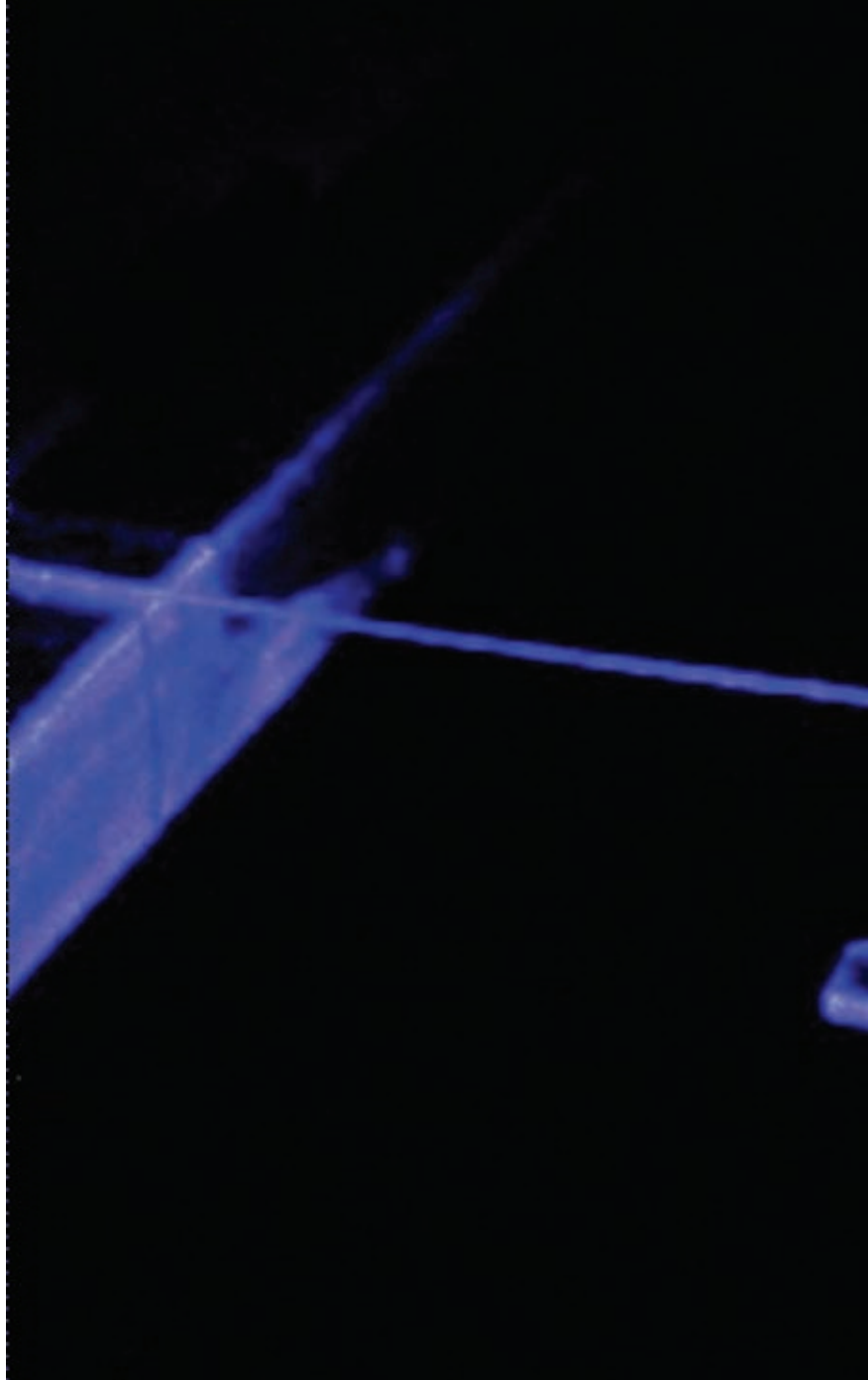


Biofotonica biedt de mogelijkheid om biologische en biochemische processen met optische technieken te onderzoeken en op die manier zowel de diagnose als de behandeling van wijdverspreide ziektes zoals kanker en infecties te optimaliseren. Dit uitgebreide interdisciplinaire onderzoeksgebied zal de komende jaren ongetwijfeld voor belangrijke omwentelingen zorgen. In dit artikel wordt deze evolutie geïllustreerd aan de hand van drie toepassingen van biofotonica die zich situeren in de domeinen van de biochemische analyse, materiaalkarakterisatie en biomedische beeldvorming.

