



# Hyperdimenzionální zobrazování jednopixelovou kamerou

## Diplomová práce

*Studijní program:*

N3901 Aplikované vědy v inženýrství

*Studijní obor:*

Aplikované vědy v inženýrství

*Autor práce:*

**Bc. Lukáš Klein**

*Vedoucí práce:*

RNDr. Karel Žídek, Ph.D.

Ústav nových technologií a aplikované informatiky





## Zadání diplomové práce

# Hyperdimenzionální zobrazování jednopixelovou kamerou

*Jméno a příjmení:* **Bc. Lukáš Klein**  
*Osobní číslo:* M19000179  
*Studijní program:* N3901 Aplikované vědy v inženýrství  
*Studijní obor:* Aplikované vědy v inženýrství  
*Zadávací katedra:* Ústav nových technologií a aplikované informatiky  
*Akademický rok:* 2020/2021

### Zásady pro vypracování:

1. Seznámení se s problematikou měření dohasínání fotoluminiscence (FL) a mapování dob dohasínání FL.
2. Sestavení, optimalizace a testování zobrazovacího systému na bázi jednopixelové kamery umožňujícího mapování –hyperspektrální informace, dohasínání FL, standardní zobrazování.
3. Identifikace přesnosti měření a zobrazování. Srovnání testovacích měření se standardními aparaturami FLIM.
4. Vyhodnocení vhodnosti aparatury pro: polovodičové vzorky, biologické vzorky, monokrystalické luminofoxy a další.

*Rozsah grafických prací:*  
*Rozsah pracovní zprávy:*  
*Forma zpracování práce:*  
*Jazyk práce:*

dle potřeby dokumentace  
40 – 50 stran  
tištěná/elektronická  
Čeština



### **Seznam odborné literatury:**

- [1] STERN, Adrian (ed.). Optical compressive imaging. CRC Press, 2016.  
[2] van Munster, Erik B., and Theodorus WJ Gadella. „Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM).“ *Microscopy techniques*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2005. 143-175.  
[3] Pelant, Ivan, and Jan Valenta. *Luminiscenční spektroskopie: Objemové krystalické polovodiče. I*. Academia, 2006.

*Vedoucí práce:*

RNDr. Karel Žídek, Ph.D.  
Ústav nových technologií a aplikované informatiky

*Datum zadání práce:*

19. října 2020

*Předpokládaný termín odevzdání:*

17. května 2021

prof. Ing. Zdeněk Plíva, Ph.D.  
děkan

L.S.

Ing. Josef Novák, Ph.D.  
vedoucí ústavu

## Prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci jsem vypracoval samostatně jako původní dílo s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé diplomové práce a konzultantem.

Jsem si vědom toho, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci nezasahuje do mých autorských práv užitím mé diplomové práce pro vnitřní potřebu Technické univerzity v Liberci.

Užiji-li diplomovou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti Technickou univerzitu v Liberci; v tomto případě má Technická univerzita v Liberci právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Současně čestně prohlašuji, že text elektronické podoby práce vložený do IS/STAG se shoduje s textem tištěné podoby práce.

Beru na vědomí, že má diplomová práce bude zveřejněna Technickou univerzitou v Liberci v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů.

Jsem si vědom následků, které podle zákona o vysokých školách mohou vyplývat z porušení tohoto prohlášení.

16. května 2021

Bc. Lukáš Klein

## Poděkování

Chtěl bych poděkovat především vedoucímu mé diplomové práce RNDr. Karlu Žídkovi, Ph.D. Kombinování několika netriviálních měřících principů do jednoho rozhodně nebyl jednoduchý úkol, ale společnými silami se ho podařilo překonat. Zároveň se právě díky němu podařilo zajistit stáž na Univerzitě v Bergenu, která byla stěžejní pro velkou část této práce. Stejně jako v případě bakalářské práce také tentokrát zajistil na pracovišti přátelskou atmosféru.

Druhé významné poděkování patří Arnemu Kristoffersenovi z UiB, který se mě během stáže i přes svou probíhající částečnou rodičovskou dovolenou ujal a seznámil mě s principy TCSPC. Společně se svou vědeckou skupinou mě také zasvětili do velkého množství různorodých experimentů, který na univerzitě probíhaly a také v neposlední řadě do jejich tradičního pátečního kvízu.

Dále bych rád poděkoval své spolužačce Sabině Bednářové, se kterou jsme řešili velké množství komplikací obou našich diplomových prací, i když se věnovaly zcela odlišným tématům. Vzájemná morální podpora byla také velice důležitá a množství při psaní snědených nachos znepokojující.

Nakonec patří opět poděkování také mé rodině, která měla v průběhu této práce pravděpodobně ještě menší představu, o co v ní jde než v případě bakalářské práce, ale i tak se se zvědavostí nadále vyptávali. Jejich zájem byl opět velkým přínosem.

## Název práce

Hyperdimenzionální zobrazování jednopixelovou kamerou

## Abstrakt

Tato diplomová práce se zaměřuje na použití jednopixelové kamery (SPC) ve dvou odlišných měřicích principech – hyperspektrálním zobrazování a mikroskopii fluorescenčního dohasínání (FLIM). Pro seznámení se s druhým zmíněným principem byla ve spolupráci s Univerzitou v Bergenu (UiB) otestována jejich FLIM sestava a získána data pro porovnání s těmi z naší jednopixelové kamery. Na námi navržené a vytvořené experimentální sestavě v laboratořích TOPTEC byly poté ověřeny schopnosti prostorového rozlišení a určování doby dohasínání a sestava byla otestována v obou konfiguracích na několika vhodně zvolených vzorcích poskytujících různorodá data v oblasti spektra i fluorescenčního dohasínání ze kterých poskytla uspokojivé výsledky.

## Klíčová slova

Komprimované snímání, jednopixelová kamera, DMD, náhodné masky, prostorové rozlišení, hyperspektrální zobrazování, spektrometr, absorpční spektrum, fotoluminiscence, fluorescence, excitace, emise, FLIM, doba dohasínání, TCSPC, fluorescenční barviva, scintilační krystaly

## Title of thesis

Hyperdimensional Imaging with a Use of Single-pixel Camera

## Abstract

This diploma thesis focuses on the use of a single-pixel camera (SPC) in two different measuring principles – hyperspectral imaging and fluorescence-lifetime imaging microscopy (FLIM). To become familiar with the second one a FLIM setup has been tested in cooperation with University in Bergen (UiB) and data has been gathered to be compared with those from our single-pixel camera. On our experimental setup, which was designed and constructed within TOPTEC laboratories, both spatial resolution and lifetime estimating have been studied and the setup has then been tested in both configurations on various selected samples providing diverse data in both the spectrum and fluorescence lifetime yielding satisfying results.

## Key words

Compressed sensing, single-pixel camera, DMD, random patterns, spatial resolution, hyperspectral imaging, spectrometer, absorption spectra, photoluminescence, fluorescence, excitation, emission, FLIM, fluorescence lifetime, TCPSC, fluorescent dyes, scintillation crystals

# Obsah

<b>ÚVOD</b>	<b>17</b>
<b>1 MĚŘÍCÍ PRINCIPY</b>	<b>18</b>
1.1 MĚŘENÍ FOTOLUMINISCENCE	18
1.2 HYPERSPEKTRÁLNÍ SNÍMÁNÍ	28
<b>2 KOMPRIMOVANÉ SNÍMÁNÍ</b>	<b>32</b>
2.1 MASKY PRO KOMPRIMOVANÉ SNÍMÁNÍ	35
2.2 DETEKCE V KOMPRIMOVANÉM SNÍMÁNÍ	37
2.3 REKONSTRUKCE V KOMPRIMOVANÉM SNÍMÁNÍ	38
<b>3 FLIM BERGEN</b>	<b>40</b>
3.1 POSTUP MĚŘENÍ	41
3.2 TESTOVÁNÍ VZORKŮ	44
<b>4 HYPERDIMENZIONÁLNÍ SNÍMAČ</b>	<b>56</b>
4.1 EXPERIMENTÁLNÍ SESTAVA	56
4.2 POSTUP MĚŘENÍ	59
4.3 PSEUDOPŘIBLÍŽENÍ OBRAZU	62
4.4 TESTOVÁNÍ ČASOVÉ SLOŽKY	65
4.5 HYPERDIMENZIONÁLNÍ MĚŘENÍ	67
<b>5 SROVNÁNÍ HYPERDIM. MIKROSKOPU S FLIMEM UIB</b>	<b>75</b>
<b>6 ZÁVĚR</b>	<b>76</b>
<b>ZDROJE</b>	<b>79</b>





# Seznam obrázků

Obrázek 1: Jablonského diagram popisující princip fotoluminiscence v systémech s energetickými hladinami (FSU, 2017)	18
Obrázek 2: Absorpční a emisní spektrum fluoresceinu (Zhang, 2018)	19
Obrázek 3: Časová doména fluorescence, červeně znázorněný pokles intenzity emise (Lakowicz, 2006)	21
Obrázek 4: Křivka dohasínání systému s dvěma komponentami (Lakowicz, 2006)	21
Obrázek 5: Rozdílná multiexponenciální dohasínání (Lakowicz, 2006)	22
Obrázek 6: Měření TCSPC – záznam časových rozdílů mezi pulzy (a) a jeho zobrazení (b) v histogramu (Wei, 2017)	23
Obrázek 7: Tvorba dat v TCSPC (Lakowicz, 2006)	24
Obrázek 8: Jednofotonová a dvoufotonová excitace (Mostany, 2014)	24
Obrázek 9: Elektronické zpracování signálu TCSPC, blíže popsáno v textu (Lakowicz, 2006)	25
Obrázek 10: Fluorescence DAPI (modře) vázaného na jádra buněk (Henty-Ridilla, 2016)	26
Obrázek 11: Zatímco fluorescenční mikroskopie může poskytnout pouze informaci o intenzitě (vlevo), FLIM dokáže vytvořit i obraz dob dohasínání (Lakowicz, 2006)	27
Obrázek 12: Dohasínání DAPI vázaného na chromozomy měřené pomocí FLIMU (Estandarte, 2016)	28
Obrázek 13: Schéma použitého spektrometru (více popsáno v textu níže) Ocean Optics Flame-S (Ocean Optics, 2019)	28
Obrázek 14: Různé typy hyperspektrálního snímání (Wang, 2017)	29
Obrázek 15: Hyperspektrální snímání jednopixelovou kamerou (Klein, 2019)	31
Obrázek 16: Minimální pozorovatelný rozdíl ve formátech RAW a .jpeg při velkém rozdílu ve velikosti dat (Candes, 2010)	32
Obrázek 17: Reprezentace dat v obrazu (vpravo) pomocí frekvenčních koeficientů (vlevo) a příklady této reprezentace (Technote, 2011)	33
Obrázek 18: Angiografie klasickým a komprimovaným snímáním. Se zvyšujícím se podvzorkováním klesá kvalita klasické fotografie výrazně rychleji, zatímco ta z komprimovaného snímání zůstává prakticky stejná. (Michael Lustig, 2007)	34
Obrázek 19: Schéma jednopixelové kamery (Candes, 2010)	35
Obrázek 20: Princip optického difusoru, který se využívá k tvorbě koherenčního zrnění (Klein, 2019)	36
Obrázek 21: Vnitřní stavba jednotlivých zrcátek DMD (Hornbeck, 1997)	37
Obrázek 22: Sestava experimentu FLIM v laboratoři UiB	40
Obrázek 23: UI softwaru Leica LAS pro nastavení jednotlivých částí sestavy	41
Obrázek 24: Živý náhled LAS	42
Obrázek 25: Výsledky měření TCSPC	43
Obrázek 26: Roztok Rhodaminu B v ethanolu	45
Obrázek 27: Histogram dob dohasínání Rhodaminu B ve vodě při molaritě $10^{-3}$ M	45
Obrázek 28: Histogram dob dohasínání Rhodaminu B v ethanolu při molaritě $10^{-2}$ M	46
Obrázek 29: Roztok kumarinu v ethanolu	46
Obrázek 30: Histogram dob dohasínání Kumarinu 6 v ethanolu při molaritě $10^{-2}$ M	47
Obrázek 31: Histogram dob dohasínání Kumarinu 6 v methanolu při molaritě $10^{-2}$ M	47
Obrázek 32: Histogram dob dohasínání luciferové žluti v methanolu při molaritě $10^{-2}$ M	48
Obrázek 33: Roztok Fluoresceinu v methanolu	48
Obrázek 34: Histogram dob dohasínání Fluoresceinu v ethanolu při molaritě $10^{-3}$ M	49
Obrázek 35: Histogram dob dohasínání Fluoresceinu v methanolu při molaritě $10^{-3}$ M	49
Obrázek 36: Mikroskopická fotografie preparátu konvalinky	50
Obrázek 37: Intenzitní zobrazení okraje řezu konvalinky	51
Obrázek 38: Časové komponenty dohasínání konvalinky (vpravo) a jejich procentuální váhy (vlevo)	51
Obrázek 39: Intenzitní zobrazení spodní strany živého listu rododendronu	52
Obrázek 40: Časové komponenty dohasínání spodní strany živého listu rododendronu (vpravo) a jejich procentuální váhy (vlevo)	53
Obrázek 41: Intenzitní zobrazení svrchní strany suchého listu pokojové palmy	54
Obrázek 42: Časové komponenty dohasínání suchého listu pokojové palmy (vpravo) a jejich procentuální váhy (vlevo)	54
Obrázek 43: Spálený vzorek polykrystalických mikrostruktur a záběr z měření v momentě spálení (místo měření červeně vyznačeno)	55
Obrázek 44: Sběr světla z DMD pomocí kolimátoru s difusorem – uspořádání použité pro hyperdimenzionální snímač (Klein, 2019)	56
Obrázek 45: Vytvořená sestava pro hyperdimenzionální snímání (více popsáno v textu níže)	57
Obrázek 46: Detail součástí umístěných za vzorkem. Zleva doprava je zde možné vidět umístěný vzorek, mikroskopový objektiv, clonu a optický filtr.	58
Obrázek 47: Sběr světla z nového DMD	59
Obrázek 48: Vliv úpravy váhového faktoru na výslednou rekonstrukci	60
Obrázek 49: Křivky dohasínání jednotlivých bodů obrazu kombinovaného vzorku Rhodaminu 6G a scintilačního krystalu před a po časových úpravách	61
Obrázek 50: Příklad hodnot na detektoru pro masku $2 \times 2$ . Bílé čtverce mají relativní intenzitu 1, černé 0, červeně označené jsou měřeny detektorem.	62

Obrázek 51: Maska vytvářená pouze na části DMD pro zobrazení menší oblasti dopadajícího obrazu	63
Obrázek 52: Zobrazení USAF skupiny 5, elementů 4 až 6 v hyperspektrálním snímání s faktorem přiblížení 2	64
Obrázek 53: Zobrazení USAF skupiny 5, elementu 5 v hyperspektrálním snímání s faktorem přiblížení 1	65
Obrázek 54: Analýza dohasínání fluoresceinu v hyperdimenzionálním snímači	66
Obrázek 55: Histogram dob dohasínání Fluoresceinu v ethanolu při molaritě $10^{-3}$ M získaný z hyperdimenzionálního snímače	66
Obrázek 56: Hyperspektrální zobrazení střípků scintilačního krystalu. Je zde možné vidět absorpci vzorku v modrých vlnových délkách a rozptyl (nízká zaznamenaná intenzita) na hranách jednotlivých střípků v celém spektru	67
Obrázek 57: Fluorescenční dohasínání střípků scintilačního krystalu. Největší intenzitu emise je možné pozorovat na hranách střípků krystalu.	68
Obrázek 58: Analýza intenzity a doby dohasínání vzorku scintilačního krystalu	69
Obrázek 59: Schéma kombinovaného vzorku testovaného v hyperdimenzionálním snímači	69
Obrázek 60: Hyperspektrální zobrazení kombinovaného vzorku. Rhodamin 6G silně absorbuje ve vlnových délkách 480-560 nm, scintilátor mezi 430-480 nm.	70
Obrázek 61: Fluorescenční dohasínání kombinovaného vzorku	71
Obrázek 62: Analýza dohasínání kombinovaného vzorku	71
Obrázek 63: Hyperspektrální zobrazení preparátu konvalinky upravené podle intenzity zdroje	72
Obrázek 64: Analýza dvouexponenciálního dohasínání preparátu konvalinky	73

## Úvod

Tato diplomová práce se zabývá 2D zobrazováním optických vlastností vzorků pomocí transmise nebo jejich vlastní fluorescenční emise. Díky tomu se o těchto vzorcích můžeme dozvědět velké množství informací užitečných pro jejich další použití v řadě aplikací, jako je příprava scintilátorů nebo studium biologických vzorků. Pro toto zobrazování se ve většině případů používá klasické zobrazování. Jeho problémem je ovšem nutnost značně složité konstrukce, ve které je zapotřebí specializovaný detektor pro každý bod obrazu. V této práci bylo testováno použití komprimovaného snímání jako alternativy pro zobrazování těchto vlastností.

Velkou výhodou komprimovaného snímání (a s ním i jednopixelové kamery) je potřeba pouze jednoho detektoru pro vytvoření obrazu dvourozměrné scény. Ve složitých aplikacích vyžadujících tak může systém založený pouze na jednom takovém poskytovat významnou alternativu s výrazně nižší pořizovací cenou. U jednopixelové kamery je navíc možné sbírané světlo analyzovat jakýmkoliv způsobem pouze připojením příslušného detektoru (a využitím vhodného zdroje světla) a velká část snímače tak může být bez úprav sdílena pro několik principů měření.

Tohoto faktu je cílem s výhodou využít v této práci a vytvořit sestavu pro komprimované snímání schopnou kombinovat dva takové principy – hyperspektrální zobrazování a měření fluorescenčního dohasínání (FLIM). Společně tyto principy umožní získat více informací o zkoumaných vzorcích a aplikace obou dvou na jeden vzorek ve stejném místě umožňuje komplexnější analýzu v porovnání s klasickými sestavami specializovanými většinou pouze na využívání jednoho zobrazovacího principu.

Zatímco hyperspektrální zobrazení již bylo částečně testováno v mé bakalářské práci [1], s měřením fluorescenčního dohasínání bylo nejprve zapotřebí se seznámit. Toho bylo dosaženo ve spolupráci s Univerzitou v Bergenu (UiB) a doktorem Arnem Kristoffersenem, který byl nápomocen v seznámení s místní FLIM sestavou a zároveň je autorem dvou článků použitých pro porovnání naměřených dat.

Pro zkoumání vzorků tedy bylo cílem sestavu použitou v bakalářské práci upravit tak, aby dokázala měřit oba dva principy s minimálním množstvím úprav pro stejný vzorek. Navržený hyperdimenzionální snímač na bázi komprimovaného snímání poté byl otestován na několika různých vzorcích s odlišnými vlastnostmi v oblasti spektra a fluorescenčního dohasínání a bylo provedeno jeho srovnání ve FLIM měření s bergenskou sestavou. Podařilo se nám ukázat, že pomocí naší soustavy můžeme získat hyperspektrální zobrazení i 2D mapu fluorescence a fluorescenčního dohasínání, jejíž výsledky souhlasí s těmi z klasického FLIMu.

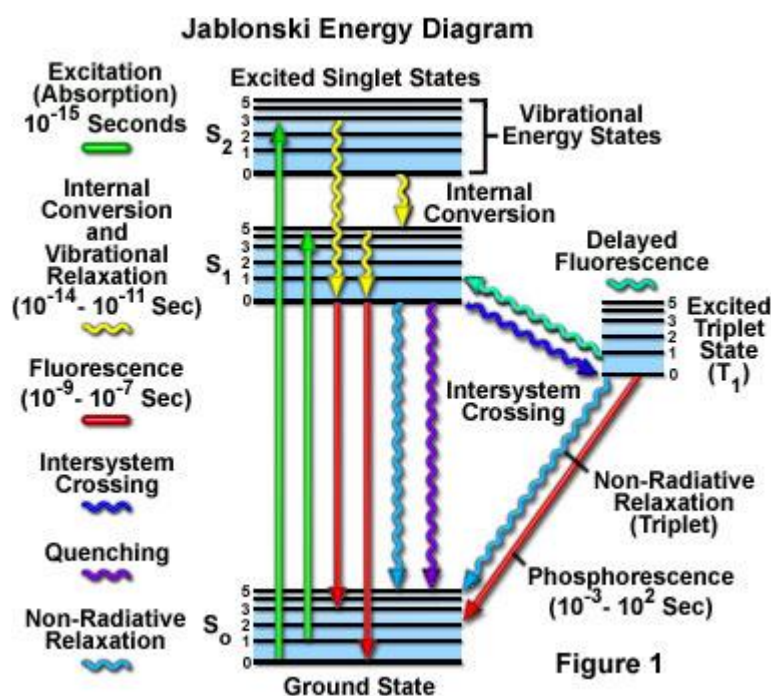
V kapitole 1 se budeme věnovat detailnímu popisu obou měřicích principů a přístrojů použitých k jejich měření, v kapitole 2 poté popíšeme komprimované snímání, generování masek, sběr dat a rekonstrukce obrazu z nich. Třetí kapitola se věnuje měření provedenému na klasické sestavě FLIM ve spolupráci s UiB a testování vzorků pro pozdější porovnání s naší sestavou. Té se poté věnuje kapitola 4. V ní bude popsáno uspořádání sestavy, způsoby měření a výsledky pro oba typy měřicích principů. Kapitola 5 se poté věnuje porovnání měření fluorescenčního dohasínání pomocí obou sestav.

# 1 Měřící principy

Aby bylo dosaženo vzniku hyperdimenzionálního snímače, je potřeba využít několik různorodých měřících principů, které poskytují různé informace o měřeném vzorku. Níže popsané principy mohou s výhodou využít komprimované snímání, díky kterému lze mezi nimi snadno přecházet a využívat je k měření jednoho vzorku bez nutnosti přesunu mezi různými aparaturami.

## 1.1 Měření fotoluminiscence

Fotoluminiscence je důležitý jev pro mnoho oblastí výzkumu.[2] Díky ní je například možné pozorovat jinak nepříliš kontrastní vzorky v mikroskopii, které by při klasickém osvětlení byly špatně viditelné. Díky rozdílům v chování fotoluminiscence můžeme určit chemické složení vzorku nebo nalézt například lokální odlišnosti v koncentraci a zastoupení fotoluminiscenčních látek.

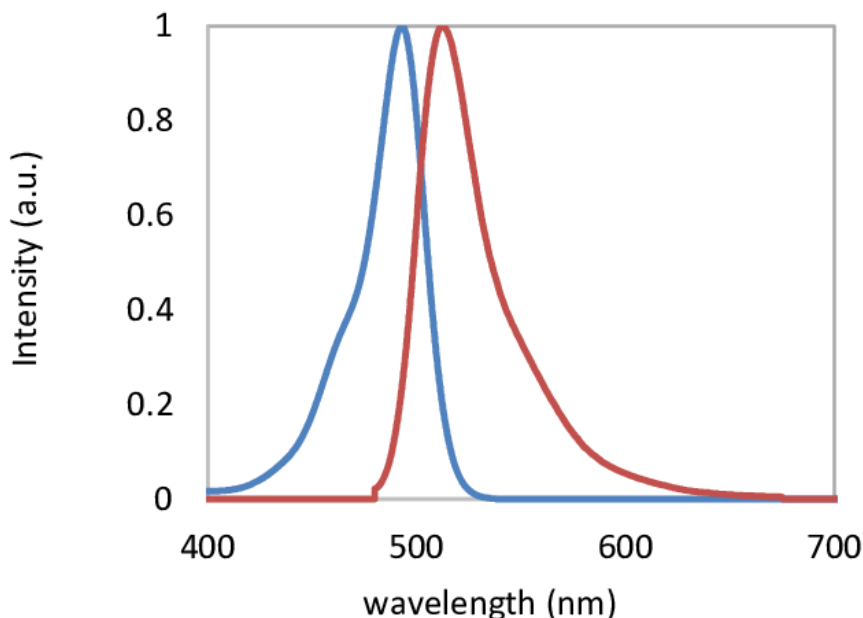


Obrázek 1: Jablonskéhoho diagram popisující princip fotoluminiscence v systémech s energetickými hladinami (FSU, 2017)

V každém atomovém orbitalu se nachází dva elektrony definované stejným hlavním, vedlejším a magnetickým kvantovým číslem. Odlišují se pouze číslem spinovým (nesmí mít všechna čtyři čísla stejná – Pauliho vylučovací princip). Tyto dva elektrony poté tvoří elektronový pár. V látkách poté vznikají díky velkému množství atomů a molekul energetické hladiny nebo pásy. My se zde zaměříme především na diskrétní energetické hladiny, které se vyskytují v jednodušších systémech. V závislosti na uspořádání a složení mohou tyto hladiny mít různé polohy na energetickém spektru a také různé šířky. To je možné vidět na obrázku 1 v takzvaném Jablonskéhoho diagramu, který popisuje děje probíhající mezi jednotlivými hladinami. Elektrony v těchto hladinách ale nadále vykazují párové vlastnosti. Na počátku fotoluminiscence je proces excitace – foton o dostatečné energii interaguje s jedním z elektronů z páru, svou energii mu předá a tím ho posune na vyšší energetickou hladinu. Ihned poté dochází k vnitřní konverzi,

relaxaci vibračních stavů a s nimi spojenému přesunu elektronu na nejnižší energetickou hladinu excitovaného stavu. Tím elektron přijde o část energie získané z prvotní interakce s excitujícím fotonem. Jelikož si elektron s nejvyšší pravděpodobností udrží stále stejný spin, bude mít tendenci se vracet do původního elektronového páru. Klesne tedy z excitovaného stavu do základního, obnoví elektronový pár a odevzdá energii. Tento přechod může být zářivý nebo nezářivý. Při zářivém přechodu je energie uvolněna ve formě fotonu a dochází k takzvané fluorescenci. V případě nezářivého přechodu se energie uvolní v jiných formách, nejčastěji takzvaných fononů – vibrací mezi atomy, a ke vzniku fotonu nedochází. Excitované elektrony mohou v některých případech svůj spin změnit, což zamezuje přímému návratu do původního páru. Zde dochází k takzvanému mezisystémovému přechodu na energeticky nižší metastabilní hladinu. Elektron tak opět odevzdá část své energie a spin se opět srovná s párovým elektronem na základní hladině. Z metastabilní hladiny se poté může opět zářivým nebo nezářivým přechodem vrátit do původního páru. Zářivému přechodu v tomto případě říkáme fosforescence. Oproti fluorescenci je fosforescenční spektrum ještě více posunuté k větším vlnovým délkám kvůli množství ztracené energie. Vzhledem k počtu procesů, které musí ve fosforescenci proběhnout současně, je pravděpodobnost tohoto přechodu nižší, a proto k ní také dochází výrazně pomaleji, čehož lze využít v různých aplikacích s potřebou dlouhodobého vyzařování fotonů, například značení únikových východů, které září několik minut po výpadku proudu a osvětlení místnosti.[3]

Všechny děje popsané v Jablonského diagramu mají pravděpodobnostní charakter. Interakce excitujícího fotonu s elektronem na základní hladině nemusí vždy proběhnout. Po excitaci jsou také různé pravděpodobnosti přechodu elektronu na jednotlivé energetické hladiny, díky čemuž při fluorescenci nebude vzorek vyzařovat pouze světlo jedné vlnové délky, ale spíše v určitém intervalu. Zároveň může dojít k nezářivému přechodu, při kterém nebude žádné světlo zaznamenáno nebo změně spinu a tím způsobenému přechodu na metastabilní hladinu.



Obrázek 2: Absorpční a emisní spektrum fluoresceinu (Zhang, 2018)

Jelikož při vnitřní konverzi a relaxaci vibračních stavů přichází elektron o část energie z excitace, dojde při fluorescenci k vyzaření fotonu o nižší energii, a tedy nižší frekvenci a větší vlnové délce, než měl původní excitující foton. Z tohoto důvodu jsou absorpční a emisní spektra

oproti sobě posunuta, jako je možné vidět na obrázku 2. [4] V praxi to při měření umožňuje jednoduché oddělení emisního spektra, které chceme zkoumat, od použitého excitujícího světla (nejčastěji laseru o specifické vlnové délce).

### 1.1.1 Časová doména měření

V souvislosti s fotoluminiscencí, a především fluorescencí, se studuje také časová složka těchto jevů. Fluorescence v čistých látkách probíhá v řádu několika nanosekund až mikrosekund a jedná se tedy o velice rychlý jev. V některých případech může být dohasínání ale i výrazně rychlejší. Dochází k tomu nejčastěji za přítomnosti nečistot nebo v místech rozhraní mezi dvěma látkami. V takových případech se v Jablonského diagramu objevuje více energetických hladin a elektron tak z vyšších hladin na základní může klesat rychleji odevzdáváním menších množství energie. Doba dohasínání v těchto místech může klesnout do řádu femtosekund. [5, 6]

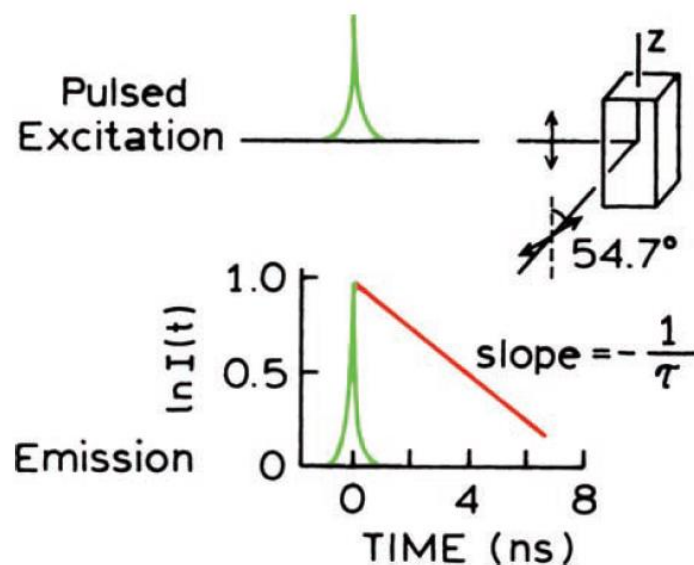
Časová doména tak poskytuje velké množství informací o složení studovaného vzorku, jeho uspořádání, lokálních defektech a je tedy výhodné jej měřit. Využit lze například k určení čistoty vyrobeného křemíku.[6] Jak již bylo naznačeno, pokud by se v krystalu nacházely nečistoty, objevily by se v dohasínání extrémně rychlé složky dohasínání indikující vady. Tento jev lze vytvořit také uměle a využít rychlého dohasínání upraveného křemíku. Doba dohasínání čistého křemíku, která se pohybuje mezi 10 až 100  $\mu\text{s}$ , může být zařazením jiných struktur snížena až do řádu jednotek ps.

Hlavním parametrem v časové době je doba dohasínání vzorku. Intenzitu emitovaného světla  $I(t)$  můžeme v jednoduchém jednosložkovém případě vyjádřit jako

$$I(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right). \quad (1.1)$$

V rovnici (1.1) představuje  $I_0$  intenzitu v čase  $t=0$  a  $\tau$  dobu dohasínání. Tato veličina vyjadřuje průměrnou dobu, která uběhne mezi excitací elektronu a jeho návratem na základní energetickou hladinu, a je hlavním parametrem používaným pro charakterizaci časové domény fluorescence.[7] Ze vzorce (1.1) je patrné, že tato veličina odpovídá času, kdy intenzita emise klesne na  $1/e$  intenzity  $I_0$ . Čím delší je doba dohasínání, tím menší sklon má křivka závislosti logaritmu intenzity emise na čase (viz obrázek 3).





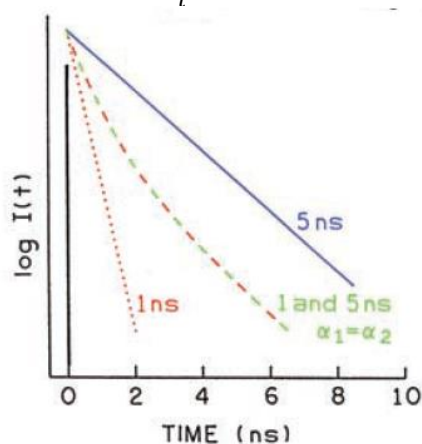
Obrázek 3: Časová doména fluorescence, červeně znázorněný pokles intenzity emise (Lakowicz, 2006)

Reálné vzorky často vykazují více složek dohasínání. Toto může být způsobeno přítomností více fluorescenčních látek nebo látky, která sama o sobě má složitější vícesložkové dohasínání. Rovnice (1.1) se poté mění na sumu příspěvků jednotlivých komponent

$$I(t) = \sum_i \alpha_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right). \quad (1.2)$$

V reálných podmínkách je v kombinaci s časovou složkou složité sledovat zároveň celkovou intenzitu světla. Její celková hodnota je zároveň závislá na větším množství faktorů, které nemusí mít spojitost se zkoumaným vzorkem (například koncentrace fluorescenčního barviva). Intenzita světla  $I(t)$  v rovnici (1.2) je tedy nejčastěji vyjádřena relativně. Její jednotlivé komponenty jsou tvořeny dvěma parametry –  $\alpha_i$ , který představuje procentuální zastoupení dané komponenty, a  $\tau_i$ , který odpovídá době dohasínání dané komponenty. Vzhledem k relativnímu charakteru tohoto vyjádření musí platit

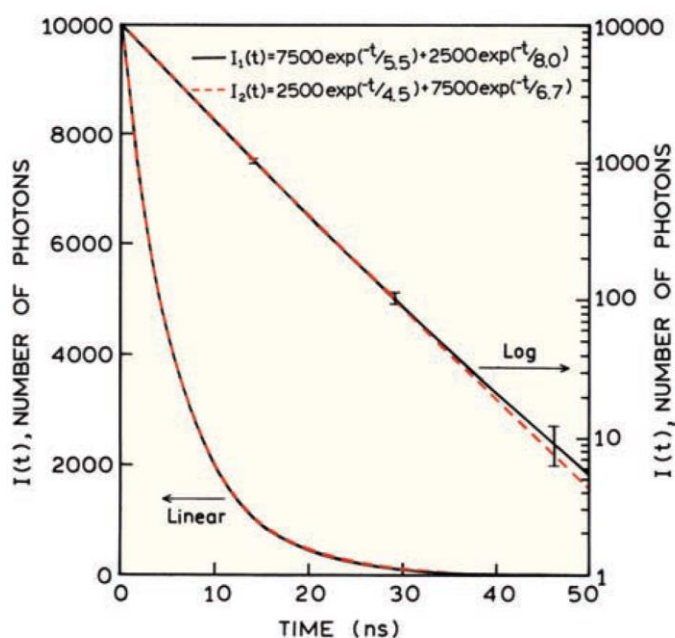
$$\sum_i \alpha_i = 1. \quad (1.3)$$



Obrázek 4: Křivka dohasínání systému s dvěma komponentami (Lakowicz, 2006)

Při multiexponenciálním dohasínání dochází v logaritmické závislosti intenzity na čase k zakřivení oproti přímce jednoexponenciálního dohasínání, jak je vidět na obrázku 4. Zde jsou ve stejném poměru kombinovaná dohasínání  $\tau_1=1\text{ ns}$  (červená tečkovaná) a  $\tau_2=5\text{ ns}$  (modrá plná) do dvouexponenciální křivky (červeno-zelená čárkovaná).

