

Optical biopsy in the anterior segment of the eye

Citation for published version (APA):

Hosseini, K. (2008). *Optical biopsy in the anterior segment of the eye*. Maastricht University.

Document status and date:

Published: 01/01/2008

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary and conclusions

In the quest to prevent visual impairment or blindness, noninvasive and real-time monitoring of the available drugs in the ocular tissue plays a key role. Furthermore, the exact mode of transport for many ocular drugs and chemical compounds in the ocular tissues is still far from understood. In this thesis, two applicable noninvasive and optical-based diagnostic techniques in ophthalmology are studied. The first technique is Raman spectroscopy. Raman spectroscopy is the measurement of the wavelength and intensity of inelastically scattered light from molecules. The Raman scattered light occurs at wavelengths that are shifted from the incident light by the energies of molecular vibrations. Raman spectroscopy provides quantitative and qualitative information of molecules such as the drugs used for the treatment of intraocular inflammations. The second technique is Optical Coherence Tomography (OCT), also a laser-based noncontact and noninvasive imaging technique that is capable of obtaining high-resolution images of the tissues. Both Raman spectroscopy and OCT add specific quantitative and qualitative information that cannot be obtained from the variety of already used optical examination modalities. In contrast to the commonly applied techniques, these new applications (can) work in a non-imaging mode. Although OCT was designed originally as an imaging device, it can deliver quantitative information such as degree of hydration in corneal tissue in a non-imaging mode in a so-called ‘A-scan’, as shown in this thesis. The same can be performed with Raman spectroscopy, however, it takes more time and provides a smaller spatial coverage at a time in a given sample.

The optical-based systems offer non-contact and accurate means of information collection and hence they essentially do not disrupt the physiology and morphology of the cells and tissues. These properties allow them to be used in a sensitive organ such as the eye, where the total tissue accessible for any type of probing is typically restricted.

Another property of the optical-based devices in data acquisition is related to their real-time capability. A fast and reliable optical data collection technique eliminates the time consuming steps that are involved with the more conventional biopsy and analytical methods, which are applied to gauge possible pathology and morphological or biochemical changes. This facet not only speeds up the availability of care in case of handling the pathology, but also provides the opportunity to study the biological processes as they occur without interference or under the influence of external interventions by either surgical procedures or drugs.

As mentioned in this thesis, data regarding intraocular drug concentration after injection and/or release from intravitreal implants are not assessable non-invasively. High concentrations of many intravitreal drugs are toxic and low concentrations miss the therapeutic threshold. Some of these drugs do ‘leak’ into the anterior segment of the eye and become detectable in the anterior chamber. However, currently there is limited understanding about these intraocular transport dynamics. The need for the above mentioned data becomes more

prominent in the cases where re-administration of a drug is considered. In other words, the decision to administer a new dose of a drug can safely be made once the physician is confident that there is not much drug left in the ocular tissue from a previous administration that could potentially become toxic as the result of too much drug in proximity of sensitive ocular tissues. The current practical way of measuring the amount of the drug left in the eye is by paracentesis (conventional biopsy with a needle). This thesis proposes Raman spectroscopy as a powerful tool for a non-contact and noninvasive method of drug concentration analysis in the eye. Using Raman spectroscopy, drugs in the anterior chamber of the eye were successfully measured. In one experiment, the presence of a drug was adequately detected in the vitreous body of the eye.

Also in this thesis, the hydration of the cornea has been probed as a target for optical biopsy. Hydration of the cornea and its spatial distribution harbors an important place within various fields of physiology and pathology of the human eye and its surgery, such as cornea transplantation, precision of “cut” in refractive surgery, exploring pathology of corneal dystrophy, effects of topical drugs on corneal endothelial pump function and dynamics of the penetration of topical drugs through the corneal layers. Using OCT, efforts have been set to develop a system capable of monitoring and measuring the hydration distribution across the corneal layers both in time and in space on a noninvasive and eye-safe basis. Emphasis has been put on practical aspects such as the much needed understanding of and addressing the potential sources of distortions of the light backscattering as a crucial step to acquire comparable data and to produce reliable images. Furthermore, it was demonstrated that *in vivo* corneal light backscatter monitoring by OCT could be used to visualize the movement of water or potentially topical drugs across the cornea in real-time¹.

