

Temperatuursveranderingen in rat hersenen tijdens optogenetische experimenten

Hannelore Verhoeven, Lies de Ceuninck²

Samenvatting

Optogenetics is a technique which uses light to control neurons in rat brain. These neurons have been genetically modified to express opsins, which are light sensitive ion channels. In optogenetic experiments the most important interactions between light and the brain tissue, are thermal effects. Therefore in this paper the temperature increase due to laser and LED stimulation are calculated for different protocols (474nm/560nm and SM/MM) and for continuous and pulsed stimulation. For these calculations an approximate solution, which uses time constant analysis, of the bioheat equation was used. Because of the approximations, this model has limited validity, which causes it to be invalid for pulsed stimulation with a SM fiber. However it provides physical insight in the influences of tissue parameters on the temperature increase.

Keywords

Keyword1 — Keyword2 — Keyword3

¹Fysica Departement, Katholieke Universiteit Leuven

Inhoudsopgave

| | |
|---|-----------|
| 1 Inleiding | 1 |
| 1.1 Optogenetica | 2 |
| 1.2 De levering van straling naar het brein | 3 |
| 1.3 Interactie van weefsel met straling | 4 |
| 2 Theoretische achtergrond | 5 |
| 2.1 De bioheat vergelijking | 5 |
| 2.2 Oplossing van de bioheat vergelijking | 5 |
| 2.3 Continue stimulatie | 6 |
| 2.4 Gepulste stimulatie | 7 |
| 3 Methode | 7 |
| 4 Resultaten en Discussie | 9 |
| 4.1 Energieverdeling | 9 |
| 4.2 Temperatuurstijging bij continue stimulatie | 11 |
| 4.3 Temperatuurstijging bij gepulste stimulatie | 13 |
| 4.4 Foutenanalyse | 13 |
| Referenties | 15 |

1. Inleiding

Neurowetenschap houdt zich bezig met de werking van het zenuwstelsel. Momenteel is er over de hele wereld veel onderzoek op de hersenen en begrijpt men elk jaar meer over de werking van het menselijk brein. Vaak gebruikte proefdieren voor neurologische proeven zijn apen, ratten, muizen, vissen,.... In dit onderzoek specificeren we ons op het rattenbrein. Om de werking van het hersenen te begrijpen is een eerste grote en noodzakelijke stap het controleren van de activiteit van de hersencellen, *neuronen*. Neuronen zijn cellen die voortdurend signalen ontvangen en versturen door ons hele lichaam. Wanneer de activiteit gehintereerd kan worden of een neuron gestimuleerd kan worden om signalen te sturen, kan de functie van die cel achterhaald worden. Bijvoorbeeld, wanneer een neuron gehintereerd wordt tijdens een test waarbij het proefdier moet onthouden waar een beloning ligt, en hij achteraf niet meer weet waar de beloning lag, kan worden afgeleid dat deze cel verantwoor-

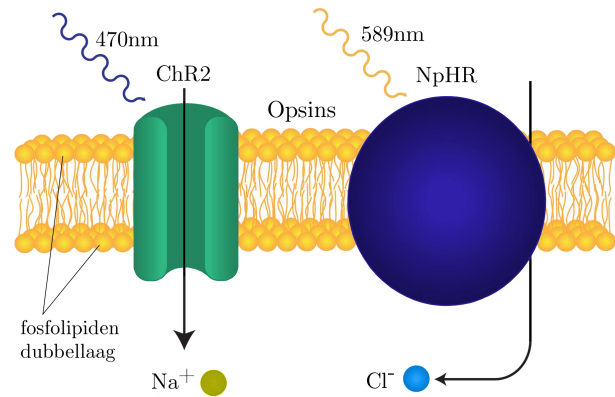
delijk is voor ruimtelijke orientatie. Activiteit controle van de hercencellen is dus essentieel in neurologisch onderzoek en er zijn dan ook heel wat technieken voor ontwikkeld.

Een eerste mogelijkheid is elektrische stimulatie van de neuronen met elektroden. Omdat de signalen tussen neuronen van elektrische aard zijn is dit een logische techniek. Een tweede mogelijkheid is het gebruik van elektromagnetische straling om neuronen te activeren of te inhiberen. Hierbij worden de neuronen genetisch gemanipuleerd zodat ze lichtgevoelig worden, *Optogenetica*. Helaas interageert elektromagnetische straling met weefsels en kan het dus nog andere reacties induceren¹. Een belangrijk effect is de temperatuurstijging en dat is het onderwerp van dit onderzoek.

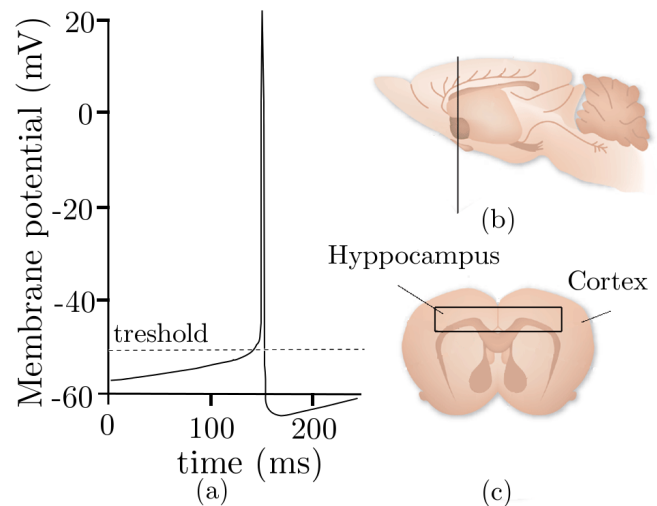
1.1 Optogenetica

Eerder werd al gezegd dat de signalen tussen neuronen van elektrische aard waren. Hoe werkt dit nu precies? Neuronen hebben net zoals alle andere cellen in ons lichaam een plasmamembraan die de scheiding vormt tussen het intercellulair en extracellulair milieu. Dit plasmamembraan bestaat uit een dubbellaag van fosfolipiden en membraanproteïnen, zie figuur 1. Deze laatste functioneren als doorgangskanalen voor moleculen en zijn dan ook verantwoordelijk voor de communicatie van cellen onder elkaar. Een belangrijke soort van membraanproteïnen zijn ionenkanalen die specifiek ionen transporteren. Door dit transport ontstaat er een potentiaal over het plasmamembraan. Een cel in rust heeft een membraanpotentiaal van ongeveer $-70mV$.

Om een signaal te sturen moet de membraanpotentiaal omhoog. Dit kan door positieve ionen in de cel te transporteren. Dit gebeurt eerst traag tot een bepaalde *threshold* potentiaal ($\approx 40 - 55mV$) bereikt wordt. Op dat moment openen de ionenkanalen volledig en stijgt de membraanpotentiaal exponentieel.



Figuur 1. Schematische weergave van een plasmamembraan met lichtgevoelige ionenkanalen of opsins (membraanproteïnen). ChR2 is een veelgebruikt voorbeeld van een Na^+ kanaal en NpHR van een Cl^- kanaal. Het eerste werkt optimaal bij stimulatie van $470nm$ en het tweede bij $560nm$.



Figuur 2. (a) Een opname van een actiepotentiaal in een neocorticale neuron uit een rat brein [?]. De rust membraan potentiaal ligt daar iets hoger $\approx 68mV$ [?]. (b) Lengtedoorsnede van een rat brein met de doorsnede plaats voor afbeelding c. (c) Dwarsdoorsnede van een rat brein [?].

Dit neuron signaal wordt een actie potentiaal genoemd. Belangrijk om op te merken is dat de actie potentiaal automatisch gegenereerd wordt eens de thresholdpotentiaal be-

¹zie paragraaf 1.3

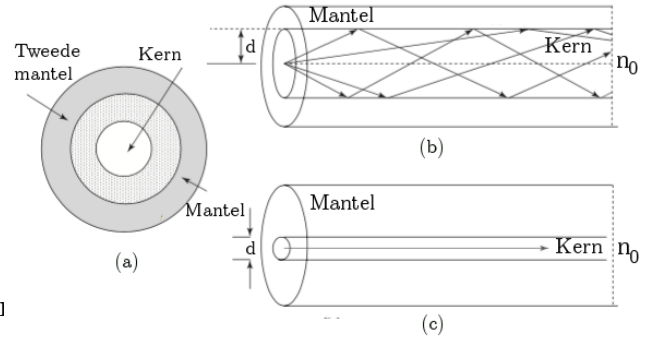
reikt is. Om de celactiviteit te inhiberen kan het omgekeerde gebeuren; de membraanpotentialaam naar beneden brengen door negatieve ionen de transporteren en zo het bereiken van de thresholdpotentialaam bemoeilijken. Het controleren van neuron activiteit is dus hetzelfde als het controleren van de activiteit van de ionenkanalen in de cel.