Velikým problémem v reálném měření multiexponenciálních systémů je jejich statistický charakter, který může způsobit nejednoznačnost analýzy. Exponenciální křivky dohasínání pro méně rozdílné koeficienty vykazují vysokou vzájemnou korelaci (například ve srovnání s harmonickými funkcemi, které se i při malém rozdílu frekvencí po delším čase rozcházejí). Jednu křivku může reprezentovat více kombinací komponent a jejich váhových faktorů. Obrázek 5 ukazuje dvě různé kombinace vytvářející velice podobné výsledné křivky. V reálné situaci nelze experimentálně vybrat správnou kombinaci komponent a je zapotřebí využít znalosti některých ze zastoupených složek a jejich vlastních dob dohasínání. Nejednoznačnost multiexponenciální křivky se snižuje, pokud jsou její komponenty výrazně odlišných hodnot (nejlépe alespoň o řád).



Obrázek 5: Rozdílná multiexponenciální dohasínání (Lakowicz, 2006)

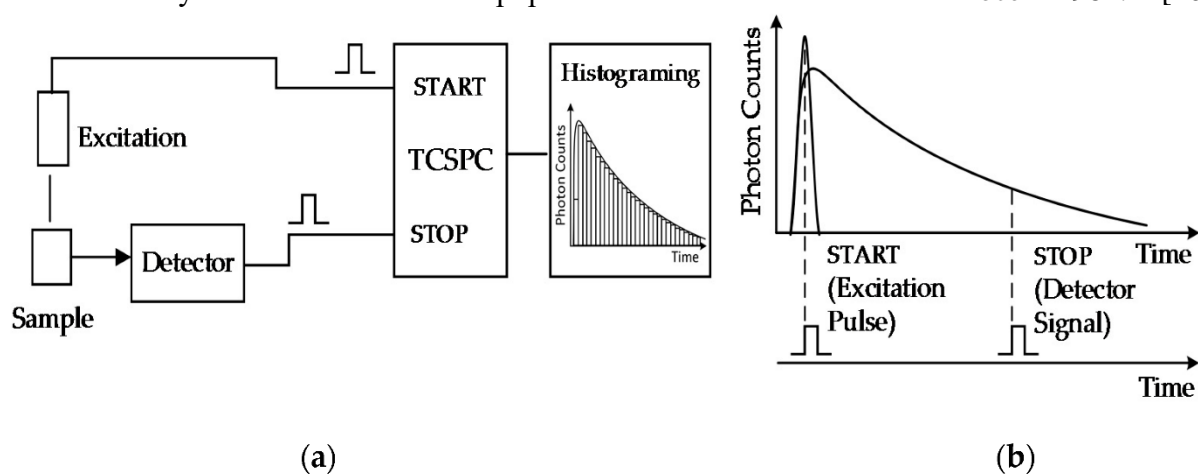
### 1.1.2 Metoda TCSPC

Existuje několik metod, jak měřit dohasínání vzorku, jejichž výběr závisí hlavně na požadovaném časovém rozlišení. Jednou z nich je takzvaná rozmitací kamera.[8] V ní se zachytávají fotony z dohasínání (či jiného procesu, kde sledujeme kombinaci času a intenzity světla) na fotokatodu a vytváří dále putující elektrony (počet elektronů závisí na intenzitě dopadajícího světla). Tyto elektrony prolétávají mezi dvěma elektrodami, na kterých je lineárně v průběhu měření zvyšováno napětí. Elektrony, které proletí dříve, jsou odchýleny méně než pozdější. Rozmítnuté elektrony jsou poté mnohonásobně zesílené na MCP (micro-channel plate) a nakonec dopadají na fosforovou plochu, kde opět vyvolají fotony. Systém tedy rozlišuje intenzitu (počet vzniklých elektronů, jejich zesílení a později opět fotonů), čas na jedné ose (míra vychýlení elektrodami) a jednu prostorovou souřadnici na druhé ose. Druhým způsobem měření je fluorescenční up-konverze.[9] Ta využívá skladbu dvou signálů na nelineárním



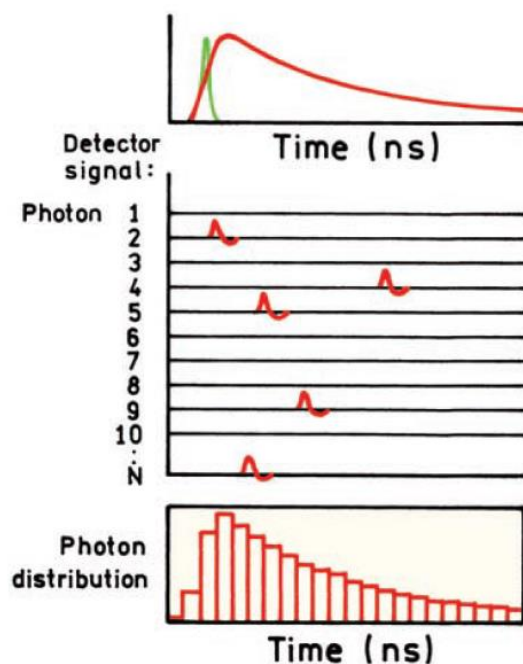
krystalu. Excitační paprsek je rozdělen do dvou větví, jedna z nichž je poté zpomalena na optické zpoždovací lince. Druhým je excitován vzorek a emitovaný signál je spolu se zpomaleným paprskem nasměrován do nelineárního krystalu. Intenzita světla z krystalu vystupující je úměrná součinu obou dopadajících paprsků a jelikož intenzitu zpomaleného paprsku můžeme stabilizovat, závisí pouze na intenzitě emitovaného světla v danou chvíli. Úpravou zpoždění tak můžeme skenovat napříč časovou složkou dohasínání a sledovat intenzitu jednotlivých úseků. Obě metody jsou velice citlivé, ale vyžadují kvalitně vyrobené neelektronické prvky (MCP, fosforový luminofor, nelineární krystaly), které značně zvyšují jejich výslednou cenu.

Pro měření doby dohasínání vzorku se tak často využívá také metoda TCSPC (time-correlated single photon counting, časově korelované zaznamenání jednoho fotonu). Tato metoda se k měření dohasínání začala používat v šedesátých letech minulého století s rozvojem pulzních laserů a byla velice detailně popsána v dedikované knize v roce 1984. [10]



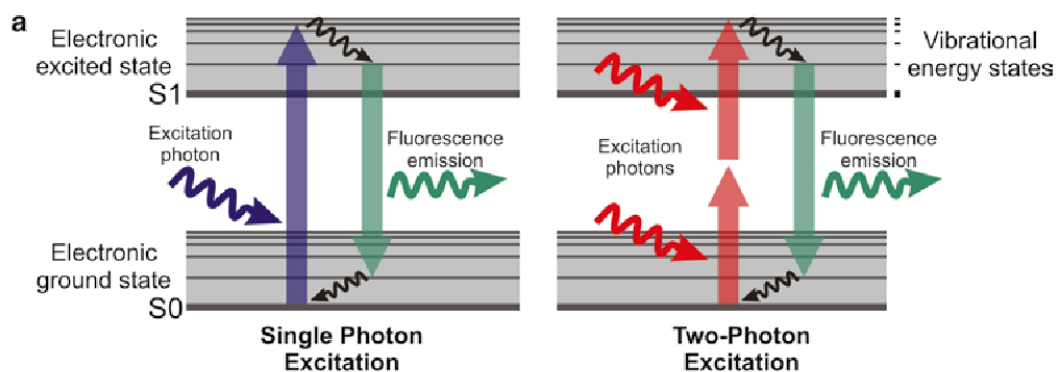
Obrázek 6: Měření TCSPC – záznam časových rozdílů mezi pulzy (a) a jeho zobrazení (b) v histogramu (Wei, 2017)

Na obrázku 6 je možné vidět zjednodušený princip fungování TCSPC.[11] Základem této metody je již zmíněný pulzní laser nebo v dnešní době často také pulzní laserová dioda. Ten je zdrojem světla o pevně zvolené vlnové délce a zároveň poskytuje vysokou opakovací frekvenci krátkých pulzů, které jsou pro tuto metodu zásadní. TCSPC zaznamenává fotony ze dvou detektorů. První detekuje část laserového paprsku a slouží jako časová reference. Druhý detektor zachytává fotony získané z měřeného vzorku po excitaci. Systém poté porovnává časový rozdíl mezi příchozími signály z referenční a měřicí větve. Toto měření je mnohokrát opakováno a ze získaných časů je vytvořen histogram, který představuje křivku dohasínání vzorku (obrázek 7).



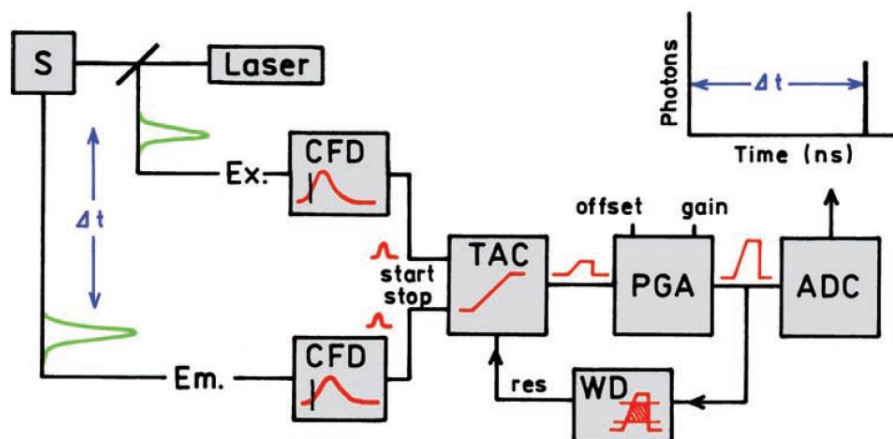
Obrázek 7: Tvorba dat v TCSPC (Lakowicz, 2006)

Excitace vzorku může být dvou typů – jednofotonová a dvoufotonová (obrázek 8). Při jednofotonové excitaci je vzorek přímo osvětlován laserovými pulzy o vlnové délce (a tedy frekvenci a energii), která umožní excitaci. U této metody je potřebné zajistit, aby se fotony, které neinteragovaly se vzorkem, nedostaly do detektoru, což lze vyřešit hranovým optickým filtrem, který propustí emitované světlo, ale ne excitující, které má kratší vlnovou délku. Dvoufotonová excitace funguje na principu dodání stejného množství energie za pomoci dvou fotonů o dvojnásobné vlnové délce (poloviční energii). Ty se ve vzorku setkají, oba předají energii elektronu a dostanou jej do excitovaného stavu. Tento proces s sebou nese několik výhod i nevýhod. Pravděpodobnost interakce elektronu s dvojicí fotonu je velice nízká a je tedy potřeba vyšší intenzity excitujícího záření. Použité záření při dvoufotonové excitaci navíc většinou vlnovými délkami již sahá do infračervené oblasti a není tedy lidským okem viditelné, což vede ke složitějšímu nastavování sestavy. Velkou výhodou této metody je relativně malý prostor, ve kterém se fotony setkávají v dostatečné intenzitě a můžeme díky tomu excitovat vybranou část vzorku nebo také vybranou hloubku. Infračervené světlo ve dvoufotonové excitaci zároveň mnohem lépe proniká biologickými vzorky, na které je nejčastěji používáno. Jednofotonová excitace může oproti tomu proběhnout kdekoliv při průchodu paprsku vzorkem.



Obrázek 8: Jednofotonová a dvoufotonová excitace (Mostany, 2014)

Obě měřicí větve TCSPC využívají CFD (constant fraction discriminator) analyzátory signálu z detektorů (obrázek 9). Ty nepoužívají pro určení času prahovou hodnotu intenzity, ale určitou procentuální hodnotu intenzity naměřeného maxima v pulzu. Pulz zachycený v CFD projde dvojicí odlišných úprav – jedna jeho kopie je zvolenou procentuální hodnotou vynásobena (a tím její hodnoty efektivně zmenšeny, druhá invertována a posunuta o čas, který uplynul mezi dosažením procentuální hodnoty a maxima. Tyto dvě křivky jsou poté sečteny a jako čas odeslaný z CFD dále do systému je vzat okamžik, kdy kombinovaná křivka protíná nulu. Pulzy z laseru mohou mít podle nastavení výkonu různou celkovou intenzitu, ale jejich tvar bude vždy stejný a CFD tedy zaznamená čas vždy ve stejném místě pulzu oproti klasické elektronice s jednoduchou mezní hladinou, která by u intenzivnějších impulzů poskytovala dřívější časy. Signál z CFD poté spouští TAC (time-to-amplitude converter, měnič času na amplitudu), který spustí uvnitř sebe lineární zvyšování napětí. Jakmile přijde signál z měřicí větve přes její CFD, zvyšování napětí je ukončeno. Napětí je poté přes programovatelný zesilovač napětí (PGA, programmable gain amplifier) předáno do A/D převodníku (ADC, analog-to-digital converter), který z napětí vytvoří numerickou hodnotu odpovídající určitému času, který je poté umístěn do histogramu. Aby se omezila chybná data, může systém pomocí diskriminátoru s okenní funkcí (WD, window discriminator) vyloučit všechna data mimo určitý interval přijatelných hodnot. Systémy TCSPC se většinou nastavují tak, aby nula časové osy byla v histogramu krátce před příchodem referenčního pulzu (viz Obrázek 7 nahoře) a interval přijatelných hodnot tedy většinou začíná krátce před očekávaným pulzem a končí před příchodem dalšího.



Obrázek 9: Elektronické zpracování signálu TCSPC, blíže popsáno v textu (Lakowicz, 2006)

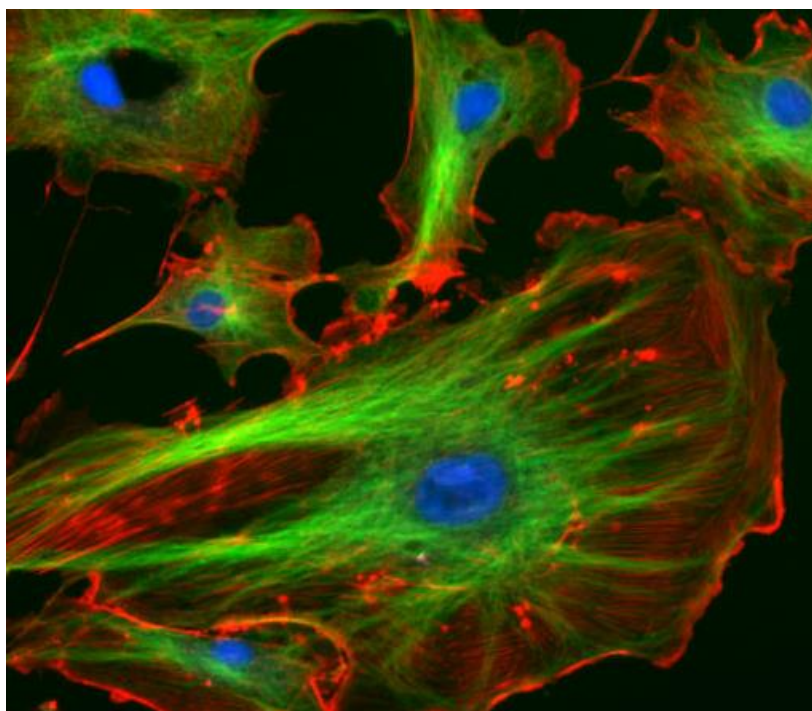
Pro vytvoření dobře analyzovatelné křivky dohasínání je tedy potřeba provést velké množství měření, aby vznikl dostatečný odstup signálu od jakéhokoliv šumu přítomného v systému. Ten může vznikat například v optické části detekováním světla z okolí nebo v elektronické části ve fotonásobičích a detektorech.

TCSPC vždy detekuje pouze první příchozí foton v měřicí větvi pro každou zaznamenanou referenci. Toto vytváří problém hlavně u vysoce svítivých vzorků nebo příliš efektivního sběru, kdy vzniká v systému preference pro záznam rychleji emitovaných fotonů a křivka dohasínání se uměle zkracuje směrem k rychlejší době dohasínání. Z tohoto důvodu se v systémech TCSPC nejčastěji efektivita nastavuje tak, aby byl detekován jeden emitovaný foton v průměru na každých 50-100 referenčních pulzů. Měření TCSPC většinou využívá pulzní lasery o vysoké frekvenci, jelikož fluorescence je velice rychlý děj a pro vytvoření histogramu je potřeba velké množství naměřených časů. Je důležité ale také vzít v úvahu vlivy, které omezují maximální

použitelnou frekvenci měření. Jedním z nich je fluorescence samotná. Pokud bychom zvolili příliš vysokou frekvenci laseru, nestihne vzorek dostatečně vyhasnout před další excitací (intenzita emitovaného světla by ideálně měla klesnout na 1-5 % počáteční hodnoty) a křivku dohasínání nebude možné naměřit. Vyhodnocovací elektronika, především TAC, také vyžaduje určitý čas pro restart a možnost zaznamenání dalšího času, který se již začíná omezovat s požadavky na frekvenci laseru. Z tohoto důvodu se častěji TCSPC používá v tzv. „reverzním módu.“ Jelikož má pulzní laser stabilní frekvenci, je známý čas mezi jednotlivými pulzy. TCSPC tedy čas začne naopak měřit až ve chvíli, kdy zaznamená emitovaný foton a porovnává ho s prvním po něm zaznamenaným referenčním fotonem. Vzhledem k výše zmíněnému poměru mezi počtem referenčních a měřicích pulzů získává elektronika dostatek času na restart před příchodem dalšího měřicího pulzu, který spustí nový průběh v TAC a v laseru může být zachována vysoká frekvence.

### 1.1.3 Fluorescence-Lifetime Imaging Microscopy

Již od počátku 20. století se ke studiu biologických vzorků, především na buněčné úrovni, a pevnolátkových mikrostruktur s úspěchem využívá fluorescenční mikroskopie. Zkoumaný vzorek může vykazovat vlastní vysokou fluorescenci (nejčastěji rostlinné vzorky) nebo může být obarven různými fluorescenčními barvivy. Správně zvolená fluorescenční barviva se v buňce dokáží vázat na specifické orgány nebo organické látky. Například Rhodamin 123 se v buňce váže prakticky výhradně k mitochondriím a DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol) preferuje specifické oblasti DNA (obrázek 10). [7, 12, 13]

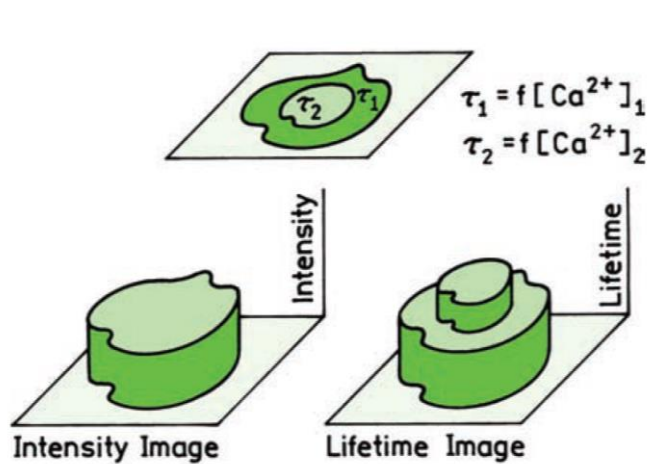


Obrázek 10: Fluorescence DAPI (modře) vázaného na jádra buněk (Henty-Ridilla, 2016)

Klasická fluorescenční mikroskopie ale dokáže rozlišit pouze intenzitu emise vzorku. Ta je ale způsobena kombinací koncentrace použitého barviva a látek, na které se váže. Z intenzitního zobrazení ale není možné určit, jestli je změna intenzity záření způsobena jedním či druhým. Jednou z možností je využití barviv, které v závislosti na koncentraci prvků ve vzorku mění své

emisní spektrum. V takovém případě nebude záležet na koncentraci barviva, ale v závislosti například na koncentraci vápníku zaznamenané spektrometrem jiné emisní spektrum.

Druhou možností je využití metody FLIM (fluorescence-lifetime imaging microscopy), která se poprvé ve vědeckých člancích začala objevovat na konci osmdesátých let.[14] Tato metoda dokáže vytvořit stejný intenzitní obraz jako fluorescenční mikroskopie, ale zároveň (nejčastěji za použití TCSPC) vytváří obraz dob dohasínání. Fluorescenční barviva totiž často na rozdílné koncentrace látek nereagují změnou intenzity emise, ale rychlostí přechodu na základní hladinu, a tedy změnou doby dohasínání (obrázek 11).

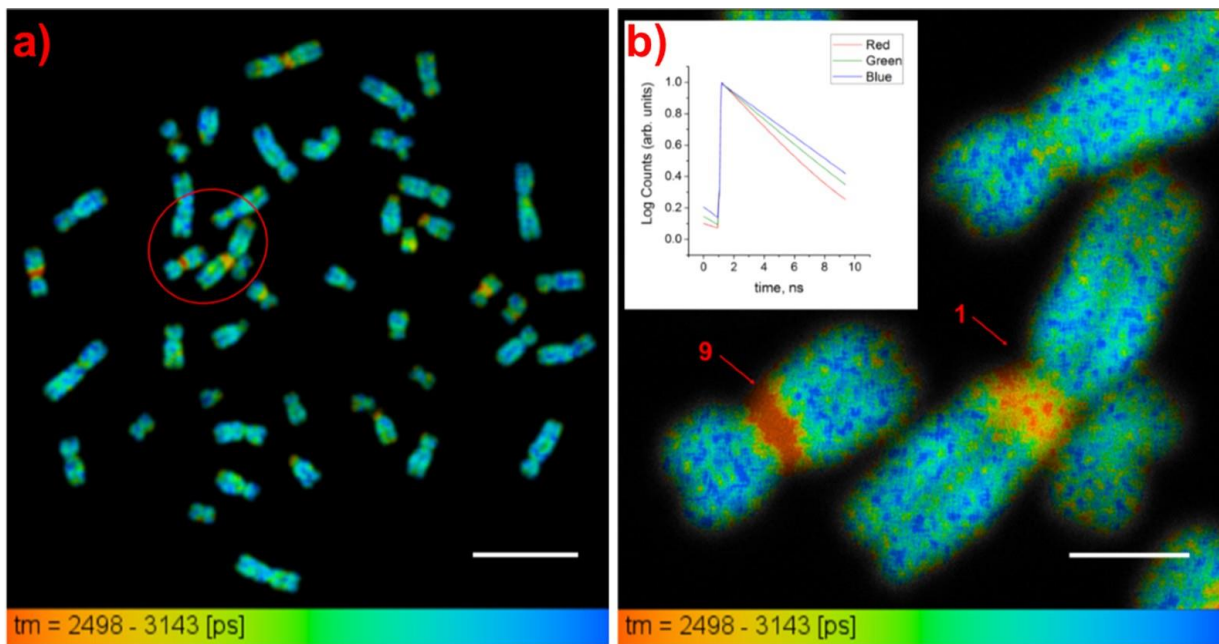


Obrázek 11: Zatímco fluorescenční mikroskopie může poskytnout pouze informaci o intenzitě (vlevo), FLIM dokáže vytvořit i obraz dob dohasínání (Lakowicz, 2006)

FLIM dokáže při dostatečné intenzitě osvětlení vytvořit křivku dohasínání pro každý bod obrazu (případně pouze pro body s dostatkem zachycených fotonů). Tyto křivky mohou být také multiexponenciální a oproti intenzitnímu nebo spektrálnímu měření fluorescence tak je možné odhalit přítomnost více látek nebo více komponent dohasínání jedné látky v jednom bodě.

Jeden z příkladů využití FLIM měření je možné vidět na obrázku 12. [12] Zde jsou ukázané chromozomy 1 a 9 s heteromorfickými oblastmi uprostřed, které vykazují rychlejší dohasínání navázaného DAPI barviva než zbytek chromozomu. Příliš široké heteromorfické oblasti na těchto chromozomech jsou často spojované s vlivem na střední délku života či plodnost a jsou cílem genetického výzkumu. FLIM tedy v této oblasti může pomoci odhalit potenciální genetické vady a usnadnit jejich analýzu.

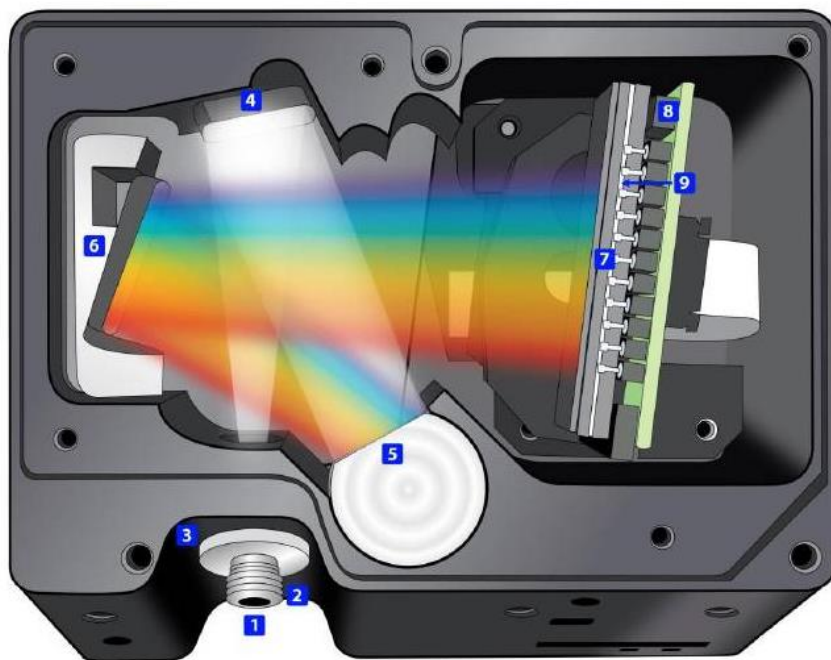




Obrázek 12: Dohasínání DAPI vázaného na chromozomy měřené pomocí FLIMU (Estandarte, 2016)

## 1.2 Hyperspektrální snímání

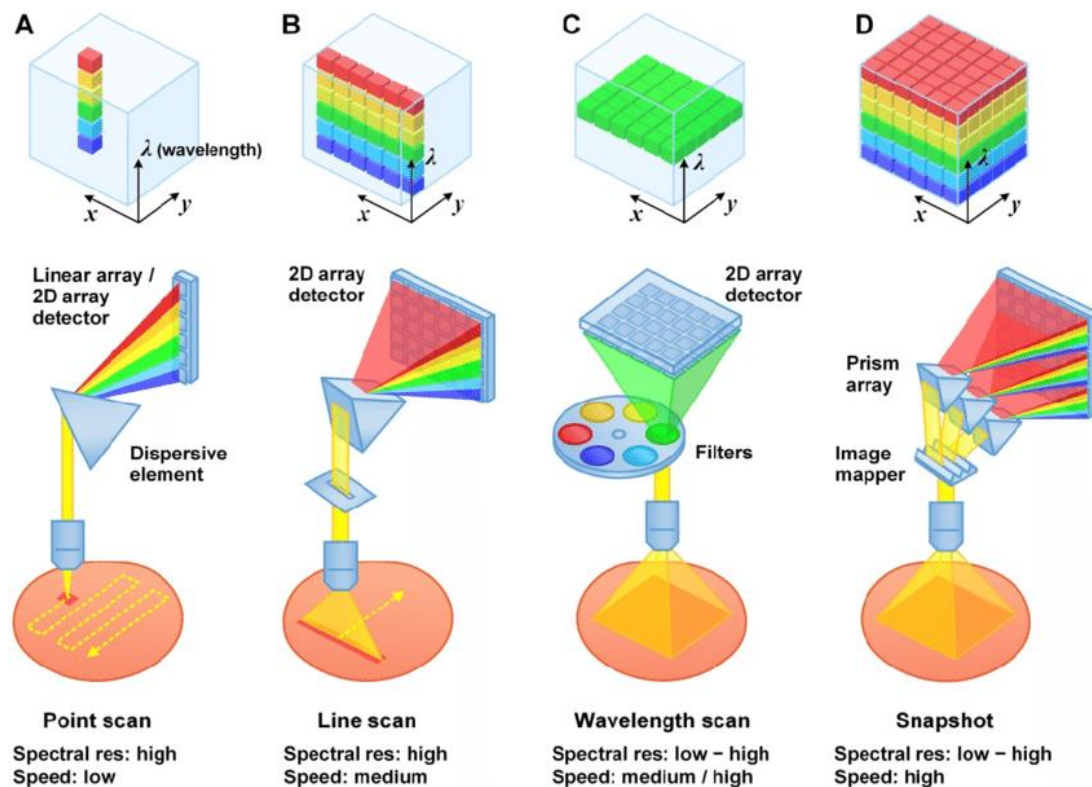
Druhým využitým měřicím principem je měření spekter – závislost intenzity světla na vlnové délce. Spektrální analýza může poskytnout v závislosti na uspořádání sestavy různé informace o zkoumaném vzorku. Při excitaci vzorku a pozorování fotoluminiscence můžeme získat emisní spektrum vzorku a při prosvícení vzorku širokopásmovým zdrojem světla můžeme na druhé straně zaznamenávat jeho absorpční spektrum. V naší sestavě jsme se zaměřili především na sledování absorpčního spektra.



Obrázek 13: Schéma použitého spektrometru (více popsáno v textu níže) Ocean Optics Flame-S (Ocean Optics, 2019)

Základním nástrojem pro měření spekter v současnosti jsou spektrometry. [15] Vlastnosti spektrometru jsou určeny především jeho typem – dominantně se používá tzv. Czerny-Turner uspořádání – a poté jeho vlastnostmi – například ohniskovou vzdáleností kolimačních zrcadel ve spektrometru, šířkou vstupní štěrbiny nebo hustotou vrypů na difrakční mřížce. Spektrometry s delší ohniskovou vzdáleností mají výhodu v minimalizaci optických vad, a tedy přesnější reprezentaci spektra. Šířka štěrbiny a parametry difrakční mřížky poté ovlivňují šířku a vzdálenost spektrálních čar na snímači.