The modifications necessary to use these techniques successfully in ophthalmology and the forthcoming findings are discussed in this thesis. Chapters 2, 3 and 4 discuss the application of Raman spectroscopy in analyzing therapeutic compounds injected into the eye. Chapters 5, 6, 7 and 8 discuss OCT and its applicability to investigate the morphological changes caused by administered compounds to the eye. In the following text, the material discussed in each chapter is briefly explained.

Chapter 2 exhibits material in relation with the possibilities of Raman spectroscopy in monitoring of the antiviral drug Ganciclovir *in vivo*. Various known concentrations of Ganciclovir were successfully detected in the anterior chamber of rabbit eyes in a pilot study. The specific Raman signature of Ganciclovir was assessed at several concentrations close to therapeutic values. Spectral features sole to Ganciclovir were identified and distinguished from the background.

Chapter 3 extends the possibilities of Raman spectroscopy in the detection of the more common intravitreal drugs used for the treatment of intraocular inflammation. This chapter describes the noninvasive monitoring of the antifungal drug Amphotericin B and antibiotic drug Ceftazidime within the anterior chamber of the eye and *in vivo* condition. Compared to ocular tissue, unique spectral features of Ceftazidime were observed near 1028, 1506, 1586 and

1641 cm^{-1} . Amphotericin B exhibited its characteristic peaks at 1156.5 and 1556 cm^{-1} . The feasibility of Raman spectroscopy for the detection of Ceftazidime, at even a lower concentration than the therapeutic dose is demonstrated. Furthermore, Amphotericin B was successfully detected in another eye compartment, namely, in the vitreous space of the eye.

Chapter 4 explains how Raman spectroscopy was employed in detecting a clinically used biomaterial in the human eye. The amount of laser power to obtain a Raman spectrum was low enough such that a complete eye-safe detection of biomaterial was demonstrated. Silicon oil, which is commonly used in vitrectomy procedures, was successfully monitored at 2906 cm^{-1} and 2965 cm^{-1} in a human eye *in vivo*. This chapter confirms the practicality of Raman spectroscopy for use in humans.

Chapter 5 shifts the scope of this thesis toward the applications of OCT in the cornea. While other OCT studies lay the accent in visualization of the cornea and its anatomical structure, this work demonstrates how OCT signals from the cornea can be interpreted in a different manner so that a change in physiology can also be studied with this technique. The following chapters explore ways to investigate and quantify the backscattering signal in relation with the change in hydration state of the cornea resulted from the impact of a topical drug on the cornea. The study in chapter 5 was based on monitoring the effects of the hypertonic agent Ophthalgan and the subsequent changes introduced in the cornea on a qualitative basis. The same chapter also discusses the importance of some of the modification factors for the optical biopsy by OCT, such as the correction for the 'confocal function' and 'speckle noise' reduction.

Chapter 6 presents some new improved data about the correlation of corneal light backscattering in-depth distribution with the magnitude and direction of water gradient within the rabbit cornea *in vivo*. This is achieved during the de- and rehydration processes of the rabbit cornea *in vivo*. Also the relation of the amplitude of light backscattering and the corneal thickness is discussed. Unlike the well-known effect of the immediate increase of the corneal opacity with corneal swelling, a new effect, which is a primary decline of the amplitude of light backscattering in the anterior part of the stroma during the swelling process, is reported. This was achieved by spatial backscattering measurement across the entire corneal thickness and thus a backscattering gradient could be observed for different layers of the cornea in real-time. In addition to the modification factors named in the previous chapter, corrections for the corneal curvature that also affect OCT measurements are discussed.

