

In Vivo Kesit Tarayan Konfokal Mikroskopla Normal İnsan Kornea Dokusunun Değerlendirilmesi¹

EVALUATION OF NORMAL HUMAN CORNEAL TISSUE BY IN VIVO CONFOCAL MICROSCOPY

Nurgül YILMAZ*, Ömür Ö. UÇAKHAN**, Ayfer KANPOLAT***

* Arş.Gör.Dr., Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları AD,

** Uz.Dr., Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları AD,

*** Prof.Dr., Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları AD, ANKARA

Özet

Amaç: Sağlam kornea dokusunun in vivo kesit tarayan konfokal mikroskopla değerlendirilmesi.

Gereç ve Yöntem: Göz muayenesi normal olan 22 sağlıklı, gönüllü olgunun 44 gözü in vivo kesit tarayan konfokal mikroskopla (Confoscan 2.0, NIDEK Co. Ltd., Osaka, Japonya) incelendi. Görüntüler kornea merkezinden alındı ve kornea yapıları niteliksel ve niceliksel olarak değerlendirildi.

Bulgular: Olguların yaş ortalaması 39.9±14.0 yıl olup, 15'i kadın (%68.2), 7'si erkekti (%31.8). Tüm olgularda epitel, bazal membran, stroma, endotel ve sinir lifleri tabakaları konfokal mikroskopi ile görüntülenebildi ve normal olarak değerlendirildi. Ortalama yüzeysel epitel hücre yoğunluğu 1435±368 hücre/mm², yüzeysel epitel hücre alanı 697±60 µm², bazal epitel hücre yoğunluğu 5394±1511 hücre/mm², bazal epitel hücre alanı 200±55 µm², ön keratosit hücre yoğunluğu 696±190 hücre/mm², ön keratosit hücre alanı 1537±399 µm², arka keratosit hücre yoğunluğu 503±114 hücre/mm², arka keratosit hücre alanı 2084 ± 465 µm², endotel hücre yoğunluğu 2732 ± 338 hücre/mm², endotel hücre alanı 373±49 µm², endotel kenar sayısı 6±0.2, hexagonalite 50.6±11.4 olarak hesaplandı. Ortalama hücre yoğunlukları ve alanlarının, kadın ve erkekler arasında (p>0.05), ve sağ ve sol gözler arasında (p>0.05) istatistiksel olarak anlamlı fark göstermediği saptandı. Ortalama ön keratosit hücre yoğunluğu arka keratosit hücre yoğunluğundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti (p<0.001). Endotel hücre yoğunluğunun yaş arttıkça azaldığı gözlemlendi ancak bu korelasyon istatistiksel olarak anlamlı değildi (r=-0.306, p=0.062).

Sonuç: Kesit tarayan konfokal mikroskop ile normal kornea dokusunun tüm katmanlarının niteliksel ve niceliksel olarak incelenebilmesi mümkündür.

Anahtar Kelimeler: Konfokal mikroskop, Kornea, Epitel, Bazal lamina, Stroma, Descemet membranı, Endotel

Summary

Purpose: Evaluation of normal corneal tissue by in vivo slit scanning confocal microscopy.

Materials and Methods: 44 eyes of 22 healthy volunteers were evaluated by in vivo slit scanning confocal microscopy (Confoscan 2.0, NIDEK Co. Ltd., Osaka, Japan). Scans obtained from central corneas and corneal structures were evaluated qualitatively and quantitatively.

Results and Conclusion: The mean age of the patients were 39.9±14.0 years, 15 were women (%68.2), 7 were men (%31.8). Epithelium, basal membrane, stroma, endothelium and nerve fiber layers could be imaged and evaluated as normal. The mean superficial epithelial cell density was 1435±368 cells/mm², the mean superficial epithelial cell area was 697±60 µm², the mean basal epithelial cell density was 5394±1511 cells/mm², the mean basal epithelial cell area was 200±55 µm², the mean anterior keratocyte density was 696±190 cells/mm², the mean anterior keratocyte area was 1537±399 µm², the mean posterior keratocyte density was 503±114 cells/mm², the mean posterior keratocyte area was 2084±465 µm², the mean endothelial density was 2732±338 cells/mm², the mean endothelial area was 373±49 µm², the mean endothelial sides 6±0.2, the mean hexagonality was 50.6±11.4. There were no statistically significant differences in regards to the mean cell densities and areas between men and women (p>0.05), and right and left eyes (p>0.05). The mean anterior stromal keratocyte density was significantly higher than the mean posterior keratocyte density (p<0.001). Endothelial cell density decreased with increasing age, however this did not reach statistical significance (r=-0.306, p=0.062).