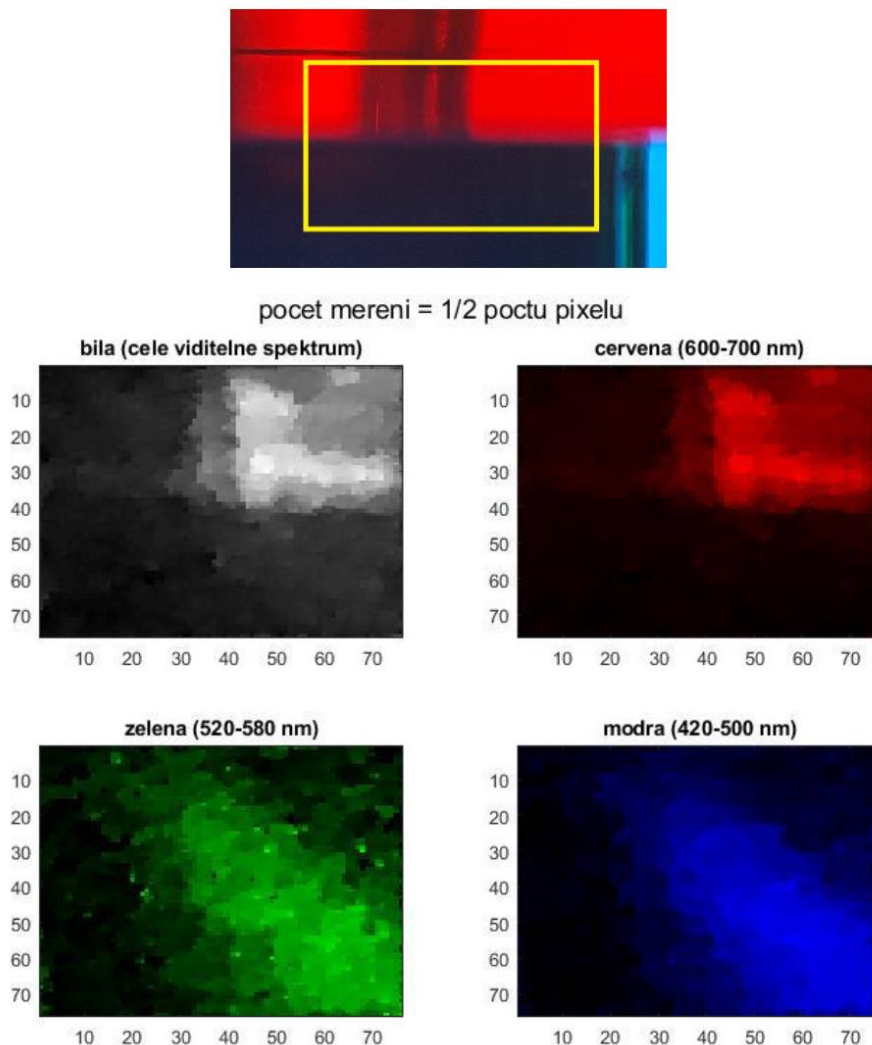
Moderní kompaktní vláknové spektrometry (obrázek 13 – spektrometr Flame-S použitý v této práci) umožňují napojení na optické vlákno a snadné měření jakékoliv světelné informace, která do optického vlákna vstupuje (a není pohlcována v jádru vlákna). V místě napojení optického vlákna (1) ke spektrometru se nachází vstupní štěrbina (3). Její šířka ovlivňuje množství ostrost spektra a intenzitu vstupujícího světla. Čím užší je zvolená štěrbina, tím přesnější spektrum získáváme (čára spektra monochromatického světla je na snímači méně rozmazaná), ale tím méně celkového světla do detektoru vstupuje a pro stejné naměřené intenzity je poté potřeba delší měření. Světlo ze štěrbiny je parabolickým zrcadlem (4) kolimováno na protilehlou blazeovanou difrakční mřížku (5). Difrakce do prvního řádu způsobí rozdělení světla podle vlnových délek, a to je poté přes další zrcadlo (6) promítáno na liniový detektor (7). V něm na každé místo dopadá specifická vlnová délka světla a pixely v daném místě měří její intenzitu. Některé spektrometry místo difrakce na mřížce využívají disperzi na hranolu. Takové spektrometry většinou fungují s menšími ztrátami intenzity, ale kvůli rozměrům optického hranolu a disperzi skla jsou také výrazně větší. Tyto spektrometry se používají prakticky pouze ve velmi náročných experimentech, které vyžadují širokou spektrální oblast nebo probíhají v podmínkách s velmi nízkou intenzitou světla a ztráty difrakcí tak nejsou přípustné.



Obrázek 14: Různé typy hyperspektrálního snímání (Wang, 2017)

Pokud je spektrometrické měření použito v kombinaci se snímáním obrazu, můžeme získat intenzitu světla v závislosti na poloze bodu v obraze a vlnové délce – hyperspektrální data rychli. V současnosti se nejčastěji využívají čtyři možnosti (obrázek 14) pro hyperspektrální snímání. [16] Nejjednodušší možností je bodové skenování (A) – měřicí systém se pohybuje nad vzorkem po specifické trajektorii a liniový detektor měří spektrum pro daný bod. Sestava takto pomalu bod po bodu naskenuje celý vzorek a vytvoří hyperspektrální krychli. Rychlejší komplexnější možností je liniové skenování (B) – systém skenuje sledovaný vzorek řádek po řádku. Světlo prochází přes štěrbinu, která propustí pouze vybraný řádek, na disperzní/difrakční element, který světlo rozmítá podle vlnových délek na 2D matici detektoru. Skenování lze dosáhnout posouváním celé sestavy nebo vzorku v jednom směru nebo pomocí otočného elementu (otáčení celé kamery nebo zrcadla před snímačem). Tento způsob je nejčastěji využíván pro hyperspektrální snímání pomocí družic či dronů, které se dokáží pohybovat po přímé dráze. Vytváří se tak hyperspektrální fotografie povrchu Země, díky kterým je možné odhalit například odlišnosti ve složení půdy. Skenovat scénu lze i v oblasti vlnových délek (C). Tento přístup je nejvíce podobný klasickému fotografování, ale v optické soustavě je několik barevných pásmových filtrů, které vždy propustí pouze určitý úsek vlnových délek. Ze záznamů v jednotlivých úsecích vlnových délek poté systém sestaví potřebnou informaci. Ta ovšem není spojitá, jako v ostatních případech, ale spíše vytvořená z několika větších bloků vlnových délek. V tomto případě tedy místo hyperspektrálního hovoříme o takzvaném multispektrálním snímání. Pro detailnější spektrum by bylo zapotřebí více pásmových filtrů s užším spektrem propouštěných vlnových délek. Jediný systém umožňující záznam v jediném snímku je založený na upraveném liniovém skenování. Snapshot systém (D) obraz ze vzorku rozdělí na několik řádků a každý z nich poté před vlastní optický hranol promítne na sekci detektoru. Jedná se o nejrychlejší způsob záznamu hyperspektrální informace, ale jeho rozlišení v jednom směru je vysoce limitováno vnitřní konstrukcí snímače, kdy je pro každý řádek potřebný další optický hranol a upravený dělič paprsků. S nároky na spektrální rozlišení navíc mnohonásobně stoupá potřebné množství pixelů a vzniká velice složitý čip.





Obrázek 15: Hyperspektrální snímání jednopixelovou kamerou (Klein, 2019)

Hyperspektrální měření bylo také testováno v přecházející bakalářské práci jako kombinace spektrometru a komprimovaného snímání. [1] Při výběru systému pro sběr světla zde spektrometr pomohl měřit spojitost spektra, které procházelo do optického vlákna. Poté byl testován přímo v komprimovaném snímání jako detektor. Díky záznamu spektrální informace umožňoval rekonstrukci do hyperspektrální krychle pro vybrané vlnové délky, jejich úseky nebo celé spektrum. Na obrázku 15 je možné vidět hyperspektrální snímání dvou spojených průsvitných LEGO kostek (červená v modré). Je patrné, že nejvíce intenzity (podle zobrazení celého spektra) prochází čistě červenou oblastí. Místo, kde jsou obě kostky spojené, propouští minimum intenzity, ale v oblastech zelených a modrých vlnových délek je stále možné vidět průsvit v rohu, který by normální fotografií nebylo možné odhalit kvůli výrazně vyšší intenzitě záření přes čistě červenou sekci snímku.

## 2 Komprimované snímání

Hlavním cílem této práce je zkombinovat oba měřicí principy popsané v minulé kapitole s komprimovaným snímáním. Toto snímání umožňuje použití pouze jednoho měřícího bodu – pixelu – (často optické vlákno vedoucí světlo k další analýze) k postupnému získání informace o obrazu. S ohledem na předchozí kapitolu tedy potřebujeme pouze jeden TCSPC měřič nebo jeden spektrometr k vytvoření 2D obrazu. Toto poskytuje velikou výhodu oproti klasickému snímání obzvláště v ceně specializovaných měřících systému.

Klasické snímání funguje na principu přezobrazení obrazu sledované scény přímo na dvourozměrný detektor. V ideální paprskové optice nám pro tento účel stačí jedna sférická čočka, ale v reálné aplikaci pro minimalizaci optických vad je potřeba větší množství optických prvků (fotoaparáty mobilních telefonů s pevně daným optickým zoomem mívají 5-6 čoček, běžně dostupné objektivy s měnitelným optickým zoomem mohou obsahovat až 20 čoček). Obraz je fokusován na snímací čip (nejčastěji CCD nebo CMOS) složený z velkého množství snímačů – pixelů, jejichž počet určuje rozlišení snímače (ne pro všechny aplikace platí, že větší rozlišení znamená automaticky lepší výsledky). Každý pixel získává informaci o intenzitě světla dopadající do jeho místa a z celého čipu tak získáváme informaci o rozložení intenzity ve 2D oblasti. Při pořizování barevných fotografií se nejčastěji na barevné informaci pro jeden bod podílí čtyři pixely s barevnými filtry (dva zelené, jeden červený, jeden modrý). Každý z nich měří intenzitu pro oblast vlnových délek své barvy a ve výsledném obrazu se poměrově skládají pro vytvoření barvy co nejbližší té, kterou by vidělo lidské oko. Z tohoto důvodu jsou například ve čtveřici zelené pixely dva, protože v této oblasti vlnových délek je lidské oko nejcitlivější.



Raw: 15MB

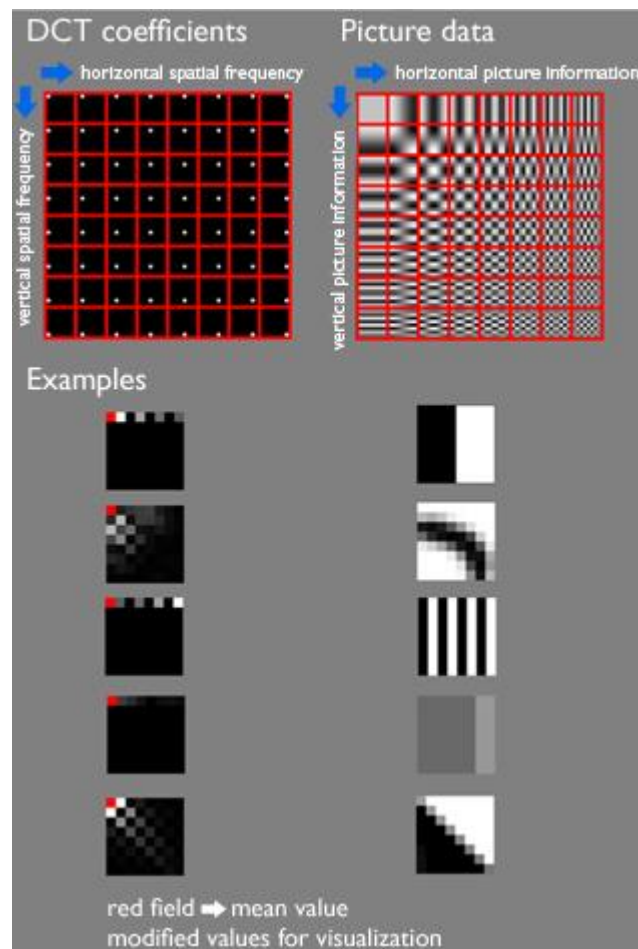


JPEG: 150KB

Obrázek 16: Minimální pozorovatelný rozdíl ve formátech RAW a .jpeg při velkém rozdílu ve velikosti dat (Candes, 2010)

Při klasickém snímání poté vznikne veliké množství informací, ze kterých je výsledný obraz vytvořen. Systém ale není schopen reagovat na to, kolik informací je k popsání obrazu potřeba. V reálných situacích se většinou setkáváme s takzvanou „řidkou informací“ – intenzita obrazu se při pohybu po jakékoliv ose nemění drasticky s každým pixellem, ale můžeme pozorovat spíše oblasti s podobnou intenzitou. Příkladem obrazu s „hustou informací“ by byl například televizní šum, u kterého se při pohybu po ose obrazu skokově mění intenzita světla s každým pixellem. Při tvorbě klasické fotografie můžeme tento rozdíl pozorovat například na formátech RAW a .jpeg (obrázek 16). [17] RAW představuje nekomprimovanou informaci získanou ze

snímání, kde je zaznamenána intenzita obrazu v každém jednotlivém pixelu, .jpeg je již komprimovaný formát, který zmenšuje objem dat. Toho je dosaženo několika různými procesy. [18]

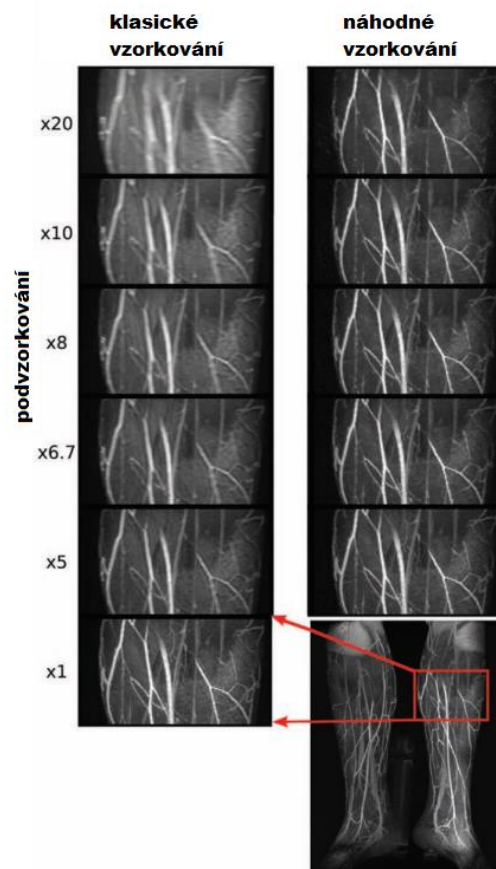


Obrázek 17: Repräsentace dat v obrazu (vpravo) pomocí frekvenčních koeficientů (vlevo) a příklady této repräsentace (Technote, 2011)

Jedním z nich je změna repräsentace barev – z údajů intenzit barev jednotlivých pixelů (RGB) se vytvoří výsledná informace složená ze dvou složek barvy a jedné intenzity (takzvaný Yuv barevný model). Barvu a její intenzitu můžeme omezit vzorkováním (kvantifikací), což umožní potřebu menšího množství různých hodnot pro jejich popis. Toho lze využít hlavně u barevné složky dat, na jejíž změnu je oproti intenzitě oko méně citlivé. Dalším procesem je DCT (diskrétní kosinová transformace, obrázek 17). Obraz je rozdělen do  $8 \times 8$  bloků a informace v nich (intenzita v každém pixelu) je změněna na frekvenční informaci. Místo 64 intenzit dostáváme 64 frekvencí, které popisují prostor bloku horizontálně a vertikálně. I tyto koeficienty frekvencí poté můžeme kvantifikovat (míru kvantifikace určuje nejčastěji uživatel). Čím větší kvantifikace je zvolena, tím méně různých hodnot mohou tyto koeficienty mít a tím více koeficientů (hlavně pro vyšší frekvence) je nulových. Po uspořádání dat poté můžeme tyto nulové koeficienty repräsentovat jejich počtem a popsat obraz pomocí méně dat. Fotografie ve formátu .jpeg zabírá mnohonásobně méně dat a v případě, že neplánujeme fotografii výrazně upravovat, fotografie v komprimované podobě se od prvotní příliš neliší. To potvrzuje, že pro získání užitečné informace o scéně je potřeba mnohem méně dat, než klasickým snímáním získáváme.

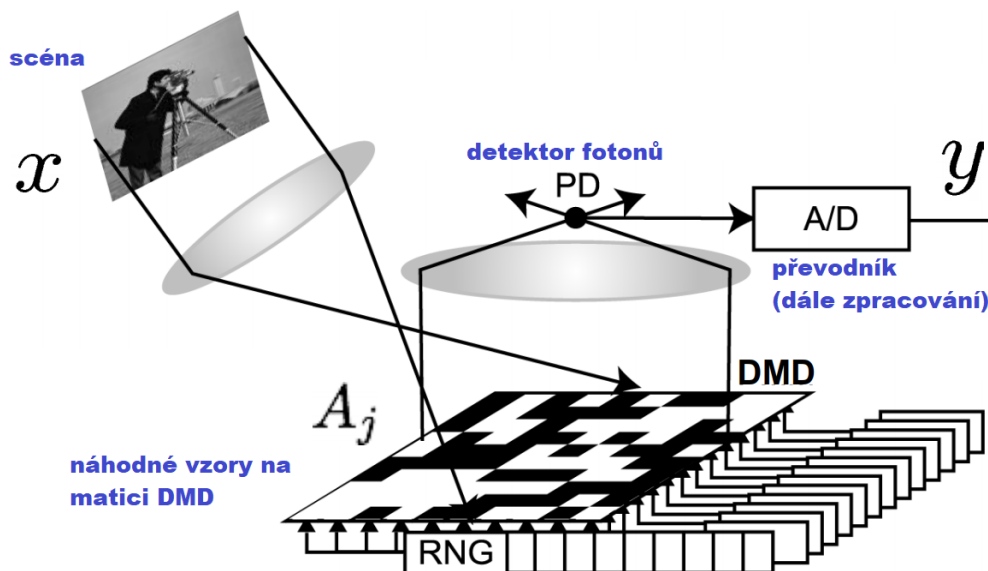
Tento fakt vedl k úvaze, jestli není možné za předpokladu řídké informace vytvořit obraz z menšího množství měření. Tím vznikl koncept komprimovaného snímání a jednopixelové kamery (SPC – single-pixel camera). Pokud si řídkou informaci představíme jako malé množství vrcholů intenzity mezi jinak nulovými hodnotami, můžeme je všechny odhalit menším počtem měření, pokud budeme náhodně měřit v různých místech obrazu, než kdybychom využili pravidelné vzorkování podle Shannonova teorému. [19]

Situaci si lze představit, jako kdybychom měli před sebou zavěšenou dlouhou řadu náhodně rozmístěných zvonků, na které nevidíme (nemůžeme tedy vyzkoušet jednotlivé zvonce) a věděli bychom, že pouze tři z nich mají uvnitř srdce a mohou vydávat zvuk (informace v systému je tedy řídká). Pro jejich nalezení by se v analogii ke snímání nabízeli dva postupy. Klasické snímání by bylo řízeno Shannonovým teorémem a podle něj bychom museli řadu zkoušet cinkáním v pevně daných intervalech daných polovinou nejmenší možné vzdálenosti dvou zvonků, abychom měli jistotu, že všechny budou vyzkoušeny (vzorkovací frekvence musí být dvakrát větší než sledovaná). Podle teorie komprimovaného snímání bychom funkční zvonky mohli najít tak, že cinkneme do mnoha náhodných míst najednou a zaznamenáme výsledný zvuk. Ze znalostí míst cinknutí a zvuku (kolik zvonků jsme slyšeli při každém pokusu) můžeme poté určit, kde tyto zvonky jsou, při výrazně menším počtu pokusů. Ve snímání reálného (řídkého) obrazu to znamená, že jsme schopni jej zrekonstruovat s menším počtem měření bez výrazných ztrát (obrázek 18). [20]



Obrázek 18: Angiografie klasickým a komprimovaným snímáním. Se zvyšujícím se podvzorkováním klesá kvalita klasické fotografie výrazně rychleji, zatímco ta z komprimovaného snímání zůstává prakticky stejná. (Michael Lustig, 2007)

Vznikla tedy úvaha, zda není možné pořídit rovnou fotografii bez nutnosti velkého množství zbytečných dat a snížit počet nutných měření na minimum. Toto vedlo k vytvoření takzvaného komprimovaného snímání a později i SPC. Předpokladem pro využití tohoto postupu je, že získávaná informace je takzvaně řídká (sparse) nebo též komprimovatelná. Řídký signál znamená, že existuje taková reprezentace (báze), ve které je možné signál popsat pomocí vektoru nebo matice, kde velká většina prvků je rovná nule a jen malý počet prvků je nenulový. U obrazu je taková vhodná reprezentace Fourierova nebo waveletová transformace. Tento předpoklad ale splňuje valná většina reálných situací (možných fotografií). Díky tomu je totiž možné do jisté míry obejít Shannovův teorém. Tento způsob obejití Shannonova teorému je základem komprimovaného snímání. Díky náhodnému faktoru v získávání informace je možné původní obrázek zrekonstruovat s výrazně menším počtem měření (nejčastěji vystačíme i s méně než 30 % počtu měření, v ideálních případech a relativně nízkých nárocích nám může stačit i pouhých 5 % počtu měření).



Obrázek 19: Schéma jednopixelové kamery (Candes, 2010)

V jednopixelové kameře (obrázek 19) je přes optickou soustavu obraz scény přeobrazěn na náhodně vytvořenou masku ( $A_j$ ). Sestavy pro toto přeobrazení se mohou v mnohém podobat těm pro klasické snímání, masku si totiž můžeme představit jako náhradu klasického snímacího čipu umístěnou na jeho místo. Z masky je poté v závislosti na jejím typu informace svedena do jednoho bodu a analyzována. Z informací o podobě masek a k nim příslušících naměřených intenzitách ( $y$ ) může poté algoritmus určit podobu původního obrazu. [19]

## 2.1 Masky pro komprimované snímání

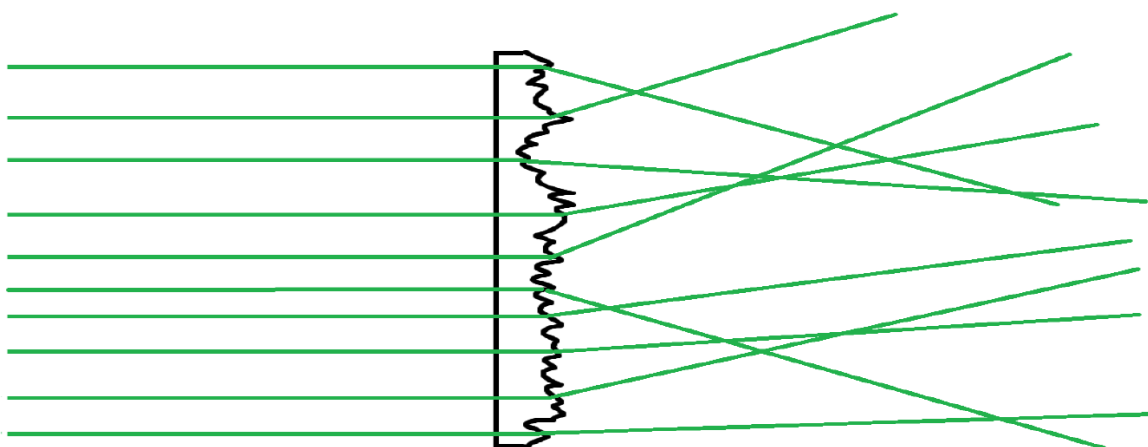
Jak již bylo naznačeno, důležitou součástí komprimovaného snímání je náhodná složka. Tato složka se ve 2D označuje jako maska a definuje velkou část vlastností obrazu v tomto principu (rozlšení, kvalita rekonstrukce). Podle typu zvolené masky se také může změnit uspořádání celé sestavy. Ve většině případů je maska tvořena jako diskrétní a binární matice – dá se tedy reprezentovat jako matice jedniček (propouští světlo nebo jej odráží na detektor) a nul



(absorbuje světlo nebo ho odráží mimo detektor). Není to však bezvýhradně nutné a celá řada implementací SPC používá komplikovanější masky s kontinuálně měnící se hodnotou.

Prvním typem používaných masek jsou masky transparentní. Obraz je promítán na masku, která se skládá z průhledných a neprůsvitných sekcí. Světlo, které projde, je poté zaměřeno do jednobodového detektoru a pozorováno. Nejjednodušším způsobem na tvorbu transparentní masky je maska vytisknutá na průhledný materiál. Tyto masky jsou poté většinou takzvané „pseudonáhodné“. Před pořízením každého snímku se tato maska posune o jeden sloupec. Z hlediska měření tak vzniká úplně nová náhodná maska, protože není žádná spojitost mezi jednotlivými sloupci. Výhodou této masky je relativně jednoduchá výroba, má ovšem pevně dané rozlišení a maximální počet měření (počet vytištěných extra sloupců) a při jejím použití je zapotřebí velice přesný posuvný pohon. Jinou transparentní masku lze vytvořit s použitím SLM (spatial light modulator, prostorový modulátor světla). V SLM systémech je možné pomocí počítače ovládat transparentnost prostředí v modulátoru. Díky tomu lze vytvářet transparentní maska s náhodně rozmístěnými transparentními body. SLM masky mohou měnit své rozlišení a počet masek není omezen. Vzhledem k transparentní povaze je ale SLM značně limitováno vlnovými délkami, které může propustit.

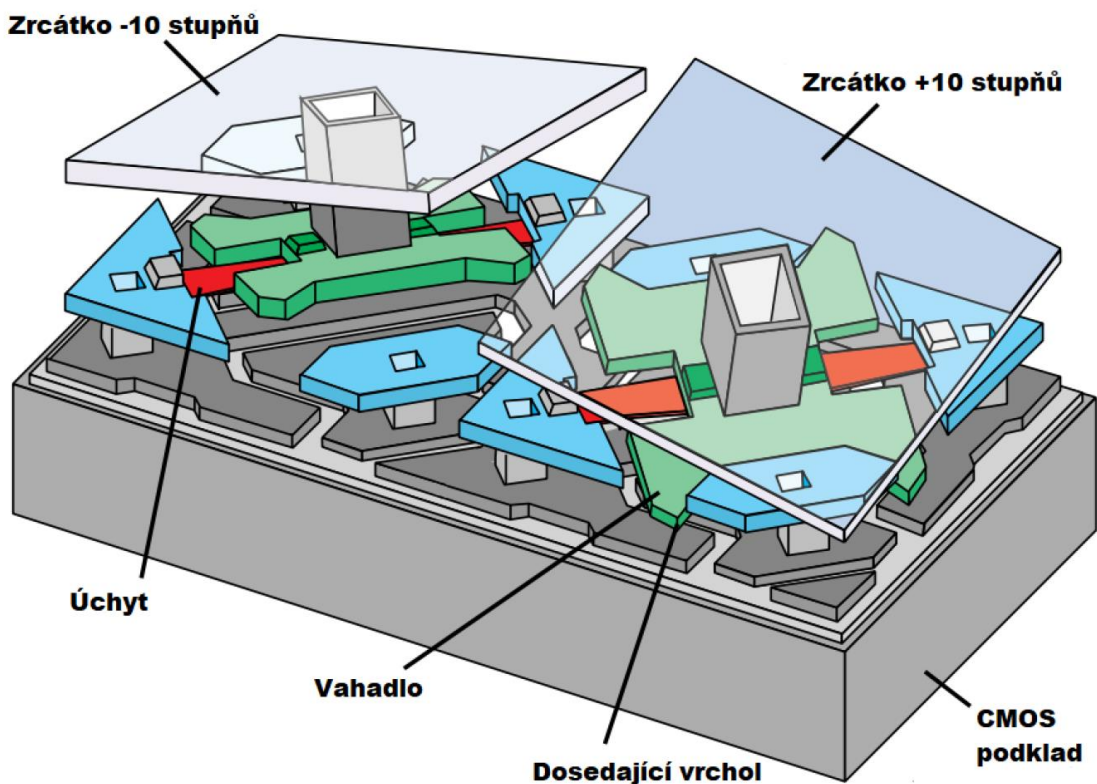
Druhým typem jsou takové aplikace, ve kterých je světelnou maskou přímo osvětlený sledovaný vzorek. I zde lze využít více možností, ale prakticky jedinou více používanou je tvorba speklí (koherenčního zrnění). Jedním ze způsobů jejich tvorby je laserový paprsek používaný k osvětlení vzorku prochází přes optický difusor (obrázek 20). Jedna strana tohoto difusoru má hrubé zbroušení a paprsky z laseru se na ní náhodně lámou. Při dopadu na vzorek umístěný za difusorem se některé z těchto paprsků díky různým uraženým drahám setkávají ve fázi a jiné v protifázi. Díky interferenci tedy vznikají náhodně rozmístěné světlé body, které vytváří náhodnou masku. Tato maska oproti ostatním není diskretní a může tedy vykazovat i hodnoty mezi 0 a 1. Zároveň nejsme schopni elektronicky předem určit, jak maska po průchodu difusorem bude vypadat. Z tohoto důvodu se část světla za difusorem přes dělič paprsků směřuje na referenční detektor ve stejné vzdálenosti jako vzorek, který zaznamená, jakou podobu maska má.



Obrázek 20: Princip optického difusoru, který se využívá k tvorbě koherenčního zrnění (Klein, 2019)

V současnosti pravděpodobně nejrozšířenějším typem jsou reflektivní masky reprezentované prakticky výhradně systémy DMD (digital micromirror device). Jedná se o sestavu mikrozrcátek (obrázek 21), které je možné elektronicky naklápět o 10-15 stupňů (v závislosti

na konstrukci) na jednu nebo druhou stranu. Masky tedy v případě DMD funguje tak, že předem vygenerované matice nul a jedniček je elektronikou DMD zpracována a zrcátka jsou buď při jedničce v matici naklopena směrem k detektoru nebo při nule odklopena od něj. [21]



Obrázek 21: Vnitřní stavba jednotlivých zrcátek DMD (Hornbeck, 1997)

DMD většinou nabízí rozlišení výrazně vyšší, než je pro komprimované snímání potřeba. Z tohoto důvodu se většinou skupina zrcátek zahrnutá jedním prvkem matice masky chová stejně a všechny zrcátka ve skupině se natočí stejně. DMD ale díky tomu nabízí možnost měnit rozlišení podle potřeby nebo využívat pouze část čipu. Taktéž počet měření není nijak omezen a matic masek může postupně systém zpracovat libovolné množství. Potenciální nevýhodou DMD systémů je difrakce, jelikož se rozměry zrcátek blíží zkoumaným vlnovým délkám. Problematika difrakce a sběru světla z DMD byla detailně zkoumána v předcházející bakalářské práci. [1]

## 2.2 Detekce v komprimovaném snímání

Při popisování konceptu komprimovaného snímače se většinou jako detektor popisuje a využívá jednoduchý intenzitní snímač – fotodiody nebo fotonásobič. Informace, kterou poté algoritmus zpracovává, sestává ze sady masek a sady celkových naměřených intenzit světla. Pokud je ovšem světlo navedeno do optického vlákna, je možné ho podle potřeby přivést na celou řadu detektorů, například tak využít i složitější detektory z kapitoly 1, které mohou poskytnout komplexnější informaci o zkoumaném vzorku.

Místo souboru masek a intenzit dostáváme soubor masek a spekter nebo naměřených dohasínání fotoluminiscence. Rekonstrukce se v těchto případech příliš neliší od té prováděné s intenzitami. Spektrum nebo naměřené dohasínání se rozdělí na jednotlivé části a rekonstrukce

poté probíhá na jednotlivých částech zvlášť. Informace je tedy redukována na stejnou jako v případě fotodiody a se souborem masek se využívají intenzity získané pro danou vlnovou délku/část spektra nebo pro daný čas/časový úsek od excitujícího pulzu. S výhodou se zde ale dá využít možnost závislosti mezi jednotlivými rekonstrukcemi. Víme, že prostorové rozložení vzorku je v průběhu celého měření stejné nebo se mění spojitě a můžeme tedy jednotlivé rekonstrukce využít jako odhad, jak další rekonstrukce má vypadat. Například v případě dohasínání můžeme rekonstrukce z časů počátku excitace s vysokou intenzitou, které budou nejlépe odhadnuté, využít pro rekonstrukce v pozdějších fázích jako počáteční odhady, které může algoritmus využít.

## 2.3 Rekonstrukce v komprimovaném snímání

Vzhledem k tomu, že informace získaná jednopixelovou kamerou je nekompletní, existuje pro rekonstrukci nekonečně mnoho řešení (obrázků, které by odpovídaly naměřeným celkovým intenzitám). Rekonstrukční algoritmus výsledné řešení z vyhovujících možností vybírá na základě regularizátoru (v našem případě totální variace detailněji popsána níže). Algoritmy pro komprimované snímání jsou tedy většinou různé podoby minimalizačních funkcí, které se snaží minimalizovat rozdíl mezi odhadem a údaji získanými z měření. Jedním z nejvíce používaných algoritmů v této aplikaci je TVAL3 (Total Variation minimization by Augmented Lagrangian and Alternating direction Algorithms). [22] Algoritmus se snaží řešit rovnici, kterou můžeme odvodit z obrázku 18:

$$A_{m,n} \times x_n = y_m. \quad (2.1)$$

A představuje matici masek, ve které  $m$  je index měření v komprimovaném snímání a  $n$  číslo pixelu v obrazu. Vektor  $x$  představuje hodnoty intenzity pro jednotlivé pixely obrazu a vektor  $y$  představuje naměřené intenzity v komprimovaném snímání. Jelikož je  $n$  výrazně větší než  $m$ , má tato rovnice nekonečné množství řešení  $x$ . Z tohoto důvodu se hledá řešení  $x$  vyhovující minimalizační funkci:

$$f(x) = |y_m - A_{m,n} \times x_n|_2. \quad (2.2)$$

Algoritmus se snaží najít takovou kombinaci pixelů  $x$ , aby při vynásobení všemi maskami v  $A$  byly výsledky co nejbližší vektoru naměřených intenzit  $y$ . Tato informace ale nepostačuje k jednoznačnému řešení, protože matice  $A$  je singularní a existuje pro ni nekonečné množství řešení.

