

Медицински университет „Проф. д-р П. Стоянов“ – Варна
Катедра по очни болести и зрителни науки

Д-р Весела Иванчева Любенова, FEBO

**Сравнителен анализ на топографски
и микроструктурни методики за оценка
на роговицата в норма и патология**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд за присъждане на образователна
и научна степен „Доктор“ по научна специалност
„Офталмология“, шифър 03.01.36.

Научен ръководител:

Проф. д-р Христина Групчева, д.м.н., FEBO, FICO(Hon), FBCLA

Варна, 2014 г.

Дисертационният труд съдържа 163 стандартни машинописни страници. За неговото онагледяване са използвани 8 таблици и 96 фигури. Библиографската справка обхваща 19 страници и съдържа общо 243 литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита от катедрения съвет на „Катедра по очни болести и зрителни науки“ към Медицински университет – Варна, проведен на 04.07.2014 г.

Публичната защита на дисертационната работа ще се проведе на 25.09.2014 г. от 16 часа в аудитория „Д-р Стефан Черкезов“ на МУ – Варна, съобразно заповед на ректора № Р-109-136/31.07.2014 г.

Научно жури в състав:

Външни членове за МУ – Варна:

Проф. д-р Валентина Георгиева Златева, д.м.н. – на свободна практика

Доц. д-р Георги Йорданов Йорданов, д.м. – Тракийски университет, Медицински факултет

Доц. д-р Виолета Силви Чернодринска, д.м. – МУ – София

Резервен външен член:

Доц. д-р Марин Ангелов Атанасов, д.м. – МУ – Пловдив

Вътрешни членове за МУ – Варна:

Проф. д-р Христина Николова Групчева, д.м.н. – Ръководител Катедра „Очни болести и зрителни науки“, МУ – Варна

Доц. д-р Александра Живкова Сантева-Цукева, д.м. – Катедра „Нервни болести“, МУ – Варна

Резервен вътрешен член:

Доц. д-р Зорница Иванова Златарова-Ангелова, д.м. – Катедра „Очни болести и зрителни науки“

Материалите по защитата са на разположение в Катедрата по очни болести и зрителни науки, СБОБАЛ – Варна, на ул. Дойран 15, гр. Варна, и са публикувани в интернет на страницата на Медицински университет – Варна.

Забележка: Номерата на фигурите и таблиците в автореферата не съответстват на номерата в дисертационния труд.

Използвани съкращения:

| | |
|---------------------------------|--|
| λ | дължина на вълната |
| mm | милиметър |
| μm | микрометър |
| nm | нанометър |
| D | диоптър |
| OCT | оптична кохерентна томография |
| PRK | фоторефрактивна кератектомия |
| LSCM | laser scanning confocal microscope (лазер сканиращ конфокален микроскоп) |
| BCVA | best corrected visual acuity (най-добра зрителна острота с корекция) |
| CAM | corneal adaptor module (корнеален адапторен модул) |
| PK | penetrating keratoplasty (пенетрираща кератопластика) |
| PMMA | полиметилметакрилат |
| Sec | second (секунда) |
| n | number (брой) |
| SD | standard deviation (стандартно отклонение) |
| ROI | region of interest (зона на избор) |

Съдържание

| | | |
|-------|---|----|
| I. | Въведение..... | 7 |
| II. | Резюмета на български и английски език..... | 8 |
| III. | Цел и задачи..... | 15 |
| IV. | Материал и методи..... | 16 |
| V. | Резултати..... | 28 |
| VI. | Обсъждане..... | 52 |
| VII. | Заключение..... | 73 |
| VIII. | Приноси..... | 74 |
| IX. | Публикации и научни съобщения, свързани с дисертационния труд..... | 75 |

I. Въведение

Патологията на предния очен сегмент се отразява пряко на качеството на живот на пациента, тъй като влияе негативно на качеството на зрение. Ето защо ефективният метод за изследване на предния очен сегмент е от особено значение за диагностичния подход. Роговицата е основната статична пречупваща среда на оптичната система на окото, ключова за качеството на зрението, изразено не само чрез зрителната острота, а и чрез контрастната чувствителност и финото цветно зрение. Тя има сложна асферична форма, което затруднява осигуряването на прецизна качествена (векторен анализ) и количествена (диоптрична стойност, елевация) информация за нея, която е от особено значение при вземането на разумни рефрактивни решения с оптични средства или хирургически процедури. В модерната офталмология контактната корекция е ежедневие, а все по-популярната рефрактивна корнеална хирургия във всичките ѝ форми налага адекватна оценка и предвиждане на бъдещата реакция на роговицата на различни интервенции. Изследването на живата роговица е значително сложно поради намеса на множество биологични и ситуационни фактори. Използването на предложената в настоящия научен труд концепция за комбиниране на Плачидо-базирана роговична топография, предносегментна оптична кохерентна томография и лазер сканираща конфокална микроскопия на живо осигурява комплексна оценка на роговицата чрез прецизно измерване, добър топографски и едновременно хистологичен профил на роговицата.

II. Резюмета на български и английски език

Цел

Основната цел на настоящата научна разработка е да бъдат използвани съвременни технологични методики за топографски и микроструктурен анализ на роговицата в норма и на тази база да бъде направена оценка на патологичните промени в роговицата при различни състояния и заболявания.

Методология

В проучването са включени общо 240 очи на 149 индивиди, които са разделени в две големи групи. В група I са включени здрави 170 очи на 85 индивиди на средна възраст 51 ± 3 г.; 40 жени, 45 мъже, без системни или очни заболявания, нетретирани оперативно и/или медикаментозно, неносещи контактни лещи, BCVA ≥ 1.0 . От тях 100 очи на 50 индивиди са изследвани с Плачидо-базирана роговична топография (група IA), 170 очи на 85 индивиди са изследвани с предно-сегментна оптична кохерентна томография (група IB) и 70 очи на 70 индивиди са изследвани с лазер сканираща конфокална микроскопия на живо (група IV). В група II са включени 70 очи на 64 пациенти с птериgium (58 с едностранен, 6 с двустранен; 29 жени, 35 мъже). За контроли са използвани очите от група IB и група IV. Всички изследвания са проведени при едни и същи условия, от един и същ екзаминатор. С помощта на оптична кохерентна томография (ОСТ) и Плачидо базирана роговична топография са изготвени триизмерни пахиметрични и елевационни карти на роговицата, както и топографски карти на предната ѝ повърхност, които са анализирани и сравнени (корелационен анализ). Чрез лазер сканираща конфокална микроскопия (LSCM) на живо са получени микроструктурни изображения на всички роговични слоеве на роговиците от група II и IV. Получените резултати по трите метода са анализирани качествено и количествено от двама независими изследователи.

Резултати

При качествения анализ на Плачидо-базираните цветно кодирани топографски изображения на здравите роговици е установено прогресиращо оплоскостяване от центъра към периферията с 2–4 диоптъра, назалните квадранти са по-плоски от темпоралните. Налице е огледална симетрия между двете очи на всеки изследван. Най-разпространеният модел е симетрична папийонка – 32%, следван от несиметрична папийонка – 31,5%, овална форма – 16%, неопределена форма – 13%, кръгла – 7,5%. При количествения анализ средният радиус на кривина на роговицата е анализиран в милиметри за ефективно търсене на корелация. По вертикалата в 3 мм зона средният радиус на кривина на роговицата е $7,51 \pm 0,33$ mm. Минималният установен радиус е 6,95 mm, а максималният измерен е 8,4 mm. Средната стойност по хоризонталата е $7,63 \pm 0,28$ mm, максималната – 8,16 mm, а минималната – 7,1 mm. Средната разлика на стойностите е $0,16 \pm 0,1$ mm, максималната е 0,61 mm, а минималната – 0 mm. Според резултатите от предносементната оптична кохерентна томография най-тънката област на роговицата е разположена инферотемпорално спрямо вертекса, а корнеалната дебелина нараства периферно. Максималната, средната и минималната централна роговична дебелина са съответно 615 μm , 556 ± 27 μm и 504 μm . На цветно кодирани елевационни роговични карти на ОСТ средната стойност на радиуса на роговична кривина на 180° е $7,74 \pm 0,25$ mm. Максималната измерена стойност е 8,34 mm, а минималната – 7,18 mm. По меридиана на 90° средният измерен радиус е $7,41 \pm 0,27$ mm. Максималната установена стойност на радиуса на роговична кривина по този меридиан е 8,0 mm, а минималната стойност е 6,76 mm. Средната разлика в милиметри между стойностите на радиусите по вертикала и хоризонтала е $0,32 \pm 0,18$ mm. Максималната установена разлика е 1,4 mm, а минималната е 0,1 mm.

Корелационният анализ на роговичните кривини по двете методики показва морфологично сходство на резултатите, като елевационната топография дава завишени, а Плачидо-базираната – занижени стойности по отношение на математически калкулираните средни стойности с векторен анализ. При качествения анализ на изображенията на лазер сканираща конфокална микроскопия в епитела на птериgiuma се ви-

зуализират плътно прилежащи една към друга клетки със светлосиви клетъчни тела, тъмни граници и пунктиформни хиперрефлексивни ядра, както и пръснати чашковидни клетки. В субепитела се откриват микрокисти, а стромата на птеригиума има предимно плътна фибро-вакуларна структура с богата мрежа от кръвоносни съдове, изпълнени с хиперрефлексивни кръвни клетки и на места инфилтрация от възпалителни клетки в обграждащата тъкан. В епитела и стромата на птеригиума се наблюдават пръснати възпалителни клетки, предимно дендритни. В някои случаи броят им е толкова голям, че изглеждат като мрежа от жички. В областта на лимба в роговиците с птеригиум е установена нарушена структура на палисадите, хиперрефлексивни струпвания и ярки клетки от предполагаем възпалителен произход. Наблюдавани са и изменения на нивото на стромата в роговиците с птеригиум – леко замъгляване на структурата и нарушена морфология на кератоцитите. Стромалните роговични нерви също са с изменен вид – начупен ход, неравномерен калибър, воалирани граници. При качествения анализ на изображенията на роговиците с птеригиум се установи нарушена морфология на суббазалните нерви, а на границата между тъканта на главата на птеригиума и чистата роговица са намерени клъстери от хиперрефлексивни клетки, за които се предполага, че кореспондират с клинично видимите петна на Фукс. Базалните епителни клетки са с изменена форма и подредени колонообразно, а в някои случаи съединителната тъкан на стромата на птеригиума граничи с базален роговичен епител с нормална морфология. На нивото на базалния епител на роговицата са наблюдавани пръснати ярки окръглени депозити, за които се предполага, че са меланинови отложения. Количественият анализ показва, че изчислената гъстота на базалните епителни клетки на роговицата на пациентите с птеригиум е 4678 ± 41 кл/мм², а на контролните субекти е 6850 ± 38 кл/мм². Плътността на кератоцитите от предната строма е 424 ± 17 кл/мм² в групата с птеригиум, тези стойности са по-ниски в сравнение с контролните субекти – 772 ± 25 кл/мм². Гъстотата на кератоцитите от средна строма е 301 ± 35 кл/мм², а от задна строма – 291 ± 31 кл/мм², по-ниски от тези на контролите – 327 ± 24 кл/мм² и 305 ± 37 кл/мм² съответно. Ендотелната плътност в групата с птеригиум е 2121 ± 781 кл/мм², а при здра-

вите роговици – 2520 ± 361 кл/мм². Плътността на откритите в тялото на птеригиума дендритни клетки е 115 ± 11 кл/мм², а при контролите – 25 ± 12 кл/мм². На предноsegmentните оптично кохерентни томографии птеригиумът се визуализира като хиперрефлексивна надигната област върху роговицата, която съответства на клинично видимия птеригиум. Режимът на изследване и полученото изображение позволява прецизно изследване на интерфейса птеригиум – роговица, както и точно измерване с мануален калипер на дебелината на птеригиума и резидуалната строма.

Заклучение

Плачидо-базираната роговична топография, предноsegmentната оптична кохерентна томография и лазер сканиращата конфокална микроскопия на живо осигуряват детайлна, точна и възпроизводима информация относно оптичните и микроструктурни качества на живата роговица. Използването на предложената в настоящия научен труд концепция за комбинирането им осигурява комплексна оценка на роговицата чрез прецизно измерване, добър топографски и едновременно хистологичен профил на роговицата.

Abstract

Purpose: The main purpose of the work is to perform an assessment of the living human cornea in healthy subjects by the combined use of three advanced diagnostic imaging techniques for topographic and microstructural analysis, to compare the results of these methods, to clarify the advantages of combining them for corneal evaluation and on this basis to evaluate pathological changes of the cornea in specific diseases and conditions.

Methods: The study included 240 eyes of 149 subjects who were divided into two large groups. Group I included 170 healthy eyes of 85 subjects, mean age 51 ± 3 years; 40 women, 45 men, without systemic or ocular disease, untreated surgically and/or medically, not wearing contact lenses, BCVA ≥ 1.0 . Of these, 100 eyes of 50 subjects were examined by Placido-based corneal topography (group I A), 170 eyes of 85 subjects were examined by optical coherence tomography (group I B) and 70 eyes of 70 subjects were examined by *in vivo* laser scanning confocal microscopy (group I C). Group II included 70 eyes of 64 patients with pterygium (58 unilateral, 6 with bilateral, 29 women, 35 men). Eyes from group I B and group I C were used for controls. All studies were conducted under the same conditions by the same examiner. With the assistance of optical coherence tomography (OCT) and Placido-based corneal topography color-coded thickness maps, three-dimensional elevation maps and topographic maps of the corneal front surface were prepared and analyzed comparatively (correlation analysis). Microstructural images of all corneal layers were obtained using *in vivo* laser scanning confocal microscopy (LSCM) in groups II and I C. The results of the three methods of examination were analyzed qualitatively and quantitatively by two independent researchers.

Results: The qualitative analysis of Placido-based color-coded topographic images of healthy corneas found progressive flattening from the center with 2–4 diopters, also nasal quadrants were flatter than temporal. There was a mirror-symmetry between the two eyes of each subject. The most common pattern was symmetrical bow tie – 32%, followed by asymmetric bow tie – 31,5%, oval – 16%, indeterminate form – 13% round – 7,5%. The quantitative analysis of the average corneal radius of curva-

ture was analyzed in millimeters to assist further correlation. In the vertical direction (the 3 mm region), the average corneal radius of curvature was $7,51\pm 0,33$ mm. Established minimum radius was 6,95 mm, and the maximum measured at 8,4 mm. The average horizontal value was $7,63\pm 0,28$ mm, maximum – 8, 16 mm, and the minimum – 7,1 mm. The mean difference of values was $0,16\pm 0,1$ mm, the maximum was 0,61 mm, and the minimum – 0 mm. From the results of optical coherence tomography the thinnest area of the cornea was located inferotemporally to the vertex and corneal thickness increases peripherally. Maximum, average and minimum central corneal thickness was respectively 615 μm , 556 ± 27 μm and 504 μm . Color coded OCT elevation maps showed that average radius of corneal curvature of 180° was $7,74\pm 0,25$ mm. The maximum measured value was 8.34 mm and the minimum – 7,18 mm. Along the meridian of 90° , the average measured radius was $7,41\pm 0,27$ mm. The maximum set value of the radius of corneal curvature on that meridian is 8,0 mm, and the minimum value was 6.76 mm. The mean difference in millimeters between the radii vertically and horizontally was $0,32\pm 0,18$ mm. The maximum discrepancy was 1.4 mm and the minimum is 0.1 mm. Correlation analysis showed similarity between the results, however elevation topography showed larger values than Placido-based method. The qualitative analysis of the images of laser scanning confocal microscopy demonstrated tightly adjacent to each other cells in the epithelium of pterygium, with the light gray cell bodies, dark borders and punctiform hyperreflective nuclei, as well as scattered goblet cells. At the level of subepithelium were detected microcysts. The stroma of the pterygium had mostly dense fibrovascular structure with a rich network of blood vessels filled with hyperreflective blood cells and infiltration of inflammatory cells into the surrounding tissue. In the epithelium and the stroma of pterygium we observed scattered inflammatory cells, predominantly dendritic. In some cases, those cells were so many, that they look like network of wires. At the level of corneal limbus in eyes with pterygium abnormal structure of palisades of Vogt was encountered, together with hyperreflective clusters and bright cells of presumed inflammatory origin. Furthermore morphological alterations at the level in the corneal stroma in eyes with pterygium was found as follows: mild haze of the structure and abnormal morphology of keratocytes. Stro-

mal corneal nerves were also altered including broken course, irregular caliber and foggy limits. Morphologic alterations of the sub-basal nerve plexus were also observed in relation to pterygium. Other changes included bright deposits at the level of the basal epithelial layer and hyperreflective spots in the surface epithelium, presumably corresponding to the clinically observed Fuchs' flecks. The basal epithelial cells are arranged in columnar fashion, and in some cases connective tissue of the stroma is surrounded by epithelium of normal morphology. At the level of the basal epithelium bright rounded deposits were encountered, and presumed to be melanin deposits. The quantitative analysis showed that the calculated density of the basal epithelial cells of the cornea of the patient with pterygium was 4678 ± 41 cells/mm², and of the control subjects was 6850 ± 38 cells/mm². The density of keratocytes of the anterior stroma was 424 ± 17 cells/mm² in the group of pterygium, these values were lower in comparison to the control subjects, 772 ± 25 cells/mm². The density of the keratocytes of the middle stroma was 301 ± 35 cells / mm I, and a posterior stroma – 291 ± 31 cells/mm², lower than the controls – 327 ± 24 cells/mm² and 305 ± 37 cells/mm², respectively. Endothelial density in the group with pterygium was 2121 ± 781 cells/mm², and in the healthy cornea – 2520 ± 361 cells/mm². Density of dendritic cells, found in the body of the pterygium was 115 ± 11 cells/mm², and in controls – 25 ± 12 cells/mm². Optical coherence tomography of pterygium showed a hyperreflective elevated mass on the cornea, which corresponds to clinically visible pterygium. Testing regimen and the resulting images allow precise examination of pterygium-cornea interface, and accurate measurement with manual caliper of the thickness of pterygium and residual stroma.

