

# **LASCA véráramlásmérő rendszer fejlesztése és a kiértékelést befolyásoló egyes folyamatok fontosságának vizsgálata**

Doktori (PhD) értekezés

**Kondász Bence**

Témavezető:

**Dr. Smausz Kolombán Tamás**

egyetemi adjunktus

Fizika Doktori Iskola

Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar



Szeged

2023

# Tartalomjegyzék

<b>Tartalomjegyzék.....</b>	<b>1</b>
<b>Rövidítések, jelölések .....</b>	<b>3</b>
<b>1. Bevezető.....</b>	<b>5</b>
<b>2. Elméleti áttekintés.....</b>	<b>7</b>
2.1. A speckle-effektus.....	7
2.2. Speckle, mint zaj lézer nyaláb formálás, homogenizálás esetén.....	7
2.3. Speckle jellemzése .....	8
2.4. Speckle kontraszt modellek (LSCI, LASCA) .....	12
2.5. LASCA számolási metódusok, rendszer típusok .....	17
2.6. A speckle véráramlásmérő rendszerek gyakorlati alkalmazása .....	24
2.7. Összehasonlítás a lézer-Doppleres véráramlás méréssel .....	29
2.8. LASCA rendszer kalibrációs problémái .....	31
<b>3. Célkitűzés .....</b>	<b>33</b>
<b>4. Homogenizáló diffúzorok vizsgálata .....</b>	<b>35</b>
4.1. Bevezetés.....	35
4.2. Kísérleti elrendezés .....	35
4.3. Speckle méret, sűrűség és az intenzitás eloszlás homogenitásának mérése.....	36
4.4. Eredmények.....	37
4.5. Összefoglalás.....	42
<b>5. A LASCA mérőrendszeren végzett fejlesztések .....</b>	<b>44</b>
5.1. Bevezetés.....	44
5.2. Lézer.....	44
5.3. PM optikai szálba csatolás .....	46
5.4. Koaxiális megvilágító-leképező elrendezés .....	47
5.5. Képképző rendszer, kamera .....	48
5.6. Vezérlő szoftver .....	48
5.7. Vezérlő elektronika .....	49
5.8. Összefoglalás.....	50
<b>6. A vegyes szórás hatása a LASCA mérések eredményeire .....</b>	<b>51</b>

6.1. Bevezetés.....	51
6.2. Kísérleti elrendezés .....	51
6.3. Szövet modellek és élő szövet mérési protokoll .....	51
6.4. A $\rho$ statikus és dinamikus szórási arány bevezetése .....	53
6.5. Eredmények.....	54
6.6. Összefoglaló.....	58
<b>7. MESI rendszer előzetes kalibrációjának korlátai: a bőr szórási tulajdonságainak függése a perfúziótól.....</b>	<b>60</b>
7.1. Bevezetés.....	60
7.2. Mérési módszerek .....	60
7.3. Eredmények.....	62
7.4. Összefoglaló.....	68
<b>8. Sebesség hisztogramok viselkedése szórási tulajdonságok változásaira .....</b>	<b>69</b>
8.1. Bevezetés.....	69
8.2. Módszerek.....	69
8.3. Eredmények.....	70
8.4. Összefoglaló.....	74
<b>9. Összefoglaló .....</b>	<b>75</b>
9.1. Tézispontok.....	75
<b>10. Summary.....</b>	<b>79</b>
10.1. Thesis points .....	79
<b>Publikációs lista .....</b>	<b>83</b>
A tézispontok alapjául szolgáló tudományos közlemények.....	83
Egyéb nemzetközi, referált folyóiratcikkek .....	83
Konferencia előadások és poszterek.....	83
<b>Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>84</b>
<b>Irodalomjegyzék.....</b>	<b>85</b>

## Rövidítések, jelölések

LASCA – *Laser speckle contrast analysis*: lézer speckle kontraszt elemzés

LSI – *Laser speckle imaging*: lézer speckle képalkotás

LSCI – *Laser speckle contrast imaging*: lézer speckle kontraszt képalkotás

LSF – *Laser speckle flowmetry*: lézer speckle áramlásmérés

SESI – *Single-exposure speckle imaging*: egy expozíciós idős speckle képalkotás

MESI – *Multi-exposure speckle imaging*: több expozíció idős speckle képalkotás

MELSCI – *Multi-exposure laser speckle contrast imaging*: több expozíciós idős lézer speckle kontraszt elemzés

MHI – *Motion history imaging*: Mozgástörténeti képalkotás

AD – *Averaged difference*: átlagolt különbség

GD – *Generalized differences*: általánosított különbség

WGD – *Weighted generalized differences*: súlyozott általánosított különbség

THSP – *Time history speckle pattern*: időbeli speckle mintázat

COM – *co-occurrence matrix*: egyidejű előfordulási mátrix

LDF – *Laser Doppler flowmetry*: Lézer Doppler áramlásmérés

AOM – *acusto-optical modulator*: akusztó-optikai modulátor

FPS – *frame per second*: kép másodpercenként

FPGA – *Field Programmable Gate Arrays*: felhasználás helyén programozható logikai kapumátrix

RGB – *red green blue*: piros zöld kék (pl: RGB - színes kamera)

PSD – *Power spectral density*: spektrális teljesítménysűrűség

CMOS – *Complementary Metal-Oxide Semiconductor*: komplementer fém-oxid félvezető

CBF – *cerebral blood flow*: agyi véráramlás

PWS – *port wine strain*: portói borfolt

WD – *working distance*: munkatávolság

LSB – *Least Significant Bit*: legkisebb helyiértékű bit

MM – *multimode*: multimódus

PM – *polarization maintaining*: polarizáció tartó

VHG – *volume holographic grating*: térfogatbeli holografikus rács

OEM – *Original Equipment Manufacturer*, gyári csomagolás nélküli termék

PID – *proportional, integral, derivative control*: PID szabályozás

PS – *polystyrene*: polisztirol

PTFE – *polytetrafluoroethylene*: Teflon

ROI – *region of interest*: vizsgált régió, terület

SNR – *signal to noise ratio*: jel zaj viszony

SPU – *speckle perfusion unit*: speckle perfúzió egység

PU – *perfusion unit*: perfúzió egység

px – *pixel*: pixel, képpont

RBC – *red blood cell*: vörösvértest

## 1. Bevezető

Ha koherens fényvel megvilágítunk egy érdekes felületet, és az arról szóródót fényt egy ernyőn vagy leképező optikán keresztül egy kamera érzékelőjén felfogjuk, akkor azon egy szemcsés mintázat alakul ki, ez a lézeres szórási interferencia, más néven speckle. Ez az effektus sokféle hétköznapi eszközben is felhasználják kezdve az optikai egerektől a 3 dimenziós képalkotásig.

A lézeres szórási interferencián alapuló véráramlásmérő módszert az 1980-as évek elején javasolták először [1], mint a meglehetősen drága lézer Doppleres mérőrendszerek egy olyan egyszerű és olcsó alternatívájaként, mely képes nagyobb területek véráramlását közel valós időben monitorozni. Az elmúlt évek során a módszer rengeteget fejlődött, mind a technikai megvalósítások, mind pedig a kiértékelésben használt elméleti modellek terén, ennek ellenére ezen mérés technikának továbbra is megvannak a korlátai. Míg a például a szemfenéki és agyfelszíni mérések kiértékelései nem okoznak különösebb nehézséget, bőr esetén a felszínhez közeli mozdulatlan szórócentrumok jelenléte és az általuk okozott statikus szórás okozhat komolyabb mérési és kiértékelési problémákat. Ez utóbbi esetben a kapott perfúziós eredményeket nagymértékben befolyásolja az alkalmazott kiértékelési modell és a mérőrendszer kalibrálásának a módja.

A kutatásom célja a laboratóriumunkban meglévő lézeres szórási interferencia kontrasztelemezésen alapuló (LASCA) mérőrendszer továbbfejlesztése volt, valamint olyan jelenségek tanulmányozása, melyek véleményem szerint nem kaptak elég figyelmet az irodalomban is elérhető kutatások során, azonban befolyásolhatják a mérések során kapott eredményeket. Az egyik fő feladatomban az volt, hogy létrehozzak egy könnyen mozgatható karon elhelyezett, relatíve kis méretű és tömegű megvilágító-kamera rendszert. Ebben a fő kihívást a hőmérsékletstabilizált lézerforrás nagy tömege jelentette, ami miatt egy optikai szál elrendezést terveztem meg, hogy könnyen kezelhető legyen a rendszer. A multimódusú optikai szál lehetővé teszi az egyszerűbb becsatolást és nagyobb fénytéljesítmény szállítását, viszont szemcsés kimeneti intenzitáseloszlása korlátozta a véráramlásmérésben való alkalmazhatóságát. Ezen probléma egy lehetséges megoldásként megvizsgáltam a nyalábhomogenizáló diffúzor alkalmazhatóságát, az ezzel kapcsolatos eredményeket 4. fejezetben mutatom be.

Bemutatom a méréseim során használt LASCA rendszer fejlesztésének lépéseit, beleértve a komponensek behangolását és az eszközök megválasztásának indoklását. Emellett

kitérek vezérlő szoftveren végzett fejlesztéseimre, melynek segítségével hatékonyabbá tehető a mérések.

A statikus szórás jelentős hozzájárulásának korrigálásában fontosak az elméleti áttekintő részben ismertetett kontraszt modellek, amelyek az egyszerűsítések miatt figyelmen kívül hagyják az ún. vegyes szórás jelentőségét, amikor adott foton a mozgó és mozdulatlan részecskéken egyaránt szóródik. Felmerül azonban a kérdés, hogy a modellek mennyire pontosan számolják ki az interferencia kép intenzitásfluktuációjának korrelációs idejét a vegyes szórás valószínűségét befolyásoló különböző mértékű statikus-dinamikus szórási arányok esetén. A szisztematikus kísérletsorozat eredményeit a 6. fejezetben mutatom be.

A szövetmodelleken végzett mérések azt mutatták, hogy a tisztán dinamikus szuszpenziók szóróréteggel való borítása során nemcsak a statikus szórás jellemző a végtelen hosszú expozíciós időhöz tartozó  $K(\infty)$  kontraszt érték növekedett meg, hanem a nullához konvergáló megvilágítási időhöz tartozó, a mozgás állapotra érzéketlen  $K(0)$  értéke is megváltozott, jelezve a minta optikai tulajdonságainak változását. Ezen megfigyelésre építve célszerű egy szisztematikus vizsgálatot megvalósítani, hogy megértsük, milyen hatással lehet a szövet perfúziós állapotában indukált változás ugyanazon terület  $K(0)$  és  $K(\infty)$  értékeire. Ennek eredményei segíthetnek a mérések optimalizálásában és a mérőrendszernek a szövetre vonatkozó (részleges) kalibrációjában.

Reményeim szerint a mérőrendszer- és mérés technikai fejlesztésekkel, valamint az elvégzett kísérletekkel és eredményeivel hozzájárulhatok a LASCA véráramlásmérési módszer technikai fejlődéséhez, valamint a mérési pontosságának növeléséhez. Mindezek hosszabb távon a módszer alkalmazási területeinek szélesítését eredményezhetik a kutatási és klinikai diagnosztika területén.

## 2. Elméleti áttekintés

### 2.1. *A speckle-effektus*

Ha egy érdekes felületet megvilágítunk egy lézer koherens fényével, akkor szabad szemmel, vagy egy kamerával nézve a felületet, azon egy szemcsés, sötét és világos foltokból álló mintázatot látunk, melyet angol nyelven speckle-nek, magyarul szórási (folt)interferenciának nevezünk, ami a legtöbb alkalmazás szempontjából rontja a jelminőséget, ezért próbálják kiküszöbölni, vagy legalább elfogadható mértékűre csökkenteni a hatását (ld. 2.2. fejezet). Más alkalmazások kimondottan a speckle effektus kiaknázásán alapulnak, a lézeres véráramlásmérés mellett ilyenek például a mozgás követés 3D térleképezéssel [2], távolságmérés [3–5], felület érdességére [6] vonatkozó mérések, felületek rezgésének holográfiás vizsgálata [7], stb.

Attól függően, hogy a felületről szóródó fényt közvetlenül egy ernyőn fogjuk fel, vagy pedig egy leképező optikán keresztül, megkülönböztetünk objektív és szubjektív speckle-t.

Amennyiben egy áramló közegben (műanyag mikrogömbök szuszpenziója, vörösvértetek) jön létre a térfogati többszörös szóródás és erről egy képet készítünk, a rögzített kép többé-kevésbé elmosódik, csak úgy mintha egy gyorsan mozgó tárgyat fotóznák. Ezen elmosódottság, azaz képkontraszt csökkenés nagymértékben függ a képkészítés során használt expozíciós időtől, valamint a mozgás sebességétől, ezek adják pl. a perfúzió mérés alapjait.

### 2.2. *Speckle, mint zaj lézer nyaláb formálás, homogenizálás esetén*

A speckle mintázat gyakran káros jelenség, emiatt sokan foglalkoznak annak csökkentésével. Ezen próbálkozásokat fogom a következőkben bemutatni, mely technikák a LASCA rendszerek megvilágítási metódusainál is fontosak lesznek. A lézer nyaláb formálása és homogenizálása nagy jelentőséggel bír különféle ipari, orvosi és tudományos területeken, beleértve az anyag megmunkálást, az interferometriás és megvilágítási (gépilátás) technikai alkalmazásokat stb. Az egységes intenzitáseloszlás (flat-top) különféle módszerekkel érhető el, pl. rendezett, vagy véletlenszerű mikrolencse mátrix (microlens array), diffraktív optikai elemek és optikai integrátor elrendezés alkalmazásával [8,9]. Míg sok homogenizálási módszer jól működik inkoherens fényforrásokkal, vagy alacsony koherenciájú lézerekkel (például excimer lézerekkel), de ha a fény nagymértékben koherens, akkor ezek a módszerek interferenciát, speckle mintázatot eredményeznek. A lézeres képalkotó rendszerekben (holográfia, projektor, kijelző stb.) a speckle úgyszintén zajként jelenik meg, ezért ezen effektus csökkentésre van szükség a homogén megvilágítás elérése érdekében. A speckle csökkentő technikák főként a következő két megállapításon, sémán alapulnak: i) a speckle mintázatnak az



időben és/vagy térben való átlagolása vagy ii) a fényforrás térbeli és/vagy időbeli koherenciájának csökkentése [10]. A térbeli átlagolás azon alapul, hogy a kép rögzítés során használt pixelméret (vagy azok összevonásából képzett ablak) nagyobb, mint a speckle méret, vagy a képek utólagos Fourier-szűrésével csökkentik a szemcsézettséget [11], míg az időbeli átlagolás az időben gyorsan változó speckle mintázat elmosódott képét rögzítik [10]. Ez utóbbi módszerek szorosan kapcsolódnak néhány koherencia-csökkentési technikához. A koherencia csökkenthető mozgó, forgó vagy vibráló optikai elemekkel (pl. diffúzorok [12–14], diffraktív optikai elemek [15], mikrotükrök [16], többmódusú szálak vagy szálkötegek [17]), képernyőrezgetéssel [18], szélessávú lézerek használatával [19], több hullámhosszú megvilágítás alkalmazásával (pl. lézerdióda módus ugrása) [20] stb. A lézer speckle kontraszt analízis esetén a kép rögzítés során használt expozíciós időn belül a megvilágított területen a koherenciát fenn kell tartani, ezért a térbeli átlagolás az egyetlen alkalmazható módszer.

### 2.3. Speckle jellemzése

#### 2.3.1. Objektív speckle méret

Objektív speckle esetén a felületről vagy részecskékről visszaszóródott fény leképezése nélkül hozza létre a szemcsés mintázatot egy ernyőn. Ekkor a felület minden pontja vagy a folyadékban lévő részecskék elemi hullámforrásként viselkednek és ezen hullámok szuperpozíciója hozza létre az interferenciát. A speckle méret meghatározásához felhasználjuk az interferenciakép térbeli intenzitás autokorrelációját:

$$R(\Delta x, \Delta y) = \langle I(x, y)I(x + \Delta x, y + \Delta y) \rangle \quad (1)$$

amely során intenzitás térkép és annak egy kis  $\Delta x$ ,  $\Delta y$ -nal eltolt szorzatainak térbeli átlagát vesszük. Az objektív speckle esetén Goodman [21] levezetett egy megoldást a fenti autokorrelációra, felhasználva Huygens-Fresnel-elvet és Fresnel-féle közelítést. Homogéen megvilágított  $L \times L$  dimenziójú négyzet alakú felület esetén, amikor ez ernyő a felülettel párhuzamosan, tőle  $z$  távolságra helyezkedik el, a következőt kapta

$$R(\Delta x, \Delta y) = \langle I \rangle^2 \left[ 1 + \text{sinc}^2 \left( \frac{L\Delta x}{\lambda z} \right) \text{sinc}^2 \left( \frac{L\Delta y}{\lambda z} \right) \right] \quad (2)$$

ahol  $\lambda$  a lézer hullámhossza,  $z$  az ernyő és a felület távolsága és

$$\text{sinc}(k) = \frac{\sin(\pi k)}{\pi k}. \quad (3)$$

Az átlagos speckle méret ( $d_{obj}$ ) megegyezik azzal a  $\Delta x$  (vagy  $\Delta y$ ) távolsággal, amikor az autokorrelációs függvény először vesz fel 0 értéket:  $R(\Delta x = d_{x,obj}, \Delta y = d_{y,obj}) = 0$ , az akkor következik be, ha a  $\text{sinc}(k)^2$  függvényben a  $k=1$ , így

$$d_{obj} = \frac{\lambda z}{L}. \quad (4)$$

A (4) egyenletből látható az elnevezés oka, hisz a foltok mérete csak az ernyő és a megvilágított felület helyzetétől függ.

### 2.3.2. Szubjektív speckle méret

A szubjektív speckle leírást használják a legtöbb alkalmazásban lévő eszközök esetén, mivel ekkor a szóró felületet valamilyen leképező rendszer segítségével figyelik meg. Ezen esetben a speckle méret, mintázat kialakulásának leírásakor már a leképező optikán bekövetkező fényelhajlásokat, apertúra nagyságokat is figyelembe kell vennünk.

Goodman [21] leképezési síkban keletkező speckle mintázatra is bevezetett egy autokorrelációs függvényt, ami a következő

$$R(r) = \langle I \rangle^2 \left[ 1 + \left| 2J_1 \left( \frac{\pi ar}{\lambda v} \right) / \left( \frac{\pi ar}{\lambda v} \right) \right|^2 \right]. \quad (5)$$

A (5) egyenletben  $r = [(\Delta x)^2 + (\Delta y)^2]^2$ ,  $J_1 \left( \frac{\pi ar}{\lambda v} \right)$  az elsőrendű Bessel-függvény,  $a$  a leképező lencse apertúrájának átmérője míg  $v$  a lencse és a leképezési sík közötti távolság [22]. Ha a függvény első két minimuma közötti távolságot vesszük az átlagos speckle méretnek ( $d_{sub}$ ), ekkor

$$d_{sub} = \frac{2,4\lambda v}{a}, \quad (6)$$

mivel  $J_1(x) = 0$ , ha  $x = 1,22\pi$ .

Mivel általában nem egy lencsével, hanem lencserendszerrel képezzük le az interferencia képet, amelyet  $M$  nagyítással,  $f/\#$  f-számmal jellemezünk, ekkor speckle méretet a következőképp is kifejezhetjük [23]:

$$d_{sub} = 1,2(1 + M)\lambda f/\# \quad (7)$$

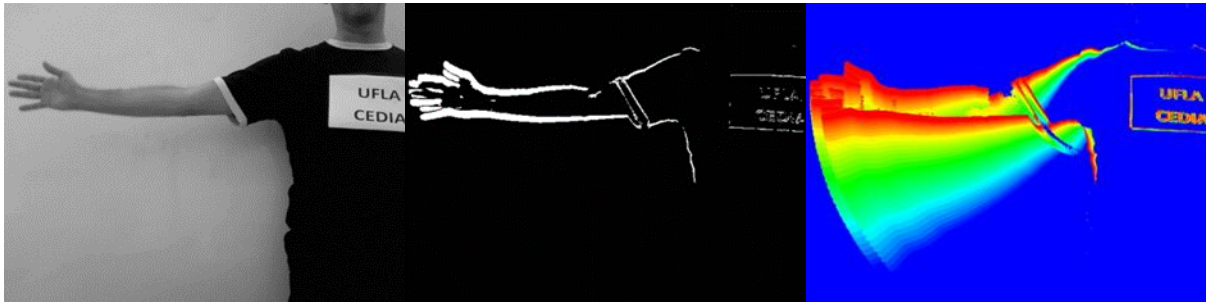
### 2.3.3. Speckle képeket jellemzésére használt metódusok

A következőkben néhány, a speckle képek elemzésére használt módszert mutatok be. Mindegyik módszert mozgás, áramlás megfigyelésére fejlesztették ki. A metódusok bemutatási sorrendje megegyezik a bonyolultságuk, számítási kapacitásuk sorrendjével, vagyis az egyszerű kép képből való kivonási művelettől (MHI) eljutva a képek kis részeinek statisztikai elemzéséig (kontraszt).

#### 2.3.3.1. *MHI*

A legegyszerűbb ilyen módszer az MHI (motion history imaging), mely alkalmas mozgás, áramlás kimutatására. A kiértékelés során az egymást követő képeket kivonják egymásból, majd az így kapott intenzitás különbség képet egy küszöb érték megadásával bináris

képé (1. ábra) transzformálják, ez lesz a mozgás sziluettje. Ezeket a bináris képeket folyamatosan egymásba fonják úgy, hogy összeadják ezeket egy a időbeliségét jellemző súlyzó tényezővel, ami az 1. ábrán is látható egy emberi kar mozgás esetén [24].



1. ábra MHI példa egy mozgó kar esetén balról jobbra az egy rögzített kép (a), a bináris kép (b) a mozgás sziluettjéről majd pedig a mozgás időben összefűzött képe (c) [24]

Ennek a módszernek a fő előnye, hogy a kiértékelés hatására nem csökken le a kapott képek részletessége. Főként növények fejlődésnek megfigyelésére használják pl: kukorica mag csírázása, kávé bab gyökerének növekedése [24], de ezenkívül az egyszerűsége illetve kis számítási igénye miatt közel valós idejű baktérium növekedési ütemének vizsgálatára is használják [25].

### 2.3.3.2. Fujii módszer

A Fujii [26,27], vagy irodalomban átlagos eltérés (AD, average differences) módszerként is megtalálható, amely utóbbi jól le is írja a dinamikus speckle képek kiértékelésének módját is, mely a következő egyenleten alapul:

$$AD = \sum_k \frac{|I_k(x, y) - I_{k+1}(x, y)|}{I_k(x, y) + I_{k+1}(x, y)} \quad (8)$$

A (45) egyenletben a  $I_k(x, y)$  az időben k-dik sorszámú speckle kép intenzitás mátrixa. Nagy előnye ennek a számítási módszernek az, hogy a képek kevésbé megvilágított helyein a változások, aktivitások jobban láthatóvá válnak.

### 2.3.3.3. Generalized Differencics, GD

A GD során az összes képet összehasonlítják, kivonják egymásból, amit az angol neve is sugall. Az intenzitás térkép kivonást a következő egyenlet alapján végzik el:

$$GD = \sum_k \sum_l |I_k(x, y) - I_l(x, y)|. \quad (9)$$

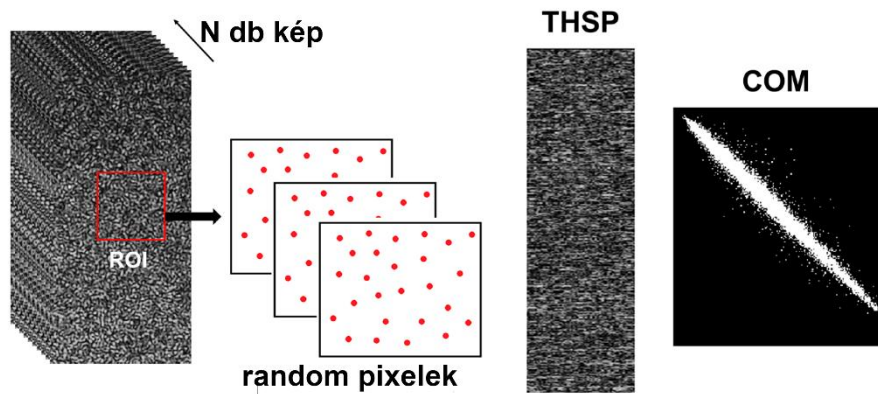
A Fujii módszerhez képest élesen elhatárolódnak az aktivitást mutató területek. Jobb eredmények elérése érdekében a (9) egyenletet egy súlyzó szorzó taggal módosították (Weighted Generalized Differencics, WGD) a következőképpen:

$$WGD = \sum_k \sum_l |I_k(x, y) - I_l(x, y)| p_l, \quad (10)$$

amelyben  $p$  a súlyzó tag, amelynek megválasztása nem egyszerű feladat, egy bonyolult statisztikán alapul, melyről bővebb leírását az alábbi [28] irodalom tartalmazza. Ezen módszernek a hátránya a nagy számítási igény.

#### 2.3.3.4. Időbeli speckle mintázat (THSP)

A THSP (Time History Speckle Pattern) során dinamikus speckle képeket rögzítünk, majd az első képből egy sort, oszlopot, vagy újabb módszerekben tetszőleges számú pontot kiválasztva vizsgáljuk ezek időbeli változását. Ezen ponthalmazokból egy mintázatot állítunk elő úgy, hogy egymás mellé rakjuk a sorokat, oszlopokat, illetve a tetszőlegesen kiválasztott pontokat (2. ábra THSP).



2. ábra A THSP módszer lépései illetve az ebből számolt co-occurrence mátrix (COM) képe nagy aktivitású területen [29]

A THSP képek alapján megmondható egy adott helyen mekkora az aktivitás, nagy aktivitás esetén a 2. ábrán láthatóhoz hasonló, míg ellenkező esetben pedig egy sötét világos vízszintes vonalokból álló mintázat alakul ki. Láthatóan ez nem egy egzakt módszer a mozgás sebességének megállapítására, ezért bevezették az ún. co-occurrence mátrixot (COM) [30], ami a következő

$$COM(x, y) = \sum_m \sum_n \begin{cases} 1, ha THSP(m, n) = x és THSP(m, n + 1) = y \\ 0, egyébként \end{cases}. \quad (11)$$

Ezt térbeli szűrkeségi függőségi mátrixnak (spatial gray level dependence matrices) is nevezik. A 2. ábra egy jellemző COM mintázat látható, amelyen pontok az átló mentén szóródnak, melynek szélessége az aktivitás csökkenésével növekszik. A COM mátrix átló mentén való szórását jellemzésére bevezették a tehetetlenségi momentumot (inertia moment, IM), melyet a következő kép definiálnak:

$$IM = \sum_x \sum_y \frac{COM(x,y)}{\sum_y COM(x,y)} |x - y|^2. \quad (12)$$

A foton korrelációs spektroszkópiából ismerős lehet ezen mérési metódus, melyet foton szerkezet függvénynek neveznek [31]. A (12) egyenletben a nevezőt, normálisi faktort a többféleképpen is definiálják az inhomogenitás csökkentése érdekében [30,32]. A IM segítségével a globális aktivitásról kapunk egy becslést.

#### 2.3.3.5. Kontraszt

Ebben részben bemutatom lézer speckle kontraszt analízis (LASCA) módszer egyik névadó mennyiséget, a kontrasztot. Ez adja alapját dolgozatomnak, hisz ezt a módszer használtam a speckle képek kiértékelésekor. A következő (13) egyenlet segítségével bevezethetjük az intenzitás szórását, ha ismerjük az intenzitás eloszlást (P(I)):

$$\sigma^2 = \int_0^{\infty} (I - \langle I \rangle)^2 P(I) dI. \quad (13)$$

A fenti egyenletből a speckle mintázatot jól jellemző mennyiség a kontraszt bevezethető:

$$K = \frac{\langle (I - \langle I \rangle)^2 \rangle}{\langle I \rangle} = \frac{\sigma}{\langle I \rangle}. \quad (14)$$

Jól látható, hogy a kontraszt 0 és 1 közötti értéket vehet fel valós esetekben, míg ideális speckle mintázat esetén a K=1, ekkor az intenzitás várható értéke és szórása megegyezik. A fenti kontrasztot definiálhatjuk térbeli mind időbeli alakban is. A gyakorlatban pixelizált speckle képeket használunk a kontraszt megállapítására, amely során az integrálást egy összegzés váltja fel. Az időbeli kontraszt esetén az egymás után rögzített képek adott pontjából számol, így kapva egy kontraszt térképet. Térbeli kontrasztot, amit én is használni fogok dolgozatomban, az adott speckle kép egy kisebb területén (ablakban) számolnak, és ezen ablak léptetésével, alakítják ki a teljes speckle képhez tartozó kontraszt térképet. Részletesebben lásd a későbbi 2.5.1 fejezetben.

#### 2.4. Speckle kontraszt modellek (LSCI, LASCA)

A fentebb definiált kontrasztból még mindig nem látszik, hogyan lesz áramlási sebesség, erre ad magyarázatot ez a fejezet. Ha egy kamerával egy gyorsan mozgó tárgyról képet készítünk, akkor az elmosódik. Speckle képek esetén is ez történik az elmosódást pedig kontraszttal tudjuk jellemezni. A kontraszt értéke függ a kamera expozíciós, integrációs idejétől, hisz nagyon rövid záridő esetén alig változik, gyakorlatilag állandó marad, míg hosszú exponálás esetén nagymértékben elmosódik a rögzített interferencia mintázat.

A LASCA elméletét Fercher és Briers [1] 1981-es cikke alapozta meg, de ekkor még nem volt megfelelő számítási kapacitás a képek közel valós idejű feldolgozására. A speckle időbeli változása esetén a T expozíciós idővel készült képen a térbeli intenzitáseloszláshoz tartozó szórása a következőképpen határozható meg:

$$\sigma_s^2(T) = \frac{1}{T} \int_0^T C^2(t) dt, \quad (15)$$

ahol  $C(t)$  a speckle intenzitás időbeli fluktuációjának autokovarianciája. Az autokovarianciát a következőképp definiálják:

$$C^2(t) = \langle (I(t) - \langle I \rangle_t)(I(t + \Delta t) - \langle I \rangle_t) \rangle_t, \quad (16)$$

amelyben  $I(t)$  egy adott képpont az időfüggő intenzitása,  $\Delta t$  az időbeli különbség míg  $\langle \rangle_t$  az időbeli átlagolást jelöli. Most nézzük meg az elektromos térerősség időbeli változását leíró autokorrelációs függvényt

$$g_1(t) = \frac{\langle E(t) \cdot E^*(t + \Delta t) \rangle_t}{\langle I \rangle_t}, \quad (17)$$

amelyben  $E(t)$  az elektromos térerősség, míg  $*$  a komplex konjugálást jelöli. Ugyanakkor bevezethetjük a normált másodrendű autokorrelációs függvényt (másnéven intenzitás autokorreláció):

$$g_2(t) = \frac{\langle I(t) \cdot I(t + \Delta t) \rangle_t}{\langle I \rangle_t^2}. \quad (18)$$

A  $g_1(t)$  és a  $g_2(t)$  közötti kapcsolatot a Siegert-reláció adja meg:

$$g_2(t) = 1 + |g_1(t)|^2 \quad (19)$$

Itt hozzá kell fűznöm, hogy a Siegert reláció csak Gaussi statisztikára érvényes, de az irodalomban speckle statisztikai számolásokban érvényesnek feltételezik. Bevezetve a (16) egyenlet alapján a normált autokovarianciát

$$c^2(t) = \frac{C^2(t)}{\langle I \rangle_t^2}, \quad (20)$$

amelyre szintén feltesszük, hogy érvényes rá a Siegert-reláció, ekkor a (19) egyenlet a következő alakúra módosul:

$$g_2(t) = 1 + c^2(t) = 1 + \frac{C^2(t)}{\langle I \rangle_t^2}. \quad (21)$$

A (15) egyenletben felhasználva (19) és (21) összefüggéseket, valamint ergodicitást feltételezve az intenzitás időbeli átlaga helyettesíthető a térbeli átlaggal, ekkor a következőt kapjuk

$$K^2(T) = \frac{\sigma_s^2(T)}{\langle I \rangle^2} = \frac{1}{T} \int_0^T g_1(t)^2 dt. \quad (22)$$

A (22) egyenletből már látszik, hogy a kontraszt időbeli lefutásának megállapításához, már csak az elektromos térerősséget jellemző autokorrelációs függvényt kell ismernünk. A  $g_1(t)$  alakja függ a mérni kívánt áramlás részecskéinek sebességeloszlásától, a LASCA irodalmában legtöbbször a Lorentz (23), Gauss (24) és a kettő keresztezéséből származtatott Voigt (25) sebesség profilokat [33] használják.

$$g_1^L(t) = \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (23)$$

$$g_1^G(t) = \exp\left(-2\left(\frac{t}{\tau}\right)^2\right). \quad (24)$$

$$g_1^V(t) = g_1^L(t) * g_1^G(t) \quad (25)$$

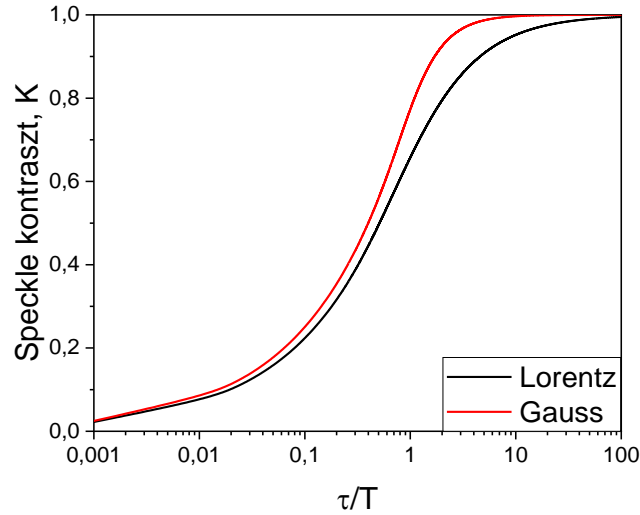
A fenti autokorrelációs függvényekben  $\tau$  a fluktuációk időbeli változásait jellemző autokorrelációs idő, melyre későbbiekben csak korrelációs időként fogom említeni, míg a  $*$  konvolúciót jelöli. Fercher és Briers Lorentzi sebesség eloszlást feltételezett, így a (22) és a (23) egyenletet felhasználva következő kontraszt modellt kapták:

$$K(T) = \frac{\sigma_s}{\langle I \rangle} = \left\{ \frac{\tau}{2T} \left[ 1 - \exp\left(-\frac{2T}{\tau}\right) \right] \right\}^{1/2}, \quad (26)$$

amely a legelőször alkalmazott függvény volt a LASCA irodalmában [1]. A (26) egyenlet egy szigorúan monoton csökkenő függvény, melynek aszimptotikus határértékei jól lekövetik az ideális speckle mintázatból következő kontrasztot, vagyis elhanyagolhatóan rövid és végtelenül hosszú expozíciós idők esetén  $K(T \rightarrow 0) \equiv K(0) = 1$  és  $K(T \rightarrow \infty) \equiv K(\infty) = 0$ . A  $\tau$  korrelációs idő reciproka (SPU) arányos az áramlás, vagy perfúzió sebességével, de egzakt arányossági tényezőt csak esetleges kalibráció után kaphatunk, azonban ezt kerülni szokták mivel sok paramétertől függ (szövet optikai tulajdonságai, szóró szemcsék fizikai tulajdonságaitól, aktuális eszköz paramétereitől) és azok megváltozása mérés közben hibát eredményezhet [34,35], emiatt sokszor csak az SPU értékek relatív változásait vizsgáljuk. Az irodalomban a SPU egyre pontosabb meghatározására további törekvések vannak, amelyek ismertetésével foglalkozok a továbbiakban. Mielőtt még tovább lépnék bemutatom a Gauss sebesség eloszlás esetén a kontraszt modellt, amely a következő

$$K(T) = \left\{ \frac{\tau}{2T} \left[ \sqrt{\frac{\pi}{2}} \operatorname{erf}\left(\frac{\sqrt{2}T}{\tau}\right) \right] \right\}^{1/2}, \quad (27)$$

ahol  $\text{erf}()$  a Gauss-hibafüggvény. A (27) egyenlet szélső értékei megegyeznek a (26) kontraszt modellnél látottakkal, illetve a hiányosságai is hasonlóak. Összehasonlítva a Gauss és Lorentz sebesség eloszlás esetén kapott kontraszt görbéket (3. ábra), a lefutásuk hasonló, de nagyban különböznek a kis SPU értékek esetén, vagyis a Gauss-sebesség esetén meredekebben tart 1-hez a kontraszt.



3. ábra Lorentz (26) és Gauss (27) sebességeloszlás esetén a kontraszt görbe

A továbbiakban már csak Lorentz eloszlást fogok használni, mivel könnyen kezelhető, illetve nagyon jól alkalmazható élő szövetek perfúziós mérései során, azaz a különböző expozíciós időkkel felvett kontrasztértékekre jobban illeszthető a függvény.

