

# Doppelbelichtungsinterferometrie in mikroskopischen Dimensionen auf Basis photorefraktiver Kristalle\*

Rainer Thien, Gerrit Borstel, Björn Kemper, Gert von Bally

Labor für Biophysik, Universitätsklinikum Münster  
Robert-Koch-Straße 45, 48149 Münster

ThienR@Uni-Muenster.de

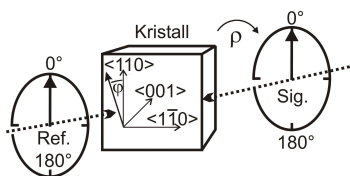
Es wurde ein holographisches Doppelbelichtungsinterferometer basierend auf einem photorefraktiven Kristall zur Untersuchung von Zellen und biologischem Gewebe realisiert. Der Kristall erlaubt die reversible Speicherung sowie das gleichzeitige Auslesen von Hologrammen mehrerer Objektzustände. Die Auswertung der auf diese Weise rekonstruierten Doppelbelichtungsinterferogramme erfolgt mit einem räumlichen Phasenschiebverfahren.

## 1 Einführung

Für die Realisierung eines holographischen Doppelbelichtungsinterferometers zur Untersuchung von Gewebe und Zellen ist eine laterale Auflösung erforderlich, die mittels Mikroskopoptiken erzielt werden kann. Hierzu ist zudem eine Anordnung in Reflexionsgeometrie von prinzipiellen Vorteil. In Verbindung mit Laserpulsen im ns-Bereich können überdies schnelle Bewegungsvorgänge erfasst werden [1]. Mit einem gütegeschalteten Nd:YAG-Laser wurden unter Einsatz eines Mikroskopobjektivs Doppelbelichtungsinterferogramme von biologischen Proben in einem undotierten BTO-Kristall ( $\text{Bi}_{12}\text{TiO}_{20}$ ) zusammen mit einem angepassten räumlichen Trägerstreifensystem eingespeichert und die Phasendifferenzen aufgrund von Objektveränderungen mittels räumlichen Phasenschiebens in den rekonstruierten Bildern bestimmt.

## 2 Photorefraktiver BTO-Kristall

Als photorefraktives Aufzeichnungsmaterial wird undotiertes BTO eingesetzt ( $\text{Bi}_{12}\text{TiO}_{20}$ , Hersteller Nanocorp, Joensuu, Finnland, nominell rein,  $2,4 \times 14,2 \times 12,3 \text{ mm}^3$ ,  $[001] \times [110] \times [1\bar{1}0]$ , max. Beugungswirkungsgrad  $\eta = 0,5 \%$ , effektive Störstellendichte  $N_{\text{eff}} = 8,5 \times 10^{16} \text{ cm}^{-3}$  [2]). Abb. 1 zeigt schematisch die Kristallorientierung bezüglich der Polarisation der Schreibstrahlen in Reflexionsgeometrie.



**Abb. 1** Orientierung der Polarisation bezüglich der Kristallachsen für Reflexionsgeometrie. Der Verzicht auf eine Verkippung der Polarisation gegenüber der  $\langle 110 \rangle$ -Achse zur Kompensation der optischen Aktivität von  $\rho = 10,2^\circ/\text{mm}$  führt zu keiner detektierbaren Minderung der Interferogrammqualität.

## Vorteile von undotiertem BTO

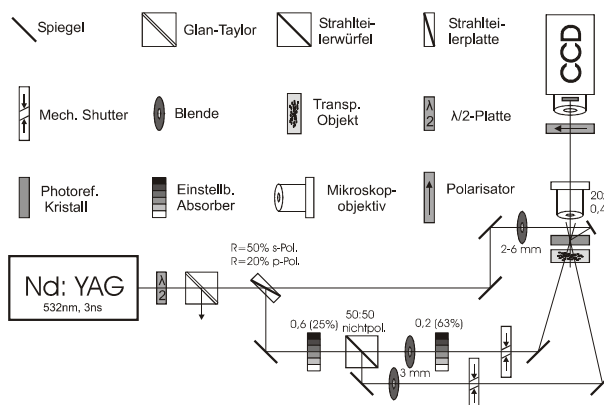
- + Hohe Beugungswirkungsgrade in Reflexionsgeometrie
- + Kurze Antwortzeiten  $\rightarrow$  Aufzeichnung mit Videowiederholrate
- + Hohe Störstellendichte  $N_{\text{eff}}$
- + Geringe optische Aktivität
- + Anisotrope Beugung  $\rightarrow$  Verbessertes Signal-zu-Rausch-Verhältnis im rekonstruierten Bild