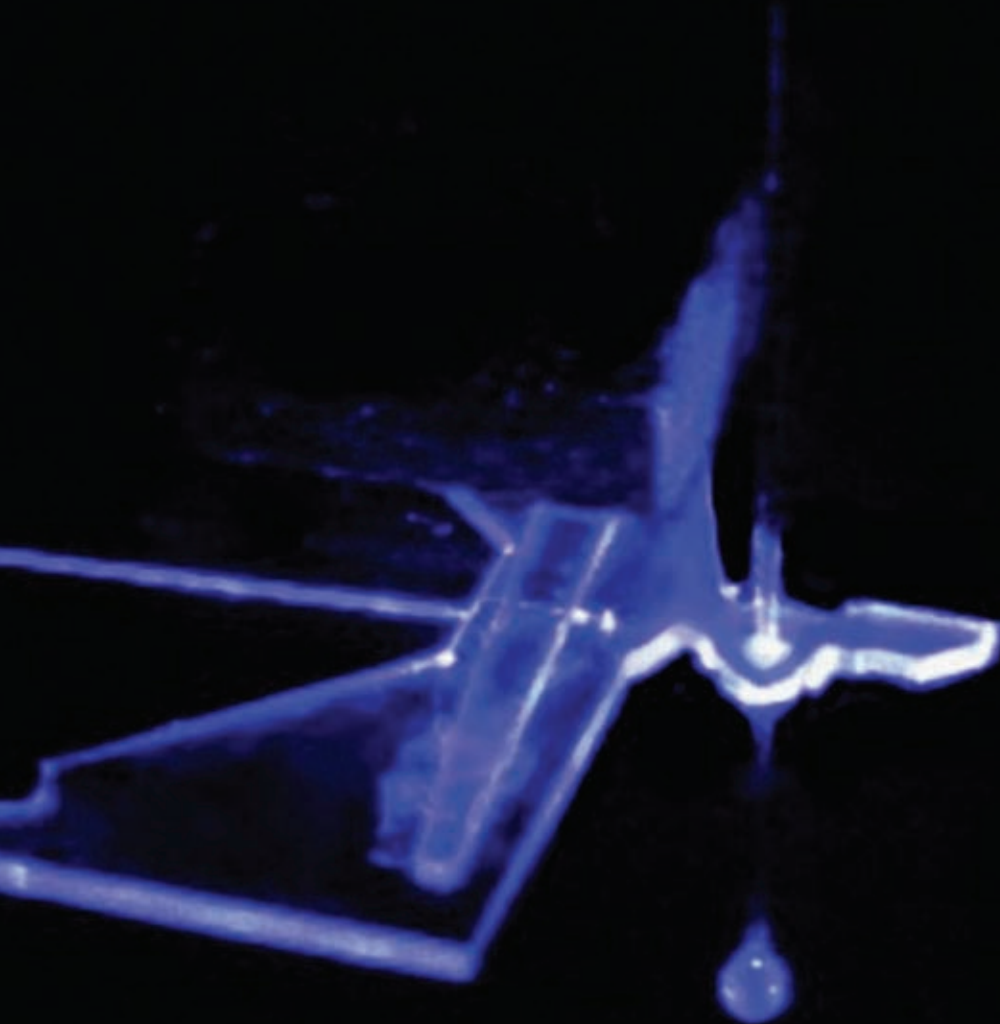
**Sara Van Overmeire, Heidi Ottevaere,
Thomas Geernaert, Francis Berghmans,
Marc Tabak, Hugo Thienpont,
Frans Cornelissen en Peter Schelkens**



Micro-fotonica in biomedici

Begin jaren '90 werd het idee gelanceerd om biochemische analyses te regelen in vloeistofkanalen op silicium chips, gefabriceerd met lithografische technieken uit de micro-elektronica industrie. Het verkleinen van de klassieke kanaaldiameter van enkele millimeter naar enkele honderden micrometer of zelfs kleiner op chip, reduceert niet alleen de grootte van het systeem en het verbruik van reagentia en stalen, maar verbetert ook de performantie en de snelheid van de toegepaste technieken met minstens twee grootteordes^[1]. Vandaag zijn allerlei bouwstenen, zoals micropompen en -kleppen, in verschillende materialen (silicium, glas en plastic) beschikbaar en is een doorgedreven integratie in een microlaboratorium, de *lab-on-a-chip*,

mogelijk. Waar traditioneel biochemische analyses uitgevoerd worden door laboranten in gespecialiseerde labo's, verlopen met een *lab-on-a-chip* alle stappen automatisch op een oppervlak van slechts enkele vierkante centimeter. Deze chips lenen zich dan ook uitstekend voor het bouwen van draagbare instrumenten en zijn nuttig in alle toepassingen waar snelle *on-site* metingen belangrijk zijn. Eenvoudige diagnostische testen bijvoorbeeld zouden uitgevoerd kunnen worden door een arts aan het bed van de patiënt zodat de resultaten onmiddellijk beschikbaar zijn. Naast deze *point-of-care* metingen, situeren toepassingen zich ook in *environmental monitoring* (opsporen van grondwatervervuiling of biowapens), forensische geneeskunde en voedselkwaliteitscontrole.

