



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Glow with the flow: Quantifying blood flow and photoluminescence signal in biological tissue

Nadort, A.

Publication date

2015

Document Version

Final published version

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Nadort, A. (2015). *Glow with the flow: Quantifying blood flow and photoluminescence signal in biological tissue*. [Thesis, fully internal, Universiteit van Amsterdam].

General rights

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Disclaimer/Complaints regulations

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, P.O. Box 19185, 1000 GD Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.



A

APPENDICES

A

LIST OF ABBREVIATIONS

Ab	antibody	M	Mie
ACF	autocorrelation function	MESI	multi exposure speckle imaging
Ag	antigen	MPE	maximum permissible exposure
AOTF	acousto-optic tuneable filter	NA	numerical aperture
Bn	barnase	NIR	near infrared
Bs	barstar	OCT	optical coherence tomography
CAM	chorioallantoic membrane	OD	optical density
CCD	charge coupled device	OPS	orthogonal polarization spectroscopy
CEA	anti-carcinoembryonic antigen	PBS	phosphate buffered saline
CI	confidence interval	PCF	pair correlation function
CMOS	complementary metal-oxide semiconductor	PD	photodiode
CV	coefficient of variation	PDF	probability density function
DLS	dynamic light scattering	PEG	poly-ethylene glycol
DWS	diffusing wave spectroscopy	PMAO	poly(maleic anhydride-alt-1-octadecene)
EMCCD	electron multiplying charge coupled device	POF	plastic optical fibers
EPR	enhanced permeability and retention	PSD	power spectral density
FAD	flavin adenine dinucleotide	PY	Percus-Yevick
FL	fluorescein	QD	quantum dot
FTIR	Fourier transform infrared	QE	quantum efficiency
FWHM	full width at half maximum	QLS	quasi-elastic light scattering
GRR	green-to-red-ratio	QY	quantum yield
Hb	haemoglobin	RBC	red blood cell
Hct	Haematocrit	RNA	ribonucleic acid
He/Ne	Helium/Neon	S/B	signal/background
ICU	intensive care unit	SDF	sidestream dark field
LASCA	laser speckle contrast analysis	SI	supplementary information
sLASCA	spatial laser speckle contrast analysis	SNR	signal-to-noise ratio
tLASCA	temporal laser speckle contrast analysis	SVS	speckle visibility spectroscopy
LDF	laser Doppler flowmetry	TEM	transmission electron microscopy
LED	light emitting diode	TIO₂	titanium dioxide
LSCI	laser speckle contrast imaging	UCNP	upconversion nanoparticle
LSI	laser speckle imaging	UV	ultraviolet
		VIS	visible

A

Other symbols

g	anisotropy factor	μ'_s	reduced scattering coefficient
μ_a	absorption coefficient	μ_s	scattering coefficient
$n_{RBC}, n_{TiO_2}, n_{SPHERE}, n_{plasma}, n_{silicone}$	refractive index	μ_{tr}	transport attenuation coefficient
		σ_{sca}	scattering cross section

LIST OF SYMBOLS

Laser speckle flowmetry

$A(N)$	model-based scaling factor for N	$p(n)$	probability distribution for n
c_1	probability constant	$p(\mathbf{q})$	scattering phase function
C_{noise}	noise in detected intensity	$p(V)$	velocity probability distribution
C_t	autocovariance of temporal speckle intensity	$p(\eta_{micro})$	microscopic particle distribution
d	diameter (channel/vessel)	\mathbf{q}	scattering vector
D	scatterer diameter	r	distance between particles in volume
D_b	Brownian motion diffusion coefficient	R^2	coefficient of determination
E	electric field	R_{adj}^2	adjusted R^2
E^*	complex conjugate of electric field	r_s	speckle size image plane
E_f	fluctuating component electric field	$S(\mathbf{q})$	structure factor
E_s	static component electric field	T	camera exposure time
F	vessel/path length factor	t	time
f_v	volume fraction	V	flow velocity
g_1	normalized electric field ACF	$\langle V^2 \rangle$	second moment of velocity distribution
g_2	normalized intensity ACF	V_0	average flow velocity
I	detected intensity	V_p	volume of particle
$\langle I \rangle$	mean detected intensity	α	proportionality constant
I_f	fluctuating component of detected intensity	β_M	measurement-geometry specific constant
I_s	static component detected intensity	Δr	displacement
K	speckle contrast	η	(global) particle number density
K_{max}	maximum attainable speckle contrast	θ	angle
k	wave number	λ	wavelength
l	path length	ρ	fraction dynamically scattered light
M	shape parameter	σ_k	standard deviation in K
M_{opt}	optical magnification	σ_i	standard deviation in I
N	average number dynamic scattering events	σ_n	standard deviation in n
n	number of dynamic scattering events	σ_s	standard deviation in spatial I
N_s	spatial pixels local region	τ	time constant
N_t	temporal pixels local region	τ_c	decorrelation time
		ω	measure of point spread function

Upconversion nanoparticles

$[Ab]$	antibody concentration	P_{abs}	absorbed power
$[Ag]$	antigen concentration	P_{em}	emitted power
Φ	fluorescence conversion efficiency	P_{ex}	excitation power
I_{ex}	excitation intensity	QE_{CCD}	quantum efficiency CCD
I_{sat}	saturation excitation intensity	S_{ccd}	CCD sensitivity
K_{off}	affinity constant	S_{UCNP}	sensor UCNP-signal intensity
N_e	number of electrons	T	exposure time
N_{ph}	photon emission rate	z	depth
N_{UCNP}	number of UCNPs	ζ_{total}	system spectral calibration coefficient
N_{Yb}	number of Yb ions	η_{uc}	upconversion efficiency
$N_{el}, N_{shot}, N_{dark}, N_{read}, N_{rest}$	electronic noise level	λ_{ex}	excitation wavelength
σ_{abs}	abs. cross section luminophore	ξ_{optics}	throughput imaging optics

A

SAMENVATTING VAN HET PROEFSCHRIFT

Optische technieken hebben een goed perspectief voor toepassing in de gezondheidszorg: ze kunnen niet-invasief zijn, licht is niet-ioniserend, de apparatuur is vaak goedkoop en compact, en optische interacties kunnen zowel structurele als fysiologische informatie over biologisch weefsel geven. De nadelen van optische technieken zijn de gelimiteerde diepte in weefsel tot waar het licht reikt en de verstrooiing door weefsel, waardoor het beeld onscherp wordt. Het deel van de circulatie waar de arteriën en arteriolen zijn vertakt tot capillairen en waar de zuurstof- en nutriëntuitwisseling met cellen in het lichaam plaatsvindt, ligt ten dele vlak onder het weefsel oppervlak. Met optische technieken kunnen we deze microcirculatie daarom in beeld brengen. Een niet goed functionerende microcirculatie kan schade aan weefsel veroorzaken en in het ergste geval leiden tot sterfte, bijvoorbeeld bij septische shock. Er zijn vele andere situaties waar een disfunctionerende microcirculatie het gevolg, de mediator of de aanleiding is van een klinische pathologie. Het monitoren van de microcirculatie kan helpen bij diagnostiek, feedback geven bij therapie, of inzicht geven in fysiologische processen. Een optische techniek die de functionaliteit van de microcirculatie betrouwbaar in beeld kan brengen heeft daarom veel klinische relevantie.

