

Konstrukcija digitalnog holografskog mikroskopa

Princip rada digitalnog holografskog mikroskopa zasniva se na snimanju holograma, interferentne slike dva svetlosna talasa, na CCD kameri i rekonstrukciji holograma numeričkim putem uz mogućnost promene uvećanja, koje nije ograničeno osobinama optičkih elemenata, već prvenstveno zavisi od procesa rekonstrukcije i karakteristika kamere. Osnova procesa numeričke rekonstrukcije je Frenel-Kirhofov integral koji opisuje difrakciju talasa na mikro-strukturi holograma. Uspešno su snimljeni i rekonstruisani hologrami krila insekata i tkiva pokorice luka za različite vrednosti uvećanja u opsegu od 100 do 400 puta, a zatim su dobijeni hologrami upoređeni sa izgledom uzoraka pod optičkim mikroskopom uvećanja od 400 puta. Za konstrukciju aparature korišćen je He-Ne laser talasne dužine 633 nm kao izvor koherentne svetlosti i mikroskopski objektiv uvećanja 40 puta. Maksimalno postignuto uvećanje u kombinaciji sa objektivom je približno 400 puta. Značaj rada ogleda se u prednosti upotrebe digitalnog holografskog mikroskopa, kao i jednostavnosti, preglednosti i kratkom vremenu izvršavanja programa.

Uvod

Denis Gabor je 1971. godine dobio Nobelovu nagradu za izuzetan doprinos optici koji je dao pronalaskom holografije, jednostavnog načina za zapisivanje trodimenzionalne slike. Hologram, koji je najčešće dvodimenzionalni zapis na fotoosetljivom materijalu, omogućava dobijanje trodimenzionalnog lika koristeći interferenciju i difrakciju svetlosti.

Interferencija predstavlja prostornu preraspodelu jačine svetlosti usled superpozicije svetlosnih, elektromagnetnih talasa. Jačina svetlosti jednaka je srednjoj vrednosti energije koja u jedinici vremena prođe kroz jedinicu površine normalno na pravac prostiranja svetlosti i proporcionalna je kvadratu talasne amplitude. Ukoliko dva sferna monohromatska talasa jednakih amplituda A_0 , kružnih frekvencija ω i talasnog broja k , u početnom trenutku osciluju u fazi, u nekom trenutku t , u datoj tački na udaljenosti s_1 od prvog i s_2 od drugog izvora, njihove elongacije će imati vrednosti $A_1 = A_0 \cdot \sin(\omega t - ks_1)$ i $A_2 = A_0 \cdot \sin(\omega t - ks_2)$, a fazna razlika ovih talasa će biti $\Delta\varphi = ks_2 - ks_1$. Kao rezultat superpozicije talasa formira se talasni front takav da je u svakoj tački rezultujućeg monohromatskog zračenja elongacija jednaka zbiru elongacija pojedinačnih talasa $A = 2A_0 \cos\left(k \cdot \frac{s_2 - s_1}{2}\right) \cdot \sin \omega t$. Dakle, pri

slaganju talasa dolazi do preraspodele jačine svetlosti u prostoru, pri čemu intenzitet dobijenog talasa može imati vrednosti od 0 do $4I_0$, u zavisnosti od fazne razlike (Kadelburg *et al.* 2011).

Dva zraka su koherentna ukoliko imaju jednake kružne frekvencije i konstantnu faznu razliku tokom vremena. Kako su za interferenciju potrebna dva koherentna svetlosna zraka, za razliku od fotografije, za snimanje holograma neophodan je laser koji predstavlja izvor koherentne svetlosti.

Difrakcija je pojava odstupanja talasa od pravolinijskog prostiranja pri prolasku kroz otvore ili pored neprovidnih prepreka reda veličine talasne dužine svetlosti. Na osnovu zakona geometrijske optike u ovim slučajevima bi razlikovali

Janko Šušteršič (1996), Kragujevac, Prvoslava Stojanovića 6/7, učenik 3. razreda Prve kragujevačke gimnazije u Kragujevcu

Marija Milutinović (1996), Loznica, Slobodana Penezića 4, učenica 3. razreda Gimnazije „Vuk Karadžić” u Loznici

MENTOR: Dr Dejan Pantelić, Institut za fiziku, Zemun

mesta jasne osvetljenosti i oblasti senke. Međutim, prilikom pojave difrakcije svetlost zalazi u geometrijsku senku, a u okolini granica prepreke jačina svetlosti postaje neravnomerno raspoređena. Difrakcija se kvalitativno objašnjava Hajgenovim principom, po kome se sve tačke talasnog fronta mogu posmatrati kao međusobno nezavisni jednaki tačkasti izvori sfernih talasa čije obvojnice formiraju novi talasni front. U posmatranoj tački sredine, amplituda i intenzitet talasa se određuju kao rezultat interferencije sekundarnih talasa koji kao da izviru iz određenih zona. Tako dobijena interferentna slika se naziva difrakciona slika (Nedeljković 2009).

Kada na fotoploču padaju dva sferna koherentna talasa ili jedan ravan i jedan sferni, na fotoploči se dobija interferentna slika sastavljena od koncentričnih prstenova različitih poluprečnika i debljina koja se naziva zonska ploča. Debljina prstenova i razmaci između susednih prstenova su reda veličine talasne dužine svetlosti, pa nakon ponovnog prolaska svetlosti kroz zonsku ploču može doći do difrakcije svetlosti koja predstavlja uslov za rekonstrukciju holograma.