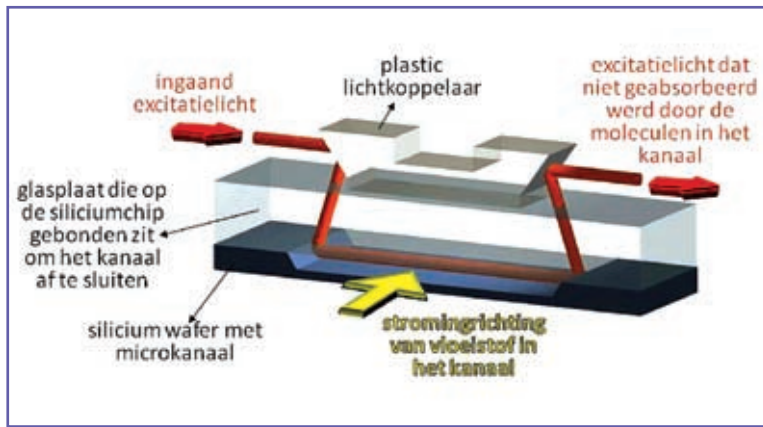


sche toepassingen

Om het resultaat van een biochemische analyse te bepalen, moeten de moleculen uiteindelijk gedetecteerd en gekwantificeerd worden. Sinds het ontstaan van het *lab-on-a-chip* is een goede detectie dan ook één van de grote uitdagingen. Vaak worden optische technieken toegepast waarbij absorptie of fluorescentie van moleculen gemeten wordt. Fluorescentiemetingen zijn heel gevoelig en selectief, maar meestal is een extra preparatiestap vereist om de doorgaans niet fluorescente biomoleculen van een fluorescent label te voorzien. Absorptiemetingen zijn minder gevoelig maar hebben deze labeling niet nodig. Tot op heden zijn enkel klassieke microscopen voldoende gevoelig om de kleine hoeveelheden moleculen in de nanoliter detectievolumes op chips te detecteren.

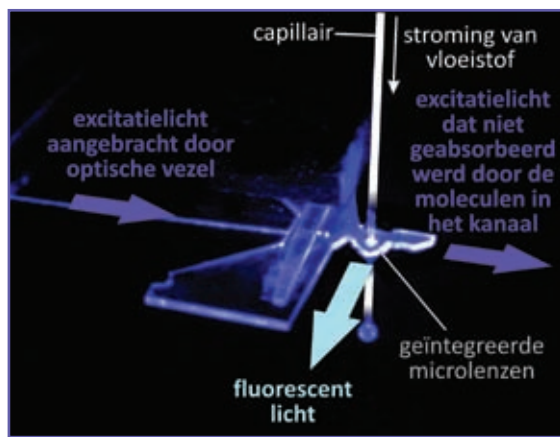
Deze instrumenten zijn echter te groot en te duur voor integratie in draagbare apparaten. Er is dan ook een grote vraag naar efficiënte, kleine en goedkope optische detectie-eenheden.

Recent werden zo in de vakgroep Toegepaste Natuurkunde en Fotonica aan de Vrije Universiteit Brussel (VUB-TONA) detectiesystemen ontwikkelt m.b.v. plastic micro-optische bouwstenen en optische vezels. Hierbij wordt gestreefd naar een sterke integratie van de optica rond de vloeistofkanalen en wordt getracht een hoge gevoeligheid te realiseren tegen een beperkte kostprijs. Het werkingsprincipe van twee systemen, elk geoptimaliseerd voor het meten van fluorescentie en absorptie van moleculen in een specifiek type kanaal, werd aangetoond.



Figuur 1: In een eerste systeem wordt m.b.v. een plastic micro-optische lichtkoppelaar de absorptie van moleculen in een silicium microfluidische chip gemeten (figuur 1)^[2]. Door middel van lichtreflecties op de koppelaar en de kanaalzijwanden, wordt het excitatielicht efficiënt in en uit het kanaal gespiegeld om zo de moleculen te exciteren en hun absorptie te meten. In deze configuratie wordt een lang gebied gerealiseerd waarin het licht kan interageren met de mogelijk aanwezige moleculen (grote optische padlengte van 1.5 millimeter), zodat uiterst lage hoeveelheden moleculen gemeten kunnen worden. Aangezien het micro-optische gedeelte ontkoppeld kan worden van de microfluidische chip, kunnen verschillende koppelaars eenvoudig gecombineerd worden om parallel op verschillende plaatsen op een chip te meten en kan een flexibel apparaat gebouwd worden dat voor allerlei types chips gebruikt kan worden.

Figuur 2: Detectie-opstelling met geïntegreerde plastic refractieve microlenzen voor het meten van fluorescentie en absorptie in een capillair.