Conclusions: Placido-based corneal topography, optical coherence tomography and in vivo LSCM provide detailed, accurate and reproducible information about the optical and microstructural properties of the living cornea. The concept of combining them offers a comprehensive assessment of the cornea via precise measurement, better topographical and histological correlation of the cornea, This novel combination provides significant advantage in taking diagnostic and therapeutic decisions.

III. Цел и задачи

Цел

Основната цел на настоящата научна разработка е да бъдат използвани съвременни технологични методики за топографски и микроструктурен анализ на роговицата в норма и на тази база да бъде направена оценка на патологичните промени в роговицата при различни състояния и заболявания.

Задачи

1. Стандартизиране на топографските характеристики на роговицата на здравата българска популация
2. Анализ на топографските характеристики на роговицата в норма
3. Анализ на топографските характеристики при патология
4. Стандартизиране на микроструктурните характеристики на роговицата на здравата българска популация
5. Анализ на микроструктурните характеристики на роговицата в норма
6. Анализ на микроструктурните характеристики на роговицата при някои патологични състояния

IV. Материал и методи

За постигане на целите и задачите на проучването е използван широк спектър от научни и практически методи, включващи: класически и специални обективни методи, специфични съвременни методики за оценка на топографията и микроструктурата на роговицата. В проучването са включени общо 240 очи на 149 индивиди, които са разделени в две големи групи. Група I включва здрави роговици (норма) – 170 очи на 85 индивиди на средна възраст 51 ± 3 г. (40 жени, 45 мъже), без системни или очни заболявания, нетретирани оперативно и/или медикаментозно, носещи контактни лещи, BCVA ≥ 1.0 . Очите от група I са разделени на следните подгрупи:

Група I А: 100 очи на 50 индивиди са изследвани с Плачидо-базирана роговична топография

Група I Б: 170 очи на 85 индивиди са изследвани с предноsegmentна оптична кохерентна томография

Група I В: 70 очи на 70 индивиди са изследвани с лазер сканираща конфокална микроскопия

В група II са включени 70 очи на 64 пациенти с птеригиум (58 с едностранен, 6 с двустранен; 29 жени, 35 мъже). Критериите, по които са подбрани, са липса на очни оперативни интервенции и патология, употреба на топикални офталмологични медикаменти и/или контактни лещи. Взето е писмено информирано съгласие от участниците, а всички изследвания са проведени при едни и същи условия. За контроли са използвани очите от група I Б и група I В.

Всички очи с птеригиум са изследвани чрез:

1 – лазер сканираща конфокална микроскопия на живо (HRT3-RCM)

2 – предноsegmentна оптична кохерентна томография OCT-3D Topcon 2000 (в два последователни дни).

Материал и методика при определяне на топографските характеристики на роговицата при здрави индивиди

Изследвани са 100 очи на 50 здрави индивиди на средна възраст 52 ± 3 г., от които 26 жени и 24 мъже. Пациенти с известни системни или очни заболявания, третирани оперативно, употребяващи системни или локални медикаменти, както и носещи контактни лещи, са изключени от проучването. Максималното рефрактивно отклонение, установено при предварителните прегледи, е миопия до $-3,0$ d sph, хиперметропия до $+2,0$ d sph, астигматизъм до $\pm 1,0$ d cyl. Зрителната острота с корекция е $\geq 1,0$.

Всеки участник е информиран подробно за целта на проучването, липсата на риск и неприятни усещания и е преминал предварително пълен очен преглед. Всички изследвани са инструктирани за няколкократно пълни премигвания непосредствено преди извършване на всяко от изследванията.

Роговична топография

Роговичната топография е осъществена с Плачидо-базирана методика – апарат CSO (CM02/CM-P02, EyeTop 2005) (Фиг. 1). Апаратът е с голям диск на Плачидо с 24 пръстена и 92 мм работна дистанция. Видеокамерата е висококачествена CCD 1/3 с 320.000 пиксела и FireWire връзка с 25 fps processed; обработените изображения са с резолюция 768 x 576 пиксела.

CSO CM02/ CMP02 топографът притежава софтуер, който позволява:

- осъществяването на пълен анализ на вълновия фронт с декомпозиция на полиномите на Zernike;
- анализ на керато-рефрактивните индекси на роговицата;
- обобщение на качеството на зрение;
- симулиране на поставена контактна леща с менажиране на предпочитаната контактна леща;
- осъществяване на директна връзка с ексимерен лазер.

Процесът на получаване на изображения е усъвършенстван, като се използва алгоритъм за най-добър фокус с цел редуциране на грешките и висока точност на кератоскопичната картина. Това повишава производителността и акуратността при обработката на роговични повърхности с малка кривина, както и при торичните такива. Наличен е и редактор за реконструкция на пръстените на Плачидо, полезен при роговици с неправилна кривина. Роговичните карти могат да бъдат axial и instantaneous. Скалите, които могат да се използват, са absolute, normalized или adjustable. Кривината на роговичната повърхност се представя в милиметри или диоптри, а асферичността в p , e , Q , SF .

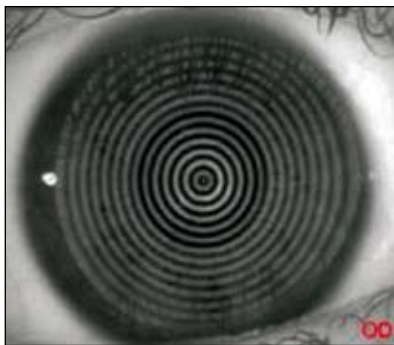
Апаратът има възможност за използване на инфрачервен бинокуларен пупилотричен модул (СМР/02), който позволява динамично измерване на размера на зеницата при скотопични, мезопични и фотопични светлинни условия. Софтуерът може да оцени децентрацията на зеницата спрямо корнеалния апекс при различни условия на осветеност и положението на зеничния център при дилатация. Възможно е също тези измервания да бъдат приложени при изчисляването на роговичния OPD (или WFE) и да се покаже положението на зеницата, насложено върху различните топографски карти или симулация на напасване на контактни лещи.



Фигура 1. CSO корнеален топограф (CM02/CM-P02, EyeTop 2005)

Всяко изследване е извършено при следване на стандартен протокол от един изследовател. С цел намаляване влиянието на субективни и биологични фактори върху роговичния хистерезис всички изследвания са осъществени в едно помещение, при еднаква температура на въздуха, в един и същ времеви диапазон на деня – между 10 и 12 часа.

След нагласяне на оптимална височина на апарата пациентът е инструктиран да постави брадата върху подбрадника и да опре челото в приставката, след което насочва погледа на изследваното око към зелената фиксационна точка в центъра на хемисфера с пръстени на Плачидо (Фиг. 2). Изследователят центрира изображението на роговицата на зрителната ос и прави три последователни топографии. Най-качественото изображение при първична обработка е запаметено за допълнителен софтуерен анализ и изготвяне на цветно кодирана рефрактивна топографска карта на предната роговична повърхност.



Фигура 2. Пръстени на Плачидо, отразени от роговичната повърхност

Със студените цветове са кодирани по-плоските зони на роговицата, съответстващи на ниски диоптри. Червената цветова гама съответства на най-стръмната част с висока диоптрична сила. Цветната скала е избрана със стъпка 1.0 D с цел постигане на по-добра илюстративност на отклоненията.

На топографските изображения е измерен радиусът на кривина на роговицата в 7 500 точки в 3 мм, 5 мм и 7 мм зона. Цветните топографски карти са анализирани и класифицирани като симетрична папийон-

ка, несиметрична папийонка, обла форма, кръгла форма и неопределена форма, която не подлежи на категоризация по горните критерии. При класифицирането на картите е взета под внимание и локализацията.

Оптическа кохерентна томография

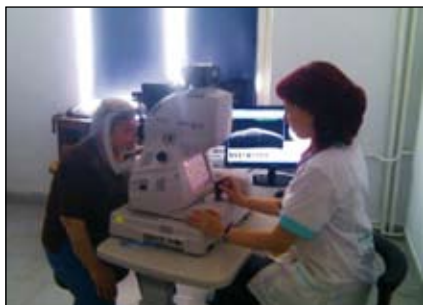
Оптическата кохерентна томография е осъществена с OCT-3D Topcon 2000, който е Spectral Domain оптичен кохерентен томограф (Фиг. 3).



Фигура 3. 3D Topcon 2000 – оптичен кохерентен томограф, използван в научната разработка

Латералната резолюция на апарата е $\leq 20 \mu\text{m}$, а резолюцията в дълбочина е 5–6 μm . Дистанцията на изследване с предносегментната приставка на апарата е 63,7 mm, скоростта е 27 000 А-скана в секунда при обхват 6x6 mm, а дълбочината на скана е 2,3 μm . Светлинният източник е супер луминесцентен диод (SLD) с дължина на вълната 840 nm, полуширина на снопа 50 nm.

Всеки субект е изследван от един и същ екзаминатор по стандартизиран протокол. След нагласяне на оптимална височина на апарата изследваният поставя брадата върху подбрадника и опира челото в приставката, след което насочва погледа на изследваното око към фиксационна точка (Фиг. 4).



Фигура 4. Изследване на пациент с 3D Topcon 2000 OCT

Осъществени са 12 радиални (1024 A line) и 3D (6x6 mm, 512x128) сканове на роговицата на двете очи. Центрацията при всяко изследване е на зрителната ос. Роговичните дебелини са измерени и представени като цветно кодирани карти, които са анализирани и класифицирани по модел като обла, овална, децентрирано обла и децентриран овал.

Кривината на роговицата също е представена като цветно кодирана карта с използване на референтни меридиани на радиус на кривина: вертикален (на 90°) и хоризонтален (на 180°).

Стойностите от предносегментната оптична кохерентна томография, както и разликите между двата основни меридиана са сравнени с кореспондиращите стойности от роговичната топография.

Материал и методика при изследване на пациенти с птеригиум

64 пациенти с птеригиум, от които 58 с едностранен и 6 с двустранен птеригиум, са проспективно подбрани от Специализирана болница по очни болести за активно лечение – Варна. За контроли са подбрани пациенти със сходно разпределение по пол и възраст (очите от група I Б и I В). Пациентите са посетили болницата по повод операция на птеригиума, профилактичен преглед или рефрактивно отклонение. Субектите са поканени да участват в проучването при условие, че имат навършени 18 години. Критериите за участие в проучването включват липса на очни оперативни интервенция, настояща или мина-

ла дългосрочна употреба на топикални офталмологични медикаменти, предходна или активна очна патология (различна от рефрактивна грешка), както и употреба на контактни лещи. Приемът на системни медикаменти не е взет предвид при включване в проучването, освен ако те не са с известен ефект върху роговицата или предния очен сегмент. Всички субекти са преминали предварително пълен очен преглед, включващ детайлна биомикроскопия на голямо увеличение и за изключване на роговични заболявания (с изключение на птериgium за съответната целева група) преди включване в проучването.

Писмено информирано съгласие е изискано от всички участници след подробно разясняване естеството на проучването, използваните методи и очакваните резултати, липсата на риск и неприятни усещания. Всички изследвани са инструктирани за няколкократно пълни премигвания непосредствено преди извършване на всяко от изследванията.

Изследваните очи с птериgium са $n = 70$, контролните очи са $n = 70$, подбирани на случаен принцип (ляво/дясно). Всички очи са изследвани при температура на въздуха 21°C от един екзаминатор, в едно помещение, по едно и също време на деня (между 10 и 12 ч.) с цел намаляване на субективни и биологични фактори, които влияят на роговичния хистерезис и биха компрометирали резултатите. Всички очи са изследвани чрез лазер сканираща конфокална микроскопия на живо и чрез предно-сегментна оптична кохерентна томография в два последователни дни.

Изследване с лазер сканираща конфокална микроскопия на живо

Лазерната конфокална микроскопия на живо е извършена на всички субекти с птериgium и на контролните субекти с ново поколение лазерен конфокален микроскоп HRTIII-RCM (Heidelberg Retina Tomograph III - Rostock Cornea Module, Heidelberg Engineering GmbH, Germany). Работата на микроскопа е базирана на диоден лазер от клас I ($\lambda = 670 \text{ nm}$), резолюцията е $1 \mu\text{m}$ и $4 \mu\text{m}$ (съответно латерална и вертикална), увеличението е до 800 пъти.

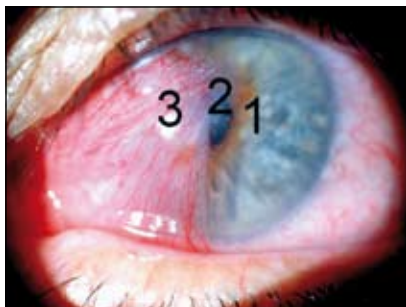
При изследването е приложен гел (Cornegel, Bausch&Lomb GmbH, Germany) като свързващ агент между апланационната шапка и лещата на обектива. Окото е анестезирано с една капка Alcaïn (0,5%

collyr, Alcon), след което е въведен Томо-Сар към роговицата. Пациентът е поставен срещу апарата така, че брадата и челото да са поставени в съответните им позиции (Фиг. 5).



Фигура 5. Изследване на пациент с лазер сканираща конфокална микроскопия на живо (HRTIII-RCM)

Обективът на микроскопа е доближен до окото до постигане на контакт с очната повърхност, позицията на окото е наблюдавана чрез камера от страни на обектива. Изследвана е централната част на роговицата при всички контролни очи. На очите с птеригиум са изследвани три зони (Фиг. 6): 1 – чистата роговица, необхваната от птеригиума; 2 – границата между главата на птеригиума и прилежащата незасегната роговица; 3 – тялото на птеригиума.



Фигура 6. Таргетни участъци за изследване с лазер сканираща конфокална микроскопия на живо: 1 – чиста роговица, необхваната от птеригиума; 2 – граница между главата на птеригиума и прилежащата незасегната роговица; 3 – тяло на птеригиума

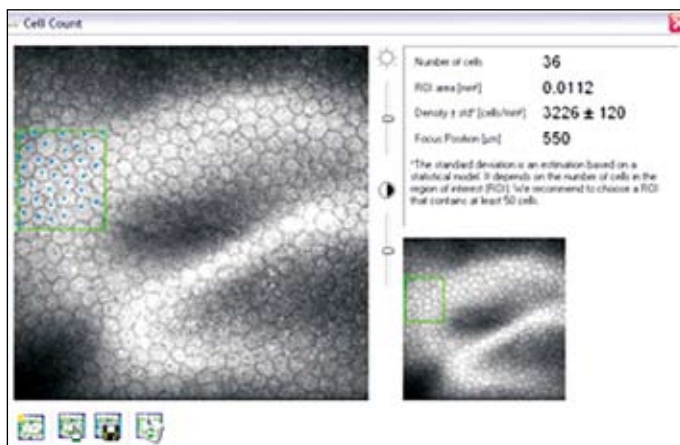
Апаратът е настроен да сканира в режим section, при който се правят срезове с ръчен контрол на дълбочината на сканиране.