V TVAL3 tak společně s rezidui minimalizuje ještě druhý faktor, a to spojitost obrazu. Tato podmínka vychází z předpokladu řídké informace, tedy jinak že se intenzita obrazu prudce nemění v každém jeho bodě, a snaží se minimalizovat totální variaci systému. Tu můžeme definovat jako součet rozdílů hodnot sousedních pixelů. Dříve zmíněný televizní šum by měl velmi vysokou totální variaci, protože se intenzita prudce mění s každým sousedním pixelem. Pro 1D by totální variace mohla být popsána rovnicí

$$\Phi(x) = \sum_{i=2}^n |x_i - x_{i-1}|. \quad (2.3)$$

Minimalizací tohoto faktoru se snažíme zmírnit náhle změny intenzity mezi sousedními pixely v jedné dimenzi, analogicky by se postupovalo pro dvoudimenzionální situaci. Oba dva faktory poté TVAL3 spojuje do jedné minimalizační funkce:

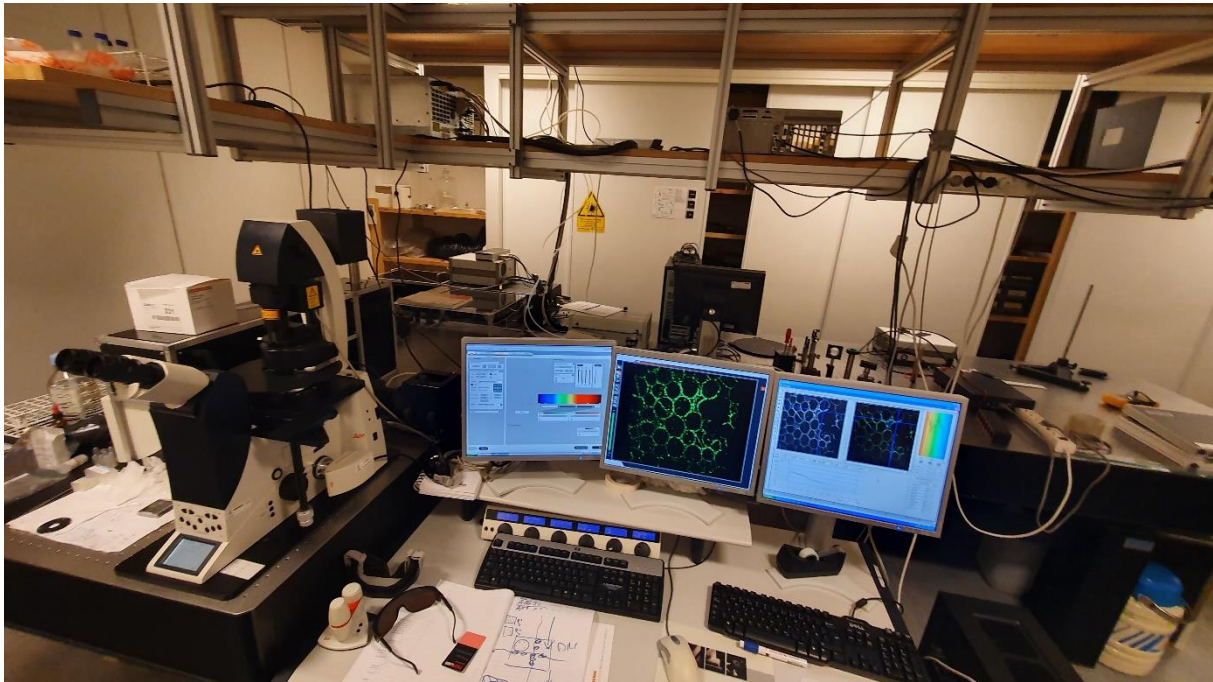


$$g(x) = \mu f(x) + \Phi(x) = \mu |y_m - A_{m,n} \times x_n|_2 + \sum_{i=2}^n |x_i - x_{i-1}|. \quad (2.4)$$

Do této minimalizační funkce přibyl váhový faktor  $\mu$ . Ten můžeme při použití algoritmu libovolně nastavit a upravit pomocí něj zastoupení obou parametrů v minimalizaci. Díky tomu je možné upřednostnit buď vyšší shodu s naměřenými daty nebo vyšší spojitost celkového obrazu. Nižší hodnoty  $\mu$  poskytují rychlejší rekonstrukci a výsledný obraz je poté více vyhlazený za cenu možné ztráty detailů. Vyšší hodnoty  $\mu$  výrazně zvyšují náročnost rekonstrukce, ale ve výsledném obrazu je poté vykresleno více detailů. Při příliš vysokých hodnotách se velice málo projeví faktor spojitosti a může vznikat výrazný šum, který rekonstrukci naruší. Algoritmus se totiž pouze snaží vyhovět rovnici (2.2) za jakoukoliv cenu a může tedy některé pixely zásadně změnit, aby vyhověl lepší shodě, i když tím získá nereálné hodnoty bodové intenzity.

### 3 FLIM Bergen

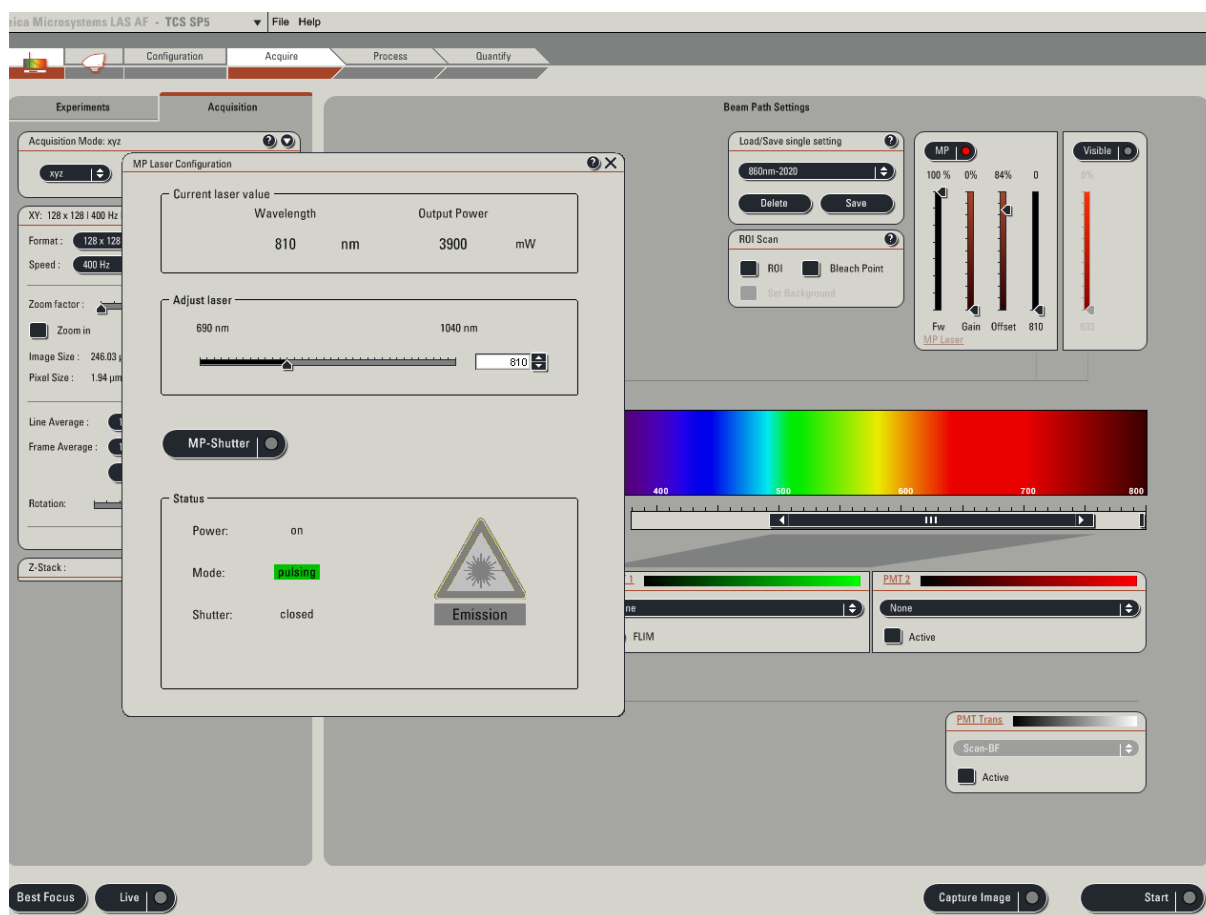
V zájmu zhodnocení hyperdimenzionálního snímače, který představíme v kapitole 4, bylo potřeba seznámit se s klasickou FLIM sestavou využívající TCSPC k určení fluorescenčního dohasínání. Toho bylo dosaženo ve spolupráci s Oddělením fyziky a technologie Univerzity v Bergenu (Institutt for fysikk og teknologi UiB). Výzkum na tomto fluorescenčním mikroskopu (obrázek 21) byl proveden pod vedením Arneho Kristoffersena z UiB, jehož měření zároveň byla využita pro porovnání získaných výsledků. [23, 24]



Obrázek 22: Sestava experimentu FLIM v laboratoři UiB

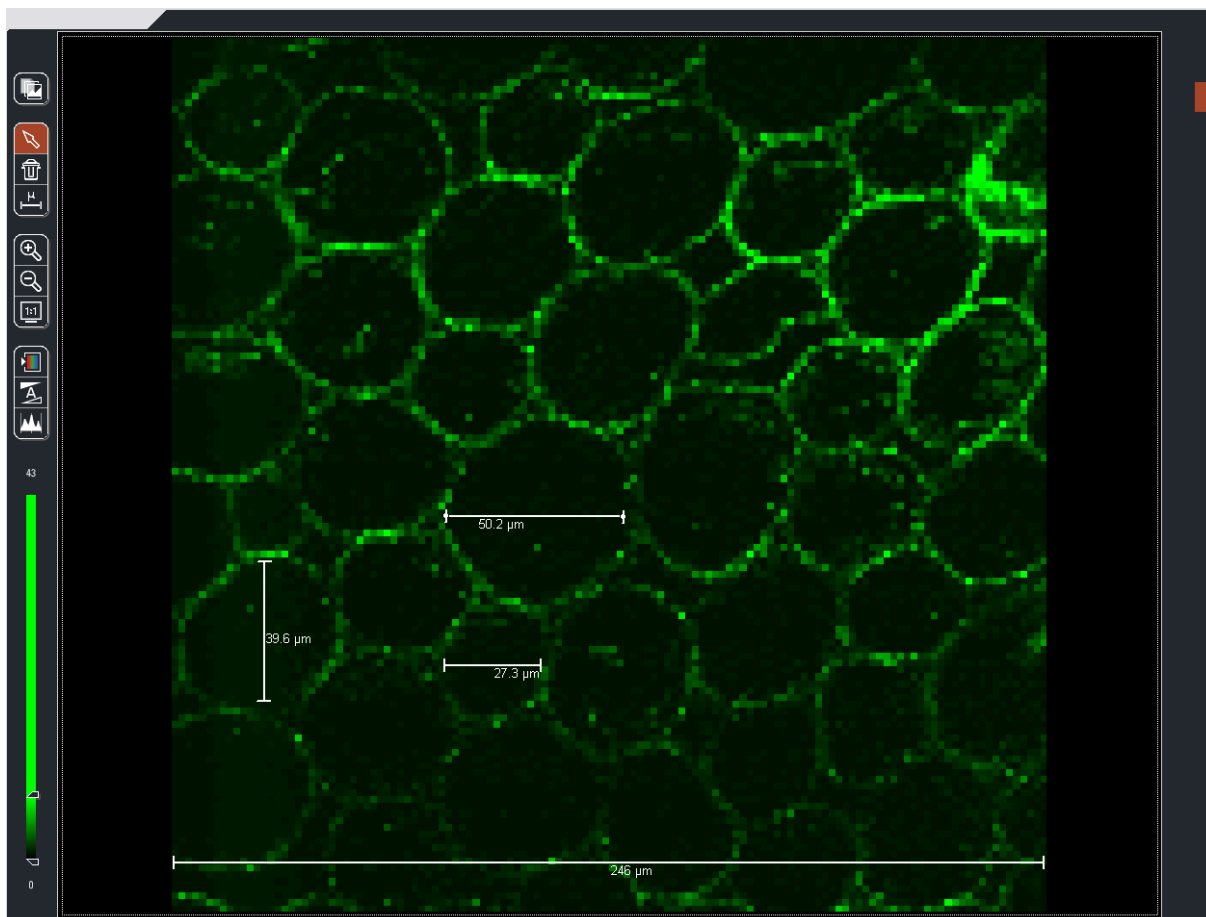
Zdrojem světla v použité sestavě byl pulzní femtosekundový laser Coherent Chameleon Ultra. Délka jednoho pulzu byla 140 fs, opakovací frekvence byla pevně nastavená na 80 MHz (mezi jednotlivými pulzy prodleva 12,5 ns). V této sestavě byl laser využíván v již zmíněné dvoufotonové excitaci. Použitý laser bylo možné nastavit pro použití vlnových délek mezi 690 a 1040 nm, vzorek je tedy prakticky excitován vlnovými délkami mezi 345 a 520 nm. Přes sestavu zrcadel je paprsek z laseru převeden do konfokálního invertovaného mikroskopu Leica TCS SP5. Zde byla možnost volby ze tří různých objektivů (zvětšení 20 $\times$ , 40 $\times$  a 63 $\times$ ) s vodní imerzí pro zvýšení numerické apertury. Vzorek byl postupně skenován s frekvencí 400 Hz a fluorescence byla detekována fotonásobičem zabudovaným pod mikroskopem, čímž vznikl 2D obraz vzorku. Pomocí TCSPC modulu Berner-Hickl SPC-830 byla poté vygenerována fluorescenční data.[23]

## 3.1 Postup měření



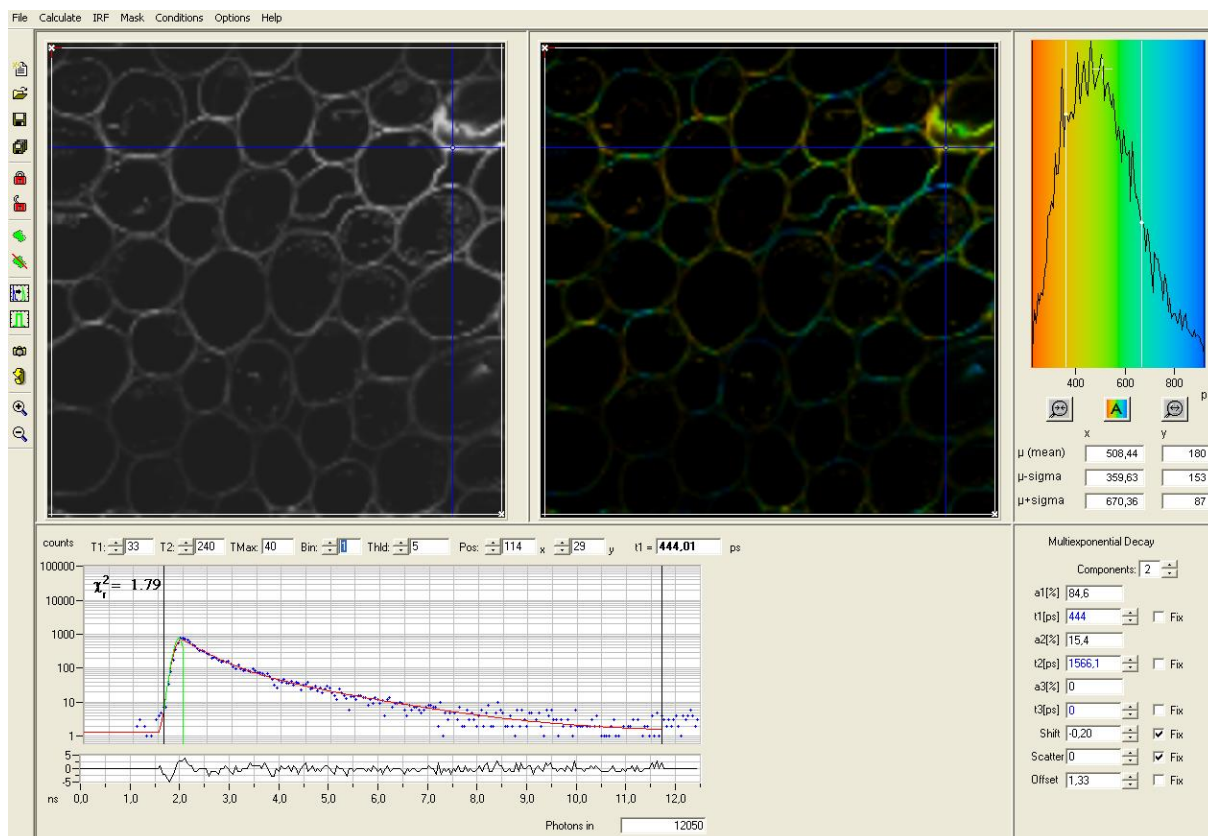
Obrázek 23: UI softwaru Leica LAS pro nastavení jednotlivých částí sestavy

Pro nastavení jednotlivých parametrů laseru, mikroskopu i fotonásobiče byl použit software Leica LAS (viz Obrázek 4). U laseru bylo možné přes software nastavit vlnovou délku, zesílení a offset. Zároveň zde bylo možné zavírat optickou clonu pro bezpečný přístup ke vzorku. Před začátkem práce s každým vzorkem bylo nutné nastavit laser na nejmenší výstupní výkon, aby bylo zamezeno poškození vzorku. V průběhu samotného měření pak bylo možné intenzitu světla zvyšovat podle potřeby až do maxima výkonu laseru 4 W. Druhým nastavitelným prvkem byl samotný mikroskop – zde se nastavovaly optické výstupy pro využití TCSPC a poloha vzorku ve všech třech osách. Nejdůležitější bylo jemné ovládání výškového umístění vzorku, aby se vzorek nacházel v místě dvoufotonové excitace, případně u tlustších vzorků probíhala ve vybraném místě. Poslední nastavitelný prvek bylo samotné TCSPC s fotonásobičem. Zde bylo možné omezit vlnové délky, které detektor zaznamenával (maximální použitelné rozpětí činilo 400-800 nm). Pokud nebylo za potřebí sledovat specifickou fluorescenční odezvu v oblasti určitých vlnových délek, byl omezujícím faktorem pouze použitý excitující paprsek, jehož detekce by narušila měření. FLIM také umožňoval nastavit rozlišení, které úzce souviselo s opakovací frekvencí měření díky binningu (spojování) pixelů do skupin. Preferován byl vyšší binning, který umožňoval díky seskupování pixelů hladší a intenzivnější křivku dohasínání. Za nejvhodnější nastavení tedy bylo zvolení rozlišení 128×128 pixelů a s tím spojené frekvence 400 Hz, které stále poskytovalo dostatečně kvalitní zobrazení (obrázek 23).



Obrázek 24: Živý náhled LAS

Po nastavení všech parametrů bylo možné umístit vzorek do mikroskopu. Jelikož se jedná o invertovaný mikroskop, bylo nutné vkládat vzorky obráceně oproti klasickému mikroskopu (krycím sklíčkem dolů). Protože při vložení vzorku je již optická dráha nastavená směrem do fotonásobiče, je další úprava pozice možná pouze s živým náhledem softwaru LAS (viz obrázek 23). Zde mimo polohy bylo nutné i přesně nastavit vzdálenost od objektivu, aby se fotony pro excitaci setkávaly přesně ve vrstvě vzorku. To se na živém náhledu projevilo rozzářením fluorescenčních struktur. Pro jednoduché pozorování přítomnosti fluorescence bylo možné připojení UV lampy a pozorování vzorku přímo přes okulár. Jelikož je UV záření vysokoenergetické (krátké vlnové délky) a proto dokáže excitovat většinu zkoumaných vzorků.



Obrázek 25: Výsledky měření TCSPC

Programem pro TCSPC poté byla provedena série měření, ze kterých vznikl podrobný výstup (viz obrázek 24). Jeho součástí jsou dvě verze získaného obrazu, první z nich je intenzitní a ukazuje množství získaných fotonů z jednotlivých částí snímané oblasti. Druhá verze zobrazuje dobu dohasínání jednotlivých bodů v závislosti na poloze. Barvy v tomto zobrazení korespondují s grafem v pravém horním rohu (nastaveno pro komponentu t1). V dolní části jsou detailní informace pro konkrétní uživatelem vybraný bod obrazu (reprezentovaný modrým křížem na obou snímcích). Můžeme zde vidět skutečnou získanou křivku histogramu (modré body), čas dopadu budícího signálu (zelená křivka) a aproximace histogramu exponenciálou (červená křivka).

Spolehlivost aproximace pro daný bod je reprezentována hodnotou  $\chi^2$  testu dobré shody. Ta hodnotí korelaci mezi teoretickými četnostmi danými pravděpodobnostním rozdělením a těmi skutečně naměřenými. Předpokládejme, že měřená veličina může dosahovat  $k$  různých hodnot  $(1, 2, \dots, i, \dots, k)$  a každá z nich má teoretickou pravděpodobnost  $p_i$ . Pokud jsme poté učinili  $N$  náhodných pokusů a souboru  $a$  každá dosažitelná hodnota byla naměřena  $X_i$ -krát. Hodnota  $\chi^2$  je poté určena jako

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(X_i - Np_i)^2}{Np_i}. \quad (2.3)$$

Tato hodnota by pro co nejlepší aproximaci dohasínání měla být blízká jedničce a lze ji v případě FLIMu ovlivnit několika parametry, nejčastěji změnou počtu komponent či binningu pixelů. Pokud i poté je hodnota  $\chi^2$  příliš vysoká, není buď fluorescence pozorovatelná (příliš dlouhá doba dohasínání, nízká intenzita) nebo je potřeba měření opakovat. Vzhledem k intenzitě používaného laserového osvětlení může hodnota  $\chi^2$  stoupat i z důvodu ohřevu

vzorku či v krajních případech jeho vysušení nebo tepelného poškození. Získaná data je pak možné exportovat a například pomocí MATLABu porovnat s dalšími měřeními provedenými například v jiné oblasti vzorku se stejným složením (například jiná část listu se stejnými buňkami). Díky tomu můžeme hlavně u kapalných vzorků dosáhnout statisticky spolehlivějších výsledků. Kapalně vzorky by totiž měly vykazovat ve všech místech stejnou koncentraci a opakované měření tak může snížit vliv lokálních chyb.

## 3.2 Testování vzorků

Na FLIMu v Bergenu bylo testováno několik sad vzorků. Metodika těchto měření byla inspirována výše zmíněnými články Arneho Kristoffersena. U každého vzorku byla provedena tři různá měření. Délka těchto měření se odvíjela o efektivitu emise světla a byla tedy upravována pro získání dobře reprezentované křivky dohasínání (nejčastěji 60 až 120 sekund). U jednoexponenciálních dohasínání byla exportována data o intenzitě a době dohasínání v jednotlivých bodech, u víceexponenciálních mohly být doby dohasínání až tři a součástí exportu byly poté i jejich procentuální váhy. Informace o intenzitě pomáhala při výběru dat ze všech třech měření pro oddělení měření z nejméně osvětlených pixelů (místa, ve kterých vlivem rozložení vzorku nebyla vytvořena spolehlivá křivka dohasínání) a pro úpravu rozměrů souborů dat do podobných velikostí. To zamezilo tomu, aby data z jednoho měření o větší intenzitě měla v celkové sadě větší váhu. Zároveň je tak eliminován vliv doby měření a ten lze tedy využít pro vylepšení intenzity světla v záznamu.

### 3.2.1 Fluorescenční barviva

Hlavními zkoumanými vzorky na této sestavě byla vybraná fluorescenční barviva rozpuštěná v různých kapalinách při různých koncentracích. Tyto vzorky byly vytvořeny pro původní články Arneho Kristoffersena.[23, 24] Ty se zabývaly určením času dohasínání samotných barviv, které do té doby nebylo v literatuře jednotně popsáno. Autor v nich sledoval především vliv typu a koncentrace rozpouštědla na dohasínání. Díky nim bylo možné porovnat naměřené dohasínání s výsledky původních článků a určit, zda bylo měření provedeno správně. Zároveň bylo možné sledovat, jestli došlo u vzorků k výraznému posunu doby dohasínání vlivem jejich stáří. Sada vzorků z prvního článku byla v době měření přibližně šest let stará a sada z druhého přibližně dva roky. Všechny vzorky byly uloženy ve vzduchotěsných nádobách a vliv oxidace po dobu uskladnění by tedy měl být minimální. Testována byla většinou barviva o nejvyšších koncentracích, které vykazovaly nejvyšší svítivost, a bylo na nich tedy možné nejlépe pozorovat fungování celého systému. Jelikož se jednalo o jednoexponenciální doby dohasínání, které měly být napříč celým vzorkem stejné, bylo možné naměřené doby dohasínání ze souboru dat reprezentovat pomocí histogramu. Z povahy měření bylo možné předpokládat, že získané doby dohasínání budou odpovídat normálnímu rozdělení.

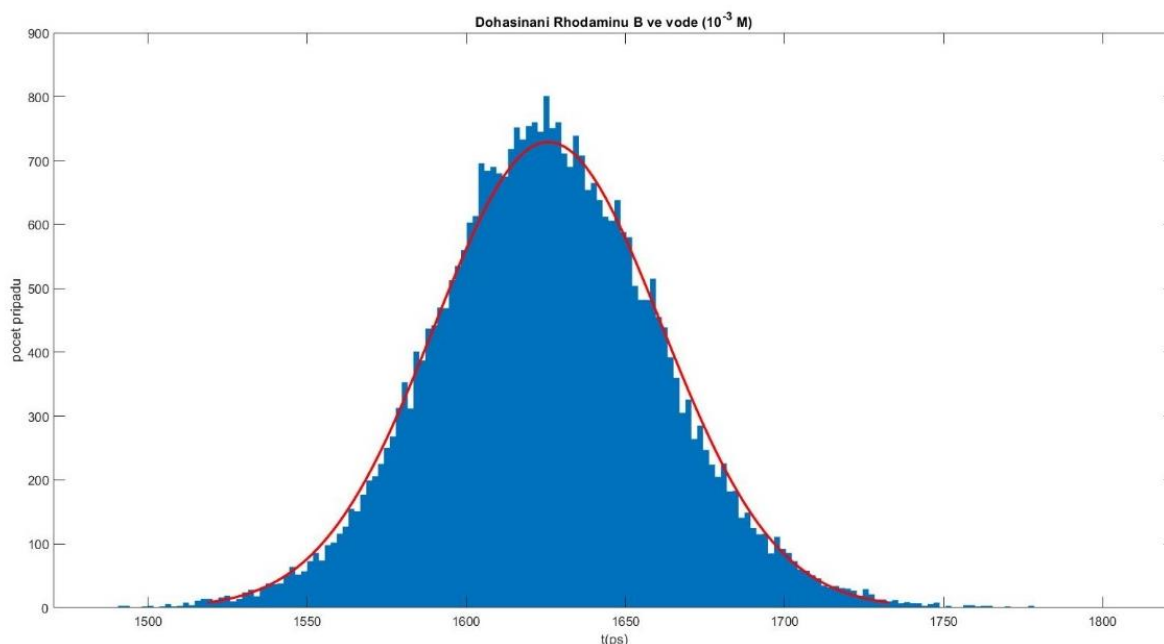


### 3.2.1.1. Rhodamin B



Obrázek 26: Roztok Rhodaminu B v ethanolu

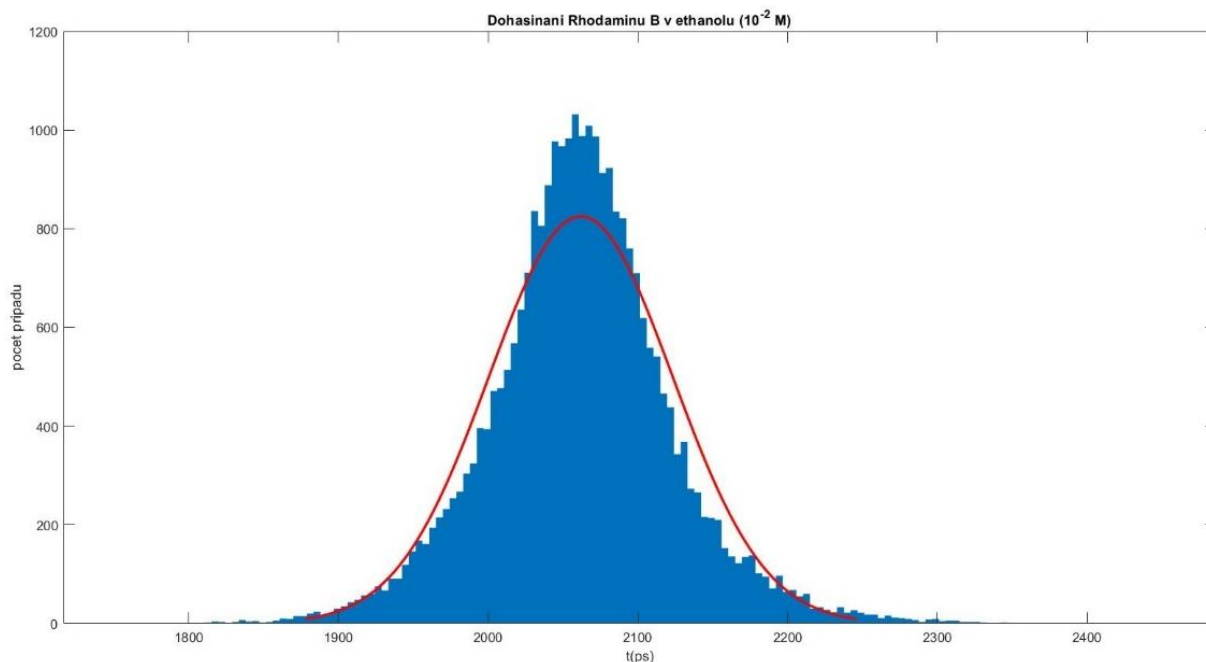
Rhodamin B (obrázek 26) je jedním z fluorescenčních barviv používaných k barvení acidorezistivních bakterií pro fluorescenční mikroskopii. Zároveň se často používán v kombinaci k herbicidy, jejichž použití je jím označení, nebo ve vakcínách proti vzteklině jako biomarker, díky němuž lze zjistit, která zvířata v divočině vakcínu pozřela. V Kristoffersenově článku zabývajícím se Rhodaminem B bylo barvivo rozpuštěno při různých koncentracích ve vodě, ethanolu a methanolu. Při rozpuštění ve vodě Rhodamin B často vykazuje dvouexponenciální dohasínání. V tomto článku ale bylo zjištěno, že pro určité rozmezí koncentrací se druhá komponenta nevyskytuje, případně je její vliv zanedbatelný.



Obrázek 27: Histogram dob dohasínání Rhodaminu B ve vodě při molaritě  $10^{-3}$  M

Jeden z testovaných vzorků tedy byl Rhodamin B rozpuštěný ve vodě při molaritě  $10^{-3}$  M. Ten měl podle původního měření dobu dohasínání  $1,49 \pm 0,04$  ns. Z testování stejného vzorku v této práci vyšlo také jednoexponenciální dohasínání s dobou dohasínání  $1,63 \pm 0,04$  ns (obrázek 27). Tato hodnota byla v porovnání s článkem mezi hodnotami pro molarity  $10^{-3}$  M a  $10^{-4}$  M, což by mohlo poukazovat na změny koncentrace ve vzorku (například usazování na dně nádoby, a

tedy nižší koncentrace v samotné kapalině, nebo nerovnost koncentrace uvnitř samotné kapaliny). Také podle zdrojového článku měření Rhodaminu B ve vodě vykazuje značnou časovou nestabilitu.



Obrázek 28: Histogram dob dohasínání Rhodaminu B v ethanolu při molaritě  $10^{-2}$  M

Druhým testovaným byl Rhodamin B rozpuštěný v ethanolu při molaritě  $10^{-2}$  M. Zde byla původní hodnota doby dohasínání  $1,95 \pm 0,05$  ns a hodnota získaná z nového měření  $2,06 \pm 0,07$  ns (obrázek 28). Hodnota je opět nepatrně vyšší než v původním měření, ale výrazně blíže než hodnotě pro molaritu  $10^{-3}$  M ( $2,68 \pm 0,08$  ns).

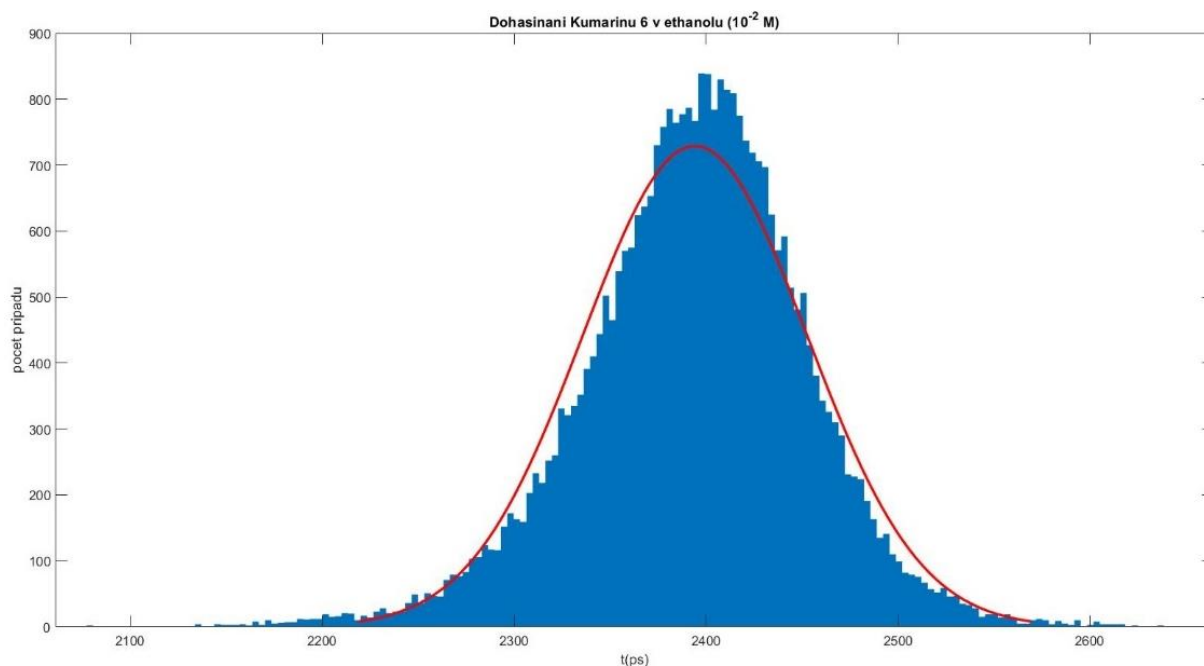
### 3.2.1.2. Kumarin 6



Obrázek 29: Roztok kumarinu v ethanolu

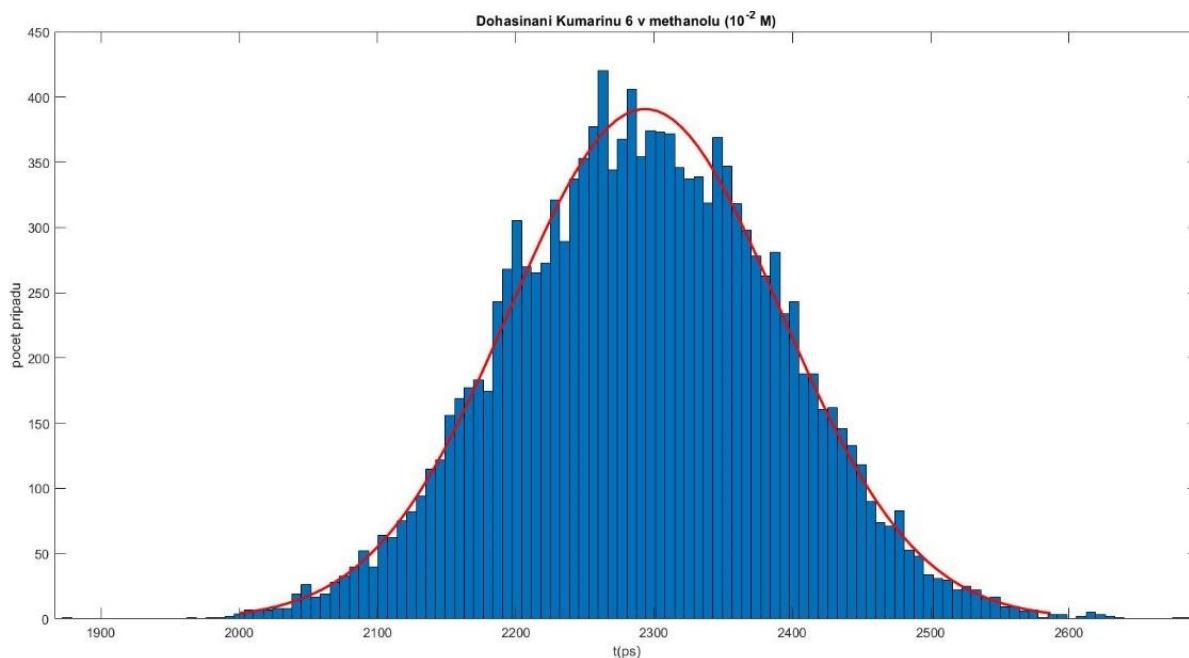
Druhým testovaným fluorescenčním barvivem je Kumarin 6 (obrázek 29), derivát rostlinného toxinu přítomného v mnoha druzích, například bílu. Kumarin 6 je jako fluorescent nejefektivnější v modrých a zelených vlnových délkách (nejvyšší intenzity okolo 500 nm). V Kristoffersenově článku bylo toto barvivo testováno v ethanolu a methanolu v různých koncentracích, ze kterých byly pro tuto práci vybrány vzorky od obou barviv s nejvyšší koncentrací  $10^{-2}$  M.