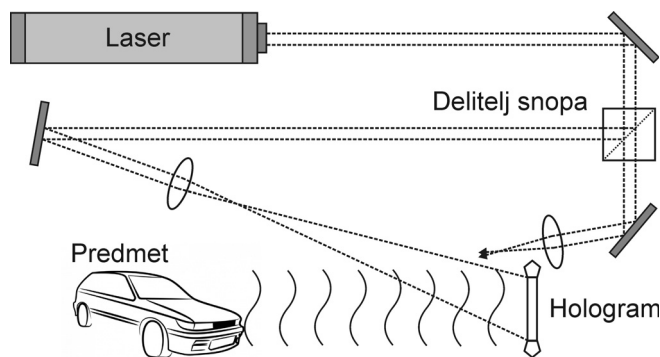
Proces dobijanja holograma se može podeliti na dva dela: snimanje holograma i rekonstrukciju holograma.

Šema snimanja holograma prikazana je na slici 1. Najpre se rašireni laserski snop podeli deliteljem snopa na dva talasa od kojih jedan pada direktno na fotoploču, a drugi se reflektuje od predmeta i potom pada na ravan holograma. Reflektovani talas nastaje superpozicijom mnogo sfernih talasa koji se odbijaju od površine predmeta, a njegov talasni front zavisi od oblika

reflektujuće površine. Ovaj talas se naziva noseći, jer nosi informaciju o osvetljenom predmetu. Uporedni talas je ravan ili sferni talas koji neometano stiže na fotoploču. Na fotoploči dolazi do interferencije uporednog i nosećeg talasa, a dobijena interferentna slika na odgovarajući način zapisana na fotoploči predstavlja hologram. Na hologramu dolazi do preklapanja više zonskih ploča nastalih od brojnih talasa reflektovanih od predmeta snimanja koje se seku pod različitim uglovima. Dakle, prilikom nastanka holograma na njemu se zapisuju odnos intenziteta svetlosnih talasa, koji je srazmeran kvadratu talasne amplitude, i fazna razlika svetlosnih talasa, koja zavisi od reljefa površine objekta, što omogućava dobijanje prostornog, trodimenzionalnog lika.

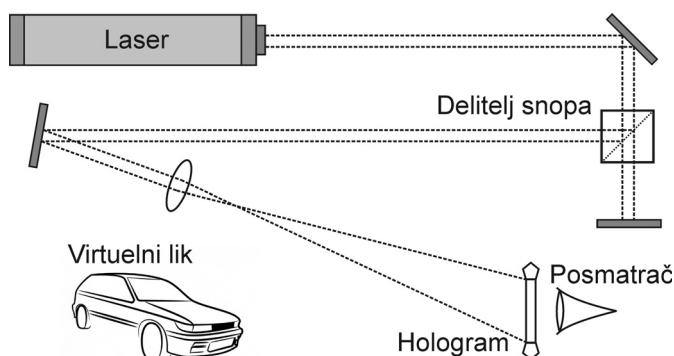
Pri snimanju holograma u svaku tačku fotoploče dolazi reflektovani svetlosni talas sa svake tačke predmeta tj. svaki delić holograma sadrži informaciju o celom snimljenom objektu. Trodimenzionalni lik predmeta stvara se difrakcijom uporednog talasa čak i na malom delu holograma. Međutim, dobijeni lik ima proporcionalno manju površinu i manju jasnoću od lika dobijenog rekonstrukcijom celog holograma, jer što je manji deo holograma to je manje svetlosti palo na njega.

Difrakcija je osnovni proces pri rekonstrukciji holograma. Prilikom rekonstrukcije na hologram se usmeri referentni talas, isti kao onaj koji je korišćen prilikom snimanja. Na mikrostrukтури holograma dolazi do difrakcije svetlosnog talasa čime se dobija snop divergirajućih zraka koji formiraju realan lik predmeta, simetrično položaju predmeta u odnosu na fotoploču.



Slika 1. Snimanje holograma

Figure 1. Hologram recording



Slika 2.
Rekonstrukcija holograma

Figure 2.
Hologram reconstruction

Ukoliko referentni talas pada na ploču pod istim uglom pod kojim je pao i prilikom snimanja, imaginarni lik nastaje na istom mestu i u istom položaju u odnosu na ploču kao što je bio položaj predmeta tokom snimanja. Na slici 2 je prikazan posmatrač koji gleda iza holograma i u preseku produžetaka difraktovanih zraka vidi imaginarni lik na istom mestu gde se nalazio predmet u trenutku snimanja holograma. Dobijeni lik predmeta je trodimenzionalan, a menjanjem ugla posmatranja moguće je videti predmet iz različitih perspektiva.

Napredak i razviće kompjuterske tehnologije omogućilo je prelazak procesa snimanja ili procesa rekonstrukcije na računar. Prvi prilaz predstavlja kompjuterski generisanu holografiju (CGH), proces nastajanja veštačkih holograma numeričkim metodama, koji se mogu rekonstruisati optičkim putem. Ovaj rad će se, međutim, oslanjati na numeričku rekonstrukciju holograma koju su osnovali Jaroslavski *et al.* početkom 70-ih godina prošlog veka. Oni su prikazali optički uvećane delove Frenelovih holograma, kod kojih su dimenzije holograma zanemarljive u odnosu na rastojanje od predmeta do fotoploče, i Furijeovih holograma, kod kojih se dimenzije holograma ne mogu zanemariti, snimljenih na fotoploči, a zatim su ovi digitalizovani „tradicionalni” hologrami rekonstruisani numerički (Jaroslavski *et al.* 1980). Haddad *et al.* su prvi opisali holografski mikroskop zasnovan na numeričkoj rekonstrukciji Furijeovih holograma (Haddad *et al.* 1992).

