

УДК 617.7–073.582(048.8)

### Современные возможности конфокальной микроскопии

Н. В. Пасечникова, член-корр. НАМН Украины, профессор, д-р мед. н., Г. И. Дрожжина, профессор, д-р мед. н., О. Н. Иванова, канд. мед. н., Е. В. Вансович, клинординатор, И. О. Насинник

ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова НАМН Украины», Одесса (Украина)

*Конфокальна микроскопія рогівки — сучасний метод дослідження, який дозволяє проводити прижиттєвий моніторинг стану рогівки, з візуалізацією тканин на гістоморфологічному рівні в стані функціональної активності. Конфокальну микроскопію використовують в науково-дослідних, експертних та клінічних цілях.*

*Конфокальний мікроскоп Confoscan 4 (NIDEK Technologies, Японія) дозволяє безконтактним методом, через іммерсійний гель сканувати рогівку по всій її товщині, в напрямку від ендотелію до епітелію з визначенням якісного і кількісного складу клітин і нервів. Дослідження ендотелію дозволяє проводити аналіз поліморфізму, плеомегатизму і щільності клітин. За допомогою насадки Z- ring здійснюється функція оптичної пахіметрії рогівки.*

*Нами, в 2013 році проведена конфокальна микроскопія у 69 пацієнтів, з них: з спадковими дистрофіями рогівки — 6, епітеліально-ендотеліальною дистрофією рогівки, включаючи дистрофію Фукса, cornea guttata і псевдоекфоліативною кератопатією — 15, кератоконусом — 18, синдромом сухого ока — 12, після кератитів — 1.*

*Проведений аналіз даних літератури та результати власних досліджень дозволяють визначити, що конфокальна микроскопія є унікальним методом діагностики широкого спектру захворювань рогової оболонки, з оцінкою процесів регенерації рогівки і ускладнень після різних видів хірургічних втручань, впливу на рогівку різних фармакологічних препаратів, контактних лінз, а також імплантів. Здатність конфокального мікроскопа дослідити тканини рогівки з візуалізацією мікроорганізмів, запальних і епітеліальних клітин, нервових волокон, фіброзу, розкриває перспективи для його використання в офтальмології.*

**Ключевые слова:** конфокальная микроскопия, роговица

**Ключові слова:** конфокальна микроскопія, рогівка

### Modern possibilities of confocal microscopy

N. V. Pasechnikova, G. I. Drozhzhyna, O. N. Ivanova, E. V. Vansovich, I. O. Nasinnik

State Institution The Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy of the NAMS of Ukraine, Odessa, (Ukraine)

*Confocal microscopy of the cornea is a modern method of research, allowing to carry out monitoring the state of the cornea in vivo due to the visualization of the tissue at the histomorphological level in the state of functional activity. Confocal microscopy is used for the research, expert and clinical purposes.*

*Confocal microscope Confoscan 4 (NIDEK Technologies, Japan) allows to investigate the cornea by the non-invasive method, through immersion gel. Scanning the cornea occurs throughout its thickness in the direction of the endothelium to the epithelium with determination of the qualitative and quantitative composition of cells and nerves. The study allows to make the analysis of endothelial polymorphism pleomegatism and cell density. Z-ring nozzle accomplished the optical pachymetry of the cornea.*

*In 2013 we conducted the confocal microscopy in 69 patients: hereditary corneal dystrophies — 6, endothelial — epithelial corneal dystrophy including Fuchs dystrophy, cornea guttata and pseudoexfoliation keratopathy — 15, keratoconus — 18, SSG — 12, outcomes of keratitis — 11, etc.*

**Conclusion.** *The analysis of the literature data and results of our own research show that confocal microscopy is a unique diagnostic method in a wide range of diseases of the cornea, with possible evaluation of the regeneration processes of the cornea, complications after different types of surgery on the cornea, and influence of the various pharmacological drugs, contact lenses and implants.*

*The possibility of the confocal microscope to investigate the corneal tissue with the visualization of microorganisms, inflammatory and epithelial cells, nerve fibers, fibrosis opens prospects for using this method in ophthalmology.*

