



Abschließender Sachstandsbericht
Leibniz-Wettbewerb

HYPERAM:
Leibniz-Forschungsnetzwerk für schnelle Weitfeld-Hyperspektral-
Raman-Bildgebung zur *in vivo* Diagnostik und intraoperativen
Analyse von Tumorresektionsrändern

Antragsnummer: SAW-2016-IPHT-2

Berichtszeitraum: 01.06.2016 – 31.05.2020

Federführendes Leibniz-Institut: Leibniz-Institut für Photonische Technologien e.V.

Projektleiter/in:
Prof. Dr. Jürgen Popp

Inhalt

1.	Zielerreichung und Umsetzung der Meilensteine.....	3
2.	Aktivitäten und Hindernisse.....	4
3.	Ergebnisse und Erfolge.....	8
4.	Chancengleichheit.....	8
5.	Qualitätssicherung.....	8
6.	Zusätzliche eigene Ressourcen.....	9
7.	Strukturen und Kooperation.....	9
8.	Ausblick.....	9

1. Zielerreichung und Umsetzung der Meilensteine

Arbeitspaket 1: Weitfeld Raman-Imaging Setup

Zur Implementierung der Nod & Shuffle-Funktion stand aus Vorgängerprojekten ein Weitfeldspektrograf zur Verfügung, der für eine gleichzeitige Erfassung von 400 Bildpunkten ausgelegt ist. Dieser wurde gemäß den Anforderungen im Projekt erweitert und umgerüstet.

Meilenstein 1: Raman-optimiertes IFS-Spektrographensystem für Weitfeld-Raman-Imaging. Wie aus den Ausführungen von AIP in Abschnitt 2 hervorgeht, wurde Meilenstein 1 erreicht.

Arbeitspaket 2: Lasersystementwicklung für die Untergrundsubtraktion

Um die Spezifikationen für Diodenlaser-Lichtquellen bei 785 nm zu erreichen, wurden DBR (distributed Bragg reflector) Trapezlaser entwickelt. Diese Arbeiten beinhalteten die Entwicklung einer vertikalen Schichtstruktur basierend auf einem GaAsP Quantengraben in AlGaAs Wellenleitern und deren Realisierung mittels metallorganischer Gasphasen-Epitaxie. Für Lichtquellen im blauen Spektralbereich standen kommerzielle GaN Laserdioden (Osram PL TB450B) mit ausreichend optischer Leistung zur Verfügung. Aufgrund der spektralen Eigenschaften eigneten sich diese Fabry-Perot- (FP-) Diodenlaser jedoch nicht für die Anwendung als Anregungslichtquelle in der Raman-Spektroskopie und erforderten eine zusätzliche Wellenlängenstabilisierung mittels Aufbauten in externen Kavitäten.

Meilenstein 2: Laser bei 785 nm Emission mit 4 W für Weitfeld Raman-Imaging, Laser mit zwei Wellenlängen bei 457 nm mit 400 mW für Erprobung des SERDS Ansatzes. Wie aus den Ausführungen von FBH in Abschnitt 2 hervorgeht, wurden der Meilenstein 2 erreicht.

Arbeitspaket 3: Datenanalyse

Die vorbehandelten, am AIP aufgenommenen, Weitfeld-Raman-Daten und die am Leibniz-IPHT gemessenen Raman-Mikroskop-Daten wurden mit Hilfe des Open Source Statistikprogramms R ausgewertet. Hierfür wurden die Daten mit Hilfe von Funktionen aus diversen am Leibniz-IPHT entwickelten und/oder frei verfügbaren Softwarepaketen verarbeitet und analysiert.

Meilenstein 3: Konzept von Bildanalyse-Algorithmen und chemometrischen Strategien entwickelt. Wie aus den Ausführungen von IPHT und AIP in Abschnitt 2 hervorgeht, wurde Meilenstein 3 erreicht.

Arbeitspaket 4: Testuntersuchungen

Zuerst wurden Versuche zur SERDS-Bildgebung an einem Raman-Mikrospektrometer des Leibniz-IPHT vorgenommen, um Messparameter und Datenverarbeitungsschritte zu erarbeiten. Testuntersuchungen an Pollen von acht Pflanzengenera verglichen die Klassifikation anhand von SERDS-Spektren, Basislinien-korrigierten Spektren und aus SERDS-Spektren rekonstruierten Spektren.

Der am AIP realisierte Weitfeld-SERDS-Aufbau mit integriertem „*interlaced nod and shuffle*“ bietet die Möglichkeit, mit nur einer Belichtung ein Image aus 400 Spektren und mehreren Wiederholungen von sehr kurzen Belichtungszeiten aufzunehmen. Diese kurzen Aufnahmezeiten konnten mit dem am Leibniz-IPHT verwendeten Laser-System nicht erreicht werden, da der Laser während der gesamten Messdauer die Probe beleuchtete und – nach einem Wechsel der Wellenlänge – der Laser für eine stabile Laserleistung eine halbe Sekunde benötigte. Aus diesem Grund wurde der Zwei-Wellenlängenlaser von FBH nach Übergabe eingesetzt. Die Spezifikationen der Proben – unter anderem tierische *ex vivo*-Modellproben – sind in den Ausführungen von Leibniz-IPHT und AIP in Abschnitt 2 dargestellt.

