



Медицински университет - Варна
„Проф. д-р Параскев Стоянов“

Факултет „Медицина“
Катедра Очни болести и зрителни науки

Д-р Теодора Лъчезарова Маринова

МИКРОСТРУКТУРЕН АНАЛИЗ НА ПАТОЛОГИЧНИ СТРУКТУРИ В РОГОВИЦАТА

АВТОРЕФЕРАТ

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

Варна, 2015



Медицински университет - Варна
„Проф. д-р Параскев Стоянов“

Факултет „Медицина“
Катедра Очни болести и зрителни науки

Д-р Теодора Лъчезарова Маринова

**МИКРОСТРУКТУРЕН АНАЛИЗ НА
ПАТОЛОГИЧНИ СТРУКТУРИ В
РОГОВИЦАТА**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“, Научна специалност „Офталмология“, шифър 03.01.36

Научен ръководител:

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

Официални рецензенти:

Проф. д-р Валентина Златева, д.м.н.

Доц. д-р Георги Йорданов, д.м.

Варна 2015

Дисертационният труд съдържа 175 страници и е онагледен с 20 таблици и 81 фигури. Библиографията включва 230 литературни източника, от които 10 на кирилица и 220 на латиница. Проучването е извършено в СБОБАЛ – Варна.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на катедрен съвет на Катедра по Очни болести и зрителни науки при Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.

Научно жури :

Проф. д-р Христина Групчева, д.м.н. – МУ - Варна

Проф. д-р Валентина Златева, д.м.н. – МУ - София

Доц. д-р Георги Йорданов, д.м. – Тракийски университет – Стара Загора

Доц. д-р Десислава Статева, д.м. – МУ – Плевен

Доц. д-р Зорница Златарова – Ангелова, д.м. – МУ – Варна

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 24 юни 2015г. от 12:00 часа във Втора аудитория на МУ – Варна на открито заседание на Научното жури. Материалите по защитата са на разположение в библиотеката на Медицински Университет – Варна.

Съдържание

Използвани съкращения.....	4
I. Въведение	5
II. Цел и задачи	6
III. Материал и методи	7
IV. Резултати.....	17
V. Обсъждане	49
VI. Заключение	64
VII. Изводи	65
VIII. Приноси.....	66
Публикации, свързани с дисертационния труд	67
Участия в научни форуми.....	67

Използвани съкращения

AS-OCT – предносементна оптична кохерентна томография

BCVA – Best corrected vision acuity, най-добрата коригирана зрителна острота

CCT – централна роговична дебелина

HRT 2-RCM – Heidelberg Retina Tomograph II –Rostock Cornea Module

HRT 3-RCM - Heidelberg Retina Tomograph III –Rostock Cornea Module

LSCM – лазер сканираща конфокална микроскопия

OCT – оптична кохерентна томография

P – статистическа значимост

PMMA - полиметилметакрилат

SSCM – слит сканираща конфокална микроскопия

TSCM – тандем сканираща конфокална микроскопия

I. Въведение

Роговицата е основната статична пречупваща среда на окото, тя е ключова за качеството на зрението. Нейното значение се изразява чрез зрителната острота, но също така тя осигурява две трети от диоптричната сила на нормалното око. Допълнителна значимост на роговицата е нейната роля за контрастната чувствителност и финото цветно зрение.

Тя има сложна асферична форма, което затруднява осигуряването на прецизна качествена и количествена информация за нея, която е от особено значение при вземането на разумни терапевтични или рефрактивни решения с оптични средства или хирургически процедури.

В клиничната практика за изследване на очната повърхност в най-голяма степен се използва биомикроскопия. Ограничена от оптичния си принцип и от нейната резолюцията, изследването със светлинна биомикроскопия не позволява винаги да се разберат патологичните тъканни промени, както и физиологичните модификации на очната повърхност.

Конфокална микроскопия на живо, днес е достъпна за клиничните специалисти благодарение на технологичния прогрес, подобрената разделителна способност и опростената технология. Разработени са множество клинични приложения на тази образна техника. 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.

Микроскопското изследване на очните структури винаги е било и ще бъде предизвикателство за очните лекари и изследователи.

II. Цел и задачи

Цел

Основната цел е да се направи оценка на характеристиките на здравата роговица, използвайки съвременни високотехнологични методики за томографски и микроструктурен анализ в норма и на тази база да се установят патологичните промени при роговични дистрофии, засягащи различни слоеве.

Задачи

1. Анализ на микроструктурните характеристики на роговицата в норма
2. Анализ на микроструктурните характеристики на роговицата при роговични дистрофии, засягащи различни роговични слоеве, чрез съвременни методики
3. Приложение на микроструктурен анализ на живо с Heidelberg Retina Tomograph III Rostock Corneal Module на роговицата и конюнктивата при пациенти с роговични дистрофии, типични за българската популация
4. Оценка на промените на клетъчно ниво в динамика и създаване на критерии за оценка и прогноза във връзка с клиничния ход на заболяванията
5. Анализ на възможностите на микроструктурния анализ в ежедневната практика както при пациенти с доказана роговична дистрофия, така и при генетично рискови пациенти
6. Микроструктурна корелация *in vivo/ex vivo* на различни роговични структури

III. Материал и методи

За постигане на целта и задачите на настоящото проучване е използван широк спектър от научни и практически методи, включващи: класически и специални обективни методи, високоспециализирани съвременни методики за оценка на микроструктурата на роговицата.

В проучването са включени общо 250 очи на 131 индивиди, които са разделени в три групи.

Група I включва здрави роговици (норма) – 140 очи на 70 индивида на средна възраст 35 ± 3 г. (40 жени, 30 мъже), без системни или очни заболявания, нетретирани оперативно и/или медикаментозно, неносещи контактни лещи, BCVA ≥ 1.0 .

Очите от група I са разделени на следните подгрупи:

Група IA: 140 очи на 70 индивида са изследвани с лазер сканираща конфокална микроскопия, Heidelberg Retina Tomograph III – Rostock Cornea Module, HRT3-RCM.

Група IB: 60 очи на 30 индивида са изследвани с предносегментна оптична кохерентна томография (AS-OCT), OCT-3D Topcon 2000.

Група II включва 90 очи на 45 пациента. Критериите, по които са подбрани са липса на очни оперативни интервенции и патология, липса на употреба на топикални офталмологични медикаменти и/или контактни лещи. Писмено информирано съгласие е изискано от участниците, а всички изследвания са проведени при едни и същи стандартни условия.

Участниците са разделени както следва:

Група II A: 30 очи на 15 пациента с клинично оценена Епителиална дистрофия на базалната мембрана, известна още като map-dot-fingerprint дистрофия (MDF) или дистрофия на Cogan.

Група II Б: 24 очи на 12 пациента с клинично видима латисова дистрофия.

Група II В: 36 очи на 18 пациента с ендотелна дистрофия на Фукс, видима на биомикроскопия.

Всички очи с дистрофии на роговицата са изследвани чрез лазер сканираща конфокална микроскопия на живо, използвайки стандартната методика.

Група III включва 20 очи на 16 пациента с кератоконус, ектатична дистрофия на роговицата.

Всички очи в тази група са изследвани чрез лазер сканираща конфокална микроскопия на живо (HRT 3-RCM) и предносегментна оптична кохерентна томография (AS-OCT), OCT-3D Topcon 2000.

Всеки участник от всяка група 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 няколкократни пълни премигвания непосредствено преди извършване на всяко от изследванията.

Всички субекти са преминали предварително пълен очен преглед, включващ детайлна анамнеза, определяне на зрителната острота с необходимата корекция, биомикроскопия. Проведеното биомикроскопско наблюдение е последователно на ниско и на високо увеличение и има за цел изключване на роговични заболявания за индивидите, включени в група I или установяване наличието на клинични доказателства за съответните проследени роговични дистрофии, за съответните целеви групи (група IА, IБ и IВ както и група II). След това са извършени високоспециализираните изследвания на съответните групи.

Субектите са поканени да участват в проучването при условие, че имат навършени 18 години. Критериите за участие в проучването включват липса на очна оперативна интервенция, настояща или минала 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 противопоказание за включване в проучването, освен ако те не са с известен ефект върху роговицата или предния очен сегмент.

Всички изследвания са проведени при едни и същи условия, лично от автора.

Лазер сканираща конфокална микроскопия

За последните тридесет години клиничните техники за изследване на жива човешка роговица на глобално или клетъчно ниво са се развили експоненциално с развитието на спекуларната микроскопия, компютъризираната корнеална топография, високочестотната ултразвукова биомикроскопия и конфокалната микроскопия на живо. Въпреки че екс виво светлинната микроскопия и електронната микроскопия осигуряват детайлна информация, те са лимитирани от ефектите на тъканна дегенерация и наличието на артефакти, така както и от състоянието на съответната роговична тъкан. Неинвазивните методи на роговично изследване без хистологично изследване както на клетъчно така и на микроструктурно ниво са като Свещен Граал за корнеалните специалисти и клинични изследователи. Технологичния напредък на апаратурата и най-вече способността за изобразяване на тънки

оптични срезове на прозрачна структура, която рефлектира само 1% от постъпилата светлина, са дали сериозна възможност за развитие микроструктурния анализ на живо.

Съвременният конфокален микроскоп на живо е неинвазивен метод за изследване на жива човешка роговица в здраве и болест, и представлява иновативно и достоверно средство за клинични и научни изследвания.

Всички конфокални микроскопи използват един и същ основен принцип на дизайн, осигуряващ оптична дисекция на относително тънък, отразяващ светлината обект, каквато е роговицата. Светлината преминава през апертурата на апарата, фокусирана е чрез обективната леща върху малка площ от зоната на интерес на изследвана тъкан. Светлината рефлектира от зоната на материята, преминава през втората леща. Тази светлина е фокусирана върху втората апертура, която е поставена така, че да се избегне разфокусиране на светлина. Тъй като илюминационния и детектиращия път споделят един и същ фокален план, терминът „конфокален“ се използва за наименование на тази методика. Способността на тази система да разграничава между светлината, която не е в полетата фокалния план и аксиалната резолюция, ѝ дава предимство в сравнение със съответния светлинен микроскоп. Разбира се такава система е ограничена от малко поле на наблюдение. По-голяма площ може да бъде обследвана при сканиране на по-голяма площ от изследвания обект.

Самото изследване се осъществява или чрез придвижване на обекта, докато микроскопът остава неподвижен, или чрез придвижване на конфокалната система при стационарен обект на изследване. Съвременните in vivo конфокалните микроскопи използват изследване на стационарен обект. Скоростта, с която се получава едно изображение на област на интерес, определя времева резолюция на микроскопа. Това е важно, защото слабата времева резолюция се свързва с повишен брой артефактни движения. Когато изследването е на живи човешки същества, неволните движения са неизбежни поради сърдечни пулсации, дишане и движение на очите.

Всеки пациент в тази научна разработка е изследван с Heidelberg Retinal Tomograph III Rostock Cornea Module (HRT 3-RCM) от Heidelberg engineering GmbH, Heidelberg, Germany (Фигура 1). Използвана е абривиатура HRT 3-RCM.



Фигура 1. HRT 3-RCM се състои от основната част на микроскопа, глава на микроскопа и съответния обектив, камера, монтирана на странично рамо, позиции за положението на пациента – подбрадник и поставка за челото.

Стъпки при осъществяване на изследването

Подготовка на апарата (обектива на лещата)

Обективът на микроскопа се покрива със стерилна PMMA (полиметилметакрилат) шапка, ТомоСар, чията гладка повърхност е в контакт с роговичната повърхност на пациента (Фигура 2). Между Томо-Сар и обектива се поставя имерсионен гел с подходящ рефрактивен индекс. В конкретното изследване се прилага Corneregel, Vausch&Lomb GmbH, Germany. ТомоСар е стерилен и се използва индивидуално за всяко изследвано лице.



Фигура 2. Стерилен еднократен ТомоСар от PMMA за поддържане референтното разстояние между обектива и окото

Поставя се една капка гел от имерсиония гел върху главата да обектива и се покрива с индивидуалната ТомоСар (Фигура 3).



Фигура 3. Подготовка на обективната леща, поставяне на визкозната субстанция(горе) и покриване с Томо-Сар(долу)

Малка камера е монтирана върху странично рамо и дава възможност за страничен изглед на изследваното око и лещата на обектива, за да съдейства контролиране на положението на обектива и светещия лазерен лъч спрямо окото. Тя произвежда цветни изображения (640 x 480pixels) със скорост от 15 кадъра в секунда. Страничната камерата се измества така, че да дава ясен образ на изследваното поле.

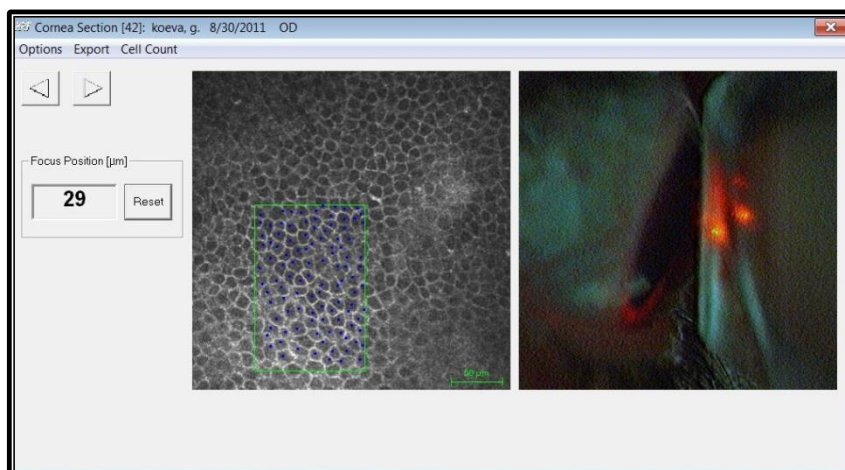
Отражението от имерсионния гел е много светло, почти бяло. Чрез наместване на фокусиращата система на микроскопа, той се поставя в позиция, която да показва максимално светъл(бял) екран и скалата за дълбочина в роговицата се нулира.

Подготовка на пациента

LSCM е контактен метод на изследване и е необходимо да се анестезирана очна повърхност. За целта се поставя една капка Alcaïn (0,5% collyr, Alcon).

Пациентът застава срещу апаратът така, че брадата и челото да са позиционирани в съответните опорни точки на апарата. Камерата се ориентира към пациента с помощта на компютърната настройка. Обективът на микроскопа се доближава до окото, докато постигне контакт с очната повърхност. Позицията на окото се наблюдава чрез страничната камера (Фигура 4).

Пациентът се инструктира да се фиксира върху външната светлинна фиксация с окото, което не се изследва в момента (Фигура 5). Компактният размер на микроскопската главата позволява контралатералното око на индивида да не се закрива и да се възпрепятства погледа.



Фигура 4. Изображение на компютърния екран на скан от LSCM (вляво) и картина от странично разположената камера (вдясно). В ляво се посочва фокусната дълбочина, на която се извършва заснемането



Фигура 5. Извършване на конфокална микроскопия

Камерата се премества към пациента, на разстояние 5-10 мм от роговицата на пациента. С помощта на ръкохватките за финна настройка на микроскопа обективът се поставя в средата на роговицата или върху друго поле, обект на наблюдение. На този етап може да се провери, дали червената светлина от лазера е точно в центъра на роговицата или да се наблюдава отражението на лазерния лъч от роговицата, което се вижда в образа на страничната камера. Аналогично се прави и фокусиране върху друга област от предния очен сегмент, която представлява обект на интерес.

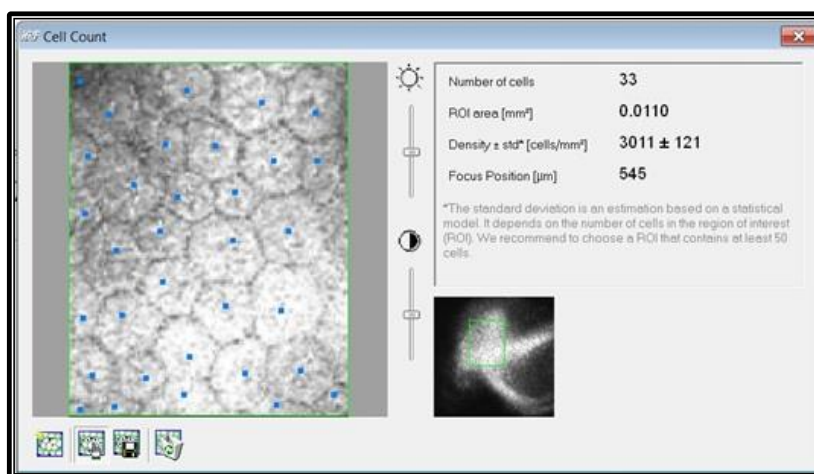
Всеки преглед може да отнеме от 5 до 15 минути в зависимост от сътрудничеството на пациента, като в някои случаи може да са необходими периоди на почивка, ако пациентът почувства дискомфорт. Обичайно се прилага скорост на заснемане от 8 изображения в секунда.

Обективът на микроскопа се доближава до окото до постигане на контакт с очната повърхност, позицията му се наблюдава чрез камера отстрани. Изследвана е централната част на роговицата при всички контролни очи. При постигане на визуализация на първите епителни клетки, ръчно се нулира брояча на метъра на позицията на обектива. След това започва постепенно навлизане и изследване на по-дълбоките роговични слоеве до достигане на изображение на роговичния ендотел. Апаратът е настроен да сканира в режим "section", при който се правят срезове с ръчен контрол на дълбочината на сканиране.

Анализ на изображенията

Изображенията на епителния слой са първите ясни образи на клетките на базалния епителен слой. За визуализация на предната строма са приети първите три ясни снимки на стромални кератоцити, които са получени непосредствено след визуализирането на слоя на Бауман. 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 слоя на Бауман и пред Десцетовата мембрана при изследване на цялата дебелина на роговицата. Z-дистанцията (вертикалното разстояние) между трите снимки от серия е средно 2 μm .

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 клетъчната гъстота е изчислена с помощта на вградения софтуер на апарата (Фигура 6).



Фигура 6. Полуавтоматично клетъчно изброяване и изчисляване на плътността на ендотелни клетки на здрава роговица

Изчислена е гъстотата на клетките от следните роговични слоеве: базален епител, предна, средна и задна строма, ендотел. Средната плътност на клетките е изчислена брой клетки на mm^2 , а не като обемна плътност ($\text{кл}/\text{mm}^3$), тъй като се търси клетъчна плътност на определена дълбочина на слоя. Данните са представени като гъстота на клетките \pm стандартното отклонение ($\text{кл}/\text{mm}^2 \pm \text{SD}$).

Оптична кохерентна томография

Оптичната кохерентна томография (ОСТ) се използва все по-често за изследване на патологични състояния на предния очен сегмент, както и за визуализиране на хирургичната микроанатомия, по-специално за биометрия на предната очна камера, картиране на дебелината на роговицата, оценка на преднокамерния ъгъл, както и изобразяване на тъканта с висока резолюция при напречен срез. Способността на оптичната кохерентна томография да изобразява тъканите при напречен срез е сходна с тази на ултразвуковия метод, но по-високата му разделителна способност позволява визуализиране и измерване на много фини анатомични структури. При тази методика не е необходим контраст.

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 $5\text{-}6\mu\text{m}$. Дистанцията на изследване с предносегментната приставка на апарата е $63,7 \text{ mm}$, скоростта е $27\,000$ А-скана в секунда при обхват $6 \times 6 \text{ mm}$, а дълбочината на скана е $2,3 \mu\text{m}$. Светлинният източник е суперлуминесцентен диод с дължина на вълната 840 nm , полу-ширина на снопа 50 nm (Фигура 7).



Фигура 7. 3D Торсон 2000 – оптичен кохерентен томограф, използван в научната разработка

Оптичната кохерентна томография е неконтактен метод за образна диагностика, който осигурява детайлно изобразяване при

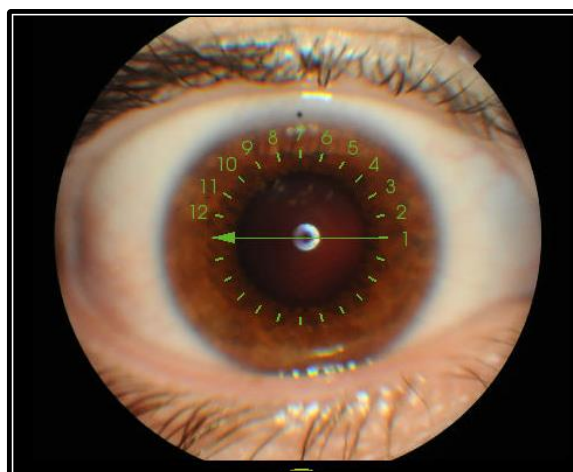
напречен срез на структурата на биологичните тъкани [159], [160]. Поради бурното развитие на корнеалната рефрактивна хирургия в последните години усилено се работи в посока усъвършенстване на предносегментното приложение на ОСТ, особено за изследване на топографските и микроструктурни характеристики на роговицата.

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 (Фигура 8).

