

Optische Kohärenztomographie der Stimmlippe zur Diagnostik und bildgebungsgestützten Laserchirurgie

Der Fakultät Mathematik und Physik
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation

von
Dipl.-Ing. (FH) Henning Wisweh
geboren am 27.04.1979 in Hannover

2010

Referent:	Prof. Dr. Holger Lubatschowski
Korreferent:	Prof. Dr. Uwe Morgner
Tag der Promotion:	14.05.2010

Zusammenfassung

Mit konventionellen Techniken ist es bei der Stimmlippenuntersuchung oft nicht möglich, zwischen gutartigen Veränderungen, Krebsvorstufen und malignen Tumoren zu unterscheiden. Meist können die Pathologien nur nach einer Biopsieentnahme histologisch differenziert werden, die neben der Gefahr einer Stimmveränderung oder sogar einer irreversiblen Heiserkeit die üblichen Risiken einer Vollnarkose birgt. Bei der Beobachtung eines Krankheitsverlaufs sind oft wiederholte Biopsieentnahmen nötig, um zuverlässig entscheiden zu können, ob und wann eine Gewebeveränderung entartet. In der Laryngologie gibt es daher einen großen Bedarf an einer nicht-invasiven Bildgebungsmethode, die bereits beim niedergelassenen HNO-Arzt am wachen Patienten eingesetzt werden kann. Zugleich werden präzise therapeutische Verfahren gefordert, die durch Schichten respektierendes Operieren eine weitestgehende Funktionserhaltung des Kehlkopfes ermöglichen.

Die optische Kohärenztomographie (OCT) stellt aufgrund der Möglichkeit zur berührungsfreien Bestimmung quantitativer Informationen zur Gewebemorphologie einen großen Fortschritt insbesondere für die Differentialdiagnostik dar. So können optischen Biopsien zum Beispiel zur Vermessung von Schichtdicken erstellt werden, ohne Gewebe entnehmen zu müssen. Die OCT ist zudem hervorragend zur intraoperativen Kontrolle laserchirurgischer Operationen geeignet, da sie durch mikrometergenaue Referenzierung des Laser-Gewebe-Wechselwirkungsvolumens die Präzision der Laseroperation verbessern kann.

Ziel dieser Arbeit war es, die OCT als neue optische Bildgebungsmethode für die Diagnostik und in Kombination mit Femtosekundenlasern für die Therapie von Stimmlippenerkrankungen zu erproben.

Zur kontaktfreien Untersuchung am wachen Patienten wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals ein integriertes OCT-Laryngoskop entwickelt, das die Strahlengänge für OCT- und konventionelle Videolaryngoskopie in nur einem Optiksistem kollinear führt. So kann der Platzbedarf im Rachen des Patienten gegenüber Realisierungen mit zwei getrennten Endoskoprohren erheblich reduziert werden. Die kollineare Strahlführung erlaubt zudem eine synchrone Fokussierung von OCT- und Videostrahlen zur schnellen Anpassung des Arbeitsabstandes an die Anatomie des Patienten über einen sehr großen Bereich. Mit diesem System können hochaufgelöste Querschnittsbilder sowohl von der Gewebemorphologie als auch von der Dynamik der Stimmlippenschwingen bis zu einer Tiefe von 1-2 mm erstellt werden. Die quantitative Auswertung der OCT-Aufnahmen kann den untersuchenden Arzt bei der Interpretation unterstützen und auf Basis objektiver Kriterien Gewebeveränderungen automatisch klassifizieren. So wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals die grundsätzliche Eignung der schwellwertbasierten Segmentierung zur automatischen Vermessung der Epitheldicke und einer darauf basierenden Klassifizierung der OCT-Bilder gezeigt.

Dass die Anwendung von Femtosekunden-Pulsen bei der oberflächlichen und subepithelialen Manipulation von Stimmlippengewebe sehr präzise Resultate liefert und neue therapeutische Möglichkeiten eröffnet, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Auf der Basis von Laborexperimenten wurde ein OCT-gestütztes Funktionsmuster für die Mikrochirurgie an den Stimmlippen entwickelt und erstmals in einer tierexperimentellen Studie erfolgreich eingesetzt. Bei mikrometergenauer Positionierung des Laserfokus mit Hilfe der OCT-Bildgebung und richtiger Wahl der Schneidparameter entstehen durch den nichtlinearen Wechselwirkungsprozess der Photodisruption nur sehr geringe thermische und mechanische Nebenwirkungen.

Die vorliegende Arbeit hat anhand der erfolgreichen Entwicklung und Erprobung eines OCT-gestützten Laryngoskops zur Stimmlippendiagnostik und mit positiven Resultaten im Rahmen von Schlüsselerperimenten zur OCT-kontrollierten Femtosekunden-Lasermanipulation von Stimmlippengewebe wesentliche Grundlagen dieses Anwendungsgebietes erforscht. Die Ergebnisse haben die Potenziale aufgezeigt, durch den Einsatz der OCT unterstützt durch eine automatische Bildauswertung die Zahl der Biopsien und iatrogene Schädigungen zu reduzieren und die Resultate laserchirurgischer Operationen im Sinne einer weitestgehenden Funktionserhaltung des Kehlkopfes zu verbessern.

Schlagworte: Laryngoskopie, Optische Biopsie, Femtosekundenlaser, Phonochirurgie

Abstract

With conventional laryngoscopic techniques the differential diagnosis of benign changes, premalignant lesions and malign tumors is hardly possible. Mostly, biopsies are needed for a histological differentiation of lesions that bear the risk of irreversible hoarseness and other consequences of a general anesthesia. Even repetitive biopsies must be taken for monitoring the course of a suspicious lesion. Hence, there is a great need among laryngologists for a noninvasive imaging technique to be applied in awake patients without any anesthesia. Furthermore, therapeutic procedures are demanded which allow precise surgery with respect to the tissue layers in order to maintain the functional integrity of the larynx to highest extend.

Optical coherence tomography (OCT) contributes to an improvement of differential diagnosis due to the possibility of quantitative analysis of tissue morphology in non-contact measurements. OCT can provide optical biopsies to determine layer thicknesses, for example, without the need for a tissue sample. In addition, OCT is well suited for intraoperative monitoring of laser surgeries. Because it can guide the location of laser-tissue interaction within several microns there is huge potential to improve the precision of laser surgeries.

The goal of this work was to evaluate the application of OCT as a new imaging modality in laryngology for diagnostics and for therapy guidance in femtosecond laser surgeries of vocal fold changes.

For non-contact examination of awake patients an integrated OCT-based laryngoscope was developed which delivers the beams for OCT and conventional video laryngoscopy through only one optical system, for the first time. Thus, less space is demanded within the patients throat compared to setups with two separate endoscopes for both imaging modalities. The collinear beam delivery enables synchronous focusing of video and OCT beams for rapid adjustment of the working distance to the patient's anatomy over a long range. With this system high resolution cross-sectional images can be acquired up to a depth of 1-2mm. Quantitative analysis of OCT images can support the physician with the interpretation of images and automatically classify tissue pathologies based on objective criteria. Within this thesis the qualification of a segmentation algorithm based on thresholding for automatic measurements of epithelial thickness and tissue classification was investigated, for the first time.

Furthermore, it was demonstrated that fs-laser pulses allow for precise superficial and subsurface manipulation of vocal fold tissue and open up new therapeutic opportunities. An OCT-enhanced prototype for vocal fold laser microsurgery was developed based on the results of laboratory experiments and used for an animal study. It was shown that only little thermal and mechanical side effects are induced by photodisruption if the laser focus was exactly positioned and the cutting parameters were appropriately adjusted.

Within this thesis the most important basics in this field of OCT application were investigated through the development of an OCT-based laryngoscope for vocal fold diagnostics and promising results in key experiments for OCT guided fs-laser microsurgery of vocal fold tissue. The results reveal the potential of OCT supported by automatic image processing to reduce the number of biopsies and iatrogenic artifacts and to improve the the outcome of laser surgeries with respect to best possible preservation of the laryngeal functions.

Keywords: Laryngoscopy, Optical Biopsy, Femtosecond Laser, Phonosurgery

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Diagnostische Methoden in der Laryngologie	1
1.2. Mikrochirurgische Operationsverfahren	4
1.3. OCT zur Charakterisierung von Kehlkopfveränderungen	5
1.4. fs-Laser zur Therapie von Stimmlippenerkrankungen	8
2. Eigenschaften des Kehlkopfes	11
2.1. Einführung in die Anatomie und Histologie	11
2.2. Einführung in die Stimmlippenphysiologie	14
2.3. Pathologische Veränderungen der Stimmlippen Schleimhaut	15
2.4. Gewebeoptische Eigenschaften	17
3. Grundlagen der OCT	21
3.1. Kurzkohärente Interferometrie	21
3.1.1. Time Domain OCT	23
3.1.2. Frequency Domain OCT	25
3.1.3. Axiale Auflösung und Dispersion	27
3.2. Systemparameter und Einflussfaktoren der Bildqualität	29
3.2.1. Empfindlichkeit, Dynamik und Signal-zu-Rausch-Verhältnis	29
3.2.2. Speckle	31
3.2.3. Laterale Auflösung und Tiefenschärfe	33
3.2.4. Scangeschwindigkeit	34
4. Entwicklung eines Laryngoskops mit integrierter OCT-Bildgebung	37
4.1. Einführung in das Optikdesign	37
4.1.1. Einführung in das Design starrer Endoskope	37
4.1.2. Designaspekte für OCT-Applikatoren	39
4.1.3. Einführung in die OCT-Endoskopie	40
4.2. Anforderungen an das Laryngoskop	43
4.3. Einfluss von Bewegungen auf die Qualität von OCT-Aufnahmen	46
4.3.1. Einfluss des Tremors	47
4.3.2. Axiale Bewegungen	47
4.3.3. Transversale Bewegungen	56
4.4. Technische Umsetzung der Anforderungen	61
4.4.1. Optikdesign für synchrone OCT- und Videobildgebung	62
4.4.2. Auswahl und Integration eines OCT-Systems	73
4.4.3. Aufbau eines Funktionsmusters	77
4.4.4. Charakterisierung und Erprobung des Funktionsmusters	80
4.5. Diskussion	83
5. Computerassistierte Diagnose von Stimmlippenerkrankungen	87
5.1. Einführung in die computerassistierte Diagnose mit OCT	87
5.2. Erfassung und Verarbeitung klinischer OCT-Aufnahmen	91
5.2.1. Erfassung klinischer OCT-Bilder	91

5.2.2.	Vorverarbeitung	92
5.2.3.	Automatische Segmentierung	93
5.2.4.	Automatische Messung der Epitheldicke	96
5.2.5.	Leistungsfähigkeit der automatischen Segmentierung	98
5.3.	Klassifizierung	99
5.4.	Diskussion	102
6.	OCT-kontrollierte fs-Laserphonochirurgie	107
6.1.	Einführung in die fs-Laserchirurgie mittels Photodisruption	107
6.2.	Laborversuche zur Spezifizierung der Schneidparameter	108
6.2.1.	Versuchsaufbau und -durchführung	108
6.2.2.	Oberflächliche Ablation von Gewebevolumina	113
6.2.3.	Subepitheliale Mikroschnitte	115
6.3.	Aufbau eines mobilen Funktionsmusters für die Phonochirurgie	117
6.3.1.	Anforderungen	117
6.3.2.	Technische Umsetzung	118
6.3.3.	Charakterisierung	121
6.4.	Tierexperimentelle Studie zur Untersuchung der Wundheilung	123
6.4.1.	Auswahl des Tiermodells	123
6.4.2.	Ablauf der Behandlung	123
6.4.3.	Untersuchung des Wundheilungsverlaufs	124
6.4.4.	Ergebnisse	125
6.5.	Diskussion	127
7.	Wertung und Ausblick	129
	Literaturverzeichnis	137
	Anhang	154
	A. Optikdesigndaten	155
	B. Eigene Veröffentlichungen	163
	C. Lebenslauf	165
	Danksagung	167

1. Einleitung

Der Kehlkopf - in der medizinischen Fachsprache Larynx genannt - bildet als Organ des Atmungsapparates den Übergang vom Rachen, dem Pharynx, zur Luftröhre, der Trachea. Er übernimmt zwei wichtige Aufgaben. Einerseits verhindert er ein Eindringen von Speisestücken und Flüssigkeiten in die Trachea, die während des Schluckaktes vom Kehldeckel verschlossen wird. Zum anderen reguliert der Kehlkopf über die variable Öffnung der Stimmritze den Fluss der Atemluft und sorgt durch die Schwingungsfähigkeit der Schleimhaut der Stimmlippen für die Bildung der Stimme. Die Stimme hat im sozialen Alltag eine enorme Bedeutung. Sie dient der Übermittlung von Information in Form von Sprache und anderen Lauten wie Schreien, Lachen und Weinen. In vielen Berufen wie Lehrer, Politiker, Sprecher oder Callcenteragent ist ihre ungestörte Funktionsfähigkeit notwendige Voraussetzung. Außerdem wird die Singstimme aufgrund ihrer außergewöhnlich großen Bandbreite verschiedener Töne von Sängern als Musikinstrument eingesetzt [Tit08].

Phoniatrie und Pädaudiologie bilden zusammen das medizinische Fachgebiet, das sich auf die Pathophysiologie der Kommunikation gründet und für Erkrankungen und Störungen der Sprache und Sprachentwicklung, der Stimme, des Schluckens sowie für kindliche Hörstörungen zuständig ist. Die HNO-Heilkunde bildet das Teilgebiet der Medizin, das sich im weitesten Sinne mit Erkrankungen, Verletzungen, Verletzungsfolgen, Fehlbildungen und Funktionsstörungen im gesamten Kopf-Hals-Bereich, einschließlich des Kehlkopfes, befasst. Dabei basieren Phoniatrie und Pädaudiologie auf den gleichen diagnostischen und therapeutischen Grundlagen wie die HNO-Heilkunde.

Jährlich stellen sich in Deutschland ca. 20.000 Patienten mit gutartigen Stimmlippenveränderungen vor, die chirurgisch behandelt werden müssen. Gutartige Stimmlippenveränderungen sind zum Beispiel Stimmlippenknötchen, Polypen, Zysten oder Ödeme. Kehlkopfkrebs betrifft jährlich etwa 3000 Männer und 400 Frauen [Bat08]. Insgesamt gehört der Kehlkopfkrebs in Bezug auf die Sterblichkeit mit ca. 1% aller Krebstoten zu den selteneren Krebserkrankungen, ist im Kopf-Hals-Bereich aber der häufigste bösartige Tumor. Details zur Epidemiologie können der aktuellen Fachliteratur entnommen werden [Bec07, Beh09].

1.1. Diagnostische Methoden in der Laryngologie

Einer Untersuchung der klinischen Anzeichen und äußeren Abtastung des Halses schließt sich zur ersten visuellen Beurteilung des Kehlkopfes eine indirekte Laryngoskopie an, durch die eine vergröß-

berte Darstellung des Kehlkopfinneren möglich ist. Bis vor wenigen Jahren wurde bei dieser sogenannten Kehlkopfspiegelung noch ein Spiegel in den Rachen des Patienten eingeführt, über den der Kehlkopf beleuchtet und abgebildet wurde. Die heute verbreitetste Form der Laryngoskopie ist die Untersuchung mit einem starren Lupenlaryngoskop, an dessen Ende die optische Achse um 70° oder 90° umgelenkt und so eine Aufsicht auf den Kehlkopf möglich wird (Abb. 1.1). Hier können bereits

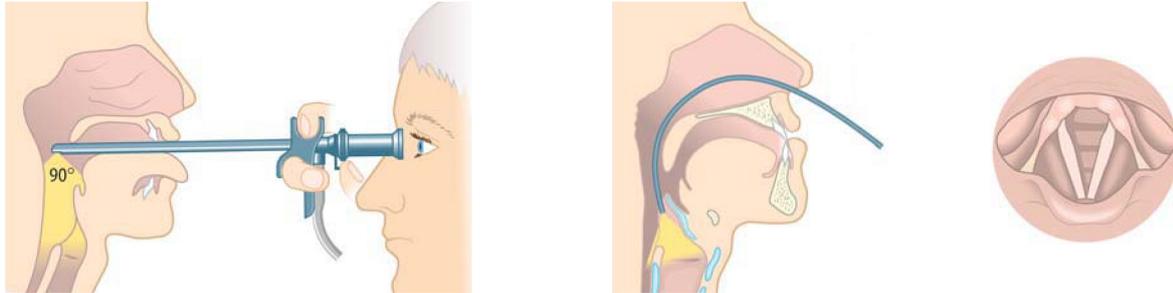


ABBILDUNG 1.1.: Verschiedene Methoden der indirekten Laryngoskopie: Untersuchung mit starrem (links) und flexiblem Laryngoskop (Mitte). Das rechte Bild zeigt die Aufsicht auf den Kehlkopf, die sich bei beiden Methoden gleicht [Boe07].

sehr gut oberflächliche Veränderungen wie Rötungen, Schwellungen, Tumorgranulationen, Fremdkörper und Bewegungseinschränkungen befundet werden. Kann der Patient nicht gut kooperieren oder ist der Würgereiz auch bei lokaler Anästhesie unüberwindbar, können als Alternative flexible Endoskope verwendet werden, die durch die Nase eingeführt werden, sogenannte Nasopharyngolaryngoskope. Diese sind häufig mit der chip-on-the-tip-Technik ausgerüstet, bei der der Kamerasensor in der Spitze des Endoskops montiert ist. Gegenüber früheren Modellen konnten dadurch Lichtstärke und Bildqualität wesentlich verbessert werden und sind in dieser Hinsicht mit starren Optiken vergleichbar [Sch08a].

Die Technik der indirekten Laryngoskopie kann mit der Stroboskopie gekoppelt werden, um die Schwingungsfähigkeit der Stimmlippen im Zusammenhang mit organischen und funktionellen Störungen zu überprüfen. Entweder durch gepulste Beleuchtung oder durch einen elektronischen Kameraschutter, der über eine Stimmaufzeichnung mit der Grundfrequenz der Stimme getriggert wird, kann ein scheinbar stehendes Bild einer bestimmten Bewegungsphase erzeugt werden. Wird die Beleuchtungs- oder Shutterfrequenz leicht variiert, können die Schwingungen in scheinbarer Zeitlupe dargestellt werden. Ohne Stroboskopie würden die Bewegungen im Laryngoskopiebild lediglich als Unschärfe des Stimmlippenrandes dargestellt. Qualitativ bessere Aufnahmen bietet die Hochgeschwindigkeitsglottographie, die Triggerungsprobleme der Stroboskopie, die durch Unregelmäßigkeiten im Schwingungsablauf entstehen, umgeht. Sie kann zuverlässige quantitative Informationen selbst bei irregulären Bewegungsabläufen liefern. Mit an Lupenlaryngoskope adaptierten Hochgeschwindigkeitskameras werden in Echtzeit bis zu 10000 Bilder/s aufgenommen. Anschließend werden die Bewegungsabläufe von einer geeigneten Software aus den Bilderserien extrahiert und quantifiziert [Sch05a, Ver09].

Weitere Methoden, die während der indirekten Laryngoskopie eingesetzt werden, können über Fluoreszenzlichtdetektion bereits präkanzeröse und kanzeröse Läsionen detektieren und so die Früherkennung von Kehlkopfkrebs signifikant verbessern [Are07b]. Die Autofluoreszenzlaryngoskopie kommt dabei vollkommen ohne Fluoreszenzfarbstoffe aus und zeigt die verdächtige Läsion bei Beleuchtung mit blauem Licht durch einen Verlust an Autofluoreszenz an. Eine Steigerung in der Fluoreszenz kann hingegen nach Gabe eines Photosensibilisators, der sich spezifisch in Tumorzellen anreichert, beobachtet werden. Das Fluoreszenzlicht bestimmter Photosensitizer können sogar in einer Tiefe bis zu 900 µm nachgewiesen werden und ermöglichen so die Detektion von oberflächlich nicht sichtbaren Veränderungen [Leu01]. Beide Fluoreszenzmethoden erlauben allerdings keine Differenzierung zwischen Dysplasiegraden, sondern lediglich eine Lokalisation und eine Abschätzung der oberflächlichen Abgrenzung der Läsion.

Bei fortbestehender Unklarheit folgt immer eine Mikrolaryngoskopie (MLS) mit optionaler Exzisionsbiopsie zur histologischen Sicherung der Diagnose. Diese Methode ist momentan der Goldstandard bei der Abklärung maligner Veränderungen der Kehlkopfschleimhaut. Bei der MLS liegt der Patient unter Vollnarkose mit überstrecktem Hals auf dem Rücken, so dass ein Operationslaryngoskop in den Rachenraum eingeführt werden kann und mittels eines Operationsmikroskopes einen geraden, bis zu 40-fach vergrößerten Blick auf den Kehlkopf ermöglicht wird (Abb. 1.2) [Kle65]. Allerdings

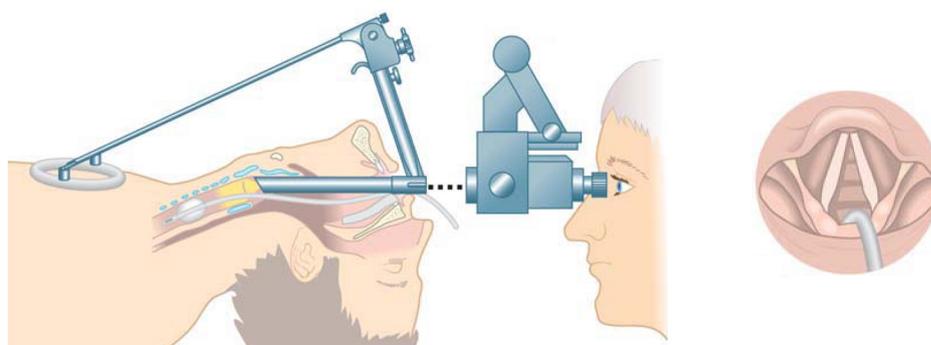


ABBILDUNG 1.2.: Untersuchung des Kehlkopfes während der Mikrolaryngoskopie: Das Operationmikroskop liefert eine vergrößerte Aufsicht (rechts) unter geradem Blick durch das auf die Brust des Patienten gestützte Operationslaryngoskop [Boe07].

ist die MLS immer ein invasiver Eingriff, der die Risiken einer Vollnarkose mit sich bringt.

Während der MLS können ergänzende endoskopische Bildgebungstechniken eingesetzt werden, um zusätzliche Informationen zum Zustand des Gewebes zu erhalten. So kann z.B. ein Kontaktendoskop für eine Darstellung oberflächlicher Zellschichten nach Anfärbung mit Metylenblau benutzt werden. Unter bis zu 150-facher Vergrößerung können Zellränder, Zytoplasma und Zellkerne hinsichtlich ihrer Dignität beurteilt werden [And95]. Einen ersten Hinweis auf die Tiefenausdehnung einer Läsion und somit eine grobe Einschätzung des Tumorstadiums liefern endoskopische Hochfrequenzultraschallgeräte, die oft mit Miniatursonden ausgerüstet sind [Are99], die allerdings für die

Detektion des reflektierten Schalls mit dem Gewebe in Kontakt gebracht werden müssen [Kra08a]. Aktuelle Geräte arbeiten mit einer Schallfrequenz im Bereich von 30 MHz und schaffen so eine axiale Auflösung von etwa 50 µm bei einer Eindringtiefe von etwa 1,5 cm. So könnten mit dieser Methode die Grenzen kleinerer Tumoren in der Tiefe bestimmt werden. Nachteil der Sonografie ist die relativ geringe laterale Auflösung von etwa 200 µm bei 30 MHz, die eine horizontale Beurteilung erschwert.

Weitere bildgebende Methoden werden zum Tumorstaging, der Abschätzung der Prognose des Patienten und der Metastasenfindung benötigt. Hier sind vor allem die Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) zu nennen, die Informationen über Lokalisation, Größe, Tiefenausdehnung und Infiltration von Nachbarstrukturen liefern. Bei der CT erstreckt sich der Untersuchungsbereich meist von der Schädelbasis bis in die Nähe des Herzens. Mit der CT lassen sich besonders gut Knochen- und Knorpelgewebe darstellen und deren Infiltration darstellen. Bei der MRT liegt das Untersuchungsvolumen ebenfalls zwischen Schädelbasis und Brust. In der MRT stellen sich Weichgewebe gut dar, Knochen- und Knorpelgewebe sind wegen dem geringen Wassergehalt kaum sichtbar. Vorteil der CT gegenüber der MRT ist die erheblich kürzere Akquisitionszeit von nur wenigen Minuten gegenüber 30-40 Minuten [Ruf05]. Konventionelle Röntgenbildgebung dient nur dem Fremdkörpernachweis, hat in der Tumordiagnostik am Kehlkopf aber keinen Wert.

1.2. Mikrochirurgische Operationsverfahren

In der Laryngologie treten mikrochirurgische Operationsverfahren immer mehr in den Vordergrund. Dabei wird nicht nur im Sinne der anatomischen Wiederherstellung operiert, sondern auch im Sinne der Funktionserhaltung, Funktionsverbesserung und Funktionswiederherstellung. Speziell werden verschiedene Verfahren, die zur Erhaltung und Verbesserung der Stimme entwickelt wurden, unter dem Oberbegriff der Phonochirurgie geführt [Wen05, Gey09]. Kleinere organische Veränderungen können ambulant mittels indirekter Mikrochirurgie unter Lokalanästhesie abgetragen werden. Die Funktion kann während des Eingriffs auditiv und visuell mittels Stroboskopie kontrolliert werden. So ist auch die Behandlung kleiner Schleimhautunregelmäßigkeiten möglich, die nur während des Schwingungsablauf erkannt werden können. Wenn beidhändiges Arbeiten erforderlich ist oder wenn Komplikationen wie Blutungen zu erwarten sind, wird die direkte Mikrochirurgie in Vollnarkose gewählt. Hier ist auch der Einsatz eines CO₂-Lasers möglich, der in der Regel an ein Operationsmikroskop gekoppelt ist und so berührungsfreies und blutarmes Operieren unter optischer Kontrolle ermöglicht.

Die Behandlung des Larynxtumors erfordert immer eine zuverlässige Resektion, möglichst aber unter Erhalt aller Kehlkopffunktionen wie Sprechen, Schlucken und Atmen. Lokalisierte Tumorstadien, die sich noch nicht auf Nachbarstrukturen ausgebreitet haben, werden fast ausschließlich laserchirurgisch behandelt [Gst98, Ilg10]. Bei fortgeschrittenen Tumoren kann neben einer Radiochemotherapie eine partielle Laryngektomie, bei Rezidiven nach Radiochemotherapie eine totale Laryngektomie,

also die komplette Resektion des Kehlkopfes, notwendig sein.

Die ständige Weiterentwicklung bildgebender Verfahren, die Abkehr von großflächigen Geweberektionen hin zu funktionserhaltenden mikrochirurgischen Techniken und ganzheitliche Rehabilitationsansätze haben die Prognose für die Patienten und die Lebensqualität nach dem Eingriff in den letzten Jahren erheblich gesteigert. Durch den Einsatz neuer hochauflösender Bildgebungsmethoden wie der optischen Kohärenztomographie (OCT) und anderer endoskopischer Mikroskopieverfahren könnten „optische Biopsien“ erstellt und Veränderungen der Kehlkopfschleimhaut noch früher erkannt werden [Ger08, Bet08, Tea09]. Wegen der hohen Ortsauflösung könnten pathologische Veränderungen auch in der Tiefe besser von gesundem Gewebe abgegrenzt werden und so eine selektivere Diagnosestellung und Therapieplanung ermöglichen. Zudem könnte die Entwicklung neuer Lasersysteme eine noch präzisere Resektion der Läsionen ermöglichen und die Operationserfolge hinsichtlich der Funktionserhaltung und der damit verbundenen Lebensqualität des Patienten weiter verbessern. Ziel dieser Arbeit soll es daher sein, die OCT als neue optische Bildgebungsmethode für die Diagnostik und in Kombination mit Femtosekundenlasern (fs-Lasern) für die Therapie von Stimmlippenerkrankungen zu erproben.

1.3. OCT zur Charakterisierung von Kehlkopfveränderungen

Die OCT hat seit ihrer ersten Veröffentlichung im Jahr 1991 Einzug in viele medizinische und auch technische Anwendungsbereiche gehalten [Hua91, Zys07, Sti07]. Vor allem in der Ophthalmologie ist sie sowohl aus klinischer als auch aus kommerzieller Sicht überaus erfolgreich und wird inzwischen in vielen Augenarztpraxen als standardmäßiges Diagnoseverfahren eingesetzt [Fuj09, Swa09]. Aber auch in anderen Anwendungsfeldern wie der Kardiologie, Gastroenterologie, Dermatologie oder Onkologie ist der Einsatz von OCT vielversprechend und auf dem Weg vom Forschungslabor in den klinischen Alltag.

Durch die Verwendung sehr breitbandiger Lichtquellen wie Femtosekundenlaser sind zelluläre Auflösungen im Bereich weniger μm möglich [Dre99a]. Standardsysteme arbeiten meist mit Superlumineszenzdioden (SLD) oder durchstimmbaren Lichtquellen und erreichen Auflösungen um $10\ \mu\text{m}$. Um eine große Eindringtiefe zu erreichen, wird in der Regel nahinfrarotes Licht verwendet, das je nach Streueigenschaften des untersuchten Gewebes einen bis zu mehrere Millimeter tiefen Einblick gewährt. So können verdächtige Gewebeveränderungen detektiert werden, die mit oberflächlichen Bildgebungsmethoden unentdeckt bleiben würden. Gegenüber anderen tiefenauflösenden Bildgebungsverfahren wie CT, MRT oder Sonographie liegt der Wert der OCT zum einen in der hohen Auflösung, zum anderen in der Möglichkeit, Bilder in Echtzeit aufzunehmen und gleichzeitig darzustellen. Zudem können die Geräte wesentlich kostengünstiger hergestellt werden und die Integration in bestehende Untersuchungsumgebungen ist meist problemlos möglich.

Da viele Organe des Körpers von außen nicht so leicht zugänglich sind wie zum Beispiel das Auge oder die Haut, wurden bereits Ende der 1990er Jahre spezielle Endoskope zur OCT-Strahlführung innerhalb von Hohlorganen entwickelt [Tea97]. Gerade durch die schnellen Entwicklungszyklen im Bereich der Mikrosystemtechnik ist die Miniaturisierung und Flexibilität der OCT-Endoskope in den letzten Jahren enorm vorangeschritten [Yaq06]. Die OCT-Endoskope werden vor allem zur Krebsdiagnose verwendet, könnten in Zukunft aber auch als optisches Hilfsmittel zur selektiveren Biopsieentnahme und zur intraoperativen Therapiekontrolle eingesetzt werden [Zar08, Sha01].

In der Laryngologie hat die OCT bisher noch nicht den Sprung in den klinischen Alltag geschafft, obwohl der klinische Wert bereits in einigen klinischen Studien gezeigt worden ist [Ter08]. Die ersten OCT-Aufnahmen von Kehlkopfgewebe wurden 1997 von der russischen Arbeitsgruppe um Sergeev publiziert [Ser97]. In dieser Arbeit wurde zunächst der Einsatz eines flexiblen endoskopischen Applikators an verschiedenen Schleimhautgeweben im Kontaktverfahren *in vivo* demonstriert. Es folgten Studien in denen OCT und Histologie gegenübergestellt und hinsichtlich der Darstellung der Morphologie verglichen wurden [Pit98, Bib04]. Die Aufnahmen erfolgten an extrahierten humanen Gewebeproben. Hier zeigte sich bereits, dass die OCT-Scans sehr gut mit der Histologie korrelieren und für eine Darstellung der oberen Gewebeschichten gut geeignet ist.

Die erste umfangreiche prospektive Studie an normalen und gutartig veränderten Kehlkopfschleimhäuten haben Wong et al. 2005 veröffentlicht [Won05]. 82 Patienten wurden unter Vollnarkose während der Mikrolaryngoskopie mit einem Handapplikator untersucht. Die Aufnahmen konnten nach Biopsieentnahme histologisch verifiziert werden. Außerdem wurden an verschiedenen Stellen im Kehlkopf die Epitheldicken aus den OCT-Aufnahmen errechnet und tabelliert. Armstrong konnte in einer weiteren prospektiven Studie zeigen, dass der Zustand der Basalmembran, also des Übergangs von Epithel zu Bindegewebe, ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal zwischen invasiven Karzinomen, Krebsvorstufen und gutartigen Läsionen ist [Arm06]. Zudem konnte er in vielen Fällen die Übergangszonen von pathologischem zu normalem Gewebe darstellen. Während MLS wurden hier bei 22 Patienten mit Kehlkopfkrebs OCT-Bilder aufgenommen und nach Biopsie mit histologischen Schnitten korreliert. Die gesamten Bilddaten (OCT, Histologie und Endoskopie) wurden hinsichtlich der Qualität, der Integrität der Basalmembran und der Erkennbarkeit typischer Mikrostrukturen von drei Experten begutachtet. Lediglich in einem Fall wurde der Zustand der Basalmembran in den OCT-Bildern falsch eingeschätzt.

In einer Zusammenarbeit des Laser Zentrum Hannover mit Kraft et al. wurde die bisher größte prospektive Studie mit insgesamt 217 benignen und malignen Veränderungen an 201 Patienten durchgeführt [Kra08b, Kra09]. Die Patienten wurden während Mikrolaryngoskope mit einem faserbasierten endoskopischen Applikator im Kontaktverfahren untersucht [Kra07]. Alle Fälle wurden auch hier nach Exzisionsbiopsie histopathologisch verifiziert. In dieser Arbeit konnte der klinische Wert in Kombination mit der Mikrolaryngoskopie anhand verschiedener Parameter statistisch belegt werden. Im Vergleich der Verdachtsdiagnosen mit den histologisch verifizierten Diagnosen war die OCT in

Kombination mit der MLS für alle 217 Fälle signifikant besser als die MLS alleine. So konnten mit OCT und MLS 89% der Läsionen richtig eingeschätzt werden, gegenüber 80% mit MLS alleine. Beim Nachweis maligner Tumoren sind keine falsch-negativen und nur sehr wenige falsch-positive Ergebnisse aufgetreten. Vor allem bei der Einschätzung der genauen Dysplasiegrade war die OCT und MLS mit 71% richtigen Diagnosen der MLS alleine mit nur 47% richtigen Einschätzungen überlegen.

Die bisher beschriebenen Kontaktverfahren haben den Nachteil, dass immer ein zusätzliches Instrument gehalten werden muss, das in der Regel die mikroskopische Aufsicht auf die zu untersuchende Region verdeckt. Zudem kann es durch den Aufdruck des Applikators auf das Gewebe zu Artefakten kommen und zum Beispiel eine Messung der Epitheldicke verfälschen. Um diese Probleme zu umgehen, wurden kürzlich unabhängig voneinander zwei Prototypen eines OCT-gekoppelten Operationsmikroskops vorgestellt, die intraoperativ eingesetzt werden können [Vok08, Jus09]. Besonders hervorzuheben sind die großen Arbeitsabstände von 230-400mm, die ein gleichzeitiges, beidhändiges Operieren durch die üblichen Operationslaryngoskope ermöglichen. Allerdings reduziert sich die laterale Auflösung gegenüber den Kontaktapplikatoren aufgrund der kleineren numerischen Apertur. In zukünftigen klinischen Studien muss gezeigt werden, ob diese Methode für die intraoperative Diagnostik geeignet ist, um zum Beispiel Biopsieentnahmen unter Berücksichtigung der Tumorgrenzen zu kontrollieren.

In den OCT-Untersuchungen während Mikrolaryngoskopie konnte bereits das Potential zur Früherkennung von Krebsvorstufen und mikroinvasiven Tumoren gezeigt werden. Da die MLS jedoch immer invasiv ist und ein gewisses Risiko für den Patienten birgt und zudem mit einem erheblichen finanziellen und organisatorischen Aufwand verbunden ist, wäre eine OCT-Untersuchung bereits beim niedergelassenen HNO-Arzt wünschenswert. Bei der Beobachtung eines Krankheitsverlaufs, sind bisher oft sogar wiederholte Biopsieentnahmen unter MLS nötig, um zu entscheiden, ob und wann eine Gewebeveränderung zu einem malignen Tumor entartet. In der Laryngologie gibt es daher einen großen Bedarf an einer nicht-invasiven Bildgebungsmethode für die Früherkennung und das Überwachen von verdächtigen Gewebeveränderungen, die bereits frühzeitig am wachen Patienten eingesetzt werden kann. So könnte möglicherweise die Zahl der Biopsien und damit das Risiko für den Patienten reduziert werden. Zudem könnte der Zeitpunkt und der Ort der Biopsieentnahme gezielter geplant werden.

Die ersten OCT-Aufnahmen während Untersuchungen am wachen Patienten wurden im Jahr 2006 von Lüerßen gezeigt [Lue06]. Ein faserbasierter OCT-Applikator wurde durch ein angepasstes Führungsrohr durch den Rachen des Patienten geführt und mit dem Stimmlippengewebe in Kontakt gebracht. OCT-Aufnahmen von normalem Stimmlippengewebe konnten hier sehr gut mit histologischen Schnitten korreliert werden. Zwei andere Ansätze verfolgen die Idee der indirekten Laryngoskopie mittels starrer und flexibler Endoskope. Guo et al. verwenden für die OCT-Strahlführung ein speziell konstruiertes Rohr, das an ein konventionelles starres Videolaryngoskop adaptiert wurde [Guo06, Guo09, Yu09]. In dieser Konfiguration mit zwei Rohren ist zwar eine OCT-Bildgebung

unter gleichzeitiger endoskopischer Übersicht möglich, allerdings wird sehr viel Raum im Rachen des Patienten benötigt. Dies könnte, gerade bei Patienten mit starkem Würgereiz, zu erheblichen Unannehmlichkeiten bis hin zu mangelnder Akzeptanz der Methode führen. Von der gleichen Arbeitsgruppe wurde außerdem ein Faserapplikator vorgestellt, der durch den Arbeitskanal eines flexiblen Nasopharyngolaryngoskops durch die Nase bis kurz über oder direkt auf das zu untersuchende Gewebe geführt wurde [Sep08]. Diese Methode umgeht zwar die optischen Einschränkungen des starren Aufbaus (großer Arbeitsabstand, kleine numerische Apertur, reduzierte laterale Auflösung), jedoch erfordert es sehr viel Geschick und Erfahrung, den Faserapplikator zu navigieren und reproduzierbar am gewünschten Ort zu positionieren. Zudem wurde der Applikator mit dem Gewebe in Kontakt gebracht, was die Akzeptanz der Methode vermindern könnte.

In Rahmen dieser Arbeit soll ein OCT-gestütztes Laryngoskop mit starrem Aufbau entwickelt werden, OCT- und Endoskopiustrahlengang sollen jedoch kollinear in lediglich einem Endoskoprohr geführt werden. So könnte der Bewegungsfreiraum im Rachen und damit die Akzeptanz des Verfahrens bei den Patienten erhöht werden. Durch die Kopplung der OCT mit einem starren Lupenlaryngoskop könnten neben endoskopischen Begutachtung zusätzliche Informationen über die Gewebebeschaffenheit der Stimmlippe unter der Oberfläche gewonnen werden, ohne einen weiteren Untersuchungsgang einzuleiten. Zudem könnten gleichzeitig funktionelle Eigenschaften wie Schwingungsamplituden und -frequenzen gemessen und direkt mit möglichen organischen Veränderungen korreliert werden.

Bei der Untersuchung von Stimmlippen könnte zudem die automatische Auswertung von OCT-Aufnahmen wertvolle Zusatzinformationen liefern, um die frühe Diagnose von malignen Veränderungen zu verbessern. Wichtige Indikatoren für Kehlkopfkrebs sind zum Beispiel die Dicke des Epithels und die Integrität der Basalmembran sein [Are07b, Kra10, Kai09]. Bisher hat noch keine Studie das Potential der automatischen Klassifikation klinischer OCT-Bilder von Kehlkopfschleimhaut untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit soll daher erstmals gezeigt werden, dass eine automatische Segmentierung, die anschließende automatische Vermessung der Epitheldicke und eine automatische Klassifizierung anhand der Intaktheit der Basalmembran möglich ist.

1.4. fs-Laser zur Therapie von Stimmlippenerkrankungen

Der Einsatz von fs-Lasern hat vor allem in verschiedenen Bereichen der Ophthalmologie zu sehr guten klinischen Ergebnissen aber auch zu finanziellem Erfolg für die Systemhersteller geführt [Gra09]. So wurden zum Beispiel bereits über eine Millionen fehlsichtige Augen im Rahmen einer fs-LASIK operiert [Abb10]. Auch für Behandlung der Presbyopie [Sch08b], für die Keratoplastik [Hol07] und die Kataraktchirurgie [Nag09] scheint der Einsatz von Femtosekundenlasern vielversprechend zu sein. In anderen Gebieten der Medizin befinden sich die Anwendungen oft noch in der Phase von Grundlagenstudien oder haben aufgrund der zu hohen Kosten der Lasersysteme nicht den Einzug in

den klinischen Alltag gefunden [Chu09].

Im Bereich der HNO sind Femtosekundenlaser aufgrund der hohen Präzision und der geringen thermischen und mechanischen Nebenwirkungen zum Beispiel für die Ablation von Hartgewebe im Innenohr zur Behandlung der Otosklerose [Arm02, Ilg06, McC09] oder im Mittelohr [Sch04, Bor06] gut geeignet. Die bisher einzige Studie zur Manipulation von Kehlkopfgewebe wurde von Weber et al. durchgeführt [Web03]. Hier wurde Epithelgewebe einer Schweinestimmlipe mit einer Pulsenergie von 350 μJ bei einer Repetitionrate von 100 Hz oberflächlich abgetragen. Die Präzision war aufgrund der schwachen Fokussierung auf einen Spot von etwa 50 μm noch gering, die Studie hat aber bereits das Potential der Femtosekundentechnologie für die Gewebeablation an den Stimmlippen demonstriert.

Lasertypen, bei denen der therapeutische Effekt durch lineare Absorption und somit durch thermische Wechselwirkung erzielt wird, sind lediglich auf den Einsatz zur oberflächlichen Photoablation beschränkt [Nie07]. Femtosekundenpulse dagegen bieten aufgrund der nichtlinearen Wechselwirkungsmechanismen die Möglichkeit, auch innerhalb des Gewebes eine Schneidwirkung zu erzielen. Unter Berücksichtigung von Streuung und linearer Absorption, die bei transparenten Medien wie dem Auge vernachlässigt werden können, ist selbst in stark streuendem Gewebe ein präziser Abtrag möglich [Sac02, She03, Tse08].

Bei der gezielten Gewebemanipulation unterhalb der Oberfläche ist die genaue Kenntnis der Schnitttiefe notwendig, um das Operationsziel mit bestmöglicher Präzision zu erreichen. Wie von unserer Arbeitsgruppe gezeigt wurde, ist die optische Kohärenztomografie als bildgebendes Verfahren sehr gut geeignet, da sie sowohl räumliche Auflösungen im Bereich der Präzision der fs-Laserchirurgie als auch eine hohe Eindringtiefe ermöglicht [Mas09]. Zudem kann mit Hilfe der OCT die zu behandelnde Region ausgewählt werden und der Operationsverlauf in situ überwacht werden [Bop99, Ohn09]. Auch zur Kontrolle von Lasereingriffen am Kehlkopf wurde die OCT bereits eingesetzt [Sha01, Tor06], jedoch wurden die Schneidapplikation und die Bildgebung jeweils mit voneinander unabhängigen Applikatoren durchgeführt.

Zur Zeit gibt es kein System, welches präzises Schneiden an der Stimmlippe mit optischer Kontrolle der Schnitttiefe ermöglicht. Der Einsatz eines fs-Lasers gekoppelt mit einer Bildgebungsmethode, würde dem Anspruch des Schichten respektierenden Operierens entsprechen. Speziell für den Einsatz in der Mikrochirurgie an der Stimmlippe wird ein Lasersystem benötigt, das eine Abtragung von Gewebe mit einer Präzision im μm -Bereich ermöglicht. Die thermisch und mechanisch induzierten Schädigungszonen sollte wenige μm nicht überschreiten, da sonst ein Schaden resultiert, der das empfindliche Schwingungsmodell der Stimmlippe zerstört. Für das optisch kontrollierte Bearbeiten von Stimmlippengewebe soll im Rahmen dieser Arbeit ein fs-Laser gekoppelt mit einem OCT-System erprobt werden.

Im Folgenden wird in Kapitel 2 zunächst in die anatomischen und physiologischen Grundlagen des Kehlkopfes sowie die für diese Arbeit relevanten pathologischen Veränderungen eingeführt. Zudem werden die optischen Gewebeeigenschaften und deren Einfluss auf die Wechselwirkung mit Licht vorgestellt.

Kapitel 3 vermittelt die grundlegenden physikalischen Zusammenhänge der optischen Kohärenztomografie. Hier werden vor allem die Einflüsse verschiedener Systemparameter auf die Abbildungsqualität hervorgehoben sowie ein Einblick in den aktuellen Stand der OCT-Technologie gegeben.

In Kapitel 4 wird die Entwicklung eines OCT-gestützten Laryngoskops für die kontaktfreie Untersuchung wacher Patienten dargestellt. Der Schwerpunkt liegt auf dem Design des optischen Systems sowie dem Aufbau und der Erprobung eines Funktionsmusters. Zudem werden mögliche Bewegungen, die während der Untersuchung auftreten können, analysiert und deren Einfluss auf die Bildqualität untersucht. Auf Basis dieser Ergebnisse kann die geeignete OCT-Messmethode für die kontaktfreie Laryngoskopie ausgewählt werden.

Das 5. Kapitel beschäftigt sich mit der computergestützten Klassifizierung pathologischer Gewebeveränderungen anhand von OCT-Aufnahmen. Es wird besonders die Entwicklung eines Algorithmus zur automatischen Segmentierung gezeigt, auf deren Grundlage der Übergang zwischen Epithel und Bindegewebe detektiert und die Epitheldicke vermessen werden kann.

Die Kopplung eines Femtosekundenlasers mit OCT für die präzise, schichtenrespektierende Mikrochirurgie an der Stimmlippe wird in Kapitel 6 behandelt. Es wird die Entwicklung eines Funktionsmusters auf Basis grundlegender Laborexperimente und dessen erfolgreicher Einsatz Rahmen einer tierexperimentellen Studie dargestellt.

Abschließend erfolgt in Kapitel 7 eine Wertung der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse und ein Ausblick auf die zukünftige Entwicklung optischer Methoden für den Einsatz in Diagnose und Therapie von Kehlkopferkrankungen.

2. Eigenschaften des Kehlkopfes

Der Kehlkopf liegt im vorderen Halsbereich und ist die Verbindung zwischen Rachenraum und Luftröhre, bildet also die Grenze zwischen oberen und unteren Atemwegen. Seine primäre biologische Funktion liegt im reflektorischen Verschluss der Luftröhre, zudem ist er maßgeblich an der Stimmbildung beteiligt. Höchstes Ziel bei der Behandlung von Kehlkopferkrankungen ist die weitestgehende Erhaltung dieser Funktionen, die jedoch eine detaillierte Kenntnis der Anatomie, Histologie und Physiologie erfordert. Daher soll in diesem Kapitel zunächst ein grundlegendes Verständnis der Anatomie und der komplexen Zusammenhänge bei der Stimmbildung vermittelt werden. Anschließend werden einige Erkrankungen des Kehlkopfes, speziell der Stimmlippen, vorgestellt, die für eine Diagnostik mittels OCT bzw. für die mikrochirurgische Therapie mit dem fs-Laser relevant sind. Außerdem werden die optischen Eigenschaften des Stimmlippengewebes betrachtet, die für Diagnose und Therapie mittels optischer Methoden von zentraler Bedeutung sind.

2.1. Einführung in die Anatomie und Histologie

Das Kehlkopfskelett besteht aus insgesamt vier Knorpeln: dem Schildknorpel (Cartilago thyroidea), dem Ringknorpel (Cartilago cricoidea), dem paarigen Stellknorpel (Cartilagine arythenoideae) und dem Kehildeckel, der Epiglottis (Abb. 2.1).

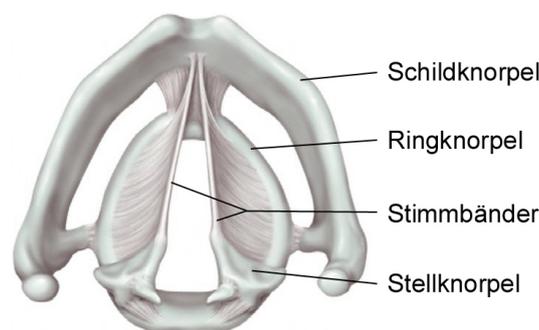


ABBILDUNG 2.1.: Aufsicht auf das Knorpelgerüst des Kehlkopfes, an dem die Stimmbänder aufgespannt sind [Sch05b].

Der Schildknorpel bildet mit seinen beiden vorne zusammenstoßenden Knorpelplatten eine Art Schutzschild. Im oberen Teil ragen die Platten hervor und stellen den Adamsapfel dar. Der Ringknorpel

bildet die Basis des Kehlkopfskelettes, er hat an oberen Seite eine Gelenkfläche zur Verbindung mit den Stellknorpeln. Sie dienen der Befestigung der Stimmbänder und können durch ihre Position die Stellung der Stimmlippen verändern. Die einzelnen Knorpel sind durch Bänder untereinander verbunden. Die Muskeln des Kehlkopfes sorgen durch ihr komplexes Zusammenspiel für das enorme Bewegungsrepertoire des Kehlkopfes. Der gesamte Innenraum des Kehlkopfes ist von Schleimhaut überzogen, die locker auf der jeweiligen Unterlage aufliegt.

In das Lumen des Kehlkopfes stülpen sich zwei paarige Falten aus, die als Begrenzungen für die verschiedenen Kehlkopfetagen gelten (Abbildung 2.2). Die Taschenfalten (*Plicae vestibulares*), auch



ABBILDUNG 2.2.: Links: Kehlkopfetagen begrenzt durch Taschenfalten und Stimmlippen. Rechts: Frontalschnitt durch die Mitte der Glottis [Sch05b].

falsche Stimmlippen genannt, grenzen den supraglottischen Raum (*Vestibulum laryngis*) nach unten ab. Hier findet sich der Kehildeckel, der die Trachea während des Schluckaktes verschließt. Der Bereich zwischen den Taschenfalten und den Stimmlippen oder Stimmfalten (*Plicae vocales*) wird Glottis genannt. Unterhalb der Stimmlippen schließt sich der subglottische Raum an, der sich bis zum Eingang der Trachea erstreckt.

Innerhalb der Glottis befindet sich beidseitig zwischen Taschenfalte und Stimmlippe eine Einsackung, der Ventrikel (*Ventriculus laryngis*). Die Öffnung zwischen den Stimmlippen wird als Stimmritze (*Rima glottidis*) bezeichnet. Sie kann durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Muskeln mit dem Knorpel- und Bänderapparat ja nach gewünschter Funktion in ihrer Stellung verändert werden.

Die Schleimhaut der Stimmlippe stellt sich histologisch als klar definierter Schichtaufbau dar. Aufgrund der starken mechanischen Beanspruchung findet sich hier ein mehrschichtiges unverhorntes Plattenepithel, das bei gesundem Gewebe zwischen 50-200 μm dick ist und bei dysplastischen Veränderungen stark verdickt sein kann [Are07a, Kra08c]. Im Epithel befinden sich in der Regel weder Gefäße noch Drüsen. Die darunterliegende Basalmembran ist eine extrazelluläre Proteinschicht, die das Epithel stabilisiert und vom Bindegewebe abgrenzt. Sie ist aufgrund ihrer Dicke von etwa 0,5-1 μm lichtmikroskopisch nicht erkennbar. Das anschließende Bindegewebe wird Lamina propria genannt, die sich in drei Schichten unterteilt: die oberflächliche, mittlere und tiefe Schicht (s. Abbildung 2.3). Die obere Schicht entspricht dem Reinke-Raum. Hier finden sich lockere, ungeord-

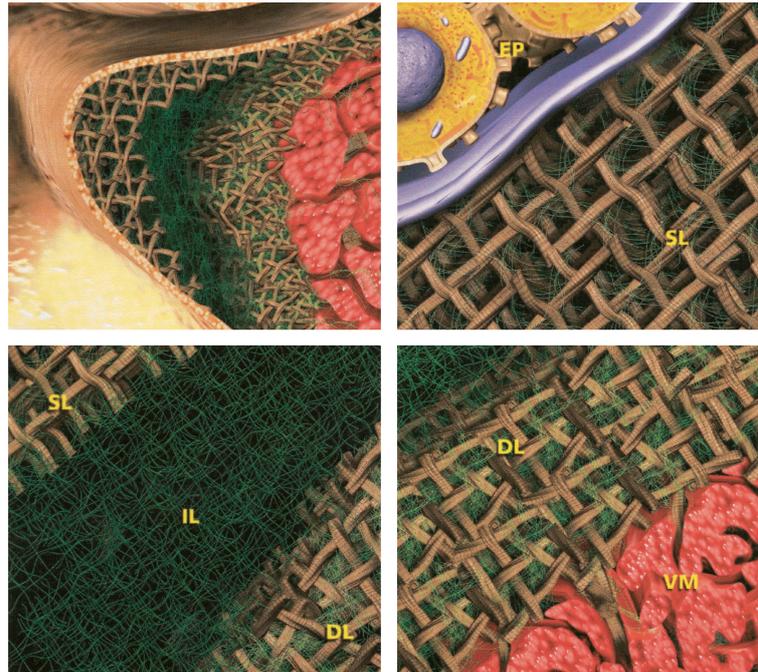


ABBILDUNG 2.3.: Kollagenverteilung und -struktur in der Lamina propria. In der oberflächlichen (SL) und tiefen Schicht (DL) finden sich vor allem dicke, netzartig angeordnete Kollagenfasern (braun), in der mittleren Schicht (IL) sind lediglich sehr feine Fasern (grün) vorhanden [Mel03]. EP=Stimmrippenepithel, VM=Stimmmuskel.

nete Elastinfasern aus stark dehnbaren Proteinen zwischen sehr festen, dicken netzartig angeordneten Kollagenfasern, die als flexibles Gerüst dienen könnten, um die Schleimhaut während der Schwingung zu stabilisieren [Mel03]. Die mittlere Schicht enthält dagegen sehr feine Kollagenfasern, die ein dreidimensionales Netzwerk bilden, jedoch nicht gebündelt sind. Dazwischen finden sich flexible Elastinfasern, Glykoproteine und Glykosaminoglycane [Sat98]. Die tiefe Schicht wird hauptsächlich durch dicke, sehr dicht vernetzte Kollagenfasern aus nicht dehnbaren Proteinen gebildet, die durch Umklammerung von Muskelfasern direkt mit dem Stimmuskel (Musculus vocalis) verbunden sind. Die mittlere und tiefe Schicht der Lamina propria werden zum Stimmband, dem Ligamentum vocale, zusammengefasst. In Tabelle 2.1 sind die Dicken der Stimmlippenschichten aufgeführt.

Schicht	Dicke [mm]
Epithel	0,05-0,2
oberflächliche Lamina propria	0,2-0,5
mittlere Lamina propria	0,5-1,5
tiefe Lamina propria	0,5-1,1
Musculus vocalis	4

TABELLE 2.1.: Dicke der einzelnen Stimmlippenschichten für gesundes Gewebe [Hir77, Kra08c].

Von Hirano stammt die Idee, die einzelnen Schichten der Stimmlippe systematisch zu gruppieren [Hir81]. In seinem Body-Cover-Modell teilt er die fünf Schichten in drei funktionelle Gruppen ein: das Epithel und die obere Schicht der Lamina propria, der Rinne-Raum, bilden das Cover, das Stimmband entspricht der Übergangsschicht (Transition) und der Body ist schließlich der Musculus vocalis. Selbst irreguläre Stimmlippenschwingungen können mit Hilfe des Body-Cover-Modells erklärt werden. Die genaue Physiologie der Stimmlippe wird im folgenden Abschnitt näher erläutert.

2.2. Einführung in die Stimmlippenphysiologie

Die Stimmlippenschwingungen sind komplexe, nichtlineare Bewegungen mit horizontalen und vertikalen Komponenten. Den Antrieb für die periodischen Vibrationen bildet der Atemluftstrom, der aufgrund eines Druckunterschiedes zwischen Trachea und Mundöffnung entsteht. Die Wechselwirkung zwischen Atemluft und den Stimmlippen als Verengungsstelle im Strömungssystem führt zu einer periodischen Schwingung dieser Verengungsstelle, d.h. es wird Energie aus dem Luftstrom auf das schwingungsfähige System übertragen. Neben dem Bernouilli-Effekt tragen weitere Modelle zum Verständnis des periodischen Verschlusses der Stimmritze bei [Pro04]. Zum Beispiel betrachtet das Zwei-Massen-Modell die Stimmlippe als zwei elastisch miteinander gekoppelte Massen, deren Schwingung eine Dämpfung erfährt [Ish72]. So stellt sich Hirano die Stimmlippen bildlich aus einem Körper mit großer Masse (Body) vor, der in einen Mantel kleiner Masse (Cover) eingehüllt ist (siehe Kapitel 2.1). Das elastische Bindegewebe der Lamina propria koppelt beide Massen. Diese Vorstellung mit Hilfe des Body-Cover-Modells ist inzwischen weithin anerkannt und erklärt die sogenannte Randkantenverschiebung, ein ellipsenförmiges Abrollen der Schleimhaut gegenüber dem Muskel. Die einzelnen Gewebeschichten beteiligen sich dabei je nach Spannungszustand der Stimmlippen unterschiedlich am Bewegungsablauf. Die Frequenz der angeregten Schwingung ist abhängig von Masse, Reibung und Elastizität der beteiligten Strukturen.

Horizontale Bewegungen und Schwingungsfrequenzen können auch bei Irregularitäten mittels Hochgeschwindigkeitsglottographie und Videokymographie visualisiert werden und sind daher hinreichend bekannt. Typische Grundfrequenzen liegen bei Frauen im Bereich von 220-250 Hz und bei Männern im Bereich von 110-140 Hz [Pro04]. Amplituden für die vertikale Bewegungskomponente konnten dagegen nur in sehr wenigen Arbeiten mittels Lasertriangulation erfolgreich dargestellt und quantitativ ausgewertet werden [Man01, Lar04, Geo08]. Die ersten Resultate zeigen, dass typische Schwingungsamplituden bei 1-2 mm liegen.

Im Falle pathologischer Veränderungen des Stimmlippengewebes kann es zu Irregularitäten im Bewegungsablauf kommen, die mit Hilfe der oben beschriebenen Verfahren detektiert werden könnten. Im folgenden Abschnitt werden die Erkrankungen der Stimmlippenschleimhaut im Einzelnen beschrieben.

2.3. Pathologische Veränderungen der Stimmlippenschleimhaut

Für die hier untersuchten Methoden kommen vor allem die benignen und malignen Tumore auf bzw. innerhalb der Stimmlippenschleimhaut in Betracht. Zudem spielen einige entzündliche Erkrankungen als Ursache und in der Differenzialdiagnose bestimmter Tumoren eine wichtige Rolle. Ein Tumor ist per Definition zunächst eine umschriebene Zunahme des Gewebevolumens, die durch fehlreguliertes Zellwachstum entsteht. Der Begriff enthält jedoch noch keine Aussage über die Dignität, also die Gut- oder Bösartigkeit der Neubildung.

Zu den gutartigen Tumoren der Stimmlippenschleimhaut zählen beispielsweise Stimmlippenknötchen, Stimmlippenpolypen und Reinke-Ödeme, die alle auf einer Zunahme der extrazellulären Matrix im Reinke-Raum beruhen [Wen05]. Sie entstehen meist durch Stimmüberlastung und zusätzliche Faktoren wie Rauchen. Bei den **Stimmlippenknötchen** handelt es sich um einander gegenüberliegende Verdickungen des Stimmlippenrandes meist am Ort der größten Schwingungamplitude auf beiden Stimmlippen. Das Epithel dehnt sich über der Schwellung im Reinke-Raum und ist zudem teilweise verdickt. Der **Stimmlippenpolyp** ist eine in der Regel einseitige geschwulstartige Schleimhautverdickung, bei der das Epithel jedoch unverändert bleibt. **Reinke-Ödeme** sind gallertige Ansammlungen von Flüssigkeiten. Das Epithel wird bei starker Ausdehnung dünn und brüchig, das subepitheliale Bindegewebe kann unterschiedliche, inhomogene Strukturen aufweisen. Ein weitere gutartige tumoröse Verdickung der Schleimhaut ist die **Stimmlippenzyste**. Durch einen Verschluss von Ausführungsgängen kleiner Schleimdrüsen kommt es zur Bildung eines schleimgefüllten Gewebehohlraums, der von einem inneren Epithel ausgekleidet ist. Das äußere Epithel bleibt in der Regel unverändert. Ein Tumor ohne eine Reaktion auf einen entzündlichen Reiz ist das **Papillom**, das sich nach Infektion mit humanen Papillomaviren bildet. Es handelt sich um zottenförmige Geschwülste mit starker oberflächlicher Verhornung und leicht verbreitertem Epithel. Bei Verdacht müssen Papillome histologisch verifiziert werden, da es in 20 % aller Fälle zu einer malignen Entartung kommt. Aus diesem Grund wird das Papillom oft auch als Präkanzerose, also als Krebsvorstufe bezeichnet. Zudem ist es aufgrund der oft nicht klar abzugrenzenden Basalmembran differentialdiagnostisch mit einem Karzinom zu verwechseln.

Unter den entzündlichen Erkrankungen sind vor allem die chronische Laryngitis und Granulome relevant. Die **chronische Laryngitis** ist eine über einen langen Zeitraum verlaufende Entzündung der Schleimhaut mit lang andauernder Heiserkeit, Rausperzwang und Reizhusten. Die Entzündung geht mit morphologischen Veränderungen der Epithelzellen (Dysplasie) einher, daher besteht ein erhöhtes Risiko für maligne Entartungen. **Granulome** sind knotenartige, entzündliche Veränderungen der Schleimhaut mit zum Teil enormen Ausmaßen, die meist im hinteren Bereich der Stimmlippen auftreten. Trotz fehlender Basalmembran können sie dadurch gut vom Karzinom unterschieden werden, das nur selten im hinteren Bereich zu finden ist. Man unterscheidet zwischen Kontaktgranulomen, die durch chronische Stimmüberlastung entstehen, und Intubationsgranulomen, deren Ursache Ver-

letzungen der Schleimhaut bei der Intubation sind. Beide bestehen meist aus Granulationsgewebe ohne Epithelüberzug, Kontaktgranulome können jedoch im Zuge von Vernarbungen ein Epithel aufweisen.

Alle Epithelerkrankungen, aus denen ein Karzinom entstehen kann, nennt man **Präkanzerosen**. Äußere Ursachen wie Tabakrauch führen eine Epithelschädigung herbei, die bei fortdauernder Einwirkung die Wahrscheinlichkeit für eine maligne Entartung erhöhen. Abbildung 2.4 zeigt die verschiedenen möglichen Zustände des Stimmlippenepithels bei der Krebsentstehung. Nach WHO-Klassifikation unterscheidet man zwischen vier verschiedenen Stufen einer Epitheldysplasie, wobei der Begriff Dysplasie dabei zunächst nur bedeutet, dass es sich um eine Abweichung von der normalen Struktur handelt, er sagt aber noch nichts über die Dignität der Veränderung aus. Histopathologisch

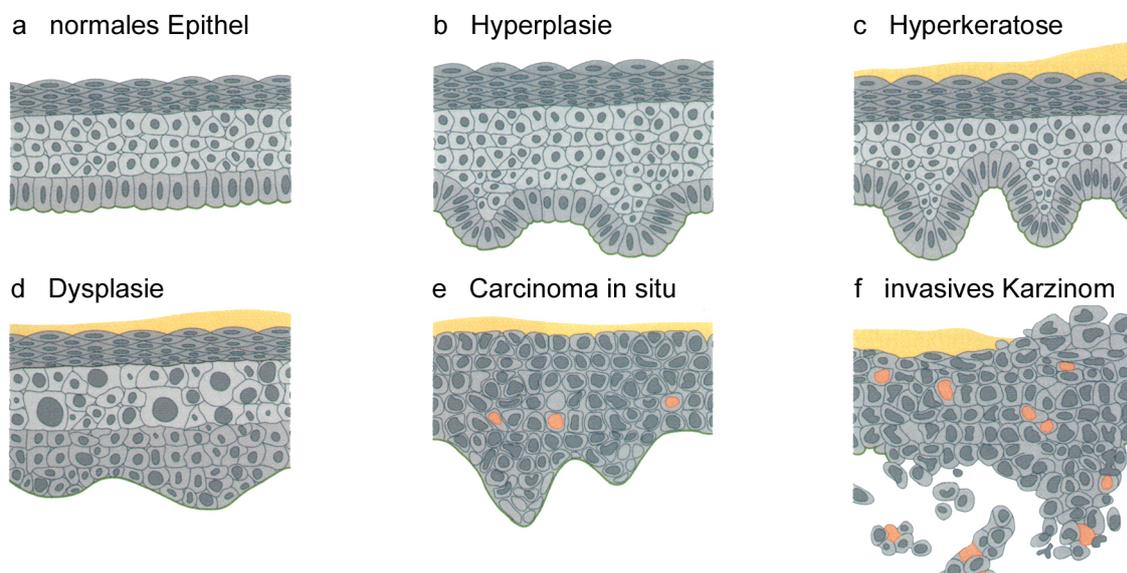


ABBILDUNG 2.4.: Verschiedene Zustände des Plattenepithels während der Karzinomentstehung [Pro04].

wird zwischen Hyperplasie, gering-, mittel- und hochgradiger Dysplasie entschieden. Bei der einfachen Hyperplasie liegt eine Verbreiterung des Epithels ohne Veränderung der normalen Schichtung und Struktur vor. Bei den verschiedenen Dysplasiegraden kommt es hingegen zu unterschiedlich stark ausgeprägten Unregelmäßigkeiten in der Schichtstruktur, zu Zellkernatypien und zu einer Verbreiterung des Epithels [Kal85, Cör97, Kra08c]. Der Dysplasiegrad gibt einen Hinweis auf die Wahrscheinlichkeit einer malignen Entartung. Insgesamt entwickeln sich etwa 10 % der Dysplasien zu invasiven Karzinomen [Wen05]. Ein wichtiger diagnostischer Schritt ist daher die Unterscheidung von Dysplasie und beginnender maligner Entartung in Form eines **Carcinoma in situ**. Bisher ist dies nur nach Biopsieentnahme möglich. Hochgradige Dysplasien erfordern zudem aufgrund ihres hohen Entartungsrisikos regelmäßige Kontrollen in kurzen Abständen. Abbildung 2.5 zeigt die Wahrscheinlichkeiten für die Entstehung und die Rückbildung der verschiedenen dysplastischen Veränderungen. Ab der schweren Dysplasie kommt es im Verlauf immer zu einer Entartung, d.h. der Prozess ist an

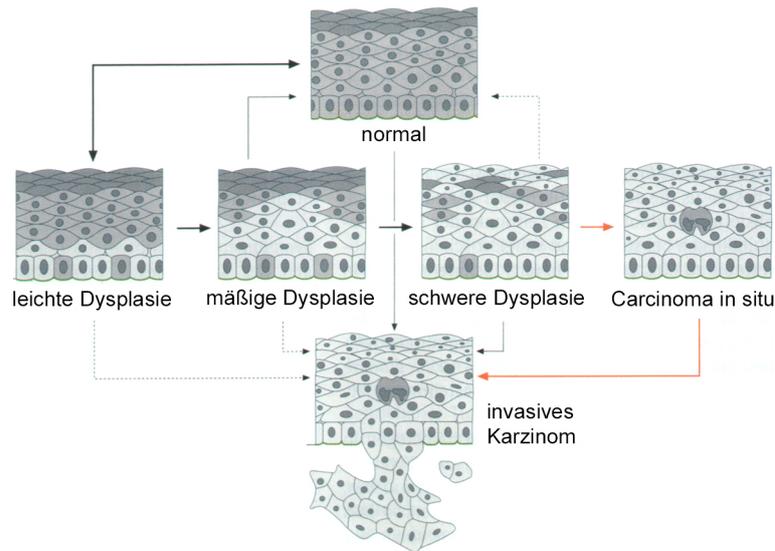


ABBILDUNG 2.5.: Die unterschiedliche Strichstärke der Pfeile zeigt die Wahrscheinlichkeiten für die verschiedenen Entwicklungsrichtungen der Epitheldysplasien. Ab der schweren Dysplasie ist der Prozess irreversibel [Pro04].

dieser Stelle unumkehrbar. Die Integrität der Basalmembran ist dabei ein eindeutiger Nachweis für die Invasivität. Im Falle eines invasiven Karzinoms ist sie stets durchbrochen und das subepitheliale Bindegewebe wird infiltriert. Das invasive **Stimmrippenkarzinom** kann sich prinzipiell aus allen Graden der Epitheldysplasie entwickeln. Im Rahmen einer Mikrolaryngoskopie erfolgt die genaue Feststellung der Tumorgrenzen, zur Verifizierung der Tiefenausdehnung können CT und MRT, in naher Zukunft aber auch hochauflösendere bildgebende Verfahren wie die OCT, sehr hilfreich sein.

2.4. Gewebeoptische Eigenschaften

Die Lichtausbreitung innerhalb von biologischen Geweben wird von den Streu- und Absorptionseigenschaften der Bausteine wie Zellen, Zellorganellen und verschiedenen Faserstrukturen bestimmt. Die Größe, Form und Dichte dieser Strukturen sowie ihr Brechungsindex relativ zu dem des Zellplasmas bzw. der Grundsubstanz in der extrazellulären Matrix sind dabei die entscheidenden Parameter. Theoretisch kann man einzelne Gewebeschichten als Ensembles von Streu- bzw. Absorptionszentren betrachten. Häufig machen jedoch komplexe inhomogene Gewebestrukturen mit verschiedenen Größen und Formen der Bestandteile die exakte analytische Beschreibung unmöglich.

