



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Físico-Matemáticas

Licenciatura en Física aplicada

**Influencia del tiempo muerto de un fotodetector sobre el  
contraste de speckle para medir flujo sanguíneo.**

Tesis presentada como requisito para obtener el grado de:  
**Licenciado en Física Aplicada**

por

**Nestor Eduardo Cruz Ojeda**

Asesorado por

**Dr. Julio César Ramírez San Juan**

Instituto Nacional de Astrofísica Óptica y Electrónica

**Dr. Cruz Meneses Fabián**

BUAP

Puebla, Pue; Diciembre de 2015.



# Dedicatoria

A mi familia

# **Agradecimientos**

A mi familia y al Dr. Julio César Ramírez San Juan



# Índice general

Introducción	7
<b>1. Teoría de coherencia óptica</b>	<b>8</b>
1.1 Coherencia temporal y correlación óptica . . . . .	9
1.2 Tiempo de coherencia y tiempo de correlación . . . . .	14
<b>2. Teoría básica de Laser Speckle Contrast Imaging (LSCI)</b>	<b>16</b>
2.1 Contraste de speckle y procesos de esparcimiento no gaussianos . . . . .	18
2.2 Relación entre el tiempo de correlación y la velocidad de los difusores . . . . .	23
2.3 Algoritmo (espacial y temporal) para determinar el contraste y procesamiento de datos . . . . .	24
2.4 Aplicaciones de Laser Speckle Contrast Imaging . . . . .	25
<b>3. Tiempo muerto en intensidad integrada</b>	<b>29</b>
3.1 Tiempo muerto y su influencia en la varianza de intensidad integrada . . . . .	31
3.2 Cálculo de contraste de speckle integrado bajo la influencia del tiempo muerto . .	34
<b>4. Análisis y discusión de resultados</b> . . . . .	<b>36</b>
<b>5. Conclusiones generales</b> . . . . .	<b>42</b>
Bibliografía . . . . .	43

## Introducción

Cuando un objeto difuso, como el tejido biológico, es iluminado mediante luz coherente, un patrón de interferencia aleatorio, llamado speckle, puede ser observado en la luz transmitida o reflejada. Cuando el objeto es estático, el patrón de speckle también es estático. Sin embargo, si el objeto se mueve con una cierta velocidad, los granos individuales del speckle se mueven y cambia su forma. La velocidad del objeto (por ejemplo las células sanguíneas) es inversamente proporcional al tiempo de correlación de la luz reflejada o transmitida a través del objeto [4, 28]. Por esta razón, un cálculo apropiado del  $\tau_{co}$  es esencial para el cálculo de la velocidad del objeto. Laser Speckle Contrast Imaging (LSCI) es una técnica óptica no invasiva [10] que emplea el contraste de la intensidad integrada de la luz reflejada/transmitida para calcular el  $\tau_{co}$  y, por lo tanto, la velocidad del flujo sanguíneo. En la comunidad de LSI, diferentes grupos de investigación han propuesto mejoras teóricas y experimentales para un mejor cálculo del  $\tau_{co}$ , es decir, Bandyopadhyay [7] demostró que la teoría original de LSCI propuesta por Fercher [4] no toma en cuenta el promedio triangular de la intensidad integrada, Parthasarathy [6] propuso un modelo robusto de LSCI y un instrumento de MESI y demostró que su instrumento mejora el cálculo del  $\tau_{co}$  en comparación con el instrumento tradicional LSCI. Kirkpatrick [29] mostró que un sub-muestreo espacial del patrón de speckle tiene el efecto perjudicial de reducir el contraste de speckle y, por lo tanto, el  $\tau_{co}$  medido, Ramirez-San-Juan [30] propuso un factor de corrección que resuelve este problema. Recientemente, el estudio de las estadísticas de la intensidad de fluorescencia promediada en el tiempo, Turgeman [24] encontró que incluso un pequeño tiempo muerto (1% del tiempo de exposición) del fotodetector conduce a mediciones grandes del  $\tau_{co}$ , tanto como un orden de magnitud en comparación con un fotodetector ideal. El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto del tiempo muerto en la estimación de contraste y  $\tau_{co}$  en la teoría de LSCI.

## Capítulo 1. Teoría de coherencia óptica.

La óptica estadística es el estudio de las propiedades de la luz aleatoria. Estas propiedades juegan un rol importante en la determinación de los resultados de muchos experimentos ópticos. Las aleatoriedades de la luz surgen debido a las fluctuaciones impredecibles de la fuente de luz o del medio a través del cual se propaga. La luz natural, por ejemplo, la radiada por un objeto caliente, es aleatoria debido a que es una superposición de la emisión proveniente de un número muy grande de átomos radiando independientemente a diferentes frecuencias y fases. Las aleatoriedades en la luz también pueden ser resultado del esparcimiento desde superficies rugosas, vidrios difusos, o fluidos turbulentos, los cuales le imparten variaciones aleatorias al frente de onda óptico. El estudio de las fluctuaciones aleatorias de la luz es también conocido como la **teoría de coherencia óptica**.

En varios casos de interés práctico, el experimento puede ser descrito mediante un modelo estadístico completo, es decir, mediante funciones de coherencia.

Vale la pena mencionar brevemente la distinción entre dos tipos de coherencia: coherencia temporal y coherencia espacial. Al considerar coherencia temporal, estamos interesados en la capacidad de un haz de luz para interferir con una versión retardada de sí mismo (pero no desplazado espacialmente) como se aprecia en el experimento del interferómetro de Michelson. Nos referimos a esta división de un haz de luz, como *división de amplitud*. Por otro lado, cuando se considera coherencia espacial, estamos interesados en la capacidad de un haz de luz para interferir con una versión desplazada espacialmente de sí mismo (pero no con retraso) como se aprecia en el experimento de Young. Nos referimos a este tipo de división de la luz como *división del frente de onda*. Estas ideas pueden generalizarse para permitir desplazamientos temporales y espaciales, lo que nos llevará al concepto de la función de coherencia mutua.

## Sec. 1.1 Coherencia temporal y correlación óptica.

Una onda óptica arbitraria se describe mediante una función de onda

$$u(\mathbf{r}, t) = \text{Re}\{U(\mathbf{r}, t)\}$$

donde  $U(\mathbf{r}, t)$  es la función de onda compleja. Si la luz es aleatoria, ambas funciones,  $u(\mathbf{r}, t)$  y  $U(\mathbf{r}, t)$  son aleatorias y están caracterizadas por un número de promedios estadísticos [1].

### 1.1.1 Intensidad óptica.

La intensidad  $I(\mathbf{r}, t)$  de la luz coherente (determinista) es el cuadrado absoluto de la función de onda compleja  $U(\mathbf{r}, t)$ ,

$$I(\mathbf{r}, t) = |U(\mathbf{r}, t)|^2 \quad 1.1$$

Si la luz es aleatoria, entonces  $U(\mathbf{r}, t)$  es una función aleatoria de la posición y del tiempo. La intensidad  $|U(\mathbf{r}, t)|^2$  es por lo tanto también aleatoria. La *intensidad media* es entonces definida como:

$$I(\mathbf{r}, t) = \langle |U(\mathbf{r}, t)|^2 \rangle \quad 1.2$$

donde el símbolo  $\langle * \rangle$  denota un ensemble promedio sobre varias repeticiones de la función aleatoria. Esto significa que la onda es reproducida varias veces bajo las mismas condiciones, y en cada ensayo se genera una función de onda diferente, y la intensidad media en cada posición y tiempo es determinada. Se llamará simplemente a  $I(\mathbf{r}, t)$  la *intensidad de la luz* (con la palabra "media" implícita). La cantidad  $|U(\mathbf{r}, t)|^2$  es llamada *intensidad aleatoria* o *instantánea*. Para luz determinista, la operación promedio es innecesaria ya que todos los ensayos generan la misma función de onda de modo que 1.1 es equivalente a 1.2.

La intensidad media puede ser independiente del tiempo o puede ser una función del tiempo, como se ilustra en la figura 1.1 (a) y 1.1 (b) respectivamente.

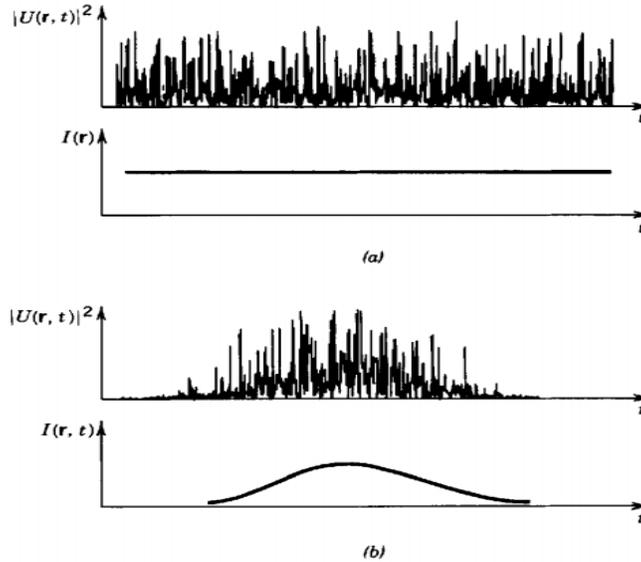


Figura 1.1. (a) Onda estadísticamente estacionaria con una intensidad media independiente del tiempo. (b) onda estadísticamente no estacionaria con una intensidad dependiente del tiempo.

El primer caso aplica cuando la onda óptica es estadísticamente *estacionaria*, esto es, sus promedios estadísticos son invariantes en el tiempo. La intensidad instantánea  $|U(\mathbf{r}, t)|^2$  fluctúa aleatoriamente en el tiempo, pero su media es constante. En este caso, se denotará  $I(\mathbf{r}, t) = I(\mathbf{r})$ . Un ejemplo de luz aleatoria estacionaria es aquella proveniente de una lámpara incandescente calentada mediante una corriente eléctrica constante. La intensidad promedio  $I(\mathbf{r})$  es una función de la distancia desde la lámpara, pero no varía con el tiempo. Sin embargo, la intensidad aleatoria  $|U(\mathbf{r}, t)|^2$  fluctúa tanto en la posición y en el tiempo.

Cuando la luz es estacionaria, la media estadística en la ecuación (1.2) puede ser determinada mediante un promedio sobre un intervalo de tiempo (en lugar de un ensemble promedio sobre varias repeticiones de la onda) de modo que [1]:

$$I(\mathbf{r}) = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \int_{-T}^T |U(\mathbf{r}, t)|^2 dt \quad 1.3$$

### 1.1.2 Coherencia temporal y espectro óptico.

Si se consideran las fluctuaciones de luz estacionaria sobre una posición fija en el espacio  $\mathbf{r}$  como una función del tiempo, entonces la función aleatoria estacionaria  $U(\mathbf{r}, t)$  tiene una intensidad constante  $I(\mathbf{r}) = \langle |U(\mathbf{r}, t)|^2 \rangle$ . Por simplificación se elimina la dependencia de  $\mathbf{r}$  (ya que  $\mathbf{r}$  es fija), tal que  $U(\mathbf{r}, t) = U(t)$  y  $I(\mathbf{r}) = I$ .

Las fluctuaciones aleatorias de  $U(t)$  están caracterizadas mediante una escala de tiempo que representa la “memoria” de la función aleatoria. Las fluctuaciones sobre puntos separados por un intervalo de tiempo más grande que el tiempo de memoria son independientes. La función parece ser suave dentro de su tiempo de memoria, pero es “rugosa” y “errática” cuando se analiza sobre tiempos de escala mayores. Se establece una medida cuantitativa de este comportamiento temporal definiendo un promedio estadístico conocido como la función de autocorrelación. El análisis de correlación es un instrumento esencial para comparar dos señales a fin de determinar el nivel de similitud entre ellas.

### 1.1.3 Función de coherencia temporal.

La función de autocorrelación de una función aleatoria compleja estacionaria  $U(t)$  es la media del producto de  $U^*(t)$  y  $U(t + \tau)$  como una función del tiempo de retardo  $\tau$

$$G(\tau) = \langle U^*(t)U(t + \tau) \rangle \quad 1.4$$

$$\text{ó} \quad G(\tau) = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \int_{-T}^T U^*(t)U(t + \tau) dt$$

Para entender el significado de la ecuación (1.4) se considera el caso en el cual la media de la función de onda compleja  $U(t) = 0$ . Esto se aplica cuando la fase del fasor  $U(t)$  puede tomar cualquier valor entre 0 y  $2\pi$  como se muestra en la figura 1.2. La fase del producto  $U^*(t)U(t + \tau)$  es el ángulo formado entre los fasores  $U(t)$  y  $U(t + \tau)$ . Si  $U(t)$  y  $U(t + \tau)$  no están correlacionados, el ángulo entre sus fasores varía aleatoriamente entre 0 y  $2\pi$ . El fasor  $U^*(t)U(t + \tau)$  entonces tiene un ángulo totalmente indefinido, tal que es igualmente probable que tome cualquier dirección, haciendo su promedio, la función de autocorrelación  $G(\tau)$  se anula. Por otro lado si, para un tiempo dado  $\tau$ ,  $U(t)$  y  $U(t + \tau)$  están correlacionados, sus fasores mantendrán alguna relación. Entonces sus fluctuaciones están relacionadas entre sí, de modo que el producto del fasor  $U^*(t)U(t + \tau)$  tiene una dirección preferencial y su promedio  $G(\tau)$  no se anulara.

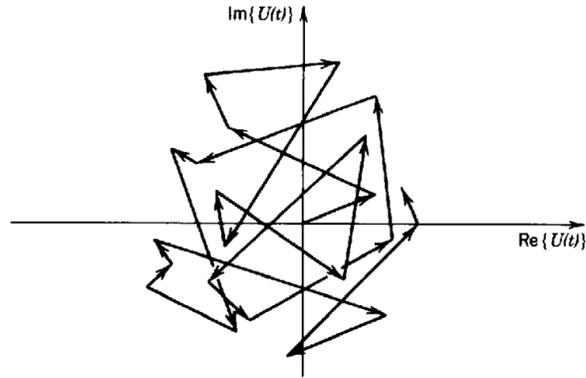


Figura 1.2. Variación del fasor  $U(t)$  con el tiempo cuando su argumento está distribuido uniformemente entre  $0$  y  $2\pi$ . El valor promedio de su parte real e imaginaria son cero, tal que  $\langle U(t) \rangle = 0$ .

Cuando  $\tau = 0$ , entonces  $G(0) = \langle U^*(t)U(t + 0) \rangle = I$ .

En la teoría de coherencia óptica, la función de autocorrelación  $G(\tau)$  es nombrada como *función de coherencia temporal* [1].