Obrázek 30: Histogram dob dohasínání Kumarinu 6 v ethanolu při molaritě  $10^{-2} M$

V případě Kumarinu 6 v ethanolu byla naměřená doba dohasínání  $2,39 \pm 0,06$  ns (obrázek 30) ve velmi dobré shodě s hodnotou v článku ( $2,42 \pm 0,06$  ns). V případě rozpuštění barviva v methanolu byla naměřená doba dohasínání  $2,3 \pm 0,1$  ns (obrázek 31) opět v dobré shodě s hodnotou získanou z Kristoffersena článku ( $2,28 \pm 0,05$  ns), i když se prakticky dvojnásobně zvýšila odchylka dat v měření.

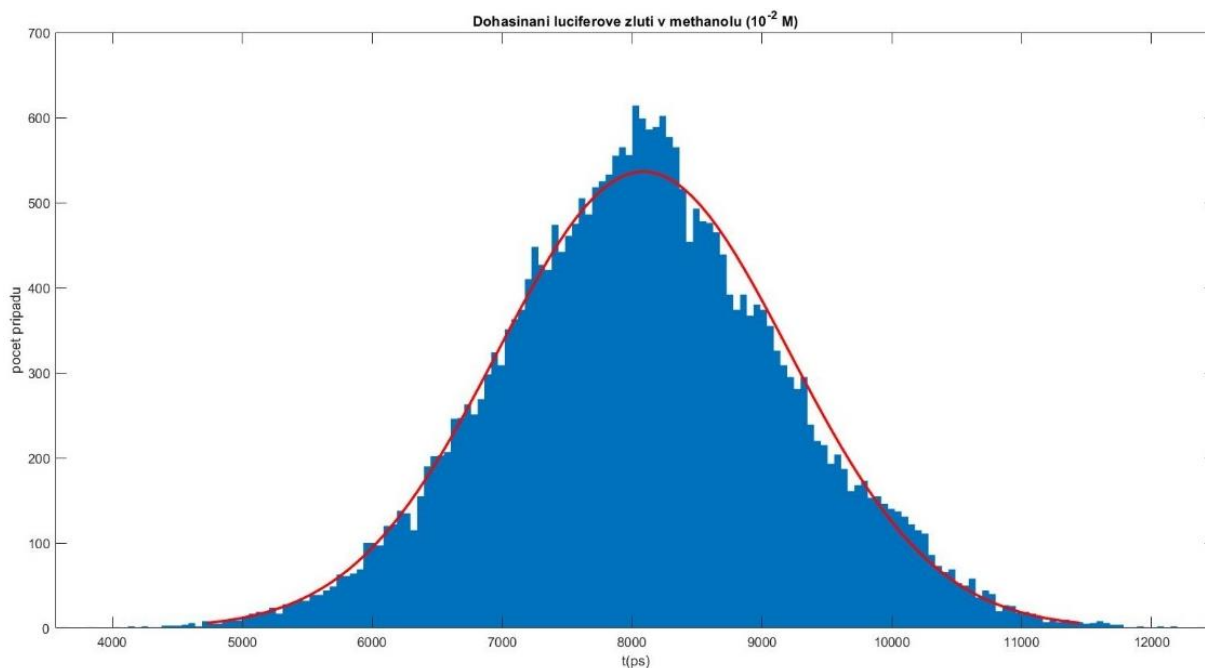


Obrázek 31: Histogram dob dohasínání Kumarinu 6 v methanolu při molaritě  $10^{-2} M$

### 3.2.1.3. Luciferová žluť

Posledním testovaným barvivem z prvního článku byla luciferová žluť používaná pro zobrazování tkání ve fluorescenční mikroskopii. Z původní testované sady byl dostupný pouze

vzorek barviva rozpuštěného v methanolu při nejvyšší koncentraci. Tomu v původním článku připadla hodnota doby dohasínání  $9,2 \pm 0,9$  ns. Naměřená doba dohasínání činila  $8,1 \pm 1,1$  ns (obrázek 32). Obě hodnoty mají již vzhledem k přibližování se k limitům použité FLIM sestavy (pulzy přichází po 12,5 ns, limitem pro měření je doba dohasínání okolo 10 ns) velké odchylky a intervaly přípustných hodnot se tak částečně překrývají.



Obrázek 32: Histogram dob dohasínání luciferové žluti v methanolu při molaritě  $10^{-2}$  M

#### 3.2.1.4. Fluorescein

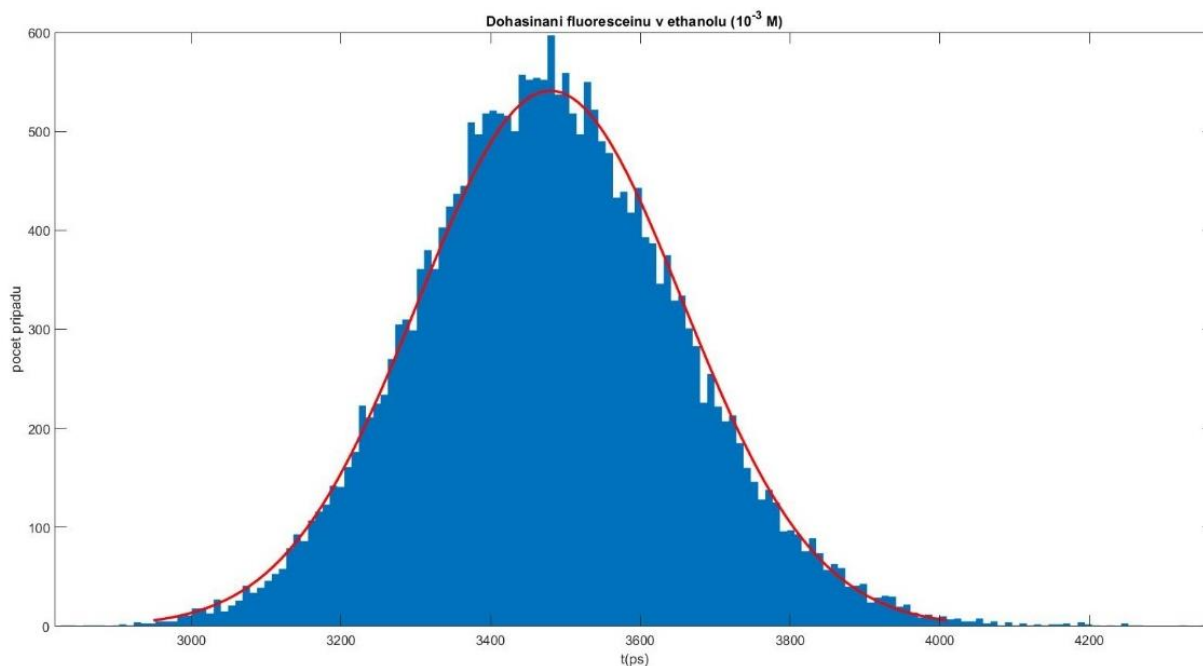


Obrázek 33: Roztok Fluoresceinu v methanolu

Z druhého článku bylo testováno pouze barvivo fluorescein ve dvou roztocích (obrázek 33). Důvodem pro toto omezení bylo, že zbytek roztoků obsahoval kyseliny a manipulace s nimi by vyžadovala značně zvýšená bezpečnostní opatření při přípravě měření. Problém s bezpečností takového měření byl zvýšen invertovaným uspořádáním samotného mikroskopu, ve kterém je kapalina a krycí sklička na spodní straně mikroskopického skla a hrozí odkapávání při otáčení a umístění v sestavě.

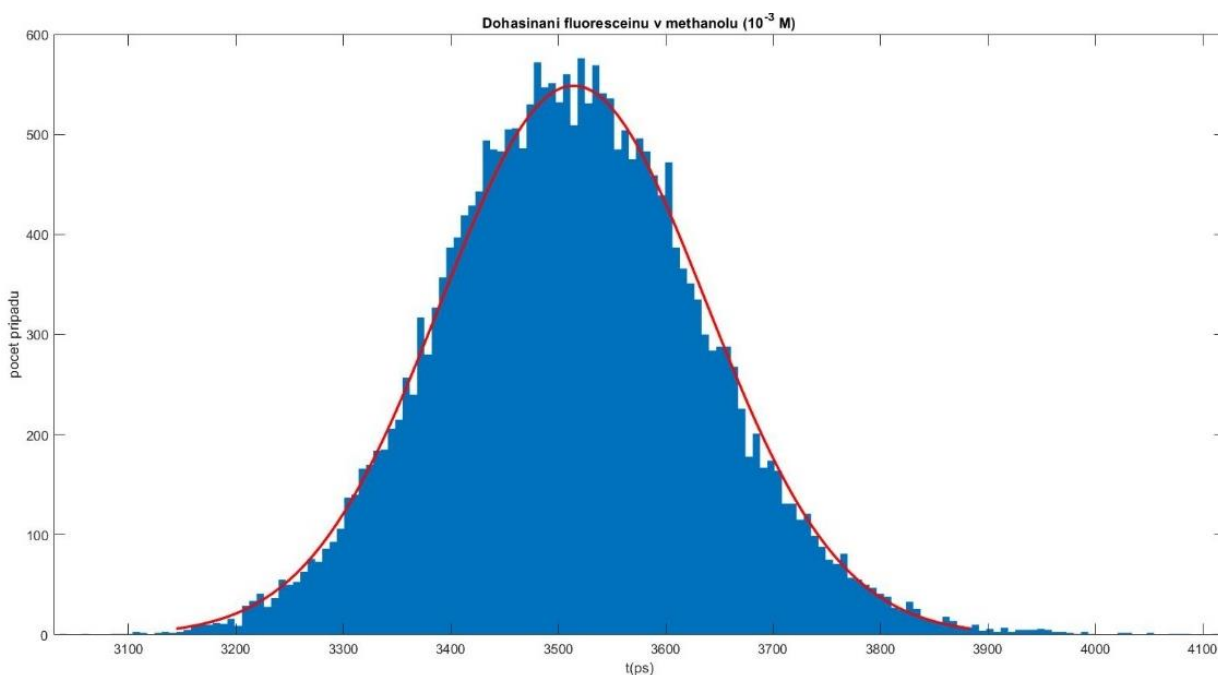
Fluorescein je synteticky vyráběné fluorescenční barvivo, které ze všech testovaných barviv poskytuje nejvyšší emisi při stejné intenzitě excitace. Z těchto důvodů je toto barvivo také

nejvíce využíváno. Nachází použití například v oftalmologii při zjišťování očních vad, v geologii při studiu proudění kapalin skrz horniny nebo pro zjištění průsaků v ropných sestavách.



Obrázek 34: Histogram dob dohasínání Fluoresceinu v ethanolu při molaritě  $10^{-3} M$

Prvním testovaným roztokem byl roztok fluoresceinu v ethanolu při koncentraci  $10^{-3} M$ . Podle měření v Kristoffersenově druhém článku byla doba dohasínání tohoto vzorku  $3,6 \pm 0,1$  ns, z měření pro tuto práci byla získána doba dohasínání  $3,5 \pm 0,2$  ns. Druhým roztokem byl fluorescein při stejné koncentraci v methanolu. Doba dohasínání z článku byla  $3,4 \pm 0,1$  ns a z nového měření  $3,5 \pm 0,1$  ns.



Obrázek 35: Histogram dob dohasínání Fluoresceinu v methanolu při molaritě  $10^{-3} M$

### 3.2.1.5. Shrnutí

Barvivo	Rozpouštědlo	Molarita (M)	$\tau$ z článku (ns)	$\tau$ z měření (ns)
Rhodamin B	Voda	$10^{-3}$	$1,49 \pm 0,04$	$1,63 \pm 0,04$
	Ethanol	$10^{-2}$	$1,95 \pm 0,05$	$2,06 \pm 0,07$
Kumarin 6	Ethanol	$10^{-2}$	$2,42 \pm 0,06$	$2,39 \pm 0,06$
	Methanol	$10^{-2}$	$2,28 \pm 0,05$	$2,3 \pm 0,1$
Luciferová žlut'	Methanol	$10^{-2}$	$9,2 \pm 0,9$	$8,1 \pm 1,1$
Fluorescein	Ethanol	$10^{-3}$	$3,6 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,2$
	Methanol	$10^{-3}$	$3,4 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,1$

Tabulka 1: Porovnání dat z článků a měření provedených na FLIMu v Bergenu

Data získaná z provedených měření fluorescenčních barviv jsou obecně v dobré shodě z těmi z obou článků i přes značné stáří některých vzorků. Jejich vlastnosti se tedy (obzvláště v alkoholech) s časem nemění nebo pouze minimálně. Částečná neshoda oproti předpokládaným výsledkům byla pozorována u roztoku Rhodaminu B ve vodě. Rozdílnou hodnotu právě u tohoto vzorku ale bylo možné očekávat v důsledku jeho dříve zmíněné časové nestálosti a výsledky měření jsou tedy i přesto uspokojivé.

### 3.2.2 Preparát konvalinky

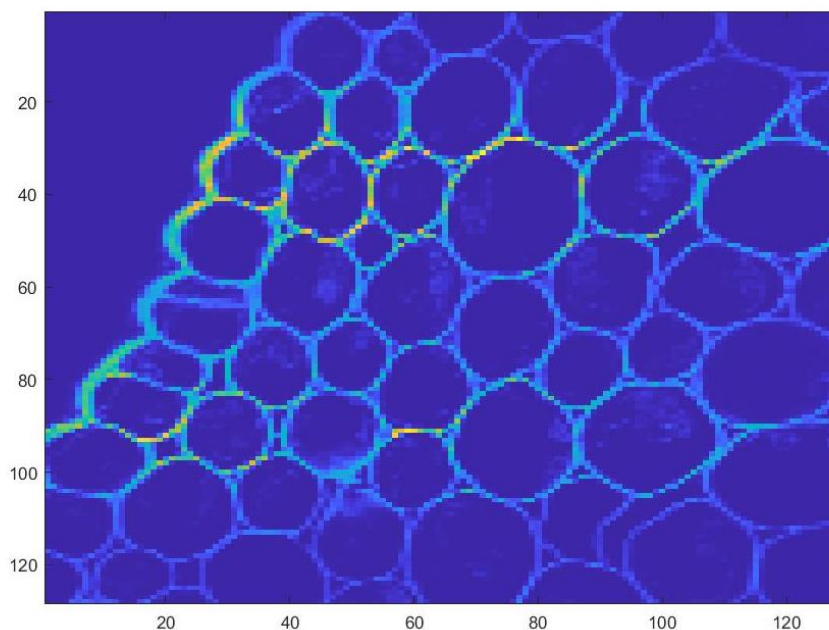


Obrázek 36: Mikroskopická fotografie preparátu konvalinky

Druhým testovaným typem vzorku byl předem vyrobený fluorescenční preparát oddenku konvalinky vonné v příčném řezu dodávaný s FLIM sestavou výrobcem (obrázek 36). Oddenek byl zvýrazněn fluorescenčními barvivy, které umožňují lepší pozorování jeho struktury. Z hlediska fluorescenčního dohasínání je takový vzorek ideální pro určování prostorového rozlišení sestavy zejména v mikroskopické škále a sledování multiexponenciálního dohasínání (v tomto případě ze dvou komponent) vznikajícího vlivem kombinace organických látek samotného oddenku a použitého fluorescenčního barviva. Na obrázku 36 je možné si zároveň povšimnout lokálního poškození vzorku vzniklého z důvodu příliš vysoké intenzity, které vzniklo během let používání tohoto preparátu. Jelikož se jedná pouze o lokální spálená místa, zbytek preparátu (modře obarvené oblasti) bylo stále možné bez problému měřit.

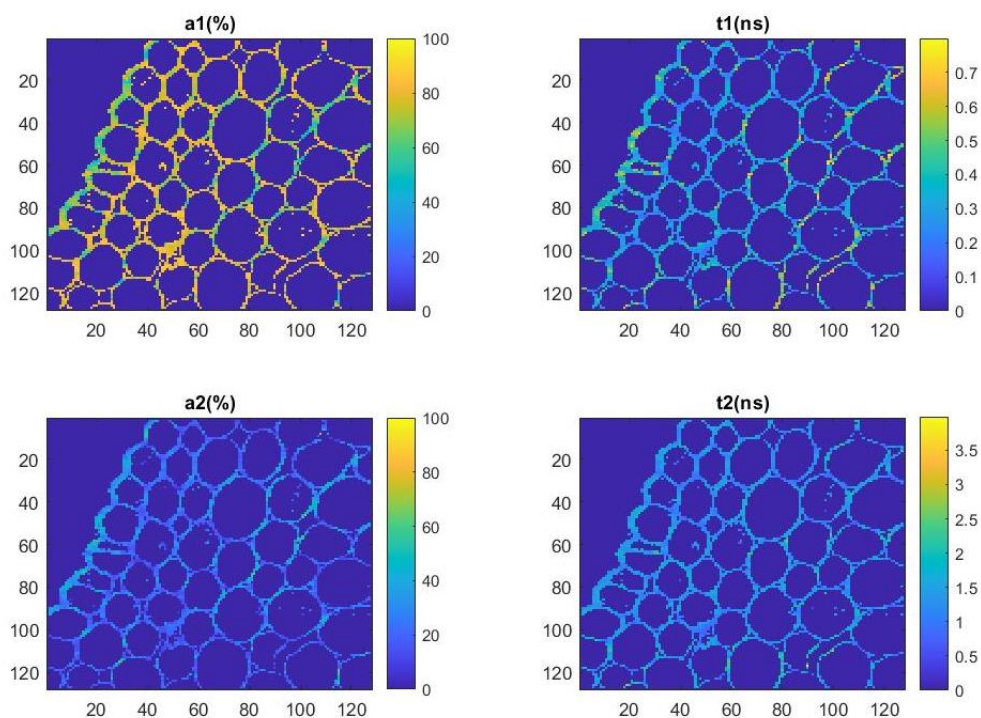
Vzhledem k nespojitě buněčné povaze vzorku zde již není možné určovat statisticky dobu dohasínání jako v případě fluorescenčních barviv. Typ a koncentrace fluorescenčních látek se

totiž napříč vzorkem značně mění a jednotlivé body tedy mohou mít jiné komponenty, které nelze společně statisticky zpracovat.



Obrázek 37: Intenzitní zobrazení okraje řezu konvalinky

Podobně jako v předchozích případech i zde lze s výhodou využít počet fotonů zaznamenaných v každém pixelu (obrázek 37) pro odfiltrování míst, ve kterých je kvalita informace (a tedy získaných časů dohasínání a jejich poměrů) příliš nízká. V bodech splňujících intenzitní podmínku poté můžeme analyzovat křivku dohasínání a v případě tohoto preparátu rozdělit na dvě komponenty a jejich procentuální váhy.



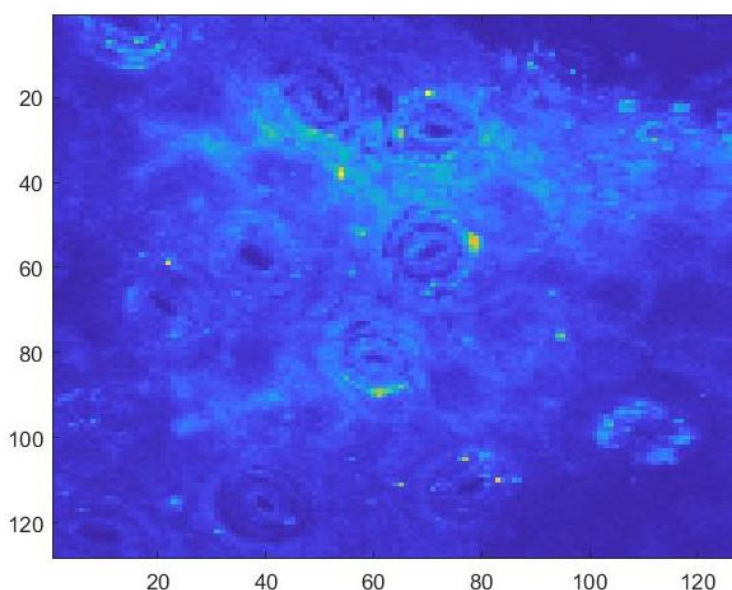
Obrázek 38: Časové komponenty dohasínání konvalinky (vpravo) a jejich procentuální váhy (vlevo)



Takovou analýzu můžeme pozorovat na obrázku 38. Na pravé straně je možné vidět, že první komponenta se ve většině případů pohybuje mezi 0,2 až 0,8 ns, zatímco druhá bývá přibližně pětikrát větší. Průměrný váhový faktor první komponenty činí přibližně 75 % (obě váhová zobrazení na levé straně jsou normalizována na maximum 100 %). Pokud vezmeme průměrné hodnoty ze všech čtyř panelů (z pixelů splňujících intenzitní podmínku) a považovali bychom zjednodušeně dohasínání ve všech bodech za stejné, dala by se v případě oddeňku konvalinky závislost intenzity  $I(t)$  na čase  $t$  (v ns) popsat podle rovnice (1.2) jako

$$I(t) = I_0 \cdot \left( 0,745 \cdot \exp\left(-\frac{t}{0,348}\right) + 0,255 \cdot \exp\left(-\frac{t}{1,364}\right) \right). \quad (3.1)$$

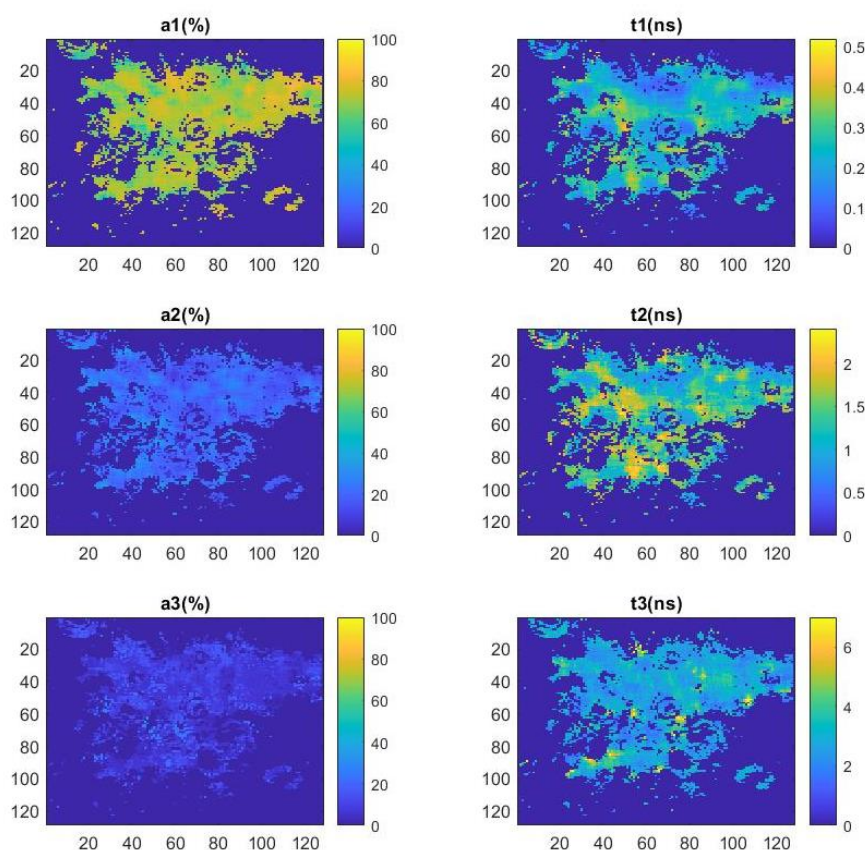
### 3.2.3 Listy rostlin



Obrázek 39: Intenzitní zobrazení spodní strany živého listu rododendronu

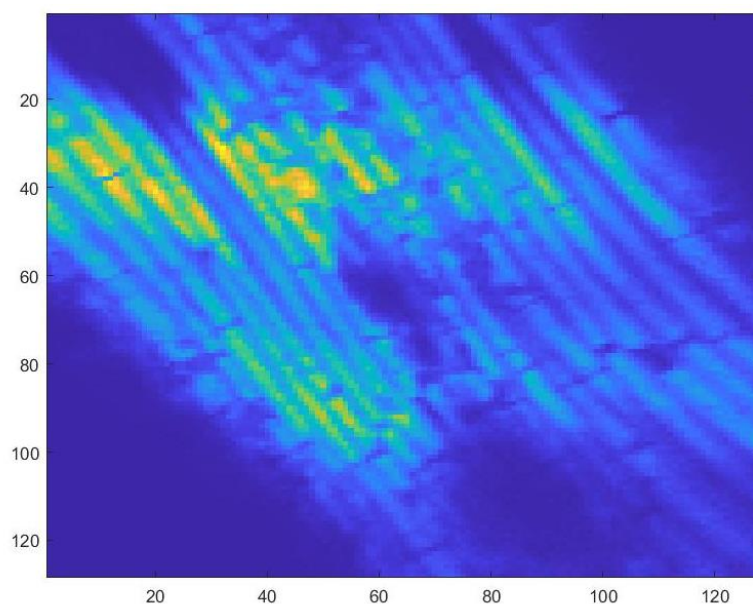
Poslední částí testování FLIMu v Bergenu byl pokus o měření fluorescenčního dohasínání běžně dostupných materiálů bez speciálních úprav (například dodatečného obarvení). Pro tuto část experimentu byly vybrány obyčejné listy rostlin, jelikož například na fotosyntéze se podílí velké množství fluorescenčních látek. Z tohoto důvodu bylo sledováno maximální systémem měřitelné množství komponent a to tři. Testovány byly živé listy z rododendronu (obrázek 39) a suché listy z pokojové palmy (obrázek 41). Zároveň je tedy možné sledovat, jestli ve fluorescenci vzniká rozdíl mezi živými a suchými listy. Postup při zkoumání těchto vzorků byl prakticky totožný s tím z měření preparátu konvalinky. Na obrázku 39 je možné si všimnout, že díky fluorescenčnímu zobrazení jsou výrazně lépe vidět průduchy na spodní straně listu než v klasické mikroskopii.





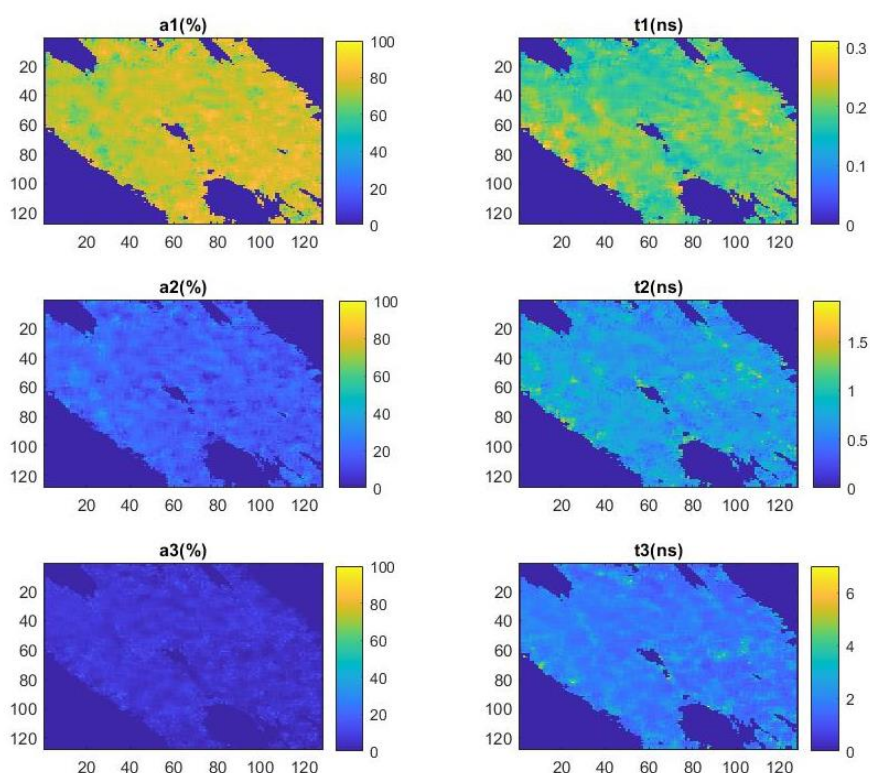
Obrázek 40: Časové komponenty dohasínání spodní strany živého listu rododendronu (vpravo) a jejich procentuální váhy (vlevo)

Na obrázku 40 můžeme vidět analýzu komponent dohasínání živého listu rododendronu pro pixely splňující intenzitní podmínku. Z obrazu je patrné relativně nízké procentuální zastoupení třetí komponenty pohybující a její velice proměnné hodnoty (krajní hodnoty dohasínání z analýzy dosahovaly až 15 ns, rozsah grafu třetí časové komponenty ale byl omezen do 7 ns, aby byly lépe zobrazeny střední hodnoty). Toto může být způsobeno rozdílnými látkami přítomnými v různých buňkách. Vyšší hodnoty třetí komponenty jsou také často vidět v okolí průduchů listu. Buňky průduchů mají značně odlišné fungování od zbytku listu a jejich látkové složení se tedy s nejvyšší pravděpodobností liší, což způsobuje odlišné časy dohasínání.



Obrázek 41: Intenzitní zobrazení svrchní strany suchého listu pokojové palmy

Na obrázku 41 je možné vidět intenzitní zobrazení fluorescence suchého listu pokojové palmy. Tento obrázek ukazuje, že i u suchého listu jsou stále přítomny fluorescenční látky a je tedy možné jej fluorescenční mikroskopií bez jakýchkoliv úprav pozorovat s vyšším kontrastem než v případě klasické mikroskopie.



Obrázek 42: Časové komponenty dohasínání suchého listu pokojové palmy (vpravo) a jejich procentuální váhy (vlevo)

Z analýzy komponent časového dohasínání (obrázek 42) je patrné, že v porovnání s listem rododendronu a složitou strukturou jeho spodní strany jsou hodnoty komponent dohasínání získané v tomto případě výrazně rovnoměrněji rozložené (většina bodů je reprezentována

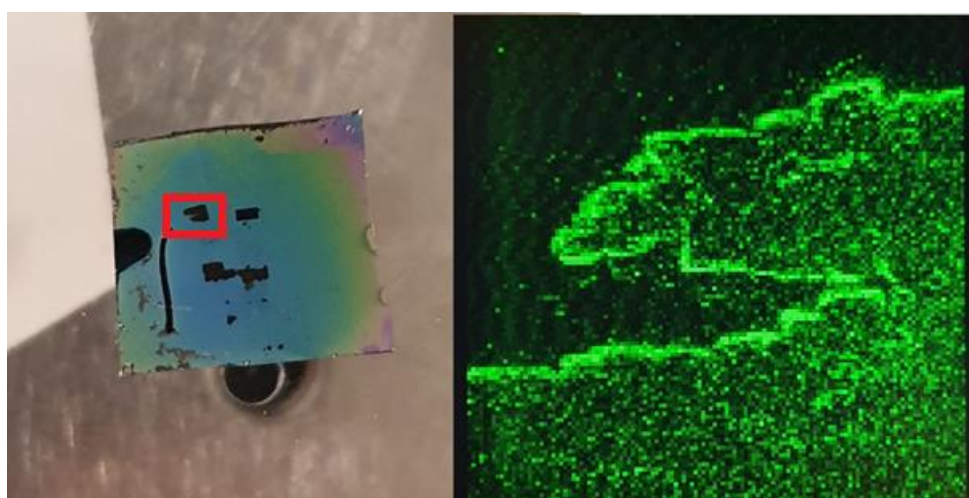
podobnými barevnými odstíny – podobnými časy). V průměru se ale hodnoty v obou případech pohybují ve velice podobných hodnotách a lze tedy předpokládat, že vysušení buněk listů nezpůsobí ztrátu nebo rozpad fluorescenčních látek v nich obsažených. Vzorky lze tedy ve fluorescenční mikroskopii a FLIMu zkoumat i z odumřelých rostlin.