Die Streuung an sphärischen Teilchen kann mit Hilfe der Mie-Theorie verstanden werden [Bor99], die sowohl die Mie- als auch die Rayleigh-Streuung beinhaltet. Für Streuzentren, die in der Größenordnung der Wellenlänge liegen, wird die Theorie der Mie-Streuung verwendet, sind die Partikel viel kleiner als die Wellenlänge, liefert die Theorie der Rayleigh-Streuung exaktere Ergebnisse. Im anderen Extremfall, wenn die Streuzentren viel größer als die Wellenlänge sind, kann man die Streuung

mit geometrischer Optik berechnen. Grundsätzlich beruhen Streuprozesse immer auf Brechungsindexunterschieden zwischen den beteiligten Medien [Tuc07].

In Zellverbänden wie dem Epithel der Stimmlippe tragen hauptsächlich die Zellkerne aber auch andere Zellorganellen wie Mitochondrien und deren Substrukturen aufgrund der Brechungsindexunterschiede zu den umgebenden Medien zur Streuung bei [Dre99b]. Da die Zellorganellen als heterogene Strukturen betrachtet werden müssen, liefert die Mie-Theorie keine exakte Beschreibung. Hier ist die Vorstellung der Zellen und deren Organellen als Kontinuum von Brechungsindexschwankungen besser geeignet als die Betrachtung einzelner sphärischer Partikel mit diskretem Brechungsindex [Mou00]. Dabei ist die Intensität des gestreuten Lichts anhängig vom Volumenanteil der Zellorganellen, deren Brechungsindizes und der Wellenlänge des eingestrahlt Lichts. Mit steigender Frequenz der Brechungsindexschwankungen nimmt auch die Intensität des zurückgestreuten Lichts zu [Dre99b].

Im Falle von Bindegewebe mit faserigen Strukturen haben die Streuzentren eher die Form langer Zylinder. Die Lamina propria der Stimmlippe besteht aus unterschiedlich dicht vernetzten Kollagen- und Elastinfasern, die ultrastrukturell aus Mikrofibrillen mit Durchmessern von 10-400 nm aufgebaut und bis zu einige Millimeter lang sind [Tuc07]. Auch hier sind die substrukturellen Brechungsindexschwankungen durch Querstreifung und Zwischenräume mit extrazellulärer Flüssigkeit für die Streuung verantwortlich. Im Vergleich zu den Zellschichten des Epithels ist die Intensität des zurückgestreuten Lichts aus dem Bindegewebe für gesundes Gewebe deutlich größer [Dre99b].

Bei dysplastischen Veränderungen des Epithels nimmt die Zahl und die Größe der Zellkerne stark zu, so dass die Intensität des zurückgestreuten Licht aus dem Epithel ebenfalls steigt [Ari03]. Gegenüber dem gesunden Gewebe, bei dem die Streuung aus dem Epithel geringer ist als aus dem Bindegewebe, kann daher z.B. bei hochgradigen Dysplasien der Kontrast zwischen beiden Schichten so gering sein, dass eine Unterscheidung allein über die Intensität des zurückgestreuten Lichts nicht mehr möglich ist.

Die Lichtverteilung im Gewebe ist im Allgemeinen durch Mehrfachstreuung dominiert, die mittlere Zahl der Streuprozesse pro Weglänge ist durch den Streukoeffizienten gegeben:

$$\mu_s = \rho_s \cdot \sigma_s, \quad (2.1)$$

wobei ρ_s die Partikeldichte pro Volumen und σ_s den effektiven Streuquerschnitt angibt. Ist zusätzlich auch noch der Absorptionskoeffizient μ_a bekannt, der in analoger Weise die Absorption im Gewebe charakterisiert, kann über die Summe der Extinktionskoeffizient μ_t berechnet werden:

$$\mu_t = \mu_s + \mu_a. \quad (2.2)$$

Für melanin- und hämoglobinfreies biologisches Gewebe liegt der Streukoeffizient für nahinfrarote Wellenlängen in der Regel mindestens eine Größenordnung über dem Absorptionskoeffizienten. Mahlstedt et al. haben beide Koeffizienten für gesundes und pathologisches Stimmlippengewebe in

einem Wellenlängenbereich von 400-2200 nm gemessen [Mah01]. Abbildung 2.6 zeigt den Verlauf des Streu- und Absorptionskoeffizienten in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Allerdings handelt es

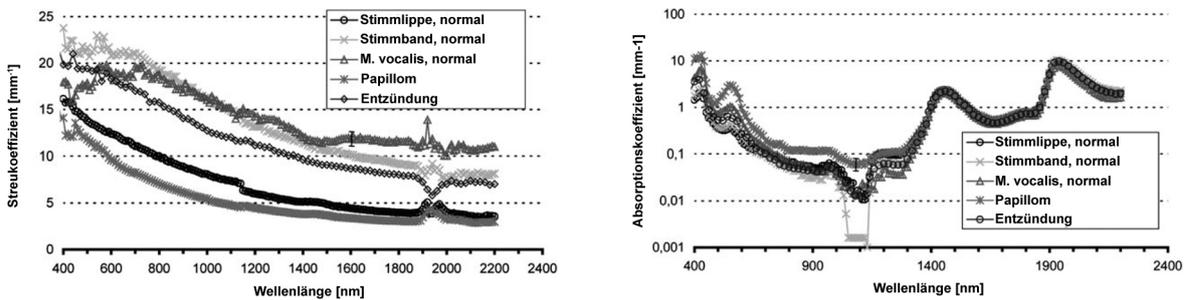


ABBILDUNG 2.6.: Streu- (links) und Absorptionskoeffizient (rechts) in Abhängigkeit von der Wellenlänge für verschiedene Stimmlippengewebe (nach [Mah01]).

sich hier um eine Pilotstudie, bei der für jeden Gewebezustand lediglich eine Probe untersucht wurde, so dass die Werte aufgrund der großen systematischen Fehler von 10-20% nur bedingt aussagekräftig sind. Jedoch zeigen die Graphen für alle Proben einen ähnlichen Verlauf, der typisch für biologisches Gewebe ist. Zudem konnten sie den Anisotropiefaktor g bestimmen, der als Mittelwert des Cosinus des Streuwinkels einen Hinweis auf die Winkelverteilung des gestreuten Lichtes gibt (Abb. 2.7). Für

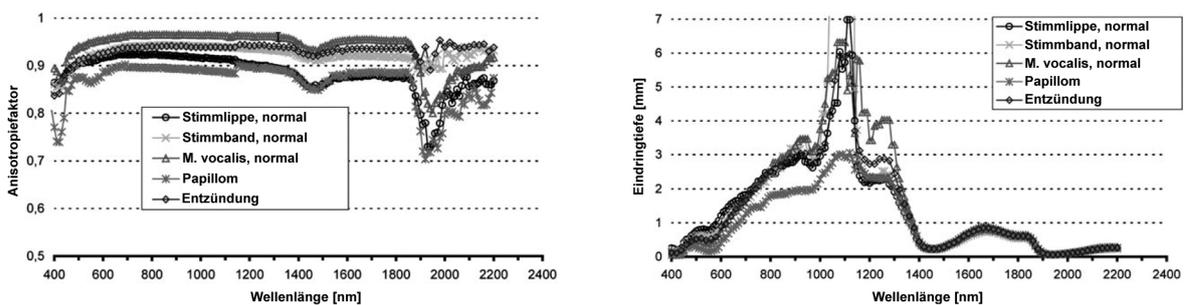


ABBILDUNG 2.7.: Anisotropiefaktor (links) und optische Eindringtiefe (rechts) in Abhängigkeit von der Wellenlänge für verschiedene Stimmlippengewebe (nach [Mah01]).

$g > 0$ dominiert die Vorwärtsstreuung, für $g < 0$ die Rückstreuung, für $g = 0$ handelt es sich um isotrope Streuung. Für Stimmlippengewebe dominiert mit Werten von $g = 0,9-0,95$ die Vorwärtsstreuung. Mit dem Anisotropiefaktor g lässt sich der reduzierte Struoeffizient $\mu'_s = \mu_s(1 - g)$ angeben. Die mittlere freie Weglänge l , also die mittlere Wegstrecke, die ein Photon zurücklegt, bis es gestreut oder absorbiert wird, kann durch

$$l = (\mu'_s + \mu_a)^{-1} \quad (2.3)$$

berechnet werden [Nie07]. Für die OCT ist die optische Eindringtiefe δ eine wichtige Kenngröße. Erklärt man die Lichtabschwächung mit dem Lambert-Beerschen Gesetz, das streng genommen nur bei dominierender Absorption gilt ($\mu_a \gg \mu'_s$), ist die einfallende Lichtintensität bei δ auf $1/e$ abgefallen

Gewebe	λ [nm]	μ_s [mm ⁻¹]	μ_a [mm ⁻¹]	g	n	Referenz
Stimmlippenepithel	532	14	0,7	0,90	1,55	[FV08]
(normal)	1064	7	0,05	0,91	1,55	[FV08]
Lamina propria	532	14	0,7	0,90	1,37	[FV08]
(oberflächlich)	1064	7	0,05	0,91	1,37	[FV08]
(Stimmband)	532	22	0,7	0,90	1,37	[Mah01, FV08]
	1064	15	0,05	0,91	1,37	[Mah01, FV08]
	1300	12	0,12	0,93		[Mah01]
M. vocalis	532	19	1,0	0,90	1,37	[Mah01, FV08]
	1064	16	0,04	0,92	1,37	[Mah01, FV08]
	1300	12	0,12	0,95		[Mah01]
Epithel Mund (normal)	850	27				[Cla04]
(Dysplasie)	850	39				[Cla04]
(Karzinom)	850	60				[Cla04]

TABELLE 2.2.: Optische Eigenschaften verschiedener Gewebearten in Kehlkopf und Mundhöhle.

[Nie07]. δ steht in direktem Zusammenhang mit l und wird durch

$$\delta = \sqrt{\frac{1}{3\mu_a(\mu'_s + \mu_a)}} \quad (2.4)$$

in mm⁻¹ angegeben [Jac98]. Für Stimmlippenepithel liegt die optische Eindringtiefe bei typischen OCT-Wellenlängen im Bereich von 2-3 mm (siehe Abbildung 2.7) und ist damit ausreichend für die Darstellung der Stimmlippenschleimhaut.

In Tabelle 2.2 sind nocheinmal alle bekannten optischen Eigenschaften von Stimmlippenepithel aufgeführt. Zum Vergleich sind außerdem Werte für das Plattenepithel im Mundraum gezeigt, an denen die Zunahme des Streukoeffizienten mit steigender Malignität verdeutlicht wird [Cla04].

3. Grundlagen der OCT

Die OCT beruht auf dem Prinzip der Weißlichtinterferometrie, das die Interferenz von breitbandigem, kurzkohärentem Licht für die berührungslose Messung axialer Distanzen ausnutzt. Licht, das aus dem Gewebe zurückgestreut bzw. zurückreflektiert wird, wird mit Licht aus einer Verzögerungsstrecke, dem Referenzarm, korreliert und in der Laufzeit verglichen. Interferenz tritt nur auf, wenn sich die Länge beider Interferometerarme um nicht mehr als die Kohärenzlänge der Lichtquelle voneinander unterscheiden. Je kürzer die Kohärenzlänge, also je breiter das Spektrum der Lichtquelle ist, desto besser ist die axiale Auflösung. Genau dieses Prinzip zeichnet die OCT gegenüber anderen mikroskopischen Verfahren aus: die axiale Auflösung ist von der lateralen Auflösung entkoppelt und somit nicht durch die numerische Apertur der fokussierenden Optik beschränkt. Typische Auflösungen liegen im Bereich von 1-15 μm bei Eindringtiefen von 1-3 mm, je nach Wellenlänge und Bandbreite der Lichtquelle. OCT-Systeme können mit kostengünstigen ASE-Lichtquellen (*amplified spontaneous emission*) wie Superlumineszenzdiode (SLD) betrieben werden, ohne dass zwangsläufig Femtosekundenlaser benötigt werden, um die große spektrale Bandbreite zu erreichen [Fuj08].

In diesem Kapitel werden die Grundlagen der Interferenz mit kurzkohärentem Licht behandelt, die für das Verständnis der Entstehung von OCT-Bildern notwendig sind. Dabei wird auf die speziellen Eigenschaften der verschiedenen OCT-Messmethoden (Time Domain OCT und Frequency Domain OCT) eingegangen und die Unterschiede hinsichtlich Bildentstehung, Bildqualität und Leistungsmerkmalen dargestellt.

3.1. Kurzkohärente Interferometrie

Die einfachste Erklärung des grundlegenden Funktionsprinzips der OCT ist mit Hilfe des Michelson-Interferometers möglich (siehe Abbildung 3.1) [Iza08]. Eine breitbandige, polychromatische Lichtquelle beleuchtet das Interferometer mit ebenen Wellen der Form $E_i = s(k, \omega) e^{i(kz - \omega t)}$, wobei $s(k, \omega)$ die Amplitude des elektrischen Feldes als Funktion der Wellenzahl $k = 2\pi/\lambda$ und der Kreisfrequenz $\omega = 2\pi\nu$ darstellt, die den räumlichen und zeitlichen Frequenzen jeder spektralen Komponente des Feldes entsprechen. Ein Strahlteiler, der als achromatisch angenommen wird, teilt die Wellen gleichermaßen in Proben- und Referenzzweige auf. Im Referenzarm wird die Referenzzweige von einem Spiegel mit der Reflektivität $R_R = |r_R|^2$ zurückgeworfen, der im Abstand z_R vom Strahlteiler aufgestellt ist. Die Probenreflektivität $r_P(z_P)$ ist dagegen abhängig von den Eigenschaften der Probe an

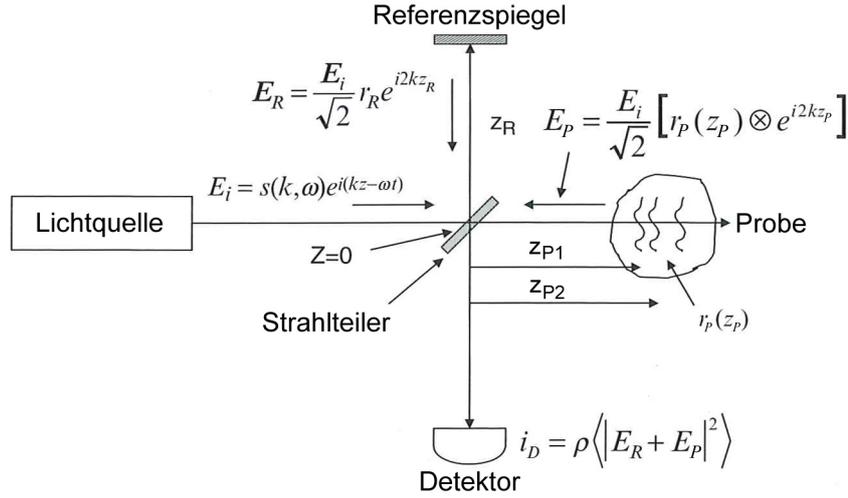


ABBILDUNG 3.1.: Michelson-Interferometer für die kurzkohärente Interferometrie (nach [Iza08]).

verschiedenen Positionen z_P entlang der Ausbreitungsrichtung. In Realität ist der Verlauf des Reflexivitätsprofils kontinuierlich, der Anschaulichkeit halber werden jedoch eine Reihe von diskreten Reflexionen der Form $r_P = \sum_n r_{Pn} \delta(z_P - z_{Pn})$ angenommen. Die r_{Pn} entsprechen den Reflexionkoeffizienten bezogen auf das elektrische Feld im jeweiligen Abstand z_{Pn} vom Strahlteiler. Bezogen auf die Intensität werden sie durch $R_{Pn} = |r_{Pn}|^2$ angegeben.

Die Probenwelle hat nach Durchlaufen des Probenarms die Form

$$E_P = \frac{E_i}{\sqrt{2}} [r_P(z_P) \otimes e^{i2kz_P}] = \frac{E_i}{\sqrt{2}} \sum_n r_{Pn} e^{i2kz_{Pn}}, \quad (3.1)$$

das heißt die einfallende ebene Welle wird mit den Reflexionskoeffizienten gefaltet (\otimes). Der Faktor 2 in der e-Funktion entsteht durch den doppelten Durchlauf des Probenarms. Die Referenzwelle hat eine ähnliche Form:

$$E_R = \frac{E_i}{\sqrt{2}} r_R e^{i2kz_R}. \quad (3.2)$$

Nach Passieren des Strahlteilers wird entsprechend der Superposition beider Wellen am Detektor eine Intensität I_D gemessen:

$$\begin{aligned} I_D(k, \omega) &= \frac{\rho}{2} \langle |E_R + E_P|^2 \rangle = \frac{\rho}{2} \langle |(E_R + E_P)(E_R + E_P)^*| \rangle \\ &= \frac{\rho}{2} \left\langle \left| \frac{s(k, \omega)}{\sqrt{2}} r_R e^{i(2kz_R - \omega t)} + \frac{s(k, \omega)}{\sqrt{2}} \sum_n r_{Pn} e^{i(2kz_{Pn} - \omega t)} \right|^2 \right\rangle. \end{aligned} \quad (3.3)$$

Per Definition entspricht die Intensität der zeitlichen Mittelung der senkrecht zur Oberfläche stehenden Komponente des Poynting-Vektors $\vec{S} = \vec{E} \times \vec{H}$ über die Belichtungszeit des Detektors, repräsentiert durch die Klammern $\langle \rangle$ [Mes08]. Für ebene Wellen liegt der elektrische Feldstärkevektor \vec{E} parallel zum Wellenvektor, so dass gilt: $I \equiv \langle \vec{S} \rangle = \frac{1}{2} \epsilon_0 n^2 \langle \vec{E}^2 \rangle$, mit der elektrischen Feldkonstante ϵ_0 und dem Brechungsindex des Ausbreitungsmediums n [Bre06]. ρ entspricht der spektralen Empfindlichkeit des Detektors.

Durch Auflösen des Betragsquadrates in (3.3) entfallen die von der Kreisfrequenz ω abhängigen Terme und nach Anwendung der eulerschen Identität ergibt sich folgende Gleichung für die gemessene Intensität:

$$\begin{aligned}
 I_D(k) &= \frac{\rho}{4} [S(k) [R_R + R_{P1} + R_{P2} + \dots + R_{Pn}]] && \text{DC-Terme} \\
 &+ \frac{\rho}{2} \left[S(k) \sum_n \sqrt{R_R R_{Pn}} \cos [2k(z_R - z_{Pn})] \right] && \text{Kreuzkorrelationsterme} \\
 &+ \frac{\rho}{2} \left[S(k) \sum_{n \neq m} \sqrt{R_{Pn} R_{Pm}} \cos [2k(z_{Pn} - z_{Pm})] \right] && \text{Autokorrelationsterme}
 \end{aligned} \tag{3.4}$$

Hier wurde $S(k) = \langle |s(k, \omega)|^2 \rangle$ substituiert, das dem Leistungsdichtespektrum der Lichtquelle entspricht. Der Einfachheit halber wird ein gaußförmiges Spektrum angenommen, das viele Lichtquellen, die in der OCT verwendet werden, näherungsweise gut beschreibt. Nach dem Wiener-Chintchin-Theorem sind das normierte Leistungsdichtespektrum S_k und die zeitliche Kohärenzfunktion der Lichtquelle $\gamma(z)$ über die Fouriertransformation miteinander verknüpft:

$$\gamma(z) = e^{-z^2 \Delta k^2} \xleftrightarrow{FT} S(k) = \frac{1}{\Delta k \sqrt{\pi}} e^{-\left[\frac{(k-k_0)}{\Delta k}\right]^2}. \tag{3.5}$$

k_0 ist die Zentralwellenzahl und Δk die spektrale Bandbreite der Lichtquelle, angegeben als halbe Breite bei $1/e$. Die volle Halbwertsbreite (FWHM) der Kohärenzfunktion wird Kohärenzlänge l_c genannt. Sie ist ein gutes Maß für die Punktspreizfunktion (engl. *point spread function*), also die axiale Auflösung eines OCT-Systems (siehe Kapitel 3.2). Gleichung (3.5) verdeutlicht, dass die Kohärenzlänge bei steigender Bandbreite Δk immer schmaler wird und sich somit das axiale Auflösungsvermögen verbessert.

Die drei Terme des Photostroms haben unterschiedliche Bedeutungen. Die DC-Terme in (3.4) entsprechen einem Offset, dessen Amplitude proportional der Summe der Referenzarm- und Probenarmreflektivitäten und mit dem Leistungsdichtespektrum der Lichtquelle skaliert ist. Sie machen den größten Teil des Photostroms aus. Der Kreuzkorrelationsterm ist für jeden Probenreflektor r_{Pn} abhängig von der Wellenzahl des Lichtquellenspektrums und der jeweiligen Weglängendifferenz $z_R - z_{Pn}$. Dieser Term ist der entscheidende Informationsträger für die OCT-Bildgebung. Interferenzen zwischen einzelnen Probenreflektoren, dargestellt durch die Autokorrelationsterme, tauchen als Artefakte im OCT-Signal auf.

3.1.1. Time Domain OCT

Bei der TDOCT wird der Endspiegel im Referenzarm mechanisch verfahren und dadurch z_R zeitlich variiert. An einer einzelnen Photodiode im Detektorarm wird somit für jede Spiegelposition ein Photostrom erzeugt, der abhängig von der jeweiligen Probenreflektivität r_{Pn} ist. Dabei können nur die Anteile interferieren, deren optischer Wegunterschied innerhalb der Breite der Kohärenzfunktion der Lichtquelle liegt. Bei der Messung der Interferenzintensität wird das Leistungsdichtespektrum

der Lichtquelle am Photodetektor über alle Wellenzahlen integriert $S_0 = \int S(k) dk$, so dass folgendes Signal resultiert:

$$i_D(z_R) = \frac{\rho}{4} [S(k) [R_R + R_{P1} + R_{P2} + \dots + R_{Pn}]] \quad \text{DC-Anteil} \\ + \frac{\rho}{2} \left[S_0 \sum_n \sqrt{R_R R_{Pn}} e^{-(z_R - z_{Pn})^2 \Delta k^2} \cos [2k_0 (z_R - z_{Pn})] \right] \quad \text{Interferenzsignal} \quad (3.6)$$

Das Resultat entspricht der Faltung des Reflektivitätsprofils der Probe mit der Kohärenzfunktion der Lichtquelle $\gamma(z_R - z_{Pn}) = e^{-(z_R - z_{Pn})^2 \Delta k^2}$ (siehe Abbildung 3.2). In Anlehnung an die Ultraschallbildgebung wird das Resultat A-Scan (amplitude mode scan) genannt. Durch Aneinanderreihung mehrerer A-Scans mittels eines geeigneten lateralen Scanverfahrens ist möglich, zwei- oder dreidimensionale Querschnittsbilder der Probe zu erzeugen.

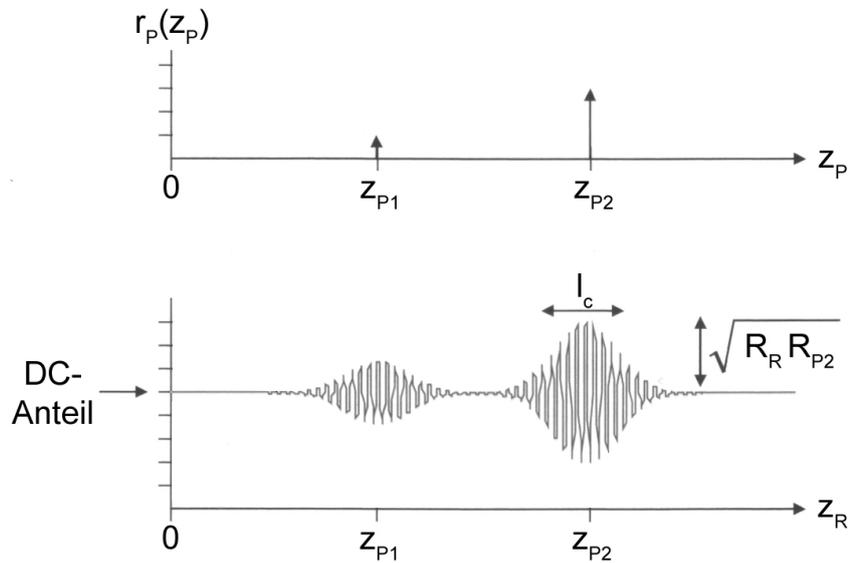


ABBILDUNG 3.2.: Entstehung eines A-Scans (unten) in der TDOCT durch Faltung des Reflektivitätsprofils der Probe (oben) mit der Kohärenzfunktion der Lichtquelle (nach [Iza08]). l_c gibt die Kohärenzlänge an.

Für die hochempfindliche Detektion der Signale wird in der TDOCT das heterodyne Messverfahren angewendet. Hierbei wird das eigentliche Interferenzsignal mit einer Trägerwelle moduliert, um das Signal in einem bestimmten Frequenzband zu filtern und somit niederfrequente Rauschanteile und den DC-Anteil unterdrücken zu können. Durch eine konstante Bewegung des Referenzarmspiegels mit der Geschwindigkeit v_R wird entsprechend des Doppler-Effektes im Referenzarm eine Frequenz ν_D erzeugt, die gegenüber der Frequenz der Probenlichtes ν_P leicht verschoben ist. Um die resultierende Schwebungsfrequenz bzw. Heterodynfrequenz

$$\nu_H = \nu_P - \nu_D = \frac{2 v_R}{\lambda_0} \quad (3.7)$$

wird mit einem Bandpass gefiltert. Für eine effektive Filterung kommt es vor allem auf die geeignete Wahl des Bandpassfilters an, da zum einen Rauschanteile effektiv unterdrückt, gleichzeitig aber auch

alle spektralen Komponenten der Lichtquelle detektiert werden sollen. Durch eine anschließende Tiefpassfilterung wird die Einhüllende des Interferenzsignal gemessen.

3.1.2. Frequency Domain OCT

In der Frequency Domain OCT (FDOCT), oft auch Fourier Domain OCT genannt, gibt es zwei Verfahren, die die Interferenzsignale zwar unterschiedlich detektieren aber gleichermaßen spektral auswerten: die spektrometerbasierte FDOCT und die Swept Source OCT. Bei beiden Methoden ist die Referenzarmlänge konstant, ein mechanisches Bewegen des Referenzarmspiegels ist nicht nötig. Ein A-Scan entsteht durch die Auswertung der wellenzahlabhängigen Kreuzkorrelationsterme in Gleichung (3.4).

Spektrometerbasierte FDOCT

Die spektrometerbasierte FDOCT wird oft auch Spectral Domain OCT genannt und wird im Folgenden als SDOCT abgekürzt. Hier wird wie in der TDOCT eine breitbandige Lichtquelle eingesetzt, zur parallelen Detektion der Interferenzsignale jedoch ein Spektrometer verwendet. Ein Transmissions- oder Reflexionsgitter spaltet das Licht nach den einzelnen spektralen Komponenten $I_D(k)$ auf, die mit einer Zeilenkamera parallel aufgenommen werden.

Das Reflektivitätsprofil der Probe, also ein A-Scan, kann durch die inverse Fouriertransformation aller spektralen Anteile $I_D(k)$ des Photostroms berechnet werden. Die Fouriertransformation verknüpft die Faltung zweier Funktionen im Ortsraum mit der Multiplikation der Fouriertransformierten dieser Funktionen im Frequenzraum: $x(z) \otimes y(z) \xleftrightarrow{FT} X(k)Y(k)$. Wird zusätzlich $\frac{1}{2}[\delta(z+z_0)+\delta(z-z_0)] \xleftrightarrow{FT} \cos(kz_0)$ berücksichtigt, resultiert aus der inversen Fouriertransformation von Gleichung (3.4) die ortsabhängige Intensität $i_D(z)$:

$$\begin{aligned}
 i_D(z) &= FT^{-1} \{I_D(k)\} \\
 &= \frac{\rho}{8} [\gamma(z) [R_R + R_{P1} + R_{P2} + \dots + R_{Pn}]] && \text{DC-Terme} \\
 &+ \frac{\rho}{4} \left[\gamma(z) \otimes \sum_n \sqrt{R_R R_{Pn}} \delta(z \pm 2(z_R - z_{Pn})) \right] && \text{Kreuzkorrelationsterme} \\
 &+ \frac{\rho}{8} \left[\gamma(z) \otimes \sum_{n \neq m} \sqrt{R_{Pn} R_{Pm}} \delta(z \pm 2(z_R - z_{Pn})) \right] && \text{Autokorrelationsterme}
 \end{aligned} \tag{3.8}$$

Durch Ausführen der Faltung wird die Kohärenzfunktion $\gamma(z)$ entsprechend $\int f(x)\delta(x-X)=f(X)$

in die Summe gezogen, so dass das Resultat schließlich folgende Form hat:

$$\begin{aligned}
 i_D(z) &= \frac{\rho}{8} [\gamma(z) [R_R + R_{P1} + R_{P2} + \dots + R_{Pn}]] && \text{DC-Terme} \\
 &+ \frac{\rho}{4} \sum_n \sqrt{R_R R_{Pn}} [\gamma [2(z_R - z_{Pn})] + \gamma [-2(z_R - z_{Pn})]] && \text{Kreuzkorrelationsterme} \\
 &+ \frac{\rho}{8} \sum_{n \neq m} \sqrt{R_{Pn} R_{Pm}} [\gamma [2(z_{Pn} - z_{Pm})] + \gamma [-2(z_{Pn} - z_{Pm})]] && \text{Autokorrelationsterme}
 \end{aligned} \tag{3.9}$$

In Abbildung 3.3 ist dieses Resultat grafisch dargestellt. Die einzelnen diskreten Reflektivitäten an

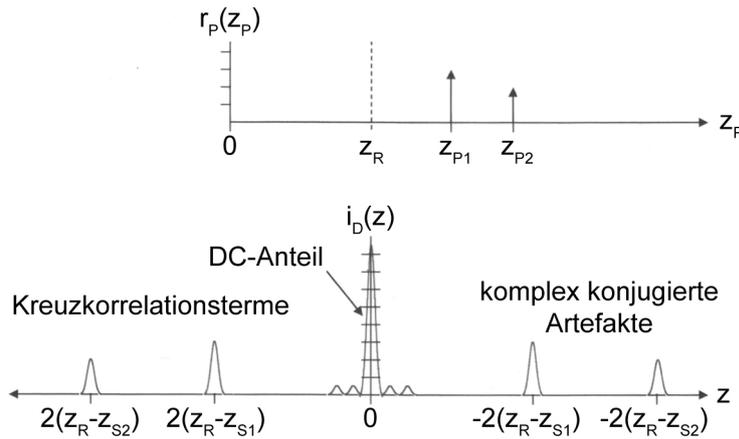


ABBILDUNG 3.3.: Entstehung eines A-Scans (unten) in der FDOCT durch Faltung des Reflektivitätsprofils der Probe (oben) mit der Kohärenzfunktion der Lichtquelle (nach[Iza08]).

den Stellen z_{Pn} werden wie auch in der TDOCT mit der Kohärenzfunktion $\gamma(z)$ gefaltet. Die Nullposition des Reflektivitätsprofils befindet sich an der Position des Endspiegels $z_{S0} = z_R$, die einzelnen Reflektivitäten liegen gespiegelt bei der doppelten Armlängendifferenz $2(z_R - z_{S_n})$ und $-2(z_R - z_{S_n})$ von der Nullposition entfernt. Diese Spiegelung des Reflektivitätsprofils an der Nullposition wird konjugiert komplexes Artefakt genannt. Das vom Detektor gemessene Interferenzsignal (3.9) repräsentiert lediglich den Realteil des eigentlich komplexen Signals. Dieses Artefakt wirkt sich nur dann aus, wenn die Probe von einer Seite über die Referenzposition hinaus bewegt wird, da sie dann an dieser gepiegelt wieder im OCT-Bild erscheint. Durch Signalverarbeitung allein kann es nicht beseitigt werden. Es gibt verschiedene Ansätze, durch Detektion des Imaginärteils des komplexen Interferenzsignals dieses Problem zu umgehen [Woj02, Sar05]. Dazu wird ein um $\pi/2$ verschobenes Interferogramm aufgenommen und mit dem Realteil kombiniert. Gleichzeitig können auf diese Weise die störenden Autokorrelationsterme entfernt und der Darstellungsbereich verdoppelt werden.

Swept Source OCT

Als Lichtquellen werden für die Swept Source OCT, auch OFDI (Optical Frequency Domain Imaging) genannt, verschiedene schnell durchstimmbare Laser verwendet, die im zeitlichen Verlauf ein

breites Spektrum erzeugen [Chi97, Oh05, Hub06b]. Vorteil gegenüber der SDOCT ist, dass die spektralen Komponenten $I_D(k)$ mit einer einzelnen schnellen Photodiode nacheinander gemessen werden können. Das verringert den Aufwand bei der Verwendung längerer Wellenlängen, bei denen Siliziumdetektoren keine ausreichend hohe spektrale Empfindlichkeit besitzen und Zeilenkameras aus alternativen Materialien wie Indium-Gallium-Arsenit (InGaAs) sehr kostenintensiv sind.

Die Interferenzsignale werden analog zu den Gleichungen (3.8) und (3.9) ausgewertet, d.h. ein A-Scan entsteht in gleicher Weise wie bei SDOCT. Die einzelnen wellenzahlabhängigen Kreuzkorrelationsterme werden lediglich zeitlich nacheinander detektiert und anschließend gleichzeitig fouriertransformiert.

3.1.3. Axiale Auflösung und Dispersion

Wie bereits beschrieben, ist das Leistungsdichtespektrum $S(k)$ der Lichtquelle über die Fouriertransformation mit ihrer Kohärenzfunktion $\gamma(z)$ verknüpft (siehe Gleichung (3.5)). Ihre volle Halbwertsbreite (FWHM), die Kohärenzlänge l_c , kann als axiale Auflösung Δz definiert werden. l_c kann in Abhängigkeit von der Bandbreite der Lichtquelle Δk oder $\Delta \lambda$ angegeben werden

$$\Delta z = l_c = \frac{2\sqrt{\ln 2}}{\Delta k} = \frac{2 \ln 2}{\pi} \frac{\lambda_0^2}{\Delta \lambda}, \quad (3.10)$$

wenn $\lambda_0 = 2\pi/k_0$ und $\Delta k = \frac{\pi}{\sqrt{\ln 2}} \frac{\Delta \lambda}{\lambda_0^2}$ berücksichtigt wird [Iza08]. $\Delta \lambda$ ist als FWHM des Wellenlängenspektrums definiert, Δk entspricht der halben Breite des Wellenzahlspektrums bei $1/e$.

Gleichung (3.10) gilt streng genommen nur für die Ausbreitung im Vakuum, im Medium verbessert sich Δz um das Verhältnis der Brechzahlen des Vakuums und des Mediums $\frac{n_{vac}}{n_{med}} = \frac{1}{n_{med}}$. Die umgekehrte Proportionalität der Auflösung zur Breite des Spektrums führt dazu, dass immer breitere Lichtquellen in der OCT verwendet und zum Teil speziell für diesen Einsatz entwickelt werden (siehe Abbildung 3.4). Besonders hohe Auflösungen werden mit fs-Lasern erreicht, die Pulse mit einer Dauer von wenigen Femtosekunden erzeugen und somit eine sehr große Bandbreite liefern. Die bisher höchste axiale Auflösung von etwa 1 μm wurde von Drexler et al. mit einem Ti:Sa-Laser gezeigt [Dre99a]. Die Breite des Spektrums betrug in diesem Fall etwa 260 nm. Aber nicht nur im Wellenlängenbereich der Ti:Sa um 800 nm, sondern auch um 1000 nm konnte zum Beispiel mit einem modengekoppelten Nd:Glass-Laser in Kombination mit einer nichtlinearen Yb-Faser eine sehr hohe Auflösung von 3,5 μm erreicht werden [Bou03]. Bei diesen Wellenlängen wird der Forderung nach größeren Eindringtiefen in biologisches Gewebe Rechnung getragen. Für viele medizinische OCT-Anwendungen sind aber noch größere Wellenlängen interessant, mit zunehmender Zentralwellenlänge nimmt jedoch auch die Kohärenzlänge bei gleicher spektraler Bandbreite proportional λ_0^2 zu. Im Wellenlängenbereich um 1300 nm müssten die Lichtquellen im Vergleich zu 800 nm eine etwa 2,5-fach größere Bandbreite besitzen, um die gleiche Kohärenzlänge zu erreichen (siehe Gleichung (3.4)). Tabelle 3.1 zeigt typische Bandbreiten und axiale Auflösungen, die mit SLDs verschiedener Wellenlängenbereiche erreicht werden. Durchstimmbare Laser für die SSOCT haben in der Regel

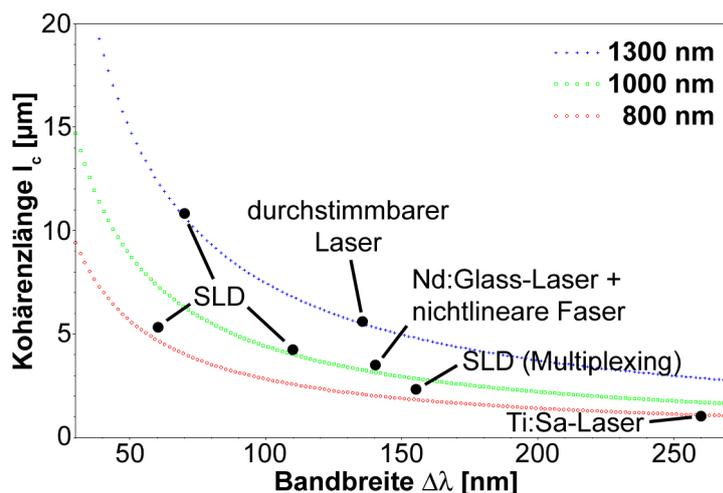


ABBILDUNG 3.4.: Kohärenzlänge in Abhängigkeit von der spektralen Bandbreite für drei typische OCT-Wellenlängen. Eingezeichnet sind verschiedene Lichtquellen aktueller OCT-Systeme.

Zentralwellenlänge [nm]	Bandbreite [nm]	axiale Auflösung [μm]
780-870	50-60	5-6
920-1060	100	4-5
1280-1320	60-70	10-12
Multiplexing [Ko04]	>150	3,5

TABELLE 3.1.: Typische Bandbreiten und axiale Auflösungen für SLDs verschiedener Wellenlängenbereiche [Shi08].

Bandbreiten von 100–130 nm und liefern je nach Wellenlängenbereich Auflösungen von 6–13 μm .

Aufgrund der großen spektralen Bandbreiten der Lichtquellen hat die chromatische Dispersion in den Interferometerarmen einen erheblichen Einfluss auf die axiale Auflösung. Innerhalb von dispersivem Material breiten sich die Wellenpakete mit der Gruppengeschwindigkeit $v_g = \frac{c}{n_g}$, wobei der Gruppenbrechungsindex n_g eine Funktion der Wellenlänge λ ist:

$$n_g = n_p(\lambda) - \lambda \frac{dn_p}{d\lambda}. \quad (3.11)$$

n_p bezeichnet den jeweiligen Phasenbrechungsindex der einzelnen Komponenten des Wellenpaketes entsprechend der Phasengeschwindigkeit $v_p = \frac{c}{n_p}$. Die Phasenbrechungsindizes dispersiver Materialien können zum Beispiel durch die Sellmeier-Gleichung genähert werden [Bor99]:

$$n_p^2 = 1 + \frac{B_1\lambda^2}{\lambda^2 - C_1} + \frac{B_2\lambda^2}{\lambda^2 - C_2} + \frac{B_3\lambda^2}{\lambda^2 - C_3}. \quad (3.12)$$

$B_{1,2,3}$ und $C_{1,2,3}$ sind empirisch ermittelte materialabhängige Konstanten, die den Glaskatalogen der Hersteller entnommen werden können. Da die einzelnen Komponenten des Wellenpaketes aufgrund des wellenlängenabhängigen Phasenbrechungsindex mit unterschiedlicher Geschwindigkeit

propagieren, läuft das Wellenpaket zeitlich auseinander, es kommt also zur Dispersion der Gruppengeschwindigkeit (*engl.* group velocity dispersion, GVD). Ist die GVD in Proben- und Referenzarm unterschiedlich groß, kommt es zu einer Verbreiterung der Kreuzkorrelationsterme in (3.6) bzw. (3.9) und somit zur Verschlechterung der axialen Auflösung.

Als Maß für die chromatische Dispersion wird häufig der aus der Telekommunikation adaptierte Dispersionsparameter D_λ verwendet

$$D_\lambda = \frac{1}{c} \frac{dn_g}{d\lambda} = -\frac{\lambda}{c} \frac{d^2 n_p}{d\lambda^2}, \quad (3.13)$$

der in $\frac{ps}{nm \cdot km}$ angegeben wird. Für eine geometrische Dicke d eines dispersiven Materials, das sich in einem der beiden Interferometerarme befindet, kann die durch chromatische Dispersion verbreiterte Auflösung unter Vernachlässigung von Dispersion höherer Ordnungen durch

$$\Delta z_D = \sqrt{\Delta z^2 + (c D_\lambda \Delta \lambda d)^2} \quad (3.14)$$

abgeschätzt werden [Lan02]. Durch eine sorgfältige Dispersionsanpassung zum Beispiel durch Einbringen dispersiver Substrate in den jeweils anderen Interferometerarm oder numerischer Korrekturen im Rahmen der Signalverarbeitung kann die axiale Auflösung auf die Kohärenzlänge minimiert werden [Gon06, Fer08].

3.2. Systemparameter und Einflussfaktoren der Bildqualität

Für die Darstellung von Strukturen innerhalb von stark streuenden Proben wie zum Beispiel Stimmlippen- und Gewebe ist eine möglichst große Eindringtiefe von Interesse. Da in der OCT nicht absolute Photonenzahlen gemessen werden und die Eindringtiefe daher nicht direkt über das Verhalten einzelner Photonen bestimmt wird, kann die Eindringtiefe auch anschaulich über den Kontrast als Funktion der Tiefe betrachtet werden [Liu07]. Dieser ist vor allem durch den Dynamikumfang, Mehrfachstreuung und die Auflösung beeinflusst. Der Kontrast ist im Allgemeinen als

$$K = \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max} + I_{min}} \quad (3.15)$$

definiert, I_{max} und I_{min} sind die maximale bzw. minimale Helligkeit im OCT-Bild. Im Folgenden werden verschiedene Faktoren vorgestellt, die einen entscheidenden Einfluss auf die Dynamik und somit auf den Bildkontrast haben.

3.2.1. Empfindlichkeit, Dynamik und Signal-zu-Rausch-Verhältnis

In der Literatur finden sich teils widersprüchliche Definitionen, die die Begriffe Empfindlichkeit, Dynamik und Signal-Rausch-Verhältnis oftmals als Synonyme verwenden oder gar vertauschen. Aufgrund der uneinheitlichen Definitionen herrscht oft Verwirrung bei der Einschätzung der Leistungsfähigkeit der OCT-Systeme und erschwert die Vergleichbarkeit [Rol99, Lei03, Cho03, Boe03,

Liu07, Spö08]. Um vor allem die verschiedenen Messmethoden miteinander vergleichen zu können, sollen die Begriffe hier kurz definiert werden.

Die **Empfindlichkeit** oder Sensitivität (engl. *sensitivity*) S ist der Kehrwert des kleinsten, gerade noch vom Rauschen unterscheidbaren Signals. Sie gibt also den Faktor an, um den sich die entsprechende Reflektivität der Probe von der eines idealen Reflektors ($R=1$) unterscheidet ($S=1/R_{P,min}$). Die **Dynamik** bzw. der **Dynamikumfang** (engl. *dynamic range*) wird dagegen als maximal mögliches Signal im Verhältnis zum Rauschpegel definiert. Sie kann auch als das Verhältnis der minimalen und maximalen Reflektivitäten der Probe, die gleichzeitig detektiert werden können, verstanden werden. Sie ist im Wesentlichen durch die Dynamik der Detektionselektronik und des Analog-Digital-Wandlers, in der SDOCT zudem durch die *full-well capacity* des Sensors begrenzt. In der OCT-Bildgebung ist vor allem der Dynamikumfang der endgültigen digitalisierten Bilder von Interesse, daher soll er im Rahmen dieser Arbeit auch auf diese Weise definiert sein. In der Praxis kann kein OCT-System einen Dynamikumfang im Bereich der Sensitivität erreichen. Dies ist jedoch nicht nötig, da typische Reflektivitäten von Gewebe mindestens vier Größenordnungen unter der eines idealen Reflektors liegen. In der Regel ist ein Dynamikumfang im Bereich von 40-60 dB für stark streuende Proben ausreichend. Das **Signal-Rausch-Verhältnis** (engl. *signal-to-noise ratio*, SNR) gibt das Verhältnis der über die Belichtungszeit des Detektors gemittelte tatsächliche Signalleistung i_{AC}^2 zur Summe der Varianzen σ_i^2 der einzelnen Rauschbeiträge an:

$$SNR = \frac{\langle i_{AC}^2 \rangle}{\sum \sigma_i^2}. \quad (3.16)$$

Das SNR betrachtet in allen Fällen das analoge Signal vor der Digitalisierung. Empfindlichkeit, Dynamik und SNR werden jeweils in *dB* angegeben, wobei im Rahmen dieser Arbeit die Definition $\text{dB}=10 \log \frac{P_{Signal}}{P_{Rausch}}$ verwendet wird [Liu07]. P_{Signal} und P_{Rausch} sind jeweils die elektrischen Leistungswerte.

Die einzelnen Messmethoden der OCT sind aufgrund ihrer jeweiligen Detektionsverfahren unterschiedlich stark von den verschiedenen Rauschbeiträgen betroffen. Die heterodyne Detektion in der TDOCT bietet mehrere Möglichkeiten der Rauschunterdrückung. Durch die Bandpassfilterung können störende Beiträge im unteren Frequenzbereich wie das $1/f$ -Rauschen, das thermische Rauschen des Detektors und der DC-Anteil des Interferometersignals entfernt werden. In den FDOCT-Verfahren ist dies nicht möglich, da die spektrale Auswertung der Interferometersignale einer Tiefpassfilterung entspricht. In der TDOCT und der SSOCT kann die sogenannte *balanced detection* Methode angewendet werden, mit der phasengleiche Rauschbeiträge wie das Intensitätsrauschen, das Schwebungsruschen und auch das Rauschen durch mechanische Vibrationen in den Interferometerarmen entfernt werden können [Pod00, Che07]. Dazu wird das Interferometersignal im Detektorarm durch einen 50 : 50-Strahlteiler aufgeteilt und von zwei gleichen Photodioden detektiert. Durch die Reflexion am Strahlteiler entsteht ein Phasensprung von π , so dass die beiden Signale nun gegenphasig sind. Werden nun beide Photoströme subtrahiert, fallen gleichphasige Anteile weg. In der SDOCT dagegen betrifft das Intensitätsrauschen der Lichtquelle einen gesamten A-Scan, da die Signale aus

unterschiedlichen Tiefen der Probe simultan detektiert werden und sich daher kohärent überlagern können. Das Rauschsignal überträgt sich somit auf alle Signalanteile gleichermaßen. Da eine *balanced detection* in diesem Fall nicht möglich ist, wird die Dynamik bzw. das Signal-Rausch-Verhältnis hier durch das Intensitätsrauschen vermindert.

Durch die zeitliche Integration bei der Detektion mit einem CCD (*charge-coupled device*) in der SDOCT kann die Verschlechterung des SNR durch die vorgenannten Rauschbeiträge zum Teil kompensiert werden. Der Effekt ist dabei proportional zur Integrationszeit des CCD. Im Vergleich zur TDOCT oder SSOCT kann die Empfindlichkeit bzw. das SNR um den Faktor \sqrt{m} gesteigert werden, wenn für alle Verfahren die gleiche Dauer eines A-Scans bei gleicher Scantiefe angenommen wird. m steht für die Anzahl der ausgeleuchteten Pixel des CCD. Es gilt jedoch zu beachten, dass bei längeren Integrationszeiten Bewegungen der Probe Artefakte hervorrufen und die Signalqualität wiederum verschlechtern können (siehe Kapitel 4.3).

Mit durchstimmbaren Lasern für die SSOCT kann eine wesentlich höhere Gesamtintensität über die gesamte spektrale Bandbreite erzeugt werden als mit breitbandigen Lichtquellen wie SLDs, so dass hier das SNR gegenüber der SDOCT verbessert werden kann. Da das Interferometersignal in der TDOCT jeweils über alle Frequenzkomponenten gemittelt wird, ergibt sich hier kein Nachteil durch die Verwendung von SLDs.

Bei der Analog-Digital-Wandlung wird das Interferometersignal in 2^M diskrete Quantisierungsstufen übersetzt, wobei M für die Bittiefe des AD-Wandlers steht. Bei linearer Quantisierung wie sie aufgrund der Fourier-Transformation in den FDOCT-Methoden durchgeführt wird, kann die Dynamik im Bild direkt über $10 \log(2^M)$ berechnet werden. Zum Beispiel ist die Dynamik mit einer für FDOCT-Systeme typischen Bittiefe von 12 bit auf 36 dB beschränkt. In der TDOCT dagegen wird das Interferometersignal vor der Digitalisierung logarithmisch demoduliert, so dass auf diese Weise theoretisch eine Dynamik bis zu 80 dB möglich ist. Insgesamt kann mit TDOCT also trotz geringer Empfindlichkeit und SNR eine größere Dynamik erreicht werden als mit den FDOCT-Methoden [Liu07, Zhe08]. Dies resultiert für stark streuendes Gewebe in kontrastreicheren OCT-Bildern.

3.2.2. Speckle

Speckle entstehen allgemein durch die Interferenz von Wellen mit zufälligen Phasen. In der OCT haben sie die Bedeutung einer zusätzlichen Rauschquelle, die sich in den Bildern als zufällige helle und dunkle - je nach konstruktiver oder destruktiver Interferenz - bemerkbar machen [Sch99]. Die Interferenzen treten zwischen Paaren von verschiedenen Streuzentren der Probe zurückreflektierter Wellen auf, dessen optischer Abstand etwa einem Vielfachen von $\lambda/2$ der Lichtquelle entspricht. Dabei müssen diese Paare immer innerhalb des Kohärenzvolumens liegen, um ein Speckle zu erzeugen. Das heißt der Abstand der Streuzentren muss kleiner als die Kohärenzlänge der Lichtquelle sein. Anschaulich wird an jedem Streuzentrum, an dem die einfallenden Photonen getreut werden, jeweils

die Form der Wellenfront der einfallenden Gesamtwelle verändert, so dass Regionen mit konstruktiver und destruktiver Interferenz entstehen. Die zufälligen Veränderungen entstehen vor allem durch Mehrfachrückstreuung, aber auch durch Mehrfachvorwärtstreuung des einfallenden Lichtes. Die zufälligen Interferenzen überlagern das eigentliche informationstragende Interferenzsignal, das durch Einfachrückstreuung erzeugt wird. Um eine Einfachrückstreuung aus tieferen Gewebeschichten zu erhalten, müsste aber das einfallende Licht immer durch höher liegende Schichten propagieren, ohne dort gestreut zu werden. Für stark streuende Proben ist dies jedoch nicht der Fall, so dass in den OCT-Aufnahmen immer Speckle auftreten. Sie müssen also als störendes Rauschen betrachtet werden, das den Bildkontrast und die Auflösung verringert und somit zum Beispiel die Unterscheidung von Schichtgrenzen erschwert. Zusätzlich zu den optischen Eigenschaften des Gewebes in Form von Größe und Verteilung der Streuzentren wird die Entstehung der Speckle durch die Kohärenzlänge der Lichtquelle, die Apertur des Detektors und Wellenfrontaberrationen durch die Optiken im Probenarm beeinflusst.

Zahlreiche Methoden wurden entwickelt, um Speckle zu unterdrücken und so den Bildkontrast zu steigern [Sch99]. Da die Specklemuster auf die statische Verteilung der Streuzentren im Gewebe zurückzuführen sind, können sie mit einer einfachen Mittelung mehrerer A-Scans unter gleichen Aufnahmebedingungen nicht entfernt werden. Werden mehrere A-Scans unter verschiedenen Bedingungen aufgenommen, sind die Speckle jeweils unkorreliert. Durch eine Mittelung dieser verschiedenen A-Scans ist ihre Entfernung möglich [Fer08].

Weitere Techniken werden meist erst im Rahmen der nachträglichen Bildverarbeitung angewendet, also nachdem die Interferenzsignale in Bilder umgewandelt wurden [Rog02]. Beliebte Methoden sind die Medianfilterung, die Filterung mit Wiener-Filtern und die Wavelet-Analyse (siehe Kapitel 5.1). Abbildung 3.5 zeigt beispielhaft die Unterdrückung von Speckle mit Hilfe eines Medianfilters mit

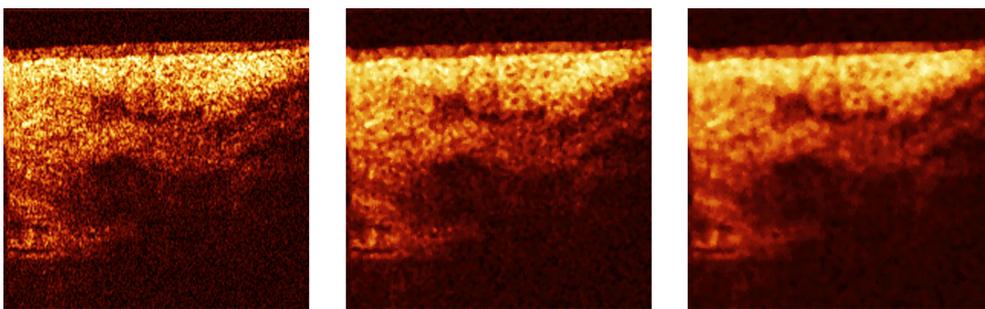


ABBILDUNG 3.5.: Unterdrückung von Speckle mit einem Medianfilter am Beispiel einer normalen menschlichen Stimmlippe. Links: Originalaufnahme, Mitte: nach Filterung mit 3x3-Kernel, rechts: nach Filterung mit 5x5-Kernel.

zwei unterschiedlichen Filterkerngrößen. Neben der Unterdrückung von Speckle bringen die Bildverarbeitungsmethoden aber immer einen Verlust der gewünschten Bildinformation mit sich, da sich Frequenzkomponenten der Speckle und der Bildstrukturen in der Regel überlagern. Ein nachträgliche

Entfernung der Speckle ist also nicht ohne Informationsverlust möglich.

3.2.3. Laterale Auflösung und Tiefenschärfe

In der OCT ist die laterale Auflösung von der axialen Auflösung entkoppelt. Sie ist entweder durch die laterale Samplingrate, also die Anzahl der Abtastpunkte pro Breite der Scanlinie, oder - falls diese genügend groß ist - durch den Durchmesser des Strahls auf bzw. in der Probe gegeben. Sie wird definiert als die volle Halbwertsbreite Δx_{FWHM} der Amplitudenverteilung des fokussierten Probenstrahls am Ort der Strahltaile z_f . Im Falle eines gut kollimierten Gaußstrahls kann der Radius der Strahltaile w_f nach Durchgang durch die fokussierende Optik näherungsweise über den Radius der Eingangsstrahltaile w_0 , also den Strahlradius am Ort der Linse, und deren Brennweite f berechnet werden:

$$w_f = \frac{\lambda_0 f}{\pi w_0}. \quad (3.17)$$

Für eine gaußsche Amplitudenverteilung wird der Tailenradius im Fokus bei $1/e^2$ der maximalen Amplitude angegeben, so dass sich für die laterale Auflösung

$$\Delta x_{FWHM} = 2 \sqrt{\ln 2} w_f = 2 \sqrt{\ln 2} \frac{\lambda_0 f}{\pi w_0} \quad (3.18)$$

ergibt. Für kleine Fokussierungswinkel Θ kann $\frac{f}{w_0} = \frac{1}{\tan \Theta}$ näherungsweise durch $\frac{1}{NA} = \frac{1}{\sin \Theta}$ ersetzt werden, da dann $\tan \Theta \approx \sin \Theta \approx \Theta$ gilt. Dann vereinfacht sich (3.18) zu

$$\Delta x_{FWHM} \approx 2 \sqrt{\ln 2} \frac{\lambda_0}{\pi NA} \approx 0,53 \frac{\lambda_0}{NA}. \quad (3.19)$$

Die Tiefenschärfe ist in der OCT über den konfokalen Parameter b , also der doppelten Rayleighlänge $z_R = \frac{\pi w_f^2}{\lambda}$ definiert und steht somit in direktem Zusammenhang mit der lateralen Auflösung:

$$b = 2 z_R = \frac{\pi \Delta x_{FWHM}^2}{2 \ln 2 \lambda}. \quad (3.20)$$

Nach Durchlaufen der Rayleighlänge z_R ist der Strahlradius gerade um den Faktor $\sqrt{2}$ größer als am Ort der Strahltaile im Fokus z_f . Aus (3.20) wird direkt ersichtlich, dass die Tiefenschärfe bei hohen lateralen Auflösungen kleiner wird. Beispielsweise bei einer Auflösung von $20 \mu\text{m}$ beträgt die Tiefenschärfe etwa $700 \mu\text{m}$, bei einer sehr hohen Auflösung von $2 \mu\text{m}$ dagegen nur etwa $40 \mu\text{m}$. Hierbei wurde jeweils eine Zentralwellenlänge von 1300 nm angenommen. Es muss also ein Kompromiss zwischen Auflösung und Tiefenschärfe geschlossen werden. Um dieses Problem zu umgehen und hohe Auflösungen bei gleichzeitig großer Tiefenschärfe zu realisieren, kann zum Beispiel der Fokus aktiv nachgeführt werden [Sch97]. Eine weitere Möglichkeit wäre die gleichzeitige Verwendung mehrerer Strahlen (*multi-beam OCT*), deren Foki in unterschiedlichen Tiefen liegen, so dass sowohl der Kontrast als auch die laterale Auflösung über einen großen Bereich konstant bleibt [Sta10].

3.2.4. Scangeschwindigkeit

Da in der TDOCT der Endspiegel im Referenzarm bewegt werden muss, um einen Tiefenscan aufzuführen, ist sie gegenüber der FDOCT in der Geschwindigkeit limitiert. In den Anfängen der TDOCT wurden häufig Linearachsen zur Translation des Endspiegels im Referenzarm eingesetzt [Hua91]. Durch die hohe Beschleunigung ist dieses Verfahren mittels kompakter, kostengünstiger Linearachsen auf nur wenige 100 Hz beschränkt. Weitaus höhere Scangeschwindigkeiten bis zu 2,4 kHz können dagegen zum Beispiel mit rotierenden Spiegeln oder Prismen erreicht werden [Rol02a]. Aber hier wie auch bei der linearen Translation des Endspiegels besteht das Problem, das durch die Beschleunigung der Massen Vibrationen im Referenzarm entstehen, die das Signal-Rausch-Verhältnis beeinträchtigen können. Mit einem piezogetriebenen Faserstretcher dagegen wird zur Änderung der Referenzarmlänge lediglich eine aufgewickelte Faser gedehnt, so dass mechanische Vibrationen entfallen [Gel98, Tea96a] und Geschwindigkeiten im Bereich von 2 kHz bei einem Verstellweg von 3,5 mm möglich sind. Noch höhere A-Scan-Raten von bis zu 4 kHz sind durch Phasenmodulation der einzelnen spektralen Komponenten mit Hilfe einer sogenannten *fourier domain delay line* möglich, wie Rollins et al. zeigen konnten [Rol98].

Da der Referenzarmspiegel in der SDOCT fixiert ist, wird die A-Scan-Geschwindigkeit lediglich durch die Ausleserate der CCD- bzw. CMOS-Zeile begrenzt. CCDs waren bisher aufgrund des geringeren Rauschens den CMOS-Sensoren überlegen. Sie haben jedoch grundsätzlich das Potential schneller zu sein als CCD-Zeilen, da lichtempfindliche Pixel, Verstärkerstufen und AD-Wandler direkt in den Chip integriert und einzelne Pixel getrennt ausgelesen werden können. So liefert z.B. die CMOS-Kamera *Basler Sprint spL4096-140k* eine Zeilenrate von 140 kHz bei einer Pixelzahl von 4096. Wird die Pixelzahl reduziert und die Integrationszeit verkleinert, sind entsprechend höhere A-Scan-Raten möglich. Das bisher schnellste SDOCT-System mit einer Zeilenrate von 312,5 kHz haben Potsaid et al. vorgestellt [Pot08]. Mit der Reduzierung der Pixelzahl geht aber ein Signalabfall in der Tiefe einher, so dass die Bildgebungstiefe verringert wird [Hu07]. Eine Verkürzung der Integrationszeit hat bei gleicher eingestrahelter Lichtleistung zudem einen Empfindlichkeitsverlust zur Folge, da entsprechend weniger Photonen pro A-Scan detektiert werden. Wird die Integrationszeit dagegen verlängert, wird das System anfällig gegenüber Bewegungen im Probenarm (siehe Kapitel 4.3). Es muss bei der Wahl der Scangeschwindigkeit also immer ein Kompromiss zwischen Geschwindigkeit, Empfindlichkeit und Bildgebungstiefe geschlossen werden.

In der SSOCT werden für die Detektion schnelle Photodioden verwendet, so dass die Scangeschwindigkeit nur von der Durchstimmgeschwindigkeit der Lichtquelle begrenzt ist. Kommerzielle Systeme erreichen A-Scan-Raten von bis zu 50 kHz, während in der Forschung bereits weit über 100 kHz möglich sind. Dabei werden verschiedene Methoden verwendet, um die Wellenlänge des Laser sehr schnell durchzustimmen. Am vielversprechendsten hinsichtlich der Geschwindigkeit sind die von Huber et al. speziell für die Anwendung in der OCT entwickelten Fourier Domain Mode-Locked Laser (FDML), mit denen bereits A-Scan-Raten von bis zu 370 kHz demonstriert wurden [Hub06b,

Hub06a].

Ein Nachteil der hohen Scanraten sind die großen Datenmengen. Werden beispielsweise 1024 Datenpunkte mit 140 kHz bei einer Bittiefe von 12 bit verarbeitet, entsteht ein Datendurchsatz von über 200 MB/s. Die Aufbereitung der Daten für die Darstellung ist bei diesen Geschwindigkeiten möglich, eine Speicherung aller Daten ist jedoch nicht sinnvoll [Pro09]. Die hohen A-Scan-Raten in der FDOCT lassen also die Echtzeitdarstellung von Gewebevolumina in naher Zukunft für möglich erscheinen. Mit 370 kHz ist beispielsweise die Aufnahme eines Volumens pro Sekunde mit etwa 600×600 A-Scans möglich. Wird die Zahl zum Beispiel auf 128×128 reduziert, können sogar über 20 Volumina pro Sekunde aufgenommen werden. So könnte möglicherweise bald eine hochauflösende, dreidimensionale intraoperative Kontrolle mit OCT in Echtzeit Wirklichkeit werden [Lan09].

4. Entwicklung eines Laryngoskops mit integrierter OCT-Bildgebung

In diesem Kapitel werden nach einer grundlegenden Einführung in die Entwicklung eines OCT-gestützten Endoskops die Rahmenbedingungen für eine kontaktfreie Untersuchung erläutert. Anschließend werden die möglichen Bewegungen während der Untersuchung theoretisch und experimentell untersucht bevor die technische Umsetzung eingehend dargestellt wird. Abschließend wird die erfolgreiche Erprobung des OCT-gestützten Laryngoskops am wachen Patienten demonstriert.

4.1. Einführung in das Optikdesign

4.1.1. Einführung in das Design starrer Endoskope

Das optische System eines starren Endoskops kann aufgrund der unterschiedlichen Funktionen in verschiedene Subsysteme unterteilt werden, die zunächst getrennt entwickelt und anschließend in ein Gesamtsystem überführt werden. Im Endoskoprohr befindet sich zum einen das Objektiv, das die eigentlichen Abbildungseigenschaften wie Vergrößerung, Apertur und Größe des Bildfeldes definiert, und zum anderen ein in der Regel mehrstufiges Relaysystem, welches das Zwischenbild des Objektivs mit Hilfe mehrerer 1:1-Abbildungen an das proximale Ende des Endoskopschaftes überträgt. Ein Okular erzeugt aus dem letzten realen Zwischenbild ein vergrößertes virtuelles Bild, das vom Auge des Betrachters oder mit Hilfe einer Videokamera mit geeigneter Kameraoptik abgebildet werden kann. Der typische Abbildungsstrahlengang eines konventionellen starren Endoskops mit Geradeausblick ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

Das Objektiv erzeugt ein invertiertes Bild mit der Größe y'_0 des Objektes der Größe y_0 , die Vergrößerung des Objektivs $M_{Obj} = \frac{y'_0}{y_0}$ ist also negativ. Endoskopobjektive sind meist bildseitig telezentrisch, das heißt die Hauptstrahlen für alle Objektpunkte wie zum Beispiel Q_0 verlaufen im Bildraum parallel zur optischen Achse und die Austrittspupille liegt im Unendlichen. So resultiert für unterschiedliche Objektweiten jeweils die gleiche Bildgröße und -weite, so dass der Anschluss an das Relaysystem garantiert werden kann.

Typischerweise sind Relaysysteme aus mehreren Stufen aufgebaut, um die Länge des Endoskoprohres zu überbrücken. Jede Relaystufe besteht aus einem Relayobjektiv, das das Zwischenbild mit einer

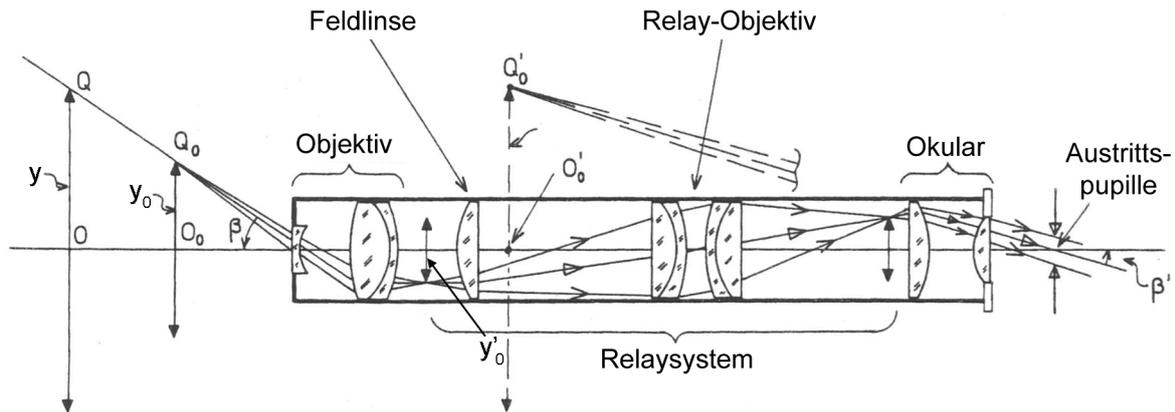


ABBILDUNG 4.1.: Strahlengang eines starren Endoskops mit Geradeausblick mit den Subsystemen Objektiv, Relaysystem und Okular (nach [Hop76]). Das Auge des Betrachters befindet sich in der Austrittspupille des Okulars.

Vergrößerung von $M_{Rel}=-1$ abbildet, und einer oder mehreren Feldlinsen, die die Strahlen jeweils in Richtung optischer Achse brechen und dadurch Vignettierung am Endoskoprohr verhindern. Die einzelnen Stufen sollten möglichst objekt- und bildseitig telezentrisch sein, um den Anschluss weiterer Stufen problemlos zu ermöglichen. Relaysysteme können je nach Anwendungszweck sowohl aus konventionellen sphärischen Optiken als auch Stablinsen oder Gradientenindexlinsen (GRIN-Linsen) aufgebaut werden [Tom96]. Abbildung 4.2 zeigt jeweils eine Stufe der verschiedenen Relayklassen. Systeme mit sphärischen Linsen haben gegenüber den anderen Klassen eine geringere Bildfeldwöl-

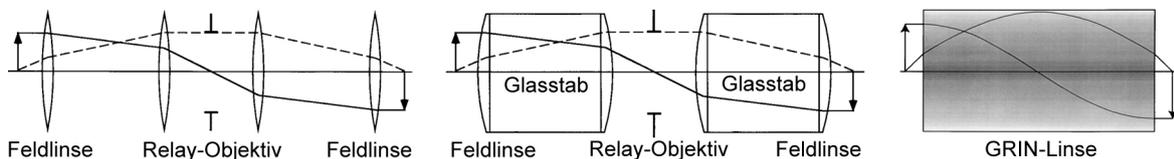


ABBILDUNG 4.2.: Verschiedene symmetrische Relaysysteme mit jeweils einer Stufe (nach [Tom96]). Links: konventionelles Relay mit sphärischen Linsen, Mitte: Stablinsensystem nach Hopkins, rechts: GRIN-Relay.

bung und erzeugen weniger Astigmatismus sowie sehr kleine Spots, leiden aber stärker unter Vignettierung. Stablinsensysteme benötigen weniger, GRIN-Relays sogar nur zwei Oberflächen. Das verringert zwar die Herstellungskosten und den Verlust durch Reflexion an den Oberflächen, reduziert aber auch die Zahl der Freiheitsgrade für die Korrektur von Aberrationen. So sind die Abbildungsfehler und damit die Spots meist größer als bei konventionellen Systemen.

Die Anzahl der Relaystufen bestimmt die Orientierung des letzten Bildes. Bei einer ungeraden Stufenzahl ist das letzte Zwischenbild, das anschließend vom Okular abgebildet wird, aufrecht und seitenrichtig, bei einer geraden Anzahl dagegen auf dem Kopf stehend und seitenverkehrt. Für eine korrekte Abbildung muss das Bild dann mit zum Beispiel mit Hilfe eines Abbe-König-Prismas voll-

ständig umgekehrt, also um 180° gedreht werden [Mal04]. Denn das Okular erzeugt ein aufrechtes und seitenrichtiges virtuelles Bild mit positiver Vergrößerung. Wird der Blickwinkel des Endoskops durch ein Prisma oder Spiegel um einen definierten Winkel umgelenkt, entsteht ein invertiertes Bild, das durch zum Beispiel durch ein Dove-Prisma wieder aufgerichtet werden muss.