Chapter 7 discusses the de- and rehydration of the rabbit corneas *in vivo* at a greater depth. The direct relation of the corneal thickness and hydration is further explored. The study findings indicated an inverse relation between the logarithm of the intensity of the backscatter within the cornea and the degree of corneal hydration at which the intensity of backscatter changed up to 20 times between the peak of de- and rehydration phases. This work also demonstrates how OCT can play an important role in real-time monitoring of physiological events in the cornea. After a severe dehydrating effect in the cornea caused by a strong dehydrating agent, an overshoot in the corneal rehydration and thickness is

successfully monitored and quantified during the recovery of the cornea. Adjunctive formulas are offered to investigate the relationship between the corneal backscattering and its thickness.

In chapter 8, the information presented in the previous chapter for the relation between the light backscattering in different corneal regions and the corneal hydration is further explored. The feasibility of OCT in assessing the dynamics of corneal hydration changes in real time, after topical application of either hypertonic or hypotonic agents by accurate measurements of corneal in-depth light backscatter distribution (CDLBD) was investigated. Optical perturbation in CDLBD, induced by water movement in rabbit cornea due to corneal hydration or dehydration propagated through the cornea at an approximate rate of 1 μm per second. This led to use the backscatter distribution within the cornea to detect the actual water movement within this ocular medium both in real-time and *in vivo*. Quantification means are also suggested to measure the exact amount of water displacement in time and space.

As partly shown in this thesis, one *modus operandi* is not sufficient to address all the lingering questions such as drug transport within ocular tissue and its effect on the morphology. Therefore, a combination of techniques seems to make a convincing case for the next generation of diagnostic devices. One could suggest a combination of the two techniques used in this thesis, namely, OCT and Raman spectroscopy to address the challenges mentioned above. Such a combination will need to address the inherent sensitivity that is further complicated by the various functions and limitations of the eye itself. Examples that need to be addressed are: the sensitivity of the retina to radiation damage, the rapid dehydration of the cornea while exposed to the air, the focusing and refractive properties of the anterior segment optics and the eye movements.

Future

The noninvasive, non-contact and real-time property of Raman spectroscopy along with its high molecule (in this thesis: drug) sensitivity and specificity, advocates its further application as a strong optical biopsy tool. Traditionally, limitations of Raman spectroscopy such as the relative high laser power needed for a detectable Raman signal for some molecules (e.g. glucose concentration within physiological ranges) and a relative poor signal to noise ratio were cited as challenges for an immediate use of this system using the conventional and off-the-shelf devices. Fortunately, steps have been taken to improve these issues in recent years. Better optical setups are being developed and near infrared (NIR) light sources are more progressively used to address the eye safety issues associated with shorter wavelengths. Also, better multivariate analysis along with more sophisticated software for a better signal-to-noise processing are being developed and utilized. In addition, new optical probes are being constructed to divert the probing light ray such that it would not directly irradiate the retina and would pass through the anterior chamber of the eye at different incoming and outgoing angles. The development around Raman

technology does not stop there. Other exciting Raman related techniques such as Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy (CARS), Raman Induced Kerr Effect Spectroscopy (RIKES), Inverse Raman Spectroscopy (IRS), Stimulated Raman Gain Spectroscopy, Photoacoustic Raman Spectroscopy (PARS) are being developed at a much higher rate than where the technology was a decade ago.

On the OCT front, many exciting and recent developments are also visible. New light sources such as Ti:Sapphire- and Nd:Glass femtosecond lasers are enhancing the axial resolution to the level of single digit micrometers (Nd:Glass 5 μ m and Ti:Sapphire 1 μ m). Another interesting field involves the refinement of Spectroscopic Optical Coherence Tomography, which is still in its early years². Using this technique, imaging of functional properties of tissues on a micron scale can be achieved. It utilizes the broad spectral bandwidth of the optical source to obtain information from the spectral content of the backscattered light. Doppler OCT catheters are being developed as an integrated functional and structural imaging modality. Also, novel imaging software is continuously being developed where three-dimensional imaging capabilities are advancing the state of the art.