Качествените снимки (без артефакти от движение и компресионни линии) от различните роговични слоеве са селектирани за последващ качествен и количествен анализ. За целите на количествения анализ клетките са преброени с помощта на вградения софтуер на апарата. Изчислена е гъстотата на клетките от следните роговични слоеве: базален епител, предна, средна и задна строма, ендотел, както и дендритни клетки. Данните са представени като гъстота на клетките ($\text{кл}/\text{мм}^2$) \pm SD.

За изображение на предната строма са приети първите три ясни снимки на стромални кератоцити, които са получени непосредствено след визуализирането на Баумановия слой на роговицата. Задната строма е дефинирана като първите три ясни и качествени снимки на строма, получени непосредствено пред Десцетовата мембрана. За средна строма се приемат поредица от три чисти изображения на стромата на еднакво разстояние зад Баумановата и пред Десцетовата мембрана при изследване на цялата дебелина на роговицата. Z-дистанцията (вертикалното разстояние) между трите снимки от серия е средно 2 μm . Средната плътност на клетките е изчислена като $\text{кл}/\text{мм}^2$, а не като обемна плътност ($\text{кл}/\text{мм}^3$), тъй като се търси клетъчна плътност на определена дълбочина на слоя.

След като е определена подходящата дълбочина на изследване, се определя и желаната таргетна зона. Не е възможно да бъдат изброени всички клетки от дадено изображение, затова при последващия количествен анализ се подбира срединна зона от снимката с възможно най-малко артефакти – ROI (region of interest), и следва мануално изброяване на клетки с „point-and-click“ софтуер. Не се маркират клетки, чиито стени се докосват до долната и до лявата стена на таргетното поле (за да се избегне хиперпреброяване и грешка при изчисляване на плътността). Маркират се всички останали цели клетки, както и половинки, прилежащи към горната и дясната стена на ROI-полето. За по-голяма достоверност на резултатите е препоръчително броят на изброените клетки от таргетната зона ROI да надвишава 50. При необходимост се използват техники за обработка на изображението с

усилване или намаляване на контраста или осветеността с цел подобряване визуализирането на границите на клетките и улесняване на маркирането им (Фиг. 7).



Фигура 7. Полуавтоматично клетъчно изброяване и изчисляване на плътността на ендотелни клетки

Изследване с оптична кохерентна томография

Оптичната кохерентна томография е осъществена с ОСТ-3D Торсон 2000. Латералната резолюция на апарата е $\leq 20 \mu\text{m}$, а резолюцията в дълбочина е 5–6 μm . Дистанцията на изследване с предносегментната приставка е 63,7 mm, скоростта е 27 000 А-скана в секунда при обхват 6x6 mm.

Субектите са изследвани от един и същ екзаминатор по стандартизиран протокол. Височината на апарата е нагласена спрямо пациента, който е инструктиран да постави лицето си срещу апарата така, че брадата и челото да са поставени в съответните им позиции, и да насочи погледа си към фиксационната точка след неколкократно пълни премигвания (Фиг. 8).



Фигура 8. Изследване на пациент с OCT-3D Topcon 2000

На всяко изследвано око са осъществени последователно 12 радиални 6 мм сканове (режим Radial, 1024 A line) и триизмерни (режим 3D, с размер на полето 6x6 mm, 512x128) сканове на роговицата на двете очи. Всяко изследване е извършено при центриране на зрителната ос (Фиг. 9, фиг. 10).

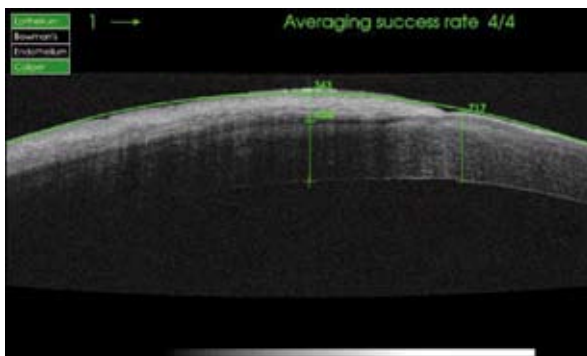


Фигура 9. Предносегментна оптична кохерентна томография: центриране на зрителната ос при извършване на 3D сканиране на роговицата на контролен субект



Фигура 10. Предносегментна оптична кохерентна томография: центриране на зрителната ос при извършване на радиално сканиране на роговицата на око с птеригиум

Роговичните дебелини са измерени и представени като цветно кодирани карти, на които е изчислена автоматично централната роговична дебелина. Дебелината на незасегнатата от птеригиум роговица, дебелината на самия птеригиум, както и на остатъчната под него роговична тъкан е измерена ръчно с калипера на апарата (Фиг. 11).



Фигура 11. Предноsegmentна оптична кохерентна томография (аксиален В-скан) на роговица с птеригиум: дебелината на незасегнатата от птеригиум роговица, дебелината на самия птеригиум, както и на остатъчната под него роговична тъкан е измерена ръчно с калипера на апарата. Кривината на роговицата също е представена като цветно кодирана карта с представен вертикален (на 90°) и хоризонтален (на 180°) радиус на кривина

Статистически анализ

С цел по-лесното и качествено проследяване на пациентите набраните данни са въведени в табличен вид в Microsoft Excel, версия 2003 (Microsoft Inc, Redmond WA). Всеки случай е въведен на отделен ред, а стойностите на измерваните параметри са подредени в колони. На първия ред на всяка колонка е въведено наименованието на въвежданата в нея информация. Така се постига значително ускоряване процеса на подреждане и групиране на информацията и нейното онагледяване с директно получаване на информация за честотата на произволно търсена характеристика. Съхранението на информацията в Excel таблица осигурява лесното опресняване на вече въведената информация, бързото въвеждане на нови случаи и предоставя лесна възможност за експортиране на набраната информация към специализирана програма за база данни, когато нуждата от това се появи. Статистическият анализ е извършен чрез програмния пакет SPSS, версия 13.0 (SPSS Inc., Chicago IL). Като статистически значими се приеха всички стойности с $P < 0,05$.

V. Резултати

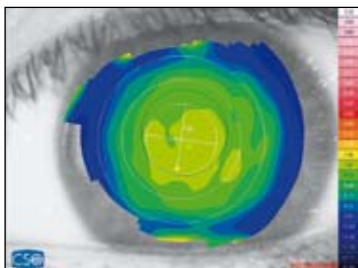
Резултати – група IA

Изследване с CSO Плачидо-базиран роговичен топограф

С помощта на CSO Плачидо-базирана роговична топография са изследвани 100 очи на 50 здрави индивиди (група IA), средна възраст 52 ± 3 г., без системни или очни заболявания, нетретирани оперативно и/или медикаментозно, неносещи контактни лещи, с BCVA ≥ 1.0

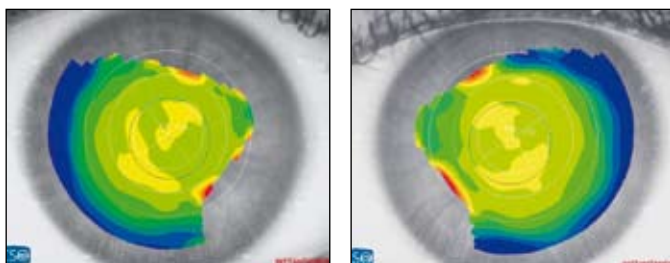
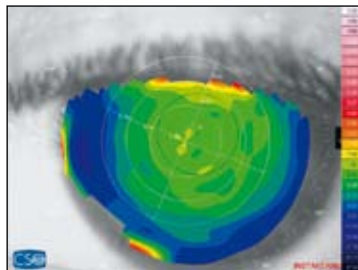
При анализа на цветно кодираните топографски изображения на здравите роговици се вижда прогресиращо оплоскостяване от центъра към периферията с 2–4 диоптъра (Фигура 12). Назалните квадранти са по-плоски от темпоралните (Фигура 13). Налице е огледална симетрия между двете очи на всеки изследван (Фигура 14). В 63,5% от изображенията се наблюдава характерна находка тип „папийонка“ (Фигура 15).

При качествения анализ на Плачидо-базираната роговична топография цветно кодираните топографски изображения бяха класифицирани по форма (по Vogan) като кръгла, овална, симетрична папийонка, несиметрична папийонка и неопределена форма. Най-разпространеният модел е симетрична папийонка – 32%, следван от несиметрична папийонка – 31,5%, овална форма – 16%, неопределена форма – 13%, кръгла – 7,5%. Оста в повечето случаи е вертикално ориентирана, т.е. стръмният роговичен меридиан е около вертикалния и повечето изследвани роговици притежават известна степен астигматизъм „по правилото“.

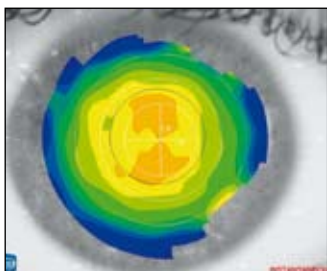


Фигура 12. Топография на нормална роговица: прогресиращо оплоскостяване от центъра към периферията

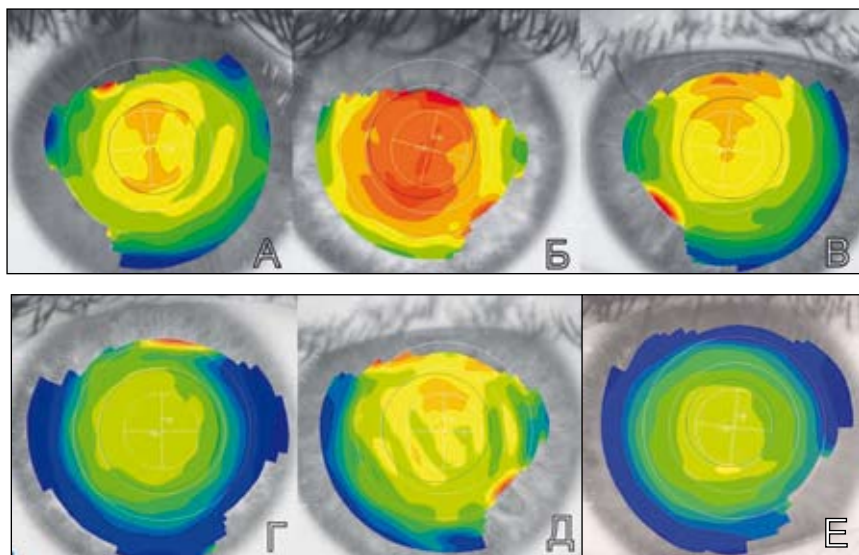
Фигура 13. Топография на нормална роговица: назалните квадранти са по-плоски от темпоралните



Фигура 14. Топография на нормална роговица: огледална симетрия между двете очи на всеки изследван



Фигура 15. Топография на нормална роговица: находка тип „лапийонка“



Фигура 16. Класификация на топографските модели:

А – симетрична папийонка, Б и В – несиметрична папийонка,
Г – овална форма, Д – неопределена форма, Е – кръгла форма

Средният радиус на кривина на роговицата е анализиран в милиметри за ефективно търсене на корелация. По вертикалата в 3 мм зона средният радиус на кривина на роговицата е $7,51 \pm 0,33$ mm. Минималният установен радиус е 6,95 mm, а максималният измерен е 8,4 mm. Средната стойност по хоризонталата е $7,63 \pm 0,28$ mm, максималната – 8,16 mm, а минималната – 7,1 mm. Средната разлика на стойностите е $0,16 \pm 0,1$ mm, максималната е 0,61 mm, а минималната – 0 mm (Таблица 4).

Таблица 4. Радиуси на кривина на роговицата в 3 мм зона на Плачидо-базирана топография

| Плачидо-базирана роговична топография | Среден радиус на кривина | Максимален радиус на кривина | Минимален радиус на кривина |
|---------------------------------------|--------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| По хоризонтала в 3 мм зона | 7,63±0,28 мм | 8,16 мм | 7,1 мм |
| По вертикала в 3 мм зона | 7,51±0,33 мм | 6,95 мм | 8,4 мм |

Резултати – група I Б

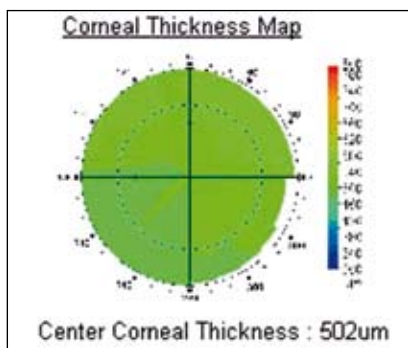
Изследване с предносегментна оптична кохерентна томография

Група I Б включва 170 очи на 85 индивиди, които са изследвани с предносегментна оптична кохерентна томография – 3D Topcon 2000. Според цветно кодираните пахиметрични роговични карти от предносегментната оптична кохерентна томография най-тънката област на роговицата е разположена инферотемпорално спрямо вертекса, което е прието за норма от повечето проучвания (Фиг. 17). Роговицата увеличава плавно дебелината си към периферията. Максималната дебелина на роговицата централно (ССТ) е 615 μm . Средната измерена стойност на ССТ е 556±27 μm . Минималната корнеална дебелина в централната зона при този метод е 504 μm .

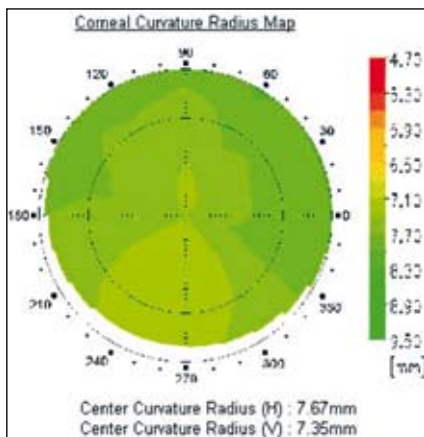
На цветно кодираните елевационни роговични карти на OCT средната стойност на радиуса на роговична кривина на 180° е 7,74±0,25 мм (Фиг. 18). Максималната измерена стойност е 8,34 мм, а минималната – 7,18 мм. По меридиана на 90° средният измерен радиус е 7,41±0,27 мм. Максималната установена стойност на радиуса на роговична кривина по този меридиан е 8,0 мм, а минималната стойност е 6,76 мм. Средната разлика в милиметри между стойностите на радиусите по вертикала и хоризонтала е 0,32±0,18 мм. Максималната установена разлика е 1,4 мм, а минималната е 0,1 мм.

Таблица 5. Радиус на роговичната кривина на ОСТ-картите на роговичната кривина

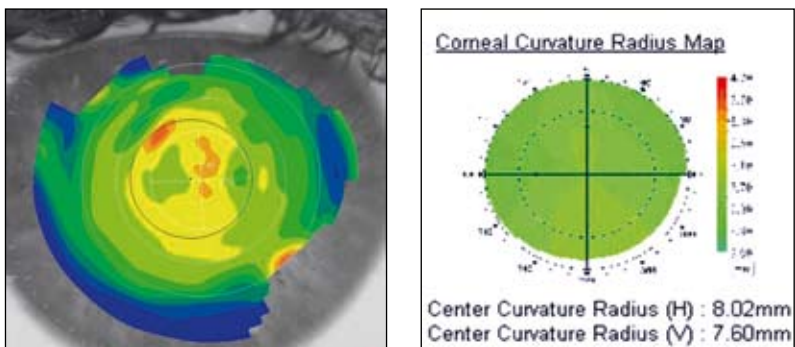
| ОСТ Карта на роговичната кривина | Радиус на роговична кривина на 180° | Радиус на роговична кривина на 90° |
|--|--|---------------------------------------|
| Средна стойност | 7,74±0,25 мм | 7,41±0,27 мм |
| Максимална измерена стойност | 8,34 мм | 8,0 мм |
| Минимална измерена стойност | 7,18 мм | 6,76 мм |



Фигура 17. Цветно кодирана пахиметрична карта на здрава роговица



Фигура 18. Цветно кодирана карта на роговичната кривина



Фигура 19. Плачидо-базирана топография VS OCT-елевационна топография на един и същ пациент

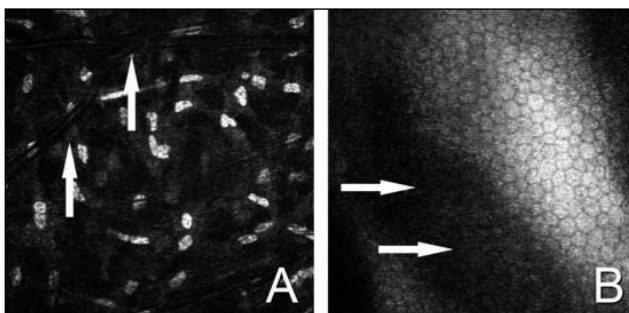
Резултати – група I B

Изследване с лазер сканираща конфокална микроскопия на живо на здрава роговица

Група I B включва 70 очи на 70 индивиди, които са изследвани с лазер сканираща конфокална микроскопия на живо (HRT3 Rostock Corneal Module). При изготвения качествен и количествен анализ на изображенията са получени следните резултати:

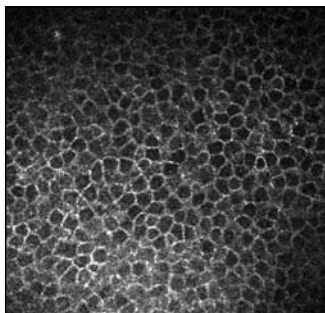
Качествен анализ

При изследванията сравнително често се наблюдават нежелани апланационни артефакти (Фиг. 20), които могат да бъдат избегнати чрез дозирано и контролирано намаляване на апланационното налягане при изследването на роговицата. Нито едно от крайно анализирания изображения няма резидуални апланационни стрии.

