

(61)

Możliwości diagnostyczne modułu rogówkowego HRT II

Normal Retinal layers in HRT II corneal module

Zofia Michalewska, Janusz Michalewski, Zofia Nawrocka

Klinika Okulistyczna „Jasne Błonia” w Łodzi
Ordynator: prof. dr hab. n. med. Jerzy Nawrocki

Summary:

Purpose: The aim of this paper is to present corneal layers of healthy individuals with a confocal laser scanning ophthalmoscope (Heidelberg Retina Tomograph/ Rostock Cornea Module).

Material and methods: We analyzed 40 corneas of 20 healthy individuals and measured corneal thickness and thickness of corneal layers. We also describe cell characteristics of each layer.

Results: In the outer endothelium 846 cells/mm² were observed. In the medium endothelium 5000 cells/mm² and in the inner endothelium about 9000 cells/mm² were noted. 34 Langerhans cells/mm² in the centre and 92 Langerhans cells/mm² were present. The mean keratocyte nuclei count in the stroma was 355/mm². In the endothelium we noted a mean of 2960 cells/mm². Our data are similar to data obtained by histopathological findings.

Conclusions: HRT II cornea module is a noninvasive, rapid and repeatable instrument that enables not only measurement of corneal thickness but also the exact cell count. It can be an important tool in diagnosis and evaluation of treatment of various corneal diseases.

Słowa kluczowe: HRT II opcja rogówkowa.

Key words: HRT II cornea module.

Wstęp

Heidelberg Retina Tomograph (HRT II) jest urządzeniem pierwotnie przeznaczonym do obrazowania zaniku włókien nerwowych. Wykorzystuje się go w diagnostyce i monitorowaniu leczenia jaskry. Pozwala również na analizę chorób plamki. Heidelberg Retina Tomograph/ Rostock Cornea Module jest kontaktowym konfokalnym oftalmoskopem skaningowym umożliwiającym uzyskanie dwuwymiarowych obrazów poszczególnych warstw rogówki, rąbka rogówki, ale również spojówki oraz powiek. Opisywane było również użycie tego urządzenia w dermatologii (analiza skóry) oraz laryngologii (język), jak również w stomatologii (dziąsła i zęby) (1).

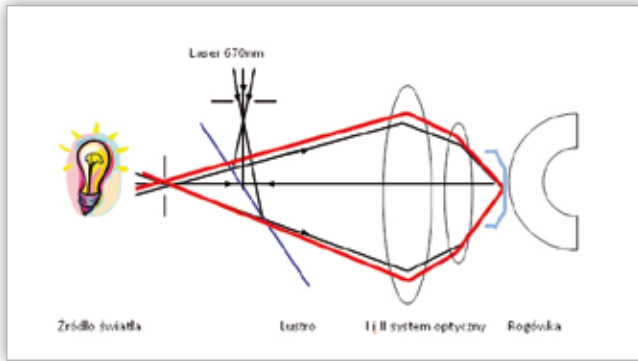
Aby uzyskać obraz, HRT II wysyła punktowe światło lasera o przekroju mniejszym niż 1 μm na powierzchnię rogówki. Światło powracające z powierzchni oka jest odbijane za pomocą dwóch oscylujących lusterek i w ten sposób powstają poszczególne dwuwymiarowe skany. Ilość światła odbitego z każdego punktu jest mierzona za pomocą detektora i przetwarzana w obraz na monitorze komputera (ryc. 1,2). Jednorazowo mierzona jest powierzchnia 0,4 mm² rogówki z rozdzielczością 384 x 384 piksele (1).

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie, po raz pierwszy w piśmiennictwie polskim, prawidłowych warstw rogówki u zdrowych osób za pomocą opcji rogówkowej HRT II.



Ryc. 1. Urządzenie HRT II, moduł rogówkowy.

Fig. 1. HRT II, cornea module.