As of now, OCT or Raman spectroscopy can only be applied to the eye diagnostic separately. The reason for this is the inherent difference of optics and principals used within these two operational systems but perhaps even more, because the capabilities of these two systems have been traditionally considered individually with either imaging purposes (OCT) or analytical intentions (Raman spectroscopy). One could argue the usefulness of combining these two techniques into one device, such that it could enable the probing of a certain region of the eye tissue. In that case, different types of imaging can be acquired from the probed region in the eye tissue, providing analytical and morphological information at the same time. As an example, one could envision an end-probe unit with adaptive optics (the housing and the focusing lens that focuses the light on the sample) mounted on a slit-lamp with a (dual) fiber optic connection to a Raman and an OCT system.

Combination of OCT with another imaging modality has already been achieved in recent years. The OCT/SLO is a combination system, which is unique in its ability to simultaneously produce a confocal Scanning Laser Ophthalmoscope (SLO) image and an Optical Coherence Tomography (OCT) image using a single source. Another commercially available system is a Spectral OCT/SLO combination that has scanning laser ophthalmoscope microperimetry; another system has built-in color fundus photography capability; and a fourth system provides color fundus photography, angiography, and fundus autofluorescence. All of these systems provide a rendered fundus image from the 3-D data set and eventually will allow importation of color photographs as overlays to the OCT image.

Given the emerging opportunities and enhancements of the optical based technologies, it is expected that optical biopsy in the eye will form a compelling and adjunct alternative for the diagnostic arsenal of the ophthalmologists and vision scientists, bringing personalized medicine one step closer to reality.

References

1. Ghosn MG, Tuchin VV, Larin KV. Nondestructive Quantification of Analyte Diffusion in Cornea and Sclera Using Optical Coherence Tomography. *IOVS*. 2007;48:2726-2733.
2. Kaluzy BJ, Kaluzny JJ, Szkulmowska A et. al. Spectral optical coherence tomography: A novel technique for cornea imaging. *Cornea*. 2006;25(8):960-5.

Samenvatting en conclusies

In de zoektocht naar de mogelijkheid om slechtziendheid of blindheid te voorkomen speelt niet invasieve diagnostiek en de mogelijkheid tot het vervolgen in real-time van stoffen en geneesmiddelen in het oog, een cruciale rol. Daarnaast is de exacte wijze van het transport in de oculaire weefsels van veel chemische verbindingen en geneesmiddelen nog onbekend. In dit proefschrift worden twee niet invasieve en optisch gebaseerde diagnostische technieken in de oogheelkunde bestudeerd. De eerste techniek is Raman spectroscopie. Raman spectroscopie is de meting van de golflengte en intensiteit van het inelastisch verstrooid licht dat door bepaalde moleculen worden uitgezonden nadat ze belicht zijn door monochromatisch licht. Het Raman effect treedt op door verschuiving van de golflengten van het invallend licht door de energieën van de moleculaire trillingen. Raman spectroscopie geeft kwantitatieve en kwalitatieve informatie van moleculen, zoals van geneesmiddelen die gebruikt worden voor de behandeling van ontstekingen in het oog. De tweede techniek is Optical Coherence Tomography (OCT), een laser gebaseerde non-contact en niet invasieve beeldvormende techniek die in staat is om hoge resolutie afbeeldingen van de weefsels te verkrijgen. Zowel Raman spectroscopie als de OCT geven specifieke kwantitatieve en kwalitatieve informatie die niet kan worden verkregen door andere gebruikte optische onderzoeksmethoden. Hoewel de OCT oorspronkelijk was ontworpen als een beeldvormende techniek, kan het ook kwantitatieve informatie verkrijgen zoals de mate van hydratatie van het hoornvlies weefsel in een niet-beeldvormende-modus in een zogenaamd 'A-scan', hetgeen werd aangetoond in dit proefschrift. Hetzelfde kan worden uitgevoerd met Raman spectroscopie, maar het verschil is dat het meer tijd in beslag neemt en dat de informatie uit een kleinere ruimtelijke dimensie komt per bemonsteringstijdstip.

De optisch gebaseerde systemen bieden een non-contact en accuraat middel voor het verzamelen van informatie en verstoren de fysiologie en morfologie van de te onderzoeken cellen en weefsels niet. Deze eigenschappen zijn vooral van belang in een delicaat orgaan, zoals het oog, waarbij de weefseltoegankelijkheid beperkt is voor menige bemonsteringstechniek.