Veel micro-organismen zijn prachtig geëvolueerd naar organismen die licht kunnen oogsten. Licht gevoelige proteïnen absorberen de straling en gebruiken de energie om de membraanpotentialen te onderhouden of om een geschikte levensomgevingen te identificeren [?]. Een belangrijke soort van deze lichtgevoelige proteïnen, *Opsins*, zijn transmembrane rodopsines. Ze zorgen voor het transport van ionen over het plasmamembraan en doen dit na stimulatie met electromagnetische straling van een specifieke golflengte (zie figuur 1). Ook hebben ze zeer snelle kinetische eigenschappen en worden ze gecodeerd door slechts één gen. Dat maakt ze zeer interessant voor gebruik in optogenetische experimenten.

De laatste jaren is veel vooruitgang gemaakt in de genetica en kan men cellen genetisch modificeren. Dit betekent dat de opsins tot expressie gebracht kunnen worden in geïnfecteerde cellen. Wanneer deze cellen nu met licht van de juiste golflengte bestraald worden, zullen de opsins ionen transporteren en kan de activiteit van de neuronen beïnvloed worden. Met behulp van fluorescentie technieken is precies te achterhalen welke neuronen geactiveerd of geïnhibeerd zijn en kan de functie van de neuronen bestudeerd worden.

1.2 De levering van straling naar het brein

Om het brein te stimuleren met electromagnetische straling gebruikt men vaak optische vezels. Dit zijn draden bestaande uit twee delen met verschillende brekingsindex; een kern en een mantel. Door het verschil in brekingsindex wordt electromagnetische straling in de kern intern gereflecteerd tegen de mantel en kan een optische vezel licht begeleiden [?]. De



Figuur 3. (a) Dwarsdoorsnede van een optische vezel (b) lengtedoorsnede van een multi-mode (MM) vezel met kern diameter d (c) lengtedoorsnede van een single-mode (SM) vezel met kern diameter d

brekingsindex van een materiaal is gedefinieerd als de verhouding van de sinussen van de hoek θ_1 van inval en de brekingshoek θ_2 wanneer licht vanuit het vacuüm invalt.

$$n = \frac{\sin\theta_1}{\sin\theta_2}$$

De reflectie aan het scheidingsvlak wordt beschreven door de wet van Snell.

$$n_1 \sin\phi_1 = n_2 \sin\phi_2$$

hierin is ϕ_1 de invallende hoek en ϕ_2 de brekingshoek. Totale interne reflectie treedt op wanneer de invallende hoek groter wordt dan de kritische hoek ϕ_{krit} .

$$\phi_{krit} = \frac{n_1}{n_2}$$

Dit is het basisprincipe waarop de werking van een optische vezel steunt (zie figuur 3). Een belangrijke eigenschap van een optische vezel is de numerieke apertuur NA.

$$NA = n_0 \cdot \sin\alpha = \sqrt{n_1^2 - n_2^2} \quad (1)$$

α is de spreidingshoek van de uitgaande straling in vacuüm/lucht (zie figuur). Ook wordt een onderscheid gemaakt tussen *multi-mode* en *single-mode* vezels (zie figuur 3). Een vezel met een kleinere kerndiameter d en bijgevolg ook kleinere numerieke apertuur NA, kan

slechts één lichtstraal of mode² begeleiden. De diameter is dan meestal gelijkaardig aan de golflengte van de staling. Een multi-mode vezel heeft een grotere diameter d en numerieke apertuur NA zodat meerdere modes tegelijk begeleid kunnen worden. Beide vezels worden gebruikt in optogenetische experimenten.

1.3 Interactie van weefsel met straling

Er zijn verschillende soorten interacties van straling met weefsel die kunnen voorkomen afhankelijk van de energie, intensiteit en blootstellingsperiode van de straling. De moleculen in het weefsel absorberen de fotonen en de mogelijke effecten worden opgedeeld in vijf categorieën[?] (zie figuur 4). De combinatie van zeer hoge intensiteit en korte blootstellings tijd (hoge irradiantie) zorgt voor volledige ionisatie van de moleculen, wat resulteert in een ketting-reactie en plasmavorming. Langere blootstellingstijd zorgt dan voor de mechanische effecten die samen gaan met plasmavorming zoals schokgolven, bubbel vorming,... Ze worden gegroepeerd onder de naam fotodisruptie. Dit maakt het weefsel kapot vindt dus een toepassing in de geneeskunde voor bijvoorbeeld het verwijderen van nierstenen. Bij lagere irradianties worden de elektronen geëxiteerd. Foto-ablatie (zie figuur 4) zorgt voor dissociatie van de moleculen. De elektronen absorberen hoog energetische fotonen en verplaatsen zich van een bindende naar een niet bindende orbitaal. Elektronen van moleculen kunnen zich ook verplaatsen van een bindend orbitaal naar een ander bindend orbitaal (op een hoger energieniveau). Een geëxiteerd molecule zal andere chemische bindingen ondergaan, vaak met apoptose (geprogrammeerde celdood) tot gevolg. Deze fotochemische reacties treden op bij lage irradiantie en lange blootstellings tijd. Wanneer de moleculen de energie van de fotonen absorberen³, wordt deze omgezet in

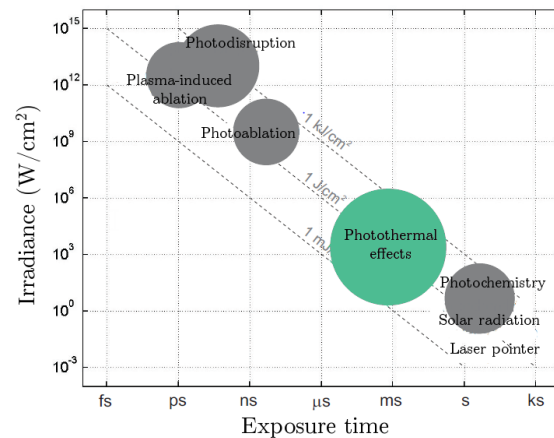
²lichte mode refereert naar een oplossing van de Maxwell vergelijkingen

³licht absorberende moleculen noemt men chromoforen

Tabel 1. Temperatuureffecten in weefsel

| T (°C) | Effect |
|--------|---|
| ≈ 37 | Normale lichaamstemperatuur |
| ≈ 38 | denaturatie van proteïnen (reversibel) |
| ≈ 41 | denaturatie van proteïnen (irreversibel) |
| ≈ 45 | weefsel coagulatie met bloedklonter vorming |

warmte via moleculaire vibraties en botsingen.



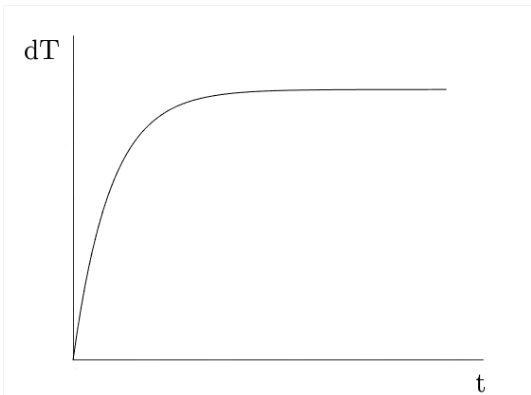
Figuur 4. Caption here

De drempel irradiantie nodig voor opsin activatie in optogenetische experimenten varieert van opsin tot opsin, ongeveer $\geq 1 \frac{mW}{mm^2}$, en de nodige blootstellingstijd is in de milliseconde range. Uit figuur 4 blijkt dus dat bij optogenetische experimenten vooral *fotothermische* effecten zullen optreden. De schade aan het weefsel hangt af van de temperatuurstijging en de duur van de opwarming. Tabel 1 geeft een overzicht van thermische effecten in weefsel. Over vanaf wanneer er precies onomkeerbare schade optreedt is wat discussie. Sommige zeggen al vanaf $0.5^\circ C$, andere pas vanaf $1.5^\circ C$. In ieder geval denatureren proteïnen al zeer snel, maar het lichaam is daar tot op zeker hoogte tegen beschermd. In het cytoplasma van de cel zijn er de zogenaamde *Chaperone-eiwitten*. Deze helpen bij de opvouwing van de proteïnen en houden de proteïnen in vorm tijdens stress situaties zoals een te hoge temperatuur. Chaperone proteïnen die voorname-