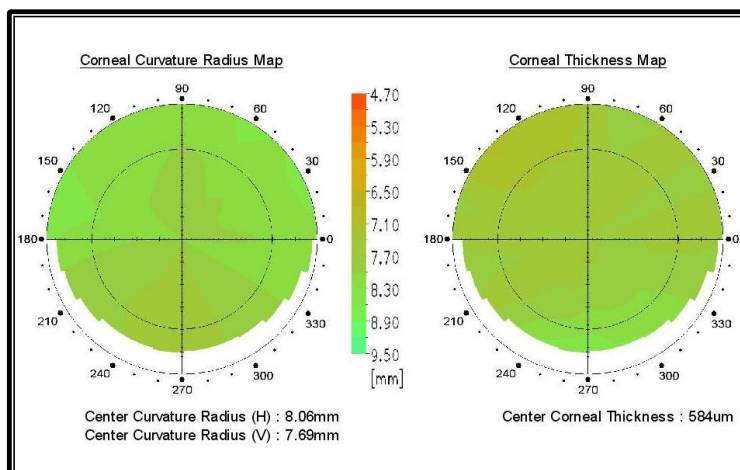


Фигура 8. Изследване с оптична коферентна томография

Осъществени са 12 радиални (1024 A line) и 3D (6x6 mm, 512x128) сканове на роговицата на двете очи (Фигура 9). Центрацията при всяко изследване е на зрителната ос. Роговичните дебелини са измерени и представени като цветно кодирани карти, на които е изчислена автоматично централната роговична дебелина. Картите са анализирани и класифицирани.



Фигура 9. Радиал скан при изследване с предносегментна оптична кохерентна томография



Фигура 10. Карта на здрава роговица при изследване с предносегментна оптична кохерентна томография

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°) (Фигура 10).

Статистически анализ

С цел по-лесното и качествено проследяване на пациентите набраните данни са въведени в табличен вид в Microsoft Excel, версия 2010 (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 произволна 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 са приети всички стойности с $P < 0,05$.

IV. Резултати

1. Оценка на роговичната микроструктура в норма

Роговичната микроструктура в норма беше оценена с помощта на лазер сканиращата конфокална микроскопия на живо, Heidelberg Retina Tomograph III Rostock Cornea Module (HRT 3-RCM). Бяха изследвани роговиците на 70 възрастни индивида, всеки изследван двуочно, общо 140 очи (група IA). Средната възраст на участниците е 35 ± 3 години, от които 30 мъже и 40 жени (съответно 42,85% и 57,15%). Извършен беше квантитативен и квалитативен микроструктурен анализ с цел да се установят нормалните характеристики на роговицата на българската популация. Демографските характеристики на изследваната популация са представени в Таблица 1.

Таблица 1. Характеристики на здравите индивиди от група IA, изследвани чрез лазер сканиращата конфокална микроскопия на живо, Heidelberg Retina Tomograph III Rostock Cornea Module (HRT3-RCM).

Демографски характеристики на здравите индивиди	
Възраст (години)	35 \pm 3
Общо	70
Мъже	30 (42,85%)
Жени	40 (57,15%)
Брой очи (общо)	140
Раса – Европейска	70

Качествен анализ

На базата на лазер сканираща конфокална микроскопия на живо беше оценен всеки роговичен слой. Качественият анализ показва добре отграничен епителен слой с лесно различими криловидни и базални клетки. Суббазален нервен плексус се наблюдава в зоните между базалния клетъчен слой и горната повърхност на мембраната на Бауман. Стромата се визуализира с характерни ядрени структури – кератоцити, които са с различна гъстота в отделните нива на роговицата. Ендотелът на конфокална микроскопия изглежда като правилно подредени шестоъгълни клетки, формиращи мозайка оприличавана на „пчелна пита“.

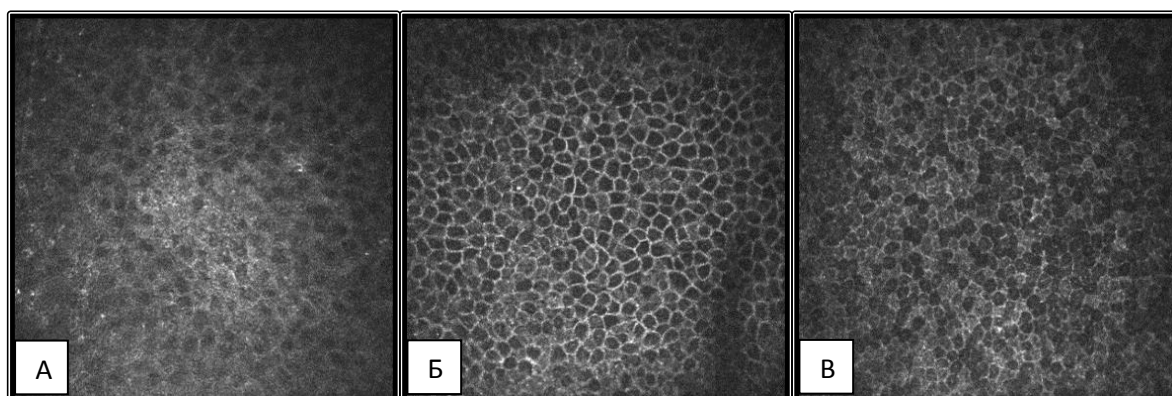
За детайлното анализиране на микроструктурно ниво на здрава роговица чрез лазер сканираща конфокална микроскопия на живо е необходимо разделянето на епителния слой на три подравнища:

повърхностни епителни клетки, слой на криловидните клетки и базален епителен слой.

Повърхностните епителни клетки (Фигура 11А) са полигонални клетки, с тъмна централна част и със светло ядро, обградено от тъмно хало. Те са с по-големи размери от подлежащите базални епителни клетки.

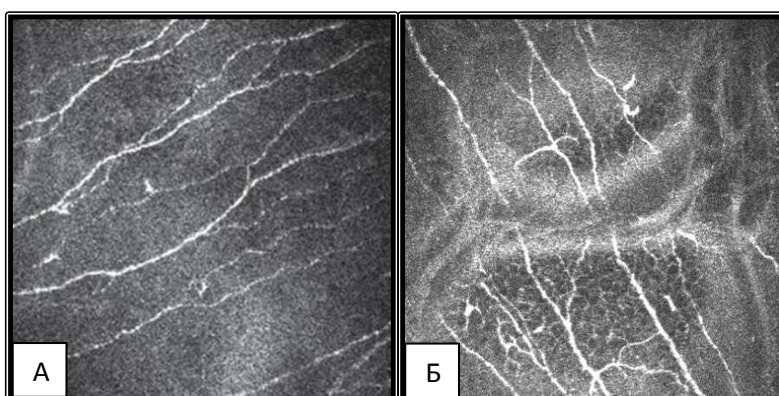
Криловидните клетки са по-малки, те представляват прехода между повърхностните епителни и базалните епителни клетки. Тяхната структура се отличава със светли клетъчни стени, тъмна цитоплазма и светло ядро без тъмно хало (Фигура 11Б). Ядрата не са винаги видими.

Базалният епител се визуализира като еднородни тъмни клетки със светли граници (Фигура 11В). Ядрото на тези клетки е трудно различимо, те са плътно подредени една до друга и изглеждат като правилно подредена мозайка от клетки с тъмна цитоплазма и светли граници.



Фигура 11. Конфокална микроскопия на живо на здрава роговица, демонстрираща повърхностен роговичен епител (А), слой на криловидните клетки (Б), базални епителни клетки (В)

Суббазалните роговични нерви прилежат към базалния епител и са със средно изразена рефлексивност, обикновено имат прав ход. Ясно видими са и имат добре отграничени граници (Фигура 12).

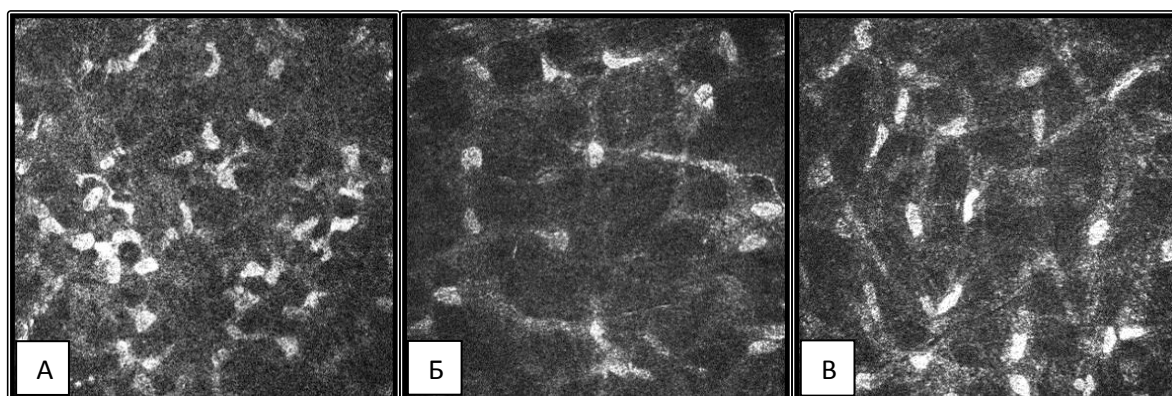


Фигура 12. Конфокална микроскопия на живо на здрава роговица, демонстрираща суббазален нервен плексус, прав ход на нервните влакна (А) и разклонения(Б)

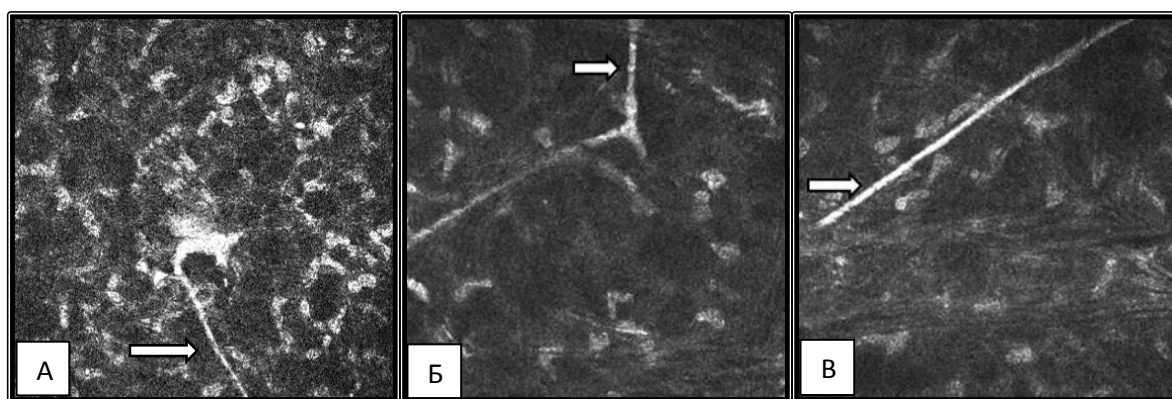
На конфокална микроскопия на живо при картографиране на нервите от суббазалния нервен плексус може да се формира картината на „завихряне“, което има центростремително движение.

Подлежащата аморфна структура, определяна като слой на Бауман се изобразява само и единствено когато има патологични изменения и при наличие на патологични структури. При здрава роговица този слой не може да се отграничи при изследване чрез лазер сканираща конфокална микроскопия на живо.

Стромата е най-големият по дебелина слой. При детайлно разглеждане на изображенията, този слой се разделя на предна, средна и задна строма. Ядрата на кератоцитите изглеждат разнородни морфологично, структури с изразена хиперрефлексивност, с овална форма 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, а понякога и неправилна форма (Фигура 13). Стромалните роговични нерви също се визуализират при конфокална микроскопия като хиперрефлексивни структури – с ясни граници и прав ход (Фигура 14).



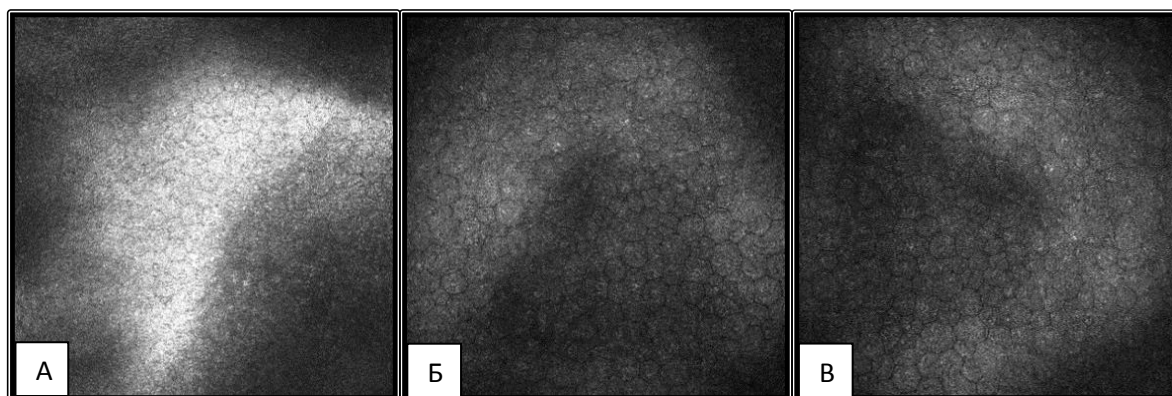
Фигура 13. Конфокална микроскопия на живо на здрава роговица, демонстрираща кератоцити в предна строма (А), средна строма с умерена гъстота кератоцити (Б), задна строма с разреждане плътността на кератоцитите(В)



Фигура 14. Конфокална микроскопия на живо на здрава роговица, демонстрираща роговични нерви на ниво предна строма (А), средна строма (Б) и задна строма (В)

Десцетметовата мембрана обикновено е неразличима от заобикалящите слоеве при очи без патология, подобно на слоя на Бауман. Тя може да бъде разглеждана при наличие на болестни изменения.

Ендотелът е най-вътрешния роговичен слой и се състои от монослой от шестоъгълни клетки, разположени в равномерна мозайка. На конфокална микроскопия на живо ендотелът се визуализира като мозайка от хексагонални светли клетки с тъмни граници (Фигура 15). В здравата роговица не се изобразяват ядрата на клетките. Наличието на видими клетъчни ядра е белег за страдание на ендотела и персистиране на болестен процес.



Фигура 15. Конфокална микроскопия на живо на здрава роговица, демонстрираща правилна структура и подреденост на клетките и нормална големина на клетките от роговичния ендотел (А, Б, В)

Ендотелните клетки са ясно отграничени, те са разделени от тъмни клетъчни граници. Само понякога ядрата могат да бъдат разграничени от високорефлексивните тела на клетките, и обикновено това може да се приеме като патологичен белег.

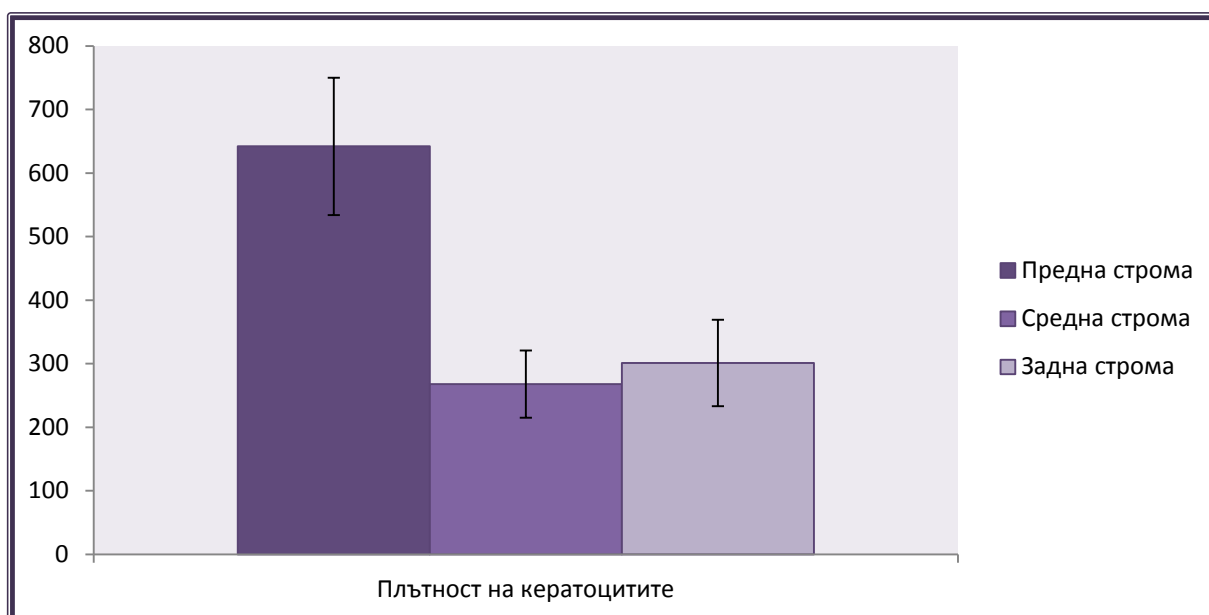
Количествен анализ

Количественият анализ на изследваната здрава роговица с лазер сканираща конфокална микроскопия на живо показва, че плътността на базалните епителни клетки при очите от тази контролна група е 5717 ± 753 кл/мм². Гъстотата на кератоцитите от предната строма е 642 ± 108 кл/мм², а в средна строма е 268 ± 53 кл/мм². Установената плътност на задностромалните кератоцити е 301 ± 68 кл/мм². Изчислената гъстота на ендотелните клетки е 2975 ± 434 кл/мм². Тези стойности са поместени в Таблица 2.

Таблица 2. Количествения анализ на клетъчните елементи в здрава роговица, изчислена клетъчна плътност в клетки на мм^2 (клетки/ мм^2)

	Плътност на клетките
Базални епителни клетки	5717±573 кл/ мм^2
Кератоцити – предна строма	642±108 кл/ мм^2
Кератоцити – средна строма	268±53 кл/ мм^2
Кератоцити – задна строма	301±68 кл/ мм^2
Ендотел	2975±434 кл/ мм^2

Клетъчната гъстота е различна в дълбочината на стромата. Стромата се подразделя на три отдела според нивото на дълбочина. Най-висока е клетъчната плътност в предната строма, която значително намалява в средните и задните слоеве на стромата. Резултатите са представени графично на Фигура 16.



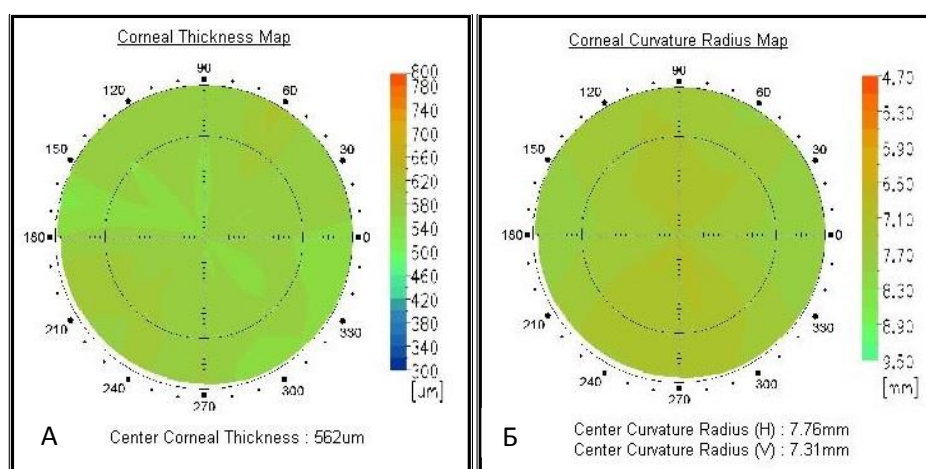
Фигура 16. Количествен анализ на клетъчни елементи на здрави роговици, демонстриращи плътността на кератоцитите в отделните роговични слоеве, изчислени в клетки/ мм^2 , посочено е стандартното отклонение

2. Оценка на томографските характеристики на роговица в норма

В група IB са включени 60 очи на 30 индивида, изследвани с предно-сегментна оптична кохерентна томография, OCT-3D Topcon 2000. В тази група 18 са жени (60%) и 12 са мъже (40%), (Таблица 3). За целта на проучването са измерени централната роговична дебелина и роговичните радиуси на клинично здрави роговици (Фигура 17).

Таблица 3. Демографски характеристики на здравите индивиди от група ІВ, изследвани с предно-сегментна оптична кохерентна томография, ОСТ-3D Topcon 2000.

Демографски характеристики на здравите индивиди	
Възраст (години)	29,25±4
Общо	30
мъже	12 (40%)
жени	18 (60%)
Брой очи (общо)	60
Раса - Европейска	30



Фигура 17. Цветно кодирана пахиметрична карта(А) и карта на роговичните кривини(Б) на здрава роговица, предносегментна оптична кохерентна томография, ОСТ-3D Topcon 2000

Максималната измерена дебелина на роговицата централно (ССТ) е 599µm. Минималната корнеална дебелина в централната зона при този метод на измерване е 524µm. Калкулираната средната стойност на ССТ е изчислена $577,7 \pm 24 \mu\text{m}$ (Таблица 4).

Таблица 4. Централна роговична дебелина на здрава роговица, изчислена с помощта на предносегментна оптична кохерентна томография, ОСТ-3D Topcon 2000.

Централна роговична дебелина на здрава роговица	
Средна стойност	$577,7 \pm 24 \mu\text{m}$
Максимална стойност	599 µm
Минимална стойност	524 µm

На цветно кодираните елевационни роговични карти на изследване чрез оптична кохерентна томография средната стойност на радиуса на роговична кривина на 90° е $7,39 \pm 0,26\text{mm}$. Максималната

стойност на радиуса на роговична кривина по този меридиан е 7,96мм, а минималната измерена стойност е 6,79мм. По меридиана на 180° средният измерен радиус е 7,70±0,31мм. Максималната стойност на радиуса на роговична кривина по този меридиан е 8,34мм, а минималната установена стойност е 6,91 мм. Стойностите от резултатите от цветно кодирани елевационни роговични карти на ОСТ са представени в Таблица 5.

Таблица 5. Роговични кривини на здрава роговица, изчислени с помощта на предносегментна оптична кохерентна томография, ОСТ-3D Topcon 2000.

