Hornhaut

Mary N. Asiyo-Vogel¹ · Norbert Koop² · Ralf Brinkmann² · Ralf Engelhardt² · Reinhard Eggers³ · Reginald Birngruber² · Alfred Vogel²

- ¹ Augenklinik, Medizinische Universität Lübeck
- ² Medizinisches Laserzentrum Lübeck
- ³ Anatomisches Institut, Medizinische Universität Lübeck

Darstellung von LTK-Läsionen durch optische Kurzkohärenztomographie (OCT) und Polarisationsmikroskopie nach Sirius-Rot-Färbung*

Zusammenfassung

Hintergrund: Für die Kontrolle der Laserdosis und der postoperativen Entwicklung bei Laserthermokeratoplastik (LTK) sind Informationen über die Ausdehnung und das Ausmaß der thermischen Läsionen von großer Bedeutung. Wir verglichen den Informationsgehalt der Darstellung frischer LTK-Läsionen durch Optische Kurzkohärenztomographie [optical low coherence tomography (OCT)] mit der histologischen Darstellung durch Polarisationsmikroskopie. Methode: Die Kornea von Schweineaugen wurde in vitro durch eine 400-µm-Quarzfaser mit Licht aus einer Laserdiode bestrahlt, die bis zu 300 mW bei λ =1,86 µm emittiert. Es wurden OCT-Querschnittsbilder verschieden starker Läsionen mit etwa 25 µm lateraler und 20 µm axialer Auflösung aufgenommen. Die mit OCT analysierten Bereiche wurden histologisch durch Polarisationsmikroskopie nach Sirius-Rot-Färbung untersucht und mit der Darstellung durch TEM verglichen.

Ergebnisse: Es konnten 3 Schadenszonen unterschieden werden: Übergangszone, mäßige und starke Koagulation. In der Übergangszone korrelierte die unter Polarisation sichtbare verstärkte Doppelbrechung mit einer Zunahme des OCT-Signals. Bei mäßiger Koagulation ging eine Abnahme der Doppelbrechung mit einer weiteren Zunahme des OCT Signals einher. Bei starker Koagulation im Zentrum der Läsion ging die Kollagenfaserstruktur weitgehend verloren, wodurch Doppelbrechung und OCT-Signal fast völlig verschwinden.

Schlußfolgerungen: OCT liefert zwar eine weniger detaillierte Information über ther-

mische Gewebsveränderungen als eine histologische Untersuchung, gibt aber Aufschluß über die Ausdehnung und das Ausmaß der Veränderungen und ermöglicht eine nichtinvasive Darstellung und Verlaufskontrolle von LTK-Läsionen ohne Präparationsartefakte. Eine quantitative Analyse der Veränderung der Hornhautdicke ist leichter möglich als mit der Spaltlampe. Zeitaufgelöste Messungen der Lichtstreuung können zur Online-Kontrolle der Laserdosis bei der LTK verwendet werden.

Schlüsselwörter

Refraktive Hornhautchirurgie · Laserthermokeratoplastik · Kollagendenaturierung · Optische Kurzkohärenztomographie · Polarisationsmikroskopie · Sirius-Rot-Färbung

Gegenwärtig wird die Laserthermokeratoplastik (LTK) als neue Methode zur Korrektur von Hyperopie und Astigmatismus entwickelt [5, 12, 16]. Außer den topographischen Daten sind dabei für die Kontrolle der Laserdosis und der postoperativen Entwicklung der Gewebseffekte Informationen über die Ausdehnung und das Ausmaß der thermischen Läsionen von großer Bedeutung.