Sidestream dark field (SDF) microscopie is een videomicroscopie-techniek die de microcirculatie onder de tong direct in beeld kan brengen, volgens het principe dat groen licht sterker wordt geabsorbeerd door bloed dan door omliggend weefsel. Uit de beelden waarin de rode bloedcellen als donkere bolletjes door lichtgrijs weefsel bewegen kan de vattendichtheid, de vatgeometrie en de bloedstroomsnelheid van de langzaam stromende capillairen (< 2 mm/s) bepaald worden. In **Hoofdstuk 2** wordt een andere groep van technieken geïntroduceerd die de beweging van rode bloedcellen op basis van een ander principe in beeld brengt: dynamische lichtverstrooiingstechnieken. Coherent laser licht (dezelfde golflengte en fase) dat terug verstrooid wordt uit weefsel heeft een groot aantal verschillende paden door het weefsel afgelegd, waardoor het met een groot aantal verschillende fasen aankomt op de detector en een gerandomiseerd interferentiepatroon ('speckles') veroorzaakt. Als er beweging plaatsvindt in dit weefsel (bijvoorbeeld bloedstroming) zal het interferentiepatroon in de tijd fluctueren. De temporele autocorrelatie functie (ACF) beschrijft deze temporele fluctuaties mathematisch, en hangt af van de optische eigenschappen, de bewegingseigenschappen (bijvoorbeeld random of directioneel) en snelheid. Het speckle patroon kan worden afgebeeld met een camera, waarbij de fluctuaties geïntegreerd worden over de camera sluitertijd. Langzame fluctuaties worden logischerwijs scherper afgebeeld dan snelle fluctuaties, en de scherpte wordt gekwantificeerd als speckle contrast K . De mathematische relatie tussen K en de ACF is afgeleid in Hoofdstuk 2, met als belangrijke parameter de karakteristieke tijdsconstante de 'decorrelatietijd' τ_c , waarbij τ_c en stroomsnelheid V omgekeerd evenredig zijn. De technieken die speckles spatieel afbeelden om een maat voor bloedstroming te vinden vallen onder laser speckle flowmetry technieken. De eenvoudigheid van apparatuur en algoritme, en de gevoeligheid voor een grote range aan stroomsnelheden geven deze techniek veel voordelen als niet-invasieve klinische microcirculatie monitor.

Het nadeel van laser speckle flowmetry technieken is dat de precieze relatie tussen contrast K (of τ_c) en bloedstroomsnelheid niet *in vivo* ('in het lichaam') gekwantificeerd is. In **Hoofdstuk 3** combineren we daarom SDF microscopie met laser speckle contrast imaging (LSCI), waarmee zowel de bloedstroomsnelheden (SDF) als de decorrelatie tijden (LSCI) kunnen worden bepaald van dezelfde vaten. In dit hoofdstuk staat validatie van de geïntegreerde SDF-LSCI techniek centraal. De resultaten laten zien dat K betrouwbaar kan worden berekend uit de speckle beelden en dat τ_c nauwkeurig kan worden bepaald door een model te passen aan K -waarden bij meerdere sluitertijden. Met optisch weefsel simulerend fantoommateriaal met ingebouwde vloeistof kanaaltjes kan τ_c als functie van V systematisch worden geanalyseerd, wat de lineaire relatie tussen $1/\tau_c$ en V bevestigde. Vervolgens onderzoeken we de relatie tussen $1/\tau_c$ en V voor de microcirculatie onder de tong. De belangrijkste conclusie uit dit eerste *in vivo* experiment is dat τ_c die wordt gemeten voor een vat in het focusvlak sterk afhangt van (onbekende) dynamische verstrooiingen in het weefsel buiten het vat (bijvoorbeeld spierbewegingen of uit-focus bloedvaten). Deze 'offset' decorrelaties kunnen worden gekwantificeerd met K -waarden gemeten voor weefsel regio's naast het bloedvat. De offset-gecorrigeerde τ_c waarden *in vivo* geven het verwachte omgekeerd evenredig verband met bloedstroomsnelheid V , terwijl de ongecorrigeerde waarden dit verband minder toonden. Dit hoofdstuk presenteert een eerste *in vivo* kwantificatie voor het meten van bloedstroom snelheden met de SDF-LSCI techniek.

A

De autocorrelatie functie is essentieel voor het nauwkeurig bepalen van τ_c (en V) uit de K -waarden en in **Hoofdstuk 4** gaan we dieper in op het modelleren van de ACF, en de relatie tussen τ_c en V . Theorieën op het gebied van dynamische lichtverstrooiingstechnieken voorspellen dat de ACF afhangt van de optische eigenschappen van de stromende verstrooiers: eigenschappen die we kunnen variëren door gebruik te maken van oplossingen van polystyreen bolletjes met verschillende groottes en volume-percentages, en de fantoom opstelling uit Hoofdstuk 3. In specifieke termen: de ACF hangt af van de verstrooiingsfasefunctie (grootte) en meervoudige verstrooiing (volume percentage) en beïnvloedt de relatie tussen $1/\tau_c$ en V , beschreven in de parameter α : $1/\tau_c = \alpha V$. De theoretische voorspelling en experimentele uitkomst voor α in het fantoomexperiment komen overeen binnen de randvoorwaarden die worden gehaald in de microcirculatie *in vivo*. Door middel van de theoretische verstrooiingsfasefunctie van rode bloedcellen en het inschatten van het aantal verstrooiingen met stromende rode bloedcellen binnen een bloedvat kan α *in vivo* worden voorspeld. De theoretische en experimentele α in de microcirculatie komen perfect overeen, waardoor V nu gekwantificeerd kan worden uit de gemeten τ_c . Samenvattend, de correctie voor offset-decorrelatie (Hoofdstuk 3) en het schalen voor meervoudige verstrooiing (Hoofdstuk 4) leiden tot de kwantitatieve afbeelding van bloedstroomsnelheid in de microcirculatie met de SDF-LSCI techniek. Omdat ook de vat morfologie uit de beelden gehaald kan worden, kunnen de klinisch relevante parameters debiet (volumestroom) en perfusie (volumestroom per weefselvolume) gekwantificeerd worden. De hoofdstukken 2 - 4 vertegenwoordigen theoretische en experimentele inzichten die de potentie voor laser speckle flowmetry technieken als kwantitatieve klinische microcirculatie monitor onderbouwen.

