

Keratokonusta in Vivo Lazer Tarayıcı Konfokal Mikroskopi Bulguları

Laser Scanning In Vivo Confocal Microscopy Findings in Keratoconus

Mehmet Fatih KARADAĞ*

Dünyagöz Hastanesi, Gaziantep

ÖZET

Amaç: In vivo konfokal mikroskopi kullanarak keratokonuslu gözlerde korneal yapıları değerlendirmek

Materyal ve Metot: Keratokonuslu 35 hastanın 68 gözü in vivo konfokal mikroskopi ile muayene edildi. 35 hastanın 70 gözü de kontrol grubu olarak seçildi. Sonuçlar kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirildi.

Bulgular: Keratokonuslu grupta in vivo konfokal mikroskopi bulguları arasında uzamış süperfisiyel hücreler, bazal epitelyal hücrelerde parlak reflektif materyal birikimi, belirginleşmiş subbazal sinirler, stromal keratositlerde düzensiz yerleşim ve belirgin reflektivite, yapısal olarak anteriyorda daha yoğun stromal keratosit nükleusları, ön orta ve arka stromada foldlar, desme membranında foldlar saptandı. Bu bulguların hiçbiri kontrol grubunda izlenmedi.

Sonuç: Keratokonuslu gözlerde korneanın tüm tabakalarında kalitatif ve kantitatif yapısal değişiklikler izlendi. Güncelliğini hala korumakta olan bu yöntem keratokonusun da tanı ve takibinde önemli bir role sahiptir

Anahtar Kelimeler: Keratokonus, Konfokal Mikroskopi, Korneal Mikroyapısal Değişiklikler

ABSTRACT

Objective: To evaluate corneal structures in the eyes with keratoconus using in vivo confocal microscopy

Material and Methods: A total of 68 eyes of 35 patients with keratoconus were examined using in vivo confocal microscopy. For the control group, 70 eyes of 35 patients were selected. A qualitative and quantitative evaluation was conducted.

Results: In vivo confocal microscopy findings in the keratoconus group included elongated superficial cells, bright reflective material accumulation in basal epithelial cells, prominent subbasal nerves, irregular location and marked reflectivity of the stromal keratocytes, stromal anterior keratocyte nuclei with high structural density, anterior, middle, and posterior stromal folds, and descemet membrane folds. None of these findings were observed in the control group.

Conclusion: Qualitative and quantitative structural changes were observed in each layer of the keratoconic cornea. This still up-to-date method has an important role in the diagnosis and follow-up of keratoconus.

Keywords: Keratoconus, Confocal Microscopy, Corneal Microstructural Changes

*Mehmet Fatih KARADAĞ
Dünyagöz Hastanesi, Gaziantep
e-mail: drmfkaradag@gmail.com
ORCID ID:// 0000-0001-8679-1605

Geliş tarihi: 17.02.2021
Kabul tarihi: 03.05.2021

GİRİŞ

Keratokonus, korneanın paraksiyel stromal incelme ve zayıflaması sonucu gelişen bilateral, progresif, non-enflamatuar bir hastalıktır. Korneanın bu ektazik bozukluğunda hücrel infiltrasyon veya vaskülarizasyon görülmez (1).

Kornea incelenmesi miyopi, düzensiz astigmatizma ve dikleşmeye neden olarak görme keskinliğinin orta ve ileri derecede azalmasına neden olabilmektedir. Keratokonus sıklıkla ergenlik çağında başlar ve 40-45 yaşına kadar remisyon ve nükslerle devam eder (2).

Keratokonus başta olmak üzere birçok kornea hastalığının değerlendirilmesinde konfokal mikroskopinin önemi giderek artmaktadır. Konvansiyonel biyomikroskopik muayenede çözünürlük ancak 20µm'dir. Konvansiyonel konfokal mikroskopide ise lateral çözünürlük 1-2µm, aksiyel çözünürlük 5-10µm düzeyindedir. Yarıklı tarayıcı konfokal mikroskoplarda saniyede 25 kare çeken bir video kamera senkronize edilerek hareketten etkilenmeyen net resimler elde edilmektedir. Ancak bu sistemlerde çözünürlük kaybı yine de önemli bir sorun olarak dikkati çekmektedir. Konvansiyonel konfokal mikroskopide karşılaşılan bu sorunlar dijital rezolüsyonu vertikal ve horizontalde 1µm/pixel olan hızlı lazer tarayıcı sistemleri kullanan konfokal mikroskoplarda (Rostock Kornea Modülü; RCM/HRT 3) ortadan kaldırılmıştır (3).