In der geometrischen Optik ist die optische Invariante oder Lagrange-Invariante H , ein hilfreiches Maß, mit dem ein optisches System ausgehend von verschiedenen Spezifikationen definiert werden kann [Smi00]. Mit ihrer Hilfe können die einzelnen Subsysteme einander angepasst werden, denn ihr Wert hat im Objektraum und in jedem Bildraum, also sowohl nach dem Objektiv als auch nach jeder Relaystufe, denselben Wert:

$$H = n \sin \alpha y = n' \sin \alpha' y'. \quad (4.1)$$

n und n' geben den Brechungsindex im Objekt- bzw. Bildraum an, α und α' sind die objekt- und bildseitigen Öffnungswinkel und y und y' die Objekt- bzw. Bildgröße. Mit der Definition der numerischen Apertur $NA = n \sin \alpha$ ergibt sich

$$H = NA y = NA' y'. \quad (4.2)$$

Mit Hilfe einfacher Gleichungen aus der paraxialen Optik kann die optische Invariante auf verschiedenen Wegen berechnet werden und ist gleichzeitig Grundlage für die Berechnung der Kenndaten des Systems. Mit den Beziehungen $\sin \alpha = \frac{h}{L}$ und $\tan \beta = \frac{y}{L}$, eingesetzt in (4.1), ergibt sich

$$H = n h \tan \beta, \quad (4.3)$$

worüber zum Beispiel der Radius der Eintrittspupille h oder der halbe Feldwinkel β berechnet werden kann. L steht für die Objektweite.

4.1.2. Designaspekte für OCT-Applikatoren

Um die Probe möglichst verzerrungsfrei darstellen zu können, sollte die Fokusebene im gesamten Bereich des lateralen Scans flach sein. Dies kann durch einen telezentrischen Aufbau der Fokussieroptik erreicht werden, bei dem die Hauptstrahlen probenseitig parallel verlaufen [Hu05]. So läuft das zurückgestreute Licht den annähernd gleichen optischen Weg zurück und die Kopplungseffizienz, also das Verhältnis zwischen zurückgestreutem und eingestrahlttem Licht, wird maximal. Zudem kann so die Vergrößerung und somit die Spotgröße im Fokus über den gesamten lateralen Scanbereich konstant gehalten werden, da kaum Aberrationen dritter Ordnung wie sphärische Aberration, Koma, Astigmatismus, Bildfeldwölbung oder Verzeichnung entstehen. Wird der laterale Scan mit einem bzw. für einen dreidimensionalen Scan mit zwei Scanspiegeln durchgeführt, sollten diese oder deren Bilder im Frontfokus der Fokussieroptik liegen, um Aberrationen zu vermeiden [Hu08].

Bei der Auswahl der Fokussieroptik sollte eine möglichst hohe und über den gesamten Scanbereich gleichförmige Koppeffizienz angestrebt werden, die allerdings durch chromatische Aberrationen

und Aberrationen dritter Ordnung beeinträchtigt werden kann. So werden zum Beispiel Achromate eingesetzt, um Farbfehler zu minimieren, Asphären hingegen reduzieren sphärische Aberrationen und erzielen dadurch bessere Spotprofile.

Die Transmission der Optiken in Abhängigkeit von der Wellenlänge sollte möglichst über die gesamte Bandbreite des Lichtquellspektrums konstant sein, um eine spektrale Filterung durch die Optiken und damit einen Verlust von axialem Auflösungsvermögen zu verhindern. Eine Antireflexbeschichtung muss also sehr sorgfältig auf die Zentralwellenlänge und die Bandbreite der Lichtquelle abgestimmt werden.

Der Anschluss eines OCT-Scanners an das eigentliche System geschieht in der Regel über eine optische Faser. Das Licht wird zunächst aus der Faser ausgekoppelt, durchläuft das gesamte optische System des Applikators zweifach und wird anschließend wieder in die Faser eingekoppelt. Bei der Fokussierung des Lichts auf den Faserkern, der einen Durchmesser von nur wenigen μm hat, tritt in einem realen System immer ein Intensitätsverlust auf, da der Fokaldurchmesser durch Aberrationen vergrößert wird. Die Kollimationsoptik sollte also möglichst gut chromatisch und sphärisch korrigiert sein. Hier empfiehlt sich ebenfalls die Verwendung achromatischer oder asphärischer Linsen.

4.1.3. Einführung in die OCT-Endoskopie

In der OCT-Endoskopie sind je nach Anwendung verschiedene Scangeometrien möglich (siehe Abbildung 4.3). In Endoskopen mit Geradeausblick ist ein aus der Ultraschallbildgebung bekannter

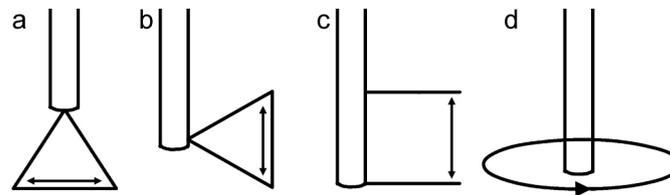


ABBILDUNG 4.3.: Verschiedene endoskopische Scangeometrien: Sektorscan in Geradeaus- (a) und Seitenblick (b), linearer Scan (c) und umlaufender Rotationscscan (d) (nach [Zar08]).

Sektorscan üblich, bei dem zum Beispiel eine optische Faser um einen bestimmten Winkel ausgelenkt wird. In Seitenblickanordnung kann neben dem Sektorscan auch ein linearer Scan durchgeführt werden, bei dem durch Vor- und Zurückziehen einer optischen Faser der Fokus auf der Probe linear verschoben wird. Zudem kann in Endoskopen mit Seitenblick durch Rotation der Fokussieranordnung ein umlaufender Scan ermöglicht werden. Es sind aber auch Kombinationen mehrerer Konfigurationen denkbar, um 3D-Scans zu erzeugen.

Die einzelnen Scangeometrien können jeweils durch verschiedene Scanverfahren realisiert werden. Der Sektorscan in Geradeauskonfiguration kann entweder durch einen Scanmechanismus in der Spitze, also distal, oder außerhalb des Endoskops (proximal) durchgeführt werden. Beispiele für distale

Scanverfahren sind die Auslenkung einer optischen Faser durch elektromagnetische oder piezoelektrische Aktuatoren [Ser97, Bop97, Liu04] und das Scannen mittels eines oder zweier MEMS-Spiegel [Pan01]. Proximal können Galvanometer-Scanner eingesetzt werden, um den Strahl bereits vor einer Relay- und Fokussieroptik zu scannen [Pan03], oder lineare Translationstische, die den Probenstrahl auf einem Faserbündel ablenken, das zusammen mit einer Fokussieroptik einen entsprechenden Scan auf der Probe erzeugt [Xie05]. Die genannten Scanverfahren für Endoskope mit Geradeausblick sind in Abbildung 4.4 gezeigt.

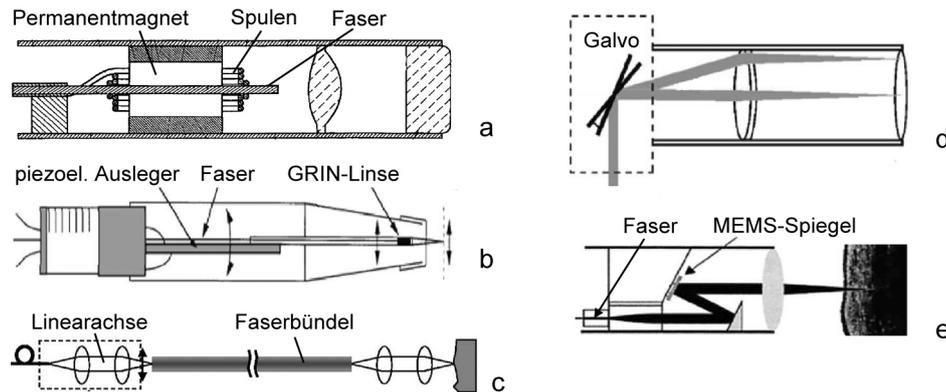


ABBILDUNG 4.4.: Scanverfahren für OCT-Endoskope mit Geradeausblick: distale Auslenkung einer Faser (a,b) [Ser97, Bop97], proximaler Scan auf einem Faserbündel (c) [Xie05], proximaler Galvanometerscanner (d) [Pan01] und distaler MEMS-Scanner (e) [Pan03].

Auch bei den Endoskopen mit Seitenblick (Abb. 4.3b-d) ist der Scanmechanismus sowohl distal als auch proximal implementierbar. In der Regel wird hier ein Innenrohr, in das die Abbildungs- und Umlenkungsoptik integriert ist, gegenüber eines transparenten Hüllrohres rotiert oder vorschoben. In Abbildung 4.5a,b sind proximale Mechanismen für die entsprechenden Bewegungen dargestellt. Eine Drehbewegung kann zum Beispiel über die Verbindung mit einer Motorwelle [Tea96b], eine Translation durch die Übersetzung der Winkelbewegung eines Galvos in eine lineare Bewegung erzeugt werden [Bou99]. In Abbildung 4.5c ist eine distale Spitze dargestellt, die mit beiden beschriebenen Scanverfahren - auch im Kombination - genutzt werden kann [Tea96b]. Durch die Integration eines an einen Mikromotor adaptierten Scanspiegels oder eines oder mehrerer MEMS-Spiegel in die Endoskopspitze ist ein distales Scannen von kleinen Winkeln bis zu vollständigen Rotationen möglich [Her04, Tra04].

OCT-Endoskope, die im Kontaktverfahren eingesetzt werden, haben in der Regel einen festen Arbeitsabstand. Der Fokus liegt meist einige 100 μm unterhalb der Gewebeoberfläche, um ein möglichst gutes Streusignal aus tieferen Regionen der Probe zu erhalten. Bei Applikatoren, die kontaktfrei verwendet werden, ist die Positionierung des Fokus dagegen wesentlich kritischer. Zum einen muss der Arbeitsabstand bei möglichen Bewegungen des Endoskops oder des Patienten dynamisch nachgeregelt werden, zum anderen muss der Arbeitsabstand auf die jeweilige Lage des zu untersuchenden

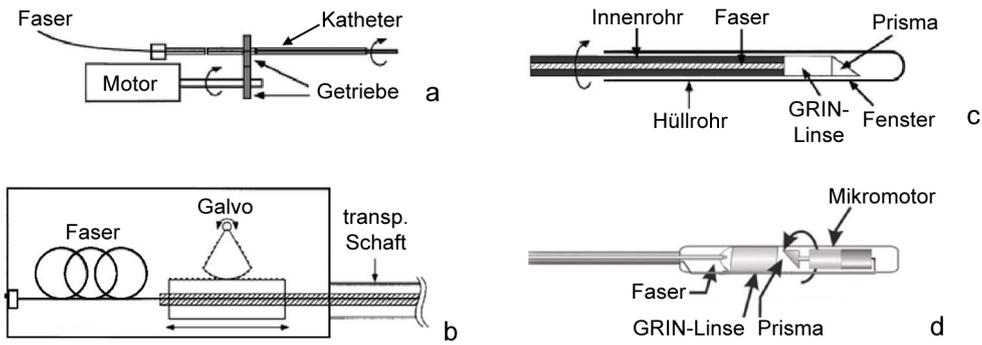


ABBILDUNG 4.5.: Distale und proximale Scanverfahren für OCT-Endoskope mit Seitenblick.

Organe, die wie am Kehlkopf um einige Zentimeter variieren kann, angepasst werden. So kann zum Beispiel die Verschiebung einer Fokussierlinse am proximalen Ende durch das Relaysystem und das Endoskopobjektiv, je nach gewählter Vergrößerung, linear oder nichtlinear übertragen werden und so die Fokusslage verändern. Xie konnte mit einer GRIN-Linse, auf deren Endfläche ein kollimierter Strahl fokussiert wurde, eine Änderung des Arbeitsabstandes von bis zu 7,5 mm durch Verschieben der Fokussieroptik erzeugen (siehe Abbildung 4.6) [Xie06]. Hat die GRIN-Linse für die Wellenlänge

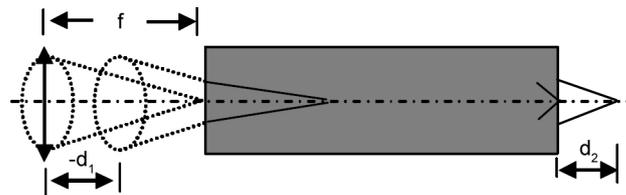


ABBILDUNG 4.6.: Lineare Fokussierung durch proximale Verschiebung des Fokus auf der Endfläche einer GRIN-Relaylinse (nach [Xie06]).

des OCT-Systems eine Länge von exakt einem Pitch, kann sie als ideales Relay betrachtet werden und die Vergrößerung beträgt -1 [Tom96]. Die Änderung des Arbeitsabstandes d_2 verhält sich also linear gegenüber der Verschiebung der Fokussieroptik $-d_1$. Wird die Länge der GRIN-Linse geändert, kann sie nicht mehr als Relay betrachtet werden. Das Verhältnis von d_2 zu $-d_1$ ist dann nicht mehr -1 , die Übersetzung wird entsprechend nichtlinear. In diesem Aufbau wurde die gesamte Einheit aus Faser, Kollimator, Scanner und Fokussieroptik relativ zur GRIN-Linse verfahren, somit war die Probenarmlänge im Fall eines idealen Relays für jeden Arbeitsabstand konstant und es war keine zusätzliche Anpassung der Armlängen notwendig. Die lineare Übersetzung ist aber je nach NA der Fokussieroptik auf einen bestimmten Bereich limitiert.

Eine weitere Möglichkeit, die Fokusslage zu verändern, besteht in der dynamischen Änderung der Brennweite der Fokussieroptik. Dies kann zum Beispiel durch flüssigkeitsgefüllte Polymerlinsen realisiert werden, die je nach Druck den Krümmungsradius einer der Linsenoberflächen und somit die Brennweite ändern kann [Div05, Alj08, Mee08]. Allerdings muss bei einer Integration in ein

OCT-Endoskop eine zusätzliche Einrichtung zur Druckänderung, zum Beispiel eine an eine Pumpe angeschlossene Wasserleitung, berücksichtigt werden. Zudem haben flüssigkeitsgefüllte Linsen in der Regel sehr kleine Aperturen von <2 mm und eine geringe Transparenz.

4.2. Anforderungen an das Laryngoskop

Bei der Entwicklung eines Laryngoskops mit kollinearer Strahlführung für OCT- und Videobildgebung muss das Optiksistem für zwei verschiedene Funktionen und Wellenlängenbereiche ausgelegt und optimiert werden. Zudem stellen die bei einer kontaktfreien Untersuchung unvermeidlichen Bewegungen hohe Anforderungen an das zu integrierende OCT-System. Das Laryngoskop darf nur wenig Platz im Rachenraum des Patienten beanspruchen, um die Beweglichkeit bei der Untersuchung zu erhalten und die Akzeptanz der Methode zu gewährleisten. Schließlich stellt auch der variable Arbeitsabstand zwischen 40 und 100 mm, bedingt durch die unterschiedliche Anatomie der Patienten, eine weitere Herausforderung an das Endoskopdesign.

Allgemeine Anforderungen

Die Untersuchung mit einem OCT-gestützten Laryngoskop sollte möglichst der für niedergelassene HNO-Ärzte gewohnten Situation entsprechen. Das bedeutet, dass das Instrument leicht in die Praxis zu integrieren sein muss, indem es nur geringen zusätzlichen Platz bedarf und zudem leicht zu bedienen ist. Der untersuchende Arzt muss sich bei der Anwendung der OCT jedoch dahingehend umstellen, dass nicht wie bisher ein großer Tiefenschärfebereich zur Verfügung steht, sondern nur ein sehr kleiner Bereich von wenigen Millimetern abgebildet wird. So muss der Arbeitsabstand, also der Abstand von der Endoskopspitze bis zu den Stimmlippen, zunächst auf die jeweilige Position des Kehlkopfes im Rachen eingestellt werden und während der Untersuchung aufgrund der verschiedenen auftretenden Bewegungen möglichst schnell dynamisch angepasst werden. Denn schon bei Bewegungsamplituden von wenigen Millimetern könnten die darzustellenden Stimmlippen außerhalb des Tiefenscanbereichs der OCT von ebenfalls nur wenigen Millimetern liegen. Um dem Arzt also die erfolgreiche Aufnahme von OCT-Bildern zu erleichtern, sind einige Hilfestellungen sinnvoll. So kann die Tiefenschärfe des Videostrahlengangs gegenüber konventionellen Laryngoskopen verkleinert werden und mittels einer synchronen Fokussierung von OCT- und Videostrahl der Arbeitsabstand für die OCT unter Sichtkontrolle korrekt eingestellt werden. Sind nämlich die Stimmlippen im Videobild scharf abgebildet, sind sie gleichzeitig auch im Tiefenscanbereich der OCT zu sehen. Für eine exakte Positionierung des OCT-Bildausschnitts auf dem zu untersuchenden Gewebeareal und die spätere Zuordnung der OCT-Bilder muss der laterale Scanbereich mit Hilfe eines Pilotstrahls im Videobild visualisiert werden.

Um das gewohnte Handling für den Arzt zu erhalten und die Akzeptanz der Methode bei den Patien-

ten zu gewährleisten, sollten in etwa die Dimensionen konventioneller Lupenlaryngoskope eingehalten werden. Beim Außendurchmesser des Endoskoprohres muss dabei ein sinnvoller Kompromiss geschlossen werden. Ein kleinerer Durchmesser kann zwar die Beweglichkeit des Laryngoskops im Rachen des Patienten erhöhen, verringert jedoch die aufgrund des großen Arbeitsabstandes ohnehin schon kleine numerische Apertur. Um eine akzeptable laterale Auflösung von mindestens $20\ \mu\text{m}$ für die OCT-Bildgebung zu erreichen, ist ein Durchmesser der letzten fokussierenden Optik von mindestens $6\ \text{mm}$ erforderlich. Für die Halterung der Optiken innerhalb des Rohres und die Führung von Lichtleitfasern, die der Beleuchtung des Kehlkopfes dienen, wird weiterer Platz benötigt. Der Gesamtdurchmesser beträgt dann etwa $10\ \text{mm}$, entspricht also etwa dem Durchmesser konventioneller Lupenlaryngoskope. Daher können für den Aufbau eines OCT-gestützten Laryngoskops konventionelle Lupenlaryngoskoprohre verwendet werden, ohne dass eine spezielle Neuentwicklung erforderlich ist.

Der Blickwinkel des Laryngoskops ist hier von größerer Bedeutung als in der konventionellen Lupenlaryngoskopie, da die Intensität des zurückgestreuten Lichts und somit der Kontrast der OCT-Aufnahmen abfällt, sobald der Einfallswinkel vom idealen senkrechten Einfall abweicht (siehe Abbildung 4.7). Bei konventionellen Laryngoskopen ist eine Blickrichtung von 70° oder 90° üblich, je

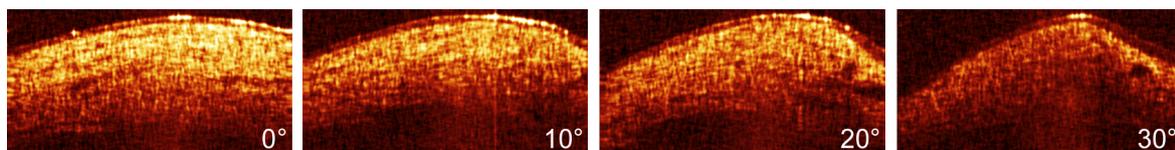


ABBILDUNG 4.7.: Kontrast in Abhängigkeit von verschiedenen Einfallswinkeln am Beispiel einer Schweinestimmlipe, aufgenommen mit TDOCT bei konstantem Arbeitsabstand ($NA=0,04$).

nach Untersuchungstechnik des Arztes. Zum Beispiel durch austauschbare Endoskopspitzen, in die verschiedene Umlenkspiegel oder -prismen integriert sind, könnte der Umlenkwinkel je nach Bedarf angepasst werden. Diese Spitzen müssen gegenüber dem Atem und dem Speichel der Patienten dicht abgeschlossen sein, um die Optiken vor dauerhaften Feuchtigkeitsrückständen zu schützen.

Die Untersuchung der Stimmlippen mit OCT ist wegen des auf wenige Millimeter beschränkten lateralen Scanbereichs und dem Signalverlust bei nicht senkrechtem Lichteinfall am besten bei geschlossener Stimmritze möglich. Ist die Stimmritze nämlich während der Untersuchung geöffnet, muss das Laryngoskop um einen bestimmten Winkel um die Achse des Endoskoprohres gedreht werden, um den Scan auf der jeweiligen Stimmlippe positionieren zu können. Die Stimmritze kann allerdings nur bei Phonation geschlossen werden (siehe Abbildung 4.8), so dass während der OCT-Untersuchung immer auch Vibrationen der Stimmlippen auftreten. Diese Bewegungen führen zu Artefakten, die die Qualität und die Interpretierbarkeit der Bilder erheblich beeinträchtigen können. In Abschnitt 4.3 werden daher die Bewegungsartefakte der verschiedenen OCT-Methoden untersucht, um auf der Basis dieser Ergebnisse die geeignete Methode auszuwählen.

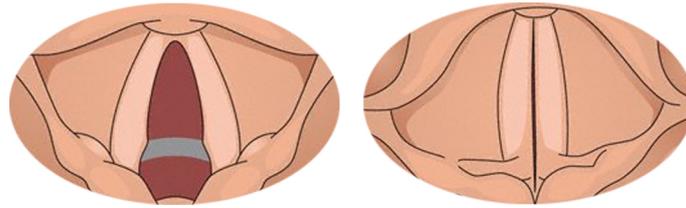


ABBILDUNG 4.8.: Stellung der Stimmklappen bei Atmung (links) und Phonation (rechts) [Sch05b].

Anforderungen an das optische System

Da die beiden Strahlengänge für Video- und OCT-Bildgebung durch dasselbe optische System geführt werden, besteht eine große Herausforderung darin, die Abbildungsqualität des Systems für beide Strahlengänge zu optimieren. Während sich der Wellenlängenbereich für die Videobildgebung über das gesamte sichtbare Licht (VIS) erstreckt, arbeiten die OCT-Systeme typischerweise im Nahinfraroten (NIR). Eine Antireflexbeschichtung der Optiken muss also beide Wellenlängenbereiche ausreichend abdecken.

Beide Strahlengänge müssen nach Durchlaufen des Endoskops durch einen dichroitischen Strahlteiler getrennt werden, um eine synchrone OCT- und Videoabbildung durchführen zu können. In einem der beiden Arme befindet sich eine Videokamera mit angepasster Abbildungsoptik zur Korrektur von Aberrationen, im zweiten Arm befindet sich Ein- bzw. Auskopplung des OCT-Strahlengangs in Form einer optischen Faser, die mit dem OCT-System verbunden ist.

Der Tiefenschärfebereich sollte etwa dem Tiefenscanbereich der OCT entsprechen, damit die Bildgebungstiefe so groß ist, dass keine dynamische Fokussachführung während eines axialen Scans notwendig ist. Außerdem ist das System dann unempfindlicher gegenüber axialen Bewegungen.

Anforderungen an das OCT-System

Die Wahl der geeigneten OCT-Messmethode hängt von mehreren Faktoren ab. Zum einen sollte das OCT-System zweidimensionale Querschnittsbilder möglichst in Videorate aufnehmen und darstellen, zum anderen aber auch trotz der zahlreichen Bewegungen möglichst artefaktfreie, kontrastreiche Bilder liefern.

Aufgrund der großen Bewegungsamplituden durch die Kopfbewegungen des Patienten und den Tremor des untersuchenden Arztes sollte der Tiefenscanbereich möglichst groß sein, um die Stimmklappen im Bild verfolgen zu können. Um aber eine ausreichend hohe Bildrate zu erreichen, darf der Tiefenscanbereich jedoch auch nicht zu groß sein.

Bezüglich der optischen Eindringtiefe für Stimmklappengewebe ist die Wahl der Zentralwellenlänge des OCT-Systems unkritisch. So ist diese für den Bereich von 800–1300 nm größer als 2 mm mit einem Maximum bei etwa 1100 nm [Mah01], was für die Darstellung des Stimmklappenepithels und der

Bindegewebsstrukturen, die bis zu einer Tiefe von etwa 2 mm erstrecken, ausreichend ist (siehe Kapitel 2.3). Für die Detektion von Kehlkopfkrebs oder Präkanzerosen ist sogar nur der erste Millimeter relevant (siehe Kapitel 5).

Die axiale Auflösung des OCT-Systems sollte mindestens $10\mu\text{m}$ innerhalb des Gewebes betragen, um die Schichtstrukturen mit möglichst hoher Genauigkeit voneinander abgrenzen zu können. Gerade bei gesunden Stimmlippen oder Zysten kann das Epithel zum Teil sehr dünn sein, in einigen Fällen sogar $<50\mu\text{m}$.

Anforderungen an den mechanischen Aufbau

Um dem untersuchenden Arzt die Verwendung des OCT-gestützten Laryngoskops zu erleichtern, muss der Aufbau möglichst ergonomisch gestaltet sein. So müssen die einzelnen Komponenten wie das Endoskoprohr, der laterale Scanmechanismus, die Videokamera und Kameraoptik, sowie der Strahlteiler und die Komponenten zur OCT-Einkopplung in ein möglichst kompaktes und leichtes Handstück integriert werden, das sicher einhändig geführt werden kann. Der Arbeitsabstand sollte mit der gleichen Hand, idealerweise mit nur einem Finger über einen Schalter oder Taster einstellbar sein, um während der Untersuchung keine zusätzliche Bewegung des Laryngoskops zu verursachen. Zudem könnte dann die zweite Hand zur Stabilisierung des Endoskops genutzt werden. Alle elektrischen Leitungen, zum Beispiel für die Scannersteuerung oder die Videokamera, sowie die optische Faser zum Anschluss eines OCT-Systems sollten zusammen an der Unterseite des Handstücks abgeführt werden, um mögliche Störungen während der Untersuchung zu vermeiden.

Die über den Schalter oder Taster gesteuerte Anpassung des Arbeitsabstandes sollte durch eine motorgetriebene Linse proximal außerhalb des Endoskoprohres realisiert werden, deren Geschwindigkeit je nach gewünschter Präzision variabel einstellbar sein sollte. Da die Tiefenschärfe in etwa dem Tiefenscanbereich der OCT entspricht, ist lediglich eine Präzision im Bereich einiger $100\mu\text{m}$ gefordert. Die Verschiebung einer Linse bzw. einer Linseneinheit hat im Falle einer vergrößerten Abbildung durch das Objektiv lediglich die Veränderung der Fokuslage zur Folge, daher müssen dazu synchron zusätzlich die Armlängen des Interferometers aufeinander abgestimmt werden. Dies kann entweder durch die Änderung der Referenzarmlänge oder der Probenarmlänge realisiert werden.

4.3. Einfluss von Bewegungen auf die Qualität von OCT-Aufnahmen

Während der kontaktfreien Untersuchung wacher Patienten mit einem OCT-gestützten Laryngoskop können Bewegungen des Applikators durch den Tremor des Benutzers, Bewegungen des Patienten, aber auch Schwingungen der Stimmlippen auftreten. Die Bewegungen der Stimmlippen sind bereits in früheren Studien untersucht worden (siehe Kapitel 2.2), die Auswirkungen des Tremors bei laryn-

goskopischen Untersuchungen ist dagegen weitgehend unbekannt. Daher sollen zunächst die Bewegungen des Laryngoskops während einer kontaktfreien Untersuchung analysiert werden. Anschließend wird der Einfluss der Bewegungen auf die Qualität von OCT-Aufnahmen für die drei OCT-Messmethoden TDOCT, SDOCT und SSOCT sowohl theoretisch behandelt als auch experimentell in OCT-Aufnahmen von extrahierten Schweinestimmklippen dargestellt. Auf Basis dieser Ergebnisse kann eine Beurteilung der Eignung der drei OCT-Verfahren für eine kontaktfreie Stimmklippenuntersuchung erfolgen.

4.3.1. Einfluss des Tremors

Zur Abschätzung der Geschwindigkeiten bei der durch den Tremor des untersuchenden Arztes induzierten Applikatorbewegungen wurde eine fixierte plane Papieroberfläche mit einem Labormuster des OCT-gestützten Laryngoskops aufgenommen. Hier wurde ein TDOCT-System mit einer Bildrate von 8 Hz und einem Tiefenscanbereich von 3,55 mm einkoppelt. Abbildung 4.9 zeigt den Verlauf der Oberfläche in insgesamt 16 aufeinander folgenden OCT-Aufnahmen über eine Dauer von 2 s. Hier wurde ein Ausschnitt einer Untersuchungsphase gewählt, während der der Applikator möglichst

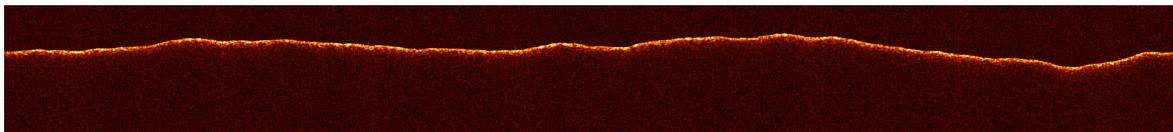


ABBILDUNG 4.9.: Zeitlicher Verlauf einer fixierten Papieroberfläche bei durch Tremor induzierten Bewegungen aufgenommen mit einem TDOCT-System über eine Dauer von 2 s. Die Tiefenscanbereich beträgt 3,55 mm.

ruhig gehalten wurde, nachdem der Arbeitsabstand bereits korrekt eingestellt war. Aus der rechten Bildhälfte lässt sich eine Schwingungsfrequenz von etwa 1 Hz abschätzen, wenn man den Verlauf der Oberfläche mit einem Sinus nähert. Die Amplitude beträgt in diesem Bereich etwa 0,5 mm, so dass die maximale Geschwindigkeit der axialen Bewegungskomponente ca. 3 mm/s beträgt.

4.3.2. Axiale Bewegungen

Axiale Bewegungen können beschrieben werden als Änderung des Abstandes zwischen Probe und Detektor in Ausbreitungsrichtung während der Dauer eines A-Scans T_{A-Scan} . Bei der Analyse der auftretenden Artefakte ist zu unterscheiden, ob sich der Applikator oder die Probe oder aber beide gleichzeitig bewegen. Die Bewegungen des Applikators können nach Abschnitt 4.3.1 als eher zufällig und klein gegenüber den Stimmklippenschwingungen betrachtet werden. Daher wird im Rahmen dieser Untersuchung der Applikator der Einfachheit halber als stationär mit fester z -Position und die Probe als beweglich angenommen.

Die axiale Bewegung der Stimmlippen wird näherungsweise als sinusförmiger Verlauf mit Amplituden bis $A=0,5$ mm und Frequenzen von $f=120-240$ Hz behandelt:

$$z(t) = z_{off} + A \sin(2\pi f t) \quad . \quad (4.4)$$

Für die Untersuchung der Bewegungsartefakte müssen zwei Arten von Proben betrachtet werden. Eine einzelne infinitesimal dünne reflektierende Schicht, zum Beispiel ein Spiegel, hat nur an einer axialen Position z_P eine Reflektivität $R_P \neq 0$, die sich entsprechend (4.4) im Verlauf der Bewegung ändert. Bei biologischen Proben dagegen müssen alle n Reflektivitäten R_{P_n} an den Positionen z_{P_n} gleichzeitig berücksichtigt werden. In diesem Abschnitt soll daher zunächst die Theorie für die drei Messmethoden TDOCT, SDOCT und SSOCT anhand eines Spiegels erläutert werden, anschließend werden Aufnahmen von bewegten extrahierten Schweinestimmklappen für die drei Messmethoden vergleichend gegenübergestellt. Die Parameter der dazu verwendeten OCT-Systeme sind in Tabelle 4.1 dargestellt.

	TDOCT	SDOCT	SSOCT
Hersteller	BioMedTech	Thorlabs HL	Thorlabs Inc.
Typenbezeichnung	OCT1300	Ganymed	OCS1300SS
Wellenlänge λ_0 [nm]	1320	930	1325
spektrale Breite $\Delta\lambda$ [nm]	71,5	100	100
laterale Auflösung [μm]	24	16	15
A-Scanrate [kHz]	2	20	16
T_{A-Scan} [μs]	350	50	62,5

TABELLE 4.1.: Parameter der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten kommerziell erhältlichen OCT-Systeme.

Sowohl der Spiegel als auch die biologischen Proben wurden auf einem Lautsprecher befestigt, der mit Hilfe eines verstärkten Frequenzgeneratorsignals ausgelenkt wurde. Dabei wurden die Amplituden und Frequenzen in den oben genannten Bereichen variiert. Die Messungen wurden mit einem Laservibrometer (*Polytec CL-V-2534*) kalibriert, mit dem mittels Laser-Doppler-Interferometrie Geschwindigkeiten mit einer Auflösung von 20 nm/s bzw. Schwingungsamplituden mit einer Genauigkeit von 2 nm bestimmt werden können.

Time Domain OCT (TDOCT)

Das Detektorsignal ist nach Gleichung (3.6) abhängig von der Differenz der Interferometerarmlängen $z_R - z_{P_n}$. Da der DC-Anteil jedoch unabhängig von der Armlängendifferenz ist, ist bei der Betrachtung

tung der Bewegungsartefakte nur der Interferenzterm

$$i_D(z_R, z_{Pn}) \propto \frac{\rho}{2} \left[S_0 \sum_n \sqrt{R_R R_{Pn}} e^{-(z_R - z_{Pn})^2 \Delta k^2} \cos [2k_0(z_R - z_{Pn})] \right] \quad (4.5)$$

von Bedeutung.

Durch die axiale Bewegung treten zwei Artefakte auf, eine Abnahme des SNR und ein Fehler in der Darstellung der axialen Position der Probe. Sowohl die konstante Bewegung des Referenzarmendspiegels als auch die periodische Schwingung der Probe

$$v_R = \frac{z_{max} - z_0}{T_{A-Scan}} , \quad v_P = A \cos(2\pi f t) 2\pi f . \quad (4.6)$$

erzeugen jeweils eine Dopplerfrequenz, mit der die eigentliche Lichtfrequenz $\nu_0 = \frac{c}{\lambda_0}$ moduliert wird:

$$\nu_R = \nu_0 + \nu_{Dr} = \nu_0 + 2 \frac{v_R}{\lambda_0} , \quad \nu_P = \nu_0 + \nu_{Dp} = \nu_0 + 2 \frac{v_P}{\lambda_0} . \quad (4.7)$$

Die Trägerfrequenz des Interferenzsignals, die Heterodynfrequenz, berechnet sich durch die Differenz der Frequenzen in Referenz- und Probenarm [Fer03]

$$\nu_H = \nu_R - \nu_P = \nu_0 + 2 \frac{v_R}{\lambda_0} - \left(\nu_0 + 2 \frac{v_P}{\lambda_0} \right) . \quad (4.8)$$

Bei ruhender Probe ($v_P=0$) vereinfacht sich (4.8) zu $\nu_H=2\frac{v_R}{\lambda_0}$. Das Interferenzsignal wird in der Regel bei dieser Frequenz bandpassgefiltert, um Rauschen zu unterdrücken. Je schmaler dabei das Passband des Filters ist, desto effektiver ist die Rauschunterdrückung. Ist $v_P \neq 0$, kann die Trägerfrequenz von ν_H verschieden sein, im schlimmsten Fall sogar außerhalb des Passbandes liegen. Folglich sinkt das SNR bis zum vollständigen Signalverlust. Die sich zeitlich ändernde Differenz der Trägerfrequenzen bei ruhender und schwingender Probe kann durch

$$\Delta\nu_H(t) = -2 \frac{v_P(t)}{\lambda_0} \quad (4.9)$$

angegeben werden. Ein entsprechender Verlauf ist in Abbildung 4.10 beispielhaft für eine sinusförmige Schwingung eines Spiegels mit einer Amplitude von $A=0,5$ mm und einer Frequenz von $f=200$ Hz gezeigt. Der Verlauf ist mit der relativen axialen Position des Spiegels um einen Offset z_{off} überlagert, die durch Gleichung (4.4) berechnet wurde. Der Bildausschnitt entspricht 20 A-Scans bei $T_{A-Scan}=350$ μ s. In diesem Beispiel kann der Spiegel nur in der Nähe der Umkehrpunkte, also bei entsprechend kleinen Geschwindigkeiten, dargestellt werden. In den übrigen Bereichen liegt die Trägerfrequenz des Interferenzsignals außerhalb des Passbandes und es kommt zum vollständigen Signalverlust. Abbildung 4.11 zeigt diesen Effekt anhand einer OCT-Aufnahme eines schwingenden Silberspiegels mit einer Amplitude von $A=0,4$ mm und einer Frequenz von $f=120$ Hz. In einigen A-Scans kommt es zum vollständigen Signalverlust und die Spiegelposition kann nicht mehr dargestellt werden. Um den Signalverlust zu vermeiden, müsste das Passband den gesamten Verlauf der Frequenzänderung $\Delta\nu_H$ abdecken. Das könnte einerseits durch eine Verkürzung von T_{A-Scan} oder durch eine Verbreiterung des Passbandes realisiert werden.

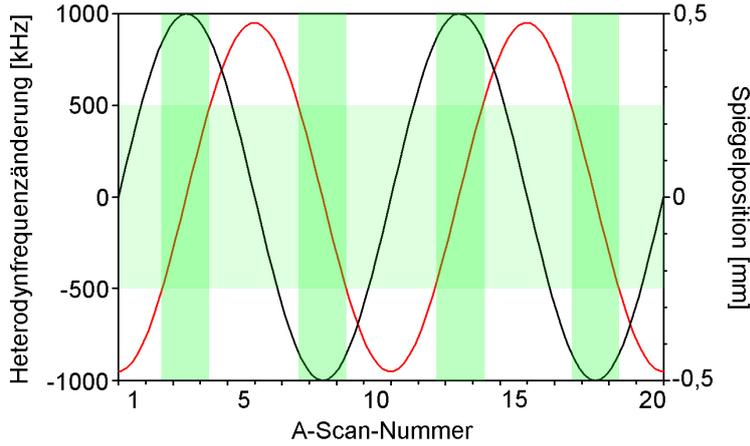


ABBILDUNG 4.10.: Änderung der Heterodynfrequenz (rot) und Position des Spiegels (schwarz) im zeitlichen Verlauf. Das Passband und die Positionen, an denen der Spiegel dargestellt werden kann, sind grün unterlegt. Das Passband hat hier eine Breite von 1 MHz.

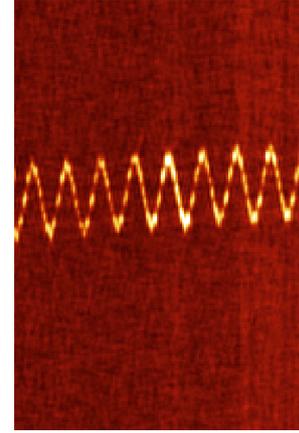


ABBILDUNG 4.11.: TDOCT-Aufnahme eines schwingenden Silberspiegels mit einer Amplitude von $A=0,4$ mm und einer Frequenz von $f=120$ Hz.

Neben der Signalabnahme kommt es bei axialen Bewegungen zu einer fehlerhaften Positionsdarstellung. Die Probe ändert die Position während der Dauer eines A-Scans T_{A-Scan} um

$$\Delta z_P = v_P(t) \cdot t - v_P(t_0) \cdot t_0 \quad (4.10)$$

Die tatsächlich gemessene Position ergibt sich jedoch aus dem Interferenzsignal (siehe Gleichung (4.5)). Es kann nur in dem Bereich Interferenz auftreten, in dem die Interferometerarmlängen gleich sind. Das Signal entsteht also nur dort, wo die Positionen von Referenzarm- und Probenarmspiegel innerhalb der Kohärenzlänge gleich sind. Die Größe dieses Bereiches, im Englischen oft *coherence gate* genannt, ist abhängig von der Geschwindigkeitsdifferenz in Referenz- und Probenarm. Da die Geschwindigkeit des Referenzarmspiegels für Stimmlippenschwingungen in der Regel etwa mindestens eine Größenordnung höher ist als die Probe, ist dieser Bereich jedoch sehr klein. Abbildung 4.12 zeigt dies beispielhaft für einen sinusförmig bewegten Silberspiegel mit einer Amplitude von $A=0,5$ mm und einer Frequenz von $f=200$ Hz. Der Referenzarmspiegel wird während der Dauer eines A-Scans von $T_{A-Scan}=350$ μ s mit einer kontinuierlichen Geschwindigkeit von $v_R=10000$ mm/s über einen Bereich von $z_{max}-z_0=3,5$ mm bewegt. Das *coherence gate* ist in diesem Fall wesentlich kleiner als die Positionsänderung des Spiegels während des A-Scans. Es liegt erkennbar nicht genau bei $\Delta z_P/2$. Das verdeutlicht, dass die tatsächliche Position z_P bei nicht synchronisierten Bewegungen in Proben- und Referenzarm nur innerhalb von Δz_P bestimmt werden können. In der Nähe der maximalen Geschwindigkeit der Probe $v_{P,max}$ kann diese näherungsweise als konstant angesehen werden, so dass der maximale Positionsfehler $\Delta z_{P,max}$ für eine gegebene Schwingung durch

$$\Delta z_{P,max} = |v_{P,max}| T_{A-Scan} \quad (4.11)$$

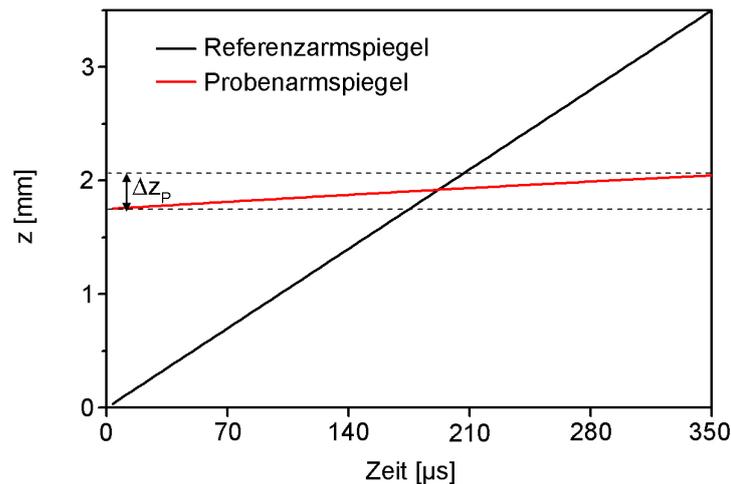


ABBILDUNG 4.12.: Positionen von Referenzarmspiegel (schwarz) und Probenarmspiegel (rot) im Verlauf eines A-Scans. Die Breite der schwarzen Linie entspricht in etwa dem *coherence gate*.

berechnet werden kann. Abbildung 4.13 zeigt das Verhältnis von maximalem Positionsfehler zu maximaler Geschwindigkeit, die die Probe bei gegebener Schwingung erreichen kann. Maximale Geschwindigkeiten, zum Beispiel für Schwingungen mit einer Frequenz von $f=240$ Hz und einer Amplitude von $A=0,5$ mm, betragen etwa 750 mm/s, die exakte Position der Probe kann dann also nur mit einer Unsicherheit von $\Delta z_{P,max}=375$ μm bestimmt werden.

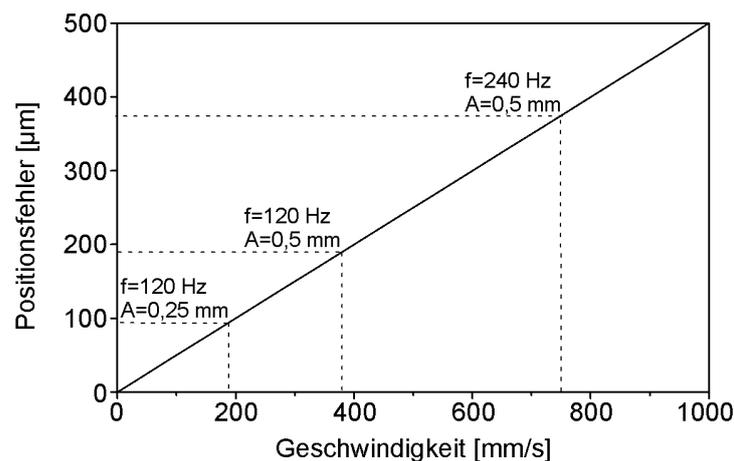


ABBILDUNG 4.13.: Positionsfehler in Abhängigkeit von der maximalen Geschwindigkeit sinusförmiger Bewegungen. Die eingezeichneten Beispiele entsprechen typischen menschlichen Stimmlippschwingungen.

Spektrometerbasierte FDOCT (SDOCT)

In der SDOCT ist eine Signalabnahme der entscheidende Effekt, der sich negativ auf Qualität der OCT-Bilder auswirkt. Durch die Bewegung der Probe um $\Delta z_P = v_P(t) \cdot t - v_P(t_0) \cdot t_0$ während der Dauer eines A-Scans T_{A-Scan} , also während der Integrationszeit der Detektorzeile, kommt es im Kreuzkorrelationsterm des Interferenzsignals (vgl. Gleichung (3.4)) zu einer Verschiebung der Phasen. Daraus resultiert ein Auswaschen der Interferenzintensität, ein sogenannter *fringe washout* und somit ein Signalabfall mit einem Faktor Γ , der sich durch Integration des Photostroms über T_{A-Scan} ergibt [Yun04]. Das SNR in Abhängigkeit vom Weglängenunterschied der Interferometerarme $\Delta z = z_R - z_P$ kann dann näherungsweise durch

$$SNR(\Delta z) = SNR(\Delta z = 0) \cdot \Gamma \quad \text{mit } \Gamma = \frac{\sin^2(k_0 \Delta z)}{(k_0 \Delta z)^2}, \quad \Gamma = [0, 1] \quad (4.12)$$

angegeben werden, wenn $\Delta z_P \ll z_{max} - z_0$. Gleich die Geschwindigkeit der Probe einem ganzzahligen Vielfachen eines Viertels der Zentralwellenlänge pro Integrationszeit $v_P = n \cdot \frac{\lambda_0/4}{T_{A-Scan}}$, kommt es aufgrund von destruktiver Interferenz zum vollständigen Signalverlust. Die OCT-Aufnahme eines mit 140 Hz oszillierenden Silberspiegels in Abbildung 4.14 belegt den Signalabfall bei höheren Geschwindigkeiten und zeigt die charakteristischen Fehlstellen im Signal. Der entsprechende Vergleich

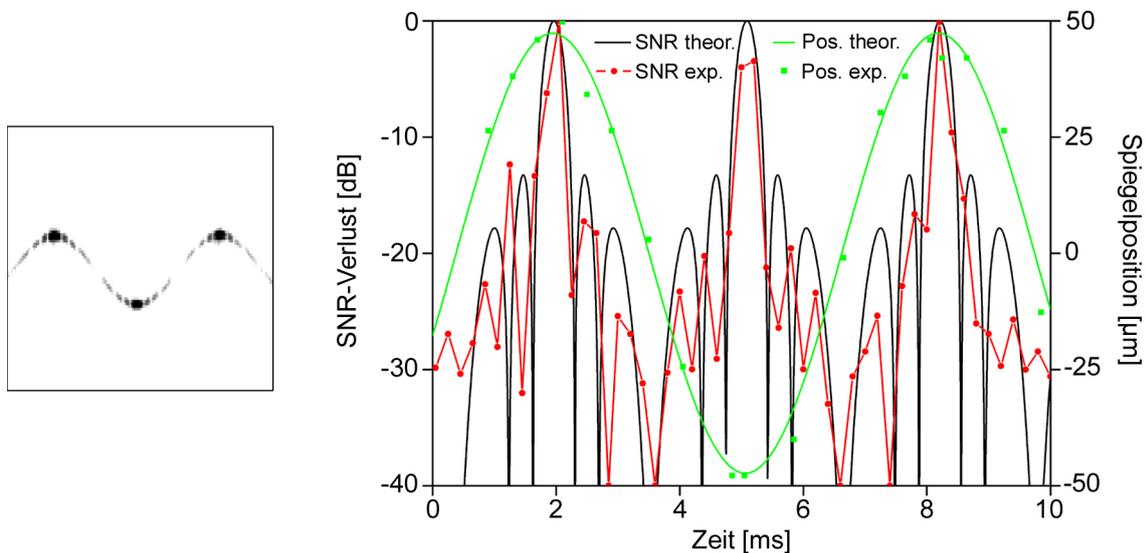


ABBILDUNG 4.14.: Vergleich zwischen theoretischer und experimenteller Analyse des SNR-Verlustes in Relation zur Bewegung eines Silberspiegels mit $f=140$ Hz und $A=48$ μm . Die Integrationszeit betrug 50 μs . Links: SDOCT-Aufnahme des bewegten Spiegels mit 200 A-Scans.

zwischen theoretischen und experimentellen Werten zeigt eine gute Übereinstimmung.

Swept Source OCT (SSOCT)

Eine axiale Probenbewegung führt in SSOCT-Systemen einerseits zu einem Skalierungsfehler bei der Darstellung der Probenposition und zu einer Verschlechterung der axialen Auflösung. Der durchstimmbare Laser erzeugt eine zeitlich variierende Frequenz, so dass die Interferenzsignale für die einzelnen Frequenzkomponenten des Durchstimmbereiches $\Delta k = k_1 - k_0$ zeitlich nacheinander detektiert werden. Dabei sei angenommen, dass die Wellenzahl linear durchgestimmt wird, $k(t) = k_0 + \frac{\Delta k}{T_S} t$, wobei t sich über die Dauer einer Durchstimmerperiode T_S erstreckt. $\frac{\Delta k}{T_S}$ gibt die Durchstimmgeschwindigkeit an. Durch die Probenbewegung entsteht im Probenarm wie bei der TDOCT eine zusätzliche geschwindigkeitsabhängige Dopplereffrequenz ν_D , mit der die Interferenzsignale moduliert werden. Aus der Fouriertransformierten der Interferenzsignale der einzelnen Frequenzkomponenten (vgl. Gleichung (3.9)) ergibt sich die Position der Probe im OCT-Bild nach Addition der tatsächlichen Position $z_R - z_{P0}(t)$, also der Differenz der Interferometerarmlängen, mit dem Fehler durch die Dopplerverschiebung $z_D(t)$

$$z_R - z_P(t) = z_R - z_{P0}(t) + z_D(t) \quad (4.13)$$

$z_D(t)$ kann nach [Yun04] durch

$$z_D(t) = \frac{k_0}{\frac{\Delta k}{T_S} T_S} \Delta z_P = \frac{\pi \sigma}{2 \ln 2} \frac{\delta z_0}{\lambda_0} \Delta z_P \quad (4.14)$$

berechnet werden. $\Delta z_P = v_P(t) \cdot t - v_P(t_0) \cdot t_0$ ist die Positionsänderung während eines A-Scans, also während T_S , $\delta z_0 = \frac{4 \ln 2}{\frac{\Delta k}{T_S} T_S \sigma}$ gibt die axiale Auflösung des Systems, wobei $\frac{\Delta k}{T_S} T_S \sigma$ die FWHM des Durchstimmbereiches in Wellenzahlen angibt. Typische Werte für σ und $\frac{\delta z_0}{\lambda_0}$ liegen bei 0,5 - 0,8 bzw. 4 - 12, so dass der Dopplerfehler das 5 - 22-fache der eigentlichen Positionsänderung während eines A-Scans betragen kann. Aus Gleichung (4.14) wird deutlich, dass sich die Größe des Dopplerfehlers bei sinusförmigen Bewegungen von A-Scan zu A-Scan ändert. Der maximale Fehler kann also an den Orten höchster Geschwindigkeit bestimmt werden. Abbildung 4.15 zeigt die lineare Abhängigkeit des Dopplerfehlers von der Geschwindigkeit der Probe für ein typisches SSOCT-System mit $\sigma = 0,71$, $\delta z_0 = 15,9 \mu\text{m}$, $\lambda_0 = 1325 \text{ nm}$ und $T_S = 62,5 \mu\text{s}$. Abbildung 4.16 zeigt beispielhaft den Verlauf einer Spiegeloszillation mit einer Frequenz von $f = 40 \text{ Hz}$ und einer Amplitude von $A = 320 \mu\text{m}$. Hier ist der Positionsfehler erst durch den um einen A-Scan gegeneinander verschobenen doppelten Verlauf zu erkennen, der durch das wechselnde Durchstimmen der Lichtquelle in Vorwärts- und Rückwärtsrichtung entsteht. Die Dopplerfehler haben entsprechend entgegengesetzte Vorzeichen.

Die axiale Bewegung verursacht neben dem Positionsfehler eine Verbreiterung der axialen Auflösung aufgrund eines geschwindigkeitsabhängigen Phasenshifts im Interferenzsignal [Yun04]. Sie ist proportional zum Positionsänderung Δz_P während eines A-Scans und der ursprünglichen axialen Auflösung des Systems. Der Verbreiterungsfaktor kann durch

$$\frac{\delta z}{\delta z_0} = \sqrt{1 + 4\sigma^2 \frac{\Delta z_P^2}{\delta z_0^2}} \quad (4.15)$$

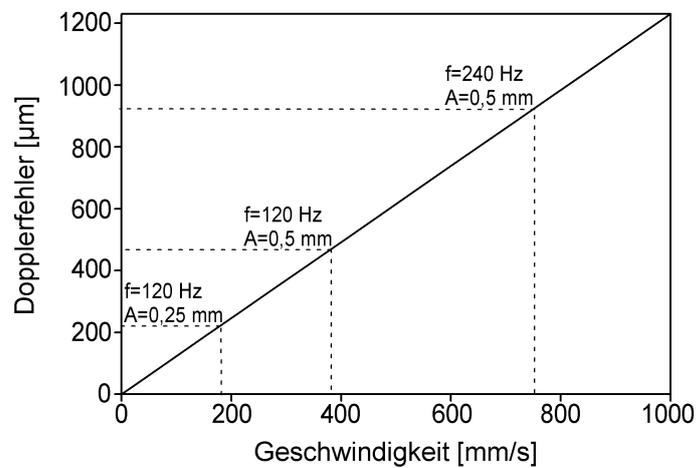


ABBILDUNG 4.15.: Abhängigkeit des Dopplerfehlers von der Geschwindigkeit für ein SSOCT-System mit $\sigma=0,71$, $\delta z_0=15,9\ \mu\text{m}$, $\lambda_0=1325\ \text{nm}$ und $T_S=62,5\ \mu\text{s}$. Die eingezeichneten Beispiele entsprechen typischen menschlichen Stimmlippenschwingungen.

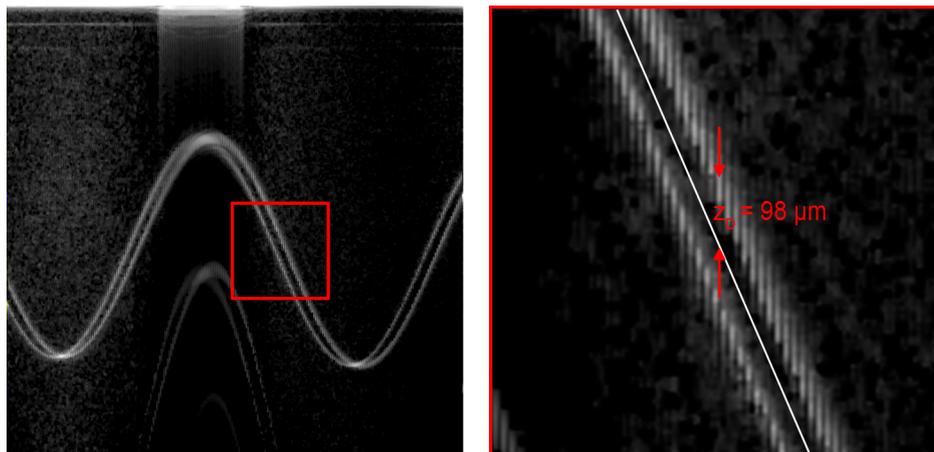


ABBILDUNG 4.16.: Darstellung des Dopplerfehlers in einer SSOCT-Aufnahme ($3\times 3\text{ mm}$, 512 A-Scans, $T_S=62,5\ \mu\text{s}$) bei sinusförmiger Bewegung eines Silberspiegels mit $f=40\ \text{Hz}$ und $A=320\ \mu\text{m}$. Die weiße Gerade gibt die eigentliche Spiegelposition an.

berechnet werden. Abbildung 4.17 zeigt den Faktor in Abhängigkeit von der momentanen Geschwindigkeit der Probe für $\sigma=0,71$ und $T_S=62,5 \mu\text{s}$. Die gute Übereinstimmung von theoretischen und

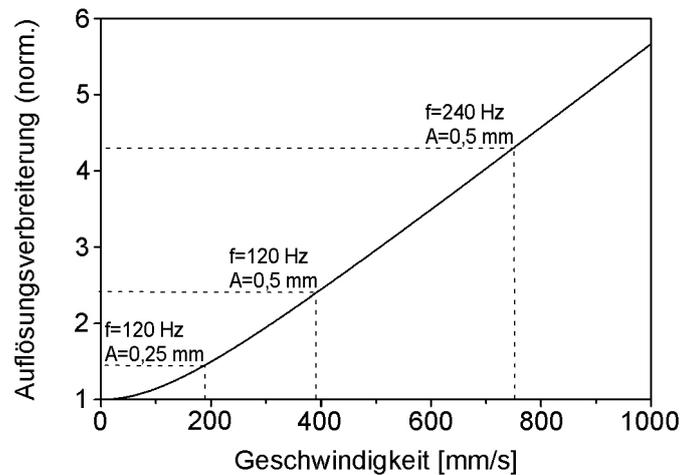


ABBILDUNG 4.17.: Verbreiterung der axialen Auflösung in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit der Probe für ein SSOCT-System mit $\sigma=0,71$, $\delta z_0=15,9 \mu\text{m}$, $\lambda_0=1325 \text{ nm}$ und $T_S=62,5 \mu\text{s}$. Die eingezeichneten Beispiele entsprechen typischen menschlichen Stimmlippenschwingungen.

experimentell bestimmten Werten ist in Abbildung 4.18 dargestellt. Für die Bewegung eines Silberspiegels mit $f=100\text{Hz}$ und $A=80 \mu\text{m}$ wurden hier zur Bestimmung der axialen Auflösung in mehreren A-Scans eines OCT-Bildes die Intensitätsprofile ausgewertet.

Zur Untersuchung des Einflusses axialer Bewegungen auf die Qualität von OCT-Aufnahmen schwingender Stimmlippen wurden extrahierte Schweinestimmlippen mit den drei verschiedenen OCT-Systemen bei verschiedenen Geschwindigkeiten vermessen (siehe Abbildung 4.19). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass für die verschiedenen Messmethoden unterschiedliche Proben verwendet wurden, so dass sich Gewebestrukturen unterscheiden. Zudem muss berücksichtigt werden, dass aufgrund der unterschiedlichen A-Scanraten der Systeme die Zahl der dargestellten Perioden bei gleicher Frequenz verschieden ist. Die laterale Bewegungskomponente, die durch den jeweiligen Scanner zur Erstellung der B-Scans erzeugt wird, hat aufgrund der geringen Geschwindigkeiten keinen sichtbaren Einfluss auf die Bildqualität (siehe Abschnitt 4.3.3). In den Aufnahmen der bewegten Proben sind die vorab untersuchten Artefakte zum Teil deutlich zu erkennen. In den TDOCT-Aufnahmen hat der SNR-Abfall erst bei hohen Geschwindigkeiten einen sichtbaren Einfluss, zudem wird die Abgrenzung des Epithels von der Lamina propria bei hohen Geschwindigkeiten durch den Positionsfehler erschwert bzw. unmöglich. Die einzelnen Gewebeschichten schwingen zur selben Zeit mit unterschiedlich hohen Geschwindigkeiten, so dass es in den OCT-Bildern aufgrund der unterschiedlichen Positionsfehler zu einer Überlagerung der Strukturen kommt. In den FDOCT-Aufnahmen macht der Signalverlust durch den *Fringe Washout* die Erkennbarkeit der Gewebestrukturen schon bei sehr kleinen Geschwindigkeiten unmöglich. Nur noch in der unmittelbaren Nähe der Umkehrpunkte ist ein Signal vorhanden, so dass eine Abgrenzung des Epithels von darunterliegenden Schichten lediglich

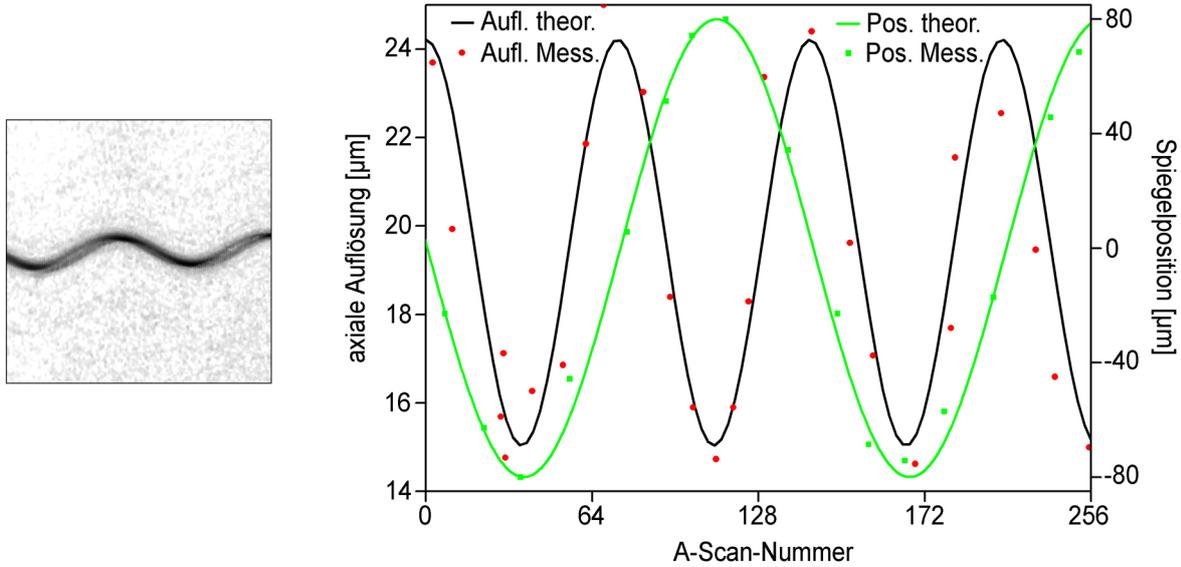


ABBILDUNG 4.18.: Vergleich zwischen theoretischer und experimenteller Analyse der Auflösungsverbreiterung in Relation zur Bewegung eines Silberspiegels mit $f=110$ Hz und $A=80$ μm . Die Dauer eines Sweeps betrug $62,5$ μs . Links: SSOCT-Aufnahme des bewegten Spiegels mit 256 A-Scans.

an diesen wenigen Stellen möglich ist. Bei der SSOCT beeinträchtigt der Dopplerfehler die Qualität der Aufnahmen entscheidend. Mit zunehmender Geschwindigkeit treten immer stärkere Überlagerungen der Gewebestrukturen auf, die in einer Unschärfe resultieren. Bei sehr hohen Geschwindigkeiten ist der Dopplerfehler so stark ausgeprägt, dass die dadurch entstandene Bildinformation fälschlicherweise als Epithel interpretiert werden könnte (vgl. Abbildung 4.16). In allen Aufnahmen ist jedoch die Amplitude und Frequenz der Grundschwingung eindeutig messbar, so dass alle Verfahren gleichermaßen für eine Untersuchung von Stimmlippenschwingungen geeignet sind.

4.3.3. Transversale Bewegungen

Transversale Bewegungsartefakte treten auf, wenn sich Applikator und Probe während der Dauer eines A-Scans T_{A-Scan} relativ zueinander entlang einer transversalen Koordinate, zum Beispiel in x -Richtung, bewegen. Der Einfachheit halber werden Bewegungen während eines A-Scans als gleichförmig angenommen werden, so dass sich die Positionsänderung während eines A-Scans aus

$$\Delta x = |v_x T_{A-Scan}| \quad (4.16)$$

ergibt. Sie hat zur Folge, dass das laterale Strahlprofil breiter wird und somit effektiv eine größere Fläche auf der Probe beleuchtet wird. Dementsprechend verbreitert sich die laterale Auslösung nach [Yun04] um den Faktor

$$\frac{w_x}{w_0} = \sqrt{1 + 0,5 \frac{\Delta x^2}{w_0^2}} \quad , \quad (4.17)$$

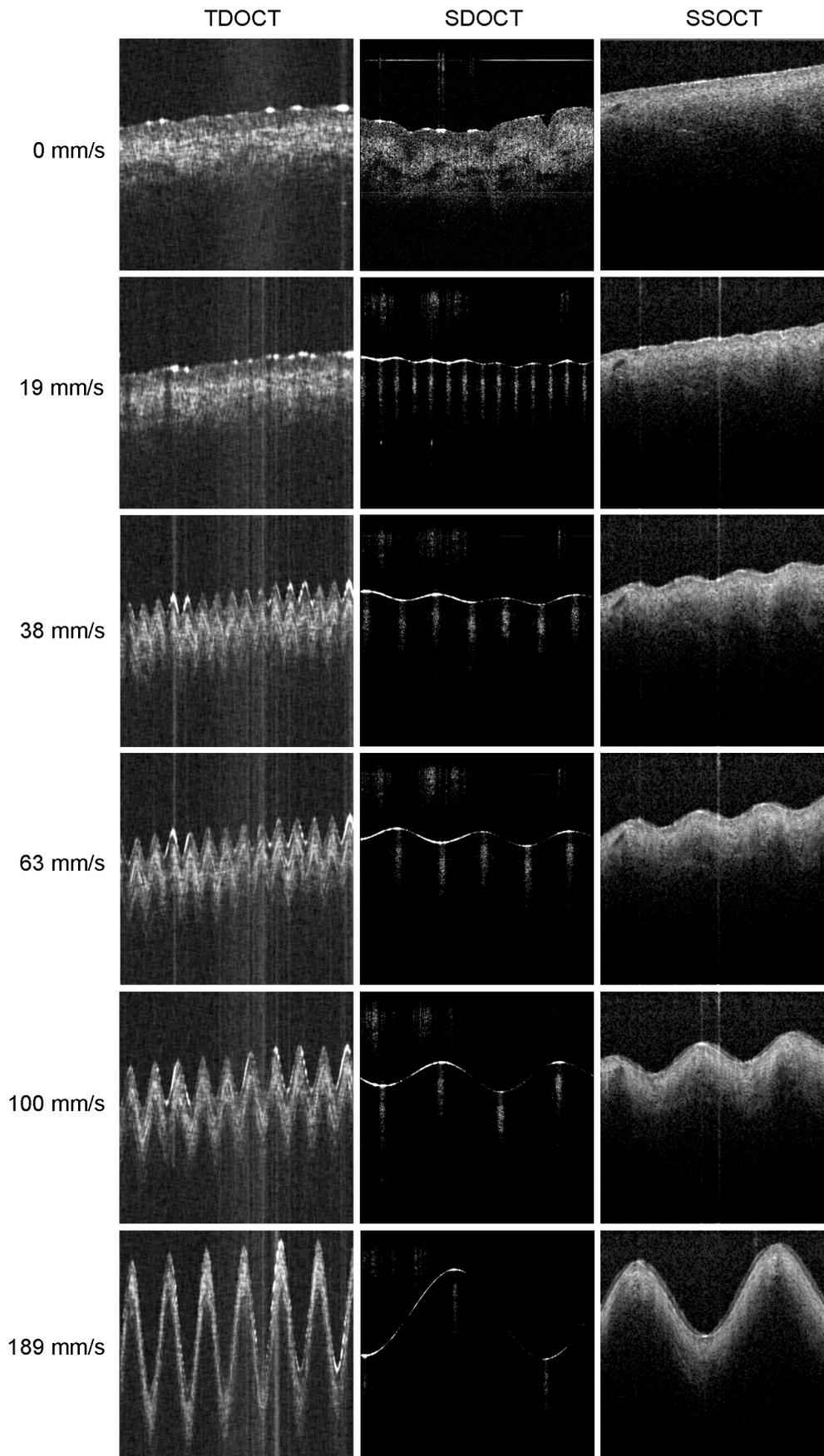


ABBILDUNG 4.19.: Vergleich der axialen Bewegungsartefakte bei TDOCT, SDOCT und SSOCT anhand von extrahierten Schweinestimmklippen für verschiedene maximale Geschwindigkeiten der induzierten Bewegung. Die Bildgröße beträgt jeweils 2×2 mm.

was sich in OCT-Bildern als Unschärfe in transversaler Richtung auswirkt. Diese Betrachtung gilt gleichermaßen für alle OCT-Messmethoden. Abbildung 4.20 zeigt die Verbreiterung der lateralen Auflösung in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit für die drei hier verwendeten Systeme. Hieraus

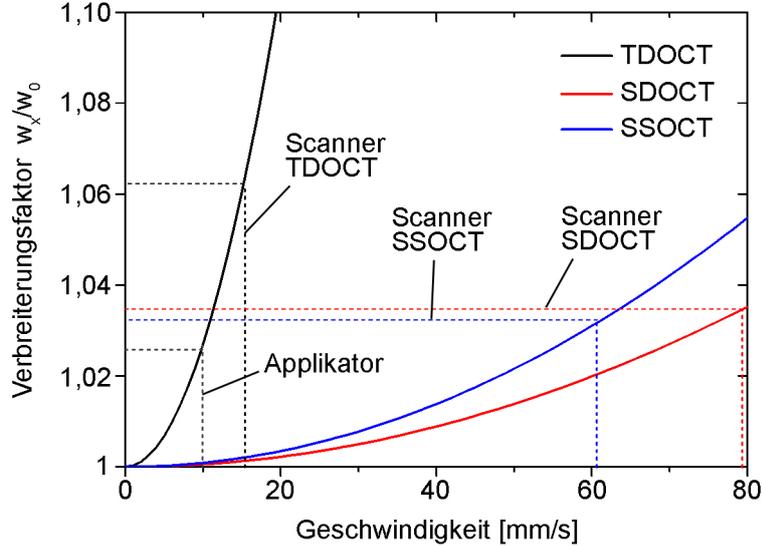


ABBILDUNG 4.20.: Verbreiterung der lateralen Auflösung in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit für die drei hier verwendeten Systeme. Es wurde jeweils ein $w_0=15\ \mu\text{m}$ angenommen. Die gestrichelten Linien kennzeichnen die Geschwindigkeiten der Scanner und des Applikators bei der Stimmlippenuntersuchung.

wird ersichtlich, dass transversale Bewegungen durch die Scanner oder des Applikators jedoch nur sehr geringe Verbreiterungen der lateralen Auflösung verursachen und in den OCT-Bildern kaum wahrnehmbar sein werden. Durch die Bewegung des Scanners in der TDOCT beispielsweise verbreitert sich die ohne Bewegung gemessene Auflösung um lediglich $1\ \mu\text{m}$.