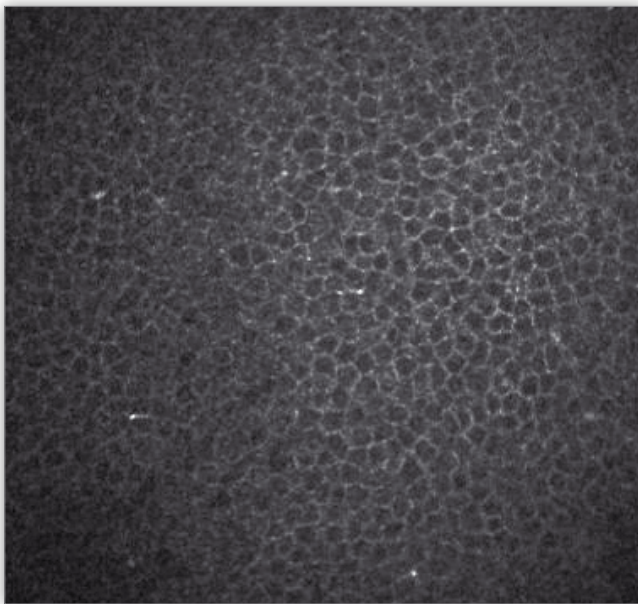


Ryc. 2. Schemat działania urządzenia HRT II, modułu jaskrowego.
Fig. 2. Principle of confocal scanning laser microscopy.

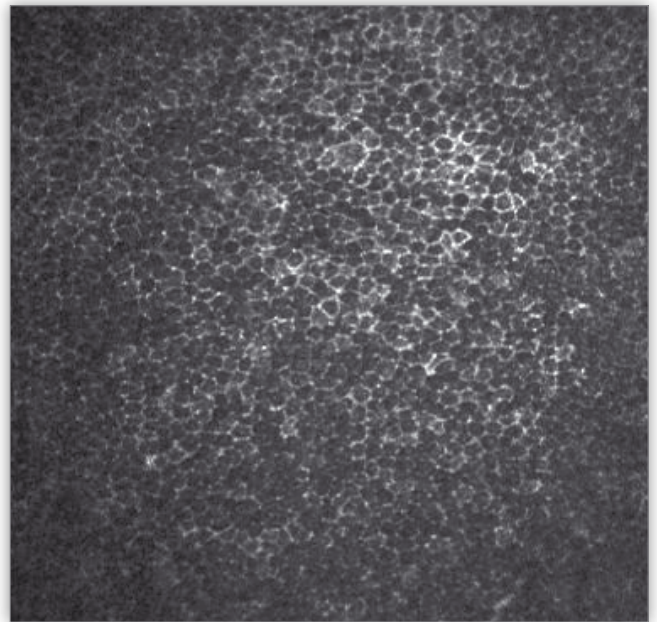
Materiał i metody

Przed pierwszym założeniem soczewek przebadano 40 oczu 20 pacjentów zakwalifikowanych do noszenia soczewek kontaktowych. Grupa składała się z 14 kobiet i 6 mężczyzn w wieku średnio 24 lat (16-35 lat). Najlepsza skorygowana ostrość wzroku wynosiła 1,0 we wszystkich oczach. Nie zaobserwowano żadnych nieprawidłowości struktury rogówki w badaniu lampą szczelinową. Wady refrakcji wynosiły od -7 do +4 Dptr. Pacjenci z astygmatyzmem nie byli brani pod uwagę. Badanie HRT II jest wykonywane po znieczuleniu powierzchni rogówki lignokainą. Następnie po założeniu na końcówkę aparatu specjalnej jednorazowej nakładki (TomoCap) dokonuje się pomiaru. Między wewnętrzną ścianą nakładki a ośrodkami optycznymi urządzenia umieszcza się niewielką ilość żelu (GenTeal) w celu zminimalizowania artefaktów mogących powstać, gdyby tę przestrzeń pozostawiono wypełnioną powietrzem.

Głębokość obserwowanych warstw była regulowana manualnie. Analizowano grubość poszczególnych warstw, strukturę komórek w poszczególnych warstwach oraz mierzono średnią grubość centralną rogówki.



Ryc. 3a. Komórki warstwy środkowej nabłonka rogówki o kształcie poligonalnym.
Fig. 3a. Polygonal cells of the corneal epithelium.

