

# Sağlıklı İnsan Korneasında Hücre ve Sinir Liflerinin İn Vivo Konfokal Mikroskopisi ile Değerlendirilmesi

## In Vivo Confocal Microscopic Evaluation of Cells and Nerve Fibers of the Healthy Human Cornea

Gülfidan BİTİRGEN,<sup>a</sup>  
Ahmet ÖZKAĞNICI<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Göz Hastalıkları Kliniği,  
Viranşehir Devlet Hastanesi, Şanlıurfa,  
<sup>b</sup>Göz Hastalıkları AD,  
Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi  
Meram Tıp Fakültesi, Konya

Geliş Tarihi/Received: 03.12.2013  
Kabul Tarihi/Accepted: 19.03.2014

*Bu çalışma sonuçlarının bir kısmı, TOD 47. Ulusal Oftalmoloji Kongresi (6-10 Kasım 2013, Antalya)'nde poster olarak sunulmuştur.*

Yazışma Adresi/Correspondence:  
Gülfidan BİTİRGEN  
Viranşehir Devlet Hastanesi,  
Göz Hastalıkları Kliniği, Şanlıurfa,  
TÜRKİYE/TURKEY  
gbtirgen@yahoo.com

**ÖZET Amaç:** Sağlıklı insan korneasında hücre dansiteleri ve sinir lifi parametrelerinin in vivo konfokal mikroskopisi ile değerlendirilmesi, ve bu bulguların yaş ve cinsiyet ile ilişkisinin incelenmesi. **Ge-reç ve Yöntemler:** Herhangi bir sistemik hastalığı bulunmayan 77 olgu (46 erkek, 31 kadın) çalışmaya dâhil edildi. Olguların santral korneaları lazer tarayıcı in vivo konfokal mikroskop ile değerlendirildi. Analizler için gözlerden biri rastgele seçildi. Bazal epitel hücreleri, ön ve arka stromal keratosit ve endotel hücre dansiteleri ile sub-epitelyal sinir lifi yapısı incelendi. **Bulgular:** Olguların ortalama yaşı  $44,5 \pm 18,1$  yıl (15-80 yıl) olup, kadın ve erkek cinsiyet arasında yaş ortalaması yönünden anlamlı fark izlenmedi ( $p=0,715$ ). Ortalama bazal epitel hücre dansitesi  $5846 \pm 393$  hücre/mm<sup>2</sup>, ön stromal keratosit dansitesi  $795 \pm 151$  hücre/mm<sup>2</sup>, arka stromal keratosit dansitesi  $318 \pm 56$  hücre/mm<sup>2</sup>, endotel hücre dansitesi  $2743 \pm 329$  hücre/mm<sup>2</sup>, sub-epitelyal sinir lifi dansitesi  $32,9 \pm 8,9$  major sinir lifi/mm<sup>2</sup>, sinir dalı dansitesi  $67,5 \pm 34,3$  sinir dalı/mm<sup>2</sup> ve sinir lifi uzunluğu  $23,5 \pm 3,7$  mm/mm<sup>2</sup> olarak tespit edildi. Kadın ve erkek cinsiyet arasında ölçülen parametrelerin hiçbirinde anlamlı farklılık izlenmedi (hepsi için  $p>0,05$ ). Yaş ile ön stromal keratosit dansitesi ( $r=-0,248$ ;  $p=0,03$ ), arka stromal keratosit dansitesi ( $r=-0,557$ ;  $p<0,001$ ) ve endotel hücre dansitesi ( $r=-0,590$ ;  $p<0,001$ ) arasında negatif korelasyon izlenirken, bazal epitel hücre dansitesi ve sinir lifi parametrelerinde ise anlamlı bir korelasyon saptanmadı (hepsi için  $p>0,05$ ). **Sonuç:** Lazer tarayıcı in vivo konfokal mikroskopisi, korneanın yapısal olarak incelenmesine imkan sağlayan, invaziv olmayan, güvenilir bir yöntemdir. Bu çalışmada sağlıklı kornealardaki hücre dansitesi ve sinir lifi parametrelerine ait normal veriler sunulmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Kornea; mikroskopisi, konfokal; sinir lifleri

