

Pregledni prispevek/Review article

KONFOKALNA MIKROSKOPIJA ROŽENICE

CONFOCAL MICROSCOPY OF THE CORNEA

Kristina Mikek, Marko Hawlina, Brigita Drnovšek-Olup, Vladimir Pfeifer

Očesna klinika Ljubljana, Klinični center, Zaloška 29 a, 1525 Ljubljana

Prispelo 2003-11-29, sprejeto 2004-03-16; ZDRAV VESTN 2004; 73: 445-50

Ključne besede: *konfokalna mikroskopija; potek preiskave; morfološke spremembe v roženici*

Izvleček – Izhodišča. *Konfokalna mikroskopija (KM) je preiskovalna metoda, s katero pregledujemo morfološko strukturo roženice in vitro in in vivo.*

Metode. *S konfokalnim mikroskopom (Confoscan 2.0, Nidek, Japonska) opazujemo in analiziramo morfološke spremembe v posameznih plasteh roženice: epitelne, preko strome do endotelne plasti. Opazujemo lahko povzročitelja roženičnega vnetja in se odločamo o načinu zdravljenja ter o vrsti kirurškega posega. Raziskujemo gostoto celic v posameznih plasteh roženice: epitelnih celic, keratocitov v stromi ter endotelnih celic. Z opazovanjem gostote celic v posameznih plasteh roženice ugotavljamo celični odgovor pri poškodbah, vnetjih roženice ali po operacijah sprednjega segmenta očesa.*

Zaključki. *S KM opazujemo tudi neprozorno roženico, ki nastane zaradi edema epitelne plasti ali strome, česar in vivo pred odkritjem KM ni bilo mogoče.*

Uvod

S konfokalnim mikroskopom (KM) *in vivo* v roženici opazujemo celične spremembe velikosti manj kot 1 μm , ki smo jih doslej lahko opazovali le z odvzemom materiala (biopsijo) in s histološkim preparatom. Analiziramo lahko morfološke spremembe v posameznih plasteh roženice ter diagnosticiramo etiologijo vnetja. S to preiskovalno metodo natančno določimo, v kateri plasti se nahaja roženična patologija, analiziramo njeno morfologijo ter tako postavimo natančnejšo diagnozo. Glede na to se odločamo o načinu zdravljenja ter o vrsti kirurškega posega. KM je klinično uporabna tudi pri neprozorni roženici, ki nastane zaradi edema epitelne plasti ali strome, kar pred odkritjem konfokalne mikroskopije z zrcalnim mikroskopom ni bilo mogoče. Konfokalno mikroskopijo odlikujeta večja prečna in globinska ločljivost. Ločljivost KM je za približno 40% večja od splošnega konvencionalnega mikroskopa. KM nam omogoča pregled prozornega odseka tkiva ter tridimenzionalno rekonstrukcijo (1).

Priprava preiskovancev

Pred preiskavo roženico ohromimo z anestetičnimi kapljicami Novesine® (Ciba Vision Ophthalmics, Atlanta, GA). Stož-

Key words: *confocal microscopy; examination; morphological changes in the cornea*

Abstract – Background. *Confocal microscopy is a diagnostic method used for examination of the morphological structure of the cornea in vitro as well as in vivo.*

Methods. *Using a confocal microscope (Confoscan 2.0, Nidek, Japan), we can determine and analyze morphological changes in individual layers of the cornea, from epithelial to stromal and endothelial ones in addition, it is possible to observe keratitis causing agents. According to the findings revealed, we choose a treatment method and a surgical procedure type. The investigation is aimed to determine a cellular density in different layers of the cornea, i. e., that of epithelial cells, stromal keratocytes and endothelial cells. Monitoring cellular density by layers helps us understand the cell response after corneal damage or surgery of the anterior segment of the eye.*

Conclusions. *The method is clinically applicable also in an opaque cornea occurring as a result of epithelial or stromal edema. Such investigations were not feasible before the introduction of the confocal microscopy.*

čast nastavek konfokalnega mikroskopa očistimo pred in po preiskavi s 70-odstotnim izopropilnim alkoholom. Na konico nastavka namestimo kapljico imerzijskega gela 2,5% hidroksipropil metilceluloze (Ciba Vision Ophthalmics, Atlanta, GA), ki prepreči neposreden stik objektivu z roženico (Sl. 1). Pri preiskavi moramo paziti, da mehansko ne poškodujemo površine roženice. Preiskovancu vedno pregledamo roženico z biomikroskopom pred in po preiskavi s KM (1).

Potek preiskave s konfokalnim mikroskopom (ConfoScan 2.0, NIDEK, Japonska)

Konfokalni mikroskop, ki ga uporabljamo na Očesni kliniki v Ljubljani, je opremljen s halogensko žarnico 100 W/12 V kot izvorom svetlobe. Pri klinično normalni roženici izvor halogenske svetlobe namestimo na maksimalno vrednost in s tem zagotovimo zadostno količino odbite svetlobe iz posameznih struktur roženice. Drugače pa je v patološko spremenjeni roženici z brazgotinami. V tem primeru jakost svetlobe zmanjšamo na približno polovico (1). Zaradi premikanja očesa je pomembna lega gibljivega stožčastega nastavka, v katerem je objektiv (2, 3). Med preiskavo se objektiv preko imerzijskega



Sl. 1. Princip preiskave s konfokalnim mikroskopom: stožčast nastavek konfokalnega mikroskopa se preko imerzijskega gela dotakne površine roženice v pravokotni smeri in se približuje in oddaljuje, kot je prikazano na sliki. Pri tem konfokalni mikroskop presvetli plasti roženice.