Bu çalışmamızda HRT 3 Rostock Kornea Modülü konfokal mikroskopisi kullanarak keratokonuslu hastalarda santral korneada tüm tabakalardaki yapısal ve kantitatif değişiklikler değerlendirildi.

MATERYAL METOT

Mayıs 2003-2008 tarihleri arasında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Kornea departmanında keratokonus tanısı almış 35 olgu incelemeye alındı. Olguların hiçbiri kontak lens kullanmıyordu. Olguların korneaları Heidelberg Retina Tomografisi 3 (HRT 3) Rostock Kornea Modülü konfokal mikroskopisi ile prospektif olarak incelendi. Elde edilen değerler aynı yaş grubundaki görme keskinliği 1.0(tam) kırma kusuru ± 0.50 D olan, herhangi bir kornea hastalığı olmayan, sistemik hastalığı bulunmayan 35 sağlıklı bireyden elde edilen değerlerle karşılaştırıldı.

Keratokonus tanısı retinoskopide makaslama refleksi, santral veya parasantral incelme, konik çıkıntı, hemosiderin birikimi (Fleischer halkası), stromal strialar (Vogt stria), Descemet membran kırışıklıkları, apikal skar veya subepitelyal fibrozis, bilgisayarlı kornea topografisinde (EyeSys Laboratories, Inc, Houston, TX) merkezi veya parasantral dikleşme ile kondu. Keratokonuslu gözler hafif (<47 diyoptri=D), orta (47-55 D) veya şiddetli (>55 D) olarak sınıflandırıldı.

HRT 3 Rostock Kornea Modülü, 670 nm dalga boylu diod lazer ışığı kullanır. Toplam imaj alım süresi iki boyutlu imaj için 0.024 sn, üç boyutlu imajlar için 4 saniyedir. Optik çözünürlük vertikal 2µm, horizontal 4µm olup dijital rezolüsyon vertikal ve horizontalde 1µm/pixeldir. Alınan görüntülerin düzenlenmesi cihaza bağlı bir CCD kamera (480x460 pixel, RGB, 15 imaj/sn) ile sağlanır.

Muayene öncesi her bir göze topikal anestezi (%0,5 Proparacain) kondu. Objektifin başına her hastada değiştirilen steril PMMA başlık takıldı. Daha sonra cihazın çene kısmına hastanın çenesi yerleştirildi. Objektif lense bir damla jel (Viscotears jel ®, CIBA Vision) sürülüp lens göze doğru ilerletildi. Görüntü netliği de CCD kameradan izlenerek manuel sayım için taranacak alan seçildi. Cihazdaki hazır bulunan program kullanılarak belirli bir derinlikteki sabit büyüklükte bir alan içindeki hücreler işaretlendi, manuel düğmesine basılarak hücre sayılarına ulaşıldı. Hata payını en aza indirmek için aynı plandaki iki ayrı görüntü alanında sayım yapıldı ve ortalaması alındı. Cihazdaki yazılım ile endotel hücre dansitesi otomatik olarak ölçüldü. Ön ve arka stromadaki keratositler ve endotel hücre sayımları manuel olarak sayıldı ve aynı programın manuel düğmesine basılarak hücre dansiteleri elde edildi. Ön ve arka stromadaki keratositlerin sayımında bir hata olmaması için z- scan görüntüden doku derinliği kontrol edildi. Seçimler her görüntü alanının altında beliren derinlik (mikron) değerine dikkat edilerek yapıldı. Aynı işlemler diğer göz için de tekrarlandı. Her göz için ortalama yüz çekim yapıldı. Bütün muayeneler aynı araştırmacı tarafından yapıldı.

Değişkenlerin normal dağılıma uyup uymadığı Shapiro-Wilk testi ile test edildi ve normal dağılıma uyan değişkenler ortalama \pm standart sapma değerleri ile verildi. İki grup arasındaki sürekli değişkenlerin analizinde "Bağımsız Örneklem t-Testi" kullanıldı. Kategorik değişken olan cinsiyet frekans ve yüzde değerleri (n(%)) ile verildi, karşılaştırmasında Pearson ki-kare testi kullanıldı. İstatistiksel analizler IBM SPSS Statistics 22.0 programında yapıldı. Anlamlılık düzeyi 0,05 alındı. Çalışma protokolü Yüzüncü Yıl Üniversitesi etik komitesi tarafından onaylandı. Çalışma Helsinki Deklarasyonu ilkelerine göre tasarlanıp katılan tüm hastalardan bilgilendirilmiş onay alındı.

