

Ocena zmian w komórkach nabłonka spojówek w zespole suchego oka przy użyciu cytologii impresyjnej

Evaluation of changes in the cells of conjunctival epithelium in dry eye syndrome by impression cytology

Summary. 48 eyes of 24 patients with dry eye syndrome and 22 eyes of 11 normal subjects (control group) were examined with the technique of impression cytology. The aim of this paper was to describe changes in the cells conjunctival epithelium in dry eyes and to evaluate relationships between cytological alternations and the clinical severity of the disease. For clinical evaluation we performed medical history, slit lamp examination, rose bengal staining, break-up time, Shirmer I test. In the specimens from dry eyes we observed morphological changes of the epithelial cells, different nuclear alterations, decrease of the goblet cells density. The degree of cytological changes was related to severity of dry eye syndrome. The impression cytology is a noninvasive, simple method, providing valuable information for diagnosis and therapeutic control of dry eye disorders.

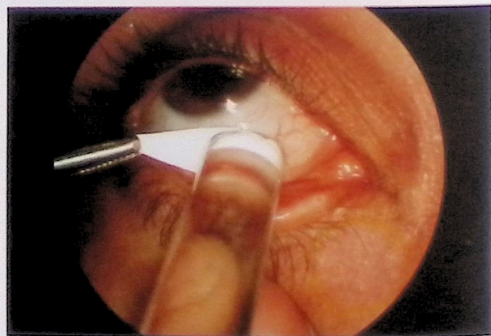
Hasła: zespół suchego oka, spojówka, cytologia impresyjna
Key words: dry eye syndrome, conjunctiva, impression cytology

Zaburzenia ilości i składu filmu łzowego stanowią częstą przyczynę uporczywych dolegliwości, a także zagrożenie powstania powikłań rogówkowych, zakażenia, a nawet utraty wzroku. Mało specyficzne objawy podmiotowe i obraz kliniczny pacjentów z zespołem suchego oka uzasadniają konieczność stosowania dodatkowych testów diagnostycznych³. Najczęściej stosowane: test Schirmera, test czasu przerwania filmu łzowego (BUT) i inne, obciążone są jednak błędem związanym z powstawaniem łzawienia odruchowego, dużym rozrzutem wyników nawet u osób zdrowych oraz brakiem całkowitej powtarzalności^{9,13}.

W badaniach histopatologicznych wycinków spojówek wykazano, że zaburzeniom filmu łzowego towarzyszą zmiany w nabłonku spojówek. U osób zdrowych prawidłowy nabłonek spojówki gąbkowej to nabłonek wielowarstwowy płaski nierogowaczący, zawierający komórki śluzowe i produkujący śluzową komponentę filmu łzowego¹. Natomiast u osób cierpiących na keratoconjunctivitis sicca w wycinkach spojówek stwierdzono wzrost uwarstwienia (stratyfikacji) nabłonka, keratyniza-

cję oraz zanik komórek śluzowych^{2,11}. Zmiany te, polegające na przetworzeniu prawidłowego nabłonka spojówek w nabłonek wielowarstwowy płaski rogowaczący, noszą nazwę metaplastji płaskonabłonkowej^{11,14}.

W celu uzyskania komórek nabłonka do badań mikroskopowych, unikając jednocześnie inwazyjnych wycinków spojówek, zastosowaliśmy metodę cytologii impresyjnej. Metoda ta wprowadzona po raz pierwszy przez *Egberta*⁵, polega na przyłożeniu do spojówki filtra miliporowego, dociśnięciu go, a następnie oderwaniu wraz z przyklejonymi komórkami zewnętrznej warstwy nabłonka (ryc. 1).



Ryc. 1. Cytologia impresyjna — pobieranie materiału przy użyciu filtra miliporowego

Celem niniejszej pracy było wykazanie zmian w komórkach nabłonka spojówek pacjentów z zespołem suchego oka za pomocą cytologii impresyjnej oraz zestawienie ich z obrazem klinicznym i wynikami powszechnie stosowanego testu Schirmera.