**ABSTRACT Objective:** To quantify baseline normative data for corneal cell densities and nerve fiber parameters in the healthy human cornea using laser scanning in vivo confocal microscopy, and to evaluate the correlation of the data with age and gender. **Material and Methods:** The central corneas of 77 (46 males, 31 females) healthy subjects were assessed using a laser scanning in vivo confocal microscope. One eye was randomly chosen for analysis. Basal epithelial cell, anterior and posterior stromal keratocyte and endothelial cell densities, and sub-epithelial nerve structure were evaluated. **Results:** Mean age was  $44.5 \pm 18.1$  years (range 15-80 years), and there was no significant difference between male and female subjects in terms of age ( $p=0.715$ ). Mean cell densities were: basal epithelium  $5846 \pm 393$  cells/mm<sup>2</sup>, anterior stroma  $795 \pm 151$  cells/mm<sup>2</sup>, posterior stroma  $318 \pm 56$  cells/mm<sup>2</sup>, and endothelium  $2743 \pm 329$  cells/mm<sup>2</sup>. The mean sub-epithelial nerve fiber density, nerve branch density, and nerve fiber length were  $32.9 \pm 8.9$  fibers/mm<sup>2</sup>,  $67.5 \pm 34.3$  branches/mm<sup>2</sup> and  $23.5 \pm 3.7$  mm/mm<sup>2</sup>, respectively. No significant differences were found in any of the parameters between female and male subjects ( $p>0.05$  for all). There was a statistically significant negative correlation between age and anterior stromal keratocyte density ( $r=-0.248$ ;  $p=0.03$ ), posterior stromal keratocyte density ( $r=-0.557$ ;  $p<0.001$ ) and endothelial cell density ( $r=-0.590$ ;  $p<0.001$ ) whereas no significant correlation was observed between age and basal epithelial cell density or any of the nerve fiber parameters ( $p>0.05$  for all). **Conclusion:** Laser scanning in vivo confocal microscopy provides a safe, non-invasive method for the evaluation of human corneal microstructure. This study constitutes normative data of corneal cell densities and nerve fiber parameters in the healthy subjects.

**Key Words:** Cornea; microscopy, confocal; nerve fibers

doi: 10.5336/medsci.2013-38278

Copyright © 2014 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2014;34(2):256-61

**K**ornea, saydam yapısı nedeniyle in vivo muayenesi zor olan bir dokudur. Konvansiyonel biyomikroskopik muayenede çözünürlük ancak 20  $\mu\text{m}$ 'dir. Bu durumda büyütmenin arttırılması, görüntünün daha da bulanık bir hal almasına yol açar. Kornea ve hastalıklarının değerlendirilmesinde son 20 yıl içinde kullanıma giren konfokal mikroskopi, kornea dokusunun in vivo olarak hücresel düzeyde incelenmesine imkan veren önemli bir teknolojik gelişmedir. Bu cihazlarda aydınlatma ve gözlem sistemleri tek bir noktaya odaklanmaktadır. Bu şekilde çözünürlük çok artmakta, ve korneanın 400-600 defa büyütülerek incelenmesi mümkün olmaktadır. Cihaz 670 nm dalga boylu diod lazer ışığı kullanır, oküler dokulara herhangi bir zarar verici etkisi yoktur. Konfokal mikroskopi ile koronal kesitler olarak kornea epiteli, Bowman tabakası, stroma, keratositler, sinirler ve kornea endoteli 1-2 mm çözünürlükte incelenebilir.<sup>1</sup>

Korneal konfokal mikroskopi, korneayı etkileyen hastalıklarla ilgili araştırmalarda geniş bir kullanım alanı bulmaktadır.<sup>2-7</sup> Anormal kornealarda elde edilen ölçümlerin kıyaslanabilmesi için, normal kornealara ait veriler büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada sağlıklı insan korneasında hücre dansiteleri ve sinir lifi parametrelerinin in vivo konfokal mikroskopi ile değerlendirilmesi, ve bu bulguların yaş ve cinsiyet ile ilişkisinin saptanması amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Herhangi bir sistemik hastalığı bulunmayan 77 (46 erkek, 31 kadın) olgunun 77 gözü çalışmaya dâhil edildi. Çalışma Helsinki Deklerasyonu prensiplerine uygunluk içinde yürütüldü ve bağlı bulunulan kurumun Etik Kurul Başkanlığı'ndan etik kurul onayı ile her olgudan bilgilendirilmiş onam formu alındı. Oküler travma ve geçirilmiş göz içi cerrahi öyküsü olan, biyomikroskopik muayenede kornea patolojisi ya da korneal skar tespit edilen veya kontakt lens kullanım öyküsü olan olgular çalışma dışı bırakıldı.