Een andere eigenschap van de optisch gebaseerde technieken in dataacquisitie betreft hun real-time mogelijkheden. Een snelle en betrouwbare optische techniek elimineert de tijdrovende stappen die betrokken zijn bij de meer conventionele biopsie en de analytische methoden die worden toegepast om pathologie en morfologie of biochemische veranderingen te meten. Deze eigenschap versnelt niet alleen de toegespitste behandeling van de ziekte, maar biedt ook de gelegenheid voor het bestuderen van de biologische processen zoals ze zich in vivo voordoen, zonder externe interventies zoals chirurgische ingrepen.

Zoals besproken in dit proefschrift zijn data betreffende de intraoculaire concentraties van een geïnjecteerd geneesmiddel en/of de vrijzetting van een geneesmiddel uit een intravitreaal geplaatst implantaat meestal niet meetbaar zonder het gebruik van invasieve methoden. Te hoge concentraties van intraoculaire geneesmiddelen kunnen schadelijk zijn terwijl te lage concentraties de therapeutische drempel missen. Sommige van deze

geneesmiddelen 'lekkende' vanuit het glasvocht naar de voorste oogkamer. Echter, momenteel is er weinig kennis over deze intraoculaire vloeistof dynamiek. De noodzaak om gegevens te hebben over intraoculaire concentraties van stoffen wordt dwingend in die gevallen waarbij overwogen moet worden een geneesmiddel opnieuw toe te dienen. Met andere woorden, de beslissing om het veilig kunnen toedienen van een nieuwe dosis van hetzelfde geneesmiddel kan worden verricht zodra de arts ervan overtuigd is dat de overgebleven spiegel in het oogweefsel uit een vorige dosering, laag genoeg is om toxiciteit te verhinderen. De huidige manier van meten van intraoculaire stoffen of geneesmiddelen in het oog is door een paracentese (conventionele biopsie met een naald). In dit proefschrift wordt Raman spectroscopie voorgesteld als een krachtig instrument voor een non-contact en niet invasieve meting van de concentratie van stoffen in het oog. Geneesmiddelen in de voorste oogkamer werden gemeten met behulp van deze techniek. Daarnaast werd de aanwezigheid van een geneesmiddel vastgesteld in het glasachtig lichaam van het oog.

In dit proefschrift wordt tevens de hydratatie van het hoornvlies bestudeerd als een geschikt doel voor optische biopsie. Hydratatie van het hoornvlies en de ruimtelijke verdeling ervan vormt een belangrijke plaats binnen de fysiologie en pathologie van het menselijk oog. De hydratatie speelt een cruciale rol bij operaties, zoals een transplantatie van het hoornvlies of bij refractieve chirurgie; bij het onderzoeken van de pathologie van hoornvlies aandoeningen; of onderzoeken naar de invloed van geneesmiddelen op de hoornvlies endotheel pompfunctie en de dynamiek van de penetratie van geneesmiddelen via de verschillende hoornvlies lagen. Op basis van OCT is een systeem ontwikkeld waarmee de hydratatie verdeling over de verschillende hoornvlies lagen zowel in de tijd en in ruimte op een niet invasieve manier bepaald kan worden. Er is nadrukkelijk gekeken naar mogelijke oorzaken van verstoringen in het terug verstrooide licht en deze op te lossen om de reproduceerbaarheid van de data te verhogen. Er werd aangetoond dat de beweging van water of geneesmiddelen in het hoornvlies in real-time waargenomen kan worden¹.

De aanpassingen die noodzakelijk zijn voor het gebruik van deze technieken in oogheelkunde en de bevindingen worden in dit proefschrift besproken. De hoofdstukken 2, 3 en 4 gaan over de toepassing van Raman spectroscopie en het analyseren van geneesmiddelen geïnjecteerd in het oog. De hoofdstukken 5, 6, 7 en 8 bespreken OCT en de toepasbaarheid daarvan voor het onderzoek naar de morfologische veranderingen in het hoornvlies veroorzaakt door toegediende geneesmiddelen. Elk hoofdstuk wordt in de volgende tekst kort toegelicht.