	Радиус на роговична кривина на 90°	Радиус на роговична кривина на 180°
Средна стойност	7,39±0,26 мм	7,70±0,31 мм
Максимална стойност	7,96 мм	8,34 мм
Минимална стойност	6,79 мм	6,91 мм

3. Оценка на роговични дистрофии, най-често срещани в България, засягащи различни роговични слоеве

В тази част на проучването са изследвани общо 90 очи на 45 пациента с роговични дистрофии. Подборът на пациентите е извършен проспективно след проведен клиничен преглед, снета анамнеза и офталмологичен биомикроскопски оглед. Таблица 6 демонстрира разпределението на отделните групи изследвани лица.

Таблица 6. Разпределение на изследваните пациенти с роговични дистрофии, включени в проучването.

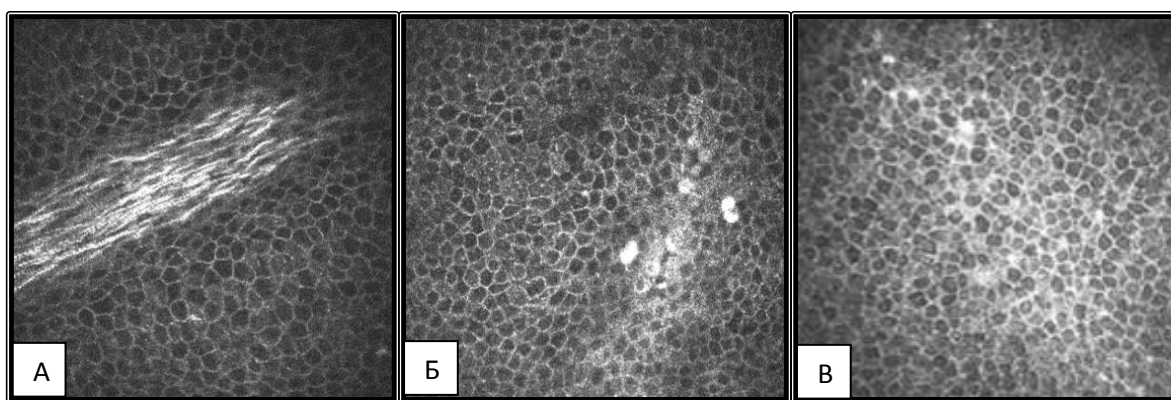
Повод за преглед	Епителиална дистрофия на базалната мембрана	Латисова дистрофия	Дистрофия на Фукс
Брой пациенти	15	12	18
Брой очи	30	24	36
Възраст (години)	44±5	38±9	49±10
Жени	8 (53,33%)	9 (75%)	14 (77,78%)
Мъже	7 (46,67%)	3 (25%)	4 (22,22%)
Раса - Европейска	15	12	18

Епителиална дистрофия на базалната мембрана

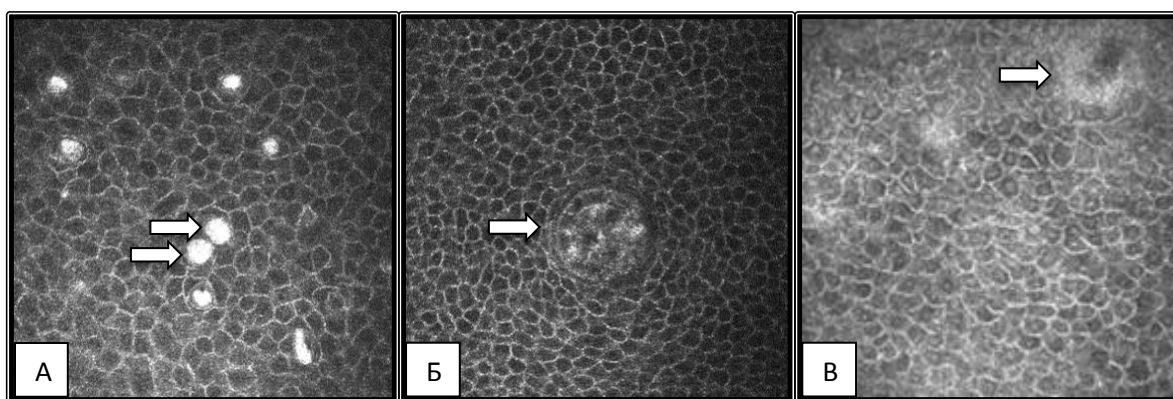
В групата пациенти с епителиална дистрофия на базалната мембрана са включени 15 случая, изследвани са и двете очи на всеки чрез лазер сканираща конфокални микроскопия на живо (HRT3-RCM).

Качествен анализ

При качествения анализ на изображенията в базалния епител и на различни нива в стромата са установени характерни промени. На ниво базален епител изображенията от лазер сканираща конфокална микроскопия на живо демонстрират линейарни структури, обградени от епител с променена морфология (Фигура 18), те се определят като ерозии по епителния слой. Наблюдава се абнормност в структурата на базалната мембрана. Предполага се, че наличните изменения могат да бъдат характеризирани като клетки на възпалението и Лангерхансови клетки. Откриват се неправилни депозити, с окръглена или пръстеновидна форма и малки хиперрефлекторни микрокисти, разположени в базалните клетки (Фигура 19).

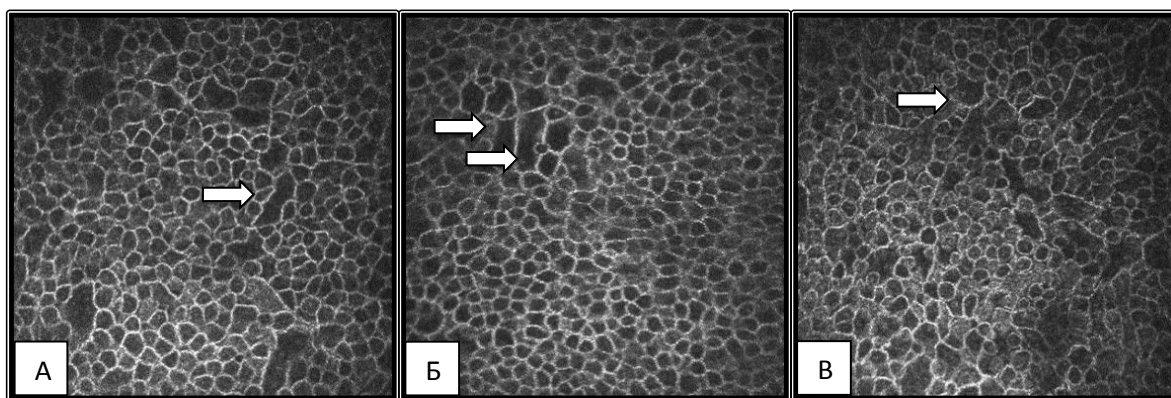


Фигура 18. Конфокална микроскопия на живо на роговица с епителиална дистрофия на базалната мембрана - демонстрация на линейарни (А) и дифузни натрупвания на ниво базални епителни клетки (Б, В)



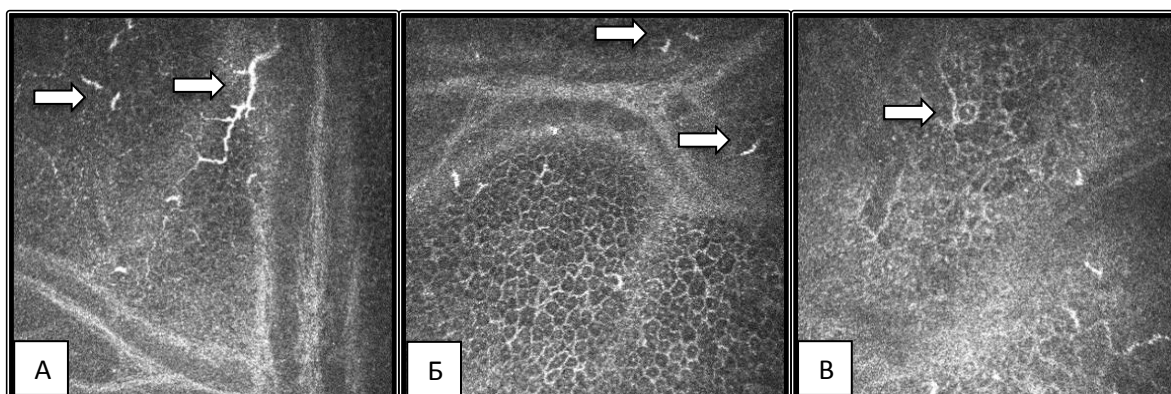
Фигура 19. Конфокална микроскопия на живо на роговица с епителиална дистрофия на базалната мембрана - демонстрация на малки хиперрефлекторни микрокисти (А), окръглени натрупвания (Б) и депозити с неправилна форма (В)

Клетките на базалния епител демонстрират плеоморфизъм и изменения в правилната подредба, форма и големина на епитела (Фигура 20). На места се виждат клетки със силно увеличена по размер повърхност, попълващи дефекти поради липсващи съседни клетки и конфлуиращи помежду си.



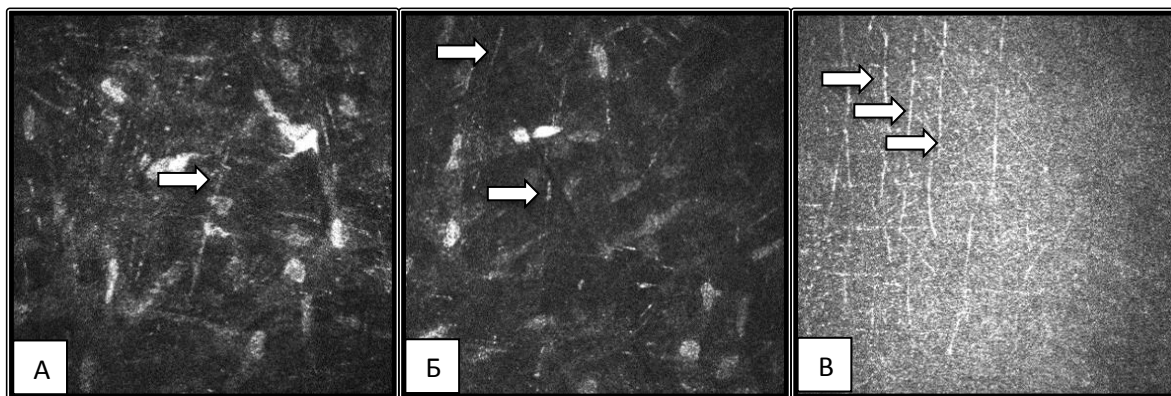
Фигура 20. Конфокална микроскопия на живо на роговица с епителиална дистрофия на базалната мембрана - демонстрация на епителни клетки с изменена форма(А), увеличени размери и разнородна големина(Б), нарушена архитектоника (В)(със стрелки)

На нивото на суббазален нервен плексус се откриват пръснати клетки с неправилна форма, определяни в литературата като дендритни клетки. Установени са и промени в структурата на суббазалните нерви, характеризиращи се с нарушена структура и редуцирани до липсващи разклонения (Фигура 21).



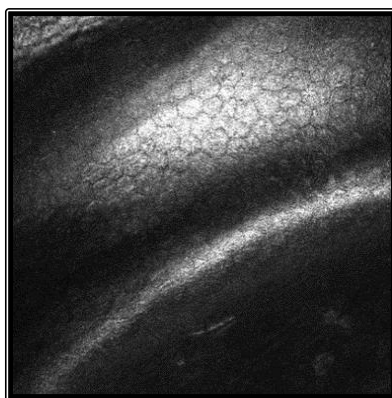
Фигура 21. Конфокална микроскопия на живо на роговица с епителиална дистрофия на базалната мембрана – демонстрация на ниво на суббазален нервен плексус - пръснати хиперрефлексивни дендритни клетки (със стрелки) (А); неправилна форма и различни размери нервни влакна(Б, В)

В стромата на различна дълбочина, но най-често в задните отдели, се наблюдават високорефлексивни, тънки, наподобяващи игли структури (Фигура 22). По-често тези промени са в по-дълбоките слоеве на роговицата, (450-475 μ m).



Фигура 22. Конфокална микроскопия на живо на роговица с епителиална дистрофия на базалната мембрана на ниво строма - демонстрация тънки хиперрефлекторни линии, наподобяващи игли в предна строма (А), средна строма (Б) и особено в задна строма (В)

В ендотелната микроструктура не са регистрирани съществени качествени изменения (Фигура 23). Изобразените клетки са с правилна хексагонална форма, без видими ядра, но с ясни граници, с типично плътно подреждане.



Фигура 23. Конфокална микроскопия на живо на роговица с епителиална дистрофия на базалната мембрана – демонстрация на ендотелни клетки, липса на патологични изменения

Количествен анализ

Количественият анализ на изследването с лазер сканираща конфокална микроскопия на живо показва плътността на базалните епителни клетки при изследването от тази група. Изчислена е 4488 ± 679 кл/мм². Гъстотата на кератоцитите от предната строма е 217 ± 20 кл/мм², съответно в средна строма – 268 ± 35 кл/мм² и плътността на задностромалните кератоцити е 252 ± 25 кл/мм². Установената плътност на ендотелните клетки е 2445 ± 917 кл/мм². Тези стойности са прегледно демонстрирани в таблица 7.

Таблица 7. Плътност на клетките (клетки/мм²) на роговиците на пациенти с доказана клинично епителна дистрофия на базалната мембрана в сравнение със здрави роговици

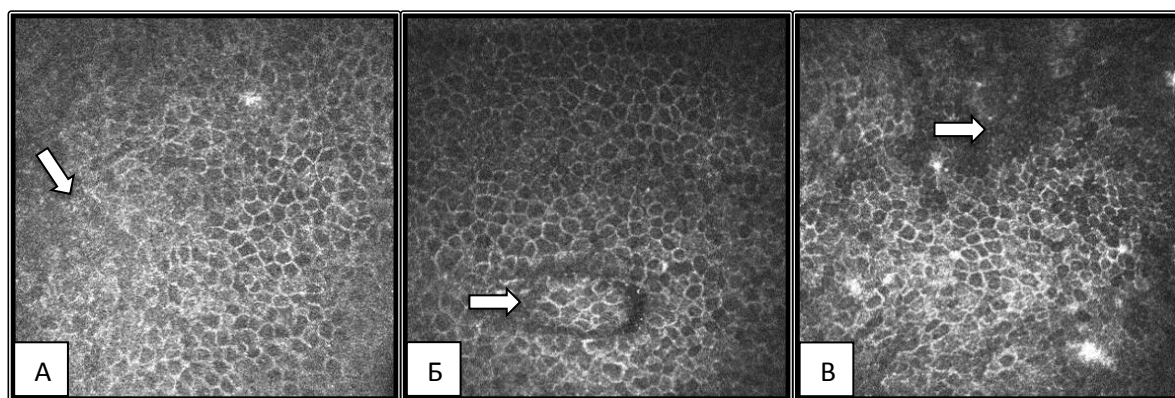
	Плътност на клетките		
	Епителна дистрофия	Здрава роговица	P
Базални епителни клетки	4488±679	5717±573	P<0,05
Кератоцити – предна строма	217±20	642±108	P<0,01
Кератоцити – средна строма	268±35	268±53	P>0,05
Кератоцити – задна строма	252±25	301±68	P<0,05
Ендотел	2445±917	2975±434	P<0,05

Латисова дистрофия

В проучването са включени 24 очи на 12 пациента с латисова дистрофия. В тази група преобладават жените (9 жени и 3 мъже). На всеки участник са изследвани и двете очи чрез лазер сканираща конфокална микроскопия на живо Heidelberg Retinal Tomograph III Rostock Cornea Module (HRT3-RCM).

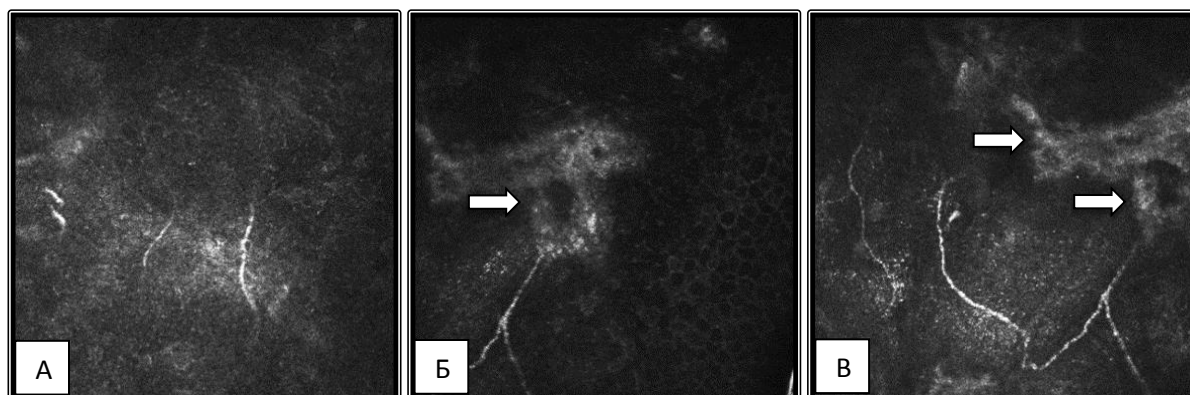
Качествен анализ

Изображенията от извършената конфокална микроскопия на живо показват наличието на съществени промени в стромата, характеризиращи се с наличието на линии, кръстосващи и конфлуиращи помежду си. Между тях могат да се наблюдават белезникави депозити. На ниво епител се наблюдава нормална структура с атрофични полета. Вероятно това е и доказателството за нарушена дегенерация на базалните епителни клетки (Фигура 24).



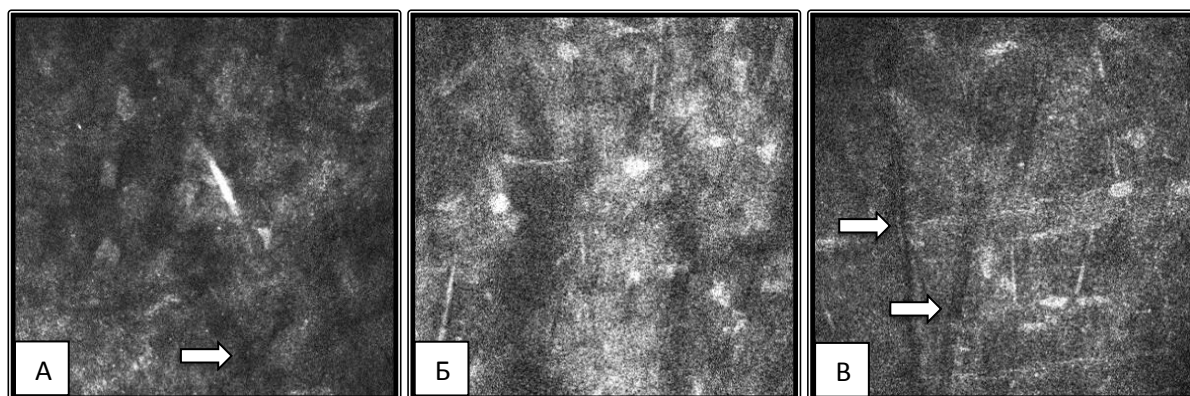
Фигура 24. Конфокална микроскопия на живо на роговица с латисова дистрофия – демонстрация на клетки на епителния слой със запазена структура и поле със загуба на клетъчна плътност (А); атрофична зона с нарушена дегенерация на базалните епителни клетки (Б); нарушена демаркация на отделните епителни клетки (В)

Суббазалните нерви са по-тънки, с намалена гъстота и не са лесно видими. Фигура 25 представя скан от ниво на суббазалния нервен плексус и наличие на депозити, с неправилна форма, между които се виждат нервни влакна, с „накъсана“ структура.



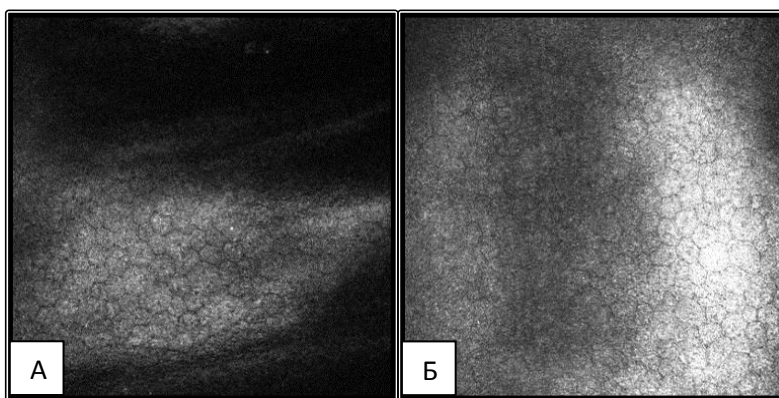
Фигура 25. Конфокална микроскопия на живо на роговица с латисова дистрофия – демонстрация на ниво на суббазален нервен плексус – намалена до липсваща структура а влакната с редукция на разклоненията им (А); наличие на депозити с неправилна форма (посочени със стрелки) сред базалните нерви (Б, В);

Депозитите, вероятно амилоидни, са основно в стромата. Те са слабо отграничени от основната тъкан. При латисова дистрофия в стромата се наблюдават линейарни разклонения с променлива интензивност (от хиперрефлексивни и ясновидими линии до едва забележими линии без рефлексивност), (Фигура 26).



Фигура 26. Конфокална микроскопия на живо на роговица с латисова дистрофия – демонстрация на линейарни структури на ниво предна строма (А); на ниво средна строма има множество депозити (Б); наличие на стромални линии с различна степен на разклоненост в задна строма (със стрелки) (В)

На ниво ендотел не се установяват съществени качествени промени, ендотелните клетки са със запазена полигонална форма, светла цитоплазма, добре видими и подчертани клетъчни стени (Фигура 27). Ядрата на ендотелните клетки не се визуализират.