Olguların santral korneaları lazer tarayıcı in vivo konfokal mikroskop (Rostock Kornea Mo-

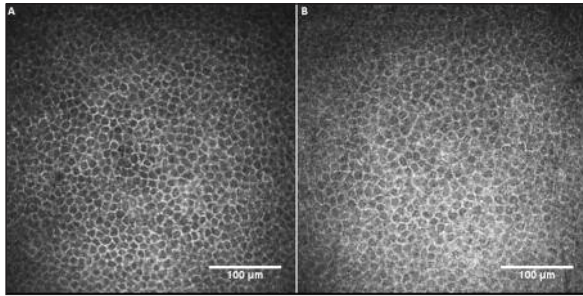
dülü/Heidelberg Retina Tomografisi 3, Heidelberg Engineering GmbH, Almanya) ile değerlendirildi. Ölçüm öncesi göze bir damla topikal anestezi (%0,5 proparacaine HCl; Alcaine®; Alcon Laboratories, Fort Worth, TX, ABD) damlatıldı. Konfokal mikroskopun objektifi göze temas edeceği için, olgu önceden uyarıldı. Objektif lensinin üzerine her olguda değiştirilen steril polimetilmetakrilat (PMMA) başlık (Tomocap®; Heidelberg Engineering GmbH, Almanya) takıldı. Başlığın üzerine bir damla jel (Viscotears®; Carbomer 980, 0.2%; Novartis, North Ryde, Avustralya) damlatıldı. Korneanın ve objektifin pozisyonu kamera monitöründen izlenerek çekime başlandı. Monitörde yüzey epiteli görüldükten sonra, objektif lensi manuel olarak odaklanarak endotele kadar ulaşıldı ve korneanın tüm tabakalarına ait görüntüler kaydedildi.

Analizler için gözlerden biri rastgele seçildi ve korneanın tüm tabakalarında netliği en iyi olan iki görüntü değerlendirmeye alındı. Her bir görüntünün merkezinde sabit bir alan (bazal epitel hücreleri ve endotel için 200x200  $\mu\text{m}$ , keratositler için 300x300  $\mu\text{m}$ ) işaretlenerek, bu alan içindeki bazal epitel hücreleri, keratositler ve endotel hücrelerinin sayımı gerçekleştirildi. Keratosit sayımı için Bowman tabakasından hemen sonraki kesit (ön stroma) ve Descemet membranı ve endotelden hemen önceki kesit (arka stroma) seçildi. İşaretlenen alan tarafından bölünmüş olan hücrelerden sadece üst ve sol yarıdakiler sayıldı. Hata payını en aza indirmek için aynı plandaki iki ayrı görüntü alanında sayım yapıldı, ve ortalaması alındı. Cihazda hazır bulunan program kullanılarak hücre dansitelerine ulaşıldı. Sinir liflerinin analizi için Automatic CCMetrics software, v 1.0 programı (University of Manchester, İngiltere) kullanıldı.<sup>8</sup> Bu programda her bir olgu için görüntü netliği en iyi olan ve en fazla sinir lifi kesiti içeren görüntü tam boyutta (400x400  $\mu\text{m}$ ) analiz edilerek; sinir lifi dansitesi (major sinir liflerinin sayısı/ $\text{mm}^2$ ), sinir lifi uzunluğu (tüm sinir liflerinin ve dallarının uzunluğu toplamı- $\text{mm}/\text{mm}^2$ ) ve sinir dalı dansitesi (major sinir liflerinden köken alan dalların sayısı/ $\text{mm}^2$ ) parametrelerine ulaşıldı.<sup>5</sup> Tüm görüntü analizleri aynı araştırmacı (GB) tarafından yapıldı.

Verilerin istatistiksel analizi, SPSS paket programı (SPSS for Windows, version 17.0, Chicago, IL, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Verilerin özetlenmesinde aritmetik ortalama±standart sapma kullanıldı. Sürekli sayısal verilerin normal dağılım uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. Konfokal mikroskopik parametrelerin yaş ile korelasyonunun tespitinde Pearson korelasyon katsayısı, her iki cinsiyet arasındaki farklılıkların değerlendirilmesinde bağımsız örneklem t-testi kullanıldı. Tüm analizlerde,  $p < 0,05$  olduğunda aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu kabul edildi.