Veliki iskorak bio je Šnars i Juptnerov razvoj direktnog snimanja Frenelovih holograma pomoću CCD (eng. charged coupled device) senzora. Ovaj metod omogućava snimanje i obradu

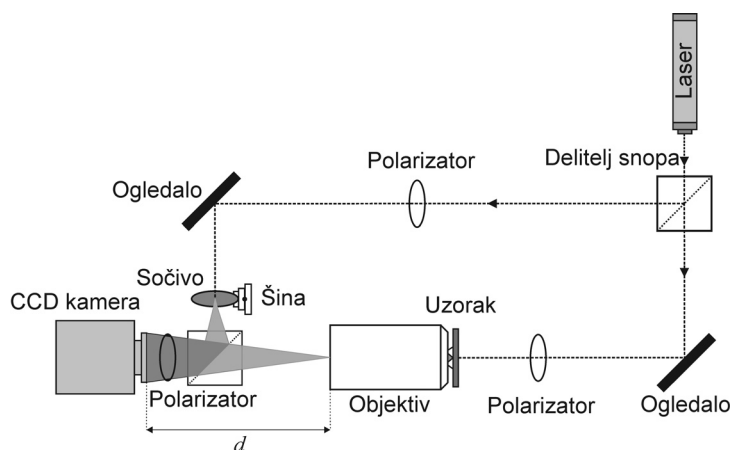
holograma bez nepotrebnih međukoraka i nepouzdatih hemijskih reakcija, što je značajno pojednostavilo i ubrzalo proces digitalne holografije. Termin digitalna holografija prvi put upotrebljavaju Šnars i Juptner u ovom radu i odnosi se na celokupni proces optičkog snimanja holograma na CCD-u i numeričke rekonstrukcije dobijenog holograma (Šnars *et al.* 2002).

Najvažnija karakteristika digitalnih holografskih mikroskopa je da uvećanje nije ograničeno osobinama optičkih elemenata, već prvenstveno zavisi od procesa rekonstrukcije i karakteristika CCD kamere. Osim dobijanja prostornog, trodimenzionalnog lika predmeta, digitalna holografija pruža mogućnost snimanja tela u pokretu, snimanje oblika neprovidnih i indeksa prelamanja providnih tela, zbog čega ima široku primenu, naročito u biofizici (Wenbo *et al.* 2001).

Aparatura i metod

Za stvaranje dva koherentna svetlosna talasa, kao jedno od mogućih rešenja iskorišćen je delitelj snopa za podelu laserskog zraka na objektni i uporedni. Šema aparature je data na slici 3.

U eksperimentu je korišćen He-Ne laser talasne dužine 633nm, čiji zrak koji je pao pod uglom od 45° na prvi delitelj laserskog snopa razdvojen na dva, međusobno ortogonalna svetlosna snopa. Prvi zrak, nakon prolaska kroz delitelj, prolazi kroz polarizator i pada na ogledalo postavljeno pod uglom od 45° u odnosu na pravac zraka. Ovaj zrak predstavlja objektni talas. Laserski zrak zatim nailazi na uzorak postavljen na pokretnu šinu, koja omogućava fino podešavanje razdaljine uzorka od objekta, u svrhu fokusiranja slike na odgovarajućem rastojanju.



Slika 3. Šema aparature

Figure 3. Scheme of the apparatus

Iza uzorka postavljen je objektiv, tako da deo snopa koji prođe kroz uzorak pada direktno na sočivo objektiva. Korišćeni objektiv uvećanja 40 puta i numeričke aperture 0.65 ima sličnu ulogu kao i kod optičkih mikroskopa, obezbeđuje primarno uvećanje snimljenog uzorka jer stvara uvećan, realan lik na poznatom rastojanju određenom udaljenosti uzorka i ujedno širi laserski snop kako bi došlo do interferencije dva zraka na čitavoj površini CCD kamere. Objektalni talas zatim prolazi kroz drugi delitelj laserskog snopa i pada na CCD senzor.

Drugi zrak, referentni talas, nakon odbijanja od delitelja prolazi kroz polarizator i reflektuje se od ogledala postavljenog pod uglom od 45° u odnosu na pravac zraka i pada na sočivo žižne daljine 25 mm, čija je glavna optička osa paralelna laserskom snopu i podlozi i koje ima ulogu da raširi laserski snop, pretvarajući ravan talas koji potiče od lasera u sferni, koji se zatim odbija od delitelja i pada ortogonalno na CCD kameru.

Pre nego što objektalni i referentni talas interferiraju na površini CCD senzora oni prolaze kroz dodatni polarizator. Upotreba polarizatora u digitalnoj holografskoj mikroskopiji u ovom radu proizašla je iz potrebe za izjednačavanjem intenziteta referentnog i objektalnog talasa. Kako referentni talas nesmetano dolazi do CCD kamere, dok objektalni prolazi kroz uzorak i nekoliko optičkih elemenata, on ima mnogo veći intenzitet od objektalnog, što dovodi do manje izražene interferencije i velikog šuma pri rekonstrukciji holograma. Kao rešenje ovog problema nametnulo se uvođenje tri polarizatora, prvi i drugi koji

će različito polarizovati objektalni i referentni zrak, i treći kroz koji će oba zraka proći i koji će njihov polaritet izjednačiti, jer prethodno navedeni zakoni inerferencije ne važe za različito polarisane svetlosne talase. Prvi i treći polarizator imaju približno paralelne ravni polarizacije, dok se rotacijom ravni polarizacije drugog polarizatora može kontrolisati intenzitet referentnog talasa.

Veličina piksela CCD kamere Sony XCL-V500 iznosi $7.4 \mu\text{m} \times 7.4 \mu\text{m}$, a broj piksela po dužini kraće i duže stranice iznosi 494 i 648 redom. Objektalni i referentni talas interferiraju na površini CCD senzora, intenzitet dobijenog talasa se zapisuje u svakom pikselu CCD kamere, nastaje interferentna slika u vidu brojnih svetlih i tamnih pruga čime je proces snimanja holograma završen.