## Vorteile der Reflexionsgeometrie

- + Großes Raumfrequenzspektrum  $\rightarrow$  höhere erreichbare Auflösung
- + Geringer Abstand zum Objekt  $\rightarrow$  größere Lichtausbeute  $\rightarrow$  geringere Antwortzeiten

## 3 Versuchsanordnung

Das holographische Doppelbelichtungsinterferometer in Reflexionsgeometrie wird auf Basis eines frequenzverdoppelten Nd:YAG-Lasers mit 3 ns Pulsdauer und 90 cm Pulslänge aufgebaut (siehe Abb. 2). Die Absorber dienen der Optimierung der Intensitätsverhältnisse von Objekt- und Referenzwelle. Der Aufzeichnungsvorgang selbst wird durch einen PC gesteuert.

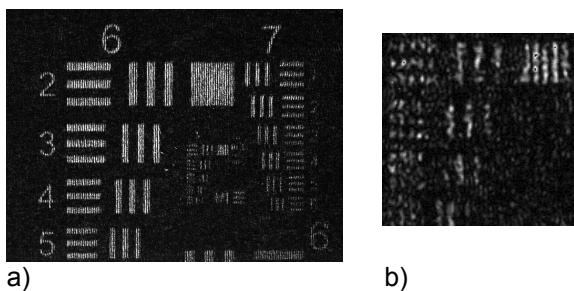


**Abb. 2** Aufbau zur mikroskopischen holographischen Doppelbelichtungsinterferometrie

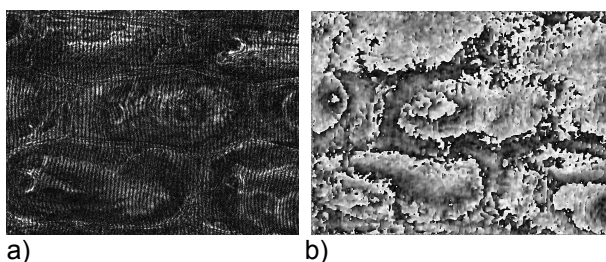
#### 4 Räumliches Phasenschieben

Die Differenzphase wird durch einen variablen 3-Schritt-Algorithmus aus nur einer einzigen Doppelbelichtungsinterferogrammaufnahme ermittelt. Die zur Detektion der Bewegungsrichtung generierte Trägerfrequenz wird einmalig bei einer separaten Doppelbelichtung ohne Objekt bestimmt und bei der Differenzphasenbestimmung jeweils die Phasensprünge.

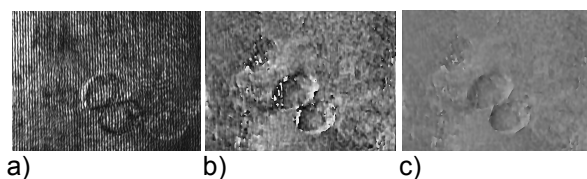
#### 5 Ergebnisse



**Abb. 3** a) Rekonstruiertes Doppelbelichtungsinterferogramm eines USAF 1951-Testtargets mit Trägerstreifen (20-fach Mikroskopobjektiv) mit Ausschnitt b). Die Gruppe 8.3  $\rightarrow$  1,5  $\mu\text{m}$  wird aufgelöst.