BULGULAR

Birinci grubu oluşturan 35 keratokonuslu olgunun 68 gözüne konfokal ölçüm yapıldı. Olguların 15'i (% 42,9) erkek ve 20'si (% 57,1) kadın olup, yaş ortalaması 21,06 \pm 11,13 (14-41) idi.

Kontrol grubu olarak ise 35 olgunun 70 gözü çalışma kapsamına alındı. Olguların 26'sı (%73,9) erkek ve 9'u (%26,1) kadın olup, yaş ortalaması 23,91 \pm 12,93 (14-35) idi (Tablo 1).

Tablo 1. Olguların yaş ve cinsiyet dağılımı

	GRUP 1	GRUP 2
	n=35	n=35
	(Keratokonus)	(Kontrol)
Yaş	21,06 \pm 11,13 (10-41)	23,91 \pm 12,93 (14-35)
Kadın	20 (% 57,1)	9 (% 26,1)
Erkek	15 (% 42,9)	26 (%73,9)

Yaş ve cinsiyet açısından karşılaştırıldığında keratokonus olgularıyla kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$).

Keratokonuslu hastalar ile sağlıklı bireyler, keratometri değerleri ve santral kornea kalınlığı açısından kıyaslandığında ileri derecede anlamlı olarak 1.grupta santral kornea kalınlığı (SKK)'nın azaldığı tesbit edildi ($p<0,01$) (Tablo 2).

Tablo 2. Gruplar arasındaki Km ve SKK değerlendirilmesi

	GRUP 1	GRUP 2
Km	52,20±5,9 D (41,25-77,40 D);	44,6±3,8 D (42,9-53,8 D)
SKK	461,3±36,6 µm (268-571 µm)	(483-571 µm) 534,5±15,6 µm

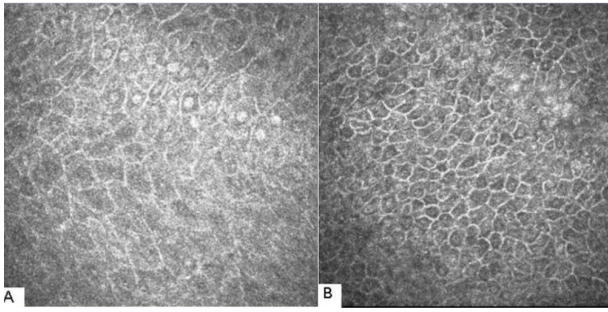
Birinci grupta 68 gözün 22'si (%28,2) hafif keratokonus, 23'ü (%35,9) orta keratokonus, 23'ü (%35,9) ağır keratokonusu. Hastaların hiçbirinde akut hidrops öyküsü yoktu. Hasta gruptaki biyomikroskopik muayene bulguları Tablo III'te görülmektedir. İkinci grupta bu muayene bulgularının hiçbirisi izlenmedi.

Tablo 3. Keratokonuslu hastaların biyomikroskop muayene bulguları

Bulgular	Göz sayısı (n=68)
Belirginleşmiş sinirler	46 (% 67,6)
Vogt striası	34 (% 50,0)
Fleischer halkası	22 (% 32,3)
Stromal skar	17 (% 25,0)
Descemet foldları	2 (% 2,91)

In vivo konfokal mikroskopi bulguları tüm gözlerin santral kornealarından çekilerek kaydedildi. Birinci grupta ağır keratokonuslu 8 (% 36,3) gözde yüzeyel epitel hücreleri genişlemiş, uzamış ve deskuame olarak izlendi (Figür 1A,B)

Figür 1A,B: Ağır keratokonuslu gözlerde izlenen genişlemiş, uzamış ve deskuame yüzeyel epitel hücreleri.

