

Untersuchungen zur Digitalen Holographie mit synthetisch verminderter Kohärenzlänge

S. Kosmeier*, B. Kemper*, P. Langehanenberg*, C. Remmersmann*, C. Denz**, G. v. Bally*

* Centrum für Biomedizinische Optik und Photonik, Universitätsklinikum Münster
** Institut für Angewandte Physik, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

http://cebop.klinikum.uni-muenster.de
sebastian.kosmeier@uni-muenster.de

MOTIVATION

Digitalholographische Verfahren ermöglichen eine quantitative Multifokus-Phasenkontrastmikroskopie, die zur markerfreien dynamischen Lebendzellanalyse geeignet ist [1]. Parasitäre Interferenzen durch Vielfachreflexionen im Mikroskopstrahlengang stellen einen limitierenden Parameter der Auflösung (lateral und Phase) dar. Durch den Einsatz teilkohärenter Lichtquellen lassen sich derartige Effekte verringern [2]. Es wird untersucht, ob durch gewichtete Überlagerung rekonstruierter Wellenfronten von Hologrammen, welche bei verschiedener Wellenlänge aufgenommen werden, Eigenschaften von teilkohärentem Licht synthetisiert werden können. Die Generierung der Hologramme mit Licht großer Kohärenzlänge stellt dabei den Vorteil in Aussicht, die robuste Justierbarkeit eines laserbasierten Aufbaus mit dem verminderten Rauschniveau kurzkohärenter Lichtquellen zu kombinieren. Es werden Hologramme bei verschiedenen Wellenlängen unter Berücksichtigung von Vielfachinterferenzen simuliert. Die Rekonstruktion erfolgt mit einem räumlichen Phasenschiebverfahren [3].

SIMULATION VON HOLOGRAMMEN

Simuliert wurden Hologramme mit parasitären Interferenzen, wie sie beispielsweise durch Reflexionen im Boden einer Petrischale entstehen können (siehe Abb. 1): Die durch die Kondensorlinse im Probenbereich divergente Signalwelle wird innerhalb des Petrischalenbodens reflektiert, so dass der transmittierte Anteil mit dem reflektierten Anteil interferiert. Die durch ein Mikroskopobjektiv vergrößerte Signalwelle wird über einen Strahlteiler und eine Tubuslinse auf dem CCD-Sensor mit der Referenzwelle überlagert. Im Rahmen einer Simulation wurden die komplexe Signal- und Referenzwelle berechnet, mit statistischem Rauschen versehen und addiert. Bilden des Betragsquadrates liefert die Intensitätsverteilung (Abb. 2).

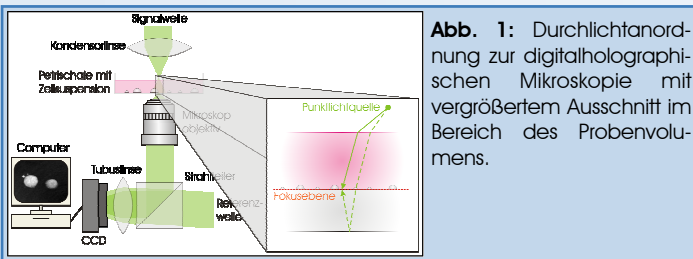


Abb. 1: Durchlichtanordnung zur digitalholographischen Mikroskopie mit vergrößertem Ausschnitt im Bereich des Probenvolumens.

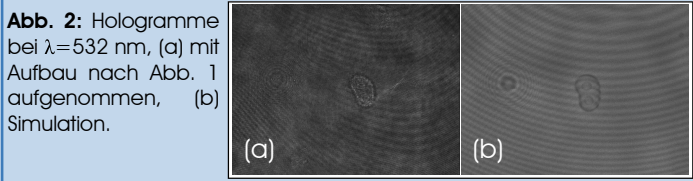


Abb. 2: Hologramme bei $\lambda=532$ nm, (a) mit Aufbau nach Abb. 1 aufgenommen, (b) Simulation.

QUANTIFIZIERUNG DES PHASENRAUSCHENS

Zur Quantifizierung des Phasenrauschens erfolgt durch Setzen eines relativen Schwellwertes (z.B. 25% des maximalen Phasenwertes für das Bsp. in Abb. 3). Das Phasenrauschen wird dann als Standardabweichung aller Werte unterhalb dieses Schwellwertes berechnet.

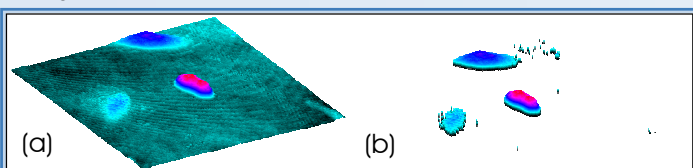


Abb. 3: (a) Pseudo-3D Plot in Falschfarbendarstellung der aus Abb. 2a rekonstruierten Phasenverteilung, (b) alle Datenpunkte oberhalb von 25% des maximalen Phasenwertes.

