

VU Research Portal

Imaging the Retina in Alzheimer's Disease

den Haan, J.

2019

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

den Haan, J. (2019). *Imaging the Retina in Alzheimer's Disease*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

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

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Nederlandse Samenvatting

Introductie

De ziekte van Alzheimer (AD) is de belangrijkste oorzaak van dementie en vertegenwoordigt ongeveer 70% van de dementiepatiënten met ongeveer 46,8 miljoen patiënten wereldwijd in 2015¹. Gezien de stijgende levensverwachting zal de wereldwijde prevalentie naar verwachting 74,7 miljoen bereiken in 2020 en 131,5 miljoen in 2050¹. AD vormt daarmee een van de grootste socio-economische problemen in de 21^e eeuw.

Pathofysiologisch wordt AD gekenmerkt door accumulatie van amyloïd en gefosforyleerd tau, neurodegeneratie en vasculaire veranderingen die uiteindelijk leiden tot cognitieve achteruitgang die het dagelijks functioneren verstoort². Onderzoek in de afgelopen decennia heeft ons inzicht in deze pathofysiologische processen vergroot en geleid tot verschillende AD-biomarkers die AD-pathologie in-vivo weerspiegelen en daarmee gebruikt kunnen worden om de klinische diagnose te ondersteunen³. Onlangs zijn door de National Institute on Aging (NIA) en de Alzheimer's Association (AA) vernieuwde NIA-AA-criteria geïntroduceerd waarin een door biomarkers ondersteund diagnosesysteem voor onderzoeksdoeleinden, het zogenaamde ATN-systeem wordt bepleit⁴. Biomarkers voor amyloïd (A), tau (T) en neurodegeneratie (N) kunnen daarbij worden gebruikt om cohorten op een uniforme wijze te beschrijven om het beantwoorden van pathofysiologische, diagnostische, prognostische en therapeutische vragen op het gebied van AD-onderzoek te vergemakkelijken. Hoewel deze biomarkers verschillende voordelen hebben, zijn er ook nadelen; ze zijn duur, invasief en/of niet geschikt voor herhaald gebruik. Er is derhalve een dringende behoefte aan patiëntvriendelijke biomarkers voor diagnose enerzijds en uitkomstmaten in medicijnonderzoek anderzijds.

Biomarkers voor AD in het oog: ATN (V) in de retina?

Het netvlies deelt veel structurele overeenkomsten met de hersenen en zou derhalve de bron kunnen zijn van niet-invasieve diagnostische biomarkers voor AD. Eerdere post-mortemstudies toonden een verminderd aantal ganglioncellen en depositie van amyloïd-bèta(A β) in het netvlies van AD-patiënten⁵⁻⁷. In-vivo-onderzoeken met optische coherentie tomografie (OCT) lieten een netvliesverdunning in AD-patiënten zien. Onderzoeken met behulp van fundus-foto's toonden veranderingen in retinale microvasculatuur⁸. Tenslotte liet een onderzoeksgroep veelbelovende resultaten zien in een proof-of-concept studie waarin amyloïd in de retina van AD-muizen werd gevisualiseerd met behulp van curcumin als fluorescent label⁷. De pathologie verscheen eerder in het netvlies dan in de cerebrale cortex.

De verschillende pathofysiologische routes van AD, namelijk neurodegeneratie, veranderde vasculatuur en depositie van amyloïd en tau, zouden potentieel in het netvlies kunnen worden afgebeeld met beschikbare technieken zoals OCT, fundusfotografie, SLO en nieuwe technieken zoals ‘targeted’ fluorescentie. Omdat deze technieken slechts gebruik maken van licht en derhalve non-invasief zijn, zouden ze kunnen helpen in de zoektocht naar nieuwe patiëntvriendelijke biomarkers.

Het doel van dit proefschrift was dan ook om te onderzoeken of veranderingen in het netvlies kunnen dienen als non-invasieve diagnostische biomarkers voor AD. Middels post-mortem en in-vivo onderzoeksopzetten hebben we onderzocht of én welke pathofysiologische routes van AD in het netvlies zijn betrokken. Neurodegeneratie in Deel I, vasculatuur in Deel II en amyloïd-en taudepositie in Deel III. Verschillende oogscans (OCT, fundus foto's, OCTA en fluorescentiescans voor en na curcumin) werden vervaardigd in goed gekarakteriseerde proefpersonen van het Amsterdam Dementia Cohort in de ‘*Optical Coherence Tomography in AD*’ (OCT-AD) en ‘*Imaging the Retina for Early diagnosis for Alzheimer’s Disease*’ (I-READ) studiecohorten.