Figure 1. Mechanism of action of the confocal microscope: the tip at the end of the microscope approaches the cornea surface through an immersion gel and scans all its layers.

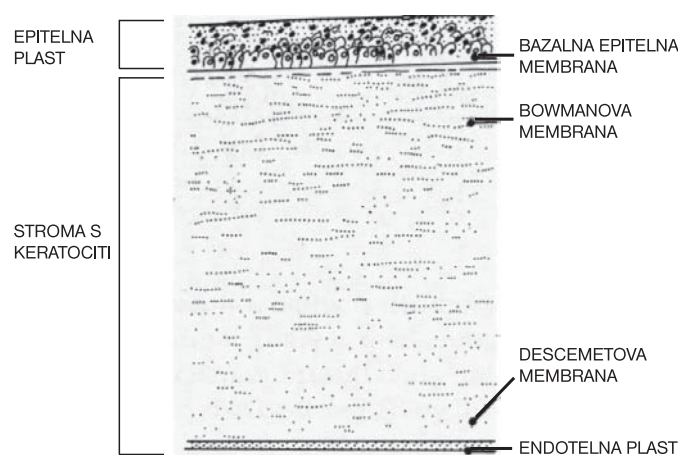
gela pravokotno dotakne zunanje površine roženice, medtem ko preiskovanec gleda naravnost v izvor svetlobe (Sl. 1) (1, 4). Za pregled roženice s KM uporabljamo objektivne z različnimi povečavami in velikostmi odprtine zaslonke objektivna: od 25-krat/0,65, 40-krat/0,75 ali 50-krat/1,0 (1, 5). Volumenski odsek tkiva, ki ga želimo pregledati, je odvisen od izbrane velikosti odprtine zaslonke objektivna in povečave leče. Boljšo globinsko ločljivost dosežemo z večjo odprtino zaslonke objektivna in večjo lečno povečavo. Pri našem KM uporabljamo objektiv s 40-kratno povečavo in odprtino zaslonke objektivna 0,75, kar prikazujemo na sliki 1. Tako dosežemo prečno ločljivost 1 μm , debelina (globinska ločljivost) preiskovanega področja pa je 10 μm . Nastavljeni parametri dovoljujejo delovno razdaljo približno 1,92 mm (1, 5-10). Slike posname digitalna video kamera med potekom preiskave in jih shrani na trdem disku računalnika. Slabe posnetke računalnik avtomatično izloči (1).

S KM posnete slike analiziramo z računalniškim programom. Posnete slike prikazemo na tri načine:

- morfologija roženice - ugotavljamo kakovost posameznih normalnih in patoloških značilnosti v roženici tako, da jih primerjamo s posnetki že objavljenih podatkov v atlasu roženice, narejenim s konfokalnim mikroskopom;
- morfometrična preiskava - obsega kvantitativno vrednotenje posameznih struktur v roženici od velikosti bazalnih epiteljskih in endoteljskih celic, strukture živčnega nitja, gostote in površine jeder keratocitov v različnih plasteh ter ugotavljanje števila presnovnih depozitov v stromi roženice;
- tridimenzionalna in kinetična rekonstrukcija posnetkov posameznih plasti roženice (1).

Anatomija in histologija roženice – pri pregledu s konfokalnim mikroskopom

Normalna roženica je avaskularna. S kisikom se oskrbuje preko sprednje površine roženice, dodatne hranljive sestavine pa se prenašajo preko zadnje endotelne plasti roženice iz prekatne vodke. Roženica je ovalne oblike. Horizontalni premer je 12,6 mm, vertikalna krivina je dolžine 11,7 mm. Centralna optična krivina roženice je premera 7,8 mm. Roženica ima

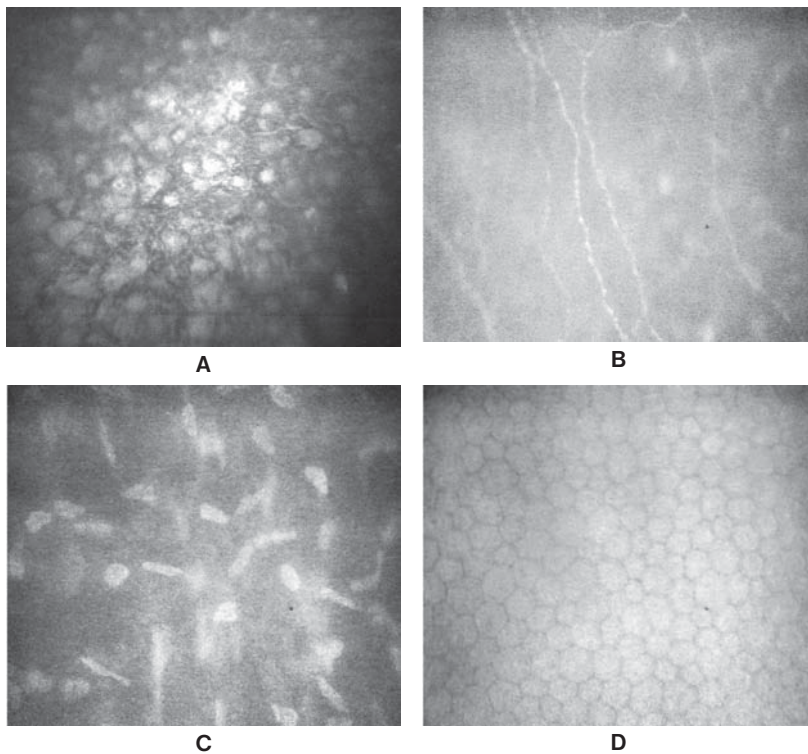


Sl. 2. Shematsko-prečni odsek roženice (13).