In het tweede systeem worden moleculen geëxciteerd via plastic refractieve microlenzen en worden ze gedetecteerd in standaard glazen capillairen, die o.a. in chromatografische toepassingen gebruikt worden (figuur 2)^[3]. De microlenzen zijn volledig geïntegreerd rond het capillaire microkanaal en zijn daardoor ook automatisch uitgelijnd - er is dus geen actieve alignatie meer nodig. De optische padlengte wordt bepaald door de binnendiameter van het capillair (typisch slechts 20 tot 150 micrometer) en de gevoeligheid van absorptiemetingen is daardoor lager dan in het vorige systeem. De bedoeling van deze plastic detectie-eenheid is echter om met één systeem een grote variatie aan concentraties te kunnen detecteren. In deze opstelling worden daarom

absorptiemetingen van vrij hoge concentraties van moleculen gecombineerd met gevoelige fluorescentiemetingen van uiterst lage concentraties van moleculen, die dan wel eerst gelabeld moeten worden.

De eerste stappen naar geïntegreerde micro-optische detectiesystemen zijn gezet en momenteel worden deze systemen getest in verschillende praktische toepassingen, waaronder de detectie van chromatografische scheidingen en de karakterisatie van smeermiddelen in industriële machines. Dit biedt de mogelijkheid om de robuustheid en reproduceerbaarheid van deze systemen verder te optimaliseren, wat de weg zal openen naar integratie in klinische diagnostische lab-on-a-chip apparaten, die in de toekomst ongetwijfeld hun intrede zullen doen in elk dokterskabinet.

Voelen met licht

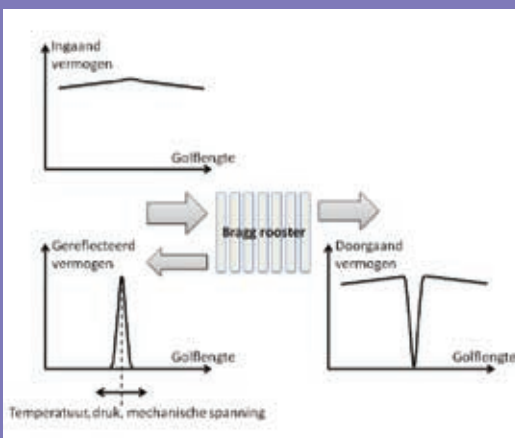
Optische vezels kunnen eveneens ingeschakeld worden als zeer gevoelige sensoren in biomedische toepassingen. De zogenaamde optische vezelsensoren steunen op de meting van hoe de eigenschappen van een lichtsignaal, dat zich doorheen de optische vezel voortplant, gewijzigd worden onder invloed van fysische grootheden die inwerken op de optische vezel, zoals de temperatuur, hydrostatische druk en/of mechanische rek. Deze sensoren hebben een aantal welgekende voordelen zoals hun ongevoeligheid voor elektromagnetische interferentie, hun zeer kleine dimensies, hun uiterst laag gewicht en de mogelijkheid om vele sensoren met slechts één enkele optische vezel gelijktijdig uit te lezen. In de volgende paragrafen illustreren we de inzet van optische vezelsensoren voor twee verschillende toepassingen in het biomedische domein. Deze sensoren steunen op zogenaamde Bragg-roosters aangebracht in de kern van een optische vezel (zie kaderstuk Bragg roosters).

Zulke sensoren worden vooreerst toegepast in de spanningsanalyse in dentale cementen. Tijdens het uitharden van tandcement induceert het polymerisatieproces krimp in het cement. De daaruitvolgende opbouw van spanning tussen dentine en porselein facings kan leiden tot overmatige gevoeligheid van de tanden en mogelijk tot scheuren van het porselein. Om de opbouw van spanning in de tijd te karakteriseren en om de hoeveelheid krimp te meten wordt een optische vezel met Bragg rooster in het tandheelkundig cement ingebed (figuur 4). De wijziging van de Bragg golflengte in de tijd geeft de dynamiek van de spanningsopbouw weer en laat toe op herhaalbare wijze de optimale uitharding vast te leggen.

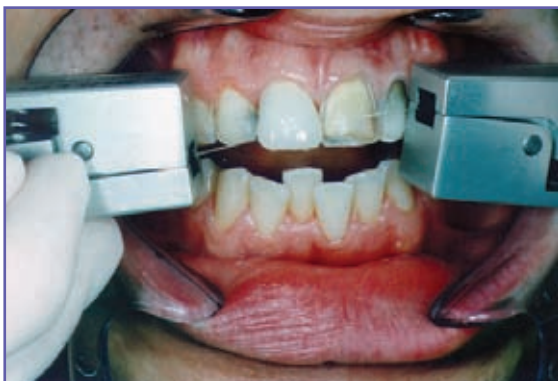
Een netwerk van optische vezels met Bragg rooster sensoren kan ook ingebed worden in vervormbare polymeerlagen. Aldus verkrijgen we een soepele en rekbare huidachtige laag die gevoelig is voor aanraking, druk of vervorming en die bijvoorbeeld in staat is om bij bedlegerige patiënten drukpunten te detecteren ter vermindering van ligwonden. De gevoelige polymeerlaag kan eveneens deel uitmaken van een vestje dat ademhalingscycli kan opvolgen door de vervorming van thorax of abdomen waar te nemen.