Фигура 27. Конфокална микроскопия на живо на роговица с латисова дистрофия – демонстрация на ендотелен клетъчен слой (А, Б)

Количествен анализ

Количественото проследяване на плътността на клетките в отделните слоеве при очите с латисова дистрофия не показва сериозни отклонения от резултатите на групата от здрави роговици. Епителните клетъчна гъстота е изчислена на 4479 ± 1072 кл/мм². Броят на кератоцитите се запазва сравнително еднакъв в предна и средна строма, съответно 225 ± 59 кл/мм² и 221 ± 10 кл/мм². В задна строма наблюдаваме леко повишаване на гъстотата им, установената стойност е 261 ± 23 кл/мм². Ендотелната гъстота се запазва висока до 2877 ± 242 кл/мм². За по-прегледно представяне информацията е поместена в таблица 8.

Таблица 8. Плътност на клетките (клетки/мм²) на роговиците на пациенти с доказана клинично латисова дистрофия в сравнение със здрави роговици

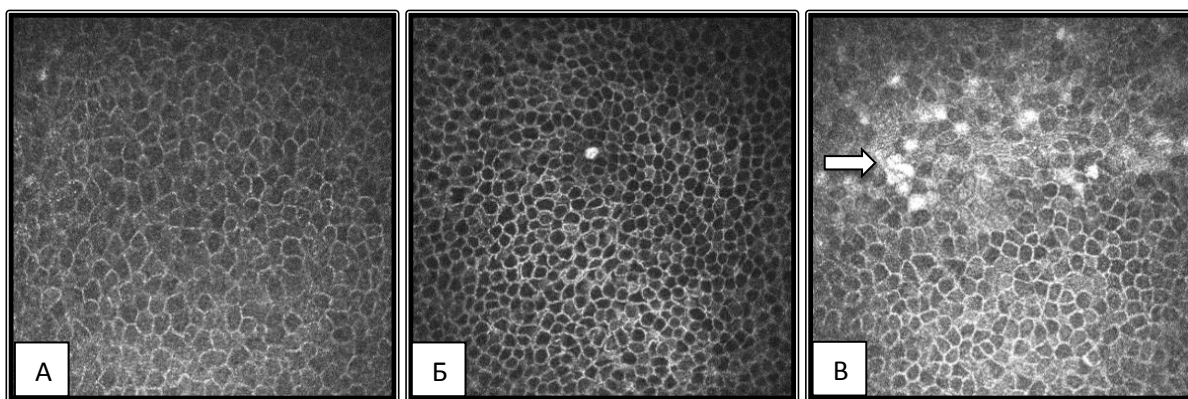
	Плътност на клетките		
	Латисова дистрофия	Здрава роговица	
Базални епителни клетки	4479 ± 1072	5717 ± 573	P<0,05
Кератоцити – предна строма	225 ± 59	642 ± 108	P<0,01
Кератоцити – средна строма	221 ± 10	268 ± 53	P>0,05
Кератоцити – задна строма	261 ± 23	301 ± 68	P<0,05
Ендотел	2877 ± 242	2975 ± 434	P<0,05

Дистрофия на Фукс

В тази част на проучването чрез лазер сканираща конфокална микроскопия са изследвани 36 очи на 18 пациенти с клинично диагностицирана дистрофия на Фукс. Сред изследваните в тази група значително преобладават жените, те са 14 и четирима мъже. Всеки пациент е изследван двуочно чрез лазер сканираща конфокална микроскопия на живо (HRT 3-RCM).

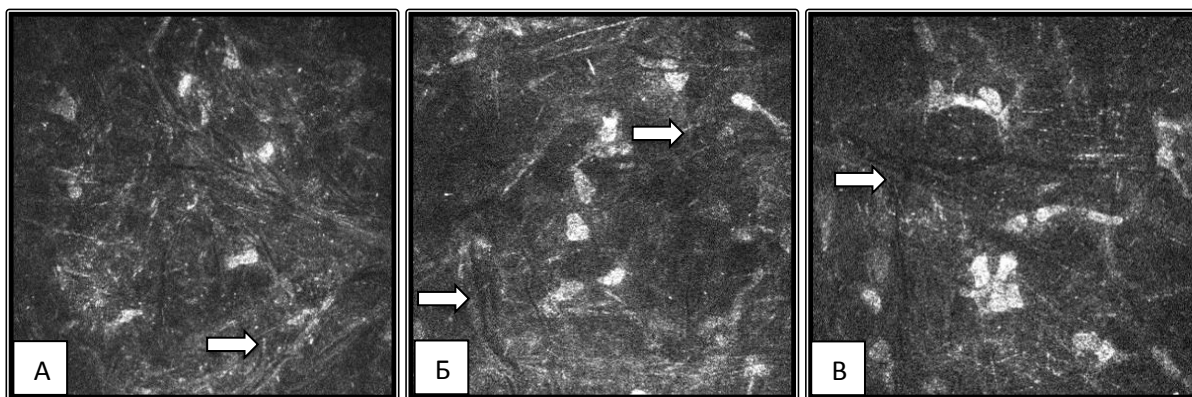
Качествен анализ

Основната отличителна характеристика на дистрофията на Фукс са промените по ендотела, като характерна е „трапчинковидна“ структура или структура на ендотела, осеяна с „кратери“. Тези промени са съпроводени с промени в характеристиките на отделните ендотелни клетки като форма и големина. Интересно е, че качествените промени засягат и останалите роговични слоеве. Цялостта и здравината на епитела са нарушени, доказателства за което са видимите були по епитела и промените в самите клетки, те са с хиперрефлексивни ясни и светли стени (Фигура 28). Повишена рефлексивност се наблюдава и в слоя на Бауман. На ниво суббазален нервен плексус не се визуализира клетъчна структура.



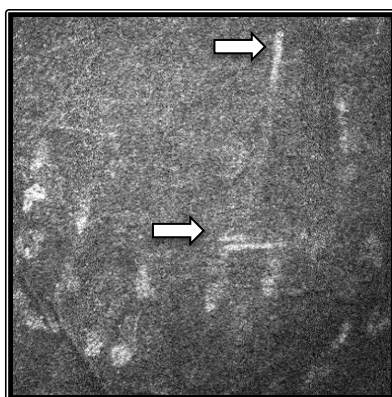
Фигура 28. Конфокална микроскопия на живо на роговица с дистрофия на Фукс - демонстрация на повърхностен слой от криловидни клетки(А) и базален епителен слой с хиперрефлексивни клетъчни стени (Б); епителни клетки с наличие на повърхностен дефект и натрупване на депозити (със стрелка)(В)

Стромата има характерен вид поради наличие на множество лакуни и линейни гънки. Колагеновите фибри изглеждат неясни и замъглени, което е доказателство за наличния роговичен едем (Фигура 29). Ламелите изглеждат раздалечени поради наличието на натрупана течност във вътрешността на стромата.



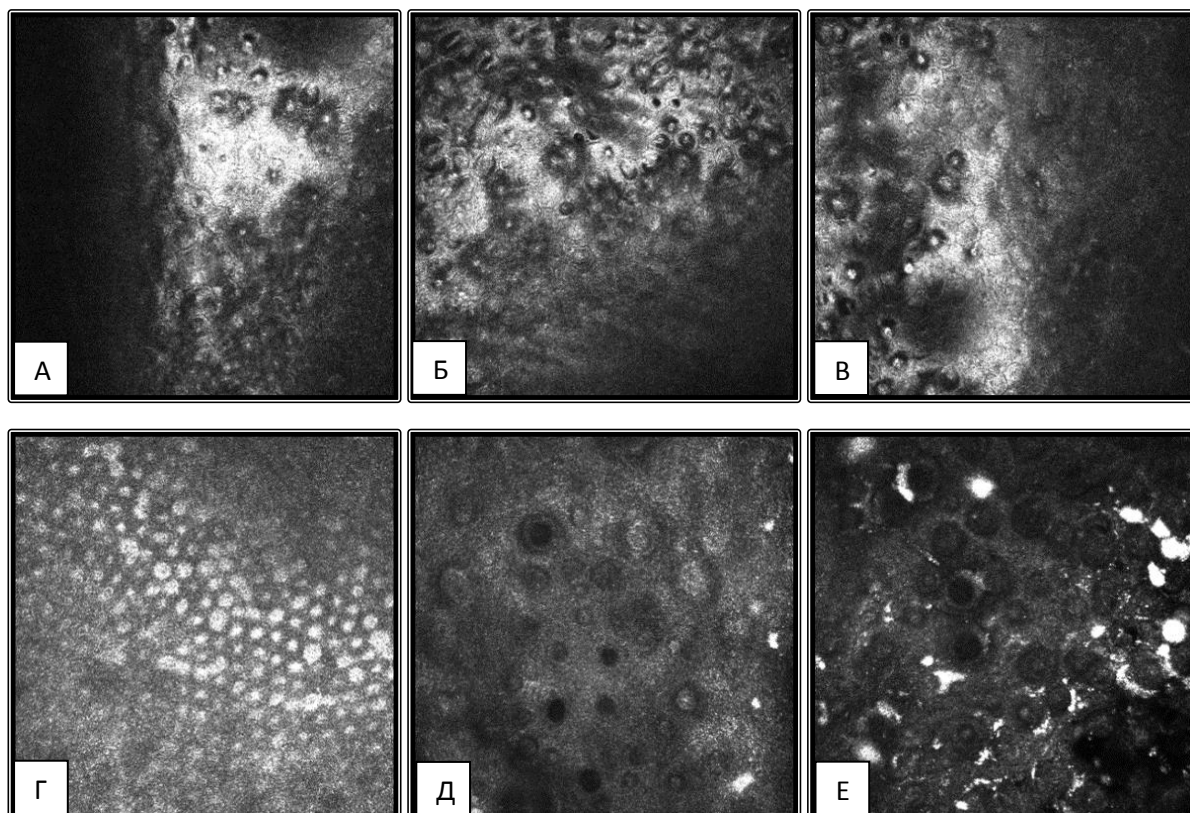
Фигура 29. Конфокална микроскопия на живо на роговица с дистрофия на Фукс - демонстрация на промени в предна(А), средна (Б) и задна строма(В)

Характерно за тази дистрофия е задебелената Десцеметова мембрана (Фигура 30), която се визуализира при изследване с конфокална микроскопия. На това ниво се наблюдават и хиперрефлексивни линии, разположение по самата мембрана.



Фигура 30. Конфокална микроскопия на живо на роговица с дистрофия на Фукс – демонстрация на Десцеметовата мембрана и наличие на хиперрефлексивни линии(със стрелки)

Ендотелните промени са най-характерните изменения при дистрофията на Фукс (Фигура 31.).



Фигура 31. Конфокална микроскопия на живо на роговица с дистрофия на Фукс – демонстрация на кръгли хипорефлексивни зони с различна големина и гъстота в централната част на ендотела (А,Б); трудно разграничими ендотелни клеткис неясни граници (В); корнеа гутата: светли зони, заобиколени с тъмно хало(Г); колагенови брадавицовидни натрупвания (Д); пигментни депозити (Е)

Клетките на ендотела са с увеличен диаметър и площ, като трудно се отдиференцират отделните клетки и целият слой изглежда като една обща клетъчна маса. Изобразяват се кръгли хипорефлективни зони с различна гъстота и големина, определяни като везикуларни лезии. Колагенови брадавицовидни натрупвания се наблюдават на фона на ендотелни клетки, загубили своята еднаквост, клетките са с различни, често нарастващи размери и разнообразна форма, с липсваща хексагоналност. Снимките от конфокалната микроскопия на живо доказват промените по ендотела, които в литературата са обединени под термина корнеа гутата. За тези промени е характерно наличието на множество светли точковидни зони заобиколени от тъмно хало.

Количествен анализ

Количественият анализ на конфокалните изображения при очите от тази група показва висока гъстота на епителните клетки 4802 ± 1183 кл/мм². Установената плътност на средно- и задностромалните кератоцити е почти еднаква, 289 ± 55 кл/мм² и 278 ± 46 кл/мм². В предната част на стромата клетките са с по-ниска плътност, 213 ± 42 кл/мм². Най-голямо впечатление прави значително ниската клетъчна гъстота на ендотела в засегнатите очи, която е изчислена на 1399 ± 579 кл/мм² (Таблица 9).

Таблица 9. Плътност на клетките (клетки/мм²) на роговици на пациенти с доказана клинично дистрофия на Фукс и в сравнение със здрави роговици

	Плътност на клетките		
	Дистрофия на Фукс	Здрава роговица	P
Базални епителни клетки	4802 ± 1183	5717 ± 753	$P < 0,02$
Кератоцити – предна строма	213 ± 42	642 ± 108	$P < 0,01$
Кератоцити – средна строма	289 ± 55	268 ± 53	$P < 0,05$
Кератоцити – задна строма	278 ± 46	301 ± 68	$P > 0,05$
Ендотел	1399 ± 579	2975 ± 434	$P < 0,01$

4. Сравнителна оценка на клетъчната плътност на здравите роговици и роговиците с дистрофични промени

Приложението на лазер сканиращата конфокална микроскопия на живо направи възможно проследяването на живо на различни патологични процеси, засягащи роговицата. Резултати от направения

анализ на количествените характеристики на клетъчните елементи при роговици на здрави индивиди, при епителиална дистрофия на базалния епител, при латисова дистрофия и при дистрофия на Фукс демонстрират промени в клетъчната плътност, като тези промени са в отрицателна посока. Най-отчетливите разлики са на нивото на засегнатия клетъчен слой за съответната роговична дистрофия. Интересно е отклонението в клетъчната гъстота и в нетипично нарушените слоеве за съответната дистрофия. Обобщените резултати са представени в Таблица 10.

Таблица 10. Резултати от количествения анализ на клетъчните елементи в роговица в норма, при роговици с епителиална дистрофия на базалната мембрана, роговици с латисова дистрофия и роговици с дистрофия на Фукс, изчислени в брой клетки на мм^2 (клетки/ мм^2)

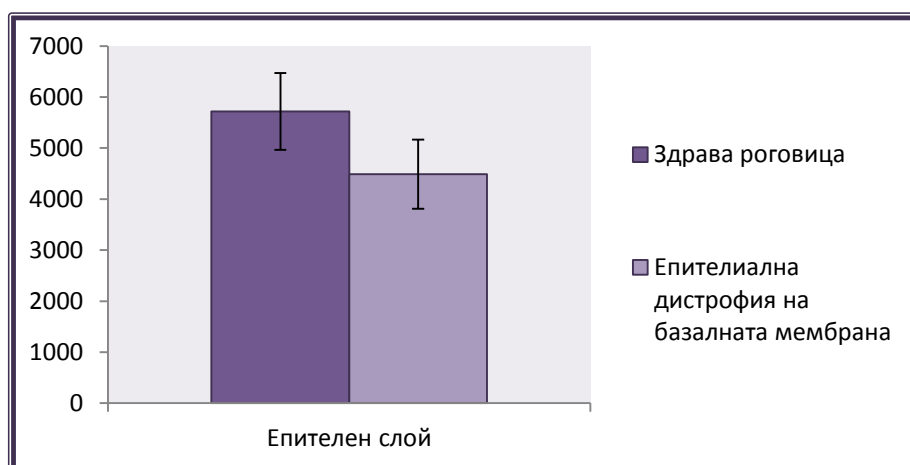
	Норма	Епителиална дистрофия	Латисова дистрофия	Дистрофия на Фукс
Базални епителни клетки	5717±753	4488±679 P<0,05	4479±1072 P<0,05	4802±1183 P<0,02
Кератоцити – предна строма	642±108	217±20 P<0,01	225±59 P<0,01	213±42 P<0,01
Кератоцити – средна строма	268±53	268±35 P>0,05	221±10 P>0,05	289±55 P<0,05
Кератоцити – задна строма	301±68	252±25 P<0,05	261±23 P<0,05	278±46 P>0,05
Ендотелни клетки	2975±434	2445±917 P<0,05	2877±242 P<0,05	1399±579 P<0,01

1. Сравнение между здрави роговици и роговици с епителиална дистрофия на базалната мембрана

При направения сравнителен анализ на клетъчните гъстоти в различните роговични слоеве при здравите очите и при очите с епителиална дистрофия на базалната мембрана се установиха по-ниски стойности на клетъчна плътност при роговиците с дистрофия.



Фигура 32. Сравнителен количествен анализ на клетъчните гъстоти на всички роговични слоеве в здрава роговица и в роговица с епителна дистрофия на базалната мембрана

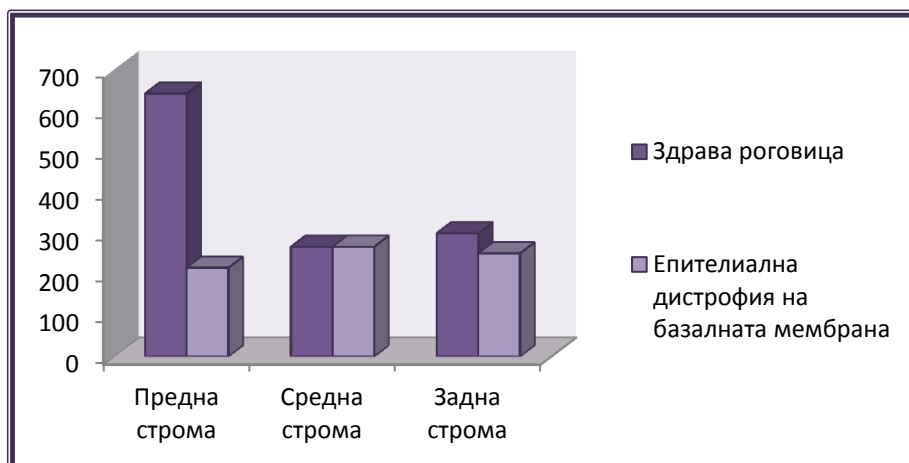


Фигура 33. Сравнителен количествен анализ на клетъчната гъстота на ниво епител в здрави роговици и в роговици с епителна дистрофия на базалната мембрана

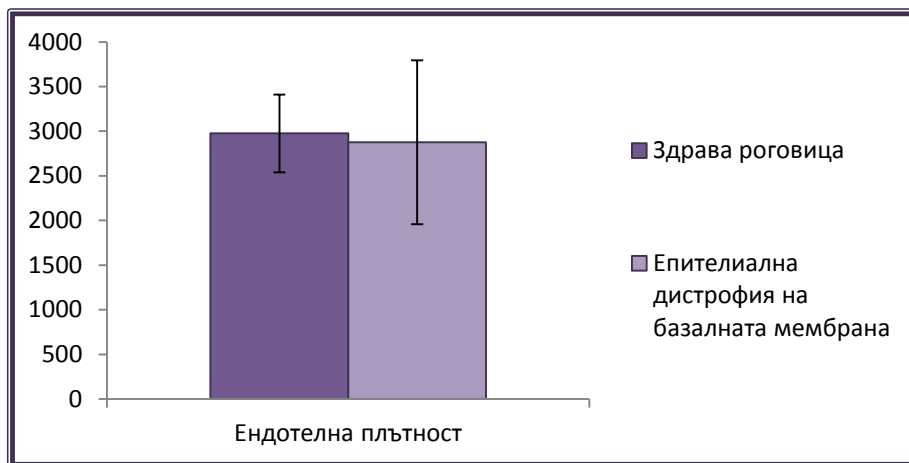
Епителната клетъчна плътност в здрави роговици е 5717 ± 108 кл/мм², докато в роговици с епителна дистрофия на базалната мембрана достига до 4488 ± 679 кл/мм² (Фигура 33).

Гъстотата на кератоцитите в предна, средна и задна строма са представени на Фигура 34. Съществена промяна в клетъчната гъстота се наблюдава при кератоцитите в предна строма.

На ниво ендотел клетъчната плътност е намалена в роговиците с епителиална дистрофия на базалната мембрана в сравнение с плътността на ендотелните клетки в здрави роговици (Фигура 35).



Фигура 34. Сравнителен количествен анализ на клетъчната гъстота на отделните нива на стромата в здрави роговици и в роговици с епителиална дистрофия на базалната мембрана



Фигура 35. Сравнителен количествен анализ на клетъчната гъстота на ниво ендотел в здрава роговица и в роговица с епителна дистрофия на базалната мембрана

2. Сравнение между здрави роговици и роговици с латисова дистрофия

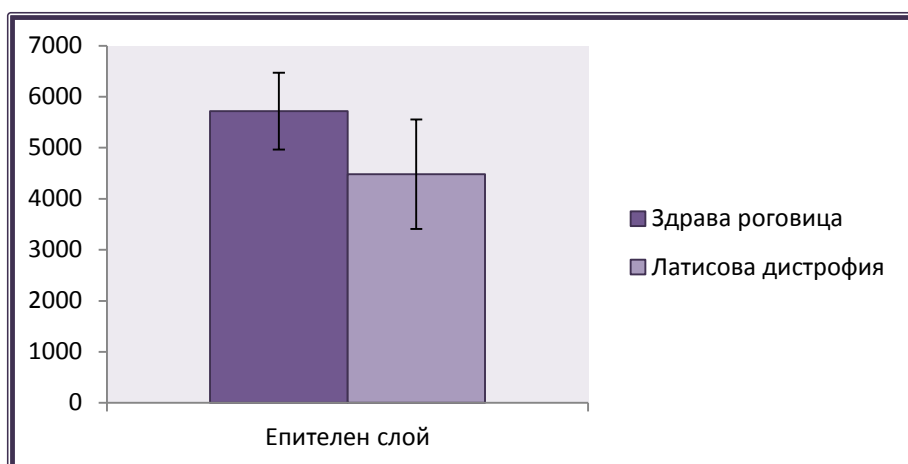
Изследването на роговични гъстоти позволи да се извърши количествена оценка на отделните клетъчни слоеве на здрави роговици и на роговици с латисова дистрофия. Резултатите от сравнението са демонстрирани на Фигура 36.