A valós mérésekből látható volt, hogy a kontraszt sosem veszi fel a 1-es értéket, annál mindig kisebb, erre Lemieux és munkatársai bevezették a  $\beta$  korrekciós, normalizációs faktort, melyet úgy definiáltak, hogy  $\beta = \lim_{T \rightarrow 0} K_{valós}^2(T)$  egyenlet teljesüljön [36]. Emiatt a (19) egyenlet, Siegert-reláció a következőképpen módosul:

$$g_2(t) = 1 + \beta |g_1(t)|^2. \quad (28)$$

Ezt behelyettesítve a (22) egyenletbe és az integrálást elvégezve a következőt kapjuk a kontrasztra:

$$K(T) = \left\{ \beta \frac{\tau}{2T} \left[ 1 - \exp\left(\frac{-2T}{\tau}\right) \right] \right\}^{1/2}. \quad (29)$$

A  $\beta$  korrekciós faktor sok tényezőtől függ, többek között: az alkalmazott megvilágítás stabilitásától és polarizációjának tökéletlenségétől, a rendszer vibrációitól [33,37], a többszörös szóródástól, valamint a leképező detektor véges pixel méretéből következő térbeli átlagolástól [38] és, az alulmintavételezés (speckle méret kisebb, mint a pixel méretének kétszerese, Nyquist limit [39]) hatásától. Bandyopadhyay és munkatársai azt javasolták, hogy



nagyobb súlyozással szerepeljenek a gyors változások (rövidebb  $\tau$  értékek) [40], emiatt a (15) egyenletbe egy  $(1-t/T)$  súlyzó tagot bevezetve a következő kapták:

$$K^2(T) = \frac{1}{T} \int_0^T \left(1 - \frac{t}{T}\right) c^2(t) dt. \quad (30)$$

A fenti (30) integrált elvégezve a kontraszt összefüggés következő alakot veszi fel:

$$K(T) = \left\{ \beta \frac{\tau^2}{2T^2} \left[ \exp\left(\frac{-2T}{\tau}\right) - 1 + \frac{2T}{\tau} \right] \right\}^{1/2}. \quad (31)$$

A kísérleti eredmények azt mutatták, hogy még a szenzor zajának kiküszöbölésével sem veszi fel a kontraszt a 0 értéket, amikor az expozíciós idő tart a végtelenbe, emiatt tovább vizsgálódtak az ezzel foglalkozó kutatócsoportok. Ennek a fő oka a statikus szóró elemek által létre hozott állandó speckle mintázat, melyet a korábban írt Siegert reláció (28) már nem ír le jól. Parthasarathy és munkatársai bevezették a következőt a szórási térre:

$$E_h(t) = E(t) + E_s e^{-i\omega_0 t}, \quad (32)$$

ahol  $E(t)$  a gaussi fluktuáció,  $E_s$  a statikus tér amplitúdója és  $\omega_0$  a frekvencia. Erre felírtak egy, itt nem részletezett módosított Siegert relációt, amelyben a fentiekben leírt újításokat már figyelembe vették, így a következőt kapták a kontrasztra [37]:

$$K(T)^2 = \beta \rho^2 \frac{\tau^2}{2T^2} \left[ \exp\left(-\frac{2T}{\tau}\right) - 1 + \frac{2T}{\tau} \right] + 4\beta \rho(1 - \rho) \frac{\tau^2}{T^2} \left[ \exp\left(-\frac{T}{\tau}\right) - 1 + \frac{T}{\tau} \right] + v, \quad (33)$$

amelyben  $\rho = \frac{I_f}{I_f + I_s}$  a dinamikusan szóródó fény ( $I_f$ ) aránya a teljeshez ( $I_f + I_s$ ) képest,  $v$  pedig az állandó speckle mintázat kontrasztjának, a mérési (kvantálási, kamera) és a nem tökéletes megvilágításból adódó zajoknak az összeségét jellemzi. A  $\rho$ -t fordítva is definiálják az irodalomban, vagyis a statikus rész arányát veszik figyelembe, emiatt (33) képletben  $\rho$  helyén  $1 - \rho$  van [41]. A (33) kontraszt modell és annak apróbb módosításai [42] a legnépszerűbb a kutatók között. Egy másik, fordított logikájú korrekció estén a  $\beta$ -t a mérőrendszer maximális kontrasztja reciprokának feleltetik meg, azaz  $\beta_m = 1/K_{max}$ . Ilyenkor a mért kontraszt értékeket szorozzák meg a  $\beta_m$  korrekciós tényezővel, hogy megfeleljen az ideális specklere vonatkozó  $K(T)$  függvénynek. A fenti kontraszt modellek sarkalatos pontja a  $\beta$  normálási faktor mérés előtti pontos meghatározása, vagyis a rendszer megfelelő kalibrálása. Az irodalomban ezekre többfajta módszert ajánlanak, melyekben vagy tisztán dinamikus mintát használnak kalibrálásra [37], vagy a rendszerrel elérhető maximális kontrasztot becsülik meg teljesen statikus mintán (szilikonba ágyazott alumínium-oxid részecskék [38], fehér papír [43], Lambert-féle reflexiós standard [44]). Ezzel a problémával bővebben a 2.8. fejezetben foglalkozok.

A (33) kontraszt modell megjelenésével szinte egy időben Smausz és mtsai. is bevezetnek egy félig empirikus kontraszt-expozíciós idő összefüggést [45]. Azt feltételezték, hogy a dinamikus és a statikus szóróelemek által létrehozott interferenciakép egymástól független és ekkor a kontraszt a következőképp írható fel [46]:

$$K^2 = \frac{\sigma_d^2 + \sigma_s^2}{\langle I \rangle^2} \quad (34)$$

amelyben a  $\sigma_d$  a mozgó, míg  $\sigma_s$  a statikus összetevők intenzitásértékeinek szórása. Ebben az esetben a kontraszt felírható, mint az időfüggő dinamikus és időfüggetlen statikus kontrasztok  $P_1$  és  $P_2$  tényezőkkel súlyozott összegeként, ami (30) képlet átírásából a következő lesz:

$$K^2(T) = P_1^2 \frac{1}{T} \int_0^T \left(1 - \frac{t}{T}\right) c^2(t) dt + P_2^2. \quad (35)$$

Az integrálást elvégezve, illetve a korábbi összefüggéseket felhasználva a kontrasztra a következőt kapjuk :

$$K(T)^2 = P_1^2 \frac{\tau^2}{2T^2} \left[ \exp\left(\frac{-2T}{\tau}\right) - 1 + \frac{2T}{\tau} \right] + P_2^2. \quad (36)$$

A (36) egyenlettel leírt kontraszt modell sokkal egyszerűbb és könnyebben illeszthető közel valós időben, mint Parthasarathy és mtsai. által leírt (33) kontraszt összefüggés, valamint nem igényel semmiféle előzetes kalibrációt az ezt használó több expozíció idős rendszerekben. Ezen könnyedségek miatt ezt a modellt használom a későbbi méréseim során.

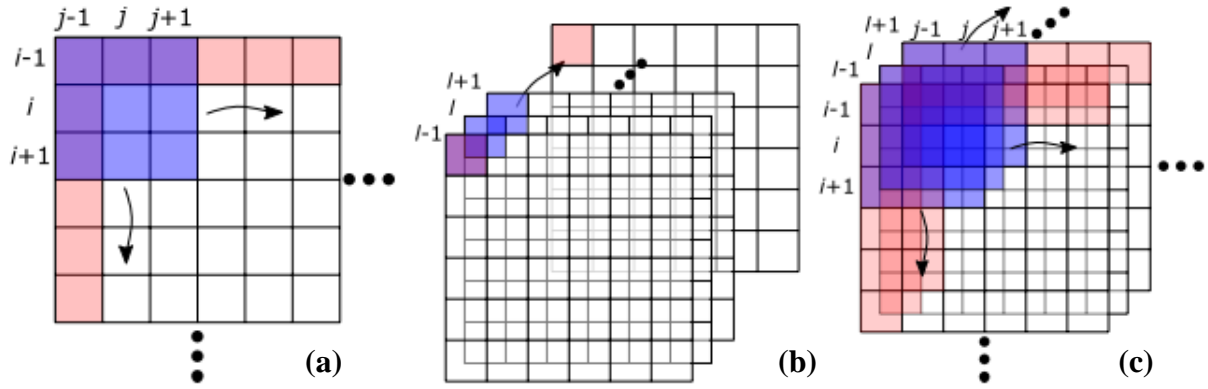
## 2.5. LASCA számolási metódusok, rendszer típusok

Ebben a részben áttekintem a LASCA különböző rendszer típusait és azok felépítését, valamint, számolási metódusait. A számolási metódusokat többféleképpen csoportosíthatjuk aszerint, hogy egy, vagy több expozíciós időt használunk, vagy a kontrasztot időben, térben vagy ezek kombinációjaként elemezzük. A fenti módszerek kombinációit is használják az irodalomban.

### 2.5.1. Kontraszt számítás módjai

#### 2.5.1.1. Térbeli kontraszt

Térbeli kontraszt esetén a rögzített speckle intenzitás képeken különböző nagyságú pixel ablakokból számolják ki a kontrasztot. Ezek az ablakok általában négyzet alakúak, de a mértük változó  $3 \times 3$ ,  $4 \times 4$  [47],  $5 \times 5$  [48] vagy  $7 \times 7$  [49], ezen kívül használnak még Gaussos és egyéb alakzatokat [50,51].



4. ábra A speckle kontraszt számolási módszerek illusztrációja: térbeli (a), időbeli (b) és a kettő kombinációja (c) [52]

A kontrasztot a szokásos módon, a (37) egyenletnek megfelelően számolható ki,  $n \times n$  pixel méretű ablak esetén a következő lesz:

$$K_{i,j,t}^s = \frac{\sqrt{\frac{1}{n^2} \sum_{x=i-\frac{n-1}{2}}^{i+\frac{n-1}{2}} \sum_{y=j-\frac{n-1}{2}}^{j+\frac{n-1}{2}} (I_{x,y,t} - \langle I \rangle_{i,j,t}^s)^2}}{\langle I \rangle_{i,j,t}^s}, \quad (37)$$

amelyben  $n$  az ablakméret,  $i, j, t$  pedig a középső pixel, valamint a számolt 'kontrasztpixel' koordinátája, míg  $\langle I \rangle_{i,j,t}^s$  a térbeli intenzitás átlag, ami pedig a következő:

$$\langle I \rangle_{i,j,t}^s = \frac{1}{n^2} \sum_{x=i-\frac{n-1}{2}}^{i+\frac{n-1}{2}} \sum_{y=j-\frac{n-1}{2}}^{j+\frac{n-1}{2}} I_{x,y,t}. \quad (38)$$

A 4.a ábrán látható térbeli kontraszt számítási módszere, amelyen a kék szín jelöli az ablakot, amelyet a léptetünk a nyilak irányába általánosan átfedés nélkül, de néhány kutató átfedést is használ, a kontraszt térkép felbontásának növelése érdekében. Az indexelés módjától függően az intenzitás képeknek gyakran adnak egy külső keretet, amely megakadályozza, hogy negatív koordináta érték jöjjön ki az intenzitás pixelre. Ezen keret a 4.a ábrán rózsaszínnel van jelölve, mely  $(n-1)/2$  sort és oszlopot karol fel.

Mivel a LASCA statisztikán alapul ezért, minél nagyobb az ablak, annál pontosabb a kapott kontraszt érték, azonban ezzel a térbeli kontraszt használatának nagy hátránya még hangsúlyosabbá válik, hiszen még inkább lecsökken a kontraszt és a perfúziós térkép térbeli feloldása az intenzitás képhez képest. Emiatt az ablak nagyságának megfelelő megválasztása erősen befolyásolja a mérési eredményeket, optimális mérete sok tényezőtől függ, többek között a speckle mérettől, azok számától, stb., mint azt Duncan és mtsai. szisztematikusan vizsgálták [53].

### 2.5.1.2. Időbeli kontraszt

Cheng és mtsai. a térbeli felbontás javítása érdekében kifejlesztették az adott pixelhez tartozó időbeli kontraszton alapuló mérést [54]. Ez a kontraszt csak statisztikailag független speckle képek esetén számolható ki, vagyis a két kép között elegendően nagy, a korrelációs időnél hosszabb időnek kell eltelnie. Az időbeli kontraszt a következőképpen számolható ki:

$$K_{x,y,t}^t = \frac{\sqrt{\frac{1}{m} \sum_{t=l-\frac{m}{2}}^{l+\frac{m}{2}} (I_{x,y,t} - \langle I \rangle_{x,y,l}^t)^2}}{\langle I \rangle_{x,y,l}^t}, \quad (39)$$

amelyben  $m$  a képek száma (minimum 15 [55], de általában ennél több képet használnak, akár 49-et is [56]) valamint  $\langle I \rangle_{x,y,l}^t$  az időbeli intenzitás átlag, melyet a (40) egyenlet definiál.

$$\langle I \rangle_{x,y,l}^t = \frac{1}{m} \sum_{t=l-\frac{m}{2}}^{l+\frac{m}{2}} I_{x,y,t} \quad (40)$$

A 4.b ábrán látható az időbeli kontraszt számítási módszere egy  $1 \times 3$  időablakra (1 pixel 3 egymás időben követő képen), melyet időben ( $t$ ) léptetünk az utolsó képig majd hasonlóan léptetjük térben is, mint a térbeli kontraszt esetén. Az időbeli kontraszt algoritmus legnagyobb hátránya az időbeli felbontás csökkenése, vagyis a perfúziós sebesség frissítési rátája nagymértékben csökken. Ha statikus szórás is jelen van a mérések során, akkor a térbeli kontrasztnál pontosabban megállapítható az időbeli kontraszt [57], sőt, in vitro kísérletekkel megállapították, hogy az teljesen független a statikus szórástól [58].

### 2.5.1.3. Tér- és időbeli kontraszt

A tér és időbeli módszer kombinációja is alkalmas speckle kontraszt számításához [59]. Ebben az esetben a pixelek kijelölése, ablak egy kocka vagy téglatest, amelyet ennek megfelelően izotrópnak (4.c ábra) vagy anizotrópnak neveznek. Ezen pixel ablak két dimenzióját a térbeli dimenziók adják, míg a 3. dimenzióját az idő határozza meg. A tér és időbeli kontraszt a fenti (37) és (39) egyenlet kombinációjából következik:

$$K_{i,j,t}^{st} = \frac{\sqrt{\frac{1}{m \cdot n^2} \sum_{t=l-\frac{m}{2}}^{l+\frac{m}{2}} \sum_{x=i-\frac{n-1}{2}}^{i+\frac{n-1}{2}} \sum_{y=j-\frac{n-1}{2}}^{j+\frac{n-1}{2}} (I_{x,y,t} - \langle I \rangle_{i,j,t}^{st})^2}}{\langle I \rangle_{i,j,t}^{st}}, \quad (41)$$

amelyben a  $\langle I \rangle_{i,j,t}^{st}$  a tér és időbeli intenzitás átlag, amelyet a (45) egyenlet definiál.

$$\langle I \rangle_{i,j,t}^{st} = \frac{1}{m \cdot n^2} \sum_{t=l-\frac{m}{2}}^{l+\frac{m}{2}} \sum_{x=i-\frac{n-1}{2}}^{i+\frac{n-1}{2}} \sum_{y=j-\frac{n-1}{2}}^{j+\frac{n-1}{2}} I_{x,y,t} \quad (42)$$

A 4.c ábrán látható ezen algoritmus lépései, vagyis az ahogy a  $3 \times 3 \times 3$  kockát léptetjük térben és időben. A tér és időbeli kontraszt kiszámításhoz általánosan olyan ablakokat szoktak választani, amelyben a térbeli kiterjedés megegyeznek, de az időbeli lehet ezekkel egyenlő (izotróp) vagy nagyobb ezeknél (anizotróp). Sok kutató vizsgálta, hogy a térbeli, illetve az időbeli pixelszám hogyan befolyásolja méréseket. Qiu és mtsai. kimutatták, hogy az átlagos kontraszt mind a térbeli mind pedig az időbeli ablak megválasztásától függ és a következő ajánlásokat tették méretre:  $5 \times 5 \times 5$  (izotróp) és  $3 \times 3 \times 15$  (anizotróp) [60]. Rege és mtsai. egy másik ablakválasztási stratégiát alkalmaztak az ablak méretet egy vizsgált ér mérete alapján határozták meg ( $9 \times 1 \times 3$ ) [61].

### 2.5.2. Expozíciós idők száma

A speckle kontraszt elemző rendszereket csoportosíthatjuk aszerint is, hogy az áramlási sebességet egyetlen vagy több expozíciós idővel rögzített monokróm kép(ek) kontraszt értékekből közvetlenül számolják, vagy azokra való függvényillesztésből határozzák meg. A fenti két módszer, valamint ezek kombinációját, illetve kísérleti megvalósításait is bemutatom ebben a fejezetben.

#### 2.5.2.1. *Egyetlen expozíciós időt használó rendszer*

A leggyakrabban a kutatók által felépített, valamint a kereskedelmi forgalomban kapható (Perimed AB, Moor Instrument, RWD Life Science) LASCA eszközök is egyetlen expozíciós időt használnak (SESI) [62]. A Fercher és Briers által mikrokeringés mérésére épített, speckle effektust használó első rendszer, melynek alapja egy analóg kamera, fényképezőgép és egy hélium-neon lézer volt [1,63], szintén egyetlen expozíciós időt használt (aránylag nagy, 162 ms értékkel). Ezen rendszerek sarkalatos pontja az expozíciós idő jó megválasztása, hiszen ez korlátozza a mérhető áramlási sebességeket: ha hosszú expozíciós időket használunk, akkor csak lassú folyamatokat tudunk meg figyelni, és ez fordítva is igaz [64]. A számunkra érdekes biológia minták esetén néhány kutató már vizsgálta, hogy mi az optimális expozíciós idő. Yuan és mtsai. azt találták, hogy 5 ms körüli expozíciós idő a legoptimálisabb, ekkor legkisebb a jel/zaj-viszony agyi véráramlás megfigyelése esetén [64]. A kutatók által fejlesztett egy expozíció időt használó LASCA rendszerek általában 1 és 30 ms között folytonosan állítható megvilágítási időt használnak [1,36,57,58,64–68]. A kereskedelmi forgalomban kapható készülékek egy darab fix, nem állítható megvilágítási időt használnak (pl.

Perimed AB, 6 ms), esetleg néhány előre rögzített érték közül lehet választani (pl. moorFLPI, 1, 2, 4 és 8.3 ms).

Ennek a rendszer típusnak a nagy előnye az egyszerűsége és a többi véráramlás mérőrendszerhez (lézeres Doppler áramlásmérő rendszer, LDF) viszonyított olcsósága, amely nagy idő és térbeli felbontással van párosítva. Hátránya pedig, ránézve a kontraszt modellekre, hogy a SPU ( $1/\tau$ ) csak akkor tudjuk meghatározni, ha előre ismerjük az éppen alkalmazott kiértékelési modellekben ((31), (33), vagy (36)) szereplő paramétereket ( $\beta$ ,  $\rho$ ,  $P_1$  és  $P_2$ ). Ez csak kalibrálás elvégzése után tudhatjuk és ekkor feltételeznünk kell azt, hogy ezen paraméterek nem változnak számottevően a mérés (pl. különböző stimulusok) során, ami véleményem szerint nem mindig teljesül.

#### 2.5.2.2. Több expozíciós időt használó rendszer

A több expozíció időt használó rendszerek (MESI) csak kutatók fejlesztik és használják, kereskedelmi forgalomban nem kaphatóak. Az első ilyen rendszereket és a hozzátartozó mérési eljárást egymástól függetlenül dolgozva Parthasarathy és mtsai. [37], valamint Smausz és mtsai. fejlesztették ki [46], amely során legalább két nagyságrendet átkaroló expozíciós időkkel felvet speckle képek kontrasztjára illesztették a megfelelő kontraszt-expozíciós idő összefüggéseket, melyekből az SPU-t már könnyedén megállapították. Nagy előnye ezen módszernek - az egy expozíciós időt használó rendszerekhez képest - a pontosabb korrelációs idő megállapítása, emellett kevésbé érzékeny a statikus szórás jelenlétére [69]. Sok kutató vizsgálta azt, hogy hány expozíciós időt és milyen tartományt használjanak a pontosság és a korrelációs idő egyre gyorsabb megállapítása, frissülése érdekében. Az első MESI rendszer 30 db 50  $\mu$ s és 80 ms tartománybeli expozíciós időt használt egy szövet modell esetén [37], a biológiai mintákra az 1. táblázatban foglaltam össze ezen paramétereket.

Expozíciós idő tartomány	Expozíciós idők száma	Referencia
50 $\mu$ s – 80 ms	15	[70,71]
50 $\mu$ s – 30 ms	11	[72]
500 $\mu$ s – 80 ms	10	[39]
1 ms – 100 ms	7	[73,74]
1 ms – 10 ms	10	[75]
50 $\mu$ s – 80 ms	6	[76]
1 ms – 64 ms	7	[47]
60 $\mu$ s – 40 ms	15	[77]

1. táblázat MESI esetén biológia mintákon használt expozíciós idők száma és ezek tartományai [76]

Kazmi és mtsai. [76] azt vizsgálták, hogyan lehetne minél gyorsabbá tenni a korrelációs idő frissülését, azáltal hogy az expozíciós idők tartományát és számát optimálisan válasszák meg. Arra jutottak, hogy a következő expozíciós idők megfelelőek: 50  $\mu$ s, 250  $\mu$ s, 750  $\mu$ s, 5 ms, 25 ms és 80 ms. Az expozíció idő változtatásának többféle módszere van: egyik a kamera integrációs [42,45,69,77,78] idejének állításán alapul a másik pedig a kivilágítás hosszának [37,46] változtatásán. Az integráció idő változtatása a legegyszerűbb, de leglassabb módszer is egyben. Ezen módszer esetén a lézer fény intenzitását expozíciós időről időre állítani kell azért, hogy azonos legyen a speckle képek fényessége, és ezáltal a kvantálási zaja. Ezt általában vagy akusztó-optikai modulátorral (AOM) [42] vagy pedig neutrális szűrők változtatásaival [45,58] érik el. Nagy hátránya ennek a módszernek az, hogy a kamera kiolvasási zaja változik az integrációs idő változtatásával [37], amivel korrigálni kellene. A másik módszer a megvilágítás hosszának változtatása, míg a kamera integrációs ideje állandó. Ezeket általában AOM-mel vagy a lézer áramának modulálásával valósítják meg. Az AOM egy jóval drágább módszer erre, de cserébe a lézer hullámhossza stabilabb, mint a másik esetén. A dióda lézer áramának modulálása során elképzelhető módus ugrás, vagyis hullámhossz változás, mely speckle méret megváltozását, illetve ebből következően kontraszt instabilitását okoz (ld.: (6), (7) egyenlet). Ennek ellenére Smausz és mtsai. sikeresen bizonyítottak ennek alkalmaságát MESI esetén [79]. Módus ugrás elkerülése véget érdemes hullámhossz stabilizált diódát használni [80]. Ezen módszerek előnye, hogy a kamera által okozott zajt konstansként lehet kezelni az összes különböző expozíciós idővel készült speckle kép esetén.

A MESI nagy előnye a SESI-hez képest az, hogy a kalibrációt nem feltétlenül kell elvégezni, hisz az alkalmazott kiértékelési modell függvényében akár minden paraméter szabadon illeszthető lehet. Már sok kutató bizonyította, hogy MESI pontosabb eredményeket ad a korrelációs időre erősen statikusan szóró minták esetén [37,81]. A hátrány, ami miatt a kereskedelmi forgalomban nem jelent meg az a bonyolultsága, hisz míg a SESI-hez csak egy kamera és egy lézerforrás kell, addig MESI esetén kell még a megvilágítási időt változtató további eszközök, valamint a közel valós idejű mérések esetén egy nagyobb számítási teljesítményű számítógép is szükséges.

### 2.5.2.3. *Kombinációk*

A kutatókban felmerült az az igény, hogy a MESI és a SESI legkedvezőbb tulajdonságait egyesíteni kellene [47,82]. Ezek a SESI esetén a gyors korrelációs idő és kép frissítési (FPS) ráta és a MESI esetén a SPU pontosabb megállapítása. Hultmann és mtsai. bevezetnek [47,83] egy új módszert, amely során  $\sim 1$ ms-os (980  $\mu$ s) expozíciós idővel 1000 fps sebességgel rögzítettek speckle képeket, melyeket összeadva generáltak hosszabb megvilágítási idővel

készült képeket (2, 4, 8, 16, 32, 64 ms). Ezen képekre pedig a fentebb leírtak szerint számoltak kontrasztot, majd illesztettek függvényt ezen értékekre a korrelációs idő megállapítása céljából. Nagy hátránya ezen kombinációnak az, hogy egy nagy sebességű kamera és mellé egy nagy számításintenzitású előfeldolgozó egység (pl: FPGA) kell, melyek elég drága eszközök.

### 2.5.3. További rendszertípusok

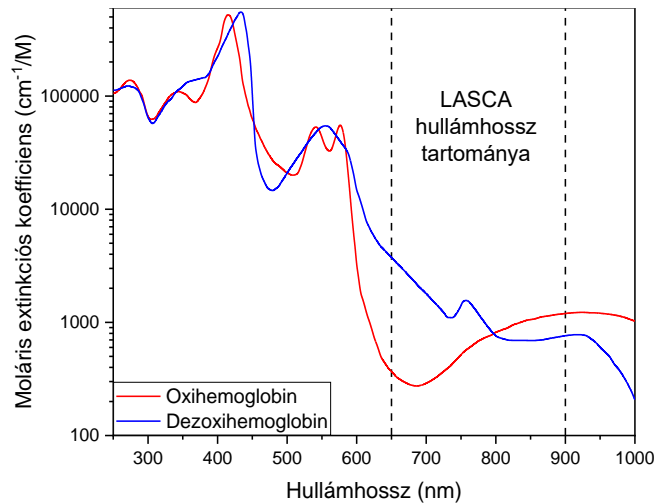
#### 2.5.3.1. *Kézben hordozható rendszerek*

Ezek a rendszerek általában egy mobiltelefon [84–87], vagy egy kompakt kézi kamerán alapulnak [88]. Ebben az esetben kéz esetleges remegése nagyban befolyásolja a készült speckle kép elmosódottságát, ezért pár kutató elkezdett foglalkozni ezen mozgások utólagos szoftveres kiküszöbölésével [88]. A fő eltérés az előzőekben tárgyalt elrendezésektől az, hogy ezen kamerák már színes képeket (RGB) rögzítenek, illetve rendelkeznek egy infravörös fényt nem átengedő szűrővel, melyek nagyban befolyásolják a képfeldolgozást és az alkalmazható lézer hullámhosszát. A kiértékelés során először az egy expozíciós idővel készült képekből, videókból leválasztják azt a színsávot, -pixeleket, amelyek az alkalmazott lézer hullámhosszához közel esnek, ez általában a piros, hisz ezen hullámhossz tartománynak van a legnagyobb behatolási mélysége a biológiai minták esetén. Ezek után már a szokásos módon számolnak kontrasztot egy erre fejlesztett programmal. Nagy előnye ennek a módszernek az egyszerűsége és az elérhetősége, gyors mérések elvégzése, azonban a mérések kevésbé pontosak, mint az asztali társai esetén. Az irodalomban még kevés alkalmazása van, de használták bőr perfúzió [85,86], égési sérülések [84], endoszkóppal belső szövetek [87] vizsgálatára, melyek során a készült képeket már az okostelefonon értékelik ki.

#### 2.5.3.2. *Több hullámhosszt használó rendszerek*

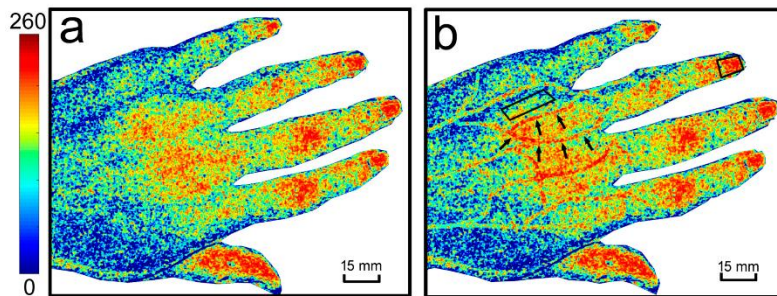
A közelmúltban kezdtek el foglalkozni a kutatók a több hullámhosszt használó LASCA rendszerek építésével és azok alkalmazhatóságának vizsgálatával. Az első rendszerek csak kettő [89–91], majd az egyre kompaktabb, megfelelő teljesítményű diódák valamint az állítható hullámhosszú lézerek megjelenésével már egyre több hullámhosszat használtak [92,93]. A multispektrális képalkotás egyik előnye, hogy extra adatokat tud adni a monitorozott áramló folyadék optikai tulajdonságairól is. Ami még a véráramlásnál is gyakran fontosabb az az, hogy milyen mértékű a vér oxigén telítettsége, amely legegyszerűbben az oxigéncserét végző oxi- és dezoxihemoglobin koncentrációjának optikai abszorpciós mérésével lehetséges.





5. ábra Az oxi- és dezoxihemoglobin abszorpciós spektruma [94] és LASCA esetében használt lézerek hullámhossztartománya

A két hemoglobin optikai abszorpciója (5. ábra) nagymértékben eltér egymástól. Ez lehetőséget ad arra, hogy a vizsgált szövetről kapott speckle képekből kiszámítsunk egy abszorpciós térképet módosított Beer-Lambert törvény alapján, melyet Zhang és mtsai. meg is tettek 805 nm hullámhossz esetén [90]. A konkrét számolási módszer már túl mutat dolgozatomban témáján, emiatt nem részletezem. A 785 nm hullámhosszon felvett speckle kontrasztból kapott áramlási (6.a ábra) és az abszorpciós térkép egyesítésével bőrfelület esetén a perfúzió és a vénákban való (oxigénben gazdag és szegény) véráramlás tökéletesen elkülöníthető (ld.: 6.b ábra).



6. ábra Egy (a) és két (b) hullámhossz használatával készült LSCI áramlási térkép összehasonlítása, mely jól szemlélteti a kézfejen lévő vénák eltérő láthatóságát [90]

Több hullámhosszt használó rendszerek esetén a vér relatív oxigén szaturációját is egyre pontosabban kapják meg, valamint felhasználják, azt hogy a speckle-effektus alkalmazásával felületi érdesség is mérhető, így tudják követni a seb gyógyulási folyamatát [93].

## 2.6. A speckle véráramlásmérő rendszerek gyakorlati alkalmazása

Amikor Briers és Fercher 1981-ben levezette az első kontraszt modellt, az akkori számítástechnikai háttér még nem tette lehetővé ezen meglehetősen számításigényes mérési

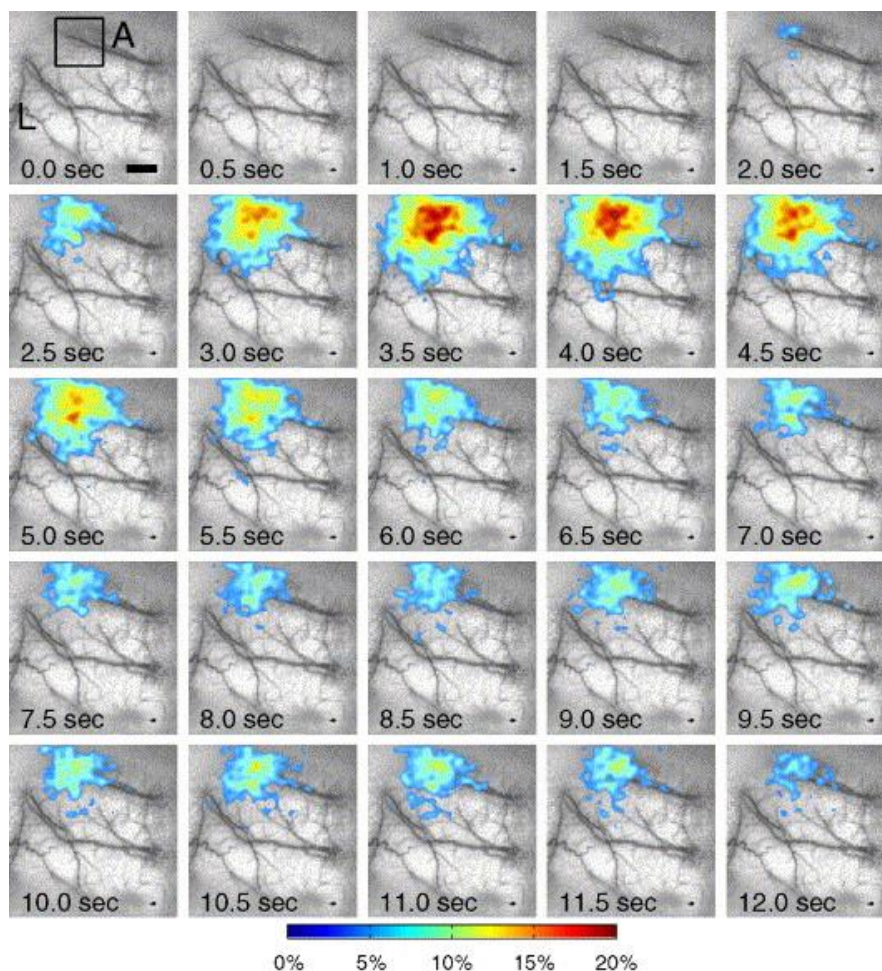
módszer gyors elterjedését. Az első speckle képek még fotó filmre készültek, melyek kontraszt kiértékelése elége nehézkes volt. Az így készült képeket a numerikus feldolgozáshoz pixelesíteni kellett, azaz egyes kis területeikhez valamilyen számbeli értéket kellett hozzárendelni aszerint, hogy lokálisan mennyire világos vagy sötét a kép. Ezután már hasonlóan számoltak kontrasztot, mint a korábban leírt módszerek. Nagy hátránya volt ezeknek a kezdeti módszereknek, hogy a kép készítés során aránylag hosszú expozíciós időt ( $1/60 \text{ s} = 166,67 \text{ ms}$  [63]) használtak, emiatt csak lassú véráramlásokat tudtak vizsgálni. A LASCA csak azután kezdett szárnyalásnak, ugrásszerű fejlődésnek indulni, miután megjelentek az első digitális kamerák és az ezekkel készült speckle képekből számolt kontraszt térképek előállításához szükséges számítógépes kapacitás. Ezek az eszközök már lehetővé tették az egyre pontosabb méréseket, ezáltal sok kutató látott neki új módszerek (kontraszt modellek, több expozíció időt használó rendszerek) kidolgozásának. A számítástechnika napjainkra már olyan nagy számítási sebességet ért el, amely lehetőséget adott a speckle képek közel valószerű feldolgozására, emiatt már műtéti környezetben is használnak LASCA-t. A következő lépcsőfok az volt, hogy megjelentek az elérhető árú kamerák és lézerdiódák, melyek segítségével olcsó, könnyen felépíthető, aránylag pontos rendszerek készültek (okostelefonos elrendezések ld.: 2.5.3.1. fejezet), amelyeket már hétköznapi emberek is használni tudnak.

Az első alkalmazott LASCA méréseket főleg szemészetben (retina) és agyi szövetek véráramlásának vizsgálatára használták, mivel ezek esetén a kapillárisok (hajszálerek) nagyon közel helyezkednek el a felszínhez, ezért nagyon jó jel-zaj arány érhető el a statikusan és a mérés szempontjából hasznos dinamikusan szóródott fotonok között. Az első szemészetben végzett méréseket Briers és mtsai. valósították meg ez volt az első eset, hogy pontos, egyidejű képet kaptak a retina nagyrészének vérellátásáról [63], amit addig csak pásztázó Doppler mérésekkel tudtak megfigyelni. Ezen áramlási térképek vizsgálatával jobban megérhetővé váltak a különböző retina betegségek, mint például diabéteszes retinopátia, az időskori makula degeneráció és a retina véna elzáródások [95]. A szemészetben nem csak a retina vérellátása fontos, hanem a szem belsejében lévő choroidális folyadék áramlása is, amely a retina felső részének táplálását is végzi. Ezen folyadék rendellenes keringése zöldhályogot, glaucoma-t okoz, mely könnyedén gyógyítható, ha időben felfedezik. Tamkai és mtsai. voltak az elsők akik ennek áramlását már digitális eszközökkel (CMOS kamera) vizsgálták [96]. Ezen kutatások nagyon sokat segítettek abban, hogy a leírt szembetegségek hamarabb észrevehetőek, ezáltal korábban kezelhetőek legyenek, így a súlyos szövődmények elkerülhetővé válhatnak.

A LASCA biológia felhasználásában az elsők között volt még a neurológia, azon belül is az agyi vérellátás (CBF). Az agyi véráramlás kutatás napjainkban is népszerű kutatási terület,

mivel ez a legbonyolultabb, legösszetettebb és a legérzékenyebb szerv a vérellátás szempontjából. Az áramlás mérésével jobban felderíthetővé válnak különböző betegségek pl: stroke, agyi ischemia [70], különböző agyi sérülések [97]. Ezeken kívül még az agyi aktivitás [98] és különböző külső behatások, stimulusok (gyógyszerek, agyi vénák elszorítása, különböző gázok belélegzése [73]) is vizsgálható ez által. Az első ilyen mérések kis állatokon főként egereken [98], malacokon [73], nyúl [99] stb. végezték el, sajnos a mérés csak a koponyacsontba vágott ablakon keresztül lehetséges. Az agyi véráramlásnak, mint az agyi aktivitás jelzőjének mérési eredményeire a 7. ábrán látható egy példa, amely egy egér első lábának ingerlésére adott perfúzió változást mutatja látható.

Az eddig felsorolt alkalmazások esetén a statikus szórás teljes mértékben elhanyagolható, emiatt akár kvantitatív perfúzió mérések is elérhetővé válnak. Ehhez csak a megfelelő kalibráció ( $\beta$  meghatározás) és az áramlási sebességhez megfelelően kiválasztott expozíciós idő (tartomány) szükséges.