Meilenstein 4: Evaluierung der Weitfeld-SERDS-Bildgebungsplattform bei *in vivo*-Tierexperimenten. Mit Ausnahme der *in vivo*-Experimente wurde Meilenstein 4 erreicht.

2. Aktivitäten und Hindernisse

Projektpartner AIP:

Das Zusammenspiel von Spektrenaufnahme und dem Hin- und Herschieben der Ladungen ist in Abb. 1 veranschaulicht.

- Zunächst wurde ein neuer CCD-Chip beschafft, der zudem um 90° gedreht eingebaut wurde. Bei einem CCD-Chip ist bauartbedingt eine von außen steuerbare Ladungsverschiebung nur in Richtung oder Gegenrichtung der Ausleseregister möglich. In der Nod & Shuffle-Konfiguration muss die Wellenlängenachse daher parallel zu denjenigen CCD-Chipkanten verlaufen, an denen sich die Ausleseregister befinden. In der ursprünglichen Konfiguration war das nicht der Fall. Für eine 90°-Drehung war der bereits eingebaute CCD-Chip ungeeignet, da er eine spezielle Antireflexbeschichtung besitzt, die sich entlang der ursprünglich vorgesehenen Wellenlängenachse ändert. Nach einer 90°-Drehung hätte der Antireflexverlauf nicht mehr zur Dispersionsrichtung gepasst. Deshalb wies der neu beschaffte CCD-Chip gleicher Bauart eine gleichförmige Antireflexbeschichtung auf. Deren Transmission ist zwar etwas geringer, dafür ist der Chip aber in beliebiger Orientierung einbaubar.
- Um den neuen CCD-Chip in der korrekten Orientierung einbauen zu können, wurde ein neues Kameragehäuse angefertigt.
- Die elektronische Steuereinheit der Kamera wurde so verändert, dass die Ladungen nicht nur komplett ausgelesen, sondern auch um eine bestimmte Anzahl von Pixeln hin- und hergeschoben werden können.
- Die Schnittstelle zum Steuerrechner wurde erweitert. Ladungen können nun computergesteuert um eine bestimmte Pixelzahl hin- und hergeschoben werden.
- Die Bedienoberfläche der Steuersoftware wurde so ergänzt, dass ganze Messserienpakete mit entsprechenden Verschiebungen vorgewählt werden können.
- Um die Laser ein-, aus- und umzuschalten, wurde die Steuereinheit der Kamera zusätzlich um 5 V-Triggerausgänge erweitert. Diese Ausgänge wurden mit den Lasertreibern verbunden.

Projektpartner FBH

Abbildung 2 zeigt ein Schema des lateralen Layouts und einen typischen Aufbau des daraus prozessierten Diodenlasers mit Trapezstruktur. Die Bauelemente beinhalten ein DBR-Gitter zehnter Ordnung mit einer Länge von $L_{\text{DBR}} = 1 \text{ mm}$ als wellenlängenselektiven rückseitigen Resonatorspiegel, einen $2,2 \mu\text{m}$ breiten Rippenwellenleiter (RW) mit einer Länge von $L_{\text{RW}} = 1 \text{ mm}$ als räumlichen Filter zur Gewährleistung einer nahezu beugungsbegrenzten Strahlqualität sowie einer Trapezsektion (TA) mit einer Länge von $L_{\text{TA}} = 2 \text{ mm}$ und einem vollen Winkel von 6° zur Leistungsverstärkung. Die Frontfacette des Diodenlasers wurde mit 0,2% entspiegelt und diente als vorderseitiger Resonatorspiegel. Der Aufbau des Halbleiterlasers erfolgte p-up auf CuW Wärmespreizern auf industrietypischen Haltern (CCP – conduction cooled package) mit einer Grundfläche von $25 \text{ mm} \times 25 \text{ mm}$.

Die erreichten elektro-optischen und spektralen Eigenschaften sind in Abbildung 3 gezeigt. Bei einer Wärmesenktemperatur von 25°C und einem Injektionsstrom von 300 mA in der RW-Sektion setzte der Laserbetrieb bei $0,15 \text{ A}$ in der TA-Sektion ein. Die bei 5 A maximal erreichte optische Leistung beträgt $4,4 \text{ W}$ im Dauerstrichbetrieb bei einer elektro-optischen Effizienz von 44%. Der Anstieg der optischen Leistung betrug $0,9 \text{ W/A}$. Die Darstellung der Emissionsspektren als Funktion des Injektionsstroms in der TA-Sektion zeigt, dass über den gesamten Leistungsbereich ein Laserbetrieb mit schmalbandiger Emission und den für DBR-Laser typischen Modensprüngen erreicht wird. Bei einsetzendem Laserbetrieb beträgt die Emissionswellenlänge $782,50 \text{ nm}$. Durch Joulesche Erwärmung des Bauelementes verschiebt sich diese bei 4 W spektral auf $782,56 \text{ nm}$. Die spektrale Breite der Emission, begrenzt durch die spektrale Auflösung des Spektrometers, liegt mit $< 0,4 \text{ cm}^{-1}$ ($< 0,02 \text{ nm}$) unterhalb der oben genannten Zielspezifikation von 5 cm^{-1} für die Raman-Spektroskopie.