Bragg roosters

Het Bragg rooster bestaat uit een periodische wijziging van de brekingsindex in de kern van een optische vezel en geeft aanleiding tot een zeer smalbandig reflectie-filter (figuur 3). Door de invloed van externe parameters wijzigen de eigenschappen van het rooster, waardoor een verschuiving in de gereflecteerde Bragg golflengte optreedt. De grootte van de verschuiving stemt overeen met een bepaalde waarde van de externe parameter. Op deze manier kunnen grootheden als temperatuur en mechanische spanning gemeten worden. Een groot voordeel is de lineaire responskarakteristiek en het feit dat niet bij elke meting een calibratie dient te worden uitgevoerd.

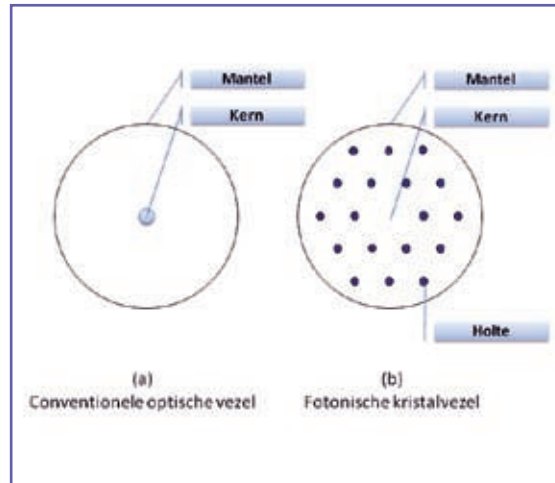


Figuur 3: Principe van een Bragg rooster sensor. Een fysische grootheid zoals temperatuur of mechanische spanning wijzigt de golflengte van het licht gereflecteerd door het Bragg rooster.



Figuur 4: In-vivo toepassing van optische vezelsensoren voor de meting van de uitharding van tandheelkundig cement bij het aanbrengen van een porselein facing op een beschadigde tand (Foto: dienst Stomatologie en Maxillofaciale Heelkunde (o.l.v. Prof. G. Wackens) van het Universitair Ziekenhuis van Jette).

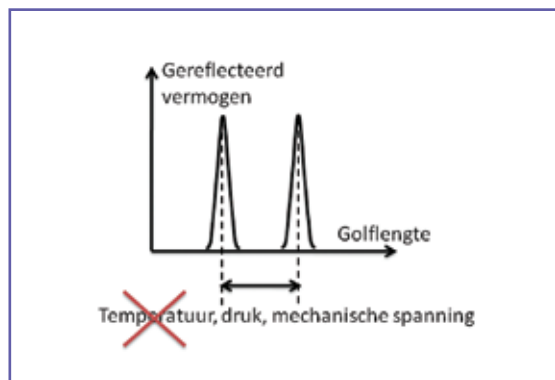
Om dit te bewerkstelligen en om de gevoeligheid voor vervorming te optimaliseren wordt gebruik gemaakt van zeer bijzondere optische vezels, de zogenaamde fotonische kristalvezels. Net zoals in een gewone vezel wordt het licht geleid doorheen een vaste kern.



Figuur 5: Vergelijking van de structuur van (a) een conventionele optische vezel bestaande uit een glazen kern met hogere brekingsindex en een mantel met lagere brekingsindex en (b) een fotonische kristalvezel waar de mantel gevormd wordt door een rooster van luchtholtes.

De mantel van de vezel bestaat echter uit een rooster van luchtholtes, die langs de gehele lengte van de vezel lopen (figuur 5).