Neben der Verschlechterung des lateralen Auflösung haben transversale Bewegungen einen Abfall des SNR zur Folge, der von den Streueigenschaften der untersuchten Probe abhängt. Durch die Verschiebung der Probe trägt ein einzelnes Streuzentrum nur für einen Bruchteil von T_{A-Scan} zum Streusignal bei, so dass das resultierende Signal entsprechend kleiner ist. Für eine Probe mit einer zufälligen Verteilung von Streuzentren trägt zwar eine höhere Anzahl Streuzentren zum Signal bei, jedoch mit verminderten Amplituden und zufälligen Phasen [Wal08]. Nimmt man an, dass sich die Streusignale verschiedener Streuzentren nicht kohärent überlagern, verhält sich die über die Speckle gemittelte Signalleistung proportional zur Breite der Intensitätsverteilung [Yun04]. Das SNR sinkt also mit zunehmender Geschwindigkeit. Der SNR-Verlust kann für TDOCT und FDOCT durch den Faktor

$$\Gamma \approx 10 \log \left(1 + 0,5 \frac{\Delta x^2}{w_0^2} \right)^\alpha, \quad \alpha = [0, 1] \quad (4.18)$$

angegeben werden kann [Wal08]. α ist eine von der Streueigenschaften der Probe abhängige Konstante und liegt für stark streuendes biologisches Gewebe um 0,5 [Wal08]. Bei SSOCT muss die

Konstante σ berücksichtigt werden, so dass der SNR-Verlust hier durch

$$\Gamma \approx 10 \log \left(1 + \sigma^2 \frac{\Delta x^2}{w_0^2} \right)^\alpha, \quad \alpha = [0, 1] \quad (4.19)$$

berechnet wird [Yun04]. In Abbildung 4.21 sind die Verläufe für die drei Messmethoden für $\alpha=0,5$ dargestellt. Auch der SNR-Verlust durch die transversalen Bewegungen der Scanner und des Ap-

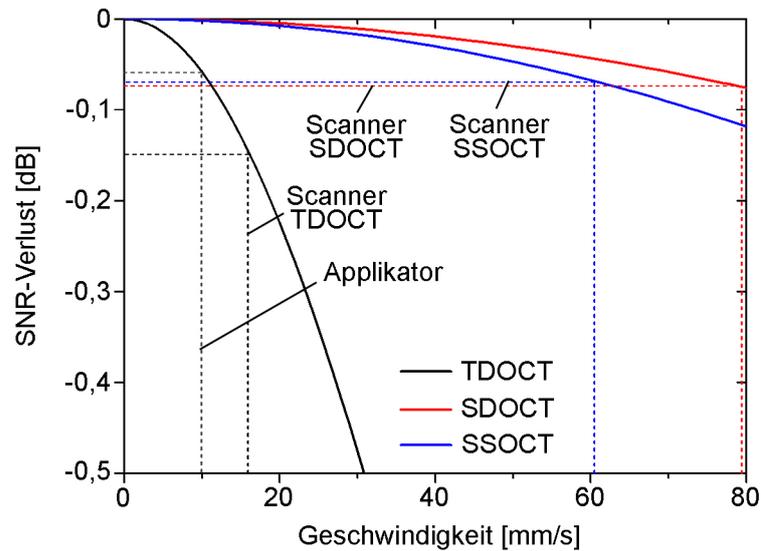


ABBILDUNG 4.21.: Abnahme des SNR in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit für die drei hier verwendeten Systeme. Es wurde jeweils ein $w_0=15 \mu\text{m}$ angenommen. Die gestrichelten Linien kennzeichnen die Geschwindigkeiten der Scanner und des Applikators bei der Stimmlippenuntersuchung.

plikators bei der Stimmlippenuntersuchung wirkt sich demnach theoretisch kaum messbar auf die Qualität der OCT-Bilder aus.

Zur Untersuchung des Einflusses transversaler Bewegungen auf die Qualität von OCT-Aufnahmen wurden extrahierte Schweinestimmklippen mit den drei verschiedenen OCT-Methoden bei einer konstanten Geschwindigkeit $v_x=10 \text{ mm/s}$ vermessen und mit Bildern von nicht bewegten Stimmlippen verglichen (siehe Abbildung 4.19). In den OCT-Aufnahmen aller Methoden sind - wie erwartet - keinerlei Artefakte erkennbar. Nach [Yun04] würden erst Auslenkungen der Probe um das Vierfache des ursprünglichen Strahldurchmessers auf der Probe während eines A-Scans zu merklichen Beeinträchtigungen der Bildqualität führen. Zu solch großen Auslenkungen würde es bei dem hier verwendeten TDOCT-System erst ab Geschwindigkeiten von etwa 100 mm/s , bei den beiden FDOCT- und SSOCT-Systemen sogar erst ab Geschwindigkeiten von etwa $500\text{-}600 \text{ mm/s}$ kommen. Während der normalen Untersuchungssituation mit einem OCT-gestützten Laryngoskop treten weder durch den Tremor des Arztes und bei der Bewegung des lateralen Scanners, also bei der Bewegung des Applikators, noch bei der Kopfbewegung des Patienten, also der Bewegung der Probe, solch hohe Geschwindigkeiten auf. Artefakte durch transversale Bewegungen beeinträchtigen die Bildqualität der OCT-Aufnahmen während der Untersuchung nicht und können daher vernachlässigt werden.

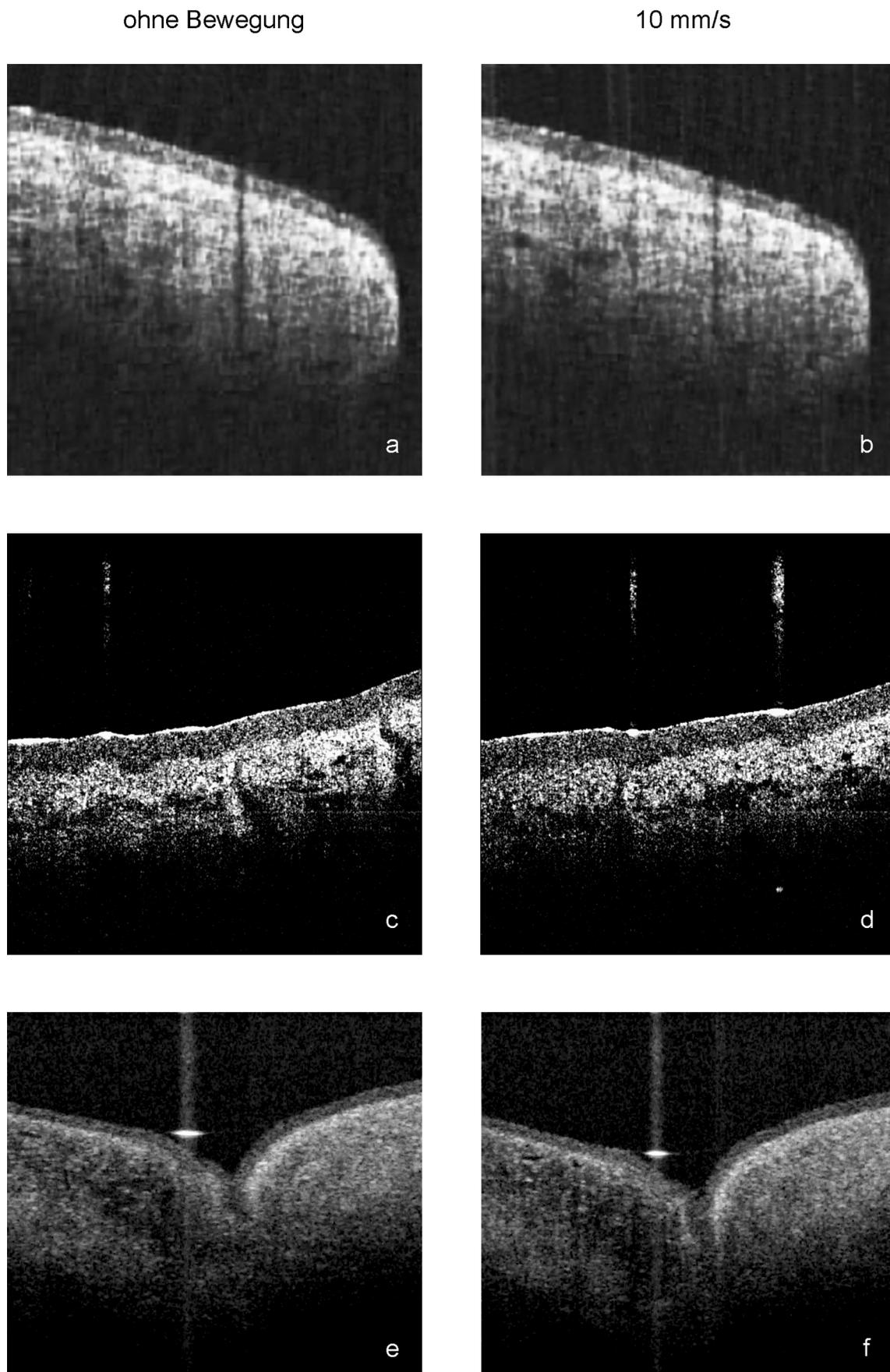


ABBILDUNG 4.22.: Vergleich von TDOCT-, FDOCT- und SSOCT-Aufnahmen extrahierter Schweinestimmklippen ohne Bewegung (a,c,e) und mit einer transversalen Geschwindigkeit von $v_x=10$ mm/s (b,d,f). Die Bildgröße beträgt jeweils 2×2 mm.

4.4. Technische Umsetzung der Anforderungen

Das Gesamtkonzept des OCT-gestützten Laryngoskops verknüpft insgesamt vier unterschiedliche Funktionen. Neben den kollinearen Strahlengängen für die OCT- und Videobildgebung wird der Strahlengang eines sichtbaren Pilotlasers durch dasselbe optische System übertragen. Er dient der Visualisierung des OCT-Scanbereichs auf der Oberfläche der Stimmlippen. Zudem werden in einem äußeren Hüllrohr Faserbündel zur Beleuchtung der Probe mit sichtbarem Licht geführt. Ein schematischer Aufbau des Laryngoskops ist in Abbildung 4.23 gezeigt.

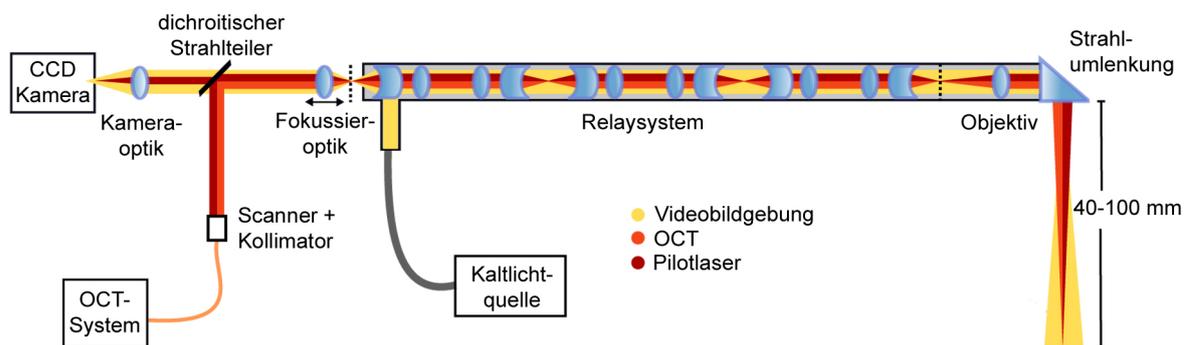


ABBILDUNG 4.23.: Gesamtkonzept des OCT-gestützten Laryngoskops, das neben den kollinearen Strahlengängen für die OCT- und Videobildgebung den Strahlengang eines sichtbaren Pilotlasers durch dasselbe optische System überträgt (nach [Roh09]).

Das optische System setzt sich aus mehreren Subsystemen zusammen. Im Endoskoprohr befindet sich zum einen das Objektiv, und zum anderen ein dreistufiges Relaysystem, welches das Zwischenbild des Objektivs an das proximale Ende des Endoskopschaftes überträgt. Distal befindet sich ein Prisma oder ein Spiegel zur Umlenkung der Strahlengänge um 70° oder 90° . Durch eine bewegliche Fokussieroptik proximal des Endoskopschaftes kann die Bildweite des Objektivs und damit der Arbeitsabstand für die OCT- und Videobildgebung synchron verändert werden. Ein dichroitischer Strahlteiler transmittiert das sichtbare Licht des Videostrahlengangs und des Pilotlasers, das anschließend mit Hilfe eines Kameraokulars auf einen Kamerasensor abgebildet wird. Für nahinfrarotes Licht ist der Strahlteiler dagegen hochreflektiv, so dass der OCT-Strahlengang um 90° umgelenkt wird.

Der laterale OCT-Scan kann bei kollinearer Strahlführung nicht distal durchgeführt werden, da der Videostrahlengang durch einen distalen Scanspiegel ebenfalls umgelenkt werden würde und sich die Abbildung kontinuierlich mit der Scangeschwindigkeit auf dem Kamerasensor bewegen würde. Bei parallelem Durchgang des Videostrahlengangs durch den Strahlteiler wäre ein Scan durch Verkippen des Strahlteilers möglich, ohne die Abbildung sichtbar zu beeinträchtigen. Hier wird der laterale Scan jedoch bereits vor dem Strahlteiler und der Kollimationsoptik in der Spitze der optischen Faser durchgeführt, mit der das Laryngoskop mit dem eigentlichen OCT-System verbunden ist (siehe Abbildung 4.42).

Entsprechend der Designdaten des Optiksystems wurde ein Funktionsmuster konstruiert und gefertigt, das die Untersuchung am wachen Patienten ermöglicht. Die einzelnen Schritte vom ersten Entwurf der einzelnen Subsysteme bis zum fertigen Funktionsmuster werden in den folgenden Abschnitten erläutert.

4.4.1. Optikdesign für synchrone OCT- und Videobildgebung

Die geometrische Optik kann bei der Berechnung optischer Systeme als Näherung verwendet werden, wenn die abzubildenden Objekte und die Aperturen innerhalb des optischen Systems viel größer als die verwendete Wellenlänge des Lichtes ist. Dann können Phänomene, die im Zusammenhang mit den Welleneigenschaften des Lichtes stehen, wie zum Beispiel Beugungseffekte und Interferenz vernachlässigt werden. Die Ergebnisse der geometrischen Optik haben in diesem Fall eine ausreichend hohe Präzision [Sin05]. Für das Design der Videobildgebung ist die geometrische Optik also eine ausreichende Näherung. Bei der Betrachtung des OCT-Strahlengangs müssen die wellenoptischen Effekte jedoch berücksichtigt werden, da die darzustellenden Gewebestrukturen nur wenige μm groß sind. Zudem hat die optische Faser, in die das zurückgestreute Licht wieder eingekoppelt werden muss, einen Kerndurchmesser von ebenfalls nur wenigen μm , der im OCT-Strahlengang die begrenzende Apertur darstellt.

Die einzelnen Subsysteme wurden zunächst durch paraxiale Gleichungen entsprechend der Spezifikationen für einen Arbeitsabstand von 70 mm entworfen und mittels computergestütztem geometrisch-optischen Raytracing in der Software *ZEMAX* optimiert. Anschließend wurden sie zu einem Gesamtsystem zusammengeführt und erneut durch Raytracing für Arbeitsabstände zwischen 40 mm und 100 mm optimiert. Abschließend wurde der OCT-Strahlengang mit Hilfe der *Physical Optics Propagation (POP)* in *ZEMAX* berechnet und hinsichtlich der Rückkopplungseffizienz in die optische Faser optimiert. Im Rahmen der POP werden numerische Algorithmen verwendet, die die Propagation der Wellenfronten mittels Beugung berechnen. Sie liefert daher korrektere Ergebnisse als geometrisch-optisches Raytracing [Zem07].

Objektiv

Aus der Spezifikation der lateralen Auflösung von mindestens 20 μm lässt sich mit Gleichung (3.19) die geforderte objektseitige $NA=0,035$ berechnen. Mit der paraxialen Näherung

$$\frac{h}{L} = \tan \alpha \approx \sin \alpha = \frac{NA}{n} \quad (4.20)$$

lässt sich aber zeigen, dass die NA durch den maximalen Radius der Eintrittspupille $h = 2,7$ mm, der der freien Öffnung der ersten Optik von 90% des Linsenradius von 3 mm entspricht, auf einen Wert von 0,033 beschränkt ist. Zusammen mit dem spezifizierten Objektradius $y = 15$ mm kann nach

(4.2) die optische Invariante bestimmt werden:

$$H = NA y = 0,495 \text{ mm}. \quad (4.21)$$

Mit Hilfe von $\tan \beta = \frac{y}{L}$ kann der Feldwinkel $\beta = 10,5^\circ$ bestimmt werden, mit dem sich zusammen mit der maximalen Bildgröße $y' = -2,8 \text{ mm}$, die dem Innendurchmesser des Endoskoprohres abzüglich Linsenabstandshaltern entspricht, die objektseitige Gesamtbrennweite des Objektivs f'_{ges} berechnen lässt [Hop76]:

$$f'_{ges} = \frac{y'}{n \tan \beta} = -15,12 \text{ mm}. \quad (4.22)$$

Für eine dünne Linse liegen die Hauptebenen übereinander, so dass $f'_{ges} = -f'_{ges}$ gilt. Weitere wichtige Kenndaten des Objektivs sind die Vergrößerung M

$$M = \frac{y'}{y} = \frac{NA}{NA'} = 0,186 \quad (4.23)$$

und die Blendenzahl k , die ein Maß für die relative Öffnung also für die Lichtstärke (*engl. speed*) des Objektivs ist [Gro05],

$$k = \frac{f'}{2h} = 2,8. \quad (4.24)$$

Streng genommen gilt (4.24) nur für unendliche Objektweiten. Da die Objektweite jedoch endlich ist, kann die hier berechnete Blendenzahl lediglich eine Abschätzung sein.

Mit Hilfe des Feldwinkels und der Blendenzahl kann nun aus der Vielzahl bekannter Designs ein passender Objektivtyp ausgewählt werden (siehe Abbildung 4.24). Hier ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Blendenzahl wieder für eine unendliche Objektweite angegeben ist, die Designs also ebenfalls für Objekte im Unendlichen ausgelegt sind. Für einen Feldwinkel von $10,5^\circ$ und einer Blenden-

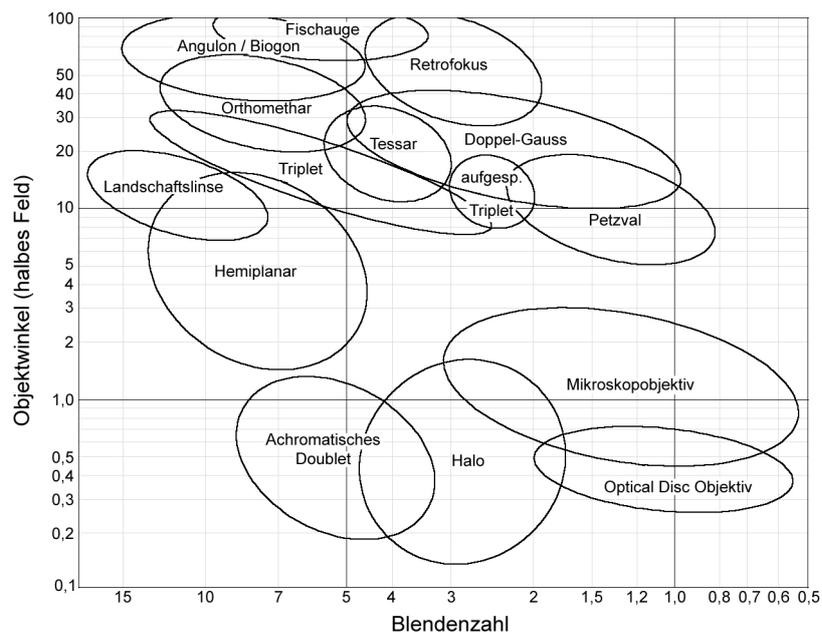


ABBILDUNG 4.24.: Auswahl des Objektivtyps nach Objektwinkel und Blendenzahl (nach [LIN09]).

zahl von $k=2,8$ bieten sich beispielsweise Triplets, aufgespaltene Triplets oder Doppel-Gauß-Designs an. Für das hier entwickelte Objektiv wurde allerdings der Retrofokustyp, oft auch als invertiertes Telephoto-Objektiv bezeichnet, gewählt. Es besteht aus einer negativen Gruppe im vorderen Bereich und einer positiven Gruppe im hinteren Bereich (siehe Abbildung 4.25d). Dieser Typ wird eigentlich

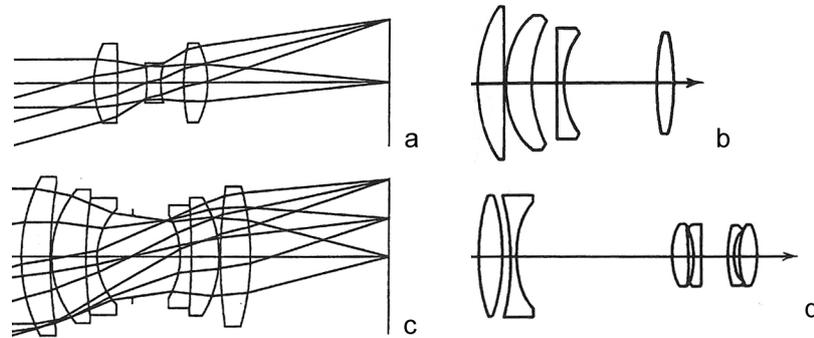


ABBILDUNG 4.25.: Mögliche Designtypen für das Endoskopobjektiv (nach [Fis08, Smi00]): Cooke-Triplett (a), vorne aufgespaltenes Triplet (b), Doppel-Gauß (c) und Retrofokustyp (d).

für sehr große Bildwinkel eingesetzt, bietet jedoch für das Endoskopdesign den Vorteil, dass die bildseitige Schnittweite s' , also der Abstand von der Linsenoberfläche bis zum Brennpunkt, größer ist als die effektive Brennweite des Objektivs f'_{ges} und die beiden Linsengruppen daher sehr weit auseinander gezogen werden können (siehe Abbildung 4.26). In diesen Zwischenraum kann zum Beispiel ein Bildumkehrprisma oder ein Umlenkprisma eingefügt werden [Lei88].

Über den Ansatz für dünne Linsen werden zunächst die Brennweiten der positiven und negativen Linsengruppe f'_n und f'_p mit

$$f'_n = \frac{d f'_{ges}}{f'_{ges} - s'} \quad \text{und} \quad f'_p = \frac{-d s'}{f'_{ges} - s' - d} \quad (4.25)$$

abgeschätzt [Smi05]. Der Abstand d zwischen den Linsengruppen beträgt 10 mm, wenn die Kanten-

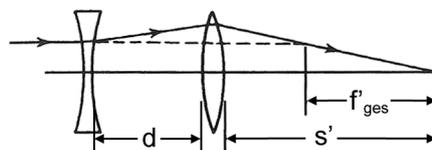


ABBILDUNG 4.26.: Vereinfachte Darstellung eines Retrofokusobjektivs mit negativer Gruppe im vorderen Bereich und positiver Gruppe im hinteren Bereich (nach [Smi00]). s' ist die bildseitige Schnittweite und f' die effektive Gesamtbrennweite des Objektivs.

länge eines möglicherweise zu verwendenden Prismas dem Innendurchmesser des Endoskoprohres von 6 mm entspricht und beidseitig ein Abstand von jeweils 2 mm angenommen wird. Da die Schnittweite größer ist als die effektive Gesamtbrennweite $f'_{ges}=15,12$ mm und wird sie hier mit $s'=20$ mm angenommen. Daraus ergeben sich $f'_n=-30,98$ mm und $f'_p=13,44$ mm. Für ein erstes reales Design

werden zusätzlich noch Linsenradien und Glassorten benötigt. Die einfachste Realisierung einer Negativkomponente ist eine Plankonkavlinse, deren konkave Krümmung R_2 durch

$$\frac{1}{f'_n} = (n - 1) \left(\frac{1}{R_1} - \frac{1}{R_2} \right) \quad (4.26)$$

berechnet werden kann [Smi05]. Die erste Oberfläche hat in dem Fall den Radius $R_1 = \infty$. Für das Glas N-BK7 zum Beispiel mit einem Brechungsindex $n_d = 1,5168$ ergibt sich ein Krümmungsradius von $R_2 = 16,01$ mm.

Eine typische positive Gruppe ist ein achromatisches Dublett, das aus zwei Linsen mit unterschiedlicher Dispersion, also verschiedenen Abbezahlen, besteht. Das positive Element besteht in der Regel aus einem Kronglas, das negative Element aus einem höher dispersiven Flintglas. Die Brennweiten der Elemente werden nach

$$f'_{p1} = \frac{f'_p (V_{p1} - V_{p2})}{V_{p1}} \quad \text{und} \quad f'_{p2} = \frac{f'_p (V_{p2} - V_{p1})}{V_{p2}} \quad (4.27)$$

über die Abbezahlen V_{p1} und V_{p2} der beiden Gläser sowie die Gesamtbrennweite f'_p der positiven Gruppe bestimmt [Smi05]. Die Krümmungsradien können analog zu Gleichung (4.26) bestimmt werden. Die beiden Krümmungsradien des positiven Element werden zunächst als gleich angenommen $R_{11} = -R_{12}$, der erste Radius des negativen Elementes ist ebenfalls gleich $R_{21} = R_{12}$. Eine typische Materialkombination ist nach [Smi05] N-BAK1 für das positive Element und N-SF8 für das negative Element. Daraus ergeben sich folgende Radien: $R_{11} = 7,02$ mm, $R_{12} = -7,02$ mm, $R_{21} = -7,02$ mm und $R_{22} = -73,88$ mm. Der entsprechende erste Entwurf des Objektivs ist in Abbildung 4.27 dargestellt. Dieses anfängliche Design zeigt noch mehrere Schwächen. Zum einen leidet es unter starker

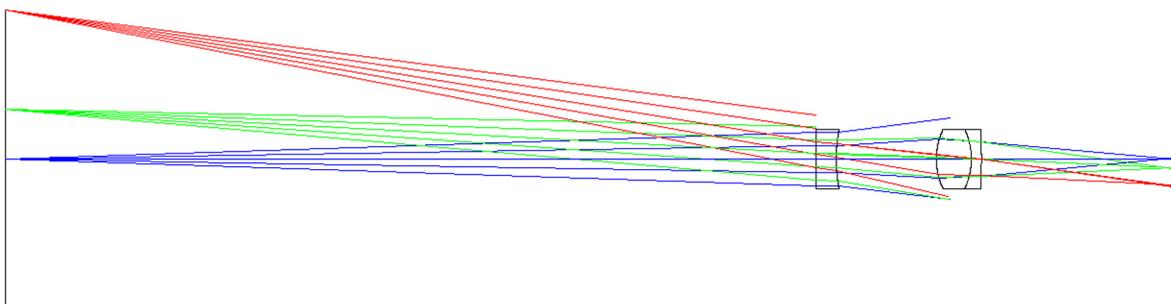


ABBILDUNG 4.27.: Der erste Entwurf des Objektivs leidet unter starker Vignettierung und Bildfeldwölbung.

Vignettierung, dargestellt durch die unterbrochenen Strahlen, zum anderen sind noch erhebliche Aberrationen dritter Ordnung vorhanden. In Abbildung 4.27 ist zum Beispiel eine Bildfeldwölbung erkennbar, die Strahlen für größere Feldwinkel schneiden sich vor der eigentlichen Bildebene. Zudem ist die Bildgröße mit einem Radius von $y' = 2,93$ mm etwas zu groß für die freie Öffnung der Optiken.

Aufgrund von starker Vignettierung im Relaysystem musste die optische Invariante H und wegen (4.21) auch die Objektgröße schrittweise auf 9,8 mm reduziert werden. Ebenso wurde die Bildgröße

auf 1,78 mm herabgesetzt, so dass sich für das endgültige Design eine Vergrößerung von $M=0,182$ ergibt. Vor die Negativkomponente wurde zusätzlich eine Positivlinse eingefügt um die Abberationen dritter Ordnung, vor allem die Verzeichnung, zu verringern [Mal04]. Nach der Optimierung durch Substitution der Glassorten und Anpassung der Krümmungsradien ergibt sich das endgültige Design mit den genannten Parametern. Das entsprechende Layout ist in Abbildung 4.28 dargestellt. Eine

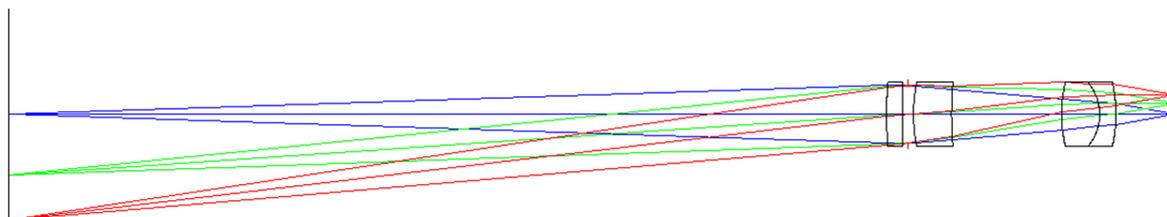


ABBILDUNG 4.28.: Endgültiges Layout des Laryngoskopobjektivs.

Übersicht über die Designdaten und einige Fehleranalysen sind in den Abbildungen A.1 und A.2 im Anhang zu finden.

Ein objektseitig telezentrisches Design ist für das hier entwickelte Objektiv aufgrund der zu kleinen Linsendurchmesser nicht möglich. Nach Gleichung 4.20 entspricht der Radius der Eintrittspupille $h=2,7$ mm bei einer $NA=0,033$ gerade dem Radius der freien Apertur der Optiken. Da die Hauptstrahlen aller Objektpunkte, also alle Punkte auf der lateralen Scanlinie mit einer geforderten Breite von mindestens 2 mm, im Falle objektseitiger Telezentrie parallel zur optischen Achse verlaufen, wäre ein um 1 mm größerer Eintrittspupillenradius nötig (siehe Abbildung 4.29). Das würde einen

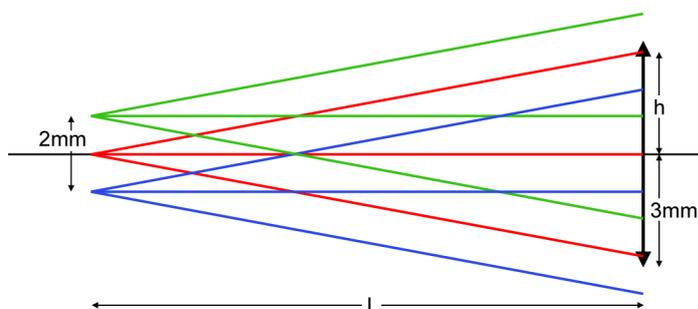


ABBILDUNG 4.29.: Eine objektseitige Telezentrie ist mit den Spezifikation für das OCT-gestützte Laryngoskop nicht möglich.

Linsendurchmesser von mindestens 8,2 mm bedeuten, was für einen Gebrauch in konventionellen Laryngoskopen jedoch zu groß ist.

Relaysystem

Als Startpunkt für das Design des Relaysystems bietet sich die bildseitige NA' des Objektivs an, die gleichzeitig die objekt- und bildseitige Apertur des Relays ist. Sie kann mit Hilfe von Gleichung

(4.23) berechnet werden und beträgt hier $NA_{rel}=NA'_{obj}=0,179$. Dieser Wert kann nur mit drei Relaystufen bei ausreichend geringer Vignettierung aufrecht erhalten werden. Da die Übertragungsstrecke des Relays der Länge des Endoskoprohres von 200mm abzüglich der Länge des Objektivs von 30mm entspricht, beträgt die Länge einer symmetrischen Stufe 56,67mm bzw. die halbe Länge $L=28,33$ mm. Abbildung 4.30 zeigt den vereinfachten Aufbau einer halben Relaystufe.

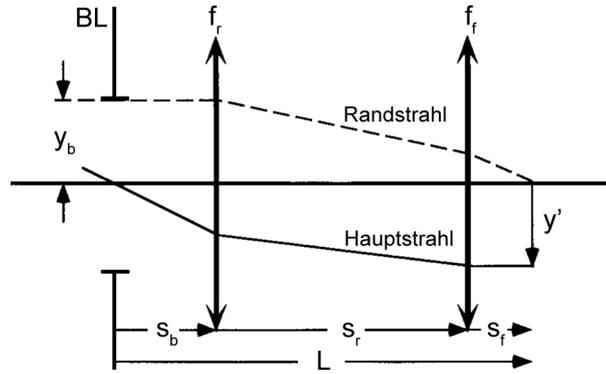


ABBILDUNG 4.30.: Zweite Hälfte einer symmetrischen Relaystufe, vereinfacht durch dünne Linsen (nach [Tom96]). f_r =Brennweite der Relaylinse, f_f =Brennweite der Feldlinse, BL=Aperturblende.

Zunächst kann die Gesamtbrennweite f'_{ges} über die Definition der Blendenzahl (siehe Gleichung (4.24)) bestimmt werden. Der Radius der Eintrittspupille h entspricht hier dem Radius der Aperturblende $y_b=2,7$ mm, der sich aus der freien Öffnung der Linsen ergibt. Berücksichtigt man zusätzlich $k=\frac{1}{2n'\sin\alpha'}=\frac{1}{2NA'}$ [Gro05], kann die Gesamtbrennweite durch

$$f'_{ges} = k \cdot 2 y_b = \frac{y_b}{NA'} \quad (4.28)$$

berechnet werden. Im nächsten Schritt wird nach [Tom96] der Abstand d zwischen Relayobjektivlinse und Feldlinse durch

$$d = \left[\frac{1 - \frac{1}{f'_{ges}} (L - s_f) s_f}{1 - \frac{1}{f'_{ges}} s_f} \right] f'_{ges} \quad (4.29)$$

bestimmt. Hierzu ist allerdings die Spezifikation der bildseitigen Schnittweite s_f notwendig. Da als Platzbedarf für die Halterung der Feldlinsen zweier aufeinander folgender Stufen 2mm angenommen wurde und sich Lage der Zwischenbildebenen aufgrund der Fokussierung um wenige Millimeter verschiebt, wurde s_f zunächst auf 2mm spezifiziert und während des Designs auf 2,7mm angehoben.

Die letzte fehlende Länge, die Schnittweite s_b , kann durch

$$s_b = L - d - s_f \quad (4.30)$$

berechnet werden. Über die Schnittweiten ist es nun möglich, die Brennweiten der Relayobjektivlinse f'_r und der Feldlinse f'_f zu ermitteln [Gro05]:

$$s_b = \frac{f'_r (f'_f - d)}{f'_r + f'_f - d} = \frac{f'_{ges} (f'_f - d)}{f'_f} \quad \text{und} \quad s_f = \frac{f'_f (f'_r - d)}{f'_r + f'_f - d} = \frac{f'_{ges} (f'_r - d)}{f'_r}. \quad (4.31)$$

Für die Relayobjektivlinse ergibt sich eine Brennweite von $f'_r=15,55$ mm und für die Feldlinse $f'_f=87,16$ mm. Die Wahl der Glassorten und Linsenradien erfolgt analog zum Design des Objektivs entsprechend der Gleichungen (4.26) und (4.27). Innerhalb von Relaysystemen haben Feldlinsen in der Regel eine Meniskusform, um die Bildfeldwölbung zu minimieren [Tom96], wobei die Krümmungsradien nicht gleich sein können. Die konvex gekrümmte Oberfläche ist in Richtung des Objektes gerichtet. Für das Flintglas N-SF4 mit dem Brechungsindex $n_d=1,75513$ können die Radien zum Beispiel die Werte $R_{f1}=-5,0$ mm und $R_{f2}=-4,647$ mm annehmen. Das Design des Relay-Achromaten geschieht zunächst analog zur positiven Gruppe des Objektivs. Mit den gleichen Gläsern N-BAK1 und N-SF8 ergeben sich für das positive Element die Radien $R_{r1}=8,118$ mm und $R_{r2}=-R_{r1}=-8,118$ mm und für das negative Element $R_{r3}=-84,847$ mm. Das vorläufige Design ist in Abbildung 4.31 dargestellt. Ähnlich wie beim Objektiv leidet der erste Entwurf unter starker Vi-

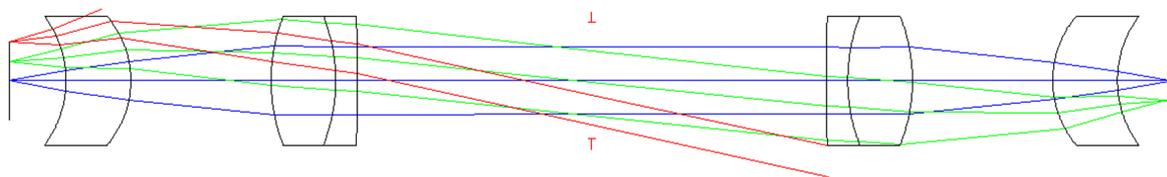


ABBILDUNG 4.31.: Erster Entwurf einer symmetrischen Relaystufe.

gnettierung. Durch Substitution der Gläser und Optimierung der Radien und Linsenabstände konnte auch hier ein gutes Design mit nur wenig Vignettierung erreicht werden (siehe Abbildung 4.32). Die

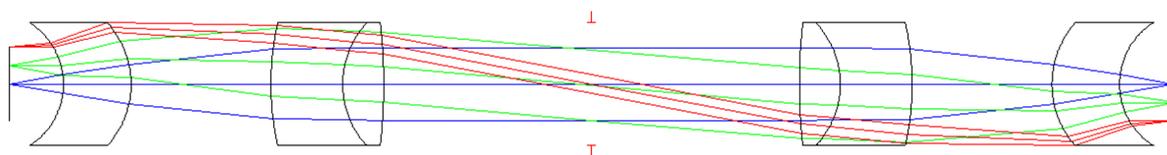


ABBILDUNG 4.32.: Symmetrische Relaystufe bestehend aus zwei Achromaten als Relaylinsen und zwei Meniskuslinsen als Feldlinsen.

Daten und Analysen des endgültigen Relaysystems sind in den Abbildungen A.3 und A.4 im Anhang zu finden.

Fokussieroptik

Die Spezifikationen für die Fokussieroptik wurden zunächst für den mittleren Arbeitsabstand des Endoskops von 70 mm vorgenommen und im Laufe der Optimierung des Gesamtsystems angepasst. Da die Strahlen nach der Fokussieroptik möglichst parallel durch den Strahlteiler propagieren sollten, um zusätzlichen Astigmatismus zu vermeiden [Fis08], entspricht die objektseitige NA der Fokussieroptik der bildseitigen $NA'=0,179$ der letzten Relaystufe. Die Objektgröße y entspricht der Zwischenbildgröße $y'_r=1,78$ mm. Die Blendenzahl ist durch die paraxiale Näherung $k=\frac{1}{2NA'}$ gegeben, die für

Objektweiten im Unendlichen gilt. Bei der Fokussierlinse liegt die Bildweite im Unendlichen, es gilt daher $k = \frac{1}{2NA} = 2,79$. Für die Bestimmung der Brennweite nach Gleichung (4.24) ist der Durchmesser der Eintrittspupille notwendig, der über den Durchmesser des OCT-Strahls auf der Fokussieroptik hergeleitet werden muss. Für einen Strahldurchmesser von 5,5 mm (siehe Kapitel 4.4.3) beträgt die Brennweite also $f' = 15,3$ mm. Der Bildfeldwinkel kann nun durch Gleichung (4.22) berechnet werden und beträgt hier $\beta = 6,6^\circ$. Für das vorläufige Design wurde entsprechend der paraxialen Daten zunächst ein achromatisches Dublett gewählt, das jedoch während der Optimierung des Gesamtsystems um einen weiteren identischen Achromaten ergänzt wurde, da durch den symmetrischen Aufbau Aberrationen wie Astigmatismus und sphärische Aberration, vor allem aber Verzeichnung, erheblich reduziert wird (siehe Abbildung 4.33).

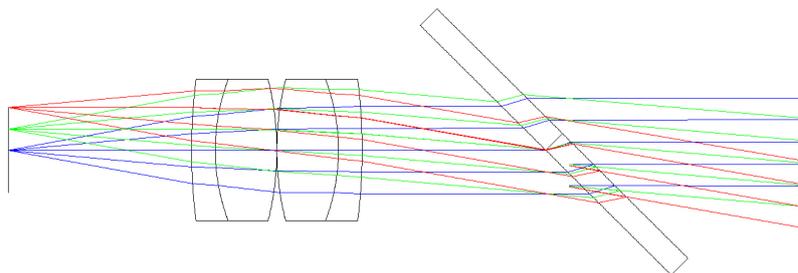


ABBILDUNG 4.33.: Fokussieroptik bestehend aus einer symmetrischen Anordnung zweier identischer Achromaten. Die Strahlen laufen parallel durch den dichroitischen Strahlteiler, um Abbildungsfehler an der planparallelen Platte zu vermeiden.

Wird der Arbeitsabstand zwischen 40 und 100 mm, also die Objektweite L zwischen 51 und 111 mm variiert, ändert sich die Bildweite des Objektivs y'_{obj} um $+1,8/-0,65$ mm (vgl. Abbildung 4.38). Diese relative Änderung hat aufgrund der Vergrößerung des Objektivs einen nichtlinearen Verlauf. Sie wird 1:1 durch das Relaysystem übertragen, so dass die Position der Fokussieroptik entsprechend angepasst werden muss, um eine scharfe Abbildung durch das Kameraobjektiv zu ermöglichen.

Kameraokular

Mit Hilfe der Spezifikationen für den objektseitigen Feldwinkel β und die Bildgröße y' kann mit Gleichung (4.22) die Gesamtbrennweite f'_{ges} des Kameraokulars ermittelt werden. β ist durch den maximalen Öffnungswinkel der parallelen Strahlenbündel nach der Fokussieroptik von $7,8^\circ$ gegeben, y' ergibt sich aus der Größe des Kamerasensors. Im Falle eines $1/2''$ -Sensors beträgt die kurze Seite der aktiven Fläche 4,8 mm, so dass $y' = 2,4$ mm ist. Die Gesamtbrennweite beträgt also $f'_{ges} = 18,4$ mm. Verwendet man für das Kameraokular wie für die Fokussieroptik Linsen mit einem Durchmesser von 8 mm, beträgt die freie Apertur 7,2 mm. Dieser Wert kann als Durchmesser der Eintrittspupille $2h$ betrachtet werden, so dass nach Gleichung (4.24) die Blendenzahl $k = 2,6$ berechnet werden kann. Aus den zahlreichen Designtypen für Okulare wurde für das endgültige Design ein Doppelanastig-

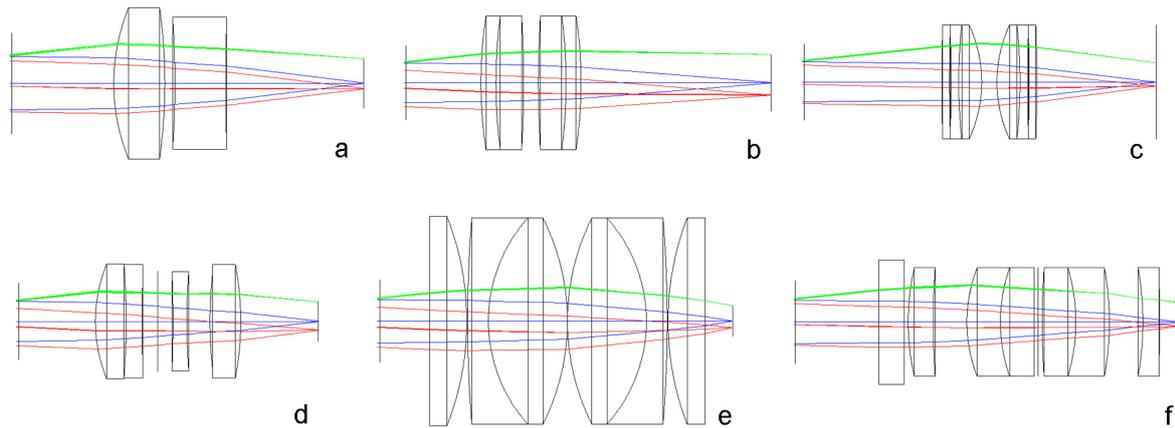


ABBILDUNG 4.34.: Verschiedene für das Laryngoskopsystem korrigierte Okulartypen (nach [Roh09]): Doublet (a), Aplanat (b), Apochromat (c), Triplet (d), Doppelanastigmat (e) und Doppel-Gauß (f).

mat gewählt (siehe Abbildung 4.34), der aufgrund der vollständig symmetrischen Anordnung und der Verteilung der Brechkraft auf mehrere Oberflächen nur geringe Aberrationen aufweist. Er besteht aus zwei Achromaten, die von zwei Plankonvexlinsen umgeben sind (siehe Abbildung 4.35). Die Funktion der Achromate liegt in der Korrektur der Farbfehler, die Plankonvexlinsen reduzieren den Öffnungswinkel vor dem Durchgang durch die Achromaten und somit die spärliche Aberration und Astigmatismus. Bei unendlicher Objektweite ist das Kameraokular bildseitig telezentrisch, die Hauptstrahlen laufen im Bildraum parallel zur optischen Achse. Die Daten und Analysen des endgültigen Relaysystems sind in den Abbildungen A.5 und A.6 im Anhang zu finden.

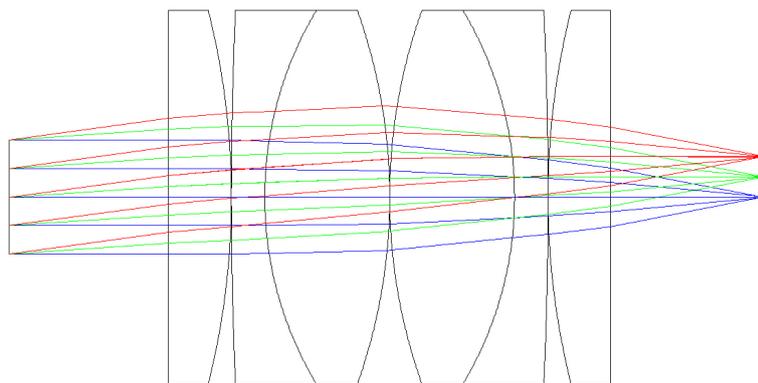


ABBILDUNG 4.35.: Kameraobjektiv bestehend aus zwei Achromaten und zwei Plankonvexlinsen. Durch die symmetrische Anordnung können die anteiligen Aberrationen teilweise ausgeglichen werden.

Gesamtsystem

Zunächst wurden die einzelnen Subsysteme zu einem Gesamtsystem zusammengesetzt und für einen mittleren Arbeitsabstand von 70 mm optimiert (siehe Abbildungen 4.36 und 4.36). Dabei wurden die

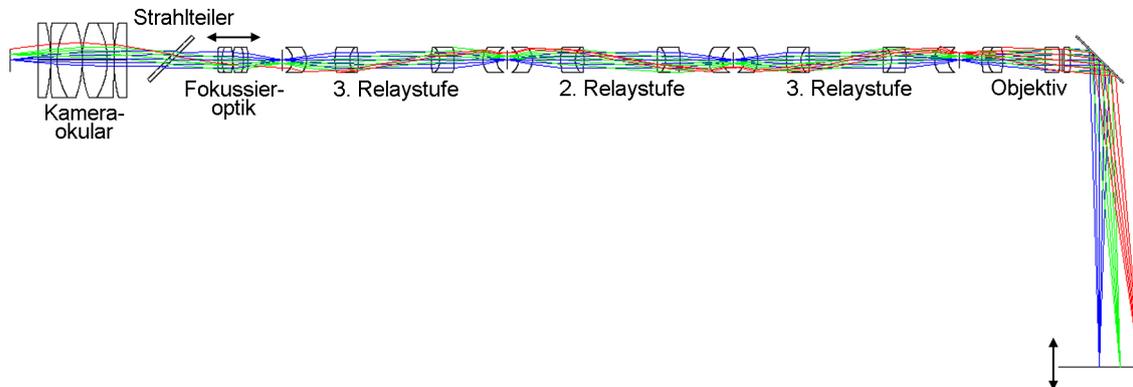


ABBILDUNG 4.36.: Gesamtsystem für den Videostrahlengang bestehend aus Umlenkspiegel, Objektiv, drei identischen symmetrischen Relaystufen, Fokussieroptik, Strahlteiler und Kameraokular. In der Bildebene befindet sich ein CCD-Sensor.

Abstände zwischen den Achromaten in den Relaystufen leicht verkürzt und dadurch die Vignettierung im Videostrahlengang entscheidend reduziert. Die Vergrößerung der einzelnen Stufen beträgt weiterhin $M=-1$, jedoch ist das Relaysystem nicht mehr exakt telezentrisch.

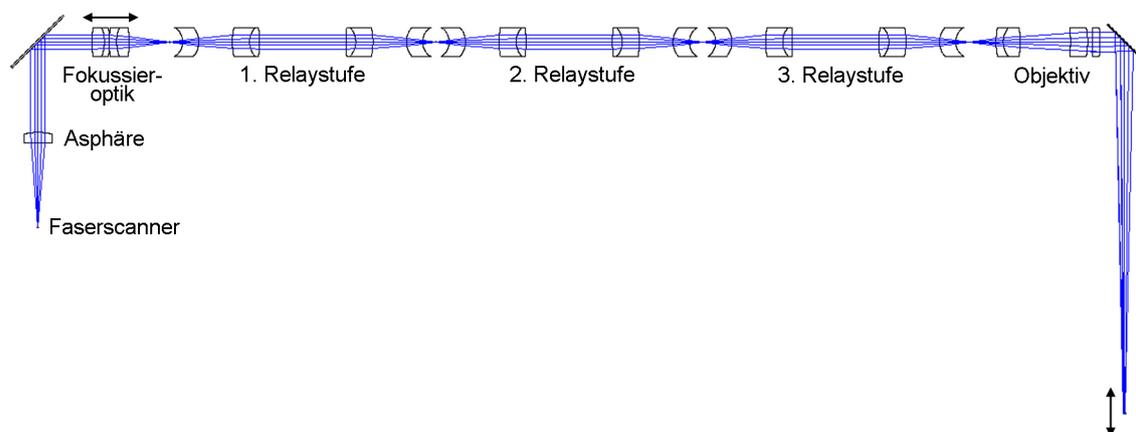


ABBILDUNG 4.37.: Gesamtsystem des OCT-Strahlengangs bestehend aus Umlenkspiegel, Objektiv, drei identischen symmetrischen Relaystufen, Fokussieroptik, Strahlteiler, asphärischer Kollimationslinse und Faserscanner.

Da sich die Brennweiten der Fokussieroptik, der Relaystufen und des Objektivs in Abhängigkeit von der Wellenlänge unterscheiden, ist eine synchrone Fokussierung von OCT- und Videostrahlengang nicht ohne leichte Modifikationen möglich. Damit die Position der Fokussieroptik für beide Strahlengänge gleich ist, müssen zum Beispiel die Strahlen des Videostrahlengangs hinter der Fokussieroptik

leicht konvergent verlaufen. Da der Konvergenzwinkel jedoch nur sehr klein ist, entsteht am Strahlteiler kaum Astigmatismus (siehe Abbildung A.7 im Anhang). Um für die OCT-Bildgebung die gleiche objektseitige $NA=0,033$ zu erreichen wie für den Videostrahlengang, wurden die Radien der Fokussieroptik und der Durchmesser des OCT-Strahls entsprechend angepasst.

Die Positionen der Fokussieroptik für die verschiedenen Arbeitsabstände wurden sowohl für den OCT- als auch für den Videostrahlengang getrennt ermittelt. Für den OCT-Strahlengang wurde dazu für jede Position der Fokussieroptik die Fokuslage am Ort des kleinsten Strahlradius bestimmt, für den Videostrahlengang wurden die Positionen der Fokussieroptik für verschiedene Arbeitsabstände anhand des kleinsten Spotradius in der Bildebene der Kameraokulars ermittelt (siehe Abbildung 4.38). Die Verläufe zeigen für Arbeitsabstände zwischen 60-100 mm einen exakt gleichen Verlauf,

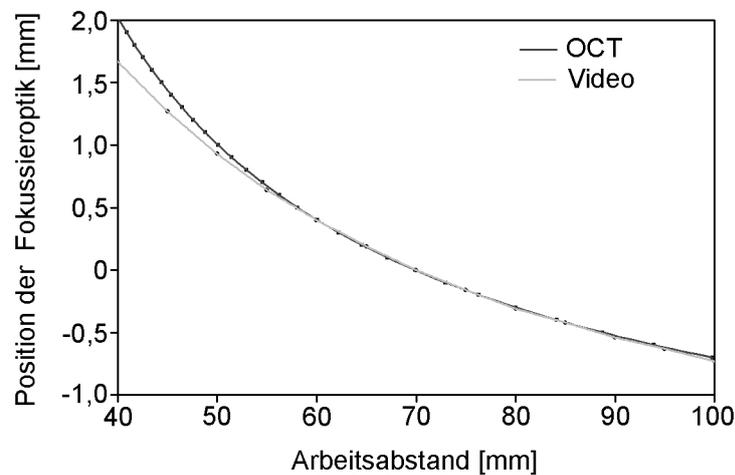


ABBILDUNG 4.38.: Relative Position der Fokussieroptik in Abhängigkeit vom Arbeitsabstand für OCT (schwarz) und Videobildgebung (grau).

so dass die Fokussierung in diesem Bereich synchron ist. Zwischen 40-60 mm finden sich leichte Abweichungen, die lediglich unterhalb von 45 mm größer sind als der Tiefenscanbereich des OCT-Systems von 3,5 mm (vgl. Abschnitt 4.4.2). Abbildung 4.39 zeigt in *ZEMAX* simulierte Videobilder für verschiedene Arbeitsabstände des OCT-Strahlengangs. Die Größe der Bildausschnitte entspricht der kurzen Seite der aktiven Sensorfläche eines $1/2''$ -Chips, die hier in etwa der optischen Bildgröße des Kameraokulars entspricht. Neben der Unschärfe für den Arbeitsabstand 40 mm ist die variable Vergrößerung des Objektivs für verschiedene Arbeitsabstände deutlich zu erkennen. Die Vergrößerung nimmt mit kleineren Arbeitsabständen zu, da bei konstantem Feldwinkel nur ein entsprechend kleinerer Ausschnitt des Linienpaarmusters abgebildet werden kann (siehe Abbildung 4.40). Zudem ist leichte Vignettierung am Rand des Bildes zu erkennen sowie Verzeichnung und Bildfeldwölbung, die die Bildqualität bei sehr kleinen bzw. sehr großen Arbeitsabständen beeinflussen.

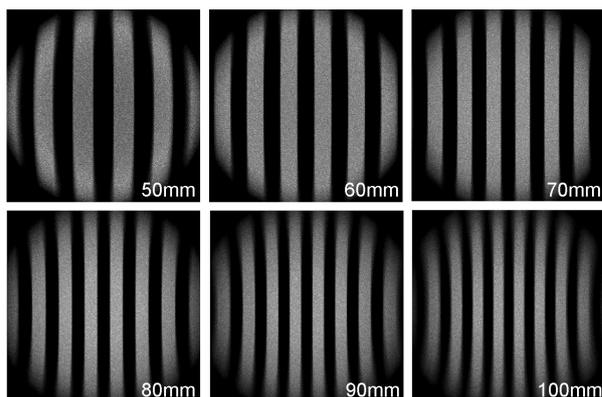


ABBILDUNG 4.39.: Simulierte Abbildungen durch den Videostrahlengang für verschiedene Arbeitsabstände. Die Bildfläche entspricht jeweils der kurzen Seite der aktiven Sensorfläche von 4,8 mm.

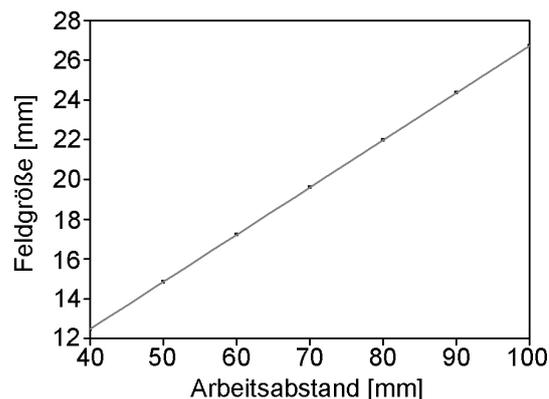


ABBILDUNG 4.40.: Die Feldgröße nimmt aufgrund des konstanten Feldwinkels des Objektivs linear mit dem Arbeitsabstand zu.

4.4.2. Auswahl und Integration eines OCT-Systems

Auf Basis der Ergebnisse der Untersuchungen zu den Bewegungsartefakten wurde TDOCT im Hinblick auf die Performance kommerziell erhältlicher Systeme als zur Zeit am besten geeignete Methode für kontaktfreie Stimmlippenuntersuchungen ausgewählt. SDOCT ist bei den momentanen Scanraten kommerzieller Systeme aufgrund der starken Signalabnahme, die die Darstellung von Gewebestrukturen unmöglich macht, nicht brauchbar. Bei SSOCT wirken sich der Dopplerfehler, der bei den hier verwendeten Scanraten mehr als das Zweifache des Positionsfehlers bei TDOCT beträgt (vgl. Abbildungen 4.13 und 4.15), und die Verbreiterung der axialen Auflösung negativ aus. Zudem ist die Integration eines SSOCT-Systems in ein frei bewegliches Endoskop wesentlich anfälliger gegenüber Signalstörungen, die entsprechend kompensiert werden müssten. Auch hinsichtlich des Kontrastes in größeren Tiefen ist TDOCT den FDOCT-Verfahren überlegen. In der TDOCT wird die Referenzarmlänge geändert, um einen Tiefenscan auszuführen. Der Tiefenscanbereich ist daher nur durch den maximalen Stellweg des Scanmechanismus limitiert, die Signalqualität bleibt aber unter Vernachlässigung des Fokussierungseffektes konstant. In der FDOCT dagegen ist die Signalqualität nicht über den gesamten Tiefenscanbereich gleichbleibend. Die tatsächliche Bildgebungstiefe in der SDOCT die Auflösung des Spektrometers begrenzt. Mit zunehmender Tiefe Δz können die höheren Modulationsfrequenzen des Interferenzsignals vom Spektrometer nicht mehr gut aufgelöst werden und es kommt zu einem Verlust des Interferenzkontrastes und damit zu einem Signalabfall in der Tiefe [Hu08]. In der SSOCT kommt es aufgrund der endlichen instantanen Linienbreite des durchstimmbaren Lasers, die über die Fouriertransformation mit der Kohärenzfunktion verknüpft ist, ebenfalls zu einem Verlust der zeitlichen Kohärenz in der Tiefe und somit zu einem ähnlichen Signalabfall [Hu08]. Gerade bei der kontaktfreien Untersuchung ist eine konstante Signalqualität über dem gesamten Scanbereich

von großer Bedeutung, da die Bewegungsamplituden mehrere Millimeter betragen können (vgl. Abschnitt 4.3.1).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein faserbasiertes TDOCT-System der Firma *BioMedTech, Nischni Nowgorod, Russland* in den Laryngoskop-Aufbau integriert, das bereits zur Untersuchung der Bewegungsartefakte eingesetzt wurde. Einige Systemparameter sind bereits in Tabelle 4.1 aufgeführt. Nach Gleichung (3.10) ist mit diesem System bei idealer Balancierung der Dispersion theoretisch in Luft eine axiale Auflösung von $10,5 \mu\text{m}$ und in Gewebe mit einem Brechungsindex von $n=1,4$ von $7,5 \mu\text{m}$ möglich. Der Tiefenscanbereich von $3,5 \text{ mm}$ in Luft besteht aus 450 Messpunkten, jeder B-Scan setzt sich aus 256 A-Scans zusammen, wobei die Breite der Scanlinie abhängig von Arbeitsabstand des Objektivs variiert (siehe Abschnitt 4.4.1). In die Probenarmfaser des OCT-Systems wird zusätzlich der Strahl eines Pilotlasers mit $\lambda=635 \text{ nm}$ eingekoppelt, der während der Untersuchung die Position des OCT-Scans auf der Probe visualisiert.

Das OCT-System ist aus einer Kombination eines Common-Path-Interferometers mit einem Michelson-Interferometer aufgebaut (siehe Abbildung 4.41). Das Common-Path-Interferometer nutzt die An-

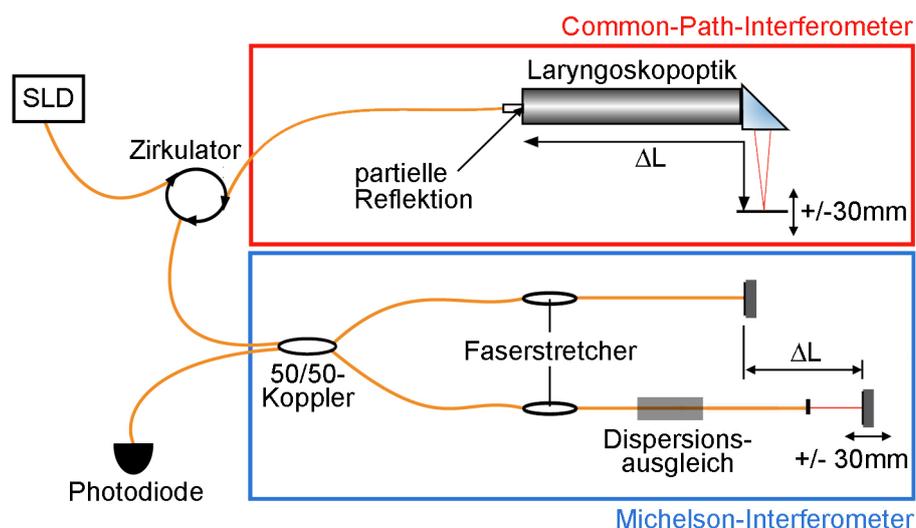


ABBILDUNG 4.41.: Ausbau des TDOCT-Systems als Kombination aus Common-Path- und Michelson-Interferometer.

schlussfaser des Applikators gleichermaßen als Referenz- und Probearm. Das hat den Vorteil, dass Störungen des Signals durch Polarisationsdrehungen bei der Biegung der Faser vermieden werden können, da sie gleichzeitig in Proben- und Referenzarm auftreten und somit keinen Einfluss haben [Sha05]. Zudem kann der Probenarm beliebig lang sein, was die Flexibilität des Systems erheblich steigert, da der Anschluss verschiedener Applikatoren problemlos möglich ist. Das von der SLD emittierte Licht wird zunächst über einen optischen Zirkulator in die Faser eingekoppelt. An der distalen Faserspitze wird ein Teil des Lichtes reflektiert und als Referenzarmsignal genutzt. Der transmittierte Teil wird durch das optische System zur Probe übertragen, dort zurückgestreut und wieder

in die Faser eingekoppelt. Das Probensignal hat also gegenüber dem Referenzsignal einen Offset ΔL , der dem zweifachen optischen Weg von der Faserspitze bis zur Probe entspricht. Beide Signale werden anschließend durch den Zirkulator in ein Michelson-Interferometer eingekoppelt, dessen Armlängen sich um den Offset unterscheiden. Erst nach diesem Ausgleich ist eine Interferenz zwischen Proben- und Referenzsignal möglich, die nach erneutem Durchgang durch den Zirkulator von der Photodiode detektiert wird. Im Michelson-Interferometer wird zudem der Tiefenscan durch zwei identische Faserstretcher durchgeführt. In dem Interferometerarm mit Offset, der dem Referenzarm des Common-Path-Interferometers entspricht, kann die Dispersion der des Probenarms zum Beispiel durch Einbringen von Substraten angeglichen werden. Common-Path-Interferometer können aber auch so konstruiert werden, dass keine Dispersionsanpassung notwendig ist. Wird nämlich die letzte optische Oberfläche des Applikators als Referenzfläche genutzt, entsteht in Proben- und Referenzarm die gleiche Dispersion und hat somit keine Verbreiterung des Signals zur Folge. Da jedoch ein unsauberes Referenzsignal, das zum Beispiel durch Mehrfachreflektionen an verschiedenen optischen Oberflächen entsteht, zu einer vielfachen Überlagerung von gleichen Bildern an verschiedenen axialen Positionen führen würde, wird hier aufgrund der Vielzahl der Oberflächen im Laryngoskop die Grenzfläche der optischen Faser als Referenz genutzt. Dabei hat der Reflektivitätswert einen entscheidenden Einfluss auf das SNR und muss daher sorgfältig ausgewählt werden [Sha05], da hier kein kontinuierliches Abschwächen der Reflektivität wie im Referenzarm eines Michelson-Interferometers möglich ist. Die Reflektivität kann also nur durch ein angepasstes Coating oder durch Polieren eingestellt werden. Unter Berücksichtigung der Vielzahl von Linsenoberflächen im Laryngoskopsystem wurde hier eine Referenzarmreflektivität von $R=0,1\%$ gewählt. In der Regel liefern Reflektivitäten zwischen $0,2\%$ und $0,4\%$ hohe SNR-Werte für biologische Proben [Sha05]. In dem hier verwendeten System wird außerdem die optische Weglängenänderung im Probenarm, die bei der Anpassung des Arbeitsabstandes entsteht (siehe Abschnitt 4.4.1), durch Verschieben eines der Endspiegel im Michelson-Interferometer dynamisch kompensiert.

Der laterale Scan wird durch eine magnetisch induzierte Auslenkung der Faserspitze durchgeführt (siehe Abbildung 4.4a). Das Faserende wird dabei um $\pm 0,25\text{ mm}$ transversal bewegt und gleichzeitig um einen Winkel von $\pm 0,1^\circ$ gedreht. Der Strahl wird zunächst aus der Faser ausgekoppelt und durch eine asphärische Linse kollimiert (siehe Abbildung 4.42). Anschließend erzeugt die Fokussieroptik ein erstes, leicht verkleinertes Bild der Faseraustrittöffnung in Form einer Scanlinie. Dabei wurde der Abstand zwischen Asphäre und Fokussieroptik so gewählt, dass die Abbildung bildseitig telezentrisch ist. Auch bei der Bewegung der Fokussieroptik zur Anpassung des Arbeitsabstandes bleibt die bildseitige Telezentrie annähernd erhalten.

Dispersionmanagement

Im Probenarm des Common-Path-Interferometers entsteht aufgrund der Vielzahl dispersiver Medien starke chromatische Dispersion, die die axiale Auflösung entscheidend beeinträchtigt. Durch Ein-

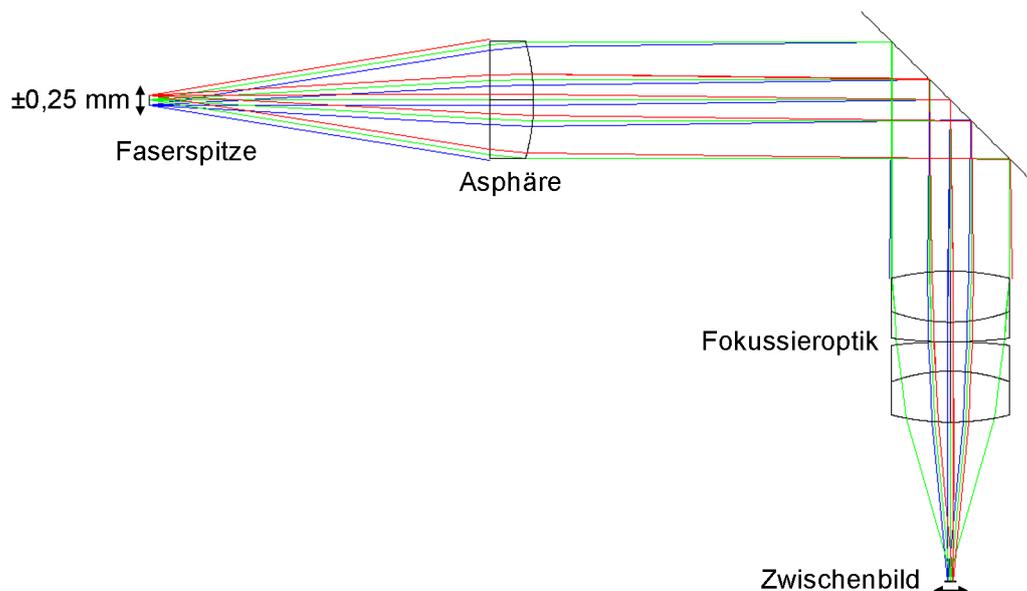


ABBILDUNG 4.42.: Simulation der OCT-Einkopplung in den Strahlengang des Laryngoskops. Nach Auskopplung aus der Faser wird das Licht kollimiert, vom Strahlteiler reflektiert und durch die Fokussieroptik in die erste Zwischenbildebene fokussiert.

bringen von dispersiven Substraten in einen Arm des Michelson-Interferometers ist es möglich, die Dispersionsbeiträge in beiden Interferometerarmen anzugleichen:

$$\sum_i D_{\lambda,i} \cdot z_i = \sum_j D_{\lambda,j} \cdot z_j \quad (4.32)$$

$D_{\lambda,i}$ bzw. $D_{\lambda,j}$ kann jeweils nach Gleichung (3.13) mit Hilfe der Sellmeier-Koeffizienten der jeweiligen Gläser mit den geometrischen Dicken z_i im Probenarm bzw. z_j im Referenzarm berechnet werden. Für die Zentralwellenlänge $\lambda_0 = 1320 \text{ nm}$ ergibt sich bei Berücksichtigung der Mittendicken aller Optiken eine Gesamtdispersion von $-0,0295 \frac{\text{ps}}{\text{nm}}$ und bei Berücksichtigung der Randdicken ein Wert von $-0,0333 \frac{\text{ps}}{\text{nm}}$. Ohne eine Dispersionsanpassung würde sich die axiale Auflösung nach Gleichung (3.14) auf $61,7 \mu\text{m}$ bzw. $69,6 \mu\text{m}$ verbreitern. Aus der Gesamtdispersion kann nun nach Gleichung (4.32) die Dicke des Substrates berechnet werden, das in den Referenzarm eingebracht werden muss, um dort den gleichen Dispersionsbeitrag zu erzeugen. Für das hochdispersive Glas N-SF57 wäre dazu eine Substratdicke zwischen $24,3 \text{ mm}$ und $27,1 \text{ mm}$ nötig. Die tatsächliche Dicke wurde durch sukzessives Erhöhen der Substratdicke in mm-Schritten bei gleichzeitiger Messung der axialen Auflösung zu 26 mm ermittelt und in den entsprechenden Arm des Michelson-Interferometers eingesetzt.