Gemäß der Projektplanung wurde in M26 der Trapezlaser bei 785 nm an den Projektpartner AIP geliefert.

Abbildung 4 zeigt eine Konzeptskizze der im Projekt für SERDS realisierten Zwei-Wellenlängen-Lichtquelle. Zur Kollimation der Laseremissionen der Dioden (1,2) wurden, basierend auf optischen Simulationen, asphärische Linsen (3) mit einer Brennweite von $f = 4,6$ mm und einer numerischen Apertur von $NA = 0,55$ ausgewählt. Die Wellenlängenstabilisierung erfolgte über optisches Feedback von transmittierenden Volumen Bragg Gittern (VBG) (4,5). Die Frontfacetten der FP-Diodenlaser waren für einen Einsatz der Halbleiterbauelemente als Gewinnmedium in einer externen Laserkavität nicht speziell beschichtet. Basierend auf kommerziell verfügbaren Bandpass-Filtern fiel die Wahl der für SERDS geeigneten Gitterwellenlängen dabei auf 457,9 nm und 458,9 nm. Die Beugungseffizienzen der VBGs für ein optisches Feedback betragen 15%. Durch Rotation des FP-Lasers um 90° um die optische Achse konnte mittels eines Prismas (6) und eines polarisationsabhängigen Strahlteilerwürfels (7) eine Überlagerung der beiden Emissionen für die Anwendung erreicht werden. Alle optischen Komponenten wurden mittels unter UV-Licht aushärtendem Kleber auf einer 12 mm x 16 mm AlN Keramik auf einem aus mechanischen Kompatibilitätsgründen eigens angefertigten CCP montiert.

In Abbildung 5 sind exemplarisch die Leistungs- und spektralen Eigenschaften der realisierten Lichtquellen gezeigt. Für beide Wellenlängen werden bei einer Wärmesenktemperatur von 40°C innerhalb der gewählten Injektionsströme optische Leistungen von $P \geq 0,45$ W im Dauerstrichbetrieb erreicht. Der Laserbetrieb setzt bei 0,15 A ein, der Anstieg der optischen Leistung mit dem Strom beträgt 1 W/A. Einzelspektren bei 0,4 W zeigen zentrale Wellenlängen der Emission von 457,74 nm und 458,90 nm, sowie spektrale Halbwertsbreiten von 0,04 nm (FWHM). Diese Eigenschaften entsprechen den oben genannten Zielspezifikationen für eine Anregungslichtquelle für die Raman-Spektroskopie und SERDS.

Gemäß der Projektplanung wurden in M19 und M32 Lichtquellen bei 457 nm an die Projektpartner AIP und IPHT geliefert. Abbildung 6 zeigt Bilder der gemeinsamen Inbetriebnahme beim Projektpartner AIP.

Projektpartner IPHT und AIP:

Die Weitfeld-Raman-Images wurden mit der Software p3D* analysiert, die ursprünglich für astronomische Bilder aus Faser-Weitfeldspektrografen programmiert wurde. Dafür wurden die CCD-Chip Rohdaten zunächst in das „FITS“-Datenformat (Flexible Image Transport System) umgewandelt. Das Open Source Software-Paket† korrigiert die CCD-Chip Rohdaten auf instrumentelle Signaturen, extrahiert die einzelnen Spektren optimal und wandelt diese in einem 3D-Datenkubus-Format um. Im Rahmen des HYPERAM-Projektes wurde diese Software auf den in Arbeitspaket 1 beschriebenen experimentellen Aufbau umgeschrieben. Die Modifikationen betrafen hauptsächlich das 20x20 Faser-Array des Spektrografen und die Umwandlung der Daten in drei Datenkuben – ein Datenkubus pro Laserposition und einen Differenz-Kubus der beiden Laserpositionen. Die Subtraktion erfolgte vor dem Pixel-Resampling, um Wellenlängenauflösung nicht zu verlieren.

Der komplette Datenreduktionsverlauf mit p3d v2.6.2 erfolgte wie folgt:

- Zunächst musste der Bias der CCD herausgefunden werden. Dafür wurden am Anfang des Tages fünf Bias Bilder mit 0 s Belichtungszeit kombiniert.
- Anschließend wurden die Spurprofile der einzelnen Spektren in einem gut ausgeleuchteten Weißlichtbild erkannt und ihre Parameter gespeichert.
- Als nächsten Schritt wurde die Wellenlängenkalibration durchgeführt. Die Linien wurden auf Aufnahmen mit einer Quecksilber-Neon- und einer Argon-Lampe identifiziert und auf Grund einer Linienliste eine Wellenlänge an jeder CCD-Position ausgerechnet.

* Sandin, C.; Becker, T.; Roth, M.M.; Gerssen, J.; Monreal-Ibero, A.; Böhm, P.; Weilbacher, P. p3d: General data-reduction tool for fiber-fed integral-field spectrographs 2012, ascl:1205.002.