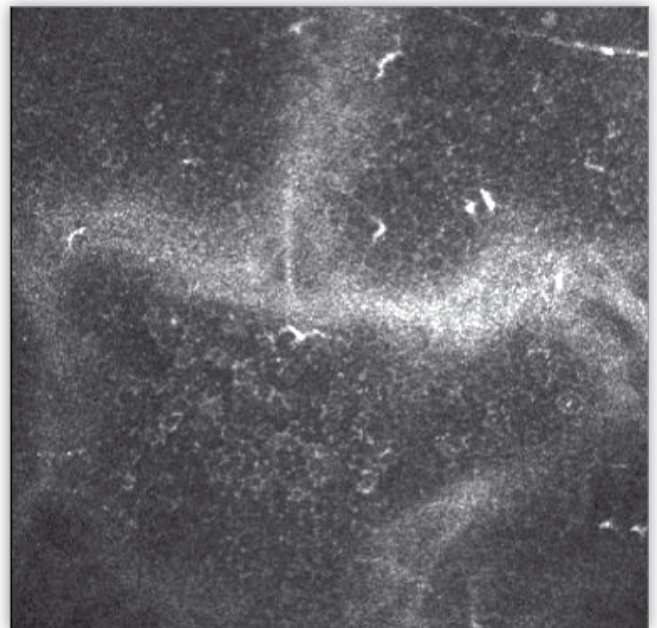


Ryc. 3b. Komórki najniższej warstwy nabłonka. Charakterystyczne są hiperrefleksyjne błony komórkowe.
Fig. 3b. Basal epithelium cells characterized by hiperreflective cell membranes.

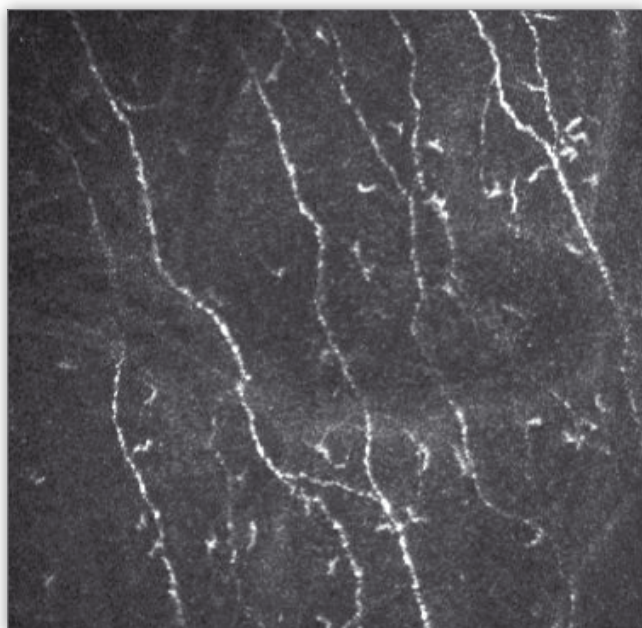
Wyniki

Średnia grubość rogówki zmierzona w 40 oczach 20 pacjentów wynosiła 558 μm ($\pm 27 \mu\text{m}$).

Nabłonek rogówki składa się z pięciu do siedmiu warstw komórek jądraztych i może zostać podzielony ze względów morfologicznych na 3 strefy. W najbardziej zewnętrznej warstwie komórek są widoczne ciemne jądro komórkowe oraz jasna cytoplazma poligonalnych, a najczęściej heksagonalnych komórek. Jej grubość wynosi około 5 μm . W ciągu doby przez film łzowy jest wymywana 1/7 tych komórek, w części tych komórek widzi-



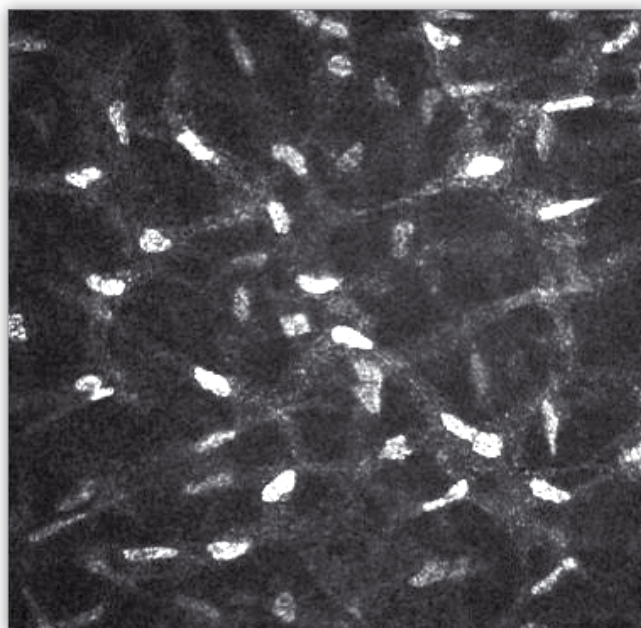
Ryc. 4a. Komórki Langerhansa pozbawione dendrytów są charakterystyczne dla centralnej części rogówki.
Fig. 4a. Langerhans cells without dendrites in central cornea.



