

# Konfokal Mikroskopi ve In Vivo Oftalmik Kullanımı

İzzet CAN\*, Belgin CAN\*\*

## Giriş

Konfokal mikroskopi (KM), son yıllarda geliştirilmiş ışık mikroskobik bir görüntüleme sistemidir. Bu sistemde görüntüler, ışığın foküs dışı olumsuz etkileri en aza indirgenerek, sadece odaklanan plandan yüksek kontrast ve rezolüsyonda elde edilmektedir. Bu da daha büyük büyütme için kullanılabilmesine olanak tanımakta ve mikro düzeyde inceleme yapılabilmektedir. KM ya da solid dokulardan optik kesit alma kavramı, konvansiyonel ışık mikroskop (İM) ve elektron mikroskop (EM) sistemlerine göre hücreleri ve hücresel yapıları daha dinamik olarak inceleme ihtiyacından doğmuştur. Konvansiyonel mikroskobik teknikler, gözlem öncesinde dokuda fiksasyon, takip ve kesitler almayı gerektirdiklerinden, statik seviyede kalmakta ve kaçınılmaz artefaktlara yol açmaktadır. Hücre biyolojisinde bu problemlere yönelik olarak faz kontrast ve interferans mikroskopları kullanılsa bile hücrelerin kalınlıkları detayların kaybolmasına neden olmaktadır.

KM'un 1986'dan beri oftalmik kullanım için adapte edilmiş olması (1-3) ve 1989'dan itibaren de in vivo insan kullanımının gerçekleşmiş olması (4), bu alanda yeni bir dönemi başlatmıştır. KM'un genel klinik kullanım için 1992 yılından beri FDA (Food and Drug Administration) onayı bulunmaktadır. Bu derlemenin amacı, oftalmik kullanıma yeni giren ve kısa sürede önemli gelişmelerin sağlandığı bu yeni görüntüleme sistemini tanıtmak, yayınlanan ilk çalışmalar hakkında bilgi vermek ve bu alandaki potansiyele dikkat çekmektir.

## Konfokal Mikroskop: Gelişimi, Optik prensipleri, Kullanıldığı tıbbi alanlar

"Konfokal mikroskop" etimolojik olarak eş odaklı ya da odak beraberliği olan mikroskop anlamında türe-

tilmiş bir terimdir. Bu mikroskobun öncüsü Minsky (5) 1955'de canlı beyinde nöral ağ üzerinde çalışırken, küçük bir doku alanına aynı anda bir kondanser yardımı ile hem ışık kaynağını hem de mikroskobun objektif lensini odaklayarak keskin bir imaj elde etmiştir. Işık kaynağı ve objektif lens aynı fokal noktayı kullandığından bu mikroskoba KM denmiştir. Modern KM'un optik teorisini Wilson ve Sheppard geliştirmişlerdir (6). Spesmendeki tek bir noktanın noktasal bir ışık kaynağından aydınlatılması ve eş zamanlı olarak noktasal bir detektörle oluşan görüntünün saptanmasının, ışığın dağılma fonksiyonunda daralmaya yol açacağı ve sonuçta hem lateral (x,y) hem de aksiyal (z) rezolüsyonda artış olacağı savunulmuştur. Ancak böyle noktasal bir incelemede, tüm alanı taramak için ya spesmeni illüminasyon odak noktasının gerisine hareket ettirmek ya da "okta illüminatör ve nokta detektörün eş zamanlı hareketleri gerekmektedir. Bu sorun Petran ve Hadravsky (7)'nin kullandıkları modifiye Nipkow diskinin mikroskoba integre edilmesi ile çözülmüştür. Bu disk üzerinde, Arşimed spiralleri şeklinde düzenlenmiş binlerce delik yer almaktadır. Bu delikler konfokal olan nokta ışık kaynağı ve nokta detektörler arasında konjuge bir simetriye sahip olacak şekilde yerleştirilmiştir. Diskin gerçek zamanlı görüntü sağlayacak hızda döndürülmesi ile iğne deliklerden geçen ışık dokuyu taramakta, bu sırada detektör delikler optik hacmin dışından gelen ışınları fotodetektöre ulaşmadan önce elimine etmekte ve objektif lens görüntüyü iğne deliğin çapında elde etmektedir. Bu şekliyle araç, "Tandem Scanning (peşpeşe tarayıcı) Konfokal Mikroskop" (TSKM) ismini almıştır. Bu mekanizma sayesinde, İM'dan farklı olarak ışık, doku üzerinde istenilen düzeyde odaklanabilmekte ve istenilen incelikte optik kesit alma şansı ortaya çıkmaktadır. Konvansiyonel optik görüntüleme uygulamaları rezolüsyon, kontrast ve foküs derinliği açısından sınırlılık göstermektedir. Rutin İM ile sağlanan görüntüler sadece foküs planını değil, ilgilenilen alanın altından ve üstünden yansıyan ışığı da içermekte böylelikle saçılan ışık alan derinliği içindeki yapıların detaylarını engellemektedir. Speküler mikroskobide ise korneal epitel ve endotef gibi yüzeylerden alınan yansıma ile bu sınırlamalar aşılmaktaysa da sağlanan yeterli

