

Samenvatting

Dit proefschrift richt zich op twee toepassingen van licht in de geneeskunde; de eerste is fotodynamische therapie (afgekort PDT, van het Engelse PhotoDynamic Therapy) en de tweede is optische diagnostiek middels diffuse reflectie spectroscopie. Voor beide toepassingen is de lichtverdeling in weefsel tijdens belichting met een lichtbron van vitaal belang. De verdeling van licht in weefsel is afhankelijk van de verstrooiende en absorberende eigenschappen van het weefsel, de zogenaamde optische eigenschappen. Het is voor fotodynamische therapie van groot belang deze eigenschappen te kennen, omdat hiermee bijvoorbeeld de indringdiepte van het therapeutische licht berekend kan worden en daarmee de te verwachten weefselschade. Ondanks veelbelovende preklinische resultaten, wordt fotodynamische therapie nog maar op beperkte schaal in de kliniek toegepast. Dit is het gevolg van de variabele resultaten en complicaties die optreden bij onjuiste toepassing van de methode. Optische diagnostiek maakt gebruik van verschillen in optische eigenschappen tussen tumor, goedaardig en normaal weefsel om de weefseltypen te kunnen onderscheiden. Optische diagnostiek middels diffuse reflectie metingen heeft tot dusver relatief beperkte diagnostische waarde opgeleverd, waardoor ook deze toepassing van licht nog niet echt klinisch van de grond is gekomen.

De hypothese die het fundament van dit proefschrift is, is dat de onderliggende oorzaak van het beperkte klinische succes van beide optische methoden het gevolg is van het inhomogene en dynamische karakter van de optische eigenschappen weefsel *in vivo*. In dit proefschrift wordt deze hypothese getoetst middels onderzoek naar de ruimtelijke verdeling van optische eigenschappen (de zogenaamde lokale intra -patiënt variaties), verschillen tussen individuen (de zogenaamde globale inter-patiënt variaties) en het dynamische gedrag van optische eigenschappen door middel van *in vivo* licht metingen.

Het onderzoek gepresenteerd in dit proefschrift is ontsproten uit zes verschillende onderzoeks projecten over een periode van 7 jaar, waarin onderzoek werd verricht naar licht metingen *in vivo*, en de rol van optische eigenschappen in verschillende klinische toepassing van licht in de oncologie. Voor dit doel zijn specifieke licht applicatoren en meettechnieken ontwikkeld waarmee lichtmetingen zijn verricht tijdens fotodynamische therapie, chirurgie en biopsie procedures.

De eerste sectie van het proefschrift (hoofdstuk 2 –5) heeft betrekking op de invloed van intra- en inter- patiënt en dynamische variaties in optische eigenschappen op de lichtverdeling tijdens fotodynamische therapie, en de bijbehorende consequenties daarvan. Het tweede gedeelte (hoofdstuk 6 –10) beschrijft het kwantitatief meten van de *in vivo* optische eigenschappen en hun relatie tot optische diagnostiek.

In hoofdstuk twee zijn lichtmetingen verricht *in situ* tijdens fotodynamische therapie van de Barrett's slokdarm met de lichtgevoelige stof 5-ALA. De manier van lichttoediening in deze studie was gebaseerd op de klassieke aanpak waarbij een vaste lichtdosis per oppervlakte eenheid wordt aangeboden. Deze dosimetrische methode houdt geen rekening met de optische eigenschappen en hun dynamisch gedrag.

Door meervoudige diffuse reflecties aan het weefsel oppervlak, welke afhankelijk zijn van de verstrooiende en absorberende eigenschappen van het weefsel, zal de werkelijke diffuse lichtintensiteit aanzienlijk hoger zijn dan wat wordt aangeboden en bovendien sterk variëren.

De diffuse lichtintensiteit gemeten *in situ* vertoonde significante verschillen tussen individuele patiënten en lag een factor 1.5 tot 4 maal hoger dan de aangeboden lichtintensiteit. Daarnaast werden significante intra -patiënt variaties in diffuse lichtintensiteit waargenomen tijdens de behandeling.

Uit de waarnemingen konden de volgende conclusies worden getrokken: de oorzaak van deze dramatische inter patiënt verschillen zijn het resultaat van globale verschillen in optische eigenschappen. Het afwijkende barrett's epitheel is rood in vergelijking met het wittige normale plaveisel epitheel; naarmate er dus meer afwijkend barrett's epitheel in de slokdarm aanwezig is, zal deze meer absorberen en daardoor een lagere opbouw in diffuse lichtintensiteit vertonen. Dit heeft consequenties voor de hoeveelheid licht die aanwezig is voor absorptie door de lichtgevoelige stof.