Figure 2. Schematic transverse section of the cornea (13).

+48,0 dioptrij in je del refrakcijskega sistema očesa (11). Zadnja krivina roženice je bolj sferična kot sprednja krivina. Zato je roženica na sredini tanjša (520 μm) kot na periferiji (650 μm ali več) (11, 12).

Roženico sestavljajo naslednje plasti (Sl. 2): epitel, Bowmanova membrana, stroma, Descemetova membrana in endotelna plast. Z zunanje strani varuje roženico solzni film, notranje pa omejuje prekatna vodka sprednjega prekata (11). S KM s spreminjanjem objektivna v aksialni smeri (z koordinata) posnamemo vzporedne, tangencialne odseke roženice (1, 10). *Epitel roženice* je debel 50 μm . Epitel sestavljajo površinske epiteljske celice, katerim sledijo tri plasti prehodnih (angl. wing cells) celic. Prehodne celice se preoblikujejo iz zadajšnje, bazalne plasti epiteljskih celic, kjer potekajo mitotične delitve. Epitelna plast se obnavlja enkrat tedensko (11). *Površinske epitelne celice* so kronološko najstarejše in so najbolj diferencirane (11). S KM vidimo, da so različnih oblik (dolžine 40 do 50 μm in debeline 4 μm), z visoko ali nizko odbojnostjo (Sl. 3A). *Prehodne ali »wing« celice* težko razlikujemo, še posebej njihove sprednje plasti, notranje plasti pa spoznamo po odbojnosti celičnih mej. *Bazalne epitelne celice* se lahko lateralno premikajo in proliferirajo. V procesu obnavljanja epitela se bazalne epiteljske celice odcepijo od bazalne lamine in potujejo proti površini. Preoblikujejo se v prehodne celice ter nato v superficialne epiteljske celice, ki na površini roženice razpadejo v procesu deskvamacije. Bazalne epiteljske celice so manjše, kroglaste (visoke 20 μm in premera 10 μm). Urejene so v spoznavni strukturi satovja in so pritrjene na Bowmanovo membrano (bazalna lamina) (1). Kinetika celične proliferacije, diferenciacije in migracije epiteljskih celic še ni razjasnjena in je še vedno predmet raziskav (14). *Bowmanova membrana* je bazalna lamina, debela 8 do 12 μm , ki jo tvorijo bazalne epiteljske celice s svojimi zunajceličnimi produkti (11). Je neodbojna plast, ki jo spoznamo s KM le po živčnih končičih in mestu, kjer se nahaja. Bazalna membrana meji v sprednjem delu na bazalne epiteljske celice, v zadnjem delu pa na prva jedra keratocitov v stromi (Sl. 3B) (1). *Stroma* predstavlja 90% debeline roženice. Gradijo jo zvezdasto oblikovani keratociti, ki tvorijo s citoplazemskimi podaljški morfološki in funkcionalni sincicij. Keratocitov je 3 do 5% prostornine strome. Keratociti so fibroblastom podobne celice, ki sodelujejo pri nastanku, preoblikovanju in razgradnji strome ter imajo zato pomembno vlogo pri celjenju poškodovane roženice. Keratociti uravnavajo velikost kolagenskih vlaken in prerazporeditev proteoglikanov v stromi in tako vplivajo na prozornost roženice. Kolagen, ki sestavlja človeško roženico, je tipa I, nekaj pa je



Sl. 3. Plasti roženice, posnete s konfokalnim mikroskopom: A – površinske epitelne celice, B – Bowmanova membrana z živčnimi vlakni, C – stroma s keratociti in D – endotelna plast.

Figure 3. Individual layers of the cornea recorded using a confocal microscope: A – superficial epithelial cells, B – Bowman layer with nerve fibers, C – stroma with keratocytes and D – endothelium of the cornea.