De microcirculatie levert ook voedingsstoffen en zuurstof aan ongewenste tumorweefsels, en tumoren kunnen via speciale signaalmoleculen de lokale microcirculatie stimuleren om

snelle tumorgroei te faciliteren. Het afbeelden van de toename van lokale microcirculatie is niet specifiek genoeg om (kleine) tumoren te detecteren, maar de tumormicrocirculatie kan wel worden gebruikt om medicijnen en andere stoffen aan de tumor te leveren. Daarom richt het tweede deel van dit proefschrift zich op de toepassing van speciale lichtgevende nanodeeltjes die het optische contrast tussen tumor en gezond weefsel kunnen verhogen, waardoor de detectie van (kleine) tumoren verbeterd kan worden. De lichtgevende eigenschappen zoals beschreven in **Hoofdstuk 5** zijn het resultaat van een *upconversion* proces, waarbij licht van lage energie (lange golflengte, excitatie licht) wordt geabsorbeerd en licht van hoge energie (korte golflengte, emissie licht) wordt uitgezonden via opeenvolgende energie-uitwisselingen tussen *rare earth ions* in een anorganisch nanokristal, de zogenoemde *upconversion nanoparticles* (UCNPs). Omdat geen enkel (bekend) biologisch molecuul in staat is tot *upconversion* kan het gewenste optische signaal volledig spectraal gescheiden worden van achtergrond-signaal (zoals autofluorescentie), en omdat *upconversion* een relatief langzaam proces is (sub-milliseconde) kan het excitatie licht volledig temporeel worden gescheiden van het gewenste *upconversion* signaal. Beide processen leiden tot de detectie van UCNPs in biologisch weefsel met hoge signaal-ruisverhouding en dus een hoog optisch contrast. Daarnaast valt de excitatie golflengte in het nabij-infrarood dat dieper in het weefsel reikt dan zichtbare golflengtes, en met minder verstrooiing. Deze unieke optische eigenschappen maken UCNPs uitermate geschikt voor biomedische afbeeldingstoepassingen.

Een belangrijke parameter die het contrast van UCNPs in weefsel bepaalt is het rendement van het *upconversion* proces, dat helaas typisch laag is voor UCNPs ($\sim 1\%$). Bovendien heeft het rendement een lineaire relatie met de intensiteit van het excitatie licht: minder excitatie licht levert minder rendement en daarmee veel minder emissie signaal op, vooral in diepe weefsellagen waar de lichtintensiteit afneemt. In **Hoofdstuk 6** evalueren we daarom de optische eigenschappen van UCNPs in de context van biologische weefsels om de optimale toepassingsgebieden voor UCNPs te identificeren. We meten het rendement en het emissie spectrum bij verschillende excitatie intensiteiten met een experimentele opstelling voor UCNP-poeder (*ensemble*) en met een gekwantificeerde optische microscoop voor enkele (*single*) UCNPs. De resultaten laten zien dat de optische eigenschappen van *single* en *ensemble* UCNPs gelijk zijn, geven feedback op de kwaliteit van de UCNP-synthese en zijn essentieel voor het modelleren van UCNP-detectie in biologische weefsels. De hoge signaal-ruisverhouding in combinatie met een sterk afnemend signaal bij toenemende diepte van weefsel impliceren dat UCNPs ideaal zijn voor toepassingsgebieden waar de detectie van lage concentraties essentieel is terwijl de diepte van minder belang is. We bevestigen dit experimenteel door één enkele UCNP te detecteren onder een dun laagje (250 micrometer) gehemolyseerd bloed. Met de optische eigenschappen van de huid, UCNPs en het detectiesysteem kunnen we het detecteren van één enkele UCNP in de huid theoretisch modelleren, waaruit blijkt dat het contrast van een enkele UCNP veel hoger is in vergelijking met een conventioneel fluorescerend molecuul. De maximale detectie diepte van één enkele UCNP in dit model is ongeveer 0.4 millimeter, wat een klinisch relevante detectie diepte is bijvoorbeeld voor het visualiseren van tumor marges tijdens operaties. Daarnaast kan het detecteren van zeer lage concentraties UCNPs van klinische waarde zijn voor toepassingen in biologische vloeistoffen (bloed, urine), weefsel coupes en weefsel oppervlakten.

De klinische toepassing van UCNP's voor het detecteren van beginnende tumormassa's of tumor marges gedurende operaties wordt verder onderzocht in **Hoofdstuk 7**. Na de synthese zijn UCNP's nog niet geschikt om *in vivo* gebruikt te worden, vanwege het hydrofobe oppervlak dat niet compatibel is met de hydrofiele biologische omgeving. De UCNP's worden daarom verder biochemisch geprepareerd met een mantel van amfilische polymeren waardoor het oppervlak hydrofiel wordt en moleculaire ankers beschikbaar zijn voor verdere functionalisatie. De eigenschappen van het UCNP-oppervlak spelen een belangrijke rol bij de interactie tussen de nanodeeltjes en cellen. Door speciale eiwitten aan het oppervlak van de UCNP's te bevestigen (functionalisatie) kan worden bereikt dat de concentratie van UCNP's hoger is bij de ongewenste tumorcellen dan bij gezond weefsel, zodat de tumor kan worden gevisualiseerd met een hoog optisch contrast. Deze eiwitten zijn vaak antilichamen - in Hoofdstuk 7 zijn dit mini-antilichamen die herkend worden door receptoren die overmatig geproduceerd worden door borstkankercellen (Her2/neu receptor, Sk-BR-3 cellen). Het toevoegen van deze gefunctionaliseerde UCNP's aan *in vitro* ('in glas/in het lab') gekweekte tumorcellen en controle cellen (die deze receptor niet overmatig produceren) resulteerde in 10 keer zoveel UCNP's bij de tumorcellen in vergelijking tot de controle cellen. Om de optische detectie van de doelgerichte specifieke levering van UCNP's aan tumorcellen *in vivo* te evalueren hebben we de UCNP-tumorcellen bedekt met dunne laagjes optisch borstweefselsimulerend fantoommateriaal en microscopisch afgebeeld. In dit experiment konden we de cellen tot 1.6 millimeters fantoomdikte nog detecteren. Een optisch model gebaseerd op deze resultaten voorspelt een theoretische detectie diepte in borstweefsel van 4 millimeter voor kleine tumoren ($\ll 1 \text{ mm}^3$). Gerichtte levering van UCNP's is dus veelbelovend voor het vroeg ontdekken van beginnende tumoren, waardoor eerder met behandeling kan worden begonnen.

Er is uiteraard nog veel onderzoek nodig voordat UCNP's simpelweg in de bloedbaan geïnjecteerd kunnen worden en met optische technieken de kleinste tumoren gedetecteerd kunnen worden. In **Hoofdstuk 8** zijn de eerste stappen gemaakt om *in vivo* levering van UCNP's te onderzoeken in een kippenembryo experiment. Ook studies naar de toxiciteit van de UCNP's op cellen staan beschreven in dit hoofdstuk. Voorsnog blijft kanker een complexe, vaak ongeneeslijke ziekte, onder andere vanwege de diversiteit aan verschillende types tumoren, maar ook variatie gedurende de groei van een tumor. Omdat de tumorgroei nauw verbonden is met de faciliterende microcirculatie kan het monitoren van de microcirculatie informatie opleveren over de tumorstructuur. De combinatie van optische technieken zodat zowel de bloedstroming als de levering van nanodeeltjes gedetecteerd kan worden in tumorweefsel (**Hoofdstuk 9**) kan constructief zijn bij onderzoek naar de interactie tussen tumorcellen, tumorgroei en -metastasen en eventuele veranderingen gedurende therapie.

