

*A Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum Szemészeti Klinikájának
(igazgató: Berta András egyetemi tanár) közleménye*

Donor corneák spekulár-mikroszkópos vizsgálata

KETTESY BEÁTA, BERTA ANDRÁS, MÓDIS LÁSZLÓ

Célkitűzés: *Corneakonzerválásra és -beültetésre kerülő donor corneák vizsgálata spekulár-mikroszkóppal. Az endothelialis sejtszám pontos meghatározásához irányelvek kidolgozása.*

Anyag és módszer: *62 donor (átlagéletkor 65 ± 11 év) 100 szemét vizsgáltuk kontakt spekulár-mikroszkóppal, és a centrális cornealis endotheliumot elemeztük különféle (normális, manuális korrekciót igénylő és kontraszt-effektuson alapuló) képanalizáló módszerrel. A kapott adatokat a cornea vastagságának megfelelően korrigáltuk és statisztikai módszerekkel elemeztük.*

Eredmények: *Az endothelialis sejtsűrűség a normális (korrekció nélküli) vizsgálattal bizonyult a legalacsonyabbnak (1853 ± 257 sejt/mm²) a három módszer közül ($p < 0,0001$). Ezt követte a manuális korrekción (2138 ± 207 sejt/mm²) és a kontraszt-effektuson (2160 ± 185 sejt/mm²) alapuló vizsgálat ($p = 0,25$).*

Következtetések: *A cornealis endothelium sejtsűrűségének pontos meghatározása csak a szaruhártya vastagságának figyelembevételével lehetséges. A pontos vizsgálathoz minimum 75 sejt elemzése szükséges. A legmegbízhatóbbnak a kontraszt-effektuson alapuló képelemzés bizonyult.*

Kulcsszavak: *cornealis endothelium, spekulár-mikroszkópia, keratoplasztika*

Specular microscopic investigation of donor corneas

Aims: *The examination of preserved and implanted donor corneas by specular microscopy. Outlining of principles via which to determine the precise endothelial cell density.*

Materials and methods: *100 eyes of 62 donors (mean age 65 ± 11 years) were examined with a contact specular microscope, and the central corneal endothelium was investigated by means of various image analysis techniques (normal, manual correction, and contrast effect). The results were corrected according to corneal thickness and were analyzed statistically.*

Results: *As concerns the three methods, the lowest endothelial density (1853 ± 257 cells/mm²) resulted from the normal analysis (without any correction) program ($p < 0.0001$). This was followed by the techniques based on manual correction (2138 ± 207 cells/mm²) and the contrast effect (2160 ± 185 cells/mm²) ($p = 0.25$).*

Conclusions: *The corneal endothelial cell density can be determined exactly only if the corneal thickness is taken into consideration. For a precise investigation, a minimum of 75 cells is necessary. The image analysis technique based on the contrast effect proved to be the most reliable.*

Key words: *corneal endothelium, specular microscopy, keratoplasty*

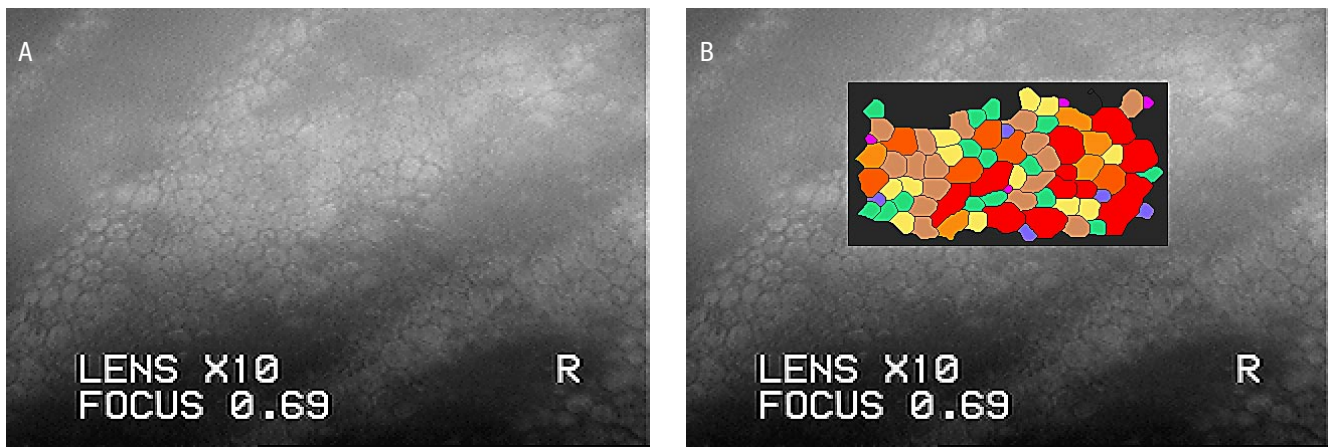
A keratoplasztikák során felhasznált donor corneák szigorú feltételeknek kell hogy megfeleljenek. Ezek közül egyik – és a későbbi funkcionális eredmény szempontjából talán legfontosabb – a donor cornea endotheliumának morfológiája és sejtsűrűsége.¹ Az Európai Szembank Szövetség 2000 sejt/mm² sejtszámot állapít meg minimális sejtszámként donor corneák beültetése esetében.³ A sejtszám meghatározására a spekulár-mikroszkóp *in vivo* és *in vitro* alkalmas.