### 1.1.4 Grado de coherencia temporal.

La función de autocorrelación  $G(\tau)$ , tiene información tanto de la intensidad  $I = G(0)$  y el grado de correlación (coherencia) de luz estacionaria. Una medida de la coherencia es la *función de autocorrelación normalizada*:

$$g(\tau) = \frac{G(\tau)}{G(0)} = \frac{\langle U^*(t)U(t + \tau) \rangle}{\langle U^*(t)U(t) \rangle} \quad 1.5$$

la cual es llamada *grado complejo de coherencia temporal*. Su valor absoluto no puede exceder la unidad,

$$0 \leq |g(\tau)| \leq 1 \quad 1.6$$

El valor de  $|g(\tau)|$  es una medida del grado de correlación entre  $U(t)$  y  $U(t + \tau)$  [1].

$$\text{Cuando } 0 \leq \begin{cases} |g(\tau)| = 1 & \text{coherencia total} \\ |g(\tau)| < 1 & \text{coherencia parcial} \\ |g(\tau)| = 0 & \text{incoherencia total} \end{cases} \quad 1.7$$

### 1.1.5 Densidad espectral de potencia.

Para determinar el espectro promedio de la luz aleatoria, llevamos a cabo una descomposición de Fourier de la función aleatoria  $U(t)$ . La transformada de Fourier de  $U(t)$  será la amplitud de la componente con frecuencia  $\nu$

$$V(\nu) = \int_{-\infty}^{\infty} U(t)e^{-j2\pi\nu t} dt \quad 1.8$$

La energía media por unidad de área de aquellas componentes con frecuencias dentro del intervalo  $\nu$  y  $\nu + d\nu$  es  $\langle |V(\nu)|^2 \rangle d\nu$ , tal que  $\langle |V(\nu)|^2 \rangle$  representa la densidad de energía espectral de la luz (energía por unidad de área por unidad de frecuencia).

Ya que una función estrictamente estacionaria  $U(t)$  es eterna y transporta energía infinita, se considera en cambio la densidad de potencia espectral. Para esto, primero se define la transformada de Fourier truncada

$$V_T(\nu) = \int_{-T/2}^{T/2} U(t)e^{-j2\pi\nu t} dt \quad 1.9$$

para después obtener la densidad de energía espectral  $\langle |V_T(\nu)|^2 \rangle$  de la función  $U(t)$  observada durante un tiempo de exposición  $T$ . Por lo tanto, la densidad de potencia espectral es la energía por unidad de tiempo  $(\frac{1}{T})\langle |V_T(\nu)|^2 \rangle$ . Ahora se puede extender el tiempo de exposición tomando el límite  $T \rightarrow \infty$ . El resultado

$$S(\nu) = \lim_{T \rightarrow \infty} \left( \frac{1}{T} \right) \langle |V_T(\nu)|^2 \rangle \quad 1.10$$

es llamado la densidad de potencia espectral. Esta expresión es diferente de cero solamente para frecuencias positivas.

Como  $U(t)$  fue definida de tal manera que  $|U(t)|^2$  representa la potencia por unidad de área, o intensidad ( $W/cm^2$ ) entonces  $S(\nu)d\nu$  representa la potencia media por unidad de área transportada entre las frecuencias  $\nu$  y  $\nu + d\nu$ , tal que  $S(\nu)$  actualmente representa la densidad de intensidad espectral ( $W/cm^2\_Hz$ ). A menudo, esto se conoce simplemente como la densidad espectral o el espectro. La intensidad promedio total es la integral [1]

$$I = \int_0^{\infty} S(\nu)d\nu \quad 1.11$$

## Sec. 1.2 Tiempo de coherencia y tiempo de correlación.

### 1.2.1 Tiempo de correlación.

Se puede definir un tiempo de correlación para la función aleatoria  $U(t)$ . Tal definición puede ser dada en términos del grado complejo de coherencia, por lo tanto se define el tiempo de correlación de la perturbación  $U(t)$  como [1], [2], [3]:

$$\tau'_c \equiv \int_{-\infty}^{\infty} |g(\tau)|^2 d\tau \quad 1.12$$

### 1.2.2 Tiempo de coherencia.

Si  $|g(\tau)|$  decrece monótonamente con el tiempo de retardo, el valor  $\tau_c$  al cual decae al valor (1/2 o 1/e, por ejemplo) sirve como una medida del tiempo de memoria de las fluctuaciones definido como *tiempo de coherencia* (ver figura 1.3). Para  $\tau < \tau_c$  las fluctuaciones están “fuertemente” correlacionadas mientras que para  $\tau > \tau_c$  ella están “débilmente” correlacionadas. En general  $\tau_c$  es el ancho de la función  $|g(\tau)|$ .

Para luz monocromática, el tiempo de coherencia es infinito ya que  $|g(\tau)| = 1$  en todas partes.

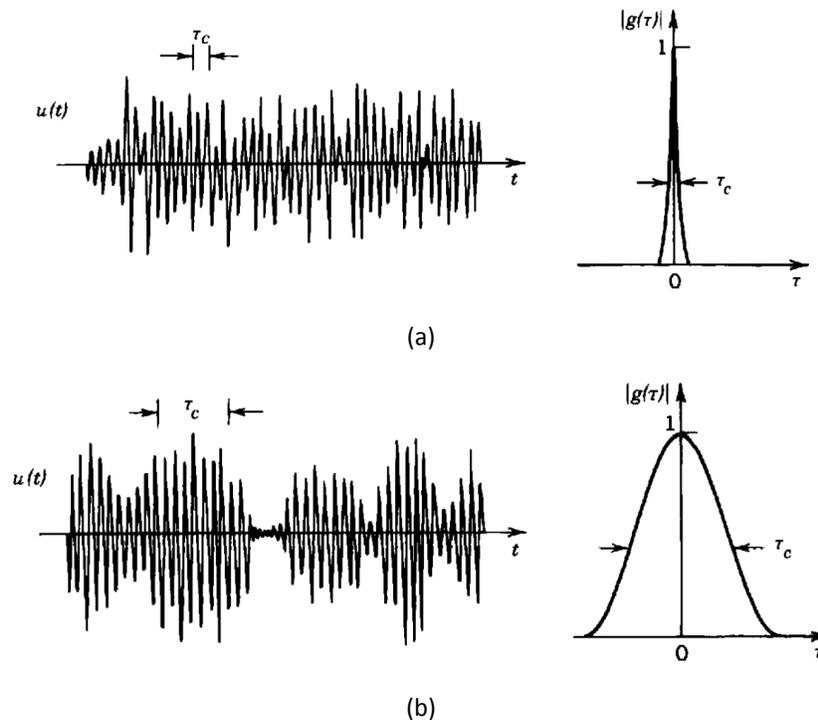


Figura 1.3. Magnitud del grado complejo de coherencia temporal  $|g(\tau)|$ , y el tiempo de coherencia  $\tau_c$  para un campo óptico con (a) un tiempo de coherencia corto y (b) un tiempo de coherencia mayor.

En la figura 1.3 se muestra la función de onda, la magnitud del grado complejo de coherencia temporal  $|g(\tau)|$ , y el tiempo de coherencia  $\tau_c$ . La amplitud y fase de la función de onda varían aleatoriamente en el tiempo. En ambos casos, el tiempo de coherencia  $\tau_c$  es mayor que la duración de un ciclo óptico. Dentro del tiempo de coherencia la onda es bastante predecible y puede ser aproximada a una senoide. Sin embargo, dada la amplitud y fase de la onda en un tiempo particular, no se puede predecir la amplitud y fase de la onda a tiempos posteriores al tiempo de coherencia [1], [2], [3].

## Capítulo 2. Teoría básica de Laser Speckle Contrast Imaging (LSCI).

Laser Speckle Contrast Imaging (LSCI) es una técnica óptica no invasiva, usada para generar mapas de flujo sanguíneo. Esta técnica fue introducida por Fercher y Briers en 1981 y ha sido usada para cuantificar el cambio de flujo sanguíneo en piel, retina y accidentes cerebrovasculares en ratas y ratones [4].

Laser speckle es un patrón de interferencia aleatorio de luz coherente. Cuando luz coherente interactúa con un medio esparcidor, la luz esparcida formará un patrón de speckle o patrón de interferencia aleatorio sobre la cámara debido al hecho de que la luz láser que está incidiendo en cada pixel habrá recorrido longitudes de camino ligeramente diferentes y se superpondrá coherentemente, tanto constructivamente como destructivamente (Fig. 2.1) [5].

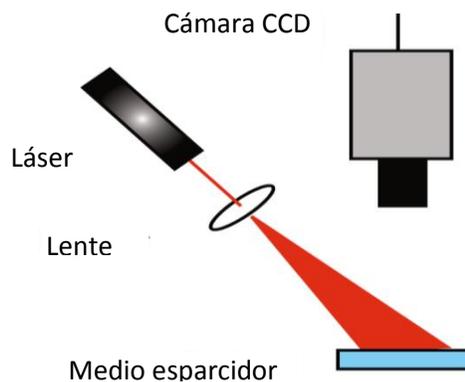


Fig. 2.1. Sistema de detección básico usado para detectar patrones de speckle.

El movimiento de las partículas en el medio esparcidor (por ejemplo, en material biológico) modifica tanto espacial como temporalmente el patrón de speckle. La estadística espacial y temporal de este patrón de speckle provee información acerca del movimiento de las partículas de esparcimiento. El movimiento puede ser cuantificado midiendo y analizando las variaciones temporales o las variaciones espaciales. En el dominio espacial, estas modificaciones se manifiestan como opacidad o blurring de la imagen. LSCI cuantifica el grado de blurring espacial calculando una cantidad llamada *contraste local de speckle* ( $K$ ), el cual, como veremos en la próxima sección, está relacionado con el tiempo de correlación ( $\tau_{co}$ ) de la luz esparcida y con la velocidad de las partículas en movimiento.

La influencia de la velocidad de las partículas en el contraste de speckle es descrito cuantitativamente usando la teoría de esparcimiento de luz dinámica (dynamic light scattering; DLS) a través de los tiempos de correlación ( $\tau_{co}$ ). El tiempo de correlación de speckle es el tiempo de decaimiento característico de la función de autocorrelación de

speckle. La función de correlación de speckle es una función que describe la dinámica del sistema usando luz coherente esparcida. El tiempo de correlación es inversamente proporcional a la velocidad media de las partículas de esparcimiento  $\tau_{co} \propto 1/v$  (donde  $v$  es la velocidad media) [6]. De esta manera, LSCI mapea variaciones de contraste en un mapa de velocidades relativas de flujo sanguíneo.

## Sec. 2.1 Contraste de speckle y procesos de esparcimiento no gaussianos.

El movimiento de las partículas (células sanguíneas) dentro del medio aleatorio causa modificaciones espaciales y temporales del patrón de speckle. Este movimiento puede ser cuantificado midiendo y analizando las variaciones temporales o espaciales del patrón de speckle. En el dominio espacial, las modificaciones del patrón de speckle se manifiestan como opacidad o blurring de la imagen. La técnica de Laser Speckle Contrast Imaging (LSCI) cuantifica el grado de blurring calculando una cantidad llamada **contraste de speckle (K)** sobre una pequeña ventana de  $n \times n$  pixeles [6]:

$$K = \frac{\sigma_s}{\langle I \rangle} \quad 2.1$$

donde  $\sigma_s$  es la desviación estándar espacial de la intensidad de speckle y  $\langle I \rangle$  es la intensidad media sobre los pixeles de la ventana.

En las áreas donde se incrementa el flujo sanguíneo, las fluctuaciones de la intensidad del patrón de speckle son más rápidas, y cuando es integrada sobre algún tiempo de exposición de la cámara (típicamente de 1 a 10 ms), el patrón de speckle se vuelve borroso en aquellas áreas. Adquiriendo una imagen del patrón de speckle y cuantificando el blurring de los speckles en la imagen midiendo el contraste espacial de las variaciones de intensidad, se obtienen los mapas espaciales del flujo sanguíneo relativo.

Hay que remarcar que esta técnica supone que la dinámica del patrón de speckle contiene información del movimiento de las partículas esparcidas en la muestra, es decir, las técnicas basadas en el concepto de speckle integrado en el tiempo confían en el hecho de que el movimiento de las partículas esparcidas está codificado en la dinámica del patrón de speckle.

Para hallar una expresión analítica para el contraste  $K$  se emplea la teoría de funciones de correlación, la cual fue estudiada en el capítulo 1. Las fluctuaciones temporales de speckle son cuantificadas mediante las funciones de autocorrelación del campo eléctrico y de la intensidad dada por la ecuación (1.4). Las funciones de autocorrelación del campo eléctrico y de la intensidad están relacionadas mediante la relación de Siegert [7]:

$$g_2(t) = 1 + \beta [g_1(\tau)]^2 = \frac{\langle I(t) * I(t + \tau) \rangle}{\langle I \rangle^2} \quad 2.2$$

donde  $\beta \leq 1$  depende del tamaño relativo entre la mota de speckle y el área del pixel,

$$g_1(\tau) = \frac{|\langle E(t)E(t + \tau)^* \rangle|}{\langle E(t)E(t)^* \rangle} \quad 2.3$$

es la función de correlación normalizada del campo eléctrico  $E(t)$  esparcido por la muestra a estudiar y  $\tau$  es el tiempo de retardo.

Para que la relación de Siegert pueda ser aplicada, se requiere que el campo eléctrico esparcido  $E(t)$  sea completamente dinámico, es decir, que no tenga una componente estática, de ser este el caso, la relación de Siegert no puede ser aplicada. Para superar este problema, se modeló el campo esparcido como:

$$E(t) = E_f(t) + E_s(t) \quad 2.4$$

donde  $E_f(t)$  es el campo eléctrico esparcido (fluctuante),  $E_s(t)$  es el campo eléctrico estático [8].