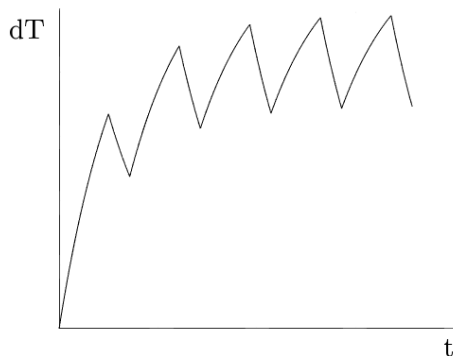
lijk de tweede functie hebben worden ook wel *stress proteïnen* of *heat-shock proteins* (Hsps) genoemd[?]. Echter vanaf 41°C is dit mechanisme niet meer voldoende en zal permanente denaturatie optreden. Hogere temperatuurstijgingen geven aanleiding tot afbraak van het weefsel.

Het is duidelijk dat significante temperatuurstijgingen in de hersenen door elektromagnetische straling vermeden moeten worden. Daarom is het belangrijk om een duidelijk model op te stellen voor de temperatuurstijging in het weefsel en dit voor verschillende stimulatie protocols; energie, intensiteit, puls-frequentie,... van de laserbeam.

2. Theoretische achtergrond



(a) Temperatuurstijging bij continue laserstimulatie.



(b) Temperatuurstijging bij gepulste laserstimulatie.

Figuur 5

2.1 De bioheat vergelijking

De temperatuurstijging in hersenweefsel kan bepaald worden met behulp van de bioheat vergelijking:

$$\frac{\partial \Delta T(t, z, r)}{\partial t} = \frac{\mu_a \phi(z, r)}{\rho c} + \frac{k}{\rho c} \left[\frac{\partial^2 \Delta T}{\partial z^2} + \frac{\partial^2 \Delta T}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial \Delta T}{\partial r} \right]. \quad (2)$$

Met ΔT de temperatuurstijging [$^{\circ}\text{C}$], μ_a de absorptiecoëfficiënt van het weefsel [m^{-1}], k de thermische geleidbaarheid [$\text{W m}^{-1} \text{ } ^{\circ}\text{C}^{-1}$], ρ de dichtheid van het weefsel [kg m^{-3}], c de warmtecapaciteit [$\text{J kg}^{-1} \text{ } ^{\circ}\text{C}^{-1}$] en $\phi(z, r)$ de lichtverdeling van het laserlicht [W m^{-2}]. Al deze parameters zijn gekend van voorgaande experimenten, behalve de lichtverdeling. Deze laatste zal berekend worden met behulp van een Monte Carlo methode, zie sectie 3.

Het rechterlid van de bioheat vergelijking bestaat uit twee delen. Het eerste deel stelt de temperatuurstijging voor in het weefsel ten gevolge van absorptie van fotonen. Het tweede deel van het rechterlid toont de temperatuurstijging door warmtegeleiding. Aangezien deze laatste term negatief is, stelt ze dus een temperatuurdaling voor ten gevolge van warmtegeleiding.

2.2 Oplossing van de bioheat vergelijking

De bioheat vergelijking werd opgelost door Martin J.C. van Gemert met de methode van scheiding van variabelen. De oplossing wordt gegeven door:

$$\Delta T(t, z, r) = \frac{\tau \mu_a \phi(z, r)}{\rho c} (1 - e^{-\frac{t}{\tau}}). \quad (3)$$

Dit model zal verder gebruikt worden om de temperatuurstijging in hersenweefsel te bepalen. Voor de oplossing werd een tijdsconstante τ ingevoerd, deze geeft een maat voor hoe snel de temperatuur in het weefsel zal stijgen ten gevolge van interactie met elektromagnetische straling. De tijdsconstante τ ziet er als volgt uit:

$$\tau = \left(\frac{1}{\tau_z} + \frac{1}{\tau_r} \right)^{-1} \quad (4)$$

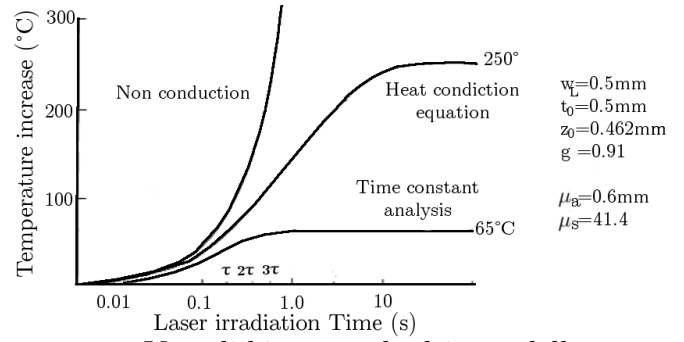
Met τ_z de axiale en τ_r de radiale component van τ .

$$\frac{1}{\tau_z} = \frac{k}{\rho c} \left(\frac{\pi(\mu_a + (1-g)\mu_s)}{4} \right)^2 \quad (5)$$

$$\frac{1}{\tau_r} = \frac{k}{\rho c} \left(\frac{2.4}{w_L} \right)^2 \quad (6)$$

Men kan zien dat de axiale component van τ bepaald wordt door weefselparameters (μ_a , g en μ_s) en de radiale component door de gebruikte optische vezel (w_L is de straal van de vezel). Aangezien de weefselparameters μ_a en μ_s afhankelijk zijn van de golflengte, zal een verandering van golflengte enkel een invloed hebben op de axiale component van τ . Anderzijds zal het gebruiken van een andere vezel enkel een invloed hebben op de radiale component van τ . Dit laatste kan men eenvoudig intuïtief verklaren. Een SM vezel is veel smaller dan een MM vezel ($w_L = 0.00045\text{cm}$ t.o.v. $w_L = 0.01\text{cm}$). Hierdoor komt bij een SM vezel alle energie op een smalle ruimte terecht, waardoor de warmte zich makkelijk in radiale richting kan verspreiden. Dit geeft een kleine τ_r . Bij een MM vezel daarentegen is de energie over een veel groter gebied verspreid, waardoor de warmte zich niet zo goed kan verspreiden in radiale richting. Dit leidt tot een grote τ_r .

Bij het opstellen van model (3) werden een aantal benaderingen gemaakt, zodat een analytische oplossing mogelijk was. Dit werd gedaan omdat een analytische oplossing meer inzicht geeft in het probleem dan een numerieke oplossing. Deze benaderingen hebben wel tot gevolg dat de oplossing niet meer exact is. In figuur 6 wordt de oplossing gevonden door tijdsconstante analyse (3) vergeleken met een exacte numerieke oplossing en een oplossing die uitgaat van geen warmtegeleiding. Men ziet dat de temperatuur voor de oplossing zonder warmtegeleiding naar oneindig gaat, geleiding is immers de enige factor die de temperatuur kan laten afnemen. Geen warmtegeleiding zorgt er dus voor dat de temperatuur



Figuur 6. Vergelijking van de drie modellen. Een model dat warmtegeleiding verwaarloost, de exacte numerieke oplossing en het model dat gebruik maakt van tijdsconstanten.

onbeperkt kan toenemen. De exacte oplossing en die met tijdsconstanten zullen satureren, weliswaar op een andere temperatuur. Op de figuur is te zien dat de oplossing met tijdsconstanten slecht voor een korte tijdsduur overeenkomt met de exacte numerieke oplossing. Vanaf een tijdsduur van langer dan ongeveer drie keer de tijdsconstante, wijkt oplossing (3) te sterk af van de exacte oplossing. De rede hiervoor is dat τ eigenlijk temperatuur afhankelijk is omdat de absorptiecoëfficiënt en de brekingscoëfficiënt, die beide voorkomen in de vergelijking van τ , afhankelijk zijn van de temperatuur. In het gebruikte model wordt τ als een constante gezien en wordt dus geen rekening gehouden met de tijdsafhankelijkheid. Hierdoor zal de benaderende oplossing slechts bruikbaar zijn voor laserstimulaties korter dan 3τ .