tudi kolagena tipa III in V. Glavna proteoglikana v stromi sta glikozaminglikana keratan sulfat in hondroitin sulfat v razmerju 3:1 (11, 15). V stromi roženice s KM vidimo le jedra keratocitov kot svetla področja v temnem polju (Sl. 3C). Mestoma vidimo kolagenska vlakna in razvejane živčne končiče, ki imajo visoko odbojnost. Oblika in prostorska razporeditev keratocitov v stromi sta odvisni od mesta v stromi. Prva plast keratocitov, ki je tik za Bowmanovo membrano, ima značilno morfološko strukturo večoglatih jeder, ki jih normalno ne najdemo v drugih plasteh strome. Prvi plasti sledijo keratociti z ovalnimi do kroglastimi jedri in občasnimi zarezi. V zadnjih plasteh strome so jedra keratocitov bolj podolgovata in vretenasta (1). Opisane tri populacije keratocitov so opazovali v različnih plasteh roženic ljudi in živali (16–18). *Descemetova membrana* je bazalna lamina, ki jo tvorijo sekretijski produkti endotelijskih celic. Loči stromo roženice od zadnje enoslojne endotelne plasti (11). S KM jo spoznamo le po njeni lokalizaciji (1). *Endotelna plast* je sestavljena iz 400.000 celic, ki so 4 do 6 μm debele, heksagonalne oblike, širine približno 20 μm . Endotelijske celice nimajo sposobnosti regeneracije. Izgubi ali poškodbi teh celic sledi le njihovo povečanje in prerazporeditev. Ob rojstvu je gostota endotelijskih celic od 3500 do 4000 celic/ mm^2 , nato pa s staranjem upada. Pri odraslem človeku je gostota od 1400 do 2500 celic/ mm^2 . Vrzeli v endotelni plasti porušijo endotelno funkcijo. Kopičenju vode v stromi sledi zamotnitev roženice in izguba vidne ostrine (7). S KM lepo prikažemo meje in oblike endotelijskih celic (Sl. 3D). Na posnetkih določimo delež celic različnih površin – pleomorfizem ter delež medceličnih stikov – polimegatizem. Mestoma vsebujejo endotelijske celice granule po fagocitozi, ki jih vidimo kot hiperodbojne znotrajcelične depozite (1).

Oživčenje roženice

Roženica dobiva senzorna in simpatična vlakna. Senzorična oskrba poteka preko 5. možganskega živca trigeminusa, katerega telo leži v trigeminalnem gangliju. Telesa živcev simpatičnega nitja pa se nahajajo v zgornjem cervikalnem gangliju. V roženici je število senzornih vlaken večje kot število simpatičnih vlaken. Po vstopu živčnega nitja skozi sklero, tik nad optičnim živcem, se živčno nitje razcepi večkrat v suprahoroidalnem prostoru. Posamezni živčni končiči so razporejeni cirkularno okrog korneoskleralnega limbusa, ki je anatomski prehod med sklero in roženico. Tukaj oživčujejo tudi veznico okrog limbusa in limbalni epitel roženice (11). Po vstopu v roženico v sprednji tretjini strome tvorijo živčni končiči gosto subepitelno mrežje. Živčni končiči predrejo na več mestih Bowmanovo membrano, kjer tvorijo bazalno epitelno živčno mrežje, ki se nadaljuje s prostimi živčnimi končiči na ravni plasti površinskih epiteljskih celic (11, 19).

S KM sledimo razporeditvi živčnih vlaken v posameznih plasteh roženice zaradi njihove visoke odbojnosti (1). Subepitelna živčna mrežja in prestopna mesta živčnih vlaken skozi Bowmanovo membrano so zanesljive orientacijske točke (Sl. 3B). S KM tako najdemo plast ali področje v roženici, ki ga želimo ponovno preiskovati (20). Auran s sodelavci je opisal centripetalno rast živčnih vlaken bazalnega epitelnega mrežja. Živčna vlakna rastejo 10 do 20 μm na dan skupaj s plastjo bazalnih epitelnih celic. Subepitelno mrežje je nepremično (21).

Morfološke spremembe v roženici, povezane s staranjem

Z raziskavami so dokazali, da se povečuje debelina roženice v prečnem preseku s staranjem (12) in da upada število endotelijskih celic (2, 9). Endotelijske celice postajajo večje, ohranjajo pravilno heksagonalno obliko, večkrat so prisotni znotrajcelični presnovni depoziti (1, 11).

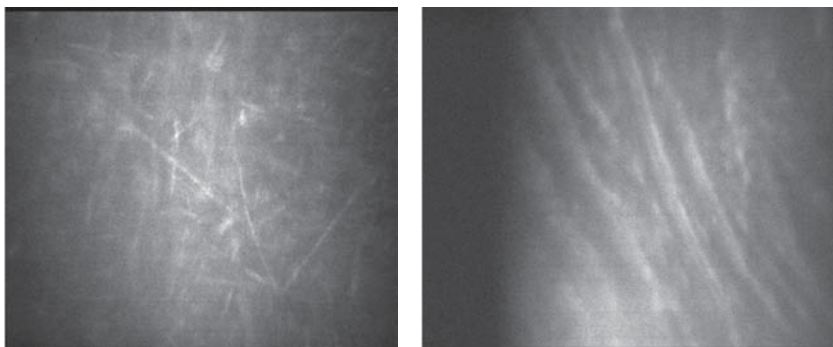
S KM so opazovali slabšo regeneracijo v epitelni plasti roženice starejših. Pri starejših ljudeh so epiteljske celice bolj podolgovate in večje v primerjavi z bazalnimi epiteljskimi celicami mlajših ljudi. Pri starejših ljudeh se v stromi, in sicer v zunajceličnem matriksu, prisotni visoko reflektivni mikro depoziti. Le-ti so ostanki presnovnih aktivnosti keratocitov. Oblika jeder keratocitov se ne spreminja (1). Študiji Moller-Pedersen (22) in Patela (23) sta ugotovili upadanje gostote keratocitov s staranjem. Mustonen (9) je v svoji raziskavi s KM dokazal le upadanje števila endotelčnih celic, gostota keratocitov se s staranjem ni spreminjala.