## BULGULAR

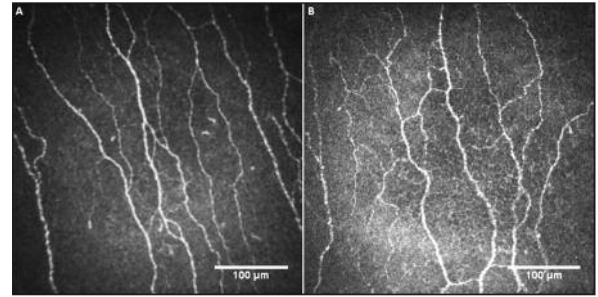
Olguların yaş ortalaması  $44,5 \pm 18,1$  yıl (15-80 yıl) olup, kadın ve erkek cinsiyet arasında yaş ortalaması yönünden anlamlı fark saptanmadı ( $p=0,715$ ). Bazal epitel hücreleri; nükleus reflektivitesi göstermeyen, parlak sınırlara sahip, hiporeflektif hücreler olarak izlendi (Resim 1). Ortalama bazal epitel hücre dansitesi  $5846 \pm 393$  hücre/ $\text{mm}^2$  olarak ölçüldü.



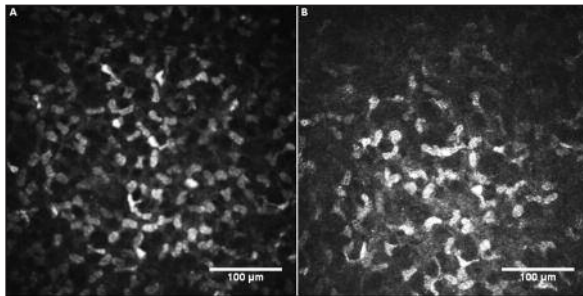
**RESİM 1:** (A) 19 yaşındaki ve (B) 71 yaşındaki iki olguda bazal epitel hücre tabakasını gösteren konfokal mikroskopik kesitleri.

çüldü. Bowman tabakası asellüler, amorf bir membran olarak izlendi ve bu seviyede subepitelyal sinir pleksusları görüntüledi (Resim 2). Ortalama sinir lifi dansitesi  $32,9 \pm 8,9$  major sinir lifi/ $\text{mm}^2$ , sinir dalı dansitesi  $67,5 \pm 34,3$  sinir dalı/ $\text{mm}^2$  ve sinir lifi uzunluğu  $23,5 \pm 3,7$  mm/ $\text{mm}^2$  olarak tespit edildi. Ön stromada hiperreflektif keratosit nükleusları ve yer yer ön stromal sinir lifleri izlendi. Arka stromada keratosit yoğunluğunun ön stromaya göre azalmış olduğu görüldü (Resim 3 ve 4). Ortalama ön stromal keratosit dansitesi  $795 \pm 151$  hücre/ $\text{mm}^2$ , arka stromal keratosit dansitesi  $318 \pm 56$  hücre/ $\text{mm}^2$  olarak hesaplandı. Endotel hücreleri hiporeflektif sınırlarla çevrili parlak hücre gövdeleri şeklinde görüntüledi (Resim 5). Ortalama endotel hücre dansitesi  $2743 \pm 329$  hücre/ $\text{mm}^2$  olarak tespit edildi.

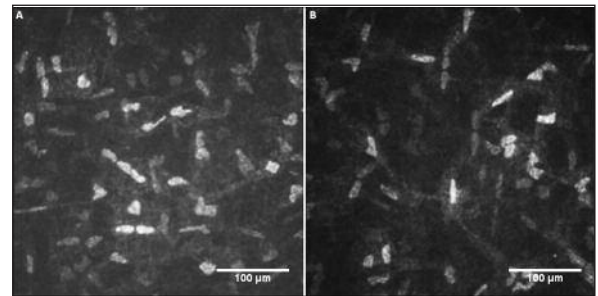
Kadın ve erkek cinsiyet arasında ölçülen parametrelerin hiçbirinde anlamlı farklılık izlenmedi (sinir lifi dansitesi:  $p=0,620$ , sinir dalı dansitesi:  $p=0,814$ , sinir lifi uzunluğu:  $p=0,828$ , bazal epitel hücre dansitesi:  $p=0,075$ , ön stromal keratosit dansitesi:  $p=0,422$ , arka stromal keratosit dansitesi:



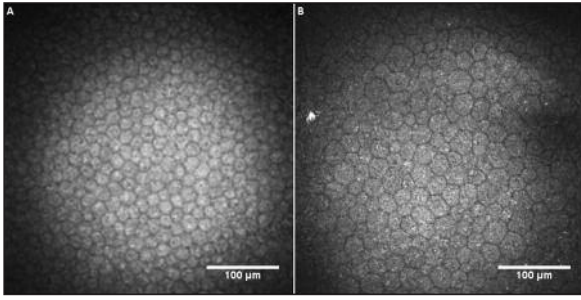
**RESİM 2:** (A) 21 yaşındaki ve (B) 73 yaşındaki iki olguda Bowman tabakası ve sinir liflerini gösteren konfokal mikroskopik kesitleri.



**RESİM 3:** (A) 23 yaşında ve (B) 69 yaşındaki iki olguda ön stromadaki keratosit nükleuslarını gösteren konfokal mikroskopik kesitleri.



**RESİM 4:** (A) 22 yaşında ve (B) 66 yaşındaki iki olguda arka stromadaki keratosit nükleuslarını gösteren konfokal mikroskopik kesitleri.



**RESİM 5:** (A) 22 yaşında ve (B) 71 yaşındaki iki olguda endotel hücre tabakasını gösteren konfokal mikroskopi kesitleri.

$p=0,474$ , endotel hücre dansitesi:  $p=0,822$ ). Yaş ile ön stromal keratosit dansitesi ( $r=-0,248$ ,  $p=0,03$ ), arka stromal keratosit dansitesi ( $r=-0,557$ ,  $p<0,001$ ) ve endotel hücre dansitesi ( $r=-0,590$ ;  $p<0,001$ ) arasında negatif korelasyon izlenirken bazal epitel hücre dansitesi ( $p=0,918$ ) ve sinir lifi parametrelerinde anlamlı korelasyon saptanmadı (Sinir lifi dansitesi;  $p=0,243$ , sinir dalı dansitesi;  $p=0,70$ , sinir lifi uzunluğu;  $p=0,07$ ).

## TARTIŞMA

Korneal konfokal mikroskopi; canlı dokunun hücresel düzeyde, yüksek çözünürlükte ve non-invaziv olarak görüntülenmesine imkan vermesinin yanında, korneanın tüm tabakalarında hücre dansiteleri ve sinir liflerine ait kantitatif veriler elde edilmesini sağlamakta ve kornea patolojilerine yeni ve farklı bir bakış açısı kazandırmaktadır.

Bazal epitel hücreleri hem şekilleri hem de büyüklükleri bakımından minimal değişiklik göstermektedir. Ortalama bazal epitel hücre dansitesini Harrison ve ark.  $5274\pm575$  hücre/ $\text{mm}^2$ , Vanathi ve ark.  $3601\pm408$  hücre/ $\text{mm}^2$ , ve Mustonen ve ark.  $5699\pm604$  hücre/ $\text{mm}^2$  olarak bildirmişlerdir.<sup>9-11</sup> Bu çalışmada ise ortalama bazal epitel hücre dansitesi  $5846\pm393$  hücre/ $\text{mm}^2$  olarak ölçülmüştür. Çeşitli çalışmalarda yayınlanan hücre dansiteleri arasındaki farklılıklar, kullanılan konfokal mikroskopların çalışma prensiplerinin farklı olmasına bağlı olabilmektedir. Ayrıca hücre dansitelerinde farklı ırklar arasında değişiklik olup olmadığının belirlenebilmesi için daha geniş çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Literatürdeki çalışmalara benzer

şekilde bu çalışmada da bazal epitel hücre dansitesinin yaş ve cinsiyete göre değişiklik göstermediği tespit edilmiştir.<sup>10-12</sup>

Keratositlerin ön stromada arka stromaya oranla daha yoğun olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada da ön stromal keratosit dansitesinin arka stromaya kıyasla anlamlı olarak yüksek olduğu görülmüştür. Literatürde arka stromal keratosit dansitesinin ön stromaya kıyasla %30-46,3 arasında değişen oranlarda azaldığı bildirilmiştir.<sup>13-17</sup> Elektron mikroskopi ile yapılan bir çalışmada ise, ön stroma keratositlerindeki mitokondri sayısının orta ve arka stroma keratositlerine kıyasla iki kat fazla olduğu gösterilmiştir.<sup>18</sup> Böylelikle stromal metabolik aktivitenin ön stromada çok daha yoğun olduğu sonucuna ulaşılmaktadır.