Metod rekonstrukcije holograma numerički

Hologram se rekonstruiše tako što se osvetli onim uporednim zrakom koji je korišćen za pravljenje istog. Time nastaje imaginarni lik predmeta koji se ni po čemu ne razlikuje od stvarnog predmeta. Matematički, talas se može predstaviti kompleksnim brojem čiji moduo predstavlja amplitudu, a argument fazu datog talasa. Označimo sa $O(x, y) = \alpha(x, y) \cdot e^{i\varphi_O(x, y)}$ objektalni i sa $R(x, y) = r(x, y) \cdot e^{i\varphi_R(x, y)}$ uporedni talas. Interferencijom ovih talasa nastaje hologram. Intenzitet interferentne slike u tački (x, y) srazmeran je kvadratu amplitude zbira objektalnog i uporednog talasa u

toj tački, $I(x, y) = |O(x, y) + R(x, y)|^2$. Koristeći osobinu kompleksnih brojeva da je proizvod kompleksnog broja i njemu konjugovanog kompleksnog broja jednak kvadratu amplitude, dobija se razvijeni oblik prethodne jednakosti:

$$I(x, y) = (O(x, y) + R(x, y)) (\overline{O(x, y) + R(x, y)}) = \\ = o^2 + r^2 + O(x, y)\overline{R(x, y)} + \overline{O(x, y)}R(x, y)$$

gde $\bar{z}$ označava konjugovano kompleksni broj broju z . Elongacija zapisa $h(x, y)$ na fotoploči (ili bilo koje druge sredine), koja se još naziva i hologramska funkcija, data je formulom $h(x, y) = h_0 + \beta\tau I(x, y)$, gde je β konstanta, τ vreme izloženosti ploče svetlosnom zraku i h_0 amplituda zapisa neizložene ploče. U digitalnoj holografiji koja koristi CCD kameru kao sredinu za snimanje h_0 se može izostaviti. Pri rekonstrukciji holograma, fotoploča se osvetljava referentnim zrakom, što je u digitalnoj holografiji ekvivalentno množenju hologramske funkcije kompleksnim brojem koji opisuje uporedni zrak i time se dobija:

$$R(x, y) \cdot h(x, y) = \beta\tau(o^2 + r^2)R(x, y) + \\ + \beta\tau r^2 O(x, y)\overline{R(x, y)} + \beta\tau r^2 \overline{O(x, y)}R(x, y)$$

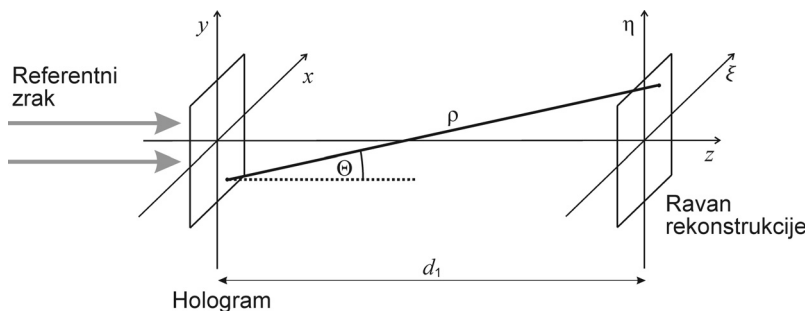
Prvi sabirak u ovoj formuli, referentni zrak pomnožen koeficijentom $\beta\tau(o^2 + r^2)$, predstavlja neprelomljeni zrak, zrak najvećeg intenziteta koji nije difraktovao, već je pravolinijski prošao kroz fotoploču. Drugi sabirak predstavlja talas koji kreira imaginarni lik, dok koeficijent $\beta\tau r^2$ utiče na osvetljenost lika. Treći sabirak predstavlja talas od koga nastaje stvaran lik i koji se nalazi na istom rastojanju od ploče kao i imaginarni, samo sa suprotne strane.

Ukoliko se umesto jednog objektnog talasa iskoriste dva talasa reflektovana od dva različita stanja predmeta, prethodna formula se može iskoristiti u svrhu holografske interferometrije, vrlo precizne metode za posmatranje deformacija neprovidnih tela ili varijacija indeksa prelamanja providnih sredina, npr. tečnosti i gasova (mogu se primetiti promene dužine puta zraka do stotog dela talasne dužine). U tom slučaju, formula dobija oblik $I(x, y) = 2o^2(1 + \cos \Delta\phi)$ iz koga se vidi direktna zavisnost intenziteta interferentne slike od fazne razlike, koja sadrži informaciju o deformaciji objekta. Kako je kosinus parna funkcija, nije moguće izračunati faznu razliku i deformaciju predmeta samo na osnovu jedne informacije, te je nastalo nekoliko tehnika rekonstrukcije fazne razlike snimanjem dodatnih informacija. Jedna od tehnika jeste rekonstrukcija pomoću Frenelove transformacije.

Difrakcija svetlosnog talasa na hologramu koji je postavljen normalno na izvor svetlosti opisana je Frenel-Kirhofov integralom, čiji je rezultat kompleksan broj koji opisuje realan lik snimljenog predmeta:

$$G(\xi, \eta) = \frac{1}{\lambda} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} R(x, y) h(x, y) \cdot \frac{e^{-i\frac{2\pi}{\lambda}\rho}}{\rho} \cdot \\ \cdot \frac{1}{2} (1 + \cos \theta) dx dy$$

gde je $\rho = \sqrt{(x - \xi)^2 + (y - \eta)^2 + d_1^2}$ rastojanje između tačke na hologramu i tačke na ravni rekonstrukcije, θ ugao koji nakon prolaska kroz hologramsku ploču zaklapa svetlosni zrak sa normalom, a x i y i ξ i η su horizontalne i vertikalne koordinate holograma i ravni rekonstrukcije,



Slika 4. Rekonstrukcija holograma numerički

Figure 4. Numerical reconstruction of holograms

redom, kao što je prikazano na slici 4. Rekonstrukcija imaginarnog lika je moguća dodavanjem karakteristika sočiva $L(x, y) = e^{\frac{i\pi}{\lambda f}(x^2 + y^2)}$ u Fresnel-Kirhofov integral. Intenzitet $I(\xi, \eta)$ se može izračunati kao kvadrat amplitude talasa $|G(\xi, \eta)|^2$ a faza $\varphi(\xi, \eta) = \arctan \frac{\text{Im}(G(\xi, \eta))}{\text{Re}(G(\xi, \eta))}$, gde se Im odnosi na imaginarni, a Re na realni deo kompleksnog broja.