A

THESIS SUMMARY

Optical techniques offer great potential for applications in healthcare: they can be non-invasive, light is non-ionising, the optical instruments are generally cheap and portable, and optical interactions provide both structural and physiological information on biological tissue. The disadvantages of optical techniques are the limited penetration depth in tissue and deterioration of image contrast by optical scattering. The part of the circulation where arteries and arterioles branch into capillaries (microcirculation) is partially located just below the tissue surface. Therefore, we can probe this part of the circulation, where the exchange of oxygen and nutrients with cells takes place, with optical techniques. A dysfunctional microcirculation can damage tissues and ultimately lead to death, for example in the case of septic shock. Many other diseases are the cause, mediator or result of a dysfunctional microcirculation. Thus, microcirculation monitoring can aid diagnostics, give feedback during therapy or provide information on physiological processes. An optical technique that reliably visualizes the functional status of microcirculation has extensive clinical relevance.

Sidestream dark field (SDF) microscopy is a hand-held video microscope technique that directly visualizes the sublingual microcirculation, using the principle that green light is more strongly absorbed by blood than the surrounding tissue. The images show red blood cells as dark globules flowing through light-grey tissue, from which the vessel density, vessel geometry and flow velocity (up to 2 mm/s) can be quantified. **Chapter 2** introduces a group of techniques that visualize blood flow based on another principle: dynamic light scattering. Coherent laser light (same wavelength and phase) back scattered by tissue has travelled a large number of different paths through tissue resulting in a large number of different phases when arriving at the detector, which causes a random interference pattern ('speckles'). When there is movement in the tissue (e.g. blood flow) the interference pattern will fluctuate in time. The temporal fluctuations can be described by the temporal autocorrelation function (ACF), which depends on the optical properties, the movement type (random, directional) and velocity. When the speckles are imaged by a camera, the fluctuations will be integrated over the finite exposure time. Fast fluctuations logically appear more 'blurred' than slow fluctuations, where the blurring is quantified by the speckle contrast K . The mathematical relationship between K and the ACF is described in Chapter 2, introducing the important parameter τ_c as the characteristic time constant of the fluctuations. Flow velocity V and τ_c are inversely related. Techniques that spatially image speckles to measure blood dynamics are known as laser speckle flowmetry techniques. The simplicity of the hardware and algorithm as well as the sensitivity to a wide flow velocity range represent advantages of these techniques as non-invasive clinical microcirculation monitors.

The disadvantage of laser speckle flowmetry techniques is the absence of a quantitative relationship between contrast K (or τ_c) and flow velocity *in vivo*. In **Chapter 3** we therefore combine SDF microscopy and laser speckle contrast imaging (LSCI) to derive both blood flow velocities (SDF) and decorrelation times (LSCI) of the same vessels. The aim of this chapter is the validation of the integrated SDF-LSCI technique. The results show that K can reliably be calculated from the speckle images and that τ_c can be accurately estimated by fitting a model to K -values obtained at a range of exposure times. We designed an optical

tissue-simulating phantom with flow channels to systematically assess τ_c as a function of V , which confirmed the linear relationship between $1/\tau_c$ and V . We subsequently investigated the relationship between $1/\tau_c$ and V for the sublingual microcirculation. The important conclusion drawn from this first *in vivo* experiment is that τ_c measured for a vessel in the focal plane depends on (unknown) additional dynamic scattering events that happen outside the vessel (e.g. muscle movements or out-of-focus vessels). This ‘offset’ decorrelation can be quantified using K -values measured for adjacent tissue regions. The offset-corrected *in vivo* τ_c values show an improved inverse relationship with V as compared to the uncorrected values. This chapter presents a first *in vivo* quantification for measuring blood flow velocities using SDF-LSCI.

A

The temporal autocorrelation function is crucial to accurately estimate τ_c (and V) from K -values. In **Chapter 4** we further investigate on modelling of the ACF and the relationship between τ_c and V . Dynamic light scattering theoretical frameworks predict that the ACF depends on the optical properties of the dynamic scatterers: properties that can be varied by changing the size and volume fraction of polystyrene sphere solutions flowing through the phantom channel. More specifically, the ACF depends on the scattering phase function (scatterer size) and multiple scattering (scatterer volume fraction) and influences the relationship between τ_c and V , described by the parameter α : $1/\tau_c = \alpha V$. The measurement of α in the phantom experiment resembles the theoretical prediction within certain conditions that are met in the microcirculation. Through modelling of the scattering phase function of red blood cells and estimation of the number of scattering events within a blood vessel α *in vivo* was predicted and matched perfectly with the experimental α found for microcirculatory vessels. This study provides the quantitative link between *in vivo* measured τ_c and V . In summary, correction for offset-decorrelation (Chapter 3) and rescaling for multiple scattering (Chapter 4) result in quantitative imaging of microcirculatory blood flow velocities using SDF-LSCI. Since vessel morphology can be derived from the images, the clinically relevant parameters blood flow and tissue perfusion can also be quantified. Chapters 2 through 4 represent the theoretical and experimental insights that demonstrate the potential for laser speckle flowmetry techniques to become quantitative clinical microcirculation imagers.

The microcirculation can also deliver nutrients and oxygen to unwanted tumour tissues, and tumours can trigger local growth of vessels to facilitate rapid tumour growth. Imaging the increase of local microcirculation lacks the specificity required to detect (small) tumours, however, the tumour microcirculation can be utilized to deliver drugs and other materials to the tumour. The second part of this thesis is therefore devoted to study luminescent nanoparticles that can enhance the optical contrast between tumour and normal tissue, which improves the detection ability of (small) tumour lesions. The luminescence as described in **Chapter 5** is the result of the upconversion process, where low energy light (long wavelength, excitation light) is absorbed and high energy light (short wavelength, emission light) is emitted after subsequent energy transfers between rare earth ions doped in an inorganic nanocrystal; upconversion nanoparticles (UCNPs). Since no known biological molecule is capable of upconversion, the upconversion signal can be spectrally separated from the background signal (e.g. autofluorescence) and the long lifetime of upconversion (\sim milliseconds) enables temporal separation of the excitation light from the emitted light. These properties enable background-free detection of UCNPs in biological tissue with a

high signal-to-noise ratio and excellent optical contrast. Additionally, the excitation wavelength in the near infrared can penetrate deeper into tissue compared with visible light, and with reduced scattering. These unique optical properties make UCNPs highly feasible for biomedical applications.