† <https://p3d.sourceforge.io/>

- Danach wurde die CCD-Ausleuchtung mit dem Weißlichtbild, dem sogenannten Spektral-Flat, ermittelt.
- Als letzten Schritt wurden nun alle Aufnahmen auf diese instrumentellen Signaturen korrigiert. Die einzelnen Spektren wurden nach ihren Spurenprofilen optimal extrahiert und nach ihrer Faserposition in einem 3D-Datenkubus gespeichert.

Die so vorbehandelten am AIP aufgenommenen Weifeld-Daten und am Leibniz-IPHT gemessenen Raman-Mikroskop-Daten wurden mit Hilfe des Open Source Statistikprogramms R ausgewertet. Hierfür wurden die Daten mit Hilfe von Funktionen aus diversen am Leibniz-IPHT entwickelten und/oder frei verfügbaren Softwarepaketen wie folgt verarbeitet und analysiert:

- Scharfe Signale aufgrund von kosmischer Hintergrundstrahlung wurden entweder mit Hilfe der sog. Fenstermethode oder von Hand entfernt.
- Die Wellenlängenachse wurde mittels der charakteristischen Raman-Banden von Paracetamol kalibriert.
- Falls noch nicht im Vorfeld durch die p3D-Datenextraktion geschehen, wurde die Intensitätsachse mit Hilfe der Weißlichtquelle einer Kalibrierlampe (Raman Calibration Accessory, Kaiser Optical Systems, Inc., USA) kalibriert.
- Unterschiede in der Intensität des Anregungslasers oder das Ausbleichen des Fluoreszenzuntergrundes durch eine vorhergehende Messung können an der gleichen, lokalen Position zu einem Restuntergrund im Differenzspektrum führen. Zu Kompensation wurde zunächst ein Normierungsschritt und später der Nod & Shuffle-Ansatz mit kurzen Messzeiten eingesetzt. Im ersten Fall wurden Differenzspektren vor und nach Normierung (z-score Normierung und Flächennormierung) verglichen. Dabei wurden Differenzen durch Skalierung des zu subtrahierenden Spektrums so optimiert, dass die Fläche unter dem absoluten Differenzspektrum minimal ist.
- Die SERDS-Methode mit zwei Spektren wurde mit der Basislinienkorrektur von Einzelspektren mittels EMSC (engl. extended multiplicative signal correction) verglichen. EMSC basiert auf mehreren Komponenten für die Abschätzung des zu erwartenden Untergrundes: ein konstanter Offset, eine lineare Funktion und einige Funktionen für die Fluoreszenzbeiträge. Als Reinkomponentenspektren wurden Raman-Spektren von Collagen, Protein, Lipid und Knochen verwendet. Die Komponenten wurden an die gemessenen Raman-Spektren angefügt. Die errechneten Koeffizienten wurden mit den Spektren des zu erwartenden Untergrundes multipliziert und von den Rohspektren subtrahiert, um die EMSC-korrigierten Spektren zu erhalten. Eine weitere mathematische Basislinienkorrektur ist SNIP (engl. sensitive nonlinear iterative peak). Diese wurde sowohl verwendet, um gemessene Raman-Spektren als auch rekonstruierte Raman-Spektren zu korrigieren.
- Für die Rekonstruktion der Raman-Spektren aus den Differenzspektren wurden diese durch Aufsummieren der Signale integriert und anschließend basislinienkorrigiert.
- Der Pearson-Korrelationskoeffizient zwischen den Spektren und dem Mittelwertspektrum wurde errechnet. Spektren mit einem Korrelationskoeffizient unter 52 %, z.B. mit einer geringen Intensität, wurden verworfen.
- Für die Segmentierung der Daten wurde die unüberwachte Methode der hierarchischen Clusteranalyse (HCA) oder die überwachte Methode der Hauptkomponentenanalyse mit anschließender linearer Diskriminanzanalyse (PCA-LDA) angewendet. Für die HCA wurden die Spektren normiert, die Pearson-Korrelationsdistanz berechnet und dann wurden die Cluster dem Minimum-Varianz-Kriterium nach Ward folgend vereint. Bei der PCA-LDA diente die PCA zur Reduktion des Rauschens in den Differenzspektren vor der Klassifizierung durch LDA.

Für Testmessungen am Leibniz-IPHT wurde der durchstimmbare Laser DL Pro (Toptica Photonics AG, Gräfelfing, Deutschland) mit einer einstellbaren Wellenlänge im Bereich von 765 nm bis 805 nm über eine Faser in den Verstärker BoosTA pro (Toptica Photonics AG) eingekoppelt. Dadurch konnten Intensitäten von rund 100 mW bei einer Wellenlänge von 785 nm hinter dem Objektiv (40x Vergrößerung; NA = 0.55; Nikon, Japan) erzielt werden. Mit Hilfe eines motorisierten Tisches wurde eine tierische Gewebeprobe vom Schwein mit einer

Schrittweite von 0,5 mm Punkt für Punkt abgescannt, wobei an jedem Punkt Raman-Spektren mit fünf verschiedenen Anregungswellenlängen (784,0 nm / 784,5 nm / 785,0 nm / 785,5 nm / 786,0 nm) aufgenommen wurden. Diese Experimente dienten dazu, den Einfluss der Wellenlängenverschiebung auf das Differenzspektrum einer biologischen Probe zu untersuchen. Durch die Aufnahme von Spektren mit fünf verschiedenen Anregungswellenlängen pro Messpunkt konnten vier Differenzspektren berechnet werden (0,5 nm / 1,0 nm / 1,5 nm / 2,0 nm). Die Belichtungszeit pro Spektrum betrug 1 s. Größere Verschiebungen waren nicht möglich, da aufgrund der im Aufbau integrierten schmalbandigen Laserlinien und Notch-Filter keine Anregungswellenlänge kleiner als 784,0 nm oder größer als 786,0 nm verwendet werden konnte.