Sustituyendo (2.4) dentro de (2.3) se tiene que

$$\begin{aligned} g_1(\tau) &= \frac{\langle [E_f(t) + E_s(t)][E_f^*(t + \tau) + E_s^*(t + \tau)] \rangle}{\langle [E_f(t) + E_s(t)][E_f^*(t) + E_s^*(t)] \rangle} = \\ &= \frac{\langle E_s(t)E_s(t + \tau)^* \rangle + \langle E_f(t)E_f(t + \tau)^* \rangle}{I_s(t) + \langle I_f \rangle + \langle E_s(t)E_f(t)^* \rangle + \langle E_f(t)E_s(t)^* \rangle} + \\ &+ \frac{\langle E_s(t)E_f(t + \tau)^* \rangle + \langle E_f(t)E_s(t + \tau)^* \rangle}{I_s(t) + \langle I_f \rangle + \langle E_s(t)E_f(t)^* \rangle + \langle E_f(t)E_s(t)^* \rangle} = \\ &= \frac{I_s(t) + \langle I_f \rangle |g_{1,f}(\tau)|}{I_s(t) + \langle I_f \rangle} \quad (2.5) \end{aligned}$$

El símbolo  $\langle \dots \rangle$  denota un promedio temporal.  $E_s(t)$  no fluctúa en el tiempo, por lo tanto la intensidad  $I_s(t) = E_s(t)E_s(t + \tau)^*$  es constante.  $E_f(t)$  fluctúa en el tiempo tal que  $\langle I_f \rangle = \langle E_f(t)E_f(t)^* \rangle$  es la intensidad fluctuante promediada en el tiempo y  $g_{1,f}(\tau)$  es la función de correlación temporal del campo  $E_f(t)$  (esta decae desde 1 hasta 0). Los términos en el numerador sobre la tercera línea en la ecuación 2.5 se promedian a cero porque las fases de los campos no están correlacionadas. Igualmente, el tercer y cuarto término sobre el denominador de la segunda y tercera línea se promedia a cero.

$$\begin{aligned} \text{Sustituyendo (2.5) dentro de (2.2) se tiene que } g_2(t) &= 1 + \beta \left| \frac{I_s(t) + \langle I_f \rangle |g_{1,f}(\tau)|}{I_s(t) + \langle I_f \rangle} \right|^2 = \\ &= 1 + \beta \frac{(I_s(t) + \langle I_f \rangle |g_{1,f}(\tau)|)^2}{(I_s(t) + \langle I_f \rangle)^2} = \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
&= 1 + \beta \frac{I_s(t)^2 + 2I_s\langle I_f \rangle |g_{1,f}(\tau)| + \langle I_f \rangle^2 |g_{1,f}(\tau)|^2}{(I_s(t) + \langle I_f \rangle)^2} \\
&= 1 + \beta [\rho^2 |g_{1,f}(\tau)|^2 + 2\rho(1 - \rho) |g_{1,f}(\tau)| + (1 - \rho)^2] \quad 2.6
\end{aligned}$$

donde  $\rho^2 = \frac{I_f^2}{(I_f + I_s)^2}$  y  $\beta$  está definida como en la ec. 2.2.

La ec. 2.6 es la relación de Siegert para campo eléctrico con componentes estática y dinámica [6].

Ahora, de la nueva relación de Siegert encontrada, se buscará la relación entre la varianza de speckle y el tiempo de correlación.

Para un tiempo de exposición dado, cada pixel reporta una señal que es proporcional al número total de fotones recibidos. Así, la intensidad integrada sobre el pixel  $i$ -ésimo está dada por:

$$I = \frac{1}{T} \int_0^T I_i(t') dt' \quad 2.7$$

donde  $T$  es el tiempo de exposición.

Por otro lado,

$$\langle I^2 \rangle_T \equiv \frac{1}{T^2} \iint_0^T \langle I_i(t') I_i(t'') \rangle dt' dt'' \quad 2.8$$

donde los corchetes triangulares significan promedio sobre el ensemble. Sustituyendo la expresión para  $g_2(\tau)$  dada por la ec. 2.6 en la ec. 2.8 obtenemos:

$$\begin{aligned}
\langle I^2 \rangle_T &= \langle I \rangle^2 \frac{1}{T^2} \iint_0^T (1 + \beta [\rho^2 |g_{1,f}(t' - t'')|^2 + 2\rho(1 - \rho) |g_{1,f}(t' - t'')| + \\
&\quad + (1 - \rho)^2]) dt' dt'' = \\
&= \langle I \rangle^2 \frac{1}{T^2} \iint_0^T dt' dt'' + \\
&+ \langle I \rangle^2 \frac{1}{T^2} \iint_0^T [\beta \rho^2 |g_{1,f}(t' - t'')|^2 + 2\beta \rho(1 - \rho) |g_{1,f}(t' - t'')| + \beta(1 - \rho)^2] dt' dt'' =
\end{aligned}$$

$$= \frac{\langle I \rangle^2 T^2}{T^2} +$$

$$+ \langle I \rangle^2 \frac{1}{T^2} \iint_0^T \left[ \beta \rho^2 |g_{1,f}(t' - t'')|^2 + 2\beta \rho(1 - \rho) |g_{1,f}(t' - t'')| + \beta(1 - \rho)^2 \right] dt' dt'' \quad 2.9$$

Restando  $\langle I \rangle^2$  y multiplicando por  $1/\langle I \rangle^2$  ambos miembros de la ecuación (2.9) se obtiene la varianza normalizada:

$$K^2 = \frac{\langle I^2 \rangle_T - \langle I \rangle^2}{\langle I \rangle^2} =$$

$$= \frac{1}{T^2} \iint_0^T \left[ \beta \rho^2 |g_{1,f}(t' - t'')|^2 + 2\beta \rho(1 - \rho) |g_{1,f}(t' - t'')| + \beta(1 - \rho)^2 \right] dt' dt'' \quad 2.10$$

Para evaluar la integral de (2.10), ambas variables de integración deben ser modificadas.

Sea  $\tau = t' - t''$  y  $\alpha = t''$ , entonces (2.10) es transformada (excepto los límites de integración) usando la fórmula de cambio de variables

$$\frac{1}{T^2} \iint_0^T \left[ \beta \rho^2 |g_{1,f}(t' - t'')|^2 \right] dt' dt'' + \frac{1}{T^2} \iint_0^T \left[ 2\beta \rho(1 - \rho) |g_{1,f}(t' - t'')| \right] dt' dt'' +$$

$$+ \frac{1}{T^2} \iint_0^T \left[ \beta(1 - \rho)^2 \right] dt' dt'' =$$

$$= \frac{1}{T^2} \iint \left[ \beta \rho^2 |g_{1,f}(\tau)|^2 \right] |J|^{-1} d\alpha d\tau + \frac{1}{T^2} \iint \left[ 2\beta \rho(1 - \rho) |g_{1,f}(\tau)| \right] |J|^{-1} d\alpha d\tau +$$

$$+ \frac{1}{T^2} \iint_0^T \left[ \beta(1 - \rho)^2 \right] dt' dt''$$

donde  $|J|$  es el valor absoluto del jacobiano para el cambio de variables dado por:

$$J = \begin{vmatrix} \frac{\partial \tau}{\partial t'} & \frac{\partial \tau}{\partial t''} \\ \frac{\partial \alpha}{\partial t'} & \frac{\partial \alpha}{\partial t''} \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} 1 & -1 \\ 1 & 0 \end{vmatrix} = 1$$

Como  $\tau = t' - t''$  y además  $0 \leq t' \leq T$ ,  $0 \leq t'' \leq T$  entonces  $-T \leq \tau \leq T$ .

Como  $\alpha = t''$  y  $0 \leq t' \leq T$  entonces  $0 \leq \alpha \leq T - |\tau|$ .

Entonces

$$\begin{aligned}
K^2 &= \frac{1}{T^2} \int_{-T}^T \int_0^{T-|\tau|} [\beta \rho^2 |g_{1,f}(\tau)|^2] d\alpha d\tau + \frac{1}{T^2} \int_{-T}^T \int_0^{T-|\tau|} [2\beta \rho(1-\rho) |g_{1,f}(\tau)|] d\alpha d\tau + \\
&\quad + \beta(1-\rho)^2 = \\
&= \frac{\int_{-T}^T (T-|\tau|) [\beta \rho^2 |g_{1,f}(\tau)|^2] d\tau}{T^2} + \frac{\int_{-T}^T (T-|\tau|) [2\beta \rho(1-\rho) |g_{1,f}(\tau)|] d\tau}{T^2} + \\
&\quad + \beta(1-\rho)^2
\end{aligned}$$

$\tau$  solamente tiene sentido físico si  $\tau \geq 0$ , por lo tanto  $|\tau| = \tau$ , entonces:

$$K^2 = 2\beta\rho^2 \int_0^T \frac{(1-\frac{\tau}{T})(g_{1,f}(\tau))^2 d\tau}{T} + 4\beta\rho(1-\rho) \int_0^T \frac{(1-\frac{\tau}{T})g_{1,f}(\tau) d\tau}{T} + \beta(1-\rho)^2 \quad 2.11$$

Suponiendo que las velocidades de los difusores tienen una distribución Lorentziana, la cual está dada como

$$g_{1,f}(\tau) = e^{-\tau/\tau_{co}} \quad 2.12$$

Y reconociendo que la raíz cuadrada de la varianza es el contraste de speckle, la ec. (2.11) se simplifica a

$$K(T, \tau_{co}) = \left\{ \beta \rho^2 \frac{e^{-2x} - 1 + 2x}{2x^2} + 4\beta \rho(1-\rho) \frac{e^{-x} - 1 + x}{x^2} + \beta(1-\rho)^2 \right\}^{1/2} \quad 2.13$$

donde  $x = \frac{T}{\tau_{co}}$ ,  $\rho = \frac{I_f}{I_f + I_s}$  es la fracción de la luz total que es esparcida dinámicamente y  $\tau_{co}$  es el tiempo de correlación de los speckles.

La ecuación 2.13 da cuenta de la luz que es esparcida por la presencia de material biológico estático y dinámico dentro de la muestra.

Teóricamente el contraste de speckle tiene valores entre 0 y 1 cuando el patrón de speckle es muestreado adecuadamente. Un contraste de speckle de 1 indica que no hay blurring del patrón de speckle y por lo tanto, no hay movimiento en la muestra, mientras que un contraste de speckle de 0 significa que los difusores se están moviendo muy rápido para promediar todos los speckle.

## Sec. 2.2 Relación entre el tiempo de correlación y la velocidad de los difusores.

En la sección 2.1 se planteó la necesidad de obtener una expresión analítica del contraste de speckle (ec. 2.1) para poder cuantificar el blurring en el patrón de speckle. Para esto, se asumió que la función de autocorrelación temporal del campo (ec. 2.12) tiene la forma

$$g_{1,f}(\tau) = e^{-t/\tau_{co}}$$

Esto da un contraste de speckle

$$K(T, \tau_{co}) = \left\{ \beta \rho^2 \frac{e^{-2x} - 1 + 2x}{2x^2} + 4\beta \rho(1 - \rho) \frac{e^{-x} - 1 + x}{x^2} + \beta(1 - \rho)^2 \right\}^{1/2}$$

donde el tiempo de correlación de los speckles  $\tau_{co}$  se supone que es inversamente proporcional a una medida de la velocidad de las partículas de esparcimiento

$$\tau_{co} \propto \frac{1}{v} \quad 2.14$$

En el caso de mediciones de láser Doppler, teóricamente es posible relacionar los tiempos de correlación de los speckles  $\tau_{co}$  con la velocidad de las células rojas de la sangre, pero esto es difícil de hacer en la práctica ya que el número de partículas en movimiento con las que la luz interactúa y sus orientaciones son desconocidos. Sin embargo, las medidas espaciales y temporales relativas de la velocidad se pueden obtener fácilmente a partir de las relaciones de los tiempos de correlación. Según Bandyopadhyay [7], la ecuación 2.12 está relacionada solamente para velocidades dentro del régimen de alto esparcimiento, donde cada uno de los fotones ha experimentado múltiples eventos de esparcimiento desde las partículas en movimiento. En el régimen de esparcimiento dinámico individual, cuando los fotones se esparcen no más de una vez a partir de las partículas en movimiento, entonces el argumento del exponente en la ecuación 2.12 debe ser cuadrado para representar la velocidad sanguínea. En el régimen de esparcimiento dinámico individual, la ecuación 2.12 es correcta si el movimiento de las partículas está sometido a un movimiento Browniano. Además, la relación entre  $\tau_{co}$  y la velocidad de las partículas de esparcimiento depende de la distribución de velocidad de las partículas de esparcimiento de la muestra mediante la luz detectada. Finalmente, las publicaciones que tratan el contraste de speckle, tienden a utilizar los términos “velocidad” y “flujo” de manera intercambiable, cuando la velocidad es una longitud por unidad de tiempo, mientras que el flujo es un volumen por unidad de tiempo [10].

## Sec. 2.3 Algoritmo (espacial) para determinar el contraste y procesamiento de datos.

### 2.3.1 Contraste de speckle espacial

Un mapa resuelto espacialmente de contraste local de speckle puede ser calculado a partir de una imagen de speckle mediante el cálculo de la relación de contraste  $K(T, \tau_{co})$  en cada punto en la imagen de los píxeles en una región circundante  $n \times n$ . En este punto, se debe tener cuidado en el muestreo espacial del patrón de speckle. Específicamente, el tamaño del speckle en relación con el tamaño del píxel de la cámara debe ser considerado, así como el número de píxeles que se utilizan para estimar el contraste de speckle.

El tamaño del speckle en relación con el tamaño del píxel está determinado totalmente por la apertura del sistema de imagen utilizado (en este caso la cámara). Si los speckles son más pequeños que los píxeles, ocurrirán algunos promedios y la técnica será menos eficaz. Si los speckles son más grandes que los píxeles (como se ilustra en la Fig. 2.2 a)), solamente unos cuantos speckles serán muestreados por el cuadro de píxeles y las estadísticas serán poco confiables [11].

La elección del número de píxeles sobre los cuales se va a calcular el contraste de speckle es muy importante: muy pocos píxeles y las estadísticas se verán comprometidas, demasiados píxeles y la resolución espacial será anulada. En la práctica, se emplea un cuadrado de  $7 \times 7$  o  $5 \times 5$  píxeles. Generalmente se elige un cuadrado con lados que tengan un número impar de píxeles para que el contraste calculado pueda ser asignado al píxel central [12].

En la Fig. 2.2 b) se muestra un esquema de la forma en que es calculado el contraste de speckle. El contraste en el píxel  $(i, j)$  (gris oscuro) se determina mediante el cálculo de la relación de la desviación estándar de los píxeles, en el área de píxeles de color gris pálido de  $n \times n$  por el valor medio de los píxeles en esta área.

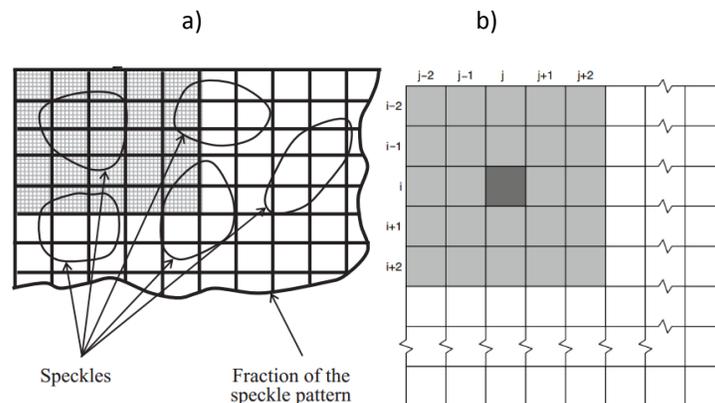


Fig. 2.2. Descripción esquemática de la forma en que es calculado el contraste de speckle.