Епителната клетъчна плътност в здрава роговица е 5717 ± 108 кл/мм², при роговиците с латисова дистрофия тази гъстота е малко по-ниска, 4479 ± 1072 кл/мм². Клетъчната плътност е демонстрирана на Фигура 37 като е посочено и стандартното отклонение.

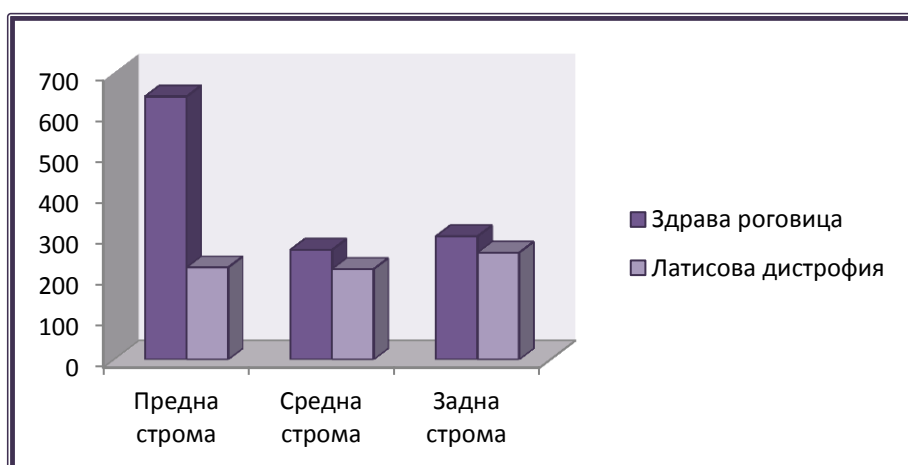
Средните стойности на плътността на кератоцитите в предна, средна и задна строма е изчислена и те са представени на Фигура 38.



Фигура 36. Сравнителен количествен анализ на клетъчните гъстоти на всички роговични слоеве в здрава роговица и в роговица с латисова дистрофия

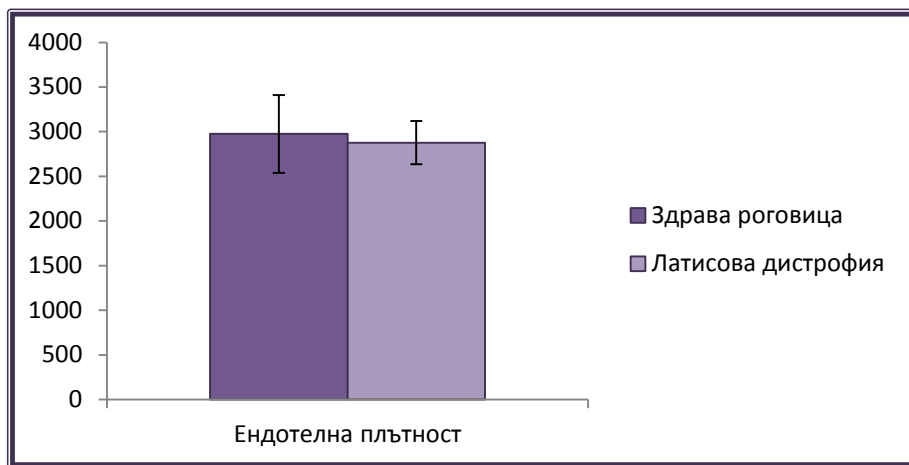


Фигура 37. Сравнителен количествен анализ на клетъчната гъстота на ниво епител в здрави роговици и в роговици с латисова дистрофия



Фигура 38. Сравнителен количествен анализ на клетъчната гъстота на отделните нива на стромата в здрави роговици и в роговици с латисова дистрофия

На ниво ендотел клетъчната гъстота на роговиците с латисова дистрофия е близка стойност на изчислената при здрави роговици. Резултатите са представени на Фигура 39.



Фигура 39. Сравнителен количествен анализ на клетъчната гъстота на ниво ендотел в здрави роговици и в роговици с латисова дистрофия

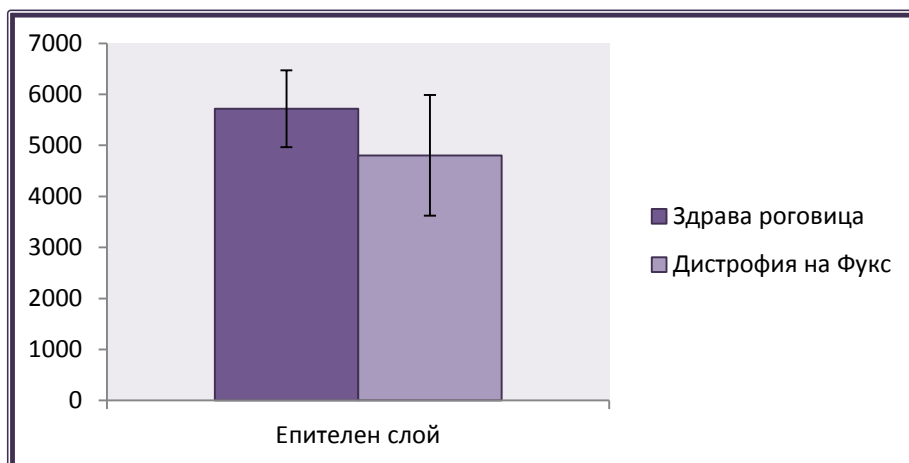
3. Сравнение между здрави роговици и роговици с дистрофия на Фукс

Направеният количествен анализ на клетъчните плътности включва сравнение между стойностите на гъстотите на клетките в отделните роговични слоеве в здрави роговици и в роговици с дистрофия на Фукс (Фигура 40).



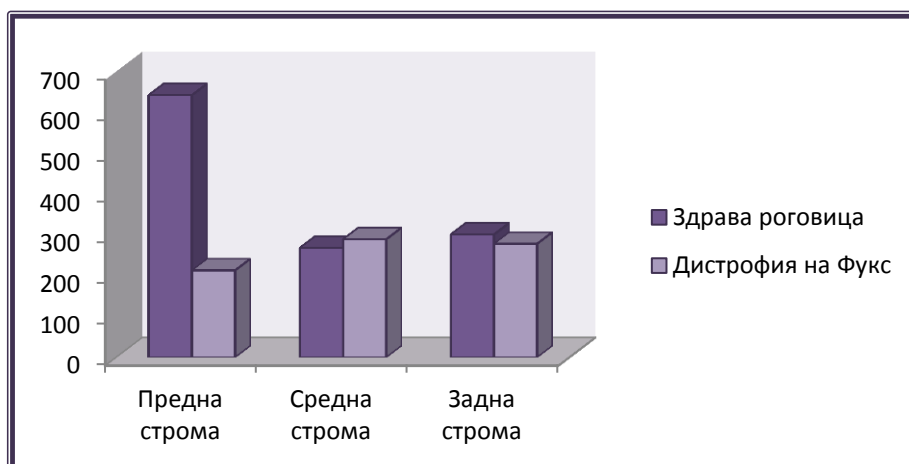
Фигура 40. Сравнителен количествен анализ на клетъчните гъстоти на всички роговични слоеве в здрави роговици и в роговици с дистрофия на Фукс

Епителната клетъчна плътност в здрава роговица е 5717 ± 108 кл/мм², а при роговиците с дистрофия на Фукс тази гъстота е малко по-ниска, съответно 4802 ± 1183 кл/мм² (Фигура 41).



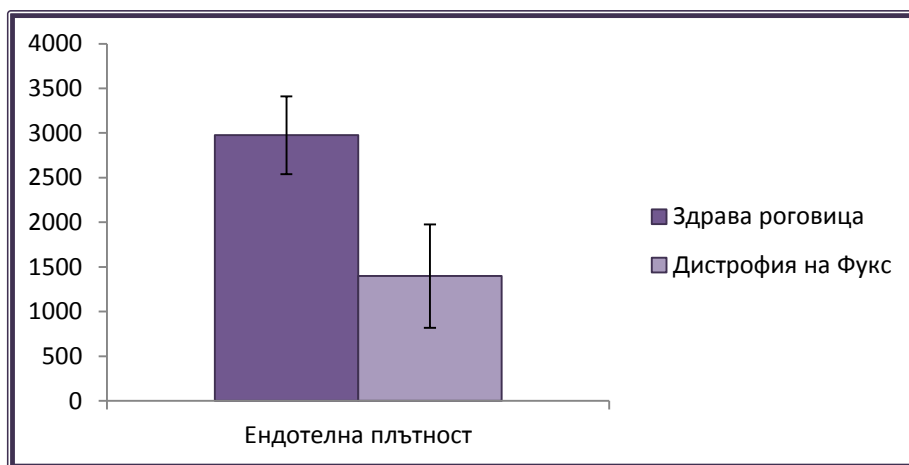
Фигура 41. Сравнителен количествен анализ на клетъчната гъстота на ниво епител в здрава роговица и в роговица с дистрофия на Фукс

Средните стойности на плътността на кератоцитите в предна, средна и задна строма са представени на Фигура 42.



Фигура 42. Сравнителен количествен анализ на клетъчната гъстота на отделните нива на стромата в здрави роговици и в роговици с дистрофия на Фукс

Най-отчетлива е разликата е отчетена при клетъчната плътност на ниво ендотел. При дистрофия на Фукс гъстотата е по-ниска отколкото тази, изчислена при здравите роговици (Фигура 43).

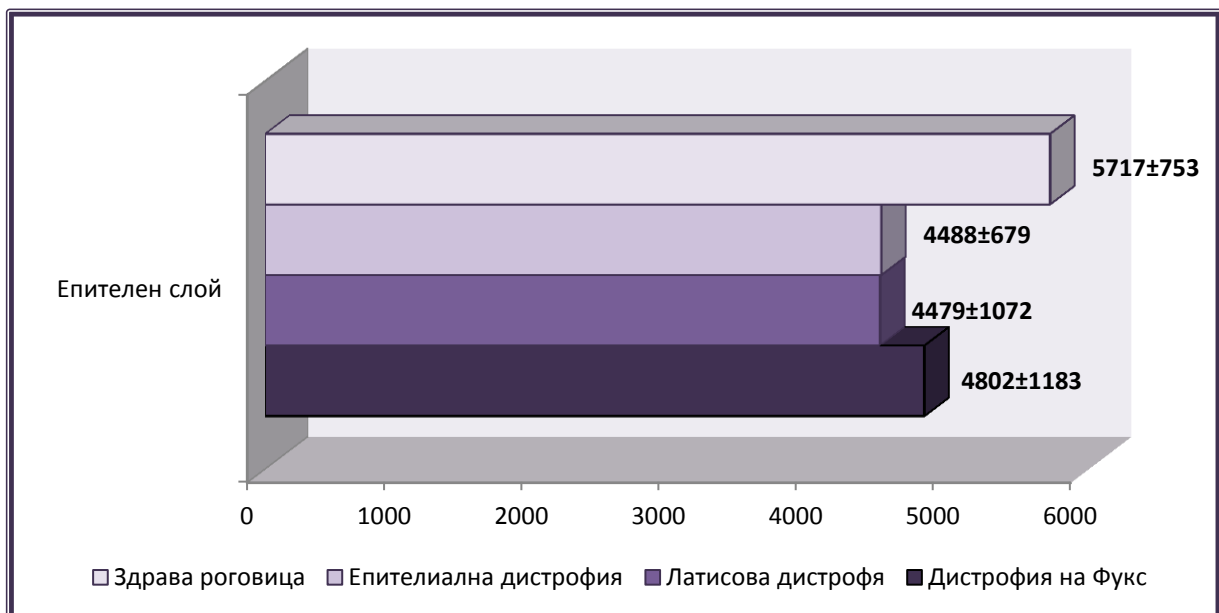


Фигура 43. Сравнителен количествен анализ на клетъчната гъстота на ниво ендотел в здрави роговици и в роговици с дистрофия на Фукс

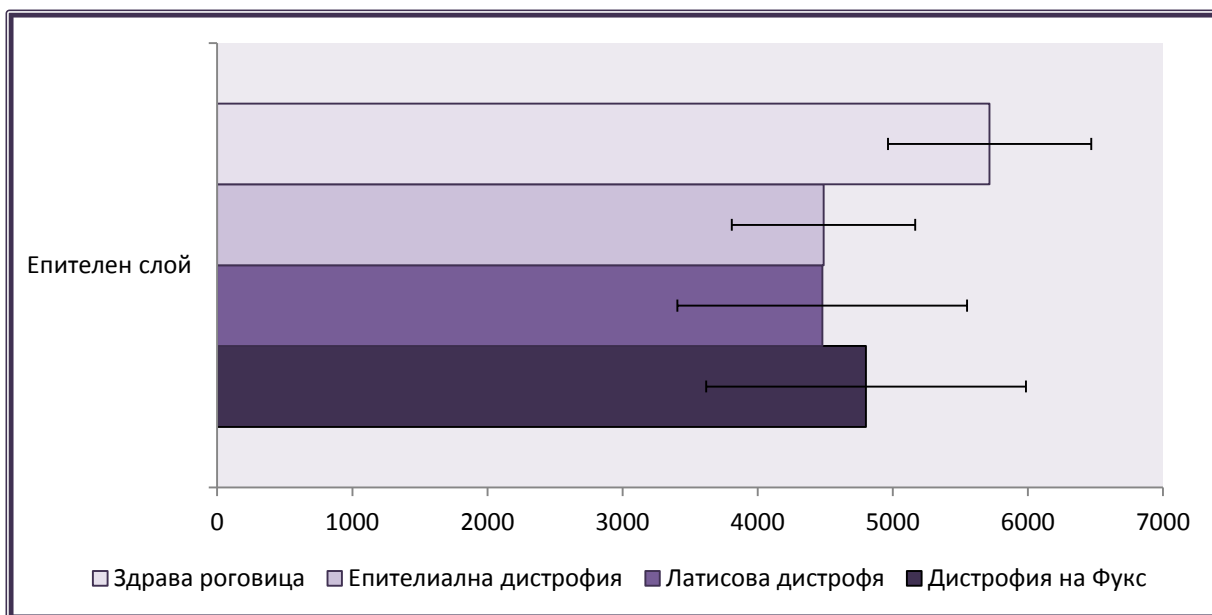
5. Сравнителен анализ на клетъчната плътност на отделните анатомични слоеве при здрави роговици и при роговици, засегнати от роговични дистрофии

Анализиран са качествени промени и количествените характеристики за съответната дистрофия. Сравнителният анализ на клетъчните гъстоти в отделните роговични слоеве при очи в норма и при очи с най-честите за българската популация роговични дистрофии може да даде повече яснота върху процесите и засягането на роговицата при конкретни клинично проявени дистрофии. Разглеждането на конкретните взаимоотношения предоставя възможност за сравнение и анализ на клетъчната загуба при различни по патологични процеси.

В трите наблюдавани дистрофични заболявания на роговицата, епителна дистрофия, латисова дистрофия и дистрофия на Фукс, не се доказаха съществени отлики в епителната гъстота. Гъстотата на епителните клетки е най-висока при здравите роговици и има съответното намаление при налична патология (Фигури 44 и 45)

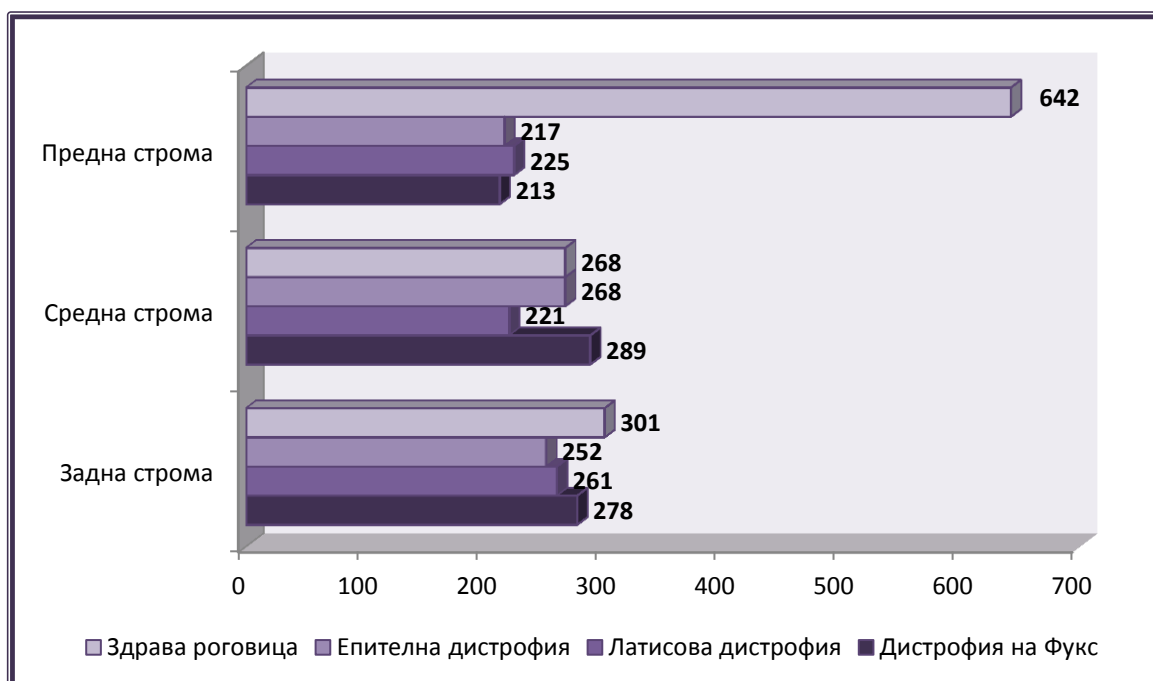


Фигура 44. Сравнителен анализ на количествените характеристики на клетъчната гъстота на ниво епител при здрави роговици и при роговици с дистрофии, изчислени в брой клетки на мм² (клетки/мм² ± SD)

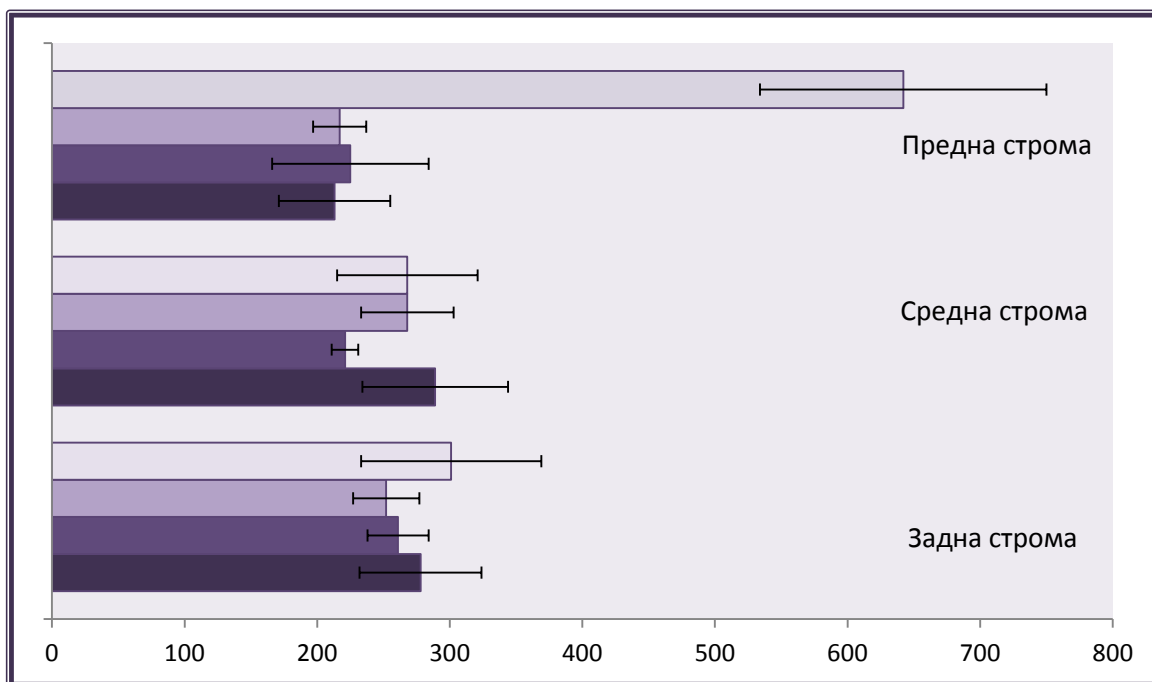


Фигура 45. Сравнителен анализ на количествените характеристики на клетъчната гъстота на ниво епител при здрави роговици и при роговици с дистрофии, изчислени в клетки на мм^2 , посочено е стандартното отклонение

Следващите две фигури събират количествените резултати от стойностите за клетъчна гъстота на кератоцитите в предна, средна и задна строма при здрави и при роговици с дистрофии (Фигури 46 и 47).