Vor den SERDS-Untersuchungen am Leibniz-IPHT wurden die Pollen in destilliertem Wasser suspendiert und auf einem CaF₂-Substrat sedimentiert. Unter Verwendung der Autofokusfunktion und der automatischen Detektion der einzelnen Pollen unter einem Wasserimmersionsobjektiv (60x Vergrößerung; NA = 1,00; Nikon, Japan) wurden diesmal automatisch pro Polle nacheinander drei Raman-Spektren bei drei verschiedenen Anregungswellenlängen (784 nm und 130 mW / 785 nm und 180 mW / 786 nm und 200 mW) und einer Integrationszeit von 0,5 s pro Spektrum gemessen.

Für die SERDS-Messungen mittels *interlaced nod and shuffle* am AIP wurden zum einen ein kommerzieller Nahinfrarot-Laser (LS 2-VBG, Ushio, Tokyo, Japan) mit zwei festen Wellenlängen (784,43 nm / 785,48 nm / 400 mW max. Laserleistung / 200 ms minimale Aufnahmezeit) und zum anderen der in diesem Projekt vom FBH entwickelte blaue Diodenlaser mit ebenfalls zwei festen Wellenlängen (457,74 nm / 458,90 nm / 400 mW max. Laserleistung / 50 ms minimale Aufnahmezeit) eingesetzt.

1. Filtern von Raumlicht mit Probe 1: Für den Einsatz der Raman-Bildgebung in einem klinischen Umfeld sollten Raman-Messungen bei angeschaltetem Raumlicht möglich sein. Da jedoch Raumlichtbanden in einem Raman-Spektrum die Analyse des Spektrums erschweren und zu einer Sättigung des Detektors führen können, sollte gezeigt werden, dass die Aufnahme und Analyse eines SERDS-Bildes sogar bei direktem Licht auf den Probenkopf möglich ist. Hierfür wurden eine Paracetamol- und eine Aspirin-tablette auf einem Probenkopf mit einem Bildfeld von 1 cm² platziert, wobei die beiden Tabletten den Probenkopf nicht vollständig bedeckten. Anschließend wurden mit Hilfe des NIR-Lasers ein SERDS-Bild mit einer Aufnahmezeit von 200 ms pro Wellenlänge und 200 Akkumulationen aufgenommen. Eine Sekunde nach Beginn der Messung wurde das Raumlicht für 3 s eingeschaltet.
2. Demonstration der räumlichen Auflösung mit Probe 2: Kügelchen mit einem wohl definierten Durchmesser bestehend aus Polymethylmethacrylat (PMMA, Ø = 120 µm) und Polystyrol (PS, Ø = 50 µm) wurden auf ein CaF₂ Fenster gegeben, welches auf dem Probenkopf mit einem Bildfeld von 0,02 cm² platziert wurde. Ein SERDS-Bild wurde mit dem blauen Laser mit einer Aufnahmezeit von 100 ms pro Wellenlänge mit 40 Akkumulationen aufgenommen.
3. Kompensation von Fotobleichen mit Probe 3: Um den Vorteil zu demonstrieren, der durch die Verwendung sehr kurzer Messintervalle in der SERDS-Bildgebung erzielt werden kann, wurde eine lipidhaltige Gewebeprobe vom Schwein erst mit einer Aufnahmezeit von 50 ms pro Wellenlänge bei 40 Akkumulationen gemessen. Anschließend wurde ein SERDS-Bild an der gleichen Position aufgenommen, wobei die Aufnahmezeit 2 s pro Wellenlänge des blauen Lasers bei nur einer Akkumulation betrug. Für beide Messungen war folglich die Gesamtintegrationszeit identisch.
4. Medizinisches Modell in Form von heterogenem Gewebe mit Probe 4: Heterogenes Schweinegewebe wurde auf ein CaF₂-Fenster platziert und ein SERDS-Bild mit einem Bildfeld von 0,02 cm² aufgenommen. Die Aufnahmezeit betrug 50 ms pro Wellenlänge des blauen Lasers mit 40 Akkumulationen.

3. Ergebnisse und Erfolge

Am 30.11.2018 wurde beim Deutschen Patent- und Markenamt ein gemeinsamer Patentantrag „Bildgebende SERDS-Ramanspektroskopie mit Nod and Shuffle-Technik“ eingereicht. (Antragsnummer DE 10 2018 130 582 A1). Vertreten werden die Projektpartner durch die Patentanwaltskanzlei Gulde & Partner, Wallstr. 58/59, 10179 Berlin.