**Key words:** confocal microscopy, the cornea

**Введение.** Возможность прижизненной оценки различных структур глаза на микроскопическом уровне всегда привлекала офтальмологов. Однако до недавнего времени изучение роговицы *in vivo* ограничивалось биомикроскопией на щелевой лампе, а гистологические исследования были возможны только в условиях *ex vivo* после фиксации срезов роговицы и окрашивания образцов различными красителями, а также с помощью электронной микроскопии. Данные методики, к сожалению, не лишены недостатков: прежде всего для их проведения необходим фрагмент ткани, удаленный хирургическим путем, а в процессе фиксации и окрашивания возможно возникновение различных артефактов, которые усугубляются постмортальными изменениями в тканях и затрудняют интерпретацию полученных результатов. Кроме того, гистоморфология роговицы *in vitro* и электронная микроскопия исключают возможность повторного исследования в динамике течения заболевания [11, 30, 66].

В связи с этим, одной из целей при разработке конфокальной микроскопии было преодоление ограничений, с которыми сталкиваются традиционная световая и электронная микроскопия.

Биомикроскопия роговицы, широко используемая в клинической практике офтальмологами, также имеет ряд ограничений. Основным лимитирующим фактором биомикроскопии на щелевой лампе является то, что свет, отраженный от структур, окружающих исследуемую точку, «затеняет» получаемое изображение. Это формирует размытость границ и снижает контрастность получаемого изображения. В результате, сорокакратное увеличение является максимально возможным для биомикроскопии на щелевой лампе, что позволяет получить разрешение в 20 мкм. Попытка дальнейшего увеличения изображения дала бы лишь размытые пятна [11]. Кроме того, роговица является практически прозрачной структурой и отражает всего лишь 1 % падающего света, что делает ее визуализацию особенно трудной.

Конфокальная микроскопия роговицы — современный метод исследования, позволяющий

проводить прижизненный мониторинг состояния роговицы с визуализацией тканей на клеточном и микроструктурном уровне. Принцип конфокальной микроскопии был впервые описан Minsky в 1957 году для прижизненного изучения клеток и нервных сплетений головного мозга [53]. Он предложил систему, в которой линза осветителя и объектива фокусировались бы в одной точке (т.е. имели общие фокальные точки), что дало название «конфокальной» микроскопии. Конфокальная микроскопия значительно увеличила аксиальное (5–10 мкм) и латеральное (до 1–2 мкм) разрешение за счет выключения из фокальных точек информации, приходящей из соседних с обследуемой точкой областей. Это делает возможным увеличение изображения без потери контрастности и четкости до 600 раз [4, 20]. С помощью такой конфокальной системы можно получить изображения очень маленького по площади участка исследуемой зоны, что обуславливает необходимость быстрого перемещения фокальной точки по плоскости исследуемого объекта и воссоздания цельного изображения в режиме реального времени [25, 62].

Впервые в 1974 г. Maurice с использованием конфокального микроскопа получил фотографии неокрашенных слоев роговицы кролика *ex vivo* с увеличением около 500 раз [52]. В последующие годы конфокальная микроскопия была применена для визуализации различных неокрашенных роговичных структур в энуклеированных глазах человека [36].

В конце 80-х годов XX века стали создаваться первые прототипы конфокальных микроскопов для использования в клинике, позволяющих исследовать ткани человеческого глаза *in vivo* на клеточном уровне. В 1988 г. Dilly опубликовал первое исследование, содержащее изображения эпителия, клеток стромы и эндотелиальных клеток роговицы человека, полученные *in vivo* с помощью конфокальной микроскопии [24].

Оптическая теория конфокальной микроскопии была более детально разработана в 1980-х (Wilson and Sheppard 1984 г.) и 1990-х годах (Hill 1994г.; Masters and Thae 1994г.).

В последние годы интерес к конфокальной микроскопии возрастает и изучению диагностических возможностей этого метода прижизненного исследования роговицы посвящены многочисленные зарубежные и отечественные публикации [2–5, 16, 28, 31].

В настоящее время разработано несколько моделей конфокальных микроскопов для исследования роговой оболочки, представленных на рынке: Confoscan P4 (Tomey Corporation, Cambridge, MA, USA), Confoscan 4 (NIDEK Technologies, Япония) и лазерный сканирующий микроскоп Heidelberg Retina Tomograph II Rostock Corneal Module (HRTII).