Ryc. 4b. Komórki Langerhansa zaopatrzone w dendryty są charakterystyczne dla centralnej części rogówki.

Fig. 4b. Langerhans cells with dendrites in corneal periphery.

my zdegenerowaną cytoplazmę oraz jądro komórkowe (wysoc-refleksyjna cytoplazma, powiększone, ciemne jądro komórkowe). HRT II umożliwia ilościowy pomiar komórek zewnętrznej warstwy nabłonka rogówki. W naszej grupie pomiar ten wynosił 846 komórek/mm². Polygonalne komórki warstwy środkowej nabłonka rogówki (grubość około 10 μm) przedstawia ryc. 3a. Komórki te są nieco mniejsze niż komórki warstwy powierzchniowej, błony komórkowe są jasne, natomiast cytoplazma – ciemna. Na 1 mm² można zaobserwować około 5000 komórek, nieco mniej w centrum niż na obwodzie. Na ryc. 3b widzimy walcowate komórki

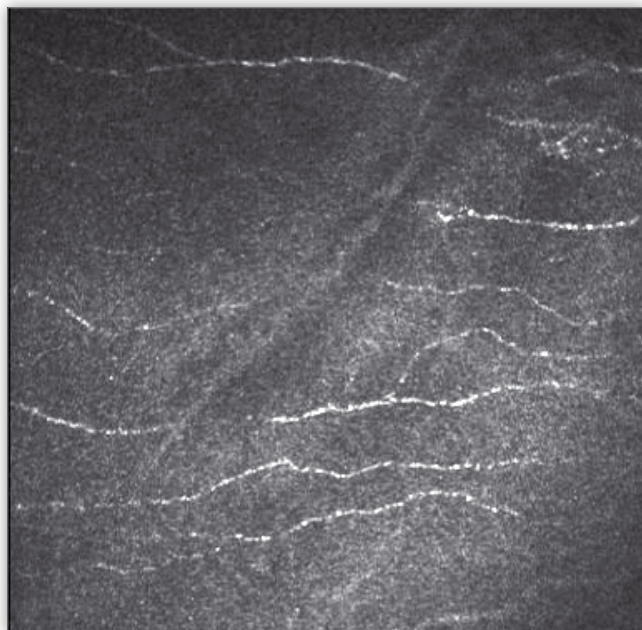


Ryc. 5. Istota właściwa rogówki.

Fig. 5. Corneal stroma.

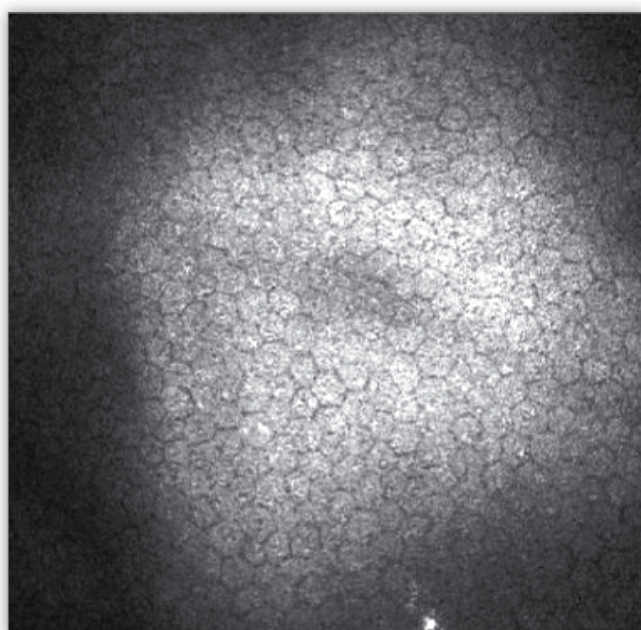
przylegające do błony podstawnej (niewidoczna w mikroskopii konfokalnej). Błony komórkowe są jasne, cytoplazma ciemna, jądra komórkowe – niewidoczne. Przeciętnie występuje około 9000 komórek/mm², nieco więcej na obwodzie rogówki.