Material i metodyka

Badania zostały przeprowadzone u 24 osób (48 oczu) z zespołem suchego oka oraz u 11 osób (22 oczu) zdrowych — z grupy kontrolnej. Wiek pacjentów wynosił od 22 lat do 74 lat (średnia 51 lat). Pod względem płci przeważały kobiety (90%).

U każdego z pacjentów przeprowadziliśmy dokładny wywiad z uwzględnieniem rodzaju dolegliwości, stosowanych leków oraz towarzyszących chorób ogólnoustrojowych. Badani sami oceniali swoje dolegliwości w skali od 0 do 3 punktów (0 — brak, 3 — najcięższe dolegliwości). Następnie badano ostrość wzroku oraz wykonywano badanie w lampie szczelinowej ze szczególnym uwzględnieniem stanu menisku łzowego, zdrażenia oka, złuszczonej resztki i nitek mucynowo-lipidowych, a także oceny stanu powiek. Kolejno przeprowadzono badanie czasu przerwania filmu łzowego (średnia z trzech pomiarów) oraz próbę fluoresceinową. Następnie wykonywano barwienie 1% różem bengalskim oraz po kilkunastominutowej przerwie test Schirmera I przy użyciu pasków z indykatorem Vidisept N (Dr Mann Pharma). Uzyskane wyniki powyższych testów były oceniane w stopniach od 0 do 3 (0 — wynik w normie, 3 — wynik najbardziej nieprawidłowy) wg kryteriów „z Pizy” podanych przez *Murube del Castillo*¹⁰.

Na podstawie całości powyżej opisanego badania podmiotowego i przedmiotowego oraz testów dodatkowych oceniono stan pacjentów z zespołem suchego oka w skali od 0 do 3 stopni, przyjmując 1° jako niski, 2° jako średni i 3° jako najwyższy stopień klinicznego zaawansowania choroby — również wg kryteriów opisanych przez *Murube del Castillo*^{4,10}.

Następnym etapem było pobranie do badania materiału ze spojówki gąbkowej metodą cytologii impresyjnej. Po uzyskaniu pisemnej zgody od badanych z każdego oka pobierano 4 lub więcej preparatów z różnych miejsc spojówki gąbkowej w odległości kilku mm od rąbka na godz. 12-tej, 6-tej, 3-ciej i 9-tej. W większości przypadków nie było konieczności stosowania znieczulenia spojówki, gdyż pobieranie materiału jest niebolesne. Do badania zastosowano filtry miliporowe VSWP 0,025 μm z octanu celulozy (produkcji Milipore) w krążkach o średnicy 25 mm, które zostały pocięte na trójkąty o wymiarach 10/5/10 mm. Filtr taki szorstką powierzchnią przykladało do spojówki trzymając pincetką za wierzchołek trójkąta i dociskając go lekko szklaną pałeczką. Po oderwaniu filtr przyklejano dwustronnie lepką taśmą Scotch za wierzchołek do szkiełka podstawowego, utrwalano w 96% etanolu lub suszono w powietrzu, a następnie barwiono metodą PAS + hema-

toksylna lub HE oraz w niektórych przypadkach dodatkowo innymi metodami np. metodą Feulgena. Po zabarwieniu i prześwietleniu ksylenem przezroczysty filtr wraz z komórkami zamykano w balsamie kanadyjskim, uzyskując trwałe preparaty, który następnie był oceniany w mikroskopie świetlnym i fotografowany.

Wyniki

W preparatach uzyskanych od osób zdrowych z grupy kontrolnej stwierdzono jedno-, a czasem dwuwarstwowy pokład małych, okrągłych, ściśle do siebie przylegających komórek nabłonkowych o różnych kształtach i rozmiarach, o stosunku średnicy jądra do średnicy cytoplazmy ok. 1/2, wśród których występowały liczne nieregularnie rozrzucone komórki śluzowe (PAS +) (ryc. 2 i 3).