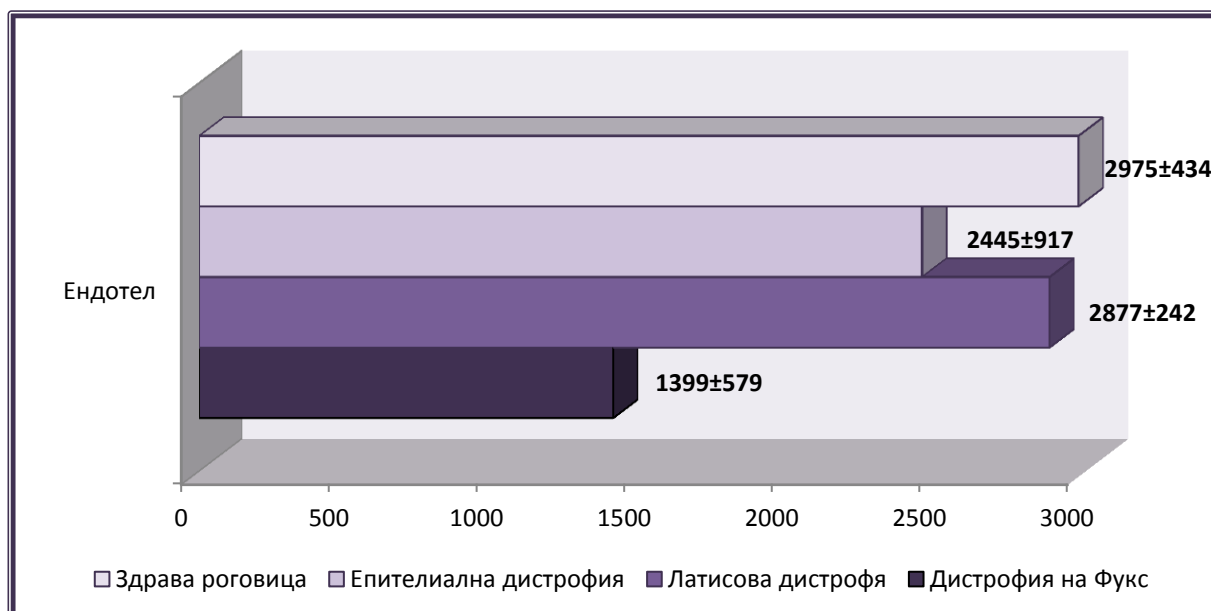


Фигура 46. Сравнителен анализ на количествените характеристики на гъстотата на кератоцитите на ниво предна, средна и задна строма при здрави роговици и при роговици с дистрофии, изчислени в брой клетки на мм^2 (клетки/ $\text{мм}^2 \pm \text{SD}$)

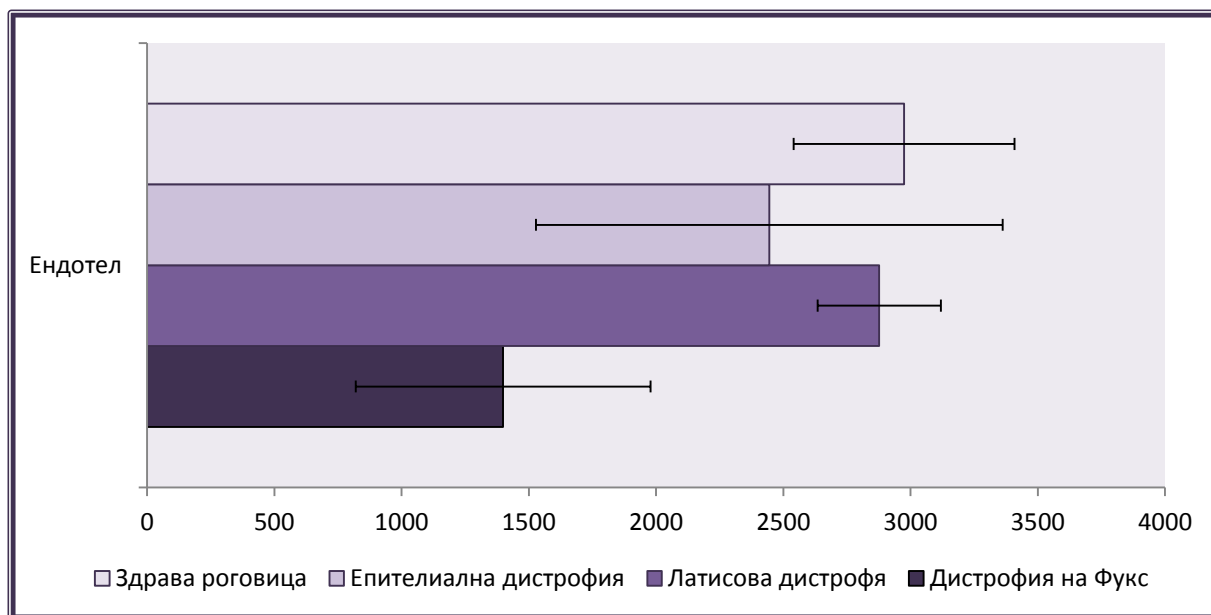


Фигура 47. Сравнителен анализ на количествените характеристики на гъстотата на кератоцитите на ниво предна, средна и задна строма при здрави роговици и при роговици с дистрофии, изчислени в брой клетки на mm^2 , посочено е стандартното отклонение

Поради значението на ендотела за здравето на роговицата, интерес предизвиква сравнението на клетъчните гъстоти на ендотелните клетки. Стойностите са по-ниски при роговиците с дистрофии, като най-ниска плътност е при роговици с дистрофия на Фукс. Сравнителните резултати са обобщени на Фигури 48 и 49.



Фигура 48. Сравнителен анализ на количествените характеристики на клетъчната гъстота на ниво ендотел при здрави роговици и при роговици с дистрофии, изчислени в брой клетки на mm^2 (клетки/ $\text{mm}^2 \pm \text{SD}$)



Фигура 49. Сравнителен анализ на количествените характеристики на клетъчната гъстота на ниво ендотел при здрави роговици и при роговици с дистрофии, изчислени в брой клетки на mm^2 , посочено е стандартното отклонение

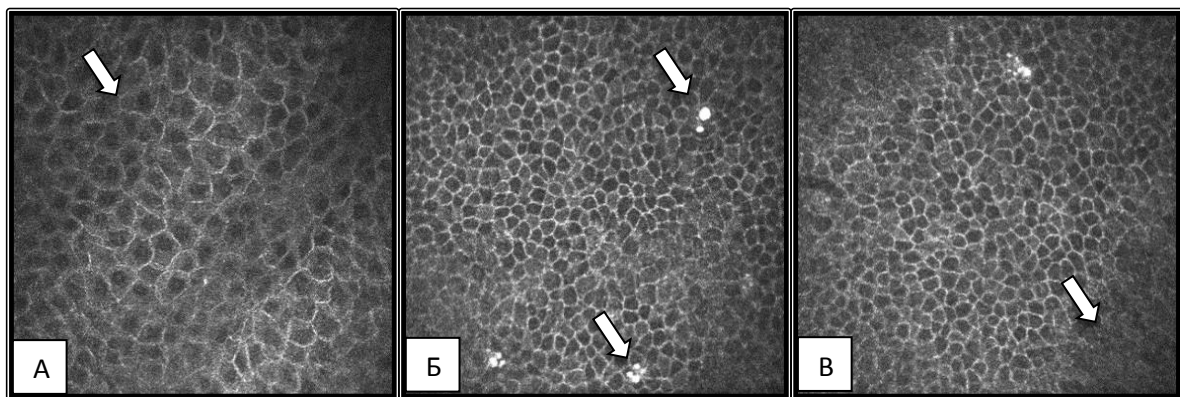
6. Оценка на роговичната микроструктура в роговици с кератоконус

Тази част от проучването обхваща наблюдение на 20 очи на 16 пациента с кератоконус. Четирима пациента са с двустранен кератоконус (Таблица 11). На всички изследвани очи в тази група е извършен микроструктурен анализ чрез помощта на лазер сканиращата конфокална микроскопия на живо, Heidelberg Retina Tomograph III Rostock Cornea Module (HRT3-RCM) на централната 5-6 мм зона на роговицата. Извършен беше качествен и количествен микроструктурен анализ с цел да се установят характеристиките на роговица с кератоконус.

Таблица 11. Демографски характеристики на пациентите с кератоконус от група III, изследвани чрез лазер сканиращата конфокална микроскопия на живо, Heidelberg Retinal Tomograph III Rostock Cornea Module (HRT3-RCM).

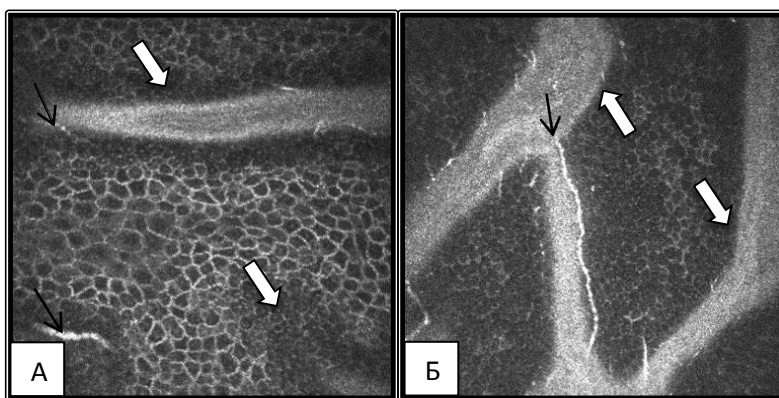
Демографски характеристики на пациенти с кератоконус	
Възраст (години)	30±6
Общо	16
мъже	8 (50%)
жени	8 (50%)
Брой очи (общо)	20
Раса – Европейска	16

Изображенията от лазер сканиращата конфокална микроскопия на живо на роговици с кератоконус демонстрират първите промени още на ниво базален епител. Епителните клетки са с висока степен на вариабилност по отношение на форма и големина. Установяват се по-големи по размер базални епителни клетки в сравнение базалните епителни клетки в нормална роговица, по-голямо разнообразие в клетъчната форма (Фигура 50). Сред епителните клетки преобладават такива с елонгирана или елипсоидна форма. Светлите силно рефлексивни окръглени структури между епителните клетки се възприемат като проминентни ядра на подлежащите клетки. Стените на клетките демонстрират повишена хиперрефлексивност, изглеждат ясно очертани.



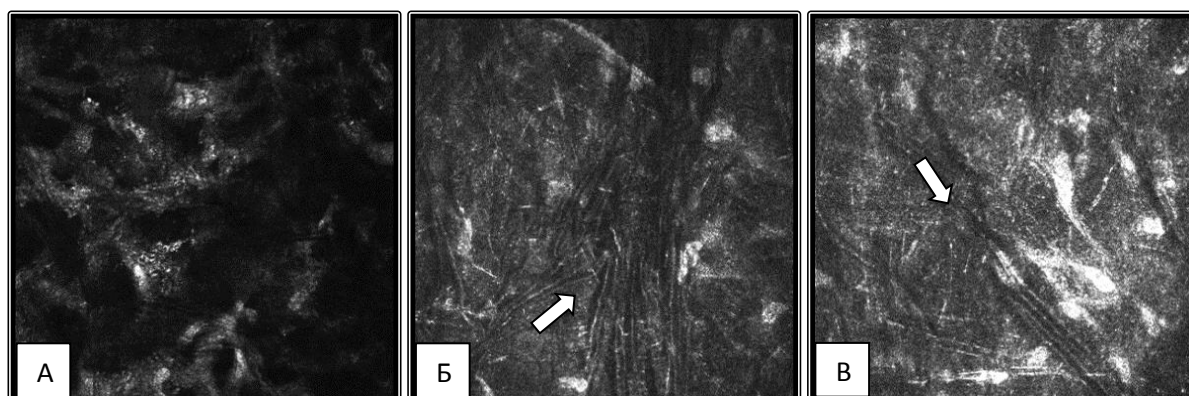
Фигура 50. Лазер сканираща конфокална микроскопия на живо на роговица с кератоконус – демонстрация на епителни клетки с хиперрефлексивни клетъчни стени(А); проминиращи хиперрефлексивни ядра(Б); лека инвагинация на епителни клетки(стрелки)(В)

На границата между базален епител и предна строма се визуализира слой на Бауман. В слоя на Бауман се виждат множество гънки и участъци с наличие на полета от епителни клетки, вероятно се касае за инвагинация на епител навътре към слоя на Бауман (Фигура 51). Островите от корнеалния епител са добре формени, обградени от светли линии. Тъмни ивици около 10-100 μ m ширина се визуализират в хиперрефлексивния Бауманов слой, подредени в тесни ивици или кръгово разпределени. Могат да се открият и ядра на кератоцити.



Фигура 51. Лазер сканираща конфокална микроскопия на живо на роговица с кератоконус – демонстрация на инвагинация на епителни клетки към слоя на Бауман, ясно оформена демаркационна линия (бели стрелки) и проминиращи нерви от суббазален нервен плексус (черна стрелка) (А,Б)

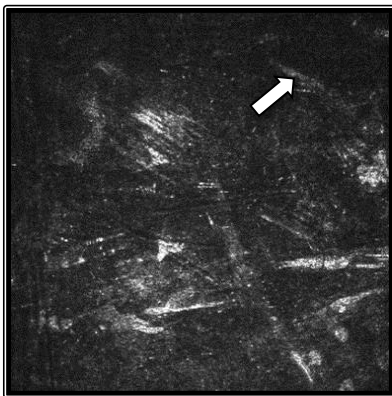
В стромата се откриват линейни структури сред стромалните клетките. (Фигура 52). Наблюдават се неправилни депозити, с кръгловата или пръстеновидна форма като „разрези“ в стромата. Множество паралелни тъмни и светли линии минават в различни посоки през цялата дълбочина на стромата. Те могат да увредят правилния ход на стромалните нерви, които също са характерно изменени. В задните отдели на стромата, в близост до Десцетовата мембрана се изобразяват тъмни линии с приблизително прав ход. В медицинската документация такива структури са описвани като стрии на Фогт (Vogt's striae) - редуващи се тъмни и светли, обикновено с вертикален ход, черти, разположени в стромата.



Фигура 52. Лазер сканираща конфокална микроскопия на роговица на очи с кератоконус – демонстрация на предна строма (А); тъмни линии (стрелки) с приблизително прав ход, описвани като стрии на Фогт (Б, В)

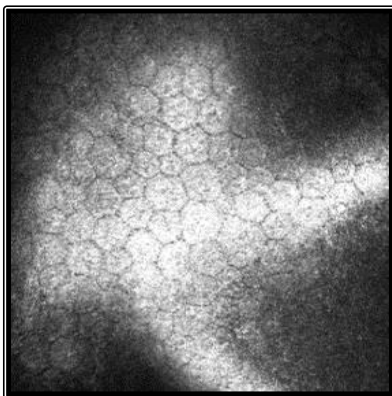
Възможни разкъсвания са по Десцетовата мембрана (по литературни данни), като тези руптури могат да са разнообразни по площ и форма, но поради трудното изобразяване на този слой тези промени много рядко добиват доказателствен характер. На конфокална микроскопия изглеждат като тъмни добре отграничени

зони с остри ръбове, откриват се на нивото на Десцетовата мембрана (Фигура 53).



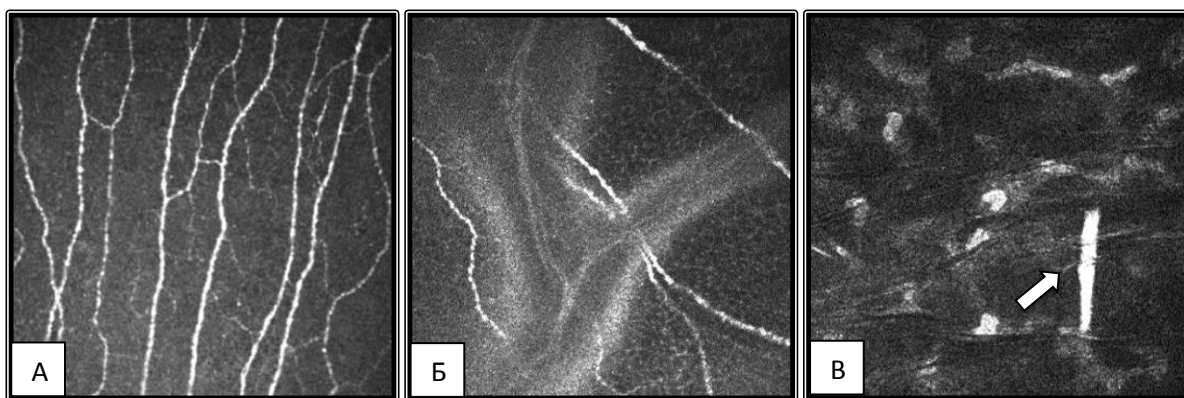
Фигура 53. Лазер сканираща конфокална микроскопия на роговица на очи с кератоконус – демонстрация на Десцетова мембрана с налична руптура (стрелка)

В ендотелния слой не се регистрират качествени изменения. Ендотелните клетки изглеждат еднакво подредени, с приблизително идентична хексагонална форма. Поради дълбочината, на която се намира този слой и поради промените в предходните по - външните слоеве на роговицата, през които премина лазерния лъч на конфокалния микроскоп, ендотелните клетки при пациентите с кератоконус се изобразяват много трудно (Фигура 54).



Фигура 54. Лазер сканираща конфокална микроскопия на роговица на очи с кератоконус – демонстрация на клетки от ендотелния слой

Проминиращите корнеални нерви са един от характерните белези на кератоконуса. На изображенията на суббазалния нервен плексус се демонстрират нерви със значително повишен тортуозитет в сравнение с нормална роговица (Фигура 55). Нервните окончания завършват без прекъсване в централната роговица. Суббазалните нервни влакна са силно нагънати, може да се определят и като леко задебелени.



Фигура 55. Лазер сканираща конфокална микроскопия на роговица на очи с кератоконус – демонстрация на суббазален нервен плексус, разклонени и нагънати нервни влакна (А, Б); задна строма, задебелен стромален нерв(стрелка) (В)

Количествената оценка на роговиците с кератоконус се състои в изготвяне и изчисление на клетъчната плътност на всички отделни слоеве и сравнение на получените стойности със стойностите, изчислени върху здрави роговици. Получените средни стойности от клетъчната плътност са описани в Таблица 12.

Таблица 12. Плътност на клетките (клетки/мм²) на роговици на пациенти с кератоконус и на здрава роговица

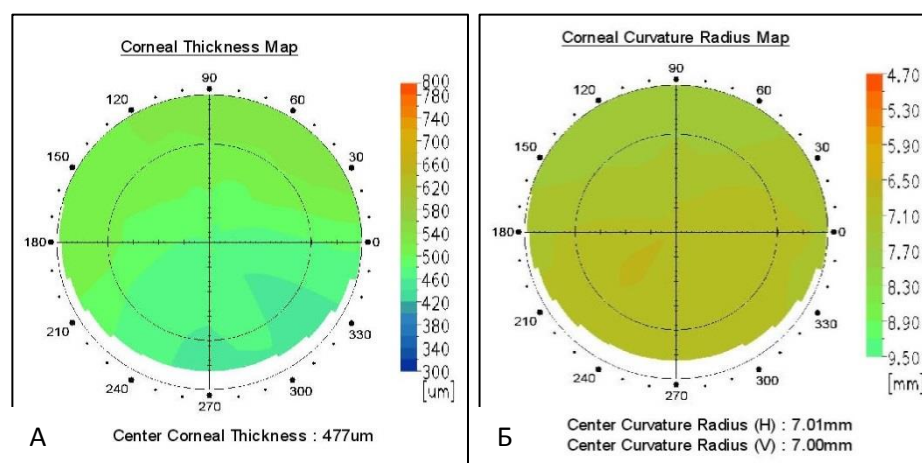
	Плътност на клетките		
	Кератоконус	Здрава роговица	Р
Базални епителни клетки	5004±452	5717±573	P>0,05
Кератоцити – предна строма	229±32	642±108	P<0,01
Кератоцити – средна строма	200±52	268±53	P>0,05
Кератоцити – задна строма	225±57	301±68	P<0,01
Ендотел	2399±433	2975±434	P<0,01

Ние установихме понижение на клетъчната плътност в роговиците с кератоконус на 5004±452 кл/мм², докато при здрави роговици тя е 5717±573 кл/мм². На ниво предна, средна и задна строма редуцията на клетъчна плътност също е отчетлива, съответни при кератоконус е 229±32 кл/мм², 200±52 кл/мм² и 225±57 кл/мм² за задна строма в сравнение с 642±108 кл/мм² в предна, 268±53 кл/мм² в средна и 301±68 кл/мм² в задна строма на здрави роговици. Ендотелната плътност е изчислена също.

7. Оценка на томографските характеристики на роговици с кератоконус

Включените в тази група 20 очи са изследвани с предно-сегментна оптична кохерентна томография, ОСТ-3D Торсон 2000. С цел да използват максимално образните методи на роговична оценка на роговица с кератоконус са калкулирани централната роговична дебелина на кератоконичните роговици и роговичните радиуси.

От цветно кодирани пахиметрични роговични карти от предносегментната оптична кохерентна томография (Фигура 56А) максималната измерена централна дебелина на роговица с кератоконус е 588 μm . Минималната корнеална дебелина в централната зона при този метод на измерване е установена 493 μm . Калкулираната средната стойност на ССТ е изчислена 532 \pm 30 μm (Таблица 13).



Фигура 56. Цветно кодирана пахиметрична карта (А) и карта на роговичните кривини на роговица с кератоконус (Б), предносегментна оптична кохерентна томография, ОСТ-3D Торсон 2000

Таблица 13. Роговични кривини на роговици с кератоконус, изчислени с помощта на предносегментна оптична кохерентна томография, ОСТ-3D Торсон 2000.

