

Anwendung zeitlicher Phasenschiebeverfahren in einem LED-basierten kurzkohärenten digitalholographischen Mikroskop

C. Remmersmann*, B. Kemper*, P. Langehanenberg*, S. Stürwald*, C. Denz**, G. von Bally*

*Labor für Biophysik, **Institut für Angewandte Physik, Universität Münster

remmersmann@uni-muenster.de

Das Rauschen lasererzeugter Interferenzstreifensysteme, wie sie in der digitalholographischen Mikroskopie Verwendung finden, hängt von im Aufbau auftretenden Mehrfachreflexionen ab. Um dieses zu reduzieren, werden Leuchtdioden als Lichtquellen erprobt und die Anwendbarkeit für biologische Zellen demonstriert.

1 Einleitung

Die digitalholographische Mikroskopie ermöglicht die numerische Rekonstruktion des von einer Probe ausgehenden Wellenfeldes in Phase und Amplitude. Sie ist geeignet für eine quantitative, minimal-invasive, zerstörungsfreie Untersuchung von Phasenobjekten wie z. B. biologischen Zellen [1]. Es soll überprüft werden, ob der Einsatz von LEDs als Lichtquelle zu einer Steigerung der Bildqualität beiträgt. Die Kohärenzlänge von LEDs im μm -Bereich reduziert Bildrauschen in Folge von Mehrfachreflexionen, begrenzt jedoch die maximale Zahl der Interferenzstreifen im Hologramm, so dass die Anwendung von räumlichen Phasenschiebeverfahren, wie sie in [1] eingesetzt werden, problematisch ist. Daher werden zeitliche Phasenschiebeverfahren eingesetzt.

2 Grundlagen

Die Erprobung einer LED ($\lambda=624\text{ nm}$, $\Delta\lambda=16,0\text{ nm}$) als Lichtquelle in der digitalholographischen Mikroskopie erfolgt mit einem Mach-Zehnder-Interferometer entsprechend Abb. 1. Im Objektpfad befinden sich eine Mikroskopoptik und die Probe. Die Interferogramme von Objekt- und Referenzwelle werden bei unterschiedlicher, mittels eines Piezotranslators (P) variiert Referenzwellenphasenlage mit einer CCD-Kamera aufgezeichnet.

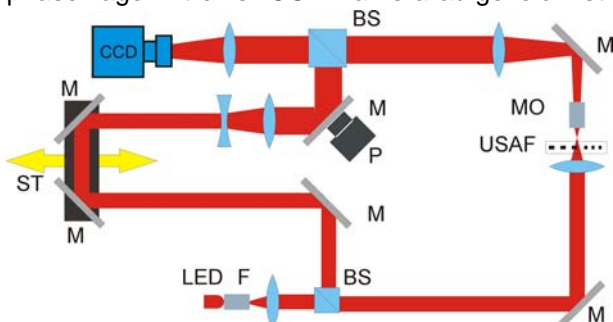


Abb. 1: Digitalholographischer Mikroskopieaufbau; F: Raumfrequenzfilter, BS: Strahlteiler, M: Spiegel, P: Piezotranslator, USAF: USAF-1951-Auflösungstestchart, MO: Mikroskopoptik, ST: Schiebepöhne

Aus den Aufnahmen wird anschließend unter Verwendung eines variablen Drei-Schritt-Algorithmus [2], aus je drei Hologrammen die komplexe Objektwelle berechnet. Ist die Abbildung in der Ebene des CCD-Sensors unscharf, so kann die zugehörige elektrische Feldstärkeverteilung mit Hilfe der Faltungsmethode [1] numerisch in eine Abbildungsebene propagiert werden.

3 Ergebnisse

Zunächst wird mit dem in Abb. 1 beschriebenen Experimental Aufbau die Rekonstruierbarkeit einer Objektwelle des Testcharts in Abhängigkeit von der optischen Weglängendifferenz zwischen Objekt- und Referenzwelle Δz untersucht. Hierzu erfolgt mit Hilfe einer Schiebepöhne (ST) die Veränderung der Länge des Referenzarms in Schritten von $2\ \mu\text{m}$.