W preparatach pochodzących od osób z zespołem suchego oka stwierdzono zmiany morfologiczne nabłonka spojówek, będące wyrazem metaplastji płaskonabłonkowej. Komórki nabłonkowe wykazywały zwiększone rozmiary przy niezmięnionej średnicy jądra komórkowego. Występowało zatem zmniejszenie wartości stosunku średnicy jądra do średnicy cytoplazmy od 1/3 do 1/8 i mniej, odpowiadające spłaszczeniu komórek (ryc. 4).

Towarzyszyły temu anizocytoza, zmiana kształtów komórek nabłonkowych na wieloboczny, czasem wrzecionowaty i różnokształtny. Często obserwowano luźno rozmieszczone komórki „łuskowate”, zrogowaciałe i zwijające się (ryc. 5). Stwierdzono też dużą liczbę komórek dwujądrowych, bejjądrowych oraz komórek z jądrami pyknotycznymi (ryc. 6).

Na szczególną uwagę zasługują obecność w wielu preparatach charakterystycznych kondensacji chromatyny o kształcie pałeczkowatym lub wężykowatym, występujących w centrum jądra komórek nabłonkowych przy zachowanej otoczce jądrowej (ryc. 7). Kondensacje te, obserwowane przede wszystkim w preparatach pochodzących z górnej części spojówki gąbkowej (godz. 12) występowały w grupach komórek nabłonkowych, stanowiąc od kilku do 80% wszystkich komórek. Stwierdzono dodatnią reakcję histochemiczną Feulgena tzn. kondensacje zabarwiała się na purpurowo, potwierdzając obecność w nich chromatyny zawierającej DNA. W preparatach od osób z zespołem suchego oka, w odróżnieniu od prawidłowego nabłonka, stwierdzono również znaczne zmniejszenie gęstości komórek śluzowych aż do ich całkowitego zaniku. Fakt ten stwierdziliśmy przy uwzględnieniu fizjologicznych różnic gęstości komórek śluzowych, występujących w zależności od obszaru spojówki⁷ (ryc. 8).

W preparatach pochodzących od 4 pacjentów z keratoconjunctivitis sicca, wśród komórek nabłonkowych, obserwowaliśmy liczne granulocytozy obojętne, świadczące o dodatkowym bakteryjnym zapaleniu spojówek⁶ (ryc. 9).

¹ Z Katedry i Kliniki Okulistyki AM we Wrocławiu
Kierownik: prof. dr hab. Maria Hanna Niżankowska

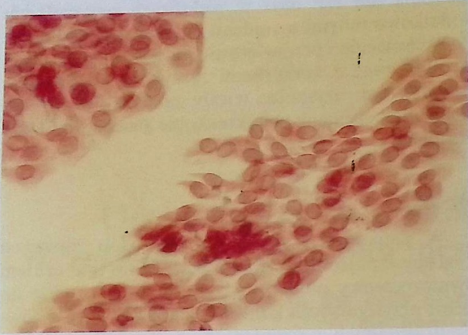
² Z Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii AM we Wrocławiu

Kierownik: prof. dr hab. Maciej Zabel

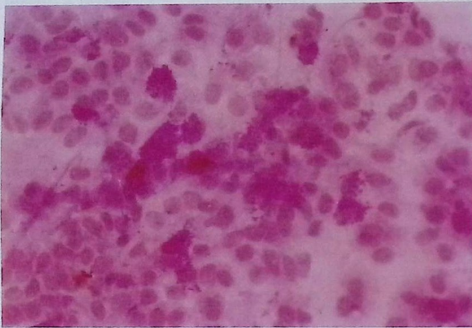
Reprint requests to:

Lek. med. Jarosław Marek

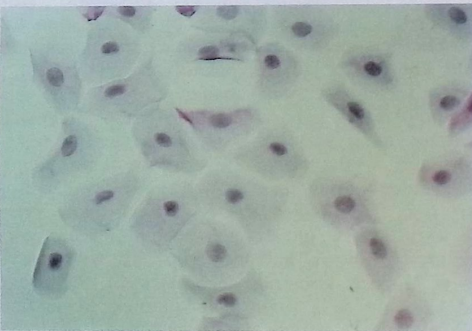
ul. Wyciągowa 42, 53-012 Wrocław



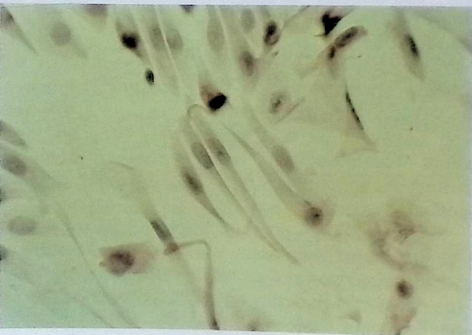
Ryc. 2. Prawidłowe komórki nabłonka spojówki i stosunku jąder do cytoplazmy ok. 1/2 (barwienie HE, pow. mikr. 125×)



Ryc. 3. Liczne komórki śluzowe (PAS+) wśród komórek nabłonkowych (barw. PAS+ hematoksylina, pow. mikr. 125×)



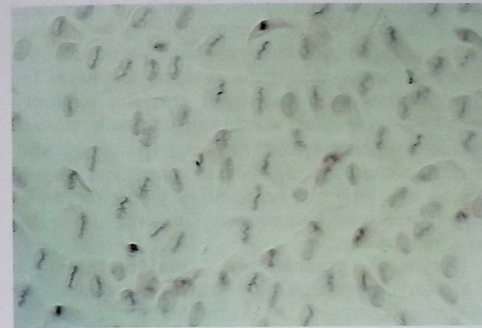
Ryc. 4. Komórki nabłonkowe od pacjenta z zespołem suchego oka — wielokształtne, o dużej średnicy, o stosunku jądra do cytoplazmy ok. 1/4-1/6, luźno rozmieszczone; brak komórek śluzowych w preparacie (barw. PAS+ hematoksylina, pow. mikr. 125×)



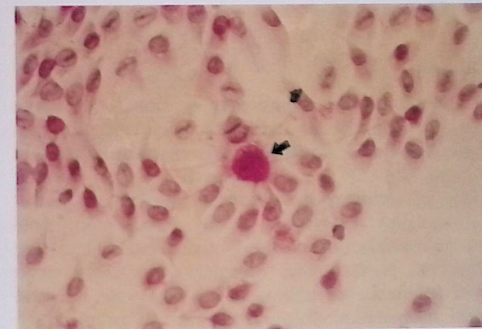
Ryc. 5. Anizocytoza, komórki o kształcie wrzecionowatym



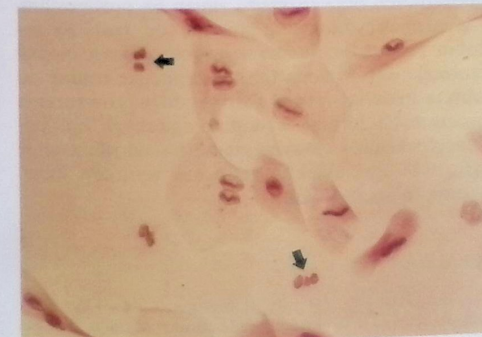
Ryc. 6. Komórki „łuskowate” z pyknotycznymi jądrami (barw. HE, pow. mikr. 125×)



Ryc. 7. Komórki nabłonkowe duże, wieloboczne, liczne komórki dwujądźraste lub z dzielącym się jądrem. Widoczne wężykowate kondensacje chromatyny oraz mniej liczne pałeczkowate kondensacje chromatyny. Brak komórek śluzowych. (barw. PAS+ hematoksylina, pow. mikr. 125×)



Ryc. 8. Komórki nabłonkowe o stosunku jądra do cytoplazmy ok. 1/2 do 1/3, pojedyncze pałeczkowate kondensacje chromatyny; niezbyt liczne komórki śluzowe (strzałka); (barw. PAS+ hematoksylina, pow. mikr. 125×)



Ryc. 9. Duże wielokształtne komórki nabłonkowe, komórki dwujądźraste, kondensacje chromatyny, widoczne jądra granulocytów (strzałki); (barw. HE, pow. mikr. 125×)