Uporaba konfokalne mikroskopije

Pomen preiskovalne metode s KM je v tem, da natančno določimo obseg obolelega področja v roženici in spremljamo klinični potek bolezni. Glede na izvid določimo medikamentno zdravljenje (1, 24).

Vnetja roženice

S KM opazimo v posameznih plasteh roženice patološke spremembe, ki jih povzročajo paraziti, bakterije in virusi (10). Tako so opisane spremembe, ki so jih opazovali s KM pri vnetju s herpesom simpleksom (4, 10, 25), vnetju z adenovirusom



Sl. 4. Morfološke spremembe pri keratokonusu, posnete s konfokalnim mikroskopom: levo – začetni keratokonus, desno – napredovala oblika keratokonusa.

Figure 4. Morphological changes in keratoconus patient record using a confocal microscope: left – keratoconus in an early stage, right – keratoconus in an advanced stage.

(1), glivo *Aspergillus flavus* (26), *Fusarium solani*, parazitom *Acanthamoeba castellanii* (28, 29). Dokazali so okužbo z bakterijama *Streptococcus viridans* in *Staphylococcus weneri* (30, 31) ter spiroheto *Borrelia burgdorferi*, posneto v roženici s KM (32).

Distrofije roženice

Pri *epitelni distrofiji* bazalne membrane (map-dot-finger print distrofiji) s KM v epitelnih plasteh vidimo nepravilno razporeditev epitelnih plasti ter prisotnost posameznih čist bazalnih celic, ki prehajajo v površinsko plast roženice (1, 33, 34). V primerih *granularne*, *Reis-Bückler* in *Lattice distrofije* tipa I, ki zajamejo sprednje plasti roženice, so značilni skupki distrofičnega materiala. Globlje plasti strome in endotelna plast so pri teh distrofiyah brez morfoloških sprememb (4, 35). Za *posteriorno polimorfno distrofijo* so značilne patološke spremembe Descemetove membrane (36). Za endotelno *Fuchsovo distrofijo* so značilne spremembe gutata, ki so posledica izločkov bolezensko spremenjenih endotelijskih celic. Te spremembe opazimo tudi pri normalnem procesu staranja, izrazi-teje so izražene na obrobju roženice (11). S KM vidimo te spremembe kot hipoodbojna okrogla področja, omejena s pleomorfno oblikovanimi endotelijskimi celicami različnih velikosti (37, 38).

Keratokonus

Keratokonus je nevnetna ektazija roženice s patološkimi spremembami v stromi roženice. Z biomikroskopom vidimo značilno stanjšanje roženice v centralnem delu in prečne strije v globljih plasteh strome (11). S KM vidimo v napredovalem stadiju bolezni vzporedno potekajoče linije (strije) v stromi roženice, kot prikazujemo na sliki 4.

Degeneracije roženice

Degenerativne spremembe so posledica dolgotrajnega kroničnega vnetja in dolgotrajnega delovanja toksinov na roženico. V roženici vidimo komaj opazne morfološke spremembe, ki ne vplivajo na ostrino vida. S KM so videli epitelne vključke (depozite) v roženici po zdravljenju s Cordaronom pri srčnih aritmijah. Pri pasasti keratopatiji vidimo subepitelne depozite kalcijevega fosfata na ravni Bowmanove membrane. Degenerativne spremembe v stromi opazimo kot podaljške keratocitov, ki jih ni v zdravi roženici. Značilna je večja odbojnost fibroznega tkiva z odbojnimi zrni lipofusceina (1).

Kirurški posegi v roženici

S KM lahko primerjamo morfološke spremembe roženice pred in po kirurškem posegu. S presaditvijo roženice nadomestimo motno roženico bolnika z roženico umrlega dajalca. Pregled s KM pogojuje tehniko operacije. S KM vrednotimo, v kateri plasti je patologija, in se odločamo za penetrantno keratoplastiko, kjer zamenjamo celotno debelino roženice, ali pa za lamelno keratoplastiko, kjer prejemniku presadimo le povrhnje plasti roženice. Po operaciji s KM opazujemo vraščanje tkiva. Tako lahko čim prej odkrijemo zgodnje in pozne pooperativne zaplete, ki z navadnim mikroskopom še niso vidni (1).

V refraktivni kirurgiji spremenimo obliko roženice in s tem refrakcijo očesa z laserjem excimer. Tako popravimo dalekovidnost, kratkovidnost ali astigmatizem. Gre za poseg v zdravo roženico. V svetu poteka veliko raziskav, ki s KM proučujejo posledice tovrstnih operacij

in jih primerjajo med seboj. Ocenjujemo spremembe v epitelni plasti roženice, opazujemo reakcijo keratocitov in okolnega stromalnega tkiva ter ponovno vraščanje živčnih končičev (1, 4, 8, 10, 39–44). Na ta način bo mogoče kvalitativno oceniti, katera tehnika refraktivnih operacij z laserjem excimer je za roženico najmanj škodljiva (1).