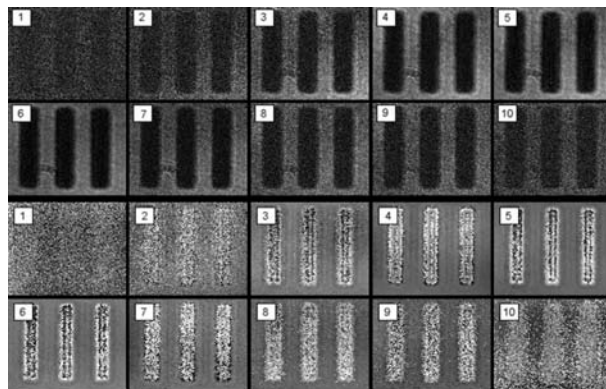


Abb. 2: Digitalholographisch rekonstruierte Amplituden (oben) und Phasenverteilung (unten) eines Ausschnitts eines USAF-1951 Testcharts bei unterschiedlicher Weglängendifferenz zwischen Objekt- und Referenzarm Δz .

Abb. 2 zeigt Ausschnitte der rekonstruierten Phasenverteilungen. Von Ausschnitt 1 bis 5 nimmt das Rauschen ab, bei den Ausschnitten 6 bis 10 wieder zu. Das Auftragen der Modulation der zu den Phasenbildern in Abb. 2. gehörigen Hologramme in Abhängigkeit von Δz führt zur in Abb. 3 gezeigten Normalverteilung. Diese ist gegenüber der theoretisch zu erwartenden Verteilung verbreitert (gestri-

chelte Linie). Erklärbar ist dies durch Dispersion in den im Interferometer verwendeten Glasbauteilen.

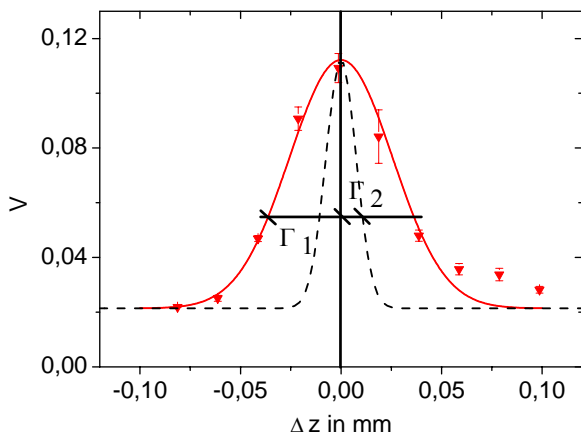


Abb. 3: Hologrammkontrast V in Abhängigkeit von der optischen Weglängendifferenz zwischen Objekt- und Referenzarm Δz . (durchgezogene Linie: an Messwerte angepasste Gausverteilung, gestrichelte Linie: Erwartung aufgrund der Kohärenzlänge)

Als nächstes wird das Rauschen σ der rekonstruierten Objektphase untersucht. Dieses wird definiert als die mittlere Abweichung der gemessenen Phasenverteilung $\phi^*(n,m)$ von der tatsächlichen Phase $\phi(n,m)$. Da die tatsächlichen Phasenwerte nicht bekannt sind, wird die Bestimmung des Rauschens an einem Probenbereich ohne Strukturen durchgeführt und $\phi(n,m)$ durch Glättung auf einem 20×20 Pixel großen Gebiet approximiert.

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{NM-1} \sum_{n=1}^N \sum_{m=1}^M (\phi(n,m) - \phi^*(n,m))^2}$$

(1) Die Anwendung des Rauschquantifizierungsalgorithmus Gl. (1) auf die in der vorherigen Messung bestimmten Phasenverteilungen führt auf die Ergebnisse für σ , die in Abb. 4 gegen die optische Weglängendifferenz Δz aufgetragen sind.