Resultaten

In Hoofdstuk 1 voerden we een meta-analyse van 25 diagnostische onderzoeken uit waarin netvliesdikte tussen AD en/of Mild Cognitive Impairment (MCI) patiënten met controles werd vergeleken. We vonden dat de peripapillaire retinale zenuwvezellaag (RNFL) en totale macula dikte significant zijn verdund bij AD-patiënten in vergelijking met controles (SMD-0.98 [CI -1.30, -0.66], $p < .01$ en -0.88 [CI -1.12, -0,65], $p = < .01$) respectievelijk). Daarnaast hebben we de effectgrootte van deze groepsverschillen gecorreleerd aan studie-eigenschappen zoals de gemiddelde leeftijd, de gemiddelde Mini-Mental State Examination (MMSE) en glaucoomexclusie, met behulp van meta-regressie. De aanwezigheid van glaucoom overschat mogelijk het effect van AD op de dikte van het netvlies in de beschreven studies. Ook recente literatuur ondersteunt het idee dat glaucoom en leeftijdsgebonden macula degeneratie vaker voorkomen in AD⁹. Ten slotte toonden een zogenaamde ‘*funnel plot*’ aanwijzingen voor publicatiebias, wat mogelijk verder kan bijdragen aan een overschatting van de bevindingen.

Samengevat vonden we netvliesverdunding in AD en MCI, maar lijkt het gebruik van OCT als een diagnostische biomarker voor AD in de klinische praktijk momenteel nog twijfelachtig. Bevindingen dienen daarom bevestigd te worden in goed beschreven cohorten in de verschillende stadia van de ziekte van Alzheimer (preklinisch, prodromaal (MCI) en AD-dementie) met informatie over de amyloïd status en rekening houdend met oogheelkundige confounders¹⁰. Het correleren van OCT-metingen met andere

biomarkers voor neuronale schade (bv. hippocampale atrofie op MRI, hypo-metabolisme op FDG-PET of verhoogde CSF-tau- en pTau- in het hersenvocht) kan inzicht geven in de rol van OCT-metingen als biomarker voor neurodegeneratie bij AD.

In Hoofdstuk 2, 3, 4 en 5 hebben we vervolgens de totale dikte en verschillende lagen van het netvlies gemeten met OCT. Dit hebben we gedaan in verschillende cohorten bestaande uit goed gedefinieerde AD- en posterieure corticale atrofie (PCA)-patiënten, preklinische AD en controles, waarbij we specifiek hebben gelet op belangrijke confounders zoals leeftijd, geslacht en oogheelkundige comorbiditeit. In onze pilotstudie in Hoofdstuk 2 toonden we in een cohort van amyloid positieve AD-patiënten en amyloïd negatieve controles zonder glaucoom aan dat de dikte van de retinale lagen niet verschilde tussen AD-patiënten en controles. In het totale cohort, en in de afzonderlijke ziektegroepen, was totale macula dikte wel gecorreleerd aan pariëtale corticale atrofie in zowel AD (Spearman Rho -0.623, $p < 0.01$) als controles (Spearman Rho -0.587, $p = 0.035$). Deze resultaten suggereren parallele veranderingen in corticale en retinale dikte. Echter zijn studies met grotere aantallen AD-patiënten nodig om de mogelijke rol van het netvlies als een bron van diagnostische en/of prognostische biomarkers in AD te bestuderen, alvorens de rol van netvliesverdunding in AD te verwerpen. Daarbij dient tevens gekeken te worden naar het verband met bekende biomarkers voor amyloïd en neuronale schade.

In Hoofdstuk 3 hebben we ons OCT-AD cohort uitgebreid met *'early onset'* AD (EOAD) en *'late onset'* AD (LOAD)-deelnemers. Daarnaast hebben we ons cohort verrijkt met cognitief normale, amyloïd-negatieve eeneïgige tweelingen uit het EMIF PreclinAD-onderzoek¹¹. Uit een vergelijking van 57 AD-patiënten met 85 controles - bevestigd door amyloïd biomarkers en zonder oogheelkundige confounders - repliceerden we de bevindingen van ons pilot-cohort. We toonden hierbij geen significante verschillen in macula(laag)dikte en peripapillaire RNFL-dikte tussen AD-patiënten en controles aan, ondanks duidelijke groepsverschillen op klinische, neuro-imaging, CSF en PET-metingen. Analyses gestratificeerd voor EOAD versus LOAD veranderde de resultaten niet. In secundaire analyses vonden we significante associaties tussen totale maculadikte en globale corticale atrofie (β -0.314; $p < 0.01$) en pariëtale corticale atrofie (β -0.276; $p < 0.01$). Deze bevindingen impliceren dat de effectgrootte van structurele veranderingen in de retina mogelijk kleiner is dan in de hersenen en/of dat veranderingen later in het ziekteverloop naar voren komen. Samenvattend ondersteunen onze resultaten niet dat retinale dikte-metingen met conventionele OCT kunnen dienen als een diagnostische biomarker voor AD.