Het model met de tijdsconstanten (3) kan nu gebruikt worden om de temperatuurstijging te meten in hersenweefsel door continue en gepulste lasterstimulatie.

2.3 Continue stimulatie

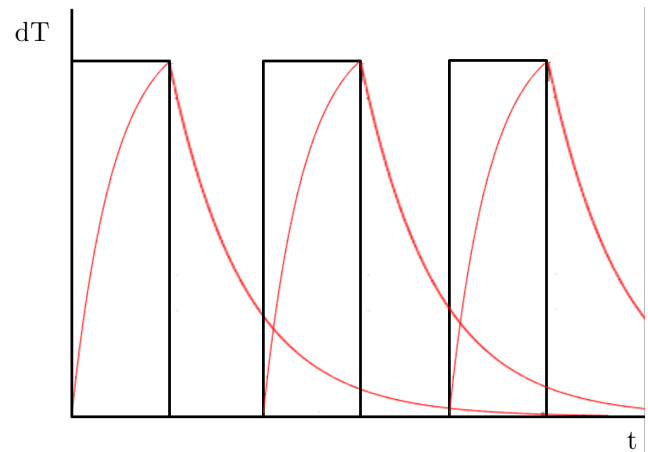
Voor de continue stimulatie zal de temperatuur in het begin snel stijgt en dat er na een bepaalde tijd saturatie optreedt, zoals te zien is op figuur 5a. Dit komt omdat er enerzijds opwarming zal zijn door absorptie, maar anderzijds ook afkoeling door warmtegeleiding. In het begin zal de absorptie groter zijn dan

de geleiding, waardoor de temperatuur sterk stijgt. Na een tijd echter zal de geleiding steeds groter worden, tot ze even groot is als de absorptie en er saturatie optreedt.

2.4 Gepulste stimulatie

Om de fysiologische omstandigheden in de neuronen zo goed mogelijk te benaderen, wordt vaak gebruik gemaakt van gepulste stimulatie. Tijdens een puls verwacht men, zoals bij de continue stimulatie, een exponentiële stijging van de temperatuur. Tussen twee pulsen zal de temperatuur exponentieel dalen, met dezelfde tijdsconstante als dat de temperatuur steeg. Bij de volgende puls zal de temperatuur opnieuw stijgen. Er moet echter rekening gehouden worden met het feit dat de temperatuurstijging ten gevolge van de vorige puls nog niet helemaal naar nul gezakt is, deze zal er dus bij opgeteld moeten worden. Bij de puls die daarop volgt, moet dan de temperatuurstijging van de twee vorige pulsen meegeteld worden. De temperatuurstijging tijdens een puls kan dus telkens geschreven worden als een som van een stijgende functie en allemaal dalende functies ten gevolge van de voorgaande pulsen. De temperatuurstijging tussen twee pulsen is dan een som van enkel dalende functies. Op figuur 7 staan de pulsen getekend met telkens de bijhorende temperatuurstijging. Op figuur 5b kan men een typische vorm zien, die men krijgt wanneer de contributies van de verschillende pulsen worden opgeteld.

Bij de gepulste stimulatie kan er op twee manieren saturatie optreden. Enerzijds zal er, wanneer een puls lang genoeg duurt, saturatie optreden binnen in een puls, net zoals bij de continue stimulatie. Anderzijds zal na een bepaalde tijd de bijdrage van de eerste puls naar nul gezakt zijn. Bij de daarop volgende puls zal ook de bijdrage van de tweede puls niet meer relevant zijn. Vanaf dat moment zal er dus telkens een gelijk aantal dalende functies zijn die een niet-triviale bijdrage leveren, waardoor de daaropvolgende pieken telkens even hoog zullen zijn. Dit is duidelijk te zien

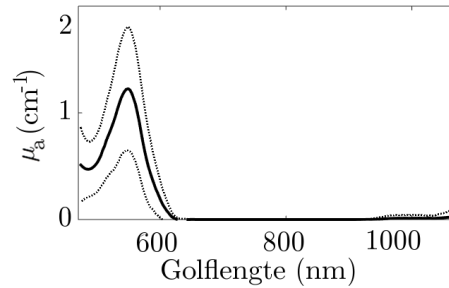


Figuur 7. Pulsen met bijhorende temperatuurstijging.

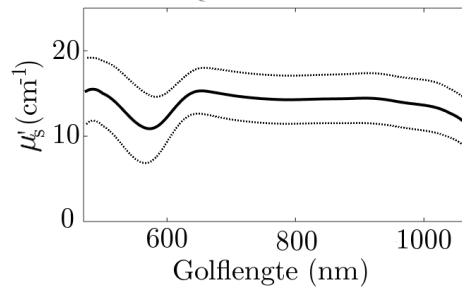
op figuur 5b. Men kan zien dat de vierde en de vijfde piek even hoog zijn, dit komt omdat de bijdrage van de eerste puls bij de vierde piek reeds naar nul gezakt is.

3. Methode

In voorgaande paragraaf is een oplossing voor de bioheat vergelijking besproken voor zowel een continu als gepulst stimulatie protocol. Deze benaderde oplossing wordt nu gebruikt om een voorspelling te doen voor de temperatuurstijging. Hiervoor is zowel informatie nodig over de structuur van het weefsel als over de thermische eigenschappen. De simulaties zullen gedaan worden voor de hippocampus van de rat (zie figuur ??). De weefsel eigenschappen zoals μ_a en μ_s zijn golf-lengte afhankelijk zoals duidelijk is uit figuur 8. De grote piek voor de absorptiecoëfficiënt bij $\approx 560nm$ komt door Hemoglobine. De thermische parameters voor de hippocampus staan in tabel 2. De fouten op de thermische eigenschappen kunnen verwaarloosd worden in vergelijking met de fouten op de weefsel parameters. Vervolgens moet ook de lichtverdeling $\phi(r, z)$ bepaald worden. De lichtverdeling is een parameter die aangeeft hoe de energie van de invallende fotonen zich verdeelt over het weefsel. Om meer precies te zijn, het geeft in elk punt de verandering van de energie per een-



(a) Caption here



(b) Caption here

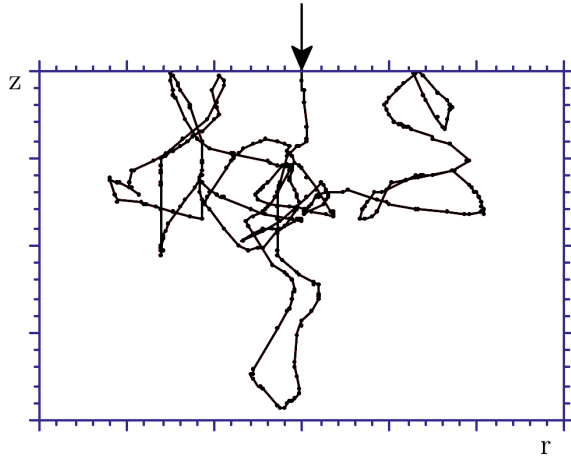
Figuur 8**Tabel 2.** Thermische eigenschappen van rat hippocampus

| Parameter | Waarde |
|-------------------------------|-----------------------------|
| Dichtheid ρ | $1040 \frac{kg}{m^3}$ |
| Warmtecapaciteit c | $3650 \frac{mJ}{g \cdot K}$ |
| Thermische conductiviteit k | $0.530 \frac{W}{m \cdot K}$ |

heid van oppervlakte, per eenheid van tijd. De lichtverdeling hangt af van zowel de weefsel eigenschappen (absorptiecoëfficiënt μ_a , verstrooiingscoëfficiënt μ_s , brekingsindex n , anisotropie factor g) als van de laserbeam eigenschappen (golflengte, numerieke apertuur NA , diameter d). Om $\phi(r, z)$ te modelleren kan de verdeling van de energie over het weefsel gezien worden als een *random walk* van fotonen (zie figuur 9). Het principe wordt uitgelegd aan de hand van een simpel voorbeeld, het zenden van 1 foton doorheen het weefsel. Wanneer een foton het oppervlak van het weefsel bereikt, wordt het opgenomen door een molecule. Dat molecule wordt geëxciteerd en door conductie effecten wordt een deel van die energie doorgegeven aan

omliggende moleculen. Dit gaat zo door tot de thermische energie niet meer kan doorgegeven worden. Dit proces kan ook gezien worden als één foton met een bepaald gewicht/energie die een random walk uitvoert en na elke stap een deel van zijn energie verliest. Hoeveel energie hij verliest en de geprefereerde staprichting wordt random gekozen maar is beïnvloed door de weefsel parameters. Het foton blijft wandelen totdat zijn gewicht onder een bepaalde drempel is gekomen, dan stopt de simulatie voor dat foton. Wanneer dit herhaald wordt voor 1 miljoen fotonen kan men een duidelijk beeld krijgen van waar de energie zal opstapelen. Aan de hand van een statistisch wiskundig protocol kan vervolgens de fotonverdeling omgezet worden naar kwantitatieve gegevens voor $\phi(r, z)$ [?].