Warstwa Bowmana (o grubości 10-16 μm) jest widoczna w konfokalnej mikroskopii skaningowej jako warstwa włókien nerwowych. Komórki Langerhansa są to jasne komórki z wypustkami. Więcej ich znajduje się na obwodzie (92/mm²) niż w centrum rogówki (34/mm²), również ich liczba zmniejsza się w głębszych warstwach rogówki. Komórki Langerhansa znajdujące się w centrum rogówki częściej są pozbawione dendrytów (ryc. 4a) niż komórki na obwodzie (ryc. 4b). Drugim elementem



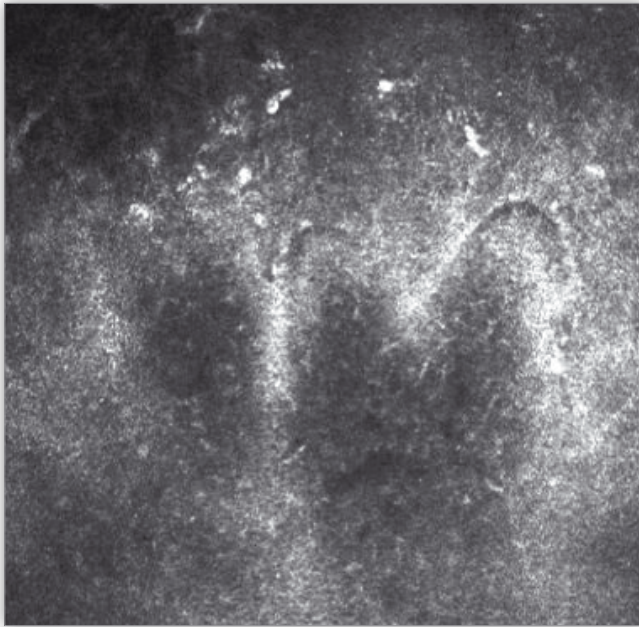
Ryc. 4c. Włókna komórek nerwowych są zlokalizowane w warstwie Bowmana.

Fig. 4c. Fibres of nerves' cells in Bowman's layer.



Ryc. 6. Komórki śródbłonka rogówki.

Fig. 6. Corneal endothelium.



Ryc. 7. Palisady Vogta.
Fig. 7. Palisades of Vogt.

składowym warstwy Bowmana są włókna komórek nerwowych, niepokryte osłonką mielinową (ryc. 4c).

Istota właściwa stanowiąca około 90% grubości rogówki składa się głównie z glikoprotein, glikozaminoglikanów, siarczanu keratyny, siarczanu chondroityny oraz kolagenu. Jedynymi, poza włóknami komórek nerwowych, możliwymi do zobrazowania strukturami istoty właściwej są jądra keratocytów, będące wyspecjalizowanymi fibroblastami (ryc. 5). Więcej keratocytów znajduje się w powierzchniowych warstwach rogówki, bliżej warstwy Bowmana oraz tuż przed błoną Descemeta (średnio 355/mm²), której nie da się uwidocznić za pomocą HRTII.

Śródbłonek rogówki (ryc. 6) składa się średnio z około 500000 heksagonalnych komórek o wymiarach 20-20 μm i grubości około 5 μm, o ciemnych błonach komórkowych oraz jasnej cytoplazmie. Opcja rogówkowa HRT II umożliwia dokładny pomiar liczby komórek śródbłonka w μm². Na tej podstawie można obliczyć całkowitą liczbę komórek śródbłonka. W naszej grupie uzyskano średni wynik 2960/mm².

W okolicy rąbka rogówki opcja rogówkowa HRT II pozwala zobrazować palisady Vogta (ryc. 7) uważane za struktury, z których powstają komórki macierzyste. Komórki nabłonka spojówki są jaśniejsze niż komórki rogówki, mniejsze i o słabiej zaznaczonych granicach.

Dyskusja

Pierwsze urządzenie umożliwiające mikroskopię konfokalną zostało przedstawione w 1957 roku (2).