Oelif Tarihi; 22.04.1995

\* Op.Dr.Ankara Numune Hastanesi 1 .Göz Kli. Başasistanı,

\*\* Uzm.Dr.Ankara Üniv. Tıp Fakültesi Histoteji-Embriyotop ABD, ANKARA

Yazışma Adresi: İzzet CAN

Ankara Numune Hastanesi 1.Göz Kliniği,  
ANKARA

kontrast ve rezolüsyon bu tabakaların önünden ve arkasından aynı şiddette yansıma olmamasına bağlıdır. Bu tabakalar arasındaki bölgelerden yeterli detay elde edilememektedir. Ayrıca skarlaşma ve ödem gibi kornea patolojiler stromadan ışık saçılmasında artışa neden olarak endotei görüntüsünü bozmaktadır. Oysa TSKM delikli rotasyonel diaframı sayesinde sadece odaklandığı plandan gelen görüntüyü geçirmekte, bu planın önü ve arkasındaki planlardan gelen görüntüleri elimine etmekte vs çok yüksek düzeyde kontrast ve rezolüsyonda (lateral düzlemde 0.2 um, aksiyal düzlemde 0.4 um) kaliteli görüntü elde edilmektedir (8).

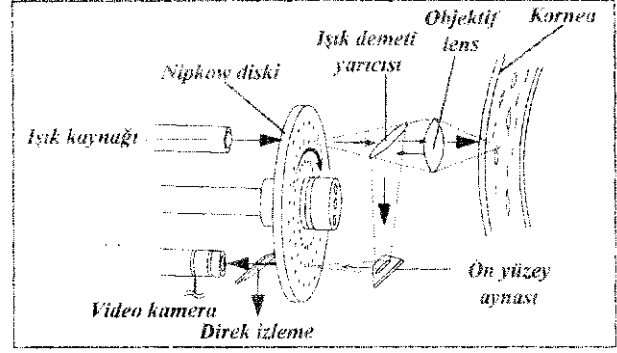
KM'un son yıllarda çok popüler hale gelmesine neden olan özelliği, 3 boyutlu (3B) görüntü sağlamasıdır. Z aksında artmış rezolüsyon, farklı derinliklerden optik kesit alma yeteneği ve bu kesitlerden alınan görüntülerin bilgisayar yardımı ile birleştirilmesi 3B derinlikli görüntü olanağı vermektedir. Ancak KM ile gerçek anlamda da stereoskopik görüntüler elde etmek mümkündür, insan gözündeki stereopsis mekanizmasına benzer şekilde, iki gözün 7 10°'lik açı farklılığı ile dünyayı görmesi gibi aynı açıda mikroskopik görüntülerin horizontal eksende kaydırılması ile ve alınan görüntülerin bilgisayarlarla birleştirilmesi sonucu stereoskopik görüntüler elde etmek mümkün olmaktadır (9,10).

Konfokal görüntülerin gerçek zamanlı olarak (saniyede 30 kareden fazla) elde edilip video kameralarla kaydedilebilmesi, dokuların dinamik olarak izlenebilmesini sağlar ki bu da görüntülere zaman boyutunu da ekleyerek 4 boyutluluğu (4B) getirir. KM'la sağlanan avantajları Tablo 1'de izlemek mümkündür.

KM, oftalmik kullanımdan önce biyolojik bilimlerde ve materyal bilimlerde geniş kullanım alanı bulmuştur. Hücre biyolojisi, genetik, immünoloji, patoloji, nöroloji, tümör araştırmaları, farmakoloji, toksikoloji, parazitoloji ve biyofizik gibi alanlarda yaygın olarak kullanılmıştır. Boyanma zorluğu olan ya da boyanmamış preparasyonların, zayıf kontrast gösteren objelerin ve yansıma özelliği gösteren maddelerle işaretlenmiş maddelerin araştırılmasında kullanılmaktadır. Yine bu teknikle ışık kaynağı olarak çift lazer kullanılarak işaretleme yapılan dokular ve işaretlenmemiş dokular birlikte görüntülenerek lokalizasyon saptama kolaylaşmaktadır. Örneğin,