Hoofdstuk 2 behandelt de mogelijkheden van Raman spectroscopie in de detectie van het antivirale geneesmiddel ganciclovir in vivo. Diverse concentraties ganciclovir werden met succes gedetecteerd in de voorste oogkamer in ogen van konijnen waarbij de gemeten concentraties dicht bij de therapeutische waarden liggen. Hoofdstuk 3 bespreekt de mogelijkheden van Raman spectroscopie bij het opsporen van de meest voorkomende intravitreale geneesmiddelen die worden gebruikt voor de behandeling van intraoculaire ontstekingen. Dit hoofdstuk beschrijft de niet invasieve in vivo bepaling van het anti-fungus geneesmiddel amfotericine B en het antibioticum

ceftazidime in de voorste oogkamer. Unieke Raman signalen van ceftazidime werden waargenomen bij 1028, 1506, 1586 en 1641 cm^{-1} . Amfotericine B toonde karakteristieke Raman signalen bij 1156.5 en 1556 cm^{-1} . De haalbaarheid van Raman spectroscopie voor de detectie van ceftazidime, zelfs bij een lagere concentratie dan de therapeutische dosis wordt aangetoond. Hoofdstuk 4 beschrijft Raman spectroscopie bij de detectie van een klinisch gebruikt biomateriaal in het menselijk oog. De benodigde laser power voor het verkrijgen van een Raman spectrum was laag genoeg om een oog veilige detectie van het biomateriaal mogelijk te maken. Dit biomateriaal, siliconen olie, wordt gebruikt bij intra oculaire ingrepen waarbij het glasvocht vervangen wordt door siliconen olie. De stof specifieke Raman spectra werden waargenomen op 2906 cm^{-1} en 2965 cm^{-1} . Dit hoofdstuk toont de bruikbaarheid van Raman spectroscopie bij de mens aan. Vanaf hoofdstuk 5 verschuift het focus van dit proefschrift naar toepassingen van de OCT in het hoornvlies. Terwijl bij het reguliere OCT onderzoek het accent in de visualisatie van het hoornvlies en de anatomische structuur ligt, toont dit werk aan hoe OCT-signalen van het hoornvlies kunnen worden geïnterpreteerd op een spectroscopische manier, zodat een verandering in de fysiologie kan worden bestudeerd met deze techniek. De volgende hoofdstukken behandelen hoe de terugverstrooide signalen veranderen door de wijziging in hydratatie van het hoornvlies als gevolg van een lokaal toegediend geneesmiddel op het hoornvlies.

Hoofdstuk 5. Het onderzoek in dit hoofdstuk is gebaseerd op het volgen van de effecten van de hypertone geneesmiddel ophthalgan en de daaropvolgende wijzigingen in het hoornvlies op een kwalitatieve basis. In dit hoofdstuk wordt ook het belang besproken van aanpassingen die nodig zijn om een optische biopsie met OCT te verrichten, zoals de correctie voor de 'confocale functie' en 'speckle ruis' vermindering. In hoofdstuk 6 wordt een aantal nieuwe gegevens over de correlatie van het hoornvlies licht terugverstrooiing en de betreffende diepte distributie met de omvang en richting van het water gradiënt in het hoornvlies van een konijn in vivo voorgesteld. Dit wordt bereikt tijdens de dehydratatie en rehydratatie behandelingen. Ook de relatie van de amplitude van licht terugverstrooiing en de dikte van de hoornvlies wordt besproken. In tegenstelling tot het bekende effect van de onmiddellijke toename van de hoornvlies troebeling bij hoornvlies zwelling, werd een nieuw effect waargenomen, dat een primaire daling liet zien van het amplitude van het terugverstrooide licht uit het voorste deel van het hoornvlies stroma tijdens het zwellings proces. Dit werd gerealiseerd door een ruimtelijke terugverstrooiings meting over de gehele dikte van het hoornvlies en zo werd de terugverstrooiings gradiënt waargenomen voor de verschillende lagen van het hoornvlies in real-time. Er worden ook correcties besproken die de invloed van de hoornvlies kromming, die gevolgen kan hebben voor de OCT metingen, opheft. Hoofdstuk 7 gaat verder met de directe relatie van de hoornvlies dikte versus hydratatie van het hoornvlies. De in dit hoofdstuk beschreven bevindingen tonen een inverse relatie aan tussen de logaritme van de intensiteit van de terugverstrooiing in het hoornvlies en de mate van hoornvlies hydratatie, waarbij de intensiteit van terugverstrooiing tot 20 maal kan veranderen. Dit werk toont ook aan hoe OCT een belangrijke rol kan spelen in real-time detectie van fysiologische processen in het hoornvlies. Na een fors dehydratatie effect in het hoornvlies veroorzaakt door een geneesmiddel, wordt de hoornvlies