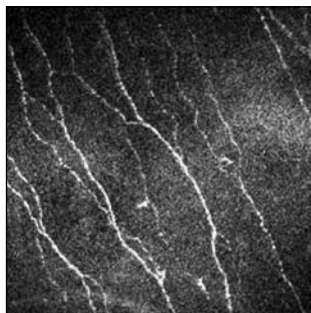


Фигура 20. Апланационни артефакти на изображения на конфокална микроскопия

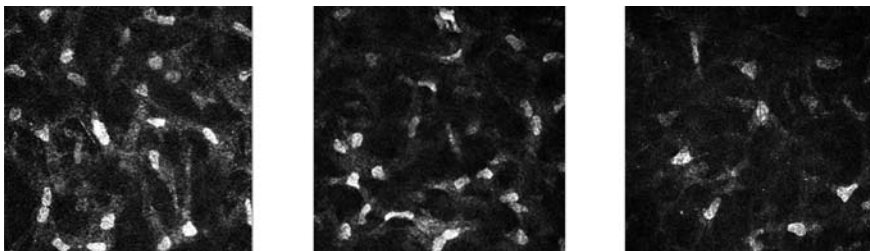
Базалният епител се визуализира като еднородни тъмни клетки със светли граници (Фиг. 21). Суббазалните роговични нерви прилежат към базалния епител и са със средно изразена рефлексивност, прав ход, с ясни граници (Фиг. 22). Ядрата на кератоцитите се визуализират като разнородни морфологично структури с изразена хиперрефлексивност, на тъмен фон. Кератоцитите от предна и задна строма имат различен вид на конфокална микроскопия: ядрата на предностромалните кератоцити са по-малки в сравнение със задностромалните. Освен това те имат леко елиптична форма и стават по-издължени към периферията (Фиг. 23). Стромалните роговични нерви също се визуализират като хиперрефлексивни структури – с ясни граници и прав ход (Фиг. 24).



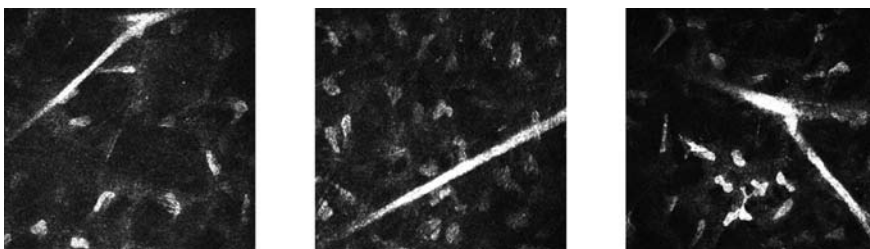
Фигура 21. Конфокална микроскопия на базален епител на роговицата



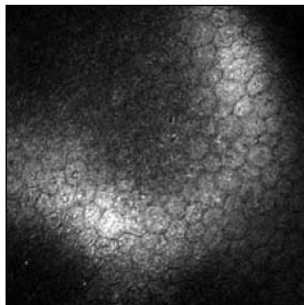
Фигура 22. Конфокална микроскопия на суббазални нерви



Фигура 23. Конфокална микроскопия на роговична строма – предна, средна, задна



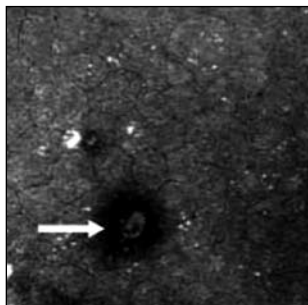
Фигура 24. Конфокална микроскопия на стромални роговични нерви



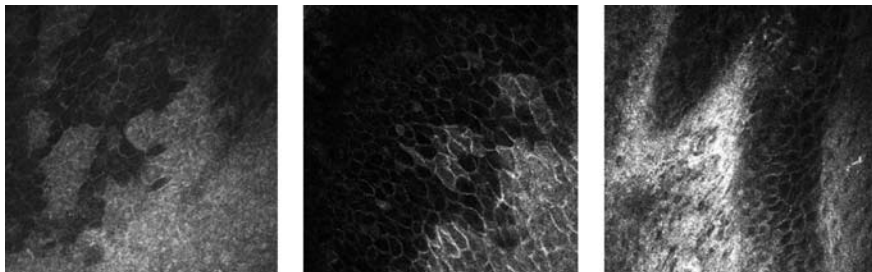
Фигура 25. Конфокална микроскопия на роговичен ендотел

На конфокалната микроскопия ендотелът се визуализира като мозайка от хексагонални светли клетки с тъмни граници (Фиг. 25). Единични роговични брадавички са намерени в централната част на ендотела при трима пациенти, без асоцииран оток на роговицата. Пациентите са на възраст 54, 62 и 55 г., от женски пол. Роговичните

брадавички се визуализират като окръглени образувания, обградени от по-тъмен пръстен на нивото на ендотела (Фигура 26). Лимбалната зона също ясно се визуализира като преходна зона между конюнктивния и роговичния епител, както и палисадите на Vogt (Фиг. 27).



Фигура 26. Роговични брадавички в ендотела (бяла стрелка)



Фигура 27. Конфокална микроскопия на лимб

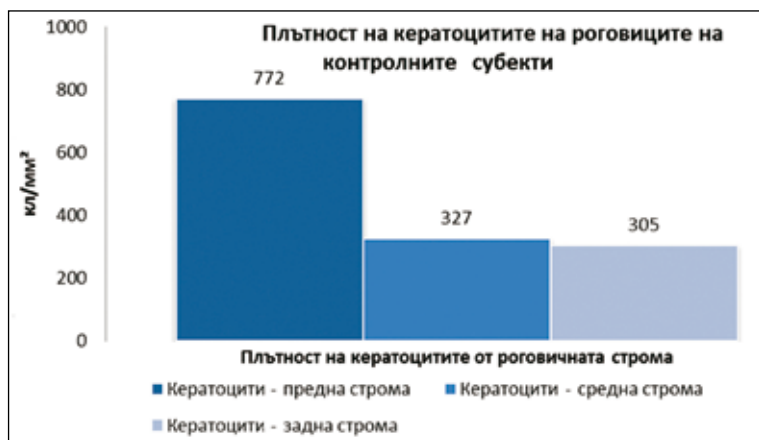
Количествен анализ

Изчислената гъстота на базалните епителни клетки на роговицата на контролните субекти е 6850 ± 381 кл/мм².

Плътноста на кератоцитите от предната строма на контролните субекти е 772 ± 25 кл/мм², от средната строма е 327 ± 24 кл/мм², от задната строма – 305 ± 37 кл/мм². Гъстотата на ендотелните клетки е 2520 ± 361 кл/мм², а на дендритните клетки в назална конюнктивна – 25 ± 12 кл/мм².

Таблица 6. Плътност на клетките (кл/мм²) на роговиците на здравите субекти

| | Плътност на клетки – здрави субекти |
|----------------------------|-------------------------------------|
| Базални епителни клетки | 6850±381 кл/мм ² |
| Кератоцити – предна строма | 772±25 кл/мм ² |
| Кератоцити – средна строма | 327±24 кл/мм ² |
| Кератоцити – задна строма | 305±37 кл/мм ² |
| Ендотел | 2520±361 кл/мм ² |
| Дендритни клетки | 25±12 кл/мм ² |



Фигура 28. Плътност на кератоцитите на роговиците (кл/мм²) на здравите субекти – намаляване на кератоцитната гъстота от предна към задна строма

Конфокална микроскопия на птериgium

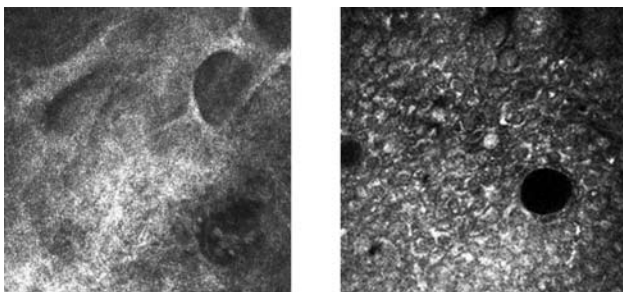
Качествен анализ

На изображенията на лазер сканираща конфокална микроскопия на епитела на птериgiumа се визуализират плътно прилежащи една

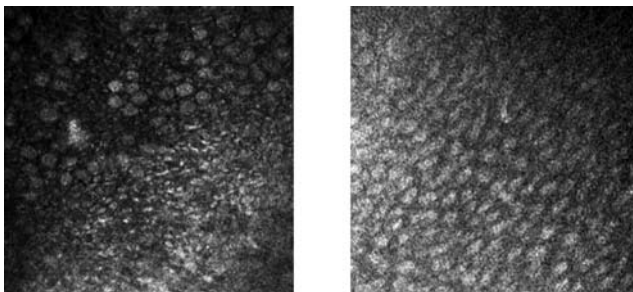
към друга клетки със светлосиви клетъчни тела, тъмни граници и пунктиформени хиперрефлексивни ядра. Наблюдават се също микрокисти в субепитела на птеригиума, с хипорефлексивно съдържимо и хиперрефлексивни гладки стени (фигура 29).

На нивото на епитела на птеригиума са наблюдавани пръснати чашковидни клетки – едри хиперрефлексивни клетки с овална форма (Фиг. 30).

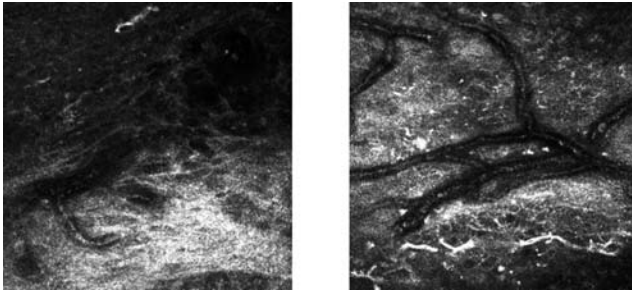
Стромата на птеригиума има предимно плътна фиброваскуларна структура с богата мрежа от кръвоносни съдове, изпълнени с хиперрефлексивни кръвни клетки и на места инфилтрация от възпалителни клетки в обграждащата кръвоносните съдове тъкан (Фиг. 31, 32, 33).



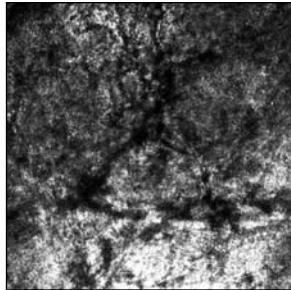
Фигура 29. Микрокисти в субепитела на птеригиума с хипорефлексивно съдържимо и хиперрефлексивни гладки стени



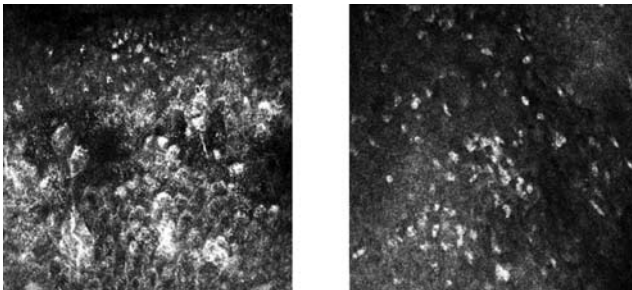
Фигура 30. Пръснати чашковидни клетки – едри хиперрефлексивни клетки с овална форма на нивото на епитела на птеригиума



Фигура 31. Конфокална микроскопия на строма на птеригиум



Фигура 32. Аморфна структура на съединителната тъкан

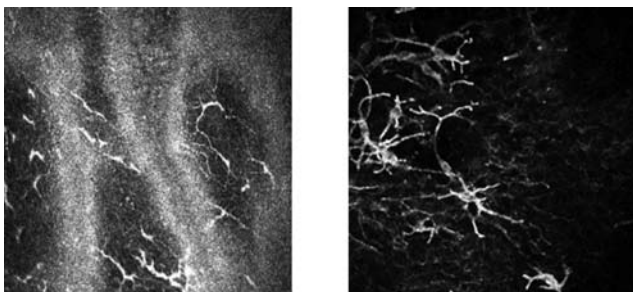


Фигура 33. Възпалителни клетки – ярки окръглени хиперрефлексивни клетки

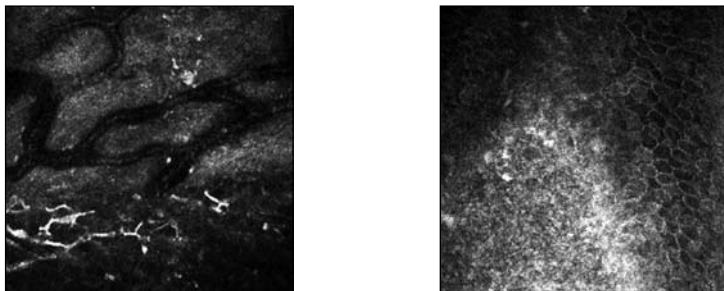
В епитела на птеригиума се наблюдават пръснати възпалителни клетки, предимно дендритни клетки. Множеството от тях имат типичната дендритна форма с разклонения. В някои случаи броят на дендритните клетки е толкова голям, че те изглеждат като мрежа от жички (Фиг. 34).

Интересен факт е, че дендритни клетки са открити и в по-дълбоките слоеве на птеригиума, където същите притежават подобна характерна форма (Фиг. 35).

В областта на лимба в роговиците с птеригиум е установена нарушена структура на палисадите, хиперрефлексивни струпвания и ярки клетки от предполагаем възпалителен произход (Фиг. 36).



Фигура 34. Дендритни клетки в епитела (вляво) и в стромата (вдясно) на птеригиума



Фигура 35. Дендритни клетки около съдовете в стромата на птеригиума

Фигура 36. Конфокална микроскопия на лимб в роговица с птеригиум

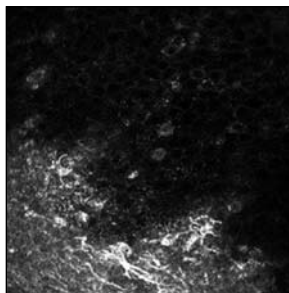
Количествен анализ

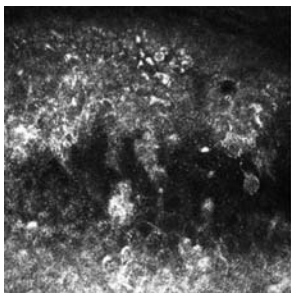
Плътноста на откритите в тялото на птеригиума дендритни клетки е 115 ± 11 кл/мм². Тази стойност е по-висока от установената в назалната булбарна конюнктива на здравите очи гъстота на дендритните клетки, която е 25 ± 12 кл/мм².

Изследване с лазер сканираща конфокална микроскопия на границата с чиста роговица

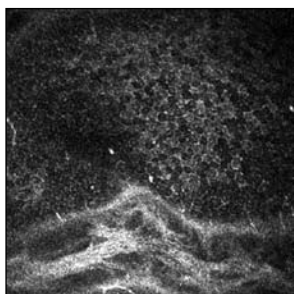
Интересна находка е открита на границата между тъканта на главата на птеригиума и чистата роговица. Там са наблюдавани разпръснати клъстери от хиперрефлексивни клетки на нивото на базалния епителен слой, за които се предполага, че кореспондират с клинично видимите т. нар. петна на Фукс (Fuchs' flecks). (Фигура 37) На самата граница птеригиум-роговична тъкан в някои случаи базалните епителни клетки са с изменена форма и подредени колонообразно (Фигура 38), а в други случаи съединителната тъкан на стромата на птеригиума граничи с базален роговичен епител с видимо нормална морфология (Фигура 39).