In Hoofdstuk 4 hebben we de hypothese van netvliesverdunding in AD getest in een uniek cohort van patiënten met PCA van het University College London (UCL)

Dementia Research Centre (DRC) in Londen. PCA wordt ook wel beschreven als de visuele variant van de ziekte van Alzheimer of de ziekte van Benson, zoals voor het eerst beschreven door neuroloog Dr. Frank Benson in 1988¹². Omdat PCA voornamelijk de pariëto-occipitale cortex beïnvloedt, cortices die betrokken zijn bij visuele verwerking, verwachten we toegenomen netvliesverdunding in PCA-patiënten ten opzichte van ‘typische’ AD-patiënten en controles. Netvlies(laag)dikte maakte echter geen onderscheid tussen goed gedefinieerde PCA-patiënten, typische AD-patiënten of controles. Ondanks de duidelijke groepsverschillen op standaard klinische, neuro-imaging en CSF-metingen. Het gebruik van cross-sectionele retinale (laag) diktemetingen met conventionele OCT als AD-biomarker in PCA lijkt daarom twijfelachtig.

Ten slotte hebben we in Hoofdstuk 5 netvliesdikte in preklinische AD onderzocht met behulp van deelnemers uit de EMIF PreclinAD Twin-studie, gestratificeerd naar amyloïd-status gemeten met PET¹¹. In overeenstemming met onze eerdere bevindingen in AD en PCA werden er geen verschillen gevonden in retina (laagdikte) tussen amyloïd positieve deelnemers (preklinische AD) en amyloïd negatieve patiënten. Retinamaten toonde wel hoge intra-twin correlaties. Dit laatste suggereert een hoge bijdrage van genetische factoren of gedeelde omgevingsfactoren op netvliesdikte.

Concluderend ondersteunen de bevindingen in Deel I (Hoofdstuk 1-5) van dit proefschrift niet de rol van cross-sectionele OCT metingen als biomarker in AD in het dementiestadium, ondanks de suggestie van netvliesverdunding in AD in onze meta-analyse. Dit geldt voor AD een typisch amnestisch -of PCA fenotype en voor de preklinische fase van AD.

In Deel II (Hoofdstuk 6) hebben we onderzocht of veranderingen in de retinale vasculatuur kunnen dienen als biomarker voor AD. Met behulp van bestaande en nieuwe technieken hebben we het vaatkaliber van de retina geëvalueerd met behulp van Singapore I Vessel Analysis (SIVA)-software op fundusfoto's, choroïdale diktemetingen uitgevoerd met behulp van *enhanced depth imaging* (EDI) OCT en de microvasculatuur van de macula gemeten met OCT-angiografie (OCTA). We vonden geen ziekte-effect op bovenstaande retinale vasculaire maten, gecorrigeerd voor belangrijke confounders zoals leeftijd, geslacht en bloeddruk. Veneuze tortuositeit was invers geassocieerd met wittestofafwijkingen op de MRI gemeten met de Fazekas-score in controles [β -0.56, $p < 0.01$], terwijl vaatdichtheid in de buitenring van de macula invers geassocieerd was met Fazekas-score in AD-gevallen [β -0.64, $p < 0.01$]. Concluderend ondersteunen de bevindingen van onze observationele studie in Deel II het gebruik van retinale vasculaire parameters als biomarker voor het dementiestadium van AD niet. Onze bevindingen kunnen een intrinsieke betrokkenheid van retinale microvasculatuur bij AD-pathofysiologie dan ook niet ondersteunen. Omdat ons cohort bestond uit

patiënten met relatief weinig vasculaire comorbiditeit zijn studies in *'vascular cognitive impairment'* (VCI) en *'mixed'*-pathologie gerechtvaardigd om het gebruik van retinale vasculaire parameters te beoordelen en om mogelijke vasculaire (co)-pathologie in deze populaties te detecteren.

In Deel III (Hoofdstuk 7, 8, 9) hebben we 1) de binding van curcumin aan amyloïd en tau in post-mortem AD hersenweefsel, 2) de aanwezigheid van AD neuropathologie (amyloïd-beta (A β) en Tau) in post-mortem AD retina's en 3) de mogelijkheid van in-vivo beeldvorming van amyloïd in de retina met behulp van PIB-PET en 'targeted' fluorescentie met curcumin als fluorescent label, onderzocht.

Curcumin, de werkzame stof in kurkuma, bindt aan A β ^{7,13-15} en is van nature fluorescerend¹⁶ en zou daarom een interessant label kunnen zijn voor in-vivo diagnostiek¹⁷. Oraal toegediende curcumin wordt echter slecht geabsorbeerd in de darmen en belemmert derhalve de biologische beschikbaarheid¹⁸. Dit heeft geleid tot de ontwikkeling van bio-beschikbare vormen van curcumin die de bio-beschikbaarheid verhogen¹⁹⁻²¹. Curcumin dat wel de systemische circulatie bereikt, wordt door de lever geconjugeerd om de wateroplosbaarheid en renale klaring te verhogen en vertegenwoordigt het grootste deel van de circulerende curcuminoïden¹⁸.

