**Technická specifikace**

**Upgrade mikroskopů Leica a software pro analýzu FLIM a FCS dat**

**Část 1 - Rozšíření konfokálního mikroskopu Leica Stellaris 8 FALCON o moduly pro fluorescenční korelační spektroskopii a STED mikroskopii**

Rozšíření stávajícího konfokálního mikroskopu Leica Stellaris 8 Falcon o modul pro fluorescenční korelační spektroskopii, spočívající v rozšíření funkcionality ovládacího software a pořízení specializovaného objektivu pro FCS měření a o modul pro super-rezoluční STED mikroskopii, zahrnující kompletní hardwarové a softwarové vybavení pro snímání s využitím technologie TauSTED Xtend.

**Modul pro fluorescenční korelační spektroskopii:**

**Softwarový modul pro FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy) a FCCS (Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy)** rozšiřující funkcionalitu stávajícího SW vybavení konfokálního mikroskopu Leica Stellaris 8 FALCON

* Modul je plně implementovaný do stávajícího řídícího software mikroskopu - LAS X Software
* Umožňuje nastavení experimentu krok za krokem (nastavení objektivu – korekce, nastavení zobrazování, nastavení vlastního FCS experimentu, měření)
* Umožňuje snímání více bodů v jednom experimentu, opakování měření v časovém intervalu a předběžné foto-vybělení (pre-bleach)
* Analytické funkce zahrnují několik modelů matematického fitování – prokládání naměřených křivek podle vlastností dějů (čistá difúze, difúze s tripletem, triplet Extended 3D, triplet Extended 2D, protonizace a konformace) a globální analýzu, která umožňuje fitování více experimentů se společnými parametry
* Obsahuje filtry pro zlepšení kvality dat (Spark filter, Bleaching Correction, Lifetime Filter, Time Gate)
* Umožňuje rozdělit časovou stopu na dílčí úseky pro zvýšení kvality dat
* Umožňuje normalizaci autokorelačních křivek

**Objektiv dedikovaný pro snímání FCS experimentů**

* Umožňující snímání FCS experimentů v definovaném objemu tvořeném konfokální bodovou rozptylovou funkcí (point spread function - PSF)
* Plan-apochromat 63x objektiv s N.A. min. 1.2 s vodní imerzí, korekcí na krycí sklo od 0.14 do 0.18 mm, pracovní vzdáleností min. 0.30 mm, použitelný pro 20-40°C

**Modul pro STED super-rezoluční mikroskopii:**

Přídavný **STED modul s optickými prvky pro tvorbu specifických PSF**, plně kompatibilní s konfokální hlavou mikroskopu Leica Stellaris 8.

* + umožňuje navázaní alespoň dvou deplečních laserů do optické cesty konfokálního mikroskopu Leica Stellaris 8
	+ Umožňuje kontrolované rozdělení svazku deplečního laseru do dvou nezávislých optických cest, včetně plynulého nezávislého nastavení použitého výkonu v obou větvích
	+ Dvě nezávislé optické cesty pro zpracování svazku, které umožňují tvarování PSF deplečního laseru za účelem:
	+ zvýšení X,Y rozlišení mikroskopu - optické prvky měnící fázi s laterální účinností umožňující tvarování PSF deplečního laseru v laterálním směru
	+ zvýšení Z rozlišení mikroskopu – optické prvky měnící fázi s axiální účinností umožňující tvarování PSF deplečního laseru v laterálním směru
	+ Svazek kteréhokoliv deplečního laseru může být směrován přes jednu, nebo obě optické cesty v jakékoliv kombinaci a umožnovat tak kompletní 3D modelaci výsledné PSF deplečního laseru
	+ Modul umožňuje zpětné sloučení obou nezávisle zpracovaných svazků deplečního laseru a precizní navázání výsledného svazku do optické dráhy konfokálního mikroskopu
	+ možnost plného seřízení prostorového navázání svazků deplečního a excitačního laseru pro zajištění jejich optimálního překryvu a precizní modelaci tvaru výsledné efektivní PSF použité pro techniky 2D STED a 3D STED mikroskopie.

