

Nowa metoda pomiaru parametru wymiany filmu łzowego przy pomocy profilometru fluoresceinowego



Foto: archiwum Aurora



Foto: archiwum Aurora

Mgr inż. IZABELA K. GARASZCZUK
Optometrystka, doktorantka, Early Stage Researcher
Wydział Optyki, Optometrii i Nauk o Widzeniu, Uniwersytet w Walencji (Hiszpania)
Dr inż. D. ROBERT ISKANDER, prof. nadzw.
Wydział Inżynierii Biomedycznej, Politechnika Wrocławska

Praca nagrodzona w konkursie CooperVision FORCE 2016 oraz zaakceptowana do publikacji w dniu 19.04.2017 w czasopiśmie naukowym „Contact Lens and Anterior Eye” pod tytułem: „Qualitative assessment of tear dynamics with fluorescein profilometry”, Izabela K. Garaszczuk, D. Robert Iskander, DOI: 10.1016/j.clae.2017.04.004

Streszczenie

Celem niniejszej pracy było opracowanie nowej metodologii do celów pomiaru i analizy wymiany łez na powierzchni oka w oparciu o obserwację spadku natężenia fluorescencji filmu łzowego w czasie, a także opisanie zależności pomiędzy nowo zdefiniowanym parametrem oczyszczania łez oraz innymi miarami charakteryzującymi film łzowy. Badania wykonano na grupie 40 młodych ochotników w wieku 32 ± 14 lat. Na protokół kliniczny składały się: historia medyczna uczestnika, kwestionariusz McMonnies, szczegółowa ocena pod biomikroskopem z lampą szczelinową oraz pomiar parametru wymiany łez przy pomocy profilometru fluoresceinowego. Parametr wymiany łez cechuje duża zmienność osobnicza i wynosi on średnio $39 \pm 23\%$. Zano-towano statystycznie znaczące korelacje pomiędzy parametrem wymiany łez a wynikiem kwestionariusza McMonnies oraz czasem przzerwania filmu łzowego mierzonym przy pomocy fluoresceiny. Profilometr fluoresceinowy pozwala na śledzenie dynamicznych zmian zachodzących w filmie łzowym na całej powierzchni oka i ma zastosowanie w jakościowej ocenie dynamiki łez.

Wstęp

Odpowiednio zbilansowany skład filmu łzowego oraz jego efektywna dynamika i wymiana są nieodzowne dla zapewnienia zdrowia i prawidłowego funkcjonowania powierzchni oka. Na prawidłową dynamikę filmu łzowego składa się jego produkcja w gruczołach, dystrybucja, retencja na powierzchni oka, wymiana, eliminacja, parowanie oraz absorpcja przez tkanki. Procesy te regulowane są przez łzową jednostkę funkcjonalną (ang. *lacrimal functional unit*), w której skład wchodzi gruczoły łzowe, gruczoły Meiboma oraz komórki kubkowe spojówki, a także powierzchnia oka i unerwienie tych struktur. Pojedyncze testy oceniające dynamikę łez często bardzo słabo korelują z symptomami raportowanymi przez pacjentów, jak również słabo korelują między sobą.

Na odpowiednią wymianę filmu łzowego (z ang. *Tear Turnover*) składają się wszystkie wymienione powyżej procesy. Parametr wy-

Abstract

The aim of the study was to develop a new methodology for tear-film dynamics assessment by observing fluorescein decay rate over time and to understand the relationship between the newly defined tear fluorescein wash-out rate (TFWR) and other measures of tear film behaviour. Forty subjects aged 32 ± 14 y.o. volunteered for the study. It consisted of the review of medical history, McMonnies questionnaire, slit lamp examination, and TFWR measurements using a newly-developed fluorescein profilometry. TFWR is highly subject-dependent. The group mean TFWR was $39 \pm 23\%$ at 30-second mark after the beginning of measurements. Statistically significant correlations were found between the percentage TFWR and McMonnies questionnaire score, as well as fluorescein tear film break-up time. Fluorescein profilometry allows clinicians to follow dynamic changes occurring in the tear film on the entire ocular surface and may be used for qualitative assessment of the tear film dynamics.

miany filmu łzowego, w literaturze anglojęzycznej określany jako TTR (*Tear Turnover Rate*), jest to fizjologiczna miara określająca prawidłowe działanie łzowej jednostki funkcjonalnej oraz wymianę (oczyszczanie) filmu łzowego. Miara ta bierze pod uwagę wkład wszystkich wyżej wymienionych procesów w dynamikę filmu łzowego [1–3]. Parametr wymiany filmu łzowego mierzy się zwykle przy pomocy fluorofotometru, który zapewnia bezpośrednią, ilościową ocenę. Istnieją również prostsze, alternatywne metody, w przeważającej większości polegające na obserwacji spadku stężenia fluoresceiny we łzach przy pomocy takich metod jak zmodyfikowane testy Schirmera lub kolorymetryczna ocena menisku łzowego, jednakże są to metody często subiektywne i nie pozwalają na ocenę dynamicznych zmian.