Het patroon van deze holtes, hun diameters en de afstanden ertussen geven de optische vezel zeer bijzondere eigenschappen, die niet met conventionele vezels te verkrijgen zijn. Een van deze eigenschappen is de dubbelbreking, die een grootteorde hoger kan zijn dan deze haalbaar met conventionele optische vezels. Bovendien is de dubbelbreking in fotonische kristalvezels bijna onafhankelijk van de temperatuur. Dit biedt een belangrijk voordeel indien we in zulk een zeer dubbelbrekende vezel een Bragg rooster aanbrengen. De respons van een Bragg rooster in een dubbelbrekende vezel vertoont inderdaad twee reflectiepieken. De spectrale afstand tussen beide pieken is een maat voor de dubbelbreking en bijgevolg voor de mechanische spanning, die nu zo goed als onafhankelijk is van de temperatuur (figuur 6). Correcties voor temperatuurswijzigingen zijn aldus niet meer nodig. [4] [5]



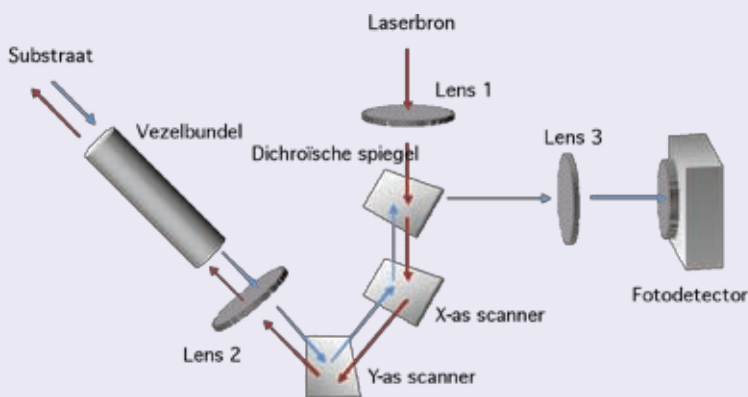
Figuur 6. Respons van een Bragg rooster in een dubbelbrekende fotonische kristalvezel. De spectrale afstand tussen de twee reflectiepieken is een maat voor de mechanische spanning en is nagenoeg onafhankelijk van de temperatuur.

Kijken in levende weefsels

Een andere toepassing van optische vezels vinden we terug in optische vezel-gebaseerde confocale fluorescentie microscopie ("fibered confocal fluorescence microscopy" of kortweg FFM). FFM met behulp van laser-scanning laat toe niet- of minimaal invasieve suboppervlakte beeldvorming te realiseren. Verschillende technische benaderingen, gebaseerd op optische vezelbundels of afzonderlijke vezels werden ontwikkeld door verschillende groepen [6] (Zie ook kaderstuk FFM).

Optische vezel-gebaseerde, confocale fluorescentie microscopie (FFM)

Confocale beeldvorming kan ofwel reflectie (licht weerkaatst op weefselstructuren) en/of fluorescentiegebaseerd zijn, waarbij fluorescent licht gegenereerd door chemische probes wordt aangewend dat specifieke weefselmicrostructuren karakteriseert. Deze laatste techniek is de leidende modaliteit geworden in het domein van de biologische beeldvorming door de hoge sensitiviteit (verhouding correcte positieve classificaties t.o.v. het effectief aantal positieve gevallen) en specificiteit (verhouding tussen het aantal correctie negatieve classificaties en het effectief aantal negatieve gevallen) van fluorescentie probes. De terminologie confocaal verwijst naar de eigenschap van de microscoop dat op verschillende dieptes kan scherpgesteld worden. Figuur 8 illustreert de werking van FFM: Licht geproduceerd door een laserbron wordt door een dichroïsche spiegel dat als splitter functioneert: het laserlicht wordt doorgelaten (rode pijlen), en het terugkerende fluorescente licht dat zich aldus manifesteert bij een andere golflengte (blauwe pijlen) wordt afgeleid naar lens 3 en vervolgens gefocuseerd op een één-pixel fotodetector. Met behulp van twee spiegels kan het laserlicht (rode pijlen) vervolgens gepositioneerd worden op de juiste vezel in de vezelbundel. Deze bundel bevat typisch een 30.000-tal vezels met elk een diameter van ongeveer 1,9 µm.

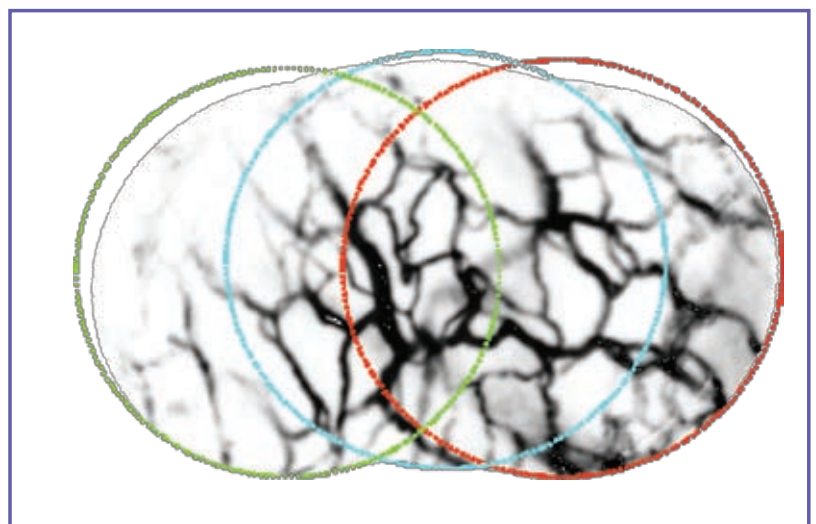


Figuur 8. Vezelbundel-gebaseerde confocale microscopie. De rode pijlen geven het pad van het uitgestuurde laserlicht weer, terwijl de blauwe pijlen het gereflecteerde/fluorescente lichtpad aangeven.