**Depleční lasery:**

* Pulsní laser s emisí vlnové délky 589 nm a výstupním výkonem alespoň 1.5 W
* Pulsní laser s emisí vlnové délky 775 nm a výstupním výkonem alespoň 1.5 W
* Frekvence obou deplečních laserů: 80 MHz, externí řízení frekvence obou laserů a jejich synchronizace s frekvencí stávajícího excitačního laserového modulu WLL.
* Systém bude vybaven tzv. „notch“ filtry, které blokují případné odražené světlo vlnových délek instalovaných deplečních laserů.

**Objektiv dedikovaný pro STED**

* Objektiv apochromatický, 100x/1.40 NA, olejová imerze, korigovaný pro krycí skla tloušťky 170 um.

**Software a TauSTED Xtend technologie**

Softwarové moduly rozšiřující funkcionalitu stávajícího software LAS X, o plné ovládání součástí mikroskopu souvisejících s modulem pro STED super-rezoluční mikroskopii. Software zároveň musí podporovat stávající technologie systému Leica Stellaris 8 a to zejména TauSense technologii využívající i informace o průměrné době životnosti fluorescence a také technologii pro plnohodnotné zobrazování doby života fluorescence FALCON. Pro super-rezoluční STED mikroskopii software musí umožňovat:

* „Gated STED“ technologii zlepšující rozlišení snímání na základě odstranění časně detekovaných fotonů
* „TauSTED“ technologii využívající TauSense technologii pro prostorově-časovou analýzu a zpracování dat pro zlepšení rozlišení STED snímání
* „Xtend“ technologii, která umožňuje kombinovat data ze STED snímání a data o časovém průběhu vyhasínání fluorescence získané stávajícím FLIM modulem FALCON. Technologie Xtend využívá modelu PSF, který zahrnuje reálný časový gradient fluorescence emitované v rámci PSF, změřený pomocí funkcí stávajícího modulu FALCON a umožní tak pokročilé filtrování a analýzu. Modul umožní zejména:
* zásadní zlepšení laterálního i axiálního rozlišení snímání na základě pokročilého filtrování dat s použitím analýzy závislosti doby vyhasínání fluoroforů a jejich posunu při použití deplečních laserů
* šetrné super-rezoluční zobrazování fixovaných i živých vzorků za použití velmi nízkých intenzit excitačních i deplečních laserů
* na základě informací o prostorovém rozlišení a změřené době vyhasínání fluoroforů umožňuje v rámci post-processingu dat laditelné rozlišení výsledného obrazu s využitím všech dostupných technologií Gated STED, TauSTED a Xtend, jakož i výrazné zlepšení kvality obrazu definované SNR

**Rozšiřující softwarový modul LAS X Lightning**

Rozšíření stávajícího software LAS X o moduly a algoritmy potřebné ke zpracování dat metodou adaptivní dekonvoluce. Modul umožňuje:

* zpracování dat za běhu, tedy v průběhu akvizice s využitím GPU
* korekci driftu
* nastavení parametrů relevantních pro dekonvoluci STED dat
* zvýšení rozlišení obrazu získaného konfokálním snímáním je až na 120 nm laterálně a 200 nm axiálně.

**Softwarové vybavení pro autonomní mikroskopii**

Pro usnadnění snímání a nalezení vzácných objektů, požadujeme rozšíření o moduly a software umožňující pokročilé snímání, analýzu dat a autonomní mikroskopii

**Modul LAS X Navigator Expert**

* umožňuje provádět přednastavené flexibilní experimenty (časové řady, z-stack, akvizice více nastavení) v různých pozicích, skupinách pozic nebo jamkách.
* Umožňuje použití široké škály různých nosičů (tj. sklíček, misek, destiček s více jamkami)
* Umožňuje aktivaci mikro dávkovače s pro vodní imerzi.