Conclusion: It is possible to examine all corneal layers quantitatively and qualitatively by slit scanning confocal microscopy.

Key Words: Confocal microscopy, Cornea, Epithelium, Basal lamina, Stroma, Descemet's membrane, Endothelium

İlk konfokal mikroskop 1957 yılında Marvin Minsky tarafından canlı beyindeki nöral ağı incelemek için geliştirilmiştir (1). Uzun bir gelişim evresinden sonra, kesit tarayan konfokal mikroskop 1994'de Masters ve Thae tarafından tanımlanmıştır (2). Tanımlandığı günden bugüne kesit tarayan konfokal mikroskop, normal kornea dokusunun incelenmesinde (3-5), kornea hastalıklarının tanı ve tedavisinde önemli bir yere sahip olmuştur.

Kornea patolojilerinin konfokal mikroskopi ile sağlıklı değerlendirilebilmesi için normal kornea yapılarının iyi bilinmesi gerekir. Bizim bu çalışmada amacımız, göz muayenesi normal olan olgularda in vivo kesit tarayan konfokal mikroskop ile kornea morfolojisinin niteliksel ve niceliksel olarak incelenmesi idi.

Gereç ve Yöntem

Çalışma kapsamına düzeltilmemiş görme keskinliği tam olup, biyomikroskopi ve fundus bulguları doğal olan, sağlıklı gönüllü olgular dahil edildi. Görme keskinliği, manifest refraksiyon, flöreseinsiz ve flöreseinsiz biyomikroskopi, göz-içi basıncı, fundus muayenesini içeren detaylı bir göz muayenesinden sonra olguların korneaları in vivo kesit tarayan konfokal mikroskop ile incelendi.

Konfokal mikroskopi muayenesi için hastaya yapılacak işlem hakkında bilgi verildikten sonra, muayene koltuğuna rahat bir pozisyonda oturması sağlandı, çenesi ve alını cihaza uygun şekilde yerleştirildi. Alt konjonktiva forniksine tek damla topikal anestezi (proparakain hidroklorür, Alcaïne®, Alcon) damlatıldı. Konfokal mikroskopun ön lensinin ucuna lubrikan jel (Viscotears® gel, CIBA Vision) uygulandı. Daha sonra ön lens hastanın kornea merkezine doğru kumanda kolu hareket ettirilerek yaklaştırıldı. İlk hücre kesiti ekranda gerçek zamanlı olarak görüldükten sonra kumanda kolu ilerletilerek endotel hücreleri görüldü, aköz içine 50 mikron kadar girilip kumanda kolundaki kayıt düğmesine basılarak otomatik olarak kayıt alındı. İşlem sırasında kornea ile jel temas halinde olup, 2 dakikayı geçmeyecek şekilde kesit görüntüleri eş zamanlı kayıt edildi. Muayene sonrası lens yerinden çıkarılarak %70 isopropranol içerisinde 10 dakika süreyle

10 dakika süreyle bekletilmek suretiyle steril edildi. Çalışma süresince tüm muayeneler hep aynı kişi tarafından ve aynı koşullar altında yapıldı.

Çalışmamızda kullanılan konfokal mikroskop; in vivo kesit tarayan konfokal mikroskop (Confoscan 2.0, NIDEK Co. Ltd., Osaka, Japonya) idi. Bu cihaz kornea ve ön segment görüntüsünü 1000 defa büyütebilmektedir, otomatik olarak 14 saniyede 350 görüntü alınmakta, fakat kayıt işlemi sırasında daha önce belirlenen görüntü kalitesine uymayan kesit görüntüleri otomatik olarak kayıttan silinmektedir. Alınan her görüntü 340×255 µm boyutundadır ve her 5µ kalınlıktan bir kesit görüntü alınmaktadır. Kullandığımız ön lens ise ×40 immersion lensidir ve çalışma mesafesi 1.98 mm'dir.