Parametr wymiany filmu łzowego pozwala nam na ocenę pracy układu łzowego oraz jest on skorelowany z markerami stanu zapal-

nego i podrażnienia powierzchni ocznej. Takie czynniki jak wiek, obecność fałdów spojówki, niedrożność punktów łzowych, anormalne mruganie lub nieprawidłowa anatomia powiek mają wpływ na zmianę tego parametru i opóźnienie wymiany łez [4–6]. TTR jest także obniżony u osób cierpiących na zespół suchego oka [7], z dysfunkcją gruczołów Meiboma lub obniżonym czuciem rogówki [2,4,5,8–11].

Większość metod analizy wymiany łez jest czasochłonna, subiektywna lub wymaga sprzętu o ograniczonej stosowalności w praktyce klinicznej, a także cechuje je zbyt niska czasowa i przestrzenna rozdzielczość do dynamicznej oceny filmu łzowego, przez co pomiary TTR najczęściej mają zastosowanie jedynie w badaniach naukowych. Ponadto, najbardziej sprawdzona metoda do oceny wymiany łez – metoda fluorofotometryczna – pozwala na obserwację wymiany łez jedynie na stosunkowo niewielkim obszarze.

Materiały i metody

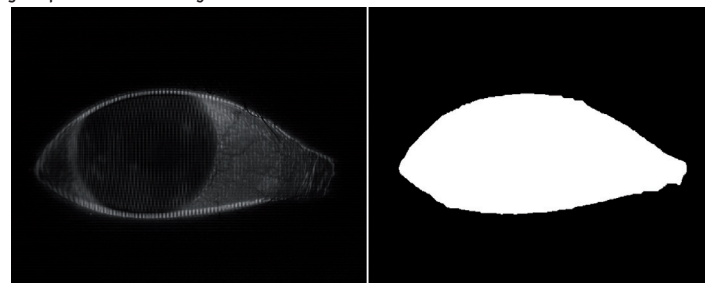
W badaniu wzięło udział 40 ochotników (24 kobiet i 16 mężczyzn) w wieku 32 ± 14 lat, z których najmłodszy miał 21, a najstarszy 70 lat. Badanie zostało przeprowadzone w zgodzie z Deklaracją Helsińską. Zgoda na wzięcie udziału w badaniach została pisemnie wyrażona przez każdego z uczestników. Na kryteria wykluczające z brania udziału w pomiarach składały się: regularne noszenie soczewek kontaktowych, objawy i symptomy suchości oka lub zapalenia powierzchni ocznej lub powiek, okres rekonwalescencji po zabiegu chirurgicznym w toku lub jakiegokolwiek oznaki zaburzenia przepływu łez.

Protokół badawczy składał się z wywiadu medycznego, kwestionariusza McMonniesa, szczegółowej oceny przedniego docinka oka w lampie szczelinowej oraz pomiaru TTR w oparciu o pomiary profilometrem fluoresceinowym (Eye Surface Profiler, Eaglet Eye, Holandia). Temperatura i wilgotność powietrza w laboratorium była kontrolowana i utrzymywana na stabilnym poziomie. Średnia temperatura wynosiła $24,5 \pm 1,2$ [°C], zaś wilgotność $25,3 \pm 3,0$ [%RH]. Podążając za przypuszczeniem, że wartość TTR może się zmieniać w ciągu dnia, badania prowadzono o tej samej porze, wcześniej rano.

Po szczegółowym wywiadzie i wypełnieniu kwestionariusza McMonniesa następowała nieinwazyjna część kontroli powierzchni oka i powiek pod biomikroskopem z lampą szczelinową. Oceniano wysokość menisku łzowego, częstość mrugania, obecność fałdy spojówki oraz wykluczano wszystkie kryteria dyskwalifikujące z udziału w badaniach. Do oceny barwienia powierzchni oka fluoresceiną oraz pomiaru czasu przzerwania filmu łzowego przystępowano po pomiarze TTR, w celu uniknięcia zabarwienia menisku łzowego fluoresceiną oraz jego sztucznego zwiększenia.