Ako su x, y, ξ i η koordinate male u poređenju sa rastojanjem d_1 između ravni holograma i ravni rekonstrukcije, može se iskoristiti aproksimacija $\rho \approx d_1 + \frac{(x-\xi)^2}{2d_1} + \frac{(y-\eta)^2}{2d_1}$ kao i da je $\cos \theta \approx 1$, što

nakon uvščavanja u formulu dovodi do jednačine koja se naziva Fresnelova transformacija. Fresnelovom transformacijom dobija se realan lik konstantne rezolucije izražene formulom $\Delta \xi = \frac{\lambda d}{N \Delta x}$ i

$\Delta \eta = \frac{\lambda d}{M \Delta y}$, gde je λ talasna dužina svetlosti kori-

šćena prilikom snimanja holograma, d rastojanje predmeta od ravni holograma, N i M broj piksela po dužini i širini CCD kamere, a Δx i Δy dužina i širina piksela. Da bi se postigla bolja rezolucija pri većim uvećanjima potrebno je sve više smanjivati rastojanje d . Međutim, pri malim rastojanjima se ne može iskoristiti aproksimacija, pa se ni Fresnelov transform ne može primeniti u digitalnoj holografskoj mikroskopiji.

Upravo s namerom da se prevaziđu fizičke prepreke uvećanju slike pri numeričkoj rekonstrukciji holograma, razvijen je drugi pristup obrade dobijenih informacija sa CCD kamere, metod konvolucije. Fresnel-Kirhofov integral se može zapisati kao:

$$G(\xi, \eta) = \frac{1}{\lambda} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} R(x, y) h(x, y) g(\xi, \eta, x, y) dx dy$$

gde je funkcija $g(\xi, \eta, x, y)$ data sa

$$g(\xi, \eta, x, y) = \frac{i}{\lambda} \cdot \frac{e^{-i \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{(x-\xi)^2 + (y-\eta)^2 + d^2}}}{\sqrt{(x-\xi)^2 + (y-\eta)^2 + d^2}},$$

pri čemu je ponovo korišćena aproksimacija $\cos \theta \approx 1$. Kako je $g(\xi, \eta, x, y) = g(\xi - x, \eta - y)$ prostorna invarijanta, prethodni integral zadovoljava uslove za primenu teoreme konvolucije, koja tvrdi da Furijeov transform proizvoda fun-

kcija $R \cdot h$ i g jednak proizvodu Furijeovih transformata tih funkcija. Prema tome, konačna formula za dobijanje realnog lika je:

$$G(\xi, \eta) = \mathfrak{T}^{-1} \{ \mathfrak{T}\{h \cdot R\} \cdot \mathfrak{T}\{g\} \}$$

gde $\mathfrak{T}$ predstavlja Furijeov, $\mathfrak{T}^{-1}$ inverzni Furijeov transform date funkcije.

Za potrebe numeričke rekonstrukcije funkciju g je neophodno diskretizovati, čime ona dobija finalni oblik:

$$g(k, l) = \frac{i}{\lambda} \cdot \frac{e^{-i \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{(k-\frac{N}{2})^2 \Delta x^2 + (l-\frac{M}{2})^2 \Delta y^2 + d_r^2}}}{\sqrt{(k-\frac{N}{2})^2 \Delta x^2 + (l-\frac{M}{2})^2 \Delta y^2 + d_r^2}}$$

U ovom eksperimentu kao referentni talas korišćen je sferni talas čiji se izvor nalazi na rastojanju d_r od CCD kamere, pa se funkcija R može predstaviti kao:

$$R(k, l) = \frac{e^{-i \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{(k-\frac{N}{2})^2 \Delta x^2 + (l-\frac{M}{2})^2 \Delta y^2 + d_r^2}}}{\sqrt{(k-\frac{N}{2})^2 \Delta x^2 + (l-\frac{M}{2})^2 \Delta y^2 + d_r^2}}$$

Veličina piksela dobijene slike primenom konvolucione metode jednaka je veličini piksela na CCD kameri. Međutim, ukoliko se numerička rekonstrukcija vrši pomoću referentnog talasa na rastojanju manjem ili većem od d_r , dobija se uvećana, odnosno umanjena slika sa istim brojem piksela. Prema tome, i rezolucija dobijene slike direktno zavisi od uvećanja koje je dato formulom $M = \left[1 + \frac{d}{d_r} - \frac{d}{d_r} \right]^{-1}$, gde je d_{r1} rastojanje

referentnog talasa od ravni holograma korišćeno prilikom rekonstrukcije (Schnars *et al.* 2002). Na ovaj način moguće je postići bilo koje uvećanje birajući odgovarajuće rastojanje prilikom rekonstrukcije. U stvarnosti to nije moguće, kako je formula samo aproksimacija koja važi u idealizovanim uslovima. Nesavršenost aparature, kao i činjenica da pikseli CCD kamere nisu bezdimenzione tačke već kvadrati konačne površine, dovode do toga da pri većim uvećanjima slika gubi kvalitet, pa je uvećanje rekonstrukcije na taj način ograničeno.