rehydratatie en de dikte veranderingen die daarmee gepaard gaan, met succes gevolgd en gekwantificeerd tijdens het hydratatie herstel van het hoornvlies.

Aanvullende rekenmodellen worden gegeven om de relatie te onderzoeken tussen de hoornvlies terugverstrooiing en de dikte ervan.

In hoofdstuk 8 wordt de informatie die in het vorige hoofdstuk is besproken over de relatie tussen de licht terugverstrooiing in verschillende hoornvlies lagen en de hoornvlies hydratatie nader onderzocht. De geschiktheid van de OCT bij de beoordeling van de dynamiek van de hoornvlies hydratatie veranderingen in de real-time, na lokale toediening van een hypotone of hypertone middelen, door nauwkeurige metingen van de zogenaamde hoornvlies diepte terugverstrooiing licht distributie (HDTLD) werd onderzocht. Optische storingen in HDTLD werden gedetecteerd als gevolg van water toe- en afvoer in het hoornvlies. De water bewegingen in konijnen ogen werden gemeten met waarden rond de 1 μm per seconde, veroorzaakt door hoornvlies de- en rehydratatie. De terugverstrooide licht distributie in het hoornvlies werd gebruikt voor het bepalen van de snelheid van de water bewegingen in real-time en in vivo. Kwantificering methoden worden voorgesteld voor het meten van de precieze omvang van waterverplaatsing in ruimte en tijd.

Zoals weergegeven in dit proefschrift is een enkele modus operandi niet voldoende om alle vragen zoals geneesmiddel transport binnen oogweefsel en de invloed daarvan op de morfologie te beantwoorden. Daarom lijkt een combinatie van technieken een logische stap in de ontwikkeling van de volgende generatie van diagnostische hulpmiddelen. Dit proefschrift beschrijft een combinatie van twee spectroscopische technieken, namelijk OCT en Raman spectroscopie. Een dergelijke combinatie zou een oplossing kunnen zijn om de inherente gevoeligheid van het oog zelf niet aan te tasten. Aandachtspunten zijn: de gevoeligheid van het netvlies voor licht schade, de snelle uitdroging van het hoornvlies blootgesteld aan de lucht, de refractieve eigenschappen van het oog, en de invloed van oogbewegingen op de metingen.

Toekomst

De niet invasieve, non-contact en real-time eigenschappen van Raman spectroscopie, gecombineerd met de hoge molecuul (in dit proefschrift: geneesmiddelen) sensitiviteit en specificiteit, pleiten voor een verdere toepassing van deze veelbelovende techniek als een optische biopsie methode. Van oudsher zijn de beperkingen van Raman spectroscopie, zoals de relatief hoge laser power die nodig is voor een detecteerbare Raman signaal voor bepaalde moleculen (bijvoorbeeld glucose concentratie in fysiologische reeksen) en een relatief slechte signaal / ruisverhouding, een drempel geweest voor onmiddellijk gebruik van dit systeem met een conventioneel off-the-shelf apparaat. Er zijn er stappen genomen in de afgelopen jaren om deze problemen aan te pakken. Betere optische opstellingen worden ontwikkeld en nabij-infrarood (NIR) lichtbronnen zijn geleidelijk meer gebruikt om de risico's van lichtschade die gepaard gaat met kortere golflengten te verminderen. Ook betere multivariate analyse modellen in combinatie met geavanceerde software voor een betere signaal / ruisverwerking worden ontwikkeld en benut. Daarnaast worden nieuwe optische instrumenten gebouwd om het excitatie licht dusdanig te richten dat het niet rechtstreeks op het netvlies kan komen. De ontwikkeling rond de Raman technologie