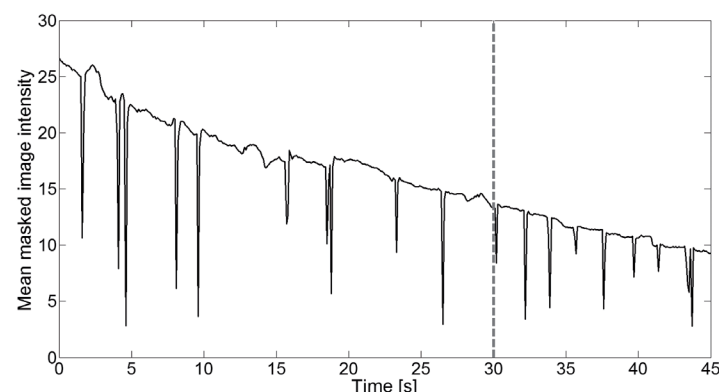
Kolejnym etapem procedury była ocena wymiany łez przy pomocy profilometru fluoresceinowego. Zasada działania profilometru opiera się na dwóch siatkach prążków rzutowanych światłem niebieskim pod różnymi kątami na powierzchnię oka. Dzięki zastosowaniu barwnika fluoresceinowego prążki te są widoczne w filmie łzowym.

Profilometr został stworzony w celu analizy topograficznej całej przedniej powierzchni oka. W niniejszych badaniach użyty został w sposób niekonwencjonalny do analizy wymiany filmu łzowego. Do aplikacji fluoresceiny użyto pasków fluoresceinowych (BioGlo, HUB Pharmaceuticals, LCC). Uczestników proszono, aby przed pomiarem trzykrotnie mrugnęli, rozprowadzając barwnik po powierzchni oka. Następnie, za pomocą wcześniej odpowiednio zogniskowanego profilometru, rejestrowano przez żółty filtr trwające nie dłużej niż minutę wideo przedstawiające obraz prążkowy w filmie łzowym powstały przez wzbudzenie fluoresceiny światłem niebieskim pochodzącym z jednej z diod iluminacyjnych urządzenia. Ochotnik miał przez ten czas za zadanie spoglądać na krzyż fiksacyjny urządzenia swobodnie mrugając. Rejestrowano w ten sposób spadek natężenia obrazu prążkowego z czasem produkcji nowych łez i wypłukiwaniem fluoresceiny z powierzchni oka w procesie mrugania. W kolejnym etapie spadek natężenia obrazu był analizowany za pomocą napisanego w tym celu programu, obliczającego średnią intensywność każdej rejestrowanej klatki obrazu w wybranym przez nas obszarze, jak pokazano na rysunku 1.

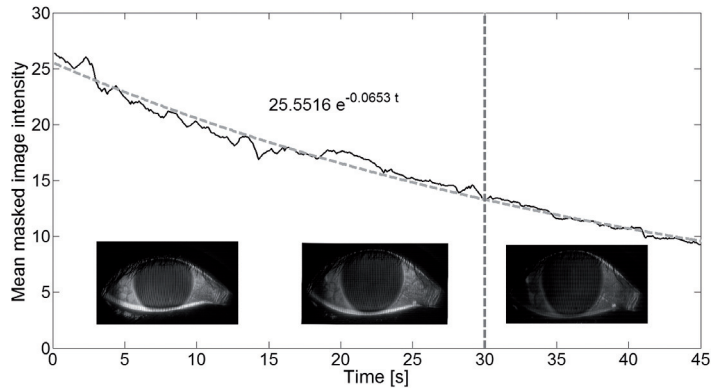


Rys. 1. Przykładowa klatka wideorejestracji z profilometru fluoresceinowego (po lewej) i odpowiadający jej zaznaczony fragment (po prawej)

Przykładowa krzywa spadku intensywności przedstawiona jest na rysunku 2. Założono jednofazowy model wykładniczy spadku natężenia, czyli $I(t) = Ae^{-\beta t}$. Po usunięciu z sygnału artefaktów spowodowanych mrugnięciami, amplitudę A i stałą zaniku β oszacowano, dopasowując metodą najmniejszych kwadratów nową krzywą do uzyskanych danych. TTR oszacowano jako procentowy spadek średniej intensywności natężenia obrazu prążkowego po 30 sekundach. Taki margines czasowy wybrany został ze względu na to, że najkrótsza sekwencja wideo, nagrana przy pomocy profilometru, trwała 40 sekund. Margines zaznaczono na rysunku 2 i 3.