Kako je neprelomljeni zrak mnogo većeg intenziteta nego ostatak holograma, neophodno je prvo izvršiti thresholding (eng. thresholding), tj. odstranjivanje piksela svetlijih i tamnijih od ne-

Pseudokod za funkciju rekonstrukcije digitalnog holograma

funkcija holo (matrica realnih brojeva h, realan broj dr1)

```
{
    h = h – suma_elemenata(h)/(dužina_matrice_h* širina_matrice_h)
    for k = 1 do dužina_matrice_h
        for k = 1 do širina_matrice_h
            g(j,k) = (i/lmb)*exp((-2*i*pi/lmb)*sqrt(d1^2+((j-M/2)*dy1)^2+((k-N/2)*dx1)^2))
                /sqrt(d1^2+((j-M/2)*dy1)^2+((k-N/2)*dx1)^2);
            R(j,k) = exp((i*2*pi/lmb)*sqrt((dr1)^2+(dy*(j-M/2))^2+(dx*(k-N/2))^2))
                /sqrt((dr1)^2+(dy*(j-M/2))^2+(dx*(k-N/2))^2);
            h(j,k) = h(j,k)*R(j,k);
        end_for
    end_for
    con1 = fast_fourier_transform(h);
    con2 = fast_fourier_transform (g);
    img = inverse_fast_fourier_transform (con1*con2);
    for k = 1 do dužina_matrice_h
        for k = 1 do širina_matrice_h
            img(j,k) = abs(img(j,k))^2;
            if (img(j,k)>gornja_granica)
                img(j,k) = gornja_granica;
            end_if
            if (img(j,k)<donja_granica)
                img(j,k) = donja_granica;
            end_if
            img(j,k) = log10(img(j,k));
            if (img(j,k)<min) min = img(j,k); end_if
            if (img(j,k)>max) max = img(j,k); end_if
        end_for
    end_for
    img = img – min;
    img = img/max;
}
```

kih empirijski utvrđenih granica. Tako dobijenu sliku potrebno je logaritmovati, kako bi se smanjio uticaj neprelomljenog zraka. Tek tada slika postaje jasno vidljiva.

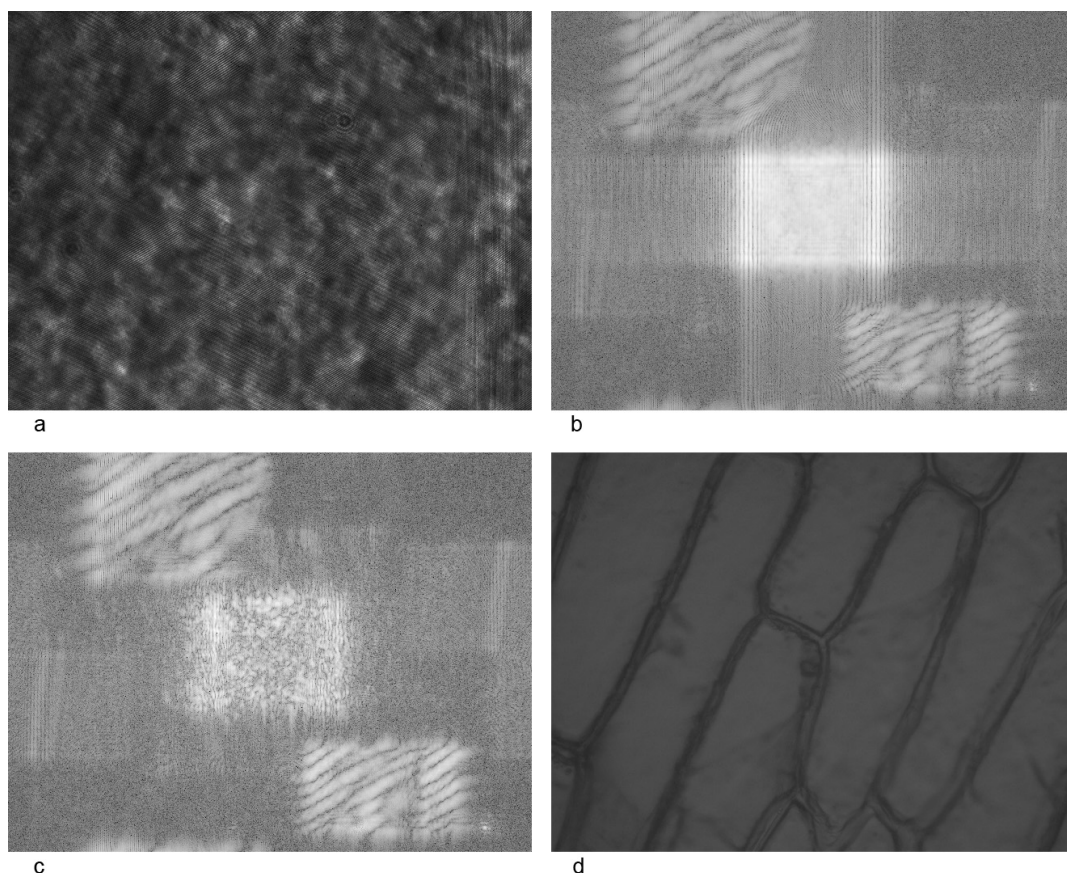
Ukoliko dolazi do preklapanja slike i neprelomljenog zraka, moguće ga je delimično ili potpuno ukloniti koristeći se odgovarajućim matematičkim modelom. Kako je $h(x, y) = h(x, y) = o^2 + r^2 + 2ro$ prva dva sabirka dovode do stvaranja neprelomljenog zraka, dok treći varira između $+2ro$ i $-2ro$ i njegova srednja vrednost je jednaka je 0. Oduzimanjem srednje vrednosti matrice h :

$$I_m = \frac{1}{MN} \cdot \sum_{k=0}^{M-1} \sum_{l=0}^{N-1} I(k\Delta x, l\Delta y)$$

od svakog njenog člana, a zatim njenom rekonstrukcijom, dobija se slika kojoj je odstranjen neprelomljeni zrak čime je proces rekonstrukcije završen.