Tablo 1. Konfokal mikroskopa sağlanan avantajlar

1. 2 aksında optik kesit alabilme
2. Konvansiyonlu mikroskoplara göre artmış lateral ve aksiyal rezolüsyon
3. Fritifing etkinin (ışınların kırılması sonucu ortaya çıkan kafes tarzı toyu gölgeler) yokluğu ile artmış İmaj kontrastı
4. Yüksek büyütme imkanı (200-630X)
5. Dört boyutlu (4B) görüntü (x,y,z ve zaman)
6. Opak dokulardan (kornea ödem, skar) görülebilen yapıların
7. Şeffaf ortamlarda (korneal stroma) çalışabilme
8. Canlı gözde gerçek zamanlı, rton invazü dinamik olarak (bir süreç içinde) uyumlu çalışabilme



Şekil 1. Tandem Scanning Konfokal Mikroskobun çalışma şeması

hücre membranları ve çekirdek bir lazerle, hücre içi immünokimyasal ajan ise ikinci bir lazerle aydınlatılarak bu ajanın hücre içi lokalizasyonu saptanabilmektedir (11).

### Konfokal Mikroskobun Teknik Özellikleri

KM, sırası ile 1) Işık kaynağı, 2) Tarayıcı sistem (Delikli diafram: modifiye Nipkov diski), 3) Objektif lens, 4) Fotodetektör (Fotomultipler), 5) Çıktı sistemleri a) direk izleme, b) videokamera, c) bilgisayar gibi bölümlerden oluşmaktadır (Şekil 1). Işık kaynağı: Nokta aydınlatmayı sağlamak için ya koheran (lazer dalga boyları) ya da inkoheran ışık (crva buharlı lamba) kullanılmaktadır. Lazer ışık kaynağı (en sıklıkla Helyum-Neon ve Argon) özellikle floresan mikroskopi gibi özel görevlerde kullanılmıştır. Koheran ışık yüksek foküsleme, yoğun aydınlatma ve sonuçta daha yüksek rezolüsyonda görüntü elde etme gibi bazı avantajlara sahiptir. Ancak bugün için lazer scanning konfokal mikroskoplarla (LSKM) görüntüleri gerçek zamanlı elde etmek açısından yeterli tarama hızı sağlanamamaktadır. Sadece Sodyum-Argon (488 nm) lazer ışık kaynağı kullanan Goldstein mikroskobu ile bu sorun sınırlı olarak aşılmıştır (4). Özellikle in vivo oftalmik görüntüleme için kullanılan gerçek zamanlı TSKM'larda inkoheran beyaz ışık kullanılmaktadır.

Tarayıcı Sistem: TSKM'un tarayıcı özelliği modifiye Nipkow diskinin rotasyonu ile sağlanmaktadır. Disk üzerinde arşimed spiralleri düzeninde 13000 ile 20000 arasında değişen sayıda 20-80 um çaplı iğne delikler yer almaktadır. Diskten ışık geçme yüzdesi %9.25-2'dir. İnkoheran aydınlatma ile kullanılan gerçek zamanlı KM'lar Nipkov diskinde aydınlatıcı ve saptayıcı deliklerin konjuge edilmesi açısından 2 tiptir. I) Çift ışık yollu (Petran-Hadravsky): Giden ve dönen ışık birbiri ile eşleştirilmiş farklı deliklerden geçer. II) Tek ışık yollu (Kino): Hem aydınlatma hem de geri toplama için aynı delik kullanılır. İkinci tip artmış noise (gürültü) seviyelerine sahip olup, birinci tipte iç yansımalar daha az olduğundan sinyal/noise oranı daha düşüktür. Nipkov di-

skinin dönme hızı mikroskobun tipine göre 180 ila 1800 devir/dakika arasında değişmektedir.

**Objektif Lens:** in vitro kullanımda mikroskobun moduna uygun {yansıma, geçirim ve floresan) objektif lens kullanılır ve özellik göstermezken, in vivo KM'ta objektif lens son derece kritik bir elemandır. Çünkü göz in situ olarak hareketlidir, oysa lens ucunun korneaya dik konumu her zaman korunmalıdır. Bu sorun Laing (12), Koester (13) ve Bourne'nin (14) çabaları ile geliştirdikleri uzun çalışma mesafeli, koni şekilli, ucu düz veya konkav şekilli lenslerle bir oranda çözülmüştür. Konfokal optik teori; maksimum lateraf ve aksiyel rezolüsyon, kontrast duyarlılığı ve optik kesit alma yeteneği açısından yüksek nümerik apertür (sayısal açıklık) değeri olan (0.9 ve daha fazla) objektif lensinin gerekliliğini vurgulamaktadır. Z aksındaki rezolüsyon gücünün fazlalığı bu aletin en önemli üstünlüklerindedir. Bu rezolüsyon, ortamın kırma indisi ve ışık kaynağının dalga boyu ile doğru objektif lensin sayısal açıklığının karesi ile ters orantılıdır (Rezolüsyon gücü-0.61xkırma indisi-ışık kaynağının dalga boyu/sayısal açıklık<sup>2</sup>). Günümüzde çoğunlukla kullanılan objektif lensler 24X, 0.5-0.8 sayısal açıklık ve 1.5 mm çalışma uzaklığı parametrelerine sahiptir.