## **Sec. 2.4 Aplicaciones de Laser Speckle Contrast Imaging.**

Debido a que Laser Speckle Contrast Imaging (LSCI) es una técnica óptica mínimamente invasiva que genera mapas de flujo sanguíneo de alta resolución, esta técnica ha sido utilizada por un gran número de aplicaciones de imagen de flujo sanguíneo en los tejidos, tales como la retina, piel y cerebro. Estos tejidos son particularmente muy adecuados para LSCI, ya que la microvasculatura de interés es generalmente superficial. Esta técnica no es capaz de detectar flujo sanguíneo en tejidos profundos. Uno de los primeros usos de formación de imágenes de speckle fue en la retina, donde la vasculatura y el flujo sanguíneo de interés son accesibles. Recientemente, LSCI se ha convertido en uno de los métodos más utilizados para la formación de imágenes “in vivo” de flujo sanguíneo en el cerebro, sobre todo en pequeñas especies de animales de ambos cerebro normal y enfermo. La formación de imágenes del flujo sanguíneo cerebral con LSCI, generalmente requiere del adelgazamiento o la eliminación de una porción del cráneo para acceder a la corteza. A continuación se mencionan algunas de las aplicaciones de LSCI [10].

### **- Perfusión de la piel.**

El monitoreo de campo completo en perfusión de la piel fue uno de los primeros usos de LSCI. Inicialmente, la piel fue una muestra de ensayo conveniente “in vivo”. Sin embargo, obtener imágenes de perfusión de la piel es complicado debido al hecho de que la mayoría de la vasculatura está contenida debajo de una capa de tejido que tiene pocos vasos sanguíneos. Por lo tanto, es difícil monitorear el flujo sanguíneo en los vasos individuales en la piel, a pesar de que LSCI sea capaz de cuantificar la perfusión global en la red capilar. Recientemente, en algunos artículos publicados como “Laser speckle imaging for monitoring blood flow dynamics in the in vivo rodent dorsal skin fold model” [13] y “Linear response range characterization and in vivo application of laser speckle imaging of blood flow dynamics” [14] han demostrado que LSCI puede ser utilizado en conjunto con la terapia láser durante el tratamiento de la mancha de vino de Oporto (PWS) de sus siglas en inglés. Por lo tanto, LSCI tiene el potencial de proporcionar información en tiempo real durante el tratamiento PWS, indicando la distribución espacial de perfusión en la piel antes y después de la terapia láser, como se ilustra en la Fig. 2.3 [15].

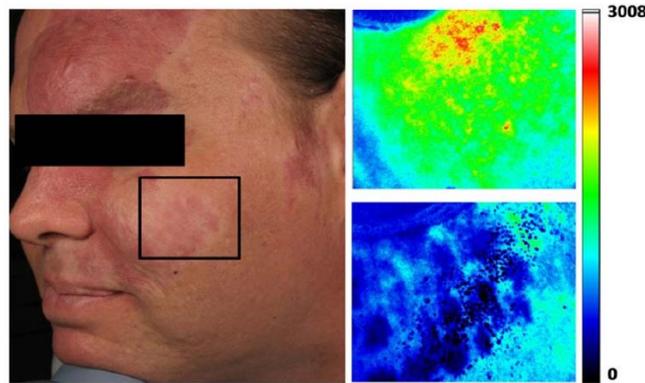


Fig. 2.3. Ejemplo de LSCI para monitorizar el tratamiento PWS. Izquierda: Fotografía del paciente con SPW en el área indicada por el rectángulo. Derecha: Imágenes adquiridas mediante LSCI antes (imagen superior) y 15 minutos después (imagen inferior) de la terapia laser. Figura proporcionada por Bernard Choi.

#### - **Flujo sanguíneo en la retina.**

Otra de las primeras aplicaciones de LSCI fue la visualización y cuantificación de flujo sanguíneo en la retina, tanto en animales como en humanos. Dado que la retina es accesible y el flujo sanguíneo es un indicador importante en diversas condiciones oftalmológicas, se han desarrollado métodos de formación de imagen de flujo sanguíneo para el ojo. La formación de imágenes de flujo sanguíneo en la retina (basado en el Speckle), han sido realizadas con diodos láser, así como con láseres de iones de argón que se acoplan en cámaras de fondo. Las aplicaciones en la retina han incluido análisis de los efectos de un amplio rango de agentes farmacológicos en el flujo sanguíneo así como análisis de flujo alrededor de la cabeza del nervio óptico. A pesar del gran número de publicaciones acerca del uso de técnicas de speckle para medir flujo sanguíneo en la retina, sin embargo, se han reportado muy pocas imágenes de flujo sanguíneo de la retina en humanos. La mayoría de los estudios han reportado valores de flujo promedio que son calculados a partir de imágenes que no muestran mapas espaciales de flujo sanguíneo. El estudio realizado por Isono (publicado en su artículo "Observation of choroidal circulation using index of erythrocytic velocity,") es una de las pocas publicaciones que muestran mapas de flujo espacial en la retina humana (Fig. 2.4), y estos mapas fueron generados mediante la unión de imágenes de zonas adyacentes para crear una imagen compuesta que abarca un área de  $3 \text{ mm}^2$  de retina [16].

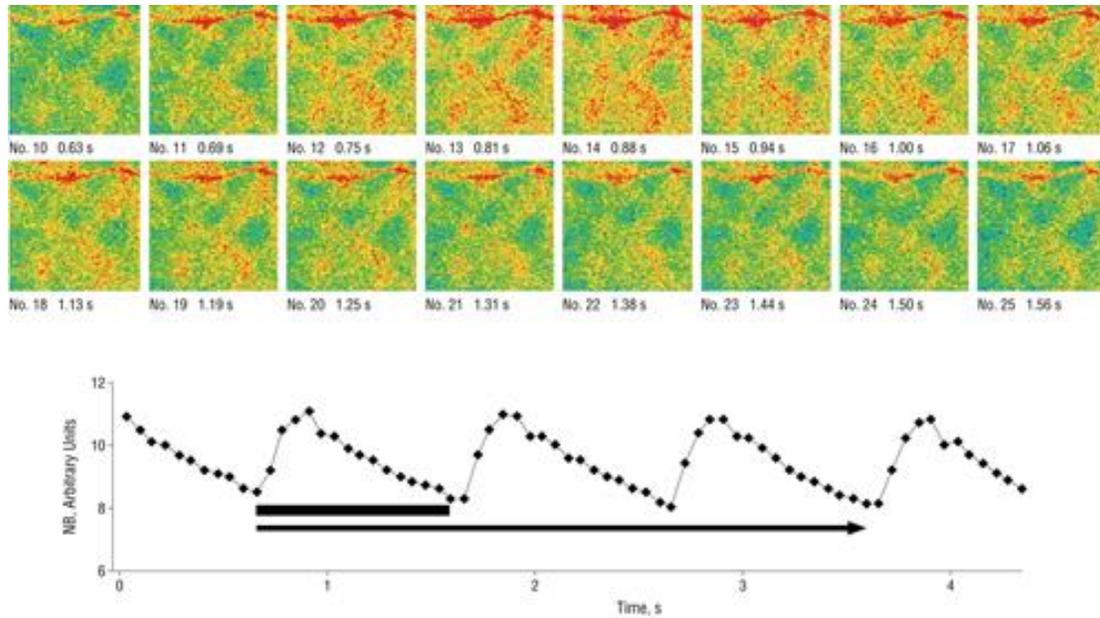


Fig. 2.4. A) Serie de mapas de contraste de la retina de un hombre de 39 años de edad (ojo derecho, -1.5 dioptrías). La imagen del mapa de contraste cambió cada dieciseisavo de un segundo. B) Gráfico mostrando que el valor medio de contraste de cada mapa original fluctúa en sincronía con el ritmo cardíaco.

En la Fig. 2.6 B) la tasa de cambio del corazón del participante es de 60 latidos/min, 1 segundo (barra) corresponde a un latido, el cual incluye 16 mapas de contraste. La flecha indica los 48 mapas de contraste durante tres pulsos.

Para generar estos mapas de contraste, se utilizó un diodo láser (con una longitud de onda de 830 nm) que iluminó el fondo ocular. La luz esparcida desde el tejido ocular genera un patrón de speckle sobre el plano donde el área del sensor es enfocado. La luz esparcida por los eritrocitos en movimiento genera blurring en el patrón de speckle. La velocidad relativa de los eritrocitos es calculada a partir de las variaciones en el blurring. El área del sensor con 100 X 100 pixeles detecta el valor de contraste en un área de  $1.5\text{mm}^2$  del fondo ocular. El valor de contraste es calculado 16 veces en un segundo.

### Aplicaciones en cerebro.

En la mayoría de aplicaciones en el cerebro, una porción del cráneo es adelgazado o removido y se aplica una solución salina o aceite mineral sobre la superficie para mejorar la calidad de la imagen, minimizando los efectos de los elementos de esparcimiento estáticos. La mayoría de las aplicaciones en el cerebro cuantifican los cambios en el contraste de speckle sobre cada píxel como un indicador del flujo sanguíneo cerebral relativo. A continuación se muestra una aplicación de este enfoque para el cerebro.

## - Activación funcional del cerebro

Un ejemplo de la capacidad de LSCI para monitorear cambios espaciotemporales en flujo sanguíneo cerebral se muestra en la Fig. 2.5. Una área de  $5 \times 5 \text{ mm}^2$  de corteza somatosensorial fue fotografiada en una rata a través de un cráneo adelgazado, donde la pata delantera de la rata fue estimulada con pulsos eléctricos. Los estímulos fueron aplicados durante 10 segundos (0.5 mA) y se realizaron 20 ensayos repetidos. Las imágenes de contraste de speckle en cada instante, en relación con los estímulos se promediaron. Los valores de contraste de speckle fueron transformados a tiempos de correlación de speckle  $\tau_{co}$  sobre cada pixel en todas las imágenes y la ecuación 2.24 fue empleada como una medida del cambio en el flujo sanguíneo cerebral. La Fig. 2.5 destaca la fuerza de LSCI al mostrar la dinámica espacial y temporal de flujo sanguíneo. Una serie de imágenes son mostradas en intervalos de 0.5 segundos, y se ilustra un incremento localizado en el flujo sanguíneo cerebral comenzando aproximadamente 1 segundo después del inicio de la estimulación. Los cambios relativos en flujo sanguíneo cerebral [17].

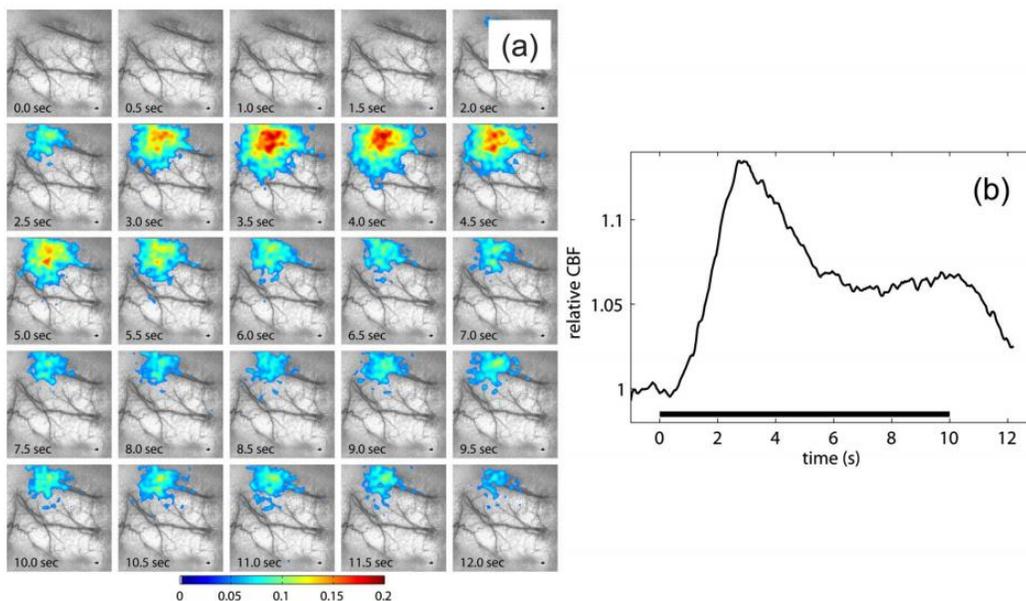


Fig. 2.5 Imágenes de cambios de flujo sanguíneo cerebral debido a estímulos inducidos. (a) secuencia de imágenes que muestran los cambios de porcentaje en flujo sanguíneo en respuesta a 10 segundos de estimulación en la pata delantera de la rata. (b) grafica que ilustra el cambio de porcentaje en flujo sanguíneo en una región de interés centrada en el área activada.

El curso temporal de los cambios de flujo sanguíneo, promediados en una región de interés centrada en el área activada, ilustra un incremento en el pico del flujo sanguíneo cerebral de aproximadamente del 12% ocurriendo 3 segundos después del inicio de la estimulación. El pico inicial en el flujo sanguíneo cerebral entonces decrece

aproximadamente a la mitad de su amplitud máxima a un valor del 6% donde se mantiene hasta el final del estímulo.

### Capítulo 3. Tiempo muerto en intensidad integrada.

La teoría de Laser Speckle Contrast Imaging (LSCI) descrita en el capítulo 2 ha considerado el caso de fotodetección ideal. Desafortunadamente los detectores ópticos nunca son ideales y a estos les lleva un cierto tiempo interactuar con los fotones incidentes. Una vez que el detector detectó un fotón, existe un cierto periodo de tiempo durante el cual el detector permanecerá inactivo e insensible a la radiación que incide sobre él, de tal modo que se pierde información y entonces es necesario tomar en cuenta el tiempo que le llevó al detector recuperarse para poder nuevamente seguir registrando la radiación incidente. Este periodo durante el cual el detector permanece inactivo se conoce como tiempo muerto  $\tau_d$ . Tal efecto ha sido discutido en diversos artículos desde diferentes campos científicos, como por ejemplo en física de partículas [18], [19], [20], en comunicaciones ópticas [21], [22], [23] o en algunos experimentos de análisis de espectroscopia de fluorescencia [24], [25], [26].

Por lo tanto, es necesario analizar la influencia que tiene el tiempo muerto de los detectores en la teoría de LSCI para poder interpretar adecuadamente los datos experimentales. De esta manera, podemos determinar el efecto resultante en la medición de la velocidad de las células sanguíneas y en la obtención de mapas de flujo sanguíneo para el caso de fotodetección no ideal. Así, podemos obtener las diferencias que existen entre el modelo ideal y el no ideal.

En este capítulo extendemos la teoría de Laser Speckle Contrast Imaging (LSCI) tomando en cuenta el efecto del tiempo muerto  $\tau_d$  en la ecuación de contraste  $K(T, \tau_{co})$ . Aquí, hacemos una analogía con el modelo teórico desarrollado en la referencia [24]. En [24], los autores determinan la varianza de la intensidad de fluorescencia. A partir de la varianza obtienen los tiempos de correlación rotacional de las moléculas de fluoresceína. Como se puede ver, el modelo que se sigue en [24] es análogo al que nosotros analizamos en el capítulo 2 de esta tesis, con la diferencia de que en [24] emplean el análisis de varianza en medición de fluorescencia y nosotros lo empleamos para analizar contraste de speckle.