7. ábra Egy kép sorozat a CBF százalékos változásáról egér mellső lábának 10 másodpercig tartó ingerlése során. [98]

Leggyakrabban LASCA-t a bőrgyógyászatban használnak, mivel a bőr felszín elég könnyen hozzáférhető és sokszor van olyan eset, hogy a vizsgálni kívánt területet

érintésmentesen kell megvizsgálni (pl: különböző hám- [100] és égési [67,101] sérülések). A bőr sérüléseinél, átültetés, illetve plasztikai műtét során és után nagyon fontos lehet megállapítani az adott terület perfúziójának mértékét, mivel az jelzi a sérülés gyógyulását, vagy a bőr transzplantációjának, műtétjének sikerességét. Hisz, ha nagyon alacsony a műtét után a szövetben a véráramlás (hipoperfúzió), akkor heg alakulhat ki, amely a plasztikai műtétek esetén nyilvánvalóan nem kívánatos. A LASCA méréseket nagyon sokan alkalmazzák égési sérülések gyógyulásának követésére [102], pontos típusának megállapítására. A másodfokú égési sérülések esetén a felületi (IIa) és a felületi mély (IIb) típusait szabadszemmel nehéz megkülönböztetni, de a két esetben a perfúzió nagymértékben különbözik egymástól, melyet LSI-vel sikerült klinikailag kimérni. Azt is sikeresen megmérték, hogy harmadfokú (III) égési sérülés esetén már hipoperfúzió figyelhető meg, amely IIa és b-től nagymértékben különbözik, de a referenciának használt sértetlen bőr véráramlásától már nem [103]. A LASCA könnyen biztosíthatja ezen sérülések megkülönböztethetőségét, amely segíti a kezelési metódus kiválasztását. Gyakran használják még bőrbetegségek vizsgálatára is, mint például rozacea, portói borfolt (PWS), ezek mind véráramlással összefüggésbe hozhatóak, így a kialakulásáról pontosabb képet kaphatnak. Ugyanakkor ezen betegségek esetleges kezelése során is személyre szabott kezelési metódusokat tudnak kialakítani. Például a PWS-t impulzus üzemű festéklézerrel kezelik, mely során Huang és mtsai. [104] azt tapasztalták, hogy a kezelt felületen a perfúzió nagymértékben lecsökken a nem kezelthez képest, majd a későbbiekben más kutatóknak [105,106] a PWS elhalványulása és ezen csökkenés között korrelációt sikerült kimutatniuk. Ezen megfigyelésből az LASCA nagyon jó támpontot ad a lézeres kezelések számának pontos meghatározásához a PWS eltüntetéséhez. LASCA segítségével nem csak áramlási sebességeket kaphatunk meg, hanem sebesség eloszlásokat is. Zölei és mtsai. [74] rozacea esetét vizsgálva azt tapasztalták, hogy az egészséges és beteg bőrfelületen felvett áramlás hisztogram görbéjének alakja nagymértékben különbözik egymástól. A LASCA-t alkalmazzák még elszorításos kísérletek során bőrben lévő véráramlás változásainak követésére. Ezen kísérletek nagyon sok mindent elárulnak a páciens egészségi állapotáról. A mérések során a páciens egy végtagjába (általában ujj, alkar) menő artériát elszorítják például egy mandzsetta segítségével, majd ezt az állapotot hirtelen megszüntetik. Eközben felvett időbeli áramlási sebesség grafikonon három részt tudunk megfigyelni, ezek a következők az elszorítás, szinte nincs perfúzió, majd jön egy túllövés, majd egy visszaállás az alapvonalra. Ezek közül LASCA gyorsasága lehetőséget ad a túllövés pontos vizsgálatára, melynek viselkedéséből (maximuma, válasz gyorsasága, lefutása) lehet következtetéseket levonni. Gyakran használják ezen vizsgálati metódust korai cukorbetegség [107], illetve különböző

kardiovaszkuláris betegségek előjelzésére [108,109]. Cukorbeteg esetén gyakran előfordul végtag vérellátását szolgáló ér elzáródása, mely LASCA segítségével már korán észre vehető a bőr perfúziójából, ezáltal megelőzhetőek a súlyos következmények, az amputáció.

A bőrben való kvantitatív véráramlás mérés az egyik legnagyobb kihívás a LASCA szempontjából, mivel ezen esetben már a statikus szórást, a különböző bőrszínekből és a vörösvértest különböző koncentrációjából adódó abszorpciót is figyelembe kell venni. Ezeket az effektusokat már sokan vizsgálták, így kialakítva újabb és újabb kontraszt modelleket. Sérülés esetén a kezelés során a bőrt egy fényes réteg (krém, testnedvek) fedhetik, amely nagymértékben reflektálja a lézerfényt. Ezen direkt reflexiók kiküszöbölésére (polarizátor pontos beállítása, lézer fény beesési szögének helyes megválasztása) nagyon körültekintően kell eljárunk a mérések során. A zavaró hatások miatt az alkalmazott kontraszt modell kalibrációs értékeit ( $\beta$ ,  $K(0)$ ) az adott szövetnek megfelelően kell megválasztani, megmérni, de ezekkel együtt is a bőrön végzett mérések inkább kvalitatív jellegűek.

Belsőszervek véráramlásának megfigyelésére legelőször Eriksson és mtsai. [110] alkalmazták a LASCA módszert egy nyitott műtéti eljárás során. A vizsgálat során májhoz tartozó vénát és artériát szorították el és vizsgálták az így kialakult okklúzió hatását. Ezen kívül a kutatók vizsgáltak még különböző belső szerveket pl: gyomor, vékonybél, nyelőcső stb. A nyitott műtéti eljárásokat felváltották a gyors felépülési idővel járó endoszkópos módszerek, melyekhez szintén alkalmaztak speckle kontraszton alapuló méréseket. Bray és mtsai. [111] kifejlesztették az első LASCA rendszert ami endoszkóp kamerán és egy optikai száliba csatolt lézeren alapult és emberi térd vérellátását vizsgálták vele. Ezen rendszerek segítségével bármely belső szerv, szövet perfúziója vizsgálhatóvá vált, ezáltal a szerv transzplantáció utáni vérellátás mérése [110] kisebb kockázattal lett elvégezhető.

Aránylag friss terület a LASCA használatában a fogászat, ahol főleg a fogíny, illetve szájnyálkahártya műtétek utáni vérellátását vizsgálják. Ezen szövetek beavatkozás utáni gyógyulási sebességét nagyban befolyásolja a perfúzió újraindulásának ideje. Ezen idő hosszára egy nemtől (férfi, nő) függő tendenciát figyeltek meg, illetve összefüggésbe hozták az ér permeabilitásának normalizálódásával [112].

Mint minden orvosi mérőeszköznek, -metódusnak, az LASCA-nak is meg van a maga hátránya, még pedig az, hogy a vizsgált területnek teljesen mozdulatlanak kell lennie. Ez egy élő szervezetnél gyakran nehezen kivitelezhető, hisz előfordulhat valami apró remegés, illetve a szívverésből adódó lüktetés. Emiatt ezen mérések eredményei általában nagyobb hibával rendelkezhetnek, mint vizsgált területhez rögzített optikai szálas lézer-Doppler esetén, de

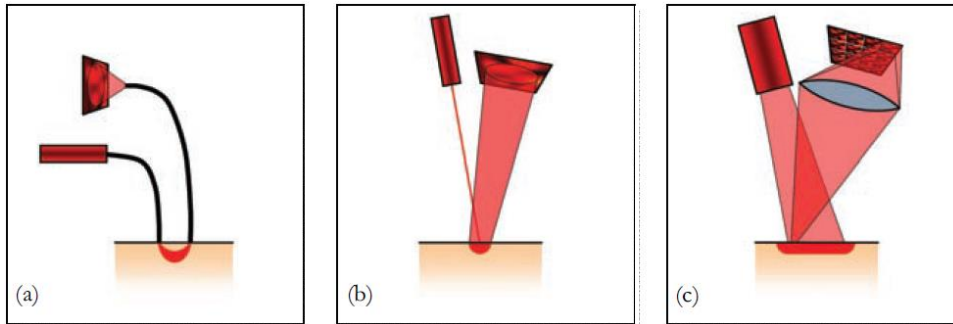
kutatók ezen problémákra is próbálnak megoldást találni (pl: speckle kép rögzítés időpontjának szinkronizálása a szívveréshez).

Az eddig bemutatott szöveti perfúzió méréseken túl a LASCA-val minden olyan áramló közeg vizsgálható, amelyben valamilyen szóró elemek vannak. Ilyen például a növények levelében, szárában, termésében és gyökerében a tápanyag áramlása. Így sikerült például roncsolás és érintés mentesen megállapítani egy alma szabadszemmel nem látható sérülését [113]. Az eljárás bármilyen más gyümölcs zöldség esetén is működik. Schott és munkatársainak [114] vörös cékla hajszálgyökereinek növekedési ütemét és bennük lejátszódó folyadékáramlást tudták megfigyelni, de lehetőség van a növényi betegségek korai kimutatására is. A legnagyobb különbség a véráramláshoz képest ebben az esetben a mért korrelációs idő, amely a lassú áramlás miatt sokkal nagyobb, ezért nagyon hosszú expozíciós idővel kell rögzíteni a speckle képeket. Ugyancsak érdekes alkalmazási terület a baktérium tenyésztés növekedési ütemének meghatározása [115], amely során hamarabb sikerült detektálni az aktivitást, mint a korábbi módszerekkel.

## **2.7. Összehasonlítás a lézer-Doppleres véráramlás méréssel**

A LASCA módszereket legtöbbször a lézeres Doppler véráramlás (LDF – Laser Doppler Flowmetry) méréshez hasonlítják. A mérés során közvetlenül, vagy áttételesen a szövetről visszaszóródót fény spektrumát vizsgálják meg, hisz amely foton mozgó részecskén szóródott az Doppler eltolódást szenved, vagyis megváltozik a hullámhossza. A Doppler eltolódás mértékéből pedig következtethetünk az áramlási sebességekre. Az áramlást jellemző korrelációs időt két féleképpen számolhatják ki: a hullámhossz eltolódásából, illetve a detektoron mérhető intenzitásfluktuáció Fourier transzformációval kapott teljesítmény spektrum első momentumából [116]. Ez utóbbi azon alapul, hogy a dinamikus és a statikus szóródó fotonok interferálnak, emiatt lüktetés, fluktuáció figyelhető meg az intenzitásban, amelynek frekvenciájából következtetni lehet az áramlás sebességre. Egy átlagos véráramlás esetén ezen frekvencia a kHz-es tartományban van.

Kereskedelmi forgalomban az LDF-nek 3 típusa kapható: a pásztázást, optikai szálal és a magas képfrissítésű (<10 kHz) kamerát alkalmazó (8. ábra) rendszerek.



8. ábra Lézer-Doppler véráramlás mérő rendszerek sematikus felépítése (a) optikai szál, b) pásztázás és c) kamerát alkalmazó, amelyen a téglatest szemlélteti a lézerforrást, míg négyzet a detektort [117]

Mind a három típusnak meg vannak az előnyei és hátrányai. A legegyszerűbb 8.a ábrán látható optikai szál megvalósítás, amely során egy tappancs segítségével, vagy más módszerrel egy fix pontra rögzítik a szálát és az onnan szóródó fényt vizsgálják. Az optikai szál kettős szerepet is betölthet: a lézerfény mintára való juttatását és az arról visszaszórt fény detektorra továbbítását. Nagy hátránya ennek az elrendezésnek, hogy csak nagyon kicsi, néhány mm<sup>3</sup> térfogatú [118] szövetrészben, egyetlen pontban képes megállapítani a véráramlást. Emellett ezen eszközöket minden mérés előtt egy a gyártó által leírt kalibrációt kell elvégezni. A következő rendszer típus esetén már nem egy ponton mérnek, hanem lézer fényel végig pásztázzák a szövetet (8.b ábra), így egy teljes áramlást térképet kapnak. Ez a módszer már hasonló eredményt ad, mint amit LASCA-val kapunk, de az elkészítése hosszú ideig tart (akár 3-4 perc [119]), ami alatt már maga az áramlás is megváltozhat. A harmadik, amely egyesíti a fenti kettő előnyös tulajdonságait (gyorsaság és áramlási térkép), felépítésben hasonlít a speckle rendszerekre (8. c ábra) azzal a nagy különbséggel, hogy az alkalmazott kamera több mint 10 kHz sebességgel rögzít képeket. Ezen a típusú kamerák ára nagyságrendekkel nagyobb, mint a LASCA-hoz használtaké. A mérések során a mintavételi frekvencia nagyon magas, emiatt nagy pontossággal lehet az adott pixelhez tartozó abszolút áramlási sebességet megállapítani. Ezen tulajdonsága miatt használja nagyon sok kutató referencia eszközként LASCA fejlesztések során [120–122].

Thompson és munkatársai [78] levezették, hogy az LDF és a LASCA alapjai lényegében azonosak. Ehhez úgy juthatunk el, hogy a (30) egyenletben egy átjelölést eszközölünk:

$$K^2(T) = \frac{1}{T} \int_0^T \left(1 - \frac{t}{T}\right) c_T(t) dt, \quad (43)$$

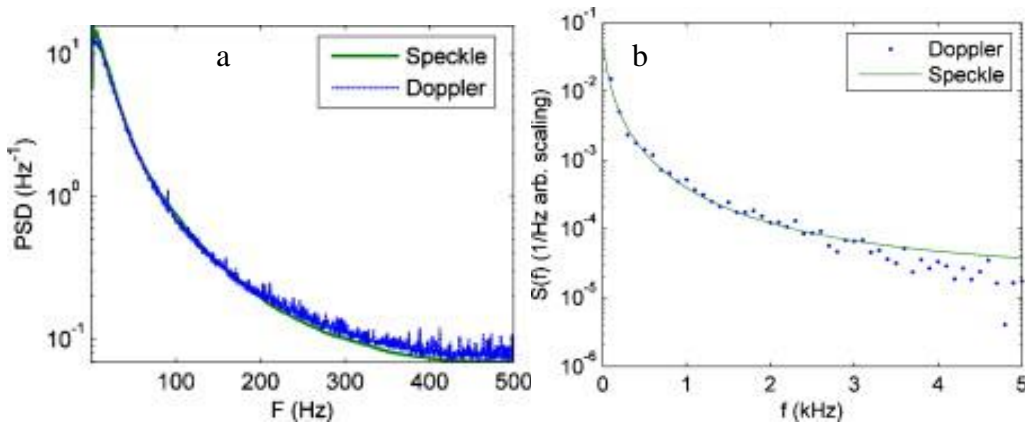
vagyis a normált autokovarianciát  $c_T(t) = c^2(t)$  alakban értelmezzük. Ekkor ezt átrendezve következőt kapjuk:

$$K^2(T)T^2 = \int_0^T (T-t)c_T(t)dt. \quad (44)$$

A (44) egyenletet a T expozíciós idő szerint kétszer deriválva az alábbi adódik:

$$c_T(t) = \frac{d^2}{dT^2}K^2(T)T^2. \quad (45)$$

A normált autokovariancia kísérletileg, illetve szimulációkkal is meghatározható, amelyből számolt spektrális teljesítménysűrűség (PSD – power spectral density) nagy hasonlóságot mutat LDF mérések során mért spektrális teljesítménysűrűségekkel (9. ábra).



9. ábra Spektrális teljesítménysűrűség (PSD,  $S(f)$ ) szimulált (a) és mért (b) több expozíciós időt használó speckle és doppler rendszer esetén [78]

Fredriksson és mtsai. demonstrálták a LASCA és LDF közötti átszámolási lehetőséget, vagyis azt, hogy a kontrasztból hogyan lesz doppler PSD és fordítva [123], ezzel még jobban bemutatva a két módszer közötti hasonlóságokat.

## 2.8. LASCA rendszer kalibrációs problémái

A LASCA rendszerek sarkalatos pontja a kalibráció helyes elvégzése, vagyis a (29), (31) és (33) egyenletekben a  $\beta$  ( $K(0)$ ) megfelelő meghatározása a mérések előtt. A  $K(0)$  paraméter nélkül a MESI által alkalmazott illesztések, illetve a SESI által kontrasztból számolt korrelációs idők adatai különböző mérések esetén nehezen összehasonlíthatóak. A normálási faktort ( $\beta$ ) általában az optikai képpalkotó rendszer általános jellemzőjeként definiálják, amely magában foglalja az alkalmazott lézer, kamera, valamint kissé ellentmondásosan a megfigyelt szövet optikai tulajdonságait is. A rendszer által elérhető kontrasztot befolyásolja a (hullámhossztól és optikai beállításoktól függő) speckle- és a pixelméret közötti arány, valamint a szórás során a fény depolarizációja és a kamerába belépő fény polarizációja [124]. Ezen kívül még hatással van rá a minta abszorpciója [125] és a szórt fény koherenciájának mértéke is. Miközben a lézerforrás koherenciahossza véges különböző úthosszúságú fotonok (a szövet optikai tulajdonságaitól függően) interferálnak a szenzoron, ami befolyásolja a koherenciát és



így az interferenciaminták kontrasztját [124,126]. Ezek mind hatással vannak a  $K(0)$  értékére is.

A  $\beta$  meghatározására több módszer is található az irodalomban. Az első ilyen eljárás a normálási faktor megállapításához a (33) egyenlettel leírt kontraszt kiértékelési módszert illesztik a tisztán dinamikus mintán ( $\rho = 1$ ) különböző expozíciós időkkel felvett kontraszt adatokra, így a  $\beta$  mint illesztési paraméter meghatározható. A probléma ezzel a módszerrel az, hogy a teljesen dinamikus minta előállítása a gyakorlatban nehezen valósítható meg. A küvetében lévő polisztirol mikrogömbökből álló szuszpenzió esetén is van statikus szórás, mivel a küvetta falára kitapadhatnak részecskék, bőrön történő mérés esetén pedig nyilvánvalóan lehetetlen. Ilyenkor csak MESI rendszerrel határozható meg nagy biztonsággal a  $\beta$ , ugyanis ekkor csak egy egyszerű függvényillesztést kell végrehajtani a használni kívánt modellel a különböző expozíciós időkkel készült kontrasztokra. SESI-vel csak abban az esetben állapítható meg a normális paraméter ily módon, ha ismerjük a teljesen dinamikus mintában a részecskék átlagos sebességét (korrelációs idejét). Ennek pontos ismerete nehézségekbe ütközik, hisz bármely erre használt szuszpenzióban lévő Brown-mozgás átlagos sebessége nagymértékben függ a környezeti hőmérséklettől.

A mérőrendszer kalibrálásához, különösen a dolgozatban nem részletezett egyszerűbb módszerek esetén, gyakran csak az elérhető maximális kontrasztot határozzák meg. Ezen érték megállapítására valamilyen szilárd fényszóró anyagot alkalmaznak, például szilikonba ágyazott alumínium-oxid részecskéket [38], fehér papírt [43], Lambert-féle reflexiós standardot [44]. Az ilyen típusú kalibrációk bizonyos esetekben jól alkalmazhatók a perfúzióban/áramlási sebességben bekövetkező relatív változások kimutatására, azonban nem univerzálisan alkalmazhatók. A probléma ezekkel az anyagokkal (szuszpenzió, teflon tömb stb.), hogy vajon mennyire utánozzák jól az élő szövet optikai tulajdonságait (pl: statikus és dinamikus szórás aránya), ugyanakkor felmerül az kérdés, hogy a mérések során állandó értéken marad-e a vizsgált mintára jellemző  $K(0)$ , vagy azt mérés közben frissíteni érdemes-e pl.: egy külső, markáns változást okozó stimulus hatására megváltozik-e a visszaszórt fény polarizációja, a szövet abszorpciója.

### 3. Célkitűzés

A doktori munkám célja a kutatócsoportban korábban felépített több expozíciós időt használó LASCA rendszer továbbfejlesztése volt, mely magában foglalta a megvilágító-leképező rendszer áttervezését, valamint perfúziós mérési eredmények pontosságát befolyásoló szövet szórási jellemzők vizsgálatát.

Az első lépésben különböző nyílásszögű (szórási szögű) homogenizáló diffúzorok fényszórási képét kívántam tanulmányozni a LASCA rendszerekben és gépi látás terén való alkalmazhatóságuk szempontjából. Az elsődleges vizsgálati szempont a diffúzor különböző intenzitáseloszlású kivilágításának hatása a vetített folt nagyleptékű homogenitására és az esetlegesen kialakuló objektív speckle foltok paramétereire.

A mérőrendszer fejlesztésének következő célja egy kis tömegű, hullámhossz-stabilizált lézeren alapuló koaxiális megvilágító-leképező rendszer megtervezése és megépítése volt.

A statikus szórás kezelésére javasolt modellek alapfeltevése, hogy a kialakuló speckle képet a kizárólagosan a mozdulatlan részecskéken, valamint a mozgó vörösvértesteken szóródott (dinamikus szórás) fotonok együttes interferenciája hozza létre. Korábbi eredmények szerint a statikus szóródás valószínűségének növelése alacsonyabb számolt áramlási sebességeket eredményez. Célul tűztem ki annak vizsgálatát, hogy ez az eltérés a számolási modellek hibájából, vagy az ún. vegyes szórás jelensége (amikor is egy adott foton a mozdulatlan részeken és a vörösvértesteken is szóródik) miatt következhet be. A kísérletek során klasszikus szövetmodellen (statikus szóróréteg szuszpenzió) és bőrön két különböző kontraszt modell esetén terveztem megvizsgálni a statikus/dinamikus szórási valószínűségek változásának hatását a Brown mozgás sebességét és szöveti perfúziót jellemző korrelációs idő számolt eredményeire. Ugyanakkor, összehasonlító mérések céljából létre kívántam hozni egy olyan kísérleti modellt, amellyel lehetővé válhat vegyes szórás mentes speckle képek létrehozása is és a számolási modellek ezen módon való tesztelése is.

A LASCA mérőrendszerek pontossága nagymértékben függ az optikai elrendezés és a vizsgált szövet együttesét jellemző kalibrációtól. Az egy expozíciós időt használó SESI mérőrendszerek előzetes kalibrációt igényelnek, a több expozíciós időn alapuló MESI mérőrendszerek a kiértékelés típusától függően igényelhetnek előzetes kalibrációt, de akár alkalmasak is lehetnek arra, hogy az időben változó optikai tulajdonságoknak megfelelően újrahangolják az illesztési paramétereket. A MESI rendszerek hátránya, hogy az időbeli felbontásuk általában rosszabb, mint a SESI módszereké. Ezen okokból kifolyólag meg kívántam vizsgálni, hogy bőr esetén a nagyfokú perfúzióváltozással járó stimulusok milyen

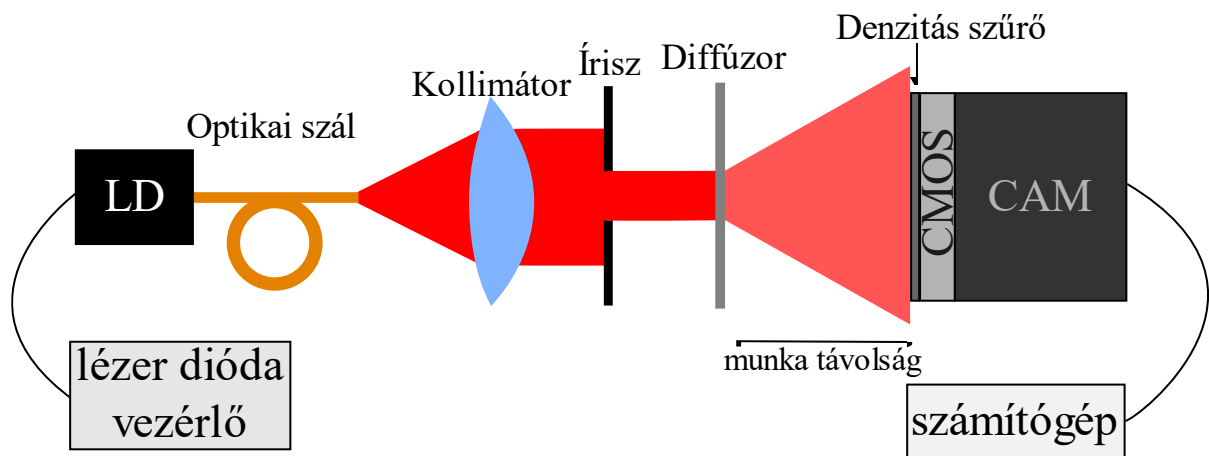
mértékben módosíthatják a kontraszt-expozíciós idő görbék illesztési paramétereit, ugyanis egy előzetes rendszerkalibráció újrahangolás hiányában hibás korrelációs idő eredményeket szolgáltatathat. További célom volt olyan kombinált kiértékelési módszer keresése, amely megnövelt időbeli felbontóképesség mellett is biztosíthatná a MESI módszerhez hasonló mérési megbízhatóságot még nagyfokú perfúzióváltozás esetén is.

## 4. Homogenizáló diffúzorok vizsgálata

### 4.1. Bevezetés

A mérőrendszer fejlesztésének egyik célja volt egy flexibilis karon elhelyezett relatíve kis tömegű megvilágító és kamera rendszer kialakítása. A hőmérsékletstabilizált lézerforrás nagy tömege miatt optikai szálas elrendezést terveztem megépíteni. A nagyobb magátmérővel rendelkező multimódusú optikai szálba egyszerűbb a becsatolás, mint egy 5-10  $\mu\text{m}$  magátmérőjű egymódusú szálba, emellett nagyobb fényteljesítményt is képes szállítani. A multimódusú optikai szál alkalmazhatóságát korlátozza a kilépő fény szemesés intenzitáseloszlása, ugyanis egy LASCA rendszer egyik legfontosabb követelménye szövet közel homogén (speckle mentes) kivilágítása. A probléma egy lehetséges megoldása egy nyalábhomogenizáló diffúzor alkalmazása, melyeket a katalógusokban különböző alakú (pl. kör, négyzet) homogén kivilágításra ajánlanak akár lézerek esetén is. Ebben a fejezetben ilyen diffúzorok által vetített homogenizált foltok részletes tanulmányozásával kapott eredményeimet mutatom be, szem előtt tartva a LASCA rendszerben való alkalmazhatóságukat. Ennek során megvizsgálom a vetített fényfolt homogenitását különböző intenzitáseloszlási profilú lézerfény forrás, illetve különböző átmérőben megvilágított diffúzor területek esetén.

### 4.2. Kísérleti elrendezés



10. ábra Az optikai szálás méréséknél használt optikai elrendezés. A lézert közvetlen kollimációjával rendelkező változatot is alkalmaztam.

A diffúzor nyalábfomálási és homogenizálási tulajdonságainak vizsgálatához használt optikai elrendezést az 10. ábra szemlélteti. A kísérletekhez egy hőmérséklet stabilizált foglalatban (Thorlabs LDM21) elhelyezett 660 nm hullámhosszú, 160 mW maximális teljesítményű lézervediódát (ML101J27) használtam, amely állandó áramú üzemmódban (Thorlabs LDC220C) működött, míg a hőmérsékletét stabilizáltam (Thorlabs TED200C), hogy

elkerüljem a hullámhossz változást és módus ugrásokat. A diffúzorok kivilágításához különböző sémákat alkalmaztam: közvetlenül a lézertől kijövő fényt kollimáltam a kísérleti céloknak megfelelő fókusz távolságú lencsével, vagy egy MM optikai szálba csatolt (Thorlabs FT400EMT, NA=0,39, 440  $\mu\text{m}$  magátmérő, 1 m hossz), majd abból kilépő multimodális fényt kollimáltam. A kollimált fényrel egy D=3-18 mm tartományon változtatható átmérőjű íriszen keresztül merőleges irányban világítottam meg a diffúzort. A méréseimhez két különböző szórási szögű (20° és 50°) kör alakú foltot vetítő diffúzort használtam (Engineered Diffuser™, Thorlabs ED1-C20 és ED1-C50). A diffúzor vetítési képét különböző munkatávolságokon (WD, 25 illetve 35 cm) egy objektív nélküli 8 bites ipari monokrom kamera érzékelője (Pixelink PL-B741F, Cypress IBIS 5B Global Shutter CMOS érzékelő, felbontás 1280x1024, 6,7  $\mu\text{m}$  x 6,7  $\mu\text{m}$  pixelméret) rögzítette, amely lehetővé tette a térbeli intenzitáseloszlás nagy felbontású leképezését. A gamma-korrekciót 1-re állítottam, hogy biztosítsam a fényintenzitás és a szürkeárnyalat-szint közötti linearitást, a kamera flat-field korrekciós funkcióját pedig úgy állítottam be, hogy kiküszöböljem a CMOS-érzékelő pixelenkénti érzékenységének változásából eredő torzító hatást. Ilyen beállítások és közel homogén megvilágítású (50%-os szürkeárnyalat-szint) tesztmérések mellett a szürkeárnyalat-értékek relatív szórása 1,2%, a számolt kontrasztok átlagának szórása pedig körülbelül 2% volt. A kiolvasási zaj a legnagyobb alkalmazott expozíciós időnél (100 ms) sem volt nagyobb  $\pm 2$  LSB (Least Significant Bit) szintnél, hatását az egymás után rögzített képek átlagolásával minimalizáltam. A fényintenzitás megfelelő szinten tartására (minél magasabb átlagos detektált intenzitás a pixelek telítődésének elkerülése mellett) a kamera elé neutrális szűrőt helyeztem. Minden mérési sorozat előtt a háttér (környezeti fény) rögzítésre került, és kivontam a feldolgozandó képekből.

A vizsgálataim során a diffúzor kivilágításához háromféle, eltérő térbeli eloszlású kollimált nyalábot állítottam elő: i) elliptikus Gauss-profil, amelyet a lézer divergens kimenetének kollimálásával kaptam, úgy hogy az kitöltse a  $D_{\text{max}}=18$  mm maximális átmérőjű apertúrát; ii) homogénebb, egyik irányban közel flat-top eloszlás, melyet nagy fókusz távolságú lencsével kollimált Gauss-nyalábprofil középső zónájának kivágásával kaptam; és iii) a többmódusú optikai szál (Thorlabs FT400EMT, NA=0,39,  $\varnothing 440$   $\mu\text{m}$  magátmérő, 1 m hosszúság) kimeneti multimodális fényét kollimáltam.

A rögzített képeket National Instruments LabView környezetben fejlesztett szoftverem dolgozta fel.

#### **4.3. Speckle méret, sűrűség és az intenzitás eloszlás homogenitásának mérése**

A foltok mérete két módszerrel mérhető: foltok detektálással (blob detection) és autokovariancia számítással. A folt detektálás során a szürkeárnyalatos képek egy adott

küszöbérték megadásával fekete-fehér képpé alakítjuk át, ahol a speckle-k fekete (vagy a beállításoktól függően esetleg fehér) foltokként jelennek meg, amelyeket meg lehet számolni és méretüket meg lehet mérni, ismert pixel méret esetén. A módszer hátránya, hogy a küszöbbeállítás erősen befolyásolja a mért méretet, azonban a módszer nagyon gyors és pontos módszert kínál a speckle szám vagy speckle sűrűség kiszámítására.

A második módszer, a térbeli autokovariancia számítás, amely a speckle statisztikán alapul és adott képet „hasonlít” össze az X-Y síkban eltolt önmagával. A normalizált autokovariancia az

$$c(\Delta x, \Delta y) = \frac{R(\Delta x, \Delta y) - \langle I(x, y) \rangle^2}{\langle I(x, y)^2 \rangle - \langle I(x, y) \rangle^2} \quad (46)$$

ahol  $R(\Delta x, \Delta y)$  az autokorreláció,  $I(x, y)$  az intenzitástérkép és a  $\langle \rangle$  térbeli átlagnak felel meg. Az autokorrelációs függvény definíciója [127]:

$$R(\Delta x, \Delta y) = \langle I(x, y)I(x + \Delta x, y + \Delta y) \rangle \quad (47)$$

A függőleges ( $R(\Delta x, 0)$ ) és a vízszintes ( $R(0, \Delta y)$ ) autokorrelációs függvények egyaránt  $R(0,0) = \langle I(x, y)^2 \rangle$  központi maximummal rendelkeznek, rájuk Gauss függvény illeszthető, melynek félérték szélessége (FWHM) megfelel az átlagos foltméretnek. A körszimmetrikus elrendezés miatt a függőleges és vízszintes irányú speckle méretnek statisztikailag hasonlóknak kell lennie. Ez a módszer pontos eredményeket ad speckle méret meghatározása során, de hátránya a hosszabb számítási idő és a kis hibával történő függvény illesztés nehézsége, amennyiben a speckle méret közel van a pixelmérethez.

Az intenzitáseloszlás homogenitását a legtöbb gyakorlati alkalmazásban (pl. gépi látás) jól jellemzi a kontraszt vagy a Michelson-láthatóság:

$$V = \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max} + I_{min}} \quad (48)$$

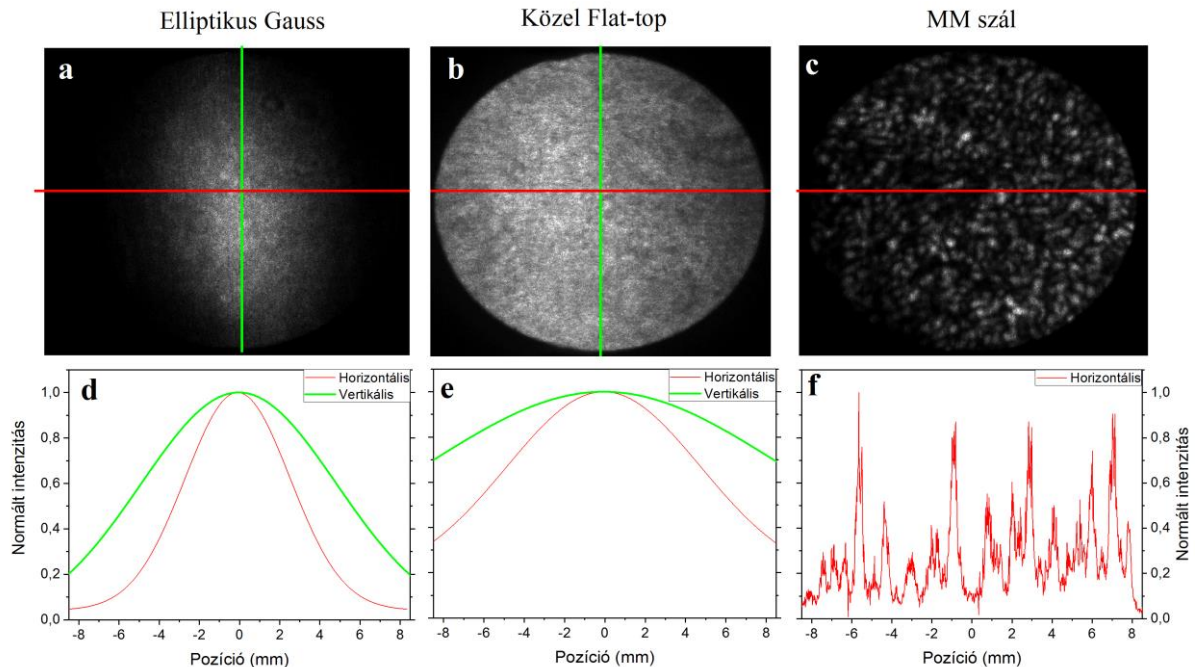
ahol  $I_{max}$  és  $I_{min}$  az intenzitás maximuma és minimuma a vizsgált területen belül, amely esetünkben a speckle méretnél jóval nagyobb. Minél nagyobb a kontraszt, annál nagyobb a speckle mintázat láthatósága, és annál kevésbé homogén az intenzitáseloszlás. Az érzékelő területét 100 pixel széles tartományokra osztottam, amelyek jóval nagyobbak, mint a foltok mérete, és a tartományokon mért helyi kontrasztértékeket átlagoltam.

#### 4.4. Eredmények

##### 4.4.1. A diffúzorra eső intenzitás eloszlások

A diffúzor előtt levő íriszsíkját egy képalkotó optikán keresztül figyeltem meg a kamerával úgy, hogy kiküszöböljem a szubjektív speckle hatását. Az írisz síkjában a függőleges és vízszintes tengely mentén az intenzitáseloszlásokat a 11. ábra mutatja. A kitágított Gauss-

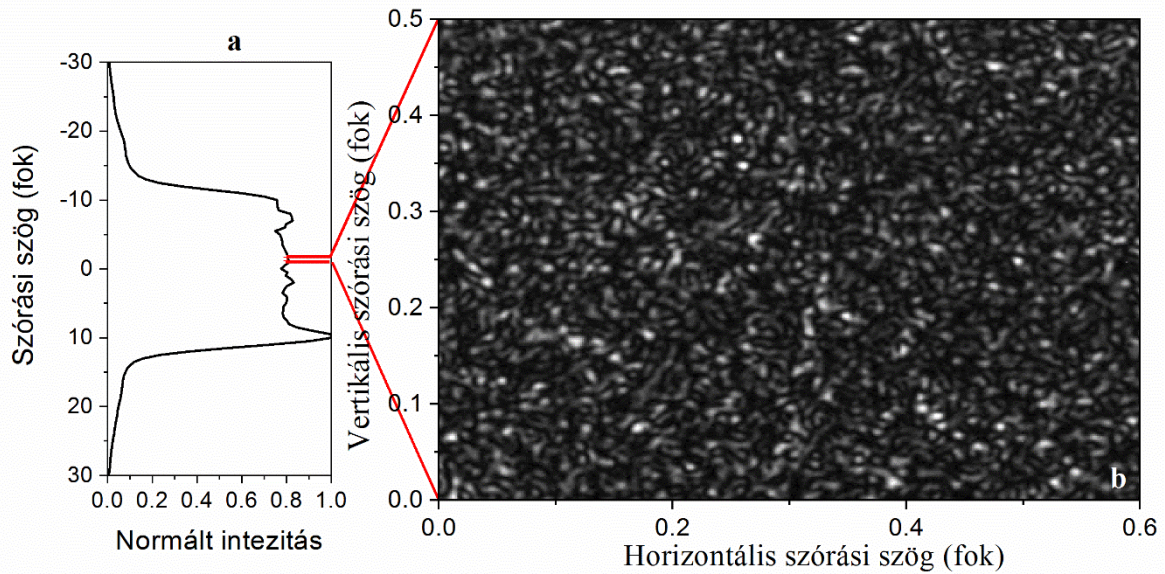
nyaláb középső része (11.b,e ábra) függőleges irányban majdnem homogén eloszlású volt, azonban van egy nagyobb az intenzitás változás a vízszintes irányban. Az MM szálak megvilágítás esetén multimodális profil látható egyenletesen elhelyezkedő szemcsés mintázattal (11. c, f ábra).