Ein etabliertes Verfahren zur Untersuchung thermischer Hornhautläsionen ist die Polarisationsmikroskopie, mit der Veränderungen der Doppelbrechung des Hornhautstromas registriert werden [18]. Wir haben kürzlich darüber berichtet, wie sich mit Hilfe von Sirius-Rot-Färbung thermische Hornhautveränderungen unter Polarisationsmikroskopie besonders differenziert und kontrastreich darstellen lassen [2]. Ein Nachteil dieser histologischen Untersuchungsmethode ist, daß sie invasiv ist und keine Verlaufskontrolle bei ein und derselben Läsion ermöglicht. Hier bietet sich ein neuartiges Verfahren an, mit dem sich LTK-Läsionen in vivo darstellen lassen: die optische Kurzkohärenztomographie [optical coherence tomography (OCT)] [7,8], die auf der Erfassung des aus der Hornhaut zurückgestreuten Lichts basiert. Die Streueigenschaften der Hornhaut ändern sich bei Koagulation, können also - wie die Veränderung der Doppelbrechung - ebenfalls zur Analyse thermischer Veränderungen benutzt werden. In der vorliegenden Untersuchung wird der Informationsgehalt der Darstellung von LTK-Läsionen durch optische Kurzkohärenztomographie mit der histologischen Darstellung durch Polarisationsmikroskopie verglichen, und es wird diskutiert, wie darauf aufbauend Verfahren zur Optimierung der Kollagenkontraktion bei LTK entwickelt werden können.

Den Änderungen der Doppelbrechung und der Streueigenschaften der Hornhaut liegen Veränderungen der Kol-

Dr. M. N. Asiyo-Vogel

^{*} Vortrag gehalten auf der 94. Tagung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft

Augenklinik, Medizinische Universität Lübeck, Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lübeck

Ophthalmologe 1997 · 94:487–491 © Springer-Verlag 1997

M.N. Asiyo-Vogel · N. Koop · R. Brinkmann · R. Engelhardt · R. Eggers · R. Birngruber · A. Vogel

Evaluation of LTK lesions by optical low coherence tomography (OCT) and polarization microscopy after Sirius-Red staining

Summary

Background: Information on the extent and degree of the thermal effect produced is of great importance for control of the laser dosage in laser thermokeratoplasty (LTK) and for postoperative follow-up. We investigated on acute LTK effects which information images obtained by optical low coherence tomography (OCT) offer compared to those obtained by polarization microscopy.

Methods: Porcine eyes were irradiated through a 400 μ m quartz fiber using light from a laser diode emitting up to 300 mW at a wavelength of 1.86 μ m. Thermal lesions of varying strength were scanned using an experimental OCT device with about 25 μ m lateral and 20 μ m axial resolution. Histologic evaluation of the scanned areas was done by polarization microscopy after Sirius-Red staining, and similar lesions were also analyzed by TEM.

Results: Both methods differentiated three damage zones: a transition zone, a zone of moderate coagulation, and a central zone of strong coagulation. In the transition zone, increased birefringence was seen in polarization microscopy, which correlated with increased light scattering seen in the OCT images. In the moderately coagulated zone, a decrease in birefringence was associated with an even stronger increase of the OCT signal. In the central zone, a loss of the fibrillar tissue structure was observed, which led to a complete loss of birefringence and a strong reduction of the OCT signal.

Conclusions: Although OCT does not provide the detailed information on thermal changes of tissue seen by the histologic method, it offers information on the extent and degree of tissue changes without preparation artifacts and provides a non-invasive method of immediate and follow-up control of LTK lesions. A quantitative analysis of changes in corneal thickness and curvature is much simpler than by a slit lamp. Timeresolved measurements of corneal light scattering may be used for on-line control of the laserlight dosage during LTK.

Key words

Refractive surgery · Laser thermokeratoplasty · Collagen denaturation · Collagen shrinkage · Optical low coherence tomography · Polarization microscopy · Sirius-Red staining

Hornhaut

lagenfaserstruktur zugrunde [3, 13, 19, 20]. Um die jeweiligen Phänomene auf makroskopischer (Lichtstreuung) und lichtmikroskopischer Ebene (Doppelbrechung) besser interpretieren zu können, untersuchten wir daher durch Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) auch die ultrastrukturellen Veränderungen bei thermischer Denaturierung.