GEWICHTETE ÜBERLAGERUNG REKONSTRUIERTER PHASENVERTEILUNGEN

Die Rekonstruktion der Hologramme liefert die von der Lichtwellenlänge λ abhängige Phase $\varphi_{S,\lambda}$ der Signalwelle:

$$\varphi_{S,\lambda}(m,n) = \frac{2\pi}{\lambda} (n_{\text{Zelle}}(m,n) - n_{\text{Medium}}) d_{\text{Zelle}}(m,n)$$

Dabei sind n_{Zelle} und n_{Medium} die Brechungsindizes von Zelle und Medium

ohne Berücksichtigung von Dispersionseffekten, d_{Zelle} ist die Zelldicke und m, n sind Pixelkoordinaten. Bei der Überlagerung werden die Phasenverteilungen der einzelnen Wellenlängen λ_i mit dem Quotienten aus der jeweiligen Wellenlänge und der mittleren Wellenlänge $\bar{\lambda}$ gewichtet addiert. Division durch die Anzahl N der Hologramme liefert die von $\bar{\lambda}$ abhängige Signalwellenphase:

$$\begin{aligned} \varphi_{S,\bar{\lambda},\text{Summe}}(m,n) &= \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \frac{\lambda_i}{\bar{\lambda}} \varphi_{S,\lambda_i}(m,n) & \text{mit } \bar{\lambda} &= \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \lambda_i \\ &= \frac{1}{N\bar{\lambda}} \sum_{i=1}^N \lambda_i \frac{2\pi}{\lambda_i} (n_{\text{Zelle}}(m,n) - n_{\text{Medium}}) d_{\text{Zelle}}(m,n) \\ &= \frac{2\pi}{\bar{\lambda}} (n_{\text{Zelle}}(m,n) - n_{\text{Medium}}) d_{\text{Zelle}}(m,n) \end{aligned}$$

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Abb. 4a und 4b zeigen rekonstruierte Phasenverteilungen von bei verschiedenen Wellenlängen simulierten Hologrammen. Die Interferenzstreifen von Vielfachreflexionen befinden sich an verschiedenen Positionen (siehe markierte Referenzpunkte). In der gewichteten Überlagerung von 12 Phasenbildern (780-791 nm, $\Delta\lambda=1$ nm, Abb. 4c) erscheinen die Interferenzstreifen stark reduziert, das Beugungsmuster eines um ca. 10 cm aus der Bildebene propagierten Phasenobjektes (siehe Markierung in Abb. 6) bleibt dagegen erhalten. Auch in Profilansichten (Abb. 5a und 5b) und Pseudo-3D Plots (Abb. 6) ist die Reduzierung des Phasenrauschens deutlich sichtbar. Abb. 5c zeigt die Abhängigkeit des Phasenrauschens σ von der Zahl N der überlagerten Bilder. Für ein Einzelbild beträgt das Phasenrauschen $\sigma_{\text{Einzel}}=0,136$ rad und sinkt für 12 überlagerte Bilder auf $\sigma_{\text{Summe}}=0,046$ rad.

Für die Simulation ergibt sich somit eine Reduktion des Phasenrauschens um ca. 66%. Es bleibt zu untersuchen, ob sich dieses Ergebnis in der Praxis bestätigt und ob durch selektive Auswahl der Wellenlängen die Anzahl der zu summierenden Bilder reduziert werden kann.

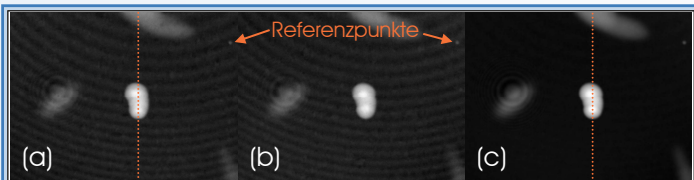


Abb. 4: Rekonstruierte Phasenverteilungen simulierter Hologramme mit (a) $\lambda=786$ nm, (b) $\lambda=788$ nm, (c) Summe aus 12 Phasenverteilungen (780-791 nm, $\Delta\lambda=1$ nm).

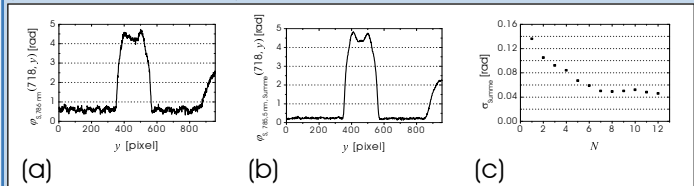


Abb. 5: Profile entlang der gestrichelten Linien in (a) Abb. 4a und (b) Abb. 4c, (c) Abhängigkeit des Phasenrauschens σ von der Anzahl N der überlagerten Phasenbilder.

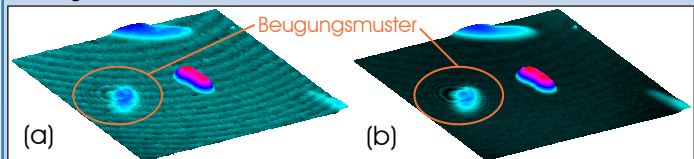


Abb. 6: Pseudo-3D Plots in Falschfarbendarstellung der rekonstruierten Phasenverteilungen in (a) Abb. 4a und (b) Abb. 4c.

LITERATUR

- [1] G. von Bally, B. Kemper et al., *New ways for marker-free life cell and tumor analysis*, in: J. Popp, M. Strehle (Eds.): *Biophotonics*, Wiley, Seiten 301 – 360, 2006.
- [2] S. Stürwald, B. Kemper et al., *Proceeding SPIE 6995*, 699507, 2008.
- [3] D. Malacara, *Optical shop testing*, Seiten 501-598, Wiley, 1992.