Фигура 37. Граница птеригиум – роговица: клъстери от хиперрефлексивни клетки на нивото на базалния епителен слой, за които се предполага, че кореспондират с клинично видимите петна на Фукс





Фигура 38. Граница птеригиум – роговица: базални епителни клетки с изменена форма и подредени колонообразно



Фигура 39. Граница птеригиум – роговица: съединителната тъкан на стромата на птеригиума граничи с базален роговичен епител с видимо нормална морфология

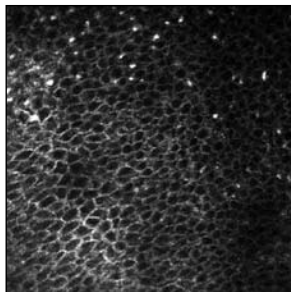
Изследване с лазер сканираща конфокална микроскопия на прилежащата към птеригиума незасегната роговица

Качествен анализ

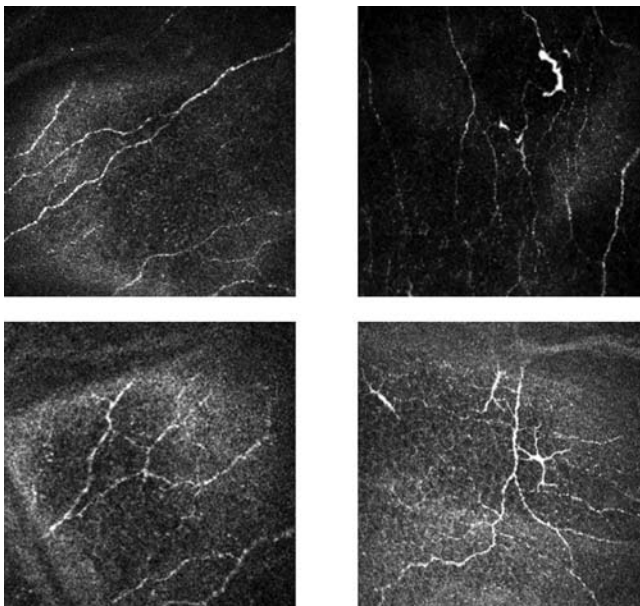
В роговиците с птеригиум е установена нарушена морфология на суббазалните нерви, също така хиперрефлексивни депозити на ниво базален епител и петна с повишена рефлексивност в повърхностния епител, отговарящи на клинично намерените Fuchs' flecks.

На нивото на базалния епител на роговицата са наблюдавани пръснати ярки окръглени депозити, за които се предполага, че са меланинови отложения, хистологично доказани от други изследователи (Фигура 40).

Фигура 40. Базален епител на неза-
сегната роговица в съседство с пте-
ригиума: пръснати хиперрефлектив-
ни депозити, вероятно от меланин

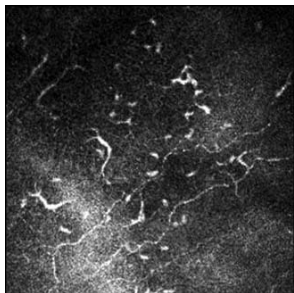


В роговиците на очите с птеригиум са наблюдавани морфологични
изменения на суббазалните нерви – неравномерна дебелина с локални
задебелявания, начупвания, повишен тортуозитет, локални бримки и
неправилен ход (Фигура 41).



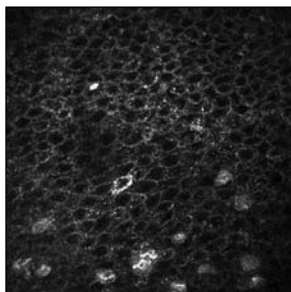
Фигура 41. Морфологични изменения на суббазалните нерви
на роговиците с птеригиум

В някои от очите са наблюдавани множество дендритни клетки с характерна морфология на нивото на суббазалния нервен плексус (Фигура 42).



Фигура 42. Дендритни клетки около суббазалните нерви в роговица с пterygium

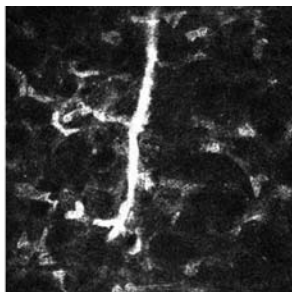
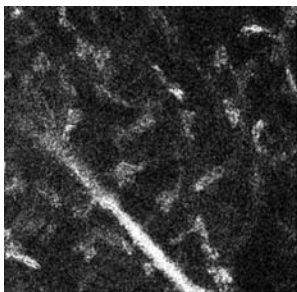
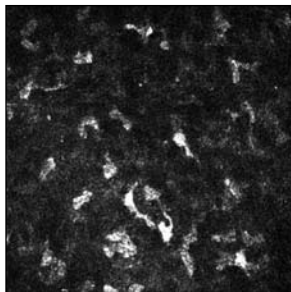
В епителния слой на роговицата в съседство с пterygium в множество от очите са наблюдавани чашковидни клетки – едри хиперрефлексивни овални клетки, неравномерно разпръснати (Фигура 43).



Фигура 43. Чашковидни клетки в епителния слой на роговица с пterygium

Наблюдавани са и изменения на нивото на стромата в роговиците с пterygium – леко замъгляване на структурата, както и нарушена морфология на кератоцитите (Фигура 44). Стромалните роговични нерви също са с изменен вид – начупен ход, неравномерен калибър, както и воалирани граници (Фигура 45).

Фигура 44. Строма на пациент с птеригиум – замъглена, нарушена морфология на кератоцитите



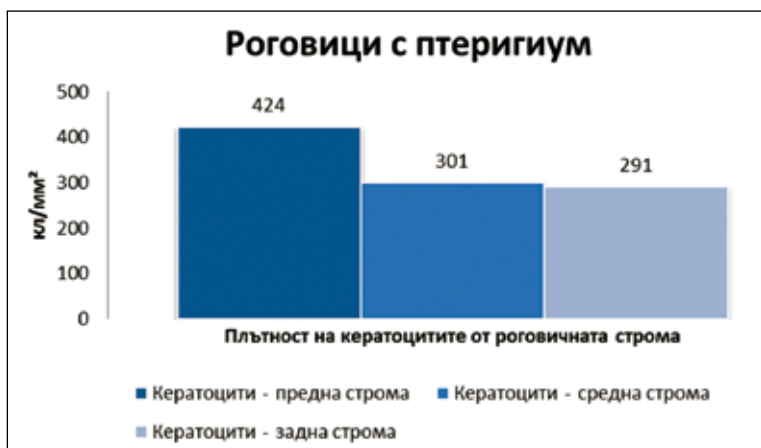
Фигура 45. Стромален роговичен нерв в роговица с птеригиум

Количествен анализ

Изчислената гъстота на базалните епителни клетки на роговицата на пациентите с птеригиум е 4678 ± 41 кл/мм², а на контролните субекти е 6850 ± 38 кл/мм². Плътноста на кератоцитите от предната строма е 424 ± 17 кл/мм² в групата с птеригиум, тези стойности са пониски в сравнение с контролните субекти – 772 ± 25 кл/мм². Гъстотата на кератоцитите от средна строма е 301 ± 35 кл/мм², а от задна строма – 291 ± 31 кл/мм². Ендотелната плътност в групата с птеригиум е 2121 ± 781 кл/мм². Резултатите от количествения анализ са представени в таблици 7 и 8 и фигури 46–50.

Таблица 7. Количествен анализ – клетъчна плътност на различните слоеве на роговицата при очите с птеригиум

| | Плътност на клетки – роговици с птеригиум |
|----------------------------|---|
| Базални епителни клетки | 4678±411 кл/мм ² |
| Кератоцити – предна строма | 424±17 кл/мм ² |
| Кератоцити – средна строма | 301±35 кл/мм ² |
| Кератоцити – задна строма | 291±31 кл/мм ² |
| Ендотел | 2121±781 кл/мм ² |
| Дендритни клетки | 115±11 кл/мм ² |



Фигура 46. Диаграма на плътността на кератоцитите от различните слоеве на роговицата при очите с птеригиум

Таблица 8. Количествен анализ – клетъчна плътност на различните слоеве на роговицата при здравите роговици и при роговиците с птеригиум

| Клетки на роговицата | Плътност на клетки – роговици с птеригиум | Плътност на клетки – контролни субекти |
|----------------------------|---|--|
| Базални епителни клетки | 4678±411 кл/мм ² | 6850±381 кл/мм ² |
| Кератоцити – предна строма | 424±17 кл/мм ² | 772±25 кл/мм ² |
| Кератоцити – средна строма | 301±35 кл/мм ² | 327±24 кл/мм ² |
| Кератоцити – задна строма | 291±31 кл/мм ² | 305±37 кл/мм ² |
| Ендотел | 2121±781 кл/мм ² | 2520±361 кл/мм ² |
| Дендритни клетки | 115±11 кл/мм ² | 25±12 кл/мм ² |



Фигура 47. Диаграма – сравнение на плътността на базалните епителни клетки между роговиците с птеригиум и контролните субекти



Фигура 48. Диаграма – сравнение на плътността кератоцитите от предна, средна и задна строма между роговиците с птериgium и контролните субекти



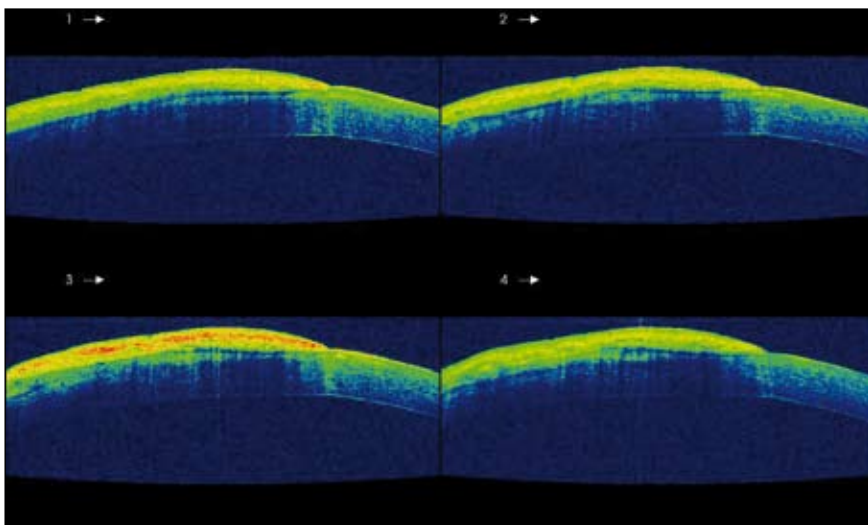
Фигура 49. Диаграма – сравнение на плътността на ендотелните клетки между роговиците с птериgium и контролните субекти



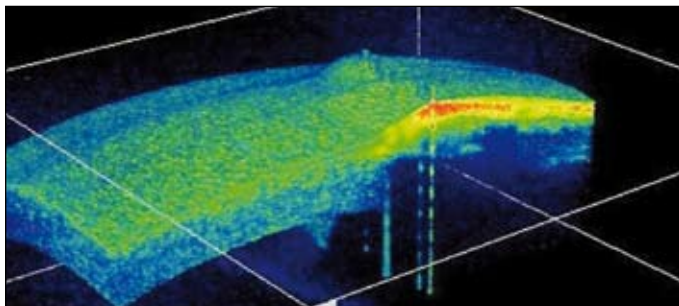
Фигура 50. Диаграма – сравнение на плътността на клетките между роговиците с птериgium и контролните субекти

Предносегментна оптична кохерентна томография на роговица с птериgium

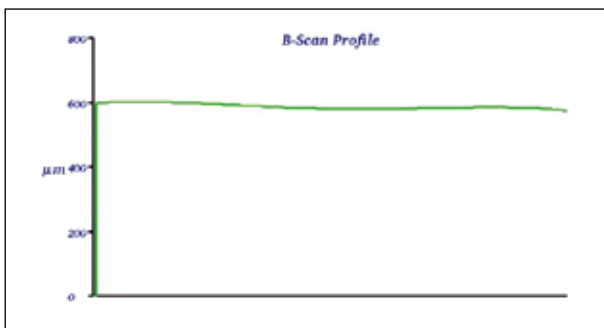
На предносегментните оптично кохерентни томографии птериgiumът се визуализира като хиперрефлексивна надигната област върху роговицата, която съответства на клинично видимия птериgium (Фигура 51, 52, 53). Режимът на изследване и полученото изображение позволява прецизно изследване на интерфейса птериgium – роговица, както и точно измерване с мануален калипер на дебелината на птериgiumа и резидуалната строма (Фиг. 54). На цветно кодираните пахиметрични карти на роговицата ясно се визуализират измененията в дебелината (Фиг. 55).



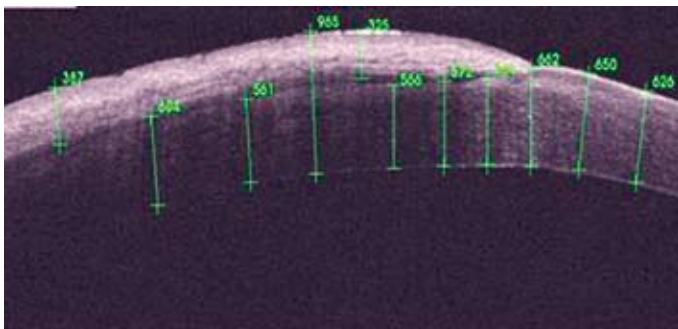
Фигура 51. OCT на роговица с птериgium



Фигура 52. Триизмерна реконструкция на срез на роговица с птериgium



Фигура 53. В-скан профил на роговица с птериgium



Фигура 54. ОСТ на роговица с птериgium: измерване с мануален калипер на дебелината на птериgiumа и резидуалната строма



Фигура 55. Цветно кодирана пахиметрична карта на роговица с птериgium

VI. Обсъждане

В съвременната офталмологична практика класическото определяне на зрителна острота далеч не е единственият показател при комплексната оценка на зрителната функция. Ключова роля за стабилността и яснотата на зрение има контрастната чувствителност, а анализът на вълновия фронт набира все по-голяма популярност. Контрастната чувствителност пряко зависи не само от оптичните, но и от топографските и микроструктурни качества на роговицата.

Роговицата е основната статична пречупваща среда на оптичната система на окото, ключова за стабилността и яснотата на зрение. Тя има сложна асферична форма, което затруднява осигуряването на прецизна качествена (векторен анализ) и количествена (диоптрична стойност, елевация) информация за нея, която е от особено значение при вземането на разумни рефрактивни решения с оптични средства или хирургически процедури. Независимо че повечето изследвания на роговицата са във връзка с оперативни процедури, изборът на подходяща методика е важен за диагностичния подход и при вземането на всяко рефрактивно решение.

Офталмологията е базирана на триизмерно мислене още от създаването на стереобиомикроскопа, но днес с помощта на софтуерните технологии може да се проследи и четвъртото измерение, даващо динамиката на процесите и базирано на времето. По дефиниция роговичната топография дава информация за формата и пречупващата сила на роговицата, но това до голяма степен зависи от вида и принципите на използваната технология.

Плачидо-базираната роговичната топография е класическа методика, която присъства във всички топографски системи, самостоятелно или в комбинация с елевационния подход (Групчева Хр., 2009, Savini G., 2011, Read, 2009). Системата се базира на принципа на кератоскопията, анализират се между 256 и 360 точки около циркумференцията на всеки проектиран пръстен на Плачидо. Специален векторен анализ позволява определяне пречупващата сила във всяка точка и охарактеризиране и цветово кодиране на цялата роговица (концепция, предложена от Клузе през 1989 г.). Интерпретацията на цветните карти става

след запознаване с цветните кодове и техните стойности (Групчева Хр., 2009).

Оптичната кохерентна томография (ОСТ) също е водеща методика за образна диагностика със способност за изобразяване на биологични тъкани на живо при висока резолюция. Методът предлага възможности за безконтактно и неинвазивно изследване както на заден, така и на преден очен сегмент. Предносегментната ОСТ за пръв път е представена през 1994 г. (Izatt J. A., 1994). Тя се базира на ниско кохерентна интерферометрия на сноп от инфрачервен диоден лазер с дължина на вълната ~ 1310 nm. Получените детайлни срезове на роговицата са кодирани в условни цветове. Предимство на ОСТ е възможността за калкулиране на роговичната дебелина и изготвянето на цветна пахиметрична карта на база прецизни лазерни измервания. Използват се оптични принципи, които са максимално близки до ултразвуковата пахиметрия, а измерването е строго перпендикулярно на роговичната повърхност. Важно е, че изследването е безконтактно, методът е неинвазивен и не се деформира роговицата. Проучвания доказват, че има висока повторваемост и възпроизводимост на резултатите – от $4,3 \mu\text{m}$ (Ehlers N., 2004, Thomas J., 2006), както и добра корелация със златния стандарт за измерване на роговична дебелина – ултразвуковата пахиметрия (Thomas J., 2006).