- 30.09.2019 erster Prüfbescheid mit Entgegenhaltungen.
- 27.11.2019 Veranlassung einer Europäischen Nachanmeldung, die am 03.06.2020 unter EP 3 660 474 veröffentlicht wurde.
- 03.06.2020 Recherchebericht mit erneuten Entgegenhaltungen.
- 30.09.2020 Fertigstellung der Erwiderung.

Dissertation Florian Korinth: „Raman-Differenz-Spektroskopie mit zwei verschiedenen Anregungswellenlängen zur untergrundfreien und bildgebenden Untersuchung von biologischen Proben“ (eingereicht an FSU Jena am 26.11.2020, Abschluss am 09.06.2021).

Wissenschaftliche Veröffentlichungen:

- [1] E. Cordero, F. Korinth, C. Stiebing, C. Krafft, I.W. Schie, J. Popp “Evaluation of Shifted Excitation Raman Difference Spectroscopy and Comparison to Computational Background Correction Methods Applied to Biochemical Raman Spectra.” *Sensors* 2017, DOI: 10.3390/s17081724 (open access)
- [2] B. Sumpf, A. Müller, M. Maiwald “Tailored diode lasers - enabling Raman spectroscopy in the presence of disturbing fluorescence and background light” *Proc. SPIE* 10894, 1089411-1 (2019), DOI 10.1117/12.2507425
- [3] E. Schmäzlin, T. Urrutia, F. Korinth, C. Stiebing, C. Krafft, J. Popp, M.M. Roth “Bildgebende Differenz-Raman-Spektroskopie mit *Nod and Shuffle*-Technik”. *AMA Proceedings 14. Dresdner Sensor Symposium 2019*, DOI 10.5162/14dss2019/6.4
- [4] F. Korinth, A.S. Mondol, C. Stiebing, I.W. Schie, C. Krafft, J. Popp “New Methodology to Process Shifted Excitation Raman Difference Scattering Data: A Case Study of Pollen Classification” *Scientific Reports* 2020, DOI 10.1038/s41598-020-67897-4 (open access)
- [5] F. Korinth, E. Schmäzlin, C. Stiebing, T. Urrutia, G. Micheva, C. Sandin, A. Müller, M. Maiwald, B. Sumpf, C. Krafft, G. Tränkle, M.M. Roth, J. Popp “Wide Field Spectral Imaging with Shifted Excitation Raman Difference Spectroscopy Using the Nod and Shuffle Technique” *Sensors* 2020, DOI 10.3390/s20236723 (open access)

Die Ergebnisse des Vorhabens werden ebenfalls im Leibniz-IPHT Jahresbericht vorgestellt und veröffentlicht.

4. Chancengleichheit

Nach Ausschreibung und Durchführung des Bewerbungsverfahrens eines wissenschaftlichen Mitarbeiters (m, w, d) am Leibniz-IPHT wurde die Stelle mit Dr. Clara Stiebing besetzt.

5. Qualitätssicherung

Die Schlüsselpublikationen sind als Open Access öffentlich verfügbar. Entsprechend den DFG Richtlinien werden die Daten, die Grundlage der Publikationen sind, für eine interne Nachnutzung auf Servern gespeichert. Eine externe Verfügbarmachung ist nicht vorgesehen.

6. Zusätzliche eigene Ressourcen

Die Projektleiter Dr. Martin Maiwald (FBH) und Dr. Christoph Krafft (IPHT) wurden nicht über das Projekt, sondern über Haushaltsmittel finanziert. Weiterhin wurden ein vorhandener durchstimmbarer Laser mit einem Laserverstärker am Leibniz-IPHT für Raman-Experimente eingesetzt. Zur Implementierung der Nod & Shuffle-Funktion stand am AIP aus Vorgängerprojekten ein Weitfeldspektrograf zur Verfügung.

7. Strukturen und Kooperation

Im Zusammenhang mit der Datenauswertung wurde mit Christer Sandin (Sandin Advanced Visualization, Tylögränd 14, 12156 Johanneshov, Sweden) kooperiert, um die Datenreduktionssoftware zu aktualisieren.

8. Ausblick

Die Weitfeld-SERDS-Bildgebung mit integrierter „interlaced nod&shuffle“ Technik und einem schnell, schaltenden Lasersystem ist im hohen Maße dazu geeignet, in einem klinischen Umfeld angewendet zu werden. Durch die SERDS-Technik könnte das Raumlicht während der Messung angeschaltet bleiben, da es – sofern es nicht direkt auf den Probenkopf fällt und so keine Detektorsättigung zu befürchten ist – aus den Differenzspektren herausgefiltert wird. Durch die Akkumulation kurzer Aufnahmezeiten würde das Fotobleichen kompensiert werden, wodurch eine Normierung der Raman-Spektren vor der Differenzbildung und damit der Berechnung der Differenzspektren entfiel. Eine direkte Klassifikation basierend auf den SERDS-Daten würde eine schnelle Zuordnung und Analyse der Messdaten ermöglichen, was eine rasche Diagnostik in einem klinischen Umfeld unterstützt. Damit würden wesentliche Einschränkungen der Raman-basierten Bildgebung wie hoher Untergrund durch Autofluoreszenz und Umgebungslicht, Ausbleichen aufgrund intensiver Laseranregung sowie lange Messzeiten überwunden und weitere Anwendungen könnten in den Gesundheits- und Umwelttechnologien erschlossen werden.