Een programma geschreven door Ph. D studenten van de universiteit van Texas *Lihong Wang en Steven L. Jacques* doet dergelijke monte-carlo simulaties en geeft uiteindelijk lichtverdeling voor het gewenst gebied. Voor meer details wordt verwezen naar de handlei-



Figuur 9. Caption here

ding [?]. De gebruikte brekingsindex is 1.4 en de anisotropie factor voor de hippocampus wordt genomen als 0.88. Opnieuw kunnen de fouten op deze parameters verwaarloosd worden in vergelijking met de fouten op de absorptie en scattering coëfficiënt.

Om de temperatuursveranderingen te modelleren volgens de benaderende oplossing besproken in paragraaf 2 werd een matlab code geschreven, zowel voor de continue als voor de gepulste stimulatie protocols, zie hiervoor de bijlage.

$$\Delta T(t) = \begin{cases} \Delta T_1(t) & \text{voor } 0 < t < t_L \\ \Delta T_2(t) & \text{voor } t_L < t < F \\ \Delta T_3(t) & \text{voor } F < t < F + t_L \\ \Delta T_4(t) & \text{voor } F + t_L < t < 2F \\ \Delta T_5(t) & \text{voor } 2F < t < 2F + t_L \\ \dots & \end{cases} \quad (7)$$

Met

$$\begin{aligned} \Delta T_1(t) &= \Delta T_s(t) \\ \Delta T_2(t) &= \Delta T_d(t - t_L) \\ \Delta T_3(t) &= \Delta T_d(t - t_L) + \Delta T_s(t - F) \\ \Delta T_4(t) &= \Delta T_d(t - t_L) + \Delta T_d(t - F - t_L) \\ \Delta T_5(t) &= \Delta T_d(t - t_L) + \Delta T_d(t - F - t_L) + \Delta T_s(t - 2F) \end{aligned}$$

Waarbij t_L de lengte van een puls is, F de tijd tussen twee pulsen en $T_s(t)$ en $T_d(t)$ stij-

gende en dalende exponentiele functies zijn, respectievelijk gegeven door:

$$\Delta T_s(t) = \frac{\tau \mu_a \phi(z, r)}{\rho c} (1 - e^{-\frac{t}{\tau}}) \quad (8)$$

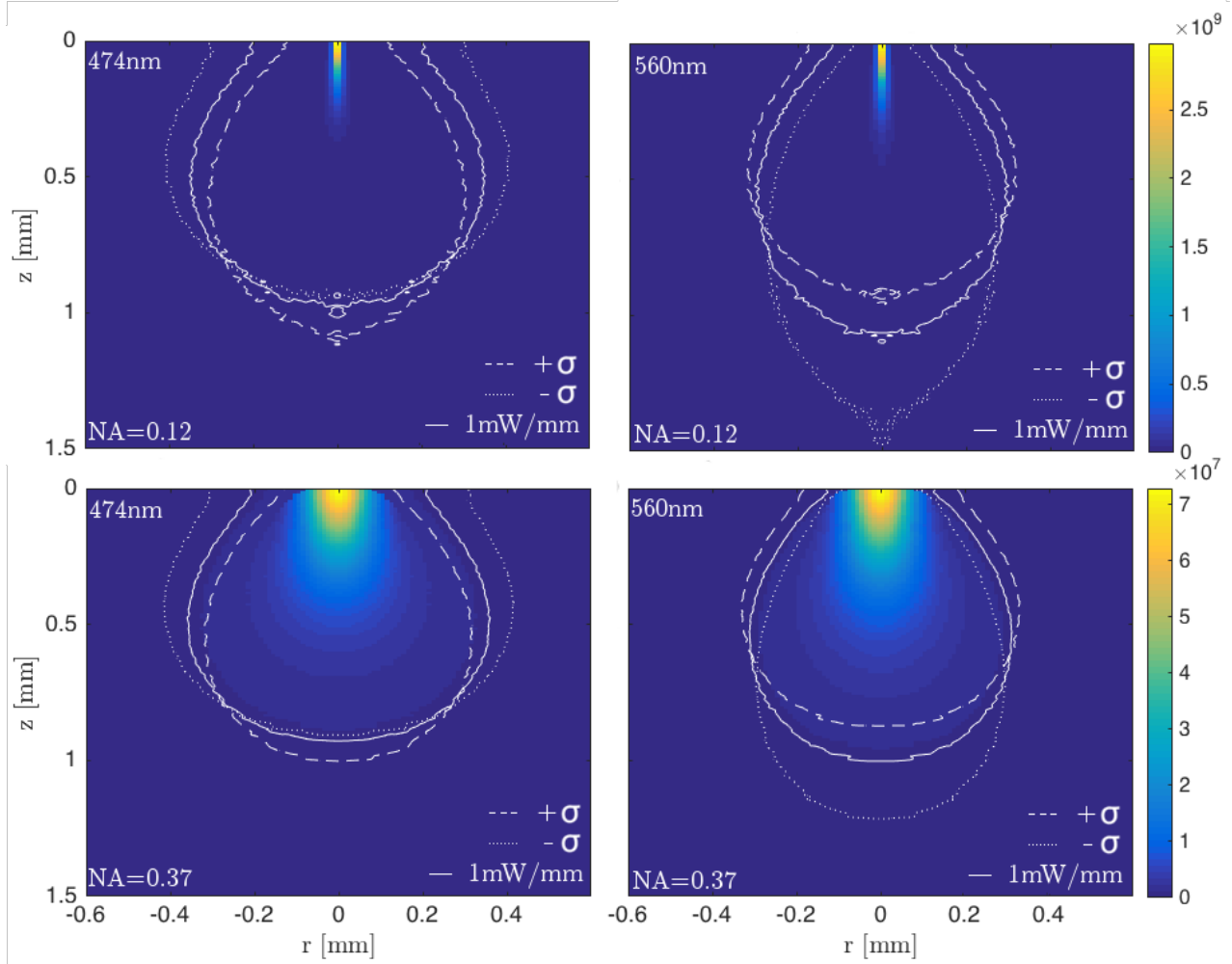
$$\Delta T_d(t) = \frac{\tau \mu_a \phi(z, r)}{\rho c} (1 - e^{-\frac{t_L}{\tau}}) e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (9)$$

4. Resultaten en Discussie

Simulaties voor de temperatuursverandering in weefsel met de tijdsconstanten methode worden uitgevoerd voor de hippocampus regio in het rat brein. Er wordt gefocust op protocols voor golflengten 474nm en 560nm en voor zowel een single-mode ($d = 0.009nm$, $NA=0.12$) als multi-mode ($d = 0.300nm$, $NA=0.37$) optische vezel. Deze twee golflengte omdat een veel gebruikt opsin *ChR2* optimaal werkt bij een golflengte $\approx 470nm$ en er een hoge piek is bij de absorptiecoëfficiënt voor een golflengte van 560nm. Dit is ideaal om de invloed van de absorptie op de temperatuursverandering na te gaan.