Opcja rogówkowa HRT II może być wykorzystywana do pomiaru grubości rogówki (3), co ma szczególne znaczenie w diagnostyce jaskry oraz kwalifikacji pacjentów do zabiegów chirurgii refrakcyjnej, jak również w pooperacyjnej ocenie pacjentów po przeszczepie rogówki oraz po chirurgii refrakcyjnej. Zaobserwowano również zmniejszenie grubości rogówki po ortokorekcji (4). Wadą niniejszego badania jest brak porównania wyników uzyskanych za pomocą HRT z innymi metodami pomiaru grubości rogówki. Dalsze badania pozwolą odpowiedzieć na pytanie, czy

grubość centralna rogówki jest porównywalna z grubością zmierzoną podczas badania ultrasonograficznego oraz pachymetrii.

Opcja rogówkowa badania HRT II jest badaniem nieinwazyjnym, lecz kontaktowym, trwa krótko, nie naraża oka na zbyt dużą dawkę iluminacji i może zostać przeprowadzone *in vivo*. Ponadto umożliwia uzyskanie powtarzalnych obrazów oraz ilościowego pomiaru komórek w danej warstwie rogówki.

Grubość nabłonka, jak wynika z danych histologicznych, wynosi około 50 μm. Pomiar liczby komórek nabłonka rogówki potwierdza dane histologiczne, według których liczba komórek warstwy powierzchniowej do liczby komórek warstwy środkowej do liczby komórek warstwy podstawnej wynosi 1.5:10 (1).

Nabłonek rogówki jest przezroczysty dzięki małej liczbie organelli komórkowych.

Komórki Langerhansa stanowią część układu immunologicznego. Niedojrzałe formy znajdujące się z reguły w centrum rogówki mają za zadanie wychwytywanie antygenów, podczas gdy formy dojrzałe zlokalizowane z reguły na obrzeżach rogówki mogą wpływać na limfocyty T poprzez układ MHC oraz wydzielanie IL-12. Wydaje się więc prawdopodobne, że podczas noszenia soczewek kontaktowych oraz w przypadkach alergii liczba komórek Langerhansa może wzrastać.

Liczba keratocytów/mm³ w badaniach histologicznych wynosi 23120 ± 3717. Różni autorzy obliczali średnie liczby keratocytów w mm³, pomiary te wahały się od 16000 do 41000 (265-328 mm³) (5). Jester i wsp. porównali w swojej pracy keratocyty *in* i *ex vivo*, dochodząc do wniosku, że za pomocą mikroskopii konfokalnej możliwe jest zobrazowanie jedynie jądra keratocytu i niewielkiej ilości otaczającej go cytoplazmy (6). Liczba keratocytów zmniejsza się podczas noszenia soczewek kontaktowych (7) oraz z wiekiem (8). Istnieją również doniesienia mówiące o tym, że w rogówkach o większej centralnej grubości odnotowano zmniejszenie liczby keratocytów (9). Pomiar liczby keratocytów ma również, przynajmniej teoretycznie – jak się wydaje – znaczenie dla oceny gojenia się istoty właściwej, np. po zabiegach PRK. Uważa się, że uszkodzenie keratocytów podczas PRK może być bodźcem do proliferacji komórek istoty właściwej (10,11).

Liczba komórek śródbłonka wynosi około 3000/mm² przy urodzeniu i zmniejsza się z wiekiem (12,13). Liczba poniżej 400-500 komórek/mm² zwiększa ryzyko dekompensacji rogówki. Dokładny pomiar tego parametru może znaleźć zastosowanie w kwalifikacji pacjentów do chirurgii zaćmy. Pacjenci z niską liczbą komórek śródbłonka są w grupie zwiększonego ryzyka dekompensacji rogówki po chirurgicznym usunięciu zaćmy i wszczepie soczewki wewnątrzgałkowej. Udowodniono, że po chirurgicznym leczeniu zaćmy liczba komórek śródbłonka zmniejsza się średnio o 346 komórek/mm² (14).

Urządzeniem podobnym do modułu rogówkowego HRT II jest konfokalny mikroskop Confoscan (Nidek). Confoscan to urządzenie działające na zasadzie podobnej, cechujące się podobną rozdzielczością, jest to jednak badanie niekontaktowe.

Do oceny struktury siatkówki można również zastosować optyczną koherentną tomografię (Visante OCT). Metoda ta pozwala na ocenę grubości rogówki oraz ocenę kąta przesączenia. Nowsza metoda, spektralna optyczna koherentna tomografia (Optovue, Copernicus Anterior), pozwala na bardziej dokładne przedstawienie poszczególnych warstw rogówki, umożliwia odróżnienie nabłonka, warstwy Bowmana, istoty właściwej oraz

hiperrefleksyjnej linii odpowiadającej śródbłónkowi. Metoda ta pozwala na pomiar grubości rogówki, ocenę struktur kąta oraz dokładniejszą niż w optycznej koherentnej tomografii ocenę patologii poszczególnych warstw rogówki, co umożliwia ewentualne planowanie leczenia operacyjnego.