Съществуват различни подходи за корелационен анализ на диоптричната стойност, роговичната елевация и съотношението и отстоянието на предната и задна роговична повърхност. Един популярен подход е комбинацията на слит сканиращата и Плачидо-базирана топография, като основният недостатък на методиката е зависимостта ѝ от прозрачността на роговицата, тъй като се използва видима светлина (Cairns G., 2005, Cairns G., 2002, Srivannaboon S., 1999). Друга методика комбинира интерферометрията с Плачидо-базирана технология (Пентакам), но високата цена я прави практически недостъпна за употреба извън централните за рефрактивна хирургия (Ousley P.J., 2002, Qisling S., 2006, Fujioka M., 2007).

Идеалният топограф трябва да притежава висока точност и доказана повторваемост, да има възможности за обработка и моделно представяне на данните. Освен това той трябва да бъде съвместим с оста-

налите платформи и системи за динамичен анализ на рефрактивните очни среди.

Идеални технологии няма, но в търсене на най-подходящата методика за комплексно изследване на роговицата нашият екип разработи концепция за комбиниране на три различни подхода: предносегментна оптична кохерентна томография, Плачидо-базирана роговична топография и лазер сканираща конфокална микроскопия на живо. Първите две методики осигуряват детайлна и точна информация за роговичната елевация по две различни технологии. Известна подобна комбинация е Орбскан технологията, която независимо от опитите за класифициране като „златен стандарт“ търпи сериозни критични бележки (Cairns G., 2005, Cairns G., 2002, G., Групчева Хр., 2009). Комбинирането на две независими методики дава възможност за анализ на причините на тези несъответствия, които се маскират от софтуерната програма на Орбскан II (Cairns G., 2002). Концепцията за едновременно приложение на Плачидо-технологията и оптична кохерентна томография е подход, притежаващ до голяма степен характеристиките на „идеален топограф.“ Едновременно с това тази концепция преодолява недостатъците на гореспоменатите патентовани комбинирани методики поради факта, че и двете технологии са широко навлезли в клиничната практика и ОСТ използва лазер, а не видима светлина. Предносегментната оптична кохерентна томография и Плачидо-базирана роговична топография обаче не осигуряват информация за микроструктурните качества на роговицата. Поглед на клетъчно ниво в роговицата дава третата използвана в научната разработка методика – лазер сканиращата конфокална микроскопия на живо, която осигурява качествени изображения с голямо увеличение, висока резолюция и контраст (Cavanagh, 1990, Jalbert, 2003). Настоящият научен труд има за цел да подчертае предимствата от комбинирането на трите методики, при което се осигурява детайлна и точна информация при оценката на оптичните, топографските и микроструктурни качества на роговицата, което хипотетично е по-добро от всички патентовани комбинации и дава най-пълна и точна оценка на роговичните характеристики.

В световен мащаб има множество проучвания за оценка на параметрите, характеризиращи различни топографски системи, като напри-

мер вариабилност на измерването, повторяемост и особено точност, в сравнение със сферични и асферични тестови повърхнини (Yobani M, Dingeldein SA, 1989, Bogan SJ., 1990, Legeais JM., 1993). Резултатите на Schultze RL и екип, както и на Jeandervin M и колектив сочат, че повечето видеокератографски системи измерват силата на сферични обекти с висока точност (Schultze RL., 1998, Jeandervin M., 1998). Други изследователи обаче (Belin MW и колектив) установяват намаляване на вариабилността на изследването, когато се изследват много плоски (< 38 D) или много стръмни (> 46 D) повърхности, повърхности с рязък преход или неправилни асферични повърхности, както установява Douthwaite WA и екип при изследване на асиметрични обекти (Belin MW, 1996, Douthwaite WA, 1998). Фактори, които биха се отразили на вариабилността на топографските изчисления, включват качеството на автоматичната дигитализация, общия брой измервания върху всеки пръстен, както и рутинната интерполация при финалното представяне на резултатите (Belin MW, 1996, Douthwaite WA, 1998). Отношение има и осредняването на парааксиална диоптрична сила, която може да даде грешни резултати за периферните участъци поради елиптичната форма на окото (Douthwaite WA, 1998). Според Mandell RB, въпреки техническите различия, всички към момента използвани в практиката топографски системи се базират на един принцип на хоризонтална проекция – с използването на светлинна фиксационна точка, локализирана на оптичната ос, в центъра на системата от дискове на Плачидо (Mandell RB, 1992). Пациентът бива инструктиран да не отклонява погледа си от тази таргетна точка по време на изследването. Според Mandell RB фиксационният процес може до известна степен също да допринесе за по-голямата вариабилност при изследването (Mandell RB, 1994).

Най-често използваните в рутинната клинична практика инструменти за изследване на роговичната топография са компютър-асистираните видеокератоскопи, базирани на диска на Плачидо. Тези системи осигуряват детайлна топографска информация от хиляди точки, разположени по предната роговична повърхност. Проучвания на Tripoli NK и екип и Tang W и колектив, изследващи точността и повторяемостта на модерните Плачидо-базирани видеокератоскопи, доказват, че тези системи са с висока точност и повторяемост при из-

мерване на сферични, асферични и астигматични тест обекти (Tripoli NK, 1995, Tripoli NK, 1996, Tang W, 2000). Според Cho P и съавтори Плачидо-базираните методики са с висока повторяемост и при измерването на човешката роговица (Cho P, 2002).

Scott A Read и екип сравняват комбинирана методика – Pentacam и Плачидо-базирана методика (Medmont videokeratoscope) по отношение на същите показатели – повторяемост и възпроизводимост, сред група здрави субекти (Read, 2009). Те доказват отлична повторяемост и добро сходство между двата апарата по отношение на най-добре пасващия сфероцилиндър за предна роговична аксиална кривина, както и за голям брой роговични аберации от висок порядък. Според тези изследователи обаче по отношение на определени аберации от по-висок порядък (азимут честоти) Пентакам не показва добро съгласие с Плачидо-базираната топографска система, която е приета за стандарт, поради което данните от Пентакам трябва да се интерпретират с внимание (Read, 2009).

При анализа на цветно кодираните топографски изображения на здравите роговици на индивидите от група IA се намери, че при всички изследвани роговици има прогресиращо оплоскостяване от центъра към периферията с 2–4 диоптъра, като назалните квадранти са по-плоски от темпоралните – т. нар. пролатна форма на роговицата.

Нашите резултати по отношение на периферното оплоскостяване на роговицата потвърждават тези на други изследователи (Read, 2006). Scott A Read и колектив, изследвайки топографията на 100 здрави млади субекти, доказват, че здравата човешка роговица има пролатна елиптична форма (т. е. по-стръмна централно и по-плоска към периферията) – в 99 от 100 изследвани очи. Според други автори малка част от здравите роговици притежават облатна форма на роговицата – роговица, която е по-стръмна в периферията, без това да е патологична находка (Read, 2006). Eghbali и екип намират, че 8 от 41 субекти – участници в изследването, притежават облатен профил на роговицата (Eghbali, 1995). Read и екип откриват такъв профил само в 1 от 100 изследвани очи (Read, 2006).

Измененията в топографския профил на периферната роговица биха имали слабо или никакво отражение на фовеалното зрение. Пе-

риферните топографски характеристики на роговичния контур обаче имат роля за off-axis аберациите и качеството на зрение. Вероятно е изменението в периферната топография на роговицата, изразяващи се в подчертано оплоскостяване, да имат значение за плавния преход между роговицата и плоската склерална повърхност (Newton R.H., 1998). Според Meek КМ ориентацията на роговичните колагенни фибрили се променя в лимбалната зона, като придобива циркумферентна ориентация в крайната роговична периферия (Meek КМ., 2004). Това подчертано изменение в стромалната колагенна ориентация според нас е вероятната анатомично обусловена причина за оплоскостяването на периферния роговичен топографски профил.

Според нашите резултати е налице огледална симетрия на топографския профил между двете очи на всеки изследван. Тази находка потвърждава резултатите на Fangjun Bao и колектив, които изследват симетричността на формата на роговицата билатерално сред 342 индивиди, представители на китайската популация (Fangjun Bao, 2013). Те изследват топографския профил на предната и задната роговични повърхности с помощта на Пентакам и доказват силна и статистически значима огледална симетрия между двете роговици. Друго подобно проучване – на предната роговична повърхност, е публикувано от Navarro R и екип. Те изследват предния топографски профил на по-малка група участници – 53, и получават сходни резултати на изразена огледална симетрия (Navarro R., 2006).

Известно е, че организацията и разпределението на колагенните фибрили на роговичната строма има ключово значение за определяне на формата на роговицата. На база намерената огледална симетрия между чифтовете очи (ляво/дясно) при всеки изследван ние смятаме, че симетричността на топографския контур е структурно обусловена от огледална симетричност на колагенната организация. Тази хипотеза подкрепя резултатите на Voote С и екип, които изследват и сравняват микроструктурата и разпределението на колагенните фибрили в стромата на леви и десни очи с помощта на широкоъгълни разсеяни рентгенови лъчи. При картирането те доказват анизотропна организираност и висока степен на срединна огледална симетрия между лявото и дясното око на изследваните субекти (Voote С., 2006).

При качествения анализ на Плачидо-базираната роговична топография цветно кодираните топографски изображения бяха класифицирани по форма (по Vogan) като кръгла, овална, симетрична папийонка, несиметрична папийонка и неопределена форма (Vogan, 1990). Най-разпространеният модел е симетрична папийонка – 32%, следван от несиметрична папийонка – 31,5%, овална форма – 16%, неопределена форма – 13%, кръгла – 7,5%. Оста в повечето случаи е вертикално ориентирана, т.е. стръмният роговичен меридиан е около вертикалния и повечето изследвани роговици притежават известна степен астигматизъм „по правилото“. Тази находка потвърждава данните, публикувани от предходни автори, които изследват роговичния астигматизъм при здрави индивиди над 18-годишна възраст. Но Chang Kim и колектив изследват топографските модели на роговицата и връзката им с роговичния астигматизъм при голяма група субекти от корейската популация с помощта на Eye Sys 2000 роговична топографска система (Но Chang Kim, 2003). Получените от тях резултати са сходни с нашите по отношение на процентното разпределение на топографските модели (кръгла – 7,5%, овална – 14,5%, симетрична папийонка – 33%, несиметрична папийонка – 32,5% и неопределена форма – 12,5%). Според подобно изследване, проведено от Vogan и екип, процентното разпределение на топографските модели е следното: (кръгла – 22%, овална – 21%, симетрична папийонка – 18%, несиметрична папийонка – 32% и неопределена форма – 7%) (Vogan, 1990). Различията между публикуваните от различните автори данни вероятно се дължат на популационните характеристики на субектите-участници в проучванията.

Количественият анализ на Плачидо-базираните топографски изображения показва, че средният радиус на кривина на роговицата в 3 мм зона по вертикалата е $7,51 \pm 0,33$ мм. Минималният установен радиус е 6,95 мм, а максималният измерен е 8,4 мм. Средната стойност по хоризонталата е $7,63 \pm 0,28$ мм, максималната – 8,16 мм, а минималната – 7,1 мм. Средната разлика на стойностите е $0,16 \pm 0,1$ мм, максималната е 0,61 мм, а минималната установена разлика е 0 мм.

При изследването на група I Б (170 очи) с предносегментна оптична кохерентна томография (3D Topcon 2000) установихме, че според цветно кодираните пахиметрични роговични карти от предносегмент-

ната оптична кохерентна томография най-тънката област на роговицата е разположена инферотемпорално спрямо вертекса, което е прието за норма от повечето проучвания (Bechmann, 2001). Роговицата увеличава плавно дебелината си към периферията. Максималната дебелина на роговицата централно (ССТ) е 615 μm . Средната измерена стойност на ССТ е $556 \pm 27 \mu\text{m}$. Минималната корнеална дебелина в централната зона при този метод е 504 μm . Намерените от нас стойности на роговичната дебелина са сходни с публикуваните от предишни изследователи данни. Doughty MJ при проучване на връзката между централната роговична дебелина и стойностите на вътреочното налягане установява средна стойност на роговичната дебелина централно $536 \pm 31 \mu\text{m}$, а Sarah Muscat намира средна стойност на ССТ $526 \pm 28 \mu\text{m}$, при измерване с ОСТ (Doughty MJ, 2000, Sarah, 2002). Според Bechmann и екип, който също измерва ССТ на здрави субекти с оптична кохерентна томография, средната стойност е $530 \pm 32 \mu\text{m}$ (Bechmann, 2001).

Измерването на централната роговична дебелина с предносегментна оптична кохерентна томография е изследване с висока повторяемост и възпроизводимост на резултатите, както доказват Sarah Muscat и екип при проучване, проведено през 2002 г. (Sarah, 2002). Пахиметричното картиране на роговицата с предносегментно ОСТ също е с доказана висока повторяемост и възпроизводимост, според Mohamed S. и съавтори, които картират роговиците на голяма група здрави субекти с Visante оптична кохерентна томография (Mohamed, 2007). Измерените стойности на роговичната дебелина с ОСТ са обаче винаги по-ниски в сравнение с получените с УЗ пахиметрия, според Prospero Ponce и екип (Prospero, 2009). Те провеждат сравнително измерване на централната и периферната роговична дебелина с ОСТ, Scheimpflug методика и ултразвукова пахиметрия при нормални субекти, суспектни за кератоконус очи и роговици след LASIK.

При анализа на цветно кодираните елевационни роговични карти на ОСТ установихме, че средната стойност на радиуса на роговична кривина на 180° е $7,74 \pm 0,25$ мм. Максималната измерена стойност е 8,34 мм, а минималната – 7,18 мм. По меридиана на 90° средният измерен радиус е $7,41 \pm 0,27$ мм. Максималната установена стойност на радиуса на роговична кривина по този меридиан е 8,0 мм, а мини-

малната стойност е 6,76 мм. Средната разлика в милиметри между стойностите на радиусите по вертикала и хоризонтала е $0,32 \pm 0,18$ мм. Максималната установена разлика е 1,4 мм, а минималната е 0,1 мм.

Установените от нас стойности на радиуса на роговичната кривина са близки до тези на предишни изследователи, използвали сходни апарати. Sorbara и екип, които провеждат проучване в научен център за контактна корекция в Канада, намират средна стойност на хоризонталния радиус на кривина 7.85 ± 0.31 мм, като максимален посочват 8.7 мм, а минималният установен от тях е 7.24 мм (Sorbara, 2010).

Резултатите на нашия експеримент на комбиниран подход показва завишаване на стойностите на радиус на кривина при изследването с ОСТ в сравнение с Плачидо-базираната технология, при запазване на съотношението център – периферия. Тъй като едната технология се базира на прецизно лазерно измерване, а другата на тригонометрични калкулации на деформацията на огледален образ върху роговицата, логиката е в полза на първата технология. Проблемът с нея обаче е превръщането на измерената по този начин роговична елевация в диоптрична сила. Ето защо вероятното комбиниране на двете технологии би имало съществено предимство при вземане на рефрактивни решения, особено ако се касае за отклонения от средностатистическата норма.

Внимателният анализ на топографските характеристики на корнеята и динамиката им е важна за скрининга на пациенти за рефрактивна хирургия на роговицата, особено за изключване на фрустни форми на кератоконус, които биха се открили при проследяване на топографските изменения. Известно е, че Плачидо-базираните системи имат висока точност и повторяемост при изследването както на нормални, така и на роговици с висока асферичност. Скорошни проучвания доказват също, че няма статистически значими разлики при определянето на асферичността на предната роговична повърхност между Плачидо-базирана топография и такива на принципа на ротираща се Scheimpflug камера (Пентакам) (Savini, 2011). Резултатите от топографските корелации от настоящото проучване потвърждават хипотезите на предишни изследователи (Savini, 2011, Read, 2009).

Анализът на роговичната топография се използва и за диференциална диагноза с промени вследствие дългогодишно носене на ригидни

контактни лещи (Макгий, 2000). Предимството на ОСТ технологията в тези случаи би било по-малката зависимост от роговичната прозрачност. Особено предимство би имала тази комбинация и при анализ на роговичната кривина и сила след кератопластика, поради множеството локални артефакти. Подобен подход би дал прецизна оценка на неправилния астигматизъм и адекватно планиране на времето и последователността на махане на шевове (Макгий, 2000, Izatt, 1994).