4.4.3. Aufbau eines Funktionsmusters

Herstellung der Optiken

Mit Hilfe einer Toleranzanalyse in der Optikdesignsoftware *ZEMAX* wurden die Spezifikationen für die Fertigung der Optik definiert. Hierzu wurde der Einfluss der Oberflächenqualität, der Zentrierung und der Abweichungen von den idealen geometrischen Maßen wie Mittendicke, Durchmesser und Radien auf die Abbildungsqualität analysiert [Lit05]. Ein Teil der Optiken konnte unter Berücksichtigung der Toleranzen durch Katalogoptik substituiert werden, die übrigen Linsen wurden entsprechend der Spezifikationen kundenspezifisch gefertigt. Die Linsen, die sich sowohl im Strahlengang der OCT als auch im Strahlengang der Videobildgebung befinden, wurden für die zwei spektralen Bereiche der beiden Verfahren mit Antireflexbeschichtungen versehen, um eine möglichst hohe Transmission zu erzielen und gleichzeitig einen Kontrastverlust durch Streuung an den Oberflächen zu vermeiden. In das Design der Coatings wurden die Spektren der Kaltlichtquelle zur Beleuchtung der Probe und der SLD des OCT-Systems einbezogen (siehe Abbildung 4.43). Zudem wurden die

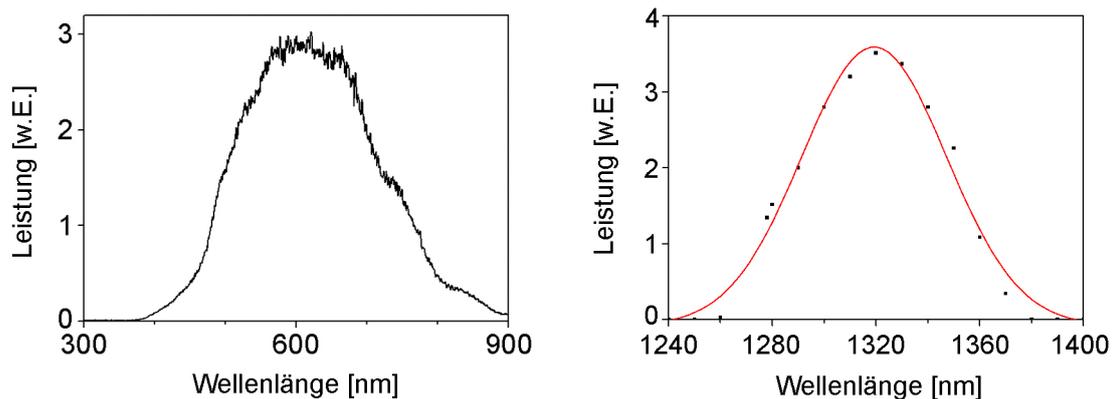


ABBILDUNG 4.43.: Leistungsspektren der Kaltlichtquelle *Storz 482B* (links) und der SLD *Inphenix IPSSD1304-3120* (rechts).

Beschichtungen auf die verschiedenen Glassorten der beteiligten Linsen angepasst, so dass für jede Oberfläche eine Restreflexion von $<0,5\%$ erreicht werden konnte. Abbildung 4.44 zeigt beispielhaft die gemessene Transmissionskurve der Antireflexbeschichtung für das 1 mm dicke Schutzfenster in der Endoskopspitze aus dem Glas N-BK7. Die Katalogoptiken wurden bereits vergütet mit Reflexionswerten von jeweils $<0,5\%$ geliefert.

Zur Trennung von OCT- und Videostrahlengang wurde ein dichroitischer Strahlteiler integriert, der hochtransmittierend für sichtbares Licht und hochreflektierend für das nahinfrarote Spektrum der SLD ist (vgl. Abbildungen 4.36 und 4.36). Das Transmissionsspektrum des Strahlteilers ist in Abbildung 4.45 dargestellt. Der Pilotlaserstrahl mit einer Wellenlänge von 635 nm, der bereits im OCT-System in die Probenarmfaser eingekoppelt wird, erfährt zunächst eine Reflexion am Strahlteiler mit $R \approx 20\%$ und in rückwärtiger Abbildung eine Transmission mit $T \approx 80\%$, so dass insgesamt 16% der

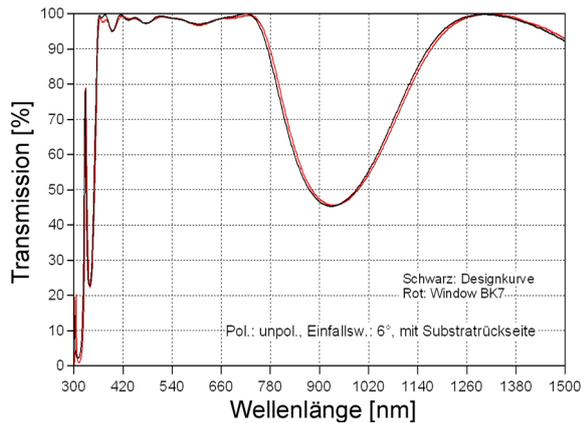


ABBILDUNG 4.44.: Transmissionsspektrum für das Schutzfenster aus N-BK7 mit $T > 97\%$ für sichtbares Licht und $T > 99\%$ für 1260-1380 nm.

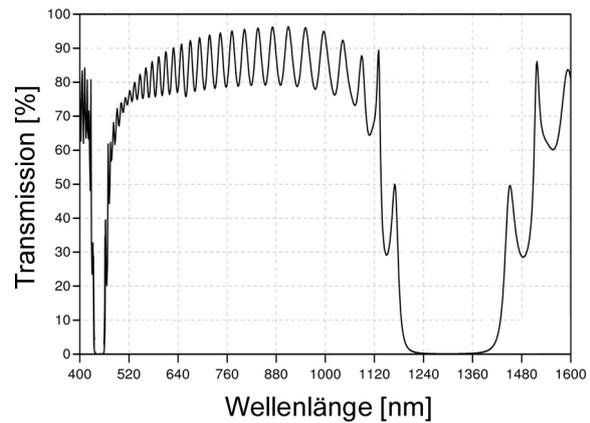


ABBILDUNG 4.45.: Transmissionsspektrum des Strahlteilers mit $T \approx 80\%$ für sichtbares Licht und $R > 99,5\%$ für 1300 nm.

Leistung genutzt werden können.

Konstruktion und Herstellung des mechanischen Aufbaus

In Abbildung 4.46 ist ein 3D-Modell des konstruierten Funktionsmusters dargestellt.

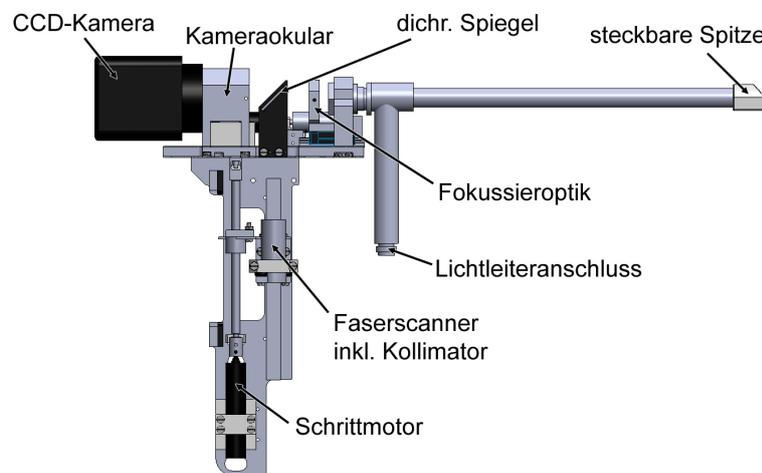


ABBILDUNG 4.46.: 3D-Modell des modular aufgebauten mechanischen Grundgerüsts des OCT-gestützten Laryngoskops.

Es besteht aus einem Grundgerüst, an das die einzelnen Subsysteme wie Endoskopschaft, elektro-mechanische Fokussiereinheit, Kameraoptik und OCT-Einkopplung adaptiert wurden. Das Funktionsmuster ist durch den modularen Aufbau leicht erweiterbar. So kann zum Beispiel ein weiterer lateraler Scanner integriert werden, um eine dreidimensionale OCT-Bildgebung zu ermöglichen.

Bei dem Endoskopschaft handelt es sich um ein an der distalen Spitze leicht modifiziertes konventio-

nelles Lupenlaryngoskop des Herstellers *Wolf*, auf das eine speziell entwickelte, austauschbare Kappe aufgesetzt wurde. Diese enthält einen Spiegel zur Umlenkung der OCT- und Videostrahlengänge um 90° und ein Fenster zum Schutz der Optiken vor Flüssigkeiten und den Atemgasen des Patienten. Durch entsprechende Modifikation der Kappe ist es möglich, einen 70° -Blickwinkel zu realisieren.

Die elektromechanische Fokussiereinheit ermöglicht dem Benutzer die Einstellung des Arbeitsabstandes durch ein axiales Verschieben der Fokussieroptik mittels eines motorisierten Antriebes. Die Bewegung hat aufgrund der variablen Vergrößerung des Objektivs einen nichtlinearen Verlauf (vgl. 4.40).

Zur Aufnahme der Videobilder wurde eine $1/2''$ -CCD-Farbkamera (*Watec WAT-221S*) integriert, die sowohl einen manuellen oder automatischen Weißabgleich als auch die Variation der Belichtungszeit ermöglicht. Auf diese Weise kann eine ideale Anpassung an die jeweilige Beleuchtungssituation während der Untersuchung erfolgen.

Die OCT-Einkopplungseinheit ermöglicht den Anschluss verschiedener OCT-Systeme durch einfachen Einbau einer Kollimationsoptik. Zudem ist es möglich die Längen Anpassung der Interferometerarme, die bei der Variation des Arbeitsabstandes nötig ist, durch Verschieben der Kollimationsoptik im Probenarm zu realisieren. Diese Bewegung kann mit der Verschiebung der Fokussieroptik synchronisiert werden, so dass eine gleichzeitige Einstellung des Arbeitsabstandes und der Probenarmlänge in Echtzeit möglich ist. Somit können also auch OCT-Systeme angeschlossen werden, die keine Möglichkeit zur Armlängen Anpassung im Referenzarm bieten.

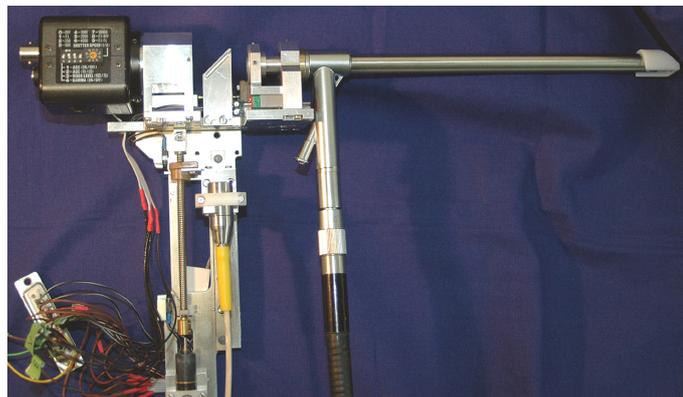


ABBILDUNG 4.47.: Foto des OCT-gestützten Laryngoskops inklusive Faserscanner des OCT-Systems und angeschlossenem Faserbündel der Kaltlichtquelle.

Abbildung 4.47 zeigt ein Foto des OCT-gestützten Laryngoskops inklusive Faserscanner des OCT-Systems und angeschlossenem Faserbündel der Kaltlichtquelle. Weitere Details zur Konstruktion sowie Konstruktionszeichnungen können der Diplomarbeit von Anne-Kristin Klockow entnommen werden [Klo07].

4.4.4. Charakterisierung und Erprobung des Funktionsmusters

Faserkopplungseffizienz

Mit Hilfe der *Physical Optics Propagation* in *ZEMAX* wurde die Rückkopplungseffizienz in die optische Faser des OCT-Systems für den gesamten OCT-Strahlengang simuliert. Dabei wurde das Linsensystem doppelt durchlaufen, als Probe wurde ein ideal reflektierender Spiegel mit $R=1$ in den Fokus gestellt. Der Hersteller des OCT-Systems hat eine Singlemode-Faser der Firma *Nufern* (980HP) mit einem Modenfelddurchmesser (MFD) von $2w_0=4,7\ \mu\text{m}$ und einer $NA=0,164$, jeweils angegeben bei $\lambda=1320\ \text{nm}$, geliefert. Für die Kollimation wurde eine asphärische Linse (*Thorlabs* C280TME-C) mit einer $NA=0,158$ bei $\lambda=1320\ \text{nm}$ verwendet. Der Abstand zwischen Faser und Kollimationslinse wurde hinsichtlich der maximalen Kopplungseffizienz optimiert. In Abbildung 4.48 ist im linken Teil das Strahlprofil bei der Rückkopplung in die Faser dargestellt, das etwas größer als der MFD der Faser ist. Daraus resultiert eine verminderte Faserkopplungseffizienz von etwa 18%, entsprechend einem Leistungsverlust von etwa -7 dB im OCT-Signal. Durch einen Vergleich mit der Rückkopplungseffi-

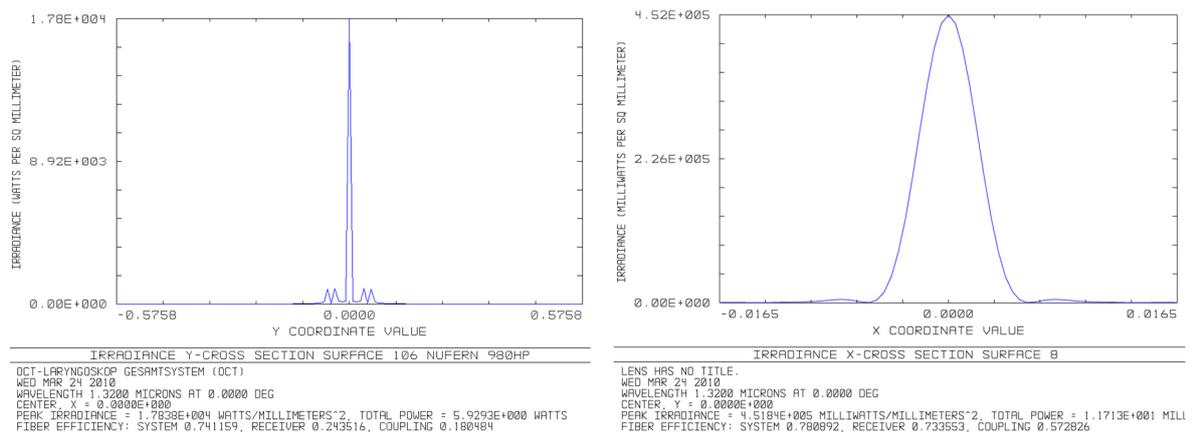


ABBILDUNG 4.48.: Strahlprofile am Ort der Faserspitze und Faserkopplungseffizienz für das Gesamtsystem (links) und die Kollimationsoptik alleine (rechts) simuliert durch die *Physical Optics Propagation* in *ZEMAX*.

zienz nur für die asphärische Linse kann der Einfluss der Abberationen im übrigen Endoskopsystem bestimmt werden. Hier wurde der Spiegel in einer Entfernung von 25 mm hinter der Asphäre aufgestellt für die Simulation wurden die gleichen Faserdaten wie zuvor verwendet. Auch hier wurde der Abstand zwischen Faser und Kollimator optimiert. Aufgrund der Fehlanpassung zwischen NA der Asphäre und NA der Faser ist der Lichtfleck auf der Faser etwas größer als der MFD, so dass die Rückkopplungseffizienz auf etwa 57% sinkt (siehe rechter Teil von Abbildung 4.48), was einem Leistungsverlust von etwa -2,5 dB entspricht. Die übrigen -4,5 entstehen durch Abberationen oder Vignettierung im Endoskopsystem.

Kenndaten der OCT-Bildgebung

Die axiale Auflösung in Luft kann direkt in OCT-Bildern als FWHM-Breite der Kreuzkorrelationsfunktion bestimmt werden. Hierzu wurde das Intensitätsprofil des OCT-Signals einer Objektträgeroberfläche an verschiedenen lateralen Positionen ausgewertet. In der Bildmitte wurde eine axiale Auflösung von $12,9\ \mu\text{m}$ gemessen, am Rand betrug der Wert von $11,7\ \mu\text{m}$ (siehe Abbildung 4.49). Der Unterschied ist auf verschiedene Glaswege für die Mitte bzw. den Rand der Optiken im Probenarm zurückzuführen, der durch die Dispersionskompensation mit planen Substraten im Referenzarm nicht ausgeglichen werden konnte (vgl. Abschnitt 4.4.2).

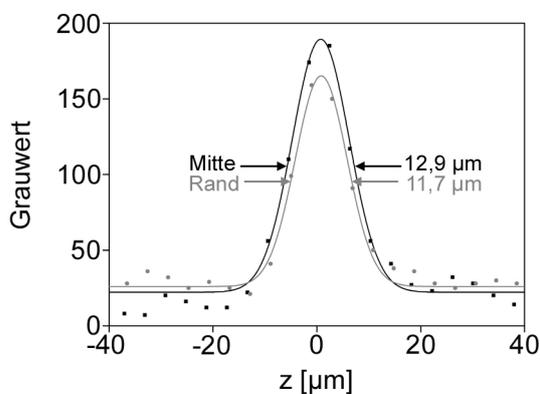


ABBILDUNG 4.49.: Axiale Auflösung gemessen in Grauwertprofilen einer Glasoberfläche angegeben für die Bildmitte und den Bildrand.

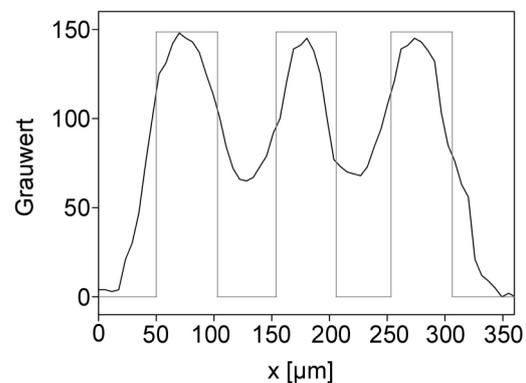


ABBILDUNG 4.50.: Laterales Intensitätsprofil einer Linienstruktur mit einer Ortsfrequenz von $10,1\ \text{LP/mm}$. Die graue Linie zeigt die ideale Kontrastfunktion.

Die laterale Auflösung wurde für den mittleren Arbeitsabstand von $70\ \text{mm}$ mit Hilfe eines positiven 1951-USAF-Auflösungstargets gemessen. Aus OCT-Aufnahmen wurden dazu laterale Intensitätsprofile extrahiert und hinsichtlich des Kontrastes in Abhängigkeit von der Linienfrequenz untersucht. Bei Element 3 aus der Gruppe 2 des USAF-Targets mit einer Linienfrequenz von $10,1\ \text{Linienpaaren/mm}$ sank der Kontrast erstmals unterhalb einen Wert von $0,5$ (siehe Abbildung 4.50). Nimmt man dies als Unterscheidungskriterium zweier Bildpunkte, beträgt die laterale Auflösung $49,5\ \mu\text{m}$.

Mit Hilfe von OCT-Aufnahmen des 1951-USAF-Auflösungstargets wurde die Breite der OCT-Scanlinie in Abhängigkeit vom Arbeitsabstand bestimmt. Hierzu wurde eine vertikal stehende Liniengruppe mit einer Frequenz von $1\ \text{Linienpaar/mm}$ lateral gescannt. Abbildung 4.51 zeigt beispielhaft die OCT-Aufnahme des USAF-Targets im Arbeitsabstand von $60\ \text{mm}$ und den linear steigenden Verlauf der Scanlinienbreite.

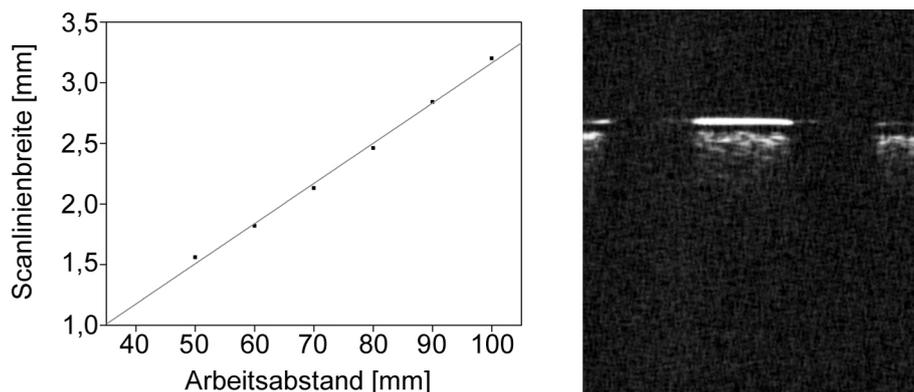


ABBILDUNG 4.51.: Messung der Scanlinienbreite in Abhängigkeit vom Arbeitsabstand (links) mit Hilfe von OCT-Aufnahmen eines USAF-Auflösungstarget (rechts).

Erprobung des OCT-Laryngoskops ex vivo

Zur ersten Erprobung des OCT-gestützten Laryngoskops wurden extrahierte Schweinestimmklippen mit OCT und gleichzeitig mit der Videobildgebung aufgenommen. In Abbildung 4.52 ist links ein OCT-Bild und rechts ein Videobild beispielhaft dargestellt, aufgenommen mit fixiertem Applikator und ebenfalls fixierten Stimmlippen in einem Arbeitsabstand von 70 mm. Aufgrund von geringer

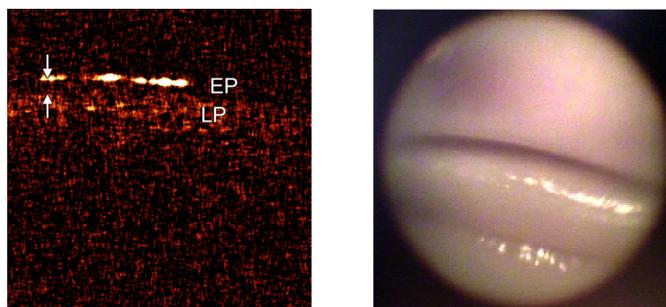


ABBILDUNG 4.52.: OCT- und Videoaufnahmen von extrahierten Schweinestimmklippen mit dem OCT-Laryngoskop in einem Arbeitsabstand von 70 mm. Die Pfeile im OCT-Bild (links) markieren die Dicke des Epithels (EP). LP=Lamina propria.

Rückkopplungseffizienz durch Fehlanpassungen bei der Fasereinkopplung und Abberationen sowie Vignettierung im Endoskopsystem ist das OCT-Signal sehr schwach und die Eindringtiefe entsprechend gering. Das Epithel grenzt sich jedoch trotz des kleinen SNR von der Lamina propria ab. Durch Applanation der Stimmlippenoberfläche mit einem Deckglas kann der Kontrast leicht verbessert werden. So ist es sogar möglich ist, die Epitheldicke mit Hilfe eines mit dem Brechungsindex für Stimmlippengewebe von $n=1,4$ skalierten Intensitätsprofils zu messen (siehe Abbildung 4.53).

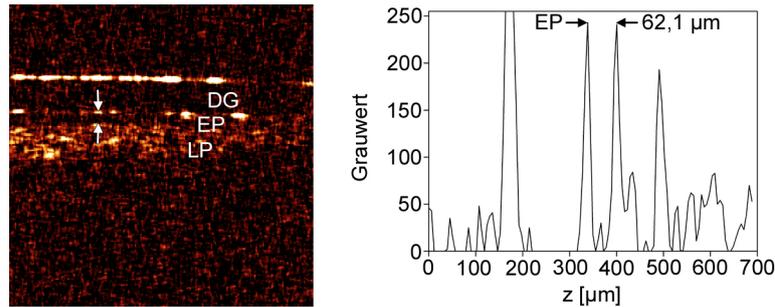


ABBILDUNG 4.53.: OCT-Aufnahme einer mittels eines Deckglases applizierten Schweinestimmlipe (links). Aus dem Intensitätsprofil (rechts) kann die Epitheldicke als Abstand zwischen den markierten Maxima bestimmt werden.

4.5. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein OCT-gestütztes Laryngoskop für die kontaktfreie Untersuchung am wachen Patienten entwickelt. Durch eine kollineare Strahlführung von OCT- und Videobildgebung kann einerseits der Platzbedarf im Rachen des Patienten gegenüber bisherigen Applikatoren mit zwei Rohren [Yu09] reduziert werden. Andererseits wird dadurch eine synchrone Fokussierung von OCT- und Videostrahl ermöglicht, so dass der Arbeitsabstand des Laryngoskops für beide Verfahren in einem Bereich von 40-100 mm auf die Anatomie des jeweiligen Patienten angepasst werden kann. Gegenüber konventionellen Laryngoskopen entspricht hier die Tiefenschärfe im Videobild aufgrund der bevorzugten Auslegung des Systems für die OCT-Bildgebung in etwa dem Tiefenscanbereich der OCT von 3,5 mm, so dass die Videobildgebung als Hilfe für die Einstellung des korrekten Arbeitsabstands genutzt werden kann. Sind die Stimmlippen im Videobild scharf abgebildet, liegen sie entsprechend auch im OCT-Scanbereich.

Die Änderung des Arbeitsabstandes führt zu einer variablen Vergrößerung des Gesamtsystems. Das hat zur Folge, dass sich die vom OCT-Strahl beleuchtete Fläche auf bzw. in der Probe sowie die NA entsprechend der jeweiligen Vergrößerung ändert, so dass die Qualität des detektierten OCT-Signals schwankt. Zudem variiert neben der lateralen Auflösung und der Breite der OCT-Scanlinie auch die Feldgröße im Videobild. Diese Probleme könnten in Zukunft durch Integration eines Zoom-Systems gelöst werden, das die Bewegung der Fokussieroptik ausgleicht. Dies wäre an verschiedenen Positionen im Optiksystem möglich, zum Beispiel als Zoom-Objektiv in der distalen Spitze. Eine weitere Möglichkeit wäre, synchron zur Bewegung der Fokussieroptik auch ihre Brennweite zu ändern. Dies könnte beispielsweise durch Flüssigkeitslinsen realisiert werden, die momentan jedoch noch keine ausreichend großen Aperturen besitzen.

Aufgrund der Aberrationen und Reflexionsverluste im Optiksystem ist die Rückkopplungseffizienz in die OCT-Faser sehr gering und hat einen starken Signalverlust zur Folge. Durch Reduktion der Oberflächenzahl könnte die Faserkopplungseffizienz in Zukunft möglicherweise verbessert werden.

So könnte zum Beispiel das 12-linsige Relaysystem durch ein GRIN-Relay mit lediglich zwei Oberflächen ersetzt werden. Hier gilt es allerdings zu klären, ob GRIN-Linsen für OCT- und Videobildgebung gleichzeitig gute Abbildungseigenschaften erreichen. Zudem ist es aufgrund der kleinen Durchmesser von maximal 2 mm nicht möglich, gleichzeitig eine hohe laterale Auflösung für die OCT und ein großes Objektfeld für die Videobildgebung zu realisieren. Eine weitere Möglichkeit wäre, alle optischen Elemente in die distale Spitze zu integrieren, ohne eine Relayoptik zu benötigen (siehe Abbildung 4.54). Durch die Integration des Kamerachips in die Spitze (Chip-on-the-tip-Technologie)

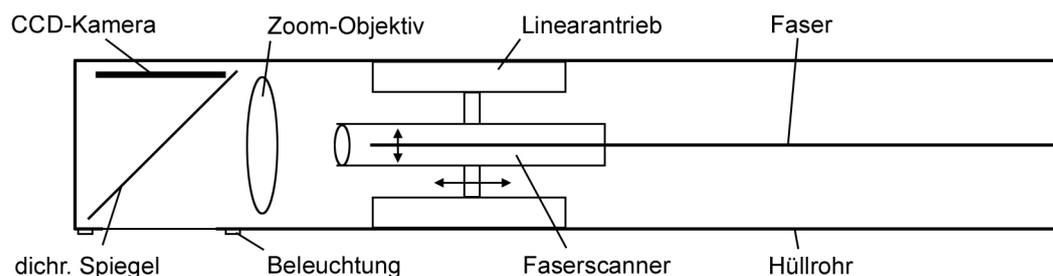


ABBILDUNG 4.54.: Die Integration aller optischen Bauelemente in die distale Spitze des Laryngoskops könnte eine Verbesserung der Abbildungseigenschaften und damit eine Steigerung der Faserkopplungseffizienz bewirken.

müsste das nach dem dichroitischen Spiegel folgende Optiksistem nur für die OCT-Wellenlänge optimiert und vergütet werden, so dass hier eine höhere Abbildungsqualität zu erwarten wäre.

Wegen des großen Arbeitsabstandes ist die NA für die OCT-Bildgebung bisher sehr klein, was in einer geringen lateralen Auflösung resultiert. Durch Änderung des Beleuchtungskonzeptes, z.B. durch Integration von LEDs in die Spitze, könnten die Durchmesser der Endoskopoptiken in Zukunft vergrößert werden. So wäre eine um bis zu 30% bessere laterale Auflösung möglich, wenn der Außendurchmesser des Endoskoprohres nicht geändert wird.

Zur Evaluierung der Methode wurde der Strahl eines faserbasierten TDOCT-Systems in das Laryngoskop eingekoppelt, das unter Berücksichtigung der möglichen Bewegungen während der Untersuchung bei kleinen Geschwindigkeiten noch ausreichend kontrastreiche Bilder mit nur geringen Bewegungsartefakten liefert. Das OCT-System ist als Kombination eines Common-Path- mit einem Michelson-Interferometer aufgebaut. Durch das Common-Path-Interferometer werden Signalstörungen durch Polarisationsdrehungen bei Biegung der Faser vermieden, da diese in beiden Armen gleichermaßen auftreten. Außerdem kann der Probenarm einfach durch Änderung der Faserlänge beliebig verlängert oder verkürzt werden, ohne eine Anpassung im System vornehmen zu müssen. Im Michelson-Interferometer wird der Tiefenscan durch Faserstretcher und die Referenzarmlängen Anpassung bei Variation des Arbeitsabstandes durchgeführt sowie die Dispersion kompensiert.

Die Position des OCT-Scans auf der Stimmlippe kann in dem hier realisierten Aufbau bisher nur durch Bewegungen des gesamten Laryngoskops verändert werden. Durch Integration eines zweiten Scan-

ners wäre die Einstellung der Scanposition in einer Raumrichtung möglich. Hier wäre auch die Auswahl der Position im Videobild denkbar. Zudem könnten mit zwei Scannern 3D-Datensätze aufgenommen werden.

Da der Messbereich der OCT im Vergleich zur konventionellen Laryngoskopie, bei der die Tiefenschärfe in etwa den gesamten Kehlkopfbereich abdeckt, nur etwa 3,5 mm beträgt, ist die Untersuchungsmethode sehr empfindlich gegenüber Bewegungen. Durch den Tremor des Arztes oder Bewegungen des Patienten kann der zu untersuchende Bereich der Stimmlippen nur schwer innerhalb des Bildausschnitts gehalten werden. In Zukunft müssen diese zufälligen Bewegungen durch ein Autofokussystem mittels einer schnellen Anpassung der Proben- oder Referenzarmlänge kompensiert werden [Zha08], um eine Untersuchung auch für Ungeübte zu ermöglichen.

Bei einer kontaktfreien Untersuchung am wachen Patienten treten immer auch schnelle axiale Bewegungen der Stimmlippen durch Phonation auf, die die Qualität der OCT-Aufnahmen beeinträchtigen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die möglichen Bewegungsartefakte für die verschiedenen OCT-Methoden theoretisch und experimentell untersucht. In der TDOCT entsteht ein Fehler in der axialen Positionsdarstellung sowie ein SNR-Verlust, der jedoch erst bei sehr hohen Geschwindigkeiten auftritt. Im Fall von SDOCT kann es sogar zum vollständigen Signalverlust kommen. Auch in der SSOCT tritt ein axialer Positionsfehler auf, zudem verbreitert sich die axiale Auflösung bei hohen Geschwindigkeiten um ein Vielfaches. Während die Positionsfehler bei Kenntnis der Geschwindigkeit numerisch korrigiert werden können, kann einem Signalverlust bzw. einer Auflösungsverschlechterung nur durch höhere Scangeschwindigkeiten entgegengewirkt werden. Die TDOCT ist aufgrund des mechanischen Scannens des Referenzarmes auf wenige kHz beschränkt und wird in Zukunft wahrscheinlich keinen entscheidenden Geschwindigkeitszuwachs mehr erfahren. In der SDOCT sind die Ausleserate der Zeilenkamera und die *full well capacity* die limitierenden Größen. Bei steigender Ausleserate zum Beispiel durch den Einsatz von CMOS-Kameras sinkt die Integrationszeit, so dass bei gleicher *full well capacity* entsprechend mehr Lichtleistung benötigt wird. Die Bestrahlungsstärke darf jedoch einen gewissen Grenzwert nicht überschreiten, so dass dadurch die Scangeschwindigkeit begrenzt wird. Eine Geschwindigkeitssteigerung bei konstanter *full well capacity* ist dann nur noch über die Steigerung der Quanteneffizienz des Sensormaterials möglich. In der SSOCT entspricht die A-Scanrate der Durchstimmrate der Lichtquelle. Diese kann über die Anpassung der Resonatorlänge skaliert werden und übersteigt potentiell die Geschwindigkeiten von SDOCT-Systemen [Hub06a]. Kürzlich wurde die experimentelle Realisierung einer durchstimbaren ASE-Lichtquelle demonstriert, bei der keine fundamentalen Grenzen in der Durchstimmgeschwindigkeit existieren [Eig09]. Da SSOCT zudem auch die Möglichkeit einer *balanced detection* [Che07] bietet, wird sie in Zukunft am besten für die kontaktfreie Stimmlippenuntersuchung geeignet sein.

5. Computerassistierte Diagnose von Stimmlippenerkrankungen

In den letzten zwei Jahrzehnten hat die computerassistierte Diagnose (*computer-aided diagnosis, CAD*) in der medizinischen Bildgebung immer mehr an Bedeutung gewonnen. Sie zielt darauf ab, den untersuchenden Arzt durch die Bereitstellung objektiver, quantitativer Maße bei der Interpretation der Bilder zu unterstützen [Doi07]. Zusätzlich kann der Arzt eine automatische Diagnose durch einen Computeralgorithmus als „zweite Meinung“ bei der entgeltigen Diagnose hinzuziehen. Das Konzept der CAD bezieht aber im Gegensatz zu einer rein automatischen Diagnose immer den Arzt und den Computer gleichermaßen ein. Die computergestützte Auswertung soll dabei den Arzt also nicht ersetzen sondern durch zusätzliche Fähigkeiten ergänzen. Gerade in der Differentialdiagnose von Gewebeveränderungen anhand von objektiven Kriterien liegt die Stärke der CAD. So konnte zum Beispiel in der Mammographie eine Steigerung der Sensitivität und Spezifität bei der Unterscheidung von malignen und benignen Läsionen gezeigt werden [Hal04].

Auch in einigen OCT-Anwendungen wurde die automatische Auswertung von OCT-Daten für den Einsatz in der CAD bereits untersucht. Ein guten Überblick über die verschiedenen Methoden und Anwendungen liefert Bazant-Hegemark [BH09]. In der Regel werden die OCT-Aufnahmen zunächst mittels geeigneter Algorithmen segmentiert, um charakterische Strukturen des Gewebes vermessen oder zusätzliche Information wie zum Beispiel optische Gewebeeigenschaften extrahieren zu können. Anhand dieser Daten kann anschließend im Rahmen der Klassifikation eine Aussage über ein bestimmtes Kriterium wie zum Beispiel den Malignitätsgrad getroffen werden.

In diesem Kapitel wird zunächst in die grundlegenden Bildverarbeitungsprinzipien im Rahmen der CAD eingeführt, bevor die Algorithmen zur Segmentierung klinischer OCT-Bilder und die Methoden zur automatischen Auswertung näher vorgestellt und diskutiert werden.

5.1. Einführung in die computerassistierte Diagnose mit OCT

Der typische Ablauf einer computergestützten Analyse von medizinischen Bilddaten ist in Abbildung 5.1 dargestellt [BH09]. Die Bilder werden nach der **Aufnahme** im Rahmen der **Vorverarbeitung** (engl. *Preprocessing*) für die anschließende Segmentierung vorbereitet. Ziel der Vorverarbeitung ist es, die Effektivität der Segmentierung zum Beispiel durch die Unterdrückung von Rauschen,



ABBILDUNG 5.1.: Typischer Ablauf einer computerassistierten Diagnose mittels OCT-Bilddaten.

Helligkeitskorrekturen oder Kontrastanpassungen zu optimieren. Die Entfernung von Speckle und Bildrauschen wird mittels geeigneter Weichzeichnungsfilter durchgeführt [Ban00]. Diese entsprechen spektral einer Tiefpassfilterung, hohe Ortsfrequenzen werden also abgeschwächt und das Bild somit geglättet. Die Filterung geschieht durch Faltung des Ursprungsbildes mit einer bestimmten Filterfunktion. Diese Filterfunktionen beziehen die umliegenden Nachbarpixel des gerade zu prozessierenden Pixels ein und speichern zum Beispiel im Falle des Mittelwertfilters den Mittelwert aller Pixel des Filterkerns (engl. *Kernel*). Im Falle des Medianfilters dagegen wird der Median aller Pixelwerte des Kerns übernommen. Der Medianfilter hat generell den Vorteil, dass er im Gegensatz zum Mittelwertfilter Kanten von Regionen, die größer sind als der Filterkernel, nicht so stark verschmiert, kleinere Strukturen wie Speckle aber trotzdem effektiv entfernt [Rog06]. Eine nichtlineare Abwandlung des Medianfilters ist der Hybrid-Medianfilter, der die Erhaltung der Kanten verbessert. Mit verschiedenen Kernelformen wird hier jeweils der Median und von den verschiedenen Zwischenergebnissen wiederum der Median berechnet. Oft kann aber auch ein Gaußfilter gute Ergebnisse liefern. Hier sind die Filterkoeffizienten des Kerns entsprechend einer gaußschen Verteilung gewählt. Abbildung 5.2 zeigt die Rauschunterdrückung durch verschiedene Weichzeichnungsfilter am Beispiel einer OCT-Aufnahme von einer gesunden humanen Stimmlippe. Mittels weitaus komplexerer,

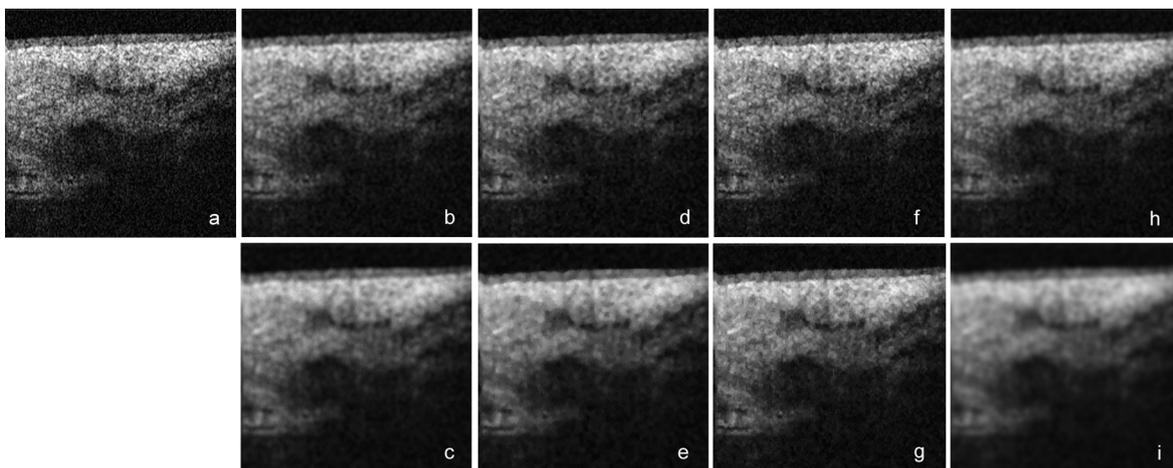


ABBILDUNG 5.2.: Rauschunterdrückung mit verschiedenen Weichzeichnungsfiltern jeweils mit einer Kernelgröße von 3×3 und 5×5 am Beispiel einer gesunden humanen Stimmlippe: Originalbild (a), Mittelwertfilter (b,c), Medianfilter (d,e), Hybrid-Median (f,g) und Gaußfilter (h,i).

nichtlinearer Methoden wie der adaptiven Filterung kann zum Beispiel mit lokal angepassten Filterparametern auf Struktur- oder Helligkeitsunterschiede innerhalb des Bildes reagiert werden. Dadurch

kann das Rauschen effektiv unterdrückt und Kanten gleichzeitig aufgestellt werden [Rog02]. Weitere Beispiele für nichtlineare Filter sind Wavelet- und Diffusionsfilter, die auch bereits erfolgreich in der OCT angewendet wurden [LP09, Sal07].

Die **Segmentierung** kann je nach gewünschtem Ziel durch zahlreiche Verfahren realisiert werden [Rog06]. Diese werden grundsätzlich in zwei Klassen unterteilt: regionenbasierte Techniken teilen bestimmte Bildanteile anhand eines definierten Homogenitätskriteriums einzelnen Regionen zu, kantenbasierte Techniken nehmen die Bildaufteilung anhand der Detektion von Kanten zwischen Regionen mit unterschiedlichen Eigenschaften vor. Die schwellwertbasierte Segmentierung ist ein beliebtes regionenbasiertes Verfahren, bei dem Helligkeitswerte einzelner Pixel mit einem Schwellwert verglichen und dementsprechend einer Region zugeordnet werden [Sez04]. Aus den resultierenden Binärbildern kann dann der Übergang zwischen den Regionen bestimmt werden. Dabei gibt es globale und lokale Techniken der Schwellwertbestimmung. Bei der globalen Methode wird ein Histogramm des Bildes erstellt, das in der Regel zwei Maxima aufweist. Ein Peak entspricht der Grauwertverteilung des Hintergrundes, der zweite Peak gibt die Grauwertverteilung der zu extrahierenden Bildinformation wieder. Über den Schwellwert, der zwischen beiden Verteilungen liegt, können nun beide Bereiche voneinander getrennt werden. Wird der Schwellwert für die Erzeugung des Binärbildes anhand von lokalen Eigenschaften verschiedener Bildbereiche bestimmt, spricht man von der lokalen Methode. Sie wird angewendet, wenn der Schwellwert aus dem Histogramm zum Beispiel aufgrund von Helligkeits- oder Kontrastschwankungen innerhalb des Bildes nicht sicher bestimmt werden kann. Die lokalen Schwellwerte können - falls nötig - auch für jedes Pixel getrennt angepasst werden. Insgesamt sind die Schwellwerte beider Verfahren leicht und schnell zu berechnen, führen aber nicht zwangsläufig zu zusammenhängenden Segmenten, da immer nur einzelne Pixel verarbeitet werden. Die Algorithmen sind aber aufgrund des geringen Rechenaufwandes einfach zu implementieren und werden daher oft komplexeren Techniken vorgezogen. Eine automatische Berechnung des Schwellwertes ist hier von Vorteil, damit der Algorithmus möglichst robust gegen Helligkeits- und Kontraständerungen ist. Zu den regionenbasierten Verfahren zählt außerdem das *Region Growing*, das nach Gruppen von Pixeln mit ähnlichen Eigenschaften sucht. Ausgehend von einzelnen zuvor bestimmten Pixeln oder Pixelgruppen einer gesuchten Region werden Nachbarpixel entsprechend eines Homogenitätskriteriums der Pixelgruppe zugeordnet, bis dieses Kriterium am Rand der Region nicht mehr erfüllt ist. Dabei ist die Qualität der Segmentierung sehr stark von dem Homogenitätskriterium abhängig [Gas09].

Kantenorientierte Verfahren suchen innerhalb des gesamten Bildes nach Kanten bzw. Rändern, die sich als Intensitätsgradienten darstellen. Viele Gradientenoperatoren wie zum Beispiel der Laplace- oder der Sobel-Kantenfilter basieren wie die linearen Rauschfilter auf einer Faltung des Bildes mit der Filtermatrix [Bur09]. In der Regel schließt sich nach der Gradientensuche eine Schwellwertoperation an, die die Lage der detektierten Kante in einem Binärbild anzeigt. Da die kantenorientierten Methoden sehr anfällig gegenüber Rauschen sind, ist eine sorgfältige Vorverarbeitung notwendig.

Falsch segmentierte oder fehlende Pixel bzw. Regionen können im Rahmen der **Nachverarbeitung** korrigiert werden, um vollständig zusammenhängende Segmente zu erhalten. Dies kann entweder manuell zum Beispiel durch Nachzeichnen einer Linie oder aber automatisch durch geeignete Interpolationsalgorithmen erfolgen.

Aus den Segmenten oder der gesamten Bildinformation werden Merkmale gewonnen, die im Rahmen der Klassifizierung als mögliche diagnostische Indikatoren dienen. Dies ist aber auch ohne vorherige Segmentierung möglich, wenn zum Beispiel Texturen oder Specklemuster anhand des gesamten Bildes analysiert werden. Mit einer Texturanalyse können beispielsweise unterschiedliche Gewebestrukturen oder sogar pathologisches von gesundem Gewebe aufgrund der verschiedenen Texturen unterschieden werden [Gos03, LP08]. Auch durch Speckleanalyse ist es möglich, verschiedene Gewebe voneinander abzugrenzen, da die jeweilige Speckleverteilerung mit den Streueigenschaften des Gewebes korreliert [Hil06]. Es können aber auch objektive Maße für die Gewebeeigenschaften wie Streukoeffizienten oder Brechungsindizes aus OCT-Bildern extrahiert werden [Knü00, Kho03]. In der Ophthalmologie ist vor allem die automatische Vermessung von Schichtdicken nach Segmentierung der OCT-Aufnahmen stark verbreitet. So können zum Beispiel die einzelnen Schichten der Retina sehr gut voneinander abgegrenzt und vermessen werden [Fer05]. Auch die Haut oder die Schleimhäute im Mundraum und Kehlkopf stellen sich als klar definierte Schichtstrukturen dar, bei denen zum Beispiel die Epitheldicke sehr gut automatisch bestimmt werden kann [Wei04]. Als mögliche Indikatoren für pathologische Gewebeveränderungen kommen hier zum Beispiel die Zunahme der Epitheldicke oder die Intaktheit der Basalmembran in Betracht [Tsa08]. Aber nicht nur rein morphologische Informationen, sondern auch zusätzliche statistische Werte können bei der automatischen Klassifikation hilfreich sein. Ein Beispiel dafür ist die Standardabweichung aller A-Scan-Intensitätsprofile innerhalb eines definierten lateralen Scanbereiches. So zeigt eine Untersuchung des Mundhöhlenkarzinoms, dass sich die Standardabweichung für verschiedene Krebsstadien in Abhängigkeit von der Tiefe ändert [Tsa09].

Eine **Merkmalsextraktion** ist nötig, wenn eine zu große Anzahl von zum Teil redundanten Variablen bzw. Indikatoren aus den OCT-Bildern gewonnen wird und so eine praktikable Weiterverarbeitung im Rahmen der Klassifizierung unmöglich machen. Der ursprüngliche Variablensatz wird hierzu mittels geeigneter Transformationen auf eine sinnvolle Anzahl von Merkmalen reduziert. Beispiele für solche Reduktionstechniken sind die Hauptkomponentenanalyse (*principal components analysis, PCA*) und die Diskriminanzanalyse (*linear discriminant analysis, LDA*) [Qi08].

Im Rahmen der **Klassifizierung** werden statistische Methoden angewendet, um die extrahierten Merkmale hinsichtlich ihrer Eignung für eine automatische Diagnose zu untersuchen bzw. um auf ihrer Basis eine Entscheidung zu treffen. Die Messdaten aus den OCT-Bildern werden über die Merkmale (Klassifikatoren) definierten Klassen, z.B. gesundes und pathologisches Gewebe, zugeordnet. Mit einem Test auf ein Merkmal können Zuordnungsfehler bestimmt werden, die durch statistische Kennwerte wie zum Beispiel Sensitivität oder Spezifität ausgedrückt werden [Fah07]. Diese cha-

rakterisieren somit die Güte eines Klassifikators. Die Sensitivität gibt die Richtigpositiv-Rate, die Spezifität die Richtignegativ-Rate in Bezug auf eine bestimmte Hypothese (z.B. die Intaktheit der Basalmembran) an. Teilt ein Klassifikator die Messgröße mehreren möglichen Klassen zu, z.B. wenn mit der gemessenen Epitheldicke ein Dysplasiegrad bestimmt werden soll, kann die Varianzanalyse prüfen, ob die Klasseneinteilung sinnvoll ist. Hier wird getestet, ob die Varianz zwischen den Klassen größer ist als innerhalb der Klassen. Ist das der Fall, unterscheiden sich die Klassen signifikant voneinander und die Einteilung gilt als sinnvoll. Voraussetzung für die Varianzanalyse ist eine Normalverteilung der Messgrößen, was bei kleinen Stichproben aber häufig nicht der Fall ist. Dann werden in der Regel parameterfreie (verteilungsfreie) Testverfahren gewählt [Bor08].

5.2. Erfassung und Verarbeitung klinischer OCT-Aufnahmen

5.2.1. Erfassung klinischer OCT-Bilder

Im Rahmen einer prospektiven Studie wurden an der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde des Universitätsklinikum Gießen klinische OCT-Bilder von 201 Patienten mit insgesamt 217 Kehlkopfveränderungen aufgenommen [Kra09]. Die OCT-Untersuchungen fanden jeweils während der Mikrolaryngoskopie zwischen der klinischen Beurteilung unter dem Operationsmikroskop und einer Biopsieentnahme statt. Insgesamt wurden 53 maligne, 34 präkanzeröse und 130 benigne Veränderungen nach histologischer Verifikation diagnostiziert. In einer bereits veröffentlichten Analyse ist der klinische Wert der OCT anhand eines Vergleiches von Verdachtsdiagnosen (OCT+MLS) mit den definitiven Diagnosen (Histologie) bestätigt worden [Kra08b]. Hier konnte auch gezeigt werden, dass die Sensitivität und die Spezifität für den Nachweis maligner Tumoren gegenüber alleiniger MLS gesteigert werden konnte. Zudem konnte eine Zunahme der Epitheldicke mit dem Grad der Malignität festgestellt werden [Kra09]. Eine objektive, quantitative Auswertung der Epitheldicken fehlt jedoch bisher.

Für die Aufnahmen wurde ein TDOCT-System der Firma *BioMedTech* (Nischni Nowgorod, Russland) eingesetzt. Bei einer Zentralwellenlänge von 980 nm liefert es eine axiale und laterale Auflösung von ca. 20 μm . Mit einer Bildrate von 1 Hz konnten Aufnahmen mit einem Tiefenscanbereich von 1,47 mm (gemessen in Luft) und einem lateralen Scanbereich von 2 mm erzeugt werden. Pro A-Scan wurden 200 Datenpunkte aufgenommen, jeder B-Scan wurde aus 200 A-Scans zusammengesetzt. Ein faserbasierter Applikator wurde unter operationsmikroskopischer Kontrolle auf die Stimmlippen aufgesetzt, um mögliche Artefakte durch Bewegungen zu minimieren. Dabei wurde darauf geachtet, das Gewebe möglichst nicht zu komprimieren, um Fehler bei der Vermessung der Gewebestruktur z.B. durch Brechungsindexänderungen zu vermeiden [Cha96, Dre09]. Der laterale Scan wurde mittels eines magnetisch ausgelenkten Scanners in der Faserspitze durchgeführt. Der Fokus lag etwa 400 μm unterhalb eines Schutzglases des Faserscanners, das mit dem Gewebe in

Kontakt gebracht wurde. Durch die Untersuchung im Kontaktverfahren war die Fokuslage für jede Untersuchung gleich, so dass diese bei der späteren Auswertung der Bilddaten keinen entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse hat. Zudem hat die Verwendung des Schutzfensters den Vorteil, dass Reflexionen an der Gewebeoberfläche aufgrund der angepassten Brechungsindizes nur sehr gering sind. Bei der Bildaufnahme wurden immer gleiche Aufnahmeparameter gewählt, um den Kontrastumfang für alle Aufnahmen möglichst konstant zu halten. Die OCT-Aufnahmen wurden nach der Aufnahme als 8 bit-Graustufenbilder gespeichert.

Aus den Bilddaten wurde ein Lernsatz mit insgesamt 32 Bildern ausgewählt (siehe Tabelle 5.1), um geeignete Algorithmen für die Segmentierung zu entwickeln und zu erproben. Alle Bilder des Lernsatzes wurden jeweils durch drei Experten der Arbeitsgruppe manuell segmentiert, um damit die Leistungsfähigkeit des Segmentierungsalgorithmus zu überprüfen.

Diagnose	n
Normal	12
Narbe	5
Zyste	4
Reinkeödem	1
Granulom	1
Papillom	1
Dysplasie	2
Invasives Karzinom	6

TABELLE 5.1.: Lernsatz mit insgesamt 32 OCT-Bildern von normalen und pathologisch veränderten humanen Stimmlippen.

5.2.2. Vorverarbeitung

Die Algorithmen sowohl für die Vorverarbeitung als auch für die Segmentierung, die Nachverarbeitung und die Vermessung der Epitheldicken wurden als Plugin für die lizenzfreie Bildverarbeitungssoftware *ImageJ* programmiert, die in der medizinischen und wissenschaftlichen Bildanalyse stark verbreitet ist. Die Software basiert auf der Programmiersprache *Java*, sie ist somit plattformunabhängig, durch Plugins leicht erweiterbar und kann zudem als Bibliothek in andere Programme eingebunden werden.

Im Rahmen der Vorverarbeitung werden die Bilder zunächst für die Segmentierung vorbereitet. Durch eine *Region of Interest (ROI)* kann der Benutzer ein geladenes Bild auf ein gewünschtes Maß verkleinern. Wird keine ROI bestimmt, wird das gesamte Bild weiterverarbeitet. Im ersten Schritt wird das Hintergrundrauschen entfernt. Dazu wird ein Histogramm des Hintergrundes erstellt und dessen

höchster Grauwert $I_{max,H}$ mit einer Häufigkeit $n \neq 0$ bestimmt. Den Zielpixeln $I(x', y')$ werden durch eine Punktoperation folgende Werte zugeordnet:

$$\begin{aligned} I(x', y') &= I(x, y) - I_{max,H} && \text{falls } I(x, y) - I_{max,H} > 0 \\ I(x', y') &= 0 && \text{falls } I(x, y) - I_{max,H} \leq 0. \end{aligned} \quad (5.1)$$

Anschließend werden die Speckle durch einen Mittelwertfilter mit einer 3×3 -Filtermatrix unterdrückt.

Zudem werden Hintergrundpixel, die oberhalb der Stimmlippen und unterhalb der Bildgebungstiefe liegen und daher keine Bildinformation tragen, entfernt. Durch die Reduktion der Pixelzahl kann der weitere Verlauf der Verarbeitung durch Einsparung von Rechenzeit beschleunigt werden.

5.2.3. Automatische Segmentierung

Für die Vermessung der Epitheldicke sind zwei Segmentierungsschritte notwendig, die Erkennung der Oberfläche und die Detektion des Übergangs zwischen Epithel und Lamina propria. In beiden Fällen wurden schwellwertbasierte Verfahren ausgewählt, die trotz der Einfachheit sehr gute Segmentierungsergebnisse in nur sehr kurzer Rechenzeit liefern. Im ersten Schritt beträgt der Schwellwert aufgrund der Hintergrundentfernung in der Vorverarbeitung $I_S=0$. Den Zielpixeln $I(x', y')$ des resultierenden Binärbildes (Abbildung 5.3c) werden also folgende Grauwerte zugeteilt:

$$\begin{aligned} I(x', y') &= 0 && \text{falls } I(x, y) = I_S \\ I(x', y') &= 255 && \text{falls } I(x, y) > I_S. \end{aligned} \quad (5.2)$$

Die Oberfläche kann für jeden A-Scan als das erste Pixel mit $I(y')=255$ angenommen werden (Abbildung 5.3d). Die Koordinaten (x', y') dieser Pixel werden gespeichert.

Ein Ablaufdiagramm für die Detektion der Basalmembran ist in Abbildung 5.4 dargestellt. Zunächst wird für das Epithel ein Histogramm H_E über die gesamte Breite des Bildes und eine Tiefe von 5 Pixeln ab der über alle A-Scans gemittelten Position der Oberfläche berechnet. Als Schwellwert wird der höchste Grauwert $I_{max,E}$ mit einer Häufigkeit $n \neq 0$ bestimmt. Entsprechend wird ein Histogramm H_L für die vermutete Lamina propria über eine Tiefe von 5 Pixeln ab einem Abstand von 6 Pixeln von der Unterkante von H_E berechnet und dessen höchster Grauwert $I_{max,L}$ berechnet. Anschließend wird geprüft, ob $I_{max,L} - I_{max,E} > 100$, also der Kontrast zwischen Epithel und Lamina propria, ausreichend groß ist. Ist dies der Fall, werden $I_{max,E}$ und $I_{max,L}$ zur Berechnung zweier Binärbilder gewählt (Abbildung 5.3e+g), aus denen jeweils die Position des ersten Pixels mit $I(y)=255$ für jeden A-Scan extrahiert wird (Abbildung 5.3f,h). Diese zwei Linien stellen die beiden Grenzwerte für die Lage der Basalmembran dar. Durch Hinzunahme der mittleren Grauwerte aus H_E und H_L wird die tatsächliche Position der Basalmembran berechnet (Abbildung 5.3i). Für $40 < I_{max,L} - I_{max,E} \leq 100$ wird zunächst der Kontrast um 50% erhöht, um das Epithel besser von der Lamina propria trennen zu

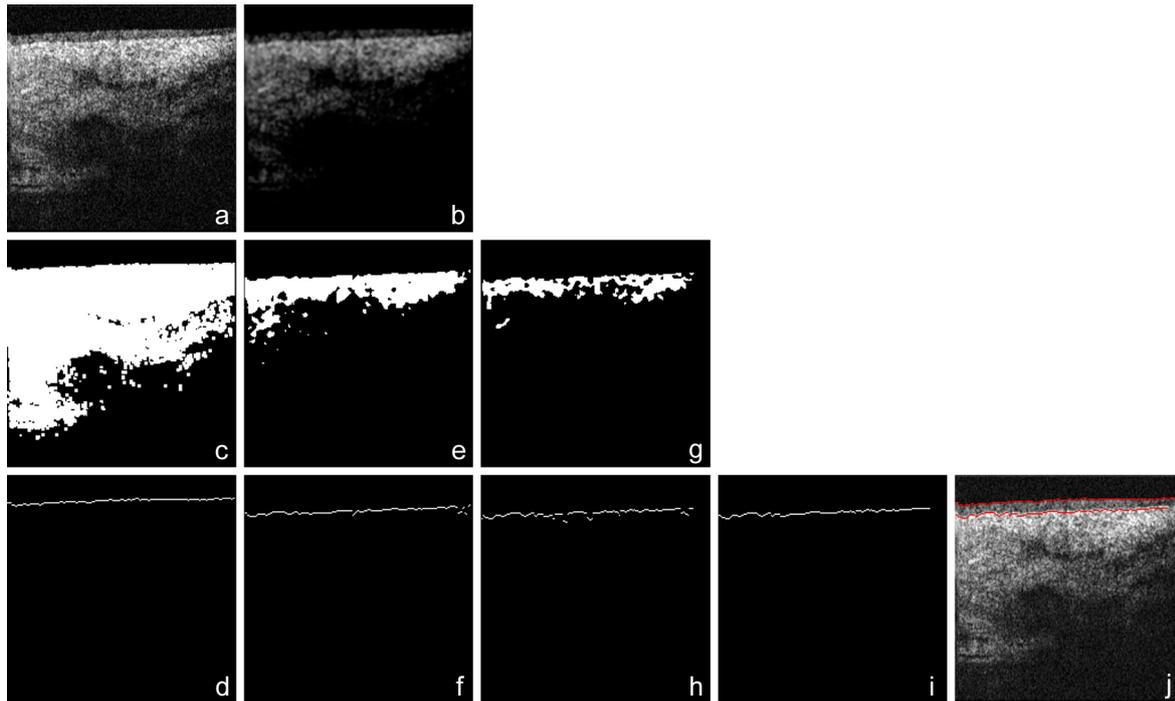


ABBILDUNG 5.3.: Originalbild (a) und Ergebnisse der einzelnen Segmentierungsschritte. Gefiltertes Bild (b), Binärbilder (c,e,g), extrahierte Linien für die Oberfläche (d) und die Basalmembran (f,h), korrigierte Linie der Basalmembran (i) und Originalbild mit beiden Linien (j).

können. Das Bild wird daraufhin mit einem 5×5 -Mittelwertfilter geglättet und die beiden Schwellwerte werden neu errechnet. Die Bestimmung der Lage der Basalmembran erfolgt anschließend wie oben beschrieben. Für $I_{max,L} - I_{max,E} < 40$ erfolgt ebenfalls eine Kontrasterhöhung um 50% und eine neue Schwellwertberechnung. Falls weiterhin $I_{max,L} - I_{max,E} < 40$, wird die Segmentierung abgebrochen. Im anderen Fall verläuft die Berechnung wie bereits beschrieben. Bei Abbruch der Segmentierung startet ein zweiter Algorithmus, der durch eine Schwellwertsegmentierung die untere Kante der Bildinformation findet. So kann unter Umständen die Umrandung eines Tumors detektiert werden und dessen Ausdehnung in die Tiefe vermessen werden, sofern er nicht größer als die Eindringtiefe des Lichtes ist. Das Ursprungsbild wird dazu nach Subtraktion des Hintergrundes zunächst mit einem 5×5 -Median gefiltert und anschließend mit $I_S=0$ in ein Binärbild transformiert, um die Kanten extrahieren zu können. In allen Fällen werden nach erfolgreicher Segmentierung beide Linien in ein Bild überführt. So kann der Abstand zwischen den Linien als Epitheldicke bestimmt werden. Zusätzlich können beide Linien zur subjektiven Überprüfung in das Originalbild eingezeichnet werden (Abbildung 5.3j).

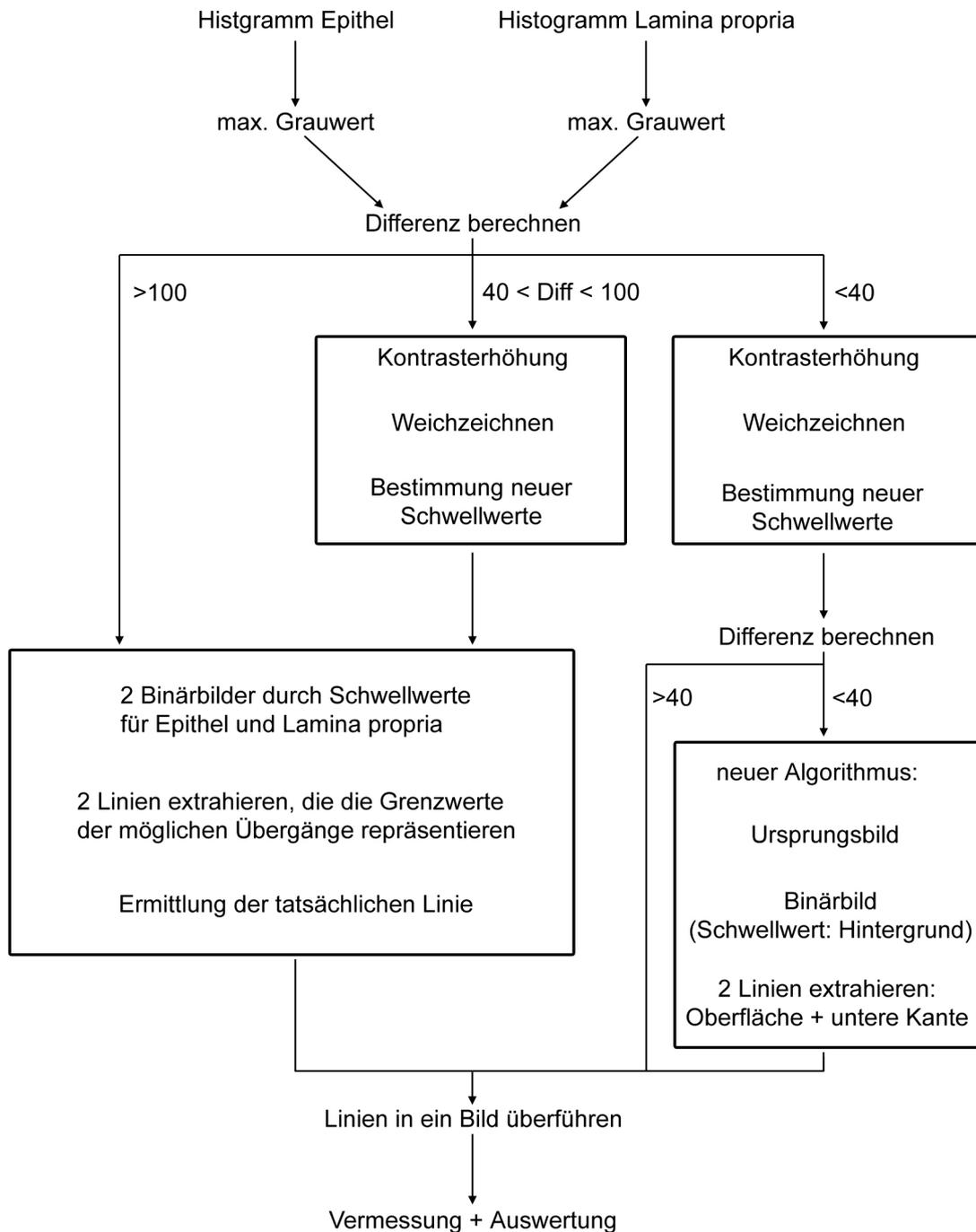


ABBILDUNG 5.4.: Ablaufdiagramm der Segmentierung zur Detektion der Basalmembran.

5.2.4. Automatische Messung der Epitheldicke

Die Epitheldicke wird für jeden erfolgreich segmentierten A-Scan als Abstand der zwei extrahierten Kanten berechnet, die die Gewebeoberfläche und den Übergang zwischen Epithel und Lamina propria repräsentieren. Die Epitheldicken, die zunächst nur als Pixelwerte vorliegen, werden über den bekannten Tiefenscanbereich skaliert. 200 Pixel entsprechen in Luft einer Tiefe von 1,47 mm, für Stimmlippengewebe reduziert sich der Wert um den Brechungsindex von $n=1,4$ (siehe Kapitel 2.4) auf 1,05 mm, so dass jedes Pixel einer Größe von $5,25 \mu\text{m}$ entspricht. Die Ergebnisse der Epitheldickenmessung nach automatischer und manueller Segmentierung sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst. Angegeben sind die über alle Mittendicken der Einzelbilder gemittelten Epitheldicken und die Standardabweichung für die Mittelung. Zwei Bilder, die nicht korrekt segmentiert werden konnten, wurden ausgeschlossen, so dass hier nur insgesamt 30 Bilder aufgeführt sind.

Diagnose	n	Algorithmus	Experte 1	Experte 2	Experte 3
Normal	11	112,36 ± 56,08	105,55 ± 57,78	103,36 ± 54,79	104,73 ± 55,62
Narbe	5	66,00 ± 26,54	54,80 ± 22,26	53,00 ± 22,77	52,20 ± 21,60
Zyste	4	90,75 ± 51,04	51,00 ± 26,81	51,25 ± 31,79	47,75 ± 26,86
Reinkeödem	1	63,00	48,00	45,00	45,00
Granulom	1	305,00	172,00	383,00	289,00
Papillom	1	278,00	311,00	367,00	297,00
Dysplasie	2	466,50 ± 41,72	321,50 ± 82,73	352,00 ± 53,74	348,00 ± 43,84
Invasives Karzinom	5	295,80 ± 75,79	307,00 ± 35,84	364,00 ± 72,73	308,20 ± 24,31

TABELLE 5.2.: Ergebnisse der Epitheldickenmessung nach automatischer und manueller Segmentierung. Dargestellt sind die über alle n gemittelten mittleren Dicken jedes Einzelbildes und die Standardabweichung für die Mittelung, jeweils angegeben in μm .

Abbildung 5.5 zeigt, dass die Epitheldicke bei einigen Veränderungen wie zum Beispiel Granulom oder Papillom sehr stark von den Normalwerten abweicht. Bei den Dysplasien und invasiven Karzinomen konnte das Epithel im Rahmen der automatischen Segmentierung nicht eindeutig von der Lamina propria abgegrenzt werden. Hier wurde der zweite Algorithmus angewendet, der jeweils die scheinbare untere Kante des Epithels detektiert hat. Im Falle der invasiven Karzinome war die Basalmembran bereits durchbrochen und die Lamina propria infiltriert, so dass hier auch die Umrandung der Tumorzapfen bei der Berechnung der Epitheldicke mit einbezogen wurde. In Abbildung 5.6 sind beispielhaft die Ergebnisse der automatischen Segmentierung für eine höhergradige Dysplasie und ein invasives Karzinom gegenübergestellt. Bei der Dysplasie ist die Basalmembran noch intakt, beim invasiven Karzinom hingegen ist sie durchbrochen. Im Falle einiger gutartiger Veränderungen wie Narbe, Zyste oder Reinkeödem ist die Epitheldicke kaum verändert, zum Teil sogar kleiner als die Normaldicke.