A spekulár-mikroszkópok nagyon leegyszerűsítve a fizika egyik alaptörvénye, a fénytörés és visszaverődés elvén működnek. Az endothelium sejtrétegéről kellően erős és széles fénynyaláb visszaverődő képét felfogva az leképezhető és megjeleníthető. A műszer segítségével az epitheliumon és endotheliumon megtörő és visszaverődő fény útkülönbségéből a szaruhártya vastagsága is meghatározható.

Vizsgálataink során arra voltunk kíváncsiak, hogy megítélhető-e a donor corneák endothelialis szerkezete

spekulár-mikroszkóppal, és alkalmas-e a készülék a donor bulbusok szűrővizsgálatára corneakonzerválás előtt? Erre azért is volt szükség, mert köztudott, hogy a bulbusok enucleatio után hypotoniássá válnak, ami nehezíti a vizsgálatot. Ismert az is, hogy post mortem a cornea rétegeiben ödéma alakul ki, tovább nehezítve az endothelialis sejtszámlálást.

Célkitűzésünk volt az is, hogy a spekulár-mikroszkóppal nyert képek értékeléséhez irányelveket adjunk. Az irodalomban fellelhető adatok ugyanis ellentmondások: a különböző sejtanalizáló módszerek és programok jelentős különbséget mutatnak az endothelialis sejtszámot illetően.^{4,6,7,10,12-16,19} Ezért a képelemző programban a választható, különböző vizsgáló stratégiákat, sejtszámláló módszereket is összehasonlítottuk.



1. ábra. Cornealis endothelium donor corneából, spekulár-mikroszkóppal megjelenítve. Jól láthatók a hatszög alakú sejtek, helyenként sejtekkel borított Descemet-redők (A), és normális, korrekció nélküli képanalízissel megjelenítve (B). A színes rajzon megfigyelhető, hogy több helyen – például jobbra lent – a sejthatárok nem különülnek el, egybefüggő piros színnel jelennek meg. A program által meghatározott sejtszám így 2050 sejt/mm². Alul a fókuszhoz tartozó adat a cornea vastagságát jelenti; részletes magyarázat a szövegben

Anyag és módszer

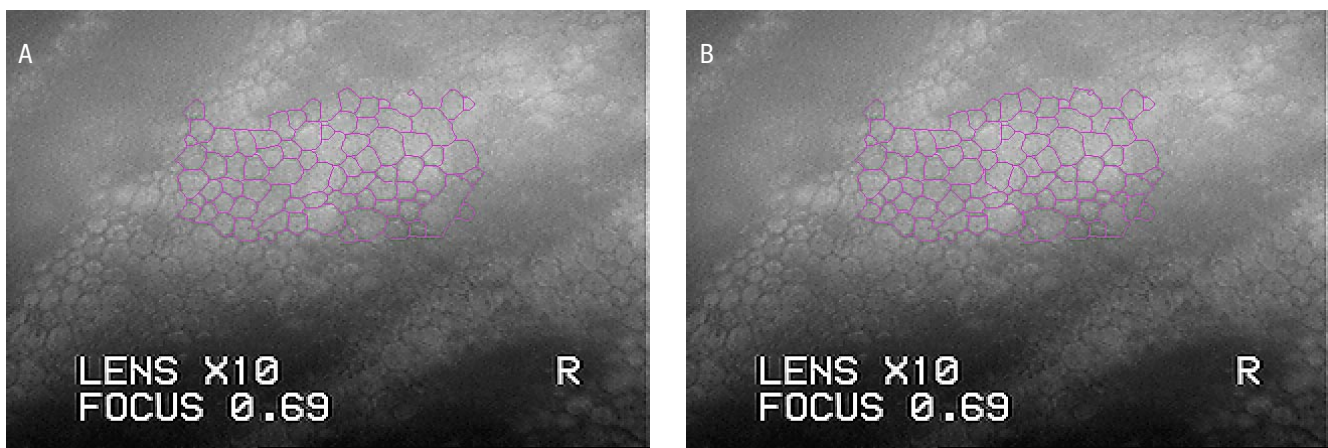
A kísérletek elvégzéséhez 62 donor 100 szemét használtuk. Az enukleált bulbusokat a halál időpontja utáni 12 órán belül vizsgáltuk. A cornealis endothelium megítélése kontakt módszerrel, Tomey EM 1000 típusú kontakt spekulár-mikroszkóppal (Tomey, Tennenlohe, Németország) történt. A szemgolyókat hypotonia esetén levegővel vagy folyadékkal (NaCl) töltöttük fel a pars planán vagy a n. opticuson keresztül. Ezután a bulbusokat magunk készítette bulbustartóra helyeztük – amely megakadályozza a szemgolyó mozgását –, és ezután helyeztük a tartót és a szemet együttesen a műszer álltató részébe.