In Hoofdstuk 7 hebben we de bindingseigenschappen van curcumin, haar conjugaten en bio-beschikbare vormen onderzocht. In een post-mortem studie hebben we mortem hersenweefsel van AD, fronto-temporale dementie (FTD) (met onderliggende pathologiën: tau, TDP-43 en de ziekte van Pick), *primary age-related tauopathy* (PART), de ziekte van Parkinson (PD), en dementie met Lewy-lichaampjes (DLB) en controles beoordeeld. Met behulp van deze post-mortem studie toonden we aan dat curcumin, haar isovormen, conjugaten en bio-beschikbare vormen binden aan fibrillaire A β -plaques en cerebrale amyloïd angiopathie (CAA) en in mindere mate neurofibrillaire tangles in post-mortem AD hersenweefsel, wat eerdere studieresultaten^{13,15,22} bevestigt.

Wij toonden als eerst aan dat verschillende curcuminvormen geen specifieke binding vertonen in de hersenen van gezonde controles of met kenmerkende pathologie in neurodegeneratieve aandoeningen. Omdat conjugaten en bio-beschikbare curcuminevormen vergelijkbare bindingseigenschappen vertoonden, kunnen curcumin, haar isovormen en conjugaten interessante kandidaten zijn voor in-vivo diagnostiek naar AD met behulp van een 'targeted' fluorescentiebenadering en vormen dan ook de basis voor de studieopzet beschreven in hoofdstuk 9.

In Hoofdstuk 8 hebben we de aanwezigheid van neuropathologische kenmerken van AD in post-mortem netvlies van AD-patiënten onderzocht door de retina's van 6 AD-patiënten

en 6 controles van de Nederlandse Hersenbank te vergelijken. Formaline gefixeerde netvliezen werden in kwadranten gesneden en 'cross-sections' van het mediale en superieure netvlies werden gemaakt. Immuno-histochemische (IHC) kleuringen werden uitgevoerd voor A β , amyloïd precursor-eiwit (APP) en gefosforyleerd (pTau). We toonden aan dat diffuus pTau in de retina AD-patiënten van controles kon onderscheiden. Daarentegen verschilde immunoreactiviteit voor APP en A β in het netvlies niet tussen groepen en toonde een belangrijke overlap. We observeerden verhoogde immunoreactiviteit voor anti-A β /APP-antilichamen intracellulair en in kleine extracellulaire deposities in AD en controles die negatief waren voor 4G8- en curcuminkleuringen. Een deel van deze deposities kan worden gekarakteriseerd als corpora amylacea. Een deel van de deposities kan echter niet als corpora amylacea gekarakteriseerd worden en hun betekenis blijft derhalve onduidelijk. Verder typering van deze deposities kan helpen om de relevantie voor AD-pathologie te bepalen.

Samenvattend vonden we dat AD-pathologie in de retina anders lijkt te zijn dan AD-pathologie in de cortex. Tau-gerelateerde veranderingen bleken aanwezig te zijn in AD retina's, wat suggereert dat tau in de retina een potentiële moleculaire biomarker in het netvlies voor AD is. Translatie van deze bevindingen naar een in-vivo studieopzet met behulp van bijvoorbeeld 'targeted' fluorescentie zou kunnen bijdragen aan een non-invasieve AD-diagnose en het meten van therapie-effecten in medicijnstudies.

In Hoofdstuk 9 hebben we gepoogd bevindingen van Koronyo²³ te repliceren, die amyloïd in de retina in AD-patiënten visualiseerde met behulp van curcumin als fluorescent label. In onze studie hebben we met twee bio-beschikbare vormen van curcumin als fluorescent label geen verhoogde fluorescentie zichtbaar gemaakt na curcumine-inname in amyloïd bewezen AD-patiënten. Voorzichtigheid is echter geboden bij het interpreteren van deze bevindingen, omdat mogelijk onvoldoende hoeveelheden curcumin het netvlies bereikt hebben om met succes de amyloïdpathologie te labelen. Dit kan te wijten zijn aan een relatief lagere biologische beschikbaarheid van Theracurmin en Novasol versus Longvida curcumin, zoals gebruikt in een eerdere studie²³. Deze bevindingen benadrukken daarom de noodzaak van een onafhankelijke replicatie van Koronyo's studieopzet met behulp van een vergelijkbare curcuminpreparaat (Longvida).