Variaties binnen een patiënt gedurende therapie, i.e. intra patient variaties, correspondeerden met de door de therapie geïnduceerde spasmes en hoesten. De kleinere variaties waren het gevolg van ademhaling en hartslag.

Er wordt gepostuleerd dat deze substantiële inter-patient variaties grote consequenties kunnen hebben voor de klinische respons voor fotodynamische therapie. Hoofdstuk zes wijdt in detail uit over de gevolgen van deze variaties voor fotodynamische therapie van de Barrett's slokdarm.

Hoofdstuk drie beschrijft de ontwikkeling van een speciaal vormgegeven lichtapplicator met daarin lichtsensoren (isotrope detectoren), die zorgt voor een homogene en reproduceerbare licht distributie ten behoeve van PDT voor nasopharynx carcinomen. De licht distributie van de applicator is eerst getest in een optisch weefsel fantoom. Daarvoor zijn middels diffuse reflectie spectroscopie eerst de optische eigenschappen bepaald van weefsel structuren vergelijkbaar met die van het nasopharynx weefsel. Op basis van deze gemeten absorptie en verstrooiingscoëfficiënten werd het fantoom samengesteld. De resultaten demonstreerden een homogene lichtverdeling in lucht en in het weefsel fantoom (relatieve variaties waren 3.8% en 18.3% respectievelijk). Vervolgens is de lichtverdeling gemeten in de nasopharynx van vijf gezonde vrijwilligers. De resultaten van deze metingen vertoonden echter een beduidend minder homogene licht verdeling (relatieve variaties variërend tussen min. 19% en max. 52%, respectievelijk). De maximale opbouw in diffuse lichtintensiteit varieerde tussen vrijwilligers en was een factor 4.1 tot 6.9 hoger dan het berekende fluentie tempo in absentie van weefsel. Op grond van de gevonden resultaten kunnen we concluderen dat de geobserveerde variaties de oorzaak zijn van globale verschillen tussen de vrijwilligers, lokale variaties in optische eigenschappen en verschillen in nasopharynx geometrie.

In hoofdstuk vier wordt de in hoofdstuk drie beschreven applicator geëvalueerd tijdens fotodynamische therapie van nasopharynx carcinomen met de licht gevoelige stof mTHPC (Foscan®). In totaal zijn 26 lichtmetingen verricht *in vivo*. De diffuse lichtintensiteit aan het oppervlak van de applicator werd voor de behandeling ingesteld op een vaste waarde van $\sim 100 \text{ mW cm}^{-2}$. De werkelijk gemeten diffuse lichtintensiteiten varieerden tussen 70 mW cm^{-2} and 440 mW cm^{-2} in het midden van de applicator. In 20 van de 26 metingen werd een significante daling van de diffuse lichtintensiteit waargenomen. Deze dynamische verandering suggereren een door de fotodynamische therapie veroorzaakte stijging in hoeveelheid bloed of een daling in de weefsel zuurstof saturatie van het bloed of een combinatie van beiden. Dit resulteert in een stijging van lichtabsorptie rond 652 nm en heeft als gevolg een lagere opbouw in diffuse lichtintensiteit. De grote variaties in gemeten lichtintensiteiten tussen patiënten en de waargenomen dynamische variaties gedurende de therapie bij een standaard laser bronvermogen benadrukken wederom het belang van *in vivo* licht dosimetrie voor fotodynamische therapie.

Voor fotodynamische therapie van asbest longkanker (kwaadaardig longslijmvlies tumoren, ook wel maligne pleuraal mesothelioma MPM genoemd) met de lichtgevoelige stof Foscan® is het van essentieel belang om de licht dosering te baseren op de diffuse lichtintensiteit en de diffuse licht dosis gemeten *in vivo*. Dit vanwege de vele gevoelige weefselstructuren zoals het hart en de slokdarm in de omgeving van het te behandelen gebied..