However, the optical contrast of UCNPs in tissue is primarily determined by the conversion efficiency of the upconversion process, which is typical only $\sim 1\%$ for UCNPs. In addition, the conversion efficiency linearly decreases with excitation intensity, resulting in a large reduction of emitted signal in deeper tissue layers where the excitation light is attenuated. In **Chapter 6** we critically evaluate the unique optical properties of UCNPs in the context of biological tissues to identify application niches for UCNPs. We obtain the conversion efficiency and spectral properties versus the excitation intensity with an experimental set-up for ensemble measurements, and a quantified optical microscope system for single particle measurements. The results show that the optical properties of single and ensemble UCNPs are similar, provide feedback on the synthesis quality, and are essential for modelling UCNP detection in biological tissue. In view of the high signal-to-noise ratio, but reduced signal with increasing imaging depth in tissue, potential applications include areas that require the detection of small amounts of particles in the (semi)ballistic regime. We experimentally confirm this by imaging a single UCNP through a 250-micrometer layer of haemolysed blood. We theoretically model the optical contrast of a single UCNP in skin using the optical properties of skin, UCNPs and the imaging system, which showed a superior UCNP-contrast as compared to a conventional fluorescent molecule. The maximal single-UCNP detection depth is estimated at 0.4 mm, which is clinically relevant for example to visualize tumour margins intra-operatively. Furthermore, the detection of small amounts of nanoparticles is clinically relevant for applications assessing biological liquids (blood, urine), thick tissue slices or subsurface tissues.

The clinical application of UCNPs to detect small tumour masses or tumour margins intra-operatively is further investigated in **Chapter 7**. As-synthesized UCNPs however, have hydrophobic surfaces that are not compatible with the hydrophilic *in vivo* environment. Therefore, the UCNPs are further prepared by coating them with amphiphilic polymers resulting in hydrophilic surfaces with functional groups. The UCNP surface properties are crucial for the interaction of the nanoparticles with cells. Functionalizing the UCNP surface with “tumour recognizing” proteins (antibodies) aims to induce a higher concentration of UCNPs in the tumour compared with normal tissue, resulting in a high tumour-to-normal tissue optical contrast. In Chapter 7 the UCNPs are functionalized with mini-antibodies that target a receptor that is over-expressed on breast cancer cells (Her2/neu receptor, SK-BR-3 cells). After *in vitro* incubation (and washing) of the functionalized UCNPs with tumour cells, the UCNP signal was 10 times higher compared to the control cells (that do not over-express the receptor) incubated with UCNPs. To evaluate the detection of UCNP-labelled breast cancer cells *in vivo*, we covered the cells with optical breast tissue simulating phantom layers. Microscopic imaging of the UCNP signal was feasible through up to 1.6 mm of phantom material. An optical model built on these results predicts a theoretical detection depth of up to 4 mm for a (small, $< 1\text{ mm}^3$) cancer lesion in breast tissue. Therefore, targeted delivery of UCNPs holds promise for the early detection of small tumours and an earlier onset of therapy.

Ample research is clearly still needed before UCNPs can simply be injected in the bloodstream and their distribution reveals the location of small tumours using optical techniques. In **Chapter 8** we continue towards *in vivo* scenarios by the delivery of UCNPs to small tumour lesions in chick embryos, in addition to the study on the toxicity of UCNPs to human cells. To date, cancer is often incurable and remains a complex disease, further complicated by the diversity between different tumour types but also between different tumour development stages. Since tumour development is highly associated with blood vessel growth, monitoring tumour microcirculation can provide insight into the tumour structure. Combining optical techniques that enable the detection of both blood flow and nanoparticle delivery in tumour tissues (**Chapter 9**) can be constructive for research into the interaction between tumour cells, tumour growth and metastasis, as well as the tumour response to therapy.

A

A

LIST OF PUBLICATIONS

Related to thesis

- **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,” *Biomedical optics express* **4**, 2347-2361 (2013).
- **A. Nadort**, V. K. Sreenivasan, Z. Song, E. A. Grebenik, A. V. Nechaev, V. A. Semchishen, V. Y. Panchenko, and A. V. Zvyagin, “Quantitative imaging of single upconversion nanoparticles in biological tissue,” *PLoS One* **8**, e63292 (2013).
- **A. Nadort**, K. Kalkman, T. G. van Leeuwen, and D. J. Faber, “Quantitative blood flow velocity imaging using laser speckle flowmetry” (in submission).
- E. A. Grebenik, **A. Nadort**, A. N. Generalova, A. V. Nechaev, V. K. Sreenivasan, E. V. Khaydukov, V. A. Semchishen, A. P. Popov, V. I. Sokolov, and A. S. Akhmanov, “Feasibility study of the optical imaging of a breast cancer lesion labeled with upconversion nanoparticle biocomplexes,” *J. Biomed. Opt.* **18**, 076004-076004 (2013).
- Z. Song, Y. G. Anissimov, J. Zhao, A. V. Nechaev, **A. Nadort**, D. Jin, T. W. Prow, M. S. Roberts, and A. V. Zvyagin, “Background free imaging of upconversion nanoparticle distribution in human skin,” *Journal of biomedical optics* **18**, 061215-061215 (2013).
- A. E. Guller, A. N. Generalova, E.V. Petersen, A.V. Nechaev, I.A. Trusova, N.N. Landyshev, **A. Nadort**, E.A. Grebenik, S.M. Deyev, A.B. Shekhter and A.V. Zvyagin, “Cytotoxicity and non-specific cellular uptake of bare and surface-modified upconversion nanoparticles in human skin cells,” *Nano Research* (2014).
- K. Liu, J. A. Holz, Y. Ding, X. Liu, Y. Zhang, T. Langping, X. Kong, B. Priem, **A. Nadort**, S. A. G. Lambrechts, M. C. G. Aalders, W. J. Buma, P. D. Y. Liu, and H. Zhang, “Targeted labeling of early-stage tumor spheroid in chorioallantoic membrane model with up-conversion nanoparticles,” *Nanoscale* (2015).

Book chapter

- A.V. Zvyagin, Z. Song, **A. Nadort**, V. K. A. Sreenivasan, and S. M. Deyev, “Luminescent Nanomaterials for Molecular-Specific Cellular Imaging,” in *Handbook of Nano-Optics and Nanophotonics* (Springer, 2013), pp. 563-596.

Not related to thesis

- A. van der Veen, J. van Dieen, **A. Nadort**, B. Stam, and T. Smit, “Intervertebral disc recovery after dynamic or static loading *in vitro*: is there a role for the endplate?,” *J. Biomech.* **40**, 2230-2235 (2007).
- R. H. Bremmer, **A. Nadort**, T. G. Van Leeuwen, M. J. Van Gemert, and M. C. Aalders, “Age estimation of blood stains by haemoglobin derivative determination using reflectance spectroscopy,” *Forensic Sci. Int.* **206**, 166-171 (2011).