Desalniettemin ondersteunen de bevindingen van onze ex-vivo studie de aanwezigheid van fibrillair A β in post-mortem AD retinas niet, vergelijkbaar met de bevindingen uit drie eerdere studies²⁴⁻²⁶. Dit werpt de vraag op of de bevindingen van Koronyo mogelijk drusen kunnen representeren, afzettingen die geassocieerd zijn met verhoogde leeftijd en leeftijdsgerelateerde maculadegeneratie en tevens A β ^{27,28} bevatten. Vervolgonderzoek met behulp van retinale flatmounts is nodig om de aanwezigheid van fibrillar amyloïd in het netvlies uit te sluiten dan wel aan te tonen en de rol van drusen in AD te beoordelen.

Discussie

Onze cohorten beschreven in Deel I en Deel II van dit proefschrift omvatten goed gedefinieerde AD-patiënten en controles die voldeden aan recent gepubliceerde NIA-AA criteria⁴ van twee internationaal gerespecteerde tertiaire geheugenklinieken; het Amsterdam Dementia Cohort (ADC) van het Amsterdam Alzheimer Center en het University College (UCL) London Dementia Research Centre (DRC). Alle deelnemers werden klinisch beoordeeld door neurologen gespecialiseerd in cognitieve stoornissen.

Biomarkers voor neurodegeneratie, neuronale schade en amyloïd werden gebruikt om de klinische diagnose (MRI, CSF en PET) te ondersteunen. In onze 'oogcohorten' van het ADC voerden we een uitgebreide oogheelkundige 'baseline meting' uit om bijkomende oogheelkundige pathologie, zoals leeftijdsgebonden macula degeneratie (AMD), glaucoom en diabetes mellitus, uit te sluiten. In het UCL-DRC-cohort, een retrospectief cohort, werd geen oogheelkundige baseline uitgevoerd. De oogheelkundige voorgeschiedenis van de deelnemers en de OCT- en fundusfoto's werden beoordeeld door een deskundige oogarts ter uitsluiting van comorbide pathologie. Daarom kunnen subtiele, pre-klinische veranderingen van glaucoom en diabetische retinopathie niet volledig worden uitgesloten in het UCL-DRC-cohort.

Het werven van patiënten via een tertiaire geheugenkliniek (zowel in Amsterdam als Londen) kan selectiebias hebben veroorzaakt. In vergelijking met andere geheugenklinieken zijn onze AD-patiënten over het algemeen jonger (gemiddeld 65 jaar) en een groot deel van de gevallen wordt gedefinieerd als EOAD. We hebben deze populatie bewust gekozen om directe effecten van AD-pathologie te beoordelen zonder substantiële bijdragen van leeftijdsgerelateerde factoren. In de loop van onze studie hypothesizeerde we dat het netvlies anders betrokken zou kunnen zijn bij EOAD in vergelijking met LOAD, wat een mogelijke verklaring zou kunnen zijn voor de negatieve bevindingen in onze pilot-cohort. In Hoofdstuk 3 hebben we daarom tevens LOAD-patiënten geïncludeerd. Deze analyses leverden echter vergelijkbare resultaten op en ondersteunden de hypothese van verschillende betrokkenheid van netvliesverdunding in EOAD versus LOAD niet.

Een tweede beperking is dat we in onze studies alleen het centrale netvlies hebben beoordeeld en niet het perifere netvlies. In onze klinische studies hebben we verschillende beeldvormingsmethoden gebruikt, waaronder OCT, fundusfotografie, OCTA en 'targeted' fluorescentie. Al deze technieken gebruiken een lens van 30 graden en brengen derhalve alleen het centrale netvlies in beeld. Er is echter een toenemende

belangstelling voor het perifere netvlies in de oogheelkunde, door de recente ontwikkeling van *widefield-imaging* tot wel 200 graden²⁹. Hierdoor is het in de toekomst wel mogelijk om deze techniek in het huidig onderzoek te implementeren en in-vivo het perifere netvlies te onderzoeken. We hebben het perifere netvlies wel onderzocht in onze post-mortemstudie. Hierin hebben we waargenomen dat hyperfosforylatie van tau prominenter aanwezig is in de perifere retina. Bovendien werd een vergelijkbare perifere gradiënt, zowel post-mortem als in-vivo, waargenomen door Koronyo en collega's²³. Omdat in-vivo veranderingen in de perifere retina niet werden beoordeeld in het onderzoek uit dit proefschrift, zal toekomstig onderzoek zich ook richten op de perifere retina met behulp van *widefield-imaging*.