A donor szaruhártyák centrális részét vizsgáltuk, és több – legalább három – digitalizált képfelvételt készítettünk, majd a legjobb minőségű képet választottuk elemzésre. A digitális képeket az endothel-sejtek vizsgálatára alkalmas számítógépes képanalízáló programmal (EM 1200, V 1.5.1, Tomey) elemeztük különféle vizsgáló módszerekkel, stratégiákkal, és ezeket hasonlítottuk össze.

A vizsgálat során rögzítettük a donorok életkorát, meghatároztuk a mm²-re számított sejtsűrűséget és a corneák vastagságát (amit az epithelium és az endothelium közötti fókusztávolság határoz meg).

A vizsgálandó téglalap alakú területet (Region of Interest, ROI) állandónak ($0,040 \pm 0,001$ mm²) állítottuk be, amely esetenként akár 100 sejtet is tartalmazott. Ezek után az alábbi – a program által választható – sejtanalízáló módszereket használtuk a sejtsűrűség megítéléséhez.

1. *Normális program:* a vizsgálandó területen az EM-1200 program futtatása, utólagos korrekció nélkül. Ennek során a program színskálával jeleníti meg az endothelsejteket, méretük alapján (1. ábra).
2. *Manuális korrekción alapuló program:* ugyancsak az adott területen belül a program által fel nem ismert sejthatárokat a vizsgáló rajzolja be. Ezek után a sejtszámolás hasonló módon történik, mint az előző pontban leírt normális esetben (2. ábra).
3. *Kontraszt-effektuson alapuló program:* az adott területen a sejthatárokat kiemeli, és ezután végzi el a sejtszámolást (3. ábra).



2. ábra. Ugyanaz a terület, mint az 1. ábrán, sejthatárookra helyezett hálóval, amin megfigyelhető, hogy a háló nem jól fedti a sejteket, például hasonló területen, mint az előző ábrán a piros színnel megjelenített sejtek esetében (A), manuális korrekció után viszont igen (B). Az így meghatározott sejtszám 2150 sejt/mm²

A kapott sejtsűrűséget mindhárom esetben korrekciónak vetettük alá. Erre azért volt szükség, mert a fényvisszaverődésen alapuló spekulár-mikroszkópia során a nagyítást is figyelembe véve, a kapott eredmény a fény által megtett út hosszától is függ, ezért vastagabb corneák esetén a sejtsűrűség kisebb a valóságosnál, vékonyabb corneák esetén pedig nagyobb. Az eredményeket az alábbi – a gyártó által megadott – egyenlet segítségével korrigáltuk:

$$Z \text{ (korr.)} = Z \times (F/10,566)^2,$$

ahol Z (korr.) a korrigált sejtsűrűség, Z az adott vizsgálatnál kapott aktuális sejtsűrűség, F a fókusz távolság, a szaruhártya vastagsága, 10,566 pedig a gyártó által megadott kalibrációs érték.