4.1 Energieverdeling

Het *Monte-Carlo multi layer* programma geeft $\psi(r, z)$, de lichtverdeling corresponderend met een eenheid irradiantie $I = 1 \frac{W}{m^2}$. Om vervolgens de eigenlijke lichtverdeling $\phi(r, z)$ voor een bepaald stimulatie protocol te bekomen wordt vergelijking ?? gebruikt. Figuur ?? geeft $\phi(r, z)$ weer voor een stimulatie van laserlicht met een power van 1mW en voor de vier verschillende protocols waarop gefocust wordt in dit onderzoek. De contourlijn op $1 \frac{mW}{mm^2}$ geeft het maximale oppervlak aan waarin opsin stimulatie kan optreden, zie paragraaf 1.3. Een aantal dingen die onmiddellijk opvallen bij de vergelijking van de energieverdeling voor de verschillende protocols. Wanneer de twee golflengten vergeleken worden valt op dat voor 474nm de energie meer radiaal verspreid wordt, terwijl bij de 560nm vooral in de axiale richting verdeeld wordt. Een



Figuur 10. Caption here

hoge absorptie zorgt dus voor minder verspreiding in de radiale richting en meer in axiale richting.

De energieverdelingen voor de verschillende optische vezels (NA=0.12 en NA=0.37) verschillend vooral wat betreft de energiever spreiding. Bij een single-mode (NA=0.12) is de meeste energie geconcentreerd rond de oorsprong terwijl bij de multi-mode een meer homogene verdeling van de energie plaatsvindt. Dit is wat te verwachten was. Een kleine NA betekent een kleine verspreidings hoek waaronder het laserlicht aangevoerd wordt naar het weefsel. Alle energie wordt op een kleine plek geconcentreerd en dus het grootste deel van de energie wordt op dezelfde plek geabsorbeerd. Wanneer de energie echter vanaf het begin

meer gespreid wordt aangevoerd (multi-mode) zal deze zich meer evenredig verspreiden over het oppervlak. De maximale energieconcentratie bij de SM is dus een factor 10^2 groter.

Er is een poging ondernomen om de resolutie van de afbeeldingen van $\phi(r, z)$ te verbeteren. Vooral bij de simulaties voor de SM zou dit nuttig zijn. Als invoer in het MCML-programma moet je naast de thermische en weefsel eigenschappen ook het aantal afgevuurde fotonen en het gebied specificeren. Het gebied waarin de fotonen mogen wandelen is een rooster met allemaal roosterpunten. Het aantal moet dus gespecificeerd worden en de roosterafstand. Een eerste mogelijkheid is het verhogen van het aantal afgevuurde fotonen. Dit vraagt echter veel rekenvermo-

gen, dus gepast technologisch materiaal is hiervoor vereist. Een tweede mogelijkheid is een zelfde aantal fotonen afvuren maar het gebied verkleinen, dus de roosterafstand verkleinen. Echter moet opgepast worden dat het gebied niet te klein is, de fotonen mogen niet in de buurt van de rand komen omdat daar geen rekening mee is gehouden in de code. Dit is een aantal keer geprobeerd maar er trad elke een probleem op met de schaling. Het gebied in een richting (axiaal of radiaal) is gelijk aan het aantal roosterpunten vermenigvuldigd met de roosterafstand. De eerste schaling was 1000 roosterpunten in de axiale richting en 500 in de radiale. De roosterafstand was twee keer $10^{-4}cm$. De afmetingen van het gebied waarin de lichtverdeling gesimuleerd moet worden is: $0.1cm \times 0.05cm$. Echter krijgen we uit de data van het programma afmetingen van $1cm \times 0.5cm$. Wanneer nu de rooster afstand gehalveerd word, waren de afmetingen wel wat verwacht was, namelijk $0.5cm \times 0.25cm$. Het eigenaardige is vooral dat er twee keer exact dezelfde code wordt gebruikt, zowel het MCML simulatie programma als de matlab code die de data-files inleest, omzet en grafisch weergeeft. Dit is een probleem waar niet onmiddellijk een oplossing voor gevonden kon worden omdat de code voor het MCML programma niet beschikbaar is. De simulaties zijn verschillende keren herhaald met steeds hetzelfde eigenaardige resultaat. Echter wordt niet uitgesloten dat het eventueel toch ergens een menselijke fout is in de inleescode. Indien betere resolutie van de lichtverdeling noodzakelijk is dit iets wat de moeite waard is om na te kijken. Verder is er ook een typfout bij de eenheden in de resulterende data file gevonden. Bij het omzetten van de fotonendistributie naar een fysische grootte zijn er verschillende mogelijkheden.

- .Frzc, Fluence rate [$W \cdot cm^{-2}$]
- .Arz, Absorptie [$W \cdot cm^{-3}$]
- ...

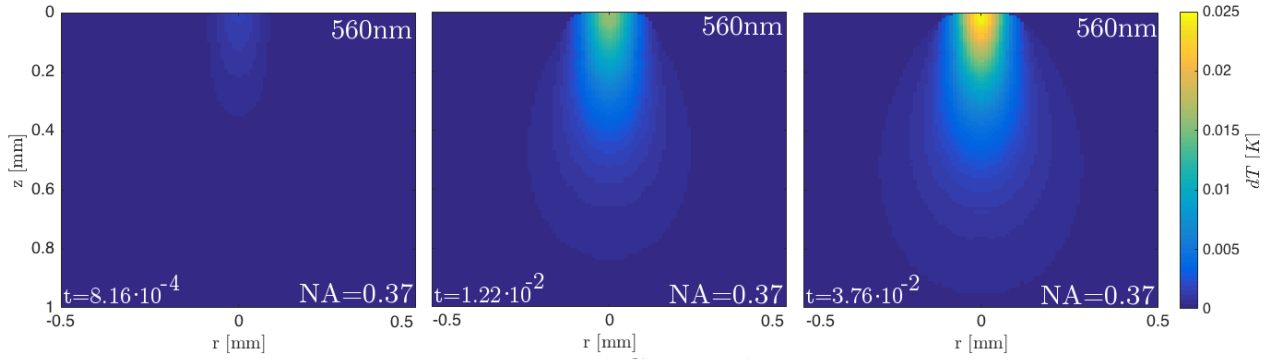
De extensie die hier nodig is, is de .Frzc en in deze datafile staat als eenheid bij de lichtverdeling [$W \cdot cm^{-3}$]. Aangezien een andere extensie deze eenheid al heeft, is dit een verwarrende fout die uit de code gehaald moet worden.

4.2 Temperatuurstijging bij continue stimulatie

De resultaten voor de lichtverdeling bekomen met de Monte-Carlo simulatie werden gebruikt om de temperatuurstijging voor continue stimulatie te bepalen. Dit werd gedaan voor alle vier de protocols, telkens bij een vermogen van $1mW$. Er kunnen nu verschillende figuren gemaakt worden.

Als eerste werden er kleurenplots gemaakt die de tijdsevolutie van de temperatuursverandering weergeven. De resultaten voor één van de protocols, namelijk $\lambda = 560nm$ en multi-mode, staan afgebeeld in figuur 11, die voor de andere protocols kan men vinden in de bijlage (figuur ??). De temperatuurstijging werd telkens geplot op drie verschillende tijdstippen. Een eerste tijdstip werd gekozen vlak nadat het laserlicht op het weefsel begint te schijnen, in dit geval $t = 0.001s$. Als tweede tijdstip werd telkens $t = \tau$ gekozen en als laatste tijdstip werd $t = 3\tau$, dit tijdstip is de uiterste grens waarop ons model geldig is. Op dit laatste tijdstip is de temperatuur reeds gesatureerd, zodat de rechtse afbeelding telkens de finale temperatuurstijging weergeeft. Op deze afbeeldingen is duidelijk de evolutie van de temperatuursverandering zichtbaar. In het begin is de maximale temperatuurstijging lager en is de verandering minder verspreidt. Naarmate de tijd vordert wordt de maximale temperatuur groter en verspreidt de temperatuurstijging zich verder doorheen het weefsel. De fouten op deze figuren werden wel berekend, maar niet afgebeeldt omdat dat de figuren te ingewikkeld zou maken.

