

Zobrazování fluorescenčního dohasínání pomocí metody RATS a jedno-pixelové kamery

Jiří Junek <jiri.junek@tul.cz>, Karel Židek

Představujeme nový přístup k zobrazování fluorescenčního dohasínání. Princip je založen na metodě RATS, která využívá náhodných časových světelných fluktuací (speklí) k excitaci měřeného vzorku, a na jedno-pixelové kameře, což je metoda komprimovaného zobrazování. Tato kombinace umožňuje zobrazovat dohasínání fluorescence s dobou života v řádu mikrosekund, kde oproti standartním metodám vyniká v rychlosti akvizice signálu. Prezentovaný přístup je také unikátní svojí bezkonkurenční jednoduchostí a nízkonákladovostí optického uspořádání, což nijak neubírá metodě na její preciznosti a efektivnosti.

Klíčová slova: FLIM, RATS, komprimované snímání, jedno-pixelová kamera

Úvod

Zobrazování fluorescenčního dohasínání (FLIM) je důležitým spektrometrickým nástrojem v mnoha oborech, zejména v chemii a biomedicíně. Vzhledem k charakteru oblastí využití je často rozhodujícím faktorem doba akvizice signálu. FLIM může být založeno na mnoha metodách pro stanovení rozpadu fotoluminiscence (PL). Běžně se však používá metoda časově korelované počítání jednotlivých fotonů PL (TCSPC).

TCSPC je velmi rychlá a efektivní metoda pro mapování nanosekundových dob života PL a v posledních letech zaznamenala velký rozvoj [1]. Přesto však stále může akvizice signálu pro zobrazování mikrosekundových dohasínání PL trvat i několik hodin. To představuje vážný problém pro měření mnoha vzorků například perovskitů.

V tomto příspěvku je představen nový koncept FLIM, který je založen na jedno-pixelové kameře a nové metodě RATS pro měření dohasínání PL [2]. Tato kombinace umožňuje akvizici signálu v řádu desítek minut pro zobrazování mikrosekundových dob života PL. Koncept metody navíc využívá poznatků předchozí práce [3], proto je snímání dynamiky PL a jejich zobrazování založeno pouze na dvojici difuzorů. Díky tomu je optická sestava relativně levná a jednoduchá ve srovnání s konvenčními přístupy k FLIM.

Princip metody

Základním bodem konceptu je metoda RATS. Tato nová metoda pro měření rozpadu PL používá pro excitaci vzorku náhodně fluktuující intenzitu I_{EXC} . PL

signál I_{PL} je poté dán konvolucí I_{EXC} a PL dohasínání I_D podle vztahu (1).

$$I_{PL} = I_{EXC} * I_D \quad (1)$$

I_D lze plně získat velmi snadno pouhým měřením signálů I_{EXC} , I_{PL} a užitím dekonvoluční věty. V metodě RATS se využívá náhodný charakter I_{EXC} , který umožňuje měření širokého rozsahu frekvencí v jednom datovém souboru.

Pro zachycení 2D obrazu dohasínání PL je použit koncept jedno-pixelové kamery. Měřený vzorek je postupně osvětlen sadou masek šedé stupnice generovaných pomocí posuvného difusoru (viz obr. 1). Celková intenzita každé masky náhodně fluktuuje dle I_{EXC} .

Nechť se předpokládá vzorek s n různými PL rozpadů. Celková intenzita PL emitovaná vzorkem je součtem rozpadů PL každého náhodně osvětleného bodu. Protože platí vztah (2), můžeme pro každou náhodnou masku rekonstruovat celkový PL rozpad I_{DA} (viz obr. 2A) podle vztahu (3).

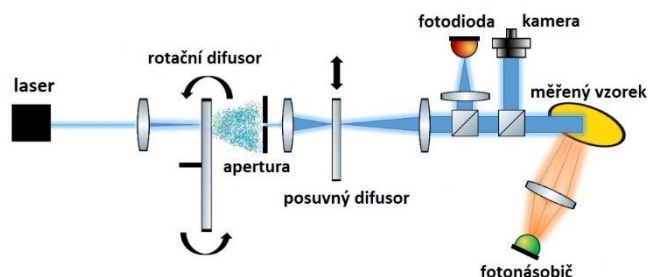
$$\sum_{i=1}^n I_{PL(i)} = \sum_{i=1}^n \mathbb{F}(I_{EXC}) \mathbb{F}(I_{D(i)}) \quad (2)$$

$$I_{DA} = \text{Re} \left\{ \mathbb{F}^{-1} \left[\frac{\mathbb{F} \left(\sum_{i=1}^n I_{PL(i)} \right)}{\mathbb{F}(I_{EXC})} \right] \right\} \quad (3)$$

Pro rekonstrukci obrazu PL dohasínání pomocí algoritmů komprimovaného snímání jsou výchozí fluktuace intenzity v každém časovém bodě I_{DA} (viz obr. 2B). Celý obraz měřeného vzorku je v každém časovém bodě rekonstruován (viz obr. 2C) a I_D je získáno v každém pixelu obrazu (viz obr. 2D). Prostorové rozlišení obrazu je dáno střední velikostí speklí v náhodné masce.