Znajomość prawidłowej struktury rogówki jest podstawą do diagnostyki jej schorzeń. Dzięki wykorzystaniu opcji rogówkowej badania HRT II są możliwe: wczesna diagnostyka powikłań u pacjentów noszących soczewki kontaktowe, różnicowanie zakażeń bakteryjnych, grzybiczych, pierwotniakowych, chorób alergicznych oraz diagnostyka suchego oka. Innym zastosowaniem jest diagnostyka dystrofii rogówkowych oraz chorób metabolicznych, takich jak m.in.: tyroznemia, gangliozydoza, cystynoza, mokolipidoza, choroba Fabry'ego. HRT II umożliwia również monitorowanie pooperacyjne po chirurgii refrakcyjnej oraz przeszczepie rogówki, jak również wczesną wizualizację komórek zapalnych po wszczepieniu poduszek filtracyjnych (1). Opisywano również przydatność tego urządzenia do oceny guzów o dużym wysyceniu melaniną, zlokalizowanych na spojówce (15).

Piśmiennictwo:

- Guthoff RF, Baudouin C, Stave J: *Atlas of Confocal Laser Scanning In-vivo Microscopy in Ophthalmology*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 2006, 149-158.
- Minsky M: *Memoir on inventing the confocal scanning microscope*. J Scanning 1988, 10, 128-138.
- Stave J: *Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie*. Augenspiegel 2005, 06, 2-4.
- Knappe S, Stachs O, Kraak R, Guthoff RF: *The cornea structure after wearing orthokeratology contact lenses-an in vivo study using a confocal laser scanning microscope*. Plakat 100, DOG/SOE, Berlin 2005.
- Patel SV, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM: *Normal Human Keratocyte Density and Corneal Thickness Measurement by using confocal microscopy in vivo*. Inv Ophthal Vis Sci 2001, 42, 333-339.
- Jester JV, Petroll WM, Garana RMR et al: *Comparison of in vitro and ex vivo cellular structure in rabbit eyes detected by tandem scanning microscopy*. J Microsc 1992, 165, 169-181.
- Efron N: *Contact lens-induced changes in the anterior eye as observed in vivo with the confocal microscope*. Prog. Retin. Eye Res 2007, 26, 398-436.
- Moller-Pedersen T: *A comparative study of human corneal keratocyte and endothelial cell density during aging*. Cornea 1997, 14, 459-464.
- Patel SV, McLaren JW, Hodge DO et al.: *Normal human keratocyte density and corneal thickness measurement by using confocal microscopy in vivo*. Invest. Ophthalmol. Vis Sci 2001, 42, 333-339.
- Wilson SE, He YG, Wneg J: *Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing*. Exp Eye Res 1996, 62, 325-327.
- Helena MC, Baerveldt F, Kim WJ, Wilson SE: *Keratocyte apoptosis after corneal surgery*. Invest Ophthalmol. Vis Sci 1998, 39, 276-283.
- Waring GO, Bourne WM, Edelhauser HF et al: *The corneal endothelium: normal and pathologic structure and function*. Ophthalmology 1982, 89, 531-590.
- Bourne WM, Kaufman HE: *Specular microscopy of human corneal endothelium in vivo*. Am J Ophthalmol 1976, 81, 319-326.
- Sobottka Ventura AC, Wälti R, Böhnke M: *Corneal thickness and endothelial density before and after cataract surgery* Br J Ophthalmol 2001, 85, 18-20.
- Messmer EM: *Konfokale In vivo Mikroskopie melanozytärer Bindehautumoren*. SOE-DOG-Kongress Berlin, 1 Kongressausgabe 2005, 09, 6-7.

Praca wpłynęła do Redakcji 20.10.2007 r. (1013)
Zakwalifikowano do druku 10.09.2008 r.

Adres do korespondencji (Reprint requests to):

lek. Zofia Michalewska
Klinika Okulistyczna „Jasne Błonia”
ul. Rojna 90
91-162 Łódź
e-mail: zosia_n@yahoo.com