Приложението на ОСТ при изследване на преден очен сегмент в последните години е обект на все по-голяма популярност (Rahul, 2011, Huang, 1991). Множество изследвания се правят в тази област, включително приложението на поляризационно-чувствителна ОСТ при изследване на различни роговични заболявания, използването на апарати с по-висока аксиална резолюция, както и такива с висока скорост и с ултрависока резолюция (Karnowski, 2011). За пре- и постоперативната оценка на роговицата при LASIK също може да се използва ОСТ, като се анализира пахиметричната карта на роговицата преди и след процедурата (Maldonado, 2000).

В ерата на контактологията и рефрактивната хирургия познаването на оптичните и топографски характеристики на роговицата е задължително. Но идеалната методика все още не съществува. Изследването на живата роговица е значително сложно поради намеса на множество биологични и ситуационни фактори. Използването на комбинация от ОСТ и Плачидо-базирана роговична топография осигурява прецизно измерване и добър топографски профил на роговицата, извършва се бързо и с минимален дискомфорт за пациента, като интерпретацията на резултатите задължително трябва да се осъществи на база клиничната находка. Подобна комбинация би била успешно преодоляване на недостатъците на сега съществуващите комбинирани технологии, класически пример за които е Орбскан II. Бъдещи проучвания ще допринесат за развитието на този иновативен подход.

При изследването на здравите роговици с лазер сканираща конфокална микроскопия на живо качественият анализ на изображенията показва, че базалният епителен слой се визуализира като мозайка еднородни тъмни клетки със светли граници. Към него прилежи фин суббазален нервен плексус със средно изразена рефлексивност. Баума-

новият слой се наблюдава като аморфна мембрана със слаба рефлексивност. В стромата се визуализират ядрата на кератоцитите като светли полиморфни структури на тъмен фон. Ендотелът се наблюдава като мозайка от хексагонални светли клетки с тъмни граници.

Роговицата е най-богато инервираната тъкан в човешкия организъм, с гъстота на нервите 300-600 пъти повече от тази на кожата и 20-40 пъти повече от тази на зъбната пулпа (Collin, 2006). Проучванията на плътността и морфологията на роговичните нерви в миналото са лимитирани от ограничения достъп до здрави човешки роговици за *ex vivo* анализи, както и от бързата дегенерация на невралната тъкан след смъртта на индивида. Възможността, която дава конфокалната микроскопия за анализ на инервацията на жива роговица чрез получените фронтални изображения на нервните снопчета, е изключително удобна за анализ на морфологията на суббазалния роговичен нервен плексус (Kinoshita, 2001, Barge, 1991) Роговичната чувствителност намалява със стареенето на организма, както доказват Millodot M и екип, както и Roszkowska AM и съавтори (Millodot, 1977, Roszkowska, 2004). В световен мащаб са провеждани проучвания с конфокална микроскопия относно измененията в архитектурата и гъстотата на суббазалните нерви с възрастта, като има противоречиви мнения дали плътността на нервите намалява със стареенето на организма. Според Erie JC и колектив, които изследват роговичната инервация с конфокална микроскопия, стареенето на организма води до изменения в архитектурата на нервните снопчета (Erie, 2005). Известно е, че инервацията на роговицата има важна защитна и трофична функция, поради което изменения в гъстотата и/или морфологията на нервните снопчета вероятно води до забавено зарастване на епителните дефекти на роговицата (Beuerman, 1980, Araki, 1994). Според нас нарушената микроструктура на суббазалните нерви при роговиците с птериgium, която установихме при качествения анализ на конфокалните изображения, е вероятна причина за намалената клетъчна плътност на предностромалните кератоцити в роговиците с птериgium.

Публикувани са множество *ex vivo* изследвания на човешка роговица, доказващи, че плътността на кератоцитите намалява със стареенето на организма. Впоследствие тази възрастово-обусловена ре-

дукция на кератоцитната плътност е потвърдена от Berlau J и екип, и Hollingsworth J и колектив, които изследват роговицата на живо с помощта на слит сканираща конфокална микроскопия (Berlau, 2002, Hollingsworth, 2001).

Количественият анализ на *in vivo* LSCM показва, че изчислената гъстота на базалните епителни клетки на роговицата на контролните субекти е 6850 ± 381 кл/мм². Kauffmann и екип (Kauffmann, 1966) установяват средна плътност на базалните епителни клетки 6248 ± 378 кл/мм², а Mustonen (Mustonen, 1998) – 5699 ± 604 кл/мм². Нашите резултати сочат по-висока плътност, което може да се дължи на различните популационни характеристики на изследваните субекти. Доказано е, че гъстотата на базалните епителни клетки няма връзка с възраст и пол.

Плътността на кератоцитите от предната строма на контролните субекти е 772 ± 25 кл/мм², от средната строма е 327 ± 24 кл/мм², от задната строма – 305 ± 37 кл/мм².

Настоящото проучване намери значително по-висока кератоцитна плътност в предна (772 ± 25 кл/мм²), в сравнение със задна роговична строма (305 ± 37 кл/мм²) – с около 40%. Тези резултати потвърждават публикуваните резултати от Muller LJ и екип, провеждали *ex vivo* електронно-микроскопски изследвания на човешка и заешка роговица, които доказват тази редукция и намират двойно по-висока концентрация на митохондрии в кератоцитите от предната строма в сравнение със средната и задната строма (Muller, 1995). Niederer и екип, както и Mustonen RK също установяват сходни стойности на кератоцитната плътност, както и редукция на гъстотата на кератоцитите от предна строма по посока на задна строма (Niederer, 2007, Mustonen, 1998). Методиката, която са използвали тези изследователи, е слит-сканираща конфокална микроскопия.

При изследване на слоевете на роговицата с витални багрила Poole SA и екип установяват, че в предна строма непосредствено зад Баумановия слой има слой с дебелина около 100 μm , в който кератоцитите са с различна морфология – с гранулиран вид и екстензивни цитоплазматични клетъчни израстъци (Poole, 1993). Вероятно е тези кератоцити да са с по-висока метаболитна активност от задностромалните,

поради което и плътността им да е по-висока, както е установено и в настоящото проучване.

Значението на установената редукция на плътността на стромалните кератоцити не е ясна; тя може да се дължи на забавяне на метаболитната активност на кератоцитите или на промяна в композицията на кератоцитните субпопулации. Възможно е също така изчисляването на по-малка плътност да се дължи на реална загуба на клетки или да е резултат на оптичен артефакт – следствие на намален контраст на изображенията при по-възрастните субекти.

Двумерната кератоцитна плътност на здравата роговица, калкулирана в настоящото проучване с лазер-сканираща конфокална микроскопия на живо (HRT3 Rostock Corneal Module), е по-ниска в сравнение с данните на предишни изследователи – Mustonen RK и екип, както и Hollingsworth J и колектив, използвали слит-сканираща конфокална микроскопия (Hollingsworth, 2001, Mustonen, 1998). Тези различия вероятно се дължат на по-малката дебелина на оптичния срез при режим Section, който дава RCM, сравнен с други устройства (Patel, 2005).

Редукция на кератоцитите е наблюдавана при дългосрочни проучвания на субекти след PRK и LASIK, както и след пенетрираща кератопластика (Erie, 2003, Erie, 2004).

Кератоцитите и техните характеристики са важни по отношение на скоростта на зарастване на роговични епителни и стромални дефекти, ето защо детайлното им изучаване би имало важна роля при хирургичните интервенции на роговицата. Бъдещи проучвания в тази посока ще допринесат за по-добрата предоперативна оценка на пациентите за рефрактивна хирургия на роговицата.

Изчислената от нас плътност на ендотелните клетки в здравите очи е 2520 ± 361 кл/мм². Тези стойности са близки до публикуваните от други изследователи, използвали сходна методика. Hollingsworth и екип установяват 3061 ± 382 кл/мм² (Hollingsworth, 2001), Mustonen и екип – 3055 ± 386 кл/мм² (Mustonen, 1998), а Klais CM и колектив намират гъстота на здравия ендотел 3069 ± 285 кл/мм² (Klais, 2003). Различията в стойностите е възможно да се дължат на популационни различия.

В настоящото проучване са установени роговични брадавички в централната част на ендотела на трима от субектите на възраст над 50 г. В минали проучвания честотата на роговични брадавички варира според използвания метод на изследване. Проучване на Kaufman HE с *ex vivo* микроскопия посочва честота от 15% в 182426 донорни роговици, които обаче са от донори на по-голяма възраст (Kaufman, 1966). Изследване със светлинна микроскопия, проведено от Lorenzetti DW и екип на 1016 субекти, показва централни роговични брадавички в 32% от роговиците на възраст 10–39 години, и в 70.4% от субектите на възраст 40–99 г. (Lorenzetti, 1967). По-скорошно проучване на Hollingsworth J и Perez-Gomez с *in vivo* конфокална микроскопия установява честота от 6–29% от пациенти над 60-годишна възраст, но при нито един от субектите под тази възраст (Hollingsworth, 2001). Роговичните брадавички може да са асоциирани с ендотелна дистрофия на Fuchs', интерстициален кератит, макуларна дистрофия, задна полиморфна дистрофия, травма, токсини или инфекция (Adamis, 1993). Идентифицирането на централни роговични брадавички е важно при пациенти за рефрактивна хирургия, тъй като дори леко изразени роговични брадавички се асоциират с повишен риск от преходен роговичен оток, загуба на BCVA, загуба на ендотелни клетки и регресия на миопията след рутинна процедура LASIK, според Moshirfar M и екип (Moshirfar, 2005).

Хистопатологични изследвания *ex vivo* на роговици с птериgium показват инвазия на фибробластна тъкан, която отсепарира епителния роговичен слой от Баумановата мембрана, и деструкция на подлежащата суперфициална предна строма (Yan Wang, 2010, Jeanie Chui, 2011). В настоящото проучване е осъществено динамично изследване *in vivo* на микроструктурата на роговици с птериgium чрез OCT и лазер сканираща конфокална микроскопия на живо, с помощта на които е описана структурата на тъканта на птериgiumа и са установени изменения в морфологията, подреждането и плътността на клетките от различните роговични слоеве. Получените резултати потвърждават тези на други изследователи, използвали сходни методики за оценка на хистопатологичните структурни алтерации на прилежащата към птериgiumа чиста роговица (Paradia, 2008). Предносегментното OCT позволява прецизно измерване на дебелината на птериgiumа, подлежащата резидуална

строма и прилежащата необхваната роговична тъкан. Тази възможност е изключително важна за вземането на решение за хирургично лечение, както и за мониториране на постоперативния период. Нашият анализ на предносегментните оптично кохерентни томографии показва, че птериgiumът се визуализира като хиперрефлексивна надигната област върху роговицата, която съответства на клинично видимия птериgium. Ясно видима е деструкцията на Баумановата мембрана и суперфициалната предна строма от главата на птериgiumа. Режимът на изследване и полученото изображение позволява прецизно изследване на интерфейса птериgium-роговица, както и точно измерване с мануален калипер на дебелината на птериgiumа и резидуалната строма. Нашите резултати потвърждават тези на предходни изследователи, използвали подобна методика за оценка на птериgium.

В световен мащаб в последните няколко години има проведени няколко проучвания на птериgium с предносегментна оптична кохерентна томография. Hans-Jürgen Buchwald и колектив изследват конюнктивни и клепачни лезии с предносегментна OCT и ултразвукова биомикроскопия с високочестотен трансдюсер (Hans-Jürgen, 2003). Те доказват, че в сравнение с ултразвуковия метод OCT има възможност да визуализира по-ясно кистични структури с много малки размери. За отграничаване границите на туморната маса според авторите ултразвуковата методика е с по-добри резултати. Welch MN сравняват два начина за измерване на точните размери на птериgiumа върху роговицата: стандартна светлинна биомикроскопия и предносегментна OCT (Welch, 2011). Те доказват, че OCT измерването с калипер дава сигнификантно по-точни и възпроизводими резултати в сравнение с биомикроскопския метод при измерване на дистанцията от апекса на птериgiumа до лимба, поради което методиката е с потенциал за по-точна клинична оценка на напредването на птериgiumа, както и за научни цели. Soliman W и Mohamed TA използват предносегментна spectral domain OCT за морфологична оценка на първичен и рекурентен птериgium, псевдоптериgium и пингвекула (Soliman, 2010, Soliman, 2012). Според техните заключения SD-OCT осигурява изображения на птериgium и пингвекула с висока резолюция и ясно показва анатомичните взаимоотношения между роговичната тъкан и

тези лезии (Soliman, 2012). Поради това приложението на методиката в клиничната практика може да спомогне за понижаване нивата на рецидивирание след ексцизия при двете образувания.

При качествения анализ на изображенията на лазер сканираща конфокална микроскопия на епитела на птеригиума се визуализират плътно прилежащи една към друга клетки със светлосиви клетъчни тела, тъмни граници и пунктифотмени хиперрефлексивни ядра. Наблюдават се също микрокисти в субепитела на птеригиума, с хипорефлексивно съдържимо и хиперрефлексивни гладки стени. На нивото на епитела на птеригиума са наблюдавани пръснати чашковидни клетки – едри хиперрефлексивни клетки с овална форма. Чашковидни клетки в епитела на птеригиума са доказани от Golu и екип при хистологично изследване на ексцизираната тъкан от птеригиум (Golu, 2011). Тези клетки не са нормална находка в роговичния епител, но нормално се срещат в конюнктивния епител, където продуцират муцин – компонент на слъзния филм. Високият брой чашковидни клетки, открити от нас с конфокална микроскопия, както и при предходни хистологични изследвания, са вероятна последица от излагането на предния очен сегмент на иритиращи вредни субстанции от околната среда.

На изображенията при лазер сканиращата конфокална микроскопия стромата на птеригиума има предимно плътна фиброваскуларна структура със средно изразена рефлексивност, богата мрежа от кръвоносни съдове, изпълнени с хиперрефлексивни кръвни клетки и на места инфилтрация от възпалителни клетки в обграждащата кръвоносна тъкан. Този строеж на стромата на птеригиума потвърждава описаната находка от други изследователи, използвали хистологични методи за изследване. Т. Golu и колектив описват стромата на птеригиума като подобна на конюнктивната субепителна тъкан – с богата мрежа кръвоносни съдове, рязко контрастираща с подлежащата роговична строма (Golu, 2011). Установената и от нас богата съдова мрежа в субепитела и в стромата на птеригиума потвърждава резултатите на Seifert и екип, които смятат, че наличието на интраепителни капилляри в тъканта на птеригиума предполага участието на потентни ангиогенни цитокини, произхождащи от епителни клетки (Seifert, 1998). Според някои изследователи – Dushku N и екип (Dushku, 1994),

и Lauweyngs B и колектив (Lauweyngs, 1993), тези епителни клетки, които имат пряко участие във формирането на птеригиума, най-вероятно произхождат от увредени лимбални базални стволони клетки. Основание за хипотезата им е наличието на експресия на виментин и багренето с AE1 МоАб. Въпреки че директно сравнително проучване на култивирани човешки лимбални или конюнктивни клетки все още не е проведено, публикация на Diebold и екип (Diebold, 1997) демонстрира имунореактивно и хистохимично оцветяване на цитокератини (AE1, 3, 5), виментин и муцин в култивирани човешки епителни клетки, сходни на тези, идентифицирани в епителните клетки на птеригиума от Nick Di Girolamo и съавтори (Di Girolamo, 2004).

На границата птеригиум – незасегната роговица се наблюдава колонообразен вид и подреждане на базалните епителни клетки, което е установено и от Yan Wang и екип (Yan Wang, 2010). Според нас това явление е вероятен резултат от механична тракция на базалните клетки при инвазията на главата на птеригиума между епитела и Баумановия слой.