Anhänge zum Sachstandsbericht
Leibniz-Wettbewerb

HYPERAM:
Leibniz-Forschungsnetzwerk für schnelle Weitfeld-Hyperspektral-
Raman-Bildgebung zur *in vivo* Diagnostik und intraoperativen
Analyse von Tumorsektionsrändern

Antragsnummer: SAW-2016-IPHT-2

Berichtszeitraum: 01.06.2016 – 31.05.2020

Federführendes Leibniz-Institut: Leibniz-Institut für Photonische Technologien e.V.

Projektleiter/in:
Prof. Dr. Jürgen Popp

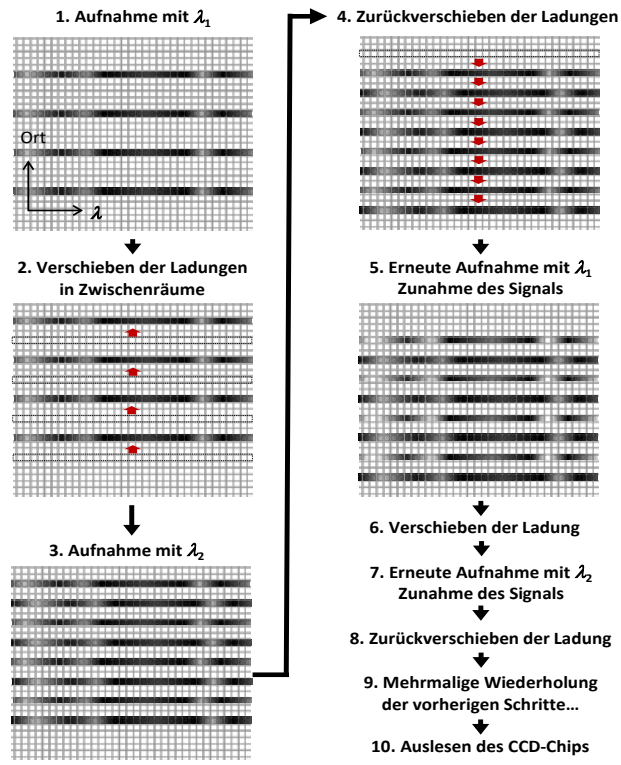


Abbildung 1: Funktionsweise von bildgebendem SERDS mit „interlaced Nod & Shuffle“. Die karierten Hintergründe deuten einen CCD-Chip mit seinen Pixeln an. Exemplarisch sind die spektralen Signalspuren von vier Bildpunkten (der verwendete Spektrografenaufbau kann tatsächlich 400 Bildpunkte gleichzeitig erfassen) als waagrechte Streifen dargestellt. Helle Stellen bedeuten Signal, d.h. Ladung aufgrund von Raman-Banden. λ_1 und λ_2 sind die beiden Anregungswellenlängen. Da sich die Raman-Banden mit der Anregungswellenlänge verschieben, sind auch die hellen Stellen entlang der Wellenlängenachse verschoben.

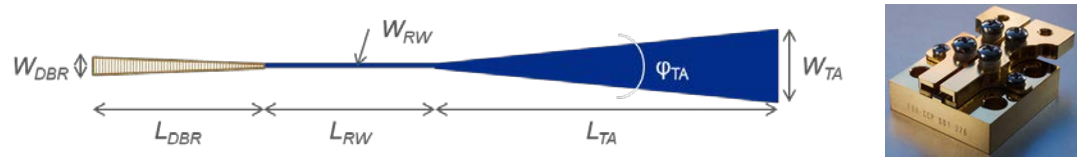


Abbildung 2: Schema eines lateralen Layouts (links) und typischer Aufbau der 785 nm DBR Trapezlaser auf einem CCP-Träger (rechts).