blijft niet beperkt tot het bovengenoemde. Andere uitdagende Raman technieken zoals Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy (CARS), Raman spectroscopie Induced Kerr Effect (RIKES), Inverse Raman spectroscopie (IRS), Gain Gestimuleerde Raman spectroscopie, Photoacoustic Raman spectroscopie (PARS) worden ontwikkeld in een veel hoger tempo dan zo'n tien jaar geleden.

Ook op het OCT gebied, zijn er nieuwe en recente ontwikkelingen zichtbaar. Nieuwe lichtbronnen, zoals Ti: Sapphire-en Nd: Glas Femtoseconde lasers hebben de axiale resolutie verhoogd tot het niveau van enkele micrometers (Nd:Glass 5 μm en Ti:Sapphire 1 μm). Een ander interessant gebied is de verfijning van de spectroscopische Optical Coherence Tomography, die zich nog in een vroeg stadium bevindt². Met deze techniek kunnen functionele eigenschappen van weefsels op een micron schaal worden bereikt. Het maakt gebruik van de spectrale bandbreedte van de optische bron om informatie te verkrijgen uit het terugverstrooide licht. Doppler OCT catheters worden ontwikkeld als een geïntegreerd functionele en structurele beeldvormende modaliteit. Ook nieuwe beeldvormende software wordt voortdurend ontwikkeld om drie dimensionale imaging te realiseren.

Op dit moment kan OCT of Raman spectroscopie alleen worden toegepast op een afzonderlijk manier voor oog diagnostiek. De reden hiervoor is niet alleen het inherent verschil in optica en fysische grondslag, maar ook omdat de inzetbaarheid van deze twee systemen van oudsher beschouwd is als zijnde, voor beeldvormende doeleinden (OCT) dan wel voor analytische doeleinden (Raman spectroscopie). Men zou kunnen voorstellen deze twee technieken in een apparaat te combineren zodat analytische en morfologische informatie op hetzelfde moment verworven kan worden.

De combinatie van de OCT met andere beeldvormende technieken is reeds bereikt in de afgelopen jaren. De OCT/SLO is een combinatie systeem dat uniek in zijn vermogen is om tegelijkertijd een confocaal laser scanning ophthalmoscoop (SLO) beeld en een Optical Coherence Tomography (OCT) beeld te vormen met behulp van een enkele licht bron. Andere commercieel systemen zijn: een Spectral OCT/SLO combinatie met scanning laser oftalmoscoop microperimetry; terwijl een ander systeem een ingebouwde fundus fotografie met kleur mogelijkheid biedt; of een systeem dat kleur fundus fotografie, angiografie, en fundus autofluorescentie biedt. Al deze systemen maken een fundus afbeelding samengesteld uit de 3-D data set en uiteindelijk zal de invoer van kleuren foto's als overlays bij het OCT-afbeelding mogelijk worden.

Gezien de nieuwe mogelijkheden en verbeteringen van de optische technologieën wordt er verwacht dat een optische biopsie van het oog een aantrekkelijk en aanvullend alternatief vormt voor invasieve diagnostiek. Hierdoor kan de op de patiënt toegespitste geneeskunde een stap dichterbij de werkelijkheid komen.

References

3. Ghosn MG, Tuchin VV, Larin KV. Nondestructive Quantification of Analyte Diffusion in Cornea and Sclera Using Optical Coherence Tomography. *IOVS*. 2007;48:2726-2733.
4. Kaluzy BJ, Kaluzny JJ, Szkulmowska A et. al. Spectral optical coherence tomography: A novel technique for cornea imaging. *Cornea*. 2006;25(8):960-5.