Rezultati i diskusija

Od raspoloživih optičkih elemenata u Istraživačkoj stanici Petnica, uspešno je konstruisana aparatura za snimanje i ostvaren digitalni proces rekonstrukcije dobijenih holograma, koji zahtevaju veliku stabilnost jer vibracije reda veličine mikrometra dovode do velikih promena. Ovime je pokazano da se u uslovima optičke laboratorije korišćenjem elementarnih optičkih elemenata



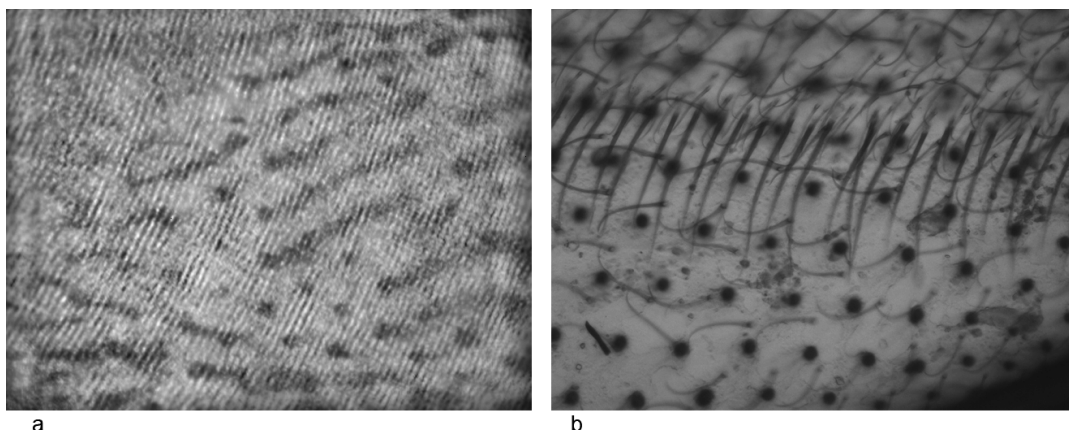
Slika 5. a) Hologram pokorice luka; b) Rekonstruisani hologram pokorice luka uvećan 125 puta; c) Rekonstruisani hologram pokorice luka uvećan 125 puta bez neprelomljenog zraka; d) Optička slika pokorice luka

Figure 5. a) Hologram of onion crust; b) Reconstruction of onion crust hologram magnified 125 $\times$; c) Reconstruction of onion crust hologram magnified 125 $\times$ without DC term; d) Optical image of onion crust

može konstruisati holografski mikroskop, pa kao takav pruža mogućnost upotrebe kao alternativne metode mikroskopiranja.

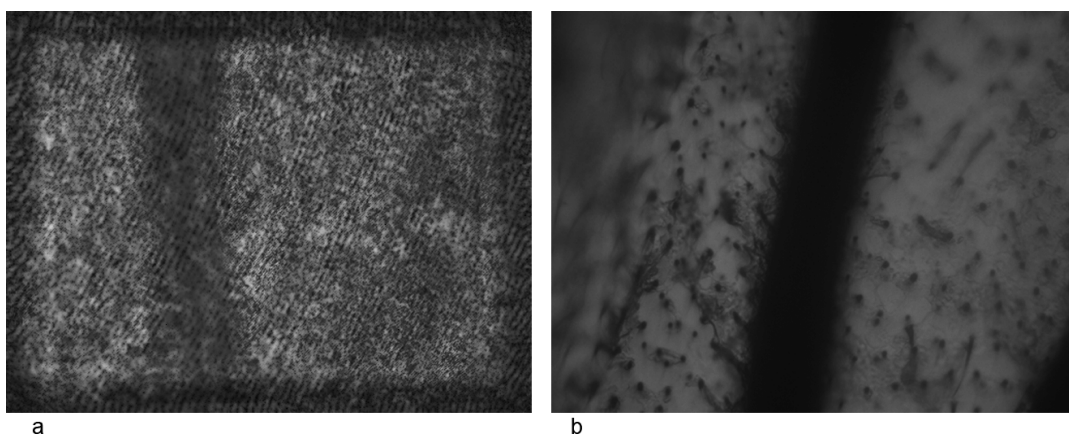
Maksimalna postignuta vrednost uvećanja putem numeričke rekonstrukcije je približno 10 puta. U kombinaciji sa upotrebljenim objektivom čije je uvećanje 40 $\times$, ukupno uvećanje koje je postignuto konstruisanim digitalnim holografskim mikroskopom je oko 400 $\times$. Ova vrednost se ne može tačno odrediti, jer zavisi prvenstveno od rezolucije kamere i drugih karakteristika aparature, ali i od potreba u čiju svrhu se mikroskop koristi. Ispitivanjem karakteristika

konstruisanog mikroskopa utvrdili smo postojanje granične vrednosti uvećanja, takve da se pri većim uvećanjima rezolucija rekonstrukcije ne menja, odnosno uvećanje se vrši na račun povećanja broja istovetnih piksela. Teorijski se predviđa da je ova vrednost obrnuto proporcionalna dimenzijama piksela CCD kamere. U slučaju aparature korišćene u ovom radu, vrednost graničnog uvećanja je 364 $\times$. Na slikama su prikazani snimljeni hologrami, rekonstruisani hologrami i optičke slike snimljenih objekata pomoću optičkog mikroskopa uvećanja 400 $\times$.