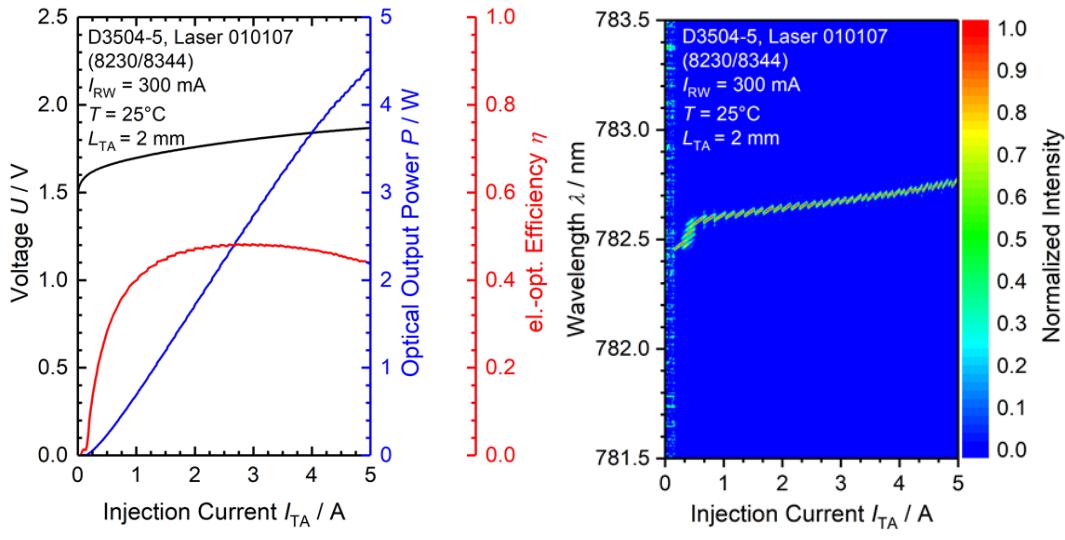


Abbildung 3: Elektro-optische (links) und spektrale Eigenschaften (rechts) eines 785 nm DBR Trapezlasers als Funktion des Injektionsstroms in der TA Sektion.

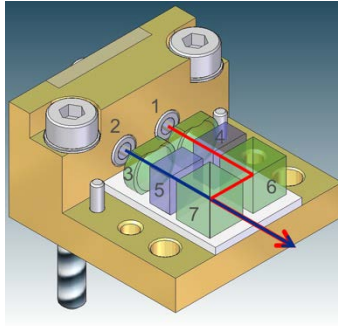


Abbildung 4: Prinzipskizze einer 457 nm Zwei-Wellenlängen Lichtquelle für SERDS

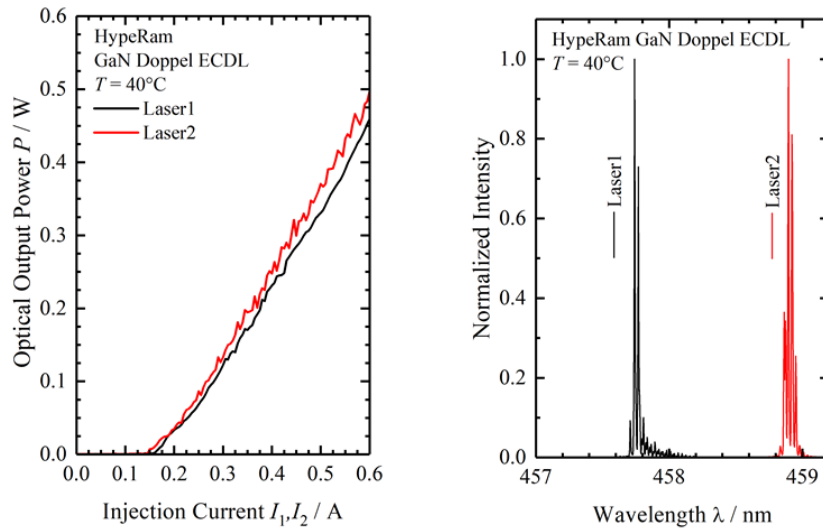


Abbildung 5: Leistungskennlinien (links) und Emissionsspektren bei 0.4 W (rechts) einer 457 nm Zwei-Wellenlängen Lichtquelle.

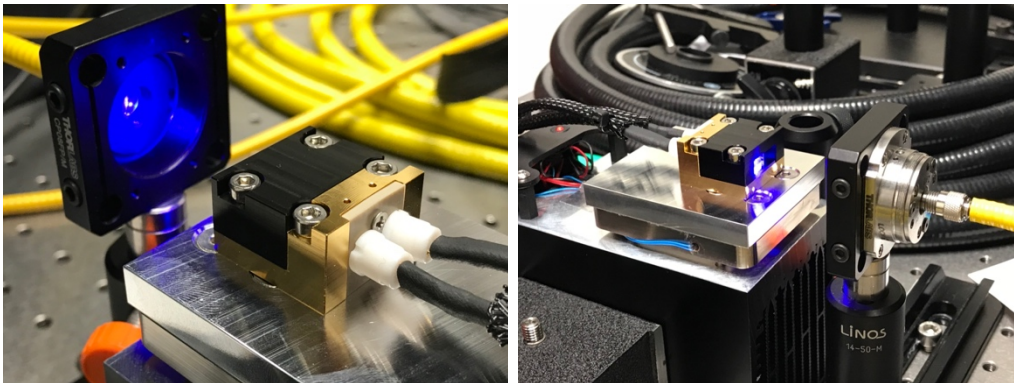


Abbildung 6: Gemeinsame Inbetriebnahme einer 457 nm Zwei-Wellenlängen-Lichtquelle beim Projektpartner AIP.

Tabelle 2: Proben und Parameter für SERDS-Testmessungen mit Nod & Shuffle

Nr.	Probe	Laser (λ_1 / λ_2) [nm]	Intensität [W/mm ²]	SERDS-Bildfeld [cm ²]	Aufnahmezeit x Anzahl an Akkumulationen
1	Aspirin / Paracetamol	784,43/785,48	0,004	1	200 x 200 ms
2	Polystyrol / Polymethylmethacrylat	457,74/458,90	0,1	0,02	40 x 100 ms
3	Lipidhaltiges Gewebe	457,74/458,90	0,2	0,02	40 x 50 ms und 1 x 2000 ms
4	Gewebeprobe	457,74/458,90	0,2	0,02	40 x 50 ms