**Modul LAS X Stellaris Aivia interface**

* Softwarové rozhraní mezi LAS X software, který slouží pro sběr dat a software AIVIA Go, který umožňuje pokročilou analýzu obrazu
* Umožňuje automatické předávání obrazových dat ke zpracování v analytickém software Aivia Go a výsledků (např. pozice) zpět do akvizičního software LAS X

**Modul LAS X Rare Event detection**

* Umožňuje kompletní workflow pro provádění experimentů tzv. autonomní mikroskopie. Pracovní postup umožňuje najít vzácné události pomocí nástrojů umělé inteligence (AI) z dat získaných v úvodním přehledném skenu, a takto identifikované objekty zájmu předat akvizičnímu software k provedení dalšího podrobného skenu ve vysokém rozlišení.

**Software AIVIA Go licence na 3 roky**

* Interaktivní vizualizační nástroje včetně nástroje Ortho Slicer a Clipping Planes pro selektivní odhalení oblastí, objektů a vztahů zájmu v surových a analyzovaných datech
* Umožňuje práci s vícekanálovými 2D až 4D daty o velikosti až 3 TB a miliony detekovaných objektů
* Systém textového označování obrázků a objektů ideální pro společnou práci a vizuální sledování různých objektů/oblastí zájmu
* Videoanimátor pro vytváření vysoce kvalitních videoanimací až do rozlišení 4K a 60 fps
* Možnost vytvářet tabulky a grafy (rozptylové, sloupcové, liniové a stopové) pro zkoumání a export analyzovaných výsledků
* Umožňuje trénovat a používat Pixel Classifier, nástroj založený na strojovém učení, pro vylepšení a segmentaci obrazu pro radikálně zjednodušenou segmentaci 2D až 5D mikroskopických datových sad
* Jednoduchá grafická interakce s UI při ovládání nástrojů pro trénování algoritmů hlubokého učení
* Integrace hlubokého učení a jazyka Python pro použití libovolného z předtrénovaných modelů hlubokého učení Aivia pro vylepšení a/nebo segmentaci obrazu.
* Rozhraní API Aivia Python, které umožňuje spouštět aplikace CellPose, StarDist a širokou škálu zásuvných modulů vyvinutých týmem Aivia a širší komunitou uživatelů
* Široká škála receptů pro analýzu obrazu včetně počítání a sledování jader, počítání a sledování buněk, počítání a sledování částic, testu buněčné proliferace, růstu neuritů, hojení ran (fázový kontrast), detekce kolonií kmenových buněk (fázový kontrast), sledování buněk (fázový kontrast), detekce objektů (oka), detekce objektů (skvrny), sledování objektů a sledování linií. Automatické určení požadovaných parametrů pomocí předtrénovaného hlubokého učení pro analýzu 3D objektů.
* Dávkové zpracování receptů, vyškolených modelů hlubokého učení a vyškolených klasifikátorů pixelů.
* Poloautomatizované nástroje pro analýzu a úpravy, jako je Editor obrysů (Contour Editor), který zjednodušuje úlohu rekonstrukce složitých 3D tvarů, jako jsou organely, neurony a další buňky
* 3D objekty vytvořené pomocí nástroje Contour Editor lze použít k vymezení oblastí zájmu, na které mohou uživatelé použít některý z receptů, vycvičený Pixel Classifier nebo modely hlubokého učení
* Analýza kolokalizace pixelů a objektů (včetně výpočtu Mandersova a Pearsonova korelačního koeficientu)
* Otevírání všech nejrozšířenějších typů mikroskopických souborů, včetně rozšířené podpory souborů Leica (načítání dat FALCON a TauSense)
* Integrace virtuální reality pro interaktivní navigaci a zkoumání surových voxelových dat i výsledků segmentace pomocí pokročilých náhlavních souprav VR

Záruka: minimálně 12 měsíců

Servisní podmínky: reakční doba servisu - 48 hodin, návštěva technika do 1 týdne, oprava do 14 dnů, při nutnosti náhradního dílu oprava do 1 měsíce.