Analiz için her kornea hücre tabakasından bir kesit görüntü seçildi. Derinlik belirlenmesine yardımcı olan Z-scan ile endotele en yakın kaliteli stroma kesit görüntüsü arka stromayı ve bazal laminanın hemen arkasındaki en kaliteli kesit görüntü ön stromayı gösterecek şekilde niceliksel ölçümler yapıldı. Epitel ve stromadaki hücreler tek tek elle işaretlendikten sonra yoğunluk ve alan ölçümleri yapıldı. Endotelle ilgili hesaplamalar ise belirli ilgi alanı seçildikten sonra otomatik olarak yapıldı.

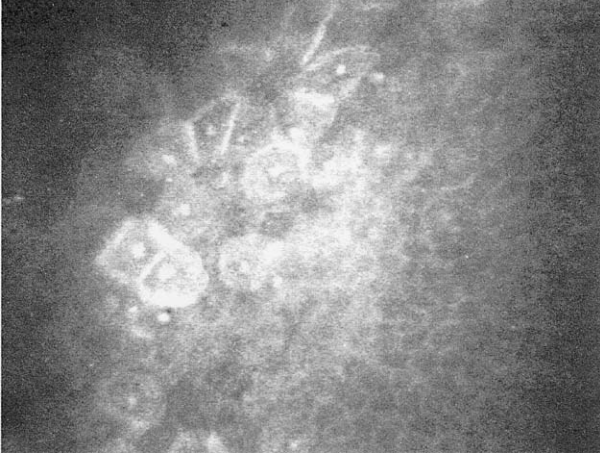
İstatistiksel analiz için Mann-Whitney U testi, Wilcoxon W testi ve Pearson korelasyon analizi kullanıldı.

Bulgular

Yirmi iki sağlıklı olgunun (7 erkek, 15 kadın) 44 gözü incelendi. Olguların yaş ortalaması 39.9 ± 14.0 (en küçük 15, en büyük 59) idi. In vivo kesit tarayan konfokal mikroskopla 44 gözden kesit görüntüleri alındı. Görüntü kalitesi 38 gözde yüzeysel epitel alanı ve yoğunluğu ile ilgili niceliksel ölçüm yapmaya uygundu. Görüntü kalitesi 44 gözün 3'ünde bazal epitel yoğunluğu ve alanını ölçmemize müsaade etmezken, ön ve arka keratosit ve endotel görüntüleri 44 gözün 44'inde de ölçüm yapmaya yeterli kalitede idi. Uzakdan daldırma yöntemi kullanılarak yapılan konfokal mikroskopi muayenesi sırasında hiçbir olguda herhangi bir komplikasyonla karşılaşılma.

Epitel

Kesit tarayan konfokal mikroskopla, yüzeysel epitel hücrelerinin çekirdekleri ve kenarları parlak,



Şekil 1. Yüzeysel Epitel Hücreler

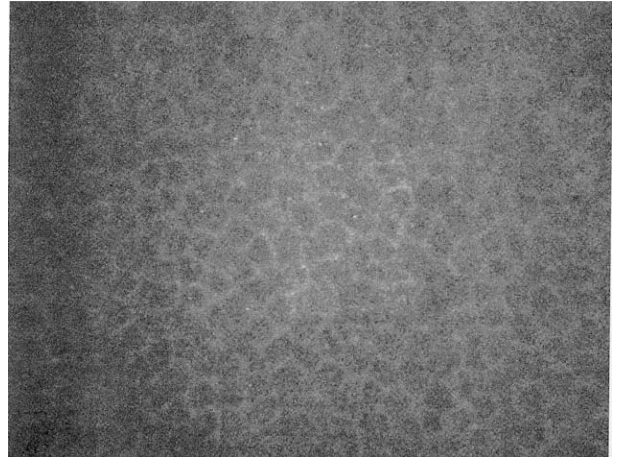
hücre içi kısım ışığı az yansıttığı için karanlık olarak izlendi (Şekil 1). Ortalama yüzeyel epitel hücre yoğunluğu 1435 ± 368 hücre/ mm^2 (575.2 ile 2681.5 arası) ve yüzeyel epitel hücre alanı 697 ± 60 μm^2 (372.9 ile 1738.4 arası) olarak saptandı. Sağ ve sol göz arasında ($p=0,817$) ve kadın ve erkekler arasında ($p=0,369$) yüzeyel epitel hücre yoğunluğu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Yüzeysel epitel hücre yoğunluğu ve yaş arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptanmadı ($r=0.001$, $p=0.857$).