Los autores de [24] proponen que el efecto del tiempo muerto de un detector es descrito mediante la siguiente expresión:

$$\frac{\tau_d}{T} = 1 - \delta$$

donde  $\delta$  es el tiempo efectivo del detector. Posteriormente, incluyen esta expresión en su análisis de varianza de intensidades y de esta manera obtienen una expresión resultante

(ecuación 14 en [24]), es decir, obtienen una nueva expresión para la varianza de intensidades en el que la fotodetección no es ideal. Finalmente, cuando grafican (14) con un tiempo muerto de  $\tau_d = 0.01T$ , es decir,  $\tau_d$  equivale al 1% del tiempo de integración, los autores muestran que la curva de la varianza de intensidades (fotodetección no ideal) decae aproximadamente un orden de magnitud.

De igual manera, como veremos en la siguiente sección, nosotros tomamos la ecuación que describe el tiempo muerto de un detector y la introducimos en la teoría de laser speckle Imaging. Así, obtenemos un modelo más general y completo que nos permite analizar el cambio que produce en los resultados de contraste.

### Sec. 3.1 Tiempo muerto y su influencia en la varianza de intensidad integrada.

Durante un proceso de detección, cuando un campo electromagnético está incidiendo sobre una fotosuperficie pueden surgir un conjunto de eventos tales como: (1) la absorción de un cuanto de energía de luz (es decir, un fotón) y la transferencia de aquella energía a un electrón excitado, (2) el transporte del electrón excitado a la superficie. A la liberación de aquel electrón desde la fotosuperficie se le conoce como un fotoevento. La mayor parte de la teoría descrita en la literatura considera el caso de fotodetección ideal y se asume que las emisiones fotoeléctricas en un fotodetector son estadísticamente independientes de las demás. Sin embargo, en la práctica esta condición no se satisface estrictamente [26]. La mayoría de los detectores requieren de algún tiempo característico llamado tiempo de recuperación o tiempo muerto  $\tau_d$  después de cada registro de un conteo durante el cual el detector no responde a cualquier campo externo, es decir, durante el cual ninguna otra fotoemisión puede ser registrada. Consecuentemente el número de eventos registrados durante un intervalo de tiempo T será más pequeño para un detector real a comparación de un detector ideal como lo considera la teoría.

El tiempo muerto de un detector se define como el intervalo de tiempo mínimo que dos conteos consecutivos deben estar separados con el fin de ser registrados como dos eventos diferentes [18].

Después de la detección de un fotón, el detector permanecerá insensible a la radiación incidente debido al tiempo muerto. Por simplicidad se asume un tiempo muerto escalonado característico. Esto significa que el detector estará inactivo durante un tiempo  $\tau_d$  después de haber detectado un fotón, como se muestra en la fig. 3.1.

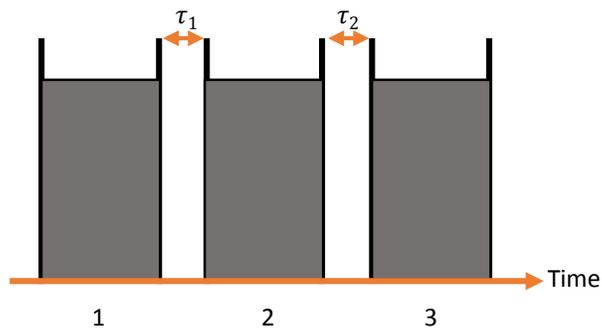


Fig. 3.1. Representación esquemática de una posible secuencia de periodos de detección (1, 2, 3,...) y tiempo de muerto ( $\tau_1, \tau_2, \tau_3, \dots$ ). Cada periodo de detección es seguido de un intervalo de tiempo muerto durante el cual el detector está inactivo

Cada periodo de detección 1, 2, 3,... es seguido por un periodo de tiempo muerto de duración  $\tau_1, \tau_2, \tau_3, \dots$  respectivamente, durante el cual el detector permanece inactivo [21].

En la referencia [24], L. Turgeman y D. Fixler obtienen una expresión analítica para el tiempo de correlación rotacional de moléculas de fluoresceína en medios con diferentes viscosidades, analizando la varianza de las señales de fluorescencia promediadas en el tiempo, donde la señal de fluorescencia es extraída a partir del primer y segundo momento de la intensidad media.

Este análisis es análogo al ya desarrollado en el capítulo 2 para el cálculo del contraste  $K = \frac{\sigma_s}{\langle I \rangle}$  (ecuación 2.1).

De acuerdo con el análisis llevado a cabo por Turgeman y Fixler, la varianza de las señales de fluorescencia resultante es

$$\langle \bar{I}(T)^2 \rangle - \langle \bar{I}(T) \rangle^2 = \frac{2}{T^2} \int_0^T (T-t) F e^{-\frac{t}{\tau_r}} dt = \frac{2F\tau_r}{T} + \frac{2F\tau_r^2}{T^2} \left( -1 + e^{-\frac{T}{\tau_r}} \right) \quad 3.1$$

Donde F es una constante de ajuste empírica correspondiente a la magnitud de la rotación de la molécula, T es el tiempo de integración,  $\tau_r$  es el tiempo de correlación rotacional y  $e^{-t/\tau_r}$  es la función de correlación de la intensidad de fluorescencia.

Debido a que los detectores nunca son ideales, Turgeman y Fixler deciden analizar la influencia del tiempo muerto en la varianza de las señales de fluorescencia resultante para poder interpretar correctamente los datos experimentales.

De este modo, los autores deciden proponer la siguiente relación matemática para describir el efecto del tiempo muerto en la varianza de intensidades:

$$\frac{\tau_d}{T} = 1 - \delta \quad 3.2$$

donde  $\tau_d$  es el tiempo muerto del detector y  $\delta$  lo nombran el tiempo relativo en el que el sistema está activo.

Turgeman y Fixler añaden la ecuación 3.2 en la ecuación 3.1, donde finalmente obtienen la siguiente relación:

$$\langle \bar{I}(T)^2 \rangle - \langle \bar{I}(T) \rangle^2 = \delta \frac{2}{T^2} \int_0^T (T-t\delta) F e^{-\frac{t\delta}{\tau_r}} dt = \frac{2F\tau_r}{T^2} \left\{ T - \tau_r + e^{-\frac{T\delta}{\tau_r}} [\tau_r + (\delta - 1)] \right\} \quad 3.3$$

Claramente se ve que cuando  $\delta = 1$ , se vuelve a recuperar la ecuación 3.1.

Los autores también muestran una gráfica de la ecuación 3.3 en la que se muestra el fuerte impacto que tiene este parámetro sobre las varianzas de las señales de fluorescencia [24], ver fig. 3.2.

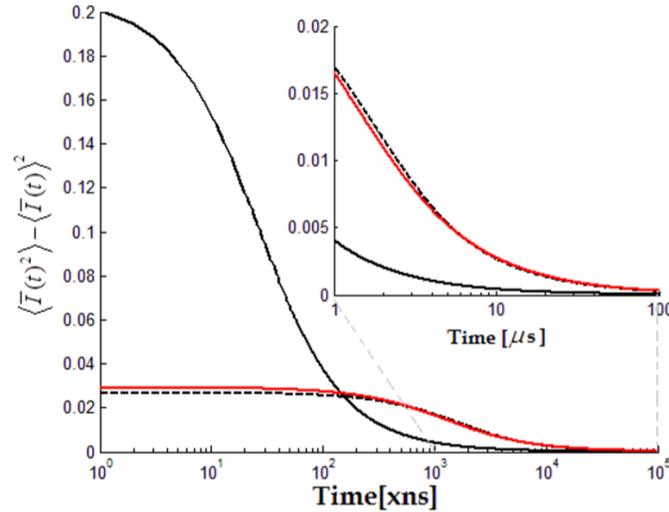


Fig. 3.2. La varianza de la intensidad promediada en el tiempo para  $\tau_r = 10$  ns (línea sólida oscura - medición ideal ( $\delta = 1$ ), línea punteada oscura -  $\tau_d/T = 1/100$ ) y para  $\tau_r = 500$  ns (línea roja sólida - medición ideal ( $\delta = 1$ )).

En la fig. 3.2 se grafica la ecuación 3.3 (varianza de la intensidad promediada en el tiempo). La línea sólida oscura representa una medición ideal para  $\tau_r = 10$  ns y  $\delta = 1$ . La línea punteada oscura representa una medición no ideal para  $\tau_r = 10$  ns y  $\tau_d/T = 1/100$  ( $\delta = 0.99$ ). La línea sólida roja representa una medición ideal para  $\tau_r = 500$  ns y  $\delta = 1$ .

Analizando la ecuación 3.2 que describe el efecto del tiempo muerto se tiene que  $\frac{\tau_d}{T} = 1 - \delta \rightarrow \tau_d = (1 - \delta)T$ , entonces para  $\delta = 0.99$  que corresponde a la línea punteada oscura de la fig. 3.2, se obtiene que  $\tau_d = (1 - 0.99)T = (0.01)T$ . Esto quiere decir que cuando  $\tau_d$  corresponde al 1% del tiempo de exposición  $T$ , la varianza de la señal de fluorescencia decae aproximadamente un orden de magnitud, es decir, desde 0.2 hasta 0.03 de acuerdo con la gráfica que los autores publicaron.

Este resultado nos lleva a pensar en el impacto que tendría el tiempo muerto  $\tau_d$  sobre las mediciones de contraste, y por tanto en los datos obtenidos de la velocidad de las células sanguíneas al introducir este parámetro en la teoría que se desarrolló en el capítulo 2.

### Sec. 3.2 Cálculo de contraste de speckle integrado bajo la influencia del tiempo muerto.

Veamos cuál es la expresión de contraste  $K$  a la que nos conduce el introducir el efecto de tiempo muerto  $\tau_d$ . Si retomamos la ecuación 2.11 del capítulo 2 y hacemos un desarrollo análogo al que propone Turgeman y Fixler,  $K^2$  es reescrita como:

$$K^2 = 2\beta\rho^2 \int_0^T \frac{\delta \left(1 - \frac{\tau\delta}{T}\right) e^{-\frac{2\tau\delta}{\tau_{co}}} d\tau}{T} + 4\beta\rho(1-\rho) \int_0^T \frac{\delta \left(1 - \frac{\tau\delta}{T}\right) e^{-\frac{\tau\delta}{\tau_{co}}} d\tau}{T} + \beta(1-\rho)^2 \quad 3.4$$

asumiendo que las velocidades de los difusores tienen una distribución lorentziana de la forma  $g_{1,f}(\tau) = e^{-\tau/\tau_{co}}$ .

Ahora, la solución para la primera integral del lado derecho de la ecuación 3.4 es:

$$\begin{aligned} & \frac{2\delta\beta\rho^2}{T} \left[ \int_0^T e^{-\frac{2\tau\delta}{\tau_{co}}} d\tau - \frac{\delta}{T} \int_0^T \tau e^{-\frac{2\tau\delta}{\tau_{co}}} d\tau \right] = \\ & = \frac{2\delta\beta\rho^2}{T} \left[ \frac{-\tau_{co}}{2\delta} e^{-\frac{2\tau\delta}{\tau_{co}}} + \frac{\tau_{co} * \tau}{2T} e^{-\frac{2\tau\delta}{\tau_{co}}} + \frac{\tau_{co}^2}{4T\delta} e^{-\frac{2\tau\delta}{\tau_{co}}} \right] \Big|_0^T = \\ & = \frac{\beta\rho^2\tau_{co}}{T} \left[ 1 - \frac{\tau_{co}}{2T} + e^{-\frac{2T\delta}{\tau_{co}}} \left[ \frac{\tau_{co}}{2T} + (\delta - 1) \right] \right] \quad 3.4 a \end{aligned}$$

La solución para la segunda integral del lado derecho de la ecuación 3.4 es:

$$\begin{aligned} & \frac{4\beta\rho(1-\rho)\delta}{T} \left[ \int_0^T e^{-\frac{\tau\delta}{\tau_{co}}} d\tau - \frac{\delta}{T} \int_0^T \tau e^{-\frac{\tau\delta}{\tau_{co}}} d\tau \right] = \\ & = \frac{4\beta\rho(1-\rho)\delta}{T} \left[ \frac{-\tau_{co}}{\delta} e^{-\frac{\tau\delta}{\tau_{co}}} + \frac{\tau_{co} * \tau}{T} e^{-\frac{\tau\delta}{\tau_{co}}} + \frac{\tau_{co}^2}{T\delta} e^{-\frac{\tau\delta}{\tau_{co}}} \right] \Big|_0^T = \\ & = \frac{4\beta\rho(1-\rho)\tau_{co}}{T} \left[ 1 - \frac{\tau_{co}}{T} + e^{-\frac{T\delta}{\tau_{co}}} \left[ \frac{\tau_{co}}{T} + (\delta - 1) \right] \right] \quad 3.4 b \end{aligned}$$

Finalmente  $K^2$  tiene la forma:

$$K^2 = \rho^2 \beta \left[ \frac{2x - 1 + e^{-2\delta x} [1 + 2x(\delta - 1)]}{2x^2} \right] + 4\beta\rho(1 - \rho) \left[ \frac{x - 1 + e^{-\delta x} [1 + x(\delta - 1)]}{x^2} \right] + \beta(1 - \rho)^2 \quad 3.5$$

Por lo tanto el contraste de speckle queda reescrito de la siguiente forma:

$$K(T, \tau_d) = \left\{ \rho^2 \beta \left[ \frac{2x - 1 + e^{-2\delta x} [1 + 2x(\delta - 1)]}{2x^2} \right] + 4\beta\rho(1 - \rho) \left[ \frac{x - 1 + e^{-\delta x} [1 + x(\delta - 1)]}{x^2} \right] + \beta(1 - \rho)^2 \right\}^{1/2} \quad 3.6$$

Claramente se ve que cuando  $\delta = 1$ , se vuelve a recuperar la ecuación 2.13.

## Capítulo 4. Análisis y discusión de resultados.

En el capítulo 3 se reformuló la ecuación de contraste 2.13

$$K(T, \tau_{co}) = \left\{ \beta \rho^2 \frac{e^{-2x} - 1 + 2x}{2x^2} + 4\beta \rho(1 - \rho) \frac{e^{-x} - 1 + x}{x^2} + \beta(1 - \rho)^2 \right\}^{1/2} \quad 2.13$$

donde se siguió un desarrollo análogo al propuesto por Turgeman et al. [24] considerando el efecto del tiempo muerto del detector. La expresión resultante para el contraste de speckle fue:

$$K(T, \tau_d) = \left\{ \rho^2 \beta \left[ \frac{2x - 1 + e^{-2\delta x} [1 + 2x(\delta - 1)]}{2x^2} \right] + 4\beta \rho(1 - \rho) \left[ \frac{x - 1 + e^{-\delta x} [1 + x(\delta - 1)]}{x^2} \right] + \beta(1 - \rho)^2 \right\}^{1/2} \quad 3.6$$

donde  $x = \frac{T}{\tau_{co}}$  y  $\rho = \frac{I_f}{I_f + I_s}$  es la fracción de la luz total que es esparcida dinámicamente,  $\tau_{co}$  es el tiempo de correlación de los speckles y  $\beta \leq 1$  depende del tamaño relativo entre la mota de speckle y el área del pixel.