**fotodetektör (Fotomultiplier):** Diskten gelen ışınların şiddetini arttırıp, ölçüm sağlar ve eğer bilgisayar desteği varsa renklendirme işlemi yapabilir ve ekrana son görüntüyü getirir.

**Çıktı Sistemleri:** Bunlar direk izleme, video kamera ile kayıt ya da bilgisayar kayıtlarıdır. Yaşayan dokuların görüntülerinin gerçek zamanlı elde edilmesinin 2 önemli avantajı vardır. Bunlar; 1) yüksek büyütme imajları bulanıklaştırabilen nabız ve solunum nedenli düzensiz hareketlerin olumsuz etkilerinin azaltılması, 2) kan akımı ve akut hücresel cevap gibi akut temporal aktiviteler üzerinde çalışabilmektedir. Gerçek zamanlı imaj şu anda sadece Nipkovv diski temelli mikroskoplarla üretilmektedir. Buna karşın bu diskten ışığın sadece %0.25-2'si geçebilmektedir. Bu da dokuya ulaşan ışıkta önemli bir azalmaya yol açar ve in vivo görüntülemenin sağlanması için düşük ışık seviyeli video kameralarla çalışmayı gerektirir. Sıklıkla kullanılan Dage-MTi SIT 66 video kamera bahsedilen özelliklere sahiptir.

### **Konfokal Mikroskobun Oftalmik Kullanımı**

Maurice (15), 1974'de mikroskobunda kullandığı sliti çok daraltarak izlenen alanın önündeki ışığı saçan hacmi azaltmak suretiyle kaliteli görüntü elde etmiştir. Ancak izlenen alanın arttırılabilmesi ya ışığın ya da objenin hareketi ile mümkün olabileceğinden Maurice'in geliştirdiği slit scanning optik mikroskopta obje hareket ettirilmiş, imaj alınan fotoğrafların birleştirilmesi ile sağlanmıştır. Ancak objenin hareket ettirilmesi zorunluluğu, gerçek zamanlı ve in vivo görüntü verme imkanı tanımamıştır. Koester (13)'in 1980'de süt speküler mikros-

kopta tarayıcı ayna sistemi ilavesi ile doku yerine sliti doku üzerinde hareket ettirerek sağladığı gelişme, kornea! endotelin geniş alanlı speküler görüntülerini sağlama da bulanık mediadan imaj temini, büyütme ve gerçek zamanlı görüntü için tarama hızı, yetersiz kalmıştır. Lemp ve ark.'lan 1988'da ilk kez konfokal sistemi oküler dokuya uygulayarak, eksiz bir insan korneası ve in situ bir tavşan gözünde tüm korneal tabakaları görüntülediler. Yine 1986'da ilk kez TSKM'la hayvan gözlerinden in vivo gerçek zamanlı imaj elde edilmiştir (1-3). Canlı insan gözlerinde TSKM ilk kez 1989'da Cavanagh ve ark. (4)'ları tarafından kullanılmıştır. ,

TSKM'un oftalmik uygulamalar yönünden geniş potansiyeli, ilk çalışmaların çeşitliliği ile ortaya çıkmaktadır.