Merjenje gostote celic

S KM merimo gostoto celic v posameznih plasteh roženice in jih analiziramo. Gostoto celic od povrhnje epitelne preko keratocitov v stromi do notranje endotelne plasti so raziskovali pri ljudeh (8, 9, 18, 23) in pri poizkusnih živalih (17, 45). Pred uvedbo KM so lahko z zrcalnim mikroskopom kvantitativno analizirali le epitelno in endotelno plast roženice (6, 46, 47). Gostota bazalnih epiteljskih celic in superficialnih epiteljskih celic se s starostjo ne spreminja (9). V stromi roženice je gostota keratocitov največja v sprednjih plasteh. Nato gostota keratocitov upada proti zadajšnjim plastem roženice in se nekoliko poveča tik pred Descemetovo membrano (17, 18). Poleg že dokazanega upadanja števila endotelijskih celic s staranjem so nekatere raziskave dokazale tudi sorazmerno upadanje gostote keratocitov (22, 23). Meritve gostote keratocitov s KM in s histološkim preparatom so primerljive, kar potrjuje primernost konfokalne mikroskopije (23, 45). Gostoto keratocitov so merili pri zdravih ljudeh (9, 18, 22, 23, 48), v bolezensko spremenjeni roženici, in sicer keratokonusu (49), ter pri ljudeh po operacijah v roženici (8, 39, 50–54).

Frueh je primerjal gostoto keratocitov pred in po fotorefraktivni keratektomiji (PRK) z laserjem excimer. V prvem in četrtem mesecu po operaciji je ugotovil statistično pomembno povečanje števila keratocitov v sprednji plasti strome roženice. Kasneje se je gostota keratocitov zmanjšala na normalo (8). Ne vemo, kaj je vzrok za spremembo gostote keratocitov po operaciji z laserjem excimer: razpad celic (55), celična delitev (56) ali celično premikanje (»migracija«) (40, 41). Takoj po operaciji z laserjem excimer so jedra keratocitov dvakrat večja in taka ostanejo tudi še eno leto po operaciji (39). Povišanje gostote keratocitov po refraktivni operaciji sovpadajo z večjo reflektivnostjo subepitelne brazgotine in kliničnim pojavom prehodne meglice (»haze«) v roženici. Keratociti so lahko odgovorni za ta pojav (57). Gostota keratocitov se poveča le v sprednji plasti strome roženice. V srednjem in zadnjem delu strome roženice se ne spremeni, nespremenjena ostane tudi gostota endotelijskih celic (8).

Pri operaciji presaditve roženice je veliko raziskav, ki so v pooperativnem obdobju dokazale upadanje števila endoteljskih

celic (53). V zadnjem času pa se z uporabo konfokalnega mikroskopa lahko *in vivo* raziskuje tudi vloga keratocitov v stromi roženice po operaciji presaditve. V 36 transplantiranih roženicah, kjer je bila narejena penetrantna keratoplastika, so določali gostoto keratocitov v obdobju 1 meseca do 20 let po operaciji. Prišli so do zanimivih rezultatov: število keratocitov/mm² v centralnem delu je po operaciji ostalo nespremenjeno ($p = 0,68$), medtem ko je število keratocitov pri kontrolni skupini normalnih roženic upadalo s staranjem ($p < 0,001$). Po drugi strani pa se je gostota celic (keratociti/mm³) v transplantiranih roženicah v pooperativnem obdobju zmanjšala (53). V isti raziskavi so podrobno sledili 5 transplantiranim roženicam v zgodnjem pooperativnem obdobju in opisovali »aktivirane keratocite« (53). Te so opazili tudi v transplantiranih roženicah, kjer je bila prisotna pozna endotelna zavrtnitvena reakcija (56). Na Očesni kliniki smo analizirali gostoto keratocitov in površino njihovih jeder v roženicah po penetrantni keratoplastiki. Skupino 20 transplantiranih roženic (starost roženice dajalca 4 do 71 let) smo primerjali s starostno primerljivo skupino 24 zdravih roženic. Upoštevali smo do sedaj objavljene raziskave v zdravih roženicah ljudi, ki so potrdile upadanje gostote keratocitov s staranjem (22, 23). Obdobje po operaciji je bilo 8 do 77 mesecev. V primerjalni raziskavi smo dokazali, da presaditev roženice ne vpliva na gostoto keratocitov in površino njihovih jeder v centralnem delu presajene roženice. Pri bolnikih po presaditvi roženice pa smo dokazali, da starost dajalca ob odvzemu roženice za presaditev vpliva na povečanje površine jeder keratocitov samo v zadnji plasti strome roženice (50). Še vedno ni natančno pojasnjeno, ali keratociti v transplantirani roženici nastajajo z delitvijo obstoječih ali pa gre morda za potovanje keratocitov iz periferije (58).

Zaključki

Sklepamo, da je konfokalna mikroskopija zelo uporabna neinvazivna preiskovalna metoda, s katero natančno pregledujemo celične procese v živem tkivu *in situ*. Sprejemljiva je tako s strani preiskovanca kot zdravnika. S KM sledimo patološkim spremembam v tkivu ter uspešnosti medikamentnega in kirurškega zdravljenja. Konfokalna mikroskopija je prispela k raziskovanju celjenja roženice po poškodbah in kirurških posegih sprednjega segmenta očesa.

Konfokalno mikroskopijo uporabljamo le v največjih kliničnih centrih. Pri analiziranju posnetkov roženičnega tkiva še vedno naletimo na nepojasnjene spremembe, pri katerih se lahko vprašamo, kaj je zdravo in kaj je patološko. Pred kratkim so bile opisane patološke spremembe v roženici pri različnih redkejših boleznih (59–61). Počasi odkrivamo popolnoma nove in doslej neznane mikroskopske spremembe, ki so morda začetne faze še neznanih bolezni roženice. Z zelo izpopolnjeno diagnostično preiskavo diagnosticiramo patologijo roženice v začetnem stadiju bolezni, kjer klinična slika še ni značilna. Razvoj konfokalne mikroskopije obeta, da bomo *in vivo* lahko pregledovali tudi globlje dele očesa.