Na podstawie oceny nasilenia zmian w preparatach tzw. zmian morfologii komórek, zmniejszenia stosunku jądra do cytoplazmy, zmian w jądrach komórkowych oraz zaniku komórek śluzowych, wyróżniono: stan bardzo zaawansowanych zmian cytologicznych — III^o, stan pośredni — II^o oraz stan niewielkich zmian — I^o. Preparaty bez zmian patologicznych określono jako 0^o.^{12,14}

W preparatach cytologicznych pochodzących od 11 osób (22 oczu) z grupy kontrolnej z zerowym stopniem (0^o) zaawansowania klinicznego choroby stwierdzono: w 9 przypadkach (18 oczu) brak zmian patologicznych (0^o), a u 2 osób (4 oczy) niewielkie zmiany I^o. Wyniki badań 24 pacjentów (48 oczu) z zespołem suchego oka zestawiono w tabeli I. Przedstawia ona ilość oczu o określonym stopniu zaawansowania klinicznego choroby i odpowiadający mu stan nasilenia zmian cytologicznych.

Tabela I

Stopień klinicznego zaawansowania choroby	Stan nasilenia zmian cytologicznych			
	0 ^o	I ^o	II ^o	III ^o
1 ^o	2	12	8	0
2 ^o	0	2	8	2
3 ^o	0	0	6	8
	(ilość oczu)			

Wyniki testu Schirmera I w oczach, w których stwierdzono określony stopień zmian cytologicznych w preparacie przedstawiono w tabeli II.

Tabela II

Stan nasilenia zmian cytologicznych w preparacie	Wartość testu Schirmera I w mm			
	mini-malna	maksy-malna	średnia	odchylenie standardowe
0 ^o (18 oczu gr. kontrolna)	15	25	17	±2,65
I ^o (14 oczu)	2	17	9	±4,28
II ^o (22 oczu)	0	13	6	±9,42
III ^o (10 oczu)	0	25	9	±9,31

Omówienie

W preparatach, uzyskanych od osób z zespołem suchego oka, stwierdziliśmy szereg zmian świadczących o różnie zaawansowanym procesie metaplastyki płaskonabłonkowej nabłonka spojówek, który w schorzeniu tym narażony jest na wysychanie, mechaniczne drażnienie, hyperosmolarny płyn łzowy, upośledzone oczyszczanie z kurzu i bakterii oraz inne następstwa zaburzenia funkcji filmu łzowego. Opisane zmiany w preparatach uzyskanych metodą cytologii impresyjnej odpowiadają zmianom patologicznym stwierdzonym w wynikach badań z zastosowaniem innych metod np. wycinków histopatologicz-

nych spojówek², biopsji szczoteczkowych^{8,15} oraz zeszkrobin spojówkowych¹⁶.

Określony w preparacie stan zmian cytologicznych zwiększa się wraz ze wzrostem stopnia klinicznego zaawansowania choroby. Obliczony na podstawie wyników zestawionych w tabeli I współczynnik korelacji stanu zmian cytologicznych ze stopniem klinicznego zaawansowania choroby wynosi $r=0,69$.

Nie stwierdziliśmy zależności między stopniem zmian cytologicznych w preparacie, a ilością wydzielanych łez, mierzoną za pomocą testu Schirmera I. Wprawdzie bardzo niskim wartościami testu Schirmera (poniżej 4 mm) odpowiadały najczęściej zaawansowane zmiany cytologiczne, ale prawidłowe i wysokie wartości testu Schirmera nie wykluczały dużych zmian w preparatach. Zjawisko to tłumaczyć można dwojako. Po pierwsze prawidłowy wynik testu Schirmera może być skutkiem łzawienia odruchowego w następstwie drażnienia paskiem testowym lub też spowodowanego bolesnymi erozjami nabłonka rogówki — częstymi w zaawansowanych stanach keratoconjunctivitis sicca. Po drugie powyższy brak korelacji uzasadnić można inną przyczyną zespołu suchego oka, związaną ze zmianami jakościowymi łez tzn. zaburzeniami komponenty śluzowej lub lipidowej filmu łzowego.

Obecność granulocytów obojętnochłonnych w niektórych preparatach wskazuje na dodatkowe zakażenie bakteryjne, na które podatność wzrasta wraz z upośledzeniem odpornościowej funkcji filmu łzowego.