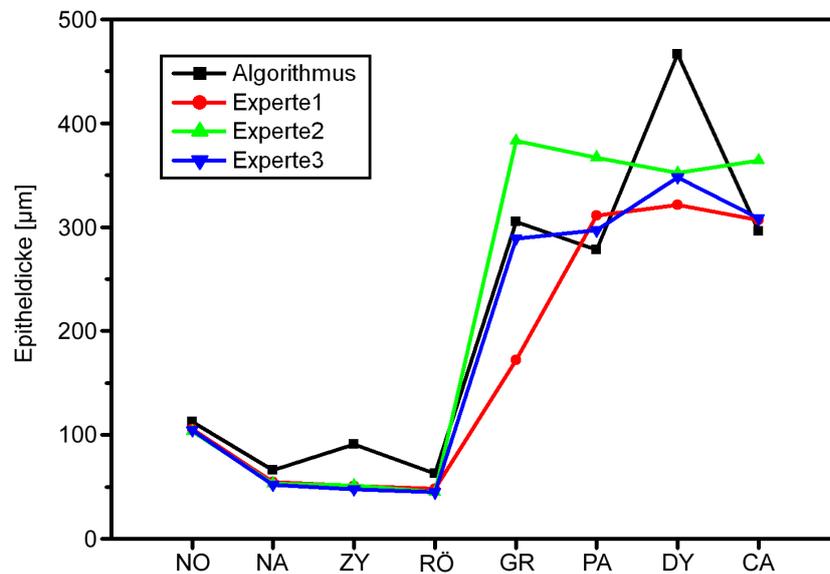


ABBILDUNG 5.5.: Gemittelte Epitheldicke nach automatischer und manueller Segmentierung (NO=normal, NA=Narbe, ZY=Zyste, RÖ=Reinkeödem, GR=Granulom, PA=Papillom, DY=Dysplasie, CA=invasives Karzinom).

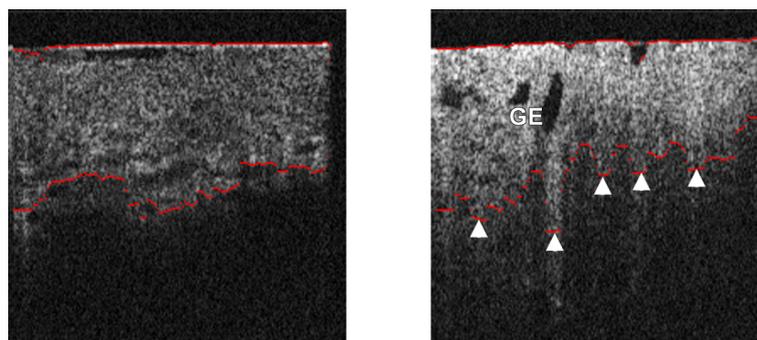


ABBILDUNG 5.6.: Vergleich von hochgradiger Dysplasie (links) und invasivem Karzinom (rechts). Die Pfeile im rechten Bild markieren die Tumorzapfen, außerdem sind deutlich Gefäße (GE) zu erkennen. Die gemessenen Epitheldicken betragen 437 µm (Dysplasie) und 403 µm (Karzinom).

5.2.5. Leistungsfähigkeit der automatischen Segmentierung

Abbildung 5.7 zeigt einen direkten Vergleich der automatischen und manuellen Segmentierungen anhand mehrerer Beispielbilder. Ein erster subjektiver Vergleich deutet darauf hin, dass der vorgestellte

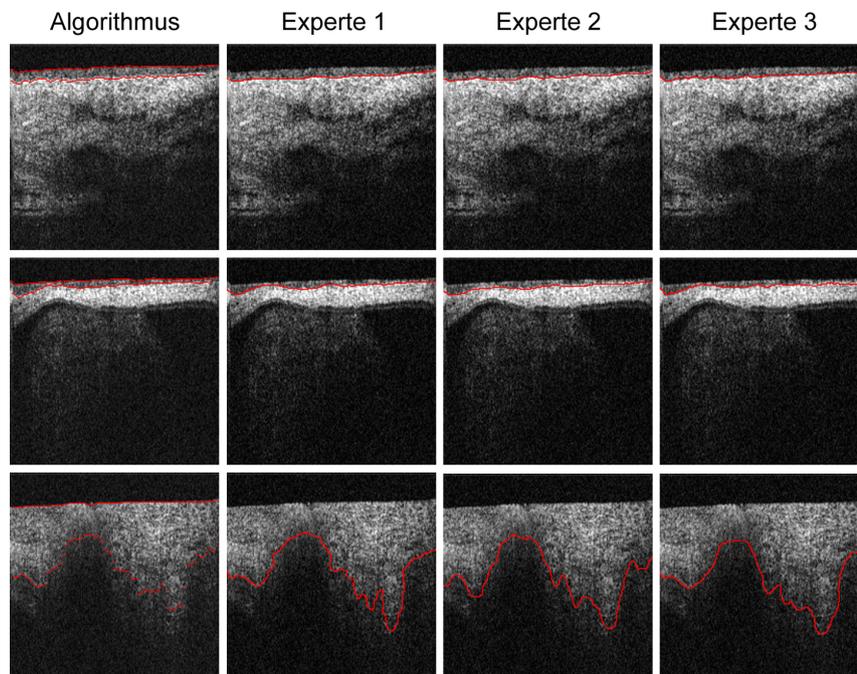


ABBILDUNG 5.7.: Vergleich der Ergebnisse nach automatischer und manueller Segmentierung. Oben: normale Stimmlippe, Mitte: Stimmlippenzyste, unten: invasives Karzinom.

Segmentierungsalgorithmus für diese drei Beispiele gut funktioniert. Besser vergleichbar sind die Ergebnisse jedoch mit Hilfe der Verteilung der Messwerte für alle A-Scans eines Bildes. In Abbildung 5.8 sind die Verteilungen der Epitheldickewerte für die drei Beispiele dargestellt, jeweils im Vergleich zu den Expertensegmentierungen. Die Epitheldickewerte für die normale Stimmlippe nach automatischer Segmentierung haben gegenüber den manuellen Segmentierungen einen leichten Offset, in den

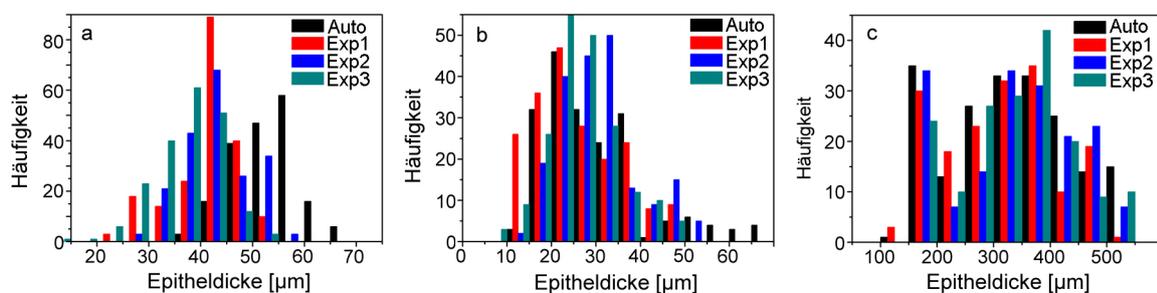


ABBILDUNG 5.8.: Verteilungen der Epitheldickewerte nach automatischer und manueller Segmentierung für drei verschiedene Beispiele: normale Stimmlippe (a), Zyste (b) und invasives Karzinom (c).

beiden anderen Fällen stimmen die Verteilungen für die Experten annähernd mit den Verteilungen für die automatische Segmentierung überein.

Die für die automatische und manuelle Segmentierung gemittelten Werte für die Epitheldicke sind vor allem für die normalen Stimmlippen vergleichbar mit verschiedenen Angaben in der Literatur (siehe Tabelle 5.3). Arens et al. haben die Epitheldicken verschiedener Pathologien von insgesamt 206 Patienten lichtmikroskopisch in histologischen Schnitten untersucht [Are07b], Wong et al. haben im Kontaktverfahren gewonnene OCT-Aufnahmen von 15 Patienten mit normalem Befund von ausgewertet. Kaiser et al. konnten erstmals einen Vergleich zwischen histologischen und OCT-Messungen jeweils gleicher Probenorte gezeigt. Hierzu wurden insgesamt 15 Patienten mit OCT im Kontaktverfahren untersucht. Zwischen den Verfahren betrug die Abweichung im Mittel über 20 μm . Da im

Diagnose	Auto	Experte1	Experte2	Experte3	[Are07b]	[Won05]	[Kai09]
Normal	112	106	103	105	146	129	81 / 103
Narbe	66	55	53	52			
Zyste	91	51	51	48			
Reinkeödem	63	48	45	45	217		
Polyp					244		
Chr. Laryngitis					247		
Granulom	305	172	383	289			
Papillom	278	311	367	297	272		
Dysplasie	466	322	352	348	258-445		
Inv. Karzinom	295	307	364	308	974		

TABELLE 5.3.: Ergebnisse der Epitheldickenmessung nach automatischer und manueller Segmentierung im Vergleich mit Literaturangaben, jeweils angegeben in μm .

Rahmen dieser Arbeit für jede Gruppe nur wenige Bilder vermessen wurden, ist dieser Vergleich jedoch nur bedingt aussagekräftig. So weichen zum Beispiel die Messwerte für das Reinkeödem oder die invasiven Karzinome erheblich von den Angaben von Arens ab [Are07b].

5.3. Klassifizierung

Abbildung 5.5 hat bereits gezeigt, dass über die Detektion des Übergangs von Epithel zu Lamina propria eine Einteilung in zwei Gruppen möglich ist. Durch die Software wird die Einteilung dadurch automatisch vorgenommen, dass die eigentliche Segmentierung durch den ersten Algorithmus abgebrochen wird, wenn kein Übergang - also kein ausreichender Kontrast zwischen Epithel und Lamina propria - vorhanden ist. Tabelle 5.4 zeigt die Wahrheitsmatrix für die analysierten Bilder. In allen Fällen, in denen kein eindeutiger Übergang zwischen Epithel und Bindegewebe mehr vorhanden ist

	Übergang nicht vorhanden	Übergang vorhanden
Übergang nicht erkannt	8	4
Übergang erkannt	0	20

TABELLE 5.4.: Wahrheitsmatrix für die Klassifizierung der OCT-Bilder anhand des Übergangs zwischen Epithel und Lamina propria.

(invasive Karzinome, Granulom, Papillom) wurde auch kein Übergang detektiert (richtig positiv). Bis auf vier Ausnahmen (falsch positiv) wurde in allen anderen Bildern, bei denen eindeutig das Epithel von der Lamina propria abgrenzbar ist, der Übergang auch detektiert (richtig negativ). In keinem Fall wurde ein Übergang erkannt, wenn keiner vorhanden war (falsch negativ). Eine Zyste konnte aufgrund eines an einigen Stellen sehr dünnen Epithels mit dem ersten Algorithmus nicht segmentiert werden und wurde daher der falschen Gruppe zugeordnet. Zudem wurde eine normale Stimmlippe falsch zugeordnet, da das Epithel vermutlich wegen eines Übergangs zu einer pathologischen Veränderung in einem Teil des Bildes nicht eindeutig abgrenzbar war (siehe Abbildung 5.9). Nach manueller Auswahl einer ROI war in beiden Fällen aber eine richtige Zuordnung möglich. Bei zwei

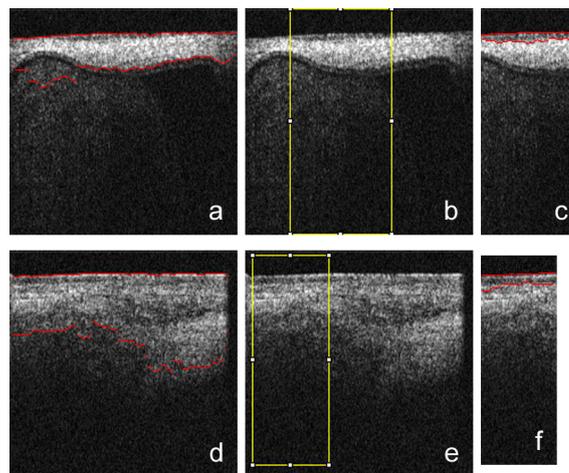


ABBILDUNG 5.9.: Durch Wahl einer ROI (b,e) konnten zuvor falsch segmentierte Bilder (a,d) in den ausgewählten Bereichen erfolgreich segmentiert werden (c,f). Das obere Beispiel zeigt eine Zyste, die unteren Bilder zeigen eine normale Stimmlippe, vermutlich mit Übergang zu einer pathologischen Veränderung.

Dysplasien wurde ebenfalls der Übergang nicht erkannt, obwohl die Basalmembran in beiden Fällen intakt war (siehe Abbildung 5.10). Hier könnte ein möglicher subepithelialer Entzündungsherd, in den oberen Bildern als transparente Regionen zwischen dem stark streuenden Epithel und der stark streuenden Lamina propria zu erkennen, die Detektierbarkeit des Übergangs unmöglich gemacht haben. Zudem ist der Kontrast zwischen Epithel und Lamina propria in beiden Fällen sehr gering, so dass eine automatische Unterscheidung, die auf dem Helligkeitsunterschied beider Regionen basiert,

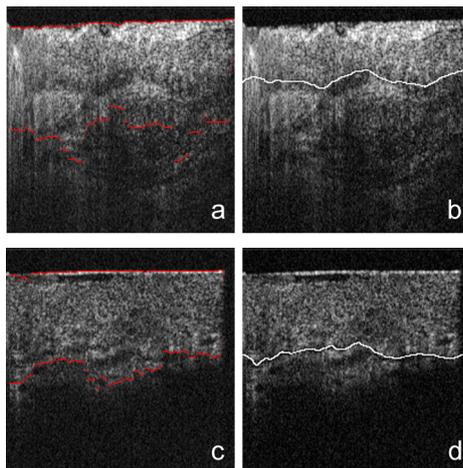


ABBILDUNG 5.10.: Vergleich der Ergebnisse nach automatischer (a,c) und manueller Segmentierung (b,d) für zwei Stimmlippen mit Dysplasien. In beiden Fällen konnte die noch intakte Basalmembran nicht erkannt werden.

hier nicht möglich war.

Mit Hilfe der Wahrheitsmatrix (Tabelle 5.4) kann die Sensitivität und die Spezifität bestimmt werden. Die Sensitivität ist hier die Wahrscheinlichkeit, dass kein Übergang erkannt wird, wenn kein Übergang vorhanden ist. Sie wird in der klinischen Forschung auch oft Empfindlichkeit oder Trefferquote für die Detektion einer Krankheit genannt. Sie wird durch

$$P(\text{Übergang nicht erkannt}|\text{nicht vorhanden}) = \frac{\text{Anzahl richtig positive}}{\text{Anzahl richtig positive} - \text{Anzahl falsch negative}}$$

berechnet. Die Spezifität dagegen entspricht der Wahrscheinlichkeit, mit der ein Übergang detektiert wird, wenn ein Übergang vorhanden ist. Die Berechnung erfolgt nach

$$P(\text{Übergang erkannt}|\text{vorhanden}) = \frac{\text{Anzahl richtig negative}}{\text{Anzahl richtig negative} - \text{Anzahl falsch positive}}$$

Die Sensitivität für die Klassifikation der OCT-Bilder anhand der Detektion der Basalmembran beträgt demnach 100 % und die Spezifität 83 %.

Durch eine nachträgliche Auswertung der A-Scan-Profile ist möglicherweise eine Unterscheidung der Reineödeme und Zysten von den normalen und vernarbten Stimmlippen möglich. Der Abfall der Intensität mit zunehmender Tiefe kann jeweils durch eine Exponentialfunktion $I(z) = I_0 \cdot e^{-\frac{z}{K}}$ mit unterschiedlichen Konstanten K für den exponentiellen Abfall genähert werden. Abbildung 5.11 zeigt, dass sich die K für das Reineködem (8,5) und die Zyste (9,4) sehr stark von denen der normalen (42,6) und vernarbten (41,7) Stimmlippe unterscheiden.

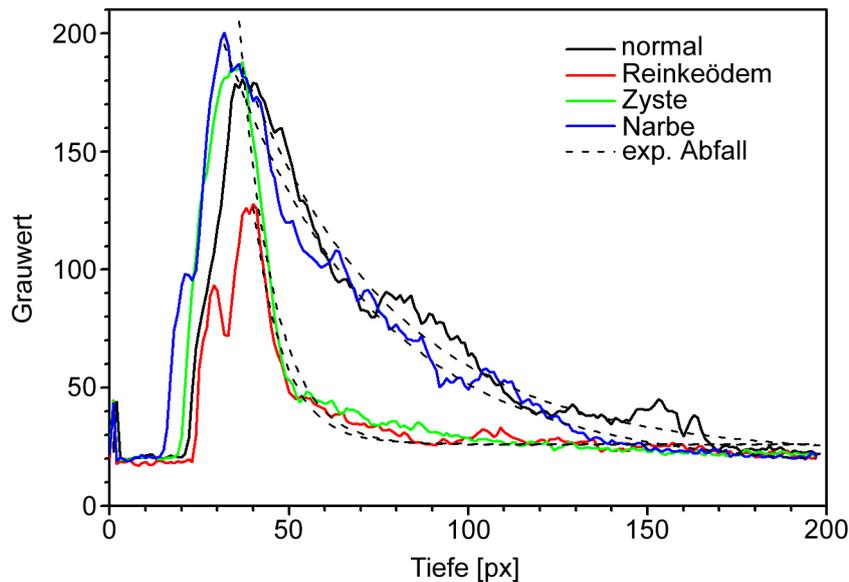


ABBILDUNG 5.11.: Über den gesamten B-Scan gemittelte A-Scanprofile im Vergleich. Der Verlauf des exponentiellen Abfalls für das Reinkeödem (rot) und die Zyste (grün) unterscheidet sich deutlich von dem für die normale (schwarz) und vernarbte Stimmlippe (blau).

5.4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die grundsätzliche Eignung der schwellwertbasierten Segmentierung zur automatischen Vermessung der Epitheldicke und der automatischen Klassifizierung der OCT-Bilder gezeigt werden. Jedoch zeigt das Verfahren noch einige Schwächen bei Aufnahmen, in denen die Struktur innerhalb eines Bildes in horizontaler Richtung variiert. Da der Schwellwert für die Erkennung des Übergangs zwischen Epithel und Lamina propria global bestimmt wird, kann auf solche Änderungen nicht reagiert werden. So kann die Epitheldickenbestimmung möglicherweise fehlerhaft sein. Das bedeutet, dass der vorgestellte Algorithmus in dieser Form ungeeignet ist, um zum Beispiel Tumorgrenzen detektieren zu können. Hierzu müsste der Schwellwert lokal bestimmt oder sogar im Laufe der Segmentierung dynamisch angepasst werden.

Die Messergebnisse für die Epitheldicke sind vergleichbar mit verschiedenen Literaturangaben, jedoch müssen für die Pathologien, die hier nur in geringer Zahl vermessen wurden, weitere Bilder ausgewertet werden, um eine verlässliche Aussage treffen zu können. Mögliche Abweichungen zwischen den Mittelwerten des Algorithmus und den Experten sind zum einen durch ein Nichterkennen der Basalmembran und zum anderen dadurch entstanden, dass bei der automatischen Segmentierung nicht immer alle A-Scans verwertbar waren und somit nicht in die Mittelwertbildung einbezogen wurden.

Auch methodische Fehlerquellen müssen bei der Bewertung der automatischen Epitheldickenmessung berücksichtigt werden. So kann zum Beispiel das Gewebe durch das Kontaktverfahren bei der

Bildaufnahme komprimiert worden sein und so die Epitheldicke entscheidend beeinflusst haben. Es wurde jedoch versucht, mit dem Faserapplikator möglichst wenig Druck auf das Gewebe auszuüben, um so den Fehler gering zu halten. Um diesen Fehler vollständig zu vermeiden, wäre ein berührungsloses Verfahren, wie es in Kapitel 4 vorgestellt wurde, besser geeignet. Alternativ könnte auch ein in ein Operationsmikroskop integriertes System zweckmäßig sein, das jedoch nur während der Mikrolaryngoskopie eingesetzt werden kann [Jus09]. Beide Verfahren haben allerdings den Nachteil, dass sie anfällig gegenüber Bewegungen sind und daher zusätzliche Artefakte möglich sind (siehe Kapitel 4.3).

Ein weiterer systematischer Fehler ist in der Skalierung der Tiefendimension durch den Brechungsindex des Epithels zu finden. Hier wurde ein Wert von $n=1,4$ angenommen, wie er häufig in der Literatur für verschiedene Weichgewebe zu finden ist. Fanjul-Velez hat den Brechungsindex des Stimmlippenepithels dagegen auf $n=1,51$ geschätzt [FV08], die Messungen würden im Vergleich also um ca. 8 % voneinander abweichen. Da jedoch die Variabilität des biologischen Gewebes sehr groß ist, wie die hohen Werte für die Standardabweichung zeigen, hat dieser Fehler eher geringe Auswirkungen auf die Klassifizierung des Gewebes. Um dennoch die Messungenauigkeit durch die Skalierung zu verringern, wäre eine Studie notwendig, in der der Brechungsindex für das Stimmlippenepithel möglichst *in vivo* vermessen wird. Zudem wäre eine Bestimmung für verschiedene Pathologien sinnvoll, da n zum Beispiel mit zunehmender Malignität ebenfalls zunimmt (siehe Kapitel 2.4). Die von Knüttel eingeführte Methode der ortsaufgelösten Messung des Brechungsindex wäre sogar mit dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten OCT-gestützten Laryngoskop möglich [Knü00].

Unter bestimmten Aufnahmebedingungen könnte auch die Fokussierung einen entscheidenden Einfluss auf die Helligkeitsverteilung bzw. den Bildkontrast haben und damit die Segmentierung erschweren. Da die Fokuslage im Kontaktverfahren immer gleich ist, hat der Effekt hier allerdings keinen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit. Bei der hier verwendeten Aufnahmetechnik lag der Fokus jeweils etwa 400 μm unterhalb der Gewebeoberfläche. Die Berechnung der Tiefenschärfe nach Gleichung (3.20) ergab für die laterale Auflösung des Faserapplikators von 20 μm einen Wert von 700 μm . Der Effekt ist für das hier verwendete Verfahren daher klein und wurde entsprechend vernachlässigt. Für höhere Auflösungen und berührungslose Verfahren müsste der Fokussierungseffekt jedoch dynamisch korrigiert werden, um ein möglichst konstanten Kontrast zu erreichen und die Reproduzierbarkeit der Segmentierungsergebnisse zu gewährleisten.

Bis auf einige Ausnahmen war die automatische Klassifizierung der OCT-Aufnahmen anhand der Detektion des Übergangs zwischen Epithel und Bindegewebe erfolgreich. Die Einteilung in zwei Gruppen über die Epitheldicke würde, wie in Abbildung 5.5 dargestellt, zum gleichen Ergebnis führen. Für eine differenziertere Einteilung entsprechend der pathologischen Veränderungen sind allerdings wesentlich mehr Aufnahmen nötig, um die einzelnen Gruppen eindeutig voneinander abgrenzen zu können. Hier könnten aber auch zusätzliche Indikatoren hilfreich sein, die die Klassifikation durch ergänzende Informationen verbessern könnten. So könnte zum Beispiel die Unterscheidung

von Zysten und Reinkeödemen von normalen und vernarbten Stimmlippen über die Auswertung der A-Scanprofile möglich sein. Jedoch muss auch hier zunächst eine größere Anzahl von Bildern untersucht werden, um eine definitive Aussage treffen zu können. Zudem könnte möglicherweise die Analyse der Abweichung zwischen den A-Scanprofilen innerhalb eines Bildes zusätzliche Informationen zum Beispiel zur Detektion von Tumorgrenzen liefern [Tsa09]. Die Unterscheidung von normalen und vernarbten Stimmlippen ist mit den hier vorgestellten Indikatoren jedoch wahrscheinlich nicht möglich (siehe Abbildung 5.11). Hierzu wäre ein alternativer Indikator notwendig. Möglicherweise ist die Unterscheidung zum Beispiel über eine Texturanalyse möglich, da vernarbtes Gewebe lokal stark verdichtet ist und von der regelmäßigen, einheitlichen Struktur einer normalen Stimmlippe abweichen kann. Zudem ist die Unterscheidung von Zysten, Reinkeödemen und wahrscheinlich auch Polypen untereinander mit den beschriebenen Methoden möglicherweise ebenfalls nicht möglich. Auch hier empfiehlt sich die Suche nach weiteren Indikatoren, die zum Beispiel charakteristische Strukturunterschiede der einzelnen Pathologien detektieren können.

Auch ist die Erkennung des Übergangs zwischen Epithel und Bindegewebe bei den Stimmlippen mit dysplastischen Veränderungen problematisch, so dass eine Abgrenzung von den invasiven Karzinomen, bei den die Basalmembran bereits durchbrochen ist, erschwert wird bzw. nicht möglich ist. Innerhalb dieser Gruppe befinden sich außerdem die Granulome und Papillome, bei den ebenfalls kein Übergang zwischen Epithel und Lamina propria detektierbar ist. Die Unterteilung der zu dieser Gruppe gehörenden Pathologien in Untergruppen ist also mit den hier gezeigten Methoden nicht möglich. Es müssten also weitere Strategien gefunden werden, um zum einen bei den Dysplasien den noch intakten Übergang zwischen Epithel und Bindegewebe zu erkennen und zum anderen die Granulome, Papillome und invasiven Karzinome voneinander abzugrenzen. Ersteres könnte möglicherweise durch geeignete Kantendetektionsalgorithmen oder eine optimierte Vorverarbeitung möglich werden. Möglicherweise könnte auch eine verbesserte axiale und laterale Auflösung die Erkennbarkeit der Basalmembran steigern [Che08]. Granulome, Papillome und invasive Karzinome könnten möglicherweise durch eine Texturanalyse klassifiziert werden, da invasive Karzinome gegenüber Papillomen und Granulomen eine wesentlich dichtere Gewebestruktur und daher möglicherweise auch unterschiedliche Texturen aufweisen.

Clark et al. haben in OCT-Aufnahmen aus verschiedenen Bereichen der Mundhöhle gezeigt, dass die Streuung aus dem Bereich des Epithels mit dem Malignitätsgrad zunimmt, da sich die Zellen zunehmend verdichten und vergrößern [Cla04]. Man könnte daraus also einen weiteren Indikator für die Diagnose von malignen Veränderungen ableiten. Allerdings ist die Größe und die Verteilung der Zellen innerhalb des Epithels selbst bei normalem Gewebe nicht homogen [Ari03, Col05], was die Auswertung erschweren könnte. In der Nähe der Basalmembran zum Beispiel sind die Epithelzellen wesentlich dichter angeordnet als in oberflächlichen Schichten. In der bisher einzigen experimentellen Studie zu den optischen Eigenschaften des Stimmlippengewebes wurde der Streukoeffizient als homogen über das gesamte untersuchte Gewebe angenommen, es wurde also nicht einmal

zwischen Epithel und Bindegewebe unterschieden [Mah01]. In einer aus dieser Studie abgeleiteten Abschätzung für die einzelnen Gewebeschichten, werden die Streueigenschaften jeweils innerhalb einer Schicht als konstant angenommen [FV08]. Da diese vereinfachten Annahmen offenbar auch für Stimmlippengewebe nicht exakt zutreffen, muss das theoretische Modell der Lichtausbreitung in Stimmlippengewebe in Zukunft verbessert werden, um die Bildinformation der OCT-Aufnahmen besser interpretieren und auf dieser Basis sichere Aussagen über den Zustand des Gewebes treffen zu können. Zunächst müssten experimentelle Daten über die Streueigenschaften für verschiedene Gewebezustände gesammelt werden. Dies sollte möglichst *in vivo* mit hoher Ortsauflösung in Abhängigkeit von der Tiefe geschehen, um mögliche Inhomogenitäten in den Streueigenschaften zu erkennen. Dafür geeignet sind alle hochauflösenden Mikroskopieverfahren, die endoskopisch an den Stimmlippen angewendet werden können, wie zum Beispiel konfokale Mikroskopie [Col05, Tho07], Zweiphotonenmikroskopie [Wu09] oder optische Kohärenzmikroskopie [Cla04, Kor09].

In Zukunft wäre der Aufbau einer Datenbank sinnvoll, in der alle OCT-Bilder mit verifizierten Diagnosen und objektiven Messdaten wie Epitheldicke, Streuprofile und optischen Gewebeeigenschaften gespeichert werden. Diese Informationen könnten zur Weiterentwicklung der Algorithmen genutzt werden oder sogar in den Ablauf der Algorithmen integriert werden, um die automatische Klassifizierung weiter zu verbessern. Diese zusätzlichen objektiven Daten könnten dem untersuchenden Arzt somit schon während der Untersuchung als wertvolle Entscheidungshilfe dienen, so dass möglicherweise die Sensitivität und die Spezifität für die frühzeitige Erkennung von malignen Veränderungen gesteigert werden könnte. Dies müsste in einem nächsten Schritt im Rahmen einer Blindstudie mit einer großen Zahl an Bilddaten untersucht werden.

6. OCT-kontrollierte fs-Laserphonochirurgie

Im folgenden Kapitel wird die Erprobung von fs-Lasern für den Einsatz im Rahmen einer Schichten respektierenden Operation der Stimmlippen dargestellt. Hierbei sollte vor allem untersucht werden, ob eine Präzision von wenigen μm ohne nennenswerte thermische bzw. mechanische Nebenwirkungen erreicht werden kann, um einen erfolgreichen Wundheilungsverlauf und damit auch den Funktionserhalt der Stimme zu garantieren. Zudem wurde der Einsatz von OCT zur Auswahl des zu behandelnden Gewebeareals, zur exakten Positionierung des Laserfokus und zur Kontrolle des Behandlungserfolgs in situ evaluiert.

Nach einer Einführung in den Wechselwirkungsprozess der Photodisruption, auf dem die Schnittwirkung der fs-Laserstrahlung im Gewebe beruht, wird die oberflächliche und subepitheliale Manipulation von Stimmlippengewebe anhand extrahierter Schweinekehlköpfe demonstriert. Auf der Basis der Ergebnisse dieser Laborversuche wurde ein mobiles Funktionsmuster für eine Wundheilungsstudie am lebenden Organismus entwickelt, die erfolgreich an Ferkeln von Hausschweinen durchgeführt werden konnte.

6.1. Einführung in die fs-Laserchirurgie mittels Photodisruption

Durch Fokussierung von fs-Pulsen können innerhalb eines kleinen Wechselwirkungsbereiches sehr hohe Leistungsdichtungen erzielt werden. In Flüssigkeiten und Festkörpern treten bei Überschreitung einer Intensitätsschwelle von etwa 10^{12} – $10^{13} \frac{\text{W}}{\text{cm}^2}$ so hohe elektrische Feldstärken auf, dass die Atome bzw. Moleküle im Bereich des Fokus ionisiert werden. Es entsteht ein Plasma mit einer Dichte freier Elektronen in der Größenordnung von 10^{21} cm^{-3} . Dieser Effekt wird optischer Durchbruch (engl. *optical breakdown*) genannt, er bildet die Grundlage des Photodisruptionsprozesses [Ora96, Nie07, Vog03, Vog05].

An der Initialisierung des Plasmas sind zwei intensitätsabhängige Mechanismen beteiligt, die Multiphotonenionisation (MPI) und die Tunnelionisation. Die ersten freien Elektronen können also sowohl durch gleichzeitige Absorption mehrerer Einzelphotonen als auch durch Absenken der Coulombschen Potentialwalls, das ein Tunneln der Elektronen ermöglicht, erzeugt werden. Diese sog. *Seed-Elektronen* können aus dem noch vorhandenen Laserfeld weitere Energie in Form von inverser Bremsstrahlung linear absorbieren und dadurch ihre kinetische Energie erhöhen. Nach Erreichen einer kritischen Energie werden durch Stöße weitere Atome bzw. Moleküle ionisiert. Dieser sukzessive

Prozess gleicht einer Kaskade und wird dementsprechend als Kaskadenionisation bezeichnet. Bei fs-Pulsen ist der Einfluss der MPI gegenüber der Kaskadenionisation vergleichsweise groß, da die Zeit für den Aufbau einer Kaskade nur sehr begrenzt ist [Hei02a]. Die Dichte freier Elektronen im Plasma steigt bis zur vollständigen Ionisation bei etwa 10^{21} cm^{-3} exponentiell an [Vog05]. Werden auch nach vollständiger Ionisation noch weiterhin Photonen absorbiert, kommt es zu einer weiteren Erwärmung des Plasmas. Geschieht diese sogenannte Thermalisierung in einem kürzeren Zeitraum (fs) als der Abtransport der Plasmaenergie (wenige 10 ps), spricht man von *thermal* und *stress confinement*. Die thermoelastischen Spannungen bleiben dann während der Pulsdauer innerhalb des Fokusvolumens eingeschlossen, was einen kontinuierlichen Druckanstieg zur Folge hat [Vog03]. Durch die anschließende thermoelastische Expansion des Volumens breitet sich eine nach außen gerichtete Stoßwelle aus, die im Falle von fs-Pulsen eine Druckamplitude von wenigen 10 MPa besitzt. Die Folge ist ein Zerreißen (Disruption) der umliegenden Strukturen. Entsprechend der Impulserhaltung entstehen bei der Abstrahlung der Stoßwelle nach innen gerichtete Zugkräfte, die sich auf das Zentrum des Fokusvolumens konzentrieren. In wässrigen Medien bildet sich eine Kavitationsblase, die sukzessive expandiert und kollabiert und nach wenigen μs als gasgefüllte Blase im Medium verbleibt.

Durch die Aneinanderreihung mehrerer optischer Durchbrüche kann eine Schnittwirkung bzw. ein Abtrag erzielt werden. Die Präzision ist dabei durch die Größe der Kavitationblasen bestimmt, die durch die Parameter Pulsdauer, Pulsenergie, Wellenlänge und Fokussierungswinkel bzw. numerische Apertur (NA) beeinflusst ist [Noa99, Vog99b, Hei05, Vog08]. Für $NA > 0,8$ können in der Nähe der Durchbruchschwelle Kavitationsblasen von nur wenigen 100 nm Größe erreicht werden. Diese Präzision ermöglicht beispielsweise die Manipulation von subzellulären Strukturen [Max05]. Für die Mikrochirurgie biologischer Gewebe, zum Beispiel in der Augenheilkunde, ist in der Regel eine Präzision von etwa $10 \mu\text{m}$ ausreichend, die bereits mit einer NA im Bereich von 0,1-0,3 erreicht wird. Bei kleineren NA nimmt jedoch auch die Elliptizität des Fokusvolumens zu und der Bereich der höchsten Plasmadichte verschiebt sich aufgrund von *plasma shielding* in Richtung des einfallenden Laserstrahls [Arn07]. Zudem können neben Wechselwirkungen aufeinander folgender Pulse [Tin09] und Aberrationen [Vog99a] nichtlineare Effekte wie Selbstfokussierung, Selbstphasenmodulation und Gruppengeschwindigkeitsdispersion die Präzision beeinträchtigen [Gae00, Hei02b].

6.2. Laborversuche zur Spezifizierung der Schneidparameter

6.2.1. Versuchsaufbau und -durchführung

Im Rahmen der Untersuchungen wurden zwei verschiedene fs-Lasersysteme eingesetzt und hinsichtlich der Eignung für die Mikrochirurgie an den Stimmlippen evaluiert. Für die einleitenden Untersuchungen zum Abtragverhalten in Stimmlippengewebe wurde zunächst das Titan:Saphir-System *Bright* des französischen Herstellers *Thales* verwendet. Hierbei handelt es sich um Oszillator/Verstärker-

System, welches aufgrund der erheblichen Abmaße für den Klinik- oder Praxiseinsatz vollkommen ungeeignet ist. Dieser Laser liefert jedoch sehr hohe Pulsenergien bis zu 300 μJ , so dass er sehr gut für eine erste grundlegende Studie geeignet war. Im Hinblick auf die Entwicklung eines Funktionsmusters und zur Vorbereitung auf die tierexperimentellen Studien wurde ein sehr kompaktes Faserlasersystem (*IMRA $\mu\text{Jewel D-400}$*) für die Eignung zur Mikrochirurgie an der Stimmlippe evaluiert. Solch ein kompaktes und transportables Lasersystem würde aufgrund der Abmaße und der Flexibilität den Einsatz eines fs-Lasers in der Praxis- oder Klinikumgebung ermöglichen. Dieses Oszillator/Verstärker-System ist vollständig aus Ytterbium-dotierten Fasern aufgebaut, die Verstärkung funktioniert nach dem Prinzip der *fiber-chirped pulse amplification (FCPA)*. Die Spezifikationen der für die folgenden Untersuchungen wichtigsten Parameter sind für beide Lasersysteme in Tabelle 6.1 aufgeführt.

	<i>Thales Bright</i>	<i>IMRA $\mu\text{Jewel D-400}$</i>
Wellenlänge [nm]	780	1040
Pulsdauer [fs]	>130	>300
Repetitionsrate [kHz]	5	100
Pulsenergie [μJ]	<300	<2,5

TABELLE 6.1.: Spezifikationen verschiedener Laserparameter für das Ti:Sa-System *Thales Bright* und das Faserlasersystem *IMRA $\mu\text{Jewel D-400}$* .

In Abbildung 6.1 ist eine Skizze des Versuchsaufbaus dargestellt. Der Laserstrahl wurde jeweils nach Aufweitung durch ein Galilei-Teleskop in eine Scaneinheit bestehend aus zwei Galvanometerscannern eingekoppelt, mit denen eine zweidimensionale Ablenkung des Strahls auf der Probe möglich war. Zur Fokussierung auf der Probenoberfläche wurden $f-\theta$ -Objektive verwendet, mit denen sowohl eine plane Fokusebene als auch ein annähernd konstanter Fokusbereich über das gesamte Feld erreicht wird. Der Strahldurchmesser wurde jeweils an die maximale Apertur der Scanspiegel bzw.

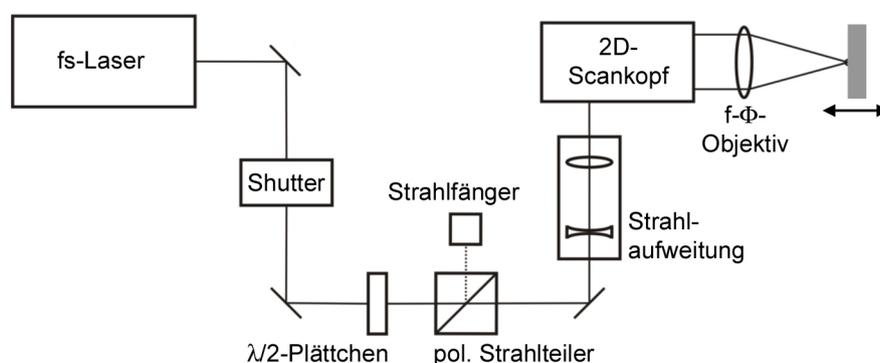


ABBILDUNG 6.1.: Skizze des Versuchsaufbaus zur Bestimmung der Schneidparameter. Die Strahlführung wurde jeweils an die Wellenlängen der verschiedenen Lasersysteme angepasst.

der Objektive angepasst, um den kleinst möglichen Fokusbereich zu erzielen. Über die Kombination aus $\lambda/2$ -Plättchen und polarisierendem Strahlteilerwürfel konnte die Laserleistung stufenlos abgeschwächt werden, ein mit dem jeweiligen Lasersystem synchronisierter Shutter ermöglichte die gezielte Applikation einer gewünschten Anzahl von Laserpulsen mit einer Genauigkeit von einzelnen Pulsen. Aufgrund der unterschiedlichen Wellenlängen der verwendeten Lasersysteme wurden für die Laborexperimente verschiedene Strahlführungen und Scaneinheiten eingesetzt. Tabelle 6.2 gibt einen Überblick über die technischen Daten beider Laboraufbauten.

Lasersystem	Thales Bright	IMRA μ Jewel D-400
Scanhead	GSI Lumonics HPM15M2	Scanlab SK1020
Arbeitsabstand f- Θ -Objektiv	75 mm	55 mm
maximale Apertur	15 mm	20 mm
NA	0,13	0,18
Fokusbereich ($2w_0$)	7,4 μ m	4,4 μ m
konfokaler Parameter ($2z_R$)	159 μ m	42 μ m
Durchmesser Scanfild	9 mm	5 mm
Shutter	Pockelszelle	AOM
Schaltzeit	wenige ns	250 ns
z-Achse	PI M-126.DG1	PI M-126.DG1
Reproduziergenauigkeit (bidir.)	1 μ m	1 μ m

TABELLE 6.2.: Übersicht über die technischen Daten der Laboraufbauten mit dem *Thales Bright* und dem *IMRA μ Jewel D-400*.

Die Positionierung des Laserfokus in z-Richtung relativ zur Probenoberfläche wurde mit Hilfe einer Linearachse (*PI M-126.DG1*) unter OCT-Kontrolle vorgenommen. Besonders für Energiedichten in der Nähe der Durchbruchschwelle war dies mit hoher Genauigkeit nötig, um überhaupt einen oberflächlichen Abtrag zu erzielen bzw. thermische Effekte wie Koagulation zu vermeiden. Dazu wurde ein faserbasiertes TDOCT-System des *Institute of Applied Physics, Nischni Nowgorod, Russland* über eine reproduzierbar einschwenkbare Faserführung in den optischen Aufbau zwischen f- Θ -Objektiv und Probe integriert (siehe Abbildung 6.2), so dass die Proben jeweils vor und nach der Behandlung in situ abgebildet werden konnten. Die technischen Daten des OCT-Systems sind in Tabelle 6.3 aufgeführt. Vor Ablauf jeder Versuchsreihe wurde die OCT-gestützte Positionierung kalibriert. Dazu wurde zunächst belichtetes und entwickeltes, also geschwärztes, Fotopapier in z-Richtung verschoben, bis dort bei sehr geringer eingestrahelter Intensität eine Wechselwirkung an der Oberfläche erkennbar war. Die Lage der Oberfläche des Photopapiers wurde mit OCT gemessen und diente anschließend als Referenz für die Lage der Fokusebene. Für die oberflächliche Ablation wurde jeweils die Probenoberfläche an der Referenzebene ausgerichtet. Für subepitheliale Schnitte wurde die Referenzebene in

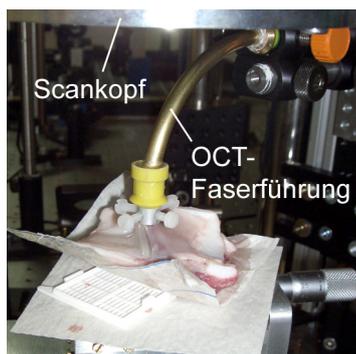


ABBILDUNG 6.2.: Integration eines ein-schwenkbaren faserbasierten OCT-Scanners zwischen Laserscankopf und Probe.

Zentralwellenlänge	980 nm
axiale Auflösung	15 μm
laterale Auflösung	24 μm
A-Scanrate	400 Hz
maximale Bildrate	0,5 Hz

ABBILDUNG 6.3.: Spezifikationen des faserbasierten TDOCT-Systems des *Institute of Applied Physics, Nischni Nowgorod, Russland*.

die gewünschte Schnitttiefe gelegt, wobei die Tiefe mit dem Brechungsindex des Gewebes von $n=1,4$ skaliert wurde.

Zur Ablation eines quaderförmigen Volumens wurden mehrere quadratische Ebenen sukzessive von der Gewebeoberfläche abtragen (vgl. Abbildung 6.6). Dabei wurde die Fokusposition in z -Richtung nach jeder abgetragenen Ebene in der Größenordnung der geschätzten Abtragrate nachgefahren, um einen erfolgreichen Abtrag zu garantieren (siehe Abbildung 6.4). Zur Erzeugung subepithelialer Mikroschnitte wurden jeweils wenige quadratische Ebenen in der mit Hilfe der OCT-Aufnahmen gewählten Tiefe abgetragen, wobei mit der tiefsten Ebene begonnen wurde. Die Fokusposition wurde nach jeder geschnittenen Ebene in Richtung Probenoberfläche nachgeführt. Für die Flapschnitte wurden zunächst wie für die subepithelialen Mikroschnitte wenige Ebenen unterhalb der Oberfläche abgetragen, anschließend wurden die Seitenflächen von der Oberfläche aus abgetragen.

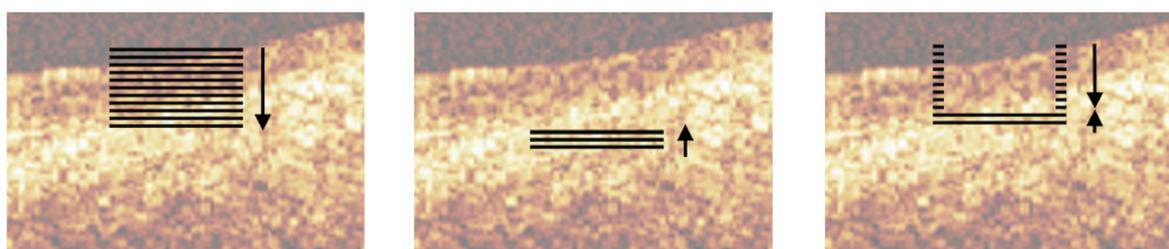


ABBILDUNG 6.4.: Verschiedene Scanmuster zur oberflächlichen Ablation (links), für subepitheliale Mikroschnitte (Mitte) und für Flapschnitte (rechts).

Mit Hilfe von OCT wurden die Ablationsresultate direkt nach der Lasermanipulation *in situ* gemessen. Über die Kratertiefe und die Zahl der in z -Richtung applizierten Pulse (Ebenen) konnte die Abtragrate, also die Abtragtiefe pro Puls, berechnet werden. Die Kratertiefe wurde durch morphometrische Auswertung zweier überlagerter OCT-Bilder, die vor bzw. nach dem Lasereinsatz aufgenommen wurden, mit einer Genauigkeit entsprechend der axialen Auflösung des OCT-Systems von 15 μm

bestimmt (siehe Abbildung 6.5). Dabei wurde der Mittelwert über zehn Messungen an äquidistanten Stellen der gesamten Kraterbreite berechnet.

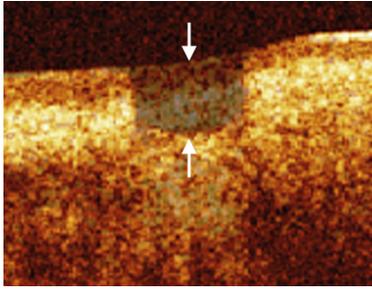


ABBILDUNG 6.5.: Überlagerung zweier OCT-Aufnahmen vor (Hintergrund) und nach Bearbeitung mit dem fs-Laser (Vordergrund). Die Pfeile markieren die Tiefe des Ablationskraters.

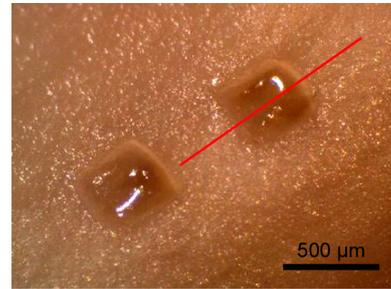


ABBILDUNG 6.6.: Auflichtaufnahme von zwei quadratischen Ablationskratern mit einer Fläche von jeweils $400 \times 400 \mu\text{m}^2$. Die rote Linie markiert den OCT-Scan in Abbildung 6.5.

Das Abtragverhalten der fs-Laser wurde an Stimmlippen extrahierter Schweinekehlköpfe untersucht. Diese wurden jeweils am Tag der Experimente von einem örtlichen Schlachtbetrieb nach Fleischbeschau durch die zuständigen Veterinärmediziner zur Verfügung gestellt und bis zur Manipulation mit dem fs-Laser gekühlt gelagert. Die Kehlköpfe wurden jeweils halbiert und so präpariert, dass die Stimmlippen unter Spannung blieben, um eine möglichst lebensnahe Situation zu simulieren (siehe 6.7). In Anlehnung an vergleichbare Strukturen des humanen Kehlkopfes wurden die caudal zur Ta-

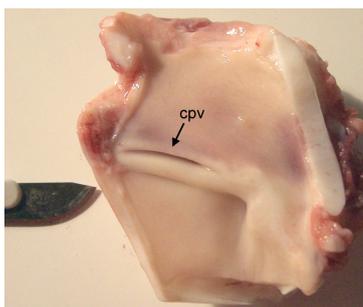


ABBILDUNG 6.7.: Halbierter Schweinekehlkopf. Es wurde jeweils die caudale Stimmlippe (caudale plica vocalis, cpv) bearbeitet.

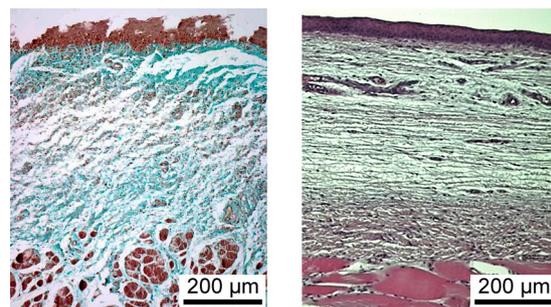


ABBILDUNG 6.8.: Histologische Schnitte von humaner Stimmlippe (links) und Schweinestimmlippe (rechts) im Vergleich.

schenfalte liegenden Stimmlippen, die caudalen *plicae vocales*, als Versuchsgewebe ausgewählt. Hier zeigen sich im histologischen Vergleich Übereinstimmungen im Schichtaufbau des Gewebes (siehe Abbildung 6.8).

6.2.2. Oberflächliche Ablation von Gewebevolumenta

Abbildung 6.9 zeigt, dass bei geeigneter Wahl der Laserparameter ein kontrolliertes Abtragen an der Gewebeoberfläche sehr gut durchgeführt werden konnte. Hier ist beispielhaft die OCT-Aufnahme eines mit dem Ti:Sa-System erzeugten Ablationskraters im Vergleich mit einem histologischen Schnitt desselben Probenortes dargestellt. Im histologischen Schnitt sieht man das Epithel erheblich dün-

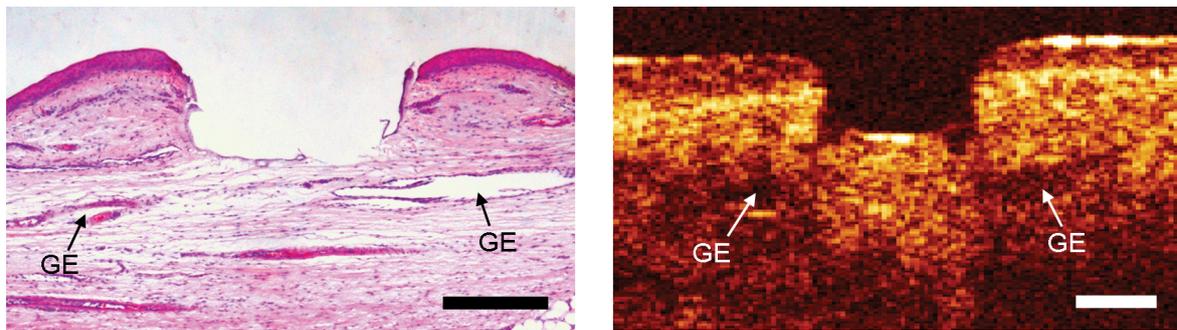


ABBILDUNG 6.9.: Vergleich von histologischem Schnitt (links) und OCT-Aufnahme (rechts) eines Ablationskraters. Die eingezeichneten Pfeile markieren zwei Blutgefäße (GE). Die Balken repräsentieren jeweils eine Länge von 200 μm für beide Raumrichtungen.

ner dar als in der OCT-Aufnahme, trotz der Skalierung mit dem Brechungsindex von $n=1,4$. Dies ist auf die Schrumpfung des Gewebes durch Fixation in Formalin und die anschließende histologischen Aufarbeitung zurück zu führen, bei der vor allem das flüssigkeitsreiche Epithel dehydriert wird. Die Schrumpfung kann für das Stimmlippenepithel zwischen 10% und 50% betragen [Kim03, Are07a, Kai09].

Der Ablationskrater ist im Mittel 210 μm tief und 400 μm breit. Der Pulsüberlapp betrug in x- und y-Richtung etwa 45%, so dass für eine Ebene etwa 10100 Pulse benötigt wurden. Es wurden insgesamt 100 Ebenen mit einem Spotabstand in z-Richtung von 2 μm abgetragen. Entsprechend der Repetitionsrate des Ti:Sa-Systems von 5 kHz betrug die Bearbeitungszeit etwa 200 s. Es wurde eine Energiedichte von $3,4 \text{ J/cm}^2$ verwendet, mit der eine Abtrage von $2,1 \mu\text{m}/\text{Puls}$ erzielt wurde.

Der Verlauf der Abtraten gegenüber der Energiedichte für den Ti:Sa-Laser ist in Abbildung 6.10. Der Verlauf ist im Bereich kleiner Energien annähernd linear. Die Schwellenergiedichte kann anhand der experimentellen Ergebnisse zu ca. $1,5 \text{ J/cm}^2$ bestimmt werden. Unterhalb dieses Wertes wurde nie ein Abtrag beobachtet. Abbildung 6.11 zeigt den Verlauf der Abtraten gegenüber der Energiedichte für das IMRA-System. Der Verlauf ist wie beim Ti:Sa im Bereich kleiner Energien annähernd linear. Die Durchbruchschwelle kann anhand der experimentellen Ergebnisse zu ca. $1,4 \text{ J/cm}^2$ bestimmt werden und stimmt annähernd mit dem Wert für den Ti:Sa-Laser überein. Unterhalb dieses Wertes wurde auch hier kein erfolgreicher Abtrag beobachtet wurde.

Es hat sich gezeigt, dass mindestens mit der 1,5-fachen Schwellenergie geschnitten werden sollte, um mögliche thermische Effekte auszuschließen und selbst bei leichter Defokussierung einen präzi-

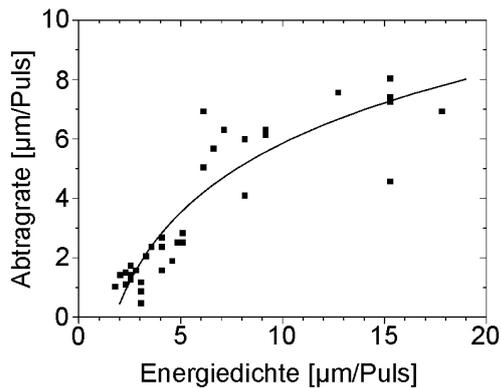


ABBILDUNG 6.10.: Abtragsrate in Abhängigkeit von der Energiedichte für das Ti:Sa-System *Thales Bright*.

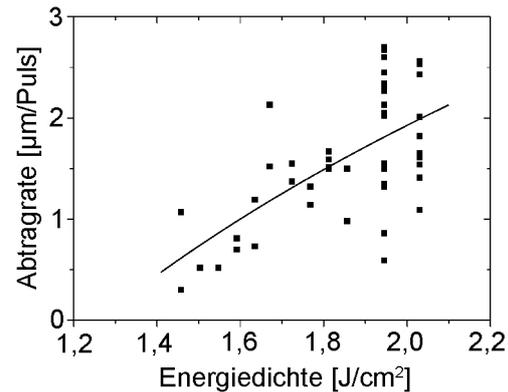


ABBILDUNG 6.11.: Abtragsrate in Abhängigkeit von der Energiedichte für den Faserlaser *IMRA µJewel D-400*.

sen Abtrag erreichen zu können. Die geringsten Ausdehnungen der thermischen Nekrosezonen am Boden der Ablationskrater von etwa 10-15 μm wurden mit dem Ti:Sa-Laser bei Energiedichten von $F=3,4 \text{ J/cm}^2$ gemessen (siehe Abbildung 6.12a). Mit dem Faserlaser kann maximal eine Energiedichte von $F=1,95 \text{ J/cm}^2$ erreicht werden, auch hier beträgt die Dicke der thermischen Nekrosezone lediglich ca. 10 μm (siehe Abbildung 6.12b). Die Schädigungszonen konnten mit OCT nicht von

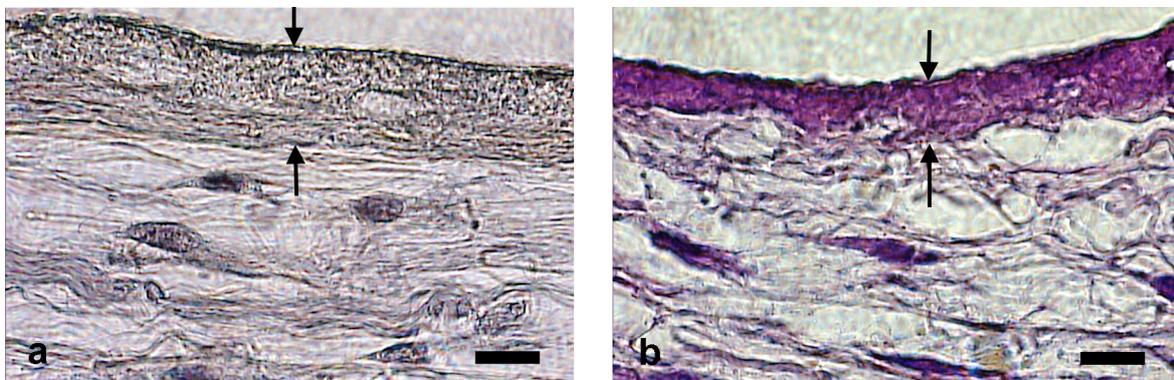


ABBILDUNG 6.12.: Histologische Schnitte von extrahierten Schweinestimmrippen nach Bearbeitung mit dem Ti:Sa-System (a) und dem IMRA-System (b). Die Ausdehnung der Nekrosezone wurde jeweils am Boden der Ablationskrater gemessen (durch Pfeile markiert). Die Balken entsprechen einer Länge von 10 μm .

darunterliegendem Gewebe unterschieden werden. Es war zwar eine Veränderung der Streueigenschaften aus diesem Bereich zu erwarten, die Ausdehnung lag jedoch jeweils im Bereich der axialen Auflösung des OCT-Systems und war daher nicht quantifizierbar.

In den Versuchen mit beiden Lasern hat sich gezeigt, dass die exakte Fokussierung des Laserstrahls oberhalb bzw. auf der Probenoberfläche zwingend notwendig ist, um thermische Nebenwirkungen zu

vermeiden und eine erfolgreiche oberflächliche Ablation zu erzielen. Wird der Laserstrahl innerhalb der Probe fokussiert, können beispielsweise intraepitheliale Blasen entstehen, ein erfolgreicher Abtrag ist dann nicht mehr möglich (siehe Abbildung 6.13). Dieser Effekt kann jedoch auch konstruktiv

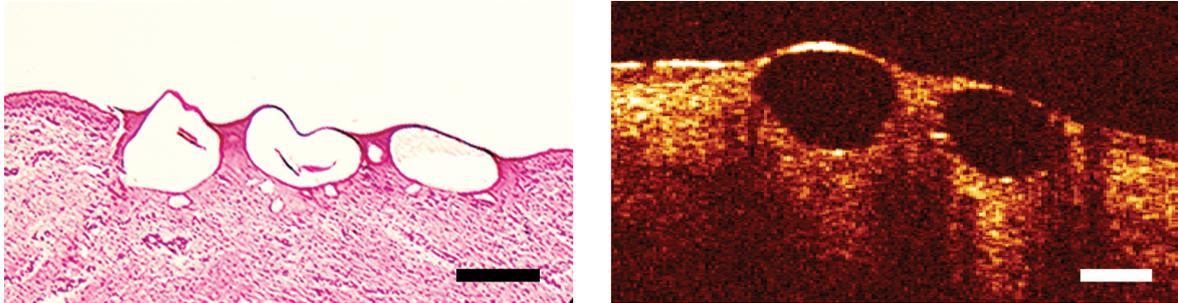


ABBILDUNG 6.13.: Blasenbildung durch Fokussierung unterhalb der Oberfläche mit teilweise intaktem Epithel. Links: OCT-Aufnahme, rechts: histologischer Schnitt. Die Balken entsprechen einer Länge von 200 µm.

genutzt werden, wenn präzise Mikroschnitte unterhalb der Oberfläche gewünscht sind, zum Beispiel zur Trennung von Vernarbungen.

6.2.3. Subepitheliale Mikroschnitte

Mit OCT jeweils direkt nach Laserbehandlung und in histologischen Schnitten konnte gezeigt werden, dass ein Schneiden auch unterhalb der Oberfläche und - was aus medizinischer Sicht sehr interessant ist - unterhalb des Epithels (im Reinke-Raum) möglich ist. Abbildung 6.14 zeigt einen Vergleich von OCT und histologischem Schnitt eines subepithelialen Mikroschnittes. Bei der Photodisruption unterhalb der Oberfläche entstehen durch Photodissoziation zunächst gasgefüllte Blasen, die das darüber liegende Gewebe nach oben drücken und je nach Größe die Gewebeoberfläche wölben. Der Wasserdampf in diesen Kavitäten geht nach dem Abkühlen in den flüssigen Zustand über

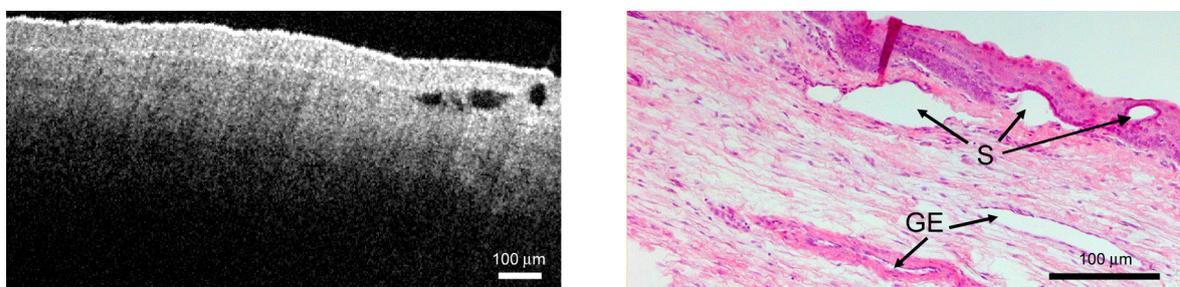


ABBILDUNG 6.14.: OCT-Aufnahme (links) und histologischer Schnitt (rechts) eines laserinduzierten Mikroschnittes unterhalb des Epithels. Die Pfeile markieren den subepithelialen Schnitt (S) und zwei Blutgefäße (GE).

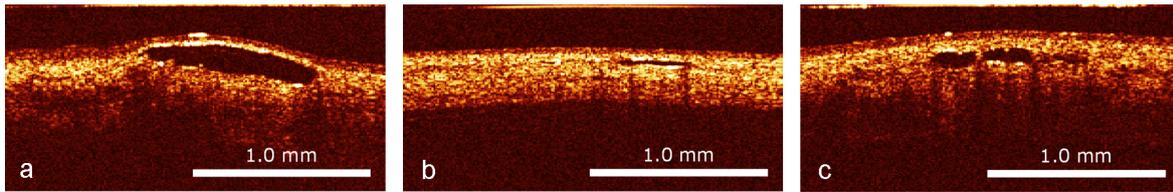


ABBILDUNG 6.15.: OCT-Aufnahmen subepithelialer Mikroschnitte in Abhängigkeit von der Anzahl der Wiederholungen und der Schnitttiefe. (a) 6 Wiederholungen, Tiefe: 80 µm, (b) 2 Wiederholungen, Tiefe: 80 µm, (c) 6 Wiederholungen, Tiefe: 160 µm. Die Schnitte wurden mit dem Faserlasersystem bei einer Pulsenergie von 1,8 µJ und einem Pulsüberlapp von 80% durchgeführt.

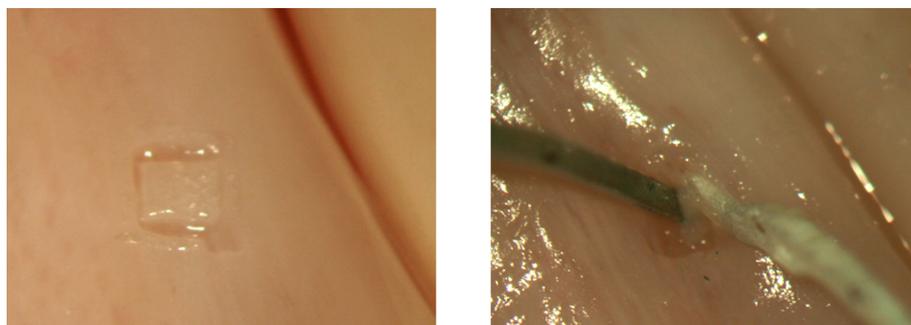


ABBILDUNG 6.16.: Durch den Faserlaser ausgeschnittener Quader in Aufsicht (links) und bei der Herausnahme (rechts) mit einer Größe von $1 \times 1 \times 0,15$ mm. Sowohl für das Schneiden der Grundfläche als auch für das sukzessive Abtragen der Seitenflächen wurde eine Pulsenergie von 1,8 µJ, ein Pulsüberlapp von 80% und ein Spotabstand in z-Richtung von 2 µm gewählt.

und löst die übrigen gasförmigen Bestandteile, so dass flüssigkeitsgefüllte Blasen im Gewebe zurück bleiben. In Abbildung 6.15 ist die Größe der Volumina in Abhängigkeit von der Anzahl der Wiederholungen des Mikroschnittes und der Schnitttiefe jeweils direkt nach Lasermanipulation gezeigt. Die Schnitte wurden mit dem Faserlasersystem bei einer Pulsenergie von 1,8 µJ und einem Pulsüberlapp von 80% durchgeführt. Für jede 1 mm^2 große Schnittebene wurden etwa 1,3 Millionen Pulse benötigt, entsprechend der Repetitionsrate des Faserlasers von 100 kHz resultiert dies in einer Bearbeitungszeit von etwa 13 s pro Ebene.

Die Applikation der Mikroschnitte innerhalb des Gewebes ermöglicht zudem ein Ausschneiden quaderförmiger Gewebevolumina, ohne das gesamte Gewebe oberflächlich abtragen zu müssen. Abbildung 6.16 zeigt einen mit dem Faserlaser ausgeschnittenen Quader mit einer Grundfläche von 1×1 mm und einer Höhe von etwa 150 µm. Die Grundfläche wurde mit drei Ebenen bei einem Pulsüberlapp von 80% mit einer Pulsenergie von 1,8 µJ geschnitten. Die Seitenflächen wurden jeweils sukzessive durch zwei nebeneinander liegende Linien mit einem Pulsüberlapp in x- und y-Richtung von 80% und einem Spotabstand in z-Richtung von 2 µm von der Oberfläche aus abgetragen. Insgesamt wurden für das Ausschneiden des Quaders etwa 4 Millionen Pulsen benötigt, die Bearbeitungszeit betrug

etwa 40 s.

6.3. Aufbau eines mobilen Funktionsmusters für die Phonochirurgie

Für die geplanten Tierstudien zur Evaluierung der OCT-kontrollierten fs-Lasermikrochirurgie wurde ein mobiles Funktionsmuster mit einer fs-Laserquelle, einer schnellen Strahlablenkung und einem integrierten OCT-System entwickelt. Diese Laseroperationsanlage musste außerhalb des Laserlabors einsetzbar sein und in einer klinischen Umgebung in Betrieb genommen werden können, da Tierstudien nach dem Tierschutzgesetzes in veterinärmedizinisch betreuten Einrichtungen durchgeführt werden müssen. Zur Umsetzung des Konzeptes waren zahlreiche komplexe Fragestellungen wie die Entwicklung eines an das Tiermodell Schwein angepassten Applikators und die Einkopplung des OCT-Strahlengang in die bereits bestehende Laserstrahlführung zu lösen.

6.3.1. Anforderungen

In den Laborexperimenten hat sich gezeigt, dass die exakte Fokussierung des Laserstrahls oberhalb bzw. auf der Probenoberfläche zwingend notwendig ist, um Gewebe erfolgreich abzutragen und Nebenwirkungen zu vermeiden. Mögliche Bewegungen durch den Tremor des Arztes oder des Patienten (vgl. Kapitel 4.3.1) würden jedoch einen erfolgreichen Abtrag während einer Behandlung mit einem freihändig geführten Applikator am wachen Patienten unmöglich machen. Die Behandlung sollte daher im Rahmen einer Mikrolaryngoskopie mit einem starren Applikator, z.B. gekoppelt an ein Operationsmikroskop, durchgeführt werden.

Zur Realisierung des Konzeptes einer OCT-kontrollierten Mikrochirurgie sind zwei Alternativen möglich. So könnte die Einkopplung des OCT-Strahls in den Strahlengang der Laserapplikation entweder vor oder hinter dem Scankopf erfolgen. Die Einkopplung vor dem Scankopf hätte den Vorteil, dass Scanner und Fokussieroptik sowohl für den Laserstrahl als auch für den OCT-Strahl genutzt werden könnten. Eine Gewebemanipulation und gleichzeitige OCT-Bildgebung ist mit dieser Alternative jedoch nicht möglich, da jeweils verschiedene Scangeometrien und -geschwindigkeiten verwendet werden. Durch Einbringen eines dichroitischen Spiegels, der reflektiv für die Wellenlänge des OCT-Systems und transmittiv für die Laserstrahlung ist, könnte die OCT-Einkopplung hinter dem Scanner realisiert werden. Auf diese Weise wären zwar Bearbeitung und Beobachtung gleichzeitig möglich, die Einkopplungseinheit würde jedoch zusätzlichen Bauraum benötigen, so dass sich der Arbeitsabstand entsprechend vergrößern würde. Zudem tritt durch den Durchgang eines konvergenten Strahls durch eine schräge planparallele Platte Astigmatismus auf [Mal04], der eine Vergrößerung des Fokusbereichs führt und somit die Schwelle für den optischen Durchbruch erhöht.

Der Arbeitsabstand muss auf die Anatomie der Patienten bzw. der Versuchstiere angepasst werden. Nach Beratungen mit Veterinärmedizinern der Tierärztlichen Hochschule Hannover wurden Ferkel

von Hausschweinen als Tiermodell gewählt (siehe Abschnitt 6.4.1). In biometrischen Untersuchungen wurde der Arbeitsabstand für den Einsatz in der Tierstudie auf etwa 15 cm bestimmt. Die Herausforderung besteht darin, in diesem sehr großen Arbeitsabstand einen ausreichend kleinen Fokus zu generieren, um dort mit den begrenzten Pulsenergien des Faserlasers (siehe Tabelle 6.1) noch einen optischen Durchbruch erzeugen zu können. Zudem muss der Arbeitsabstand über einen Bereich von wenigen Zentimetern einstellbar sein, um die Anpassung an des Arbeitsabstandes an verschiedene Tieranatomien zu ermöglichen.