TSKM'la normal korneal yapı: İn vivo incelemelerde epitel tabakasında sadece yüzey hücrelerinden oluşan ilk tabaka görülür. Yüzey hücreleri parlak çekirdekleri ile kolayca izlenirler. Kanat ve bazal hücreler herhangi bir yansıma sağlamazlar. Epitel altında epitelyal bazal laminadan zayıf bir yansıma izlenir. Bovvman alanında bazal laminanın bu 3B'lu geometrisi ilk kez in vivo olarak TSKM'la gösterilmiştir (1-4). Bazal laminanın, sıkı epitelyal yapıya olanak tanıyan dalgalı yapısı izlenebilir. Hemen bazal epitle birlikte ince taneli subepitelyal sinir pleksusu görülebilir. Klasik bilgilere göre, korneal stromanın relatif olarak aseüler olduğu ve az sayıda keratosit içerdiği kabul edilmektedir, TSKM'la in vivo incelemede korneal keratositlerin stromanın büyük kısmını doldurdukları görülmektedir (6). Ayrıca daha önce Nisida ve ark. (17)'lerinin. SEM çalışmalarında gösterdikleri ve patolojik durumlarda ortaya çıktığı söylenen (doku ödemi ve hücre aktivasyonuna bağlı) keratositlerin filapodial hücreler arası uzantıları, TSKM ile doğrulanmıştır (1). Keratositlerin stromal yoğunluğu yine ilk kez TSKM ile kantitatif olarak değerlendirilmiştir (18). LSKM ile hesaplanan keratosit yoğunluğu, 20.2±1.0 hücre/KHE (korneal hacim eleman1-250x250x10 um, kornea için kullanılan bir hacim birimi) olarak bulunmuştur. Bu mm3'de 32360+1680 hücreye karşılık gelmektedir. Yine bu araştırma ile en büyük keratosit yoğunluğunun stromanın anteriorunda epitel altında olduğu görülmüş (26.3+2.5 h/KHE) daha sonra posteriora gittikçe yoğunluğun lineer tarzda azaldığı ancak pre-Descemet bölgesinde yeniden bir miktar arttığı saptanmıştır. Stromada kollajen lamelleri, şeffaf olduklarından tek tek görme imkanı yoksa da myelinli sinir demetlerini ve tek tek aksonları tanımlayabilmek mümkündür (1,19). Elde edilen endotel görüntüleri. SM ile elde edilenlerle aynı kalitededir. Yine ilk kez episkleral venöz pleksus in vivo görüntülenerek, aközün kollektör kanallardan venöz pleksusa geçişi dinamik olarak dökümanete edilmiştir (4). TSKM'un normal yapılar içerisinde tartışmaya açtığı konulardan biri de prekorneal gözyaşı filminin yapısı ve kalınlığıdır. Önceki çalışmalar insan ve tavşanlarda çeşitli metodlarla bu kalınlığı 4-7 um olarak ölçmüşler-

dir. Prydal ve Campbell (20) hayvan ve insan çalışmalarında TSKM ve interferometre ile bu kalınlığı daha fazla bulmuşlar (40 fım) ve ana komponentin mukus tabakası olduğunu bildirmişler, daha önceki araştırmalarda kullanılan tekniklerin bu tabakayı önemli ölçüde ihmal ettiğini söylemişlerdir.

Kornea enfeksiyonlarında in vivo TSKM: KM'nin enfeksiyöz kornea hastalıklarında tanı ve takip aşamalarında sağladığı imkanlar son derece heyecan uyandırıcıdır. Chew ve ark. (21)'ları tavşanlarda deneysel bakteriyel ve fungal keratit yaptıkları araştırmalarında, biyomikroskopik yarıktı lamba muayenesi ile nonspesifik minimal stromal bulanıklık (haze) ve limbal enjeksiyon dışında bir bulgunun olmadığı, steril ülser ve epitelyal defektlerden ayırım imkanının olmadığı enfeksiyonun ilk dönemlerinde, TSKM ile epitel içinde ve yüzeysel stromada bakterileri (basillus cereus) yüksek yansıtıcılığı olan cisimcikler olarak, fungal lifleri de (aspergillus) dallanan şekillerde görüntülemişlerdir. Cavanagh ve ark. (6)'ları, domuz kornealarında deneysel akantamoeba modelinde, aktif trofozoit ve kistleri subepitelyal bölgede TSKM ile tanımlamışlardır. Yine Auran ve ark. (22)'ları, 29 yaşında bir hastada in vivo TSKM ile akantamoebayı 26 pm'luk bir obje olarak kist formunda tanımlamışlardır. Daha sonra bu tanı biyopsi ile doğrulanmıştır. Winchester ve ark. (23)'ları ise 8 olgulu bir seride akantamoeba keratitini tanı aşamasında aynı teknikle tanımlamışlar ve tedavi sürecinde stromadaki kist sayısındaki azalma ile tedaviye alınan cevabı takip etmişlerdir. Kronik rekürren herpetik keratitin bir hastadaki etkileri de TSKM'ta incelenmiştir (6). Burada epitel hücrelerinin genişliğinin arttığı, ön stromada yoğun fibrozis olduğu ve bölgedeki subepitelyal sinir pleksusunun kaybolduğu, derin stromada da skarlaşma ve mikrovaskülarizasyon olduğu tanımlanmıştır. KM'un subepitelyal ve stromal sinirlerin varlığını değerlendirmesi, herpetik keratit gibi bazı hastalıkların fizyopatolojik mekanizmalarının anlaşılmasında önemli bilgiler kazandırmaktadır. Bu gözlem, Lemp ve ark. (24)'larının epitelyal turnover ve kornea) denervasyon arasında ters orantı olduğuna dair teorilerini desteklemektedir. Ayrıca korneal stromada mikro damarların tesbiti neovaskülarizasyonların in situ kantitatif değerlendirilmesinde TSKM'un yararlı olacağını düşündürmektedir.