Bazal epitel hücrelerinin sınırları parlak renkte olup çekirdekleri kesit görüntülerde izlenememekteydi, hücre içi ise karanlık idi (Şekil 2). Bizim çalışmamızda ortalama bazal epitel hücre yoğunluğu 5394 ± 1511 hücre/ mm^2 (3136 ile 9418 arası) ve bazal epitel hücre alanı 200 ± 55 μm^2 (106.2 ile 381.9 arası) olarak tesbit edildi. Sağ ve sol göz arasında ($p=0.914$) ve kadın ve erkekler arasında ($p=0.252$) bazal epitel hücre yoğunluğu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi. Bazal epitel hücre yoğunluğu ve yaş arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptanmadı ($r=0.001$, $p=0.995$).

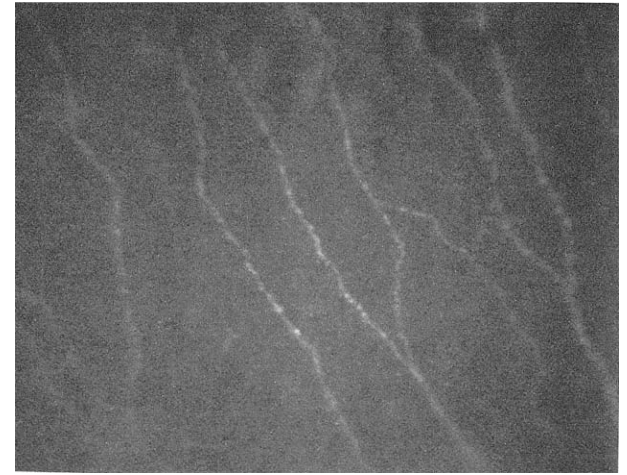
Stroma

Kesit tarayan konfokal mikroskopla Bowman tabakası amorf bir membran olarak izlendi, seçilebilen tek hüresel eleman parlak olarak izlenen subepitelyal sinir pleksusu lifleri idi (Şekil 3).

Stromada ise siyah bir zemin üzerinde parlak



Şekil 2. Bazal Epitel Hücreler



Şekil 3. Bown tabakası

olarak sadece keratosit çekirdekleri görüldü. Keratositlerin hücre sınırları ve sitoplazmaları görülmemekteydi (Şekil 4-6). Ön keratosit hücre yoğunluğu 696 ± 190 hücre/ mm^2 (424.8 ile 1106.4 arası), ön keratosit hücre alanı 1537 ± 399 μm^2 (903.9 ile 2354.1 arası), arka keratosit hücre yoğunluğu 503 ± 114 hücre/ mm^2 (298.2 ile 798.3 arası), arka keratosit hücre alanı 2084 ± 465 μm^2 (1252.6 ile 3353.6 arası) olarak tesbit edildi.

Ön keratosit yoğunluğu ve arka keratosit yoğunluğu açısından, sağ ve sol gözler (sırasıyla $p=0.708$, $p=0.603$), ve kadın ve erkekler (sırasıyla $p=0.084$, $p=0.258$) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi. Yaşa bağlı olarak da, ön ve arka keratosit yoğunlukları istatistiksel olarak



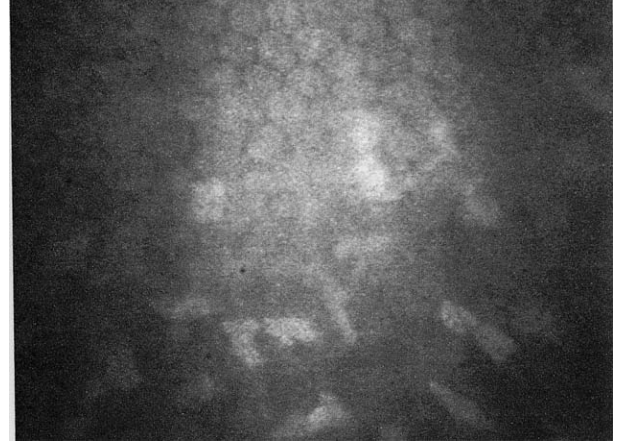
Şekil 4. Ön stroma keratositleri



Şekil 5. Arka stroma keratositleri



Şekil 6. Stroma içinde sinir hücresi



Şekil 7. Desme membranı

anlamli düzeyde değişmemektedir (sırasıyla $r=0.115$, $p=0.493$ ve $r=0.133$, $p=0.427$).