A kapott értékeket statisztikai módszerekkel (SPSS 13, Windows) elemeztük. A statisztikai analízis során az átlagérték \pm standard deviáció értékét adtuk meg. A hasonló paramétereket Wilcoxon-próbával hasonlítottuk össze. Szignifikáns különbségnek a $p < 0,05$ értéket tekintettük. Az összefüggést a Spearman-féle korrelációs koefficienssel („ r ”) adtuk meg.

Eredmények

A vizsgált donorok életkora 65 ± 11 év volt (a legfiatalabb 43 éves, a legidősebb 87 éves). A corneák vastagsága átlagosan $0,64 \pm 0,07$ mm-nek adódott.

Az átlagos centrális endothelialis sejtsűrűség legalacsonyabbnak – 1823 ± 253 sejt/mm² – a normál (módosítás nélküli vizsgáló stratégia) programmal bizonyult. A szaruhártya vastagságához korrigált adat ugyanakkor 1853 ± 257 sejt/mm² volt ($p < 0,0001$).

Manuális korrekció során 2103 ± 194 sejt/mm²-nek adódott az átlagos sejtsűrűség, amely a cornea vastagságához történő korrigálás után 2138 ± 207 sejt/mm²-nek felelt meg ($p < 0,0001$).

A kontraszt-effektus használatával az átlagos sejtszám 2126 ± 180 sejt/mm², amely a korrekciós egyenlet alkalmazása után 2160 ± 185 sejt/mm² volt ($p < 0,0001$).

Ezek után már csak a cornea vastagságát figyelembe vevő korrigált adatokkal számoltunk tovább. A normális program során kapott eredmény szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a másik két módszer (manuális, kontraszt) alkalmazásakor kapott érték ($p < 0,0001$). A manuális korrekció és a kontraszt-effektus között nem volt szignifikáns különbség ($p = 0,25$).

Az életkor és a sejtsűrűség között nem találtunk szignifikáns korrelációt.

Megbeszélés

A szaruhártya anatómiai és funkcionális állapotának jellemzéséhez nélkülözhetetlen a cornea vastagságának és az endothelialis sejtsűrűségnek a megadása. A corneavastagság és az endothelialis sejtsűrűség vizsgálatára számos műszer létezik, a spekulár-mikroszkópia azonban ezeket az adatokat egyszerre képes meghatározni.

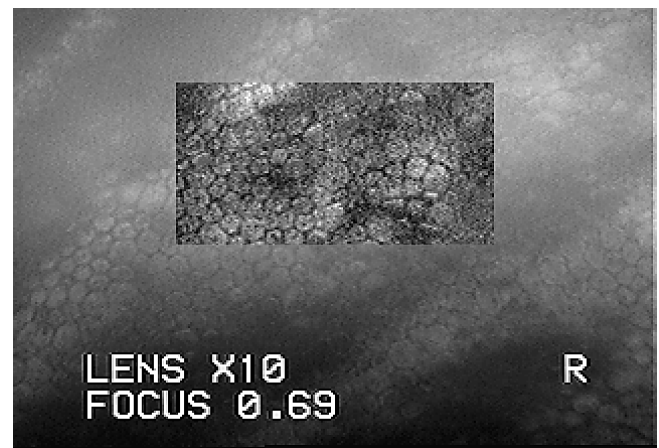
Ezek a paraméterek különböző szemészeti betegségek széles skálájában kórjelzők lehetnek, mint például a szaruhártya-degenerációk és -dystrophiák, kontaktlencse viselésével kapcsolatos cornealis komplikációk, a glaucoma, a száraz szem és a diabetes mellitus cornealis szövődémenyei kapcsán.^{1,8} Az Európai Szembank Szövetség (European Eye Bank Association, EEBA) pedig

minimálisan 2000 sejt/mm²-es sejtszámot ír elő szaruhártya-átültetés előtt.³

Az endothelium tanulmányozására olyan enukleált bulbusokat használtunk fel, amelyek post mortem 12 órán belül vizsgálatra kerültek. Így is az esetek többségében hypotonia és a kezdődő autolízis miatt fellépő ödéma nehezítette az endothelialis sejtréteg megítélését. Ezeket a szemgolyókat a pars planan vagy a nervus opticuson keresztül levegővel vagy NaCl-oldattal töltöttük fel. Ezek után minden esetben sikerült a sejtanalízishez kielégítő minőségű képet nyerni az endotheliumról. Ezért corneakonzerválás előtt javasoljuk a hypotóniás bulbusok feltöltését.