Hoofdstuk vijf beschrijft een studie naar *in vivo* licht dosimetrie tijdens fotodynamische therapie voor MPM. Tijdens deze procedure wordt eerst de long verwijderd waarna er een maximale chirurgische tumorresectie plaats vindt, welke gevolgd wordt door een adjuvante PDT sessie. Ondanks de optimale integrale belichting middels een sferische diffuser, welke op basis van de gemeten diffuse lichtintensiteit met vier isotrope detectoren in de thoraxholte wordt gepositioneerd, blijft het belichten van het diafragma-sinus moeilijk. Een wigvormige licht applicator met daarin isotrope detectoren is daarom ontwikkeld om een additionele lichtdosis af te leveren in de sinus. De lichtapplicator bestaat uit een siliconen wig met daarin een cilindrische diffuser en twee isotrope detectoren op strategische locaties, namelijk in het midden (waar de lichtintensiteit het hoogst is) en aan het einde (waar deze het laagst is) van de applicator. De applicator is eerst getest in optische weefsel fantomen met verschillende optische eigenschappen om de diffuse lichtverdeling van de applicator te bepalen. Daarna is de applicator toegepast tijdens MPM-PDT. De genormaliseerde lichtverdeling over het oppervlak van de applicator demonstreerde weinig verschil tussen de verschillende fantomen. Tevens bleek de applicator tijdens PDT in staat te zijn een homogene additionele licht dosis af te leveren in het diafragma sinus.

Hoofdstuk zes behandelt in detail de gevolgen van de in hoofdstuk 2 gemeten inter-patiënt variaties in diffuse lichtopbouw voor PDT van de Barrett's slokdarm met betrekking tot de klinische respons en complicaties. We bespreken in dit hoofdstuk de potentiële oorzaken voor de afwezigheid of gedeeltelijke respons van 5-ALA Barrett's PDT, en

poneren dat de gebrekkige klinische respons het gevolg is van de variaties in werkelijk afgeleverde diffuse lichtintensiteit en lichtdosis. Verder beschrijven we waarom de effectiviteit van gefractioneerde PDT met ALA gecompromitteerd wordt door de waargenomen variaties in de diffuse lichtintensiteit. Bij PDT met de potentere lichtgevoelige stof Photofrin komen complicaties zoals vernauwingen (stricturen) van de slokdarm ten gevolge van de therapie met grote regelmaat voor. We concluderen dat deze PDT-specifieke complicatie het directe gevolg is van een te hoge lichtintensiteit.

Samengevat: Het therapeutisch licht *in vivo* gemeten gedurende PDT demonstreerde substantiële variaties tussen patiënten bij een gelijkblijvend vermogen van de lichtbron. Deze variaties reflecteren de globale verschillen in optische eigenschappen tussen patiënten. Vergelijkbare verschillen werden waargenomen in gezonde vrijwilligers. Naast de inter-patiënt variaties, zijn ook significante lokale verschillen aan het oppervlak van het te behandelen oppervlak binnen een individu geobserveerd, de zogenaamde intra-patient variaties. De laatstgenoemde variaties zijn het resultaat van de inhomogene verdeling van optische eigenschappen en van de geometrie. De laatste belangrijke conclusie is dat de optische eigenschappen kunnen veranderen ten gevolge van de PDT.

Zoals eerder genoemd spelen weefsel optische eigenschappen ook een belangrijke rol in optische diagnostiek. Verschillen in optische eigenschappen kunnen worden gebruikt om tumor van normaal weefsel te onderscheiden.

Hoofdstuk zeven beschrijft een studie naar de invloed van de inhomogene distributie van hemoglobine (bloed) in cilindrische vaten op diffuse reflectie spectroscopy (DRS). De DRS methode wordt gebruikt om de absorptie- en verstrooiingscoëfficiënten te bepalen van weefsel, en levert betrouwbare resultaten op voor golflengtes tussen de 650 en 1050 nm. Het theoretische diffusiemodel waarmee de diffuse reflectie metingen wordt beschreven, heeft als aanname dat de absorptie homogeen verdeeld moet zijn. Bloed absorbeert echter sterk beneden 650 nm en is ingesloten in discrete vaten. Hierdoor is de absorptie in weefsel dus niet homogeen verdeeld. Een correctie factor voor de inhomogene verdeling van bloed wordt geïntroduceerd en meegenomen in het diffusiemodel. Hiermee wordt het mogelijk de optische eigenschappen te bepalen tot 500nm. De betrouwbaarheid van de correctie methode werd gevalideerd en bevestigd op huid metingen van vrijwilligers. We concluderen dan ook dat het includeren van dit correctiemodel in de DRS analyse, de mogelijkheid biedt om DRS data correct te interpreteren tot ~500nm in plaats van 650 nm. Tevens genereert het correctiemodel informatie over de exacte hoeveelheid bloed en extra informatie over de gemiddelde vaatdiameter binnen het gemeten volume.