	Централна роговична дебелина на здрава роговица	Централна роговична дебелина на роговица с кератоконус
Средна стойност	577 \pm 24 μm	532 \pm 30 μm
Максимална стойност	599 μm	588 μm
Минимална стойност	524 μm	493 μm

На цветно кодирани елевационни роговични карти от оптична кохерентна томография (Фигура 56Б) средната стойност на радиуса на роговична кривина на 90° е 7,35 \pm 0,20мм. Максималната

стойност на радиуса на роговична кривина по този меридиан е 8,27мм, а минималната установена стойност е 6,51мм. По меридиана на 180° средният измерен радиус е 7,42±0,22мм. Максималната стойност на радиуса на роговична кривина по този меридиан е 9,08мм, а минималната установена стойност е 6,26мм. Стойностите от резултатите от цветно кодираните елевационни роговични карти на ОСТ са представени в Таблица 14.

Таблица 14. Роговични кривини на роговици с кератоконус, изчислени с помощта на предносегментна оптична кохерентна томография, ОСТ-3D Topcon 2000.

	Радиус на роговична кривина на 90°	Радиус на роговична кривина на 180°
Средна стойност	7,35±0,2 мм	7,42±0,22 мм.
Максимална стойност	8,27мм	9,08мм
Минимална стойност	6,51мм	6,26мм

8. Сравнителна оценка на томографските характеристики на роговица с кератоконус и на здрави роговици

Следващите таблици демонстрират сравнение на радиусите на роговичните кривини на 90° и на 180° при здрави роговици и при роговици с кератоконус (Таблица 15 и 16).

Таблица 15. Роговични кривини на 90° на здрава роговица и роговици с кератоконус, изчислени с помощта на предносегментна оптична кохерентна томография, ОСТ-3D Topcon 2000.

	Здрава роговица	Роговица кератоконус	P
Средна стойност	7,39±0,26 мм	7,35±0,2 мм.	P<0,05
Максимална стойност	7,96 мм	8,27мм	
Минимална стойност	6,79 мм	6,51мм	

Таблица 16. Роговични кривини на 180° на здрава роговица и роговици с кератоконус, изчислени с помощта на предносегментна оптична кохерентна томография, ОСТ-3D Topcon 2000.

	Здрава роговица	Роговица кератоконус	P
Средна стойност	7,70±0,31 мм	7,42±0,22 мм.	P<0,05
Максимална стойност	8,34 мм	9,08мм	
Минимална стойност	6,91 мм	6,26мм	

V. Обсъждане

В клиничната практика за изследване на очната повърхност в най-голяма степен се използва биомикроскопия. Ограничена от оптичния си принцип и от нейната резолюцията, изследването със светлинна биомикроскопия не позволява винаги да се разберат патологичните тъканни промени, както и физиологичните модификации на очната повърхност. Първоначално запазена за научни изследвания, конфокална микроскопия на живо, днес е достъпна за клиничните специалисти благодарение на технологичния прогрес, подобрената разделителна способност и опростената технология. Разработени са множество клинични приложения на тази образна техника.

Очната повърхност, като част от окото, представлява един физиологичен конгломерат и едновременно анатомичен комплекс, които заедно осигуряват границата между външната среда и чувствителните вътрешни очни структури. Морфологично и структурно различни тъкани са обединени така, че да осигурят механична и функционална бариера срещу постоянната „агресия“ на външната среда [162]. Клепачите също участват, както и слъзните жлези и слъзния филм като първата протективна бариера.

Оценяването на множество патологични състояния на очната повърхност, при които клетъчните механизми са нарушени или е засегната способността на авторегулация и автовъзстановяване, се основава понякога на недостатъчно надеждни клинични белези. Биомикроскопия е полезен и достоверен метод, но с лимитирани възможности, а допълнителните специфични клинични изследвания, често са неоправдани и са резервирани само за тежките случаи. Затова появата на нова технология, позволяваща приложение в клиниката и улесняване на офталмолога за по-добро разбиране на роговичното заболяване събужда жив интерес.

Първо ретиналните специалисти имат тази привилегия с навлизането на ангиографията, а по-късно и конфокалния микроскоп, осигурявайки нови надеждни възможности за проследяване на състоянието на очното дъно и ретината. Анализът на оптичния нерв и нервните влакна при заболяването глаукома, са постигнали завиден напредък, докато възможностите за обстойно проследяване на очната повърхност са значително ограничени.

В края на 80-те години на ХХ век появата на новата система на конфокална микроскопия на живо внася промяна в разбирането за изследването на очната повърхност. Роговицата може да бъде наблюдавана на клетъчно ниво, като при хистологично изследване, но

без инвазивни и болезнени процедури. Това се приема като революция за корнеалните изследователи.

Високото ниво на резолюция и възможността да се сканира цялата очна повърхност в трите измерения, както и изобразяването на кръвоносни съдове и възпалителни клетки позволява цялостна ревизия на познанията за патологията на очната повърхност. Следващите поколения конфокална микроскопия на живо и по-конкретно лазер сканиращата конфокална микроскопия (LSCM) внесоха нова светлина върху патологията на очната повърхност [162]. Освен наличната досега сравнителна хистология конфокалната микроскопия позволява още да се идентифицират структури и типове клетки и е „едно вълнуващо пътуване“ между хистологията и директното роговично изследване в реално време.

Здравата роговица изисква поддържането на прозрачност, идентична форма и дебелина, както и стабилност на клетъчния интегритет за запазването на нормалното зрение. 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.

Конфокална микроскопия на живо драстично разширява границите на резолюция в реално време, като по този начин позволява изображения на микроструктурно ниво на всеки слой на роговицата в по-физиологични условия, отколкото е било възможно по-рано [116]. Това е най-бързо развиващия се образен метод за диагностика и мониториране. Конфокалната микроскопия на живо предлага вълнуващ мост между клинични и лабораторни наблюдения, позволяваща на клиничните специалисти и изследователите да разберат микроструктурните промени в роговицата както в здраве, така и в болест.

Конфокална микроскопия на живо дава уникален поглед върху роговичната структура. Лазер сканиращата конфокална микроскопия (LSCM) използва точка на сканиране с кохерентна светлина. Научната, техническа и медицинска общност първоначално насочват своите усилия в утвърждаване на ролята на лазерно сканиране и след това в използването на лазер сканиращата конфокална микроскопия за наблюдение на роговични структури в здраве и при патология за установяване на характерни за роговични дистрофии и корнеална ектазия изменения.

Лазер сканиращата конфокална микроскопия (LSCM) използва кохерентен светлинен източник лазерен лъч с висока интензивност,

който сканира над обектива на микроскопа чрез набор от галванометрични сканиращи огледала [116]. LSCM е търговски достъпна като модул за роговица Rostock Corneal Module. Heidelberg Retina Tomograph III Rostock Corneal Module (HRT3-RCM) е последното поколение конфокален микроскоп, който използва диоден лазер с дължина на вълната от инфрачервения спектър, от 670 nm. [148]. Това е клас I лазер и следователно не създава опасност от очно увреждане [75]. В сравнение със светлинно сканиращия конфокален микроскоп (SSCM), има по-голяма възможност да индуцира артефакти и сравнително по-висок, макар и нисък риск от създаване на дефекти по епитела [75]. По-ранни изследвания показват, че лазер сканиращата конфокална микроскопия осигурява по-голям контраст за разлика от тандем-сканиращата конфокална микроскопия (TSCM) или слит-сканиращата конфокална микроскопия (SSCM) [70],[153].

Като се има предвид високата разделителна способност на изображенията и неинвазивната процедура на изследване, много автори са използвали техниката на LSCM за изучаване на здравата роговица и роговица в различни патологични състояния. Епителните дистрофии на роговицата [164], [165] стромалните дистрофии [166]–[168] и ендотелните дистрофии [19], [169], [170] са наблюдавани и проучени. Кератоконус [171] и иридокорнеален ендотелен синдром [172] са също наблюдавани с конфокална микроскопия на живо. Освен това са описани кератити с различна етиология: бактериални [173], гъбичкови [174], херпетични [175] или токсични [176] кератити.

Разполагайки с възможността да наблюдаваме директно и на живо на квази-хистологично ниво различните структури и анатомични слоеве на роговицата чрез LSCM настоящата работа има за цел да установи и представи анализ на микроструктурните характеристики на роговицата в здраве на българската популация. Представените резултати в известен смисъл имат потвърдителен характер, но са уникални за българската популация.

Роговицата има пет анатомично обособени слоя. Това подразделяне се използва и при конфокалния анализ на живо. Епителния слой се описва като се идентифицират три типа клетки: повърхностни, криловидни и базални. Niederer et al. описва повърхностните клетки като полигонални клетки, с размер 40-50 μm с централно светло ядро, заобиколени с тъмно хало; подлежащите клетки са определени като криловидни клетки, те са със светли стени и светла вътрешна част. Клетките от базалния епител са по-малки по размер, плътно прилепени една към друга. Те се описват като малки клетки, размер от 8-10 μm с тъмна цитоплазма и светещи и ярки бели граници [155].

Изследванията, които са се занимавали с анализиране на здрава роговица, освен качествено описание демонстрират и клетъчните плътности в отделните роговични слоеве. В литературата не са много изследванията по този въпрос, осъществени чрез LSCM. Поради времето на употреба и развитието на различните генерации апарати преобладават научните проекти, при които наблюдението е направено чрез SSCM, а тези с LSCM са единични.

В литературата има публикации на различни автори, които посочват плътността на базалните епителни клетки. Всички изследвания са върху групи от 20 до 85 очи. Различни изследвания посочват съответно плътност 6162 ± 503 кл/мм² [75], [177], 6000 ± 1080 кл/мм² [156], 6618 ± 648 кл/мм² [158], 8996 ± 1532 кл/мм² [177]. Нашите резултати са изчислени на базата на контролна група здрави роговици на 140 очи (70 пациента) и показват, че плътността на базалните епителни клетки при очите от тази група е 5717 ± 753 кл/мм². Това го прави най-голямото по обем от публикуваните проучвания.

В литературата, базирана на екс виво, корнеалната строма се разглежда като се подразделя на две или три части. Изследване на Niederer et al. определя кератоцитна плътност на предна и задна строма, съответно 765 ± 262 кл/мм² и 315 ± 57 кл/мм² [155], [156]. Нашето изследване проследи плътността на този роговичен слой, разделяйки го на предна, средна и задна строма. Гъстотата на кератоцитите определена от нас в предната строма е 642 ± 108 кл/мм², а в средна строма е 268 ± 53 кл/мм². Установената плътност на кератоцити в задна строма е 301 ± 68 кл/мм². Открива се добра корелация между ин виво и екс виво клетъчната гъстота [178], [179]. Интересно е, че някои проучвания съобщават за възможност за анализизиране на резултатите само в 68% от скановите от предна строма [180] и в 74% в друго проучване [181]. В нашето проучване ние достигнахме до 95% ефективност.

Стромалните кератоцити са описани като клетки с хиперрефлексивни ядра, със слабо представени израстъци [19], [181], въпреки че могат да бъдат по-видими при роговичен едем [59], [167]. Нашето проучване установи наличие на високорефлексивни ядрени структури в цялата строма. Отделните нива на стромата имат различна клетъчна гъстота. В по-външната част на стромата кератоцитите са с по-кръгла форма, по-гъсто разположени един до друг. В задните стромални нива ядрата са по-издължени и изглеждат пръстнати поради малката клетъчна плътност.

Mustonen, а по-късно и от Hollingsworth описват Десцетовата мембрана като ацелуларен слой разположен между задната строма и ендотелните клетки [19],[180]. В настоящото изследване при здрава роговица тази мембрана не беше визуализирана.

Ендотелните клетки дълго време са предствалявали интерес и са наблюдавани чрез спекуларна микроскопия. С навлизането на LSCM се предложи уникална възможност за ясно изобразяване на роговичния ендотел дори и в едемна роговица. Доказана е добра корелация между демонстрацията на клетъчна гъстота от спекуларна и конфокална микроскопи. [19], [182]. При LSCM ендотелната мозайка съответства на правилно подредени хексагонални клетки, оформяйки структура, приличаща на пчелна пита [19]. Този слой е ясно различим. Едно проучване демонстрира, че автоматичното разпознаване на този слой е възможно в 93% от случаите [183] и съобщава за добра репродуктивност и повторяемост от автоматичното клетъчно броене [184]. Клетъчната ендотелна гъстота в множество публикувани изследвания със SSCM и LSCM е изчислена съответно 2668 ± 584 кл/мм² [90] и 2720 ± 367 кл/мм² [156] и 2553 ± 311 кл/мм² [158]. Повечето провеждани досега изследвани са по-често осъществени чрез SSCM и посочените резултати са сравними с тези от LSCM (Таблица 17).

Таблица 17. Резултати от ендотелна плътност чрез SSCM и LSCM [151]

Endothelial cell density.			
Study	Number of subjects	Confocal microscope	Endothelial density (cells/mm ²)
Mustonen et al., 1998b	45 (58 eyes)	SSCM	3055 ± 386
Imre and Nagymihaly 2001	12 (12 eyes)	SSCM	3125 ± 407
Hollingsworth et al., 2001	120 (120 eyes)	SSCM	3061 ± 382
Vanathi et al., 2003	50 (100 eyes)	SSCM	2818 ± 361
Hara et al., 2003	14 (28 eyes)	SSCM	2916 ± 334
Klais et al., 2003	42 (42 eyes)	SSCM	3069 ± 285
Popper et al., 2004	20 (20 eyes)	SSCM	2743 ± 285
Muller et al., 2004	75 (75 eyes)	SSCM	2488 ± 301
Kitzmann et al., 2005	25 (50 eyes)	SSCM	2664 ± 173
Szaflik 2007b	16 (16 eyes)	SSCM	2091 ± 369
Szaflik 2007a	20 (38 eyes)	SSCM	1953 ± 395
Szaflik 2007a	20 (38 eyes)	LSCM	2668 ± 584
Niederer et al., 2007a	85 (85 eyes)	LSCM	2720 ± 367
Sheng et al., 2007	30 (30 eyes)	SSCM	2973 ± 347
Niederer et al., 2008	40 (40 eyes)	SSCM	2472 ± 277
Niederer et al., 2008	40 (40 eyes)	LSCM	2553 ± 311

SSCM – slit scanning confocal microscope; LSCM – laser scanning confocal microscope.

Изчислената гъстота на ендотелните клетки в рамките на настоящото проучване е на базата на 140 контроли на 70 души и средната стойност е 2975 ± 434 кл/мм².

В литературата съществуват публикации, представящи изчисление на дебелината на отделните роговични слоеве. Епителната дебелина е изчислена чрез LSCM, но няма толкова категорични данни за съответствието между епителна и стромална дебелина чрез LSCM и трябва да се развива този въпрос в бъдеще [177]. Равнината на изследване чрез LSCM (HRT3-RCM) се настройва чрез движение на главата на обектива и съответно на аплантационната шапка. Като аплантационен метод стабилизирането на обектива е аналогично като това при другите поколения конфокални апарати. Максималното автоматично заснемане е 40 скана или 80 μm [158] и увеличава времето за ръчно настройване на заснемане в цяла дебелина, увеличавайки възможността от артефакти поради неволеви движения на пациента и сърдечните пулсации.

LSCM позволява заснемане на роговицата *in situ* създавайки потенциал за наличие на артефакти, свързани с тъканно фиксиране, секционирание и стабилизиране [185]. Има специфични щамове, които се появяват вследствие на техниката на LSCM и е много важно те да бъдат разпознати и отхвърлени преди анализа на изображенията. Те са свързани с натиска върху роговицата [154] и образуваните роговични гънки и линии изглеждат като пресичащи се с тънки линии, чиято интензивност нараства с увеличаване на натиска върху роговицата [154],[186].

Въвеждането на LSCM в областта на клиничните проучвания и клиничната практика представлява революция във възможностите за проследяване на наследствените роговични дистрофии. Това неинвазивно изследване позволява микроструктурен анализ на живо на роговицата на засегнати субекти още в ранен стадий на заболяването и скрининг на членове на семейството, евентуални носители на заболяването [196].

В литературата както и в клиничната медицина роговичните дистрофии са получили подобаващо внимание и има множество публикации. В последните години публикациите във връзка с конфокална микроскопия зачестяват, въпреки че са изследвани малки групи пациенти [19], [162], [168], [170], [197].

В литературните библиотеки обаче наличните публикации, съобщаващи за изследване с последно поколение Heidelberg Retina Tomograph III Rostock Cornea Module (HTR3-RCM) са твърде малко.

Именно тази технология е методиката на лазер сканиращата конфокална микроскопия на живо, която е използвана за целите на това проучване.

Една от най-често срещаните епителни дистрофии за България е епителиалната дистрофия на базалната мембрана. В настоящото проучване се установиха качествени изменения в епителните слоеве на изследваните роговици и техните количествени характеристики.

Епителната дистрофия на базалната мембрана е билатерална, обикновено се проявява през 40-те години от живота. При клинично изследване със светлинна биомикроскопия се характеризира с наличие на сивеещи епителни линии под формата на пръстов отпечатък, кръстосващи се тип „географска карта“ и точковидни депозити [186], [198]. Като тези промени са променливи във времето. Werblin et al. съобщават за нея при над 76% от хората над 50 години, предполагайки че при повечето случаи се касае за възрастово-обусловена дегенерация на роговицата [199].

Екип от японски изследователи са представили изследване, което е имало за цел да установи патологичните промени в роговичните слоеве при пациенти с епителиална дистрофия на базалната мембрана чрез LSCM на живо. Изследването е извършено чрез второ поколение конфокален микроскоп (HRT2-RCM). Публикацията е въз основа на изследване върху двама пациента, за които не е известна предишна фамилна обремененост за епителиална дистрофия [186].

Микроскопията на засегнатите роговици открива лезии, които са свързани с различни по форма високорефлексивни екстрацелуларни депозити в повърхностния и базалния епител и на нивото на слоя на Бауман. Тази картина се характеризира с промените тип “географска карта”. Във вторият случай са описани лезиите тип „пръстов отпечатък“ като множество тъмни стрии сред повърхностния и базалния епител и слоя на Бауман. Възможна е инфилтрацията от Лангерхансови клетки и силно рефлексивни точки, наблюдавани на ниво слоя на Бауман.

В стромата се откриват хиперрефлексивни приличащи на игли структури. В стромата на втория клиничен случай откриват високо рефлексивни микрокисти. Десцеметовата мембрана и ендотелът имат нормална структура и при двамата пациента [186].

Установените от нас характеристики са въз основа на 30 засегнати роговици на 15 пациента, изследвани чрез последно

поколение LSCM (HRT3-RCM) и включват типичните линейарни структури сред клетките на епитела. Откриват се и неправилни депозити, с окръглена или пръстеновидна форма и малки хиперрефлексивни микрокисти, разположени в базалните клетки.

Новост при изследването на тази епителна дистрофия е съобщението за промените в стромата, описани като микрокисти и игло-образни материи. Тези промени не са описани в предходни проучвания [164], [197], но в настоящото проучване намерихме доказателства за тях.

Хистопатологичните лезии тип „географска карта“ и „пръстов отпечатък“ представят изтънена базална мембрана, която навлиза в епитела под формата на многослойни листове от фиброгрануларен материал [200]–[202].

Многообразните по форма хиперрефлексивни структури в епителния слой и слоя на Бауман, установени чрез LSCM, съответстват на граничните или вътрешни сред лезиите от „карто“-образни мътнини фиброгрануларни материи. Също се описват множеството от прави или извити хипорефлексивни линии в зоните на лезиите тип „пръстов отпечатък“, които вероятно представляват вгъване на абнормно разрастнала се базална мембрана. Някои автори приемат, че тези промени могат да бъдат и резултат от артефакти от самата процедура. Нашето проучване не установи промени, дължащи се на техниката на изследване.

Откритията при комплексния анализ на снимките от LSCM съответстват на описаните в предишни съобщения хистопатологични промени екс виво при роговици с епителиална дистрофия на базалната мембрана [186].

Все още липсват съобщения, които да декларират доказателства за произхода на натрупания под формата на игли материал в стромата. Има публикации, които определят, че появата на тези изменения е възможна в ранните и в по-късните стадии на роговичното възпаление [203].

Ние наблюдавахме също вероятни Лангерхансови клетки и други възпалителни клетки в повърхностния епителен слой. Такива са описани и в публикация върху двама пациента [186]. Тези потенциални възпалителни компоненти, открити в роговици, засегнати от епителиална дистрофия на базалната мембрана, потвърждават теорията за асоциация на дистрофията с налично възпаление. Възможно обяснение за възпалителните промени е

теорията, че те се дължат на вторичен отговор поради предходните роговични ерозии и/или депозитите от фиброгрануларни материи [186].

Резултатите от извършената LSCM на живо на роговици с клинично поставена диагноза епителиална дистрофия на базалната мембрана демонстрират финна, високорефлексивна задебелена линейна структура, разположена в средните и базалните епителни слоеве и предна строма, кореспондиращи на абнормна мембрана [204]. В епитела са идентифицирани висококонтрастни, кръгли или с форма на капчици кисти, вариращи по размер от 10 до 400µm [165], [205]. Базалните епителни клетки около нарушената базална мембрана изглеждат силно изменени, с разлята и изтеглена овално цитоплазма и ядра с висока рефлексивност [164], [206].

Допълнително множество патологични промени са установени на ниво суббазален нервен плексус. Описват се къси нервни влакна, с изменен ход, групирани като в пакет и намален брой на по-дългите нерви [164]. Нашето проучване на това ниво установи пръстнати клетки с неправилна форма, определяни в литературата като дендритни клетки. Налични са и промени в структурата на суббазалните нерви, характеризирани се с нарушен ход и намален брой нервни разклонения до напълно липсващи.