11. ábra A képkalkáló módszerrel kapott lézer fényintenzitás-eloszlása a diffúzor síkjában (a, b, c) és az eloszlások megfelelő függőleges (zöld) és vízszintes (piros) profilja (d, e, f)

#### 4.4.2. Diffúzorok által vetített intenzitásprofil jellemzése

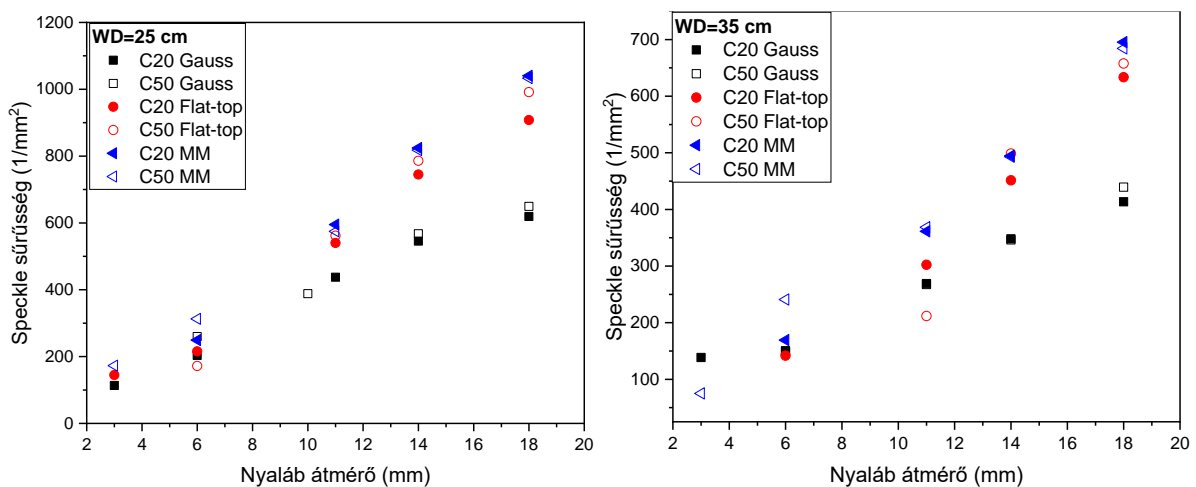
A próbaméréseim szerint, amikor a diffúzor által egy ernyőre vetített képet távolról kamerával néztem, megvilágított terület kör alakú, közel homogén eloszlású volt, a nagy léptékű inhomogenitása nem haladta meg a forgalmazó specifikációnak megfelelő kb. +/- 10%-os értéket (12.a ábra), ezért a továbbiakban a nagyléptékű homogenitást nem vizsgáltam részletesen. Amikor azonban az ernyő helyett a homogenizált fény közvetlenül a kamera érzékelőjére vetült, a nagyobb szögfelbontás miatt (a diffúzortól tekintve a pixelek mérete 0,092 és 0,069 ívperc nyílásszögnek/szórési szögnek felelnek meg a WD=25 cm-es, illetve WD=35 cm-es munkatávolságok esetén) láthatóvá válik az intenzitás kisléptékű inhomogenitása, amely szemcsés (speckle) mintázatot mutat (12.b ábra) bármelyik térbeli intenzitáseloszlású diffúzor kivilágítás és munkatávolság esetén.



12. ábra Az intenzitás tipikus szögeloszlása C20 diffúzorok esetén 638 nm-es lézerhullámhosszon [128] és a kamera által rögzített lokális intenzitáseloszlás nagy szögfelbontásnál  $WD=25$  cm és  $D=6$  mm mellett.

#### 4.4.2.1. A foltok sűrűsége és mérete

A 13. ábra 25 cm és 35 cm-es munkatávolságban folt-detektálással mért speckle sűrűség látható a két diffúzor különböző intenzitás profillal történő megvilágítása esetén. Látható, hogy a speckle sűrűség a  $D$  nyálábátmérő növekedésével együtt nő, ugyanakkor független a diffúzor tervezett szórési szögétől. A Gauss-féle intenzitásprofillal történő kivilágítás viszonylag alacsony speckle sűrűséget eredményez, különösen nagyobb nyáláb átmérők esetén. A két különböző munkatávolságnál kapott tendenciák hasonlóak, a speckle sűrűség értékek a körülbelül munkatávolságok arányának négyzetével skálázódnak, azaz  $(35/25)^2$ -es szorzótényezővel különböznek. Ez azt mutatja, hogy a foltok diffúzortól mérhető átlagos szögtávolsága független a diffúzor szórési szögétől, hanem csak a diffúzor kivilágításának módjától (kivilágított terület és intenzitáseloszlás) függ.



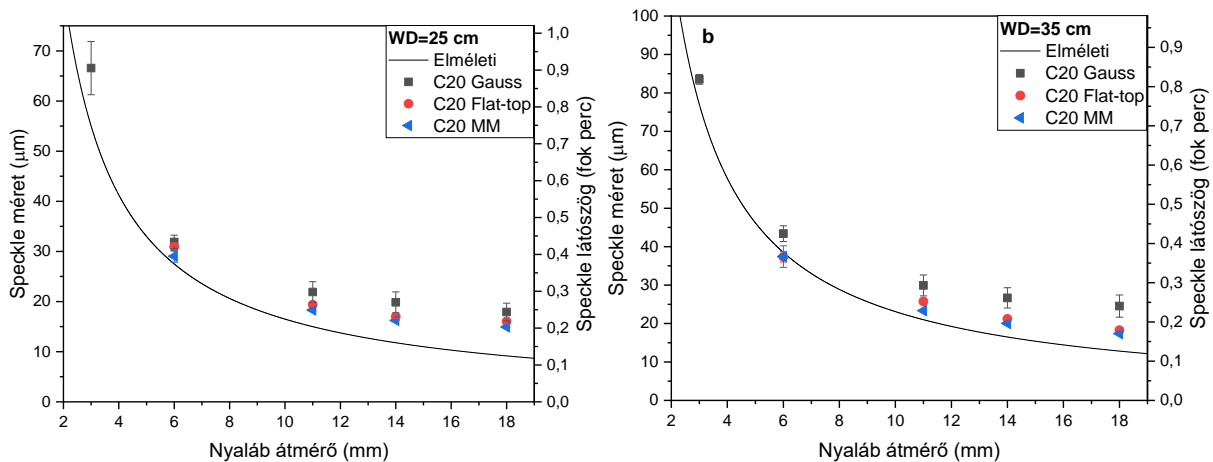
13. ábra A 25 és 35 cm-es munkatávolságon mért folt-sűrűségek C20 és C50 esetén a diffúzort kivilágító nyáláb átmérőjének függvényében.



A 14. ábra az autokovariancia mérésekkel kapott speckle méretet mutatja C20 diffúzor különböző nyalábátmérőjű kivilágítása esetén a két vizsgált munkatávolságon. Az alacsonyabb  $D$  értékű mérési pontok egy része hiányzik, mivel a szórt fény intenzitásának nagymértékű csökkenése a MM és közel flat-top eloszlások esetén nem tette lehetővé pontos meghatározást. A C50 diffúzor hasonló viselkedést mutatott ugyanezen mérési körülmények között. A folytonos vonal a 14. ábrán a Goodman által a távotérbeli objektív speckle méretére ( $d$ ) levezetett elméletnek megfelelő görbe (ld. 2.3.1. fejezet) egyenletesen megvilágított szórófelületek esetén [21], mely az általam most használt jelöléssel a következő:

$$d \cong \frac{\lambda \cdot (WD)}{D}$$

A diffúzor felületét kivilágító folt átmérőjének növelésével a  $d$  közel fordítottan arányos csökkenése volt tapasztalható: a flat-top és az MM megvilágítás esetén a megfelelő speckle méretek gyakorlatilag hasonlóak voltak, míg a Gauss intenzitáseloszlás használatakor ezeknél kissé magasabbak. Ez azt jelzi, hogy a gyorsan csökkenő Gauss intenzitáseloszlás kisebb effektív nyalábátmérőt eredményez, mint a másik két kivilágítási profil. A mért foltméret mindig nagyobb, mint az elméleti modell előrejelzése, az elméleti görbe és a mért adatok közötti eltérés viszonylag nagyobb lesz, ha  $D$  nő. Megjegyzendő, hogy a modell általában referenciaértéket ad, feltételezi, hogy a diffúzor két ellentétes széléről érkező sugarak közötti úthossz különbség kisebb, mint a fényforrás koherenciahossza, a tényleges átlagos speckle méretet a szórt fény statisztikai amplitúdója, fáziseloszlása és koherenciahossza befolyásolja.



14. ábra A foltméret és a megfelelő látószög grafikonja 25 cm (a) és 35 cm (b) munkatávolságra C20 diffúzor esetén

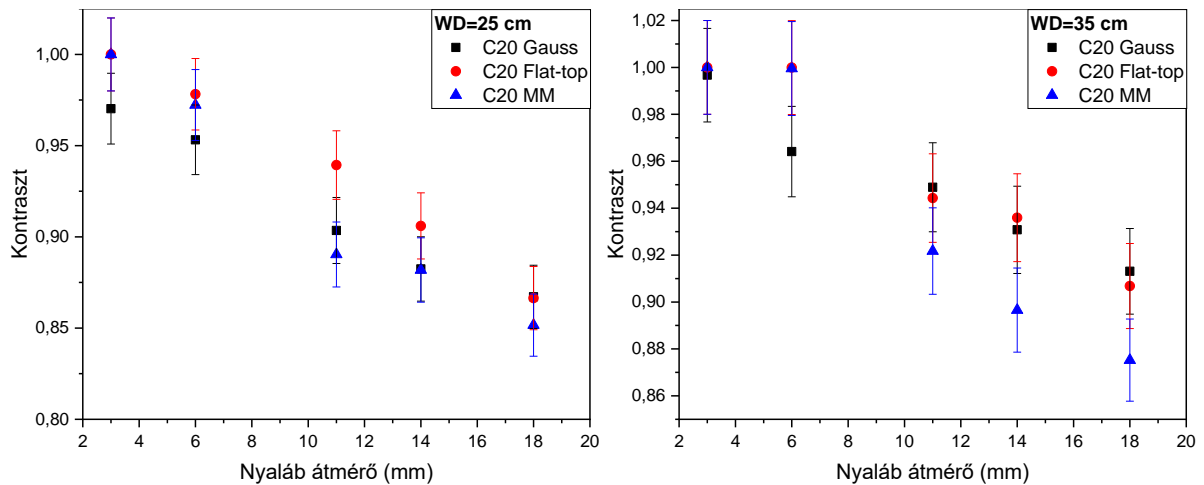
#### 4.4.2.2. Kontraszt

Az érzékelő felületén mért átlagos kontrasztértékek a 15. ábrán láthatók C20 és C50 esetén 25 cm és 35 cm-es munkatávolságnál. A maximális kontraszt közel 1, ami a sötét zónákban a teljes kioltást jelzi, vagyis a koherenciahossz jóval nagyobb, mint az interferáló hullámok közötti úthossz-különbség. A megvilágított folt méretének növekedésével a kontraszt

valamivel kisebb lesz, ami a speckle mintázat térbeli átlagolásával (alulmintavétellel), vagyis a szemcsék méretének csökkenésével magyarázható [129]. A kontraszt csökkenéséhez nagyobb nyaláb átmérők esetén a korlátozott koherenciahossz is hozzájárulhat. MM megvilágítás esetén jelentősebb a kontrasztugrás. Elfogadható magyarázat a kezdetben polarizált fény depolarizációja az MM optikai szálban (esetemben akár 10%). A keresztben polarizált fény létrehozza a saját speckle mintáját, és az eredmény két minta szuperpozíciója, ami csökkent átlagos kontrasztot eredményez. Ezt az érzékelő elé helyezett lineáris polarizátorral két, egymásra merőleges állásánál ( $\updownarrow$  és  $\leftrightarrow$ ) rögzítettem a speckle mintázatot, és ellenőriztem a következő egyenlőséget [21]:

$$\frac{\sigma}{\langle I \rangle} = \frac{\sqrt{\sigma_{\updownarrow}^2 + \sigma_{\leftrightarrow}^2}}{\langle I_{\updownarrow} \rangle + \langle I_{\leftrightarrow} \rangle}, \quad (49)$$

ahol  $\sigma$  a szórás,  $I$  pedig az intenzitás középértéke a vizsgált területen belül. A méréseim szerint, ha a MM szál kimenetének lineárisan poláros fénye esik a diffúzorra, akkor a közel flat-top kivilágításhoz hasonló kontrasztot kapunk.

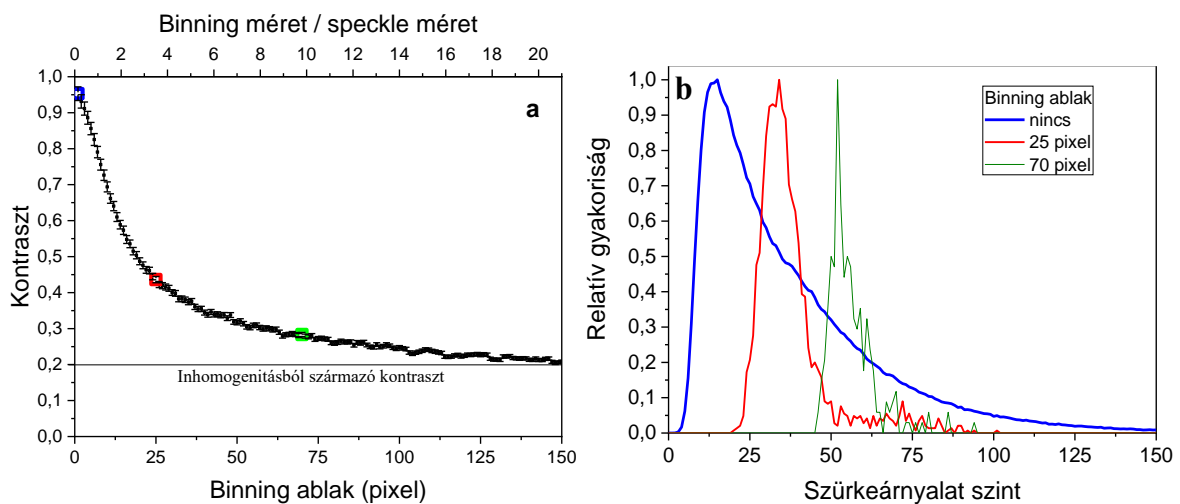


15. ábra C20 esetén mért kontraszt 25 és 35 cm-es munkatávolságnál a nyalábátmérő függvényében.

Az eredmények összességében azt mutatják, hogy az ilyen diffúzorok koherens fénnel történő megvilágítása nagy kontrasztú speckle mintázatot eredményez. Képpalkotó alkalmazásokhoz viszonylag homogén (alacsony kontrasztú) intenzitáseloszlást csak a mintázat megfelelő térbeli átlagolásával lehet elérni. Ennek szimulációjaként pixel binninget alkalmaztam a rögzített képeken, azaz a teljes képet  $n \times n$  pixeles zónákra osztottam fel, ezeknek intenzitásátlagolással egyetlen képpontot feleltettem meg, így a szimulált kép pixeleinek a száma  $n^2$  arányban lecsökkent. Az így generált képeken kiszámítottam az átlagos kontrasztot, valamint az intenzitás hisztogramot, melynek eredménye a 16. ábrán látható. A számolások igen nagyfokú, 150 pixeles binning méret esetén már jelentősebb mértékű,  $\sim 0,2$  kontrasztnak megfelelő homogenitást mutatnak. Ha a binning méretet a speckle foltok méretéhez

viszonyítjuk, akkor a speckle méret körülbelül 10-szerese esetén  $\sim 0,3$  kontrasztértéket kaphatunk, amely kontraszt már elég alacsony lehet ahhoz, hogy perfúziómérésre alkalmas legyen a kivilágítás. Az eredményeket interpolálva, a diffúzorok teljes felületének ( $\sim 24$  mm átmérő) kivilágítása esetén munkatávolságtól függetlenül a C20 és C50 diffúzor esetében körülbelül kb. 750, illetve 1900 effektív pixeles átmérővel képezhető le a felszín úgy, hogy  $\sim 0,3$ , vagy az alatti megvilágítási kontrasztot érzékeljen a kamera. Megapixeles felbontású alkalmazásokhoz a nagyobb szórásszögű diffúzorok a megfelelőbbek, de a diffúzorok átmérőjének további növelésével tovább javítható megvilágított terület átmérőjének és a speckle méretnek az aránya, azaz növelhető az effektív pixelek száma

Meg kell jegyeznem, hogy ha a megvilágítási alkalmazás során gamma-korrekciót (pl. vizuális észlelést) használnék, akkor a nagyobb szűrkeskála szinteken látható kontraszt a kisebb lesz, mint a fent becsült értékek.



16. ábra A térbeli átlagolás intenzitáskontrasztra gyakorolt hatásának szimulációja pixel binning (a) és néhány reprezentatív intenzitási histogram (b) C20 diffúzor esetén (Gauss-profil,  $D=6$  mm,  $WD=25$  cm).

#### 4.5. Összefoglalás

A speciálisan kialakított homogenizáló diffúzorok koherens fényvel történő megvilágítása viszonylag jó nagyléptékű homogenitást eredményez, azonban a nagy felbontású képalkotás feltárja az intenzitáseloszlás kis léptékű szemcsés szerkezetét. A kialakult speckle mintázat nagy kontrasztot mutat gyakorlatilag teljes kioltással, méréseim során a speckle méret közel követte a  $\lambda \cdot (WD)/D$  függvényt, azonban a mért értékek ennél akár 50%-kal is magasabbak lehetnek nagy  $D$  értékeknél. A nagy speckle méret jelentős hátrányt jelent a gépilátási és LASCA alkalmazásokban, ahol a megfelelő homogenitás csak a speckle mintázat megfelelő térbeli átlagolásával érhető el úgy, hogy a képalkotó rendszer laterális felbontásának jóval kisebbnek kell lennie, mint a megvilágítási speckle méret. Bár a tényleges homogenitási követelmények alkalmazásonként változhatnak, a képalkotó rendszer maximális térbeli

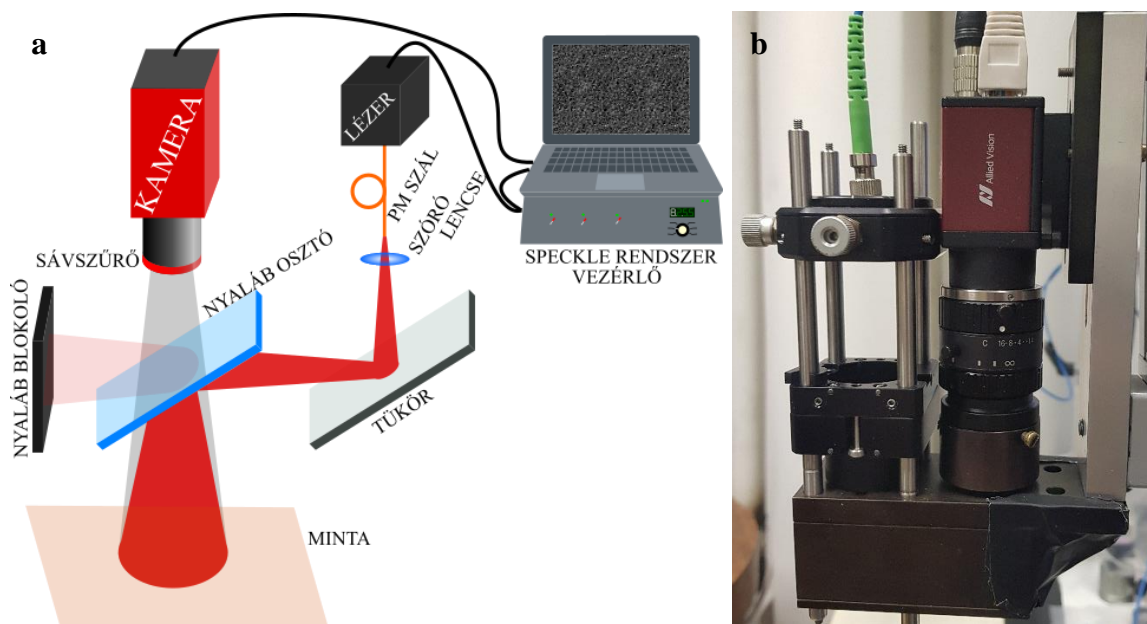
felbontása, amely a foltméret körülbelül 10-szeresének felel meg, jó közelítés lehet. A felbontás további növelése a lokális (rövid léptékű) homogenitás drasztikus romlását eredményezi. Mivel a speckle tulajdonságok függetlenek a homogenizáló diffúzor tervezett szórási szögétől, ezért javasolt a lehető legnagyobb szórási szögű diffúzor alkalmazása, amely rövidebb munkatávolságban a kívánt vetített felület méretet eredményezi. A diffúzort ugyanakkor a lehető legnagyobb felületén ki kell világítani. A könnyű és nagy hatásfokú fénybecsatolás lehetősége miatt a nagy magátmérőjű MM optikai szálakat gyakran előnyben részesítik a fényvezetéshez. Amint eredményeim is mutatják, a fent említett korlátozások figyelembevételével a diffúzorok alkalmasak ezen optikai szálak multimodális kimenetének homogenizálására is. Megjegyzendő, hogy az optikai szálak kimeneti homogenitása javítható időbeli átlagolással, pl. a fényvezetők nagyfrekvenciájú rezgésével, azonban ennek alkalmazhatósága függ a felhasználási céltól.

A diffúzorok vizsgálata során kapott eredményeket a LASCA-ban való alkalmazhatóság szempontjából kielemezve arra a következtetésre jutottam, hogy ezek alkalmazása egy potenciális hibafaktort hozna be a többexpozíciós mérési módszert alkalmazó rendszerembe, mindemellett nehezítené a különböző megvilágítási geometriákhoz (méret, munkatávolság) való alkalmazkodást, ezért elvettem a használatukat.

## 5. A LASCA mérőrendszeren végzett fejlesztések

### 5.1. Bevezetés

A doktori munkám lényeges eleme volt a laboratóriumban meglévő több expozíciós időt használó LASCA mérőrendszer (MESI) hardveres és szoftveres továbbfejlesztése, melynek főbb lépéseit ebben a fejezetben ismertetem. A 17. ábrán látható az általam megtervezett koaxiális megvilágító-leképező egységen alapuló mérőrendszer sematikus felépítése és a megépített optikai egység fényképe. Végül pedig ismertetem a meglévő vezérlő szoftveren általam elvégzett fejlesztéseket is.

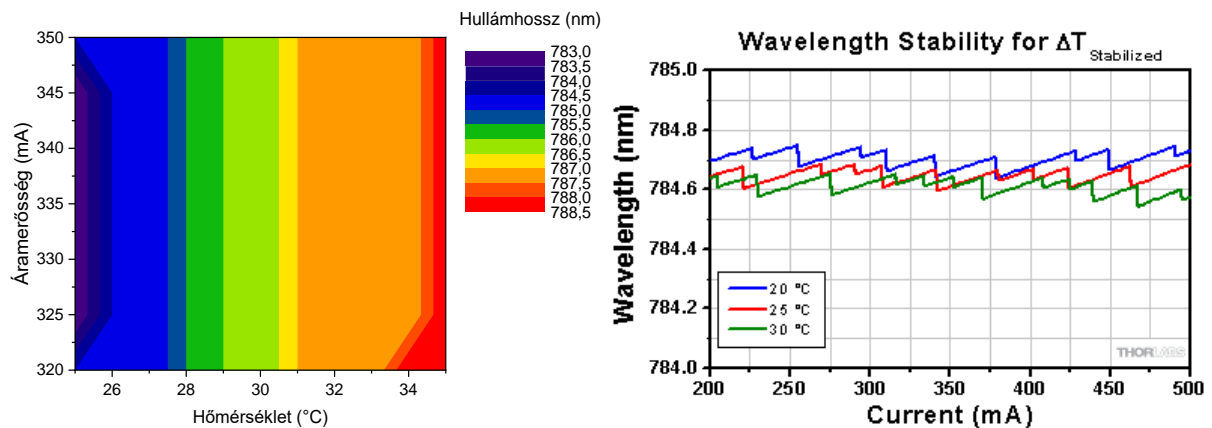


17. ábra A kísérleti elrendezés sematikus ábrája (a) és a kompakt koaxiális megvilágító rendszer és kamera rögzítése a mozgatható karra (b)

### 5.2. Lézer

A többszörös expozíciós időt használó rendszeremben a kutatócsoport által korábban is alkalmazott áram modulált impulzusüzemű lézervezérlést használtam, ami szükségessé tette az alkalmazott dióda lézerek gondos hangolását. Ezen megvilágítási módszer lényege, hogy az expozíciót adott számú azonos fényimpulzus sorozat adja (13 db, 47  $\mu$ s impulzus hosszú), az expozíciós idő hossza az impulzussorozat időbeli nyújtásával/összenyomásával szabályozható. Kezdetben egy hőmérséklet stabilizált foglalatban (Thorlabs LDM21) elhelyezett 785 nm körüli hullámhosszú Fabry-Perot lézervediódát (Thorlabs LD785-SH300) használtam. Ezen lézer spektruma ebben a meghajtási módban nagyon instabil, emiatt egy megfelelő paraméter tartományt (hőmérséklet, áramerősség) kellett keresnem a hullámhossz stabil, módusugrásmentes működéshez. Amennyiben LASCA mérés közben a hullámhossz képről képre megváltozik, akkor az maga után vonja a speckle méret és az abból következő kontraszt

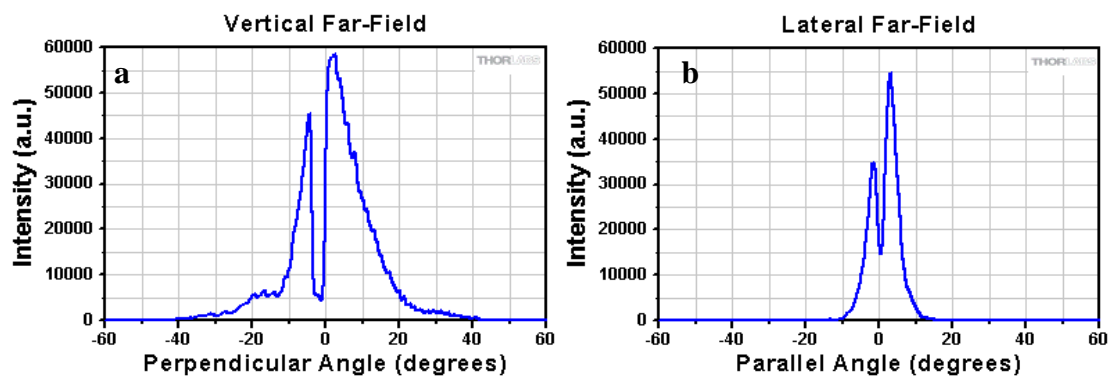
változását, ugrását is. Ennél azonban lényegesen nagyobb problémát jelent, ha egyetlen kép rögzítése során történik módusugrás, ebben az esetben ugyanis az interferenciakép hirtelen megváltozik és hamis kontraszt adatot kapunk. Ezen effektusok külön-külön is megbízhatatlanná tehetik a perfúziós méréseket, ezért a lézer üzemeltetési paramétereit gondosan kell megválasztani. Ehhez fel kellett vennem egy áramerősség, hőmérséklet és hullámhossz térképet (ld.: 18.a ábra) különböző expozíciós idők esetén.



18. ábra Egy hagyományos Fabry-Perot lézercióda áramerősség, hőmérséklet és hullámhossz térképe 9 ms-os expozíciós idő esetén (a), valamint VHG stabilizált lézercióda hullámhossza stabilitása különböző hőmérsékleteken és áramerősségeken esetén

A térképen láthatók a különböző módusokhoz tartozó áramerősség és hőmérséklet tartományok, ezek közül a legszélesebbet még részletesebben feltérképeztem különböző expozíciós idők esetén, és egy olyan működési paramétert választottam ki, ahol a lézer spektrumának alakja mindegyik alkalmazni kívánt expozíciós idő esetén nagyon hasonló volt. Mindezek után következett egy hosszú idejű (több mint 4 óra) járatás, amely során azt vizsgáltam meg, hogy mikortól kezd el stabil lenni egy PTFE tömbön felvett kontraszt (ez a bemelegedési idő) és meddig marad az (maximális mérési idő). Ezek tudatában a tudtam megtervezni későbbi méréseim időtartamait.

Ahhoz, hogy ez a hosszadalmas folyamatot kiküszöbölhessem egy 785 nm hullámhosszú, 300 mW átlagos teljesítményű, VHG (volume holographic grating) hullámhossz stabilizált lézerciódát (Thorlabs LD785-SEV300) szereztünk be, melynek működési hullámhossza csak kis mértékben függ a hőmérsékletváltozásoktól, illetve az áramerősségtől (ld. 18.b ábra), emiatt sokkal alkalmasabb az általam használt villogtatott meghajtáshoz. Ezen diódához már nem volt alkalmas a fent leírt lézerfoglat, emiatt egy nagyobbra (Thorlabs LDM9) cseréltem le, amelyben jóval stabilabb hőmérsékletet lehet elérni. A hullámhossz-stabil üzemeltethetőség mellett a lézer másik előnyös tulajdonsága a keskeny sávzélessége (és nagy koherenciahossza), amelynek következtében LASCA rendszerekben nagyobb az ezzel elérhető kontraszt [80].



19. ábra VHG lézer dióda vertikális és laterális (a és b) intenzitás eloszlása

Hátránya ennek lézerdiódnak az, hogy nagyon érzékeny a fény visszacsatolásra, emiatt minden optikai elem antireflexiós bevonattal kell rendelkezzen. Emellett a térbeli intenzitáseloszlása (ld. 19. ábra) egy „lyukat” tartalmaz, amely miatt közvetlenül nem alkalmazható a LASCA mérések által megkövetelt homogén megvilágítás megvalósítására. Ezen probléma áthidalását az alábbi alfejezetben mutatom be.

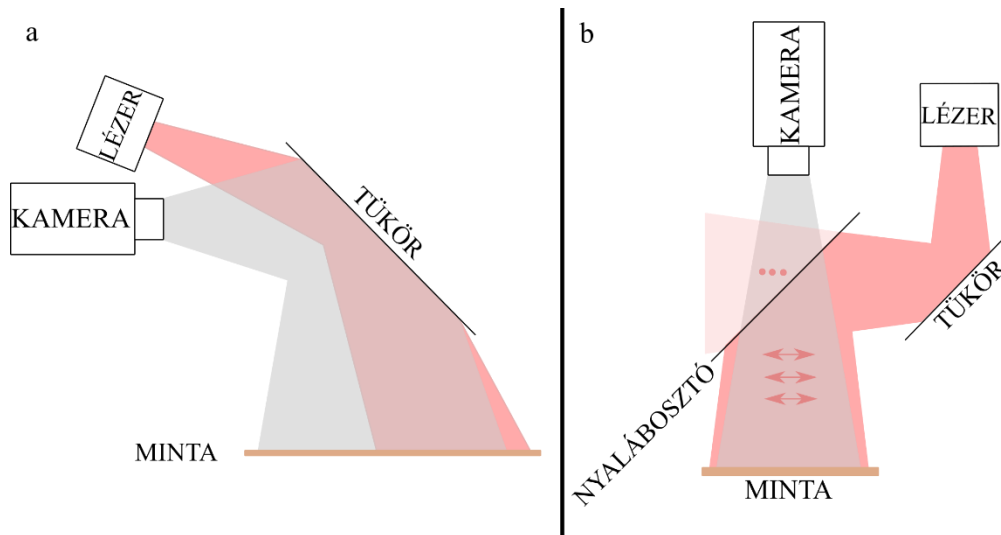
### 5.3. PM optikai szálba csatolás

Mivel az általam használt lézerdióda intenzitásának térbeli eloszlása egy elliptikus Gauss, melynek a közepe ki van takarva (19. ábra) fényét egy egymódusú optikai szálba való csatolás során fellépő térbeli szűréssel közel Gauss eloszlásra tudtam alakítani. A fényvezető szál alkalmazásának másik előnye, hogy a lézert nem kellett közvetlenül a flexibilis karra elhelyezett optikai egységbe építeni, így kisebb lett ennek a tömege. A lézer fényét kollimáló és azt az optikai szálba becsatoló aszférikus lencsepár legideálisabb fókusz távolságainak meghatározásához számolásokat végeztem. A kollimált lézerfényt egy kétszeres nagyítású anamorf prizmapáron (Thorlabs PS875-B) vezettem keresztül a nagyobb körszimmetria elérése érdekében [130], tovább javítva az optikai szálba csatolás hatékonyságát. Fényvezetőnek egy polarizációt tartó egymódusú optikai szál (Thorlabs PM780-HP) választottam, elkerülendő az optikai szálban fellépő esetleges mechanikai feszültségek miatti depolarizációt és biztosítva ezzel a megvilágító rendszer stabil polarizációs síkját. Ezen szál vége  $8^\circ$  fokos szögben volt vágva (FC/APC csatlakozó), ezzel is minimalizálva a szálvégről esetleges visszaverődések visszajutását a lézerbe. A becsatoláshoz felépítettem egy 5 szabadsági fokkal rendelkező optikai rendszert. Az első két szabadsági fokot (a lézerfény és az optikai szál tengelyének párhuzamosra állítását) két, egymásra közel merőleges tükörrel értem el, melyeket finoman dönthető tartóban (Thorlabs KM100) helyeztem el. A következő két legfontosabb szabadsági fok a szál vég x és y irányban való mozgatása a fókuszáló lencse optikai tengelyhez képest. Ezen translációs beállításhoz szükségem volt a legpontosabb pozicionálásra, emiatt mindkét irányba differenciális mikrométer csavarral ellátott tartóba (Thorlabs ST1XY-D/M) raktam be az

antireflexiós bevonattal ellátott aszférikus becsatoló lencsét. Az ötödik szabadsági fok pedig a lencse és a szál közötti távolság, melynek állítására a szálvéget egy mikrométer csavarral rendelkező tartóba (Thorlabs SM1ZA) szereltem. A PM szál és a lézer polarizációs síkjának finom állításra sajnos nem volt lehetőségem.

#### 5.4. Koaxiális megvilágító-leképező elrendezés

A képalkotó-megvilágítás elrendezésre két módszer jöhetett számításba az egy- és kétutas, amelyekről egy sematikusán a 20. ábrán láthatóak.



20. ábra A két (a) és egyutas (b) koaxiális megvilágítás-képalkotó rendszer vázlatos elrendezései

A mérőrendszert úgy terveztük, hogy alkalmazható legyen nehezen hozzáférhető, szűk, csak tükör közbeiktatásával elérhető helyeken való mérésekre is. Először a hagyományos két utas elrendezést próbáltam ki, ahol a megvilágítás és a kamera optikai tengelye adott szöget zár be egymással. Ahogy a 20. ábrán is látható, egy tükörfelület maximális kihasználása mellett, a megvilágítás és a megfigyelt terület nem esik teljesen egybe, ami bizonyos felhasználási célok esetén problémát okozna. Ezért végül egyutas, koaxiális megvilágítás-képalkotó rendszert terveztem és építettem meg egy nagy kontrasztú polarizációs nyalábosztó lap (Thorlabs PBSW780R) alkalmazásával. A nyalábosztó biztosította a keresztpolarizációt a megvilágító és a kamerába jutó fény között, valamint minimalizálta a mintáról történő közvetlen visszaverődés hatását. Osztólap helyett alkalmazhattam volna polarizáció osztókockát is, de a kutatócsoport korábbi megfigyelése az volt, hogy a kocka hátoldaláról reflektált fény még antireflexiós bevonat estén is zavarta a nagyobb távolságban történő méréseket. A koaxiális rendszer munkatávolságok széles tartományában biztosítja a megvilágítás és látótér megfelelő átfedését, emellett használatával elkerülhető a nem síkfelületek ferde megvilágításánál megfigyelhető árnyékhatások. Ahhoz, hogy a rendszer kompakt legyen, az optikai elemeket egy általam tervezett alumínium házban helyeztem el (ld:17.b ábra). Minderre azért volt szükséges, hogy a

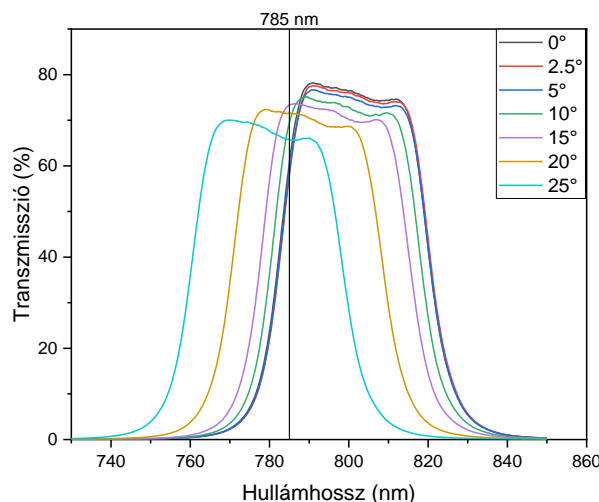


kutatócsoport által korábban megtervezett és felépített mobilmérőállomás mozgatható karjára könnyedén felszerelhetővé váljon.

### 5.5. Képképző rendszer, kamera

A speckle képeket egy NIR-ben érzékenyített monokróm CMOS-kamera (Allied Vision, Mako G-419B NIR,  $2048 \times 2048$  px,  $5,5 \mu\text{m} \times 5,5 \mu\text{m}$  pixelméret, 12 bites bitmélység, global shutter mód) rögzítette. A méréseim során használt objektív egy Computar M3514-MP ( $f=35$  mm), az  $f/\#$  16 volt, a képek térbeli felbontása pedig  $65 \mu\text{m}/\text{px}$ .