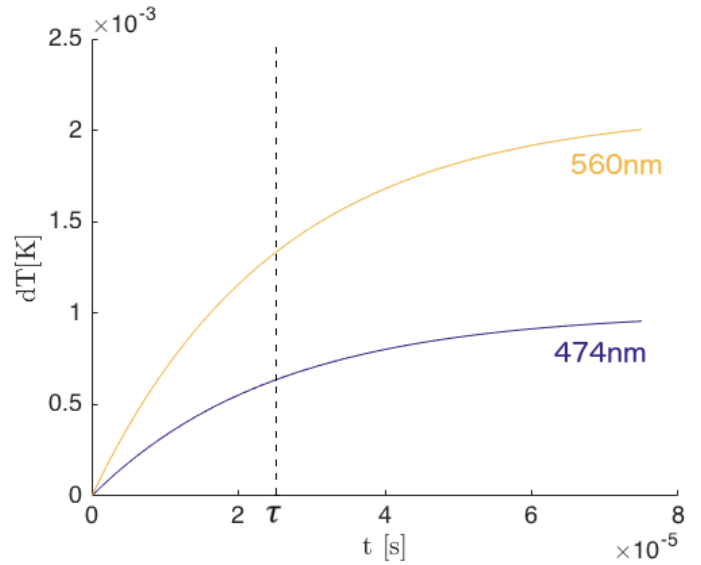
Op figuren 12 en 13 werd de temperatuurstijging van het hersenweefsel geplot in functie van de tijd op $z = 0$ en $r = 0$, telkens voor



Figuur 11. Caption here

de twee verschillende golflengtes. Op de grafieken werd telkens $t = \tau$ aangeduid met een stippellijn. Aangezien de tijdsconstante voor eenzelfde vezel (SM of MM) zeer weinig van elkaar verschillen (zie later) kon er per afbeelding een stippellijn getekend worden. Wanneer men naar de vorm van de grafieken kijkt, is te zien dat de temperatuurstijging inderdaad vrij snel zal satureren. Anderzijds is het opvallend dat de temperatuurstijging voor $560nm$ veel groter is dan voor $474nm$. Dit komt omdat de absorptie coefficient van het weefsel een piek vertoont rond $550nm$. Rond $550nm$ zal de absorptie van fotonen door het weefsel veel groter zijn omwille van absorptie door hemoglobine. [?] Hierdoor zal de absorptie coefficient bij $560nm$ groter zijn dan bij $474nm$ en aangezien absorptie verantwoordelijk is voor temperatuurstijging, verklaart dit de grotere temperatuursverandering bij $560nm$.

Zoals daarnet al werd vermeld, is er een zeer klein verschil tussen de tijdsconstanten voor eenzelfde vezel. Dit kan men zien in tabel 3. Voor verschillende golflengten is τ min of meer gelijk. De rede hiervoor is dat de waarde van de optische parameters (deze zijn afhankelijk van de golflengte) weinig invloed heeft op τ . Ze heffen elkaar als het ware op. Anderzijds heeft de gebruikte vezel een zeer grote invloed op de waarde van τ . De rede hiervoor is dat de tijdsconstante zeer sterk afhankelijk is van de straal van de optische vezel (w_L). Men kan zien dat voor de multi-mode vezel de tijdsconstanten veel groter zijn



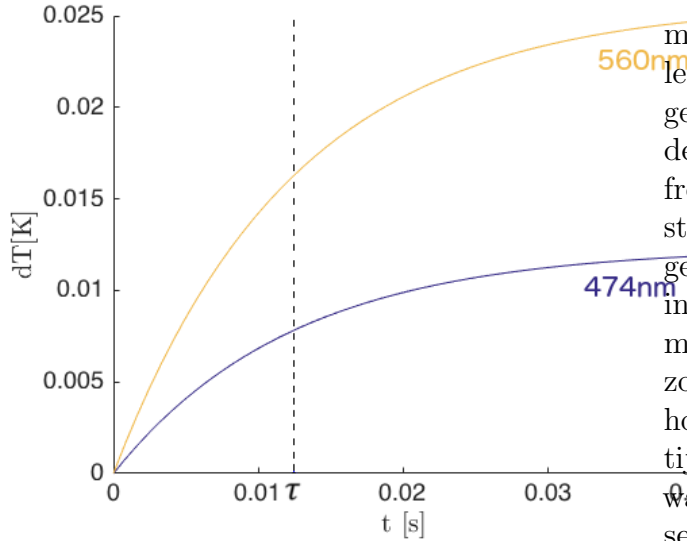
Figuur 12. Caption here

Tabel 3. Bekomen tijdsconstanten τ voor elk protocol

| | $\tau_{SM} [10^{-2}ms]$ | $\tau_{MM}[ms]$ |
|-------|-------------------------|------------------|
| 474nm | 2.52 ± 0.01 | 12.40 ± 0.07 |
| 560nm | 2.52 ± 0.02 | 12.41 ± 0.09 |

dan voor single-mode. De rede hiervoor is vrij eenvoudig intuïtief te verklaren. Een SM vezel is smaller, waardoor alle energie zich in een klein en smal gebied bevindt. Hierdoor kan de temperatuur makkelijker en dus sneller stijgen, wat leidt tot een kleine τ . Voor de MM vezel is dezelfde energie over een groter gebied verspreidt, waardoor de temperatuur trager zal stijgen. Dit geeft een grotere waarde voor de tijdsconstante.

Tot slot kunnen we de kleurenplots voor



Figuur 13. Caption here

de vier protocols met elkaar vergelijken. Afbeelding 14 geeft de temperatuurstijging weer voor de verschillende protocols, telkens op 3τ , wat de uiterste grens van de geldigheid van het model is. Men kan een aantal zaken opmerken. Ten eerste komt de vorm sterk overeen met die van de afbeeldingen voor de lichtverdeling. Dat komt omdat in een gebied met een hoge lichtverdeling de temperatuur sterk zal stijgen en in een gebied met een lage lichtverdeling, zal de temperatuur minder sterk stijgen. Ook is te zien dat de temperatuursverandering voor $560nm$ telkens groter en verder verspreid is dan voor $474nm$. Dit komt, zoals eerder al vermeld werd, door de hogere absorptie bij $560nm$.

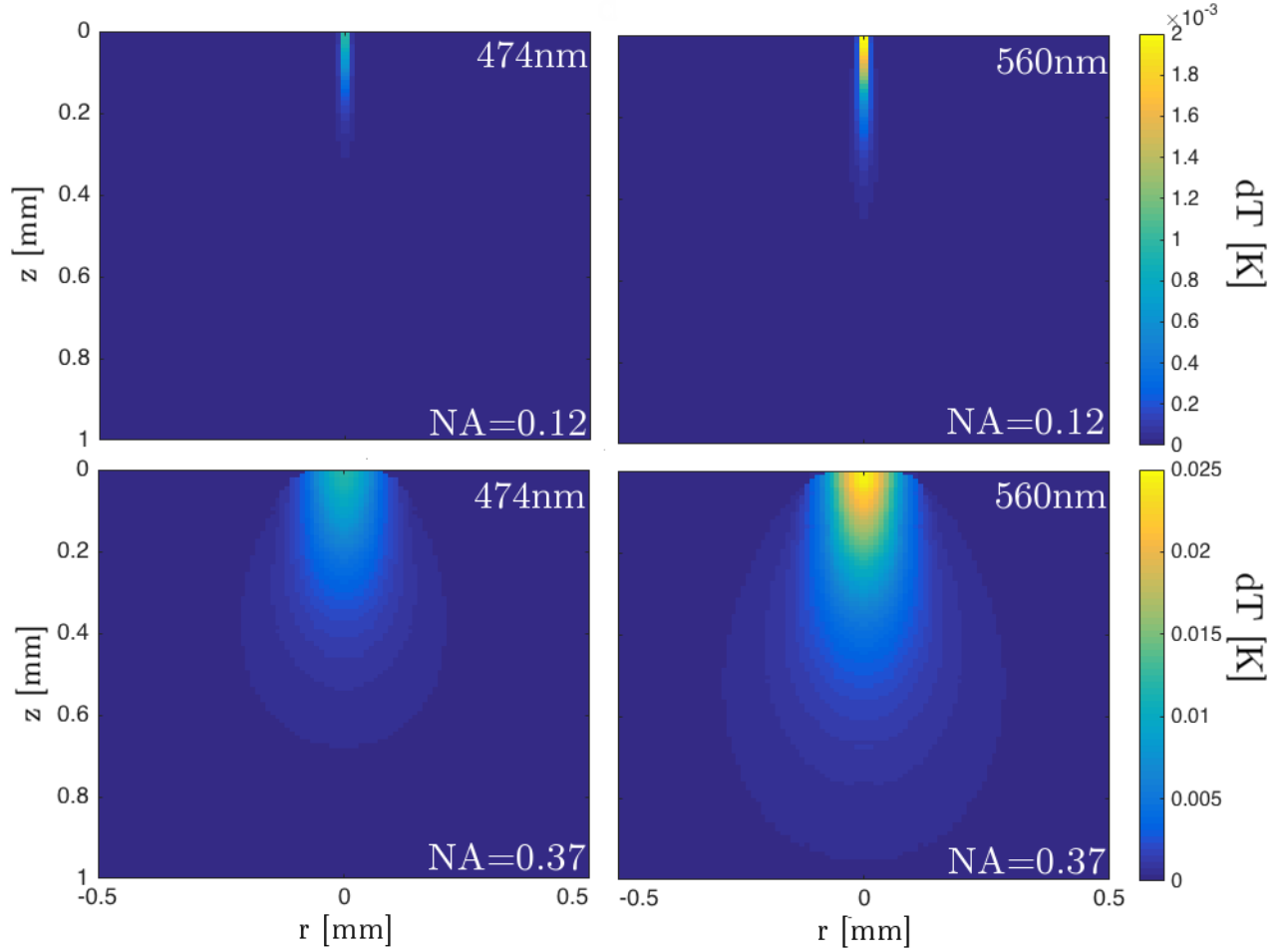
4.3 Temperatuurstijging bij gepulste stimulatie