Wnioski

Metoda cytologii impresyjnej umożliwia ocenę zmian w komórkach nabłonka spojówek, których stopień nasilenia zależy od zaawansowania zespołu suchego oka. Do najważniejszych zalet tej metody należy jej nieinwazyjny charakter, możliwość wielokrotnego powtarzania bez szkody dla chorego, prostota wykonania i stosunkowo niski koszt. Uzyskane wyniki są powtarzalne, niezależne od chwilowego stanu łzawienia odruchowego, obiektywne i trwale dzięki możliwości sfotografowania. W preparatach możliwa jest ocena zachowanych interakcji międzykomórkowych oraz rozkładu zmian na powierzchni, co wyróżnia cytologię impresyjną od badania zeszkrobin lub materiału uzyskanego techniką biopsji szczoteczkowej. Metoda ta, udostępniając trudny do zdobycia materiał, otwiera drogę do wprowadzenia nowoczesnych technik histopatologicznych np. immunocytochemii i stwarza szansę na udoskonalenie diagnostyki oraz obiektywnej oceny wyników leczenia zespołu suchego oka.

Piśmiennictwo

1. Abdel-Khalek L. M. R., Williamson J., Lee R.: Morphological changes in the human conjunctival epithelium. I. In the normal elderly population. Brit. Ophthalmol. 62: 792-799 (1978). — 2.

Abdel-Khalek L. M. R., Williamson J., Lee R.: Morphological changes in the human conjunctival epithelium. II. In keratoconjunctivitis sicca. Brit. Ophthalmol. 62: 800-806 (1978). — 3. Behrens-Baumann W.: Häufigkeit der verschiedenen, subjektiven Symptome beim "Trockenen Auge" Fortsch. Ophthalmol. 83: 118-119 (1986). — 4. Boyd B.: What are the main advances in the diagnosis and management of the dry eye? Highlights of Ophthalmology XXII: 23-29 (1994). — 5. Egbert P., Lauber S., Maurice D.: A simple conjunctival biopsy. Amer. Ophthalmol. 83: 798-801 (1977). — 6. Kanski J.: Clinical Ophthalmology, 74 (Butterworth-Heinemann, London 1994). — 7. Kessing S. V.: Investigations of the conjunctival mucin. Acta Ophthalmol. 44: 439-453 (1966). — 8. Kobayashi T.: Presence of Bar-Shaped Nuclear Chromatin in Cell Samples from the Conjunctiva. Acta Cytol. 36: 163-166 (1992). — 9. Koch J.M., Waubke Th: Impressioncytologie und ihr licht- und elektronenmikroskopisches Äquivalent bei Patienten mit Keratoconjunctivitis sicca. Fortsch. Ophthalmol. 84: 446-449 (1987).

— 10. Murube del Castillo J., Costes-Rodriguez M.: Eye parameters for the diagnosis of xerophthalmos. Clin Exp Rheumatol 7: 145-150 (1989).

11. Naumann G. O. H., Apple D. J.: Pathology of Eye, 260, 270 (Springer-Verlag, New York 1986). — 12. Nelson J. D., Havener V., Cameron J. D.: Cellulose Acetate Impressions of the Ocular Surface: Dry Eye States Arch. Ophthalmol. 101: 1869-1872 (1983). — 13. Prost M.: Diagnostyka zaburzeń przedrocznego filmu łzowego. Klin. oczna 93: 29-30 (1991). — 14. Tseng S. C. G.: Staging of Conjunctival Squamous Metaplasia by Impression Cytology. Ophthalmology 92: 728-733 (1985). — 15. Tsubota K., Kajiura K., Ugajin S., Hasegawa T.: Conjunctival Brush Cytology. Acta Cytol. 34: 233-235 (1990). — 16. Wander A., Masukawa T.: Unusual appearance of condensed chromatin in conjunctival cells in superior limbic keratoconjunctivitis. The Lancet 07.4: 42-43 (1981).

Praca wpłynęła: 14.04.1995 (288)