По принципу сканирования современные офтальмологические конфокальные микроскопы разделяют на «тандемные сканирующие конфокальные микроскопы», использующие технологию вращающегося диска Nipkow (62) и «щелевые сканирующие конфокальные микроскопы». Диск Nipkow состоит из металлической пластинки с микроскопическими отверстиями, расположенными в виде Архимедовой спирали. Наличие множества отверстий и быстрое вращение диска позволяют получить одновременное сканирование всего объекта. Подобный принцип использован в конфокальных микроскопах, производимых фирмой Nidek (Япония) — Confoscan 2,3,4. Для сканирования в данных приборах использован низкокогерентный белый свет с инфракрасными и ультрафиолетовыми фильтрами с толщиной слоя сканирования 5 мкм.

Щелевой сканирующий конфокальный микроскоп позволяет получить изображение исследуемого объекта за счет быстрого перемещения тонкого лазерного луча [67, 75]. Данный принцип лежит в основе разработанного компанией Heidelberg Engineering (Германия) конфокального микроскопа Rostock Cornea Module для HRT II, использующего диодный лазер с длиной волны 670 мкм.

Поскольку метод конфокальной микроскопии бесконтактный, свет от линзы к роговице проходит через иммерсионный гель, находящийся между роговицей и объективом линзы, что исключает непосредственный контакт и сводит к минимуму риск повреждения переднего эпителия (Рис. 1). Результаты исследования отображаются на мониторе с возможностью цифровой системы записи и хранения результатов.

Современное применение конфокальных микроскопов в офтальмологии осуществляется в научно-исследовательских, экспертных и клинических целях.

Научно-исследовательское направление заключается в описании и анализе различных состояний роговицы: интактном, после травм, при воспалительных заболеваниях, дистрофиях [39, 50], неоваскуляризации после воспаления и ожогов роговицы [10], течении репаративных процессов [2, 58, 81].

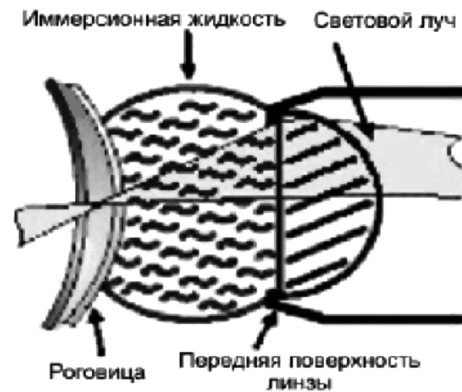


Рис. 1. Схема расположения линзы по отношению к роговице, через вязкую иммерсионную среду.

Экспертное применение конфокальных микроскопов позволяет проводить оценку воздействия на роговицу фармакологических препаратов, контактных линз, различных имплантатов [40, 73].

Клиническое направление выводит офтальмологию на качественно новый уровень прижизненной динамической визуализации ультраструктурных изменений роговицы различной этиологии [16, 81, 86].

Важным показателем, характеризующим состояние роговицы, является количественный состав ее клеточных слоев [62], однако наибольшее практическое значение имеет подсчет эндотелиальных клеток. Конфокальная микроскопия эндотелия позволяет проводить качественную и количественную оценку (анализ полиморфизма, плеомегатизма и плотности клеток) [16, 30]. Кроме этого прибор Confoscan 4 оснащен специальной насадкой Z-ring, с ее помощью осуществляется функция оптической пахиметрии.

Одной из проблем конфокальной микроскопии остается подсчет клеток стромы и эпителия в единице объема роговичной ткани [62]. Трудность обусловлена трехмерным размещением клеток, что затрудняет их достоверный количественный анализ с помощью двумерных конфокальных срезов. Частично это решается с помощью компьютерной реконструкции трехмерного изображения роговицы из ряда последовательных двумерных снимков, но пока эти исследования не внедрены в практику [48].

Berlau [9] в 2002 г. опубликовал данные о корреляции количества кератоцитов в различных слоях роговицы с оптической плотностью этих слоев. Путем математических расчетов он получил количественные данные о плотности кератоцитов в норме и при различной офтальмопатологии. Например, у здоровых людей в возрасте от 20 до 25 лет средняя плотность кератоцитов в роговице составляет  $4,9 \times 10^4$  клеток/мм<sup>3</sup>. Существует статистически

значимый градиент уменьшения количества кератоцитов в глубоких слоях стромы по сравнению с передними и снижение плотности кератоцитов с возрастом (на 5 % за каждые 10 лет) [62].