Hoofdstuk acht beschrijft in detail de meting van het absorptiespectrum van dierlijk vet. Voor de component analyse van weefsel absorptie spectra worden de standaard en goed gedefinieerde absorptie spectra van bloed (100% zuurstof saturatie en volledige gesatureerd hemoglobine) en water gebruikt. Een betrouwbaar en goed gedefinieerd spectrum van humaan vet echter is hiervoor niet beschikbaar. Om dit spectrum te benaderen is puur dierlijk vet onttrokken uit varkens spek en gepurificeerd totdat het een

optisch transparante vloeistof werd waarmee klassieke transmissiemetingen mogelijk waren. Een transmissiemetmethode is ontwikkeld die alle reflecties aan het oppervlak van het cuvet uitsluit, en het tevens mogelijk maakt om nauwkeurige spectrale metingen te verrichten in gebieden waar de absorptie hoog en laag is. Bij kamertemperatuur is het vet een solide, diffuus verstrooiende, niet transparante substantie. Er zijn daarom naast de transmissie metingen, twee diffuse reflectie methoden gebruikt om het absorptiespectrum van vet in vaste toestand te bepalen, namelijk ruimtelijke- en tijdsopgeloste diffuse reflectie spectroscopie. Met deze drie onafhankelijke methoden is een nauwkeurig referentie spectrum van dierlijk vet bepaald. Met dit spectrum is een betrouwbare componenten analyse van weefsel absorptie spectra mogelijk; tevens zorgt het gebruik van standaard referentie spectra voor een betere vergelijking tussen weefsel spectroscopische technieken en methodes. Het spectrum wordt nu als standaard referentie gebruikt door vele onderzoekers, en is beschikbaar op de database op de website van het Oregon Medical Laser Center (<http://omlc.ogi.edu/spectra/>).

Hoofdstuk negen beschrijft het gebruik van ruimtelijk opgeloste diffuse reflectie spectroscopie om tijdens chirurgie (intraoperatief) de optische eigenschappen van normaal borstweefsel en van borsttumoren te bepalen. Kennis omtrent deze eigenschappen is van essentieel belang voor o.a. optische mammografie. Metingen werden verricht in het golflengte gebied van 600 tot 1100 nm. Eerst is de reproduceerbaarheid van de methoden bepaald middels metingen op de borsthuid van een vrijwilligster. Drie opeenvolgende metingen op dezelfde borstlocatie resulteerde in een absorptie variatie van 4% en een 2.6% variatie in verstrooiing. Echter, metingen op verschillende locaties op dezelfde borst resulteerde in significante variaties in absorptie en verstrooiing tussen de locaties (18.6% and 27.2% voor respectievelijk verstrooiing en absorptie). Vervolgens zijn de intrinsieke optische eigenschappen bepaald van verschillende weefseltypen gedurende chirurgie, welke significante variaties in optische eigenschappen lieten zien. We suggereren dat deze variaties voornamelijk het gevolg zijn van heterogeniteiten in het weefsel, dwz de inhomogene verdeling van bloedvaten, klieren en vet. Dit resulteert in grote lokale variaties in optische eigenschappen. De ratio tussen gemiddelde absorptie van alle normaal en tumor weefsel spectra, liet een maximaal contrast zien rond de 650 nm. Het is zeer aannemelijk dat deze piek in contrast het directe gevolg is van verschillen in bloed zuurstofsaturatie tussen tumor en normaal borstweefsel. Rond 650 nm is het verschil in absorptie tussen zuurstofrijk en zuurstofarm bloed maximaal. Door het verhoogde metabolisme van de tumor zal door een verhoogd zuurstof gebruik de saturatie lager zijn.

De geobserveerde grote variaties in optische eigenschappen zijn echter niet alleen het gevolg van heterogeniteiten in het weefsel, maar zijn mede het gevolg van de DRS methodiek. Het theoretische DRS model is geldig mits er aan een paar aannames wordt voldaan; een ervan is dat het weefsel homogeen moet zijn. We concluderen dan ook dat DRS metingen zeer gevoelig zijn voor inhomogeniteiten, met als gevolg instabiele analyses. Het meetvolume verschilt voor iedere bron- detectie-fiberafstand ($\sim 2\text{mm}^3$ tot 2cm^3), dwz een kleine afstand heeft weer een kleiner meetvolume.

Tevens is de locatie van het meetvolume weer afhankelijk van de golflengte, en is dus verschillend per golflengte voor een en dezelfde bron-detectie fiberafstand.