6.3.2. Technische Umsetzung

Das Funktionsmuster wurde als eigenständige Einheit bestehend aus 3-Achs-Scanner, f- Θ -Objektiv, einem Applikationsrohr zur Einführung in den Rachenraum und einer OCT-Einheit als intraoperatives Bildgebungsverfahren für die direkte Applikation am Versuchstier realisiert (siehe Abbildung 6.17). Die technischen Daten des Aufbaus sind in Tabelle 6.3 aufgeführt. Das gesamte Funktions-

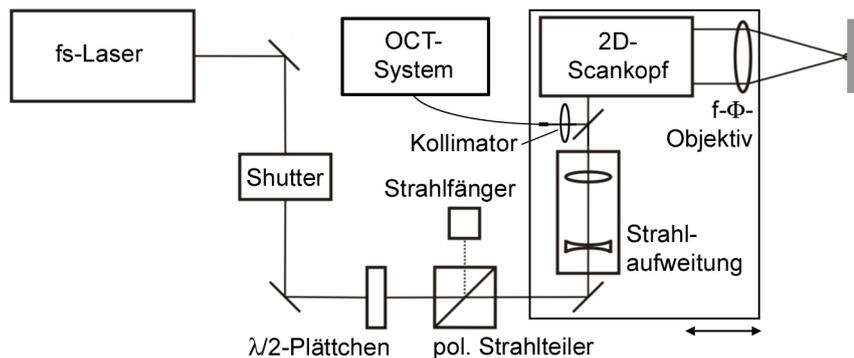


ABBILDUNG 6.17.: Aufbauskitze des Funktionsmusters für den Einsatz in der tierexperimentellen Studie.

muster inklusive dem Laser wurde für die Durchführung der tierexperimentellen Studien auf einem transportablen Breadboard aufgebaut. Die Grundplatte hatte eine Größe von etwa 1,20 m \times 1,50 m, das Gesamtgewicht des Aufbaus betrug etwa 22 kg. Der Justageaufwand nach dem Transport lag im Bereich von nur etwa 1-2 Stunden, da lediglich die Strahlage mit Hilfe einiger Spiegel angepasst werden musste.

Für die intraoperative Bildgebung wurde ein TD-OCT-System der Firma *LightLab Imaging* über einen ausschwenkbaren Silberspiegel zwischen Teleskop und Scankopf in den Strahlengang eingekoppelt (siehe Abbildung 6.18). Dadurch war es möglich, den OCT-Strahl mit einem Durchmesser hinter dem Kollimator von $2w_0=6,9$ mm durch den Scankopf zu führen und mit dem f- Θ -Objektiv auf eine Fleckgröße von $2w_f=20,3$ μ m zu fokussieren, was einer lateralen Auflösung von $\Delta x=16,9$ μ m entspricht. Die Lage des Laserfokus und die Probenarmlänge des OCT-Systems wurden aufeinander abgestimmt, dass eine mikrometeregenaue Positionierung des Laserfokus auf bzw. in der zu bearbei-

Lasersystem	IMRA μ Jewel D-400
Scanhead	GSI Lumonics HPM15M2
f- Θ -Objektiv	Jenoptik 03-90FT-125-1064
Arbeitsabstand	157 mm
maximale Apertur ($1/e^2$)	15 mm
NA	0,085
Fokusbereich ($2w_0$)	14,9 μ m
konfokaler Parameter ($2z_R$)	335 μ m
Durchmesser Scanfeld	90 mm
Shutter	AOM
Schaltzeit	250 ns
z-Achse	LINOS x.act LT50
Reproduziergenauigkeit (bidir.)	3 μ m

TABELLE 6.3.: Übersicht über die technischen Daten des Funktionsmusters.

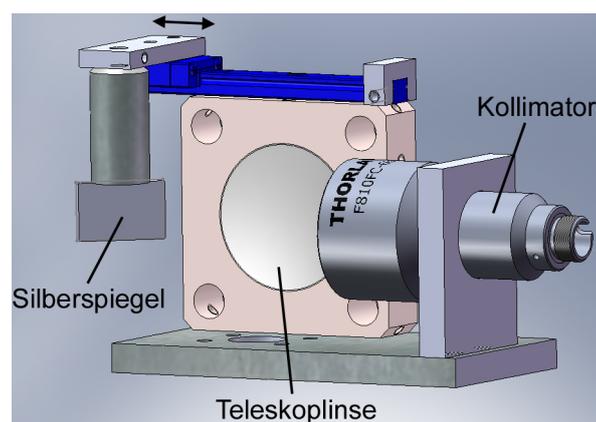


ABBILDUNG 6.18.: Über einen ausschwenkbaren Silberspiegel wird der kollimierte OCT-Strahl zwischen Teleskop und Scankopf eingekoppelt.

tenden Probe unter OCT-Kontrolle möglich war. Außerdem war es auf diese Weise möglich, zunächst die zu behandelnde Region auszuwählen und den Abtragerfolg direkt nach der Bearbeitung qualitativ und quantitativ zu beurteilen. Die technischen Daten des OCT-Systems sind in Tabelle 6.4 zusammengefasst.

Zentralwellenlänge	1278 nm
axiale Auflösung (Luft)	18 μm
laterale Auflösung	15 μm
A-Scanrate	1250 Hz
maximale Bildrate	12,5 Hz
Tiefenscanbereich	3,5 mm

TABELLE 6.4.: Übersicht über die technischen Daten des TDOCT-Systems der Firma *LightLab Imaging*.

Die Laserpulse wurden durch einen konisch geformten Abstandshalter appliziert (siehe Abbildung 6.19), der zum einen als Positionierhilfe auf dem zu bearbeitenden Gewebe und zum anderen als Referenz für die OCT-Bildgebung dient. Zur Kalibrierung wurde zunächst der Laserfokus auf die Ebene



ABBILDUNG 6.19.: Abstandshalter zur Befestigung an der Laserscannereinheit mit Aufnahmehalterung für ein flexibles Laryngoskop, Düse für Druckluftzufuhr und Einrichtung zur Speichelabsaugung.

ne der Spitze des Abstandshalters eingestellt, anschließend wurde die Referenzarmlänge des OCT-Systems auf die entsprechende Probenarmlänge angepasst. Die Lage der Spitze und damit des Fokus im OCT-Bild wurde als Referenzebene gespeichert. Somit konnten die OCT-Bilder als Positionierhilfe mit einer Genauigkeit im Bereich der axialen Auflösung des OCT-Systems genutzt werden. Der Abstandshalter wurde speziell an die Anatomie der Versuchstiere angepasst. Mit geeigneten auf-

steckbaren Spitzen aus biokompatiblen Kunststoff kann eine Ebnung des Gewebes im Arbeitsbereich erreicht werden, zudem sind Vorrichtungen für eine Vakuumserzeugung zur Fixierung am Gewebe vorgesehen (siehe Abbildung 6.20) ebenso wie Öffnungen zur Einführung von Rauchabzugsgeräten und flexiblen Endoskopen. Der Halter ist sehr leicht an den Applikator adaptierbar und kann somit jederzeit ausgetauscht werden.

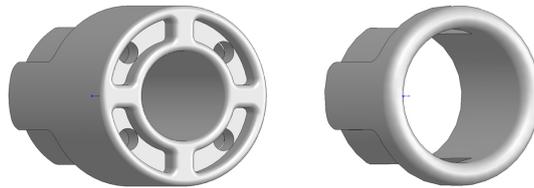


ABBILDUNG 6.20.: Verschiedene Aufsätze für den Abstandshalter mit einem Außendurchmesser von jeweils 8mm. Links mit Vakuumkammern zur Fixierung des Applikators auf dem Gewebe, rechts mit großer Öffnung für die Anwendung zusätzlicher Instrumente.

6.3.3. Charakterisierung

In einer Parameterstudie an extrahierten Schweinestimmklappen wurden die geeigneten Werte für die räumlichen Pulsabstände und die Pulsenergie für einen Abtrag an der Oberfläche ermittelt. Die besten Ergebnisse wurden mit der maximalen Pulsenergie von $2,5\mu\text{J}$ erreicht, die unter Berücksichtigung der Fokusfläche einer Energiedichte von $F=1,75\text{J}/\text{cm}^2$ entspricht. Die Parameter wurden während Studie iterativ optimiert, um möglichst geringe thermische Schädigungen im Gewebe zu erzeugen. Sowohl in den Vorversuchen als auch in der tierexperimentellen Studie konnten die geforderten Gewebevolumente von $0,5\times 0,5\times 0,1\text{mm}^3$ mit räumlichen Pulsabständen von $1\mu\text{m}$ in x- und y-Richtung bzw. $2\mu\text{m}$ in z-Richtung erfolgreich abgetragen werden. Dazu wurden pro Volumen 12,5 Millionen Pulse bei einer Pulswiederholrate von 100 kHz in einer Bearbeitungszeit von 125 s appliziert. Abbildung 6.21 zeigt beispielhaft die Schneidergebnisse bei optimaler Wahl der Parameter. Im OCT-Bild ist der Ablationskrater aufgrund der gespannten Stimmlippe wannenförmig, im histologischen Schnitt dagegen zeigt sich die Quaderform.

Die Laserfokusgröße wurde mit Hilfe einer Strahlprofilkamera (*DataRay WinCamD*) ermittelt. Dazu wurde das Strahlprofil an verschiedenen axialen Positionen im Fernfeld des Fokus vermessen und über die gaußsche Strahlpropagation die Lage der Strahlteile und der dortige minimale Strahldurchmesser errechnet. Fokuslage und -größe konnte durch Variation des Linsenabstandes im Strahlauweitungsteleskop vor der Einkopplung in den Scankopf optimiert werden (siehe Abbildung 6.22). Die besten Schnittergebnisse wurden mit dem minimalen Fokusdurchmesser von $13,7\mu\text{m}$ in einem Arbeitsabstand von 158 mm erzielt.

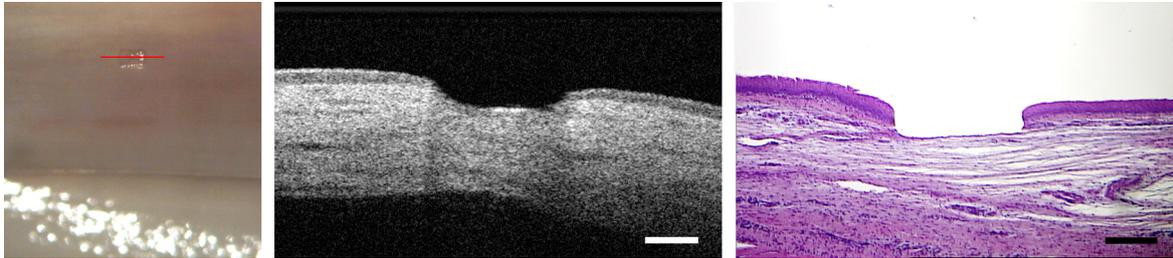


ABBILDUNG 6.21.: Erfolgreicher oberflächlicher Gewebeabtrag an einer Schweinestimmrippe mit dem *IMRA µJewel D400* und dem Funktionsmuster unter realitätsnahen Bedingungen. Links: Auflichtaufnahme mit Operationmikroskop, Mitte: OCT-Aufnahme, rechts: histologischer Schnitt desselben Ablationskraters. Die Balken repräsentieren jeweils eine Länge von 200 µm.

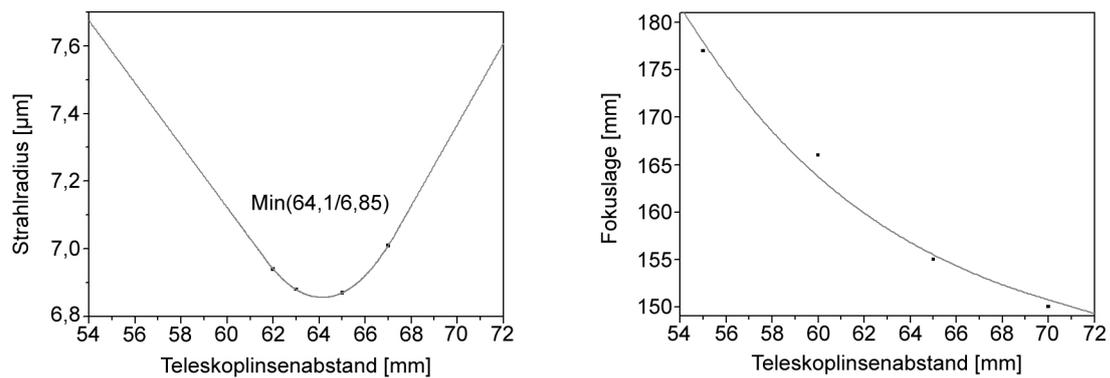


ABBILDUNG 6.22.: Strahlradius im Fokus (links) und Fokusslage (rechts) in Abhängigkeit vom Abstand der Linsen im Strahlaufweitungsteleskop.

6.4. Tierexperimentelle Studie zur Untersuchung der Wundheilung

Zum Studium des Wundheilungsverlaufes und des möglichen Schädigungspotenzials der fs-Laserstrahlung wurde in Zusammenarbeit mit der Medizinischen Hochschule Hannover und der Firma Harlan Bioservice for Science eine *in vivo* Studie an Ferkeln von Hausschweinen durchgeführt (Tierversuchsantrag 33.9-42502-04-07 / 1374). Ziel der Studie war es, zu überprüfen, ob durch die fs-Lasermanipulation Schädigungen des umliegenden Gewebes entstehen und die Wundheilung dadurch negativ beeinflusst wird. Zudem sollte das Konzept der OCT-kontrollierten Mikrochirurgie am lebenden Organismus eruiert werden.

6.4.1. Auswahl des Tiermodells

In Vorversuchen hat sich gezeigt, dass Kaninchen, die ursprünglich als Tiermodell vorgesehen waren, für die Wundheilungsstudien ungeeignet sind. Die anatomischen Verhältnisse sind zu klein, um mit angemessenem Aufwand erfolgreiche, reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. In den *ex vivo* Studien wurden mit Schweinestimmklippen zwar gute Ergebnisse erreicht, erwachsene Hausschweine waren jedoch aus anatomischen Gründen ebenfalls für die Wundheilungsstudien ungeeignet. Der Kehlkopf liegt so weit innerhalb des Körpers, dass eine Entwicklung eines Laserapplikators mit ausreichend guter Fokussierung unmöglich war. Es wurde daher nach Beratung mit einem Veterinärmediziner beschlossen, Absetzferkel von Hausschweinen als Tiermodell zu wählen. So konnte der Arbeitsabstand so weit reduziert werden, dass eine ausreichend gute Fokussierung für einen optischen Durchbruch möglich wurde. Um das passende Verhältnis zwischen Tiergröße, -alter und -gewicht zu finden, war es notwendig, im Rahmen eines Vorversuches mit Absetzferkeln die optimalen biometrischen Werte der Versuchstiere zu ermitteln. Anschließend wurde dann die eigentliche Studie mit Tieren dieser Gewichts- und Altersgruppe durchgeführt. Tiere mit einem Gewicht von mehr als 6,5 kg haben sich als ungeeignet herausgestellt, da die Stimmklippen mit dem Arbeitsabstand des Laserapplikators von 158 mm nicht erreicht werden konnten.

6.4.2. Ablauf der Behandlung

Fünf zu behandelnde Ferkel mit einem Lebendgewicht zwischen 5,0 und 6,5 kg wurden vor der Generalanästhesie durch intramuskuläre Injektion von Ketamin, Stresnil und Atropinsulfat beruhigt. Nach Einleitung der Narkose erhielten die Tiere Propofol (7 mg/kg/h) intravenös injiziert bis der Kornealreflex erloschen war. Während der Behandlung wurden die Vitalfunktionen regelmäßig überwacht. Bei sternaler Lagerung und Aufsprühen eines Lokalanästhetikums direkt auf den Kehlkopf wurde das Laserapplikationsrohr unter Sichtkontrolle mit einem flexiblen Videolaryngoskop in den Rachenraum der Tiere platziert und vorsichtig bis zum Kehlkopf vorgeschoben. Vor dem Rohr lagen die Stimmklippen in einem Abstand von 1 mm, die man durch das Rohr hindurch endoskopisch betrachten konnte.

Nach erfolgreicher Platzierung wurde das Laserapplikationsrohr an der Laserscannereinheit fixiert (siehe Abbildung 6.23). Das Funktionsmuster wurde vor Durchführung jeder Behandlung so kali-

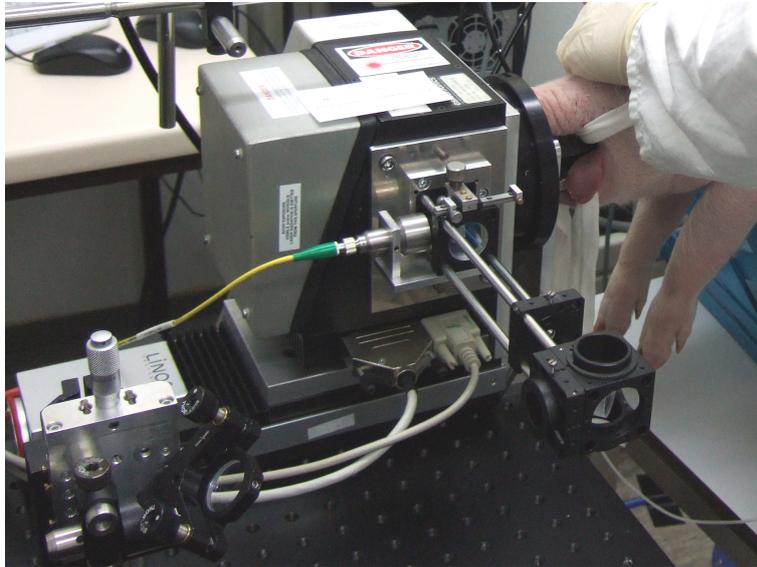


ABBILDUNG 6.23.: Die anästhesierten Ferkel wurden in sternaler Lage mit Hilfe des Abstandshalterrohres an der Laserscannereinheit fixiert.

briert, dass der Fokus exakt 1 mm vor der Abstandshalterspitze lag, um während der Behandlung Ablationsreste und Flüssigkeiten über eine konstante Druckluftzufuhr zu entfernen. So konnte die Absorption von eingestrahelter Energie vermieden werden.

Während der Vorbereitungen der Tierstudie wurde ein starker Leistungsverlust der OCT-Lichtquelle festgestellt, so dass keine ausreichend kontrastreichen Bilder mehr erstellt werden konnten, um eine zuverlässige Aussage treffen zu können. Daher wurde zur Auswahl der zu behandelnden Region und zur Kontrolle des Behandlungsergebnisses nach Laseranwendung ein flexibles Videolaryngoskops verwendet.

Auf den beiden caudalen Stimmlippen der Ferkel wurden je 3 Stellen pro Seite, also insgesamt 6 Stellen pro Tier, mit dem Laser bearbeitet. Die dabei abzutragenden quaderförmigen Strukturen hatten jeweils eine Fläche von $0,5 \times 0,5 \text{ mm}^2$ und eine Tiefe von 0,1 mm. Entsprechend der Pulsabstände von 1 μm in x- und y-Richtung bzw. 2 μm in z-Richtung wurde je Volumen eine Bearbeitungszeit von 125 s benötigt. Die applizierte Laserpulsenergie betrug jeweils 2,5 μJ .

6.4.3. Untersuchung des Wundheilungsverlaufs

Die Untersuchung des Gewebes hinsichtlich der Wundheilung nach Wechselwirkung mit ultrakurz- en Laserpulsen erfolgte an verschiedenen Tieren direkt nach Laserbehandlung, nach einer, zwei und vier Wochen post OP. Die Tiere wurden dazu am jeweiligen Untersuchungstag durch eine Überdosis

Pentobarbital euthanasiert. Nach makroskopischer Untersuchung des Mundraumes, des Kehlkopfes, speziell der Stimmlippen, und des oberen Trachearegionen wurden die Kehlköpfe extrahiert und unter einem Operationsmikroskop und einem Stereomikroskop beurteilt. Nach anschließender Dokumentation der Befunde wurden die Gewebeproben für histopathologische Untersuchungen aufbereitet.

6.4.4. Ergebnisse

Die Stimmlippen der Ferkel konnten zum Teil wie geplant mit dem Femtosekundenlaser bearbeitet werden. Abbildung 6.24 zeigt beispielhaft eine endoskopische Aufnahme einer bearbeiteten Stimmlippe direkt nach dem Lasereingriff. In den meisten Fällen war der Abtrag des Epithels erfolgreich.



ABBILDUNG 6.24.: Endoskopische Aufnahme direkt nach der Behandlung mit dem Femtosekundenlaser. Im linken Teil des Bildes sind mehrere Wechselwirkungsbereiche deutlich erkennbar. Der rote Kreis markiert einen erfolgreichen quaderförmigen Abtrag.

Abbildung 6.25 zeigt einen histologischen Schnitt der in Abbildung 6.24 markierten Läsion, die mit dem Femtosekundenlaser erzeugt wurde. In dem vergrößerten Ausschnitt sind - wie erwartet - keine Schädigungen durch thermische Nekrose zu erkennen. Vielmehr ist eine glatte Kante am Rand des Wechselwirkungsbereiches ohne Koagulationszonen entstanden.

In einigen Fällen hingegen war der oberflächliche Gewebeabtrag nicht erfolgreich. Gründe hierfür liegen zum einen in der ungenauen Fokussierung und zum anderen an der Bewegung der Tiere während der Behandlung allein aufgrund von Atmung. Abbildung 6.26 zeigt einen histologischen Schnitt eines misslungenen Eingriffs, bei dem der Laserfokus zu tief im Gewebe lag und somit der Abtrag in der Tiefe erfolgt ist. Daraus resultierten zum Teil große Blasen innerhalb des Epithels, ohne dass dieses jedoch erfolgreich abgetragen wurde.

Im Falle der Gewebeentfernung ohne thermische Nekrosezonen (Abbildung 6.25) war eine vollständige Reepithelisierung wie nach konventioneller Phonochirurgie zu erwarten. So waren die erfolgreich abgetragenen Bereiche in der Kontrolluntersuchung nach 4 Wochen histopathologisch nicht mehr nachweisbar, was auf eine komplikationsfreie Wundheilung schließen lässt.

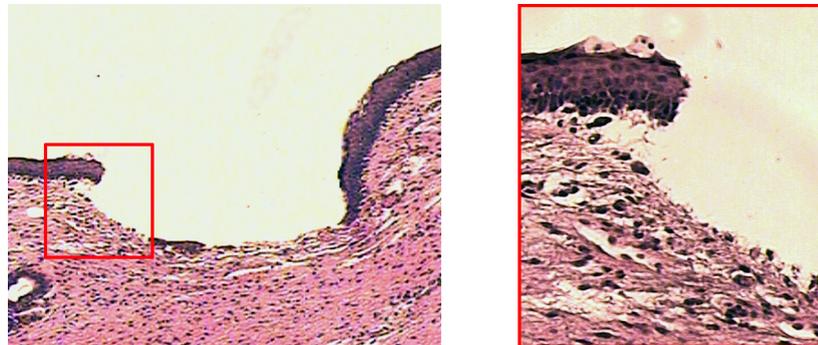


ABBILDUNG 6.25.: Histologischer Schnitt nach Behandlung mit dem Femtosekundenlaser. Das Epithel wurde nahezu vollständig abgetragen. Im vergrößerten Ausschnitt rechts sind keine Schäden durch thermische Nekrose zu erkennen.

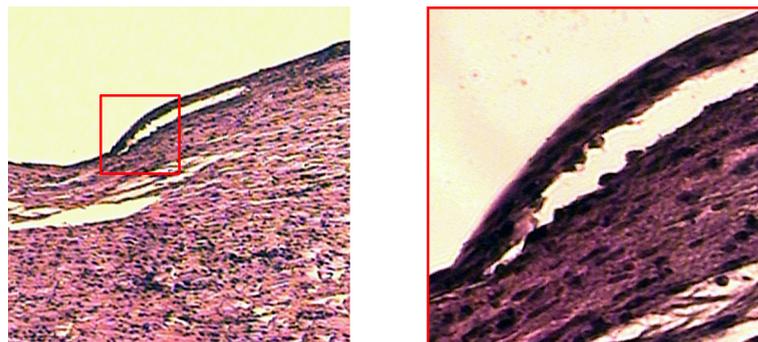


ABBILDUNG 6.26.: Histologischer Schnitt von Stimmlippengewebe nach Behandlung mit dem Femtosekundenlaser. Links eine Übersichtsaufnahme, rechts eine vergrößerte Darstellung. Durch nicht exakte Positionierung des Laserfokus aus der Gewebeoberfläche entstanden Blasen unterhalb des Epithels, so dass ein oberflächlicher Abtrag nicht möglich war.

6.5. Diskussion

Für den Einsatz in der Mikrochirurgie an der Stimmlippe wird ein Lasersystem benötigt, das eine Abtragung von Gewebe mit einer Präzision im Bereich weniger μm ermöglicht. Die thermisch und mechanisch induzierte Schädigungszone der Stimmlippe sollte 20-30 μm nicht überschreiten, da sonst ein Schaden resultiert, der das empfindliche Schwingungsmodell der Stimmlippe zerstört. Es resultiert ein phonatorischer Stimmlippenstillstand mit einer irreversiblen Heiserkeit. Ein entscheidender Lösungsansatz ist daher das Schichten respektierende, optisch kontrollierte Operieren. Ein fs-Laser gekoppelt mit der tiefenauflösenden Bildgebungsmethode OCT erfüllt diese Anforderungen sehr gut. So konnte im Rahmen dieser Arbeit mit zwei verschiedenen fs-Lasersystemen gezeigt werden, dass bei richtiger Wahl der Laserparameter die geforderte maximale Ausdehnung der thermischen Schädigungszone unterschritten werden konnte. In der tierexperimentellen Studie konnten darüber hinaus keine Komplikationen in der Wundheilung durch thermische Nebeneffekte nachgewiesen werden.

Voraussetzung für einen erfolgreichen oberflächlichen Abtrag ist allerdings die exakte Positionierung des Laserfokus auf der Probenoberfläche. Liegt der Fokus zu tief innerhalb des Gewebes findet der Abtrag unterhalb der Oberfläche statt, sofern dort noch die Schwelle für einen optischen Durchbruch erreicht werden kann. Denn oberhalb des Fokus geht ein Teil des Lichts durch Streuung und lineare Absorption verloren. Die Photodisruption könnte aber auch konstruktiv zum Schneiden innerhalb des Gewebes genutzt werden. So ist zum Beispiel das subepitheliale Trennen von untereinander vernarbten Schichten denkbar. Für die Behandlung von Vernarbungen konnte sich bisher mangels viel versprechender Ergebnisse kein Verfahren entscheidend durchsetzen [Hir05, Han06]. Außerdem könnten durch Photodisruption innerhalb des Reinke-Raums Kavitäten erzeugt werden, die man beispielsweise zur gezielten Medikation des umliegenden Gewebes oder zur kontrollierten Verteilung von Unterfütterungsmaterial nutzen könnte. Die Applikation von Mikroschnitten unterhalb der Oberfläche macht zudem ein Ausschneiden von Gewebevolumina möglich. Auf diese Weise könnte die Entfernung des Gewebes in wesentlich kürzerer Zeit durchgeführt werden, so dass das Risiko von Komplikationen durch Bewegungen während der Laserbehandlung minimiert werden könnte. Zudem wäre diese Methode für eine selektive, gewebeschonende Biopsieentnahme geeignet.

Ein entscheidender Faktor für das Gelingen des Abtrags sowohl oberflächlich als auch in der Tiefe ist die NA. Für einen oberflächlichen Abtrag ist eine kleine NA, die eine großen konfokalen Parameter liefert, vorteilhaft. Da bei Pulsenergien, die mindestens zweifach über der Durchbruchschwelle liegen, ein Abtrag im gesamten Bereich des konfokalen Parameters möglich ist, ist die Fokusslage weniger kritisch als bei großen NA. Bei kleinerem Fokussierungswinkel sinkt jedoch auch die Präzision der fs-Laserschnitte, so dass hier immer ein Kompromiss zwischen Genauigkeit der Fokusslage und Präzision der Schnitte getroffen werden muss. Für präzise Schnitte unterhalb der Oberfläche sollte die NA möglichst groß sein, da andernfalls ein optischer Durchbruch bereits vor dem Fokus stattfinden kann, sobald an einem bestimmten Ort die Pulsenergie über der Durchbruchschwelle liegt.

Somit verbessert sich die Präzision der Methode mit zunehmender NA. Bei großen NA ist die Tiefe der Schnitte jedoch limitiert, da man mit einem sehr großen Strahldurchmesser in das Gewebe eintritt und somit Streuung und lineare Absorption einen größeren Einfluss haben. Hier ist also ein Kompromiss zwischen Präzision und Schnitttiefe zu treffen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die OCT für die Positionierung des Fokus auf der Gewebeoberfläche bzw. in der Tiefe des Gewebes unverzichtbar ist. In der Tierstudie wurde der Fokus aufgrund der fehlenden OCT-Bildgebung in einigen Fällen falsch positioniert, was zum Teil erhebliche Nebenwirkungen zur Folge hatte. In den Laborexperimenten dagegen konnten mit Hilfe der zweidimensionalen Querschnittsbilder zu bearbeitende Gewebeareale und die gewünschte Schnitttiefe mit einer Genauigkeit der axialen Auflösung des OCT-Systems ausgewählt werden. Im Anschluss an die Laserbehandlung konnte das Resultat jeweils in situ mit OCT dargestellt werden. Auf diese Weise wurden schädigende Effekte durch ungenaue Fokuspositionierung vermieden. In Zukunft könnte eine OCT-Kontrolle der Laserbehandlung in Echtzeit die Schneidergebnisse noch weiter verbessern. So könnte zum Beispiel die Pulsenergie durch einen geeigneten Regelalgorithmus an die jeweilige Gewebeart angepasst werden, um thermische und mechanische Nebenwirkung weiter zu reduzieren. Zudem könnte die Gewebeoberfläche bei Bewegungen während der Behandlung oder Unregelmäßigkeiten in der Gewebestruktur bzw. die Ausrichtung der Oberfläche in Echtzeit verfolgt und die Fokuslage entsprechend nachgeführt werden [Mag07, Zha08].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Funktionsmuster für die Mikrochirurgie an den Stimmlippen entwickelt und in einer tierexperimentellen Studie erfolgreich eingesetzt. Es wurde als starrer Applikator zur Verwendung am anästhesierten Patienten während einer konventionellen Mikrolaryngoskopie (MLS) realisiert. So ist die Methode gegenüber Bewegungsartefakten und damit eingehenden Fokussierungsproblemen unempfindlich und kann somit die gewünschte Präzision erreichen. Aufgrund der schweren Zugänglichkeit zu den Stimmlippen im Rachenraum ist bis zur Realisierung eines handgeführten Applikators, mit dem der Operateur die fs-Laserpulse appliziert, noch eine weitere komplexe Entwicklungsstufe notwendig. So müsste der Strahlengang für die ultrakurzen Pulse in allen drei Raumrichtungen flexibel geführt werden. Dies könnte zum Beispiel durch photonische Kristallfasern (PCF) realisiert werden [Hoy08, Har08]. Die Entwicklung der PCF ist jedoch noch nicht so weit fortgeschritten, dass hochenergetische fs-Pulse ohne Energieverlust und mit ausreichender Strahlqualität geführt werden können. In zukünftigen Arbeiten sollte daher die Eignung von PCF zur Führung der fs-Laserstrahlung untersucht werden.

Zusammenfassend stellt die hier vorgestellte Methode ein schnelles und präzises Werkzeug für die Entfernung von Stimmlippenveränderungen dar. Die Kopplung von OCT und fs-Laser ermöglicht eine präzise Positionierung des Fokusvolumens relativ zu dem zu behandelnden Gewebeareal in drei Dimensionen und bietet zudem die Möglichkeit einer Therapiekontrolle in situ. Insbesondere wurden durch die tierexperimentelle Studie die Grundlagen für einen erfolgreichen Einsatz des fs-Lasers für die Phonochirurgie gelegt, so dass eine zukünftige klinische Anwendung möglich scheint.

7. Wertung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte das Anwendungspotenzial der OCT sowohl für die nichtinvasive Diagnose von pathologischen Stimmlippenveränderungen als auch für die Kontrolle von fs-Laserschnitten in Kehlkopfgewebe erfolgreich demonstriert werden.

Für die kontaktfreie Stimmlippendiagnostik am wachen, nicht anästhesierten Patienten wurde ein OCT-gestütztes Laryngoskop entwickelt. Gegenüber konventionellen indirekten Laryngoskopen mit alleiniger Videobildgebung soll es zusätzliche Informationen über die Gewebemorphologie bis zu einer Tiefe von 1-2 mm liefern, zudem wird es möglich sein, funktionelle Untersuchungen wie die quantitative Analyse axialer Stimmlippen-schwingungen durchzuführen.

OCT- und Videostrahlengang werden durch ein gemeinsames Optiksystem geführt, so dass gegenüber einer bisherigen Lösung mit zwei getrennten Endoskoprohren [Yu09] weniger Platz im Rachen des Patienten benötigt wird. Durch synchrone Fokussierung von OCT- und Videostrahl und gleichzeitige Anpassung der Interferometerarmlängen kann der Arbeitsabstand in einem Bereich von 40-100 mm variiert werden, so dass das OCT-gestützte Laryngoskop sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern und Jugendlichen einsetzbar sein wird.

Der Arzt muss sich bei der Untersuchung mit OCT gegenüber der konventionellen Laryngoskopie dahingehend umstellen, dass die Tiefenschärfe nicht - wie bisher - sehr groß ist und der gesamte Kehlkopf gleichzeitig scharf darstellbar ist, sondern dass der OCT-Bildausschnitt lediglich wenige Millimeter groß ist. Das hat eine starke Empfindlichkeit gegenüber Bewegungen des Patienten und des Laryngoskops durch den Tremor des Arztes zur Folge. Der Bildausschnitt bewegt sich entsprechend zufällig über die darzustellenden Stimmlippen hinweg, so dass bei hohen Bewegungsgeschwindigkeiten und -amplituden zum einen die Bildaufnahme erschwert wird und zum anderen die Qualität des OCT-Signals schwankt. Der Untersuchende benötigt zudem sehr viel Übung, um den Arbeitsabstand korrekt auf die Lage der Stimmlippen anzupassen und diesen Arbeitsabstand konstant zu halten. Hier könnte in Zukunft eine Autofokusfunktion den Arzt unterstützen, bei der die Gewebeoberfläche mit OCT detektiert und die Referenzarmlänge sowie die Fokusslage mittels eines Regelkreislaufes nachgeführt wird [Ift04, Zha09].

Die axiale Bewegungskomponente bei der Phonation beeinträchtigt die Qualität der OCT-Bilder. Je nach Messmethode entstehen unterschiedliche geschwindigkeitabhängige Artefakte, die teilweise durch numerische Korrekturen nachträglich entfernt werden könnten. Dagegen kann ein Signalverlust, wie er in der TDOCT oder SDOCT auftritt, oder einer Verbreiterung der axialen Auflösung, wie

in der SSOCT beobachtet wird, nur durch schnellere Scangeschwindigkeiten kompensiert werden. Da SSOCT neben den potentiell höheren Scanraten [Eig09] auch die Möglichkeit einer *balanced detection* [Che07] und zudem nicht von einem Signalabfall bei axialen Bewegungen betroffen ist, wird sie in Zukunft die Anforderungen der kontaktfreien Untersuchungsmethode am besten erfüllen können.

Der Ablauf der Untersuchung könnte durch Kopplung mit zusätzlichen optischen Methoden weiter verbessert werden, um verdächtige Läsionen schneller zu detektieren und somit die Untersuchungsdauer zu reduzieren. Hier wäre zum Beispiel die Kopplung mit der Autofluoreszenzendoskopie denkbar, mit der verdächtige Stellen durch Verlust des Autofluoreszenzsignal oberflächlich erkannt werden können [Are07b]. An den verdächtigen Stellen könnte anschließend die Morphologie mittels OCT untersucht werden.

Mögliche Einsatzgebiete für das OCT-gestützte Laryngoskop sind die Detektion von Läsionen im Reinke-Raum wie Zysten, Polypen, Reinke-Ödeme, Narben und Knötchen, die mit konventionellen oberflächlichen Techniken nicht zu erkennen sind, sowie die frühzeitige Erkennung von Dysplasien und frühen invasiven Karzinomen über den Zustand der Basalmembran bzw. die Epitheldicke. So könnten verdächtige Stellen mit unklarem oberflächlichen Erscheinungsbild in Form einer optischen Biopsie auch in der Tiefe untersucht werden, ohne einen Eingriff vornehmen zu müssen. Zudem wäre mit diesem System ein Monitoring, also eine wiederholte Beobachtung verdächtiger Bereiche denkbar, ohne bei jeder Untersuchung eine mit hohem Risiko verbundene Biopsie entnehmen zu müssen. Muss im Falle eines fortbestehenden Verdachts dennoch eine Biopsie entnommen werden, kann die OCT durch präzise Vermessung der Läsionsgrenzen eine gezieltere Biopsieentnahme ermöglichen und somit helfen, die Zahl fehlerhafter Probenentnahmen zu verringern. Ein großes Potential der Methode liegt außerdem im Einsatz bei Nachsorgeuntersuchungen zum Beispiel nach Entfernung von Karzinomen. So könnte auch hier im Rahmen eines Monitoring geklärt werden, ob und wann Rezidive auftreten. Auch der Erfolg einer bestimmten Behandlungsmethode, z.B. einer Strahlentherapie, könnte mit dem OCT-gestützten Laryngoskop im zeitlichen Verlauf beobachtet werden.

Neben der Gewebemorphologie könnte mit dem entwickelten System auch die Dynamik der Stimmlippschwingungen während der Phonation dargestellt und quantitativ bestimmt werden. So kann über die Zahl der Perioden in einem B-Scan die Frequenz berechnet werden und die Amplitude direkt aus den OCT-Bildern unter Berücksichtigung der Bewegungsartefakte bestimmt werden. Da die Schwingungsverläufe und deren Geschwindigkeiten in den einzelnen Gewebeschichten jedoch unterschiedlich sind, ist diese Auswertung streng genommen nur für die Oberfläche gültig. Möglicherweise könnte die Geschwindigkeit in Abhängigkeit von der Tiefe mit Hilfe von Doppler-OCT bestimmt werden, die bewegungsinduzierte Dopplerverschiebungen, mit denen das Interferenzsignal moduliert wird, auswertet [Rol02b]. Diese Methode könnte neben der Detektion von Funktionsstörungen auch wichtige Daten für die Stimmforschung liefern. Zudem könnte mit Hilfe der gemessenen Schwingungsgeschwindigkeiten eine numerische Korrektur der Bewegungsartefakte realisiert werden.

Da es sich bei der Laryngoskopie um einen kleinen, spezialisierten Markt handelt, müssten für einen zukünftigen kommerziellen Erfolg und damit der Etablierung dieser Methode die Systeme auch für niedergelassene HNO-Ärzte und Phoniater preislich attraktiv werden. Dazu müssten die Kosten für Lichtquellen und Computerhardware noch weiter sinken, um einen gewissen kritischen Preis unterschreiten zu können. Einfach aufgebaute halbleiterbasierte Lichtquellen zum Beispiel mit einem durchstimmbaren Fabry-Perot-Filter in einem kurzen externen Resonator [Kuz10] können wesentlich kostengünstiger hergestellt werden als Laser mit scannenden Elementen [Yun03, Hub05] oder FDML-Laser mit mehreren Kilometern optischen Fasern im Resonator [Hub06b] und hätten daher das Potential für den Einsatz in einem Laryngoskop-System. Schnelle Scanraten haben immer den Nachteil eines hohen Datenaufkommens, das bei gewünschter Speicherung der Daten nur durch kostenintensive Digitalisierungshardware oder bei ausschließlicher Darstellung nur mit modernen Grafikkarten kontrolliert werden kann [Pro09]. Hier muss also ein sinnvoller Kompromiss gefunden werden zwischen Geschwindigkeit und Kosten der Komponenten, um die Methode in Zukunft als Routineverfahren etablieren zu können.

Eine Verbreitung der OCT im alltäglichen klinischen Einsatz ist nur möglich, wenn die Geräte leicht zu bedienen sind und die Anforderungen an die Benutzer zum Erlernen der Methode möglichst gering sind. Eine automatische computergestützte Gewebeklassifizierung kann den untersuchenden Arzt bei der Auswertung der OCT-Aufnahmen und der anschließenden Diagnosestellung unterstützen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine automatische Unterscheidung von normalem und pathologisch verändertem Stimmlippengewebe durch einen schwellwertbasierten Segmentierungsalgorithmus grundsätzlich möglich ist. Anhand des Zustandes der Basalmembran und der Epitheldicke konnte eine Einteilung der prozessierten Bilder eines Testsatzes in zwei Gruppen vorgenommen werden. In einer Gruppe finden sich normales Gewebe bzw. gutartige Läsionen, bei denen sich das Epithel nicht oder nur kaum verdickt, die zweite Gruppe bilden gutartige, präkanzeröse sowie kanzeröse Läsionen, bei denen der Übergang zwischen Epithel und Lamina propria nicht eindeutig detektiert werden konnte bzw. das Epithel stark verdickt ist. Hier zeigen sich Schwierigkeiten in der Differentialdiagnose von gutartigen Granulomen, Papillomen, die zu bösartigen Läsionen entarten können und Dysplasien bzw. Karzinomen. Alle haben im OCT-Bild ein ähnliches Erscheinungsbild, so dass in Zukunft zusätzliche Indikatoren benötigt werden, um eine Unterscheidung innerhalb der Gruppe zu ermöglichen. Granulome, Papillome und invasive Karzinome könnten möglicherweise durch eine Texturanalyse klassifiziert werden, da invasive Karzinome gegenüber Papillomen und Granulomen eine wesentlich dichtere Gewebestruktur und daher möglicherweise auch unterschiedliche Texturen aufweisen.

Um eine pathologische Veränderung des Gewebes in OCT-Bildern zuverlässig detektieren und klassifizieren zu können, ist die genaue Kenntnis der normalen Morphologie inklusive der Epitheldicke erforderlich. Bisher sind nur wenige Studien zu den Epitheldicken normaler Stimmlippen veröffent-

licht worden, sie wurden oft nur an histologischen Präparaten [Are07b] oder mit OCT an einer begrenzten Patientenzahl untersucht [Won05, Kai09]. In weiteren klinischen Studien mit einer großen Anzahl an Patientendaten muss daher in Zukunft zunächst die Normdicke des gesunden Epithels festgelegt werden. In anschließenden Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob eine Unterscheidung verschiedener Dysplasiegrade, also eine sensitive Detektion von Präkanzerosen, ebenfalls über die Epitheldicke oder aber über andere Parameter möglich ist. Dann wäre die OCT hervorragend als Früherkennungsmethode von Krebsvorstufen geeignet und könnte unter Umständen die Zahl der Biopsien bei verdächtigen Läsionen reduzieren bzw. eine gezieltere Biopsieentnahme ermöglichen.

Sollte die Unterscheidung von Dysplasiegraden mittels konventioneller OCT nicht möglich sein, könnte der Einsatz von erweiterten OCT-Methoden erprobt werden, die über inhärente oder durch Kontrastmittel induzierte gewebeoptische Effekte eine Kontraststeigerung erreichen. So kann beispielsweise mit polarisationssensitiver OCT (PSOCT) die Doppelbrechung des Lichtes an den geordneten Kollagenstrukturen der Lamina propria nachgewiesen werden [Bur05, Kle06]. Mit zunehmendem Dysplasiegrad geht die charakteristische Ausrichtung der Kollagenfasern verloren, so dass das Doppelbrechungssignal entsprechend schwächer wird. So ist möglicherweise indirekt eine Klassifizierung des Epithelzustands über die Quantifizierung der Doppelbrechung möglich. Mittels Cross Polarization OCT können Polarisationsdrehungen durch Streuung im Gewebe anhand von zwei gleichzeitig detektierten senkrecht stehenden Polarisationsrichtungen ermittelt werden. Hier zeigen sich starke Polarisationsdrehungen in Abhängigkeit vom Kollagengehalt im Gewebe [Kur02].

Da Streuung auf Brechungsindexschwankungen innerhalb des Gewebes basiert, ändert sich durch Veränderung der Zellkerne in Größe und Form bei einer Dysplasie das Brechungsindexprofil und damit die Intensität des Streusignals [Cla04]. Durch Messung des Brechungsindex und des Streukoeffizienten *in vivo* zum Beispiel mit der Methode von Knüttel könnte der Zustand des Epithels bestimmt werden [Knü00]. Um jedoch dysplastische Veränderungen von gesundem Gewebe unterscheiden zu können, müssen zunächst Normwerte für das gesunde Epithel bestimmt werden. Bisher hat noch keine Studie weder die Brechungsindizes noch die Streukoeffizienten für die einzelnen Gewebeschichten getrennt untersucht.

Eine weitere Möglichkeit der Kontraststeigerung wäre die Anwendung von Nanopartikeln zum Beispiel aus Gold oder beschichtete Mikrokugeln [ES10], die gegenüber den umliegenden Gewebestrukturen einen höheren Brechungsindex aufweisen und daher ein stärkeres Streusignal hervorrufen [Adi09]. Die Partikel könnten in Zukunft mit Antikörpern oder Molekülen funktionalisiert werden, die spezifisch an bestimmte Moleküle, Zelltypen oder Gewebearten binden. Möglicherweise könnte so der Kontrast zwischen präkanzerösem und gesundem Gewebe gesteigert werden. Die Gabe von Nanopartikeln ist jedoch immer ein invasiver Eingriff, so dass zunächst die Unbedenklichkeit ihrer Anwendung bewiesen werden muss.

Optische Biopsien zur Klassifizierung von Stimmlippengewebe könnten auch mit alternativen optischen Verfahren mit hoher räumlicher Auflösung erstellt werden. Als Beispiele sind hier die konfo-

kale Laser-Scanning-Mikroskopie (confocal laser scanning microscopy, CLSM) und die Multiphotonenmikroskopie (MPM) zu nennen. So konnten Just et al. im Rahmen einer *ex vivo* Studie mit extrahierten humanen Kehlkopfproben in CLSM-Aufnahmen zeigen, dass sich die Größe der Zellkerne und die Form der Zellen mit zunehmendem Malignitätsgrad verändern [Jus06]. Die CLSM kann auch endoskopisch implementiert werden, was in Zukunft *in vivo* Studien am Kehlkopf ermöglichen könnte [Del08]. Nachteilig ist hier jedoch die geringe Eindringtiefe von bis zu 200 μm [Jus07], so dass der Übergang zwischen Epithel und Lamina propria in Falle von Epithelverdickungen nicht mehr nachweisbar ist. Auch mit MPM lassen sich die Zellen und Zellkerne des Epithels gut differenzieren, so dass diese Methode ebenfalls für die Unterscheidung von Dysplasiegraden geeignet sein könnte [Ska05]. Bestandteile des Epithels lassen sich durch Detektion des Autofluoreszenzsignals sehr gut darstellen, Kollagenstrukturen sind dagegen im SHG-Signal (second harmonic generation) besser nachweisbar [Li09]. Für die Multiphotonen-Anregung wird jedoch immer ein fs-Laser benötigt, was der Verbreitung der Methode als diagnostisches Routineverfahren entgegenstehen könnte. In beiden Verfahren werden die Aufnahmen zum Erreichen der hohen Auflösung mit Objektiven sehr hoher NA meist in Immersion durchgeführt, so dass sich diese Methoden nicht für eine kontaktfreie Untersuchung am wachen Patienten eignen. Zudem ist für die Interpretation der Aufnahmen eine detaillierte Kenntnis der Zellmorphologie vorauszusetzen.

Die OCT ist neben der morphologischen Abklärung verdächtiger Läsionen aufgrund der Möglichkeit, nichtinvasiv und kontaktfrei zu messen, hervorragend für die intraoperative Diagnostik zum Beispiel im Rahmen von lasergestützten Eingriffen geeignet. So wurde im Rahmen in dieser Arbeit gezeigt, dass eine hochauflösende Bildgebung wie OCT für eine erfolgreiche Durchführung der fs-Lasermikrochirurgie an Stimmlippen unverzichtbar ist. Aufgrund der starken Fokussierung der Laserstrahlung ist der Wechselwirkungsbereich im Gewebe sehr klein, was zum einen eine sehr hohe Präzision ermöglicht zum anderen aber auch eine hohe Auflösung für die Kontrolle erfordert. Es wurde gezeigt, dass die OCT für die Referenzierung der Fokusslage, der Auswahl der zu bearbeitenden Gewebeareale und der quantitativen Auswertung der Schneidresultate eine ausreichend hohe Genauigkeit liefert und zur Verbesserung der Schneidergebnisse führt. In Zukunft wäre die Nutzung der OCT-Bilder als Feedback während des Schneidprozesses denkbar, um instantan auf eine Änderung der optischen Gewebeeigenschaften reagieren zu können und beispielsweise die Laserleistung oder die Fokusslage im Rahmen eines Regelalgorithmus anzupassen. So könnten die thermischen und mechanischen Nebenwirkungen des Schneidprozesses weiter vermindert werden und die Funktion der Stimmgebung im mikrochirurgischen Sinne bestmöglich erhalten werden.

Der Einsatz der OCT wäre auch bei der Tumorentfernung wünschenswert. So könnten für eine Operationsplanung zunächst die Tumorgrenzen intraoperativ bestimmt werden. Die OCT bietet hier gegenüber dem bisherigen Standard, der Anfertigung von Schnellschnitten, den Vorteil mehrere Scans auch in verschiedenen Winkeln durchführen zu können, so dass dadurch Fehler bei der Vermessung reduziert werden könnten. Anschließend kann während der Operation zum Beispiel mit einem CO_2

die vollständige Entfernung des Tumorgewebes überwacht werden. Denn werden nicht alle Tumorzellen entfernt, ist die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Rezidiven sehr hoch [Hug10]. Wird jedoch zuviel gesundes Gewebe entfernt, können die Funktionen des Kehlkopfes nach der Operation entsprechend stärker beeinträchtigt sein.

Die OCT könnte außerdem zur Kontrolle von Biopsieentnahmen intraoperativ angewendet werden, da die Umgrenzungen von verdächtigen Läsionen auch in der Tiefe sehr gut dargestellt werden können und so die möglicherweise die Zahl falscher Biopsien reduziert werden könnte.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Anwendung von fs-Pulsen für die oberflächliche und subepitheliale Manipulation von Stimmlippengewebe sehr gute Resultate liefert und neue therapeutische Möglichkeiten eröffnet. Hier wurde nach erfolgreicher Bestimmung der Schneidparameter an Kadaverkehlköpfen erstmals im Rahmen einer *in vivo* Studie am Tiermodell Schwein bestätigt, dass bei richtiger Wahl der Schneidparameter keine thermischen und mechanischen Nebenwirkungen entstehen.

Ein präziser oberflächlicher Abtrag epithelialer Veränderungen könnte auch durch einen thermischen Wechselwirkungsprozess wie der Photoablation z.B. mit einem Erbium-Laser kostengünstiger als mit einem fs-Laser durchgeführt werden [Her93, Lue07]. Aufgrund der sehr effektiven Wasserabsorption bei der Laserwellenlänge von $\lambda=2,94 \mu\text{m}$ sind die Schädigungszonen lediglich wenige μm groß und daher vergleichbar mit denen in dieser Arbeit bestimmten Werten für den fs-Laser. Die Strahlung lässt sich wegen der großen Wellenlänge jedoch nicht so stark fokussieren wie die fs-Laserstrahlung, so dass die transversale Genauigkeit entsprechend geringer ist [Lue07]. Zudem ist die Integration der OCT in einen Schneidapplikator für fs-Laser, wie in dieser Arbeit erfolgreich demonstriert wurde, leichter möglich, da aufgrund der geringen Wellenlängenunterscheide die gleichen Strahlführungs-komponenten wie Scanner und Fokussieroptiken genutzt werden können.

Das Einbringen subepithelialer Schnitte bzw. das Ausschneiden definierter Gewebevolumina ist dagegen nur mit dem nichtlinearen Effekt der Photodisruption möglich. Hieraus ergeben sich neue Therapieansätze wie beispielsweise das Trennen von Vernarbungen unterhalb des Epithels oder das gezielte Erzeugen von Kavitäten zur Medikation oder zur lokalisierten Applikation von Unterfütterungsmaterial im Bindegewebe. Für die bildgebungsgestützte Trennung von Narben sind im nächsten Schritt Untersuchungen an einem Narbenmodell, zunächst im Laborversuch und anschließend *in vivo*, nötig, in denen neben Parameterstudien für den Schneidvorgang auch die Eignung der OCT zur Darstellung der Vernarbungen evaluiert werden muss. Möglicherweise könnte hier die Abbildung einzelner Kollagenfasern bzw. Faserbündel und damit eine Auflösung weniger μm oder sogar unterhalb eines μm gefordert sein. Alternativ zur Ultrahigh Resolution OCT könnte hier für die intraoperative Kontrolle auch die SHG-MPM geeignet sein, mit der Kollagenstrukturen sehr gut darstellbar sind. Die Eindringtiefe der MPM jedoch ist prinzipiell geringer als in der OCT, so dass es zu klären gilt, welche maximale Schnitttiefe mit ausreichender Präzision erreicht werden kann und ob aus dieser Tiefe ein ausreichend gutes SHG-Signal detektiert werden kann.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit die Eignung der OCT als nichtinvasive Bildgebungsmethode sowohl für die kontaktfreie, rein diagnostische Anwendung am wachen Patienten als auch für den intraoperativen Einsatz zum Beispiel im Rahmen einer fs-Lasermikrochirurgie an Stimmlippen demonstriert werden. Durch computerstützte Auswertung der Querschnittsbilder können quantitative Maße wie zum Beispiel die Epitheldicke genutzt werden, um den Zustand des Gewebes zu klassifizieren oder den Ablauf eines Laserprozesses zu steuern. Dadurch könnten möglicherweise sowohl die Zahl der Biopsien reduziert als auch die Ergebnisse der chirurgischen Eingriffe im Hinblick auf eine bestmögliche Funktionserhaltung des Kehlkopfes und damit einen Erhalt der Lebensqualität der Patienten verbessert werden.

Literaturverzeichnis

- [Abb10] ABBOTT MEDICAL OPTICS INC, IntraLase FS Laser, <http://www.abbottmedicaloptics.com/>, 2010, zuletzt aufgerufen am 10.01.2010.
- [Adi09] ROSENTHAL E, ZINN KR (Hg.) *Optical imaging of cancer*, Springer, 2009, ADIE SG, BOPPART SA, Kapitel Optical coherence tomography for cancer detection, Seiten 209–250.
- [Alj08] ALJASEM K, WERBER A, SEIFERT A, ZAPPE H, Fiber optic tunable probe for endoscopic optical coherence tomography, *Journals of Optics A: Pure and Applied Optics*, **10**: 044.012, 2008.
- [And95] ANDREA M, DIAS O, SANTOS A, Contact endoscopy during microlaryngeal surgery: a new technique for endoscopic examination of the larynx, *Annals of Otolaryngology, Rhinology and Laryngology*, **104**: 333–339, 1995.
- [Are99] ARENS C, GLANZ H, Endoscopic high-frequency ultrasound of the larynx, *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, **256** (6): 316–322, 1999.
- [Are07a] ARENS C, GLANZ H, WÖNCKHAUS J, HERSEMAYER K, KRAFT M, Histologic assessment of epithelial thickness in early laryngeal cancer or precursor lesions and its impact on endoscopic imaging, *Eur Arch Otorhinolaryngol*, **264** (6): 645–649, 2007.
- [Are07b] ARENS C, REUSSNER D, WOENKHAUS J, LEUNIG A, BETZ C, GLANZ H, Indirect fluorescence laryngoscopy in the diagnosis of precancerous and cancerous laryngeal lesions, *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, **264**: 621–626, 2007.
- [Ari03] ARIFLER D, GUILLAUD M, CARRARO A, MALPICA A, FOLLEN M, RICHARDS-KORTUM R, Light scattering from normal and dysplastic cervical cells at different epithelial depths: finite-difference time-domain modeling with a perfectly matched layer boundary condition, *J Biomed Opt*, **8** (3): 484–494, 2003.
- [Arm02] ARMSTRONG WB, NEEV JA, DA SILVA LB, RUBENCHIK AM, STUART BC, Ultrashort pulse laser ossicular ablation and stapedotomy in cadaveric bone, *Lasers Surg Med*, **30**: 216, 2002.
- [Arm06] ARMSTRONG WB, RIDGWAY JM, VOKES DE, GUO S, PEREZ J, JACKSON RP, GU M, SU J, CRUMLEY RL, SHIBUYA TY, MAHMOOD U, CHEN Z, WONG BJJ, Optical cohe-

- rence tomography of laryngeal cancer, *Laryngoscope*, **116** (7): 1107–1113, 2006.
- [Arn07] ARNOLD CL, HEISTERKAMP A, ERTMER W, LUBATSCHOWSKI H, Computational model for nonlinear plasma formation in high NA micromachining of transparent materials and biological cells, *Optics Express*, **15**: 10.303–10.317, 2007.
- [Ban00] BANKMAN IN (Hg.), *Handbook of Medical Imaging: Processing and Analysis*, Academic Press, 2000.
- [Bat08] BATZLER WU, GIERSEPEN K, HENTSCHEL S, HUSMANN G, KAATSCH P, *Krebs in Deutschland 2003-2004 - Häufigkeiten und Trends*, Robert Koch Institut, 2008.
- [Bec07] BECKMANN I, *Die blauen Ratgeber 11 - Rachen- und Kehlkopfkrebs*, Deutsche Krebshilfe e.V., 2007.
- [Beh09] BEHRBOHM H, KASCHKE O, NAWKA T, *Kurzlehrbuch Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde*, Georg Thieme Verlag, 2009.
- [Bet08] BETZ CS, STEPP H, HAVEL M, JERJES W, UPILE T, HOPPER C, SROKA R, LEUNIG A, A set of optical techniques for improving the diagnosis of early upper aerodigestive tract cancer, *Medical Laser Application*, **23** (4): 175–185, 2008.
- [BH09] BAZANT-HEGEMARK F, STONE N, Towards automated classification of clinical optical coherence tomography data of dense tissues, *Lasers in Medical Science*, **24**: 627–638, 2009.
- [Bib04] BIBAS AG, PODOLEANU AG, CUCU RG, BONMARIN M, DOBRE GM, WARD VMM, ODELL E, BOXER A, GLEESON MJ, JACKSON DA, 3-D optical coherence tomography of the laryngeal mucosa, *Clin Otolaryngol Allied Sci*, **29** (6): 713–720, 2004.
- [Boe03] DE BOER JF, CENSE B, PARK BH, PIERCE MC, TEARNEY GJ, BOUMA BE, Improved signal-to-noise ratio in spectral-domain compared with time-domain optical coherence tomography, *Opt Lett*, **28** (21): 2067–2069, 2003.
- [Boe07] BOENNINGHAUS HG, LENARZ T, *Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde*, Springer Medizin Verlag, 2007, 13. Auflage.
- [Bop97] BOPPART SA, BOUMA BE, PITRIS C, TEARNEY GJ, FUJIMOTO JG, BREZINSKI ME, Forward-imaging instruments for optical coherence tomography, *Optics Letters*, **22**: 1618–1620, 1997.
- [Bop99] BOPPART SA, HERRMANN J, PITRIS C, STAMPER DL, BREZINSKI ME, FUJIMOTO JG, High-resolution optical coherence tomography-guided laser ablation of surgical tissue, *J Surg Res*, **82** (2): 275–284, 1999.
- [Bor99] BORN M, WOLF E, *Principles of Optics*, Cambridge University Press, 1999.
- [Bor06] BORNEMANN J, *Wirkung von Nah-Infrarotstrahlung (NIR) eines gepulsten Titan-Saphir-*

- Lasers (Femtosekunden-Laser) auf Gewebe und Zellen in vitro*, Dissertation, Universität Hannover, 2006.
- [Bor08] BORTZ J, LIENERT GA, *Kurzgefasste Statistik für die klinische Forschung*, Springer, 2008.
- [Bou99] BOUMA BE, TEARNEY GJ, Power-efficient nonreciprocal interferometer and linear-scanning fiber-optic catheter for optical coherence tomography, *Optics Letters*, **24**: 531–533, 1999.
- [Bou03] BOURQUIN S, AGUIRRE A, HARTL I, HSIUNG P, KO T, FUJIMOTO J, BIRKS T, WADSWORTH W, BÜNTING U, KOPF D, Ultrahigh resolution real time OCT imaging using a compact femtosecond Nd:Glass laser and nonlinear fiber, *Opt Express*, **11** (24): 3290–3297, 2003.
- [Bre06] BREZINSKI ME, *Optical Coherence Tomography: principles and applications*, Academic Press, 2006.
- [Bur05] BURNS JA, ZEITELS SM, ANDERSON RR, KOBLER JB, PIERCE MC, DE BOER JF, Imaging the mucosa of the human vocal fold with optical coherence tomography, *Ann Otol Rhinol Laryngol*, **114** (9): 671–676, 2005.
- [Bur09] BURGER W, BURGE MJ, *Principles of digital image processing: Fundamental techniques*, Springer, 2009.
- [Cha96] CHAN EK, SORG B, PROTSENOKO D, O’NEIL M, MOTAMEDI M, WELCH AJ, Effects of compression on soft tissue optical properties, *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, **2**: 943–950, 1996.
- [Che07] CHEN Y, DE BRUIN DM, KERBAGE C, DE BOER JF, Spectrally balanced detection for optical frequency domain imaging, *Optics Express*, **15**: 16.390–16.399, 2007.
- [Che08] CHEN Y, AGUIRRE AD, HSIUNG PL, HUANG SW, MASHIMO H, SCHMITT JM, FUJIMOTO JG, Effects of axial resolution improvement on optical coherence tomography (OCT) imaging of gastrointestinal tissues, *Opt Express*, **16** (4): 2469–2485, 2008.
- [Chi97] CHINN SR, SWANSON EA, FUJIMOTO JG, Optical coherence tomography using a frequency-tunable optical source, *Opt Lett*, **22** (5): 340–342, 1997.
- [Cho03] CHOMA M, SARUNIC M, YANG C, IZATT J, Sensitivity advantage of swept source and Fourier domain optical coherence tomography, *Opt Express*, **11** (18): 2183–2189, 2003.
- [Chu09] CHUNG SH, MAZUR E, Surgical applications of femtosecond lasers, *Journal of Biophotonics*, **2**: 557–572, 2009.
- [Cla04] CLARK AL, GILLENWATER A, ALIZADEH-NADERI R, EL-NAGGAR AK, RICHARDS-KORTUM R, Detection and diagnosis of oral neoplasia with an optical coherence microscope, *J Biomed Opt*, **9** (6): 1271–1280, 2004.

- [Col05] COLLIER T, FOLLEN M, MALPICA A, RICHARDS-KORTUM R, Sources of scattering in cervical tissue: determination of the scattering coefficient by confocal microscopy, *Appl Opt*, **44** (11): 2072–2081, 2005.
- [Cör97] CÖR A, GALE N, KAMBIC V, Quantitative pathology of laryngeal epithelial hyperplastic lesions, *Acta Otolaryngol Suppl*, **527**: 57–61, 1997.
- [Del08] KIESSLICH R, GALLE PR, NEURATH MF (Hg.) *Atlas of endomicroscopy*, Springer, 2008, DELANEY P, THOMAS S, MCLAREN W, Kapitel Development and current technological status of confocal laser endomicroscopy, Seiten 17–23.
- [Div05] DIVETIA A, HSIEH TH, ZHANG J, CHEN Z, BACHMAN M, LI GP, Dynamically focused optical coherence tomography for endoscopic applications, *Applied Physics Letters*, **86**: 103.902, 2005.
- [Doi07] DOI K, Computer-aided diagnosis in medical imaging: Historical review, current status and future potential, *Cumputerized Medical Imaging and Graphics*, **31**: 198–211, 2007.
- [Dre99a] DREXLER W, MORGNER U, KÄRTNER FX, PITRIS C, BOPPART SA, LI XD, IPPEN EP, FUJIMOTO JG, In vivo ultrahigh-resolution optical coherence tomography, *Opt Lett*, **24** (17): 1221–1223, 1999.
- [Dre99b] DREZEK R, DUNN A, RICHARDS-KORTUM R, Light scattering from cells: finite-difference time-domain simulations and goniometric measurements, *Applied Optics*, **38**: 3651–3661, 1999.
- [Dre09] DREW C, MILNER TE, RYLANDER CG, Mechanical tissue optical clearing devices: evaluation of enhanced light penetration in skin using optical coherence tomography, *Journal of Biomedical Optics*, **14**: 064.019, 2009.
- [Eig09] EIGENWILLIG CM, BIEDERMANN BR, WIESER W, HUBER R, Wavelength swept amplified spontaneous emission source, *Optics Express*, **17**: 18.794–18.807, 2009.
- [ES10] EL-SAYED IH, Nanotechnology in Head and Neck Cancer: The Race Is On, *Current Oncology Reports*, **published online**, 2010.
- [Fah07] FAHRMEIR L, KÜNSTLER R, PIGEOT I, TUTZ G, *Statistik*, Springer, 2007, 6. Auflage.
- [Fer03] FERCHER AF, DREXLER W, HITZENBERGER CK, LASSER T, Optical Coherence Tomography - Principles and Applications, *Reports on Progress in Physics*, **66**: 239–303, 2003.
- [Fer05] FERNANDEZ DC, Delineating fluid-filled region boundaries in optical coherence tomography images of the retina, *IEEE Transactions on Medical Imaging*, **24**: 929–945, 2005.
- [Fer08] DREXLER W, FUJIMOTO JG (Hg.) *Optical Coherence Tomography - Technology and Applications*, Springer, 2008, FERCHER A, Kapitel Inverse Scattering, Dispersion, and Speckle in Optical Coherence Tomography, Seiten 119–146.

- [Fis08] FISCHER RE, TADIC-GALEB B, YODER PR, *Optical System Design*, SPIE Press, 2008.
- [Fuj08] DREXLER W, FUJIMOTO JG (Hg.) *Optical Coherence Tomography - Technology and Applications*, Springer, 2008, FUJIMOTO JG, DREXLER W, Kapitel Introduction to Optical Coherence Tomography, Seiten 1–45.
- [Fuj09] FUJIMOTO JG, DREXLER W, SCHUMAN JS, HITZENBERGER CK, Optical Coherence Tomography (OCT) in Ophthalmology - Interactive Science Publishing Focus Issue, http://www.opticsinfobase.org/oe/virtual_issue.cfm?vid=81, 2009, zuletzt aufgerufen am 19.01.2010.
- [FV08] FANJUL-VÉLEZ F, ARCE-DIEGO JL, Modeling thermotherapy in vocal cords novel laser endoscopic treatment, *Lasers in Medical Science*, **23**: 169–177, 2008.
- [Gae00] GAETA AL, Catastrophic collapse of ultrashort pulses, *Physical Review Letters*, **84**: 3582–3585, 2000.
- [Gas09] GASCA F, RAMRATH L, HÜTTMANN G, SCHWEIKARD A, Automated segmentation of tissue structures in optical coherence tomography data, *Journal of Biomedical Optics*, **14**: 034.046, 2009.
- [Gel98] GELIKONOV VM, GELIKONOV GV, GLADKOVA ND, LEONOV VI, FELDCHEIN FI, SERGEEV AM, KHANIN YI, Optical fiber interferometer and piezoelectric modulator, Patent US 5835642, 1998.
- [Geo08] GEORGE NA, DE MUL FFM, QIU Q, RAKHORST G, SCHUTTE HK, New laryngoscope for quantitative high-speed imaging of human vocal folds vibration in the horizontal and vertical direction, *J Biomed Opt*, **13** (6): 064.024, 2008.
- [Ger08] GERSTNER AOH, Früherkennung von Kopf-Hals-Tumoren: Entwicklung, aktueller Stand und Perspektiven, *Laryngo-Rhino-Otologie*, **87** (1): 1–20, 2008.
- [Gey09] GEYER M, LEDDA GP, TAN N, BRENNAN PA, PUXEDDU R, Carbon dioxide laser-assisted phonosurgery for benign glottic lesions, *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2009.
- [Gon06] GONG Q, JIANG J, WANG R, ZHANG F, YAO J, Dispersion compensation methods for ultrahigh-resolution optical coherence tomography, in: *Proceedings of SPIE Vol. 6047*, 2006.
- [Gos03] GOSSAGE KW, TKACZYK TS, RODRIGUEZ JJ, BARTON JK, Texture analysis of optical coherence tomography images: feasibility for tissue classification, *Journal of Biomedical Optics*, **8**: 570–575, 2003.
- [Gra09] GRABNER G, Die Entwicklung der refraktiven Chirurgie, *Spektrum der Augenheilkunde*, **16**: 187–192, 2009.
- [Gro05] GROSS H, *Handbook of Optical Systems - Volume 1: Fundamentals of Technical Optics*,

- Wiley-VCH, 2005.
- [Gst98] GSTÖTTNER W, HAMZAVI J, ALOY A, KORNFELH J, Die funktionserhaltende chirurgische Therapie von Kopf-Hals-Tumoren mit dem CO₂-Laser, *Radiologe*, **38** (2): 106–108, 1998.
- [Guo06] GUO S, HUTCHISON R, JACKSON RP, KOHLI A, SHARP T, ORWIN E, HASKELL R, CHEN Z, WONG B, Office-based optical coherence tomographic imaging of human vocal cords, *J Biomed Opt*, **11** (3): 30.501, 2006.
- [Guo09] GUO S, YU L, SEPEHR A, PEREZ J, SU J, RIDGWAY JM, VOKES D, WONG B, CHEN Z, Gradient-index lens rod based probe for office-based optical coherence tomography of the human larynx, *J Biomed Opt*, **14** (1): 014.017, 2009.
- [Hal04] HALL F, Improved sensitivity of mammography with computer-aided detection, *Am J Roentgenol*, **182**: 1598–1599, 2004.
- [Han06] HANSEN JK, THIBEAULT SL, Current understanding and review of the literature: vocal fold scarring, *Journal of Voice*, **20**: 110–120, 2006.
- [Har08] HARZIC RL, WEINIGEL M, RIEMANN I, KÖNIG K, MESSERSCHMIDT B, Nonlinear optical endoscope based on a compact two axes piezo scanner and a miniature objective lens, *Opt Express*, **16**: 20.588–20.596, 2008.
- [Hei02a] HEISTERKAMP A, *Einsatz ultrakurzer Laserpulse in der refraktiven Laserchirurgie*, Dissertation, Universität Hannover, 2002.
- [Hei02b] HEISTERKAMP A, RIPKEN T, MAMOM T, DROMMER W, WELLING H, ERTMER W, LUBATSCHOWSKI H, Nonlinear side-effects of fs-pulses inside corneal tissue during photodisruption, *Applied Physics B*, **74**: 1–7, 2002.
- [Hei05] HEISTERKAMP A, MAXWELL IZ, MAZUR E, UNDERWOOD JM, NICHESON JA, KUMAR S, INGBER DE, Pulse energy dependence of subcellular dissection by femtosecond laser pulses, *Optics Express*, **13**: 3690–3696, 2005.
- [Her93] HERDMAN RCD, CHARLTON A, HINTON AE, FREEMONT AJ, An in vitro comparison of the erbium:YAG laser and the carbon dioxide laser in laryngeal surgery, *Journal of Laryngology & Otology*, **107**: 908–911, 1993.
- [Her04] HERZ PR, CHEN Y, AGUIRRE AD, SCHNEIDER K, HSIUNG P, FUJIMOTO JG, MADDEN K, SCHMITT J, GOODNOW J, PETERSEN C, Micromotor endoscope catheter for in vivo, ultrahigh-resolution optical coherence tomography, *Opt Lett*, **29** (19): 2261–2263, 2004.
- [Hil06] HILLMAN TR, ADIE SG, SEEMANN V, ARMSTRONG JJ, JACQUES SL, SAMPSON DD, Correlation of static speckle with sample properties in optical coherence tomography, *Opt Lett*, **31** (2): 190–192, 2006.