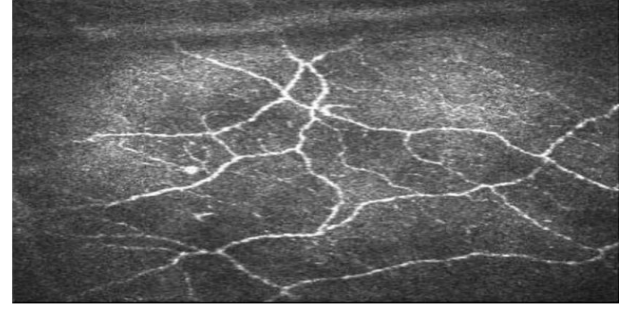


Figür 1A,B

Fleischer halkası izlenen 22 gözün 18' inde (% 81,8) bazal epitel hücrelerinde hemosiderin olduğu düşünülen parlak, reflektif material birikimi izlendi. Bowman membranı bu seviyede amorföz bir membran olarak izlendi.

Her iki grupta da subbazal sinir plexusunun boncuk gibi dizilmiş sinir lifleri izlendi. Birinci grupta belirginleşmiş sinir lifleri mevcut olan 46 gözün 16'sında (%34,7) sinirlerde boncuk tarzı dizilim yanında kalınlaşma, kıvrımlaşma ve dallanma artışı da izlendi (Figür 2).

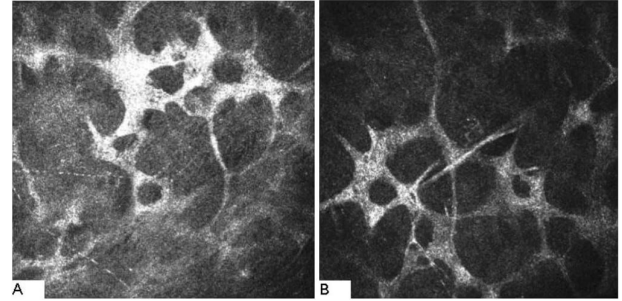
Figür 2: Subbazal sinir plexusunda boncuk tarzı dizilim yanında kalınlaşma, kıvrımlaşma ve dallanma artışı görülüyor.



Figür 2

Keratosit nükleusları anterior stromada posterior stromaya göre oldukça fazla olup anterior stromal keratosit nükleuslarının düzensiz yapılaşması izlendi (Figür 3 A,B).

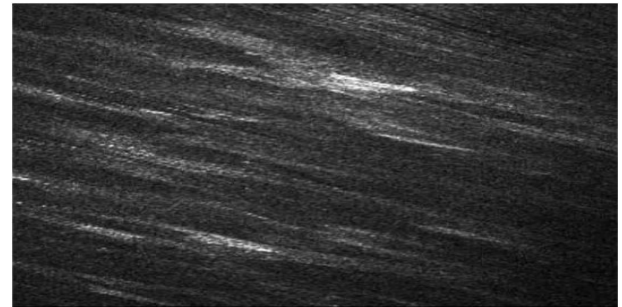
Figür 3 A,B: Anterior stromada daha yoğun olan keratosit nükleuslarındaki düzensiz yapılaşma izleniyor.



Figür 3 A,B

Birinci grupta 16 (%23,5) gözde, anterior stromada artmış arkaplan illüminasyonu, artmış reflektivite ve anterior stromal keratosit nükleuslarının düzensiz yapılaşması izlendi. Bu da değişen derecelerdeki haze ve stromal skarın varlığı ile ilgiliydi. Vogt strialarını ifade eden stromal foldlar 34 (%50) gözde izlendi (Figür 4).

Figür 4: Stromal foldlar (Vogt striaları).



Figür 4

Foldlar boyunca keratosit nükleusları sadece foldların tepe yaptığı alanlarda izlenebildi. Karanlık bantlar olarak görülen oluk hattı boyunca izlenemedi.

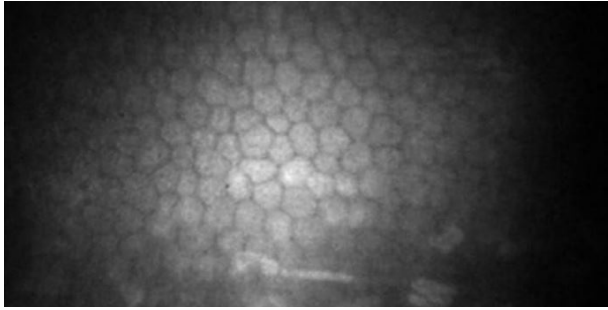
Tüm olgularda stroma keratositlerinin yoğunluğunu saptamak için ön ve arka stroma bölgesindeki keratositler sayıldığında istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı olarak keratokonuslu olgularda ön ve arka stroma keratosit dansitesinin kontrol grubuna göre azaldığı saptandı (Tablo 4).