In onze post-mortemstudies gebruikten we weefsel van goed gedefinieerde proefpersonen van de Nederlandse Hersenbank met een pathologische diagnose op basis van NIA-AA-criteria³⁰. Onze analyses naar A β en tau bestonden uit kwalitatieve methoden met behulp van *cross-sections* van het netvlies. Met behulp van een groot aantal antilichamen konden we AD gerelateerde pathologie bestuderen. Het belangrijkste nadeel van deze methode is het beperkte aantal *cross-sections* dat kan worden geanalyseerd, slechts een relatief klein deel van het gehele oppervlak van het netvlies representerend, wat 'sampling bias' zou kunnen veroorzaken. Om het bestudeerde oppervlak van het netvlies te vergroten en de *sampling bias* van het gebruik van *cross-sections* te vermijden, kunnen flatmounts worden gemaakt voor fluorescerende of immuno-histochemische (IHC)-kleuring. Door de neuro-retina uit de oogbol te prepareren en radiale incisies te plaatsen, kan de neuro-retina op een glaasje worden gelegd en vervolgens worden verwerkt en gekleurd. In ons cohort voerden we experimenten uit op kalfs- en humane ogen om extractie en kleuring van de neuro-retina te testen. Ondanks protocollen voor enzymatische digestie van glasvocht, bleven glasvochtresten achter op het netvlies wat de penetratie van antilichamen bemoeilijkte. Hierdoor was betrouwbare interpretatie van kleuringen onmogelijk. Toekomstige studies in samenwerking met een vitreoretinale chirurg zullen worden uitgevoerd om het glasvocht volledig te verwijderen en deze technische problemen op te lossen. Op die manier kunnen we de retina als doorsnede én als geheel beoordelen en zowel de centrale/perifere verdeling van pathologie als de verdeling over verschillende netvlieslagen analyseren.

Onafhankelijke studies met vergelijkbare protocollen voor weefselverwerking/kleuring zijn nodig om discrepanties tussen verschillende laboratoria met betrekking tot aanwezigheid van amyloïd in de retina te verhelpen²³⁻²⁶. Deze onderzoeken helpen om te bepalen welke van de waargenomen veranderingen in het netvlies leeftijdgerelateerd zijn en welke gerelateerd zijn aan AD en zouden zo aangrijpingspunten kunnen identificeren voor in-vivo beeldvorming. Optische technieken kunnen vervolgens worden afgestemd op de waargenomen veranderingen in het netvlies. Toekomstig

onderzoek in post-mortem retinas zou zich moeten richten op het repliceren van eerdere bevindingen van amyloid en gefosforyleerd tau met behulp van een flat-mount benadering, het uitbreiden van de beoordeling van gefosforyleerd tau in AD en andere neurodegeneratieve ziekten en kwantificering van deze bevindingen. Alvorens tau in de retina te transleren naar een in-vivo studieopzet, stellen we voor het cohort met AD en controles uit te breiden met de gehele bandbreedte van tau- en amyloïd stadia, rekening houdend met leeftijd als versturende factor. Daarnaast is het beoordelen van andere tauopathieën, zoals frontotemporale dementie (FTD), progressieve supranucleaire verlamming (PSP), corticobasale degeneratie (CBD) en glaucoom nodig om de specificiteit van tau hyperfosforylering in de retina voor AD te bepalen. Verschillende methoden kunnen worden gebruikt om bevindingen te kwantificeren. Kwantificering van IHC-kleuringen, ELISA/Simoa-analyse op retinale lysaten, (imaging) massa spectrometrie en/of proteomics of RNA-analyses kunnen worden gebruikt voor het detecteren en kwantificeren van moleculaire veranderingen in de retina. Correlatie met corticale pathologie kan uiteindelijk worden gebruikt om relaties tussen moleculaire veranderingen in de retina en cortex te beoordelen.

Conclusies en een blik op de toekomst

De bevindingen van dit proefschrift suggereren dat moleculaire veranderingen, en niet zozeer structurele (netvliesverdunding) of vasculaire retinale veranderingen, de meeste potentie hebben als biomarkers voor AD. We hebben aangetoond dat hypergefosforyleerd tau kan worden waargenomen in post-mortem AD retinas. Met opkomende technieken zoals ‘targeted’ fluorescentie zouden deze bevindingen een stap naar moleculaire beeldvorming in het netvlies voor neurodegeneratieve ziekten kunnen betekenen. Gezien de non-invasieve aard en de hoge resolutie van retinale beeldvorming zou deze benadering grote voordelen kunnen hebben voor vroegdiagnostiek van neurologische aandoeningen. Een recente proof-of-concept studie van Cordeiro toont veelbelovende validatie van ‘targeted’ fluorescentie als methode, waarbij in-vivo celapoptose wordt getoond bij glaucoompatiënten³¹. Beeldvorming van moleculaire veranderingen in oogheelkundige ziekten kunnen worden vertaald naar neurodegeneratieve ziekten, omdat de grootste gemene deler bij neurodegeneratie de accumulatie van verkeerd gevouwen eiwitten is³². Beoordeling van de aanwezigheid van ziektespecifieke eiwitten: bijv. *α-synucleïne* bij de ziekte van Parkinson, Parkinson-dementie, dementie met Lewy-lichaampjes en multipele systeematrofie; *tau* in frontotemporale dementie, AD, progressieve supranucleaire verlamming en corticobasale degeneratie; en *amyloid* in AD in post-mortem retinas kunnen helpen bij het identificeren van aangrijpingspunten voor in-vivo moleculaire beeldvorming van de retina. Nieuwe (labelvrije) technieken zoals ‘two-photon’-microscopie³³, (gestimuleerde) Raman³⁴ en hyperspectrale beeldvorming³⁵ kunnen technieken zijn om deze moleculaire veranderingen in het netvlies in de toekomst zichtbaar te maken.