Rys. 2. Przykładowa krzywa spadku natężenia obrazu prążkowego (czarna linia) z zaznaczonym marginesem 30 sekund. Mean masked image intensity – średnia intensywność rejestrowanego obrazu, time – czas



Rys. 3. Przykładowa krzywa spadku natężenia obrazu prążkowego po usunięciu artefaktów spowodowanych mrugnięciami (czarna linia) oraz wykładnicza krzywa dopasowana do sygnału (szara linia), z zaznaczonym marginesem 30 sekund. Mean masked image intensity – średnia intensywność rejestrowanego obrazu, time – czas

Wyniki i dyskusja

Średnia parametru TTR dla całej grupy pomiarowej wynosiła 39 ± 23 [%] dla profilometru po 30 sekundach od rozpoczęcia pomiaru. Dla TTR zmierzonego przy pomocy profilometru wykazano statystycznie znaczące korelacje z czasem przerwania filmu łzowego ($r^2 = 0,136$, $p = 0,009$) oraz wynikiem kwestionariusza McMonniesia ($r^2 = 0,214$, $p = 0,001$).

Większość testów mających za zadanie ocenę pojedynczych parametrów dynamiki filmu łzowego często nie koreluje z subiektywnym odczuciem pacjenta, a także nie koreluje między sobą. TTR, miara wymiany filmu łzowego, stanowi pośrednią sumę wkładów wszystkich procesów zachodzących w filmie łzowym i jest fizjologiczną miarą integralności układu łzowego oraz wymiany łez na powierzchni oka, a dodatkowo źródła potwierdzają jego związek z odczuwanym i obserwowanym podrażnieniem i stanem zapalnym powierzchni ocznej. TTR standardowo szacowane jest w oparciu o metodę fluorofotometryczną, ponieważ pozwala ona na bezpośrednią ocenę, jednakże nie jest pozbawiona ograniczeń, które obniżają jej kliniczną użyteczność. Fluorofotometr jest relatywnie drogim urządzeniem i wymaga znaczących umiejętności w celu wykonania nim udanego pomiaru. Pomiar TTR przy pomocy fluorofotometru jest również dość czasochłonny. Szacowanie parametru TTR tą metodą jest ograniczone przez rozdzielczość przestrzenną urządzenia i notowaną niezerową przepuszczalność rogówki dla fluoresceiny oraz przez procesy biochemiczne zachodzące w samej fluoresceinie. Prostsze metody nie pozwalają na ocenę dynamicznych zmian zachodzących w filmie łzowym raz często opierają się na subiektywnej ocenie.

Raport The International Dry Eye WorkShop z 2007 roku przedstawia TTR mierzony przy pomocy fluorofotometru jako jeden z dodatkowych testów, jakie można wykonać w celu diagnozy i monitorowania zespołu suchego oka i wskazuje na potrzebę wynalezienia tańszej i mniej czasochłonnej techniki pomiarowej. W odpowiedzi na to zapotrzebowanie Pearce et al. [12] opracował automatyczną ulepszoną metodę pomiarów TTR przy użyciu fluorofotometru, składającą się z zaledwie sześciu pomiarów w czasie 10 minut, skracając do ostatecznego minimum

pomiary fluorofotometryczne. Pomiary zwykle zajmują od 14 do 30 minut. Limit 30-minutowy jest zalecany ze względu na to, iż po upływie tego czasu notuje się znaczący wpływ na wyniki fluorescencji rogówkowej, spowodowanej wnikaniami fluoresceiny w rogówkę i faktu, iż niska rozdzielczość przestrzenna fluorofotometru nie pozwala na odróżnienie fluorescencji filmu łzowego od fluorescencji kawałka rogówki, który znajduje się w obszarze pomiarowym urządzenia [3,13,14]. W 2014 roku Zheng [15] opisał mniej inwazyjną metodę pomiaru TTR przy pomocy OCT i chociaż wyniki pomiaru TTR zdają się korelować z TTR zmierzonym przy pomocy prostych testów fluoresceinowych, a sama metoda ma wyższą użyteczność kliniczną niż fluorofotometria, to jednak nie pozwala nam ona na pełny wgląd w dynamikę wymiany łez.