FFM is in het bijzonder ontworpen voor in vivo en in situ observatie met behulp van een probe, die is samengesteld uit een vezelbundel en micro-optica, en die een diameter heeft van slechts 650 µm. De belangrijkste karakteristieken van FFM vergelijken gunstig met deze van intravitale fluorescentie microscopie (IFM)^[7]. Het is uitermate geschikt om kwantitatieve metingen van capillaire permeabiliteit, functionele capillaire dichtheid, vasoconstrictie (vernauwing van bloedvaten door aanliggende spieren t.g.v. bijvoorbeeld verhoogde bloeddruk) en dilatatie effecten uit te voeren. Daarenboven kunnen fluorescent gemerkte rode bloedcellen of perifere zenuwstructuren (in handen en voeten) gevisualiseerd worden. Door het reële tijd karakter van het systeem, evenals zijn flexibiliteit en de dunne diameter van de optische probe wordt microinvasiviteit mogelijk en kunnen de beeldvormingscapaciteiten uitgebreid worden voor in vivo en in situ observaties zoals bij IFM. Een andere toepassing van FFM beeldvorming is de in vivo monitoring van cellulaire processen zoals geprogrammeerde celdood (apoptose). Zo werd bijvoorbeeld in situ apoptotische DNA fragmentatie gevisualiseerd.

Janssen Pharmaceutica wendt FFM bijvoorbeeld aan in de context van de studie van perifere neuropathie. Perifere neuropathie is het gevolg van beschadigingen aan de zenuwen in het perifere zenuwstelsel. Deze worden veroorzaakt door ziekten zoals diabetes en AIDS, maar ontwikkelen zich ook als dosisbeperkende randeffecten bij chemotherapie. De beschadigingen aan de sensorvezels resulteren in een branderig gevoel, zenuwpijnen, tintelingen en/of gevoelsloosheid, en bijkomend een moeilijkere bepaling van de positie van gewrichten, wat op haar beurt coördinatieproblemen oplevert. Bij vele neuropathieën treden de gevoelswijzigingen dikwijls eerst op aan de voeten en progresseren dan naar het centrum van het lichaam. In een klinische omgeving wordt de ziekteprogressie opgevolgd door - naast een fysisch onderzoek - de kwantificatie van intra-epidermale zenuwdensiteit door het nemen van biopsiepuncties van de huid van de extremiteiten. Deze arbeidsintensieve taak beschadigt evenwel het weefsel waardoor het moeilijk wordt longitudinale studies (d.w.z. studies over langere periodes) m.b.t. de efficiëntie van de behandeling uit te voeren.

Figuur 7. Door de inzet van beeldmozaïekingstechnieken kan een geaggreerd, statisch beeld worden bekomen dat toelaat longitudinale studies uit te voeren met betrekking tot de zenuwweefsel densiteit.



Dankwoord

Het lab-on-a-chip onderzoek gebeurt in het kader van het Network of Excellence on Micro-Optics (NEMO, 6th FP EU) en het Network of Excellence on Biophotonics (Photonics4Life, 7th FP). Het onderzoek en de ontwikkeling van systemen die gebruik maken van deze sensor-technologie wordt momenteel verder gezet in een Europees project PHOSFOS - Photonic Skins for Optical Sensing, betoelaagd door het 7^{de} kaderprogramma van de Europese Commissie (www.phosfos.eu) en gecoördineerd door VUB-TONA. De FFM technologie en de daarbij behorende mozaïktechnieken zijn onderwerp van studie in het IBBT GBO-project DMOBISA.

In preklinisch onderzoek laat de combinatie van Thy-1/YFP transgenetische muizen en FFM toe om niet-invasieve, niet-destructieve en dus longitudinale studies uit te voeren van deze zenuwdensiteit in relatie tot behandelingschema's. Daarenboven zijn huidbiopsieën typisch gelimiteerd tot een zone van 2 à 3 mm. FFM gecombineerd met beeldmozaïktechnieken^[8] laat toe grotere gebieden af te dekken. Het gezichtsveld (of field-of-view, kortweg FOV) van een FFM probe is typisch van de grootte-orde van 0,5 mm en beelden worden genomen aan een beeldenfrequentie van ongeveer 8 beelden/s. Met een probebewegingssnelheid beperkt tot 2 mm/s, wordt op deze wijze 50% overlapping tussen opeenvolgende beelden bekomen (zie figuur 7). Door beeldmozaïktechnieken in te zetten worden vervolgens geaggregeerde, statische beelden bekomen. Een bijkomende motivatie voor deze procedure is de verbetering van de signaal-tot-ruisverhouding van de acquisitie daar individuele beelden hoge ruisniveaus en significante intensiteitsinhomogeniteiten vertonen.