Ön keratosit yoğunluğunun ise arka keratosit yoğunluğundan istatistiksel olarak anlamli derecede fazla saptandı ($p<0.001$).

Endotel

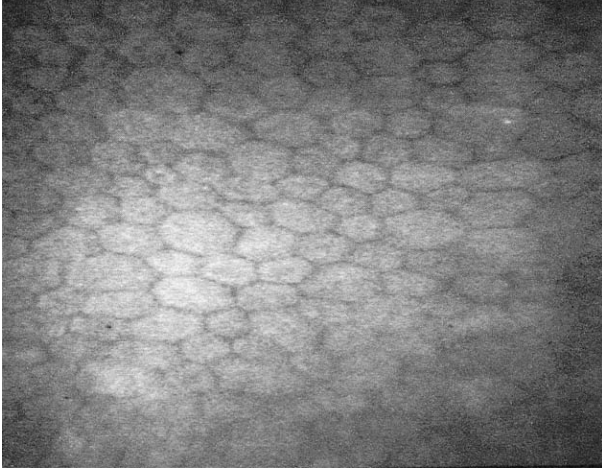
Descemet membranı kesit tarayan konfokal mikroskopla görüntülenmemektedir. Descemet membranı seviyesinde keratosit çekirdekleri ve endotel hücreleri görüldü (Şekil 7).

Endotel hücrelerinin hücre-içi kısmı parlak olarak izlenirken hücre sınırları karanlık idi (Şekil 8). Endotel hücre yoğunluğu 2732 ± 338 hücre/mm² (2732 ile 337.8 arası), endotel hücre

alanı 373 ± 49 µm² (292.3 ile 521.2 arası), endotel kenar sayısı 6.0 ± 0.2 (5.8 ile 6.8 arası), hexagonalite 50.6 ± 11.4 (23.8 ile 79.1 arası) olarak tesbit edildi. Endotel hücre yoğunluğu sağ ve sol göz, ve kadın ve erkekler arasında istatistiksel olarak anlamli bir farklılık saptanmadı (sırasıyla $p=0.339$, $p=0.084$). Endotel hücre yoğunluğu yaş arttıkça azalmakla beraber, istatistiksel olarak yaş ve endotel hücre yoğunluğu arasında anlamli korelasyon tesbit edilemedi ($r=-0.306$, $p=0.062$).

Tartışma

Konfokal mikroskop yeni bir tanı ve takip yöntemi olarak klinik kullanıma girmiştir. Bu muayene yöntemi sayesinde tüm kornea tabakaları,



Şekil 8. Endotel hücreleri

diğer tanı yöntemlerinden farklı olarak canlı dokuda incelenebilmekte ve ayrıntılı olarak değerlendirilebilmektedir.

Cavanagh ve arkadaşları (1), 1993 yılında 52 yaşında bir erkek hastada normal kornea bulgularını tanımlamışlardır. Bu çalışmaya göre, yüzeysel epitel hücrelerinin sınırları, parlak çekirdekleri gibi kolaylıkla görülmektedir. Bazal epitel komşuluğunda ince sinir pleksusu görülmektedir. Kornea stromasında ise siyah bir zemin üzerinde sadece hücre çekirdekleri görülmektedir. Orta ve arka stromayla karşılaştırıldığında ön stromada çok sayıda keratosit var gibi görünmektedir. Stroma içinde de belirgin sinir lifleri görülebilir. Bizim bulgularımız da diğer birçok çalışmada da gösterildiği gibi bu morfolojik bulgularla paraleldir.

İncelenen gözlerin tümünde kaliteli stroma ve endotel kesitleri alınabilirken, %6.8'inde bazal epitel ve %13.6'sında yüzeysel epitel hücre kesitleri niceliksel analiz yapılabilecek kalitede alınmamıştır. Gözünü açık tutamayan ve çok hareket ettiren olgulardan kaliteli görüntü alınamamaktadır.