Slika 6. a) Rekonstruisani hologram krila mušice uvećan 400 puta; b) Optička slika krila mušice

Figure 6. a) Reconstruction of fly wing hologram magnified 400 $\times$; b) Optical image of fly wing



Slika 7. a) Rekonstruisani hologram krila mušice uvećan 400 puta; b) Optička slika krila mušice

Figure 7. a) Reconstruction of fly wing hologram magnified 400 $\times$; b) Optical image of fly wing

Podudarnost koja se uočava na rekonstruisanim hologramima i optičkim slikama dobijenim na mikroskopu ukazuje na mogućnost upotrebe ove vrste mikroskopa kao alternativne metode za posmatranje bioloških uzoraka. Postignuto uvećanje ograničeno je veličinom piksela i površinom CCD kamere, pa bi se upotrebom kamere boljih karakteristika ostvarila mogućnost većeg uvećanja i stvaranje slika digitalnog holografskog mikroskopa bolje rezolucije.

Zaključak

U laboratorijskim uslovima uspešno je konstruisan holografski mikroskop od raspoloživih optičkih elemenata. U kombinaciji sa objektivom uvećanja 40 $\times$, ukupno postignuto uvećanje primenom programa za rekonstrukciju je približno 400 puta. Princip rekonstrukcije holograma odlikuje se nestandardnom jednostavnošću i preglednošću, kao i zadovoljavajućom brzinom

izvršavanja koja omogućava snimanje i rekonstrukciju video snimaka u realnom vremenu. Uspešno su snimljeni i rekonstruisani hologrami krila insekata i tkiva pokorice luka za različite vrednosti uvećanja u opsegu od 100 do 400 puta, a zatim su dobijeni hologrami upoređeni sa optičkim slikama uzoraka snimljenim optičkim mikroskopom uvećanja 400 puta. Primećena je podudarnost rekonstruisanih holograma i optičkih slika uzoraka.

Značaj ovog projekta ogleda se u promeni uvećanja rekonstruisanog holograma snimljenog digitalnim holografskim mikroskopom nezavisno od osobina optičkih elemenata. Ograničenje koje se javlja uslovljeno je samo veličinom piksela na CCD kameri, ali i pored toga, pokazano je da je moguće konstruisati digitalni holografski mikroskop u uslovima optičke laboratorije. U daljem istraživanju, konstruisana aparatura bi se mogla koristiti kao metod za proučavanje promene oblika neprovidinih tela, indeksa prelamanja providnih tela kao i snimanja tela u pokretu što pruža široku mogućnost primene digitalne holografske mikroskopije posebno u biofizici.

Zahvalnost. Zahvaljujemo se svom mentoru dr Dejanu Panteliću sa Instituta za fiziku u Beogradu, rukovodiocu seminara fizike Jeleni Pajović, saradnicima seminara fizike u Istraživačkoj stanici Petnica, Marku Kuzmanoviću i Vladanu Pavloviću, na korisnim savetima i pruženoj pomoći tokom teorijskih priprema i konstrukcije eksperimentalne postavke. Takođe se zahvaljujemo Tomici Mišljenoviću, rukovodiocu seminara biologije na pomoći tokom snimanja slika uzoraka optičkim mikroskopom.

Literatura

Haddad W. S., Cullen D., Solem J. C., Longworth J. W., McPherson A., Boyer K., Rhodes C. K. 1992. Fourier-transform holographic microscope. *Applied Optics*, **31**: 4973.

Kadelburg N., Rapajić V. 2011. *Fizika za treći razred Matematičke gimnazije*. Beograd: Krug

Kim M. K. 2010. Principles and techniques of digital holographic microscopy. *SPIE Reviews*, **1** (1): 018005.

Nedeljković N. 2009. *Talasi i optika*. Beograd: Fizički fakultet Univerziteta u Beogradu

Schnars U., Juptner W. P. O. 2002. Digital recording and numerical reconstruction of holograms. *Measurement Science and Technology*, **13**: R85.

Xu W., Jericho M. H., Meinertzhagen I. A., Kreuzer H. J. 2002. Digital in-line holography for biological applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**: 11301.

Yaroslavskii L. P., Merzlyakov N. S. 1980. *Methods of Digital Holography*. New York: Consultants Bureau

Janko Šušteršič and Marija Milutinović

Construction of Digital Holographic Microscope

The purpose of this project was the construction of an experimental setup of digital holographic microscopy, reconstruction of recorded holograms and observing performances of digital holographic microscope. In digital holography the first step is recording holograms using charged coupled devices (CCD), and the second step is numerical reconstruction of holograms which enables the change of magnification within boundaries not set by properties of optical elements, but mostly by reconstruction method and the performances of CCD sensor. In holography, on photosensitive material you can record light waves' intensity in each point of hologram and also light waves' phase difference which depends on deformations of the object's surface and that allows us to obtain a three-dimensional figure.

Unlike the photography, holographic recording requires two coherent light beams. One wave that illuminates the object is scattered and reflected to the recording medium. The second wave, called the reference wave, illuminates the

plate directly. Both waves are interfering on the holographic plate creating interference pattern. The interference pattern recorded on CCD is called a digital hologram. The He-Ne laser with wavelength of 633 nm was used in this experiment as a source of coherent light that is necessary for recording holograms. We used 40× microscope objective as optical magnifier and also to widen the object wave over the whole surface.

The diffraction of a light wave at an aperture which is fastened perpendicular to the incoming beam is described by the Fresnel-Kirchhoff integral. In the process of numerical reconstruction of holograms, convolution approach was used. The essence of this code reflects in its unusual simplicity and speed.

In this project, we successfully recorded and reconstructed holograms of fly wings and onion crust for different values of magnification between 100× and 400× and determined the boundary magnification for apparatus used in this paper. The reconstructed holograms were compared with optical images of the same objects under an optical microscope of 400× magnification. We observed clear similarity between these images and it indicates that digital holographic microscopy can be used as an alternative method for observing biological samples. The significance of the project lies in the advantages of using digital holographic microscopy especially in biophysics, as well as simplicity of the code that allows the reconstruction of holograms in real time.