A corneák vastagságát átlagosan 0,64 mm-nek találtuk. Ez hasonlatos volt más szerzők kontaktelven működő spekulár-mikroszkóppal mért eredményeikhez.^{9,11} Ugyancsak enukleált, konzerválásra szánt bulbusok szaruhártyáját más szerzők Orbscan topográfia 0,766 mm-nek találták.¹⁷ Utóbbi készülékről azonban tudjuk, hogy vastagabbnak méri a corneát, mint a széles körben elfogadott ultrahangos pachymetria.⁹

Spekulár-mikroszkópia során a pontos sejtszámlálás elvégzésének számos buktatója van. Elsőként, nem mindegy, hogyan és mekkora vizsgálandó területet (ROI, Region of Interest) választunk ki. Az irodalomban 100 sejt megszámlolását tartják optimálisnak, de az egyes szerzők megegyeznek abban, hogy a vizsgált területnek minimálisan 75 sejtet kell tartalmaznia.^{2,5} Kevés sejtet vizsgálva az eredmény éppúgy téves lehet, mint amikor a sejtelemező program nem megfelelően ismeri fel a határokat. Ezért további fontos szempont a sejtszámlálásban a szoftver által felkínált megfelelő képjavító opciók használata. Saját vizsgálatunkban a kontraszt-effektus és a manuális számlálás módszerét hasonlítottuk össze a gép által alapként választható teljesen automatikus (ún. normális program) sejtszámlálással. Minden esetben azonos nagyságú (ROI) mezőt használtunk. Megállapítottuk, hogy a szoftver által alapopcióként felkínált normális program automata sejtszámlálása a sejthatárokat nem megfelelően ismeri fel, ami a kapott digitális fénykép és a sejthatárokra



3. ábra. Az identikus terület mint az előző ábrákon, kontraszt-effektussal kiemelve. A sejthatárok jól kirajzolódnak. A sejtszám 2350 sejt/mm²

vetített hálóból egyértelműen kiderült. Ha azonban a kontraszt-effektussal vagy kézi számlálással jelöltük ki a sejthatárokat és ezt követően számoltuk meg a sejteket, akkor nemcsak azt láttuk az elkészült képeken, hogy a sejthatárok felismerése megfelelő volt, hanem azt is megállapíthattuk, hogy a két utóbbi módszerrel számolva a sejtsűrűséget szignifikáns különbség nem volt.

Kiemelt fontosságú továbbá a kapott sejtsűrűség korrekciója a szaruhártya-vastagság függvényében, ahogy ezt a jelen tanulmányban is tettük, mindhárom képelemző stratégia esetében. Erre azért volt szükség, mert a kontakt spekulár-mikroszkóp gyárilag 0,5 mm-es corneavastagságra van kalibrálva. A kontakt spekulár-mikroszkópia működési elvét figyelembe véve, a kapott eredmény, a sejtszám, a fény által megtett út hosszától is függ, ezért vastagabb corneák esetén a sejtsűrűség a valóságosnál kisebb, vékonyabb corneák esetén pedig nagyobb. Ez a korrekció különösen fontos a donor bulbusok vizsgálatánál, mert a post mortem cornealis ödéma csaknem mindig jelen van.

Az elmúlt 20 év irodalmában a spekulár-mikroszkóp segítségével számolt endothelialis sejtsűrűség (60 év felett vizsgálva) nagy variabilitást mutat, 2300 és 3500 sejt/mm² közötti értékekről számolnak be.^{3,4,6,7,10,12-16,19} Megállapítható, hogy az általunk kapott sejtsűrűség az irodalmi adatokhoz képest alacsonyabb volt. Az eltérések hátterében valószínűleg az *in vivo* és *in vitro* vizsgálat közötti különbség, valamint a post mortem autolízis állhat.

Adataink elemzése során nem találtunk korrelációt az életkor és az endothelialis sejtsűrűség között. Ez abból eredhet, hogy a donorkorok egységesen idősebb populációból kerültek ki. Ismert, hogy az endothelialis sejtsűrűség csökkenése az első életévben a legnagyobb (a cornea növekedése miatt), majd a huszas évekig a csökkenés mértéke lassul. A huszadik és a nyolcvanadik életév között a csökkenés mértéke mintegy évi 0,52%.^{1,18}

Összefoglalva megállapítható, hogy a donor bulbusok corneájának *in vitro* vizsgálatára a spekulár-mikroszkópia jól alkalmazható. A hypotoniás szemgolyókat a Descemet-redők csökkentése céljából célszerű gázzal vagy folyadékkal feltölteni. Az endothelialis morfológia vizsgálata során minimum 75 sejt elemzése szükséges, és a sejtelemezés során vagy kézi, vagy a szoftver által felajánlott kontraszt-effektus alkalmazását javasoljuk. Az utóbbi módszer gyorsabb és nem függ a vizsgáló személytől. Az endothelialis sejtszám korrekciója corneavastagság függvényében a megfelelő egyenlet használatával szintén kötelező.