Tablo 4. Tüm gözlerde ölçülen kantitatif in vivo konfokal mikroskopi indeksleri

	GRUP 1	GRUP 2	P değeri
Ön stroma keratosit dansitesi (hücre/mm ²)	651,38±89,09	879,40±75	<0,05
Arka stroma keratosit dansitesi (hücre/mm ²)	363,56±73,69	466,69±56,47	<0,01
Endotel hücre dansitesi (hücre/mm ²)	2664,91±86	2729,55±94	>0,05

Keratosit nükleusları ve endotel hücrelerinin birlikte görüldüğü transizyon zonunda olduğu düşünülen Descemet membranı konfokal mikroskopi ile ayırt edilemez.

Endotelial hücreler parlak hücre sınırları ve parlak hücre gövdeleri ile ayırt edilir (Figür 5).

Figür 5: Parlak hücre sınırları ve parlak hücre gövdeleri ile ayırt edilebilen endotelial hücreler.**Figür 5**

Keratokonumlu hastalarda endotel hücre dansitesi 2664,91±86 hücre/mm² olup kontrol grubunda 2729,55±94 hücre/mm² olarak saptandı. Her ne kadar 1.grupta ortalama endotelial hücre dansitesi 2. gruba göre daha az ise de bu istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 4).

TARTIŞMA

İn vivo konfokal mikroskopi kornea fizyolojisini ve hastalıklarını incelemek için vazgeçilmez bir araç haline geldi. Kornea mimarisinin hücresel düzeyde diseksiyonunu sağlayan bu teknik, ex vivo histokimyasal tekniklerle karşılaştırılabilir görüntülerle korneanın hızlı ve invaziv olmayan in vivo görüntülenmesine olanak sunar (4,5).

Korneal konfokal mikroskopi canlı kornea dokusunda yapısal değişiklikleri incelemek için kullanılan non invaziv bir yöntemdir. Çalışmamızda HRT3 konfokal mikroskobisi ile santral korneal yapılar tüm hastalarda başarılı bir şekilde görüntülendi. Hasta kornealardaki morfolojik değişiklikler genellikle kornea apeks bölgesinde izlendi. Artmış arkaplan illuminasyonu, artmış reflektivite ve anterior stromal keratosit nükleuslarının düzensiz yapılaşması, uzamış süperfisyal epitel hücreleri, yüksek yansımali opasiteler, Bowman membranı kenarında folda benzer yapılar, boncuk gibi dizilmiş sinir lifleri, ön stromanın artmış yansımaları, Vogt striaları, uzamış, kıvrımlanmış ve virgül benzeri konfigürasyon gösteren keratosit nükleuslarının görünümü tipikti. Bu bulgular keratokonusta ile ilgili yapılmış birçok olguyla benzerlik arz ediyordu (6-10).

Keratokonumlu gözlerdeki dejeneratif sürece bağlı

olarak epitelyal devir oranı arttığından epitelyal hücrelerde sıklıkla elongasyon ve ekfoliyasyon izlenir. Bizim tesbit ettiğimiz bu durum birçok yayında da gösterilmiştir (8).

Bizim çalışmamızda keratokonusun evresine bağlı olarak hem yüzeysel epitel hücrelerinde hem de bazal epitel hücrelerde uzama ve genişleme tesbit ettik. Hollingsworth ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da bazal epitel hücrelerinin genişlediği ifade edildi (11).

Uçakhan ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, bazal epitel hücrelerdeki hemosiderin birikimi (Fleischer halkası) gözlerin %70'inde izlenebildi. Periferik yerleşiminden dolayı gözlerin %30'unda izlenemedi (9). Bizim çalışmamızda ise aynı sebepten dolayı gözlerin sadece %25,9'unda parasantral Fleischer halkası izlenebildi.

Belirginleşmiş korneal sinirler keratokonumlu gözlerin biyomikroskopi muayenesinde de bazen görülebilirken temel olarak konfokal mikroskopi ile tesbit edilebilir (12-13). Belirginleşmiş sinir oranı bizim çalışmamızda %67,6 olup bu gözlerin de yaklaşık yarısında (%34,7) boncuk tarzı dizilim mevcuttu. Uçakhan ve arkadaşlarının çalışmasında bu oran %29,2 idi. Bazı yayınlarda bu sinir plexusunun önemi vurgulandı. Özellikle Flockerzi ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptığı çalışmada korneal topografinin progresyonu takip etmekte yetersiz kaldığı ileri keratokonusta hastalarında, konfokal mikroskobiyile subbazal sinir plexusundaki değişimlerin izlenmesinin önemi gösterildi (14).