Material und Methode

Erzeugung der LTK-Läsionen

Es wurden frisch enukleierte Schweineaugen benutzt, die bis zum Experiment maximal 5 h in physiologischer Kochsalzlösung bei 10°C aufbewahrt wurden. Kurz vor der Laserbestrahlung wurden die Bulbi in Kochsalzlösung mit Raumtemperatur transferiert. Das Hornhautepithel wurde entfernt, und durch einen Infusionstropf wurde der normale intraokulare Druck aufrechterhalten, um Artefakte durch eine mechanische Verformung der Hornhaut zu vermeiden. Die Kornea wurde dann mit Licht aus einer Laserdiode (Spectra Diode Labs SDL 6432-P2) bestrahlt, die bei einer Wellenlänge von 1,86 μ m emittierte [6]. Die optische Eindringtiefe der Laserstrahlung beträgt bei dieser Wellenlänge etwa 700 μm [10], d.h. etwas weniger als die mittlere Dicke der Schweinehornhaut, die von uns zu 840 um bestimmt wurde. Das Laserlicht wurde in eine 400-µm-Quarzfaser eingekoppelt und die Kornea im Nonkontaktverfahren 10 s lang bestrahlt. Verschiedene Läsionsstärken wurden durch Veränderung der Laserleistung zwischen 100 und 250 mW erreicht. Es wurden jeweils 6 Augen mit 100 mW, 150 mW, 200 mW und 240 mW bestrahlt.

Optische Kurzkohärenztomographie

Die Bildgebung durch optische Kurzkohärenztomographie erfolgt, indem ein fokussiertes Lichtbündel in das Gewebe eingestrahlt und die Verzögerungszeit gemessen wird, nach der das rückgestreute Licht den Detektor erreicht. Das OCT-Verfahren liefert daher Schnittbilder senkrecht zur Gewebsoberfläche, die dem Ultraschall-B-Scan ähneln. Während aber beim Ultraschall die Ortsinformation durch direkte Laufzeitmessung gewonnen wird, erhält man sie bei OCT indirekt durch Interferometrie mit Licht sehr kurzer Kohärenzlänge [7,8]. Die Auflösung beim OCT ist deutlich besser als beim Ultraschall: Sie beträgt bei dem von uns verwendeten experimentellen OCT-Gerät [14] etwa 25 µm in lateraler und 20 µm in axialer Richtung. Die axiale Ortsauflösung ist dabei durch die Kohärenzlänge der verwendeten Lichtquelle gegeben (Superlumineszenzdiode mit einer Kohärenzlänge von 25-30 µm in Luft und etwa 20 µm im Gewebe), und die laterale Auflösung ist durch die numerische Apertur der Meßanordnung bestimmt.

Es wurden unmittelbar nach der Laserbestrahlung Querschnittbilder einzelner Läsionen verschiedener Stärke aufgenommen (n=5 für jede Läsionsstärke). Zum Vergleich wurden die Läsionen auch bei normaler Spaltlampenbeleuchtung mit etwa 100 μ m Spaltbreite fotografiert.

Histologie

Die mit OCT dargestellten Läsionen wurden histologisch durch Polarisationsmikroskopie nach Sirius-Rot-Färbung untersucht, und vergleichbare Läsionen (n=5) wurden außerdem transmissionselektronenmikroskopisch analysiert. Die Augen wurden für die lichtmikroskopische Untersuchung in 4% Neutralformalin in Natriumphosphatpuffer fixiert und für die Elektronenmikroskopie in 4% Glutaraldehyd in Natriumkakodylatpuffer. Um eine schnelle Fixierung zu erreichen und mechanische Deformationen der Hornhaut zu vermeiden, wurde das Fixativ in die Vorderkammer injiziert und die gesamten Bulbi für 2 h in die Fixationslösung eingetaucht. Danach wurden die Hornhäute mit einem Trepan exzidiert und über Nacht weiterfixiert. Die Präparate wurden anschließend unter Verwendung von Standardverfahren für die Lichtund Elektronenmikroskopie vorbereitet.

Paraffinschnitte mit 7 µm Dicke wurden mit Pikrosiriusrot gefärbt [2, 9, 15] und polarisationsmikroskopisch untersucht. Die Sirius-Rot-Färbung verstärkt die Doppelbrechung des normalen Hornhautkollagens, weil sich die elongierten, optisch anisotropen Farbstoffmoleküle parallel an die Tropokollagenmoleküle anlagern [15]. Koaguliertes Hornhautgewebe hingegen wird durch die Färbung nicht doppelbrechend, weil hier die Kollagenmoleküle verknäuelt sind und daher die Farbstoffmoleküle eine irreguläre, zufällige Orientierung haben. Die Sirius-Rot-Färbung verstärkt somit den Kontrast zwischen gesundem und denaturiertem Gewebe.