De bovengenoemde problemen van ruimtelijk opgeloste DRS compromitteert de validiteit van de methode. Het was daarom van belang om een techniek te gebruiken die in staat is de optische eigenschappen te bepalen over een heel klein meetvolume (orde van grote $\sim \text{mm}^3$), en daardoor minder gevoelig is voor inhomogeniteiten. De recentelijk ontwikkelde techniek differentiële padlengte spectroscopie (DPS) is zo een techniek. De DPS methode is voor dit onderzoek gemodificeerd om de intrinsieke optische eigenschappen van borstweefsel te bepalen.

In hoofdstuk tien is een conventionele borst-biopsie aangepast zo dat DPS metingen konden worden verricht op exact dezelfde locatie als een weefsel monster (biopsie) werd genomen. In deze studie zijn *in vivo* DPS metingen verricht en biopsies genomen in normaal borstweefsel en in en rondom borsttumoren. Het is met deze techniek mogelijk gebleken om heel lokaal informatie te krijgen over de lokale bloed zuurstofsaturatie, de hoeveel bloed in het meetvolume, de gemiddelde vaatdiameter, de concentratie β -carotene, en informatie over de verstrooiing, voor zowel tumor als normaal weefsel.

Uit de resultaten kunnen we concluderen dat tumoreweefsel een gemiddeld significant lagere bloed zuurstofsaturatie kent, en een verhoogd bloed volume in vergelijking met normaal borstweefsel. Het in hoofdstuk zes beschreven correctie model was tevens van fundamenteel belang voor de correcte analyse van DPS data bij de lagere golflengten.

Uit de resultaten van de in hoofdstuk 2 t/m 10 beschreven onderzoeken, worden de volgende algemene conclusies getrokken:

- I. Optische eigenschappen variëren tussen patiënten en gezonde vrijwilligers voor vergelijkbare weefsel typen.
- II. Optische eigenschappen zijn inhomogeen verdeeld binnen het klinisch relevante behandel of diagnostische weefsel volume.
- III. Optische eigenschappen kunnen veranderen gedurende fotodynamische therapie.
- IV. Variaties in optische eigenschappen en in het bijzonder de absorptie zijn primair gerelateerd aan de hoeveelheid bloed en saturatie in het behandel of diagnostisch volume.

Deze vier algemene conclusies in ogenschouw nemende, voor wat betreft de consequenties voor fotodynamische therapie en optische diagnostiek middel diffuse reflectie metingen, worden de volgende specifieke conclusies worden getrokken.

Met betrekking tot fotodynamische therapie:

- Licht dosimetrie op basis van een vast lichtbron vermogen en het te behandelen weefsel oppervlak/volume, kan leiden tot een inefficiënte tumor respons en ongewenste complicaties.
- Licht dosis planning op basis van de aanname dat de optische eigenschappen in het behandelvolume homogeen gedistribueerd, en gedurende therapie statisch zijn, kan leiden tot een inefficiënte tumor respons en klinisch onacceptabele complicaties.
- We postuleren dat lichtdosering op basis van de werkelijk *in situ* gemeten fluentie (tempo), kan leiden tot een significante verbetering in tumor respons en een drastische vermindering in complicaties.
- Het concept van *in situ* licht dosering op basis van de werkelijk gemeten fluentie, moet overwogen worden voor iedere PDT applicatie, en met name toepassing waarbij het behandelvolume zich in een holle ruimte bevindt, zoals de Barrett's slokdarm en de blaas.

Met betrekking tot optische diagnostiek:

- Diffuse reflectie methoden die gebruikt maken van meerdere golflengten moeten rekening houden met het feit dat voor iedere golflengte het detectievolume verschillend is, tengevolge van de weefseloptische eigenschappen waardoor voor iedere golflengte de padlengte van de gedetecteerde fotonen anders is.
- Diffuse reflectie methoden die gebruikt maken van meerdere bron detectie fiber afstanden, moeten rekening houden met het feit dat voor iedere afstand het detectievolume voor dezelfde golflengte verschillend is.
- Diffuse reflectie modellen, met als aanname een homogene distributie in optische eigenschappen, die gebruikt worden voor de analyse van data onttrokken uit een heterogeen medium, resulteren in een instabiele modellering en bijgevolg onbetrouwbare optische eigenschappen.
- Voor de inhomogene distributie van bloed in discrete cilindrische vaten, en daardoor de inhomogene distributie absorptie, kan worden gecorrigeerd. De in dit proefschrift beschreven correctieanalyse is van vitaal belang voor iedere optisch diagnostische toepassing die gebruikt maakt van diffuse reflectie onder de 650nm.