A környezeti fény hozzájárulását egy sávszűrővel (Thorlabs FB800-40) minimalizáltam, amelyet a működő lézer hullámhosszához hangoltam annak enyhe megdöntésével, melyet a gyártó is javasol. A pontos megdöntési szög megállapításához, megmértem a sávszűrő transzmisszióját különböző beesési szög esetén egy spektrofotométerrel (Shimadzu UV-2101PC).



21. ábra A sávszűrő (Thorlabs FB800-40) transzmisszió görbéje különböző beesési szögek esetén

A transzmissziós görbék (21. ábra) alapján  $20^\circ$  döntést választottam, mert ebben az esetben volt a legnagyobb a transzmisszió a használt lézer dióda hullámhossz  $\pm 10$  nm környékén, mely biztosította, hogy a kamerába különböző szögek alatt érkező szórt lézertény is átengedje.

### 5.6. Vezérlő szoftver

Az expozíciós időket képkockáról képkockára változtattam a 1-162 ms tartományban a beállított értékek pedig a következők: 1, 3, 9, 27, 81 és 162 ms, a [46,74] hivatkozásokban részletesen leírt módon. A környezeti megvilágítás hatását a periodikusan rögzített háttérképek kivonásával küszöböltem ki. A speckle képeket a kutatócsoport által kidolgozott, de általam tovább fejlesztett LabVIEW (National Instrument) szoftverrel rögzítettem és elemeztem. Ezen

fejlesztések során a programba beleilleszttem a fentebb említett kamerát, illetve a képkészítési sebességet is megemeltem 5 fps-ről 7,5 fps-re, valamint optimalizáltam a szoftvert.

A kutatócsoport korábban firewire csatlakozású kamerát használt (Pixelink PL-B741F) a LASCA rendszerében, de mostani pedig egy GigE Vision (ethernet) szabványú, emiatt ezt implementálnom kellett a speckle rendszert vezérlő Labview szoftverben. Ennek során a szoftvert úgy alakítottam át, hogy a régebbi kamera is használható legyen. Mindenek során a kialakítottam a kamera hiba kezeléséért, inicializálásáért és a képek rögzítéséért felelős programrészleteket.

### 5.7. Vezérlő elektronika

A lézer dióda áram modulált vezérlésére a kutatócsoport által korábban kifejlesztett egy 8 bit-es AtMega mikroprocesszor köré felépült áramkört használtam. Ezen áramkör felelős mind az expozíciós/megvilágítási időért (lézer villogtatásáért) mind pedig a kamera kép rögzítését indító jel/jelsorozat előállításáért.

A dióda meghajtásához és állandó hőmérséklet tartáshoz egy OEM (Thorlabs ITC110) lézer dióda vezérlőt használtam. Ezt, valamint a modulálásért felelős áramkört együtt egy műszerdobozba helyeztem el. Mivel ezek az eszközök nagyon érzékenyen reagálnak táplálásukra használt feszültségforrás zajaira, egy ezen célra kifejlesztett és megépített több feszültség kimenetű tápegységet használtam. A lézerdiódát hőmérséklet-szabályozott tartóba helyeztem, a változások gyors és pontos lekövetése céljából ehhez PID hangoltam az alkalmazott OEM vezérlőt, ezzel is minimalizálva a hullámhossz eltolódásokat és módusugrások valószínűségét.



22. ábra Az általam bedobozolt, a lézerdióda meghajtásáért, állandó hőmérsékleten tartásért és vezérléséért felelős modulok (fent) illetve a hozzátervezett több feszültség kimenetű tápegység (lent)

## 5.8. *Összefoglalás*

Felépítettem egy olyan kompakt rendszert, amely alkalmazható lehet változatos mérési körülmények között. A LASCA fejlesztése során egy olyan hullámhossz stabilizált lézer diódát alkalmaztam, amely nagymértékben megrövidítette áram modulált speckle rendszer be szabályozásához szükséges időt. A lézer fényének egymódusú polarizációtartó optikai szálba csatolásának kettős hozadéka volt: a térbelileg inhomogén lézerfényből sikerült egy Gauss intenzitás profilú megvilágítást kialakítani, emellett egy kis tömegű kompakt optikai egységet tudtam kialakítani. Nagyobb becsatolási hatásfokot értem el, mintha az ugyanezen lézerdiódának közvetlenül optikai szálba csatolt (pigtail) verzióját használtam volna, a NIR-ben érzékenyített kamerával együtt így nagyobb felületek véráramlása is vizsgálhatóvá vált optimális fényerő mellett. A koaxiális megvilágító-kamera elrendezés felépítése lehetőséget adhat árnyékmentes és szűk helyeken (pl: szájüreg) való perfúzió mérések könnyebb elvégzésére. A mérőrendszer stabilitásának további növelése érdekében továbbfejlesztettem a MESI rendszer vezérlő elektronikáját, valamint a vezérlő szoftverét.

## **6. A vegyes szórás hatása a LASCA mérések eredményeire**

### **6.1. Bevezetés**

Az elméleti áttekintő részben ismertetett kontraszt modellek, melyeket abból a célból vezettek be, hogy korrigálják (pl. bőrön történő vizsgálat, esetén) a statikus szórás jelentős hozzájárulását, azon az egyszerűsítésen alapulnak, hogy a speckle képek kialakulásához olyan fotonok járulnak hozzá, amelyek kizárólagosan vagy a felszíni mozdulatlan részecskéken, vagy pedig az alsóbb, vörösvértesteket tartalmazó térfogatban szóródnak. Mivel a szórás egy valószínűségi folyamat, kell legyenek olyan fotonok, amelyek vegyes szórást szenvednek, azaz mind a felületi, mind pedig a mélységi rétegekben egyaránt szóródnak. Ennek a problémáját más kutatók is felvetették [131], de részletesebben nem vizsgálták.

A korábbi, szöveti modelleken végzett mérések [45] azt mutatták, hogy ha a polisztirol mikrogömb szuszpenziót valamilyen szóró réteggel (pl. Teflon) lefedik, a korrekciós modellek alkalmazása mellett is a fedetlen szuszpenzióhoz képest némileg nagyobb korreláció időt (látszólag lassúbb Brown-féle mozgás) kapunk. Felmerül a kérdés, hogy a modellek rosszul számolják ki az intenzitásfluktuáció korrelációs idejét, vagy maga a korrelációs idő tolódik el például a vegyes szórás hatása miatt, esetleg minkét tényező hozzájárul az eltéréshez.

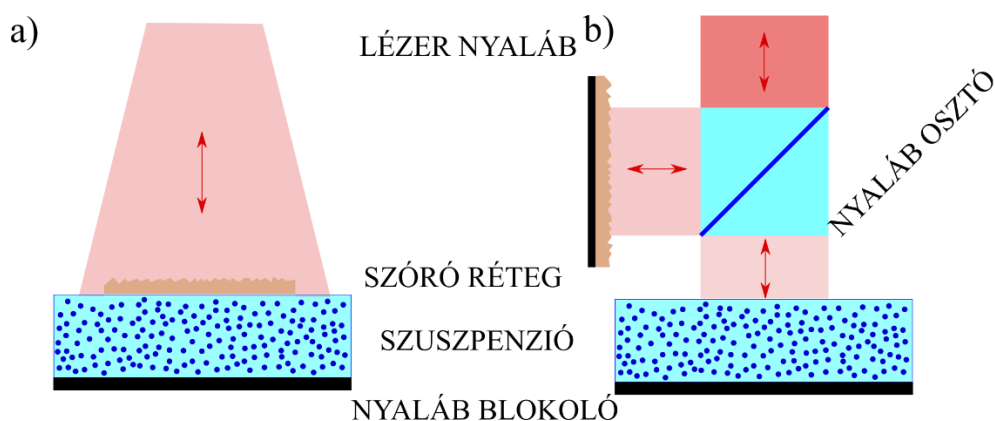
Ebben a fejezetben ismertetem azt a szisztematikus kísérletsorozatot, mely során azt vizsgáltam, hogy különböző mértékű statikus szórás esetén milyen hatással van a vegyes szórás a mért kontrasztra és az ebből két különböző kiértékelési módszerrel számolt korrelációs időre.

### **6.2. Kísérleti elrendezés**

A mérésekhez az előző fejezetben részletesen ismertetett, koaxiális megvilágító-leképező rendszert alkalmaztam (17.a ábra). A képek rögzítéséhez használt expozíciós időt képről képre változtattam a következő expozíciós idő sorozat ismétlésével: 1, 9, 3, 9, 9, 27, 9, 75 és 9 ms.

### **6.3. Szövet modellek és élő szövet mérési protokoll**

Méréseket szövetmodelleken és kéz bőrön végeztem, miközben változtattam a mintákon a dinamikus és statikus szórások arányát. Klasszikus szövet modellnek (23. ábra) vizes alapú polisztirol (PS) mikrogömb szuszpenziót (0,625 m/m%, monodiszperz, átlagos részecskeméret 3  $\mu\text{m}$ ; microParticles GmbH, Berlin, Németország) használtam, amely egy 1 cm-es fény úttal rendelkező üvegküvetében volt.



23. ábra A két mintamodell: klasszikus szövetmodell (a) és a statikus és a kevert szórás szétválasztása (b).

Az elfektetett kűvetta tetején különböző mértékben szóró rétegeket (50-200  $\mu\text{m}$  vastagságú PTFE-fóliák, pauszpapír, matt üveg diffúzor és ezek kombinációi) helyeztem el a szövetek statikus szórásának szimulálása érdekében. A kűvetta belső felületére tapadt PS-részecskék úgyszintén statikus szóró rétegeként viselkedhettek, ezért a tisztán dinamikus szórásnak megfelelő referencia méréseket nyílt felszínű szuszpenzióon végeztem el. A mérésorozatok előtt a szuszpenziót ultrahanggal felráztam és hagytam szobahőmérsékletűre visszahűlni, hogy a mikrogömbök Brown-mozgásának átlagos sebessége azonos legyen. A teljes 20 perces mérési idő alatt nem volt megfigyelhető szedimentációs hatás, ülepedés.

Építettem egy módosított modellt is, amely lehetővé tette a statikus és dinamikus komponensek relatív hozzájárulásának változtatását, miközben kizárta a klasszikus szöveti modellek esetében előforduló vegyes szórás hatásait. Az elrendezés alapja egy antireflexiós réteggel bevont nyalábosztó kocka (Thorlabs BS017, R:T=40:53,6 a lézer hullámhosszán). A statikus szóróréteget és a mikrogömb szuszpenziót a kocka szomszédos oldalain helyeztem el, ahogyan az a fenti 23.b ábrán is látható. Különböző statikus szóró rétegek alkalmazásával és a minták pozíciójának felcserélésével az összetevők relatív hozzájárulása változtatható volt.

Az élő szövetes méréseket kézfejen lévő bőrön végeztem állandó szobahőmérsékleten egy  $\geq 20$  perces akklimatizációs időszak után. A bőrön a vizsgált területet (ROI) úgy választottam ki, hogy elkerüljem a mélyebben elhelyezkedő nagyobb erek jelenlétét, amelyek befolyásolhatják a szöveti perfúzió mérést [77]. A megfigyelt régió szórási tulajdonságainak megváltoztatása érdekében a ROI-t részben szóró rétegekkel fedtem be, akár csak a szövetmodell-kísérleteknél. A bőr és a fedőréteg közzé desztillált vizet cseppentettem, hogy csökkentsem a határfelületek közötti reflexiót. Minden mérés 45 másodpercig tartott és háromszor ismételt meg. A mérések között 2 perces szüneteket tartottam, az eredményeket átlagoltam.

#### 6.4. A $\rho$ statikus és dinamikus szórási arány bevezetése

A térbeli speckle kontrasztot  $5 \times 5$  pixeles csúszóablakban számítottam ki a kutatócsoport által fejlesztett Labview szoftver segítségével. Az adatelemzést és a függvények illesztését a nemlineáris legkisebb négyzetek regressziós módszerével a Microsoft Excel és az Origin szoftverekkel végeztem el. Az utóbbi esetben a Pearson-féle korrelációs együtthatókat is kiszámítottam és feltüntettem a grafikonokon. A korrelációs időket és a dinamikus hozzájárulásokat a (36) és (33) egyenletek által leírt két különböző számolási modellel is kiszámítottam. A dinamikus hozzájárulás jellemzésére az (36) egyenlet alapján egy új mennyiséget vezettem be. Egy ideális, zajmentes speckle mérés esetén a statikus szórás teljesen elhanyagolható, ilyenkor a kontraszt-expozíciós idő görbe  $T \rightarrow \infty$  és  $T \rightarrow 0$  esetekhez tartozó két aszimptotája  $K(\infty)=0$  és  $K(0)=P_1$ . Ha statikus szórás is jelen van, akkor  $K(\infty)=P_2$  és  $K(0)=(P_1^2+P_2^2)^{1/2}$ . Ezért definiálhatunk egy mennyiséget ( $\rho$ ) a dinamikus szórás hozzájárulásának jellemzésére:

$$\rho = \frac{P_1}{P_1 + P_2} \quad (50)$$

Az (36) egyenletet némileg módosítani kellett, hogy kvantitatív módon el lehessen különíteni a statikus szórás és a mérési zaj ( $v_{noise}$ ) hatását. A mérési zajt eredetileg nem vették figyelembe, mivel az nem befolyásolja a származtatott korrelációs idő értékét. Így az (36) egyenlet a következőképpen írható át:

$$K(T)^2 = P_1^2 \frac{\tau^2}{2T^2} \left[ \exp\left(\frac{-2T}{\tau}\right) - 1 + \frac{2T}{\tau} \right] + P_2^2 + v_{noise} \quad (51)$$

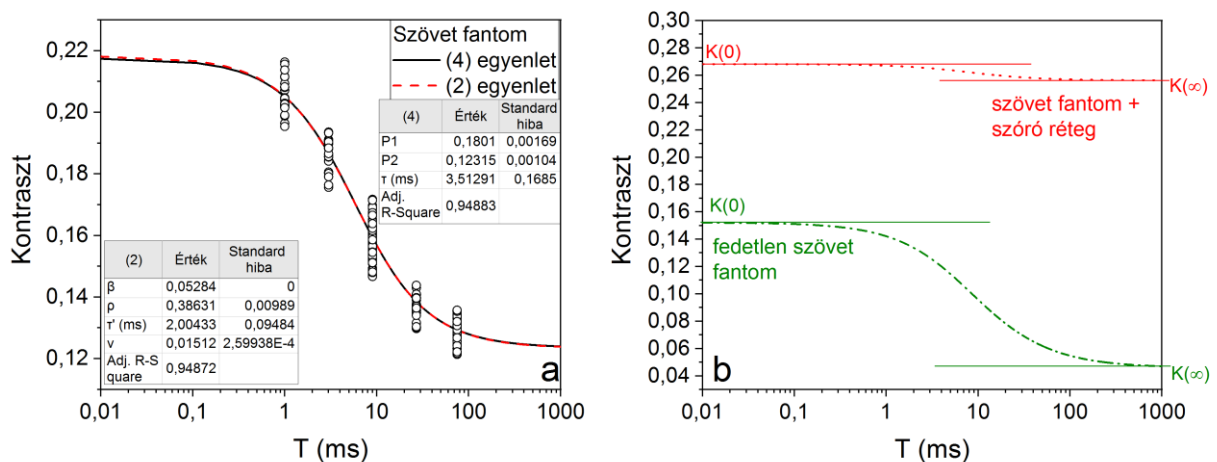
ahol a kísérletileg mért  $v_{noise}$   $1.68 \times 10^{-3}$ -nak bizonyult. A zajt a nyílt felszínű szuszpenzió esetén kapott legalacsonyabb  $K(\infty)$  kontrasztból határoztam meg, mivel ez tekinthető tisztán dinamikus hozzájárulásnak a kontraszt modellek esetén ( $P_2=0$ ). Ezt követően a  $P_1$ ,  $P_2$  és  $\tau$  értékeket a kísérletileg mért kontrasztadatoknak az (51) egyenlet segítségével történő illesztésével kaptam meg a rögzített  $v_{noise}$  érték alkalmazásával. Az összehasonlításhoz felhasznált másik módszer a Parthasarathy és mtsai. által javasolt (33) egyenlet, melynek a mérési adatokra való illesztésével úgyszintén meghatároztam a korrelációs időt ( $\tau'$ ) és a dinamikus szórt fény hozzájárulását ( $\rho'$ ). Amint látható, a két különböző modellből származó adatok megkülönböztetésére indexeket alkalmaztam. Mivel a (33) egyenlet 4 illesztési paramétert tartalmaz, az illesztés pontatlannak bizonyult a nagymértékben dinamikus szórás ( $\rho'=1$  körül) tartományában. Ezért kezdetben a  $\beta$ -t több, szabadfelszínű szuszpenzió végzett mérés alapján számoltam ki, amelyek esetében  $\rho'=1$  értéket vehetem figyelembe. Ezt a módszert Parthasarathy és mtsai. is javasolták, mint lehetséges megoldást az illesztési nehézségek

leküzdésére [37]. A bőrön végzett méréseknél azonban nincs tisztán dinamikus szórás, ezért a (33) egyenlet szabadon változó paraméterekkel illesztettem meg. Az ebben a régióban végzett szövetmodell-méréseknél a négyváltozós illesztés összhangban volt azokkal a számításokkal, ahol a  $\beta$  értéket rögzítettem.

## 6.5. Eredmények

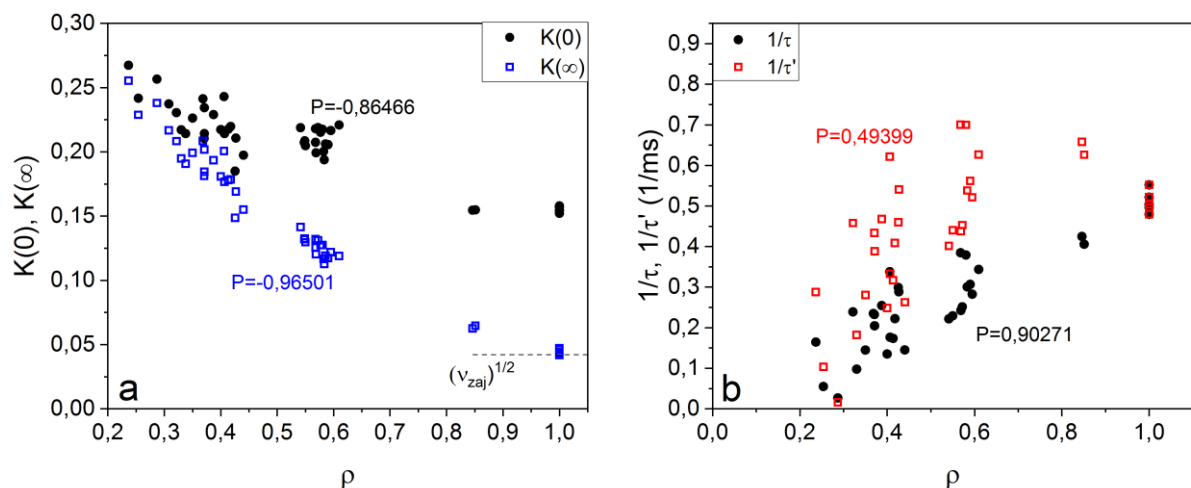
### 6.5.1. Klasszikus szövet modell

Az optikai elrendezést ebben a fázisban úgy optimalizáltam, hogy az  $5 \times 5$  pixeles alterületeken számolva maximális kontrasztot érjek el. Adott képen belül a kontrasztterképek jel-zaj viszonya (SNR), amelyet a kontrasztértékeknek a ROI átlagos kontrasztjához viszonyított standard eltéréseként határoztam meg, 6,6 és 4,2 között volt, anélkül, hogy egyértelműen függött volna az alkalmazott szöveti modellektől. Ezek az értékek az irodalomban lévő LASCA mérések tipikus tartományába esnek [43,132]. Az átlagos kontraszt képről képre való fluktuációja kevesebb mint 4%-osnak bizonyult. A szövetmodell-mérésekből kapott kontraszt adatokra  $K(T)$  mindkét modellt (a (51) és a (33) egyenlet) illesztettem. Amint azt a 24.a ábra egy mérési példán is bemutatja a két modell illesztési görbéi átfedik egymást és csak kisebb eltérés látható 1 ms-nál rövidebb expozíciók esetén. Az illesztési paraméterek relatív hibái megfeleltek az ilyen méréstípusoknál általában tapasztaltaknak. A statikus fedőréteg jellegzetes hatása a  $K(T)$  görbére és annak  $K(\infty)$  és  $K(0)$  aszimptotikus értékeire a 24. ábra látható: míg a  $K(\infty)$  egyértelműen növekszik, a  $K(0)$  és a  $K(\infty)$  konvergál. A  $K(T)$  görbe dinamikus tartományának beszűkülése jól mutatja a dinamikus szórás hozzájárulásának csökkenését. Meg kell jegyezni, hogy a szuszpenzió és a fedőréteg szórási tulajdonságai függvényében a fedőréteg alkalmazása a  $K(0)$  csökkenését is eredményezheti.



24. ábra Példa a két kontrasztmodell illesztésére a szövetmodell kontraszt adataira (a) és példa a kontrasztgörbékre a szuszpenzió feletti statikus szóró réteggel (piros) és anélkül (zöld) (b). Az a. ábra mutatja az illesztési paramétereket és azok hibáit is

A felületi szórórétegek nagyszámú kombinációjával végeztem méréseket és értékeltem ki ezeket. A 25.a ábrán a  $K(0)$  és  $K(\infty)$  aszimptotikus kontrasztértékek láthatók a dinamikus arány ( $\rho$ ) függvényében, amelyeket az (51) összefüggés alkalmazásával kaptam, a megfelelő illesztési paraméterekből származtatva (lásd az (50) egyenletet). Mivel a speckle képek statisztikai hibával terheltek, a mért adatok is szórnak, azonban a korreláció még mindig nyilvánvaló. A dinamikai hányad ( $\rho$ ) csökkenésével mind a  $K(0)$ , mind a  $K(\infty)$  aszimptotikus kontrasztok konvergálnak a vastag statikus szórási rétegen mérhető érték irányába. Meg kell jegyezni, hogy bár a fedetlen küvetében mért PS szuszpenzió esetében hasonló dinamikus arányt várnánk, mint a szabad levegőn ( $\rho=1$ ), a megfigyelt eltérés (1 helyett  $\sim 0,85$ ) annak tulajdonítható, hogy mikrogömbök megtapadnak a küvetta belső falán, és statikus szóróréteggént viselkednek. A 25.b ábra a két kiértékelési módszerrel számított inverz korrelációs időket (SPU) mutatja a dinamikus hozzájárulások függvényében ( $\rho$ ). Tisztán dinamikus szórás esetén ( $\rho=\rho'=1$ ) a (33) és (51) egyenletek egyenértékűvé válnak, ekkor  $\tau=\tau'$ . Jól látható, hogy bár mindkét módszer célja a statikus szórás hatásainak kiküszöbölése, a mért SPU-értékeket a statikus szórás jelenléte befolyásolja. Parthasarathy és mtsai. módszere szerint a statikus szórás növekedése ( $\rho$  csökkenése) kezdetben enyhe növekedést, majd az inverz korrelációs idő meredek csökkenését eredményezte, míg Smausz és mtsai. módszere a teljes vizsgált tartományban közel lineáris csökkenést mutat.



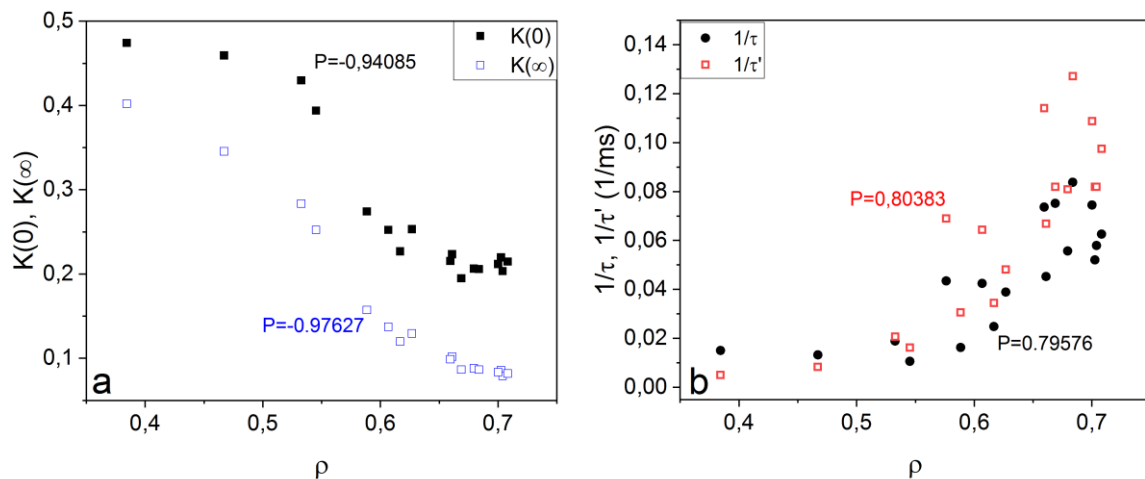
25. ábra Szövetmodell mérések. (a) A  $K(0)$  és  $K(\infty)$  függése a bevezetett dinamikus komponensről,  $\rho$ -tól, és (b) az  $1/\tau$  és  $1/\tau'$  inverz korrelációs idők függése  $\rho$ -tól. A Pearson-féle korrelációs együtthatók ( $P$ ) a grafikonokon szerepelnek.

### 6.5.2. Bőr

A vörösvértestek dinamikus fényszórása mellett a bőr szerkezetéből adódóan erős statikus szórás is mutat. A bőrt is lefedtem szóró rétegekkel, hogy tovább csökkentsem a dinamikus szórás hozzájárulását a speckle kép kialakulásához, és hogy lássam annak hatását a

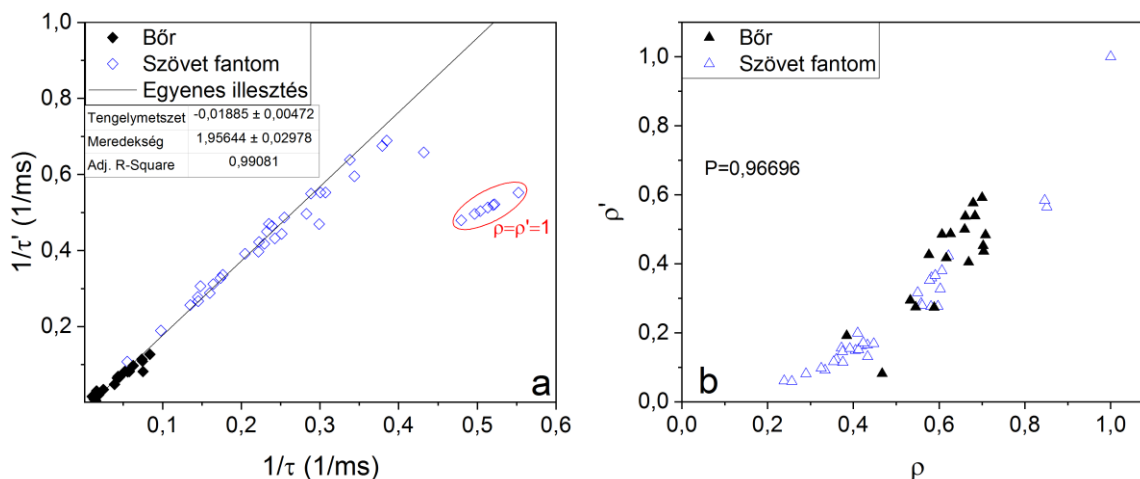


számolt SPU perfúziós értékekre. A további szóró rétegek hasonló hatással lehetnek a mért értékekre, mint a bőr szórási tulajdonságainak változásai különböző felületi sérülések miatt. A dinamikus komponens csökkenésével az inverz korrelációs idő mindkét értékelési módszer esetében gyorsan csökken, amint az a következő 26. b ábrán látható. Valószínűsíthető, hogy az alacsony dinamikus hozzájárulás tartományban ( $\rho < 0,5$ ) a remegés hatásai erősen befolyásolják a mért adatokat [101] és elnyomják a perfúziót. A remegés csökkenti a kontrasztot, különösen hosszú expozíciós idő esetén, ami magyarázatot adhat a  $K(0)$  és a  $K(\infty)$  konvergenciájának hiányára és a számított dinamikai arányok viszonylag magas értékeire ( $\rho > 0,4$ ) a PS szuszpenzióál kapott értékekhez képest ( $\rho > 0,2$ ) (ld. 25. ábra és 26. ábra). Ilyen esetekben a korrelációs idő inkább ezt a véletlenszerű mozgást, remegést jellemzi nem pedig a tényleges perfúziót.



26. ábra Bőrmérések. A  $K(0)$  és  $K(\infty)$  függése (a) és az  $1/\tau$  és  $1/\tau'$  inverz korrelációs idők függése (b) a  $\rho$  dinamikus aránytól

Megvizsgáltam, hogy a két kiértékelési módszerrel kapott korrelációs idők és a dinamikus hozzájárulási értékek mennyire korrelálnak egymással. Amint a 27.a ábrán látható, az SPU értékek közötti korreláció erős mind a szövetmodell, mind pedig a bőrön történő mérések esetén. Van egy viszonylag széles lineáris tartomány, amelyet az  $1/\tau'$  telítődő viselkedése követ. Ha megnézzük, hogy mely mérésekhez tartoznak a lineáris tendenciától eltérő adatpárok, jól látszik, hogy ezek a mérési pontok a magas ( $\rho > 0,6$ ) dinamikus hozzájárulási tartományba esnek. Ami a dinamikus arányt jellemző paramétereket illeti, bár az összefüggés nem lineáris, de a két módszerrel meghatározott mennyiség ( $\rho$  és  $\rho'$ ) szintén korrelál egymással (27.b ábra).



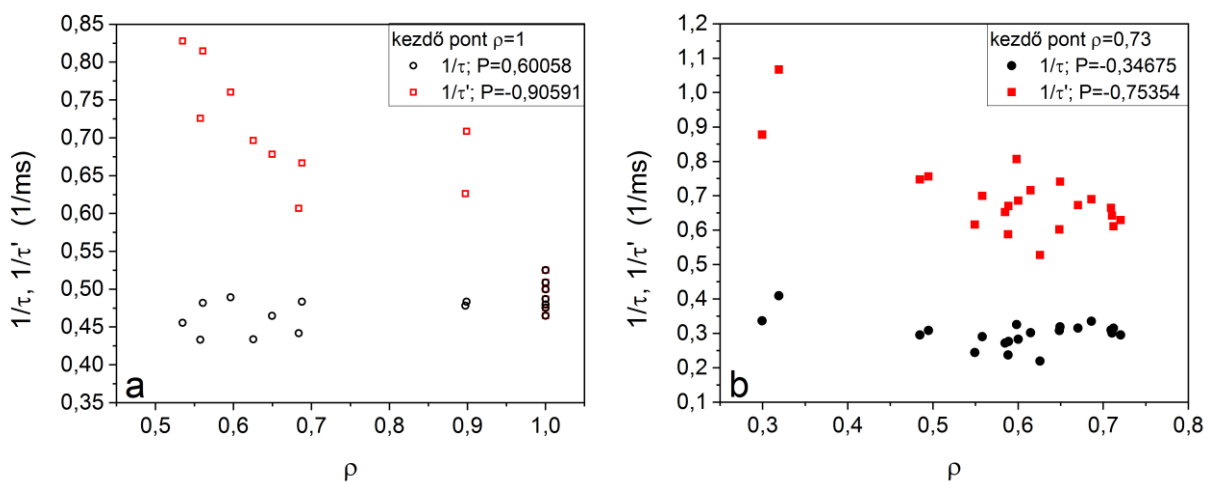
27. ábra A két értékelési módszerrel kapott SPU-értékek ( $1/\tau$  és  $1/\tau'$ ) (a) és a származtatott dinamikus hozzájárulások ( $\rho$  és  $\rho'$ ) (b) közötti korreláció. Az a. ábrán lineáris illesztést végeztem a  $0,25$   $1/\text{ms}$  alatti  $1/\tau$  értékek esetén.

### 6.5.3. A vegyes szórás eliminálása új szövetmodellel

Láthattuk, hogy a dinamikus hozzájárulás nagymértékű csökkenésével az inverz korrelációs idő ugyancsak lecsökkent. Feltételezhetően ez a mozgó és mozdulatlan részeken történő többszörös fényszórással kapcsolatos átlagolási hatásnak tudható be, amely a felületi statikus szóró rétegek hozzáadásakor (ld. 25.a és 26.a ábra), egyre jelentősebbé válik. A speckle képhez hozzájáruló fotonok adott átlagos számú szórási eseményt szenvednek el, mielőtt elhagyják a megvilágított mintákat. Ezek közül néhányan csak a felső statikus rétegben lévő részecskéken szóródnak, és hozzájárulnak az intenzitáseloszlás időfüggetlen térbeli varianciájának kialakulásához. Az alsó dinamikus tartományokból jövő fotonok mind a dinamikus, mind a felső statikus tartományok szóródhatnak, ilyenkor minél több szórási esemény a felső statikus rétegben történik, annál lassabb lesz a speckle mintázat fluktuációja, ami hosszabb korrelációs időnek felel meg.

A nyalábosztó kockán alapuló elrendezéssel (23.b ábra) teljesen szét tudtam választani a fotonok statikus és dinamikus szóródását, majd egyetlen speckle interferenciaképbe összegezni őket. Két mérésorozatot végeztem: az egyiket nyitott szuszpenzió használatával,  $\rho=1$ ; a másikat pedig üvegeküvettaiba töltött szuszpenzióval, amely eredetileg kisebb dinamikus arányt ( $\rho=0,73$ ) mutatott. A 28.a ábra szerint a nyitott szuszpenzió esetén az (33) egyenlet alapján kapott SPU-értékek a dinamikus hozzájárulás csökkenésével növekvő tendenciát mutatnak, míg az (51) egyenlet esetében az adatok szóródásától eltekintve az SPU-értékek közel állandóak maradnak. A küvetta esetében, az alap  $0,73$  dinamikus arány miatt a két modell által adott SPU-értékek még akkor is eltérőek, ha a nyalábosztó kockára nem tettem további szóró réteget, hasonlóan a korábbi mérések során is tapasztaltakkal (ld. 25.b ábra). A statikus

hozzájárulás további növelésekor hasonló tendenciák figyelhetők meg, mint a nyitott szuszpenzió esetében: az  $1/\tau$  majdnem megtartja kezdeti értékét, míg az  $1/\tau'$  lassan növekszik. A statikus szórás növelésekor az SPU-értékek csökkenése egyik esetben sem volt megfigyelhető, mely eltér a klasszikus szövetmodellben bemutatott tendenciáktól (25. ábra). Mivel a klasszikus és a módosított szövetmodell közötti egyetlen koncepcionális különbség az, hogy az utóbbi esetben nincs kevert szórás, ez azt mutatja, hogy mindkét modell képes lenne korrigálni a tisztán statikus szórás hatásait, de amikor a fotonok vegyes szórása is jelen van és jelentőssé válik, a mért inverz korrelációs idő az átlagolási hatások miatt jelentősen alacsonyabb értékek felé tolódik.



28. ábra Vegyes szórás kiküszöbölése. Az  $1/\tau$  és az  $1/\tau'$  függése a  $\rho$  dinamikus hozzájárulástól, amikor dinamikus komponensként nyílt felszínű szuszpenziót alkalmazok  $\rho=1$  (a), illetve üveg küvettában lévő szuszpenziót  $\rho=0,73$  (b).

## 6.6. Összefoglaló

Bár a két vizsgált kiértékelési modell, amelyeket a pl. a bőrről vagy a szövetmodell fedőrétegeről származó statikus szórás hatásának kezelésére javasoltak, jó eredményeket adott az áramlási sebesség relatív változásainak megfigyelésében, a jelenlegi méréseim egyértelműen kimutatták, hogy a levezetett abszolút SPU-értékeket erősen befolyásolja, ha a statikus szórás jelentőssé válik. A klasszikus szövetmodell elrendezés esetén a dinamikus hozzájárulás csökkenése az (51) egyenlet alapján kapott SPU ( $1/\tau$ ) értékek pillanatnyi csökkenését eredményezte. Az (33) egyenlet jobban tudta kezelni a mérsékelt statikus szórás jelenlétét (ami  $0,6 < \rho < 1,0$  és  $\sim 0,4 < \rho' < 1,0$ -nak felel meg), azonban a dinamikus hozzájárulás további csökkenése a megfelelő SPU ( $1/\tau'$ ) gyors csökkenését eredményezte ezen modell esetében is. A bőrön történő mérések esetében, ahol a dinamikus komponens még az alapesetben is viszonylag alacsony, mindkét modell eredményei hasonló tendenciát mutattak, amikor a statikus arányt módosítottam.

A modellkísérletem, amelyben a statikus és dinamikus szórást egy nyálábosztó kocka segítségével teljesen szétválasztottam, azt mutatta, hogy a korrekciós módszerek közös feltételezése, miszerint a speckle mintázathoz hozzájáruló fotonokat vagy kizárólag a mozgó, vagy kizárólag a statikus komponens szórja, a gyakorlatban pontatlan perfúziós értékeket ad: a fotonok többszörös oda-vissza szóródása a statikus fedőréteg és a dinamikus szóró térfogat között az SPU alacsonyabb értékek felé történő eltolódását eredményezi az átlagolási hatás miatt.