Ergebnisse

In Abb. 1, 2 werden repräsentative OCT-Bilder und polarisationsmikroskopische Aufnahmen histologischer Schnitte von einer schwachen und einer starken LTK-Läsion verglichen. Die Läsionen wurden mit 100 bzw. 240 mW Laserleistung erzeugt.

Im Zentrum der schwachen Läsion (Abb. 1) ist ein deutlicher Verlust an Doppelbrechung sichtbar, während der leichter koagulierte Randbereich sich als helleres Halo abhebt. Im OCT-Bild weisen beide Bereiche ein verstärktes Signal auf, was auf einer verstärkten Streuung des Lichts im koagulierten Gewebe beruht. Streuung tritt auch schon im Randbereich der Läsion, also bereits bei relativ leichter Koagulation auf.

Bei starken LTK-Läsionen (Abb. 2) sind die eben beschriebenen Veränderungen der Doppelbrechung und Streu-





achten. Im Zentrum ist die Doppelbrechung nun völlig verschwunden. Die Streuung ist hier aber bemerkenswerterweise nicht stärker als am Rand, sondern deutlich reduziert, mit Ausnahme des Bereichs unmittelbar an der Hornhautoberfläche. Ein ähnliches Erscheinungsbild zeigt sich auch im Spaltlampenbild der starken Läsion in Abb. 3. Abb. 4 zeigt die ultrastrukturellen

Veränderungen bei thermischer Denaturierung anhand von transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen von normalem Hornhautstroma, mäßig koaguliertem Stroma und stark koaguliertem hyalinisiertem Stroma. Bei zunehmender thermischer Denaturierung erfolgt ein zunächst gradueller und dann völliger Verlust der Kollagenfaserstruktur.

Diskussion

Die durch thermische Denaturierung hervorgerufenen Veränderungen der Hornhautstreuung und -doppelbrechung können durch Analyse der Kollagenveränderungen auf ultrastruktureller Ebene interpretiert werden. Abb. 4a zeigt als Referenz ein elektronenmikroskopisches Bild von normalem Hornhautstroma. Die regelmäßigen Abstände zwischen den Kollagenfibrillen bewirken, daß der mittlere Brechungsindex nahezu konstant ist, obwohl die Brechungsindizes des Kollagens und der Grundsubstanz sich unterscheiden. Die Konstanz des mittleren Brechungsindex in Bereichen, deren Abmessungen der halben Lichtwellenlänge entsprechen, ist die Grundlage für die Transparenz der Hornhaut [3, 11]. Die parallele Anordnung der Kollagenfibrillen und der -moleküle in den Fibrillen





ein schwaches Streusignal im OCT-Bild (Abb. 2a). Die elektronendichten Kondensate in der gelatinisierten Masse sind allerdings ein Indiz dafür, daß nach wie vor einige wenige Streuzentren vorhanden sind - stark koagulierte Hornhaut ist daher ebenso wie Gelatine nicht völlig transparent. Im mäßig koagulierten inneren Randbereich der Läsion ergibt sich ein ähnliches Bild wie im Zentrum der schwachen Läsion in Abb. 1. Ein OCT-Signal ist auch im endothelseitigen Randbereich unterhalb des stark koagulierten Läsionszentrums vorhanden. Dies ist ein Indiz dafür, daß es sich bei der signalarmen Fläche im Läsionszentrum nicht um einen Abschattungseffekt durch darüberliegende stark streuende Strukturen handeln kann. Die Herkunft der relativ starken Streuung nahe der Hornhautoberfläche im Zentrum des bestrahlten Bereichs ist noch nicht vollständig verstanden. Möglicherweise sind hier trotz Desintegration der Kollagenfaserstruktur durch inhomogene Dehydrierung des stark koagulierten Stromas weiterhin Brechungsindexfluktuationen vorhanden.

ner starken Läsion erscheint daher un-

ter Polarisationsmikroskopie völlig dun-

kel (Abb. 2b) und verursacht lediglich

Der äußere Randbereich der LTK-Läsionen erscheint unter Polarisationsmikroskopie heller als das normale Hornhautstroma (Abb. 1b, 2b). Dieses Phänomen ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß durch leichte thermische Veränderungen der Kollagenmoleküle im Randbereich vermehrt Sirius-Rot-Farbstoffmoleküle gebunden werden können, während die natürliche Kollagendoppelbrechung weitgehend intakt bleibt [2]. Durch die parallele Orientierung der doppelbrechenden Farbstoff- und Kollagenmoleküle wird die natürliche Doppelbrechung verstärkt. Das OCT-Signal im äußeren Randbereich der Läsionen ist stärker als im normalen Stroma, was auf verstärkte Lichtstreuung schließen läßt. Der histologisch deutlich sichtbare Übergang zwischen dem äußeren und inneren Randbereich der Läsion konnte mit OCT nicht eindeutig identifiziert werden.