**Abb. 4** a) Rekonstruiertes Doppelbelichtungsinterferogramm eines trocknenden Zwiebelhäutchens ( $I_{\text{Ref}} = 2,4 \text{ mJ/cm}^2$ ,  $I_{\text{Sig}} = 0,3 \text{ mJ/cm}^2$ , Doppelbelichtungsabstand 45 s). b) zeigt die zugehörige Differenzphasenverteilung.



**Abb. 5** a) Doppelbelichtungsinterferogramm einer Migrationsbewegung tumoröser Leberzellen (40x Immersionsmikroskopobjektiv). Bei dieser Anordnung wurden mit einem cw-Laser unter Einsatz einer Pockels-Zelle Pulse von ms-Länge erzeugt. Aufgrund des Immersionsobjektivs wurde der Kristall hierbei hinter dem Objektiv positioniert (Pulsdauer Objektzustand I: 4 ms, Pulsdauer Objektzustand II: 2 ms. Intensitäten:  $I_{\text{Ref}} = 35 \text{ mW}$ ,  $I_{\text{Obj}} = 5 \text{ mW}$ , Strahldurchmesser: 0,7 mm, Doppelbelichtungsabstand 3 s). b) und c) zeigen die zugehörige Differenzphasenverteilung sowie das entfaltete Differenzphasenbild.

Abb. 3 a) und der Ausschnitt 3 b) zeigen die erreichbare laterale Auflösung im rekonstruierten Doppelbelichtungsinterferogramm.

Abb. 4. und 5. demonstrieren die Anwendbarkeit des Verfahrens an biologischen Proben. 4 a) zeigt das rekonstruierte Bild eines trocknenden Zwiebelhäutchens bei einem zeitlichen Abstand zwischen den aufgezeichneten Einzelhologrammen zweier Objektzustände von 45 s mit dem zugehörigen Differenzphasenbild mod  $2\pi$  (3 b)).

Abb. 5 a) bis c) zeigt das rekonstruierte Doppelbelichtungsinterferogramm, die zugehörige Differenzphasenverteilung sowie das entfaltete Differenzphasenbild tumoröser Leberzellen (Größe der Zellen ca. 10  $\mu\text{m}$ ). Es wird eine geringe Verformung aufgrund einer Migrationsbewegung innerhalb des Doppelbelichtungsabstandes von 3 s detektiert.

#### 6 Diskussion

1. Mit dem vorgestellten Doppelbelichtungsinterferometer können laterale Strukturen in Interferogrammen im Bereich 1,5  $\mu\text{m}$  mit für die weitere Auswertung ausreichendem Kontrast rekonstruiert werden.
2. Objektveränderungen, die Auswirkungen auf die optische Weglänge haben, können detektiert und ausgewertet werden.
3. Doppelbelichtungsinterferometrie in mikroskopischen Dimensionen an biologischen Objekten ist möglich.
4. Das räumliche Phasenschiebungsverfahren ermöglicht die Differenzphasenberechnung aus nur einem einzigen Interferogramm.
5. Bezüglich der Interferogrammwiederholrate ist nicht der Kristall, sondern die Bildaufnahmezeit der eingesetzten Kamera der limitierende Faktor. Kristallabhängig sind prinzipiell Interferogrammraten in der Größenordnung 1000 Hz realisierbar.
6. Ein kostengünstiger Aufbau auf Basis eines cw-Lasers und mittels mechanischen Shuttern oder Pockelszelle generierten Pulsen ist möglich.

#### 7 Literatur

- [1] M. Weber, F. Rickermann, G. von Bally, *Realization of a Double-Exposure Interferometer with Photorefractive Crystals for Biomedical Applications*. In *Optics and Lasers in Biomedicine and Culture*, Hrsg. C. Fotakis, T. G. Papazoglou, C. Kalpouzos, S. 312-315, Springer Verlag, Berlin 1999.
- [2] M. Weber, *Photorefraktive Kristalle in Reflexionsgeometrie und Phasenschiebungsverfahren für die holographische Interferometrie im sichtbaren und nahen IR-Bereich*, Dissertation, Shaker Verlag, 2002.

\* Die Arbeiten wurden durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung BMBF (FKZ 13N8183) gefördert.