Konfokal mikroskopi görüntülerinin analizi ile hesaplanan keratosit dansitelerinin tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğu ve histolojik çalışma sonuçları ile uyumlu bulunduğu bildirilmiştir.<sup>19,20</sup> Bu çalışmada önceki çalışmaların sonuçlarına benzer şekilde, keratosit dansitelerinde kadın ve erkek cinsiyet arasında anlamlı farklılık görülmemiştir.<sup>10,11,17</sup> Yaş ile birlikte keratosit dansitesinde azalma olduğu ise birçok çalışmada bildirilmiştir.<sup>13,17,21,22</sup> Bu çalışmada hem ön hem de arka stromal keratosit dansitesinin yaş ile negatif korelasyon gösterdiği görülmüştür. Yaşa bağlı keratosit dansitesindeki azalma, muhtemelen stromal metabolik aktivitedeki azalma ve keratosit apoptozisindeki artmaya bağlı gelişmektedir. Yaşlı olgularda stromal arka plan reflektivitesinde artış nedeniyle görüntü kontrastındaki azalmanın da keratosit dansitesinin daha düşük hesaplanmasına yol açabileceği ileri sürülmektedir.<sup>22</sup>

İn vitro çalışmalarda ve speküler mikroskopi kullanılarak yapılan çalışmalarda endotel hücre dansitesinin yaş ile birlikte azaldığı gösterilmiştir.<sup>23,24</sup> Korneal konfokal mikroskopi ile hesaplanan endotel hücre dansitesinin speküler mikroskopi sonuçlarına benzer olduğu bildirilmiştir.<sup>25</sup> Hollingsworth ve ark., yaş ortalaması 41 yıl olan sağlıklı olgu grubunda ortalama endotel hücre dansitesini  $3061\pm382$  hücre/ $\text{mm}^2$  olarak bildirirken, Niederer ve ark., yaş ortalaması 37,8 yıl olan



sağlıklı olgularda endotel dansitesinin  $2720 \pm 367$  hücre/ $\text{mm}^2$  olduğunu bildirmişlerdir.<sup>17,22</sup> Her iki çalışmada da endotel dansitesinin yaşla birlikte azaldığı ve cinsiyete bağlı değişiklik göstermediği belirtilmiştir. Hollingsworth ve ark. çalışmalarında slit tarayıcı konfokal mikroskop kullanırlarken, Niederer ve ark. lazer tarayıcı konfokal mikroskop kullanmışlardır.<sup>17,22</sup> Bu çalışmada lazer tarayıcı konfokal mikroskop ile yapılan ölçümlerde, yaş ortalaması 44,5 yıl olan sağlıklı olgularda ortalama endotel hücre dansitesi  $2743 \pm 329$  hücre/ $\text{mm}^2$  olarak bulunmuştur. Bu durum hücre dansitelerinin hesaplanmasında kullanılan konfokal mikroskop türünün sonucu etkileyebileceğini ve farklı çalışmalarda bildirilen sonuçlar kıyaslanırken bu konunun dikkate alınması gerektiğini düşündürmektedir.

Korneanın tüm dokular arasında en yoğun innervasyona sahip olduğu ve deriden 300-400 kat fazla sinir lifi içerdiği gösterilmiştir.<sup>26</sup> Korneal konfokal mikroskopisi sayesinde korneal sinir lifleri non-invaziv olarak doğrudan görüntülenebilmekte, ve geliştirilen bilgisayar programları ile sinir lifi dansitesi, sinir lifi uzunluğu, sinir dah dansitesi gibi parametrelere ulaşılabilmektedir.<sup>8</sup> Bu yönüyle korneal konfokal mikroskopisi periferik sinir hastalıklarının ve özellikle diyabetik nöropatinin teşhis ve

takibinde giderek artan sıklıkta kullanım alanı bulmaktadır.<sup>5,27-29</sup> Bir çalışmada ise, diyabet hastalarındaki periferik sinir hasarının cilt biyopsilerinin patolojik inceleme sonuçlarına kıyasla konfokal mikroskopisi ile daha erken evrede tespit edilebildiği gösterilmiştir.<sup>30</sup>