A

Contribution to publications

- **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,” *Biomedical optics express* **4**, 2347-2361 (2013)
Design and realization of all experiments, performing the experiments, supervising R.G. Woolthuis, data analysis, paper writing
- **A. Nadort**, V. K. Sreenivasan, Z. Song, E. A. Grebenik, A. V. Nechaev, V. A. Semchishen, V. Y. Panchenko, and A. V. Zvyagin, “Quantitative imaging of single upconversion nanoparticles in biological tissue,” *PLoS One* **8**, e63292 (2013).
Design and realization of all experiments, performing the experiments, data analysis, paper writing
- **A. Nadort**, K. Kalkman, T. G. van Leeuwen, and D. J. Faber, “Quantitative blood flow velocity imaging using laser speckle flowmetry” (in submission).
Design and realization of all experiments, performing part of the experiments, supervising K. Kalkman, data analysis, paper writing
- E. A. Grebenik, **A. Nadort**, A. N. Generalova, A. V. Nechaev, V. K. Sreenivasan, E. V. Khaydukov, V. A. Semchishen, A. P. Popov, V. I. Sokolov, and A. S. Akhmanov, “Feasibility study of the optical imaging of a breast cancer lesion labeled with upconversion nanoparticle biocomplexes,” *J. Biomed. Opt.* **18**, 076004-076004 (2013).
Design and realization of optical imaging and UCNP characterization and optical phantom experiments, performing these experiments, data analysis, paper writing. A. Nadort has not been involved in UCNP biofunctionalization and cell labelling experiments.
- Z. Song, Y. G. Anissimov, J. Zhao, A. V. Nechaev, **A. Nadort**, D. Jin, T. W. Prow, M. S. Roberts, and A. V. Zvyagin, “Background free imaging of upconversion nanoparticle distribution in human skin,” *Journal of biomedical optics* **18**, 061215-061215 (2013)
Design of quantitative imaging experiment and experimental quantification of microscope parameters.
- A. E. Guller, A. N. Generalova, E.V. Petersen, A.V. Nechaev, I.A. Trusova, N.N. Landyshev, **A. Nadort**, E.A. Grebenik, S.M. Deyev, A.B. Shekhter and A.V. Zvyagin, “Cytotoxicity and non-specific cellular uptake of bare and surface-modified upconversion nanoparticles in human skin cells,” *Nano Research* (2014).
Design and realization of quantitative imaging experiment, performing UCNP optical characterization and cellular uptake imaging experiment and confocal imaging, including data analysis and paper writing (relevant parts)
- K. Liu, J. A. Holz, Y. Ding, X. Liu, Y. Zhang, T. Langping, X. Kong, B. Priem, **A. Nadort**, S. A. G. Lambrechts, M. C. G. Aalders, W. J. Buma, P. D. Y. Liu, and H. Zhang, “Targeted labeling of early-stage tumor spheroid in chorioallantoic membrane model with upconversion nanoparticles,” *Nanoscale* (2015).
Part of design, realization and performance of chick embryo CAM tumour model and intravital imaging system

PORTFOLIO

Name PhD student: Annemarie Nadort

PhD period: February 2011 - February 2015

Name PhD principal supervisors:

prof. dr. A.G.J.M. van Leeuwen (University of
Amsterdam, AMC)

prof. E. M. Goldys (Macquarie University, MQ)

1. PhD training**General courses**

» BROK ('Basiscursus Regelgeving Klinisch Onderzoek') and Good Clinical Practice certificate, AMC	2012	0.9 ECTS
» Research skills in physics, PHYS802, MQ	2012	4.0 ECTS
» Scientific writing retreat, MQ	2013	0.5 ECTS

Department seminars & colloquia	2011 - 2015	6.0 ECTS
--	-------------	----------

International conferences**Poster presentations**

» Gordon Research Conferences (GRC) Lasers in Medicine and Biology, Holderness, USA	2012	1.5 ECTS
--	------	----------

Oral presentations

» European Conferences on Biomedical Optics, ECBO, Munich, Germany	2011	1.5 ECTS
» SPIE Photonics West, San Francisco, USA	2011	1.5 ECTS
» Conference on Optics Atoms and Laser Applications KOALA, Melbourne, Australia	2011	1.5 ECTS
» MQ BioFocus Research Conference, Wisemans Ferry, Australia	2011	1.5 ECTS
» International Conference on Nanoscience and Nanotechnology, ICONN, Perth, Australia	2012	1.5 ECTS
» Australian and New Zealand Conference on Optics and Photonics, ANZCOP, 2013, Perth, Australia	2013	1.5 ECTS
» SPIE Photonics West, San Francisco, USA	2014	1.5 ECTS
» Australian Institute of Physics conference, AIP, Canberra, Australia	2014	1.5 ECTS

2. Teaching

Supervising

- | | | |
|---|------|----------|
| » Rutger Woolthuis (TU Delft, Master student)
Laser speckle flowmetry
Biomedical Engineering & Physics, AMC | 2011 | 1.0 ECTS |
| » Koen Kalkman (TU Delft, Master student)
Laser speckle flowmetry
Biomedical Engineering & Physics, AMC | 2013 | 1.0 ECTS |
| » Emma Baars (VU Amsterdam, Master student)
Quantitative spectroscopy
Biomedical Engineering & Physics, AMC | 2013 | 2.0 ECTS |

Lab demonstrations, Tutoring

- | | | |
|-----------------------------------|------|--|
| » First year physics students, MQ | 2014 | |
|-----------------------------------|------|--|

3. Parameters of esteem

Grants

- | | |
|---|---------------|
| » Gerbrand de Jong Fund
fund for PhD students in the field of medicine | 2011 and 2014 |
| » Prins Bernhard Culture fund
fund for high potential young academic researchers | 2011 |
| » Macquarie University Research Excellence Scholarship | 2011 |

Awards and Prizes

- | | |
|--|------|
| » Student Presentation Award, Biofocus Research Conference | 2011 |
| » Outstanding Poster Award, GRC Lasers in Medicine and Biology | 2012 |
| » Faculty of Science and Engineering Award for Excellence in Sessional Teaching (MQ) | 2014 |

A

CURRICULUM VITAE

Annemarie Nadort (1983) was born in Zaanstad and raised in Wormer in The Netherlands. In 2001 she graduated from the Sint Michaël College in Zaandam. In 2004 she completed a Bachelor of Science degree at the VU University in Amsterdam and in 2008 she completed a Master of Science degree in Medical Physics (VU University) and a Master of Science degree in Forensic Sciences (University of Amsterdam), both with distinction. Her undergraduate traineeship was completed in the area of biomechanics (VU University hospital) and her graduate traineeships in the areas of experimental audiology (VU University hospital), biophotonics (Academic Medical Centre, Amsterdam), biometrics (Netherlands Forensics Institute) and forensic sciences (NSW Police Force, Australia). In 2009 she started a job in research and development at Microvision Medical Inc., in collaboration with the department of Biomedical Engineering and Physics of the Academic Medical Center, both in Amsterdam. In 2011 she initiated a joint PhD project at the University of Amsterdam, the Netherlands, and Macquarie University in Sydney, Australia, of which this thesis is the result.

A

A

ACKNOWLEDGMENTS

At this stage of thesis writing, everything is hard. My fingers are sticky from the never-cleaned keyboard, my eyes are wondering if they'll ever see the sky again, and my bum and chair have become fused together like integrated SDF-LSCI (Chapter 3). Therefore, it's time to thank you all.

First of all, congratulations for arriving here, although research has shown that the majority of readers actually start here. Good on ya[§]. Although I feel this is going to be a relatively long acknowledgement compared to thesis standards, if you are not in here, or not enough to your liking, please don't take it personal. It might be that I really love you in real life, but that you haven't contributed much to the actual contents of this thesis or my 'professional' life. Still friends?