Korneal yara iyileşmesi ve radial keratotomide TSKM: KM'un dinamik bir yöntem olarak geliştirilmesi, korneal yara iyileşmesi sürecinin izlenmesi olanağını ortaya çıkarmıştır. Jester ve ark. (2)'ları, tavşan ve kedi gözlerinde deneysel olarak yaratılan radial insizyonları, 0-30 günler arasında TSKM'la izlemişlerdir. Kedilerde yara boşluğunun ilk 7 günde arttığı, 14-30 günler arasında ise giderek azalma gösterdiği, oysa tavşanlarda bu boşluğun sürekli arttığı görülmüştür. Kedilerde iyileşme sürecinin prekontraktıl ve kontraktıl olarak bifazik olduğu ve kontraktıl aşamanın yara yerine giren fibroblast hücrelerinin yarattığı kontraksiyona bağlı olduğu doğrulanmış, bu duruma uymayan tavşan modelinin ra-

dial keratotomi (RK) değerlendirmelerinde uygun olmadığı düşünülmesi bildirilmiştir. Petroll ve ark. (3)'ları, maymun modelinde TSKM'la RK kesilerini 45.güne dek in vivo takip etmişler, 7.gün sonrasında orta derecede fibrozis ile yara boşluğunun 45.güne dek küçüldüğünü göstermişler ve paralellik gösteren benzer değişimin santral kornea kurvatüründe de olduğunu, dolayısı ile yara içinde gelişen kontraktıl elemanların yara boşluğunu module ederek, korneal kurvatürü belirlediğine dair hipotezi desteklemişlerdir. Cavanagh ve ark. (6)'ları excimer lazer fotorefraktif keratektomi (PRK) uygulanmış bir hastada uygulamadan 6 hafta sonra, yaptıkları TSKM incelemesinde z aksında aynı seviyede bulunan merkezdeki fotoablasyon bölgesi ile çevresindeki uygulama yapılmayan alanı kıyaslamışlar, PRK bölgesi içinde bir skar dokusunun düzensiz dağılmış fibroblast hücreleri ile birlikte geliştiğini, subepitelyal sinir pleksusunun henüz rejenere olmadığını ve normal bölgede izlenen bazal lamınanın saptanmadığını tanımlamışlardır.

Kontakt lens etkilerinin araştırılmasında TSKM: Ichijima ve ark. (25)'ları, tavşan gözlerinde farklı O2 transmissibilitesi (Dk/L) olan rijid gaz geçirgen lenslerin etkilerini incelemişler, sıfır Dk/L'lı lenslerde 24 saatlik kullanımı takiben, hiç yüzey epitel hücresi izlenmezken, kanat hücrelerinin görünür hale geldiğini, 33 Dk/L'lı lenslerde yüzey hücrelerinde dökülme, 56 Dk/L'lı grupta yüzey hücrelerinde şişme ve yer yer dökülme olduğunu, 64 Dk/L'lı lenslerde ise değişim izlenmediğini bildirmiş ve gece aşırı kullanım için O2 transmissibilitesinin en az 56 olması gerektiği sonucuna varmışlardır. Ayrıca gözyaşı laktik denitrogenaz seviyelerindeki artışla da durumun paralellik gösterdiği aynı yazarlarca saptanmıştır (26). Ichijima ve ark. (27)'larının bir başka çalışmalarında, benzalkonyum klorid'in korneal olumsuz etkileri TSKM'la araştırılmış, %0.05 konsantrasyonun üzerinde yüzey epitel hücrelerinde ve alttaki kanat hücrelerinde çözülme görülmüş ve bu bulguların SEM yöntemleri ile elde edilenlerle aynı olduğu bildirilmiştir. Bu şekilde klinik korneal toksisitenin TSKM'la incelenebileceği anlaşılmıştır. Cavanagh ve ark. (6)'ları, yumuşak lens kullanımı sırasında tight lens sendromu gelişmiş bir hastada TSKM ile lensin çıkarılmasından hemen sonra yaptıkları in vivo incelemede epitel hücrelerinin düzeninin kaybolduğunu, yüzey epitel hücrelerinin abrazyona uğradığını görüntülemişlerdir.