Literatura

- Böhnke M, Masters BR. Confocal microscopy of the cornea. Retinal and eye research 1999; 18: 553–628.
- 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 Opt 1980; 19: 1749–57.
- Cavanagh HD, Petroll WM, Alizadeh H et al. Clinical and diagnostic use of in vivo confocal microscopy in patients with corneal disease. Ophthalmology 1993; 100: 1444–54.
- Wiegand W, Thae AA, Kroll P, Geyer OC, Garcia AJ. Optical sectioning of the cornea with a new confocal in vivo slit-scanning videomicroscope. Ophthalmology 1995; 102: 568–75.
- Koester CJ, Auran JD, Rosskothien HD, Florakis GJ, Tackaberry RB. Clinical microscopy of the cornea utilizing optical sectioning and a high-numerical-aperture objective. J Opt Soc Am A 1993; 10: 1670–79.
- Masters BR, Thae AA. Real-time scanning slit confocal microscopy of the in vivo human cornea. Appl Optics 1994; 33: 695–701.
- Frueh BE, Cadez R, Böhnke M. In vivo confocal microscopy after photorefractive keratectomy in humans. Arch Ophthalmol 1998; 116: 1425–31.
- Mustonen RK, McDonald MB, Srivanneboon S et al. Normal human corneal cell populations evaluated by in vivo scanning slit confocal microscopy. Cornea 1998; 17: 485–92.
- Cavanagh H, El-Agha MS, Petroll WM, Jester JV. Specular microscopy, confocal microscopy and ultrasound biomicroscopy. Cornea 2000; 19: 712–22.
- Klyce SD, Beuerman RW. Structure and function of the cornea. In: Kaufman HE, Barron BA, McDonald MB eds. The cornea. 2nd ed. Boston: Butterworth-Heinemann, 1998: 3–50.
- Hitzenberger CK, Drexler W, Fercher AF. Measurement of corneal thickness by laser Doppler interferometry. Invest Ophthalmol Vis Sci 1992; 33: 98–103.
- Green WT, Muir MGK. The cornea. In: Spalton DJ, Hitchings RA, Hunter PA eds. Atlas of clinical ophthalmology 2nd ed. Mosby, 1994: 6: 2–30.
- Beebe DC, Masters BR. Cell lineage and the differentiation of corneal epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 1996; 37: 1815–25.
- Müller LJ, Pels L, Vrensen FJM. Novel aspects of the ultrastructural organization of human corneal keratocytes. Invest Ophthalmol Vis Sci 1995; 36: 2557–67.
- Poole CA, Brookes NH, Clover GM. Keratocyte networks visualised in the living cornea using vital dyes. J Cell Sci 1993; 106: 685–91.
- Petroll WM, Boettcher K, Barry P, Cavanagh HD, Jester JV. Quantitative assessment of anteroposterior keratocyte density in the normal rabbit cornea. Cornea 1995; 14: 3–9.
- 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: 185–93.
- Müller LJ, Pels L, Vrensen FJM et al. Architecture of human corneal nerves. Invest Ophthalmol Vis Sci 1997; 38: 985–94.
- Masters BR, Thae AA. Real-time confocal microscopy of in vivo human corneal nerves. Bioimages 1996; 4: 129–34.
- Auran JD, Koester CJ, Kleiman NJ et al. Scanning slit confocal microscopic observation of cell morphology and movement within the normal human anterior cornea. Ophthalmology 1995; 102: 33–41.
- Moller-Pedersen T. A comparative study of human corneal keratocyte and endothelial cell density during aging. Cornea 1997; 16: 333–8.
- Patel SV, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM. Normal human keratocyte density and corneal thickness measurement by using confocal microscopy in vivo. Invest Ophthalmol Vis Sci 2001; 42: 333–9.
- Beuerman RW. Confocal microscopy: Into the clinic. Cornea 1995; 14: 1–2.
- 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.
- Winchester K, Mathers WD, Sutphin JE. Diagnosis of Aspergillus keratitis in vivo with confocal microscopy. Cornea 1997; 16: 27–31.
- Florakis GJ, Moazami G, Schubert H, Koester CJ, Auran JD. Scanning slit confocal microscopy of fungal keratitis. Arch Ophthalmol 1997; 115: 1461–63.
- Auran JD, Starr MB, Koester CJ, LaBombardi VJ. In vivo scanning slit confocal microscopy of Acanthamoeba keratitis. Cornea 1994; 13: 183–5.
- Winchester K, Mathers WD, Sutphin JE, Daley TE. Diagnosis of Acanthamoeba keratitis in vivo with confocal microscopy. Cornea 1995; 14: 10–17.
- Chew SJ, Beuerman RW, Assouline M et al. Early diagnosis of infectious keratitis with in vivo real-time confocal microscopy. CLAO J 1992; 18: 197–201.
- Kaufman SC, Laird JA, Cooper R et al. Diagnosis of bacterial contact lens related keratitis with the white-light confocal microscope. CLAO J 1996; 22: 274–7.
- Linna T, Mikkila H, Karma A et al. In vivo confocal microscopy: a new possibility to confirm the diagnosis of Borrelia keratitis? Cornea 1996; 15: 639–42.
- Sherif ZAR, Pleyer U, Rieck P, Hartmann C. Confocal microscopy in corneal dystrophies. Klin Monatsbl Augenheilkd 1999; 214: 12–21.
- Rosenberg ME, Tervo TMT, Petroll WM, Vesaluoma MH. In vivo confocal microscopy of patients with corneal recurrent erosion syndrome or epithelial basement membrane dystrophy. Ophthalmology 2000; 107: 565–73.
- Werner LP, Werner L, Dighiero P, Legeais JM, Renard G. Confocal microscopy in Bowman and stromal corneal dystrophies. Ophthalmology 1999; 106: 1697–704.
- Chiou AG, Kaufman SC, Beuerman RW, Maitchouk D, Kaufman HE. Confocal microscopy in posterior polymorphous corneal dystrophy. Ophthalmologica 1999; 213: 211–3.
- Mustonen RK, McDonald MB, Srivanneboon S et al. In vivo confocal Fuchs' endothelial dystrophy. Cornea 1998; 17: 493–503.
- Chiou AG, Kaufman SC, Beuerman RW et al. Confocal microscopy in cornea guttata and Fuchs' endothelial dystrophy. Br J Ophthalmol 1999; 83: 185–9.
- Corbett MC, Prydal JI, Verma S et al. An in vivo investigation of the structures responsible for corneal haze after photorefractive keratectomy and their effect on visual function. Ophthalmology 1996; 103: 1366–80.