As a Joint-PhD candidate, I have many supervisors. The very first one that was added to the team was Dirk, back in the day when we were in a swept-source project. Though we haven't done much sweeping, it has been the source of some interesting science. Dirk, you must have been fed up with me (let's not pretend we were not fed up with each other at times). Mistakes (whatevs[§] 200 or 300 micrometer diameter, same difference) that ruin data analysis (but give rise to better ones), my impatience that maybe sometimes shined through in between the lines, chaotic, tangled VI's, and all of this on the background of a long distance relationship (professional of course) and a Skype icon. Thank *someone* we are rational physicists, even though I'm a woman. We never cried. I really, really appreciate your supervision. *Genau*.

Andrei, having you as a supervisor has been interesting and fruitful in many ways. My thesis experience has turned multicultural due to Dutch, Russian and Australian influences, all of which I'm very grateful for. I feel we have built a strong relationship over the years. I highly appreciate your support, valuable scientific feedback, helpful supervision though always letting me do my own thing, and continuous stream of research ideas. I'm grateful for working together a little while longer so that we can get some useful data out of these chick embryos...

Ewa, as director of the BioFocus group at the MQ Photonics Research Centre you have been the facilitator of my biophotonics project in Australia. I want to thank you for your constructive feedback during meetings and your inspiring ideas for new research projects, in addition to your success in keeping our research lines noticed in Australia and beyond.

Ton, you have been a stable factor as department head and later supervisor since I arrived as a Master student (see next paragraph) at the AMC. You can combine excellent scientific thinking with pragmatic managing skills and turn dramas into no dramas[§]. You and Dirk have given this thesis a thorough theoretical basis that wouldn't have been possible without you and the time you dedicated to our meetings.

§ Australian slang: Good on ya : goed gedaan!
 Whatevs : whatever : wat maakt 't uit
 No dramas, no worries, too easy: kun je áltijd zeggen

Maurice, you had me at 'hello' at our first encounter in the AMC basement when we discussed my Master research project on blood stain age back in 2007. I have great memories of those days and the fact that I discovered that scattering (no... really?) needed to be included in the analysis has given me insights for life. It was the start of an endless relationship with the department. Thank you for being part of my PhD degree as well, welcoming me into the CAM project and giving me the necessary critique at times, although our scientific collaborations have been surpassed by our musical collaborations. On that note, Martin van Gemert, also from you I have fond memories of the duality of our light scattering theories and guitar-saxophone duets.

A Keshen & Jean-Marc, thank you for inviting me into the Microvision Medical team. To be able to work on scientific research that is so close to clinical applications has inspired me throughout my PhD project. It also amazes me how much research is actually needed before there is a working clinical device, so thumbs up for your achievements. Thank you for giving me the time and freedom to do this research and ongoing support till the end. Hopefully there are future collaborations waiting for us. Eva and Zahid, it's great to have met you and I have always enjoyed working with you. When can I come for lunch again?

Rutger & Koen & Emma, speckle and spectroscopy students, thank you heaps[§] for opting for a research project in microcirculation imaging. I have enjoyed working with you, to see your devotion to your research projects and want to thank you once again for contributing to this thesis. I wish you all a great career!

To the committees for the Dutch PhD defence and the Australian thesis examination: thank you so much for your time and effort to read these ~70.000 words. I feel honoured to receive feedback from true experts in the various fields of this thesis.

Kim & Mitra, my paranimphjes, I am so lucky to have you by my side. We are all generally the same height and will make a perfect picture. We will get through this together, Mitra will tackle the bolletjes questions and Kim will give legal advice throughout. She'll be right[§]. Thank you for superb organizing skills and for the inspiration for the stellingen that just didn't make it:

Carien, thanks for taking the pictures!

I have had so many great colleagues throughout the years and throughout the world, it makes me a lucky person. The order here makes no sense, I'm just typing whatever comes up in my head. Katya darling, you have been the person I have most intensely collaborated with in the research sense, and I mean *intense*. For people who have not noticed the logarithmic

- * Deze thesis is gemaakt op broodjes hagelslag
- * Great communication is what keeps us together
- * A brownie in motion is ook in Brownian motion
- * Ik heb het idee dat ik vooruit ga en jij alleen maar stil staat.
- * "We are not here to judge each other, we are here to enjoy each other"
Brendan, Beverly Hills 90210
- * "Even slikken en weer doorgaan" M. Borsato

§ Australian slang: Heaps : Emma's favo ozzy woord: veel
She'll be right: het komt wel goed

and densely spaced time points in figure 8.2: this doesn't happen between 9 and 5. Thank you for being a friend and knowledgeable biochemist. Let's meet in Moscow soon! Olivia, it's great to know you're keeping the fire burning in the chick incubator. Good luck with your PhD project, I'm happy you joined the team and looking forward to work with you the next months. Barb, the way you have multiple babies and do your PhD project is amazing. It is always a pleasure hanging out with the Wellmanns, from WA via Canberra to the eventful Macquarie Park: let's stay in contact and hang out in Berlin in the future. Varun, Vazzoos, Vazza you have been a long-lasting colleague slash friend at MQ and turning more and more into a surf dude. I highly appreciate working with you both in the lab and outside. Tristan, I can rely on you for many things, both professionally and inappropriately. Besides horse riding, you can English very good. Thank you so much for feedback on many parts of this thesis (but not all, if there are mistakes do not blame Tristan). Claire, Jana and Graham, as native Australian, Canadian and British proofreaders I have all my accents covered. Thanks! Ondra, walking past your desk many times a day has always been a pleasure. Thanks for being there.

Anna, you are the newest addition to our little OBIS group but we already had many interesting discussions and even a published paper. I feel there is more to come! Good luck during your project. Zhen, as a previous OBIS member thanks for showing me around at MQ and in the lab, and doing research together. Nice to have you back in Sydney! Krystyna (you have a great 50x objective), Ayad, Martin, Wei, Sandhya, David, Michael and the whole Biofocus crew: thank you for your feedback over the years on Friday afternoons. Jin's team, Lu, Tim, Lixhin, Jay and of course Jin, thanks for your collaboration in the past, current and future. Michael thank you for bringing the party to my 30th birthday party. Wan, you're the best nanoruby ball miller I know. Chris, congrats to us both for submitting our thesis. Maria, your spider's silk must have great optical properties, keep feeding them the good stuff. To all students in E7B-148/165: cheers!!

Rob, Aaron, Jipeng, Peter, Thanh-Phong, Andy, Andrew, Carlo: thanks for your collegiality, the smiles, the stories, the lunches. Douglas, BJ, Josh: us coasties know what living is. Peeps over in the HearingHub: it's not the same after the separation. Miss you Simon, Alex, Marty, Graham, Ali, Nick, Iza...

Ludmila, Maider, Iza, Nora, Bar, Katya, Stacey a.k.a. the great OSA OptChicas soccer team, I enjoyed our hot training sessions, and excellent tournament appearance. Dennis & Paul, thanks for teaching us schwalben up to perfection.