Obecně tato část experimentu také ukázala, že je možné získat zajímavé vzorky pro fluorescenční analýzu i bez složitých příprav preparátů a použití speciálních barviv. Spolu s tím je ale nutné podotknout, že pro analýzu dohasínání se jedná o velmi složité příklady s velkým množstvím různých konstant dohasínání. Určování komponent nemusí být přesné, může se jich lokálně vyskytovat více či méně a s nejvyšší pravděpodobností bez jejich předchozích znalostí nebudeme schopni určit, čemu ve vzorku odpovídají.

### 3.2.4 Neúspěšná měření

Při výzkumu na FLIMu UiB bylo zjištěno také několik vzorků, které místní sestavou nebylo možné naměřit. Důvodem pro to byly vlastnosti materiálů v kombinaci s uspořádáním použité sestavy. Nejvíce omezujícím faktorem byla frekvence použitého laseru 80 MHz, kterou nebylo možné upravit. Vzorek tedy byl novým pulzem excitován každých 12,5 ns a pro úspěšné měření musela být doba dohasínání nejlépe menší než 10 ns. Díky tomu nebylo možné testovat například scintilační krystaly používané v elektronových mikroskopech. Ty sice vykazovaly zcela nejvýraznější fluorescenci z testovaných vzorků, ale jejich doba dohasínání byla mnohonásobně vyšší než měřitelné maximum. Pulzy laseru vzorek excitovaly tak často, že emisní intenzita byla prakticky konstantní a křivky dohasínání v ní nebylo možné nalézt.

Druhý problém omezující tuto sestavu bylo transmisní uspořádání experimentu. Laser vzorek osvětloval na jedné straně, zatímco detektor jej pozoroval z druhé. Z tohoto důvodu nebylo možné měřit neprůsvitné vzorky, které vykazovaly fluorescenci ve strukturách na svém povrchu (například neprůhledný křemík pokrytý na jedné straně diamantovými nanokrystaly). Než se v takovém případě dosáhlo intenzity laseru, která by nebyla při průchodu křemíkem na druhou stranu zcela absorbována a excitovala by krystaly na druhé straně, byl vzorek touto intenzitou zničen.

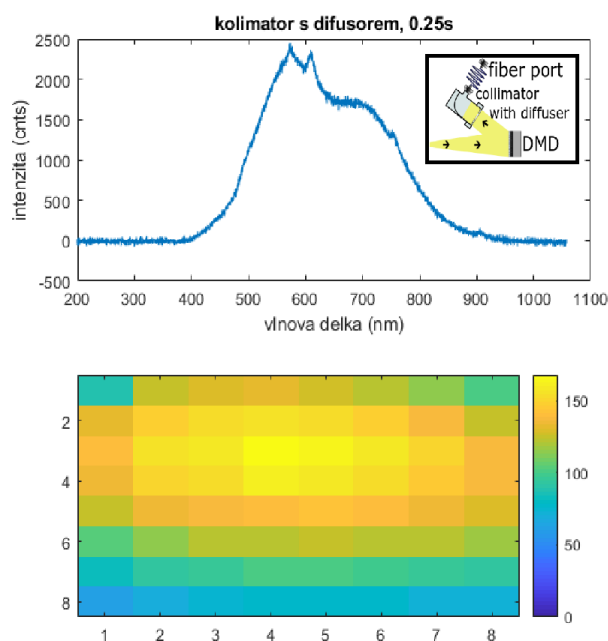


Obrázek 43: Spálený vzorek polykrystalických mikrostruktur a záběr z měření v momentě spálení (místo měření červeně vyznačeno)

## 4 Hyperdimenzionální snímač

V této kapitole se budeme věnovat konstrukci a měření na experimentálním uspořádání v centru TOPTEC, které mělo za úkol kombinovat jednopixelovou kameru s měřením spekter a fluorescenčního dohasínání. Cílem bylo dosáhnout vzniku hyperdimenzionálního snímače schopného získat obě informace ze stejného vzorku pomocí jedné sestavy.

Již na konci mé bakalářské práce byly prováděny experimenty s využitím jednopixelové kamery v hyperspektrálním snímání. Sestava po vytvoření efektivního sběru světla do vlákna rekonstruovala dobře spojité spektrum použité žárovky a sběr z celé plochy detektoru byl uspokojivě homogenní (obrázek 44). Vytvořené uspořádání bylo již v tomto případě vyzkoušeno pro jednoduché hyperspektrální měření, jehož výsledky byly rozděleny do tří barevných úseků (modré, zelené, červené).

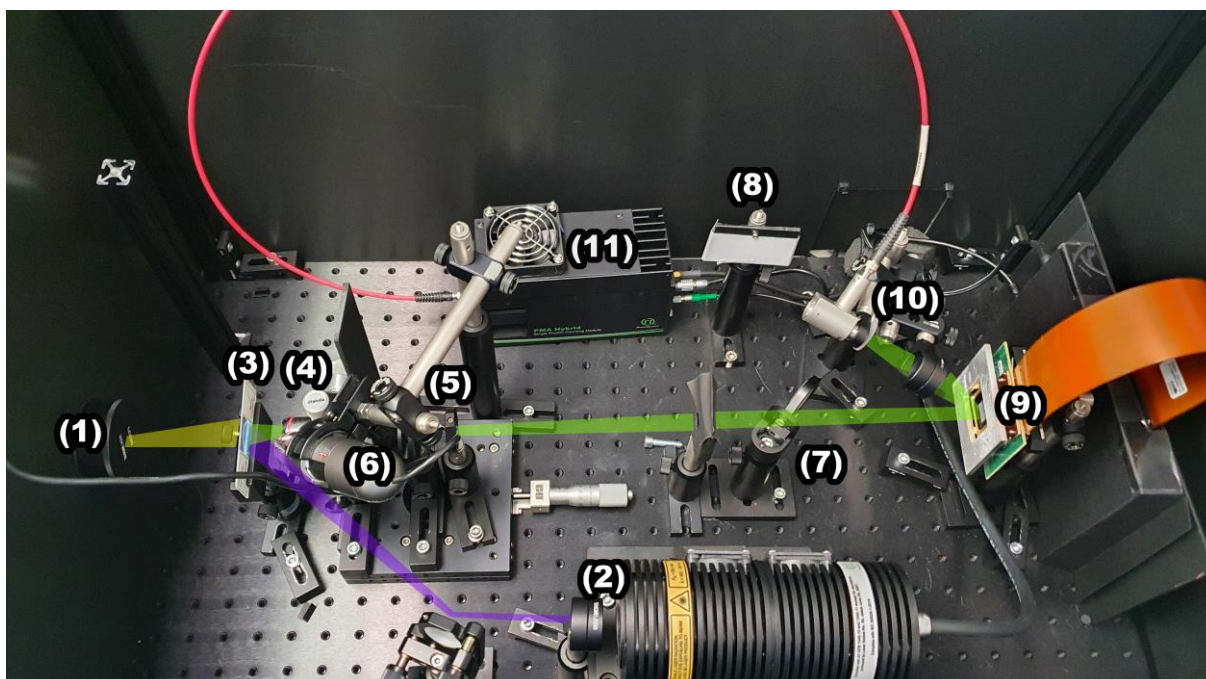


Obrázek 44: Sběr světla z DMD pomocí kolimátoru s difusorem – uspořádání použité pro hyperdimenzionální snímač (Klein, 2019)

### 4.1 Experimentální sestava

Aby bylo možné z předcházejícího experimentu vytvořit hyperdimenzionální snímač, bylo zapotřebí provést několik zásadních úprav. Cílem bylo vytvořit jednu sestavu, která by s minimem úprav dokázala na jednom vzorku provést hyperspektrální měření i analýzu fluorescenčního dohasínání (obrázek 45). Pro dosažení tohoto výsledku bylo zapotřebí, aby úsek mezi umístěným vzorkem a vstupem do optického vlákna byl pro oba experimenty totožný. Vzorek tedy byl umístěn tak, aby se jeho obraz přezobrazil na DMD. Celá sestava byla zakrytována tak, aby byl odstraněn vliv osvětlení z okolního prostředí, které by obzvláště v případě počítání jednotlivých fotonů v TCSPC znemožnilo měření.





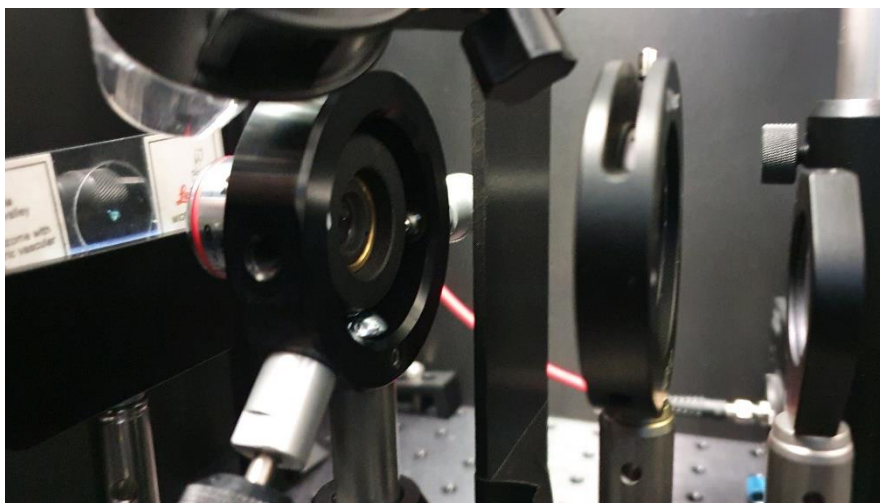
Obrázek 45: Vytvořená sestava pro hyperdimenzionální snímání (více popsáno v textu níže)

#### 4.1.1 Zdroje světla

V případě hyperspektrálního snímání intenzity prošlého světla byla jako zdroj použita bílá světlo emitující dioda (LED) umístěná na druhé straně vzorku (1) tak, aby vzorek byl v jejím ohnisku (3). Ačkoliv má LED méně spojitě spektrum než například žárovka, byla zvolena díky vysoké intenzitě vyprodukovaného světla a vyšší plošné homogenitě. Jelikož víme, že použité uspořádání rekonstruuje spektrum spolehlivě, lze při potřebě lepšího spektra zdroje provést jednoduchou výměnu, kterou snímač zvládne reprezentovat.

Druhým zdrojem určeným pro TCSPC měření byl pulzní laser PicoQuant LDH-P-C-405M (2). [25] Ten produkoval světlo o pevné vlnové délce 405 nm a byl použit pro jednofotonovou excitaci. I když vlnovou délku nelze upravit a dosáhnout absorpčního maxima, je vlnová délka dostatečně krátká pro excitování většiny fluorescenčních vzorků. Pulzy mohou být vysílány v nastavitelné frekvenci od 1 Hz až do maxima 40 MHz (25 ns mezi dopadajícími pulzy). Díky tomu lze měření přizpůsobit vzorkům s dlouhou dobou dohasínání. Laser byl umístěn na stejné straně vzorku jako snímač a oproti FLIMu UiB tedy světlo nemuselo projít skrz celý vzorek.

### 4.1.2 Zobrazení vzorku



Obrázek 46: Detail součástí umístěných za vzorkem. Zleva doprava je zde možné vidět umístěný vzorek, mikroskopový objektiv, clonu a optický filtr.

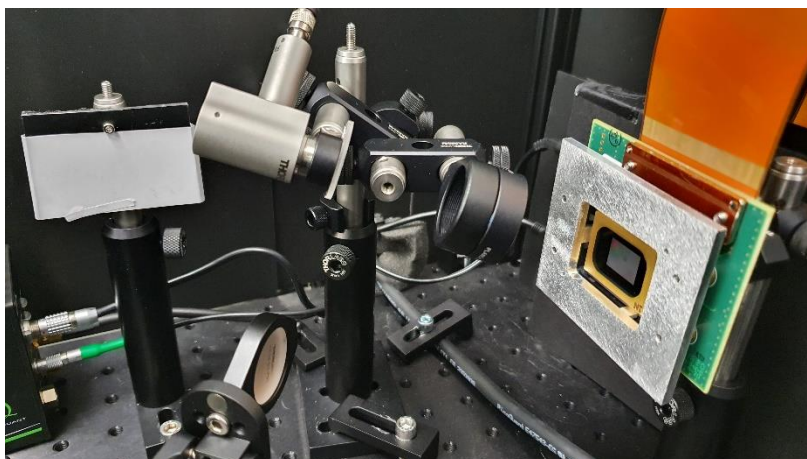
Obraz transmisního spektra vzorku nebo jeho emise je poté přes mikroskopový objektiv (Olympus PLN 4x, NA = 0.1) (4) přenesen na plochu DMD (9). Umístění vzorku může být kontrolováno také umístěnou mikroskopovou kamerou (6), díky které lze určit, která část vzorku byla systémem pozorována. V případě TCSPC je mezi čočky systému zařazen ještě optický filtr (5) zabráňující průchodu světla o vlnové délce menší než 415 nm, který brání průniku odražených paprsků z laseru do snímače, což by narušilo měření dohasínání a mohlo poškodit fotonásobič. Před DMD bylo umístěno také sklopné rovinné zrcátko (7), které umožňovalo světlo putující od vzorku odklonit na stínítko (8) umístěné ve stejné vzdálenosti jako DMD. To umožňovalo správné umístění vzorku do ohniska, což na stínítku (a tedy poté i na DMD) vytvořilo ostrý obraz.

### 4.1.3 Tvorba masek

DMD DLP3000 použité v mé bakalářské práci bylo nahrazeno novějším čipem DLP7000BFLP [26] s řídicí deskou DLP Discovery 4100. [27] Toto DMD má v porovnání se svým předchůdcem v sestavě výrazně větší plochu a také lepší rozlišení. Čip má rozměry 14×10,5 mm při rozlišení 1024×768 pixelů, zatímco čip DLP3000 měl pouze 6,9×3,7 mm při rozlišení 684×608 pixelů. Největší výhodou nového čipu DMD je ale rozměr samotných mikrozrcátek – délka jejich úhlopříčky je 13,7 μm oproti 10,8 μm předcházejícího čipu. Díky tomu se u nového DMD výrazně snížil vliv difrakce na jednotlivých zrcátkách, která způsobovala výrazné ztráty intenzity v předchozí sestavě. Mikrozrcátka DLP 7000 se zároveň naklání ve směru diagonály čipu, v závislosti na dodané binární hodnotě tedy světlo dopadající zepředu na čip odráží vzhůru doprava nebo dolů doleva. U DLP3000 se zrcátka otáčela pouze podle svislé osy a odrážela teda jen na jednu nebo druhou stranu bez elevace. Aby se tedy u původní sestavy mohl sběr světla umístit dostatečně blízko, muselo být DMD nakloněno směrem vzhůru, což při náročnější aplikaci vytvářelo problém v hloubce ostrosti. DLP7000 může být natočený přímo kolmo vůči směru přicházejícího světla a odražené světlo přesto míří dostatečně vzhůru pro blízko umístěný kolimátor, který světlo sbírá (viz obrázek 47).



#### 4.1.4 Sběr světla a detektory



Obrázek 47: Sběr světla z nového DMD

Systém pro sběr světla z DMD (10) byl prakticky totožný s tím vybraným v předchozí bakalářské práci. Jednalo se o kolimátor Thorlabs RC08SMA-P01 s parabolickým zrcadlem napojený na optické vlákno. Jelikož na něj dopadající svazek nebyl kolimovaný, byl na kolimátor umístěn ještě speciálně navržený optický difusor s kontrolovanou směrovností rozptylu, který paprsky v tomto svazku lomil do náhodných směrů (v omezeném úhlu) a světlo z DMD tak bylo rovnoměrně za cenu ztráty intenzity svedeno do optického vlákna. Jediným rozdílem oproti uspořádání v bakalářské práci bylo zařazení jedné spojné čočky mezi DMD a kolimátor s difuzorem. Jelikož je totiž použité DMD výrazně větší než předchozí, je i odražené světlo rozloženo ve větší ploše a bylo tedy pomocí spojky zaměřeno do menší plochy kolimátoru. Na kolimátor napojené optické vlákno poté světlo při hyperspektrálním snímání vedlo do spektrometru Ocean Optics Flame-S (obrázek 13) popsáno v podkapitole 1.2. Při TCSPC měření bylo vlákno přepojeno do fotonásobiče (11) ze série PicoQuant PMA Hybrid.[28] Signál z fotonásobiče a laseru koordinuje a měří TCSPC modul PicoQuant PicoHarp 300 [29], který porovnává čas příchodu referenčního impulzu z laseru a čas zaznamenání fotonu z excitace.

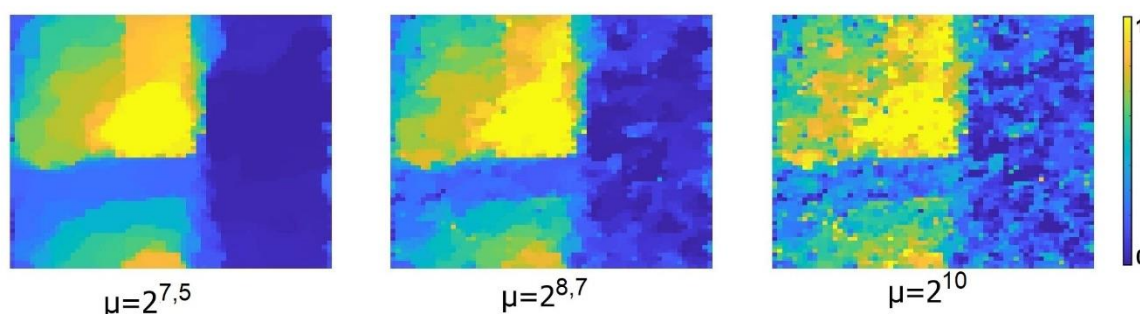
## 4.2 Postup měření

V obou konfiguracích byl vzorek osvětlen příslušným zdrojem světla a procházející/emitované světlo dopadlo na DMD. Na něj byly programem odesílány jednotlivé binární masky nastavující polohu mikrozrcátek. Podle zvoleného typu měření byl připojen vybraný detektor a zaznamenáno buď transmisní spektrum nebo křivka dohasínání. Výstupem samotného měření tak byla použita sada masek pro jednopixelovou kameru a k nim příslušící naměřené informace.

V případě hyperspektrálního snímání tedy byl vzorek osvětlen zezadu světlo emitující diodou, procházející světlo bylo zachyceno spektrometrem a výstupní informace byly nastavené masky a pro každou z nich získané spektrum prošlého světla. V případě fluorescenčního dohasínání byl vzorek excitován pulzním laserem zepředu a emitované světlo bylo zachyceno fotonásobičem napojeným na modul PicoHarp. Zde byly výstupní informace opět nastavené masky a pro každou z nich naměřená křivka dohasínání.

Tyto informace byly dále zpracovány s pomocí algoritmu TVAL3. V závislosti na požadované úrovni detailů byl upravován váhový faktor  $\mu$  z rovnice (2.3).

### Emise vzorku v okamžik excitace laserovým pulzem ( $t=0\text{ns}$ )



Obrázek 48: Vliv úpravy váhového faktoru na výslednou rekonstrukci

Vliv volby váhového faktoru v našem případě je možné pozorovat na obrázku 48. Pokud je zvoleno malé  $\mu$ , preferuje algoritmus minimalizaci totální variace a snaží se omezit náhlé změny intenzity. To výrazně redukuje šum, ale zároveň vyhlazuje detaily, které se mohou v obraze reálně nacházet. Při vysoké hodnotě  $\mu$  naopak algoritmus určuje hodnoty pixelů hlavně tak, aby vyhovovaly hodnotám z měření, tím je možné získat ostřejší obraz, který ale bývá výrazně více zašuměn. V závislosti na charakteru vzorku je potřeba váhový faktor upravovat pro každé měření. Pokud totiž vzorek má složitou strukturu (například malé střepey nebo buňky), s malým váhovým faktorem rekonstrukce jejich hrany nevykreslí. Naopak pro jednoduchý vzorek je možné faktorem  $\mu$  výrazně vylepšit poměr signálu vůči šumu.

Vzhledem k dlouhému trvání měření (pro obraz  $64 \times 64$  pixelů v závislosti na intenzitě nejčastěji okolo 1-2 hodin, pro velmi nízké intenzity i více než 10 hodin) se může hodnota celkové intenzity ve spektru nebo dohasínání postupně s časem posouvat například vlivem ohřevu detektoru. Jelikož ale víme, že díky náhodnému charakteru masek musí být průměr intenzit okolo neměnné střední hodnoty, je možné tuto tendenci jednoduše identifikovat a z dat odstranit. Tato výhoda komprimovaného snímání umožňuje použití méně sofistikovaného chlazení, které by u jiných typů snímání bylo potřeba, aby tendence posunu střední hodnoty nevznikala.

Rekonstrukci bylo možné provádět na celém úseku dat (spektru, čase dohasínání), na vybraných částech nebo pouze ve určité části. Významným nástrojem použitelným při rekonstrukci byly různé typy průměrování, které umožňovaly získat spojitější informaci. Toho se využívalo hlavně v měření TCSPC v případě nízkých intenzit emitovaného světla. Mimo prostorových úprav, především spojování sousedních pixelů – binningu, se pak prováděly úpravy v časové ose. Můžeme využít znalosti, že dohasínání by mělo být exponenciální a zároveň značně spojitě. Z tohoto důvodu bylo tedy možné provádět průměrování klouzavým průměrem v čase, kdy byly značně vyhlazeny hodnoty intenzity v jednom pixelu v čase. V závislosti na zvoleném počtu  $m$  prvků, přes které budeme průměrovat, můžeme ovlivnit míru vyhlazení za cenu zkrácení celkového souboru dat. Řekněme, že dohasínání máme popsáné jako soubor diskretních intenzit  $I$  s prvky  $I_1$  až  $I_n$  odpovídající časovým kanálům snímače 1 až  $n$  (odpovídající čas závisí na zvolené šířce kanálu). Vyhlazený soubor intenzit  $\tilde{I}$  tedy můžeme dostat následující rovnicí:

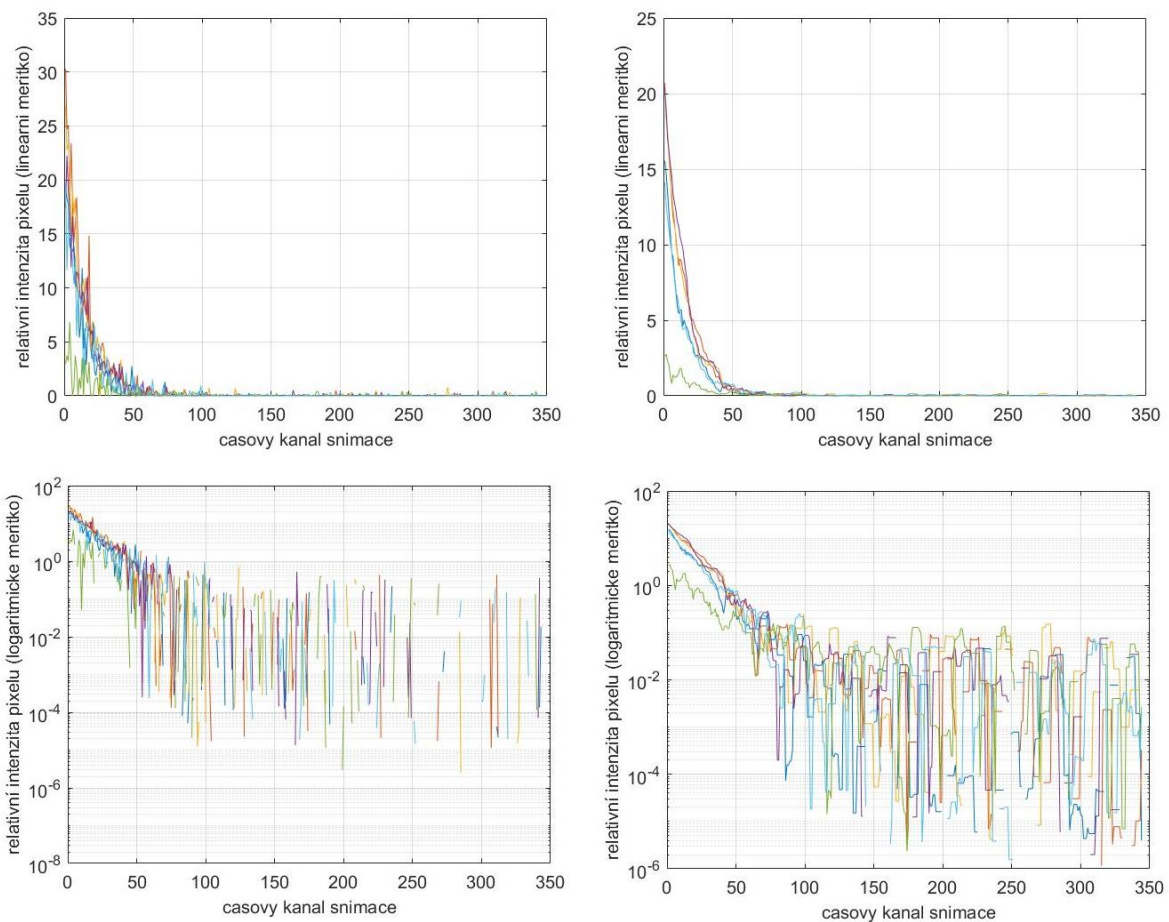
$$\tilde{I}_i = \frac{I_i + I_{i+1} + I_{i+m}}{m}, i = 1, \dots, (n - m + 1). \quad (4.1)$$

Jelikož komprimované snímání rekonstruuje obraz v každém časovém okamžiku bez závislosti na jiných, vzniklý šum bude jiný v každém z nich. Klouzavý průměr v jednom bodě po časové ose tedy eliminuje tyto skoky intenzity a poskytne lepší křivku pro následné určování času dohasínání. Z rovnice (4.1) je také patrné, že vyhlazený soubor dat je kratší o  $m-1$  prvků. Nastavením frekvence laseru ale můžeme vytvořit dostatečně velký prostor mezi pulzy (a tedy dostatek časových kanálů), aby odebrání několika prvků na konci dat nezpůsobilo žádné komplikace.

## Dohasínání jednotlivých bodů obrazu

Bez časových úprav

S klouzavým průměrem



Obrázek 49: Křivky dohasínání jednotlivých bodů obrazu kombinovaného vzorku Rhodaminu 6G a scintilačního krystalu před a po časových úpravách

Na obrázku 49 můžeme vidět vliv takových úprav. Horní dva grafy ukazují dohasínání jednotlivých pixelů, jak byly určeny nezměněnou rekonstrukcí. Dolní dva grafy ukazují totéž po použití klouzavého průměru přes 10 časových kanálů. Je zde patrný výrazný pokles zašumění, obzvláště poté v lineárním měřítku, kde byly eliminovány skokové hodnoty šumu zvyšující lokálně intenzity oproti předchozím časům.

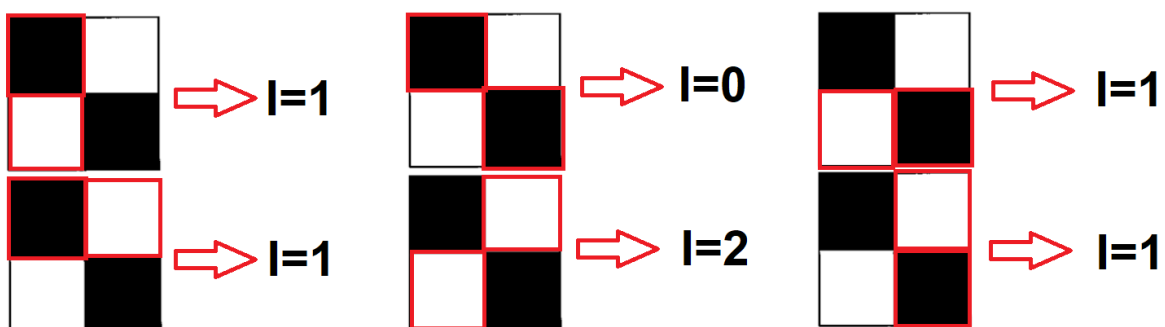
### 4.3 Pseudopřiblížení obrazu

I když to v samotné teorii komprimovaného snímání není nijak omezeno, operuje většina jednopixelových kamer s menším rozlišením, než kterého by bylo možné použitým generátorem masky dosáhnout. I námi vytvořený systém využívá DMD s rozlišením 1024×768 pixelů a většina měření na něm je prováděna v rozlišení 64×64 pixelů. Důvodů pro to existuje několik. Prvním je samotná délka měření. Jelikož je měření ve své podstatě postupné (nastaví se maska, naměří informace a proces se cyklicky opakuje), trvá mnohonásobně déle než to využívající klasické snímání (každý cyklus trvá přibližně stejně dlouho jako vytvoření jednoho klasického snímku). Pokud zvolíme dvakrát vyšší rozlišení, při stejném procentu počtu měření je potřeba cyklů provést čtyřikrát déle. Pro zde použité DMD by tedy při plném rozlišení bylo potřeba 192krát více měření než při zvoleném rozlišení 64×64 pixelů.

Druhý problém vychází z modulace naměřeného signálu. Ta se řídí Poissonovým rozdělením a se zvyšujícím se počtem pixelů ( $N_{pix}$ ) tak klesá směrodatná odchylka signálu:

$$\sigma = \frac{1}{\sqrt{N_{pix}}} \quad (4.2)$$

Se zvyšujícím se rozlišením tedy odstup naměřených hodnot od té střední klesá a signál se stává hůře rozlišitelným. To lze ukázat na příkladu vlivu jednoho pixelu na celkovou intenzitu. Předpokládejme, že na DMD dopadá obraz tak, že na každé zrcátko dopadne relativní intenzita 1 nebo 0. Relativní intenzitou 1 bude osvětlena přesně polovina počtu pixelů. Podobně náhodná maska bude vždy nastavena tak, aby přesně polovina počtu zrcátek směřovala na detektor a polovina ne. Pokud tedy budeme mít rozlišení masky 2×2 pixelů, budou dvě náhodná zrcátka osvětlená intenzitou 1 a dvě se náhodně natočí na detektor. Detektor tedy může detekovat relativní intenzitu 0, 1 nebo 2, z nichž intenzita 1 je nejpravděpodobnější (viz obrázek 50). Ta vzniká ve čtyřech případech, zatímco intenzity 0 a 2 pouze v jednom případě každá. Relativní intenzita 1 je tedy střední hodnota a může se měnit o 1 nahoru nebo dolů, nejbližší krok signálu od ní tedy je o 100 % více nebo méně.

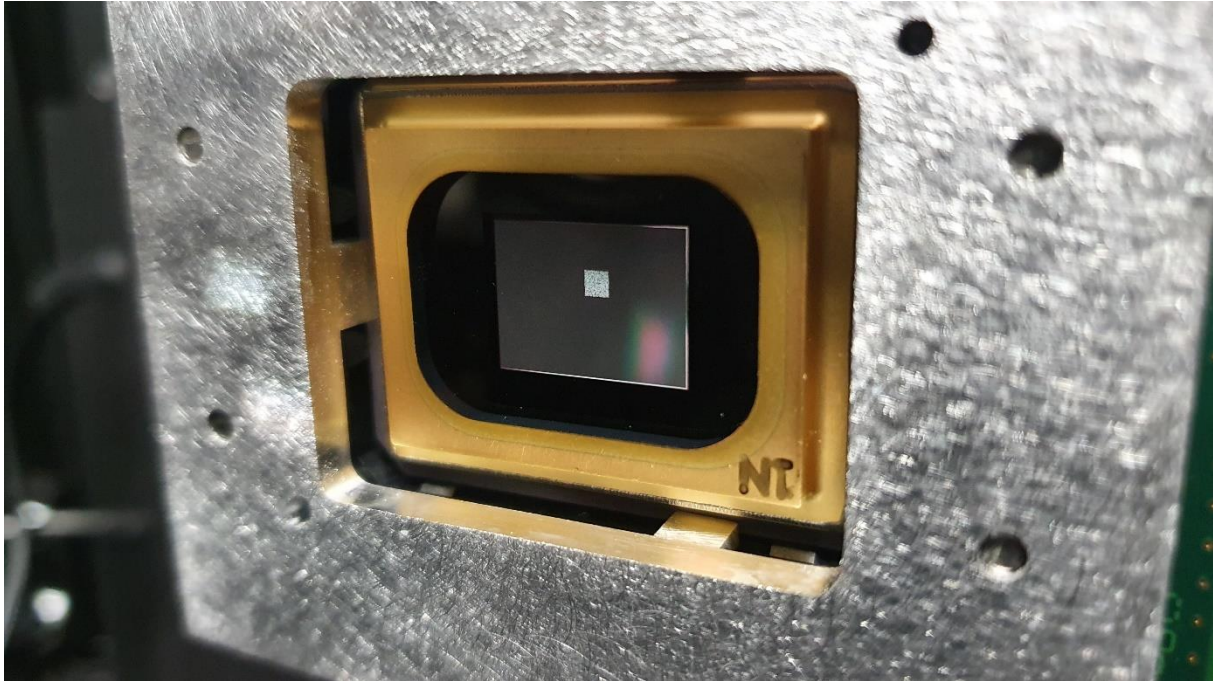


Obrázek 50: Příklad hodnot na detektoru pro masku 2×2. Bílé čtverce mají relativní intenzitu 1, černé 0, červeně označené jsou měřeny detektorem.