Geleneksel olarak ifade edilen aksine çalışmamızda Vogt striaları sadece arka stromada değil ön ve orta stromada da izlenmiştir. Bazı yayınlarda da benzer bulgu rapor edildi (9,11).

Literatürde kontak lens kullanan ve kullanmayan keratokonumlu olgularda keratositlerin anormal morfolojisi ve keratosit dansitesinin ön ve arka stromada istatistiksel olarak anlamlı olarak değişik oranlarda azaldığı saptanmıştır (7,9,10,11).

Kontakt lens kullanmayan keratokonumlu hastalarda yaptığımız çalışmamızda ise bu azalma ön stromada %25,9 arka stromada ise %22,1 olarak izlendi.

Keratosit dansitesindeki bu azalış ile ilgili olarak Hollingsworth ve arkadaşları kronik göz ovuşturma ve atopiye suçlarken, Wilson ve arkadaşları ise bu durumun epitelyal hasara sekonder gelişen apoptozise bağlı olabileceğini ifade ettiler (8,14).

Endotel hücreleri hegzagonal yapıda ve yaklaşık aynı boyutlarda hücrelerden oluşur. Endotel hücre dansitesi doğumdan sonra adolesan çağına kadar hızla azalır, 20 ile 50 yaş arasında stabilize olur ve 60 yaşından sonra belirgin olarak azalır. Doğumda endotel hücresi yaklaşık 4000 hücre/ mm² iken genç erişkinde 3500 hücre/ mm²dir (16). Kontakt lens kullanımı birçok mekanizma ile endotel hücre değişikliğine neden olur. Bunlar arasında özellikle laktat akümülyasyonu, pH değişikliği, CO₂ içeriğinde artış, endotelial adenozin trifosfat düzeyinde azalma ve kalsiyum metabolizmasında bozukluk sayılabilir (17). Bilgin ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ortalama 7,8 ±3,6 yıl, günde en az 12 saat PMMA kontakt lens kullanan olgularda normal gruba göre endotel hücre dansitesinde istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma ve polimegatizmde

ise istatistiksel olarak anlamlı artış bildirilmiştir (18). Bizim çalışmamızda kontak lens kullanılmamasına rağmen hastalarda benzer bulgular görüldü. Bu durum hastalık sürecinin bir parçası olarak değerlendirildi.

Uçakhan ve arkadaşları, endotel hücre dansitesinin keratokonus evresinden etkilendiğini ve ileri keratokonuslu hastalarda hafif ve orta keratokonuslu hastalara ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak belirgin derecede azalmış olduğunu tesbit ettiler (9).

Aksine bazı çalışmalarda keratokonuslu gözlerde endotel hücre dansitesinin belirgin olarak arttığı izlenmiş olup bunun sebebi olarak da bu gözlerde miyopi birlikteliği, sert gaz geçirgen lensler ile ilgili olabileceği ifade edildi (11).

Keratokonuslu bazı gözlerde kon apeksine doğru endotel hücre uzaması birkaç yayında rapor edildi (19,20). Bunun aksine olarak Hollingsworth ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada ileri keratokonuslu hastalarda bile endotel hücrelerinde ciddi bir değişim izlemediler (8,21).

Bizim çalışmamızda ise endotel hücrelerde bir şekil değişikliği görmedik. Bununla beraber keratokonus evresinden bağımsız olarak keratokonuslu 1. grupta endotel hücre dansitesi sağlıklı bireylere göre daha az bulundu. Fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$).

Sonuç olarak bu çalışmada in vivo konfokal mikroskopi kullanılarak keratokonus hastalarında santral korneanın tüm katlarında yapısal ve kantitatif değişiklikler gözlemlendi. Konfokal mikroskopi kullanılmaya başlandığı günden bu yana canlı dokuda hücresel seviyede verdiği kesin bilgiler ile hastalığın takibinde önemli bir yere sahip olmuştur. Özellikle keratokonus hastalarında teşhis ve progresyon takibinde hala güncelliğini korumakla beraber, hastalığın topografik olarak tesbitinden çok önce klinisyenin bu cihazla hastalığı teşhisine imkan vermektedir.