Использование специальных приспособлений к конфокальным микроскопам позволяет визуализировать слезную пленку [50], хрусталик [47], сетчатку [49]. Кроме того, с помощью некоторых моделей конфокальных микроскопов можно визуализировать структуру конъюнктивы [77].

**Подготовка к конфокальной микроскопии роговицы.** Данный прибор позволяет сканировать роговицу по всей ее толщине, в направлении от эндотелия к эпителию, фиксируя все слои в автоматическом режиме, ручной режим используется для визуализации отдельных интересующих корнеальных структур. Как указывалось выше, микроскоп обладает возможностью проводить исследование бесконтактным методом для визуализации эндотелия с последующей количественной и качественной оценкой формы, размера и плотности клеток. Для этого применяется линза 20x, NA 0,75, WD 1,98мм, Zeiss исследуемая зона роговицы — 460 x 690  $\mu\text{m}$ , получаемое изображение — 384 x 576 pixel, латеральное разрешение — 1.2  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ , скорость сканирования — 25 снимков в секунду, количество изображений до 200. Сканирование и гистоморфологическая оценка всех слоев роговицы осуществляется через иммерсионный гель с линзой 40x, NA 0,75, WD 1,98мм, Zeiss. Перед исследованием проводится инстилляционная анестезия. Для проведения конфокальной микроскопии на объектив линзы конфокального микроскопа помещают каплю иммерсионной жидкости. Это исключает непосредственный контакт линзы с роговицей и сводит к минимуму риск повреждения эпителия. Линзу с каплей геля подводят к роговице до касания и устанавливают так, чтобы толщина слоя иммерсионной жидкости составляла 2 мм. Исследуемая зона роговицы составляет — 500 x 375  $\mu\text{m}$ , получаемое изображение — 768 x 576 pixel, латеральное разрешение — 0,65  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ , скорость сканирования — 25 снимков в секунду, количество изображений до 350, толщина слоя сканирования — 5 мкм. Конструкция прибора позволяет исследовать роговицу в центральной зоне и её парацентральных участках. Изображение появляется на экране прибора, что дает возможность контролировать ход исследования и в режиме видео просматривать полученный материал после его завершения.

**Интерпретация данных конфокальной микроскопии роговицы.**

Нормальная морфологическая картина роговицы включает пять слоев: эпителий, Боуменову мембрану, строму, десцеметову мембрану и эндотелий.

Передний эпителий состоит из 5–6 слоев клеток. Средняя толщина всего эпителия роговой обо-

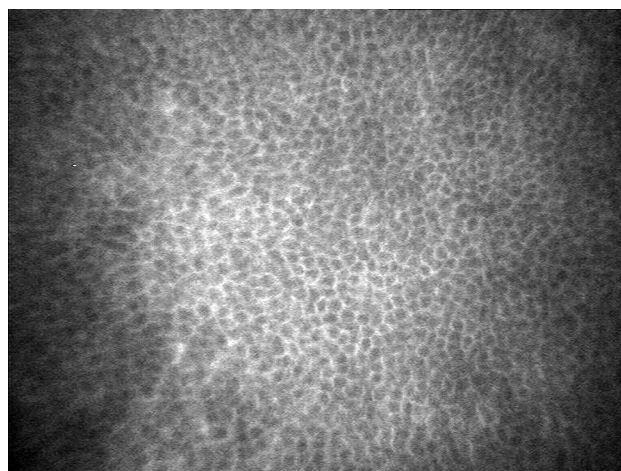
лочка составляет приблизительно 50 мкм. По морфологической структуре выделяют следующие слои (изнутри кнаружи): базальный, слой шиповидных клеток и поверхностный (рис. 2)



а



б



в

**Рис. 2.** Конфокальная микроскопия изображений эпителиального слоя роговицы: поверхностные эпителиальные клетки (а), крыловидные клетки (б), базальные клетки (с).

- Самый внутренний (базальный) слой представлен маленькими плотными цилиндрическими клетками без видимого ядра. Границы базальных клеток чёткие, яркие.