A continuación, se presentan gráficas de la ecuación de contraste  $K(T, \tau_d)$  3.6 y se determina el efecto del tiempo muerto  $\tau_d$  sobre el contraste de speckle.

En la figura 4.1 se muestran las gráficas que resultan de la ecuación 3.6 para un detector real ( $0 < \delta < 1$ ) comparado con un detector ideal ( $\delta = 1$ ), donde  $K(x, \delta = 1)$  es el contraste para un detector ideal y  $K(x, \delta)$  es el contraste para un detector real, donde  $\delta$  está dado por la ecuación 3.2

$$\frac{\tau_d}{T} = 1 - \delta \quad 3.2.$$

Dos valores diferentes de  $\delta$  fueron empleados: 0.95 y 0.9, que corresponden a tiempos muertos de 5% y 10% del tiempo de exposición  $T$  respectivamente.

En la figura 4.1 a) se grafica  $K$  vs  $x$  para vasos sanguíneos superficiales ( $\rho = 1$ ), es decir, la luz esparcida por la muestra es completamente dinámica ya que  $I_s = 0$ . Además, se toma un tiempo de correlación del orden de  $\tau_{co} = 62.75 \mu s$  reportado por Parthasarathy et al. [6]. Debido a que la muestra es completamente dinámica ( $\rho = 1$ ), los últimos dos términos del lado derecho de la ecuación 3.6 son cero. Además, cuando  $T \gg \tau_{co}$  el primer término del lado derecho de 3.6 tiende a cero. Por lo tanto el contraste de speckle decae a cero, lo cual es consistente con la figura 4.1 a).

En la figura 4.1 b) se grafica  $K$  vs  $x$  para vasos sanguíneos profundos ( $\rho = 0.5$ ), es decir, una fracción de la luz esparcida es estática y nuevamente se toma un tiempo de correlación del orden de  $\tau_{co} = 62.75 \mu s$  [6]. Se observa que, a diferencia de la figura 4.1

a), el valor del contraste de speckle no decae a cero, esto se debe a que una fracción de la luz total esparcida proviene del medio esparcidor estático, así el último término del lado derecho de la ecuación 3.6 es diferente de cero.

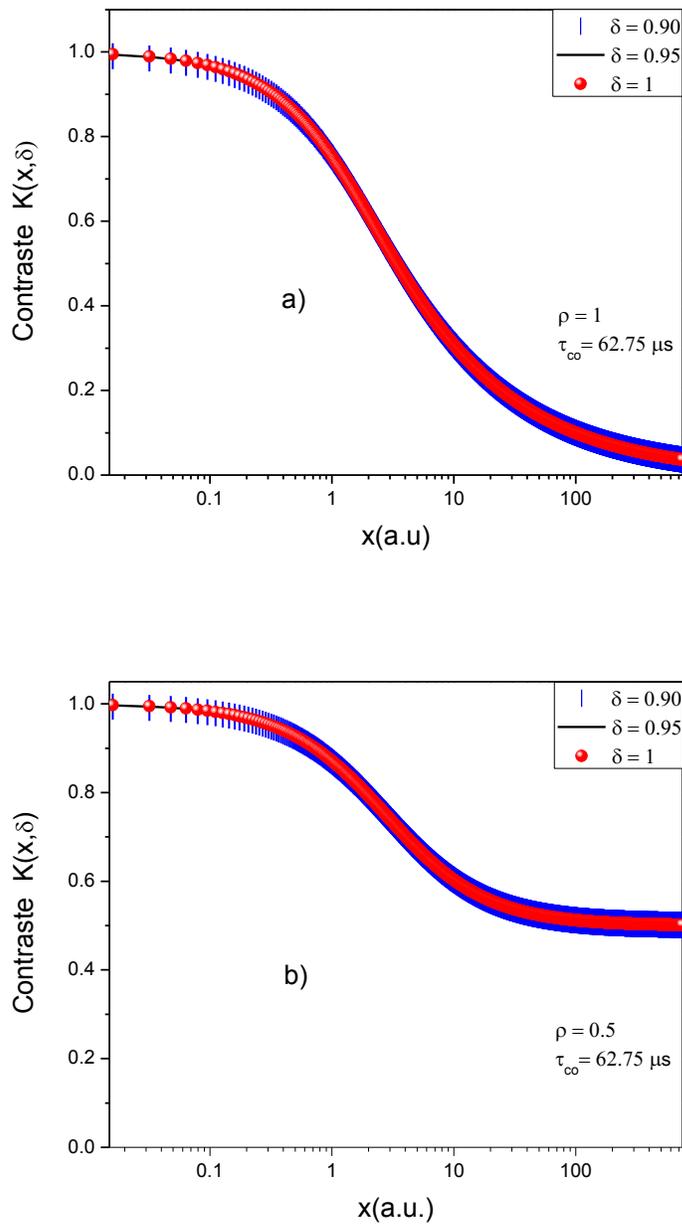


Fig. 4.1. Contraste de speckle para diferentes valores de  $\delta$  con a)  $\rho = 1$  para vaso sanguíneo superficial y b)  $\rho = 0.5$  para vaso sanguíneo profundo.

De la figura 4.1 se observa que no hay cambio significativo en las curvas de contraste de speckle entre un detector real y uno ideal. En ambas figuras se tomaron valores de tiempo muerto  $\tau_d$  del orden del 5% y 10% del tiempo de exposición  $T$ .

Más adelante se calcula la diferencia de contraste entre una medición real y una ideal para calcular de manera cuantitativa el efecto que produce el tiempo muerto de un detector sobre los valores de contraste.

En la figura 4.2 se muestran las gráficas que resultan de la ecuación 3.6 para un detector real ( $\delta = 0.95$ ) correspondiente a un tiempo muerto de 5% del tiempo de exposición  $T$  del detector.

$$K(T, \tau_d) = \left\{ \rho^2 \beta \left[ \frac{2x - 1 + e^{-2\delta x} [1 + 2x(\delta - 1)]}{2x^2} \right] + 4\beta\rho(1 - \rho) \left[ \frac{x - 1 + e^{-\delta x} [1 + x(\delta - 1)]}{x^2} \right] + \beta(1 - \rho)^2 \right\}^{1/2} \quad 3.6$$

En la figura 4.2 a) se grafica  $K$  vs  $T$  para vasos sanguíneos superficiales ( $\rho = 1$ ), es decir, la luz esparcida por la muestra es completamente dinámica.

En la figura 4.2 b) se grafica  $K$  vs  $T$  para vasos sanguíneos profundos ( $\rho = 0.5$ ), es decir, una fracción de la luz esparcida es estática.

En ambas figuras se tomaron diferentes tiempos de correlación  $\tau_{co}$  reportados por Parthasarathy et al. [6]. Cada curva de contraste se graficó con un tiempo de correlación diferente. A saber, la curva de puntos rojos corresponde a un tiempo de correlación de  $62.75 \mu s$ , la curva negra continua corresponde a un tiempo de correlación de  $74.67 \mu s$  y la curva con barras azules corresponde a un tiempo de correlación  $295.79 \mu s$ .

Debido a que la muestra es completamente dinámica ( $\rho = 1$ ), los últimos dos términos del lado derecho de la ecuación 3.6 son cero. Además, cuando  $T \gg \tau_{co}$  el primer término del lado derecho de 3.6 tiende a cero. Por lo tanto el contraste de speckle decae a cero, lo cual es consistente con la figura 4.2 a).

De estas gráficas, también se observa que cuando el tiempo de correlación es mayor, los valores de contraste de speckle son mayores. Esto se puede explicar de la siguiente manera: como el tiempo de correlación  $\tau_{co}$  es inversamente proporcional a la velocidad del medio esparcido ( $\tau_{co} \propto 1/v$ ), cuanto mayor sea el tiempo de correlación, menor será la velocidad del medio (y viceversa). Así, las fluctuaciones de la luz esparcida por el medio y el patrón de speckle que se forma sobre el detector serán bajas y el difuminado o blurring de la imagen también será bajo. Como se mencionó en el capítulo 2, un contraste de speckle cercano a 1 indica que el blurring de la imagen es bajo y por lo tanto, el medio casi no se mueve; mientras que un contraste de speckle cercano a 0 significa que el medio se está moviendo suficientemente rápido y el speckle se vuelve borroso. Por lo tanto, para

tiempos de correlación grandes, el contraste de speckle será mayor y viceversa, lo cual es consistente con la figura 4.2.

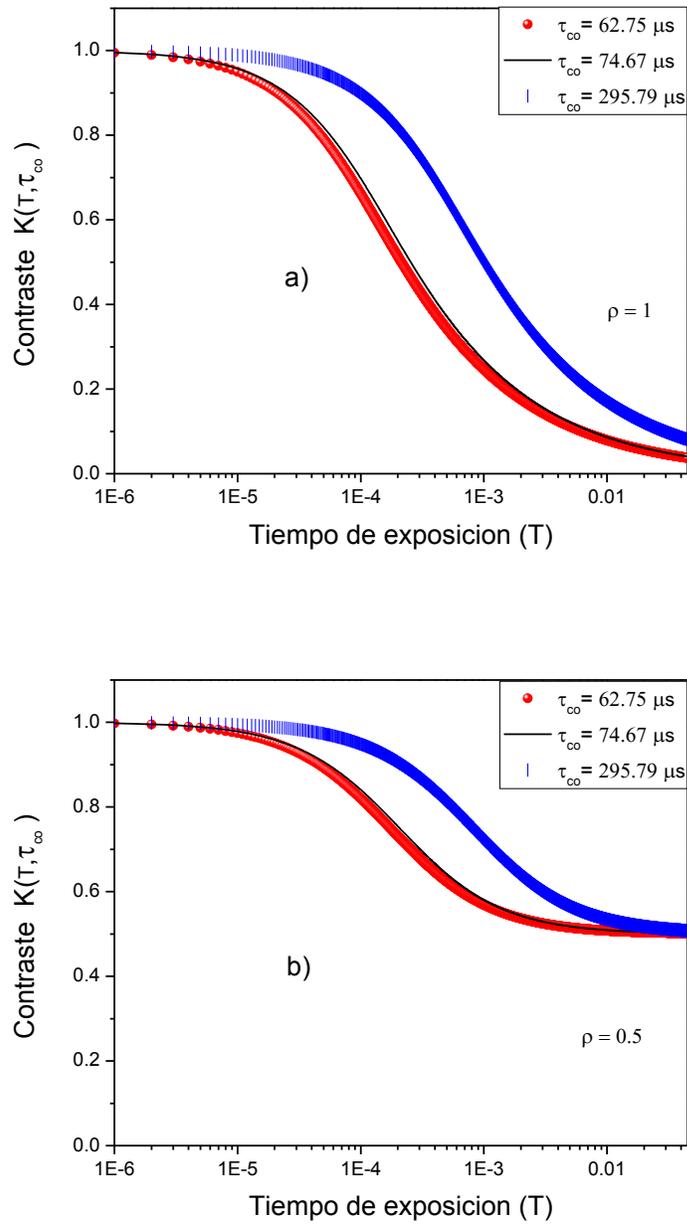


Fig. 4.2. Contraste de speckle para  $\delta = 0.95$  con diferentes tiempos de correlación  $\tau_{co}$  con a)  $\rho = 1$  para un vaso sanguíneo superficial y b)  $\rho = 0.5$  para un vaso sanguíneo profundo.

En la figura 4.3 se graficó el porcentaje de error ( $EP$ ) del contraste de speckle obtenido para un detector real ( $0 < \delta < 1$ ) comparado con un detector ideal ( $\delta = 1$ ) dado mediante:

$$EP = \frac{K(x,\delta=1)-K(x,\delta)}{K(x,\delta=1)} \times 100 \quad 4.1$$

donde  $K(x, \delta = 1)$  es el contraste para el detector ideal ( $\tau_d = 0$ ) y  $K(x, \delta)$  es el contraste para un detector real, donde  $\delta$  está dado por la ecuación 3.2.

$$\frac{\tau_d}{T} = 1 - \delta \quad 3.2.$$

Dos valores diferente de  $\delta$  fueron empleados: 0.95 y 0.9, el cual corresponde a tiempos muertos de 5% y 10% del tiempo de exposición  $T$  del detector respectivamente.

La figura 4.3 a) muestra el  $EP$  vs  $x$  para vasos sanguíneos superficiales  $\rho = 1$ , es decir, toda la luz es esparcida dinámicamente por los vasos sanguíneos y por lo tanto el segundo y tercer término de la ecuación 3.6 decaen a cero.

$$K(T, \tau_d) = \left\{ \rho^2 \beta \left[ \frac{2x - 1 + e^{-2\delta x} [1 + 2x(\delta - 1)]}{2x^2} \right] + 4\beta\rho(1 - \rho) \left[ \frac{x - 1 + e^{-\delta x} [1 + x(\delta - 1)]}{x^2} \right] + \beta(1 - \rho)^2 \right\}^{1/2} \quad 3.6$$

En la figura 4.3 b) se muestran los resultados correspondientes para vasos sanguíneos profundos  $\rho = 0.5$ , esta vez el 50% de la luz que llega al fotodetector es esparcida dinámicamente por el vaso sanguíneo y el otro 50% es esparcida estáticamente por el tejido.

En ambos casos podemos observar que en el régimen de corta exposición ( $x \leq 1$ ) el error del contraste obtenido con un fotodetector real comparado con uno ideal es menor al 0.5% y para un régimen de larga exposición ( $x > 1$ ) el error decae rápidamente a cero. Aquí, es importante recordar que la mayor parte de los experimentos de LSCI se desarrollan en el régimen de larga exposición [27].