Endotel değerlendirilmesi ve çeşitli kornea distrofi-lerinde TSKM: TSKM, SM'da endotel değerlendirilmesinin mümkün olmadığı patolojik durumlarda (korneal ödem, haze, skar) endotelinden görüntü sağlayabilme yeteneğine sahiptir. Bu konuda ilk tanımlama, Cavanagh ve ark. (4)'larınca sağlanmış, canlı tavşan gözlerinde ön kamaraya hipertonic solüsyon enjekte edilerek, SM ile endotel görüntüsü elde edilemeyecek derecede kornea ödemi oluşturulmuş, enjeksiyon anı, 5 ve 10. dakikalarda endotelin uğradığı tahribat dinamik olarak görüntülenmiştir. Kaufman ve ark. (28)'ları süt muayene ve SM ile endotel değerlendirmesi yapamadı

klan bulanık kornealı bir olguda TSKM incelemesi ile Fuchs' distrofi tanısı koymuşlar keratoplasti sonrası yapılan SEM incelemesinin bu tanıyı doğruladığını bildirmişlerdir. Blgar (29) ise 32 saatten fazla moist chamberde saklanmış stromal ödemi donör bir korneada TSKM ile hem endotei hem de korneanın diğer katlarını değerlendirmiştir. Cavanagh ve ark. (6)'ları bir iridokorneal endotelyal sendrom olgusunda endotei tabakasının yerini küçük parlak çekirdekleri ile karakterize epitel hücrelerinin aldığını göstermişler, ayrıca Reis-Buckler ve granüler distrofi olgularında in vivo görüntüler elde etmişlerdir.

İlaveten TSKM ile, hayvan modellerinde iris ve lensten de görsel bilgi sağlanmıştır (19,30).

### Sonuç

TSKM incelemeleri ile alınan ilk bilgiler; travmatik, infeksiyöz, inflamatuvar, dejeneratif ve her katın distrofik kornea hastalıklarında hücresele seviyede, noninvazif değerlendirme imkanı sağlandığını göstermektedir. Ayrıca iris ve lensten de görüntü elde edilebilmektedir. TSKM bazı dezavantajlara da sahiptir, bunların başında in vivo çalışmada karşılaşılan göz hareketleri sorunu gelir. Özellikle gözün irite olduğu bazı kornea hastalıklarında TSKM kullanımındaki parlak ışık ve applanasyon objektif problemlere yol açabilmektedir.

TSKM, bir çok yeni oftalmolojik alanda potansiyel göstermektedir. Örneğin SEM büyütmesinde ve kalitesinde görüntülerle konjonktival ve episkleral lezyonları in vivo izlemek önemli tanısall gelişmeler sağlayabilir ya da trabeküler ağın bu şekilde in vivo görüntülenmesi ile glokom gelişimine dair önemli bilgiler sağlanabilir. Yüksek sayısal açıklıklı ve çalışma mesafeli objektif lenslerin geliştirilmesi ve daha iyi video kameraların kullanımı ile retinadan in vivo yüksek büyütme görüntülerin elde edilmesi yakın gelecekte imkan dahilinde görünmektedir. Bu şekilde biyopsi olanağının olmadığı yavaş gidişli herediter retina hastalıklarında örneğin retinitis pigmentozada çok değerli vizüel bilgiler elde edilebilecektir.

Cavanagh'ın (4) dediği gibi, bu instrumanfa daha önce kimsenin gitmediği yerlere gitmek ve kimsenin görmediklerini görmek mümkün olacaktır. Yine bu temelde, aletin ileri gelişiminin vizüel bilimlerde temel bazı kavramları değiştirebileceğini düşünebiliriz.