- [Hir77] SAWASHIMA M, COOPER F (Hg.) *Dynamic aspects of speech production*, University of Tokyo, 1977, HIRANO M, Kapitel Structure and vibratory behaviour of the vocal folds.
- [Hir81] HIRANO M, *Clinical Examination of the Voice*, Springer, 1981.
- [Hir05] HIRANO S, Current treatment of vocal fold scarring, *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, **13**: 143–147, 2005.
- [Hol07] HOLZER MP, RABSILBER TM, AUFFARTH GU, Penetrating keratoplasty using femtosecond laser, *Am J Ophthalmol*, **143** (3): 524–526, 2007.
- [Hop76] BERCI G (Hg.) *Endoscopy*, Appleton-Century-Crofts, 1976, HOPKINS HH, Kapitel Optical principles of the Endoscope, Seiten 3–26.
- [Hoy08] HOY CL, DURR NJ, CHEN P, PIYAWATTANAMETHA W, RA H, SOLGAARD O, BENYAKAR A, Miniaturized probe for femtosecond laser microsurgery and two-photon imaging, *Opt Express*, **16**: 9996–10.005, 2008.
- [Hu05] HU Z, ROLLINS AM, Quasi-telecentric optical design of a microscope-compatible OCT scanner, *Optics Express*, **13**: 6407–6415, 2005.
- [Hu07] HU Z, PAN Y, ROLLINS AM, Analytical model of spectrometer-based two-beam spectral interferometry, *Appl Opt*, **46** (35): 8499–8505, 2007.
- [Hu08] DREXLER W, FUJIMOTO JG (Hg.) *Optical Coherence Tomography - Technology and Applications*, Springer, 2008, HU Z, ROLLINS AM, Kapitel Optical Design for OCT, Seiten 379–404.
- [Hua91] HUANG D, SWANSON EA, LIN CP, SCHUMAN JS, STINSON WG, CHANG W, HEE MR, FLOTTE T, GREGORY K, PULIAFITO CA, Optical coherence tomography, *Science*, **254** (5035): 1178–1181, 1991.
- [Hub05] HUBER R, WOJTKOWSKI M, FUJIMOTO JG, JIANG JY, CABLE AE, Three-dimensional and C-mode OCT imaging with a compact, frequency swept laser source at 1300 nm, *Optics Express*, **13**: 10.523–10.538, 2005.
- [Hub06a] HUBER R, ADLER DC, FUJIMOTO JG, Buffered Fourier domain mode locking: Unidirectional swept laser sources for optical coherence tomography imaging at 370,000 lines/s, *Opt Lett*, **31** (20): 2975–2977, 2006.
- [Hub06b] HUBER R, WOJTKOWSKI M, FUJIMOTO JG, Fourier Domain Mode Locking (FDML): A new laser operating regime and applications for optical coherence tomography, *Opt Express*, **14** (8): 3225–3237, 2006.
- [Hug10] HUGHES OR, STONE N, KRAFT M, ARENS C, BIRCHALL MA, Optical and molecular techniques to identify tumor margins within the larynx, *Head Neck*, Seite published online, 2010.

- [Ift04] IFTIMIA NV, BOUMA BE, DE BOER JF, PARK BH, CENSE B, TEARNEY GJ, Adaptive ranging for optical coherence tomography, *Optics Express*, **12**: 4025–4034, 2004.
- [Ilg06] ILGNER J, WEHNER M, LORENZEN J, BOVI M, WESTHOFEN M, Morphological effects of nanosecond- and femtosecond- pulsed laser ablation, *Journal of Biomedical Optics*, **11**: 014.004, 2006.
- [Ilg10] ILGNER J, WESTHOFEN M, Laser interventions in otolaryngology - Current techniques and future developments, *Medical Laser Application*, **25**: 27–33, 2010.
- [Ish72] ISHIZAKA K, FLANAGAN JL, Synthesis of voiced sounds from a two-mass model of the vocal cords, *Bell System Technical Journal*, **51**: 1233–1268, 1972.
- [Iza08] DREXLER W, FUJIMOTO JG (Hg.) *Optical Coherence Tomography - Technology and Applications*, Springer, 2008, IZATT J, CHOMA M, Kapitel Theory of Optical Coherence Tomography, Seiten 47–72.
- [Jac98] JACQUES SL, Light distributions from point, line and plane sources for photochemical reactions and fluorescence in turbid biological tissues, *Photochemistry and Photobiology*, **67**: 23–32, 1998.
- [Jus06] JUST T, STAVE J, BOLTZE C, WREE A, KRAMP B, GUTHOFF RF, PAU HW, Laser scanning microscopy of the human larynx mucosa: a preliminary, ex vivo study., *Laryngoscope*, **116** (7): 1136–1141, 2006.
- [Jus07] JUST T, STAVE J, KREUTZER HJ, GUTHOFF R, PAU HW, Konfokalmikroskopische Untersuchungen des Kehlkopfepithels, *Laryngorhinootologie*, **86** (9): 644–648, 2007.
- [Jus09] JUST T, LANKENAU E, HÜTTMANN G, PAU HW, Intra-operative application of optical coherence tomography with an operating microscope, *J Laryngol Otol*, **123** (9): 1027–1030, 2009.
- [Kai09] KAISER ML, RUBINSTEIN M, VOKES DE, RIDGWAY JM, GUO S, GU M, CRUMLEY RL, ARMSTRONG WB, CHEN Z, WONG BJB, Laryngeal epithelial thickness: a comparison between optical coherence tomography and histology, *Clinical Otolaryngology*, **34**: 460–466, 2009.
- [Kal85] KALTER PO, LUBSEN H, DELEMARRE JF, ALONS CL, VELDHUIZEN RW, MEYER CJ, SNOW GB, Quantitative morphometry of squamous cell hyperplasia of the larynx, *J Clin Pathol*, **38** (5): 489–495, 1985.
- [Kho03] KHOLODNYKH AI, PETROVA IY, LARIN KV, MOTAMEDI M, ESENALIEV RO, Precision of measurement of tissue optical properties with optical coherence tomography, *Appl Opt*, **42** (16): 3027–3037, 2003.
- [Kim03] KIMURA M, TAYAMA N, CHAN RW, Geometrical deformation of vocal fold tissues indu-

- ced by formalin fixation, *Laryngoscope*, **113**: 607–613, 2003.
- [Kle65] KLEINSASSER O, Weitere technische Entwicklung und erste Ergebnisse der endolaryngealen Mikrochirurgie, *Zeitschrift für Laryngologie, Rhinologie, Otologie und ihre Grenzgebiete*, **44**: 711–727, 1965.
- [Kle06] KLEIN AM, PIERCE MC, ZEITELS SM, ANDERSON RR, KOBLER JB, SHISHKOV M, DE BOER JF, Imaging the human vocal folds in vivo with optical coherence tomography: a preliminary experience, *Ann Otol Rhinol Laryngol*, **115** (4): 277–284, 2006.
- [Klo07] KLOCKOW AK, *Entwicklung eines OCT-gestützten Laryngoskops mit elektromechanischer Fokussiereinheit*, Diplomarbeit, Fachhochschule Oldenburg/Ostfriesland/Wilhelmshaven, 2007.
- [Knü00] KNÜTTEL A, BOEHLAU-GODAU M, Spatially confined and temporally resolved refractive index and scattering evaluation in human skin performed with optical coherence tomography, *J Biomed Opt*, **5** (1): 83–92, 2000.
- [Ko04] KO T, ADLER D, FUJIMOTO J, MAMEDOV D, PROKHOROV V, SHIDLOVSKI V, YAKUBOVICH S, Ultrahigh resolution optical coherence tomography imaging with a broadband superluminescent diode light source, *Opt Express*, **12** (10): 2112–2119, 2004.
- [Kor09] KORDE VR, LIEBMANN E, BARTON JK, Design of a Handheld Optical Coherence Microscopy Endoscope, in: *Proceedings of SPIE Vol. 7172*, 2009.
- [Kra07] KRAFT M, LÜERSSEN K, LUBATSCHOWSKI H, GLANZ H, ARENS C, Technique of optical coherence tomography of the larynx during microlaryngoscopy, *Laryngoscope*, **117** (5): 950–952, 2007.
- [Kra08a] KRAFT M, ARENS C, Technique of high-frequency endolaryngeal ultrasound, *The Journal of Laryngology & Otology*, **122**: 1109–1111, 2008.
- [Kra08b] KRAFT M, GLANZ H, VON GERLACH S, WISWEH H, LUBATSCHOWSKI H, ARENS C, Clinical value of optical coherence tomography in laryngology, *Head Neck*, **30** (12): 1628–1635, 2008.
- [Kra08c] KRAFT M, LÜERSSEN K, LUBATSCHOWSKI H, WOENCKHAUS J, SCHÖBERLEIN S, GLANZ H, ARENS C, Schleimhautveränderungen im Kehlkopf: Prädiktionswert neuerer bildgebender Verfahren für eine histologische Diagnose, *HNO*, **56** (6): 609–613, 2008.
- [Kra09] KRAFT M, GLANZ H, VON GERLACH S, WISWEH H, LUBATSCHOWSKI H, ARENS C, Optische Kohärenztomographie - Stellenwert einer neuen Methode bei der Abklärung unklarer Kehlkopfveränderungen, *HNO*, **published online**, 2009.
- [Kra10] KRAFT M, MENDE S, ARNOUX A, ARENS C, Anatomical landmarks for endosonography of the larynx, *Head Neck*, **32**: 326–332, 2010.

- [Kur02] KURANOV R, SAPOZHNIKOVA V, TURCHIN I, ZAGAINOVA E, GELIKONOV V, KAMENSKY V, SNOPOVA L, PRODANETZ N, Complementary use of cross-polarization and standard OCT for differential diagnosis of pathological tissues., *Opt Express*, **10** (15): 707–713, 2002.
- [Kuz10] KUZNETSOV M, ATIA W, JOHNSON B, FLANDERS D, Compact ultrafast reflective Fabry-Perot tunable lasers for OCT imaging applications, in: *Proceeding of SPIE Vol. 7554*, 2010.
- [Lan02] LANKENAU EM, *Optische Kohärenztomographie: Dispersive Einflüsse und Anwendungen in der medizinischen Diagnostik*, Dissertation, Medizinische Universität zu Lübeck, 2002.
- [Lan09] LANKENAU E, KLINGER D, MÜLLER HH, MALIK A, WINTER C, GIESE A, OELCKERS S, JUST T, HÜTTMANN G, 3-D intraoperative imaging combining an operating microscope with optical coherence tomography, *Medical Laser Application*, **24**: 127, 2009.
- [Lar04] LARSSON H, HERTEGÅRD S, Calibration of high-speed imaging by laser triangulation, *Logoped Phoniatr Vocol*, **29** (4): 154–161, 2004.
- [Lüe06] LÜERSSEN K, LUBATSCHOWSKI H, URSINUS K, GASSE H, KOCH R, PTOK M, Charakterisierung von Stimmlippen mittels optischer Kohärenztomographie, *HNO*, **54** (8): 611–615, 2006.
- [Lüe07] LÜERSSEN K, LUBATSCHOWSKI H, PTOK M, Erbium:YAG-Laserchirurgie an Stimmlippen- gewebe, *HNO*, **55** (6): 443–446, 2007.
- [Lei88] LEINER DC, Miniature Optics in the hospital operating room, in: *Proceedings of SPIE 935*, 1988.
- [Lei03] LEITGEB R, HITZENBERGER C, FERCHER A, Performance of fourier domain vs. time domain optical coherence tomography, *Optics Express*, **11** (8): 889–894, 2003.
- [Leu01] LEUNIG A, MEHLMANN M, BETZ C, STEPP H, ARBOGAST S, GREVERS G, BAUMGARTNER R, Fluorescence staining of oral cancer using a topical application of 5-aminolevulinic acid: fluorescence microscopic studies, *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, **60** (1): 44–49, 2001.
- [Li09] LI D, ZHENG W, QU JY, Imaging of epithelial tissue in vivo based on excitation of multiple endogenous nonlinear optical signals., *Opt Lett*, **34** (18): 2853–2855, 2009.
- [LIN09] LINOS, WinLens Predesigner 1.0.22, Software, 2009.
- [Lit05] LITFIN G (Hg.), *Technische Optik in der Praxis*, Springer, 2005.
- [Liu04] LIU XM, COBB MJ, CHEN YC, KIMMEY MB, LI XD, Rapid-scanning forward-imaging miniature endoscope for real-time optical coherence tomography, *Optics Letters*, **29**: 1763–1765, 2004.

- [Liu07] LIU B, BREZINSKI ME, Theoretical and practical considerations on detection performance of time domain, Fourier domain, and swept source optical coherence tomography., *J Biomed Opt*, **12** (4): 044.007, 2007.
- [LP08] LINGLEY-PAPADOPOULOS CA, LOEW MH, MANYAK MJ, ZARA JM, Computer recognition of cancer in the urinary bladder using optical coherence tomography and texture analysis, *Journal of Biomedical Optics*, **13**: 024.003, 2008.
- [LP09] LINGLEY-PAPADOPOULOS CA, LOEW MH, ZARA JM, Wavelet analysis enables system-independent texture analysis of optical coherence tomography images, *Journal of Biomedical Optics*, **14**: 044.010, 2009.
- [Mag07] MAGULURI G, MUJAT M, PARK B, KIM K, SUN W, IFTEMIA N, FERGUSON R, HAMMER D, CHEN T, BOER J, Three-dimensional tracking for volumetric spectral-domain optical coherence tomography, *Optics Express*, **15**: 16.808–16.817, 2007.
- [Mah01] MAHLSTEDT K, NETZ U, SCHÄDEL D, EBERLE HG, GROSS M, An initial assessment of the optical properties of human laryngeal tissue, *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, **63** (6): 372–378, 2001.
- [Mal04] MALACARA D, MALACARA Z, *Handbook of Optical Design*, Marcel Dekker, 2004.
- [Man01] MANNEBERG G, HERTEGARD S, LILJENCRANTZ J, Measurement of human vocal fold vibrations with laser triangulation, *Optical Engineering*, **40**: 2041–2044, 2001.
- [Mas09] MASSOW O, JACKSTADT M, WISWEH H, WILL F, LUBATSCHOWSKI H, OCT-aided femtosecond laser micromachining device, in: *Proceedings of SPIE Vol. 7203*, 2009.
- [Max05] MAXWELL IZ, CHUNG SH, MAZUR E, Nanoprocessing of subcellular targets using femtosecond laser pulses, *Medical laser application*, **20**: 193, 2005.
- [McC09] MCCAUGHEY RG, SUN H, ROTHHOLTZ VS, JUHASZ T, WONG BJB, Femtosecond laser ablation of the stapes, *J Biomed Opt*, **14** (2): 024.040, 2009.
- [Mee08] MEEMON P, LEE KS, MURALI S, ROLLAND J, Optical design of a dynamic focus catheter for high-resolution endoscopic optical coherence tomography, *Applied Optics*, **47**: 2452–2457, 2008.
- [Mel03] DE MELO ECM, LEMOS M, FILHO JAX, SENNES LU, SALDIVA PHN, TSUJI DH, Distribution of collagen in the lamina propria of the human vocal fold, *Laryngoscope*, **113** (12): 2187–2191, 2003.
- [Mes08] MESCHÉDE D, *Optik, Licht und Laser*, Vieweg + Teubner, 2008.
- [Mou00] MOURANT JR, CANPOLAT M, BROCKER C, ESPONDA-RAMOS O, JOHNSON TM, MATANOCK A, STETTER K, FREYER JP, Light scattering from cells: the contribution of the nucleus and the effects of proliferative status, *Journal of Biomedical Optics*, **5**: 131–137,

- 2000.
- [Nag09] NAGY Z, TAKACS A, FILKORN T, SARAYBA M, Initial clinical evaluation of an intraocular femtosecond laser in cataract surgery, *J Refract Surg*, **25**: 1053–1060, 2009.
- [Nie07] NIEMZ M, *Laser-Tissue Interactions: Fundamentals and Applications*, Springer, 2007, 3. Auflage.
- [Noa99] NOACK J, VOGEL A, Laser-induced plasma formation in water at nanosecond to femtosecond time scales: calculation of thresholds, absorption coefficients, and energy density, *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, **35**: 1156–1167, 1999.
- [Oh05] OH WY, YUN SH, TEARNEY GJ, BOUMA BE, 115 kHz tuning repetition rate ultrahigh-speed wavelength-swept semiconductor laser., *Opt Lett*, **30** (23): 3159–3161, 2005.
- [Ohn09] OHNISHI M, TAKADA D, OHMI M, HARUNA M, Dynamic analysis of laser ablation of biological tissue using a real-time OCT, in: *Proceedings of SPIE Vol. 7175*, 2009.
- [Ora96] ORAEVSKY AA, DASILVA LB, RUBENCHIK AM, FEIT MD, GLINSKY ME, PERRY MD, MAMMINI BM, SMALL W, STUART BC, Plasma mediated ablation of biological tissues with nanosecond-to-femtosecond laser pulses: Relative role of linear and nonlinear absorption, *IEEE Journal on Selected Topics in Quantum Electronics*, **2**: 790, 1996.
- [Pan01] PAN YT, XIE HK, FEDDER GK, Endoscopic optical coherence tomography based on a microelectromechanical mirror, *Optics Letters*, **26**: 1966–1968, 2001.
- [Pan03] PAN Y, LI Z, XIE T, CHU CR, Hand-held arthroscopic optical coherence tomography for in vivo high-resolution imaging of articular cartilage, *J Biomed Opt*, **8** (4): 648–654, 2003.
- [Pit98] PITRIS C, BREZINSKI ME, BOUMA BE, TEARNEY GJ, SOUTHERN JF, FUJIMOTO JG, High resolution imaging of the upper respiratory tract with optical coherence tomography: a feasibility study, *Am J Respir Crit Care Med*, **157** (5 Pt 1): 1640–1644, 1998.
- [Pod00] PODOLEANU AG, Unbalanced versus balanced operation in an optical coherence tomography system., *Appl Opt*, **39** (1): 173–182, 2000.
- [Pot08] POTSAID B, GORCZYNSKA I, SRINIVASAN VJ, CHEN Y, JIANG J, CABLE A, FUJIMOTO JG, Ultrahigh speed spectral / Fourier domain OCT ophthalmic imaging at 70,000 to 312,500 axial scans per second., *Opt Express*, **16** (19): 15.149–15.169, 2008.
- [Pro04] PROBST R, GREVERS G, IRO H, *Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde*, Thieme, 2004.
- [Pro09] PROBST J, KOCH P, HÜTTMANN G, Real-time 3D rendering of optical coherence tomography volumetric data, in: *Proceedings of SPIE Vol. 7372*, 2009.
- [Qi08] QI X, *Computer-aided diagnosis of early cancers in the gastrointestinal tract using optical coherence tomography*, Dissertation, Case Western Reserve University, 2008.

- [Rog02] ROGOWSKA J, BREZINSKI ME, Image processing techniques for noise removal, enhancement, and segmentation of cartilage, *Physics in Medicine and Biology*, **47**: 641–655, 2002.
- [Rog06] BREZINSKI ME (Hg.) *Optical Coherence Tomography: Principles and Applications*, Academic Press, 2006, ROGOWSKA J, Kapitel Digital Image Processing Techniques for Speckle Reduction, Enhancement, and Segmentation of OCT Images, Seiten 305–329.
- [Roh09] ROHRBECK N, *Entwicklung eines OCT-gestützten Laryngoskops zur kontaktfreien Untersuchung von Kehlkopferkrankungen*, Diplomarbeit, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 2009.
- [Rol98] ROLLINS A, YAZDANFAR S, KULKARNI M, UNG-ARUNYAWEE R, IZATT J, In vivo video rate optical coherence tomography., *Opt Express*, **3** (6): 219–229, 1998.
- [Rol99] ROLLINS AM, IZATT JA, Optimal interferometer designs for optical coherence tomography., *Opt Lett*, **24** (21): 1484–1486, 1999.
- [Rol02a] BOUMA BE, TERNEY GJ (Hg.) *Handbook of Optical Coherence Tomography*, Marcel Dekker, 2002, ROLLINS AM, IZATT JA, Kapitel Reference Optical Delay Scanning, Seiten 99–123.
- [Rol02b] ROLLINS AM, YAZDANFAR S, BARTON JK, IZATT JA, Real-time in vivo color Doppler optical coherence tomography., *J Biomed Opt*, **7** (1): 123–129, 2002.
- [Ruf05] RUFFING S, STRUFFERT T, GRGIC A, REITH W, Bildgebende Diagnostik von Pharynx und Larynx, *Radiologe*, **45** (9): 828–836, 2005.
- [Sac02] SACKS ZS, KURTZ RM, JUHASZ T, MOUROU G, High precision subsurface photodisruption in human sclera, *Journal of Biomedical Optics*, **7**: 442–450, 2002.
- [Sal07] SALINAS HM, FERNANDEZ DC, Comparison of PDE-based nonlinear diffusion approaches for image enhancement and denoising in optical coherence tomography, *IEEE Transactions on Medical Imaging*, **26**: 761–771, 2007.
- [Sar05] SARUNIC M, CHOMA MA, YANG C, IZATT JA, Instantaneous complex conjugate resolved spectral domain and swept-source OCT using 3x3 fiber couplers., *Opt Express*, **13** (3): 957–967, 2005.
- [Sat98] SATO K, Reticular fibers in the vocal fold mucosa, *Ann Otol Rhinol Laryngol*, **107** (12): 1023–1028, 1998.
- [Sch97] SCHMITT JM, LEE SL, YUNG KM, An optical coherence microscope with enhanced resolving power in thick tissue, *Optics Communications*, **142**: 203–207, 1997.
- [Sch99] SCHMITT J, XIANG S, YUNG K, Speckle in Optical Coherence Tomography, *Journal of Biomedical Optics*, **4** (1): 95–105, 1999.

- [Sch04] SCHWAB B, HANGER D, MÜLLER W, LUBATSCHOWSKI H, LENARZ T, HEERMANN R, Knochenablation mittels ultrakurzer Laserpulse. Eine neue Technik für die Mittelohrchirurgie, *Laryngorhinotologie*, **83**: 219–225, 2004.
- [Sch05a] SCHADE G, MÜLLER F, Hochgeschwindigkeitsglottographische Diagnostik in der Laryngologie, *HNO*, **53** (12): 1085–1091, 2005.
- [Sch05b] SCHÜNKE M, SCHULTE E, SCHUMACHER U, VOLL M, WESKER K, *Prometheus Lern-Atlas der Anatomie - Hals und innere Organe*, Thieme, 2005.
- [Sch08a] SCHRÖCK A, STUHRMANN N, SCHADE G, Flexible Chip-on-the-tip-Endoskopie zur Larynxdiagnostik, *HNO*, **56** (12): 1239–1242, 2008.
- [Sch08b] SCHUMACHER S, FROMM M, OBERHEIDE U, GERTEN G, WEGENER A, LUBATSCHOWSKI H, In vivo application and imaging of intralenticular femtosecond laser pulses for the restoration of accommodation, *J Refract Surg*, **24**: 991–995, 2008.
- [Sep08] SEPEHR A, ARMSTRONG WB, GUO S, SU J, PEREZ J, CHEN Z, WONG B, Optical coherence tomography of the larynx in the awake patient, *Otolaryngol Head Neck Surg*, **138** (4): 425–429, 2008.
- [Ser97] SERGEEV A, GELIKONOV V, GELIKONOV G, FELDCHEIN F, KURANOV R, GLADKOVA N, SHAKHOVA N, SNOPOVA L, SHAKHOV A, KUZNETZOVA I, DENISENKO A, POCHINKO V, CHUMAKOV Y, STRELTZOVA O, In vivo endoscopic OCT imaging of precancer and cancer states of human mucosa, *Opt Express*, **1** (13): 432–440, 1997.
- [Sez04] SEZGIN M, SANKUR B, Survey over image thresholding techniques and quantitative performance evaluation, *Journal of Electronic Imaging*, **13**: 146–165, 2004.
- [Sha01] SHAKHOV AV, TARENTJEVA AB, KAMENSKY VA, SNOPOVA LB, GELIKONOV VM, FELDCHEIN FI, SERGEEV AM, Optical coherence tomography monitoring for laser surgery of laryngeal carcinoma, *Journal of Surgical Oncology*, **77** (4): 253–258, 2001.
- [Sha05] SHARMA U, FRIED NM, KANG JU, All-fiber common-path optical coherence tomography: sensitivity optimization and system analysis, *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, **11** (4): 799–805, 2005.
- [She03] SHEN N, *Photodisruption in biological tissues using femtosecond laser pulses*, Dissertation, Harvard University, 2003.
- [Shi08] DREXLER W, FUJIMOTO JG (Hg.) *Optical Coherence Tomography - Technology and Applications*, Springer, 2008, SHIDLOVSKI VR, Kapitel Superluminescent Diode Light Sources for OCT, Seiten 281–299.
- [Sin05] SINGER W, TOTZECK M, GROSS H, *Handbook of Optical Systems - Volume 2: Physical Image Formation*, Wiley-VCH, 2005.

- [Ska05] SKALA MC, SQUIRRELL JM, VROTSOS KM, EICKHOFF JC, GENDRON-FITZPATRICK A, ELICEIRI KW, RAMANUJAM N, Multiphoton microscopy of endogenous fluorescence differentiates normal, precancerous, and cancerous squamous epithelial tissues., *Cancer Res*, **65** (4): 1180–1186, 2005.
- [Smi00] SMITH WJ, *Modern Optical Engineering*, McGraw-Hill, 2000.
- [Smi05] SMITH WJ, *Modern Lens Design*, McGraw-Hill, 2005, 2. Auflage.
- [Spö08] SPÖLER F, *Neue Methoden und Applikationen für die hochauflösende optische Kohärenztomographie*, Dissertation, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen, 2008.
- [Sta10] STANDISH BA, LEE KKC, MARIAMPILLAI A, MUNCE NR, LEUNG MKK, YANG VXD, VITKIN IA, In vivo endoscopic multi-beam optical coherence tomography, *Physics in Medicine and Biology*, **55**: 615–622, 2010.
- [Sti07] STIFTER D, Beyond biomedicine: a review of alternative applications and developments for optical coherence tomography, *Applied Physics B: Lasers and Optics*, **88** (3): 337–357, 2007.
- [Swa09] SWANSON E, HUANG D, Ophthalmic Optical Coherence Tomography Market: Past, Present and Future, <http://www.octnews.org/articles/1027616/ophthalmic-optical-coherence-tomography-market-pas/>, 2009, zuletzt aufgerufen am 19.02.2010.
- [Tea96a] TEARNEY G, BOUMA B, BOPPART S, GOLUBOVIC B, SWANSON E, FUJIMOTO J, Rapid acquisition of in vivo biological images by use of optical coherence tomography, *Optics Letters*, **21** (17): 1408–1410, 1996.
- [Tea96b] TEARNEY GJ, BOPPART SA, BOUMA BE, BREZINSKI ME, WEISSMAN NJ, SOUTHERN JF, FUJIMOTO JG, Scanning single-mode fiber optic catheter-endoscope for optical coherence tomography, *Optics Letters*, **21**: 543–545, 1996.
- [Tea97] TEARNEY GJ, BREZINSKI ME, BOUMA BE, BOPPART SA, PITRIS C, SOUTHERN JF, FUJIMOTO JG, In vivo endoscopic optical biopsy with optical coherence tomography, *Science*, **276** (5321): 2037–2039, 1997.
- [Tea09] TEARNEY GJ, WANG TD (Hg.), *Endoscopic Microscopy IV, Proceedings of SPIE*, Band 7172, SPIE, 2009.
- [Ter08] WOLFGANG DREXLER JGF (Hg.) *Optical Coherence Tomography - Technology and Applications*, Springer, 2008, TERENTÉVA A, SHAKHOV A, MASLENNIKOVA A, GLADKOVA N, KAMENSKY V, FELDCHTEIN F, SHAKHOVA N, Kapitel OCT in Laryngology, Seiten 1123–1150.
- [Tho07] THONG PSP, OLIVO M, KHO KW, ZHENG W, MANCER K, HARRIS M, SOO KC, Laser

- confocal endomicroscopy as a novel technique for fluorescence diagnostic imaging of the oral cavity., *J Biomed Opt*, **12** (1): 014.007, 2007.
- [Tin09] TINNE N, SCHUMACHER S, NUZZO V, RIPKEN T, LUBATSCHOWSKI H, Dynamic and interaction of fs-laser induced cavitation bubbles for analyzing the cutting effect, in: *Proceedings of SPIE Vol. 7373*, 2009.
- [Tit08] TITZE IR, The Human Instrument, *Scientific American*, **298** (1): 94–101, 2008.
- [Tom96] TOMKINSON TH, BENTLEY JL, CRAWFORD MK, HARKRIDER CJ, MOORE DT, ROUKE JL, Rigid endoscopic relay systems: a comparative study, *Applied Optics*, **35**: 6674–6683, 1996.
- [Tor06] TORKIAN BA, GUO S, JAHNG AW, LIAW LHL, CHEN Z, WONG BJB, Noninvasive measurement of ablation crater size and thermal injury after CO₂ laser in the vocal cord with optical coherence tomography, *Otolaryngol Head Neck Surg*, **134**: 86–91, 2006.
- [Tra04] TRAN PH, MUKAI DS, BRENNER M, CHEN Z, In vivo endoscopic optical coherence tomography by use of a rotational microelectromechanical system probe, *Opt Lett*, **29** (11): 1236–1238, 2004.
- [Tsa08] TSAI MT, LEE HC, LEE CK, YU CH, CHEN HM, CHIANG CP, CHANG CC, WANG YM, YANG CC, Effective indicators for diagnosis of oral cancer using optical coherence tomography., *Opt Express*, **16** (20): 15.847–15.862, 2008.
- [Tsa09] TSAI MT, LEE CK, LEE HC, CHEN HM, CHIANG CP, WANG YM, YANG CC, Differentiating oral lesions in different carcinogenesis stages with optical coherence tomography., *J Biomed Opt*, **14** (4): 044.028, 2009.
- [Tse08] TSE C, ZOHDY MJ, YE JY, O'DONNELL M, Penetration and Precision of Subsurface Photodisruption in Porcine Skin with Infrared Femtosecond Laser Pulses, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, **55**: 1211–1218, 2008.
- [Tuc07] TUCHIN VV, *Tissue Optics*, SPIE Press, 2007.
- [Ver09] VERIKAS A, ULOZA V, BACAUSKIENE M, GELZINIS A, KELERTAS E, Advances in laryngeal imaging, *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, **published online**, 2009.
- [Vog99a] VOGEL A, NAHEN K, THEISEN D, BIRNGRUBER R, THOMAS RJ, ROCKWELL BA, Influence of optical aberrations on laser-induced plasma formation in water and their consequences for intraocular photodisruption, *Applied Optics*, **38**: 3636–3643, 1999.
- [Vog99b] VOGEL A, NOACK J, NAHEN K, THEISEN D, BUSCH S, PARLITZ U, HAMMER DX, NOOJIN GD, ROCKWELL B, BIRNGRUBER R, Energy balance of optical breakdown in water at nanosecond to femtosecond time scales, *Applied Physics B*, **68**: 271–280, 1999.
- [Vog03] VOGEL A, VENUGOPALAN V, Mechanisms of pulsed laser ablation, *Chem Rev*, **103**: 577,

- 2003.
- [Vog05] VOGEL A, NOACK J, HÜTTMANN G, PALTAUF G, Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues, *Applied Physics B*, **81**: 1015–1047, 2005.
- [Vog08] VOGEL A, LINZ N, FREIDANK S, PALTAUF G, Femtosecond-laser-induced nanocavitation in water: Implications for optical breakdown threshold and cell surgery, *Physical Review Letters*, **100**: 038.102, 2008.
- [Vok08] VOKES DE, JACKSON R, GUO S, PEREZ JA, SU J, RIDGWAY JM, ARMSTRONG WB, CHEN Z, WONG BJB, Optical coherence tomography-enhanced microlaryngoscopy: preliminary report of a noncontact optical coherence tomography system integrated with a surgical microscope, *Ann Otol Rhinol Laryngol*, **117** (7): 538–547, 2008.
- [Wal08] WALTHER J, KRÜGER A, CUEVAS M, KOCH E, Effects of axial, transverse, and oblique sample motion in FD OCT in systems with global or rolling shutter line detector, *J Opt Soc Am A*, **25**: 2791–2802, 2008.
- [Web03] WEBER D, MAHLSTEDT K, DRESSLER C, BEUTHAN J, First results with ablating superficial cell layers of the porcine vocal fold using a femtosecond laser, *Medical Laser Applications*, **18**: 260–264, 2003.
- [Wei04] WEISSMAN J, HANCEWICZ T, KAPLAN P, Optical coherence tomography of skin for measurement of epidermal thickness by shapelet-based image analysis., *Opt Express*, **12** (23): 5760–5769, 2004.
- [Wen05] WENDLER J, SEIDNER W, EYSHOLDT U, *Lehrbuch der Phoniatrie und Pädaudiologie*, Georg Thieme Verlag, 2005.
- [Woj02] WOJTKOWSKI M, KOWALCZYK A, LEITGEB R, FERCHER AF, Full range complex spectral optical coherence tomography technique in eye imaging., *Opt Lett*, **27** (16): 1415–1417, 2002.
- [Won05] WONG BJB, JACKSON RP, GUO S, RIDGWAY JM, MAHMOOD U, SU J, SHIBUYA TY, CRUMLEY RL, GU M, ARMSTRONG WB, CHEN Z, In vivo optical coherence tomography of the human larynx: normative and benign pathology in 82 patients, *Laryngoscope*, **115** (11): 1904–1911, 2005.
- [Wu09] WU Y, LENG Y, XI J, LI X, Scanning all-fiber-optic endomicroscopy system for 3D non-linear optical imaging of biological tissues., *Opt Express*, **17** (10): 7907–7915, 2009.
- [Xie05] XIE T, MUKAI D, GUO S, BRENNER M, CHEN Z, Fiberoptic-bundle-based optical coherence tomography, *Optics Letters*, **30**: 1803–1805, 2005.
- [Xie06] XIE T, GUO S, CHEN Z, MUKAI D, BRENNER M, GRIN lens rod based probe for endoscopic spectral domain optical coherence tomography with fast dynamic focus tracking, *Opt*

- Express*, **14** (8): 3238–3246, 2006.
- [Yaq06] YAQOUB Z, WU J, MCDOWELL EJ, HENG X, YANG C, Methods and application areas of endoscopic optical coherence tomography, *J Biomed Opt*, **11** (6): 063.001, 2006.
- [Yu09] YU L, LIU G, RUBINSTEIN M, SAIDI A, WONG B J F, CHEN Z, Office-based dynamic imaging of vocal cords in awake patients with swept-source optical coherence tomography, *J Biomed Opt*, **14** (6): 064.020, 2009.
- [Yun03] YUN SH, BOUDOUX C, TEARNEY G J, BOUMA B E, High-speed wavelength-swept semiconductor laser with a polygon-scanner-based wavelength filter, *Optics Letters*, **28**: 1981–1983, 2003.
- [Yun04] YUN SH, TEARNEY G, DE BOER J, BOUMA B, Motion artifacts in optical coherence tomography with frequency-domain ranging, *Opt Express*, **12** (13): 2977–2998, 2004.
- [Zar08] ZARA J M, LINGLEY-PAPADOPOULOS C A, Endoscopic OCT Approaches Toward Cancer Diagnosis, *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, **14** (1): 70–81, 2008.
- [Zem07] *ZEMAX User's Guide*, ZEMAX Development Corporation, 2007.
- [Zha08] ZHANG K, WANG W, HAN J, KANG J U, A surface topology and motion compensation system for microsurgery guidance and intervention based on common-path optical coherence tomography, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, **56**: 2318–2321, 2008.
- [Zha09] ZHANG K, WANG W, HAN J, KANG J U, A Surface Topology and Motion Compensation System for Microsurgery Guidance and Intervention Based on Common-Path Optical Coherence Tomography, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, **56**: 2318–2321, 2009.
- [Zhe08] ZHENG K, LIU B, HUANG C, BREZINSKI M E, Experimental confirmation of potential swept source optical coherence tomography performance limitations., *Appl Opt*, **47** (33): 6151–6158, 2008.
- [Zys07] ZYSK A M, NGUYEN F T, OLDENBURG A L, MARKS D L, BOPPART S A, Optical coherence tomography: a review of clinical development from bench to bedside, *J Biomed Opt*, **12** (5): 051.403, 2007.

A. Optikdesigndaten

System/Prescription Data

File : C:\Dokumente und Einstellungen\Henning\Eigene Dateien\Diss\OCT-Laryngoskop\optikdesign\objektiv_final.ZMX
 Title: OCT-Laryngoskop Objektiv
 Date : THU NOV 5 2009

LENS NOTES:

Retrofokus-Typ

GENERAL LENS DATA:

Surfaces : 10
 Stop : 3
 System Aperture : Object Space NA = 0.033
 Glass Catalogs : SCHOTT schott-17-03-2009
 Ray Aiming : Off
 Apodization : Uniform, factor = 0.00000E+000
 Temperature (C) : 2.00000E+001
 Pressure (ATM) : 1.00000E+000
 Effective Focal Length : 15.00008 (in air at system temperature and pressure)
 Effective Focal Length : 15.00008 (in image space)
 Back Focal Length : 2.744295
 Total Track : 26.62943
 Image Space F/# : 2.752415
 Paraxial Working F/# : 2.752415
 Working F/# : 2.757302
 Image Space NA : 0.1787335
 Object Space NA : 0.033
 Stop Radius : 2.648948
 Paraxial Image Height : 1.781232
 Paraxial Magnification : -0.1817584
 Entrance Pupil Diameter : 5.449789
 Entrance Pupil Position : 1.527586
 Exit Pupil Diameter : 3.633174e+009
 Exit Pupil Position : -1e+010
 Field Type : Object height in Millimeters
 Maximum Field : 9.8
 Primary Wave : 0.5605
 Lens Units : Millimeters
 Angular Magnification : -1.168674e-016

Fields : 3

Field Type: Object height in Millimeters

#	X-Value	Y-Value	Weight
1	0.000000	0.000000	1.000000
2	0.000000	-5.665000	1.000000
3	0.000000	-9.800000	1.000000

Vignetting Factors

#	VDX	VDY	VCX	VCY	VAN
1	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
2	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
3	0.000000	-0.005235	0.000000	0.005235	0.000000

Wavelengths : 3

Units: Microns

#	Value	Weight
1	0.478000	1.000000
2	0.560500	1.000000
3	0.643000	1.000000

SURFACE DATA SUMMARY:

Surf	Type	Comment	Radius	Thickness	Glass	Diameter
OBJ	STANDARD		Infinity	81		19.6
1	STANDARD	OBJ LINSE 1	31.13434	1.5	N-BK7	6
2	STANDARD	DCX	-81.86264	0.5		6
STO	STANDARD		Infinity	0.5		5.4
4	STANDARD	OBJ LINSE 2	16.39497	3.5	N-LAK12	6
5	STANDARD	CXCX	32.84339	10.15874		6
6	STANDARD	OBJ LINSE 3	12.8535	3.5	N-SK16	6
7	STANDARD	AC	-4.64518	1.5	N-SF4	6
8	STANDARD		-13.63258	5.470684		6
9	STANDARD		Infinity	0		3.6
IMA	STANDARD		Infinity			3.6

ABBILDUNG A.1.: Systemdaten für das in Kapitel 4.4.1 beschriebene Objektiv.

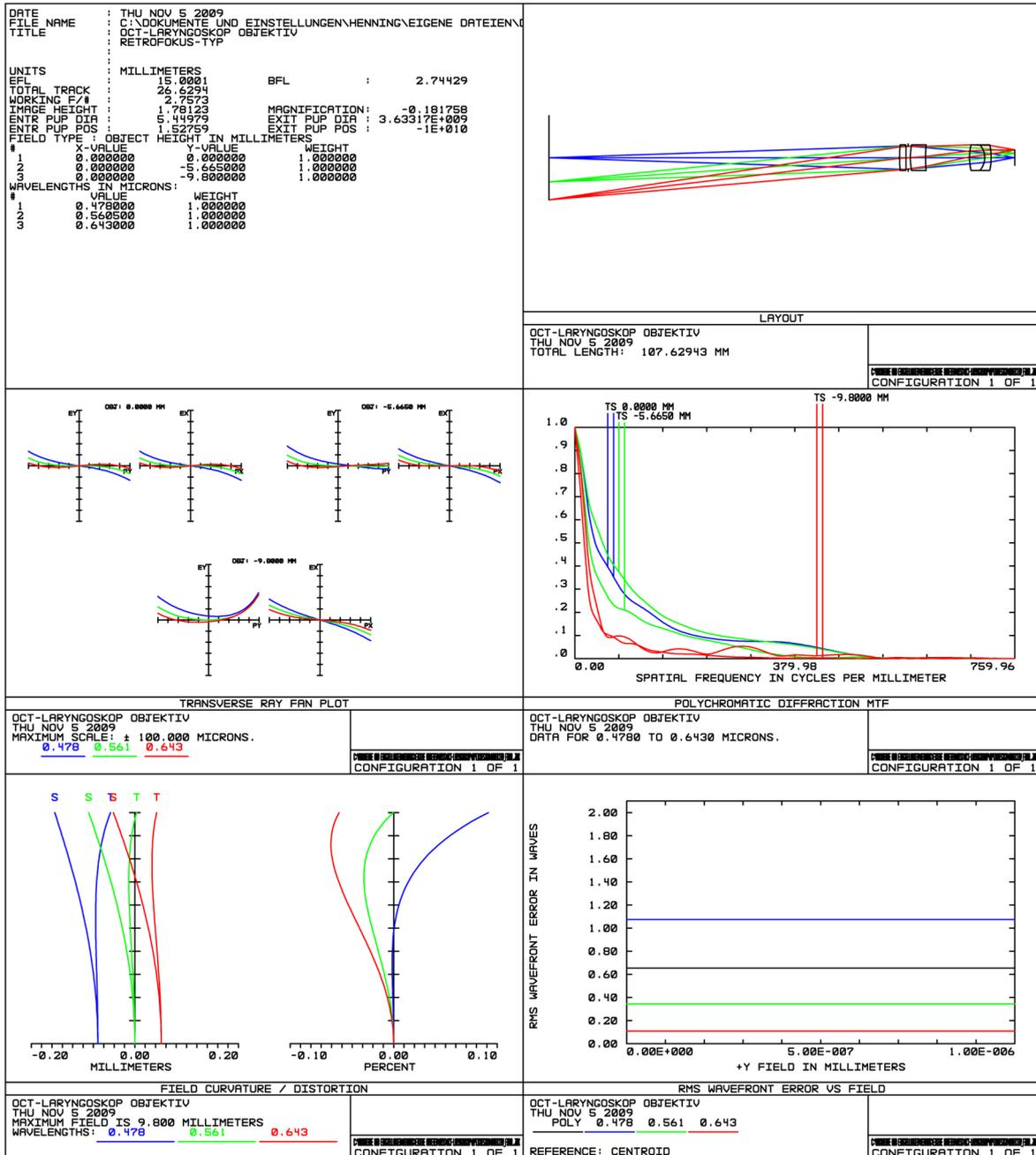


ABBILDUNG A.2.: Verschiedene Analysen für das in Kapitel 4.4.1 beschriebene Objektiv.

System/Prescription Data

File : C:\Dokumente und Einstellungen\Henning\Eigene Dateien\Diss\OCT-Laryngoskop\optikdesign\relay_final.ZMX
 Title: OCT-Laryngoskop 1:1-Relaystufe
 Date : FRI NOV 6 2009

LENS NOTES:

objekt- und bildseitig telezentrisch

GENERAL LENS DATA:

Surfaces : 15
 Stop : 6
 System Aperture : Object Space NA = 0.172
 Telecentric Mode : On
 Glass Catalogs : SCHOTT
 Ray Aiming : Off
 Apodization : Uniform, factor = 0.00000E+000
 Temperature (C) : 2.00000E+001
 Pressure (ATM) : 1.00000E+000
 Effective Focal Length : 5e+009 (in air at system temperature and pressure)
 Effective Focal Length : 5e+009 (in image space)
 Back Focal Length : -4.999998e+009
 Total Track : 54.0577
 Image Space F/# : 1.431827
 Paraxial Working F/# : 2.863654
 Working F/# : 2.906974
 Image Space NA : 0.172
 Object Space NA : 0.172
 Stop Radius : 1.804822
 Paraxial Image Height : 1.8
 Paraxial Magnification : -1
 Entrance Pupil Diameter : 3.492042e+009
 Entrance Pupil Position : 1e+010
 Exit Pupil Diameter : 3.492042e+009
 Exit Pupil Position : -1e+010
 Field Type : Object height in Millimeters
 Maximum Field : 1.8
 Primary Wave : 0.5605
 Lens Units : Millimeters
 Angular Magnification : 1

Fields : 3

Field Type: Object height in Millimeters

#	X-Value	Y-Value	Weight
1	0.000000	0.000000	1.000000
2	0.000000	0.900000	1.000000
3	0.000000	1.800000	1.000000

Vignetting Factors

#	VDX	VDY	VCX	VCY	VAN
1	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
2	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
3	0.000000	0.330359	0.058524	0.673333	0.000000

Wavelengths : 3

Units: Microns

#	Value	Weight
1	0.478000	1.000000
2	0.560500	1.000000
3	0.643000	1.000000

SURFACE DATA SUMMARY:

Surf	Type	Comment	Radius	Thickness	Glass	Diameter
OBJ	STANDARD		Infinity	2.62		3.6
1	STANDARD		-3.552802	3.3	SF4	6
2	STANDARD		-4.485701	6.822094		6
3	STANDARD		14.01908	3.5	SF1	6
4	STANDARD		4.382625	2	SSKN5	6
5	STANDARD		-26.63232	10.13736		6
STO	STANDARD		Infinity	-0.04445142		5.4
7	STANDARD		Infinity	-0.04445142		6
8	STANDARD		Infinity	10.13736		6
9	STANDARD		26.63232	2	SSKN5	6
10	STANDARD		-4.382625	3.5	SF1	6
11	STANDARD		-14.01908	6.822094		6
12	STANDARD		4.485701	3.3	SF4	6
13	STANDARD		3.552802	2.627696		6
14	STANDARD		Infinity	-0.007695937		3.6
IMA	STANDARD		Infinity			3.6

ABBILDUNG A.3.: Systemdaten für das in Kapitel 4.4.1 beschriebene Relaysystem.

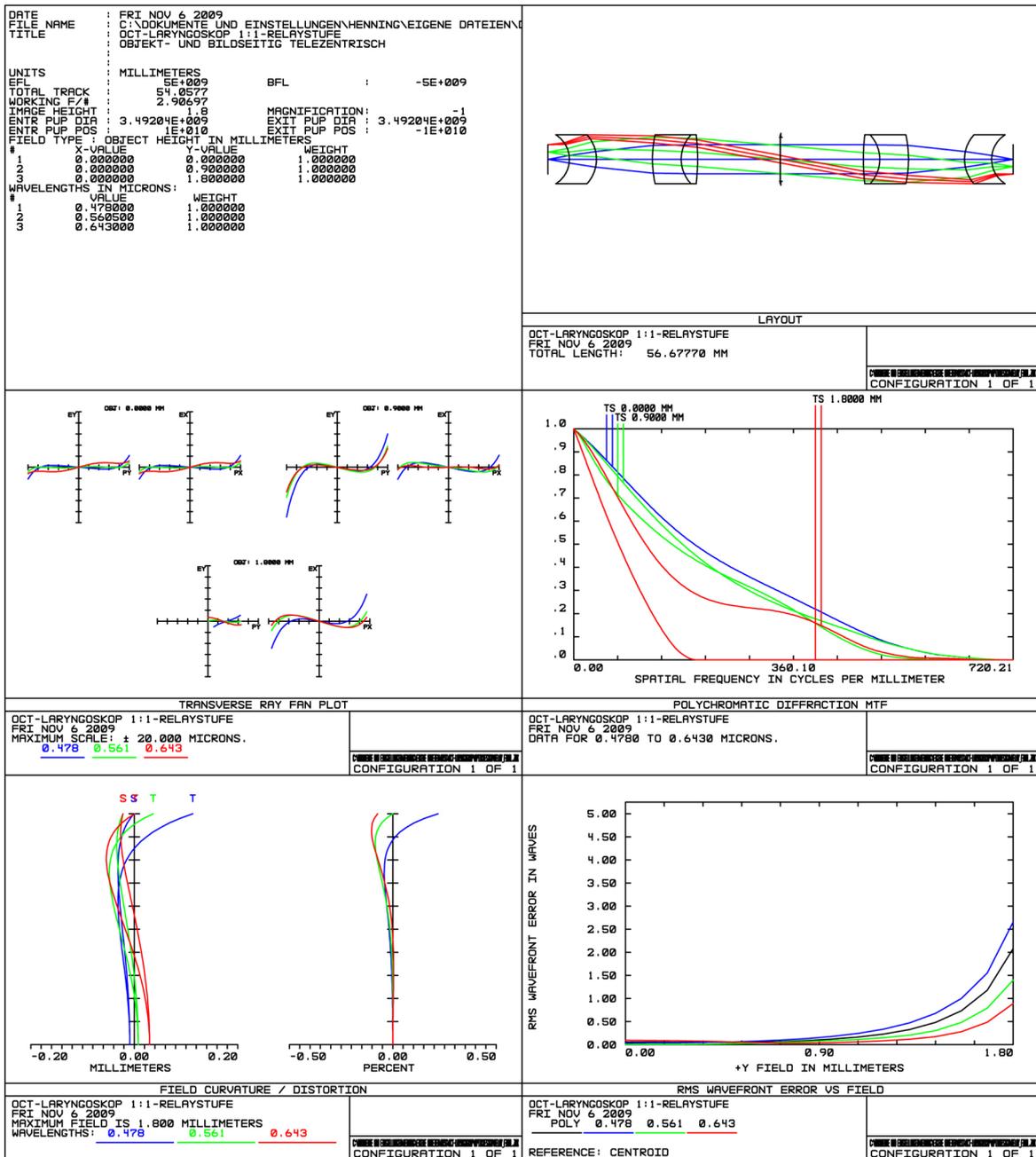


ABBILDUNG A.4.: Verschiedene Analysen für das in Kapitel 4.4.1 beschriebene Relaysystem.

System/Prescription Data

File : C:\Dokumente und Einstellungen\Henning\Eigene Dateien\Diss\OCT-Laryngoskop\optikdesign\kameraobjektiv_video.ZMX
 Title: Kameraokular
 Date : TUE DEC 8 2009

GENERAL LENS DATA:

Surfaces : 13
 Stop : 1
 System Aperture : Entrance Pupil Diameter = 5.5
 Glass Catalogs : Schott schott-17-03-2009
 Ray Aiming : Off
 Apodization : Uniform, factor = 0.00000E+000
 Effective Focal Length : 14.32278 (in air at system temperature and pressure)
 Effective Focal Length : 14.32278 (in image space)
 Back Focal Length : 7.51262
 Total Track : 36.17
 Image Space F/# : 2.604143
 Paraxial Working F/# : 2.604143
 Working F/# : 2.607988
 Image Space NA : 0.1885577
 Object Space NA : 2.75e-010
 Stop Radius : 2.75
 Paraxial Image Height : 1.961977
 Paraxial Magnification : 0
 Entrance Pupil Diameter : 5.5
 Entrance Pupil Position : 0
 Exit Pupil Diameter : 534.5059
 Exit Pupil Position : 1392.092
 Field Type : Angle in degrees
 Maximum Field : 7.8
 Primary Wave : 0.5605
 Lens Units : Millimeters
 Angular Magnification : -0.01028988

Fields : 3

Field Type: Angle in degrees

#	X-Value	Y-Value	Weight
1	0.000000	0.000000	1.000000
2	0.000000	3.900000	1.000000
3	0.000000	7.800000	1.000000

Vignetting Factors

#	VDX	VDY	VCX	VCY	VAN
1	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
2	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
3	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000

Wavelengths : 3

Units: Microns

#	Value	Weight
1	0.478000	1.000000
2	0.560500	1.000000
3	0.643000	1.000000

SURFACE DATA SUMMARY:

Surf	Type	Comment	Radius	Thickness	Glass	Diameter
OBJ	STANDARD		Infinity	Infinity		0
STO	STANDARD		Infinity	7.66		5.5
2	STANDARD	KL 1	Infinity	3	N-BK7	18
3	STANDARD	PCX	-37.22	0		18
4	STANDARD	KL 2	205.03	1.6	N-SF10	18
5	STANDARD	AC	17.64	5.98	N-BAF10	18
6	STANDARD		-26.97	0		18
7	STANDARD	KL 3	26.97	5.98	N-BAF10	18
8	STANDARD	AC	-17.64	1.6	N-SF10	18
9	STANDARD		-205.03	0		18
10	STANDARD	KL 4	37.22	3	N-BK7	18
11	STANDARD	PCX	Infinity	7.35		18
12	STANDARD	DUMMY	Infinity	0		3.92071
IMA	STANDARD		Infinity			3.92071

ABBILDUNG A.5.: Systemdaten für das in Kapitel 4.4.1 beschriebene Kameraokular.

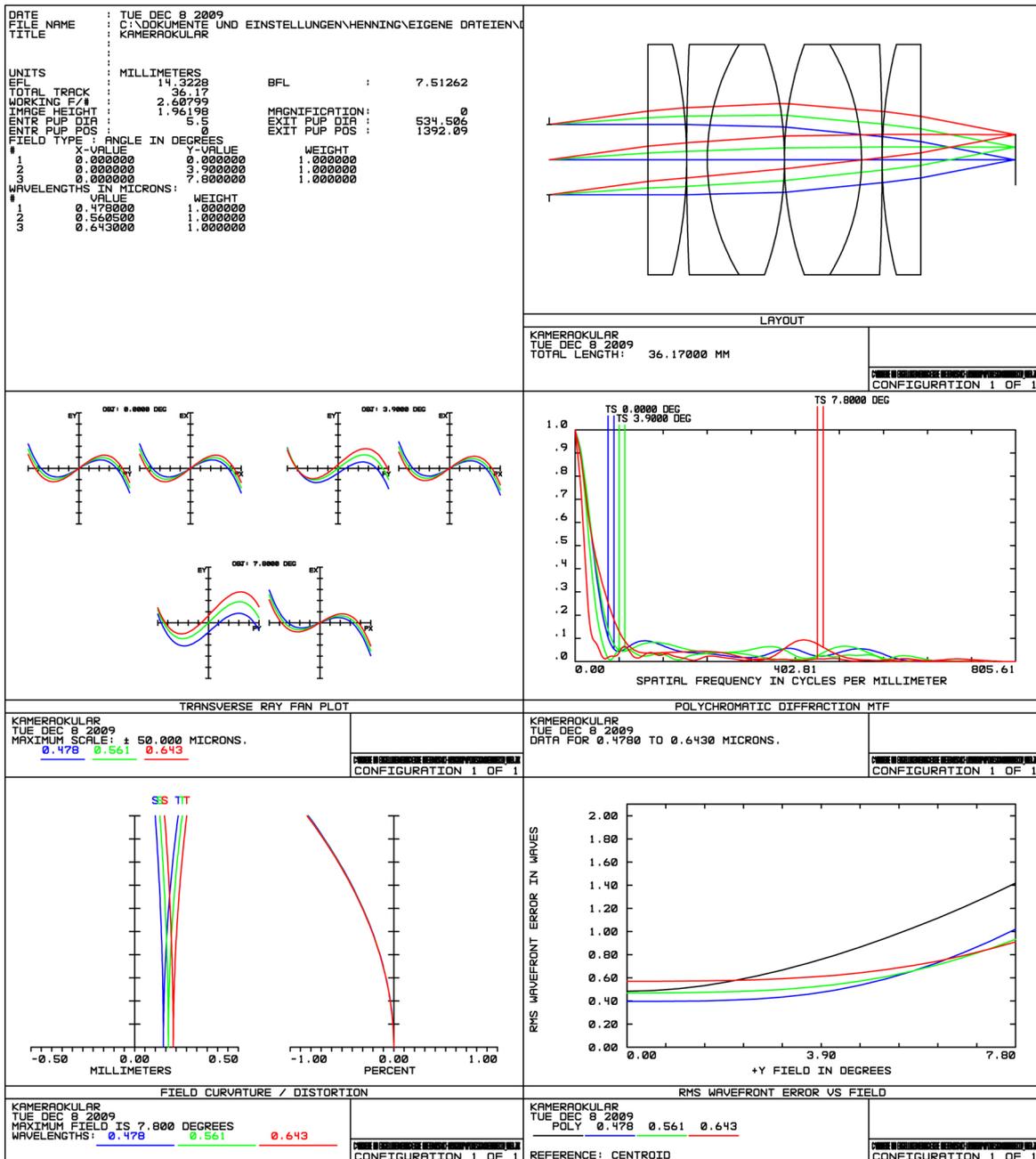


ABBILDUNG A.6.: Verschiedene Analysen für das in Kapitel 4.4.1 beschriebene Kameraokular.

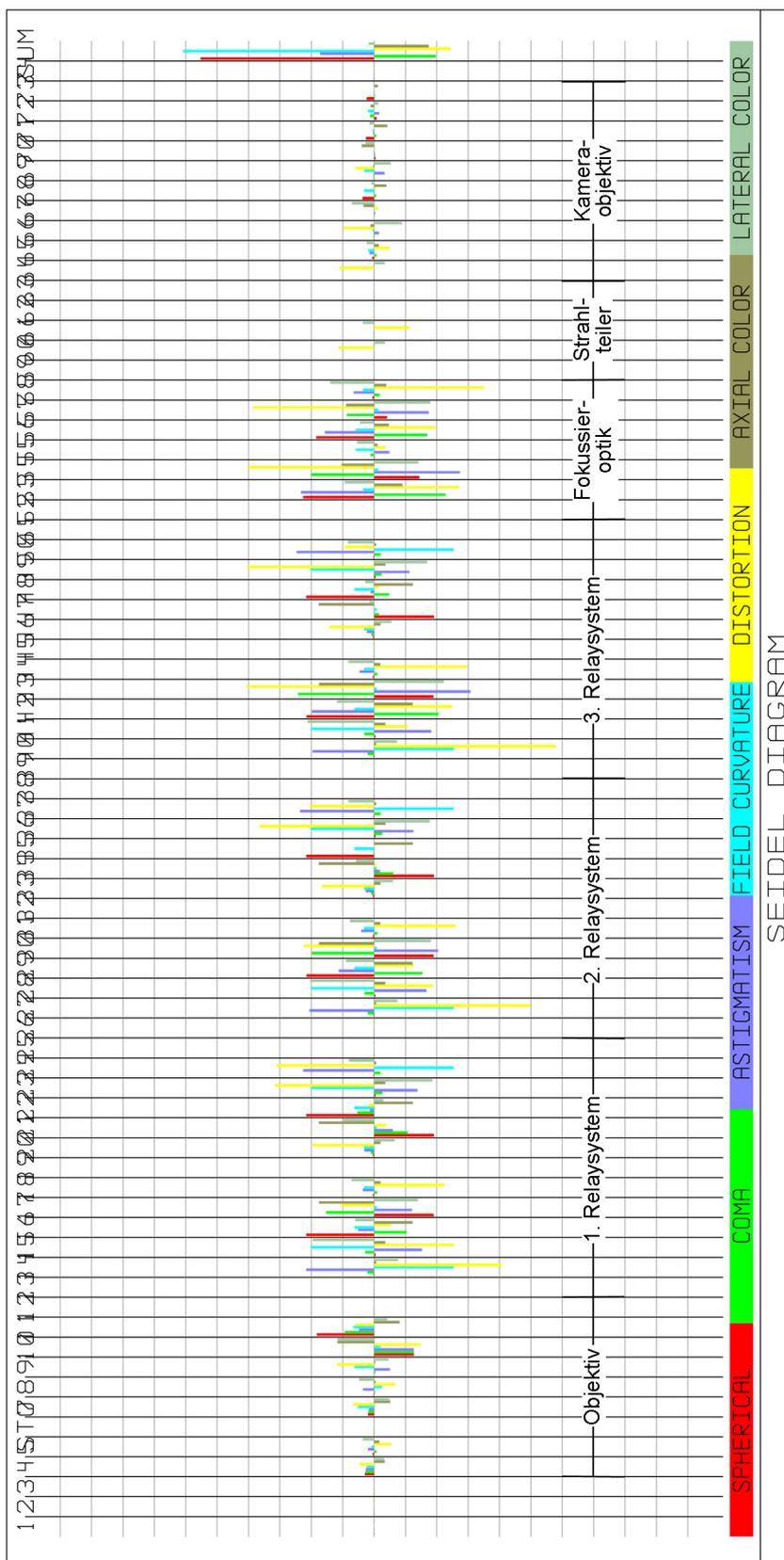


ABBILDUNG A.7.: Seideldiagramm für den Videostrahlengang.

B. Eigene Veröffentlichungen

H. WISWEH, L. MARTINEZ MATEU, M. KRAFT, A. KRÜGER, H. LUBATSCHOWSKI, Automatic segmentation of clinical OCT images for the determination of epithelial thickness changes in laryngeal lesions, *BiOS - Conferences on Biomedical Optics*, Paper 7548C-76, 2010.

H. WISWEH, N. ROHRBECK, A. KRÜGER, M. KRAFT, K. ALEXANDROV, H. LUBATSCHOWSKI, A laryngoscope for office-based imaging of human vocal folds using OCT, *Proceedings of SPIE Vol. 7372*, doi:10.1117/12.831820, 2009.

M. KRAFT, H. GLANZ, S. VON GERLACH, H. WISWEH, H. LUBATSCHOWSKI, C. ARENS, Morphologische Klassifikation des Reinke-Ödems mittels optischer Kohärenztomografie, *Laryngorhinootologie*, doi:10.1055/s-0029-1243169, 2009.

N. ROHRBECK, H. WISWEH, K. ALEXANDROV, H. LUBATSCHOWSKI, Entwicklung eines OCT-gestützten Endoskops zur kontaktfreien Untersuchung von Stimmlippenerkrankungen, *DPG Frühjahrstagung der Sektion AMOP*, Q65.4, 2009.

M. KRAFT, H. GLANZ, S. VON GERLACH, H. WISWEH, H. LUBATSCHOWSKI, C. ARENS, Optische Kohärenztomographie - Stellenwert einer neuen Methode bei der Abklärung unklarer Kehlkopfveränderungen, *HNO*, doi:10.1007/s00106-008-1873-0, 2009.

O. MASSOW, M. JACKSTADT, H. WISWEH, F. WILL, H. LUBATSCHOWSKI, OCT-aided femtosecond laser micromachining device, *Proceedings of SPIE Vol. 7203*, doi:10.1117/12.808754, 2009.

H. WISWEH, U. MERKEL, K. ALEXANDROV, OCT-kontrollierte Mikrochirurgie der Stimmlippe basierend auf fs-Technologie, *Abschlussbericht zum BMBF-Verbund „Sehendes Skalpell“*, 2009.

M. KRAFT, H. GLANZ, S. VON GERLACH, H. WISWEH, H. LUBATSCHOWSKI, C. ARENS, Clinical value of optical coherence tomography in laryngology, *Head Neck*, 30, 1628-1635, 2008.

H. LUBATSCHOWSKI, K. ALEXANDROV, H. WISWEH, Operieren ja/nein - Optikentwicklung soll die Entscheidung sicherer machen, *Laser+Photonik*, 4/2008, 14-15, 2008.

M. KRAFT, S. VON GERLACH, K. ALEXANDROV, H. WISWEH, H. LUBATSCHOWSKI, H. GLANZ, C. ARENS, Significance of optical coherence tomography in the assessment of laryngeal lesions, *Proceedings of SPIE Vol. 6842*, doi:10.1117/12.772822, 2008.

H. WISWEH, U. MERKEL, A.-K. HÜLLER, K. LÜERSSSEN, H. LUBATSCHOWSKI, Optical cohe-

rence tomography monitoring of vocal fold femtosecond laser microsurgery, *Proceedings of SPIE Vol. 6632*, doi:10.1117/12.728139, 2007.

K. LUEERSEN, H. WISWEH, M. PTOK, H. LUBATSCHOWSKI, Optical characterization of vocal folds by OCT-based laryngoscopy, *Proceedings of SPIE Vol. 6424*, doi:10.1117/12.699539, 2007.

H. WISWEH, U. MERKEL, K. LÜERSEN, H. LUBATSCHOWSKI, OCT-kontrollierte Mikrochirurgie an der Stimmlippen, *DPG Frühjahrstagung der Sektion AMOP*, Q20.1, 2007.

H. WISWEH, Aufbau und Charakterisierung eines optischen Kohärenztomographen mit schnellem lateralen Scan, *Diplomarbeit*, Fachhochschule Köln, 2006.

Anmerkung: Ein Teil der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurden aus Prioritätsgründen bereits vorveröffentlicht und sind in der Liste der Veröffentlichungen enthalten.

C. Lebenslauf

Zur Person:

Name: Henning Wisweh
Geburtsdatum: 27. April 1979
Geburtsort: Hannover
Eltern: Erwin Wisweh
Marlies Wisweh geb. Fäseke
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Kinder: keine

Beruflicher Werdegang und Ausbildung:

Beruflicher Werdegang

seit 09/2008 Wissenschaftlicher Mitarbeiter des Laser Zentrum Hannover e.V.
02/2006 bis 08/2008 Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Medizinischen Hochschule Hannover
und Gastwissenschaftler am Laser Zentrum Hannover e.V.

Ausbildung

02/2006 bis 01/2010 Promotion, Laser Zentrum Hannover e.V.
09/2000 bis 01/2006 Studium Photoingenieurwesen, Fachhochschule Köln
Juli 1998 Abitur, Carl-Friedrich-Gauß-Schule Hemmingen

Mitglied in der International Society for Optics and Photonics (SPIE) und Head and Neck Optical Diagnostics Society (HNODS).

Danksagung

Im Folgenden möchte ich all denjenigen danken, die maßgeblich zu einer spannenden, ereignis- und lehrreichen Promotionszeit und natürlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Holger Lubatschowski danke ich für die interessanten und herausfordernden Aufgabenstellungen und für die Betreuung meiner Arbeit. Seine offene, unkomplizierte und optimistische Art - in guten wie in schlechten Zeiten - hat mich immer sehr beeindruckt. Er hat stets für eine freundschaftliche Arbeitsatmosphäre in der Abteilung gesorgt, die für einen großen Teil meiner Motivation verantwortlich war.

Herrn Prof. Dr. Uwe Morgner danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Herrn PD Dr. med. Marcel Kraft möchte ich ganz herzlich für die freundschaftliche Verbindung in die Schweiz danken. Er hat mir durch viele spannende Diskussionen einen umfassenden Einblick in die HNO-Welt verschafft und die Liebe zu den Stimmlippen geweckt.

Ein großer Dank gilt meinen (ehemaligen) Kollegen in der MHH und im LZH. Dr. med. Ulrich Merkel danke ich für die vielen spannenden Stunden im Labor. Seine Kreativität und seine Ausdauer haben entscheidend zum Gelingen der Experimente beigetragen. Ganz besonders möchte ich mich bei Nadine Rohrbeck, Julian Welzel, Laura Martinez Mateu, Anne-Kristin Klockow, Siim Sepman und Melissa Glasser bedanken, die im Rahmen von Diplom- und Projektarbeiten sowie Praktika wichtige Beiträge zu dieser Arbeit geleistet haben. Ohne ihre Ideen, ihren Einsatz und die Unbeschwertheit wäre ich völlig aufgeschmissen gewesen. Mein besonderer Dank gilt außerdem Dr. Alexander Krüger für die vielen Fachgespräche und Denkanstöße. Mich hat vor allem sein kritisches Hinterfragen und seine zielgerichtete Denkweise oft ein großes Stück nach vorn gebracht. Vielen Dank auch an alle anderen Lasermedis und Biophotoniker für die schöne Zeit. Unvergessen bleiben die Dänemark-Fahrten, Weihnachtsfeiern, das Boßeln bei Familie Schomaker, die Baracke, die Konferenzbesuche und viele andere schöne Abende. Danke: Ole Massow, Silvia Schumacher, Cord Arnold, Judith Baumgart, Thomas Block, Micha Fromm, Heiko Meyer, Fabian Will, Alex Heisterkamp, Tammo Ripken, Yesim Dimen (Danke für die Hilfe beim Endspurt!), Markus Schomaker, Kai Küttemeyer, Sabine Donner, Heike Hoffmann, Nadine Tinne, Raoul Lorbeer, Marko Heidrich, Mario Simons, Diego Fernando Ramírez Ojeda, Anja Hansen.

In besonderem Maße möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich immer bedingungslos unterstützt hat. Schön, dass es Euch gibt!

Und für viel Geduld, das „großen Interesse“ an Optik, Mitgefühl und Ermutigung: Danke, Janine!