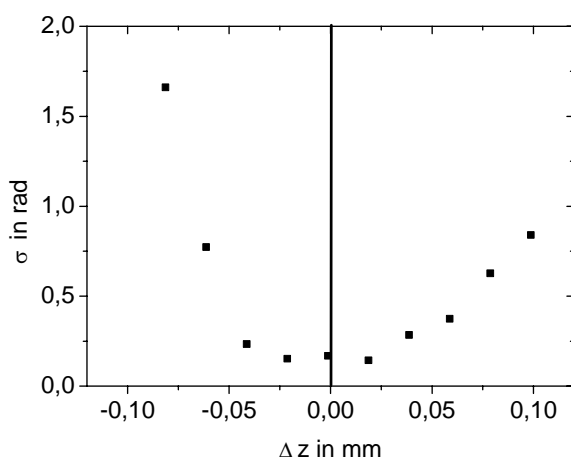


Abb. 4: Phasenrauschen σ in Abhängigkeit von der optischen Weglängendifferenz zwischen Objekt und Referenzarm Δz .

Das minimale Rauschen wird erwartungsgemäß beim vollständigen Abgleich der optischen Weglängen der Interferometerarme erreicht und beträgt $\sigma = 0,14$ rad. Bis zu einer Weglängendifferenz von $\Delta z = \pm 0,025$ mm ist das Rauschen nahezu konstant. Die Größe des Intervalls entspricht ungefähr der dreifachen Kohärenzlänge der Lichtquelle.

Abschließend wird eine LED basierte digitalholographische Untersuchung an fixierten Bauspeicheldrüsen-Tumorzellen durchgeführt. Die entfaltete Objektphase wird rekonstruiert und in die in Abb. 4 wiedergegebene Pseudo-3D-Darstellung umgewandelt. Die Abbildung zeigt, dass es trotz des niedrigen Kontrastes bei Einsatz von LEDs möglich ist, unter Verwendung der digitalen Holographie quantitative Phasenkontrastbilder zu erzeugen.

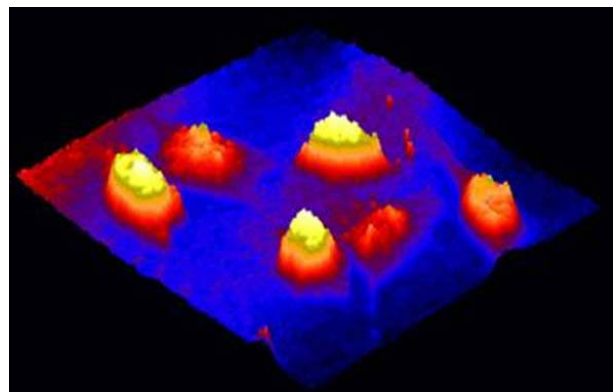


Abb. 5: Pseudo-3D-Darstellung der Phasenverteilung von Pankreas-Tumorzellen

4 Zusammenfassung

Es wurde gezeigt, dass die digitale Holographie mit LED-Lichtquellen einen genauen Abgleich der Interferometerarme erfordert, um einen deutlichen Interferogrammkontrast und damit ein niedriges Phasenrauschen zu erzielen. Die Einsatzfähigkeit an biologischen Proben wurde an Pankreas-Tumorzellen demonstriert.

Literatur

- [1] B. Kemper, "Investigations on living pancreas tumor cells by digital holographic Microscopy", in: J. Biomed. Opt., **11** 034005 (2006)
- [2] K. Creath: "Phase-shifting holographic interferometry" in *Holographic Interferometry*, R. K. Rastogi (Hrsg.) (Springer Verlag 1994), S. 109-150

Die Arbeiten wurden finanziell unterstützt vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF). Besonderer Dank gilt Frau Dipl. Biol. Ilona Bredebusch (Universitätsklinikum Münster, Medizinische Klinik und Poliklinik B, Labor für Gastroenterologische Molekulare Zellbiologie) für die Präparation der Zellen.