Друга интересна находка на границата между тъканта на главата на птеригиума и чистата роговица са множество разпръснати клъстери от хиперрефлексивни клетки на нивото на базалния епителен слой. Предполагаме, че кореспондират с клинично видимите т. нар. петна на Фукс (Fuchs' flecks), оригинално описани от Ernst Fuchs още през миналия век в неговата статия „Ueber das Pterygium“ едновременно на микроскопско и макроскопско ниво като малки петънца, прилежащи към главата на птеригиума (Fuchs, 1892). Jeanie Chui и колектив при проучване на ексцизирана тъкан от птеригиум с имунохистохимични и хистопатологични методики намират подобни клетъчни струпувания в 18 % от пробите си и ги описват като клъстери, навлизащи в корнеалния базален епител и строма, с ясно отграничени непигментни меланоцитни гнезда (Jeanie Chui, 2011). Клетките в тези агрегати са по-малки, с повишено съотношение ядро – цитоплазма, състоят се от 8 – 15 клетки, прикрепени към базалната мембрана, и спорадично асоциирани с роговичноподобен епител близо до главата на птеригиума. Морфологично тези клетки са примитивно изглеждащи и по-ниско диференцирани от обграждащите ги супрабазални клетки, което води

до предположението, че е възможно те да бъдат подобни на стволочни клетки. Фенотипизирането с имунооцветяване при използване на LSCs маркери показва, че тези клетъчни клъстери демонстрират имунореактивност към СК-15, СК-19, p63 и са двойно имунореактивни към СК-15/p63 и СК-19/p63, но не показват имунореактивност към Ki-67 (маркер за пролиферация) или Сх43 (протеин за гап-контакти). Според авторите, въпреки че тези клетки не са активно пролифериращи (нямат експресия на Ki-67), те имат пролиферативен потенциал (силна експресия на p63) и могат да бъдат активирани от подходящи сигнални механизми по време на развитието на птеригиума.

При други проучвания *ex vivo* са установени повишен брой различни имунни клетки (мастоцити, лимфоцити, CD4+, CD8+Т клетки, дендритни клетки) в ексцизирани проби от птеригиум (Beden, 2003). В нашето проучване на живо ние също установихме повишен брой ярки възпалителни клетки, както и т. нар. дендритни клетки в тъканта на птеригиума, отколкото в здравите очи – (115 ± 11 кл/мм²) в сравнение с контролните субекти (25 ± 12 кл/мм²). Дендритните клетки са специализирани антиген-представящи клетки, част от имунологичния отговор на очната повърхност. Повишената плътност на дендритни клетки предполага участието на имунологичен механизъм при формирането на птеригиума, както и наличието на хронично възпаление във и около него. Лангерхансовите клетки са тип дендритни клетки, които се намират в роговичния и конюнктивния епител (Gillette, 1982). Те представляват специализирани антиген-представящи клетки, които се идентифицират електронномикроскопски по наличието на гранули на Birbeck. Тези гранули са описани от Birbeck и екип (Birbeck, 1961) и представляват молекула лангерин/CD207, специфичен за този тип клетки, както установява Valladeau J през 2000 г. (Valladeau, 2000). Гранулите на Birbeck не могат да бъдат идентифицирани с конфокална микроскопия, поради което Mastropasqua L и колектив предлагат терминът „Лангерхансови“ клетки да се замени с „дендритни“ клетки в контекста на конфокалната микроскопия (Mastropasqua, 2006). Други автори – Cruzat A и екип, приемат по-дескриптивния термин „дендриформени“ клетки и с тях означават освен дендритните и Лангерхансовите клетки, още моноцитите и макрофагите (Cruzat, 2011).

Към днешна дата конфокалната микроскопия е единственият об-разнодиагностичен метод, която е в състояние да открива антиген-представящите дендриформени клетки в живата човешка роговица. Тази техника осигурява мост между *in vivo* визуализирането и *ex vivo* хистопатологията, който в бъдеще би могъл да допринесе за изясняване на същността на дендриформените клетки. Методиката тепърва може да се използва в посока изучаване поведението и процесите на мутация и миграция на дендриформените клетки в роговицата в отговор на различни имунологични стимули, както и като мониторинг при антивирусна и противовъзпалителна терапия. Провъзпалителни хемокини и цитокини като IL-1, TNF- α и CCR5 медиат възстановяването на дендритните клетки в роговицата. Вероятно е участието на медиатори на възпалението в появата и развитието на птеригиума, както в процесите на миграция на дендритни клетки. Според нас е възможен и „via the nerve“ път на дендритните клетки към роговицата, както предполага повишената им плътност около суббазалните нерви.

При нашите изследвания на нивото на базалния епител в незасегнатата роговица на очите с птеригиум се визуализират хиперрефлексивни депозити – вероятно гранули меланин, доказани от Nebil Bal и екип при *ex vivo* хистологични изследвания (Nebil Bal, 2006). Те откриват корелация между броя на мастоцитите и наличието на меланинови депозити при птеригиума.

Интересна находка са чашковидните клетки в повърхностния епителен слой на прилежащата към птеригиума роговица, което е знак за дефицит на стволови клетки според Thaer S. Alomar и съавтори (Thaer, 2011).

Други заслужаващи внимание находки са морфологичните алтерации на суббазалните нерви, както и намалената плътност на клетките от базалния епителен слой и кератоцитите от предна и средна строма. Роговичната инервация има важна трофична функция (Cruzat, 2011), поради което структурните нарушения на суббазалния нервнен плексус вероятно имат отношение към редуцирането на клетъчните популации от епителния и предно-стромалния слой на роговиците с птеригиум.

При количествения анализ на конфокалните изображения ние намираме намалена плътност на базалните епителни клетки в роговиците с птеригиум (4678 ± 41 кл/мм²) в сравнение със здравите роговици (6850 ± 381 кл/мм²). Тази находка потвърждава резултатите на Paradia M и екип, които през 2008 г. провеждат изследване с конфокална микроскопия при по-слабо увеличение ($\times 40$ обектив) на централната роговица на 20 очи с птеригиум. Освен редукция на клетъчната гъстота, на ниво базален епител те също като нас установяват и множество дендриформени клетки (Paradia, 2008).

При нашето изследване установяваме, че плътността на кератоцитите от предната строма е 424 ± 17 кл/мм² в групата с птеригиум, тези стойности са по-ниски в сравнение с контролните субекти – 772 ± 25 кл/мм². Гъстотата на кератоцитите от средна строма е 301 ± 35 кл/мм², а от задна строма – 291 ± 31 кл/мм². Ендотелната плътност в групата с птеригиум е 2121 ± 781 кл/мм², а при контролите – 2520 ± 361 кл/мм². Редукция на плътността на предностромалните кератоцити в роговиците с птеригиум в сравнение със здрави субекти намират и други изследователи – Paradia M. и колектив, които установяват също нарушена морфология на кератоцитите и присъствие на лакуни. Тези изследователи обаче не изчисляват гъстотата на кератоцитите от останалите слоеве на роговичната строма.

Di Girolamo и екип установяват повишени нива на IL-1, за които се смята, че водят до намаляване нивата на други матриксометалопротеинази и медиатори на възпалението, потенциално влияещи на развитието на птеригиум (Di Girolamo, 2004). Според нас медиатори като IL-1 биха могли да допринесат за намаляване клетъчната гъстота на кератоцитите чрез ускоряване на апоптозата им.

В настоящата разработка *in vivo* LSCM доказва алтерации на тъканите на птеригиума и прилежащата роговица, включително и лимба, на микроструктурно ниво. Zheng T и екип използват същата методика за изследване микроструктурните изменения на роговичния лимб на живо (Zheng, 2008).

Поради ефекта на фокусиране на светлината от роговицата, UV лъчи от слънчевата светлина се концентрират в назалния лимб – те

ория, въведена от Cogoneo и съавтори (Cogoneo, 1993). Според тази теория лимбалните стволони клетки назално се увреждат при ексцесивно излагане на слънчева светлина, което е тригерен механизъм, активиращ епителните клетки в областта на лимба или в близост да продуцират цитокини като IL-6 и -8. Тези мултифункционални протеини задвижват каскада от събития, които включват възпаление, антиапоптоза, пролиферация и ангиогенеза. Според други модели, представени от Luca M, Franchimont N и екипи, тези цитокини са в състояние да индуцират експресията на MMPs и техните тъканни инхибитори (TIMPs), а това според Ito A и съавтори повлиява тъканното ремоделиране, включително деструкцията на Баумановата мембрана и инвазията на птеригиума (Luca , 1997, Franchimont, 1997, Ito, 1992). Бъдещи проучвания на тези процеси на микроструктурно ниво с *in vivo* LSCM биха допринесли за изясняване механизмите на възникване на птеригиума и връзката с увредата на лимбалните стволони клетки на роговицата от ултравиолетовото облъчване, особено на назалния лимб.

VII. Заключение

Патологията на предния очен сегмент се отразява пряко на качеството на живот на пациента, тъй като влияе негативно на качеството на зрение. Ето защо ефективният метод за изследване на предния очен сегмент и конкретно на роговицата, е от особено значение за диагностичния подход. Изследването на живата роговица е значително сложно поради намеса на множество биологични и ситуационни фактори. Използването на предложената в настоящия научен труд концепция за комбиниране на Плачидо-базирана роговична топография, предносегментна оптична кохерентна томография и лазер сканираща конфокална микроскопия на живо осигурява комплексна оценка на роговицата чрез прецизно измерване, добър топографски и едновременно хистологичен профил на роговицата.

VIII. Приноси

Приноси с познавателен характер

1. За първи път в България е проведено мащабно микроструктурно изследване на роговица.
2. Проведено е най-мащабното към момента в страната проучване на птеригиум с комбинация от две методики, даващи различни микроструктурни характеристики на роговицата и конюнктивата.
3. Описани са топографските характеристики на предната очна повърхност на субекти от български произход и тези характеристики са сравнени с европейските и на САЩ.

Приноси с научно-приложен характер

1. Създаден е алгоритъм за използване на комбинация от роговична топография, ОСТ и лазер сканираща конфокална микроскопия на живо.
2. Създаден е стандарт за нормална роговица, на базата на който могат да бъдат оценени патологичните промени с помощта на лазер сканираща конфокална микроскопия на живо.
3. Създаден е алгоритъм за изследване на преден очен сегмент с оптична кохерентна томография.
4. Разработена е методика за систематичен подход към пациенти с птеригиум в различни стадии.

Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдени са топографските характеристики на роговицата на българската популация.
2. Потвърдени са микроструктурните характеристики на роговицата на българската популация (брой клетки в различните роговични слоеве).

IX. Публикации и научни съобщения, свързани с дисертационния труд

Списък на публикациите, свързани с дисертационния труд

Весела Иванчева, *Има ли златен стандарт за оценка на роговицата?* Наука и младост, Сборник научни съобщения от конкурсна сесия 2013, 2013, 283-287

Иванчева В., Т. Маринова, С. Пеева, Хр. Групчева *Топографски характеристики на роговицата при здрави индивиди: сравнителен анализ на предно-сегментна оптична кохерентна томография и роговична топография*, Български офталмологичен преглед 2013, бр. 2, 3-10

Ivancheva V, T Marinova, V Sheherov, CN Grupcheva, *Microstructural evidence of anterior ocular surface alteration in patients with pterygium*, Scripta Scientifica Medica, Vol 45, Supl 6, 2013, 19-24

Ivancheva V, T Marinova, S Peeva, Y Manolova, C Grupcheva *New diagnostic approach to pterygium-optical coherent tomography and in vivo laser scanning confocal microscopy* Trakia journal of sciences Volume 10, Supplement 2, 2012, 126-133.

Ivancheva V., Т. Marinova, S. Peeva, CN Grupcheva *In vivo examination of contact lens structural changes in human cornea* J Biomed Clin Res Vol 5 Number 2, 2012, 121-126

Участия в научни форуми

Юбилейна научна конференция „30 години висше медицинско образование“ – Тракийски университет, Стара Загора, май 2012

New diagnostic approach to pterygium-optical coherent tomography and in vivo laser scanning confocal microscopy **Ivancheva V.**, Т. Marinova, Sv. Peeva, Y.M. Manolova, C.N. Grupcheva

Pigment dispersion syndrome – how to utilize in vivo laser confocal microscopy Peeva Sv., Т. Marinova, **V. Ivancheva**, D.I. Grupchev, C.N. Grupcheva

XV годишна среща на Съюза на очните лекари в България, май 2012

*Оптичната кохерентна томография и лазерната конфокална микроскопия на живо и тяхната роля за диагнозата, клинично-патологичната корелация и прогнозата на птериgium (постер) **Иванчева В.**, Св. Пеева, Т. Маринова*

*Пигментен дисперсен синдром – възможности на лазерната конфокална микроскопия на живо (постер) Пеева Св., Т. Маринова, **В. Иванчева***

Първа награда за постер

Second Scientific Students' Conference-Trakia University, Stara Zagora, 19–20.10.2012

*Optical coherence tomography and in vivo laser scanning confocal microscopy-useful for diagnostics of keratoconus **Ivancheva V**, T Marina, SS Peeva, CN Grupcheva*

*Rieger Syndrome-case report Marina T., **V. Ivancheva**, S. Peeva, C. N. Grupcheva*

Tenth International Medical Scientific Conference for Students and Young Doctors, Pleven, 17–20.10.2012

In vivo examination of contact lens-induced structural changes in human cornea

Ivancheva V, T Marina, SS Peeva, CN Grupcheva

Трета награда в секция „Докторанти“

Comparison of four methods for measuring the corneal thickness Marina TL,

V. Ivancheva, S. Peeva, C. N. Grupcheva

Първа награда в секция „Докторанти“

Национална конференция „Новости в офталмологията“ 23–24.11.2012, гр. София

Топографски характеристики на роговицата при здрави индивиди: сравнителен анализ на предносегментна оптична кохерентна томография и роговична топография, Иванчева В., Т. Маринова, С. Пеева, Хр. Групчева

Десети симпозиум на Националната глаукомна асоциация – София, 05-06.04.2013 г.

Едностранен ли е псевдоексфолиативният синдром, Автор: В. Иванчева

Втора награда в конкурс „Млад учен 2013“

Изследване на живо чрез конфокална микроскопия на пациенти с глаукома с и без диабет, Автори: В. Шехеров, В. Иванчева, Т. Маринова, Хр. Групчева

Глаукома и роговица – възможности на конфокалната микроскопия на живо, Автори: Хр. Групчева, В. Иванчева, Т. Маринова

Научен конкурс „Наука и младост“ – Пловдив, 18–20.04.2013 г.

Има ли златен стандарт за изследване на роговицата? В. Иванчева

XII International Congress of Medical Sciences – ICMS 2013, 09–12.05.2013

In vivo laser scanning confocal microscopy analysis of pseudoexfoliation syndrome: a case report Ivancheva V, T Marinova, SS Peeva, CN Grupcheva

Role of in vivo laser scanning confocal microscopy for examining the human limbus V Sheherov, V. Ivancheva, T. Marinova, CN Grupcheva

16-та годишна среща на Съюза на очните лекари в България, Пловдив, 16–19.05.2013

Микроструктурни данни за увреда на предната очна повърхност при пациенти с птеригиум. **Иванчева В.**, Т. Маринова, Я. Манолова, Хр. Групчева

Да покриваме или да не покриваме? Терапевтични контактни леци след трансплантация на амниотична мембрана. (постер) **Иванчева В.**, Я. Манолова, Д. Групчев, Хр. Групчева

Контактни леци – да, но какви? Маринова Т., **В. Иванчева**, Ж. Симова, Хр. Групчева

Муцинови топчета. Маринова Т., **В. Иванчева**, Д. Групчев, Хр. Групчева (постер)

British Contact Lens Association 2013, 37th Clinical Conference and exhibition, Manchester, United Kingdom, 06–09.06.2013

To cover or, not to cover...Therapeutic lenses after amniotic membrane transplantation Grupcheva CN, YM Manolova, **V Ivancheva**, DI Grupchev

Втора награда за най-добър постер на конгреса

The importance of the mucin balls Grupcheva CN, T Marinaova, **V Ivancheva**, DI Grupchev

Международен конгрес на Европейското дружество по офталмология (SOE 2013, 08–11.06.2013, Copenhagen, Denmark)

The importance of in vivo confocal microscopy for examining the human limbus V. Sheherov, **V. Ivancheva**, T. Marinaova

Central and peripheral corneal thickness in White Europeans subjects measured by different technology Marinaova TL, **V Ivancheva**, SS Peeva, CN Grupcheva (Ел. постер)

The importance of the mucin balls Grupcheva CN, T Marinaova, **V Ivancheva**, DI Grupchev (Ел. постер)

11th International Medical Scientific Conference For Students And Young Doctors, Medical University Pleven, 16–19.10.2013

Pseudoexfoliation syndrome-how to utilize in vivo confocal microscopy,
Ivancheva V. T Marinova, V Sheherov, CN Grupcheva
First prize for presentation, PhD students Session

Contact lenses-yes, but what kind? Marinova T, **V Ivancheva**, V Sheherov, CN Grupcheva

Gold standard for corneal evaluation Marinova T, **V Ivancheva**, V Sheherov, CN Grupcheva (Poster)

30-та юбилейна конференция „Новости в офталмологията“ 29–30.11.2013 г., ВМА, София

Изследване на микроструктурните промени в очната повърхност на пациенти с диабет и глаукома Шехеров В., **В. Иванчева**, Т. Маринова, Р. Тошев, Хр. Групчева