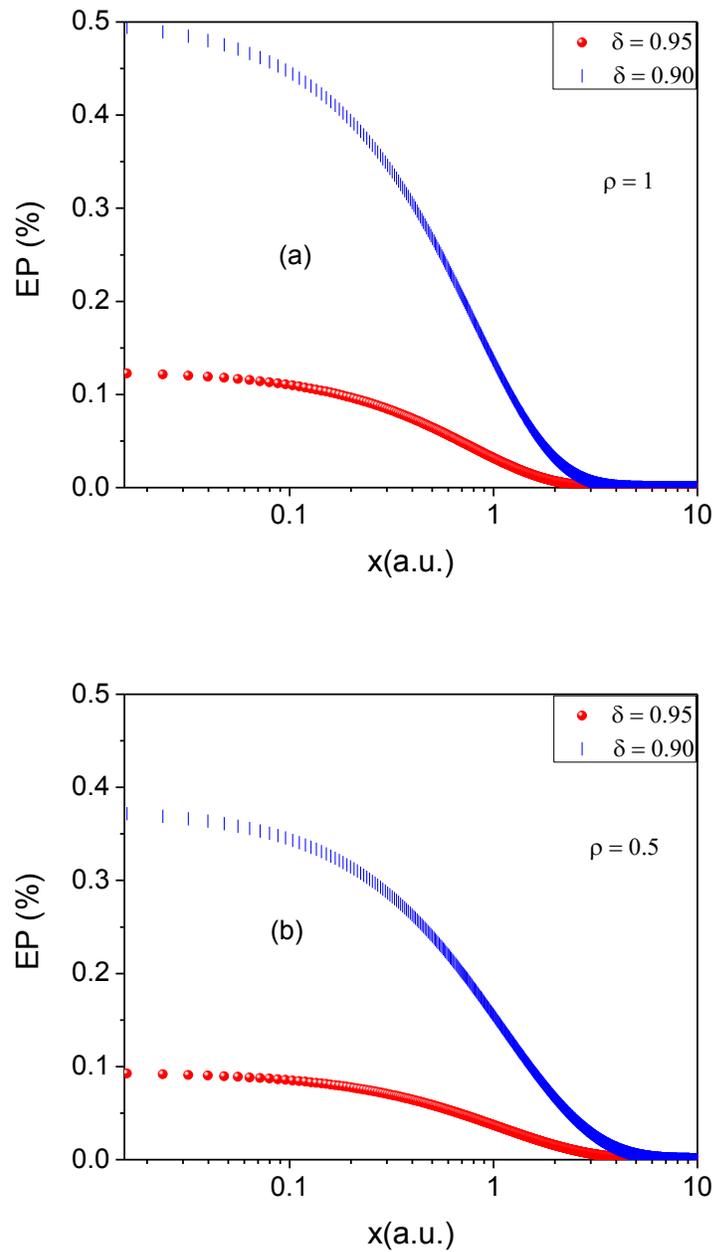


Fig. 4.3. EP como función del número de intervalos coherentes capturados mediante el fotodetector para un 5% de tiempo muerto (línea roja punteada) y 10 % de tiempo muerto (línea azul continua), para a)  $\rho = 1$ , es decir, vasos sanguíneos superficiales, y b)  $\rho = 0.5$ , es decir, vasos sanguíneos profundos. En cualquier caso el EP fue menor al 0.5% bajo las condiciones descritas en este trabajo.

## Capítulo 5. Conclusiones generales.

Se extendió el modelo teórico de Laser Speckle Contrast Imaging (LSCI) introduciendo el tiempo muerto de un detector  $\tau_d$  dentro de la ecuación de contraste 2.13. De esta manera se obtuvo una expresión más completa para el contraste de speckle, ecuación 3.6, la cual aporta información más precisa y detallada del comportamiento de la muestra.

Siguiendo a Turgeman y Fixler [24], se incorporó  $\tau_d$  en la teoría LSCI y encontramos que dado que  $\tau_d$  es del orden de nanosegundos [24],  $\tau_{co}$  está en el orden de decenas o cientos de microsegundos [6] y  $T$  en el orden del milisegundos [27], el efecto de  $\tau_d$  es despreciable en el cálculo de contraste de luz dispersada dinámicamente para la medición de flujo sanguíneo.

A partir de la figura 4.3 se demuestra que en el régimen de corta exposición ( $x \leq 1$ ) el error del contraste obtenido con un fotodetector real comparado con uno ideal es menor al 0.5% y para un régimen de larga exposición ( $x > 1$ ) el error decae rápidamente a cero.

La introducción del tiempo muerto  $\tau_d$  en la ecuación de contraste 2.13  $K(T, \tau_{co})$  y su desarrollo, se basó en el análisis teórico mostrado por Turgeman y Fixler [24], en donde muestran (ver figura 3.2) que cuando  $\tau_d = 0.01T$  correspondiente al 1% del tiempo de exposición  $T$ , la varianza de las intensidades decae un 90% con respecto a la señal para una detección ideal.

## Bibliografía:

### Introducción

- [1] Bahaa E. A. Saleh, Malvin Carl Teich, *Fundamentals of photonics* (John Wiley & Sons, 1991).
- [2] Leonard Mandel, Emil Wolf, *Optical Coherence and Quantum Optics* (Cambridge University Press, 1995).
- [3] J. W. Goodman, *Statistical Optics*(John Wiley & Sons, 1985).
- [4] A. Fercher and J. Briers, "Flow visualization by means of single-exposure speckle photography," *Opt. Commun.* **37**, 326–330 (1981).
- [5] ANDREW K. DUNN, *Laser Speckle Contrast Imaging of Cerebral Blood Flow* (*Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 40, No. 2, February 2012)
- [6] A. B. Parthasarathy, W. J. Tom, A. Gopal, X. Zhang, and A. K. Dunn, "Robust flow measurement with multi-exposure speckle imaging," *Opt. Express* **16**, 1975–1989 (2008).
- [7] R. Bandyopadhyay, A. Gittings, S. Suh, P. Dixon, and D. Durian, "Speckle-visibility spectroscopy: A tool to study time-varying dynamics," *Rev. Sci. Instrum.* **76**, 093110 (2005).
- [8] P. Lemieux and D. Durian, "Investigating non-Gaussian scattering processes by using n-th order intensity correlation functions," *J. Opt. Soc. Am. A* **16**, 1651–1664 (1999).
- [9] D. A. Boas, "Diffuse photon probes of structural and dynamical properties of turbid media: theory and biomedical applications," Ph.D. dissertation (Department of Physics and Astronomy, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pa., 1996).
- [10] Boas D A and Dunn A K 2010 Laser speckle contrast imaging in biomedical optics *J. Biomed. Opt.* **15** 011109.
- [11] Briers JD (2007) Laser speckle contrast imaging for measuring blood flow. *Opt Appl XXXVII*: 139–152.
- [12] Draijer, M., et al., 2009. Review of laser speckle contrast techniques for visualizing tissue perfusion. *Lasers Med. Sci.* **24**, 639–651.
- [13] "Laser speckle imaging for monitoring blood flow dynamics in the in vivo rodent dorsal skin fold model," *Microvasc. Res.* **68**, 143–146 2004.
- [14] B. Choi, J. C. Ramirez-San-Juan, J. Lotfi, and J. Stuart Nelson, "Linear response range characterization and in vivo application of laser speckle imaging of blood flow dynamics," *J. Biomed. Opt.* **11**, 0411292006.
- [15] Y. C. Huang, T. L. Ringold, J. S. Nelson, and B. Choi, "Noninvasive blood flow imaging for real-time feedback during laser therapy of port wine stain birthmarks," *Lasers Surg. Med.* **40**, 167–173 2008.
- [16] H. Isono, S. Kishi, Y. Kimura, N. Hagiwara, N. Konishi, and H. Fujii, "Observation of choroidal circulation using index of erythrocytic velocity," *Arch. Ophthalmol. (Chicago)* **121**, 225–231 2003.

- [17] A. Dunn, A. Devor, A. Dale, and D. Boas, "Spatial extent of oxygen metabolism and hemodynamic changes during functional activation of the rat somatosensory cortex," *NeuroImage* 27, 279–290 (2005).
- [18] V. Bécares and J. Blázquez, Detector dead time determination and optimal counting rate for a detector near a spallation source or a subcritical multiplying system, *Science and Technology of Nuclear Installations*, Volume 2012.
- [19] S.M. Karabıdak, U. Cevik, S. Kaya, A new method to compensate for counting losses due to system dead time. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* 603 (2009) Elsevier.
- [20] Lénárd Pál, Imre Pázsit, On some problems in the counting statistics of nuclear particles Investigation of the dead time problems. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* 693 (2012) Elsevier
- [21] Höbel, M., and J. Ricka. 1994. Dead-time and afterpulsing correction in multiphoton timing with non-ideal detectors. *Rev. Sci. Instrum.* 65:2326– 2336.
- [22] Bedard, G. 1967. Dead-time corrections to the statistical distributions of photoelectrons. *Proc. Phys. Soc.* 90:131–141.
- [23] Teich, M. C., and G. Vannucci. 1978. Observation of dead-time modified photocounting distributions for modulated laser radiation. *J. Opt. Soc. Am.* 68:1338–1342
- [24] Lior Turgeman and Dror Fixler, Time-averaged fluorescence intensity analysis in fluorescence fluctuation polarization sensitive experiments, *Biomedical Optics Express* 4(6): 868–884 (2013).
- [25] L. N. Hillesheim and J. D. Müller, "The photon counting histogram in fluorescence fluctuation spectroscopy with non-ideal photodetectors," *Biophys. J.* 85(3), 1948–1958 (2003).
- [26] H. Z. Cummins and E. R. Pike, *Photon correlation and light beating spectroscopy*, Plenum Press, 1974.
- [27] J.C. Ramirez-San-Juan, "Impact of velocity distribution assumption on simplified laser speckle imaging equation"; *Opt. Express* 16, 3197-3203 (2008).
- [28] J. Ohtsubo and T. Asakura, "Velocity measurement of a diffuse object by using time-varying speckles", *Opt. Quant. Electron.* 8, 523-529, 1976.
- [29] S. J. Kirkpatrick, D. D. Duncan, and E. M. Wells-Gray, "Detrimental effects of speckle-pixel size matching in laser speckle contrast imaging," *Opt. Lett.* 33, 2886–2888 (2008).
- [30] J. C. Ramirez-San-Juan, R Ramos-Garcia, G. Martinez-Niconoff and B. Choi, "Simple correction factor for laser speckle imaging of flow dynamics," *Opt. Lett.* 39, 678-681 (2014).



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

# Journal of Applied Research and Technology



Journal of Applied Research and Technology xxx (2015) xxx–xxx

[www.jart.ccadet.unam.mx](http://www.jart.ccadet.unam.mx)

Original

## Influence of photo-detector's dead-time on the speckle contrast for blood flow measurement

N. Cruz-Ojeda<sup>a</sup>, R. Porrás-Aguilar<sup>a,b</sup>, R. Ramos-García<sup>a</sup>, J.C. Ramírez-San-Juan<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Optics Department, Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica, Luis Enrique Erro No. 1, Sta. Ma. Tonantzintla Puebla, México CP 72840, Mexico

<sup>b</sup> Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Av. Insurgentes Sur 1582, 03940 Mexico, D.F., Mexico

Received 29 March 2015; accepted 21 September 2015

### Abstract

The statistics of temporal integration of dynamically scattered light is commonly employed to calculate the correlation time of the light and related physical properties of the object that produce it, i.e. scatterer's speed. Recently, studying the statistics of time-averaged fluorescence intensity, it was reported that a small dead-time (1% of the exposure time) of the photo-detector increases the correlation time by one order of magnitude compared with an ideal photo-detector. Applying the same theory to the speckle contrast calculation for blood flow measurement, we found that the effect of dead-time is negligible compared to an ideal photo-detector for contrast calculation.

All Rights Reserved © 2015 Universidad Nacional Autónoma de México, Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico. This is an open access item distributed under the Creative Commons CC License BY-NC-ND 4.0.

**Keywords:** Laser speckle imaging; Dead-time photo-detectors; Blood flow measurements; Speckle contrast

### 1. Introduction

When a diffuse object, e.g., biological tissue, is illuminated by coherent light, a random interference pattern, called speckle, can be observed in the reflected or transmitted light. When the object is static, the speckle pattern is static too. However, if the object moves with a certain speed, the individual grains of the speckle move and change their shape. The speed of the object (for example the blood cells) is inversely proportional to the correlation time ( $\tau_{co}$ ) of the reflected or transmitted light through the object (Fercher & Briers, 1981; Ohtsubo & Asakura, 1976). For this reason, a proper calculation of  $\tau_{co}$  is essential for the object's speed calculation. Laser Speckle Contrast Imaging (LSCI) is a non-invasive optical technique (Boas & Dunn, 2010) that employs the contrast of integrated intensity of the reflected/transmitted light to calculate  $\tau_{co}$  and, therefore, the

speed of blood flow. In the LSCI community, different research groups had proposed theoretical and experimental improvements for the better calculation of  $\tau_{co}$ , i.e., Bandyopadhyay, Gittings, Suh, Dixon, and Durian (2005) showed that the original LSCI theory proposed by Fercher and Briers (1981) did not account for the triangular averaging of the integrated intensity. Parthasarathy, Tom, Gopal, Zhang, and Dunn (2008) proposed a robust LSCI model and a MESI instrument (Multi-Exposure Speckle Imaging) and showed that their instrument improves the calculation of  $\tau_{co}$  compared to the traditional LSCI instrument. Kirkpatrick, Duncan, and Wells-Gray (2008) showed that a spatial sub-sampling of the speckle pattern has a detrimental effect of reducing the speckle contrast and, therefore, the measured  $\tau_{co}$ . Ramírez-San-Juan, Ramos-García, Martínez-Niconoff, and Choi (2014) proposed a correction factor to solve this problem. Recently, studying the statistics of time-averaged fluorescence intensity, Turgeman and Fixler (2013) found that even a small dead-time (1% of the exposure time) of the photo-detector yields higher measured  $\tau_{co}$ , as much as one order of magnitude compared with an ideal photo-detector. The aim of this work is to review the effect of the dead-time on the estimation of contrast and  $\tau_{co}$  in the LSCI theory.

\* Corresponding author.

E-mail address: [jcram@inaoep.mx](mailto:jcram@inaoep.mx) (J.C. Ramírez-San-Juan).

Peer Review under the responsibility of Universidad Nacional Autónoma de México.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jart.2015.10.008>

1665-6423/All Rights Reserved © 2015 Universidad Nacional Autónoma de México, Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico. This is an open access item distributed under the Creative Commons CC License BY-NC-ND 4.0.

**2. Dead-time effect in photo-detectors**

In an ideal detection process, the photoelectric emissions in a detector are statistically independent of each other. Nevertheless, in practice, this condition is not strictly satisfied (Cummins & Pike, 1974). In most detectors, some radiation events may not be accounted, either because the system is busy processing a previous pulse or because the system is transferring data (Radiation Solutions, 2007). During this period of time, so-called dead-time or recovery time  $\tau_d$ , no radiation events can be registered. Therefore, an actual detector registers a smaller number of events during the integration time ( $T$ ) compared to an ideal detector.

For simplicity, we assume that the time response of the photo-detector can be described by a pulsed function as shown in Figure 1. During a certain time interval, the detector switches from a detection period (illustrated in Fig. 1 as a grey area) to a dead-time period (empty area,  $\tau_1, \tau_2$ ). During these time intervals, the detector is insensitive to radiation (Karabıdak, Çevik, & Kaya, 2009).