V případě námi používaného rozlišení 64×64 pixelů je střední hodnotou relativní intenzity čtvrtina počtu pixelů (1024) a opět se mění o 1 nahoru nebo dolů při nejmenší změně signálu. Zde už ovšem jde pouze o 0,1 % střední relativní intenzity. Signál je tedy výrazně méně modulován oproti předchozímu příkladu. Vzhledem ke statistickému charakteru náhodného



procesu se hodnota naměřená detektorem pro každou masku bude pohybovat v blízkosti střední hodnoty a se stoupajícím rozlišením bude nejmenší krok změny intenzity zmenšující se procento střední intenzity. V ideálním teoretickém případě by nevznikal problém, ale v reálné aplikaci, modulace signálu začne klesat do úrovně šumu a nebude možné obraz z měření správně zrekonstruovat. Pokud by tedy DMD fungovalo na nejvyšší rozlišení, bude střední relativní intenzita 196608 a změna o 1 již činí pouze 0,0005% změnu hodnoty intenzity, kterou ve většině reálných aplikací nebude možné rozlišit.



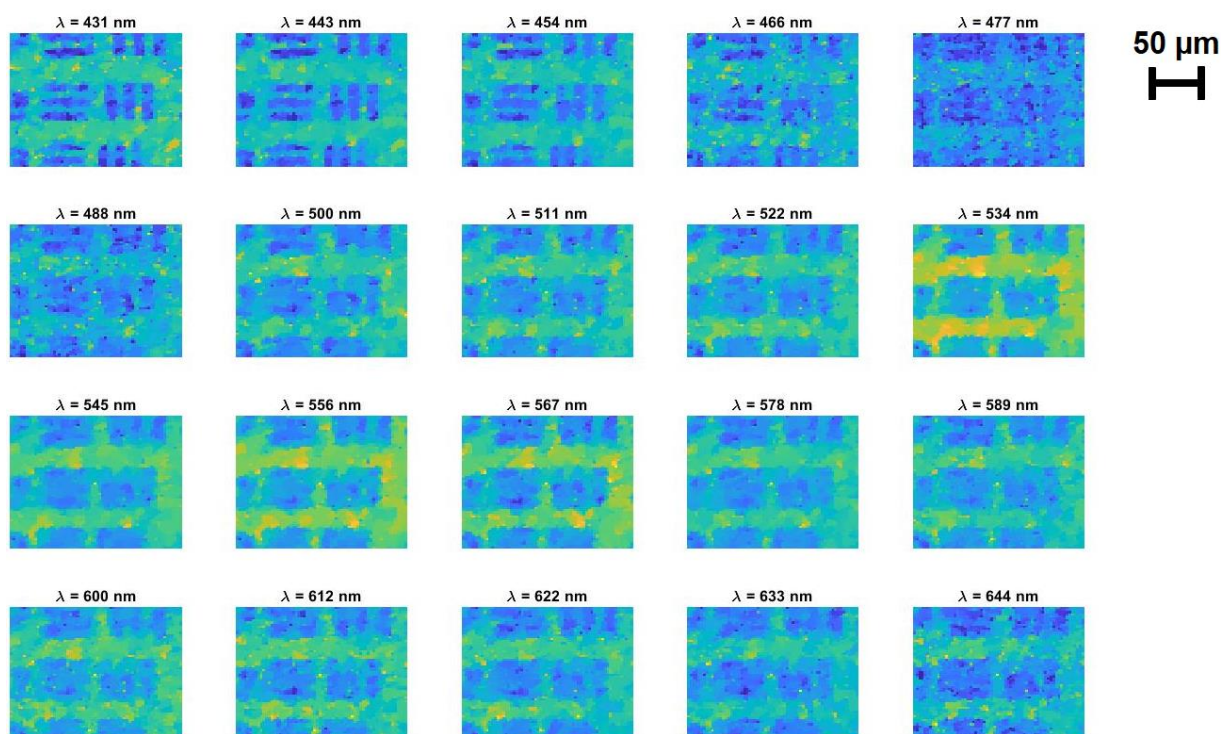
Obrázek 51: Maska vytvářená pouze na části DMD pro zobrazení menší oblasti dopadajícího obrazu

DMD tedy podle této analýzy zdánlivě nemůže dosáhnout vyššího rozlišení, a tedy ani detailnějšího obrazu i při velmi dobrém přenosu optickou soustavou. Použitý mikroskopový objektiv s numerickou aperturou  $NA=0,1$  nám totiž podle vztahu Abbeho kritéria umožňuje rozlišit dva body v minimální vzdálenosti

$$d = \frac{\lambda}{NA} \quad (4.3)$$

Rozlišení se tedy zhoršuje se zvyšující se vlnovou délkou. Zatímco v případě nejkratších viditelných vlnových délek (400 nm) je  $d = 4 \mu\text{m}$ , pro nejvyšší viditelné vlnové délky (800 nm) odpovídá  $d = 8 \mu\text{m}$ . Se čtyřnásobným zvětšením tedy dva rozlišitelné body ve viditelném spektru budou na DMD 16-32  $\mu\text{m}$  od sebe. Zatímco pro krátké vlnové délky to odpovídá pouze o trochu více než jedné úhlopříčce mikrozrcátka, pro 800 nm jde o skoro tři úhlopříčky. Optická soustava tedy v našem konkrétním případě částečně omezuje zobrazení pro krátké vlnové délky a značně pro dlouhé vlnové délky. DMD použité ve svém maximálním rozlišení tedy může dobře zobrazovat v modré oblasti vlnových délek, ale pro větší vlnové délky bude obraz rozmazaný. Toto je platné za předpokladu, že by nevznikal problém s modulací signálu. Částečně ale bylo možné tuto komplikaci obejít vytvořením takzvaného „pseudopřiblížení“ obrazu. Možností je při stejném rozlišení zmenšit zobrazovanou oblast samotného DMD (obrázek 51). Celková intenzita se sice sníží (což lze vynahradit delší integrační dobou

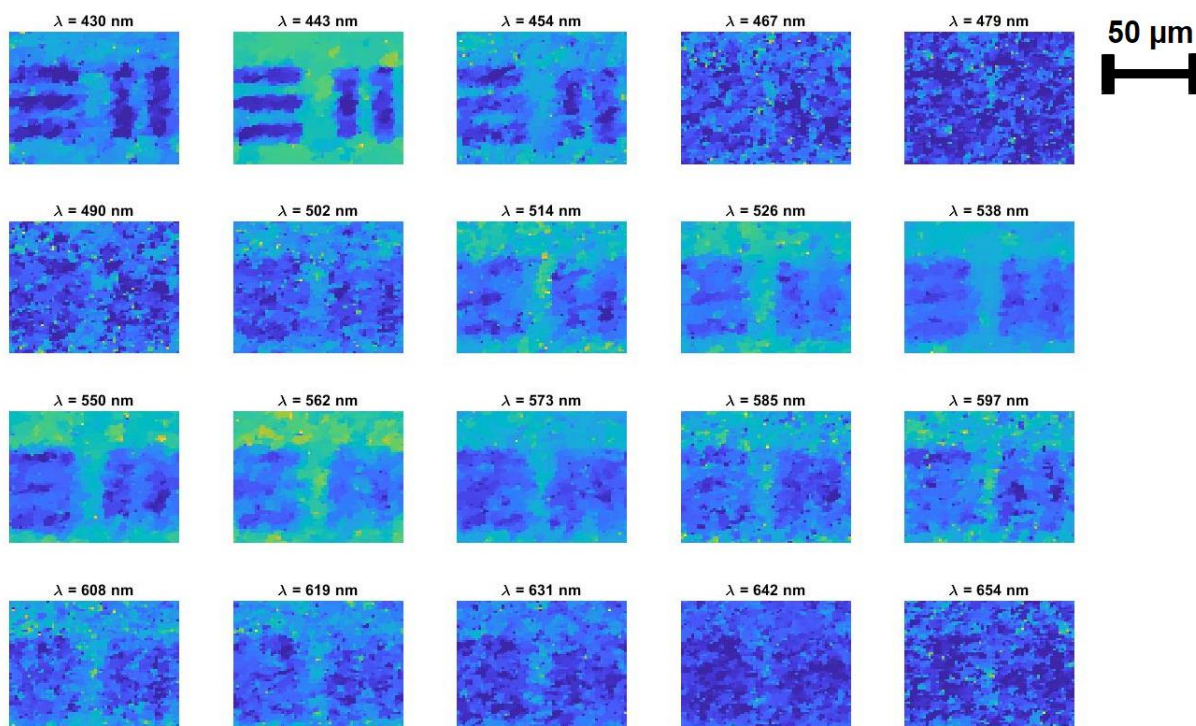
snímání), ale procentuální odstup modulovaného signálu od jeho průměrné hodnoty (který je daný rozlišením masky) zůstává stejný jako při využití celé plochy. Díky tomu můžeme zobrazit detaily obrazu v relativně podobném čase (odlišnou pouze o delší integraci na detektoru) za cenu menšího zorného pole. Se snižující se celkovou intenzitou je samozřejmě šum zvyšující se komplikací, ale jeho vliv se díky stále vysoké modulaci signálu projevuje až výrazně později. U našeho pseudopřiblížení bylo možné nastavit faktor přiblížení (celé číslo), který určoval kolik mikrozrcátek bude tvořit stranu jednoho pixelu obrazu. Při faktoru přiblížení 2 tedy například jeden pixel tvořila čtyři zrcátka ve čtverci  $2 \times 2$ . Při faktoru 1 by každé zrcátko reprezentovalo jeden pixel. Takto zmenšenou snímací oblast bylo poté možné na DMD umístit kamkoliv a zvýšit tak detaily libovolné části obrazu.



Obrázek 52: Zobrazení USAF skupiny 5, elementů 4 až 6 v hyperspektrálním snímání s faktorem přiblížení 2

Jako nástroj pro určení rozlišení byl použit terč USAF 1951, který obsahuje opakující se struktury se zmenšující se velikostí. Ty jsou označeny čísly skupiny a elementu, podle kterých je možné určit šířku proužků v daném místě. Na obrázku 52 je možné vidět použití faktoru přiblížení 2 pro zobrazení elementů 4 až 6 ve skupině 5. Uprostřed umístěné proužky elementu 5 jsou zřetelně viditelné obzvláště v modré oblasti vlnových délek (jak bylo předpovězeno rovnicí (4.3) výše) a je možné i částečně rozlišit jednotlivé proužky šestého elementu. V době psaní této práce bylo nejvyšší nalezené doložené rozlišení na jednopixelové kameře z článku IEEE z roku 2017 [30], ve kterém byl rozlišitelný čtvrtý element čtvrté skupiny. Ten odpovídá proužkům o šířce  $22,10 \mu\text{m}$ , zatímco šířka námi rozlišených proužků byla  $9,84 \mu\text{m}$  ( $8,77 \mu\text{m}$ , pokud bychom za rozlišený považovali šestý element). Pokud tedy zmíněný článek představuje největší zdokumentované rozlišení jednopixelové kamery, bylo použitím našeho systému a pseudopřiblížení dosaženo více než dvakrát lepšího výsledku.





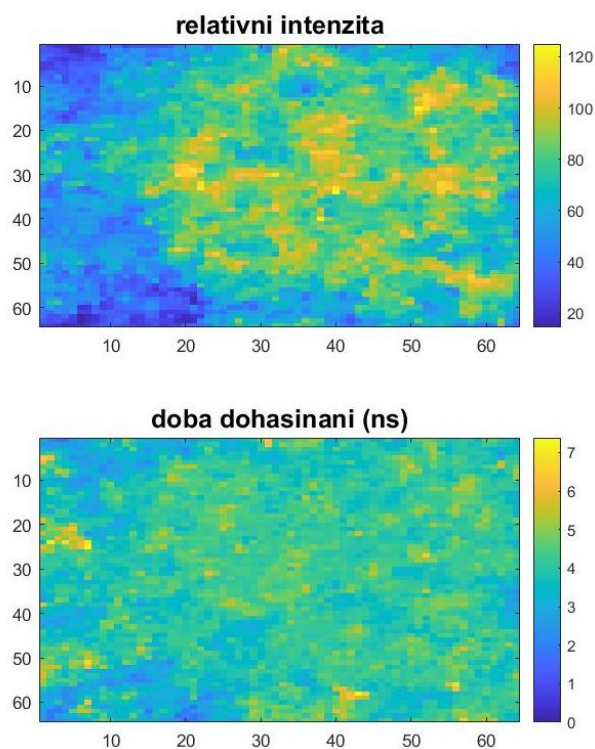
Obrázek 53: Zobrazení USAF skupiny 5, elementu 5 v hyperspektrálním snímání s faktorem přiblížení 1

Na obrázku 53 je možné vidět bližší přiblížení elementu 5 faktorem přiblížení 1. Zde je již patrné značné přiblížení modulačnímu šumu a v případě vyšších vlnových délek (horší rozlišení optické soustavy) rekonstrukce proužky vůbec neukázala. Rekonstrukce zde nejlépe proběhla ve vlnových délkách okolo 443 nm, kde jsou zřetelně rozlišitelné všechny proužky elementu.

Tato měření nám umožnila kalibraci prostorového rozlišení našeho mikroskopu a potvrdila, že optická soustava je limitující pro námi vytvořený experiment obzvláště v červené oblasti vlnových délek. Pro krátké vlnové délky ale DMD lze používat v maximu pseudopřiblížení – jednotlivá mikrozrcátka jsou jednotlivé prvky generované masky.

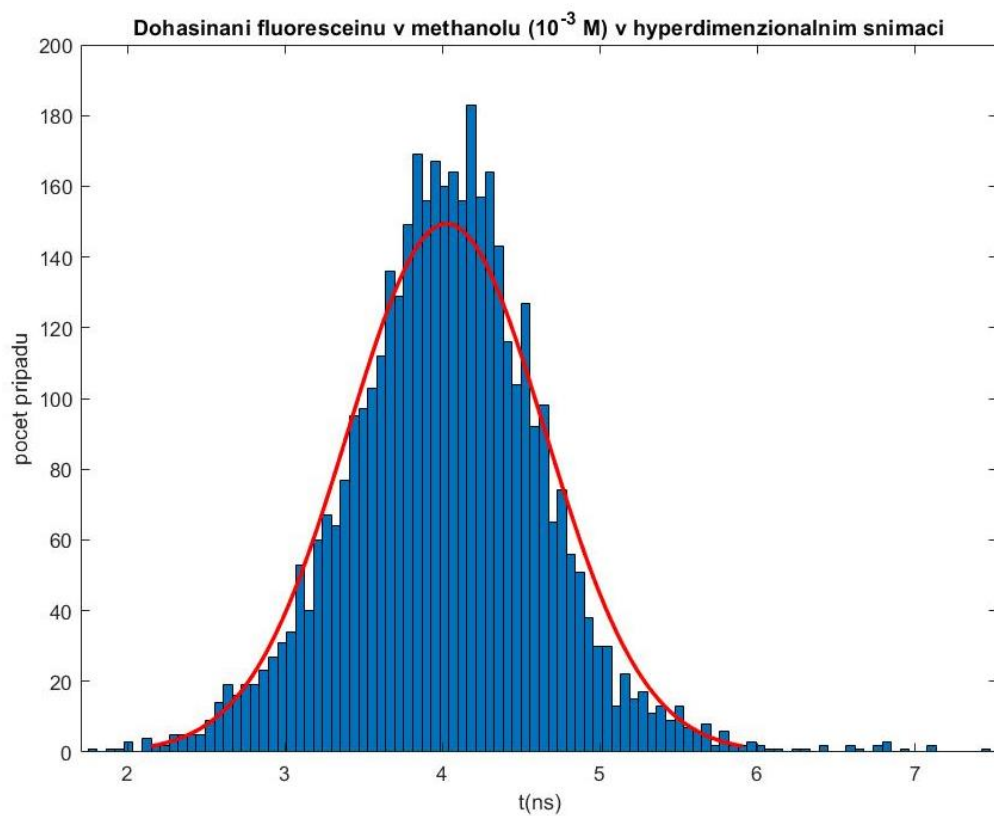
## 4.4 Testování časové složky

Experimenty s rozlišením zároveň ukázaly, že hyperspektrální část sestavy je funkční a poskytuje očekávaná data. Před kombinovaným měřením bylo ale zapotřebí otestovat také analýzu fluorescenčního dohasínání. K tomu byl použit vzorek barviva Fluoresceinu rozpuštěného v ethanolu při koncentraci  $10^{-3}$  M, který byl předtím testován na FLIMu UiB.



Obrázek 54: Analýza dohasínání fluoresceinu v hyperdimenzionálním snímači

Z analýzy dohasínání vyplývá, že i když vzorek vykazoal vyšší míru emise ze středu zkoumané oblasti oproti okrajům, doba dohasínání byla napříč vzorkem naměřena s uspokojivou homogenitou.



Obrázek 55: Histogram dob dohasínání Fluoresceinu v ethanolu při molaritě  $10^{-3}$  M získaný z hyperdimenzionálního snímače

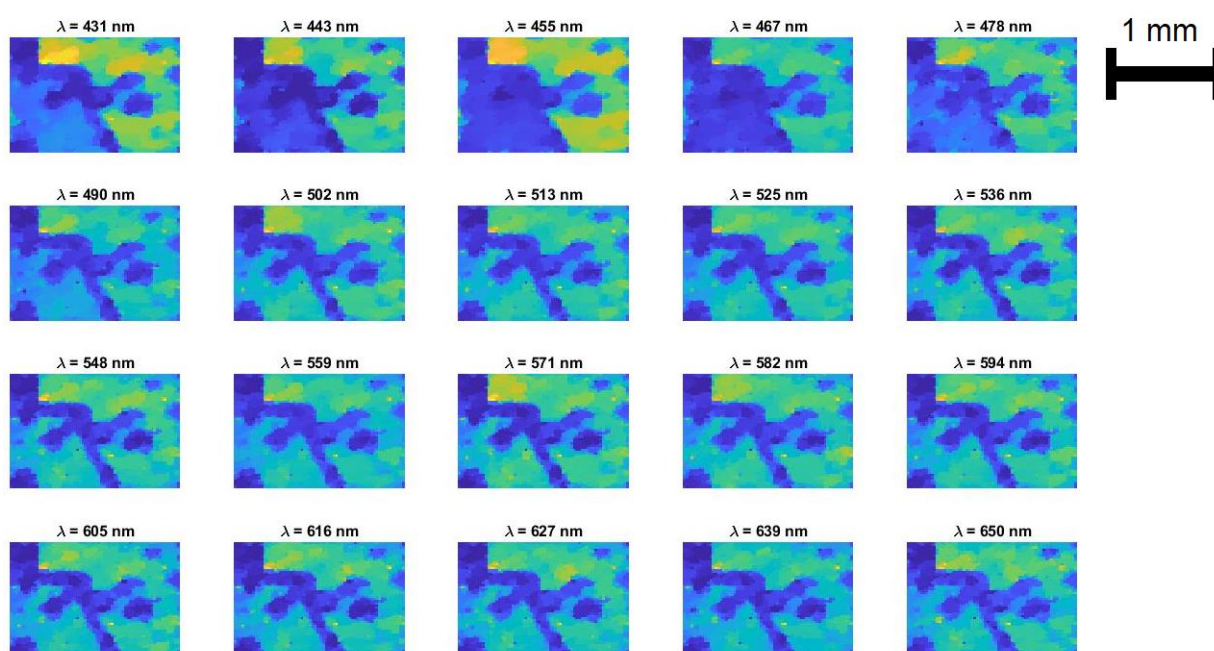
Výsledná doba dohasínání naměřená na hyperdimenzionálním snímači činila  $4,0 \pm 0,6$  ns. Střední hodnota je tedy vyšší než ta naměřená na FLIMu UiB ( $3,5 \pm 0,2$  ns), intervaly spolehlivosti obou měření se ale překrývají. Vyšší směrodatná odchylka v případě našeho systému je způsobena vlivem zašumění a také neúplností získané informace, což tvoří základ metody komprimovaného snímání. Širší interval spolehlivosti tedy v tomto případě bylo možné očekávat a měření tedy i tak považovat za úspěšné.

## 4.5 Hyperdimenzionální měření

Vytvořený hyperdimenzionální komprimovaný snímač bylo nutné otestovat pro oba měřicí principy. Bylo tedy zapotřebí použití vzorků, které jsou fluorescenční pro TCSPC a ideálně s výraznou barvou, aby i v hyperspektrálním snímání bylo možné s vlnovou délkou pozorovat určité změny.

### 4.5.1 Scintilační krystal

Jedním ze vzorků, které nebylo možné na FLIMu UiB měřit, byly scintilační krystaly. Jejich dohasínání bylo pro tento systém příliš pomalé a kvůli vysoké frekvenci pulzů použitého laseru nebylo možné křivku dohasínání zrekonstruovat. Pro prostorově pestřejší obraz byl vytvořen vzorek ze střípků krystalu luminoforu Ce-dopovaného YAGu od společnosti Crytur, což poskytovalo lepší obraz pro analýzu než prosvítit čistý výřez krystalu, který by v celé ploše obrazu vytvářel jednotný obraz.

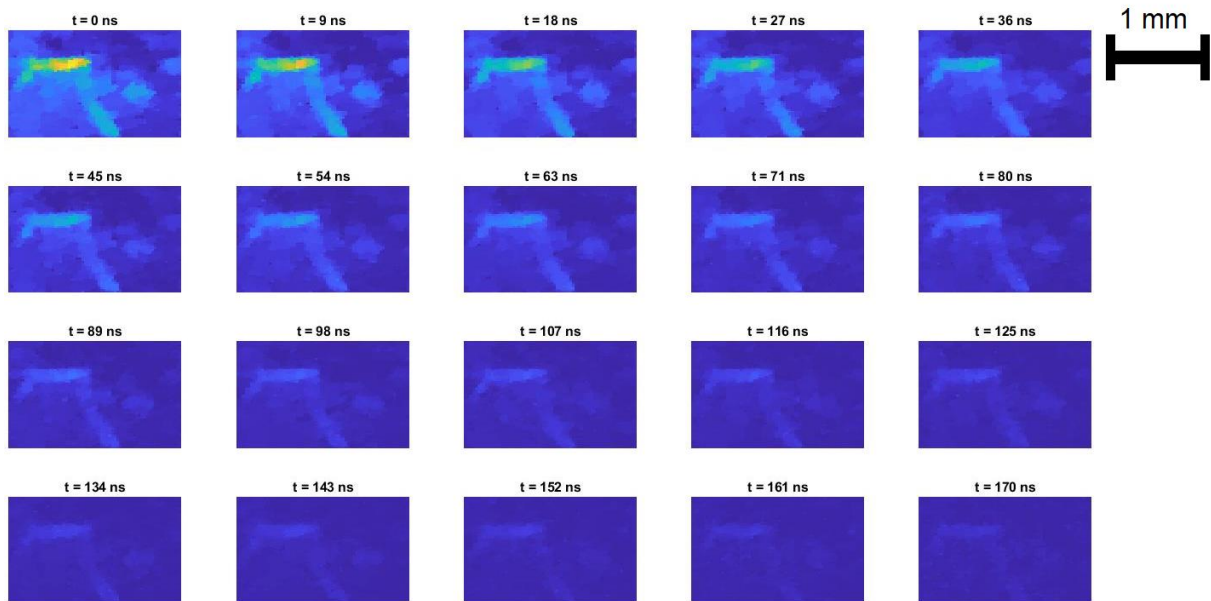


Obrázek 56: Hyperspektrální zobrazení střípků scintilačního krystalu. Je zde možné vidět absorpci vzorku v modrých vlnových délkách a rozptyl (nízká zaznamenaná intenzita) na hranách jednotlivých střípků v celém spektru

Obrázek 56 ukazuje hyperspektrální analýzu vzorku. V levém dolním rohu je umístěn větší kousek krystalu a napříč obrazem je několik dalších menších střípků. V horní řadě snímků je vidět, že materiál výrazně pohlcuje světlo modrých vlnových délek a jeví se tak tmavší oproti svému okolí – to je patrné zejména při porovnání s vyššími vlnovými délkami (600-650 nm),

kde je absorpce vzorku minimální. Tomu odpovídá i žlutá barva samotného vzorku. Napříč všemi vlnovými délkami jsou tmavé okraje střepů (a celé menší kousky), na kterých se světlo značně láme mimo optickou cestu směřující na detektor.

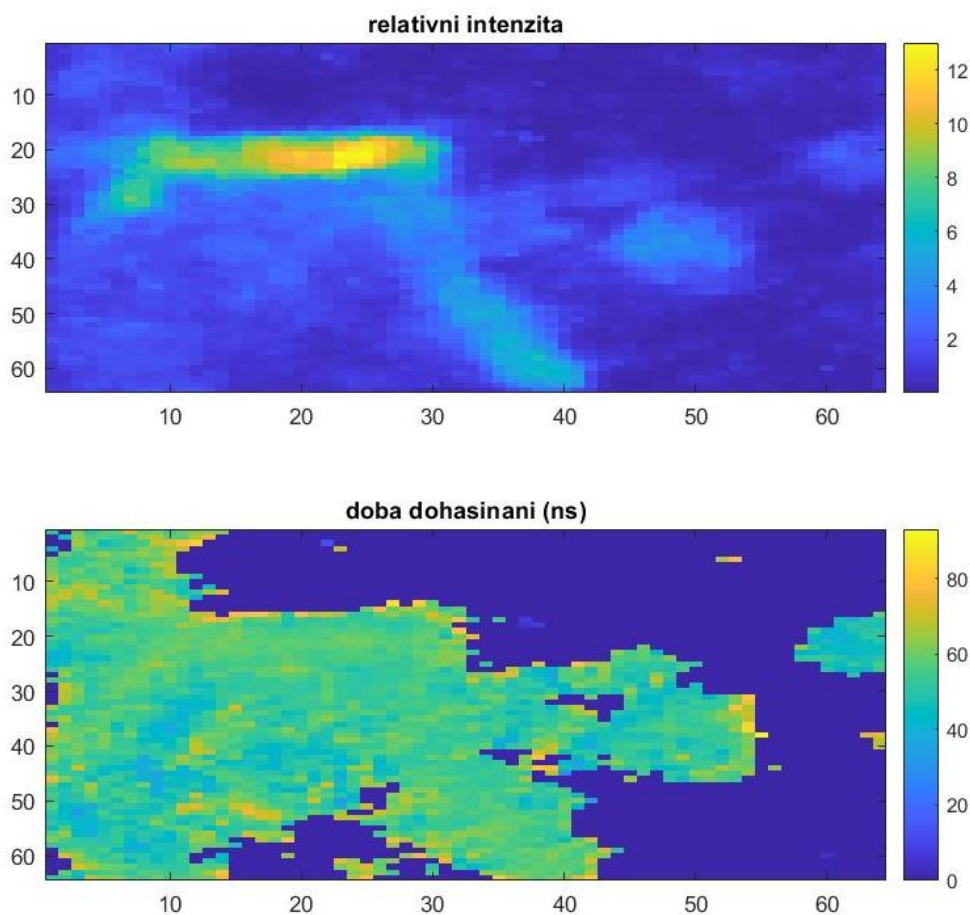
Pro přesné určení samotného absorpčního spektra by bylo nutné provést nejprve kalibrační měření samotné světelné diody, poté změřit spektrum po průchodu vzorkem a obě hodnoty porovnat v každém bodě obrazu. Aby taková analýza byla co nejspolehlivější, byl by ale zapotřebí širokopásmový spojitý zdroj světla, který by v celém spektru vykazoval vysoké intenzity vyzařování.



Obrázek 57: Fluorescenční dohasínání střípků scintilačního krystalu. Největší intenzitu emise je možné pozorovat na hranách střípků krystalu.

V případě fluorescenčního dohasínání (obrázek 57) byla situace prakticky opačná. Nejvíce výrazným místem obrazu byla hrana velkého kousku krystalu (levá horní část obrazu), o něco méně poté vyzařovaly luminescenci menší kousky krystalu v pravé části obrazu. Výrazně méně intenzity bylo možné poté pozorovat ze samotné plochy střípků, kvůli méně účinnému vyvazování fotoluminiscence. Podobně jako u prostorově složitějších vzorků testovaných na FLIMu UiB, i zde bylo možné provést analýzu exponenciálního dohasínání (obrázek 58).





Obrázek 58: Analýza intenzity a doby dohasinání vzorku scintilačního krystalu

Stejně jako u předchozích vzorků i zde byl zvolen práh pro určování doby dohasinání, aby nedošlo k ovlivnění nízkými intenzitami mimo střípky, pro které by program mohl odhadnout špatný výsledek. Z výsledného grafu (obrázek 58 dole) je patrné, že vzorek má dobu dohasinání okolo 60 ns, což potvrzuje, že by vzorek FLIMem UiB nebylo možné měřit.

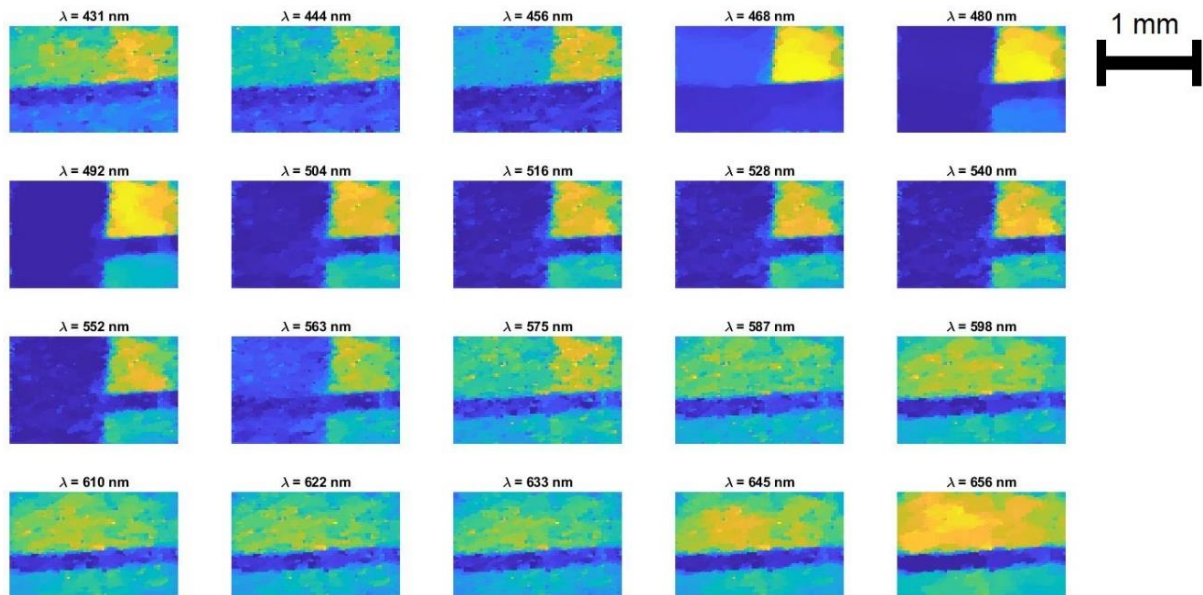
#### 4.5.2 Kombinovaný vzorek



Obrázek 59: Schéma kombinovaného vzorku testovaného v hyperdimenzionálním snimači

První testovaný vzorek potvrdil, že systém umí v TCSPC s jednopixelovou kamerou účinně rekonstruovat prostorové rozložení emise. Druhým vzorkem tedy byla testována hlavně schopnost rozlišení doby dohasinání. Byla vytvořen kombinovaný vzorek, jehož účelem bylo

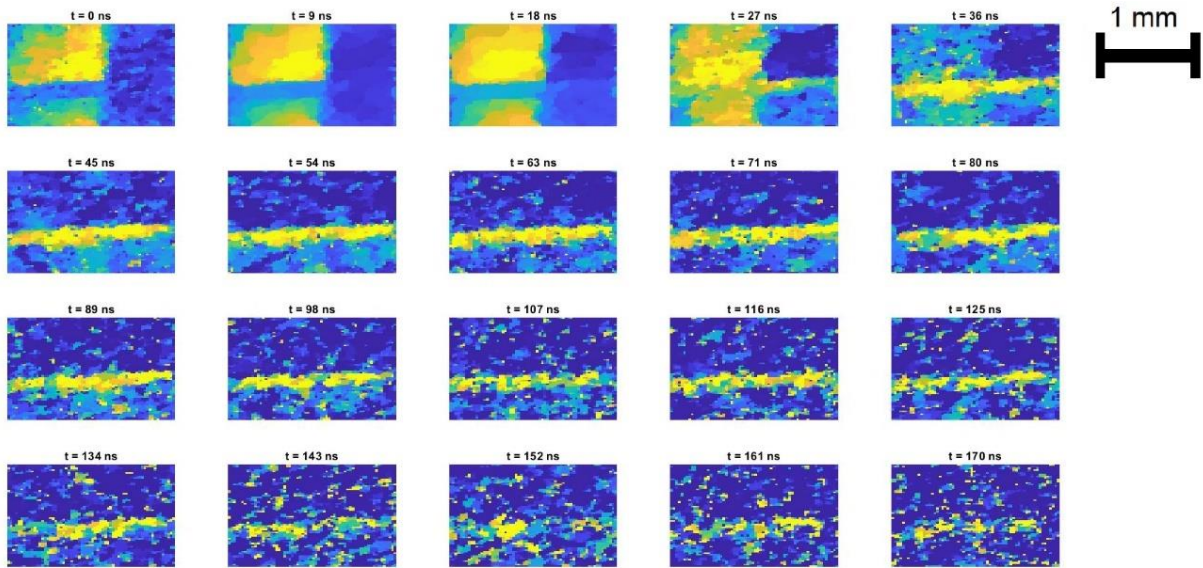
určit, jestli systém dokáže dvě velice odlišné doby dohasínání – fluorescenční barvivo Rhodamin 6G (odlišné od Rhodaminu B – pomalejší dohasínání, výraznější barva vhodná pro hyperspektrální část měření) a scintilační krystal z předchozí části. Barvivo bylo umístěno ve skleněné kyvetě tak, aby na jednu polovinu DMD dopadalo světlo procházející pouze stěnou kyvety a na druhou světlo procházející barvivem (nebo z něj emitované). Přes něj byl příčně umístěn scintilační krystal, který by měl spektrum dále ovlivnit. Schéma rozmístění těchto materiálů ve vzorku je znázorněno na obrázku 59.