A LASCA mérések pontosságának további növelése érdekében részletesebben meg kell vizsgálni a bőr statikus szórásának hozzájárulása és a mért perfúzió közötti kapcsolatot, és a vegyes szórás hatását be kell építeni a modellekbe, vagy valamilyen megbízható korrekciós módszert kell alkalmazni. Ha feltételezzük, hogy az átlagolás hatását már tartalmazó korrelációs helyesen határozzuk meg, akkor a dinamikus hozzájárulás mértékének ismeretében optimális esetben visszaszámolható az, hogy milyen korrelációs idő jellemezné a statikus szóróréteg nélküli dinamikus szóró térfogatot, és ennek reciprokát feleltethetjük meg a valós perfúziós értéknek. A szövetmodell mérések esetében a (51) egyenletből kapott  $1/\tau$  majdnem lineárisan csökken a dinamikus hozzájárulás csökkenésével ( $\rho$ ). Ez azt sugallja, hogy a számított SPU-értékek egyszerű korrekciója lehetséges, azonban a bőr esetében a korrekció nem ilyen egyszerű. A bőrön végzett mérések esetében a csökkenés szintén nyilvánvaló volt, azonban a remegés miatt az SPU számítása bizonytalan a nagyon alacsony  $\rho$  értékek tartományában. A remegés hatásának korrekciójával, amire már vannak publikált kísérleti eredmények [88] jobb korrelációt lehetne elérni. A bőr esetében az átlagolási hatás és a statikus hozzájárulás közötti pontos korreláció meghatározása azt jelentené, hogy megbízhatóbb perfúziós méréseket lehetne végezni, amelyek által egymással jól összevethetők a különböző bőrterületeken kapott információk, például nagyon eltérő szórási tulajdonságokkal rendelkező egészséges és sérült bőr esetén.

## **7. MESI rendszer előzetes kalibrációjának korlátai: a bőr szórási tulajdonságainak függése a perfúziótól**

### **7.1. Bevezetés**

A MESI mérési módszerekkel feltérképezhető  $K(T)$  görbék aszimptótáit az adott mérőrendszer jellemzői, valamint a minta optikai (szórási, abszorpciós) tulajdonságai együtt határozzák meg. A modellek szerint, amennyiben a szövet modell felépítése nem változik, csak a dinamikus szórócentrumok mozgási (áramlási) sebessége, akkor az aszimptóták értéke megmarad, a  $K(T)$  görbe csak az időtengellyel párhuzamosan tolódik el, azaz az inflexiós pontja más expozíciós időnél lesz, miközben korrelációs idő számolt reciproka a sebességgel együtt skálázódik. Amennyiben egy mérési folyamat során a szórási tulajdonságok nem változnak, lehetőség adódhat a rendszer egy MESI méréssel történő előzetes kalibrációjára (a sebességfüggetlen illesztési paraméterek meghatározására), majd a mérések elvégzésére a nagyobb időbeli felbontóképességet adó SESI mérőmódszerrel.

A szövetmodelleken végzett MESI kontrasztmérések azt mutatták, hogy a tisztán dinamikus szuszpenziók szóróréteggel való borítása során a  $K(\infty)$  statikus szórás jelenléte miatti növekedése mellett a  $K(0)$  értéke is megváltozott [37,41,45] (ld. 6. fejezet). Mivel a  $K(0)$  esetén minden szóró részecske mozdulatlanak tekinthető, ezen érték megváltozása a minta optikai tulajdonságainak megváltozására utal. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy ugyanazon bőrterület perfúziójának megváltozása a visszaszórt fény alapján mérhető szórási és abszorpciós együttható megváltozását vonja maga után [133,134].

A fentiek alapján felmerül a kérdés, hogy a szövetben bekövetkező perfúzió-változás milyen mértékben befolyásolja a  $K(T)$  görbe viselkedését. Céлом egy szisztematikus vizsgálat elvégzése annak kiderítésére, hogy a bőr perfúziós állapotában indukált nagymértékű változás milyen hatással lehet ugyanazon terület  $K(0)$  és  $K(\infty)$  értékére. A méréssorozaton belüli változások nagyságrendjére vonatkozó információk segíthetnek a MESI-mérések optimalizálásában az időbeli felbontás növelése érdekében, illetve lehetővé tehetik a mért szövetre vonatkozó (részleges) kalibrációt. Olyan, a LASCA-mérések során gyakran alkalmazott ingereket alkalmaztam, mint a bőr hűtése [49,135–137], kapszaicin alkalmazása [69,135,138,139] és okklúzió [140,141].

### **7.2. Mérési módszerek**

#### **7.2.1. Az illesztési paraméterek és az SPU megállapítása**

A kísérletekhez a korábban bemutatott mérőrendszert használtam (17.a ábra), annyi különbséggel, hogy kiterjesztettem expozíciós idők számát (6 db) és a mérési tartományt (1-

162 ms). Erre a módosításra, azért volt szükségem, hogy pontosabb illesztést kapjak, mind SPU-ra mind pedig  $P_1$  és  $P_2$ -re. A folyamatos, közel valószerű MESI módszerben a következő kiértékelési paramétereket alkalmaztam. A képeket 1, 9, 3, 9, 9, 27, 9, 81, 9, 162 és 9 ms expozíciós idősorozat ismétlésével rögzítettem. A képek kontrasztját egy  $5 \times 5$  pixeles ablakon számoltam ki, melyet 3 px lépésközzel csúsztattam. A  $P_1$  és  $P_2$  illesztési paramétereket (és így a  $K(0)$  és  $K(\infty)$  értékeket) a  $K(T)$  görbének (51) a különböző expozíciós időkkel rögzített kontrasztértékekre való illesztésével kaptam meg. A kiértékelés során az adott expozícióhoz időhöz tartozó kontraszt a legutóbbi 5 felvétel mozgó átlaga volt, és minden teljes expozíciós sorozat után függvényillesztés segítségével frissült a  $P_1$  és  $P_2$  paraméter. A  $P_1$  és  $P_2$  utolsó ismert értékei alapján a 9 ms expozíciós idejű képek (perfúzió monitorozó idő) utolsó 5-ös mozgóátlag kontrasztjaiból SPU-t számoltam. Mivel minden második képet 9 ms expozíciós idővel rögzítettem, a perfúziós adatokat ötször gyakrabban frissülnek, mint a  $P_1$  és  $P_2$  paramétereket, mely a lenti grafikonokon is látható. Ezen számítási módszert korábban Zölei és mtsai. dolgozták ki [46].

#### 7.2.2. A bőr perfúzióváltozását indukáló stimulusok

A kontrasztgörbe szélső értékeit és a perfúzió változásait az alkar bőr felületén vizsgáltam. A méréseket légkondicionált helyiségben végeztem el 20 perces akklimatizálási idő után. Széleskörű perfúziós értékeket és különböző szöveti optikai tulajdonságokat az alábbi stimulusokkal hoztam létre: alkari artériás elszorítás, lokális hűtés, kapszaicines kezelés és ezután elszorítás, amelyek jelentősen különböző áramlási sebességeket és RBC-koncentrációkat eredményeztek. Az artériás okklúziót a felkarra helyezett vérnyomásmérő mandzsetta 200 Hgmm nyomásra történő pumpálásával értem el. A bőr hűtését egy 25 mm átmérőjű réztömb segítségével valósítottam meg: a tömböt jeges vízbe helyezve lehűtöttem, majd a bőrfelületre helyeztem 5 perc időtartamra. A mérést a tömb eltávolítása után a hűtés helyén végeztem el. A megnövelt perfúzió elérése érdekében kapszaicin krémet alkalmaztam a megfigyelt bőrfelületen. A méréseket 10 perccel a krém felvitele után végeztem el, amikor a bőr már kipirosodott és az előzetes mérések közel állandósult, megnövekedett perfúziós értéket mutattak. Minden egyes stimulust egy referencia (alapvonal) felvétel előzött meg ugyanazon a területen, az ingerek hatásait ezzel a referenciával hasonlítottam össze. Az adatokat négy személyen végeztem, különböző napokon háromszor megismételt mérési sorozatból nyertem.

#### 7.2.3. Áramló mikrogömb szuszpenzió

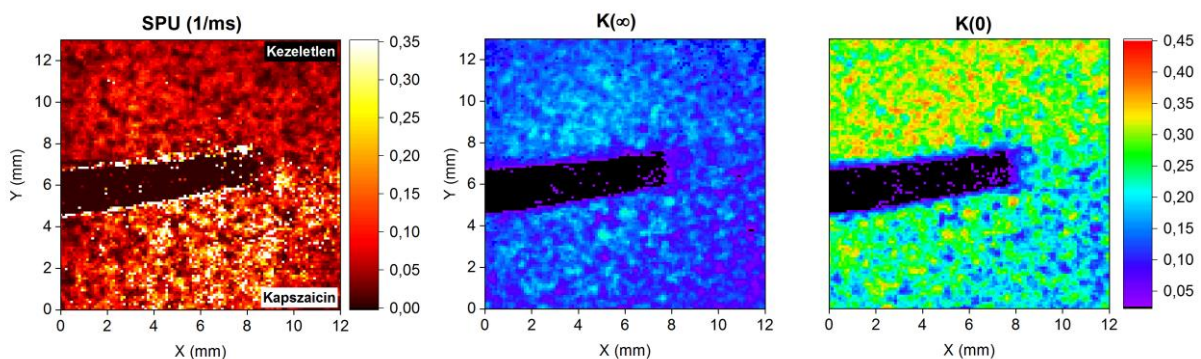
A vizes mikrogömb szuszpenziókon jellemzően jóval kisebb korrelációs idők (néhány ms) mérhetők, mint a bőr perfúziója esetén. A kísérleteimhez ezért kisebb átlagsebességű

Brown-mozgással rendelkező viszkózus mikrogömb szuszpenziót készítettem, mely nyugvó állapotban 35 ms korrelációs időt eredményezett. A szuszpenzió összetétele a következő volt: víz és glicerin 70:30 térfogatarányú keveréke 7 mg/ml koncentrációban tartalmazott 3  $\mu\text{m}$  méretű polisztirol mikrogömböket (monodiszperz, microParticles GmbH). Az szuszpenziót hidrosztatikus nyomással vezérelve egy matt (fényszóró) csövön (2,5 mm belső átmérőjű és 4 mm külső átmérőjű) keresztül erős statikus szórás mellett áramoltattam. A szórási tulajdonságok módosítása érdekében a cső egy részét a kamera látómezőjében egy 50  $\mu\text{m}$  vastag PTFE-fóliával fedtem le.

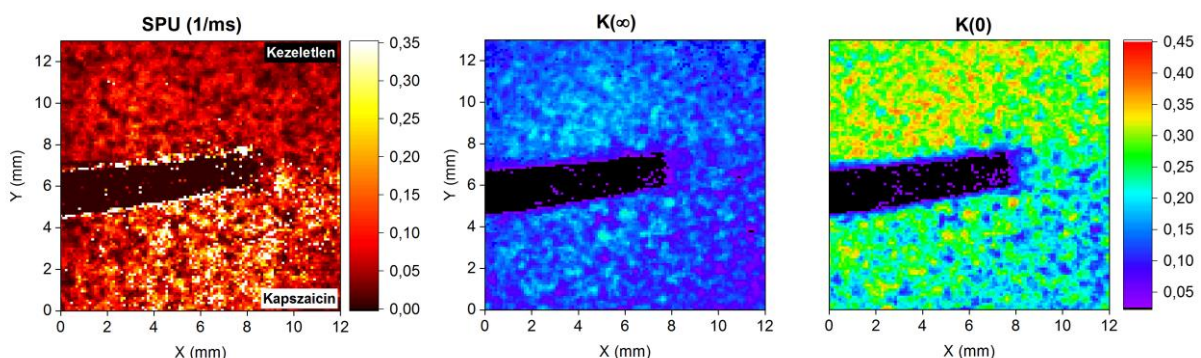
### 7.3. Eredmények

Szemléltetésképpen,

a



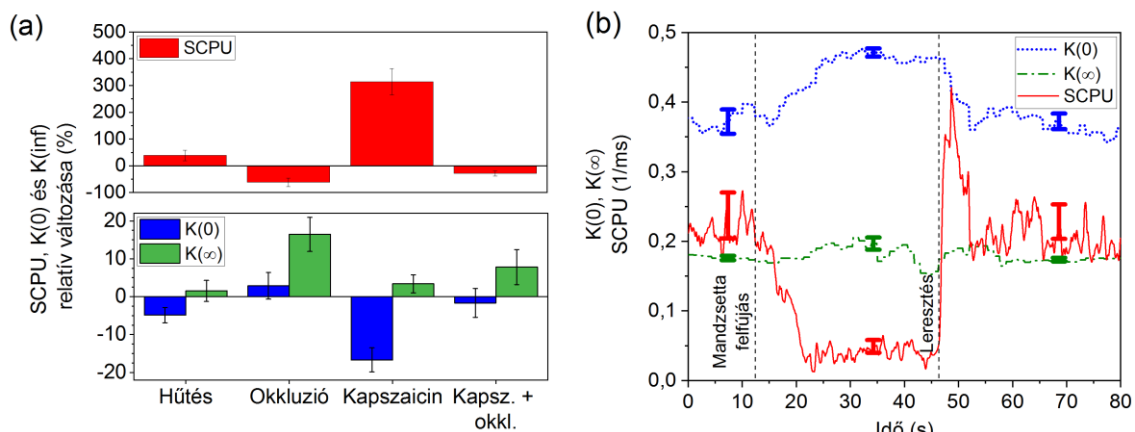
29. ábra a kapszaicinnal kezelt terület határa körüli térképét mutatja a mért perfúziós indexnek (SPU) és a  $K(T)$  görbék dinamikai tartományát jelző  $K(0)$  és  $K(\infty)$  paramétereknek. A képek szemcsés szerkezete a bőr inhomogenitásának és a megfigyelt terület képkockáról képkockára történő véletlenszerű elmozdulásából eredő bizonytalanságoknak tulajdonítható. Az ilyen kiértékelési hibák elkerülése érdekében az elkövetkező eredményeket a kontrasztértékek térbeli átlagolásával kaptam egy 10 mm  $\times$  10 mm-es területen.



29. ábra  $K(0)$ ,  $K(\infty)$  és SPU térképek egy részben kapszaicinnal kezelt bőrfelületen. Egy ragasztószalag (fekete csík) jelöli a kezelt régió szélét

A 30. ábra a  $K(0)$  és  $K(\infty)$  paraméterek változásait mutatja ugyanazon a területen kapott referenciaértékekhez viszonyítva az összes alkalmazott stimulusra vonatkozóan. Minden egyes

mérésnél a paramétereket időátlagoltam, az okklúzió esetén ~15-20 másodperces, az összes többi felvétel esetében pedig 30 másodperces időtartamra, a hibasávok az összes mérés átlagától való standard eltérésének felelnek meg. Az adatok azt mutatják, a  $K(T)$  dinamikai tartománya az ingerektől függően jelentősen változhat. A két véglet a kapszaicin és az elszorítás esete volt. A kapszaicin alkalmazásakor a statikus összetevő csak kis mértékben változott a dinamikus összetevők és a  $K(0)$  jelentős csökkenése mellett. Az okklúzió a statikus komponens jelentős növekedését és a dinamikus összetevő mérsékelt csökkenését eredményezte, miközben a  $K(0)$  gyakorlatilag változatlan maradt. A mandzsetta leeresztését követő reperfúziós fázisban (túllövés) a perfúzióban bekövetkező változások olyan gyorsak voltak, hogy a rendszerem nem tudta pontosan követni a perfúzió és kontrasztgörbe aszimptotáiban bekövetkező változásokat. Amikor a kapszaicinnal kezelt karon elszorítást alkalmaztam, az illesztési paraméterek megközelítették a referenciaértékeket. A 30.b ábra a  $K(0)$ ,  $K(\infty)$  és a perfúzió paramétereinek időfüggésére mutat példát a kapszaicinnal kezelt kar elszorítása esetén, a hibasávok a megfelelő kiértékelési időtartamra vonatkozó ingadozásból adódó szórást jelzik. Az elszorított kar  $K(\infty)$  értékének ingadozását a kar akaratlan remegései okozhatják, amelyek hosszú expozíciós idő esetén csökkentik a kontrasztot, míg a rövid expozíciós idejű képeket kevésbé érintik. Mivel az azonos expozíciós időknél a kontrasztértékekre 5 pontból álló mozgó átlagot használtam, a reperfúzió kezdetén tapasztalható túllövés simítva (kisebb amplitúdójú csúcs) jelenik meg az adatsor görbéjén. A dezoxi- és az oxi-hemoglobin abszorpciós együtthatója közel azonos a rendszerünkben használt 785 nm-es hullámhosszon (ld.: 5. ábra), mely magával vonja azt, hogy a szórási tulajdonságokat várhatóan nem befolyásolja a vér oxigénellátottsága. A kamerába visszaszórt depolarizált fény intenzitását is megmértem a különböző ingereknél, azonban annak ingadozása néhány százalékos tartományon belül volt, és nem mutatott tendenciaszerű összefüggést a kontrasztgörbe dinamikus és statikus összetevőivel, sem a mért perfúzióval.

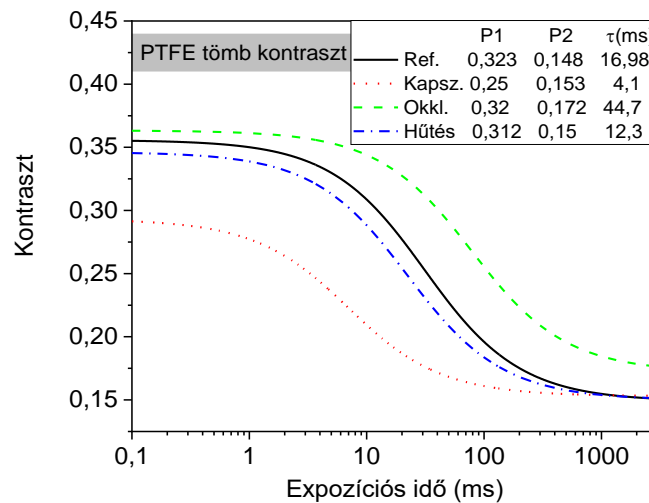


30. ábra A kontrasztgörbe  $K(0)$ ,  $K(\infty)$  aszimptotikus értékeinek és a perfúziós indexnek a változása különböző ingerek



esetén (a) és egy példa az időfüggésükre, amelyet kapszaicinnal kezelt bőrön alkalmazott okklúzió esetén mértek (b).

A 31. ábra a megfigyelt szövet  $K(T)$  görbéinek jellegzetes lefutását mutatja ugyanazon a területen az ingerek alkalmazása előtt (referenciaként jelölve) és utána. A görbéket a folyamatos MESI-vel a különböző stimulusokra kapott átlagos illesztési paraméterek felhasználásával szimuláltam több nagyságrendet lefedő expozíciós idő tartományra. A Teflon tömbön mért és az ábrán úgyszintén feltüntetett kontraszt eltér a bőrön mért  $K(0)$  kontrasztoktól, ami az élő szövet és a rendszer kalibrálásához gyakran használt Teflon modell eltérő szórási tulajdonságaira utal.



31. ábra  $K(T)$  görbék különböző ingerekre, összehasonlítva az azonos bőrfelületen mért

A szövetmodelleken végzett korábbi mérések során a  $K(\infty)$  növekedését és a  $K(0)$  csökkenését tapasztalták, amikor a fedőréteg szórási együtthatója jelentősen kisebb volt, mint az szuszpenzióké (azaz az átlagos szórási együttható csökkent) [37]. Ezzel ellentétben, amikor a szuszpenziót vagy a bőrfelületet nagyobb szórási együtthatóval rendelkező PTFE-réteggel fedtem be (azaz az átlagos szórási együttható megnőtt), a  $K(0)$  is megnőtt (ld.: 6.5 fejezet). Ez utóbbi hasonló az in vivo esethez, ahol a bőr szórási együtthatója magasabb, mint a véré [142].

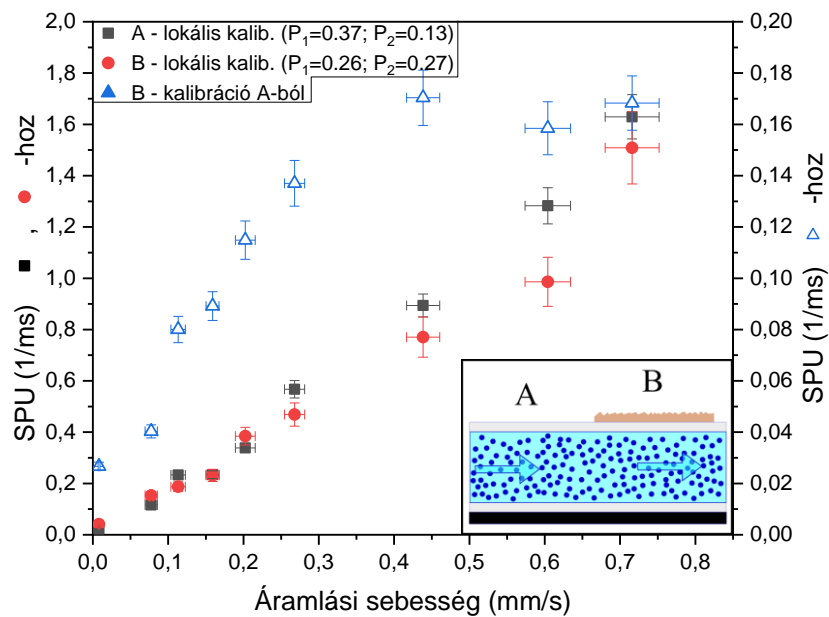
A mérések során megfigyelt  $K(\infty)$  eltolódás egyszerűen magyarázható azzal, hogy megváltozik a dinamikus szórt fény hozzájárulásának változása a speckle képek kialakulásához. A kapszaicin esetében észlelt enyhe növekedését valószínűleg a krém bőrfelületre történő felvitele okozta, mivel ez a változás azonnal megfigyelhető volt, jóval azelőtt, hogy a kapszaicin elkezdte volna kifejteni hatását a perfúzióra. Azt feltételezem, hogy a hűtés esetén megfigyelt kis mértékű  $K(\infty)$  emelkedést szintén a hideg rézre kicsapódott nedvesség jelenléte okozta. A kar artériás elszorítása esetén a perfúzió csökkenését a bőr vörösvérsejt-koncentrációjának csökkenése is kíséri [143,144], mely a bőr nem mozgó,

statikus alkotórészein történő szóródás nagyobb valószínűségét eredményezi, amit a magasabb  $K(\infty)$  érték mutatja is.

Rendkívül alacsony expozíciós idő esetén szükségtelené válik különbséget tenni a statikus és mozgó elemről történő szóródás között, ezért a változó  $K(0)$  azt jelenti, hogy az erősen eltérő perfúziós állapotok esetén a megfigyelt szövetnek megváltoznak a szórási tulajdonságai. A  $K(0)$  csökkenését a hűtés és a kapszaicin hatására figyeltem meg. A hűtés általában érszűkületet okoz, de a bőr lokális hűtése esetén lokális értágulást és fokozott perfúziót eredményezhet [145], ami összhangban van a megfigyeléseimmel. A kapszaicin szintén helyi értágulást okoz [146]. Úgy tűnik, hogy a bőr alatti régióban a vörösvértestek feldúsulása erősen befolyásolja a szövet szórási tulajdonságait, ami a korrelációs idő csökkenését eredményezi.

Mivel a perfúzió jelentős változása megváltoztatja a kontrasztgörbe dinamikai tartományát, az illesztési/kalibrációs paraméterek változásainak nyomon követése növelheti a korrelációs idő mérésének pontosságát. A megváltozott szórási tulajdonságok mérésekre gyakorolt hatásának egyszerű demonstrációjaként mikrogömb szuszpenzió áramoltatásos kísérleteket végeztem el. Az áramlásra vonatkozó korrelációs időket két különböző statikus szórási hozzájárulás esetén határoztam meg. A PTFE fólia ráhelyezése az eleve jelentős statikus szórást mutató csőre a  $K(\infty)$ -t (0,14-ről 0,27-re) növelte és csökkentette (0,40-ről 0,38-ra) a  $K(0)$  értékét, ami különböző mértékben, de hasonló tendenciát mutat, mint a bőrre alkalmazott egyes ingereknél megfigyelt változások. A mérési eljárás a következő volt: kezdetben a  $P_1$  és  $P_2$  illesztési paramétereket lokálisan, áramlás nélkül határoztam meg MESI-vel, majd ezek rögzített értékeit felhasználva a korrelációs időket a 9 ms expozíciós idejű képek alapján számoltam ki, a hibasávok a kontrasztok standard eltéréséből származnak. Amint a 32. ábra mutatja, a különböző szórási tulajdonságokkal rendelkező régiókon kapott reciprok korrelációs idő (a 32. ábra A és B jelöléssel) közel azonos és lineárisan függ az átlagos áramlási sebességtől, ha megfelelő helyi kalibrációt alkalmaztam. Megjegyzendő, hogy a B esetben (némiel megnövelt statikus szórás) a meredekség kicsivel alacsonyabb, mint az A esetben, ezt jól magyarázza az előző fejezetben tárgyalt vegyes szórás átlagoló hatása. Amikor azonban a fedetlen csövön kapott illesztési paramétereket alkalmaztam a PTFE-vel borított régióra, az  $1/\tau$  jelentősen eltérővé válik (ld.: 32. ábra az eltérő jobb és bal oldali y-tengelyek skálái közti különbséget). Ez világosan jelzi, hogy amikor a perfúzió változását a szórási tulajdonságok változása kíséri, a korrelációs idő mért változása nem elhanyagolhatóan eltérhet a valóságtól, ha az illesztett modellek paramétereit nem módosítják. E modellkísérletben a  $K(\infty)$  eltolódása nagyobb, mint a bőr esetében megfigyeltem, a megváltozott szórási tulajdonságok által indukált

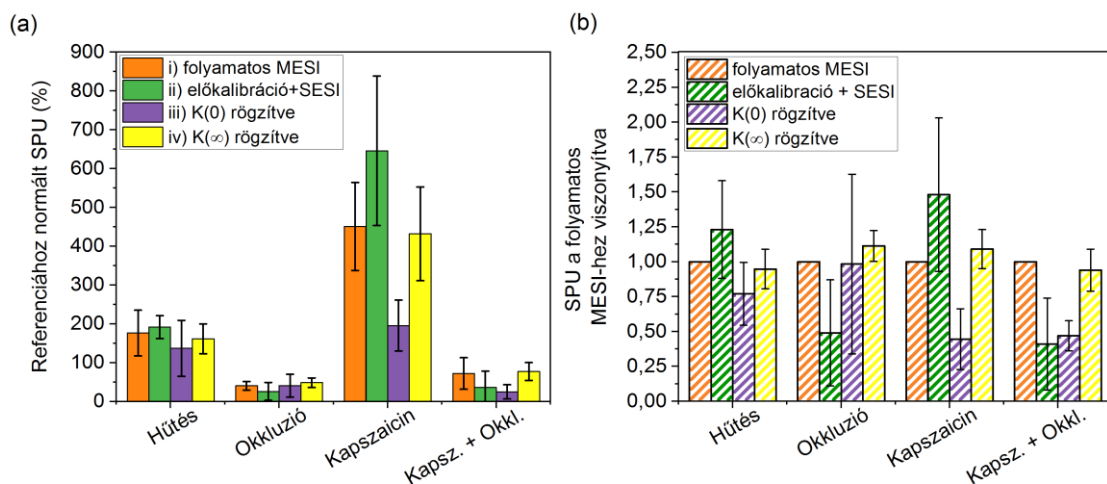
mérési hiba aktuális nagyság a megfigyelt szövettől és a mérési paramétereiktől függ. Érdekes ugyanakkor megjegyezni, hogy egy korábbi összehasonlító vizsgálat, melyben malacok agykérgi perfúzióját vizsgálták, azt mutatta ki, hogy a folyamatos MESI és PTFE tömbön  $\beta$ -kalibrált SESI mérési módszerek eltérő abszolút értékű SPU értékeket, ugyanakkor hasonló mértékű relatív változást mértek a parenhimális perfúzió jelentős mértékű csökkentése/növelése esetén [73]. Az eltérő viselkedés abból adódhat, hogy az agykérgi mérések esetén a statikus szórás elhanyagolható, a kontraszt dinamikai tartománya nagy, míg bőr esetén a statikus szórás miatt a dinamikai tartomány jelentősen beszűkül.



32. ábra A mikrogömb szuszpenzió mért reciprok korrelációs idő áramlási sebességtől való függése különböző szórási körülmények között (a képen A és B-vel jelölve). A tele szimbólumok felelnek meg a megfelelő lokális előkalibrálás eseteinek, az üres szimbólumú adatok az A ponton kapott kalibrálás a B alkalmazásának eredményei

Mivel a változó szórási tulajdonságok folyamatos megfigyeléséhez szükséges folyamatos MESI időbeli felbontása viszonylag alacsony a SESI-hez képest, a mérések időbeli felbontásának javítását szem előtt tartva különböző kombinált mérési megközelítéseket alkalmaztam a reciprok korrelációs idő (SPU) meghatározására, és ezen eredményeket összehasonlítottam. A kombinált módszerek előkalibráláson (a  $K(0)$  és a  $K(\infty)$  kezdeti aszimptóták meghatározása) alapultak, melynek során referencia bőr felületen végzett MESI-mérésekből megállapított illesztési paramétereket használtam konstansokként a további mérésekhez. A korrelációs idő meghatározására a különböző ingerek esetén a következő kiértékelési módszereket alkalmaztam: i) időben folyamatosan szabad illesztés az összes expozíciós időnél kapott kontrasztértékekre (folyamatos MESI); ii) az illesztési paraméterek rögzítése (mind a  $K(0)$ , mind pedig a  $K(\infty)$ ) a referencián mért értékekhez, majd a  $\tau$  kiszámítása a 9 ms expozíciós időnél mért kontrasztértékből, ami megfelel egy előkalibrálásnak, amelyet

nagyobb sebességű egy expozíciós idejű speckle képalkotás (SESI) követ; iii) a  $K(0)$  aszimptóta rögzítése és két hosszú expozíciós idővel (81 ms és 162 ms) készült kontrasztok felhasználása a  $\tau$  függvényillesztés meghatározásához és iv) csak a statikus rész ( $K(\infty)$ ) rögzítése és a  $\tau$  meghatározása a rövid expozíciós időkkel (1, 3 és 9 ms) kapott kontrasztadatokra való illesztéssel. Az 1 ms és 3 ms expozíciós idő közel van a  $K(T)$  görbe aszimptotikus tartományához, amely segíti a  $K(0)$  követését, míg a 9 ms a meredekebb tartományba esik, amely pedig a  $\tau$  meghatározásához nélkülözhetetlen. A 33. ábra a különböző értékelési módszerekkel kapott SPU-értékeket mutatja a stimulus előtti referenciához normalizálva és az adott stimulus esetén kapott összes adatra átlagolva. Az 33. ábra a folyamatos MESI-hez viszonyított relatív SPU-értékeket mutatja, melyen jobban látható az egyes kiértékelési módszerek eredményei közötti relatív eltérés.



33. ábra A különböző kiértékelési módszerekkel kapott normalizált SPU-értékek összehasonlítása különböző ingerek esetén

Egyértelműen látható, hogy az ii) módszerrel kapott adatok (amelyek megfelelnek a több expozícióval történő előkalibrálásnak, majd a nagyobb sebességű, egyszeri expozícióval történő megfigyelésnek) jelentősen eltérnek az i) folyamatos MESI módszerrel kapott adatokhoz képest: a perfúzió túlbecsült hűtés és kapszaicin esetén (amikor a  $K(0)$  csökken az inger hatására), és erősen alulbecsült okklúzió esetén (amikor a  $K(\infty)$  nő). Az iii) módszer alkalmazása még nagyobb eltérést eredményezett a folyamatos MESI-hez képest, ami azt jelzi, hogy az eredményeket erősen befolyásolja a  $K(0)$  változása, amelyet a szövet RBC-feldúsulása okozhat. Összességében az adatok legkisebb szórását (a hibasávok jelzik) és a folyamatos MESI-vel való legjobb egyezést a iv) módszer esetében kaptam, ami a következőknek tulajdonítható: a  $P_1$  körülbelül kétszer akkora, mint a  $P_2$  (0,25-0,323 vs. 0,148-0,172 között mozog), miközben ezek négyzetesen járulnak hozzá a mért kontraszthoz (lásd a (36) egyenletet), így az illesztésekhez használt rövid expozíciós idők (1, 3 és 9 ms) kontrasztját

kevésbé befolyásolja a statikus szórás változása; a rövid expozíciós idők ugyanakkor, lehetővé teszik az erősen változó  $K(0)$  folyamatos nyomonkövetését. A kiválasztott expozíciós idők száma tovább csökkenthető nagyon rövid expozíciós idő alkalmazásával. Például 0,1 ms vagy annál rövidebb expozíciós idő esetén, a  $K(T)$  görbék telítődése miatt (lásd a 31. ábrán), a kép kontrasztja gyakorlatilag közvetlenül megfeleltethető lenne a  $K(0)$ -nak (figyelembe véve a foltok statisztikai ingadozását).

#### **7.4. Összefoglaló**

A bőr perfúziós állapotainak széles skáláját létrehozva szisztematikusan tanulmányoztam a kontraszt expozíciós idő függésének viselkedését, amely kulcsfontosságú a szöveti perfúzió meghatározásához. Az eredmények azt mutatták, hogy az artériás elszorítás megnöveli a statikus szórás hozzájárulását a speckle mintázat kialakulásához. A kapszaicin alkalmazása során bekövetkező szöveti RBC feldúsulás pedig jelentősen csökkentette a rövid expozíciós idő  $K(0)$  aszimptotáját. Ezek arra utalnak, hogy az erősen eltérő perfúziós állapotokhoz a szövet eltérő általános szórási tulajdonságai tartoznak, és ezért a kezdeti  $K(0)$  meghatározás alapján előkalibrált LASCA rendszer (pl.  $\beta$  kalibráció) a perfúzió változásai miatt elveszítheti érvényességét. A tényleges elrendezéstől és a megfigyelt szövetből függően az indukált hibák akár elhanyagolhatóak is lehetnek (a mérési bizonytalanságon belül). Ha azonban a kontrasztgörbe dinamikus tartományát statikus szórás szűkíti (pl. bőr), és a mérések során az általános szórási jellemzők nagymértékben változnak, érdemes megfontolni a kalibráció hangolását a mérési pontosság növelése érdekében.

Tekintettel arra, hogy a MESI a szórási tulajdonságok megfigyelt változása tekintetében, sokkal kisebb időbeli felbontás mellett, nagyobb pontosságot kínál, mint a SESI, különböző kiértékelési módszereket teszteltem, amelyek, bizonyos kompromisszumokkal kombinálhatják a két módszer előnyeit. Az eredmények azt mutatták, hogy az előkalibrációként használt kezdeti teljes expozíciós időtartományú MESI-sorozat, majd a  $K(T)$ -görbe telítődő és meredekebb tartományában csak 2-3 rövid expozíciós időérték alkalmazása ígéretes módszer lehet. Ez lehetővé teszi az erősen változó  $K(0)$  folyamatos megfigyelését, miközben feltételezzük az állandó  $K(\infty)$  értéket, mivel a korrelációs idő számítását ez utóbbi paraméter kevésbé befolyásolja.

## 8. Sebesség hisztogramok viselkedése szórási tulajdonságok változásaira

### 8.1. Bevezetés

Ez a fejezet már nem képezi részét a tézispontoknak, a bemutatott eredmények nem lettek publikálva, azonban érdekesnek láttam ezeket összefoglalni, mivel ez a LASCA egy kevésbé vizsgált, de érdekes területéhez tartozik. A speckle képek jelentős statisztikai zajjal terheltek, ennek megfelelően egyetlen felvétel kontrasztterképéből számolt sebességterkép (SPU térkép) úgyszintén zajos. Emiatt a sebességterképek elemzésekor jellemzően több egymásutáni kontrasztterképet, vagy sebességterképet képet átlagolnak és egy adott területre vonatkozó átlagértéket szokták meghatározni. Zölei-Szénási mtsai. egy korábbi vizsgálatuk során az átlagolatlan sebességterképek valószínűségi elosztását vizsgálva azt mutatták ki, hogy a rozaceás és egészséges bőrterületek hisztogramjai nagyon különböznek [74]. Felmerül a kérdés, hogy ezek a hisztogramok az áramlásról, vagy szöveti perfúzióról milyen információt hordozhatnak, illetve hogyan befolyásolják ezeket a szórási tulajdonság változásai, vagy a részecskék áramlásának inhomogenitásai. A következőkben, részben a korábbi fejezetekben ismertetett mérésekre, részben pedig további mérésekre alapozva azt fogom röviden áttekinteni, hogy különböző átlagos méretű, viszkozitású szuszpenziók, szuszpenzió keverékek, illetve bőr perfúziója esetén kapott hisztogramok milyen jellegzetességeket mutatnak.

### 8.2. Módszerek

#### 8.2.1. Hisztogramok előállítása

A sebesség hisztogramokat a monitorozó idővel készült kontraszt térképek kijelölt részein számoltam ki. Ez a kutatócsoport által korábban írt szoftver segítségével valósítottam meg, amely minden egyes kontraszt pixelből külön SPU-t számolt, majd ebből egy hisztogramot készít. Mivel az egyes térképek pixelszáma kevés volt a megfelelő statisztikai elemzéshez és így zajos hisztogramot eredményeztek, több egymásutáni áramlási térkép adatait összegeztem.

#### 8.2.2. Szövetmodellek

A korábban ismertet szövet modellek mellé még további két új szövetmodellt állítottam elő a különböző áramlási sebességeloszlások (pl. véráramlás az arteriolákban és a kapillárisokban) szimulálására. Az elsőt azonos tömegkoncentrációjú 3  $\mu\text{m}$ -es és 0,65  $\mu\text{m}$ -es polisztirol mikrogömb szuszpenziók 1:1 v/v arányú keveréke képezte egy 1 cm-es üvegtüvegyben. A szuszpenziók koncentrációját 10 és 0,625 m/v% között változtattam. A második modell pedig két különböző viszkozitású, ezért eltérő sebességeloszlású (0,65  $\mu\text{m}$ , 2 m/v%) monodiszperz szuszpenziót tartalmazó küvetta egymásra helyezésén alapuló

szövetmodell. A szuszpenzió oldószere víz, illetve glicerin-víz keverék volt, amelyek ( $\eta$ ) viszkozitása 0,89, illetve 4,45 mPas voltak. A fedőréteg vastagsága 50  $\mu\text{m}$  volt.