Besluit

Dit artikel belichte enkele potentiële toepassingen van biofotonica waarbij vooral analyse-, sensing- en visualisatieaspecten aanbod kwamen. Hierbij werd aangetoond dat de huidige technologie reeds toelaat medische diagnoses te stellen met een gereduceerde invasiviteit en een verbeterde diagnose (bijvoorbeeld door het mogelijk maken van longitudinale studies). De toepassingen van biofotonica zijn echter legio, en naar verwachting zal deze technologie een grote impact hebben op de biochemische en biomedische wereld.

Referenties

- [1] A. Manz, N. Graber, and H. M. Widmer, "Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing," *Sens. Actuators, B, Chem.*, vol. 1, pp. 244-248, 1990.
- [2] S. Van Overmeire, H. Ottevaere, L. Nieradko, P. Marc, T. Mappes, J. Mohr, C. Gorecki, H. Thienpont, "Plastic light coupler for absorbance detection in silicon microfluidic devices", 14th Microoptics Conference MOC2008, Brussel, September 2008.
- [3] S. Van Overmeire, H. Ottevaere, G. Desmet, H. Thienpont, "Miniaturized detection system for fluorescence and absorbance measurements in chromatographic applications", *IEEE J. Sel. Top. Quant.*, vol. 14, pp. 140-150, 2008.
- [4] T. Geernaert, T. Nasilowski, K. Chah, M. Szpulak, J. Olszewski, G. Statkiewicz, J. Wojcik, W. Urbanczyk, K. Poturaj, M. Becker, M. Rothhardt, H. Bartelt, F. Berghmans and H. Thienpont, "Fiber Bragg Gratings in Germanium-Doped Highly Birefringent Microstructured Optical Fibers", *IEEE Photonics Technology Letters*, 20, pp. 554-556, 2008.
- [5] T. Geernaert, G. Luyckx, E. Voet, T. Nasilowski, K. Chah, M. Becker, H. Bartelt, W. Urbanczyk, J. Wojcik, J. Degrieck, H. Terry, F. Berghmans and H. Thienpont, "Transversal Load Sensing with Fiber Bragg Gratings in Microstructured Optical Fibers", *IEEE Photonics Technology Letters*, 21, pp. 6-8, 2009.
- [6] Sokolov, K., Aaron, J., Hsu, B., Nida, D., Gillenwater, A., Follen, M., MacAulay, C., Adler-Storthz, K. Korgel, B., Descour, M. Pasqualini, R., Arap, W., Lam W. and Richards-Kortum, R., "Optical systems for in vivo molecular imaging of cancer," *Technol. Cancer Res. Treat.* 2, pp. 491-504, 2003.
- [7] Laemmel, E., Genet, M., Le Goualher, G., Perchant, A., Le Gargasson, J-F, Vicaut, E., "Fibered Confocal Fluorescence Microscopy Facilitates Extended Imaging in the Field of Microcirculation A Comparison with Intravital Microscopy," *J Vasc Res*, Vol. 41, pp. 400-411, 2001.
- [8] F. Cornelissen, S. De Backer, J. Lemeire, B. Torfs, R. Nuydens, T. Meert, P. Schelkens and P. Scheunders, "Fibered fluorescence microscopy (FFM) of intra epidermal nerve fibers - translational marker for peripheral neuropathies in preclinical research: processing and analysis of the data", *SPIE Optics and Photonics - Applications of Digital Image Processing*, vol. 7073, San Diego, CA, 2008.
- [9] H. Bay, T. Tuytelaars, and L. Van Gool, "SURF: Speeded up robust features". *European Conf. on Computer Vision (ECCV)*, Lecture Notes on Computer Science (LNCS), vol. 3951, Springer, Heidelberg, 2006.

De auteurs

Sara VAN OVERMEIRE, Heidi OTTOVAERE, Thomas GEERNAERT, Francis BERGHMANS, Marc TABAK en Hugo THIENPONT zijn werkzaam bij de Vrije Universiteit Brussel, dept. TONA

Frans CORNELISSEN is werkzaam bij Janssen Pharmaceutica

Peter SCHELKENS is wetenschappelijk coördinator bij het departement ETRO - Interdisciplinair Instituut voor Breedbandtechnologie- van de Vrije Universiteit Brussel.