Wnioski

Podsumowując, technika z użyciem profilometru fluoresceinowego jest mniej czasochłonna (pomiar trwa mniej niż minutę), prosta w wykonaniu, wymaga użycia niskiej koncentracji fluoresceiny. Urządzenie używane jest także do oceny topografii przedniego odcinka oka, może zostać użyte zarówno w doborze soczewek kontaktowych, pomiarze topografii, jak i do oceny TTR, który, gdy obniżony, może być przeciwwskazaniem do noszenia soczewek. To wszystko zwiększa jego kliniczną przydatność. Urządzenie to może posłużyć do analizy subtelnych zmian zachodzących w filmie łzowym, ze względu na bardzo wysoką rozdzielczość obrazu i nie jest ograniczone przez rozdzielczość przestrzenną tak, jak to jest w przypadku fluorofotometru.

O Autorce

Absolwentka optometrii na Politechnice Wrocławskiej. Nagrodzona tytułem CooperVision FORCE Student of the Year 2016. Obecnie realizuje podwójny doktorat na Uniwersytecie w Walencji oraz na Politechnice Wrocławskiej, w ramach projektu H2020 European Dry Eye Network (EDEN), finansowanego z grantu Marie Skłodowskiej-Curie.

Piśmiennictwo

1. A. Tomlinson, S. Khanal. Assessment of tear film dynamics: quantification approach. *The Ocular Surface* 2005;3(2): 81–95
2. C.S. de Paiva, S.C. Pflugfelder. Tear clearance implications for ocular surface health. *Experimental Eye Research* 2004;78(3): 395–397
3. J.D. Nelson. Simultaneous evaluation of tear turnover and corneal epithelial permeability by fluorophotometry in normal subjects and patients with keratoconjunctivitis sicca (KCS). *Transactions of the American Ophthalmological Society* 1995;93: 709
4. P. Prabhasawat, S.C. Tseng. Frequent association of delayed tear clearance in ocular irritation. *British Journal of Ophthalmology* 1998;82(6): 666–675
5. A.A. Afonso, D. Monroy, M.E. Stern, W.J. Feuer, S.C. Tseng, S.C. Pflugfelder. Correlation of tear fluorescein clearance and Schirmer test scores with ocular irritation symptoms. *Ophthalmology* 1999;106(4): 803–810
6. A. Jordan, J. Baum. Basic tear flow: does it exist? *Ophthalmology* 1980;87(9): 920–930
7. L. Sorbara, T. Simpson, S. Vaccari, L. Jones, D. Fonn. Tear turnover rate is reduced in patients with symptomatic dry eye. *Contact Lens and Anterior Eye* 2004;27(1): 15–20
8. S.C. Pflugfelder, A. Solomon, D. Dursun, D.-Q. Li. Dry eye and delayed tear clearance: "a call to arms". *Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes 3*. Springer 2002, pp. 739–743
9. A. Macri, S. Pflugfelder. Correlation of the Schirmer 1 and fluorescein clearance tests with the severity of corneal epithelial and eyelid disease. *Archives of Ophthalmology* 2000;118(12): 1632–1638
10. A.A. Afonso, L. Sobrin, D.C. Monroy, M. Selzer, B. Lokeshwar, S.C. Pflugfelder. Tear fluid gelatinase B activity correlates with IL-1 α concentration and fluorescein clearance in ocular rosacea. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1999;40(11): 2506–2512
11. A. Macri, M. Rolando, S. Pflugfelder. A standardized visual scale for evaluation of tear fluorescein clearance. *Ophthalmology* 2000;107(7): 1338–1343
12. E.I. Pearce, B.P. Keenan, C. McRory. An improved fluorophotometric method for tear turnover assessment. *Optometry & Vision Science* 2001;78(1): 30–36
13. E. Kuppens, T. Stolwijk, R. de Keizer, J. Van Best. Basal tear turnover and topical timolol in glaucoma patients and healthy controls by fluorophotometry. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1992;33(12): 3442–3448
14. W. Webber, D. Jones. Continuous fluorophotometric method of measuring tear turnover rate in humans and analysis of factors affecting accuracy. *Medical and Biological Engineering and Computing* 1986;24(4): 386–392
15. X. Zheng, T. Kamao, M. Yamaguchi, Y. Sakane, T. Goto, Y. Inoue, A. Shiraishi, Y. Ohashi. New method for evaluation of early phase tear clearance by anterior segment optical coherence tomography. *Acta Ophthalmologica* 2014;92(2): e105–e111