Kornea duyarlılığının yaş ile birlikte azaldığı bilinmektedir.<sup>31,32</sup> Ancak korneanın konfokal mikroskopik analizi ile elde edilen sinir lifi dansitesinin yaş ile korelasyonu tartışmalıdır. Niederer ve ark.<sup>22</sup> sinir lifi dansitesinin artan yaş ile birlikte azaldığını gösterirlerken, Erie ve ark. yaş ile korelasyon bulunmadığını bildirmişlerdir.<sup>33</sup> Bu çalışmada sinir lifi parametrelerinin hiçbirinde yaş ve cinsiyet ile anlamlı korelasyon saptanmamıştır.

## SONUÇ

İn vivo konfokal mikroskopisi; korneanın yapısal olarak incelenmesine imkan sağlayan invaziv olmayan, güvenilir ve tekrarlanabilirliği yüksek bir yöntemdir. Bu çalışmada sağlıklı kornealardaki bazal epitel hücreleri, ön ve arka stromal keratosit ve endotel hücre dansiteleri ile sinir liflerine ait normal veriler sunulmuştur. Bu veriler primer kornea patolojileri veya korneayı etkileyen sistemik hastalıklarla ilgili konfokal mikroskopisi çalışmalarını için referans olarak kullanılabilir.

## KAYNAKLAR

1. İrkeç M, Bozkurt B. [The place of confocal microscopy in diagnosis and pursuit of corneal diseases]. *Turkiye Klinikleri J Surg Med Sci* 2007;3(8):15-24.
2. Kobayashi A, Yokogawa H, Sugiyama K. In vivo laser confocal microscopy findings in patients with map-dot-fingerprint (epithelial basement membrane) dystrophy. *Clin Ophthalmol* 2012;6:1187-90.
3. Mocan MC, Yılmaz PT, Irkeç M, Orhan M. In vivo confocal microscopy for the evaluation of corneal microstructure in keratoconus. *Curr Eye Res* 2008;33(11):933-9.
4. Hsiao YC, Tsai IL, Kuo CT, Yang TL. Diagnosis of microsporidial keratitis with in vivo confocal microscopy. *J Xray Sci Technol* 2013; 21(1):103-10.
5. Malik RA, Kallinikos P, Abbott CA, van Schie CH, Morgan P, Efron N, et al. Corneal confocal microscopy: a non-invasive surrogate of nerve fibre damage and repair in diabetic patients. *Diabetologia* 2003;46(5):683-8.
6. Küçümen RB, Görgün E, Yenerel NM. [Confocal microscopy in corneal dystrophies]. *Turk J Ophthalmol* 2011;41(2):66-72.
7. Bakbak B, Gedik Ş, Köktekir Ekinci B, Gönül Ş. [Evaluation of corneal endothelium with in vivo confocal microscopy in cases with diabetes mellitus]. *Turkiye Klinikleri J Ophthalmol* 2012;21(3):145-51.
8. Dabbah MA, Graham J, Petropoulos IN, Tavakoli M, Malik RA. Automatic analysis of diabetic peripheral neuropathy using multi-scale quantitative morphology of nerve fibres in corneal confocal microscopy imaging. *Med Image Anal* 2011;15(5):738-47.
9. Harrison DA, Joos C, Ambrósio Jr R. Morphology of corneal Basal epithelial cells by in vivo slit-scanning confocal microscopy. *Cornea* 2003;22(3):246-8.
10. Vanathi M, Tandon R, Sharma N, Titiyal JS, Pandey RM, Vajpayee RB. In-vivo slit scanning confocal microscopy of normal corneas in Indian eyes. *Indian J Ophthalmol* 2003; 51(3):225-30.
11. Mustonen RK, McDonald MB, Srivannaboon S, Tan AL, Doubrava MW, Kim CK. Normal human corneal cell populations evaluated by in vivo scanning slit confocal microscopy. *Cornea* 1998;17(5):485-92.
12. Tomii S, Kinoshita S. Observations of human corneal epithelium by tandem scanning confocal microscope. *Scanning* 1994;16(5):305-6.
13. Berlau J, Becker HH, Stave J, Oriwol C, Guthoff RF. Depth and age-dependent distribution of keratocytes in healthy human corneas: a study using scanning-slit confocal microscopy in vivo. *J Cataract Refract Surg* 2002;28(4):611-6.