### 8.2.3. Mérések bőrön

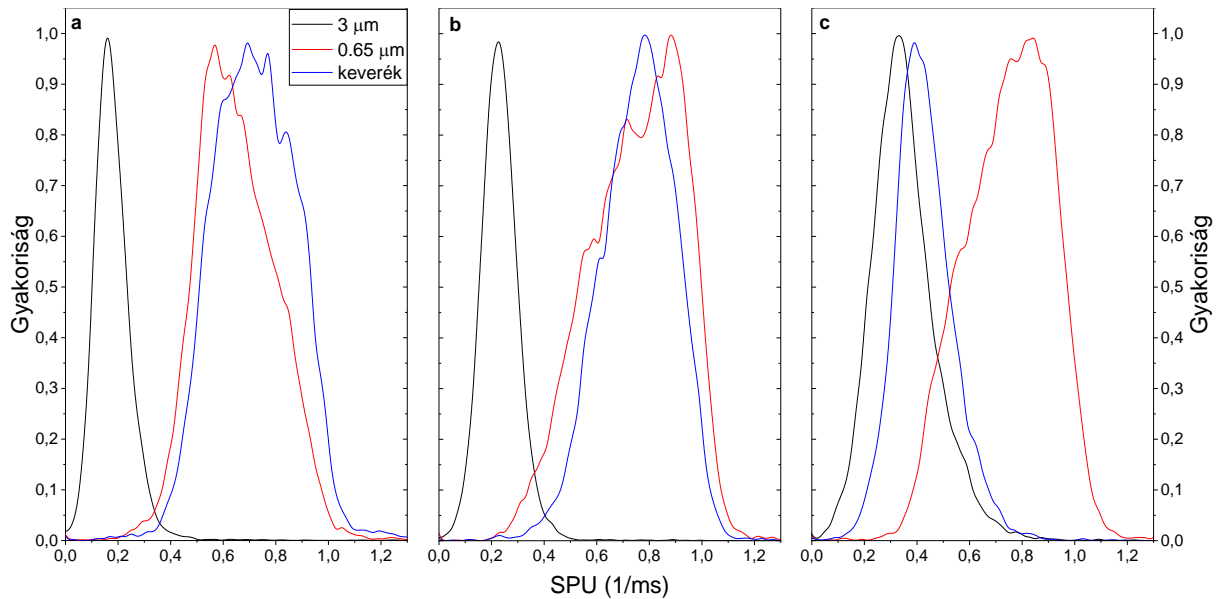
Bőr esetén az előző fejezetekben leírt módszerrel készült kontraszt adatokat használtam fel a hisztogramok kiszámítására.

## 8.3. **Eredmények**

### 8.3.1. Szövetmodellek

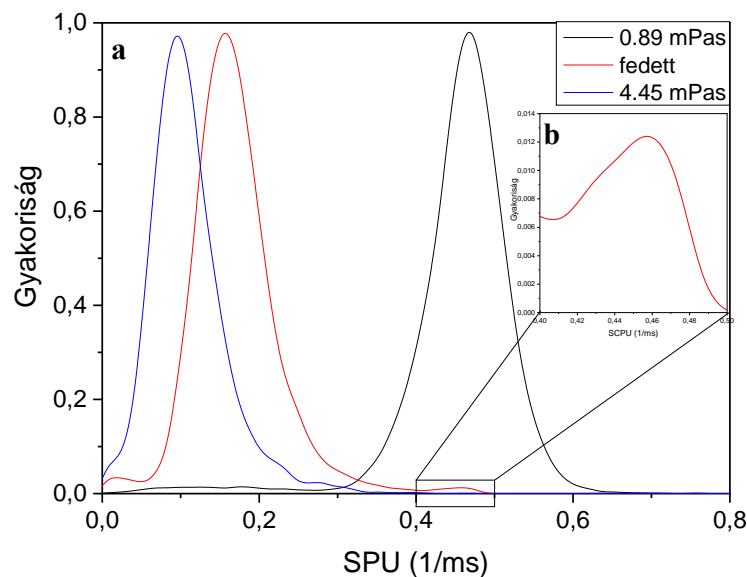
Elsőként a szuszpenzió keverék esetén kapott eredményeket részletezem. Nagy koncentrációnál (34. ábra) az átlagos SPU magasabb lett, mint a legnagyobb mozgékonyaságú (0,65  $\mu\text{m}$ ) mikrogömböket tisztán tartalmazó monodiszperz szuszpenzió esetén. Ennek oka valószínűleg a mikrogömbök közötti jelentős kölcsönhatás lehet, azaz a különböző méretű részecskék közötti ütközés a kisebbek esetében megnövekedett sebességet eredményezhet. A koncentráció csökkenésével az ütközések valószínűsége is csökkent, és a keverék hisztogramjának csúcsa a monodiszperz szuszpenzióknál mért értékek között kezdett mozogni (34. ábra). A 34. ábra azt sugallja, hogy alacsony koncentrációnál (0,625 m/v% és az alatt) a különböző méretű mikrogömbök közötti kölcsönhatás elhanyagolhatóvá válik; valószínűleg ez az a tartomány, ahol a keverék két külön sebességeloszlású szóró részecskékből álló szöveti modellként viselkedhet. Itt a keverék átlagos SPU-értéke közel azonos a monodiszperz szuszpenziók átlagos SPU-értékeinek súlyozott átlagával. Mivel a két féle szuszpenzió koncentrációja azonos, a súlyozó tényező a fotonok megfelelő  $r$  sugarú mikrogömbökön való szóródásának valószínűsége, amely arányos a számukkal ( $\sim 1/r^3$ ) és a szórási

keresztmetszetükkel ( $\sim r^2$ ). Várakozásaimmal ellentétben nem tapasztaltam jelentős kiszélesedést vagy bimodális viselkedést a hisztogramon a keverék esetében.



34. ábra A szuszpenziók sebesség hisztogramjai különböző tömeg koncentrációk (a 10, b 2.5 és c 0.625 v/m%) esetén

A mikrogömbök Brown-mozgásának átlagos sebessége fordítottan arányos az oldószer viszkozitásával ( $\sim 1/\eta$ ), ami a mért SPU sebességeloszlásokban is látható (35. ábra). Amikor a viszonylag átlátszó, vékony ( $50 \mu\text{m}$ ), nagy viszkozitású réteget alacsony viszkozitású szuszpenzió fölé helyeztem, a hisztogramcsúcs közelebb volt a felső szuszpenzió csúcsához. Az átlagos SPU itt is hisztogram nagyon jól megközelíti a két szuszpenzió külön-külön mérhető SPU-knak az átlagos foton szórási eseményeinek arányában súlyozott átlagával. Amint a 35. ábra kinagyított része mutatja, a hisztogramon csak kis mértékben látszik az alsó, nagyobb sebességű szuszpenzióból eredő csúcs.

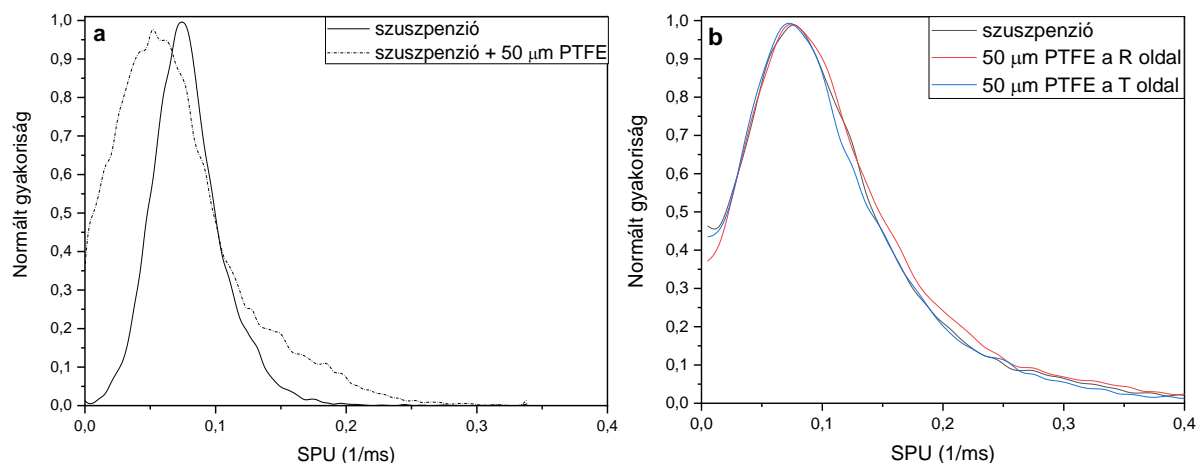


35. ábra Különböző viszkozitású különálló, valamint átfedő szuszpenziók áramlási hisztogramjai (a) és a fedett szuszpenzió második csúcsának kiemelése (b)



Az eddigi eredmények összegzéseként elmondható, hogy hacsak a különböző sebességeloszlású részek nincsenek térben laterális irányban elválasztva, a kétféle átlagos méretű mikrogömbökön való többszörös szórás teljesen eltünteti az eltérő sebességeloszlással rendelkező komponensekre utaló információt.

A továbbiakban a mozgó részecskékkel térben keveredő mozdulatlan szórócentrumok hisztogramra gyakorolt hatását vizsgáltam meg, mivel jelenlétük valós szövetekben is megváltoztathatja a mért perfúziós adatokat. Amikor a szuszpenziót bármilyen statikus szóróréteggel fedtem be, a hisztogram csúcsa mindig elcsúszott a kisebb SPU irányába, valamint a félértékszélessége is megváltozott a fedetlenhez képest (36.a ábra). Az átlagos SPU megváltozása összhangban volt a vegyes szórás hatásainak vizsgálata során leírtakkal. A vegyes szórás hatásait kiiktató szövetmodellel kapott sebességeloszlás minden esetben teljesen megegyezik a referenciával, a nyalábosztó kocka bármelyik oldalára is raktam a statikus szóró elemet (36.b ábra).



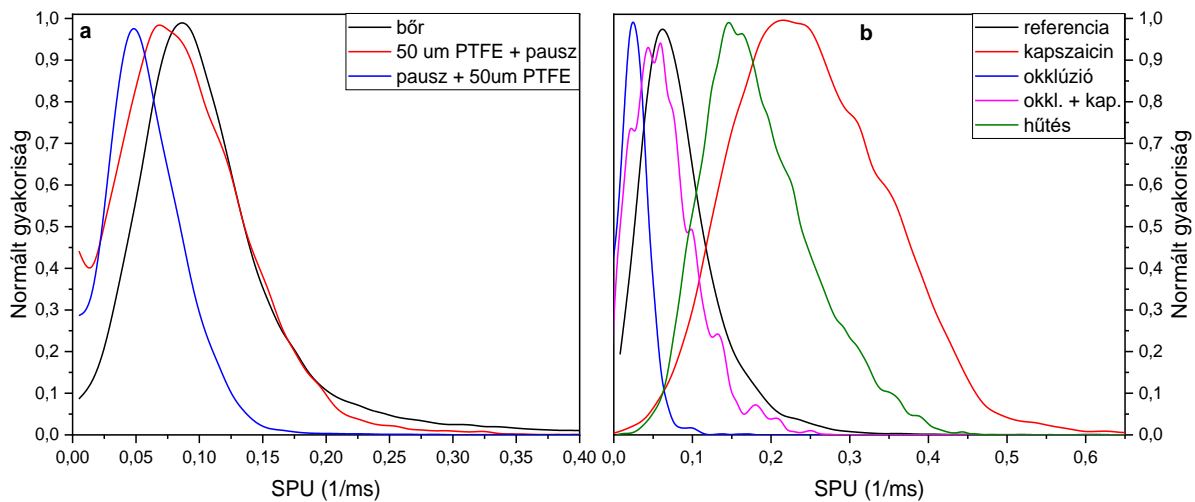
36. ábra Klasszikus (a) és a vegyes szórást kiküszöbölő (b) szövet modell sebesség hisztogramja különböző szóróréteg esetén

### 8.3.2. Bőr

A bőrön elvégzett perfúziómérés eredményeit összevetettem azokkal az esetekkel, amikor a bőr felületére különböző extra szóróréteget helyeztem. A plusz statikus szóróréteg miatt a sebességeloszlás a fedetlen referenciához képest az alacsonyabb sebességek irányába tolódott (37.a ábra), amint az vegyes szórás hatása miatt várható is volt.

Az alkar bőr esetén alkalmazott stimulusok során mért sebesség eloszlások már sokkal érdekesebb változásokat mutatnak (37.b ábra). Ezekről összességében leírható, hogy SPU csúcs helyzetével együtt közel lineárisan növekszik a görbe félértékszélessége, valamint nagymértékben különböznek egymástól a hisztogramok lefutásai. Azon stimulusoknál, amelyek vérbőséget, RBC koncentráció növekedést mutatnak (hűtés, kapszaicin) a sebesség eloszlás grafikonjukon apró oldal csúcsok is megfigyelhetőek voltak. Ezen csúcsocskák

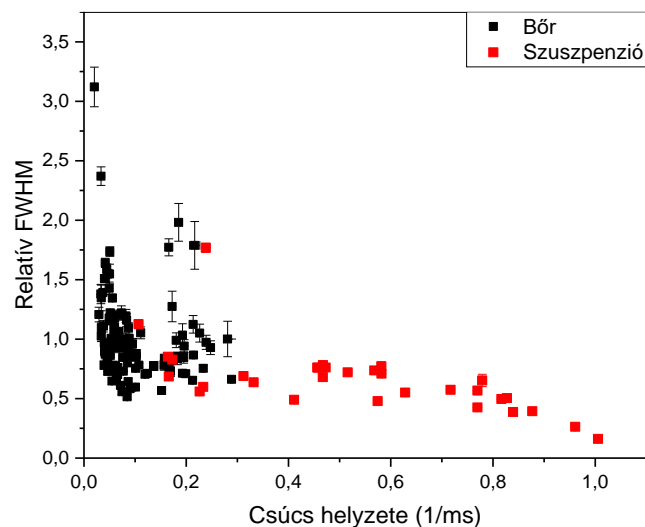
megjelenésének oka az lehet, hogy a vizsgált területen egy laterális irányban inhomogén sebesség eloszlás alakulhatott ki, vagyis a kapilláris áramlás mellett a bőrben lévő nagyobb erek áramlásai is láthatóvá váltak.



37. ábra Alkar bőr felületén mért sebesség histogramok változásai különböző statikus szóró rétegek (a) és stimulusok (b) hatására

### 8.3.3. Összehasonlítás

Az előzőekből látható volt, hogy a statikus szórás hatására mind a szövetmodell, mind pedig a bőr histogramjainak viselkedése hasonló tendenciákat mutat (kiszélesedés, eltolódás). Hogy pontosabb képek kapjunk erről, a sebesség histogramokra Lorentz görbét illesztettem. Ezen illesztésből kapott félértékszélesség (FWHM) és csúcshelyzete hányadosából bevezettem a relatív félértékszélességet. A 38. ábrán látható, hogy a relatív FWHM a szövetmodell esetén csak kismértékben változik, míg bőr esetén drasztikus változások láthatóak. Ezen fő különbség oka bőrben erősebben jelenlévő vegyes szórás lehet, valamint a bőr modell nem egyezik meg tökéletesen optikailag a vizsgált szövettel.



38. ábra A sebesség histogramok relatív félértékszélességének változása szövet modell (piros) és különböző stimulusok által ingerelt bőr (fekete) esetén

#### **8.4. Összefoglaló**

A hisztogramok vizsgálata azt mutatta, hogy amennyiben a szövetben lévő különböző sebességi eloszlású részek nincsenek laterális irányba elkülönülve, csak mélységben különböznek, akkor az nem eredményez bimodális profilt. Vagyis ezen technika nem alkalmas mélység szerinti sebesség eloszlások megállapítására.

A hisztogramoknak a növekvő statikus szórás hatására bekövetkező eltolódása megfelel a korábbi fejezetekben tárgyalt átlagos SPU változásnak mind a szövetmodellek, mind pedig bőr felület esetén, ugyanakkor eltolódást kísérő kiszélesedés nagymértékben eltérő szövetmodell és bőr esetén. Ennek lehetséges oka, hogy a szövetmodell nem képes az élő szövet minden optikai tulajdonságát megfelelően szimulálni úgy, mint az abszorpció, szórási hatáskeresztmetszet, a bőr alsóbb rétegeinek statikus szórása stb.

## 9. Összefoglaló

Annak ellenére, hogy a LASCA technika alkalmazása több évtizedes múltra tekint vissza, a megbízható kvantitatív mérések megvalósítása sok esetben nehézségekbe ütközik. A mérések során számolt kontrasztot, majd az ebből levezett korrelációs időt számos tényező befolyásolja, többek között a szórási viszonyok megváltozása, a rendszer kalibrálásának módja és a vizsgált szövet esetleges remegése, ezért módszer mérési pontosságának növeléséhez és a szélesebb körű elterjedéséhez további fejlesztések szükségesek. A PhD disszertációmban bemutatott munkám során a több expozíciós időt használó LASCA mérés technikával kapcsolatos három nagyobb témakört érintettem: a megvilágítás fejlesztése, vegyes szórás jelenségének és a szövet optikai tulajdonságainak mérések közbeni változásának problémája, valamint új mérési módszerek alkalmazhatóságának vizsgálata. A feltételezések bizonyítására, illetve a következtetéseim ellenőrzésére több szakaszban is kísérleteket végeztem el, minden egyes témakörben a kapott új eredményeket összevettem az irodalommal. Az elért eredményeimet részletesebben az alábbi tézispontokba foglaltam össze.

### 9.1. Tézispontok

#### [T1] Nyaláb homogenizáló diffúzorok alkalmazhatóságának vizsgálata

Egyenletes megvilágítások megvalósításra, különböző gyártók az ún. nyaláb homogenizáló diffúzorokat javasolják, akár lézeres fényforrás alkalmazása esetén is. A katalógusok szerint az ilyen diffúzorok makroszkopikusan valóban homogén megvilágítást hoznak létre, azonban nagy szögfelbontású, objektív speckle jelenség által létrehozott inhomogenitásról kevés információ áll rendelkezésre.

[T1/A] Egy lézer dióda közvetlenül, illetve MM optikai szálból kollimált fényével kivilágítva a vizsgált diffúzorokat kimutattam, hogy a vetített kép az objektív speckle jellemzőit mutatja, az interferencia foltok mérete pedig kevéssel meghaladja azt az értéket, amit a homogénean megvilágított véletlenszerűen szóró felületek elméleti modellje ad.

[T1/B] Megvizsgáltam, hogy milyen feltételek alkalmazása mellett érhetünk el megapixeles gépi látás, vagy LASCA számára alkalmas homogén megvilágítást. Ennek feltétele, hogy a speckle méret jóval kisebb legyen, mint az érzékelő egyetlen pixeléhez tartozó látótér. Szimulációval kimutattam, hogy a két méret aránya legalább 1:10-hez kell legyen ahhoz, hogy a Michelson-kontraszt ne legyen nagyobb, mint egy kompromisszumként elfogadható 0,3-as érték. A legnagyobb effektív felbontást a MM szálból kollimált lézerek fény alkalmazásával tudtam elérni: 660 nm-es lézerek és a teljesen kivilágított 24 mm átmérőjű, 20° és

50°-os vetítési szögű diffúzorok esetén a fenti feltételekkel 750, illetve 1900 effektív pixelnyi folt átmérőt kaptam. [S1][S9]

### **[T2] A LASCA rendszer optikájának fejlesztése**

Kifejlesztettem egy flexibilis karra szerelhető optikai egységet, mely az alábbi fő jellemzőkkel rendelkezik. Koaxiális megvilágító-leképező rendszert alakítottam ki, amellyel kiküszöbölhető a ferde megvilágításból eredő árnyék hatás, emellett a lehetővé válhatnak a nehezen hozzáférhető helyeken (pl. keskeny résen keresztül) történő mérések is. A sémát egy polarizációs nyalábosztó lap felhasználásával valósítottam meg, ezáltal elkerülve a nyalábosztó kockákra jellemző többszörös visszaverődést. A LASCA rendszer megbízhatóságát egy VHG hullámhossz stabilizált lézerrel növeltem meg, melynek fényét egy egymódusú polarizációtartó optikai csatolva juttattam el az optikai egységhez. Az általunk alkalmazott impulzus üzemű megvilágításnál a korábban használt klasszikus Fabry-Perot lézerhez képest jobb hullámhossz stabilitást biztosított (módusugrás-mentes működés, nagy koherenciahossz). [S2,S3][S6-S8]

### **[T3] A vegyes szórás jelentőségének bizonyítása**

A kontraszt alapján korrelációs időt számító modellek azon az egyszerűsítésen alapulnak, hogy a speckle képek kialakulásához olyan fotonok járulnak hozzá, amelyek kizárólagosan vagy a felszíni mozdulatlan részecskéken, vagy pedig az alsóbb, vörösvérttesteket tartalmazó térfogatban szóródnak, ugyanakkor a korábbi, klasszikus szövet modelleken végzett mérések azt mutatták, hogy ha a mikrogömb szuszpenziót valamilyen szóró réteggel (pl. Teflon) lefedik, az így számolt korrelációs idők a fedetlen szuszpenzióhoz képest némileg nagyobb értéket mutatnak. A szórás egy valószínűségi folyamat, ezért kell legyenek olyan fotonok, amelyek vegyes szórást szenvednek, azaz mind a felületi mozdulatlan, mind pedig a mélységi rétegekben egyaránt szóródnak (vegyes szórás).

[T3/A] Egy szisztematikus mérésorozat keretében mozdulatlan szórórétegekkel fedett mikrogömb szuszpenzióból álló szövetmodelleken, illetve szórórétegekkel fedett bőr felületeken vizsgáltam a kontrasztnak az expozíciós időtől való függését. Kimutattam, hogy a statikus szóródás hozzájárulásának relatív növelésével a kontraszt görbe dinamikai tartománya besszűkül, ugyanakkor mindkét vizsgált kiértékelési modell alapján kapott korrelációs idők a magasabb értékek felé tolódtak el.

[T3/B] Vegyes szórás hozzájárulásnak vizsgálatához egy új szövet modellt alkottam meg. Egy nyalábosztó kocka segítségével a dinamikus (mikrogömb szuszpenzió) és a statikus (mozdulatlan szóró réteg) szórást fizikailag elkülönítve kezelhettem és az így szórt fotonokat a kamera érzékelőjére átfedésben képeztem le, így létrehozva vegyes szórás mentes interferencia képeket. Ezen méréseket összevetve a klasszikus szövet modell eredményeivel azt kaptam,

hogy mindkét kiértékelési modell képes jó kezelni a statikus szórást, ha kiküszöböljük a vegyes szórást valószínűségét, azaz a korábban említett korrelációs idő eltolódását az átlagolási hatás miatt a vegyes szórás okozza. A mérési pontosság növelése érdekében szükséges valamely korrekció bevezetése az áramló részecskékre jellemző korrelációs idő meghatározására, függetlenül az őket borító felületi szórórétegtől. [S2][S7]

#### **[T4] A LASCA rendszer előzetes kalibrációjának korlátai: a bőr szórási tulajdonságainak függése a perfúziótól**

A LASCA mérések során kontraszt értékekből korrelációs időt számoló modellek a rendszer (előzetes) kalibrációját is magában foglalják, melyeket az adott mérőrendszer jellemzői, valamint a minta optikai (szórási, abszorpciós) tulajdonságai együtt határoznak meg. Az előzetes kalibráció feltételezi, hogy az egy mérési folyamat során a szórási tulajdonságok nem változnak. A több expozíciós időt alkalmazó rendszerek (MESI) alkalmasak a kontraszt-expozíciós idő görbe aszimptótáinak meghatározására, melyek alkalmasak a rendszer optikai tulajdonságainak kalibrálására.

[T4/A] Az irodalom szerint a szövetek optikai tulajdonságai függenek az aktuális perfúziós állapottól. Azért, hogy megvizsgáljam ennek a hatását a kontraszt-expozíciós idő görbékre ( $K(T)$ ), egy szisztematikus méréssorozat keretében az alkar belső oldali bőrfelületén egymástól nagymértékben eltérő perfúziós állapotokat hoztam létre a következő stimulusok alkalmazásával: felkar elszorítása, kapszaicin krémmel való kezelés és lokális hűtés. Megállapítottam, hogy a kontraszt görbe rövid és hosszú expozíciós idejű aszimptótái ( $K(0)$  és  $K(\infty)$ ) együtt vagy külön-külön is változhatnak a mérések során. A legnagyobb mértékű változást az elszorítás és a kapszaicin hatására figyeltem meg. Az artériás elszorítás esetén a  $K(0)$  kis mértékű (~3%) növekedésével együtt a  $K(\infty)$  mintegy 15%-ot emelkedett, ami a statikus szórás hozzájárulásának növekedését mutatja. Az RBC koncentráció erőteljes növekedését okozó kapszaicin hatására, a  $K(0)$  mintegy 15%-kal csökkent a  $K(\infty)$  kis mértékű (<5%) emelkedése mellett. Ezen változások arra utalnak, hogy a bőr optikai tulajdonságainak megváltozása miatt az előzetes kalibrációk érvényüket veszíthetik. Nagymértékű perfúzió változásokat magába foglaló mérések során az adatok megbízhatóságának növelése érdekében szükségessé válhat a rendszer folyamatos kalibrálása, például a MESI rendszerek alkalmazásával azzal a feltétellel, hogy az optikai tulajdonságokat jellemző illesztési paraméterek szabadon változhatnak.

[T4/B] Mivel a MESI mérőmódszerek időbeli felbontóképessége jellemzően kisebb, mint az egyetlen expozíciós időt tartalmazó (SESI) eljárásé különböző kombinált módszerek alkalmazhatóságát teszteltem, melyek kompromisszumok árán a két módszer előnyeit

kombinálhatják. Az alábbi 4 számítási módszer eredményeit vetttem össze: (i) folyamatos MESI (1, 3, 9, 27, 81, 162 ms expozíciós időkkel), melyhez viszonyítottam a többi eljárás eredményeit, (ii) egy MESI által elvégzett előkalibrációt követő SESI, mely olyan expozíciós időt használ (9 ms), mely a  $K(T)$  görbe meredek szakaszára esik, (iii)  $K(0)$  rögzítése és a hosszú expozíciós idők használata (81, 162 ms), valamint (iv)  $K(\infty)$  rögzítése és a rövid expozíciós idők (1, 3 és 9 ms) alkalmazása. A számolások eredményei alapján a folyamatos MESI-től való legnagyobb, 50%-ot is meghaladó eltérést a legjobb időbeli felbontást biztosító előkalibrált SESI (ii) esetén tapasztaltam. A legjobb egyezést a (iv) esetben kaptam, ahol az eltérések a statisztikai szóráson belül voltak. Ez utóbbi módszer alkalmazásával legalább kétszerére nő az időbeli felbontóképesség a MESI-hez képest, azonban további optimalizálással két expozíciós idő alkalmazása is elégséges lehet (pl.: 0,1 és 9 ms). [S3]

## 10. Summary

Even though the LASCA technique has been in use for decades, reliable quantitative measurements are often difficult to obtain. The contrast and the derived correlation times are affected by a number of factors including changes in scattering of the tissue, the way the system is calibrated and possible tremor of the tissue under test, therefore further improvements are needed to increase the accuracy of the method and to make it more widely available. The work presented in my PhD dissertation addressed three major issues related to the LASCA measurement technique using multiple exposure times: the development of illumination system, the problem of mixed scattering phenomena, the variation of tissue optical properties during measurements, and the applicability of new measurement methods. In order to prove my hypotheses and to verify my conclusions, I have carried out experiments in several stages, comparing the new results obtained in each of these areas with the literature. The results are summarized in more details in the following thesis points.

### 10.1. Thesis points

#### [T1] Investigating the applicability of beam homogenizing diffusers

To achieve uniform illumination, various manufacturers recommend so-called beam homogenizing diffusers, applicable even for laser light sources. According to the catalogues, such diffusers do indeed produce macroscopically homogeneous illumination, but little information is available on the inhomogeneity created by the objective speckle phenomenon at high angular resolution.

[T1/A] By illuminating the investigated diffusers with light collimated directly from a laser diode or from a MM optical fiber, I showed that the projected grainy image exhibits the characteristics of the objective speckle. The size of the speckles slightly exceeding the value given by a theoretical model of homogeneously illuminated randomly scattering surfaces.

[T1/B] I investigated the conditions under which homogeneous illumination suitable for megapixel machine vision, or LASCA, can be achieved. This requires that the speckle size is much smaller than the field of view corresponding to single pixel of the sensor. By simulation, I have shown that the ratio of the two sizes must be at least 1:10 in order to achieve a Michelson contrast no larger than a compromise value of 0.3. The highest effective resolution was obtained using laser light collimated from MM fiber: using a 660 nm laser and fully illuminated 24 mm diameter diffusers with projection angles of 20° and 50°, I obtained projected diameters corresponding to 750 and 1900 effective pixels, respectively, under the above specified conditions. [S1][S9]



## **[T2] Improving the optics of the LASCA system**

I developed a flexible arm-mounted optical unit with the following main features. A coaxial illumination-imaging system was built in order to eliminate the shadow effect due to oblique illumination and to allow measurements in difficult to access places (e.g. through a narrow slit). The scheme was implemented using a polarizing beamsplitter plate, thus avoiding the multiple reflections typical of beamsplitter cubes. I increased the reliability of the LASCA system by using a VHG wavelength-stabilized laser with light coupled into a single-mode polarizing maintaining optical fiber and guided to the optical unit. The VHG laser more suitable for the applied pulsed mode illumination due to its improved wavelength stability (mode hopping-free operation, high coherence length) as compared to the previously used classical Fabry-Perot laser [S2,S3][S6-S8].

## **[T3] Demonstration the significance of mixed scattering**

Models used to calculate the correlation times from the image contrast are based on the simplification that speckle images are formed by photons which scatter exclusively either on the surface immobile particles or in the lower volume containing red blood cells. Earlier measurements on classical tissue phantoms have shown that if the microsphere emulsions are covered with static scattering layer (e.g. Teflon), the correlation times calculated in this way show a slightly higher value as compared to the uncovered emulsion. Since scattering is a probabilistic process there must be photons that undergo mixed scattering, i.e. scattering in both the surface static and in depth moving scattering centers.

[T3/A] In a systematic series of measurements, tissue phantoms consisting of microsphere emulsion covered with static scattering layers and skin surfaces covered with scattering layers were used to investigate the dependence of contrast on exposure time. I have shown that the increase in the relative contribution of static scattering resulted in narrowing of the dynamic range of the contrast curve, while the correlation times obtained from both applied evaluation models shifted towards higher values.

[T3/B] To study the contribution of mixed scattering, I designed a new tissue phantom. By applying a beamsplitter cube, I was able to physically separate the dynamic (microspherical emulsion) and static (scattering layer) scattering and overlapped the scattered photons on the camera sensor, thus creating interference images free of mixed scattering. By comparing these measurements with the results of the classical tissue phantom, I found that both evaluation models can handle static scattering if the probability of mixed scattering is negligible. This means that the aforementioned correlation time shift can be attributed to the averaging effect caused by mixed scattering. In order to increase the accuracy of the measurement, it is necessary

to introduce a correction to determine the correlation time for the flowing particles, independent of the surface scattering layer covering them. [S2][S7]

#### **[T4] Limitations of the pre-calibration of the LASCA system: dependence of skin scattering properties on perfusion**

In LASCA measurements, the applications of models used to calculate correlation times from contrast values involve a (preliminary) calibration of the system, which is influenced by the characteristics of the measurement system in combination with the optical (scattering, absorption) properties of the sample. The precalibration assumes that the scattering properties do not change during a measurement process. Multi-exposure speckle imaging (MESI) systems are suitable for determining asymptotes of the contrast-exposure time curve ( $K(T)$ ), which can be used to calibrate the optical properties of the system.

[T4/A] According to the literature, the optical properties of tissues depend on the current perfusion state. In order to investigate the effect of this on  $K(T)$  curves, I performed a systematic series of measurements on the inner forearm skin by creating largely different perfusion states using the following stimuli: upper arm occlusion, treatment with capsaicin cream and local cooling. I found that the asymptotes of the contrast curve at short and long exposure times ( $K(0)$  and  $K(\infty)$ ) can vary together or separately during the measurements. The largest variation was observed for the cases of occlusion and capsaicin. For arterial occlusion, a small increase (~3%) in  $K(0)$  was accompanied by an increase in  $K(\infty)$  of about 15%, indicating an growth in the contribution of static scattering. When applying capsaicin, which caused a strong increase in RBC concentration,  $K(0)$  decreased by about 15% along with a small increase (<5%) in  $K(\infty)$ . These changes suggest that alteration of the optical properties of the skin may invalidate the previous calibrations. Therefore, measurements involving large changes in perfusion may require continuous re-calibration of the system to increase the reliability of the data, e.g. by using MESI systems with the condition that the fitting parameters characterizing the optical properties are free variables.

[T4/B] As the temporal resolution of MESI methods is typically lower than that of single exposure time (SESI) methods, I tested the applicability of different approaches that can combine the advantages of both methods with some trade-offs. The results of 4 computational methods are compared: (i) a continuous MESI (1, 3, 9, 27, 81, 162 ms exposure times), against which I compared the results of the other methods, (ii) a SESI using an exposure time (9 ms), which falls on the steepest part of the  $K(T)$  curve following a pre-calibration by MESI, (iii) fixing  $K(0)$  and using long exposure times (81, 162 ms), and (iv) fixing  $K(\infty)$  and using short exposure times (1, 3 and 9 ms) in evaluation. The results of these calculations show that the

largest deviation from the continuous MESI, exceeding 50%, was observed for the pre-calibrated SESI (ii), which would provide the best temporal resolution. The best agreement was obtained in case (iv), where the deviations were within the statistical standard deviation. Using the latter method at least doubles the temporal resolution compared to MESI, but with further optimization, using only two exposure times (e.g., 0.1 and 9 ms) may be sufficient. **[S3]**

## Publikációs lista

### *A tézispontok alapjául szolgáló tudományos közlemények*

- [S1] B. Kondász, B. Hopp, and T. Smausz, "Homogenization with coherent light illuminated beam shaping diffusers for vision applications: spatial resolution limited by speckle pattern," J. Eur. Opt. Soc. Publ. 14, 27 (2018). MTMT azonosító: **30386979**, Impa
- [S2] B. Kondász, B. Hopp, and T. Smausz, "Mixed scattering as a problem in laser speckle contrast analysis," Appl. Opt. 60, 6593 (2021). MTMT azonosító: **32337027**
- [S3] T. K. Smausz and B. Kondász, "Multi-exposure laser speckle contrast analysis system calibration limited by perfusion dependent scattering on the skin," J. Biomed. Opt. 28(9), 096006 (2023). MTMT azonosító: **34144534**

### *Egyéb nemzetközi, referált folyóiratcikkek*

- [S4] S. Tomi, G. Kecskeméti, B. Kondász, G. Papp, Z. Bengery, K. Judit, and H. Béla, "Nanoparticle Generation From Nitinol Target Using Pulsed Laser Ablation," J. Laser Micro/Nanoengineering 10, 171–174 (2015). MTMT azonosító: **2948864**
- [S5] T. Smausz, B. Kondász, T. Gera, T. Ajtai, N. Utry, M. Pintér, G. Kiss-Albert, J. Budai, Z. Bozóki, G. Szabó, and B. Hopp, "Determination of UV–visible–NIR absorption coefficient of graphite bulk using direct and indirect methods," Appl. Phys. A 123, 633 (2017). MTMT azonosító: **3320425**

### *Konferencia előadások és poszterek*

- [S6] B. Kondász, B. Hopp, and T. Smausz Kolumbán, "A vegyes szórás mint probléma LASCA perfúziós mérések esetén," in Kvantumelektronika 2021 (Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar Fizikai Intézet, 2021), pp. 108–111. MTMT azonosító: **32063359**
- [S7] T. Smausz and B. Kondász, "Perfusion Measurement on Skin Model with Lasca Affected by Static and Mixed Scattering," in 2019 Conference on Lasers and Electro-Optics Europe & European Quantum Electronics Conference (CLEO/Europe-EQEC) (IEEE, 2019), pp. 1–1. MTMT azonosító: **34103109**
- [S8] B. Kondász, B. Hopp, and T. Smausz, "Lasca Perfusion Histogram on Tissue Phantoms Composed of Bimodal Speed Distribution Scattering Centers," in 2019 Conference on Lasers and Electro-Optics Europe & European Quantum Electronics Conference (CLEO/Europe-EQEC) (IEEE, 2019), pp. 1–1. MTMT azonosító: **31170437**
- [S9] B. Kondász, B. Hopp, and T. Smausz Kolumbán, "Homogenizáló diffúzorok alkalmazása lézeres kivilágításra: lehetőségek és korlátok," (2018). MTMT azonosító: **2814971**
- [S10] T. Smausz Kolumbán, G. Kecskeméti, B. Kondász, P. Gergely, B. Zsolt, J. Heszlerné Kopniczky, and B. Hopp, "Nanoparticle Generation From Nitinol Target Using Pulsed Laser Ablation," in The 15th International Symposium on Laser Precision Microfabrication (2014), p. 44. MTMT azonosító: **2814971**
- [S11] B. Kondász, G. Kecskeméti, T. Smausz Kolumbán, C. Tápai, J. Heszlerné Kopniczky, and B. Hopp, "Nitinol nanorészecskék előállítás a lézeres besugárzással," in VII. Szimpózium a Hazai Kvantumelektronikai Kutatások Eredményeiről (2014). MTMT azonosító: **2949403**

## Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék szívből köszönetet mondani minden olyan személynek és intézménynek, akik hozzájárultak ahhoz, hogy kutatásom és doktori értekezésem így megvalósulhasson.