Optické uspořádání

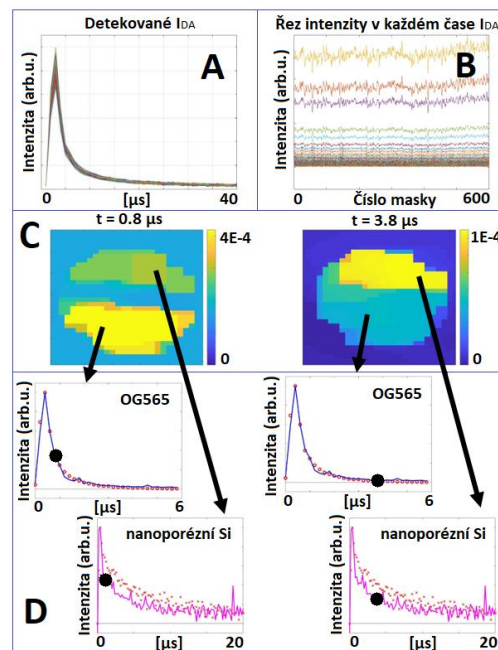
V optické sestavě byl použit CW laser s vlnovou délkou 405 nm. Náhodně fluktuující intenzita excitačního signálu byla zajištěna sestavou rotačního difusoru a apertury. Je-li na difusor fokusován optický svazek, za difusorem vzniká pole speklí, které se náhodně mění v čase díky rotaci difusoru a náhodnému charakteru povrchu difusoru. Pole speklí je následně oříznuto aperturou. Za aperturou získáme v intenzitě náhodně fluktuující svazek, který charakterizuje I_{EXC} a byl detekován referenční fotodiódou. Náhodná maska šedé škály byla generována posuvným difusorem jako pole stacionárních speklí, které tvořily pro každou pozici difusoru jednu náhodnou masku. Masky byly snímány pomocí kamery a pomocí fotonásobiče byl měřen I_{PL} .



Obrázek 1: Optické uspořádání

Ověřovací experiment

K ověření principu byl použit uměle vyrobený vzorek, kde byl zkombinován křemíkový plátek s nanopórním povrchem a absorpční optický filtr OG565. Každý materiál byl nejprve měřen samostatně již verifikovanou metodou 1D RATS. Následně byl celý vzorek změřen prezentovanou metodou FLIM (2D RATS). Výsledky byly pro jednotlivé oblasti porovnány (viz obr. 2D). PL byla detekována ve spektru vlnových délek od 520 nm do 565 nm. Měřená plocha vzorku činila 18 mm² s rozlišením obrazu dohasínání PL 42x34 pixelů. Při použití 600 masek byla data shromážděna za 90 minut. Kompresní poměr pro dané rozlišení obrazu činil 0,42.



Obrázek 2: (A) Jednotlivá I_{DA} , (B) Intenzita I_{DA} v řezu pro každý časový bod, (C) Zobrazení PL map v různých časech, (D) Verifikace metody (červené body – 1D RATS, plné čáry – prezentovaná metoda (2D RATS)).

Závěr

Příspěvek představuje nový nízkonákladový a jednoduchý přístup k FLIM, který kombinuje metodu RATS s jedno-pixelovou kamerou. Díky přístupu RATS jsou rekonstruovaná data robustní vůči šumu. Doba akvizice dat závisí na rozlišení a velikosti obrázku. Přesto je možné získat mapu dohasínání PL za několik desítek minut. Proto je tato metoda velmi zajímavá především pro měření rozpadu PL v řádu mikrosekund a sub-mikrosekund.

Poděkování

Tato práce byla podpořena z projektu Studentské grantové soutěže (SGS) na Technické univerzitě v Liberci v roce 2020.

Reference

- [1] X. Liu, D. Lin, W. Becker, J. Niu, B. Yu, L. Liu, and J. Qu, "Fast fluorescence lifetime imaging techniques: A review on challenge and development," J. Innov. Opt. Health Sci. **12**, 1930003 (2019).
- [2] J. Juneč, L. Ondič, and K. Žídek, "Random temporal laser speckles for the robust measurement of sub-microsecond photoluminescence decay," Opt. Express, OE **28**, 12363–12372 (2020).
- [3] K. Žídek, O. Denk, and J. Hlubuček, "Lensless Photoluminescence Hyperspectral Camera Employing Random Speckle Patterns," Scientific Reports **7**, 15309 (2017).