Ten slotte zouden ‘artificial intelligence’ (AI) en ‘machine learning’ kunnen bijdragen aan de zoektocht naar nieuwe biomarkers voor AD. Een voorbeeld: geen enkele oogarts zal in staat zijn om het geslacht van een patiënt te bepalen op basis van een fundusfoto. Computeralgoritmes getraind met grote datasets van fundusfoto’s kunnen dit echter wel^{36,37}. Onlangs zijn ‘artificial intelligence’ en ‘machine learning’ toegepast in de oogheelkunde om bijvoorbeeld glaucoom, AMD en diabetische retinopathie te detecteren³⁷⁻³⁹. Het toepassen van vergelijkbare methoden op oogscans van AD-patiënten en controles zouden kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van niet-invasieve diagnostische of screeningstools voor AD. Een project waarbij hyperspectrale beeldvormende gegevens van het netvlies worden gebruikt om amyloïddepositie in de hersenen te voorspellen, zal worden gestart in het ADC met behulp van een dergelijke benadering.

Referenties

1. Association As. Alzheimer's disease facts and figures. https://www.alz.org/documents_custom/2018-facts-and-figures.pdf. 2018.
2. Cummings JL. Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. Jul 01 2004;351(1):56-67.
3. Scheltens P, Blennow K, Breteler MMB, et al. Alzheimer's disease. *The Lancet*. 2016;388:505-517.
4. Jack CR, Jr., Bennett DA, Blennow K, et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. Apr 2018;14(4):535-562.
5. Hinton DR, Sadun AA, Blanks JC, Miller CA. Optic-nerve degeneration in Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. Aug 21 1986;315(8):485-487.
6. Blanks JC, Torigoe Y, Hinton DR, Blanks RH. Retinal pathology in Alzheimer's disease. I. Ganglion cell loss in foveal/parafoveal retina. *Neurobiol Aging*. May-Jun 1996;17(3):377-384.
7. Koronyo-Hamaoui M, Koronyo Y, Ljubimov AV, et al. Identification of amyloid plaques in retinas from Alzheimer's patients and noninvasive in vivo optical imaging of retinal plaques in a mouse model. *NeuroImage*. 2011;54(SUPPL. 1):S204-S217.
8. McGrory S, Cameron JR, Pellegrini E, et al. The application of retinal fundus camera imaging in dementia: A systematic review. *Alzheimer's & dementia (Amsterdam, Netherlands)*. 2017;6:91-107.
9. Lee CS, Larson EB, Gibbons LE, et al. Associations between recent and established ophthalmic conditions and risk of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. Aug 2 2018.
10. Ong SS, Doraiswamy PM, Lad EM. Controversies and Future Directions of Ocular Biomarkers in Alzheimer Disease. *JAMA Neurol*. Jun 1 2018;75(6):650-651.
11. Konijnenberg E, Carter SF, Ten Kate M, et al. The EMIF-AD PreclinAD study: study design and baseline cohort overview. *Alzheimers Res Ther*. Aug 4 2018;10(1):75.
12. Benson DF, Davis RJ, Snyder BD. Posterior cortical atrophy. *Arch Neurol*. Jul 1988;45(7):789-793.
13. Mutsuga M, Chambers JK, Uchida K, et al. Binding of Curcumin to Senile Plaques and Cerebral Amyloid Angiopathy in the Aged Brain of Various Animals and to Neurofibrillary Tangles in Alzheimer's Brain. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2012;74(1):51-57.
14. Yang F, Lim GP, Begum AN, et al. Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J Biol Chem*. Feb 18 2005;280(7):5892-5901.
15. Veldman ER, Jia Z, Halldin C, Svedberg MM. Amyloid binding properties of curcumin analogues in Alzheimer's disease postmortem brain tissue. *Neurosci Lett*. Sep 06 2016;630:183-188.
16. Hun Bong P. *Spectral and Photophysical Behaviors of Curcumin and Curcuminoids*. Vol 212000.
17. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curecumin": From kitchen to clinic. *Biochemical Pharmacology*. 2008;75(4):787-809.
18. Heger M, van Golen RF, Broekgaarden M, Michel MC. The molecular basis for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin and its metabolites in relation to cancer. *Pharmacol Rev*. 2014;66(1):222-307.
19. Kanai M, Otsuka Y, Otsuka K, et al. A phase I study investigating the safety and pharmacokinetics of highly bioavailable curcumin (Theracurmin®) in cancer patients. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2013;71(6):1521-1530.