### Kaynaklar

- Jester JV, Petroll WM, Garana RMR, Lemp MA, Cavanagh HD. Comparison of in vivo and ex vivo cellular structure in rabbit eyes detected by tandem scanning microscopy. *J MJcros*1992; 165:169-81.
- Jester JV, Petroll WM, Feng W, Esseptan J, Cavanagh HD. Radial keratotomy. I.The wound healing process and measurement of incisional gape in two animal models using in vivo confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33:3255-70.
- Petroll WM, New K, Sachdev M, Cavanagh HD, Jester JV. Radial keratotomy. III.Relationship between wound gape and corneal curvature in primate eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*1992; 33:3283-91.
- Cavanagh HD, Jester JV, Esseptan J, Shields W, Lemp MA. Confocal microscopy of the living eye. *CLAO J* 1990; 16:65-73.
- Minsky M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning* 1988; 10:128-38.
- Cavanagh HD, Petroll WM, Alizadeh H, He YG, Mc CulSey JP, Jester JV. Clinical and diagnostic use of in vivo confocal microscopy in patients with corneal disease. *Ophthalmology* 1983; 100:1444-54.
- Petran M, Hadravsky M, Egger MD, Galambos R. Tandem-scanning reflected-light microscope. *J Opt Soc Am* 1968; 58:661-4.
- Can A, Tekelioğlu M. Konfokal mikroskopu: Işık mikroskopu teknolojisinde son on yıldaki en önemli gelişme. *AÜ Tıp Fak Mec*1990; 43:717-26.
- Boyde A. Stereoscopic images in confocal (tandem scanning) microscopy. *Science* 1985; 230:1270-2.
- Siegel A, Hellmuth T, Seidel P, Geist A. Generation of 3D images via laser scanning microscopy. *Eur J Cell Biol Suppl* 1989;48:35-7.
- Baak JPA, Thunnissen FBJM, Oudejans CBM. Schipper NW. Potential clinical uses of laser scan microscopy. *Appl Optics* 1987; 26:3413-6.
- Laing RA, Sandstrom MM, Leibowitz HM. In vivo photomicrography of the corneal endothelium. *Arch Ophthalmol* 1975; 93:143-5.
- Koester CJ. Scanning mirror microscope with optical sectioning characteristics: applications. *In ophthalmology. Appl Optics* 1980; 19:1749-57.
- Boume WM, McCarey BE, Kaufman HE. Clinical specular microscopy. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1976; 81:743-53.
- Maurice DM. A scanning slit optical microscope. *Invest Ophthalmol* 1974; 13:1033-7.
- Lemp MA, Dilly PN, Boyde A. Tandem scanning (confocal) microscopy of the full thickness cornea. *Cornea* 1986; 4:205-9.
- Nishida T, Yasumato K, Otori T, Desaki J. The network structure of corneal fibroblasts in the rat as revealed by scanning electron microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988; 29:1887-90.
- Petroll WM, Boettcher K, Barry P, Cavanagh HD, Jester JV. Quantitative assessment of anteroposterior keratocyte density in the normal rabbit cornea. *Cornea* 1995; 4:3-9.
- Petroll WM, Cavanagh HD, Lemp MA, Andrews PM, Jester JV. Digital image acquisition in in vivo confocal microscopy. *J Microsc* 1992; 165:61-9.

20. Prydal JI, Campbell FW. Study of precorneal tear film thickness and structure by interferometry and confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33:1996-2005.
21. Chew SJ, Beuerman RW, Assouline M, Kaufman HE, Barron BA, Hill JM. Early diagnosis of infectious keratitis with in vivo real time confocal microscopy. *CLAO J* 1992; 18:197-201.
22. Auran JD, Starr MB, Koester CJ, LaBombardi VJ. In vivo scanning slit confocal microscopy of Acanthamoeba keratitis. A case report. *Cornea* 1994; 13:183-5.
23. Winchester K, Mathers WD, Sutphin JE, Daley TE. Diagnosis of acanthamoeba keratitis in vivo with confocal microscopy. *Cornea* 1995; 14:10-7.
24. Lemp MA, Mathers WD, Gold JB. Surface cell morphology of the anesthetic human cornea: a color specular microscopic study. *Acta Ophthalmol Suppl* 1989; 192:102-7.
25. Ichijima H, Petroll WM, Jester JV, Ohashi J, Cavanagh HD. Effects of increasing Dk with rigid contact lens extended wear on rabbit corneal epithelium using confocal microscopy. *Cornea* 1992; 11:282-7.
26. Ichijima H, Ohashi J, Petroll WM, Cavanagh HD. Morphological and biochemical evaluation for rigid gas permeable contact lens extended wear on rabbit corneal epithelium. *CLAO J* 1993; 19:121-8.
27. Ichijima H, Petroll WM, Jester JV, Cavanagh HD. Confocal microscopic studies of living rabbit cornea treated with benzalkonium chloride. *Cornea* 1992; 11: 221-5.
28. Kaufman SC, Beuerman RW, Kaufman HE. Diagnosis of advanced Fuchs' endothelial dystrophy with the confocal \* microscopy. *Am J Ophthalmol* 1993; 116:652-3.
29. Bigar FA. Examination of the cornea of intact donor eyes with confocal slit-scanning video microscopy. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1994; 204:421-3.
30. Masters BR. Confocal microscopy of the in-situ crystalline lens. *J Microsc* 1992; 165:159-67.