Először is, hálásan köszönöm témavezetőmnek, *Dr. Smausz Kolumbán Tamásnak*, aki kiemelkedő szakmai tudásával és támogatásával mindig segített, amikor a kutatásom nehézségekbe ütközött. Beszélgetéseink során felmerült ötletei és észrevételei katalizátorként hatottak előrehaladásomra, és nélküle a tézisek és cikkek, melyek értekezésem alapjait alkotják, nem nyerték volna el jelenlegi formájukat.

Külön köszönet illeti *Dr. Hopp Bélát*, aki már hallgató korom óta irányította és inspirálta kutatói pályafutásomat. Nélküle nem lettek volna meg a kutatásomhoz szükséges eszközök, és állhatatos közreműködése nélkül nem valósulhatott volna meg a projekt.

Nem feledkezem meg *Dr. Kopniczky Juditról* sem, aki bár nem saját kutatási területén mozog, mindig elkötelezett módon átnézte cikkeim kéziratait, és értékes tanácsokkal segített a javításban és finomításban.

Hálás köszönetemet fejezem ki *Dr. Zölei-Szénási Dánielnek* is, aki segített megérteni a korábban megírt LASCA rendszer vezérlő program forráskódját, és további fejlesztéseket is végzett a lézer villogtatásáról gondoskodó vezérlő mikroprocesszor kódjában.

Köszönettel tartozom dolgozószoba társamnak, *Dr. Gera Tamásnak*, akivel közös szakmai beszélgetéseink során számtalan új ötlettel gazdagodtam, és akinek pozitív hozzáállása és közreműködése hozzájárult a sikeres munkakörnyezethez.

Nem maradhat el a köszönet a *Fény-anyag Kölcsönhatás Kutatócsoport* valamennyi tagjának, akik vállalták a „kísérleti nyúl” szerepét a mérések során, még akkor is, ha ez időnként kellemetlenséggel járt. Az ő hozzájárulásuk nélkül a kutatás nem lett volna teljes és átfogó.

Az *Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék* minden dolgozójának külön köszönettel tartozom, hiszen az ő szakértelmük és segítségük nélkül a megfelelő munkakörnyezet és eszközök hiányoztak volna.

Végezetül, de nem utolsó sorban, mély hála és köszönet jár *családomnak*, akik mindvégig mellettem álltak, támogatták és megértették, hogy a kutatómunka időigényes és elkötelező folyamat. Az ő türelmük és megértésük nélkül mindez nem valósulhatott volna meg.

Még egyszer mindenkinek köszönöm a hozzájárulását és támogatását.

## Irodalomjegyzék

1. A. F. Fercher and J. D. Briers, "Flow visualization by means of single-exposure speckle photography," *Opt. Commun.* **37**, 326–330 (1981).
2. F. Zhong, R. Kumar, and C. Quan, "RGB laser speckles based 3D profilometry," *Appl. Phys. Lett.* **114**, 1–5 (2019).
3. M. Giglio, S. Musazzi, and U. Perini, "Distance measurement from a moving object based on speckle velocity detection," *Appl. Opt.* **20**, 721 (1981).
4. M. L. Jakobsen and S. G. Hanson, "Distance measurements by speckle correlation of objective speckle patterns, structured by the illumination," *Appl. Opt.* **51**, 4316 (2012).
5. D. V. Semenov, I. S. Sidorov, E. Nippolainen, and A. A. Kamshilin, "Speckle-based sensor system for real-time distance and thickness monitoring of fast moving objects," *Meas. Sci. Technol.* **21**, 045304 (2010).
6. D. Léger, E. Mathieu, and J. C. Perrin, "Optical Surface Roughness Determination Using Speckle Correlation Technique," *Appl. Opt.* **14**, 872 (1975).
7. D. Nicolae, "Vibration Measurement by Speckle Interferometry between High Spatial and High Temporal Resolution," in *Holography, Research and Technologies* (InTech, 2011).
8. F. M. Dickey, ed., *Laser Beam Shaping: Theory and Techniques* (CRC press, 2014).
9. R. Voelkel and K. J. Weible, "Laser beam homogenizing: limitations and constraints," in *Optical Fabrication, Testing, and Metrology III*, A. Duparré and R. Geyl, eds. (2008), Vol. 7102, p. 71020J.
10. T. S. McKechnie, "Speckle reduction," in *Laser Speckle and Related Phenomena*, J. C. Dainty, ed. (Springer, 1975), pp. 123–170.
11. J. Maycock, B. M. Hennelly, J. B. McDonald, Y. Frauel, A. Castro, B. Javidi, and T. J. Naughton, "Reduction of speckle in digital holography by discrete Fourier filtering," *J. Opt. Soc. Am. A* **24**, 1617 (2007).
12. K. Kasazumi, Y. Kitaoka, K. Mizuuchi, and K. Yamamoto, "A Practical Laser Projector with New Illumination Optics for Reduction of Speckle Noise," *Jpn. J. Appl. Phys.* **43**, 5904–5906 (2004).
13. S. Kubota and J. W. Goodman, "Very efficient speckle contrast reduction realized by moving diffuser device.," *Appl. Opt.* **49**, 4385–91 (2010).
14. J.-W. Pan and C.-H. Shih, "Speckle noise reduction in the laser mini-projector by vibrating diffuser," *J. Opt.* **19**, 045606 (2017).

15. L. Wang, T. Tschudi, T. Halldórsson, and P. R. Pétursson, "Speckle reduction in laser projection systems by diffractive optical elements," *Appl. Opt.* **37**, 1770 (1998).
16. M. N. Akram, Z. Tong, G. Ouyang, X. Chen, and V. Kartashov, "Laser speckle reduction due to spatial and angular diversity introduced by fast scanning micromirror," *Appl. Opt.* **49**, 3297 (2010).
17. D. S. Mehta, D. N. Naik, R. K. Singh, and M. Takeda, "Laser speckle reduction by multimode optical fiber bundle with combined temporal, spatial, and angular diversity," *Appl. Opt.* **51**, 1894 (2012).
18. S. C. Shin, S. S. Yoo, S. Y. Lee, C.-Y. Park, S.-Y. Park, J. W. Kwon, and S.-G. Lee, "Removal of hot spot speckle on laser projection screen using both the running screen and the rotating diffuser," *Displays* **27**, 91–96 (2006).
19. A. Furukawa, N. Ohse, Y. Sato, D. Imanishi, K. Wakabayashi, S. Ito, K. Tamamura, and S. Hirata, "Effective speckle reduction in laser projection displays," in *Emerging Liquid Crystal Technologies III*, L.-C. Chien, ed. (2008), Vol. 6911, p. 69110T.
20. T. Iwai and T. Asakura, "Speckle reduction in coherent information processing," *Proc. IEEE* **84**, 765–781 (1996).
21. J. W. Goodman, "Statistical properties of laser speckle patterns," in *Laser Speckle and Related Phenomena*, J. C. Dainty, ed. (Springer, 1975), pp. 9–75.
22. R. Jones and C. Wykes, *Holographic and Speckle Interferometry*, 2nd ed., Cambridge Studies in Modern Optics (Cambridge University Press, 1989).
23. J. C. Dainty, *Laser Speckle and Related Phenomena*, Topics in Applied Physics (Springer Berlin Heidelberg, 1975), Vol. 9.
24. R. P. Godinho, M. M. Silva, J. R. Nozela, and R. A. Braga, "Online biospeckle assessment without loss of definition and resolution by motion history image," *Opt. Lasers Eng.* **50**, 366–372 (2012).
25. M. Z. Ansari, E. E. Ramírez-Miquet, I. Otero, D. Rodríguez, and J. G. Darias, "Real time and online dynamic speckle assessment of growing bacteria using the method of motion history image," *J. Biomed. Opt.* **21**, 066006 (2016).
26. H. Fujii, K. Nohira, Y. Shintomi, T. Asakura, and T. Ohura, "Blood flow observed by time-varying laser speckle," *Opt. Lett.* **10**, 104 (1985).
27. H. Fujii, K. Nohira, Y. Yamamoto, H. Ikawa, and T. Ohura, "Evaluation of blood flow by laser speckle image sensing Part 1," *Appl. Opt.* **26**, 5321 (1987).
28. H. J. Rabal and R. A. Braga Jr, *Dynamic Laser Speckle and Applications*, 1st ed. (CRC Press, 2018).

29. A. J. Pérez, R. J. González-Peña, R. Braga, Á. Perles, E. Pérez-Marín, and F. J. García-Diego, "A portable dynamic laser speckle system for sensing long-term changes caused by treatments in painting conservation," *Sensors (Switzerland)* **18**, (2018).
30. R. Arizaga, M. Trivi, and H. Rabal, "Speckle time evolution characterization by the co-occurrence matrix analysis," *Opt. Laser Technol.* **31**, 163–169 (1999).
31. P. J. Bryanston-Cross, *Laser Light Scattering: Basic Principles and Practice* (1993), Vol. 25.
32. R. R. Cardoso and R. A. Braga, "Enhancement of the robustness on dynamic speckle laser numerical analysis," *Opt. Lasers Eng.* **63**, 19–24 (2014).
33. D. D. Duncan and S. J. Kirkpatrick, "Can laser speckle flowmetry be made a quantitative tool?," *J. Opt. Soc. Am. A. Opt. Image Sci. Vis.* **25**, 2088–94 (2008).
34. J. A.K., S. N., and R. R. M., "Measuring blood flow : techniques and applications - a review," *IJRRAS* **6**, 203–216 (2011).
35. A. B. Parthasarathy, W. G. Shin, X. J. Zhang, and A. K. Dunn, "Laser speckle contrast imaging of flow in a microfluidic device," in *Biomedical Applications of Light Scattering*, A. Wax and V. Backman, eds. (2007), Vol. 6446, p. 644604.
36. P. Zakharov, A. C. Völker, M. T. Wyss, F. Haiss, N. Calcinaghi, C. Zunzunegui, A. Buck, F. Scheffold, and B. Weber, "Dynamic laser speckle imaging of cerebral blood flow," *Opt. Express* **17**, 13904 (2009).
37. 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 (2008).
38. O. Thompson, M. Andrews, and E. Hirst, "Correction for spatial averaging in laser speckle contrast analysis," *Biomed. Opt. Express* **2**, 1021 (2011).
39. A. Nadort, R. G. Woolthuis, T. G. van Leeuwen, and D. J. Faber, "Quantitative laser speckle flowmetry of the in vivo microcirculation using sidestream dark field microscopy," *Biomed. Opt. Express* **4**, 2347 (2013).
40. R. Bandyopadhyay, A. S. Gittings, S. S. Suh, P. K. Dixon, and D. J. Durian, "Speckle-visibility spectroscopy: A tool to study time-varying dynamics," *Rev. Sci. Instrum.* **76**, 093110 (2005).
41. P. Zakharov, A. Völker, A. Buck, B. Weber, and F. Scheffold, "Quantitative modeling of laser speckle imaging," *Opt. Lett.* **31**, 3465 (2006).
42. S. M. S. Kazmi, E. Faraji, M. A. Davis, Y.-Y. Huang, X. J. Zhang, and A. K. Dunn, "Flux or speed? Examining speckle contrast imaging of vascular flows," *Biomed. Opt. Express* **6**, 2588 (2015).



43. J. Qiu, Y. Li, Q. Huang, Y. Wang, and P. Li, "Correcting speckle contrast at small speckle size to enhance signal to noise ratio for laser speckle contrast imaging," *Opt. Express* **21**, 28902 (2013).
44. C. Wang, Z. Cao, X. Jin, W. Lin, Y. Zheng, B. Zeng, and M. Xu, "Robust quantitative single-exposure laser speckle imaging with true flow speckle contrast in the temporal and spatial domains," *Biomed. Opt. Express* **10**, 4097 (2019).
45. T. Smausz, D. Zölei, and B. Hopp, "Real correlation time measurement in laser speckle contrast analysis using wide exposure time range images," *Appl. Opt.* **48**, 1425 (2009).
46. D. Zölei, T. Smausz, B. Hopp, and F. Bari, "Self-tuning laser speckle contrast analysis based on multiple exposure times with enhanced temporal resolution," *J. Eur. Opt. Soc. Rapid Publ.* **8**, 13053 (2013).
47. M. Hultman, I. Fredriksson, M. Larsson, A. Alvandpour, and T. Strömberg, "A 15.6 frames per second 1-megapixel multiple exposure laser speckle contrast imaging setup," *J. Biophotonics* **11**, e201700069 (2018).
48. A. K. Dunn, H. Bolay, M. A. Moskowitz, and D. A. Boas, "Dynamic Imaging of Cerebral Blood Flow Using Laser Speckle," *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **21**, 195–201 (2001).
49. J. D. Briers, "Laser speckle contrast analysis (LASCA): a non-scanning, full-field technique for monitoring capillary blood flow," *J. Biomed. Opt.* **1**, 174 (1996).
50. Y. Zhang, Y. Zhao, W. Li, Z. Qian, and L. Xing, "Enhancement of microvessel in laser speckle image using Gaussian kernel template," *J. Innov. Opt. Health Sci.* **12**, 1–10 (2019).
51. E. B. Postnikov, M. O. Tsoy, P. A. Timoshina, and D. E. Postnov, "Gaussian sliding window for robust processing laser speckle contrast images," *Int. j. numer. method. biomed. eng.* **35**, e3186 (2019).
52. P. G. Vaz, A. Humeau-Heurtier, E. Figueiras, C. Correia, and J. Cardoso, "Laser Speckle Imaging to Monitor Microvascular Blood Flow: A Review," *IEEE Rev. Biomed. Eng.* **9**, 106–120 (2016).
53. D. D. Duncan, S. J. Kirkpatrick, and R. K. Wang, "Statistics of local speckle contrast," *J. Opt. Soc. Am. A* **25**, 9 (2008).
54. H. Cheng, Q. Luo, S. Zeng, S. Chen, J. Cen, and H. Gong, "Modified laser speckle imaging method with improved spatial resolution," *J. Biomed. Opt.* **8**, 559 (2003).
55. H. Cheng and T. Q. Duong, "Simplified laser-speckle-imaging analysis method and its application to retinal blood flow imaging," *Opt. Lett.* **32**, 2188–90 (2007).

56. M. Draijer, E. Hondebrink, T. Van Leeuwen, and W. Steenbergen, "Review of laser speckle contrast techniques for visualizing tissue perfusion," *Lasers Med. Sci.* **24**, 639–651 (2009).
57. H. Cheng, Y. Yan, and T. Q. Duong, "Temporal statistical analysis of laser speckle images and its application to retinal blood-flow imaging," *Opt. Express* **16**, 10214 (2008).
58. J. C. Ramirez-San-Juan, C. Regan, B. Coyotl-Ocelotl, and B. Choi, "Spatial versus temporal laser speckle contrast analyses in the presence of static optical scatterers.," *J. Biomed. Opt.* **19**, 106009 (2014).
59. D. D. Duncan and S. J. Kirkpatrick, "Spatio-temporal algorithms for processing laser speckle imaging data," *Opt. Tissue Eng. Regen. Med. II* **6858**, 685802 (2008).
60. J. Qiu, "Spatiotemporal laser speckle contrast analysis for blood flow imaging with maximized speckle contrast," *J. Biomed. Opt.* **15**, 016003 (2010).
61. A. Rege, J. Senarathna, N. Li, and N. V. Thakor, "Anisotropic processing of laser speckle images improves spatiotemporal resolution," *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **59**, 1272–1280 (2012).
62. A. Khalil, A. Humeau-Heurtier, G. Mahé, and P. Abraham, "Laser speckle contrast imaging: age-related changes in microvascular blood flow and correlation with pulse-wave velocity in healthy subjects," *J. Biomed. Opt.* **20**, 051010 (2014).
63. J. D. Briers and A. F. Fercher, "Retinal blood-flow visualization by means of laser speckle photography.," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **22**, 255–9 (1982).
64. S. Yuan, A. Devor, D. A. Boas, and A. K. Dunn, "Determination of optimal exposure time for imaging of blood flow changes with laser speckle contrast imaging," *Appl. Opt.* **44**, 1823–1830 (2005).
65. W. J. Tom, A. Ponticorvo, and A. K. Dunn, "Efficient Processing of Laser Speckle Contrast Images," *IEEE Trans. Med. Imaging* **27**, 1728–1738 (2008).
66. L. Song and D. Elson, "Endoscopic laser speckle contrast imaging system using a fibre image guide," in *Proc. of SPIE*, A. P. Wax and V. Backman, eds. (2011), Vol. 7907, p. 79070F.
67. C. J. Stewart, R. Frank, K. R. Forrester, J. Tulip, R. Lindsay, and R. C. Bray, "A comparison of two laser-based methods for determination of burn scar perfusion: Laser Doppler versus laser speckle imaging," *Burns* **31**, 744–752 (2005).
68. J. D. Briers, G. Richards, and X. W. He, "Capillary Blood Flow Monitoring Using Laser Speckle Contrast Analysis (LASCA)," *J. Biomed. Opt.* **4**, 164 (1999).

69. O. Thompson, J. Bakker, C. Kloeze, E. Hondebrink, and W. Steenbergen, "Experimental comparison of perfusion imaging systems using multi-exposure laser speckle, single-exposure laser speckle, and full-field laser Doppler," *Dyn. Fluctuations Biomed. Photonics IX* **8222**, 822204 (2012).
70. A. B. Parthasarathy, S. M. S. Kazmi, and A. K. Dunn, "Quantitative imaging of ischemic stroke through thinned skull in mice with Multi Exposure Speckle Imaging," *Biomed. Opt. Express* **1**, 246 (2010).
71. S. M. S. Kazmi, A. B. Parthasarthy, N. E. Song, T. A. Jones, and A. K. Dunn, "Chronic imaging of cortical blood flow using Multi-Exposure Speckle Imaging," *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **33**, 798–808 (2013).
72. Y. Atchia, H. Levy, S. Dufour, and O. Levi, "Rapid multiexposure in vivo brain imaging system using vertical cavity surface emitting lasers as a light source," *Appl. Opt.* **52**, (2013).
73. F. Domoki, D. Zölei, O. Oláh, V. Tóth-Szuki, B. Hopp, F. Bari, and T. Smausz, "Evaluation of laser-speckle contrast image analysis techniques in the cortical microcirculation of piglets," *Microvasc. Res.* **83**, 311–317 (2012).
74. D. Zölei-Szenasi, S. Czimmer, T. Smausz, F. Domoki, B. Hopp, L. Kemeny, F. Bari, and I. Ivanyi, "Enhancements on multi-exposure LASCA to reveal information of speed distribution," *J. Eur. Opt. Soc. Rapid Publ.* **10**, 15033 (2015).
75. A. Rege, K. Murari, A. Seifert, A. P. Pathak, and N. V. Thakor, "Multiexposure laser speckle contrast imaging of the angiogenic microenvironment," *J. Biomed. Opt.* **16**, 056006 (2011).
76. S. M. S. Kazmi, S. Balial, and A. K. Dunn, "Optimization of camera exposure durations for multi-exposure speckle imaging of the microcirculation," *Biomed. Opt. Express* **5**, 2157 (2014).
77. J. A. Arias-Cruz, R. Chiu, H. Peregrina-Barreto, R. Ramos-Garcia, T. Spezzia-Mazzocco, and J. C. Ramirez-San-Juan, "Visualization of in vitro deep blood vessels using principal component analysis based laser speckle imaging," *Biomed. Opt. Express* **10**, 2020 (2019).
78. O. B. Thompson and M. K. Andrews, "Tissue perfusion measurements: multiple-exposure laser speckle analysis generates laser Doppler-like spectra," *J. Biomed. Opt.* **15**, 027015 (2010).
79. T. Smausz, D. Zölei, and B. Hopp, "Laser power modulation with wavelength stabilization in multiple exposure laser speckle contrast analysis," *Speckle 2012 V Int.*

- Conf. Speckle Metrol. **8413**, 84131J (2012).
80. D. D. Postnov, X. Cheng, S. E. Erdener, and D. A. Boas, "Choosing a laser for laser speckle contrast imaging," *Sci. Rep.* **9**, 2542 (2019).
  81. D. Zölei, T. Smausz, B. Hopp, and F. Bari, "Multiple Exposure Time Based Laser Speckle Contrast Analysis: Demonstration of Applicability in Skin Perfusion Measurements," **1**, 28–32 (2012).
  82. T. Dragojević, D. Bronzi, H. M. Varma, C. P. Valdes, C. Castellvi, F. Villa, A. Tosi, C. Justicia, F. Zappa, and T. Durduran, "High-speed multi-exposure laser speckle contrast imaging with a single-photon counting camera," *Biomed. Opt. Express* **6**, 2865 (2015).
  83. M. Hultman, I. Fredriksson, M. Larsson, and T. Strömberg, "Evaluation of a high framerate multi-exposure laser speckle contrast imaging setup," in *High-Speed Biomedical Imaging and Spectroscopy III: Toward Big Data Instrumentation and Management*, K. Goda and K. K. Tsia, eds. (SPIE, 2018), p. 44.
  84. S. Ragol, I. Remer, Y. Shoham, S. Hazan, U. Willenz, I. Sinelnikov, V. Dronov, L. Rosenberg, and A. Bilenca, "Static laser speckle contrast analysis for noninvasive burn diagnosis using a camera-phone imager," *J. Biomed. Opt.* **20**, 086009 (2015).
  85. D. Jakovels, I. Saknite, and J. Spigulis, "Implementation of laser speckle contrast analysis as connection kit for mobile phone for assessment of skin blood flow," *Biophotonics Photonic Solut. Better Heal. Care IV* **9129**, 91293I (2014).
  86. P. Kong, H. Xu, R. Li, G. Huang, and W. Liu, "Laser Speckle Contrast Imaging Based on a Mobile Phone Camera," *IEEE Access* **9**, 76730–76737 (2021).
  87. Y. Kim, W. J. Choi, J. Oh, and J. K. Kim, "Compact Smartphone-Based Laser Speckle Contrast Imaging Endoscope Device for Point-of-Care Blood Flow Monitoring," *Biosensors* **12**, (2022).
  88. A. Chizari, T. Knop, B. Sirmacek, F. van der Heijden, and W. Steenbergen, "Exploration of movement artefacts in handheld laser speckle contrast perfusion imaging," *Biomed. Opt. Express* **11**, 2352 (2020).
  89. R. Reif, J. Qin, L. Shi, S. Dziennis, Z. Zhi, A. L. Nuttall, and R. K. Wang, "Monitoring Hypoxia Induced Changes in Cochlear Blood Flow and Hemoglobin Concentration Using a Combined Dual-Wavelength Laser Speckle Contrast Imaging and Doppler Optical Microangiography System," *PLoS One* **7**, (2012).
  90. L. Zhang, L. Ding, M. Li, X. Zhang, D. Su, J. Jia, and P. Miao, "Dual-wavelength laser speckle contrast imaging (dwLSCI) improves chronic measurement of superficial blood flow in hands," *Sensors (Switzerland)* **17**, 9–11 (2017).

91. J. Qin, R. Reif, Z. Zhi, S. Dziennis, and R. Wang, "Hemodynamic and morphological vasculature response to a burn monitored using a combined dual-wavelength laser speckle and optical microangiography imaging system," *Biomed. Opt. Express* **3**, 455 (2012).
92. J. W. Kim, H. Jang, G. H. Kim, S. W. Jun, and C.-S. Kim, "Multi-spectral laser speckle contrast images using a wavelength-swept laser," *J. Biomed. Opt.* **24**, 1 (2019).
93. M. Zieger, M. Kaatz, S. Springer, R. Riesenberger, A. Wuttig, M. Kanka, S. Stanca, C. Reble, G. Khazaka, R. Sieg, M. De Gregorio, M. Sattler, and F. Fischer, "Multi-wavelength, handheld laser speckle imaging for skin evaluation," *Ski. Res. Technol.* **27**, 486–493 (2021).
94. B. Pahari, S. Chakraborty, B. Sengupta, S. Chaudhuri, W. Martin, J. Taylor, J. Henley, D. Davis, P. K. Biswas, A. K. Sharma, and P. K. Sengupta, "Biophysical Characterization of Genistein in Its Natural Carrier Human Hemoglobin Using Spectroscopic and Computational Approaches," *Food Nutr. Sci.* **04**, 83–92 (2013).
95. X. Wei, P. K. Balne, K. E. Meissner, V. A. Barathi, L. Schmetterer, and R. Agrawal, "Assessment of flow dynamics in retinal and choroidal microcirculation," *Surv. Ophthalmol.* **63**, 646–664 (2018).
96. Y. Tamaki, M. Araie, E. Kawamoto, S. Eguchi, and H. Fujii, "Noncontact, two-dimensional measurement of retinal microcirculation using laser speckle phenomenon," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **35**, 3825–3834 (1994).
97. G. Wang, Y. P. Zhang, Z. Gao, L. B. E. Shields, F. Li, T. Chu, H. Lv, T. Moriarty, X. M. Xu, X. Yang, C. B. Shields, and J. Cai, "Pathophysiological and behavioral deficits in developing mice following rotational acceleration-deceleration traumatic brain injury," *DMM Dis. Model. Mech.* **11**, (2018).
98. A. K. Dunn, A. Devor, A. M. Dale, and D. A. Boas, "Spatial extent of oxygen metabolism and hemodynamic changes during functional activation of the rat somatosensory cortex," *Neuroimage* **27**, 279–290 (2005).
99. A. Mangraviti, F. Volpin, J. Cha, S. I. Cunningham, K. Raje, M. J. Brooke, H. Brem, A. Olivi, J. Huang, B. M. Tyler, and A. Rege, "Intraoperative Laser Speckle Contrast Imaging For Real-Time Visualization of Cerebral Blood Flow in Cerebrovascular Surgery: Results From Pre-Clinical Studies," *Sci. Rep.* **10**, 1–13 (2020).
100. R. Mirdell, S. Farnebo, F. Sjöberg, and E. Tesselaar, "Accuracy of laser speckle contrast imaging in the assessment of pediatric scald wounds," *Burns* **44**, 90–98 (2018).
101. N. Krezdorn, A. Limbourg, F. J. Paprottka, Könniker, R. Ipaktchi, and P. M. Vogt,

- "Assessing burn depth in tattooed burn lesions with LASCA Imaging.," *Ann. Burns Fire Disasters* **29**, 223–227 (2016).
102. J. Q. Nguyen, C. Crouzet, T. Mai, K. Riola, D. Uchitel, L.-H. Liaw, N. Bernal, A. Ponticorvo, B. Choi, and A. J. Durkin, "Spatial frequency domain imaging of burn wounds in a preclinical model of graded burn severity," *J. Biomed. Opt.* **18**, 066010 (2013).
  103. A. Limbourg, C. Radtke, R. Ipaktchi, and P. M. Vogt, "Quantitative Perfusionsanalyse durch Laser Speckle Contrast Analysis (LASCA) Perfusions-Imaging von kritisch perfundierten Geweben Quantitative Perfusion," *Handchirurgie Mikrochirurgie Plast. Chir.* **48**, 354–362 (2016).
  104. Y.-C. Huang, N. Tran, P. R. Shumaker, K. Kelly, E. V. Ross, J. S. Nelson, and B. Choi, "Blood flow dynamics after laser therapy of port wine stain birthmarks," *Lasers Surg. Med.* **41**, 563–571 (2009).
  105. H. Qiu, Y. Zhou, Y. Gu, Q. Ang, S. Zhao, Y. Wang, J. Zeng, and N. Huang, "Monitoring microcirculation changes in port wine stains during vascular targeted photodynamic therapy by laser speckle imaging," *Photochem. Photobiol.* **88**, 978–984 (2012).
  106. J. Ren, P. Li, H. Zhao, D. Chen, J. Zhen, Y. Wang, Y. Wang, and Y. Gu, "Assessment of tissue perfusion changes in port wine stains after vascular targeted photodynamic therapy: A short-term follow-up study," *Lasers Med. Sci.* **29**, 781–788 (2014).
  107. A. S. Alessandra, E. L. S. Clemente, M. de Lourdes Guimarães Rodrigues, D. C. Torres Valença, and M. B. Gomes, "Assessment of microvascular endothelial function in type 1 diabetes using laser speckle contrast imaging," *J. Diabetes Complications* **31**, 753–757 (2017).
  108. J. P. Borges, G. O. Lopes, V. Verri, M. P. Coelho, P. M. C. Nascimento, D. A. Kopiler, and E. Tibirica, "A novel effective method for the assessment of microvascular function in male patients with coronary artery disease: A pilot study using laser speckle contrast imaging," *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **49**, 1–6 (2016).
  109. M. Hellmann, M. Roustit, and J. L. Cracowski, "Skin microvascular endothelial function as a biomarker in cardiovascular diseases?," *Pharmacol. Reports* **67**, 803–810 (2015).
  110. S. Eriksson, J. Nilsson, G. Lindell, and C. Stureson, "Laser speckle contrast imaging for intraoperative assessment of liver microcirculation: A clinical pilot study," *Med. Devices Evid. Res.* **7**, 257–261 (2014).
  111. R. C. Bray, K. R. Forrester, J. Reed, C. Leonard, and J. Tulip, "Endoscopic laser speckle imaging of tissue blood flow: Applications in the human knee," *J. Orthop. Res.* **24**, 1650–

- 1659 (2006).
112. E. Molnar, B. Molnar, Z. Lohinai, Z. Toth, Z. Benyo, L. Hricisak, P. Windisch, and J. Vag, "Evaluation of Laser Speckle Contrast Imaging for the Assessment of Oral Mucosal Blood Flow following Periodontal Plastic Surgery: An Exploratory Study.," *Biomed Res. Int.* **2017**, 4042902 (2017).
  113. L. Yan, J. Liu, and S. Men, "The biospeckle method for early damage detection of fruits," *Mod. Phys. Lett. B* **31**, 1–5 (2017).
  114. C. Schott, T. Bley, T. Walter, J. Brusius, and J. Steingroewer, "Monitoring the apical growth characteristics of hairy roots using non-invasive laser speckle contrast imaging," *Eng. Life Sci.* **22**, 288–298 (2022).
  115. I. Balmages, D. Bliznuks, J. Liepins, S. Zolins, and A. Lihachev, "Laser speckle time-series correlation analysis for bacteria activity detection," in *Biomedical Spectroscopy, Microscopy, and Imaging*, J. Popp and C. Gergely, eds. (SPIE, 2020), p. 48.
  116. M. Leutenegger, P. Harbi, T. Thacher, W. Raffoul, and T. Lasser, "Real-time full field laser Doppler imaging," *AIP Conf. Proc.* **1457**, 282–286 (2012).
  117. I. Fredriksson, "Quantitative Laser Doppler Flowmetry," Linköping University (2009).
  118. V. Rajan, B. Varghese, T. G. Van Leeuwen, and W. Steenbergen, "Review of methodological developments in laser Doppler flowmetry," *Lasers Med. Sci.* **24**, 269–283 (2009).
  119. D. Briers, "Laser Doppler , speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging Laser Doppler , speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging," *Physiol. Meas.* **22**, R35–R66 (2001).
  120. G. A. Tew, M. Klonizakis, H. Crank, J. D. Briers, and G. J. Hodges, "Comparison of laser speckle contrast imaging with laser Doppler for assessing microvascular function," *Microvasc. Res.* **82**, 326–332 (2011).
  121. T. Binzoni, A. Humeau-Heurtier, P. Abraham, and G. Mahe, "Blood perfusion values of laser speckle contrast imaging and laser doppler flowmetry: Is a direct comparison possible?," *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **60**, 1259–1265 (2013).
  122. C. Millet, M. Roustit, S. Blaise, and J. L. Cracowski, "Comparison between laser speckle contrast imaging and laser Doppler imaging to assess skin blood flow in humans," *Microvasc. Res.* **82**, 147–151 (2011).
  123. I. Fredriksson and M. Larsson, "On the equivalence and differences between laser Doppler flowmetry and laser speckle contrast analysis," *J. Biomed. Opt.* **21**, 126018 (2016).

124. D. A. Boas and A. K. Dunn, "Laser speckle contrast imaging in biomedical optics," *J. Biomed. Opt.* **15**, 011109 (2010).
125. K. Khaksari and S. J. Kirkpatrick, "Combined effects of scattering and absorption on laser speckle contrast imaging," *J. Biomed. Opt.* **21**, 076002 (2016).
126. P.-A. Lemieux and D. J. Durian, "Investigating non-Gaussian scattering processes by using nth -order intensity correlation functions," *J. Opt. Soc. Am. A* **16**, 1651 (1999).
127. Y. Piederrière, J. Cariou, Y. Guern, B. Le Jeune, G. Le Brun, and J. Lortrian, "Scattering through fluids: speckle size measurement and Monte Carlo simulations close to and into the multiple scattering," *Opt. Express* **12**, 176 (2004).
128. Thorlabs, "Engineered™ Diffuser," <https://www.thorlabs.com>.
129. 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 (2008).
130. U. Oechsner, C. Knothe, and M. Rahmel, "Anamorphic Shaping of Laser Beams," *PhotonicsViews* **16**, 56–59 (2019).
131. D. D. Postnov, J. Tang, S. E. Erdener, K. Kılıç, and D. A. Boas, "Dynamic light scattering imaging," *Sci. Adv.* **6**, 1–10 (2020).
132. S. E. Skipetrov, J. Peuser, R. Cerbino, P. Zakharov, B. Weber, and F. Scheffold, "Noise in laser speckle correlation and imaging techniques," *Opt. Express* **18**, 14519 (2010).
133. X. Chen, W. Lin, C. Wang, S. Chen, J. Sheng, B. Zeng, and M. Xu, "In vivo real-time imaging of cutaneous hemoglobin concentration, oxygen saturation, scattering properties, melanin content, and epidermal thickness with visible spatially modulated light," *Biomed. Opt. Express* **8**, 5468 (2017).
134. C. Casavola, L. A. Paunescu, S. Fantini, and E. Gratton, "Blood flow and oxygen consumption with near-infrared spectroscopy and venous occlusion: spatial maps and the effect of time and pressure of inflation," *J. Biomed. Opt.* **5**, 269 (2000).
135. H. H. Andersen, J. N. Poulsen, Y. Uchida, A. Nikbakht, L. Arendt-Nielsen, and P. Gazerani, "Cold and 1 -menthol-induced sensitization in healthy volunteers - A cold hypersensitivity analogue to the heat/capsaicin model," *Pain* **156**, 880–889 (2015).
136. J. D. Wilkinson, S. A. Leggett, E. J. Marjanovic, T. L. Moore, J. Allen, M. E. Anderson, J. Britton, M. H. Buch, F. Del Galdo, C. P. Denton, G. Dinsdale, B. Griffiths, F. Hall, K. Howell, A. MacDonald, N. J. McHugh, J. B. Manning, J. D. Pauling, C. Roberts, J. A. Shipley, A. L. Herrick, and A. K. Murray, "A Multicenter Study of the Validity and Reliability of Responses to Hand Cold Challenge as Measured by Laser Speckle Contrast Imaging and Thermography," *Arthritis Rheumatol.* **70**, 903–911 (2018).



137. J. D. Pauling, J. A. Shipley, S. Raper, M. L. Watson, S. G. Ward, N. D. Harris, and N. J. McHugh, "Comparison of infrared thermography and laser speckle contrast imaging for the dynamic assessment of digital microvascular function," *Microvasc. Res.* **83**, 162–167 (2012).
138. I. Unal-Cevik, "Temporal and Spatial Quantification of Pain- Related Small Fiber Functionality Assessed Using Laser Speckle Contrast Analysis," *Pain Pract.* **18**, 824–838 (2018).
139. J. Lötsch, C. Walter, M. Zunftmeister, S. Zinn, M. Wolters, N. Ferreiros, T. Rossmannith, B. G. Oertel, and G. Geisslinger, "A data science approach to the selection of most informative readouts of the human intradermal capsaicin pain model to assess pregabalin effects," *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **126**, 318–331 (2020).
140. R. Mirdell, F. Iredahl, F. Sjöberg, S. Farnebo, and E. Tesselaar, "Microvascular blood flow in scalds in children and its relation to duration of wound healing: A study using laser speckle contrast imaging," *Burns* **42**, 648–654 (2016).
141. K. Basak, G. Dey, M. Mahadevappa, M. Mandal, D. Sheet, and P. K. Dutta, "Learning of speckle statistics for in vivo and noninvasive characterization of cutaneous wound regions using laser speckle contrast imaging," *Microvasc. Res.* **107**, 6–16 (2016).
142. T. Lister, P. A. Wright, and P. H. Chappell, "Optical properties of human skin," *J. Biomed. Opt.* **17**, 0909011 (2012).
143. S. Farnebo, J. Thorfinn, J. Henricson, and E. Tesselaar, "Hyperaemic changes in forearm skin perfusion and RBC concentration after increasing occlusion times," *Microvasc. Res.* **80**, 412–416 (2010).
144. A. Holmer, F. Tetschke, J. Marotz, H. Malberg, W. Markgraf, C. Thiele, and A. Kulcke, "Oxygenation and perfusion monitoring with a hyperspectral camera system for chemical based tissue analysis of skin and organs," *Physiol. Meas.* **37**, 2064–2078 (2016).
145. R. H. Fox and H. T. Wyatt, "Cold-induced vasodilatation in various areas of the body surface of man," *J. Physiol.* **162**, 289–297 (1962).
146. L. Van Manen, W. A. J. Birkhoff, J. Eggermont, R. J. M. Hoveling, P. Nicklin, J. Burggraaf, R. Wilson, J. S. D. Mieog, D. J. Robinson, A. L. Vahrmeijer, M. S. Bradbury, and J. Dijkstra, "Detection of cutaneous oxygen saturation using a novel snapshot hyperspectral camera: A feasibility study," *Quant. Imaging Med. Surg.* **11**, 3966–3977 (2021).