20. Schiborr C, Kocher A, Behnam D, Jandasek J, Toelstede S, Frank J. The oral bioavailability of curcumin from micronized powder and liquid micelles is significantly increased in healthy humans and differs between sexes. *Mol Nutr Food Res*. Mar 2014;58(3):516-527.
21. Gota VS, Maru GB, Soni TG, Gandhi TR, Kochar N, Agarwal MG. Safety and pharmacokinetics of a solid lipid curcumin particle formulation in osteosarcoma patients and healthy volunteers. *J Agric Food Chem*. Feb 24 2010;58(4):2095-2099.
22. Mohorko N, Repovs G, Popovic M, Kovacs GG, Bresjanac M. Curcumin labeling of neuronal fibrillar tau inclusions in human brain samples. *J Neuropathol Exp Neurol*. Apr 2010;69(4):405-414.
23. Koronyo Y, Biggs D, Barron E, et al. Retinal amyloid pathology and proof-of-concept imaging trial in Alzheimer's disease. *JCI Insight*. Aug 17 2017;2(16).
24. Ho CY, Troncoso JC, Knox D, Stark W, Eberhart CG. Beta-amyloid, phospho-tau and alpha-synuclein deposits similar to those in the brain are not identified in the eyes of Alzheimer's and Parkinson's disease patients. *Brain Pathol*. Jan 2014;24(1):25-32.
25. Schön C, Hoffmann Na, Ochs SM, et al. Long-Term In Vivo Imaging of Fibrillar Tau in the Retina of P301S Transgenic Mice. *PLoS ONE*. 2012;7(12):1-9.
26. Williams EA, McGuone D, Frosch MP, Hyman BT, Laver N, Stemmer-Rachamimov A. Absence of Alzheimer Disease Neuropathologic Changes in Eyes of Subjects With Alzheimer Disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. May 01 2017;76(5):376-383.
27. Ohno-Matsui K. Parallel findings in age-related macular degeneration and Alzheimer's disease. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2011;30(4):217-238.
28. Bergen AA, Arya S, Koster C, et al. On the origin of proteins in human drusen: The meet, greet and stick hypothesis. *Prog Retin Eye Res*. Dec 17 2018.
29. Csincsik L, MacGillivray TJ, Flynn E, et al. Peripheral Retinal Imaging Biomarkers for Alzheimer's Disease: A Pilot Study. *Ophthalmic Res*. 2018;59(4):182-192.
30. Montine TJ, Phelps CH, Beach TG, et al. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: a practical approach. *Acta Neuropathol*. Jan 2012;123(1):1-11.
31. Cordeiro MF, Normando EM, Cardoso MJ, et al. Real-time imaging of single neuronal cell apoptosis in patients with glaucoma. *Brain : a journal of neurology*. Jun 1 2017;140(6):1757-1767.
32. Brettschneider J, Tredici KD, Lee VMY, Trojanowski JQ. Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies. *Nature Reviews Neuroscience*. 2015;16(2):109-120.
33. Sharma R, Williams DR, Palczewska G, Palczewski K, Hunter JJ. Two-Photon Autofluorescence Imaging Reveals Cellular Structures Throughout the Retina of the Living Primate Eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Feb 2016;57(2):632-646.
34. He S, Ye C, Sun Q, Leung CK, Qu JY. Label-free nonlinear optical imaging of mouse retina. *Biomed Opt Express*. Mar 1 2015;6(3):1055-1066.
35. More SS, Vince R. Hyperspectral Imaging Signatures Detect Amyloidopathy in Alzheimer 's Mouse Retina Well before Onset of Cognitive Decline. 2014.
36. Butler KT, Davies DW, Cartwright H, Isayev O, Walsh A. Machine learning for molecular and materials science. *Nature*. Jul 2018;559(7715):547-555.

-
37. Rahimy E. Deep learning applications in ophthalmology. *Curr Opin Ophthalmol*. May 2018;29(3):254-260.
 38. Shibata N, Tanito M, Mitsuhashi K, et al. Development of a deep residual learning algorithm to screen for glaucoma from fundus photography. *Sci Rep*. Oct 2 2018;8(1):14665.
 39. Yu K-H, Beam AL, Kohane IS. Artificial intelligence in healthcare. *Nature Biomedical Engineering*. 2018/10/01 2018;2(10):719-731.