In Turgeman and Fixler (2013), the influence of the dead-time on the fluorescence variance is analyzed and the following equation is proposed to describe such influence:

$$\delta = \frac{T - \tau_d}{T}, \tag{1}$$

where  $\delta$  is the fraction of the integration time during which the photo-detector is active.

**3. Influence of dead-time on integrated speckle contrast**

The random interference pattern produced by the coherent addition of scattered laser light with slightly different path lengths produces laser speckle patterns. Such speckle patterns produced by motion of scattering objects, i.e. blood cells, can be used to estimate its speed due to the spatial and temporal variations of the speckle pattern.

For the case of spatial variations, its effect is observed as a blurring in the image.

LSCI quantifies the extent of this localized spatial blurring by calculating the speckle contrast  $K$  of the image. The speckle contrast  $K$  can be expressed using the following equation

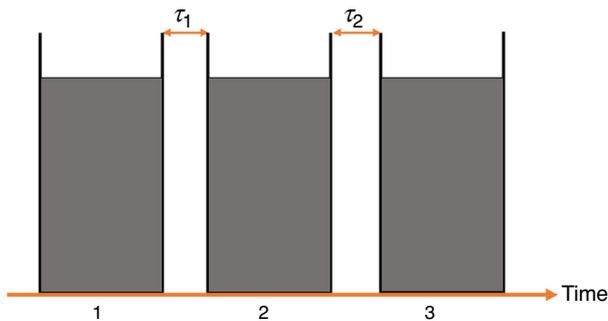


Figure 1. Schematic representation of a possible sequence of detection periods (1, 2, 3, ...) and dead-time ( $\tau_1, \tau_2, \dots$ ). Each detection period is followed by a dead-time interval during which the detector is inactive.

(Parthasarathy et al., 2008),

$$K^2 = \frac{2\beta}{T} \rho^2 \int_0^T \left(1 - \frac{t'}{T}\right) (g_1(t'))^2 dt' + \frac{4\beta}{T} \rho(1 - \rho) \int_0^T \left(1 - \frac{t'}{T}\right) g_1(t') dt' + \beta(1 - \rho)^2, \tag{2}$$

where

$$\rho = \frac{I_f}{I_f + I_s}, \tag{3}$$

is the fraction of dynamically scattered light,  $I_s$  and  $I_f$  are the contribution from the static and dynamic light, respectively,  $\beta$  is a normalization factor that accounts for spatial integration of the speckle and  $g_1(t)$  is the normalized correlation function of the electric field reflected/transmitted by the sample.

Given that  $t\delta$  is the effective time that the photo-detector is active during an exposure time  $t$ , and assuming that the velocities of the scatterers have a Lorentzian distribution (Ramirez-San-Juan, Ramos-Garcia, Guizar-Iturbide, Martinez-Niconoff, & Choi, 2008) i.e.,  $g_1(t) = \exp(-t/\tau_{co})$ ,  $K^2$  can be expressed by

$$K^2 = \frac{2\beta\delta}{T} \rho^2 \int_0^T \left(1 - \frac{t'\delta}{T}\right) e^{-(2t'\delta)/\tau_{co}} dt' + \frac{4\beta\delta}{T} \rho(1 - \rho) \int_0^T \left(1 - \frac{t'\delta}{T}\right) e^{-(t'\delta)/\tau_{co}} dt' + \beta(1 - \rho)^2. \tag{4}$$

After some calculations (see Appendix A), it is possible to express Eq. (3) as

$$K^2 = \rho^2 \beta \left\{ \frac{2x - 1 + e^{-2\delta x} [1 + 2x(\delta - 1)]}{2x^2} \right\} + 4\beta\rho(1 - \rho) \left\{ \frac{x - 1 + e^{-\delta x} [1 + x(\delta - 1)]}{x^2} \right\} + \beta(1 - \rho)^2, \tag{5}$$

where  $x = T/\tau_{co}$  is the number of correlation intervals captured during the exposure time.

For an ideal detector ( $\delta = 1$  or  $\tau_d = 0$ ), Eq. (5) reduces to:

$$K^2 = \rho^2 \beta \left\{ \frac{2x - 1 + e^{-2x}}{2x^2} \right\} + 4\beta\rho(1 - \rho) \left\{ \frac{x - 1 + e^{-x}}{x^2} \right\} + \beta(1 - \rho)^2, \tag{6}$$

which is the well-known expression for the contrast of light in presence of dynamic and static scatterers (Boas & Dunn, 2010).

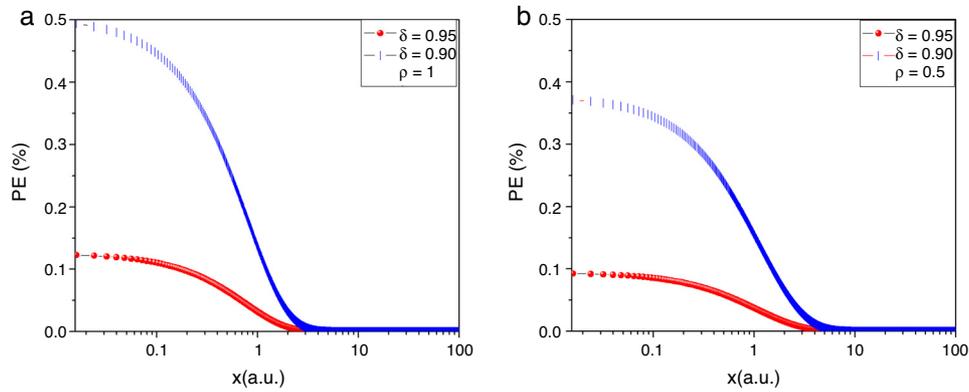


Figure 2. PE as function of the number of coherent interval captured by the photo-detector for a 5% dead-time (● lines) and 10% dead-time (◻ lines), for (a)  $\rho = 1$  i.e., superficial blood vessel, and (b)  $\rho = 0.5$  i.e. deep blood vessel. In any case, the PE was smaller than 5% under the conditions described in this work.

In Figure 2, we plotted the percentage error (PE) of contrast obtained for an actual detector ( $0 < \delta < 1$ ) compared with an ideal detector ( $\delta = 1$ ) and given by:

$$PE = \frac{K(x, \delta = 1) - K(x, \delta)}{K(x, \delta = 1)} \times 100, \quad (7)$$

where  $K(x, \delta = 1)$  is the contrast for the ideal detector ( $\tau_d = 0$ ) and  $K(x, \delta)$  is the contrast for a  $\delta$  given by Eq. (1). Two different values of  $\delta$  were employed: 0.95 and 0.9, which correspond to dead-time of 5 and 10% of  $T$ , respectively. These values are well beyond the actual photo-detector’s dead-time.

Figure 2a shows  $PE$  vs  $x = T/\tau_{co}$  for a superficial blood vessel ( $\rho = 1$ ), i.e. all the light is dynamically scattered by the blood vessel and therefore the second and third terms of Eq. (5) drop to zero. Figure 2b shows the corresponding results for a deep blood vessel ( $\rho = 0.5$ ) (Parthasarathy et al., 2008). In this case, 50% of the light reaching the photo-detector is dynamically scattered by the blood vessel and the remaining 50% is statically scattered by the tissue lying over it. In both cases, we can observe that in the short exposure regime ( $x \leq 1$ ), the error of the contrast obtained with an actual photo-detector compared with an ideal one is smaller than 0.5%, and for the long exposure regime ( $x > 1$ ), the error rapidly drops to zero. Here, it is important to remark that most of the LSCI experiments are developed in the long exposure regime (Ramirez-San-Juan et al., 2008).

It should be emphasized that there are important differences between the work presented in (Turgeman & Fixler, 2013) and this work which explain the influence that small dead-time has on the calculated correlation time. For example, in (Turgeman & Fixler, 2013), the authors calculated rotational correlation times of fluorescein molecules. In this manuscript, the correlation time of the backscattered light from a blood flow model was calculated. The correlation time of fluorescein molecules is in the order of  $ns$  and the integration times reported in (Turgeman & Fixler, 2013) are in the order of tens of  $ns$ . Under this regime, the signal captured by the photo-detector is more likely to be influenced by the dead-time. However, for the case of LSCI, the correlation time of dynamic speckle is in the order of tens or hundreds of  $\mu s$  (Parthasarathy et al., 2008), and the

integration time is in the order of  $ms$ , far away from the dead-time values.

#### 4. Conclusions

Following Turgeman and Fixler (2013) methodology, we have incorporated the dead-time in the LSCI theory. Even when it was reported that this factor is crucial for fluorescence imaging correlation calculations, it was found that the dead-time does not play such an important role in LSCI. In this manuscript, we have confirmed that given that the correlation time and the integration time are much longer than the dead-time of the photo-detector under this regime, the influence of it on the contrast calculation of dynamically scattered light for blood flow measurement is negligible.

#### Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

#### Acknowledgements

This research was funded in part by CONACYT (CB-2010-156876-F). In addition, R. Porrás-Aguilar acknowledges the support of the Mexican Science Council, CONACyT through the Catedra-2066.

#### Appendix A.

The speckle contrast  $K$ , can be expressed as

$$K^2 = \frac{2\beta}{T} \rho^2 \int_0^T \left(1 - \frac{t'}{T}\right) (g_1(t'))^2 dt' + \frac{4\beta}{T} \rho(1 - \rho) \int_0^T \left(1 - \frac{t'}{T}\right) g_1(t') dt' + \beta(1 - \rho)^2. \quad (I)$$

Assuming that the velocities of the scatterers have a Lorentzian distribution i.e.,  $g_1(t) = \exp(-t'/\tau_{co})$ ,  $K^2$  can be expressed by

$$K^2 = \frac{2\beta}{T} \rho^2 \int_0^T \left(1 - \frac{t'}{T}\right) e^{-(2t')/\tau_{co}} dt' + \frac{4\beta}{T} \rho(1 - \rho) \int_0^T \left(1 - \frac{t'}{T}\right) e^{-(t')/\tau_{co}} dt' + \beta(1 - \rho)^2. \quad (\text{II})$$

By introducing the effective time during which the photo-detector is active  $t' \rightarrow \delta t$  into  $K^2$ , we obtain:

$$K^2 = \frac{2\beta}{T} \rho^2 \int_0^T \left(1 - \frac{t\delta}{T}\right) e^{-(2t\delta)/\tau_{co}} d(t\delta) + \frac{4\beta}{T} \rho(1 - \rho) \int_0^T \left(1 - \frac{t\delta}{T}\right) e^{-(t\delta)/\tau_{co}} d(t\delta) + \beta(1 - \rho)^2. \quad (\text{III})$$

Now, the solution for the first integral on the right side of the Eq. (III) is

$$\frac{2\beta\delta}{T} \rho^2 \int_0^T \left(1 - \frac{t\delta}{T}\right) e^{-(2t\delta)/\tau_{co}} dt = \beta\rho^2 \times \left[ \frac{\tau_{co}}{T} - \frac{\tau_{co}^2}{2T^2} + e^{-(2T\delta)/\tau_{co}} \left( \frac{-\tau_{co}}{T} + \frac{\delta\tau_{co}}{T} + \frac{\tau_{co}^2}{2T^2} \right) \right]. \quad (\text{IV})$$

The solution for the second integral on the right side of Eq. (III) is:

$$\frac{4\beta\delta}{T} \rho(1 - \rho) \int_0^T \left(1 - \frac{t\delta}{T}\right) e^{-(t\delta)/\tau_{co}} dt = 4\beta\rho(1 - \rho) \times \left[ \frac{\tau_{co}}{T} - \frac{\tau_{co}^2}{T^2} + e^{-(T\delta)/\tau_{co}} \left( \frac{-\tau_{co}}{T} + \frac{\delta\tau_{co}}{T} + \frac{\tau_{co}^2}{T^2} \right) \right]. \quad (\text{V})$$

Substituting (IV) and (V) into (III) and making  $x = T/\tau_{co}$  then (III) takes the form

$$K^2 = \beta\rho^2 \left[ \frac{2x - 1 + e^{-2\delta x}[1 + 2x(\delta - 1)]}{2x^2} \right] + 4\beta\rho(1 - \rho) \left[ \frac{x - 1 + e^{-\delta x}[1 + x(\delta - 1)]}{x^2} \right] + \beta(1 - \rho)^2, \quad (\text{VI})$$

which is the Eq. (5) of this manuscript.

## References

- Bandyopadhyay, R., Gittings, A. S., Suh, S. S., Dixon, P. K., & Durian, D. J. (2005). Speckle-visibility spectroscopy: A tool to study time-varying dynamics. *Review of Scientific Instruments*, 76(9), 093110.
- Boas, D. A., & Dunn, A. K. (2010). Laser speckle contrast imaging in biomedical optics. *Journal of Biomedical Optics*, 15(1), 011109.
- Cummins, H. Z., & Pike, E. R. (1974). *Photon correlation and light beating spectroscopy*. New York: Plenum Press.
- Fercher, A. F., & Briers, J. D. (1981). Flow visualization by means of single-exposure speckle photography. *Optics Communications*, 37(5), 326–330.
- Karabidak, S. M., Çevik, U., & Kaya, S. (2009). A new method to compensate for counting losses due to system dead time. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 603(3), 361–364.
- Kirkpatrick, S. J., Duncan, D. D., & Wells-Gray, E. M. (2008). Detrimental effects of speckle-pixel size matching in laser speckle contrast imaging. *Optics Letters*, 33(24), 2886–2888.
- Ohtsubo, J., & Asakura, T. (1976). Velocity measurement of a diffuse object by using time-varying speckles. *Optical and Quantum Electronics*, 8(6), 523–529.
- Parthasarathy, A. B., Tom, W. J., Gopal, A., Zhang, X., & Dunn, A. K. (2008). Robust flow measurement with multi-exposure speckle imaging. *Optics Express*, 16(3), 1975–1989.
- Radiation Solutions. (2007). *Dead time*. Available at: [www.radiationsolutions.ca/fileadmin/pdf/DeadTime.pdf](http://www.radiationsolutions.ca/fileadmin/pdf/DeadTime.pdf) (Accessed 01.04.15)
- Ramirez-San-Juan, J. C., Ramos-Garcia, R., Guizar-Iturbide, I., Martinez-Niconoff, G., & Choi, B. (2008). Impact of velocity distribution assumption on simplified laser speckle imaging equation. *Optics Express*, 16(5), 3197–3203.
- Ramirez-San-Juan, J. C., Ramos-Garcia, R., Martinez-Niconoff, G., & Choi, B. (2014). Simple correction factor for laser speckle imaging of flow dynamics. *Optics Letters*, 39(3), 678–681.
- Turgeman, L., & Fixler, D. (2013). Time-averaged fluorescence intensity analysis in fluorescence fluctuation polarization sensitive experiments. *Biomedical Optics Express*, 4(6), 868–884.