Американски екип от изследователи обобщават резултати от различни клинични проучвания на роговични дистрофии чрез конфокална микроскопия. Целта на съобщението е да подпомогне клиничните специалисти при диагностицирането на роговични дистрофии, когато диагностицирането не е достатъчно обосновано при наблюдение със светлинен микроскоп. LSCM подпомага разбирането на морфологичните характеристики на роговицата на хистологично ниво и може да е полезна при окончателното поставяне на диагнозата, при определяне на прогресията и дори за разбиране на патофизиологията на патологичния процес [206]. Това е едно от малкото публикувани изследвания на роговицата, извършени с последната генерация конфокален микроскоп, използван и в нашето изследване, а именно HRT3-RCM.

Роговичната микроструктура при стромални дистрофии е представена в няколко публикации на клинични случаи или малка серия от случаи [92], [166], [168]. При латисовата дистрофия при LSCM амилоидното натрупване се характеризира със слабо отграничени, хиперрефлексивни линейни и разклонени структури с вариабилна интензивност [207].

Описанието, съответстващо на латисова дистрофия е мрежа от линии от субепителни мътнини в засегнатите роговици. При хистологично изследване латисовите линии реагират позитивно на амилоидни маркери, каквото е оцветяването по Congo red.

Ние установихме нормална структура с атрофични полета на ниво епител. Суббазалните нерви са по-тънки, с намалена гъстота и не са лесно видими. На ниво на суббазалния нервнен плексус амилоидни депозити са разположени между къси нервни влакна. Нашите доказателства са потвърдени в други проучвания. Rothstein et al. съобщава за намалена плътност на влакната от суббазалния нервнен плексус, което е обяснението според него и за намалената роговична сетивност [207].

Kaufmann et al. за първи път в литературата описва клиничен случай на първична роговична амилоидоза и представя хиперрефлексивния изглед на амилоидните депозити чрез конфокална микроскопия [209]. От тогава различни изследвания описват различни пунктиформни екстрацелуларни депозити в базалния епителен слой [144], [188].

Нашето изследване описва наблюдавани линейни разклонения с променлива интензивност на ниво строма, изглеждащи като разнообразни структури от хиперрефлексивни и ясновидими линии до едва забележими линии без рефлексивност. Високорефлексивни филаменти с диаметър до 50µm в диаметър и по-плътни разклонения от 80 до 100µm в диаметър с променлива рефлексивност и лошо отграничаване са описани в три досегашни проучвания [92], [166], [210]. Тези изменения се потвърждават и в установените от нас промени. Промяната в хиперрефлексивността кореспондира с липсата на хомогенност на депозитите [92].

Намалението на дългите нервни влакна в суббазалния нервнен плексус, което резултира в намалена механична и топлинна чувствителност, е описано в публикация на клиничен случай с латисова дистрофия тип 2 (фамилна амилоидоза)[168].

Още през 1988 Krachmer и Rogrigues описват амилоидалните депозити в субепителните и стромални слоеве на роговицата като филаментозни разклонени мътнини [212]. В проучване на Alomar са регистрирани субепителни депозити, описани като хиперрефлексивни зони на ниво базален епител [213]. Тези описания са детайлно разгледани и в други вече цитирани съобщения. Установени са наличните промени както в епитела, така и преобладаващо в стромата [92], [168], [210]. Проучването на Kobayashi е направено с апаратура

(HRT2-RCM), близка до използвания конфокален апарат в нашето изследване.

Изследването и проследяването на роговичните промени при пациенти с дистрофията на Фукс е тежка задача. Дистрофията е често срещана сред населението на Европейските държави. Едно изследване обсъжда сравнително високата честота на това заболяване в държавите от Европа в сравнение с останалия свят [214]. Изследване чрез светлинна биомикроскопия и спекуларна микроскопия сред 774 участници в Reykjavik Eye Study през 2005 съобщава, че 11% от жените и 7% от мъжете имат корнеа гутата [215]. Изследване в Япония върху 107 случая установява първична гутата в приблизително 4%, описание съответстващо според изследователите на ранни промени на роговицата като при дистрофия на Фукс [216]. Сравнение на честотата на това състояние между Япония и Сингапур установи значително по-голяма честота в Сингапур (8,5% срещу 5,5%) и намаление на ендотелната плътност най-вече сред японската изследвана популация [217].

Пациентите най-често се представят с клиниката на болка, силно сутрешно дразнене и съобщение за плуващи мътнини през окото. Интактната роговица се засяга през нощта, нейната хидратация зависи от овлажняването на двата ѝ крайни слоя: епител-постъпването на вода от външната среда [218] и ендотел-снабдяването с водни молекули от вътреочната течност [219]. Зрителните смущения и силната сутрешна болка са основните симптоми. Това възпретяства изследването както с биомикроскоп, така и с LSCM.

Клиничните изяви варират със сериозността на ендотелното страдание, от наличие на корнеа гутата по ендотела и ефекта ѝ върху хидратацията до пигментно разпръскване. Други описани промени са задебеляване на Десцеметовата мембрана, едем в стромата, субепителиална фиброза и були в епитела [206]. Клетките на ендотела представят уголемяване на размера им и изменения, които могат да се отнесат към промяна в клетъчната форма или полиморфизъм. Тяхната здравина се нарушава и от излишъка от колаген [220].

Едно от големите като брой включени пациенти публикувани проучвания е на Rachel Niederer. Авторът е проследил 20 очи с дистрофия на Фукс чрез LSCM (HRT2-RCM) [221]. Извършен е качествен и количествен анализ на снимките от конфокалната микроскопия. LSCM е извършена на всеки проследен пациент на роговица в цяла дебелина с цел да се осигурят качествени снимки на всеки роговичен слой при пациенти с значителен роговичен едем. Изчислението на

ендотелната плътност е било възможно само при лимитиран брой от изследваните лица. В изследването на Niederer стойностите за стромална и ендотелна клетъчна плътност са значително по-ниски, отколкото в конкретни аналогични публикации. Предполага се, че това може да се дължи на факта, че изследваните контроли са на възраст над 59 години [156].

В нашето проучване и лицата с дистрофия на Фукс (49±10години) и контролите (35±3години) са в по-млада възраст и отговарят на избраната възраст за проследяване на клетъчната плътност в повечето публикации.

LSCM разкрива наличието на кръгли хипорефлексивни изображения с променена големина и брой, свързани с централно изсветляване на ендотела [169], [222]. Между тях ендотелът изглежда изменен от нормалния, с характеристиките на явен полимегатизъм и плеоморфизъм. Клетките изглеждат хиперрефлексивни и не могат да бъдат разграничени една от друга [223]. В по-късните стадии на заболяването се установяват дифузни хипорефлексивни зони, заобиколени от хиперрефлексивни ендотелни клетки [206], [224].

В рамките на роговичната строма, колагенови влакна са размазани и фоновата осветеност е увеличена вторично, вследствие на отока в предната строма. Количественият анализ установява намалена кератоцитна плътност в предна строма [225].

Ние установихме, че стромата има характерен вид поради наличие на множество лакуни и линейни гънки. Колагеновите фибри изглеждат неясни и замъглени, което е доказателство за наличния роговичен едем. Ламелите изглеждат раздалечени поради наличието на едемна натрупана течност във вътрешността на стромата. Стромални безклетъчни зони, наричани още лакуни, и тъмни линии се изобразяват най-вече на ниво задна строма.

Лакуните и тъмните линии с размер от 5 до 20 μm ширина се откриват в задна строма. Тези тъмни линии се предполага, че представляват натрупвания по Десцеметовата мембрана. Колагеновите ламели са разделени една от друга поради наличния роговичен оток или джобчета с течност [19], [226], [227].

На ниво суббазален нервен плексус се съобщава за намаление или липса на нервни влакна [227]. Grupcheva et al. използват LSCM за демонстриране на промени в роговицата при роговичен едем и намалена роговична прозрачност [228]. Конфокалната микроскопия може да потвърди диагнозата корнеа гутата или съответно дистрофия

на Фукс чрез доказване на гутата. Най-важното предимството на конфокалната микроскопия на живо при роговичен едем е възможното изобразяване на всички клетъчни слоеве на роговицата.

Значима разлика е открита в големината на гутатата и броя кератоцити в задна строма, ендотелна гъстота и централна роговична дебелина [221], [229]. Няма корелация между гутатата и стойностите на клетъчна плътност при базалния епител и предна строма.

Количественият анализ дава сравнение между клетъчната плътност на четири нива в цялата роговица и сравнява 20 очи с дистрофия на Фукс и 20 нормални здрави контроли. При очите с дистрофията на Фукс плътността на клетките в базалния епител е 6180 ± 1040 кл/мм², докато при здравите контроли плътността е 5380 ± 1030 кл/мм². Промените засягат категорично клетъчната плътност и на кератоцитите. Ендотелната плътност при дистрофичните роговици е калкулирана на 2410 ± 375 кл/мм², а при здравите контроли е 1610 ± 730 кл/мм² [221]. Всички публикувани стойности имат статистическа значимост и са поместени в Таблица 18.

Таблица 18. Стойности на клетъчната гъстота при изследване на пациенти чрез конфокална микроскопия на живо (HTR 2-RCM) [221], стойностите са изчислени в брой клетки на мм², посочено е стандартното отклонение

	Control subjects n = 20	Fuchs' dystrophy n = 20	P value*
Basal epithelial density (cells/mm ²)	6180 ± 1040	5380 ± 1030	0.019
Sub-basal nerve fibre density (mm nerve/mm ²)	16.0 ± 6.2	11.9 ± 7.8	0.073
Anterior keratocyte density (cells/mm ²)	594 ± 236	334 ± 207	0.001
Posterior keratocyte density (cells/mm ²)	292 ± 68	224 ± 72	0.004
Endothelial density (cells/mm ²)	2410 ± 375	1610 ± 730	< 0.001

Резултатите получени от нас показаха висока гъстота на епителните клетки 4802 ± 1183 кл/мм² в роговици с дистрофия на Фукс. Установената плътност на средно- и задностромалните кератоцити е почти еднаква, 289 ± 55 кл/мм² и 278 ± 46 кл/мм². В предната част на стромата клетките са с по-ниска плътност, 213 ± 42 кл/мм². Най-голямо впечатление прави значително ниската клетъчна гъстота на ендотела в засегнатите очи, която в нашето проучване изчислихме на 1399 ± 579 кл/мм². В сравнение с резултатите от нашите здрави роговици е

установено намаление на клетъчната плътност в епителния слой, в предна и средна строма, и най-голяма клетъчна загуба на ниво ендотел.

Мексиканско проучване описва микроскопските структурни характеристики, установени чрез конфокална микроскопия на пациенти с епителни, стромални и ендотелни дистрофии. Това е сравнително голямо проучване, при което са изследвани 30 пациента или 60 очи с различни дистрофии, засягащи съответните роговични слоеве. Поради това публикацията заслужава нашето внимание. Авторите обобщават структурните характеристики за конкретни дистрофии и заключават, че микроструктурното описание може да се приема за диагностична алтернатива, която подкрепя клиничните находки [230].

Проучване на Niederer демонстрира клетъчната гъстота при роговици с кератоконус в сравнение със здрави роговици. Установени са по-ниски клетъчни плътности на базалния епител 4340.6 ± 595.2 кл/мм² при кератоконус спрямо 5777.6 ± 958.2 кл/мм² в здрави роговици. Аналогично е и съотношението на ниво строма, за предната строма в роговици с кератоконус е 523.6 ± 206.4 кл/мм², докато в здрави е 859.7 ± 219.1 кл/мм², а в задна строма е 240.4 ± 64.5 кл/мм² спрямо 330.6 ± 52.3 кл/мм² [158], [229]. Ендотелната гъстота не е проследена в цитираната публикация.

Ние установихме понижение на епителната плътност в роговиците с кератоконус на 5004 ± 452 кл/мм², докато при здрави роговици тя е 5717 ± 573 кл/мм². На ниво предна, средна и задна строма редукцията на клетъчна плътност също е отчетлива, съответни при кератоконус е 229 ± 32 кл/мм², 200 ± 52 кл/мм² и 225 ± 57 кл/мм² за задна строма в сравнение с 642 ± 108 кл/мм² в предна, 268 ± 53 кл/мм² в средна и 301 ± 68 кл/мм² в задна строма на здрави роговици. Ние изчислихме също ендотелната клетъчна гъстота, която също отбеляза намаление от 2975 ± 434 кл/мм² при здравата до 2399 ± 433 кл/мм² при роговиците с кератоконус.

LSCM на живо осигурява възможността за визуализиране на характерни микроструктурни промени в роговицата при висока резолюция, свързани с генетично определени дистрофии. Използването ѝ е необходимо за диференциална диагноза на различни роговични дистрофии, особено когато диагнозата не е напълно убедителна, и за наблюдение на характерните промени при вече установена дистрофия. Полезността ѝ се изразява най-вече в способността да открива и диагностицира различни състояния без

необходимостта от инвазивни методи на изследване, дори заменяйки някои генетични и хистологични изследвания.

LSCM има приложение и в бъдеще време за проследяване и прогнозиране на състоянието както и по-доброто разбиране на патофизиологията на заболяването.

VI. Заключение

Лазер сканиращата конфокална микроскопия на живо (LSCM) дава уникален поглед върху роговичната структура. Изследването чрез LSCM осигурява качествена и количествена оценка на роговицата. LSCM понастоящем е единствената методика за образно изследване на роговицата, позволяваща едновременно измерване на роговичната дебелина, плътността на клетъчните субпопулации от всички роговични слоеве в цялата дълбочина, гъстотата на суббазалните нервни влакна. Методиката е уникална в комбинирането на количествен анализ с морфологична оценка на живо на микроструктурно ниво на всички структури и клетъчни популации на роговицата.

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 и терапевтичното поведение.

Настоящото проучване успя да дефинира промените в роговицата при различни дистрофии: епителиална дистрофия на базалната мембрана, латисова дистрофия и дистрофия на Фукс, както и при ектатични дистрофии като кератоконус с помощта на конфокална микроскопия на живо и да докаже, че промените в роговицата са факт. Проучването определи качествени промени на роговицата, които могат да служат за оценка на моментното състояние, да съдействат за прогнозиране на прогресията на заболяването и терапевтичното поведение. Изчислените клетъчни гъстоти в отделните роговични слоеве както при здрави роговици така и при роговични дистрофии могат да послужат за оценка на състоянието на изследваната роговица.

VII. Изводи

1. Лазер сканиращата конфокална микроскопия на живо позволява да се извърши качествен и количествен анализ на здрава роговица
 - 1.1. Описани са морфологичните характеристики на клетките, разположение в отделните анатомични слоеве в здравата роговица
 - 1.2. Изчислени са стойностите на клетъчните плътности, характерни за здравата роговица
2. Анализирани са микроструктурните характеристики на роговицата при роговични дистрофии, засягащи различни роговични слоеве
 - 2.1. Установени са качествените характеристики на роговици с клинично диагностицирани дистрофии
 - 2.2. Изчислени са стойностите на клетъчната плътност, които са характерни за съответните нозологични единици
3. Изработен е алгоритъм за микроструктурен анализ на живо с Heidelberg Retina Tomograph III Rostock Corneal Module на роговицата и конюнктивата при пациенти с роговични дистрофии, типични за българската популация. Изследването чрез LSCM осигурява качествена и количествена оценка на моментното състояние на роговицата, както и възможност за проследяване и прогнозиране на последващите изменения.
4. Дефинирани са качествените и количествените промени на роговицата, които могат да служат за оценка на моментното състояние и да съдействат за прогнозиране на прогресията на заболяването, както и при избор на терапевтично поведение.
 - 4.1. Създадени са критерии за оценка на състоянието на роговицата към момента на изследване
 - 4.2. Установени са качествените белези, които да определят хода на заболяването и на базата, на които да се прогнозира развитието на патологичния процес
5. LSCM е методика с висока резолюция, която осигурява всички необходими предпоставки да се осъществява корелация на качествените и количествени характеристики на наблюдаваните *in vivo* или *ex vivo* роговични структури.
6. Иновативната технология на LSCM дава достоверен поглед върху роговицата на микроструктурно ниво на живо, което е достатъчна причина конфокалната микроскопия на живо да бъде предпочитан метод за микроструктурно изследване.

VIII. Приноси

Приноси с научно-приложен характер

- Разработи се приложение на лазер сканиращата конфокална микроскопия на живо за изследване на преден очен сегмент
- Създаден е стандарт за нормална роговица за България на базата, на който могат да бъдат оценени патологичните промени с помощта на лазер сканираща конфокална микроскопия на живо
- Изчислени са нормалните стойности на клетъчна плътност за отделните слоеве на здравата роговица.
- Установени са качествените промени в корнеата и характерните патологични структури за съответните роговични дистрофии (епителиална дистрофия, латисова дистрофия, дистрофия на Фукс)
- Описани са микроструктурните характеристики на роговици с кератоконус
- Описани са топографските характеристики на здравата роговица с оптична кохерентна томография и са анализирани различията при роговици с кератоконус
- Доказани са възможностите на лазер сканиращата конфокална микроскопия на живо да се прилага като неинвазивна алтернатива на хистологичните изследвания на здрава и патологична роговица

Приноси с научно-теоритичен характер

- За пръв път в България са описани структурните характеристики на нормалната роговица на базата, на които могат да се характеризират промените при пациенти с роговични дистрофии
- Доказани са характерни промени при следните роговични дистрофии:
 - епителиална дистрофия на базалната мембрана
 - латисова дистрофия
 - дистрофия на Фукс
 - кератоконус
- Описани са топографските характеристики на предната очна повърхност на здрави субекти от български произход

Приноси с потвърдителен характер

- Сравнени са топографските характеристики на роговицата на българската популация с публикации за Европа и света
- Сравнени са микроструктурните характеристики на здравата роговицата на българската популация с тези в публикуваната литература.

Публикации, свързани с дисертационния труд

1. **Т. Маринова**, В Иванчева, С Пеева, Хр. Групчева Безобидна ли е пингвекулата? Български офталмологичен преглед 2013, брой 2, 11-17
2. **Т. Маринова**, Морфологични и структурни характеристики на Мейбомиевите жлези – анализ чрез конфокална микроскопия, Известия на съюза на научените, Варна 2/2013, 26-31
3. **Т. Маринова**, Хр. Групчева, Псевдоексфолиативен и пигментно-дисперсен синдром – диференциация чрез лазер-скениращата конфокална микроскопия, Глаукоми, том 2, брой 2, 2013, 27-31
4. **Т. Маринова**, В. Иванчева, Св. Пеева, Хр. Групчева Познаваме ли необходимостта от УВ защитни средства, Превантивна медицина III, 2014, 2 (7), стр. 20-23
5. **Marinova T, V Ivancheva, S Peeva, CN Grupcheva** Comparison of four methods for corneal thickness measurement J Biomed Clin Res Vol 6, Number 1, 2013, 37-42
6. **Teodora Marinova, Vesela Ivancheva, Valeri Sheherov, Christina Grupcheva** Microstructural proofs of dry eye changes, Scripta Scientifica Medica vol. 45, suppl. 6, 2013, pp. 12-18

Участия в научни форуми

1. **Т. Маринова**, Св. Пеева, В. Иванчева, Микроструктурна характеристика на Мейбомиевите жлези при пациенти с евапоративно сухо око – нови възможности за диагностика, , XV-та Годишна Среца на Съюза на Очните Лекари в България, Пловдив, май 2012, (*постер*)

2. **Т. Маринова**, Хр. Групчева Микроструктурен анализ на патологични промени в роговици с корнеална дистрофия, XVIII-та Годишна Среца на Съюза на Очните Лекари в България, Пловдив, май 2015, (*презентация*)
3. **Т. Л. Маринова**, Безобидна ли е пингвекулата Национална конференция „Новости в офталмологията“, София 23-24 март 2012,
Поощрителна награда-Конкурс за наградата на името на проф. Дъбов, (*презентация*)
4. **Marinova TL**, V. Ivancheva, S. Peeva, C. N. Grupcheva, Comparison of four methods for measuring the corneal thickness, Xth International Medical Scientific Conference for Students and Young Doctors, Pleven, 17-20.10.2012, Първа награда в секция „Докторанти“, (*presentation*)
5. **Marinova T**, V Sheherov, V Ivancheva, CN Grupcheva, Meibomian glands morphology and dry eye symptoms-clinical correlation, 12th International Medical Scientific Conference For Students And Young Doctors, Medical University Pleven, 8-10.10.2014, Втора награда в секция „Докторанти“, (*presentation*)
6. Пеева Св., **Т. Маринова**, В. Иванчева, Пигментен дисперсен синдром възможности на лазерната конфокална микроскопия на живо, XV-та Годишна Среца на Съюза на Очните Лекари в България, май 2012, Първа награда за най-добър постер, (*постер*)
7. **Marinova TL**, V Ivancheva, SS Peeva, CN Grupcheva, Central and peripheral corneal thickness in White Europeans subjects measured by different technology, SOE 2013, 08-11.06.2013, Copenhagen, Denmark (*poster-presentation*)
8. **Marinova TL**, V Ivancheva, V Sheherov, CN Grupcheva, Contact lenses? Yes, but what kind... ,World Ophthalmology Congress 2014, 2-6.04.2014, Tokyo, Japan, Awarded Travel Grant (*poster-presentation*)
9. **Marinova TL**, V Ivancheva, CN Grupcheva Map-dot-fingerprint and Lattice dystrophies microstructural insides by laser-scanning confocal microscopy, Marinova TL, V Ivancheva, CN Grupcheva, SOE 2015, 08-11.06.2015, Vienna, Austria (*poster-presentation*)