David Coutts and Judith Dawes, thank you for being approachable and supportive department heads, Rich Mildren, Dave Spence for your excellent HDR management, Gabriel for the chats and (not) finding DAQ cards, James Downes for letting me teach. Carol, Lisa, Laura, Liz: cheers to the admin group, as well as Gina and Sue for looking after the labs. I will get a bit more general: thank you great people at Physics & Astronomy!

Let's not forget Joe the hatchery manager for unlimited supply of fertile eggs. And to keep in the Joe section: Joe from the Faculty store for never-failing service. Thanks to the MQ METS workshop for indispensable hardware support.

Ik swop voor de gelegenheid even naar het Nederlands, want we zijn aangekomen bij de BEPH afdeling!! Waar zal ik beginnen... Mn meest trouwe kamergenoot: Marcel van Herk, wij waren toch de (in)stabile factors van L0-159, het lijkt me terecht dat we nu allebei deze kamer verlaten. Succes met je nieuwe baan aan de University of Manchester. Mn trouwste BEPH buddy Nienke, volgens mij begon ik als master student, nam jij het over als promovendus, kwam ik weer terug als IOP-partner en vervolgens ook promovendus terwijl jij intussen het postdocstokje in handen hebt. Het was fantastisch. Dank je voor vriendschap in de wetenschap, het verheffen van conferenties tot ware werkgerelateerde ecstasies, maar ook de mooie parawetenschappelijke momenten. Wij weten wat het is om in het Oosten te wonen, waar de no worries[§] nog overheersen. Van Nienke naar de overige laserbabes: Bar (van VU partners naar AMC partners, leuk dat je langskwam down under!), Lida (altijd heerlijk positief en relaxed, dank voor de leuke post naar Daley Avenue), Merel (wij waren samen master student en nu beide dok(c)to(e)r! Vanaf het moment dat we op zoek waren naar cyanide wist ik dat er een ware anesthesist in je schulde): zonder jullie zou ik er zelf, maar ook mijn beph-herinneringen, een stuk minder leuk uit zien! Allemaal succes in onze carrières, let's stay in touch!

Martijn, Rolf & Roy: ik heb jullie bro-code nooit begrepen... maar ik denk vaak aan jullie. Hoop dat we kunnen proosten op 1 april. Alle Jeroenen, jullie zijn toppers, jij ook Jeroen. Corianne, het is alweer lang geleden maar we waren productieve kamergenoten! Judith, het was altijd leuk om tussen de experimenten door even over muziek te praten, succes met BUN! Angela, dank voor je vele in-1-keer-raak bloedprik momenten, maar ook het organiseren van het labuitje met jou en Nienke was too easy[§].

De mensen van de overkant: Nicolas, volgens mij zijn we ongeveer gelijk klaar? Veel succes met de volgende stappen! Ronni, waar jij komt schijnt de zon en passen er meer woorden in de lucht. Succes met je opleiding! Frank, op de een of andere manier herinner ik me vooral de opening van het Amsterdam LaserLab met jou?? Vitali, in principle you are a funny man. Maybe see you April 1st? Duc, thanks for teaching me Vietnamese, 1 April *tram phan tram*? Naza, Froukje, Cristina, Monique, Janina, Nadia, Lorena, Ingar: The other side of the hall way is a happy place thanks to you. Jetty, dank voor je steun tijdens allerlei fondsaanvragen en dingen die via formulieren gaan. Martin, dank voor je verkoeling bij oververhitte laptops. Jos & Maria, jullie zijn een leuk stel. Iwan, zonder jou was AVA er niet. Erik, het was leuk om over bloed & nanodeeltjes in de hersenen te praten. Ed, dank voor de bruggen tussen vasculair en photonics, en ook de leuke gesprekken tijdens uitjes en lunches.

Dan even naar de kelder, het was altijd spannend (maar toch ook fijn) om daar te komen: Edwin, gaan we nog even schaatsen zo? Kai, thanks for our short but great collaboration (and Bram!). Jasmin, the chicks have brought us close together, I hope you will finish soon too and good luck in Boston. Annemieke, hoe gaat het met de biggetjes? Saskia, dank voor je bruikbare feedback tijdens meetings en leuke gesprekken daarbuiten. Richelle, met jou lunchen of autorijden is echt gezellig, wie weet lukt het paardrijden ook nog eens! Gerda, van de Ponteneur naar het NFI en AMC: gek dat we elkaar dan in Australië net hebben gemist :(Alan, thanks for getting the scientists in the row boats!

§ Australian slang: No dramas, no worries, too easy: kun je áltijd zeggen

Jelmer, het was leuk om samen van student naar loonlijst te gaan, doe de groeten aan de VU! Paul, dank voor je hulp bij de speckle opstelling, maar ook als koffie-baken in de gang. Abel en de 'nieuwe' generatie promovendi, als ik niet zo blij zou zijn dat ik dit nu kan typen zou ik jaloers zijn! Enjoy :) Alle andere lieve Biomedical Engineering & Physics-ers: het was leuk met jullie!

Noortje, het was fijn om af en toe op het Voetenplein relativerende koffie te drinken met je! Veel succes met de zware laatste loodjes.

Tim Casey, you really know how to make red blood cells glow. Thanks for your excellent work in Paint 1.0. I owe you a coldie.

The Shakin' Babies: wat kan ik zeggen, na al die jaren nog net zo strak. Eeuwige dank!

Zusjes Els & Marlies, jullie omringen mij in leeftijd en in expertise: het is zo lekker om tussen een wiskundige en een dokter-to-be in een proefschrift in biomedical optics te schrijven. Leuk dat je ook een halve BEPHer bent Els :) En Marlies, dank voor de reflectie en afleiding buiten werktijd. Pete, Ross & Jim: thanks for being supportive in-laws, I promise I will stop studying now...

Alle andere vrienden en familie: dank voor jullie interesse (en medelijden...!)
All other friends and family: thank you for your interest (and support to Ben...!)

Pap & mam, vanaf het plaatjes uitknippen voor werkstukken op de basisschool tot het solderen van LEDjes voor de opstelling op pagina 77, jullie hebben altijd voor me klaar gestaan tijdens mijn vele studies. Dank voor jullie onvoorwaardelijke steun en betrokkenheid, en het vertrouwen dat het wel goed komt met me aan die andere kant van de wereld. Kom nog maar vaak langs!

Ben, thanks for building our house while I was busy doing science. You're a keeper.

Lastly and the most important: I would like to thank my red blood cells. The majority of this thesis would not have been written without them, I dare to say I wouldn't even be here without them. They have always assisted in the validation of laser speckle contrast ideas and they were there to cover up upconversion nanoparticles to show their detectability through blood. Always flawless, looking like perfect pancake-donuts, rolling and gliding, flowing and slipping through my vessels, coming out when I gently asked them and punctured my finger. Red blood cells I love you. And, for the record, you should love yours too. We all should acknowledge our red blood cells right now. Here's to everybody's red blood cells!

Get a dog up ya[§].

Annie.

§ Australian slang: Get a dog up ya: an instruction to take your alcoholic beverage and drink it