Die mittels OCT gemachten Beobachtungen zur Streuung in LTK-Läsionen wurden durch das Spaltlampenbild verifiziert (Abb. 3). Die Spaltlampe liefert zwar ähnliche Information wie das OCT-Bild der Hornhaut, erfordert aber ei-

führt dazu, daß die Hornhaut sowohl intrinsisch als auch formdoppelbrechend ist [4, 11, 21].

Mäßige thermische Denaturierung führt zu einer Verknäuelung der Kollagenmoleküle in den Fibrillen und daher zu einer Verdickung der Fibrillen (Abb. 4b). Die Verknäuelung geht mit einem Verlust der intrinsischen Doppelbrechung einher, die auf der parallelen Anordnung der Kollagenmoleküle beruht. Die Faserstruktur bleibt zunächst noch weitgehend erhalten, solange nicht die Mehrzahl der kovalenten Bindungen zwischen den Kollagenmolekülen aufgebrochen ist. Die Fasern sind jedoch ausgefranst, und deshalb geht auch ein Teil der Formdoppelbrechung verloren. Der Verlust der intrinsischen Doppelbrechung und die Reduktion der Formdoppelbrechung führen dazu, daß das Läsionszentrum unter Polarisationsmikroskopie dunkler als normal erscheint (Abb. 1b). Ein Teil der Formdoppelbrechung bleibt erhalten, solange die Fasern nicht völlig desintegriert sind. Der Fibrillenabstand in denaturierter Hornhaut ist viel unregelmäßiger als in normaler Hornhaut (Abb. 4b). Diese Randomisierung der Abstände führt zu Brechungsindexfluktuationen auf makroskopischer Ebene und somit dazu, daß die Hornhaut nicht mehr transparent ist, sondern das Licht streut [3, 20] (Abb. 1a).

Bei starker Koagulation geht die Faserstruktur des Kollagens völlig verloren (Abb. 4c), und es bildet sich eine gelatineartige Substanz. Ohne Faserstruktur gibt es aber keine Brechungsindexvariationen mehr, und damit verschwinden sowohl die Basis für die Formdoppelbrechung als auch die Grundlage für die Streuung. Das Zentrum einen schrägen Einblick auf den Lichtschnitt. Nur bei einem bekannten und standardisierten Betrachtungswinkel eignet sie sich zur quantitativen Analyse von LTK-Läsionen. Das OCT-Bild stellt einen senkrechten Schnitt durch die Hornhaut dar und liegt sofort in digitalisierter Form vor. Mittels OCT lassen sich daher leichter eine morphometrische Analyse der Läsionen sowie eine Analyse von Änderungen der Hornhautdicke durchführen als mit der Spaltlampe.

Die OCT liefert zwar weniger detaillierte Information als ein histologischer Schnitt, doch ist sie nicht invasiv und führt zu keinen Präparationsartefakten, die die Hornhautdicke verändern. Sie erlaubt daher eine recht gute Verlaufskontrolle und -dokumentation der Hornhautveränderungen nach LTK.

Schlußfolgerungen

Die Ergebnisse unserer Analyse können dazu benutzt werden, um ein Feedback-System zur Online-Steuerung für die Laserthermokeratoplastik zu entwickeln. Der klinisch erwünschte Effekt der Hornhautkontraktion tritt auf, wenn sich die Kollagenmoleküle verknäueln und zusammenziehen, aber noch durch kovalente Bindungen miteinander verbunden bleiben [1, 13]. Dies ist nur bei einer moderaten Koagulation der Fall. Wenn bei höherer Temperatur die kovalenten Bindungen aufgebrochen werden und sich die Faserstruktur auflöst, relaxiert das Gewebe wieder [1, 17]. Wir haben gezeigt, daß dies mit einem Nachlassen der Streuung einhergeht. Es bietet sich daher an, zur Erzielung einer für die LTK optimalen Koagulation das Maximum der Lichtstreuung zu detektieren und den Laser abzuschalten, wenn dieses Maximum gerade überschritten wird.