14. Hahnel C, Somodi S, Weiss DG, Guthoff RF. The keratocyte network of human cornea: a three-dimensional study using confocal laser scanning fluorescence microscopy. *Cornea* 2000;19(2):185-93.
15. Petroll WM, Boettcher K, Barry P, Cavanagh HD, Jester JV. Quantitative assessment of anterior-posterior keratocyte density in the normal rabbit cornea. *Cornea* 1995;14(1):3-9.
16. Møller-Pedersen T, Ehlers N. A three-dimensional study of the human corneal keratocyte density. *Curr Eye Res* 1995;14(6):459-64.
17. Hollingsworth J, Perez-Gomez I, Mutalib HA, Efron N. A population study of the normal cornea using an in vivo, slit-scanning confocal microscope. *Optom Vis Sci* 2001;78(10):706-11.
18. Müller LJ, Pels L, Vrensen GF. Novel aspects of the ultrastructural organization of human corneal keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36(13):2557-67.
19. Patel SV, McLaren JW, Camp JJ, Nelson LR, Bourne WM. Automated quantification of keratocyte density by using confocal microscopy in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(2):320-6.
20. Prydal JI, Franc F, Dilly PN, Kerr Muir MG, Corbett MC, Marshall J. Keratocyte density and size in conscious humans by digital image analysis of confocal images. *Eye (Lond)* 1998;12 ( Pt 3a):337-42.
21. Patel S, McLaren J, Hodge D, Bourne W. Normal human keratocyte density and corneal thickness measurement by using confocal microscopy in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(2):333-9.
22. Niederer RL, Perumal D, Sherwin T, McGhee CN. Age-related differences in the normal human cornea: a laser scanning in vivo confocal microscopy study. *Br J Ophthalmol* 2007;91(9):1165-9.
23. Sherrard ES, Novakovic P, Speedwell L. Age-related changes of the corneal endothelium and stroma as seen in vivo by specular microscopy. *Eye (Lond)* 1987;1(Pt 2):197-203.
24. Hoffer KJ, Kraff MC. Normal endothelial cell count range. *Ophthalmology* 1980;87(9):861-6.
25. Mustonen RK, McDonald MB, Srivannaboon S, Tan AL, Doubrava MW, Kim CK. In vivo confocal microscopy of Fuchs' endothelial dystrophy. *Cornea* 1998;17(5):493-503.
26. Rózsa AJ, Beuerman RW. Density and organization of free nerve endings in the corneal epithelium of the rabbit. *Pain* 1982;14(2):105-20.
27. Tavakoli M, Marshall A, Pitceathly R, Fadavi H, Gow D, Roberts ME, et al. Corneal confocal microscopy: a novel means to detect nerve fibre damage in idiopathic small fibre neuropathy. *Exp Neurol* 2010;223(1):245-50.
28. Tavakoli M, Mitsu-Pretorian M, Petropoulos IN, Fadavi H, Asghar O, Alam U, et al. Corneal confocal microscopy detects early nerve regeneration in diabetic neuropathy after simultaneous pancreas and kidney transplantation. *Diabetes* 2013;62(1):254-60.
29. Bitirgen G, Ozkagnici A, Malik RA, Kerimoglu H. Corneal nerve fibre damage precedes diabetic retinopathy in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 2014;31(4):431-8.
30. Quattrini C, Tavakoli M, Jeziorska M, Kallinikos P, Tesfaye S, Finnigan J, et al. Surrogate markers of small fiber damage in human diabetic neuropathy. *Diabetes* 2007;56(8):2148-54.
31. Millodot M. The influence of age on the sensitivity of the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977;16(3):240-2.
32. Roszkowska AM, Colosi P, Ferreri FM, Galasso S. Age-related modifications of corneal sensitivity. *Ophthalmologica* 2004;218(5):350-5.
33. Erie JC, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM. The effect of age on the corneal sub-basal nerve plexus. *Cornea* 2005;24(6):705-9.