40. Beuerman R, McDonald M, Shofner R et al. Quantitative histological studies of primate corneas after excimer laser photorefractive keratectomy. *Arch Ophthalmol* 1994; 112: 1103-10.
41. Lohmann C, Gartry D, Muir KM et al. Haze in photorefractive keratectomy: its origins and consequences. *Lasers and light in ophthalmology* 1991; 4: 15-34.
42. Linna T, Tervo T. Real-time confocal microscopic observations on human corneal nerves and wound healing after excimer laser photorefractive keratectomy. *Curr Eye Res* 1997; 16: 640-9.
43. Bühren J, Kohnen T. Stromal haze after laser in situ keratomileusis: clinical and confocal microscopy findings. *J Cataract Refract Surg* 2003; 29: 1718-26.
44. Lee BH, McLaren JW, Erie JC, Hodge DO, Bourne WM. Reinnervation in the cornea after LASIK. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 3660-4.
45. 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: 320-6.
46. Fitzke FW, Masters BR, Buckley RJ, Speedwell L. Fourier transform analysis of human corneal endothelial specular photomicrographs. *Exp Eye Res* 1997; 65: 205-14.
47. Doughty MJ, Müller A, Zaman ML. Assessment of the reliability of human corneal endothelial cell-density estimates using a noncontact specular microscope. *Cornea* 2000; 19: 148-58.
48. 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 Surg* 2002; 28: 611-6.
49. Erie JC, Patel SV, McLaren JW et al. Keratocyte density in keratoconus. A confocal microscopy study. *Am J Ophthalmol* 2002; 134: 689-95.
50. Mikek K, Hawlina M, Pfeifer V. Comparative study of human keratocyte density after corneal grafting by using confocal microscopy in vivo. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2003; 220: 830-4.
51. Mitooka K, Ramirez M, Maguire LJ et al. Keratocyte density of central human cornea after laser in situ keratomileusis. *Am J Ophthalmol* 2002; 133: 307-14.
52. Perez-Gomez I, Efron N. Change to corneal morphology after refractive surgery (myopic laser in situ keratomileusis) as viewed with a confocal microscope. *Optom Vis Sci* 2003; 80: 690-7.
53. Bourne WM. Cellular changes in transplanted human corneas. *Cornea* 2001; 20: 560-9.
54. Luo L, Liu Z, Chen J et al. Confocal microscopy in transplanted human corneas. *Yan Ke Xue Bao* 2003; 19: 201-5.
55. Fantes FE, Hanna KD, Waring GO et al. Wound healing after excimer laser keratomileusis (photorefractive keratectomy) in monkeys. *Arch Ophthalmol* 1990; 108: 665-75.
56. Kratz-Owens KL, Hageman GS, Schanzlin DJ. An in vivo technique for monitoring keratocyte migration following lamellar keratoplasty. *J Refract Corneal Surg* 1992; 8: 230-4.
57. Somodi S, Slowik C, Guthoff R. The stromal keratocyte in human and porcine corneas: visualization by conventional and confocal fluorescence microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36: Suppl: 299-9.
58. Fini ME. Keratocyte and fibroblast phenotypes in the repairing cornea. *Prog Retinal Eye Res* 1999; 18: 529-51.
59. Watson SL, Hollingsworth J, Tullo AB. Confocal microscopy of Thygeson's superficial punctate keratopathy. *Cornea* 2003; 22: 294-99.
60. Kobayashi A, Ohkubo S, Tagawa S, Uchiyama K, Kazuhisa S. In vivo confocal microscopy in the patients with cornea farinata. *Cornea* 2003; 22: 578-81.
61. Lopez JD, Benitez del Castillo JM, Lopez CD, Sanchez G. Confocal microscopy in ocular chrysiasis. *Cornea* 2003; 22: 573-5.