Literatur

- 1. Allain JC, Le Lous M, Cohen-Solal L, Bazin S, Maroteaux P (1980) Isometric tensions developed during the hydrothermal swelling of rat skin. Connect Tissue Res 7:127–133
- Asiyo-Vogel MN, Brinkmann R, Notbohm H, Eggers R, Lubatschowski H, Laqua H, Vogel A (1997) Histologic analysis of thermal effects in laser-thermokeratoplasty and corneal ablation using sirius-red polarization microscopy. J Cataract Refract Surg 23:514–526
- 3. Benedek GB (1971) **Theory of transparency** of the eye. Appl Opt 10:459–473
- 4. Brewer DB (1957) Differences in the fine structure of collagen and reticulin as revealed by the polarising microscope. J Pathol Bacteriol 74: 371–385
- Brinkmann R, Dröge G, Koop N, Wördemann A, Schirner G, Birngruber R (1994) Investigations on laser thermokeratoplasty. Lasers Light Ophthalmol 6: 259–270
- Brinkmann R, Koop N, Kamm K, Geerling G, Kampmeier J, Birngruber R (1996) Laser thermokeratoplasty by means of a continuously emitting laser diode in the mid-IR. SPIE Proc 2390:66–75
- Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schumann JS, Stinson SG, Chang W, Hee MR, Flotte T, Gregory K, Puliafito CA, Fujimoto JG (1991) Optical coherence tomography. Science 254: 1178–1181
- Izatt JA, Hee MR, Swanson EA, Lin CP, Huang D, Schuman JS, Puliafito CA, Fujimoto JG (1994) Micrometer-scale resolution imaging of the anterior eye in vivo with optical coherence tomography. Arch Ophthalmol 112: 1584–1589
- Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR (1979) Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. Histochem J 11: 447–455

- Maher EF (1978) Transmission and absorption coefficients for ocular media of the rhesus monkey. Report SAM-TR-78-32, USAF School of Aerospace Medicine, Brooks Airforce Base, San Antonio, Texas 78235
- 11. Maurice DM (1984) **The cornea and sclera.** In: Davson H (ed) The eye, vol 1b, 3rd edn. Academic Press, New York London, pp 1–158
- Moreira H, Campos M, Sawusch MR, McDonnell JM, Sand B, McDonnell PJ (1993) Holmium laser thermokeratoplasty. Ophthalmology 100: 752–761
- Nimni ME, Harkness RD (1988) Molecular structure and functions of collagen. In: Nimni ME (ed) Collagen, vol 1, Biochemistry. CRC Press, Boca Raton, pp 1–78
- 14. Pan Y, Arlt S, Birngruber R, Engelhardt R (1996) Optical coherence tomography in turbid tissue: theoretical analysis and experimental results. SPIE Proc 2628:239–248
- Puchtler H, Sweat Waldrop F, Valentine LS (1973) Polarisation microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red FBA. Beitr Pathol 150: 174–187
- 16. Seiler T, Matallana M, Bende T (1990) Laser thermokeratoplasty by means of a pulsed holmium:YAG laser for hyperopic correction. Refract Corneal Surg 6:355–359
- Spörl E, Genth U, Schmalfuß K, Seiler T (1996) Thermo-mechanisches Verhalten der Hornhaut. Klin Monatsbl Augenheilkd 208: 112–116
- Thomsen S, Pearce JA, Cheong W-F (1989) Changes in birefringence as markers of thermal damage in tissues. IEEE Trans Biomed Eng 36: 1174–1179
- Thomsen S (1991) Pathological analysis of photothermal and photomechanical effects of laser-tissue interactions. Photochem Photobiol 53:825–835
- Twersky V (1975) Transparency of paircorrelated, random distributions of small scatterers, with applications to the cornea. J Opt Soc Am A 65:524–530
- Wolman M, Kasten FH (1986) Polarized light microscopy in the study of the molecular structure of collagen and reticulin. Histochemistry 85:41–49