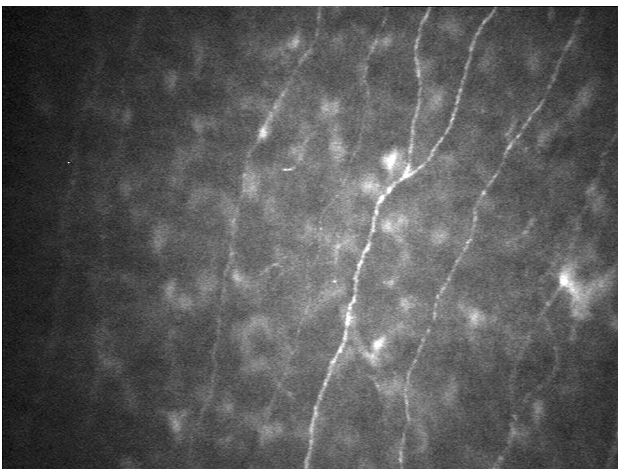
- Средний слой состоит из 2–3 пластов шиповидных (крыловидных) клеток с глубокими инвагинациями, в которые встраиваются выросты соседних клеток, имеющих непостоянную форму и размер 30–45 мкм. Микроскопически границы клеток довольно хорошо различимы, а ядра могут не определяться или быть нечёткими.

- Поверхностный слой эпителия представлен одним или двумя пластами полигональных клеток 40–50 мкм в диаметре и около 5 мкм толщиной. Визуализируются чёткие границы и гомогенная плотность клеток. Ядра обычно ярче, чем цитоплазма, в которой также можно различить околядерное тёмное кольцо.

Среди клеток поверхностного слоя различают тёмные и светлые, обладающие различной степенью рефлексивности. Повышенная отражательная способность эпителиальных клеток свидетельствует о снижении в них уровня метаболизма и начинающейся их десквамации.

Боуменова мембрана (передняя пограничная пластина) — прозрачная структура толщиной 10 мкм, не отражающая свет, поэтому в норме при конфокальной микроскопии её визуализация невозможна. Боуменова мембрана пронизана нервными пучками суббазального нервного сплетения.

Суббазальное нервное сплетение находится под боуменовой мембраной. В норме нервные волокна выглядят как параллельно идущие на тёмном фоне яркие полосы, контактирующие между собой. Рефлексивность (отражательная способность) может быть неравномерной по протяжению волокна (рис. 3).



**Рис. 3.** Конфокальное изображение Боуменовой мембраны пронизанной суббазальными нервными волокнами.

Строма роговицы занимает от 80 до 90 % ее толщины и состоит из трех основных компонентов: клеточного (кератоцитов), бесклеточного (коллагеновых волокон, межклеточной субстанции) и нервосенсорного (стромальные нервы). Коллагеновые волокна и межклеточный матрикс прозрачны и выглядят как серый аморфный фон. Основные клеточные элементы стромы — кератоциты — составляют примерно 5 % объёма. Типичная микроскопическая картина стромы включает несколько ярких неправильной овальной формы тел (ядер кератоцитов), которые лежат в толще прозрачного тёмно-серого или чёрного матрикса. Ядра кератоцитов имеют размеры от 5 до 30 мкм. В норме визуализация внеклеточных структур невозможна из-за их прозрачности. Строма может быть условно разделена на субслои: передний (расположен непосредственно под боуменовой мембраной и составляет 10 % толщины стромы), передне-средний, средний и задний.

Средняя плотность кератоцитов выше в передней строме, постепенно их количество уменьшается по направлению к задним слоям. Плотность клеток передней стромы почти в два раза больше, чем клеток задней стромы (если плотность клеток передней стромы принять за 100 %, то плотность клеток задней составит около 53,7 %). В передней строме ядра кератоцитов имеют округлую бобовидную форму, а в задней — овальную и более вытянутую (рис 4а, б).

Ядра кератоцитов могут различаться по яркости. Различная способность отражать свет зависит от их метаболического состояния. Более яркие клетки принято считать активированными кератоцитами («стрессовыми» клетками), деятельность которых направлена на поддержание внутреннего гомеостаза роговицы. В норме в поле зрения встречаются единичные активированные клетки.

Нервные волокна в передней строме роговицы визуализируются в виде ярких гомогенных полос, нередко образующих бифуркации (Рис. 4 с).

Десцеметова мембрана в норме прозрачна и при конфокальной микроскопии не визуализируется.

Эндотелий (задний эпителий) представлен монослоем плоских клеток гексагональной или полигональной формы, с равномерно светлой поверхностью на фоне чётких тёмных межклеточных границ [1]. Ядра визуализируются редко (Рис 5).