Obrázek 60: Hyperspektrální zobrazení kombinovaného vzorku. Rhodamin 6G silně absorbuje ve vlnových délkách 480-560 nm, scintilátor mezi 430-480 nm.

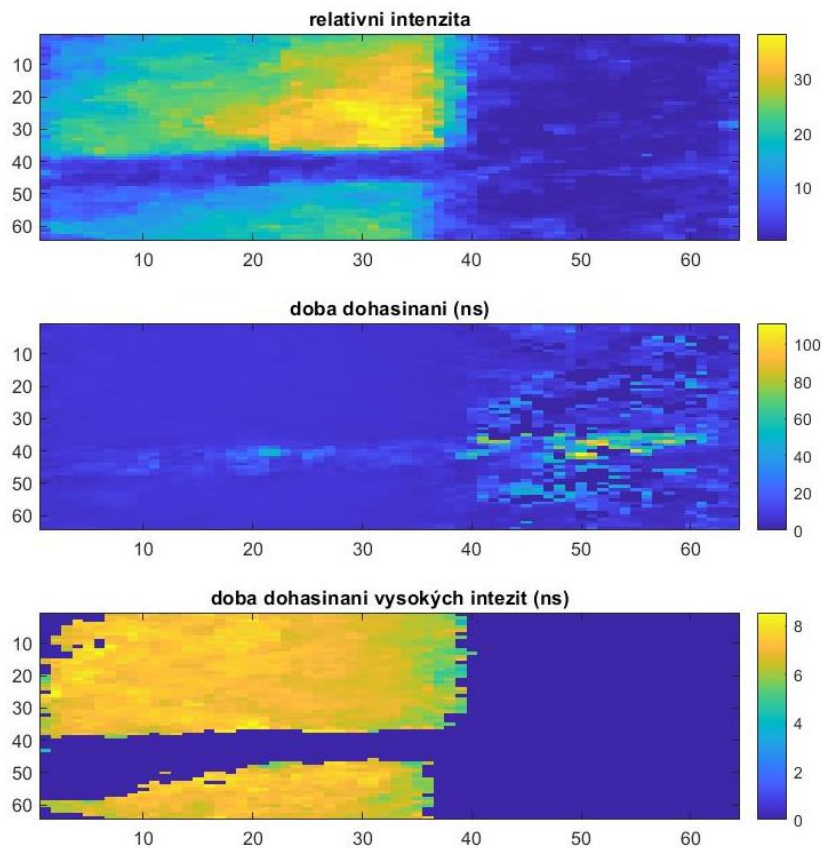
V hyperspektrálním zobrazení (obrázek 60) je patrné, že scintilátor umístěný v dolní polovině obrazu opět nejvíce absorbuje v modrých vlnových délkách (430-480 nm) a jeho hrana rozptyluje světlo v celé šířce zkoumaného spektra. Oproti tomu vlevo umístěný Rhodamin 6G pohlcuje světlo v zelené oblasti vlnových délek (480-560 nm) a díky tomu se máfiálovou barvu (propouští modré a červené světlo). Sklem v pravém horním rohu bez porozovatelné absorpce prochází všechny vlnové délky zkoumaného spektra a je tedy ve všech panelech nejjasnější.





Obrázek 61: Fluorescenční dohasínání kombinovaného vzorku

Na obrázku 61 je možné vidět fluorescenční dohasínání stejného vzorku. Oproti obrázku 57 je zde v každém panelu relativní intenzita kvůli nepoměru intenzity scintilačního krystalu v pozdějších panelech oproti počáteční intenzitě Rhodaminu. Ta je totiž krátce po excitaci mnohem vyšší než ta z krystalu. S ubíhajícím časem od pulzu je ale patrné, že svítí již prakticky jen hrana krystalu (podobně jako u předchozích měření).

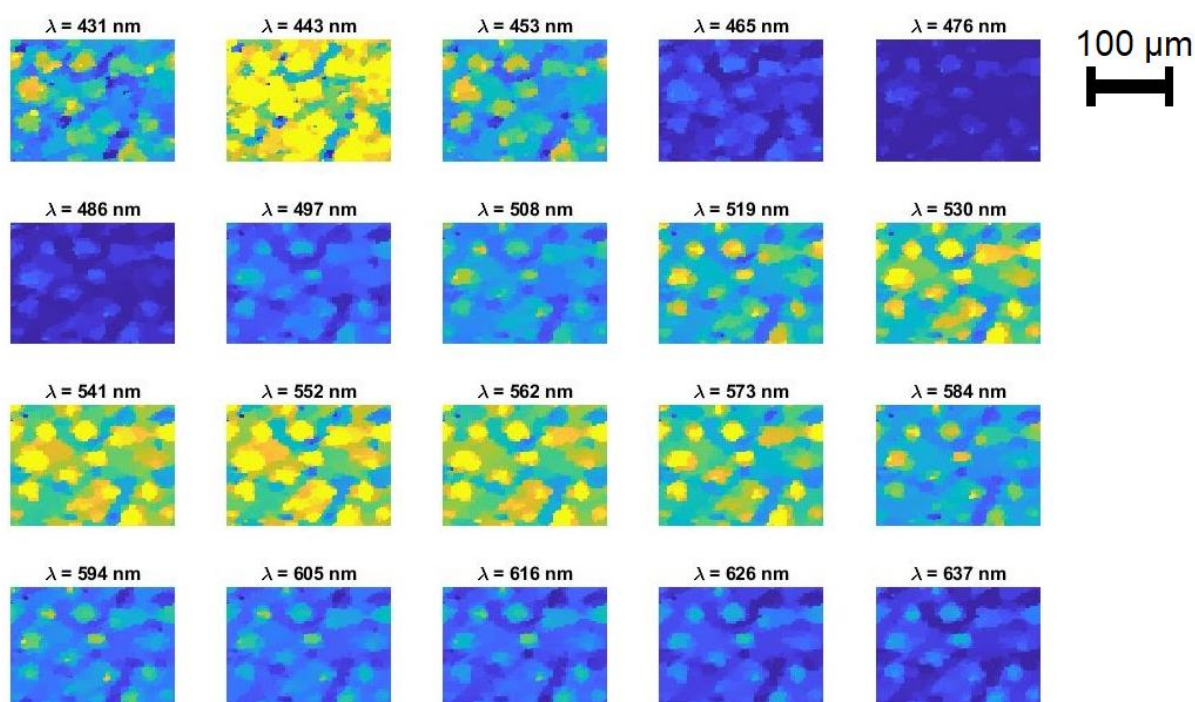


Obrázek 62: Analýza dohasínání kombinovaného vzorku

Jelikož jsou doby dohasínání velice odlišné, byla intenzitní podmínka využita pro jejich oddělené zobrazení (obrázek 62). Prostřední panel tedy má tento práh nastavený velice nízko, čím se zobrazují dlouhé doby dohasínání krystalu, hodnotami podobné těm z předchozího měření. Pokud poté práh zvýšíme, graficky se zvýrazní doby dohasínání pro vyšší intenzity, a tedy Rhodamin 6G. Doba dohasínání Rhodaminu 6G se v závislosti na koncentraci pohybuje nejčastěji okolo 3 ns.[31] Jeho absorpční a emisní spektra jsou ale velice blízka a mnoho emitovaných fotonů uvnitř kapaliny je opět absorbováno a excituje elektrony jiného atomu. Z tohoto důvodu se při detekci jeví doba dohasínání v závislosti na koncentraci v hodnotách až mezi 6-10 ns, čemu již naměřené hodnoty v dolním panelu odpovídají. Zajímavostí je, že spodní levý roh obrazu by měl vykazovat dvojexponenciální dohasínání. Pokud je analyzován jako jednoexponenciální, měl by vykazovat delší dobu dohasínání. Intenzitní rozdíl mezi vzorky je ovšem tak velký, že vliv dohasínání plochy krystalu je zcela zanedbatelný (hrana krystalu sice září výrazněji, ale láme světlo z Rhodaminu umístěného za ní). Vzorek se tedy přes své sestavení prakticky chová jako dvě jednoexponenciální dohasínání v jednom obraze.

### 4.5.3 Preparát konvalinky

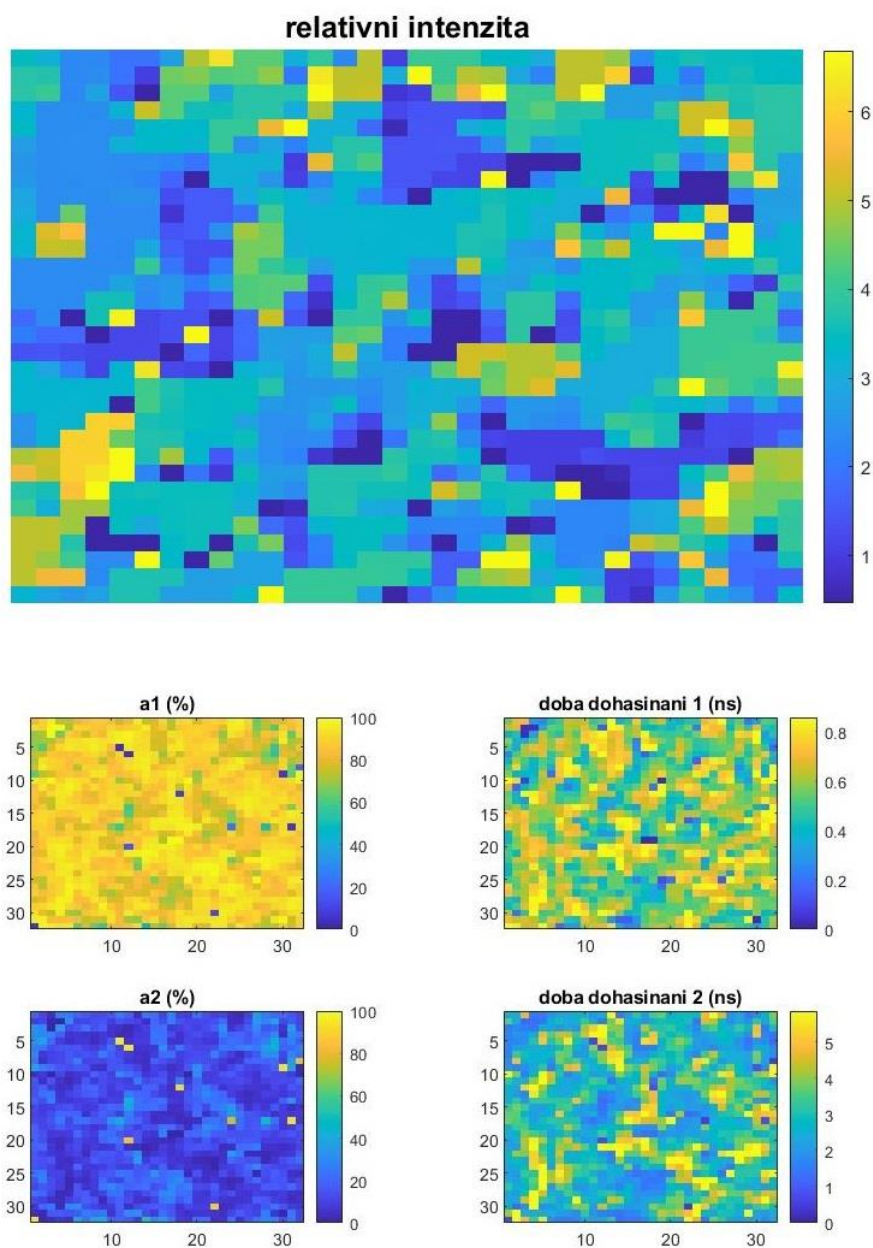
Posledním testovaným vzorkem byl preparát konvalinky, který byl předtím testovaný na FLIMu UiB. U tohoto vzorku je možné pozorovat buněčnou strukturu, která měla v našem případě za úkol otestovat pseudopřiblížení při hyperdimenzionálním snímání.



Obrázek 63: Hyperspektrální zobrazení preparátu konvalinky upravené podle intenzity zdroje

Na obrázku 63 je možné vidět hyperspektrální zobrazení preparátu konvalinky. Jelikož se jedná o velmi tenký vzorek s malou absorpcí, bylo zobrazení upraveno tak, aby ukazovalo absolutní intenzitu v daném úseku spektra. Zobrazení tak v tomto případě díky nízké absorpci kopíruje spektrum zdroje. Je možné vidět úzký vrchol intenzity v zobrazení okolo 443 nm a širší vrchol v oblasti mezi 530 a 570 nm. Zároveň jsou z rekonstrukce patrné propady intenzit v místech buněčné stěny. Buněčná stěna totiž má vyšší index lomu než její médium [32] a zároveň na ní

může docházet k lomům mimo optickou cestu podobně jako na hraně krystalu luminoforu v přechozích případech.



Obrázek 64: Analýza dvouexponenciálního dohasinání preparátu konvalinky

V případě dohasinání preparátu (obrázek 64) byl systém při snaze přiblížit na úroveň buněčné struktury již přiveden značně do limitů signálu odlišitelného od šumu. Z tohoto důvodu bylo zmenšeno rozlišení na  $32 \times 32$  spojením čtveřic pixelů do jednoho pro snížení vlivu šumu. V intenzitním zobrazení je buněčná struktura i přesto stále pouze částečně rozlišitelná se světlejšími místy v oblastech buněčné stěny a tmavšími v místech vlastního těla buňky. Zobrazení je také komplikováno tím, že rostlinné vzorky emitují hlavně v delších vlnových délkách [33], které jsou hůře rozlišitelné (viz podkapitole 4.3) Doba dohasinání byla na základě testování stejného vzorku v Bergenu analyzována jako dvouexponenciální. Výsledná doba dohasinání měla první komponentu o průměrné hodnotě 0,6 ns s váhou 85 % a druhou

komponentu 2,95 ns s váhou 15 %. Z hlediska váhového zastoupení jednotlivých komponent se výsledek příliš neliší od toho získaného na bergenské soustavě, samotné hodnoty komponent jsou ovšem přibližně dvakrát větší. Důvodem pro to může být již příliš vysoké zašumění signálu, které při analýze prodlužuje dohasínání a systém tam odhaduje delší doby dohasínání. Pro lepší výsledky měření u složitých buněčných struktur by tedy bylo zapotřebí omezit vznikající šum, který zhoršuje intenzitní zobrazení i odhad složek samotného dohasínání.



## 5 Srovnání hyperdim. mikroskopu s FLIMem UiB

V rámci diplomové práce byly otestovány dvě různé sestavy pro FLIM měření. Obě z nich měly velice odlišné uspořádání, zdroje světla a detekci, což v obou případech poskytovalo několik výhod a nevýhod.

Prvním zásadním rozdílem byl použitý laser a způsob excitace. Největší limitací FLIMu UiB byla pevně nastavená frekvence pulzů 80 MHz určená pro měření dohasínání organických vzorků, díky které nebylo možné měřit vzorky s delší dobou dohasínání než 10 ns. Oproti tomu frekvence námi použitého laseru byla nastavitelná ve velkém rozsahu hodnot, což umožnilo měřit vzorky s výrazně delší dobou dohasínání. Situace byla opačná pro vlnové délky excitujícího světla. Tento parametr byl v případě našeho laseru pevně nastaven na 405 nm, zatímco bergenský laser bylo možné nastavit mezi 700 a 1020 nm, což odpovídalo ve dvoufotonové excitaci vlnovým délkám 350 až 510 nm. Díky tomu bylo možné efektivněji excitovat vzorky, které měly různě umístěné absorpční maximum, případně sledovat vliv excitační vlnové délky na dobu dohasínání.

Druhým rozdílem bylo uspořádání samotné sestavy. Zatímco FLIM UiB excitoval vzorky z druhé strany oproti snímači, náš systém měl laser umístěn na stejné straně jako snímač. To umožňuje testování vzorků, které nejsou transparentní. Dvoufotonová excitace použitá ve FLIMu UiB je výhodou pro měření organických vzorků, které většinou v těchto vlnových délkách neabsorbují a je tedy možné excitovat konkrétní místo uvnitř vzorku. Zároveň nehrozí vznik nechtěných odrazů, které mohou při jednofotonové excitaci vznikat a narušit měření.

Hlavním rozdílem obou sestav byla samotná detekce. V případě FLIMu UiB byla použita klasická detekce s rychlým liniovým skenováním vzorku pomocí TCSPC, čímž byl vytvářen 2D obraz. Díky tomu bylo měření výrazně rychlejší a bylo možné v průběhu sledovat aktuální stav vzorku. Pokud tedy například v průběhu měření kapalina s barvivem v místě snímání vlivem intenzity excitačního paprsku vyschla, mohlo být měření přerušeno. V případě komprimovaného snímače není žádné zobrazení dostupné až do provedení rekonstrukce po samotném měření. Změnu ve vzorku během měření lze tedy určit pouze podle náhlé změny intenzity. Délka měření se vlivem použitých principů značně lišila – zatímco jedno průměrné měření FLIMu UiB trvalo průměrně okolo dvou minut, měření s jednopixelovou kamerou nejčastěji trvalo jednu až dvě hodiny a obraz poté ještě musel být z dat zrekonstruován, což v závislosti na výpočetním výkonu, nastavených a počtu rekonstrukcí (jak jemně má být reprezentováno spektrum/časová osa) mohlo trvat od několika vteřin až do půl hodiny.

Komprimovaný snímač díky svému principu využíval TCSPC snímač bez nutnosti skenovací aparatury, která vyžaduje velmi přesnou časovou synchronizaci, a náklady na vytvoření takové sestavy tedy budou výrazně nižší než v případě klasického FLIMu. Nabízí také díky dobře zvolenému zdroji světla možnost měření širšího výběru vzorků. Zároveň s malými úpravami mohl být upraven na hyperspektrální snímač (snímající stejný vzorek a jeho stejné místo), čehož na specializované FLIM sestavě nebylo možné dosáhnout. Ta oproti tomu poskytuje lepší výsledky přímo při zobrazování fluorescenčního dohasínání díky vyšší rychlosti měření, rozlišení a specializovanému softwaru schopnému rychlé analýzy dohasínání s určením kvality odhadu a snadným nastavením počtu komponent. Dokáže také vytvořit obraz i na buněčné úrovni, čemuž u naší sestavy brání vysoká úroveň šumu.



## 6 Závěr

V rámci této diplomové práce byl vytvořen hyperdimenzionální snímač pro snímání hyperspektrálního obrazu a fluorescenčního dohasínání vzorku za pomoci jednopixelové kamery. Oba tyto typy snímání za normálních okolností vyžadují složité specializované sestavy, jejichž cena může být pro pořizující instituce velkou komplikací. Námi vytvořený systém poskytuje díky komprimovanému snímání výrazně jednodušší alternativu, ve které lze jednoduše měnit mezi oběma typy snímání.

Ačkoliv například FLIM UiB ve své specifické aplikaci poskytoval lepší výsledky, bylo jej díky jeho vlastnostem možné využít pouze k měření velice úzké skupiny vzorků, pro které uzpůsoben. Na hyperspektrální snímání by v jeho případě byla potřebná zcela jiná sestava, zatímco v našem experimentu bylo možné provádět obě měření na stejném místě vzorku, což by při přesunu mezi různými setupy vyžadovalo velice přesné umístění do stejné polohy.

Při tvorbě sestavy byl zároveň vytvořen systém pro praktické přiblížení obrazu bez nutnosti upravovat optickou část sestavy. Při generování masky pouze ve vybrané části DMD bylo možné udržet dostatečnou modulaci signálu, a tedy i z výrazně menší plochy (a intenzity světla) zrekonstruovat požadovaný obraz. Díky tomu bylo dosaženo největšího zdokumentovaného rozlišení jednopixelové kamery s více než dvakrát lepším rozlišením oproti nalezené nejlepší sestavě.

Tvorba a testování sestavy zároveň ukázaly několik úprav, které by bylo možné dále provést pro vylepšení v oblasti získávání dat a obsluhy systému. V oblasti hyperspektrálního snímání by byl pro spolehlivé určení absorpčního spektra zapotřebí uniformní zdroj poskytující spojitou intenzitu světla napříč sledovaným spektrem. K tomu se nejčastěji využívají integrační koule s velkým množstvím světlo emitujících diod o různých čárových spektrech, která poté imituje na výstupu uniformní zdroj světla. Z emise vzorku by také bylo možné určit jeho emisní spektrum a jednou sestavou tedy získat obě spektra a představu o energetických hladinách. Použitý laser ale vyžaduje optický filtr mezi vzorkem a DMD, který by zamezil zobrazení kratších vlnových délek v emisním spektru. Pro tento účel by vhodnější byla právě dvoufotonová emise bergenského laseru, při které není zapotřebí použití optických filtrů. Při sledování čistě emisního spektra by navíc nebyl problém s příliš vysokou frekvencí pulzů, jelikož v danou chvíli dohasínání není pozorováno. Při použití třetího zdroje by tedy sestava dokázala zobrazit pro jeden vzorek hyperspektrální zobrazení absorpce, emise a fluorescenční dohasínání vzorku pro 2D plochu.

Druhým důležitým vylepšením by byl návrh uživatelského rozhraní a automatizace procesu pro jednodušší měření a automatické přepínání mezi typy měření. Při řízení vytvořené experimentální sestavy bylo zapotřebí složité nastavení mnoha parametrů napříč několika kódy. Program zároveň s některými součástmi musel komunikovat pomocí externích programů a některé (zdroje světla) nemohl ovládat vůbec. V případě širšího použití takové sestavy by tedy bylo důležité vytvořit jednoduché rozhraní pro ovládání obou systémů s možností jednoduchého přepínání mezi nimi, zároveň by zde mohla být možnost propojení s jednoduchou rekonstrukcí (například pouze pro nejintenzivnější vlnovou délku nebo počátek dohasínání), která by již v průběhu měření zkoušela vytvářet prvotní odhad podoby obrazu a umožnila tak sledování průběhu měření ve skoro reálném čase. Mnohé z těchto prvků by ovšem

vyžadovaly složité programování, a hlavně sjednocení komunikace počítače se všemi prvky sestavy.

Celkově by však i přes některé komplikace mohla vytvořená sestava poskytnout jednoduchou alternativu pro vysoce specializované sestavy, díky které je možné na jednom místě provést komplexní analýzu získaného vzorku. Pokud se poté navíc podaří rozšířit aplikaci do větších vlnových délek (například blízká infračervená oblast), může takový systém být přelomový pro výzkum materiálů.



## Zdroje

- [1] KLEIN, Lukáš. Light Collection in the Imaging Systems Based on Compressed Sensing. 2019, 64.
- [2] *Molecular Expressions Microscopy Primer: Fluorescence - Jablonski Energy Diagram - Interactive Java Tutorial* [online]. [vid. 2021-03-09]. Dostupné z: <https://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/jablonski/jabintro/index.html>
- [3] *EverGlow NA, Inc. - Overview of Photoluminescent Emergency Lighting* [online]. [vid. 2021-05-09]. Dostupné z: <https://www.everglow.us/why-everglow/overview-of-photoluminescent-emergency-lighting>
- [4] ZHANG, Pengfei, Ratheesh K. MALEPPAT, Edward N. PUGH, Marcos A. S. DE OLIVEIRA, Che-Wei CHANG, James W. CHAN, Robert J. ZAWADZKI a Suman K. MANNA. Feasibility study of Raman spectroscopy for investigating the mouse retina in vivo. In: [online]. B.m.: SPIE-Intl Soc Optical Eng, 2018, s. 54. ISBN 9781510614338. Dostupné z: doi:10.1117/12.2288790
- [5] SHARMA, Rajesh, H S BHATTI, N K VERMA, N KUMAR, S R VADERA a K MANZOOR. Lifetime shortening in doped ZnS nanophosphors. *Journal of Physics D: Applied Physics To cite this article* [online]. 2006, **39**, 1754–1760. Dostupné z: doi:10.1088/0022-3727/39/9/008
- [6] ŽÍDEK, K., I. PELANT, F. TROJÁNEK, P. MALÝ, P. GILLIOT, B. HÖNERLAGE, J. OBERLÉ, L. ŠILLER, R. LITTLE a B. R. HORROCKS. Ultrafast stimulated emission due to quasidirect transitions in silicon nanocrystals. *Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics* [online]. 2011, **84**(8). ISSN 1550235X. Dostupné z: doi:10.1103/PhysRevB.84.085321
- [7] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy* [online]. Boston, MA: Springer US, 2006. ISBN 978-0-387-31278-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-0-387-46312-4
- [8] HAMAMATSU PHOTONICS K.K. *Guide to Streak Cameras*. B.m.: Hamamatsu Photonics K.K. duben 2008
- [9] *Introduction to time-resolved spectroscopy with applications in biophysics and physical chemistry*. 2015.
- [10] PHILLIPS, D., R.C. DRAKE, D.V. O'CONNOR a R.L. CHRISTENSEN. Time Correlated Single-Photon Counting (Tcspc) Using Laser Excitation. *Instrumentation Science & Technology* [online]. 1985, **14**(3–4), 267–292 [vid. 2021-03-15]. ISSN 1073-9149. Dostupné z: doi:10.1080/10739148508543581
- [11] WEI, Liping a Derek HO. Recent Advances in Fluorescence Lifetime Analytical Microsystems: Contact Optics and CMOS Time-Resolved Electronics. *Sensors* [online]. 2017, **17**(12), 2800 [vid. 2021-04-06]. ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s17122800
- [12] ESTANDARTE, Ana Katrina, Stanley BOTCHWAY, Christophe LYNCH, Mohammed YUSUF a Ian ROBINSON. The use of DAPI fluorescence lifetime imaging for investigating chromatin condensation in human chromosomes. *Scientific Reports* [online]. 2016, **6**(1), 1–12 [vid. 2021-03-16]. ISSN 20452322. Dostupné

z: doi:10.1038/srep31417

- [13] HENTY-RIDILLA, Jessica L., Aneliya RANKOVA, Julian A. ESKIN, Katelyn KENNY a Bruce L. GOODE. Accelerated actin filament polymerization from microtubule plus ends. *Science* [online]. 2016, **352**(6288), 1004–1009. ISSN 10959203. Dostupné z: doi:10.1126/science.aaf1709
- [14] BUGIEL, I, K KÖNIG, H Wabnitz - Lasers Life SCI a undefined 1989. Investigation of cells by fluorescence laser scanning microscopy with subnanosecond time resolution. *blt.uni-saarland.de* [online]. nedatováno [vid. 2021-04-07]. Dostupné z: [http://www.blt.uni-saarland.de/src-open/pub/10\\_Lasers\\_in\\_the\\_life\\_sciences\\_3\\_1989\\_47-53.pdf](http://www.blt.uni-saarland.de/src-open/pub/10_Lasers_in_the_life_sciences_3_1989_47-53.pdf)
- [15] OCEAN OPTICS. *Flame Spectrometer - Ocean Optics* [online]. 2019 [vid. 2019-03-23]. Dostupné z: <https://oceanoptics.com/product/flame-spectrometer/#tab-details>
- [16] WANG, Yu Winston, Nicholas P. REDER, Soyoung KANG, Adam K. GLASER a Jonathan T.C. LIU. *Multiplexed optical imaging of tumor-directed nanoparticles: A review of imaging systems and approaches* [online]. B.m.: Ivyspring International Publisher. 2017. ISSN 22067418. Dostupné z: doi:10.7150/ntno.21136
- [17] CANDÈS, Emmanuel. *Compressive Sensing -- A 25 Minute Tour* [online]. 2010 [vid. 2019-03-24]. Dostupné z: <http://nuit-blanche.blogspot.com/>
- [18] *How does the JPEG compression work?* [online]. [vid. 2021-04-10]. Dostupné z: <https://www.image-engineering.de/library/technotes/745-how-does-the-jpeg-compression-work>
- [19] *Compressed Sensing Makes Every Pixel Count* [online]. nedatováno [vid. 2019-03-24]. Dostupné z: [https://www.email.cz/download/k/gL5tWa3RiiZdff\\_PAtdO\\_r4BRZuS54Fi\\_SSVr4m0SX-4vMNFkqBrdrJHNPmVShfw-E0688/Candes.CompressedSensingMakesEveryPixelCount.pdf](https://www.email.cz/download/k/gL5tWa3RiiZdff_PAtdO_r4BRZuS54Fi_SSVr4m0SX-4vMNFkqBrdrJHNPmVShfw-E0688/Candes.CompressedSensingMakesEveryPixelCount.pdf)
- [20] LUSTIG, Michael, David DONOHO a John M PAULY. Sparse MRI: The Application of Compressed Sensing for Rapid MR Imaging. *Magnetic Resonance in Medicine* [online]. 2007, **58**, 1182–1195 [vid. 2021-03-22]. Dostupné z: doi:10.1002/mrm.21391
- [21] HORNBECK, Larry J. *Digital Light Processing™ for High-Brightness, High-Resolution Applications* [online]. 1997 [vid. 2019-03-11]. Dostupné z: <https://www.dlinnovations.com/dli/wp-content/uploads/white-paper-dlp-for-high-brightness-high-resolution-applications.pdf>
- [22] LI, Chengbo, Wotao YIN a Yin ZHANG. *User's Guide for TVAL3: TV Minimization by Augmented Lagrangian and Alternating Direction Algorithms* [online]. nedatováno [vid. 2019-04-27]. Dostupné z: <http://www.caam.rice.edu/>
- [23] KRISTOFFERSEN, Arne S., Svein R. ERGA, Børge HAMRE a Øyvind FRETTE. Testing fluorescence lifetime standards using two-photon excitation and time-domain instrumentation: Rhodamine B, coumarin 6 and lucifer yellow. *Journal of Fluorescence* [online]. 2014, **24**(4), 1015–1024. ISSN 10530509. Dostupné z: doi:10.1007/s10895-014-1368-1
- [24] KRISTOFFERSEN, Arne S., Svein R. ERGA, Børge HAMRE a Øyvind FRETTE. Testing Fluorescence Lifetime Standards using Two-Photon Excitation and Time-



- Domain Instrumentation: Fluorescein, Quinine Sulfate and Green Fluorescent Protein. *Journal of Fluorescence* [online]. 2018, **28**(5), 1065–1073. ISSN 10530509. Dostupné z: doi:10.1007/s10895-018-2270-z
- [25] *LDH Series / PicoQuant* [online]. [vid. 2020-08-25]. Dostupné z: <https://www.picoquant.com/products/category/picosecond-pulsed-sources/ldh-series-picosecond-pulsed-diode-laser-heads#custom1>
- [26] TEXAS INSTRUMENTS. *DLP7000 DLP7000 DLP® 0.7 XGA 2x LVDS Type A DMD* [online]. 2019 [vid. 2021-04-26]. Dostupné z: [www.ti.com](http://www.ti.com)
- [27] *DLP® Discovery™ 4100 Development Platform User's Guide* [online]. 2016 [vid. 2021-04-26]. Dostupné z: [www.ti.com](http://www.ti.com)
- [28] *PMA Hybrid Series / PicoQuant* [online]. [vid. 2020-08-25]. Dostupné z: <https://www.picoquant.com/products/category/photon-counting-detectors/pma-hybrid-series-hybrid-photomultiplier-detector-assembly>
- [29] *PicoHarp 300 / PicoQuant* [online]. [vid. 2020-08-25]. Dostupné z: <https://www.picoquant.com/products/category/tcspc-and-time-tagging-modules/picoharp-300-stand-alone-tcspc-module-with-usb-interface>
- [30] SUN, Yicheng, Guohua GU, Xiubao SUI, Yuqi LI a Shuangshuang XU. Super-Resolution Imaging Using Compressed Sensing and Binary Pure-Phase Annular Filter [online]. 2017 [vid. 2021-05-03]. Dostupné z: <https://ieeexplore.ieee.org/stamp/stamp.jsp?arnumber=7906531>
- [31] SELANGER, K. A., J. FALNES a T. SIKKELAND. Fluorescence lifetime studies of rhodamine 6G in methanol. *Journal of Physical Chemistry* [online]. 1977, **81**(20), 1960–1963 [vid. 2021-05-10]. ISSN 00223654. Dostupné z: doi:10.1021/j100535a016
- [32] TAMADA, Yosuke, Takashi MURATA, Masayuki HATTORI, Shin OYA, Yutaka HAYANO, Yasuhiro KAMEI a Mitsuyasu HASEBE. Optical Property Analyses of Plant Cells for Adaptive Optics Microscopy. *International Journal of Optomechatronics* [online]. 2014, **8**(2), 89–99 [vid. 2021-05-10]. ISSN 15599620. Dostupné z: doi:10.1080/15599612.2014.901455
- [33] ESPOSITO, Alessandro, Arjen N. BADER, Simon C. SCHLACHTER, Dave J. VAN DEN HEUVEL, Gabriele S. Kaminski SCHIERLE, Ashok R. VENKITARAMAN, Clemens F. KAMINSKI a Hans C. GERRITSEN. Design and application of a confocal microscope for spectrally resolved anisotropy imaging. *Optics Express* [online]. 2011, **19**(3), 2546. ISSN 1094-4087. Dostupné z: doi:10.1364/oe.19.002546