Yapılan ölçümler sonucu santral korneada ortalama yüzeysel epitel hücre yoğunluğu 1435 ± 368 hücre/mm², yüzeysel epitel hücre alanı 697 ± 60 µm², bazal epitel hücre yoğunluğu 5394 ± 1511 hücre/mm², bazal epitel hücre alanı 200 ± 55 µm², ön keratosit hücre yoğunluğu 696 ± 190 hücre/mm², ön keratosit hücre alanı 1537 ± 399

µm², arka keratosit hücre yoğunluğu 503 ± 114 hücre/mm², arka keratosit hücre alanı 2084 ± 465 µm², endotel hücre yoğunluğu 2732 ± 338 hücre/mm², endotel hücre alanı 373 ± 49 µm², endotel kenar sayısı 6.0 ± 0.2 , hexagonalite 50.6 ± 11.4 olarak tesbit edildi.

Çalışmamızda yaşa bağlı olarak korneanın herhangi bir tabakasındaki ortalama hücre alanı veya yoğunluğunda istatistiksel olarak anlamlı değişiklik saptanmadı. Endotel hücre yoğunluğunda yaşla azalma saptanmakla birlikte bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi. Artan yaşla birlikte Moller-Pedersen ve ark. (6), ortalama keratosit yoğunluğunda, Mustenon ve ark. (4), ise endotel hücre yoğunluğunda azalma bildirmişlerdir. Bu sonuçlar değerlendirilirken çalışma gruplarının yaş dağılımı göz önünde bulundurulmalıdır. Mustenon ve ark.nın incelediği grubun yaş ortalaması 45 ± 17 (en küçük 20, en büyük 84) olarak bildirilmiştir. Bizim çalışma grubumuzdaki olguların yaş dağılımı ise göreceli olarak daha genç idi (39.9 ± 14.0).

Çalışmamızda ortalama hücre yoğunlukları ve alanları açısından, sağ ve sol gözler ve kadın ve erkekler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanamadı. Ön stroma ortalama keratosit yoğunluğu ise ortalama arka stromada keratosit yoğunluğundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptandı.

Çalışmamızda, kesit tarayan konfokal mikroskop ile korneanın tüm katmanları niteliksel ve niceliksel olarak incelenebildi. Kesit tarayan konfokal mikroskop, 'in vivo' ortamda kornea hücrelerinin niteliksel ve niceliksel incelenmesine olanak sağlayan oldukça yararlı bir yöntem olup, bugün pekçok klinik uygulamında yerini almıştır.

KAYNAKLAR

1. Cavanagh HD, Petroll WM, Alizadeh H, He YG, Mc Culley JP, Jester JV. Clinical and diagnostic use of in vivo confocal microscopy in patients with corneal disease. *Ophthalmology* 1993;10(100):1444-53.
2. Masters BR, Thae AA. Real time scanning slit confocal microscopy of the in vivo human cornea. *Appl Optics* 1994;33:695-701.
3. Yaylalı V, Kaufman HE. Korneanın in vivo konfokal mikroskopi ile incelenmesi. *MN Oftalmoloji* 2000; 7:227-9.

4. Mustenon RK, McDonald, Srivannaboon S, Tan AL, Doubrava MW, Kim CK. Normal human corneal cell populations evaluated by in vivo scanning slit confocal microscopy. *Cornea* 1998;17:485-92.
5. Auran JD, Koester CJ, Kleiman NJ, Rapaport R, Bomann JS, Wirotko BM et al. Scanning slit confocal microscopic observation of cell morphology and movement within the normal human anterior cornea. *Ophthalmology* 1995;102:33-41.
6. Moller-Pedersen T. A comparative study of human corneal keratocyte and endothelial cell density during aging. *Cornea* 1997;16:333-8.

Geliş Tarihi: 29.03.2002

Yazışma Adresi: Dr.Nurgül YILMAZ
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Göz Hastalıkları AD
Mamak, ANKARA

[¶]*Bu yazı poster olarak 35. ulusal oftalmoloji kongresinde sunulmuştur (İzmir, 23-26 Eylül 2001)*