Végül hangsúlyozzuk, hogy a spekulár-mikroszkópia és az endothelialis sejtszám-meghatározás számos nehézséggel jár, sok szempont figyelembevételét igényli, és a képek értékeléséhez megfelelő gyakorlat szükséges.

Irodalom

1. Berta A., Békési L., Módis L., Takács L., Vámosi P.: Endothelsejt-károsodás phacoemulsificatio és műlencse-beültetés során. Szemészet 1998; 135(Suppl.): 51-58.
2. Doughty M.J., Müller A., Zaman M.L.: Assessment of reliability of human corneal endothelial cell-density estimates using a noncontact specular microscope. Cornea 2000; 19: 148-158.
3. European Eye Bank Association, Directory, Eleventh edition, 2003.
4. Hoffer K.J., Kraff M.C.: Normal endothelial cell count range. Ophthalmology 1980; 87: 861-866.
5. Laing R.: Specular microscopy. In: Krachmer J.H., Mannis M.J., Holland E.J. (editors): Cornea. Fundamentals of cornea and external disease. Vol. 1. St. Louis, Mosby; 1997; 313-334.
6. Liesegang T.J., Bourne W.M., Ilstrup D.M.: Short- and long-term endothelial cell loss associated with cataract extraction and intraocular lens implantation. Am J Ophthalmol 1984; 97: 32-39.
7. Matsuda M., Yee R.W., Edelhauser H.F.: Comparison of the corneal endothelium in an American and a Japanese population. Arch Ophthalmol 1985; 103: 68-70.
8. Módis L., Kettesy B., Kemény Beke Á., Berta A.: A cornealis endothelium diabetes mellitusban. Szemészet 2000; 137: 157-161.
9. Módis L., Langenbacher A., Seitz B.: Scanning-slit and specular microscopic pachymetry in comparison with ultrasonic determination of corneal thickness. Cornea 2001; 20: 711-714.
10. Módis L., Langenbacher A., Seitz B.: Corneal endothelial cell density and pachymetry measured by contact and noncontact specular microscopy. J Cataract Refract Surg 2002; 28: 1763-1769.
11. Módis L., Langenbacher A., Seitz B.: Evaluation of normal corneas using the scanning-slit topography/pachymetry system. Cornea 2004; 23: 689-694.
12. Padilla M.D., Sibayan S.A.B., Gonzalez C.S.A.: Corneal endothelial cell density and morphology in normal Filipino eyes. Cornea 2004; 23: 129-135.
13. Pardos G.J., Krachmer J.H.: Comparison of endothelial cell density in diabetics and control population. Am J Ophthalmol 1980; 90: 172-174.
14. Rao S.K., Sen P.R., Fogla R.: Corneal endothelial cell density and morphology in normal Indian eyes. Cornea 2000; 19: 820-823.
15. Schultz R.O., Matsuda M., Yee R.W., Edelhauser H.F., Schultz K.J.: Corneal endothelial changes in type I and type II diabetes mellitus. Am J Ophthalmol 1984; 98: 401-410.
16. Seitz B., Müller E.E., Langenbacher A., Kus M.M., Naumann G.O.H.: Reproduzierbarkeit und Validität eines neuen automatisierten Verfahrens der spiegelmikroskopischen Hornhautendothelanalyse. Ophthalmologie 1997; 94: 127-135.
17. Terry M.A., Ousley P.J.: New screening methods for donor eye-bank eyes. Cornea 1999; 18: 430-436.
18. Tuft S.J., Coster D.J.: The corneal endothelium. Eye 1990; 4: 389-424.
19. Williams K.K., Noe R.L., Grossniklaus H.E., Drews-Botsch C., Edelhauser H.F.: Correlation of histologic corneal endothelial cell counts with specular microscopic density. Arch Ophthalmol 1992; 110: 1146-1149.

Levelezési cím: Dr. Kettesy Beáta
 Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi
 Centrum, Szemészeti Klinika
 4012 Debrecen, Nagyerdei krt. 98.
 E-mail: Imodis@dragon.klte.hu