Met behulp van matlab werd de temperatuurstijging voor gepulste stimulatie berekend voor verschillende stimulatie protocols (zie tabel 4). Dit werd echter enkel gedaan voor multi-mode vezels. De rede hiervoor is dat voor single-mode vezels de limiet van geldigheid van het gebruikte model overschreden wordt. Omdat τ voor SM zo klein is (orde $10^{-2}ms$), is de pulslengte telkens veel langer dan 3τ , wat de grens was voor de geldigheid van het model.

In tabel 4 vindt men de resultaten voor de maximale temperatuurstijging voor verschillende stimulatie protocols. Hierop werden geen fouten berekend. Uit deze tabel kan men de invloed van de irradiantie, pulslengte en frequentie op ΔT_{max} afleiden. Wanneer deze stijgen, zal de maximale temperatuur ook stijgen. Dit is evident aangezien er meer fotonen in het weefsel worden gebracht en er dus ook meer fotonen geabsorbeerd kunnen worden, zodat de temperatuur meer stijgt. Bij een hoger frequentie heeft het weefsel ook minder tijd om de temperatuur terug te laten zakken, waardoor de contributies van voorgaande pulsen groter zijn. Men zien dat de gevonden maximale temperatuurstijgingen ruim onder de $0.5^{\circ}C$ blijven, wat als ondergrens wordt genomen voor mogelijke schade aan het weefsel. Binnen dit model kan dus besloten worden dat gepulste stimulatie met de gegeven protocols waarschijnlijk geen weefsel schade zal opleveren. Het is echter wel mogelijk dat wanneer de fouten berekend zouden worden, de temperatuurstijging toch hoger blijkt dan $0.5^{\circ}C$. Belangrijk hierbij is op te merken dat het gebruikte model een lagere temperatuurstijging voorspelt dan er in werkelijkheid is (zie figuur 6). De mogelijkheid bestaat dus dat met het model een temperatuurstijging berekend wordt die niet schadelijk is, maar dat de werkelijke temperatuurstijging hoger is en mogelijks wel schadelijke gevolgen heeft.

4.4 Foutenanalyse

Het is belangrijk om bij het berekenen van de temperatuurstijging rekening te houden met de fouten op de parameters die gebruikt worden. Er moet dus een foutenanalyse gedaan worden om zo de fouten op ΔT te berekenen. De temperatuurstijging is afhankelijk van volgende parameters $\Delta T(\mu_a, \mu_s, g, \rho, c, k, w_L, \phi)$ met $\phi(\mu_a, \mu_s, g)$. Aangezien de fouten op de absorptiecoëfficiënt μ_a en gereduceerde verstrooiingscoëfficiënt μ'_s zeer groot zijn (zie figuur 8), worden de fouten op de andere parameters verwaarloosd. De fouten op μ_a en μ'_s kunnen uit deze grafiek afgelezen worden. Ver-



Figuur 14. Caption here

volgens kan door g constant te nemen, de fout op μ'_s eenvoudig omgezet worden in een fout op μ_s , daar $\mu'_s = (1 - g)\mu_s$. Omdat de lichtverdeling bepaald werd met een Monte-Carlo methode, kan de fout hierop niet berekend worden met behulp van de doorwerkingsregel. De doorwerkingsregel voor een functie f afhankelijk van parameters a, b, c, \dots wordt gegeven door:

$$(\Delta f)^2 = \left(\frac{\partial f}{\partial a}\right)^2 (\Delta a)^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial b}\right)^2 (\Delta b)^2 + \dots \quad (10)$$

De fout op de temperatuurstijging werd als volgt berekend. De twee parameters waarop fouten gekend zijn (μ_a en μ_s), werden elk afzonderlijk gevarieerd binnen hun foutenmarges. Door telkens de temperatuurstijging te berekenen met $\mu_a \pm \sigma$ of $\mu_s \pm \sigma$ kon achterhaald worden wat de invloed was van elke pa-

rameter op de temperatuurstijging. Uit deze analyse bleek dat de absorptiecoëfficiënt een zeer grote invloed had op ΔT , namelijk een grotere absorptie zorgt voor een grotere temperatuurstijging en omgekeerd, een kleinere absorptie zorgt voor een kleinere temperatuurstijging. De verstrooiingscoëfficiënt bleek zeer weinig invloed te hebben op de grootte van de temperatuurstijging. Toch was te zien dat grotere verstrooiing zorgde voor een iets grotere temperatuurstijging en dat een kleinere verstrooiing een iets kleinere temperatuurstijging tot gevolg had. Vervolgens werd ΔT opnieuw berekend, met $\mu_a + \sigma$ en $\mu_s + \sigma$ om als bovengrens van de fout op ΔT te gebruiken en met $\mu_a - \sigma$ en $\mu_s - \sigma$ om de ondergrens van de fout op ΔT te gebruiken. De fout op de temperatuurstijging werd enkel berekend voor continue

Tabel 4. Maximale temperatuurstijging bij gepulste stimulatie met een MM vezel voor verschillende protocols.

| Irradiantie[mW/mm ²] | Puls lengte [ms] | Frequentie [Hz] | Maximale ΔT [m°C] | |
|----------------------------------|------------------|-----------------|---------------------------|-------------------|
| | | | $\lambda = 474nm$ | $\lambda = 560nm$ |
| 70.5 | 5 | 5 | 4.54 | 9.44 |
| | | 20 | 4.62 | 9.61 |
| | | 130 | 9.81 | 20.4 |
| 380 | 30 | 5 | 67.2 | 140 |
| | | 10 | 67.2 | 140 |
| | | 20 | 68.4 | 142 |
| 46 | 1 | 40 | 0.798 | 1.66 |
| 10 | 4 | 5 | 0.535 | 1.11 |
| | | 10 | 0.535 | 1.11 |
| | | 45 | 0.642 | 1.34 |
| 5 | 20 | 8 | 0.777 | 1.62 |

stimulatie. Aangezien gepulste stimulatie vaker gebruikt wordt, is het zeer interessant om ook hier de fouten op te berekenen. Dat werd hier echter niet gedaan.

Er werd ook een iets wiskundige methode gebruikt om de fouten te berekenen. Hierbij werd de fout op de lichtverdeling berekend met bovenvermelde methode. Vervolgens werd de fout op de temperatuurstijging berekend door gebruik te maken van de doorwerkingsregel. De resultaten hiervan staan afgebeeld in figuur ???. Zoals men kan zien is de fout exponentieel afhankelijk van de tijd. Hierdoor zal $\Delta T - \sigma$ na een bepaalde tijd onder 0 gaan. Dit is niet fysisch en daarom wordt de eerste methode geprefereerd.

De fout op tau kon met de doorwerkingsregel en wordt gegeven door:

Aangezien de absorptie en gereduceerde verstrooiing de enige parameters zijn waar een significante fout op is, kan de nauwkeurigheid van ΔT verhoogt worden door de nauwkeurigheid van deze parameters te verhogen. Hiervoor zijn verdere experimentele verbeteringen nodig.

Referenties