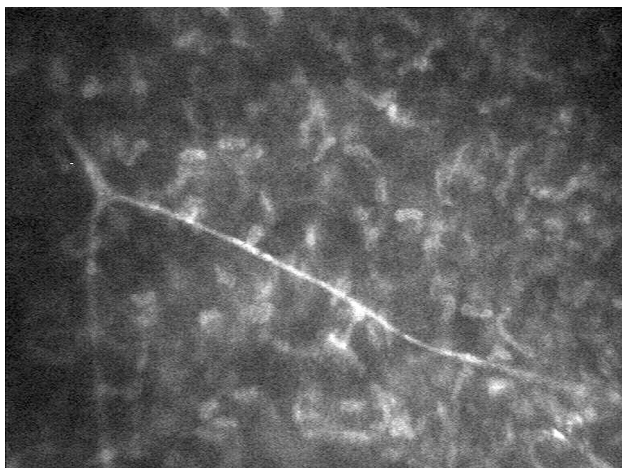
В связи с тем, что конфокальная микроскопия представляет собой неинвазивную прижизненную технику морфологического исследования роговицы, она может быть использована для изучения изменения структуры роговицы при различных заболеваниях, а также после хирургических вмешательств на роговице и глазном яблоке, для дифференциальной диагностики различных патологических процессов и диагностики инфекционных заболеваний роговицы.



а



б

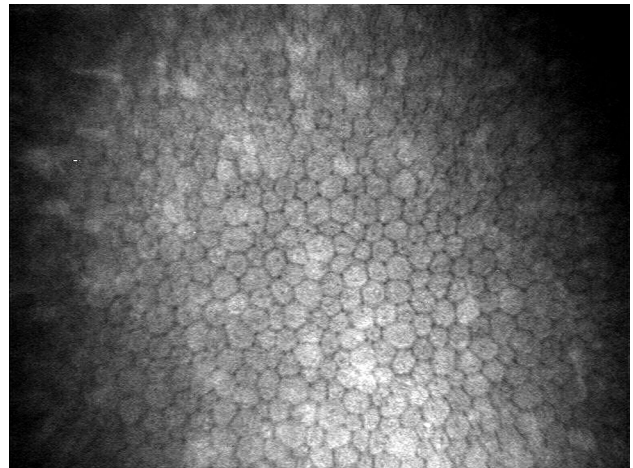


в

**Рис. 4.** Конфокальное изображение стромы: (а) передняя, (б) задняя, (с) стромальные нервы — бифуркация нервного волокна.

**Использование конфокальной микроскопии при различных заболеваниях глаз**

Перечень дистрофий и дегенераций роговицы, изученных с помощью конфокальной микро-



**Рис. 5.** Конфокальное изображение эндотелия.

скопии, включает эпителиальные дистрофии с вовлечением базальной мембраны, дистрофию Reis-Bucklers, Meesmann, решетчатую, пятнистую, гранулярную, кристаллическую дистрофию Schnyder, заднюю полиморфную дистрофию, эндотелиальную дистрофию Fuchs или «cornea guttata», кератоконус, иридокорнеальный эндотелиальный синдром, узелковую дегенерацию Salzmann, ретрокорнеальную мембрану и первичный амилоидоз роговицы [17–19, 21, 43, 70–72, 82].

Конфокальная микроскопия позволяет диагностировать заболевание на самых начальных стадиях, провести дифференциальную диагностику, контролировать эффективность терапевтического и хирургического лечения.

Быстрая и точная диагностика различных инфекционных поражений роговицы, в особенности вызванных возбудителями, которые не растут на обычных питательных средах, с помощью конфокальной микроскопии является крайне перспективной, так как обеспечивает своевременное начало специфической терапии и улучшает прогноз заболевания. Данная методика позволяет обнаружить в ткани роговицы акантамебы [68], различные виды грибов [28], диагностировать Лайм-боррелиозный кератит. Бактерии и другие микроорганизмы, имеющие малый размер (1–3 мкм), сопоставимый с разрешающей способностью конфокального микроскопа, пока не доступны для четкой визуализации и идентификации. С помощью конфокальной микроскопии можно контролировать эффективность лечения кератитов по эрадикации инфекционных агентов на фоне применения специфической терапии [70].

Также в литературе описаны ультраструктурные изменения в роговице, связанные с различными системными и глазными заболеваниями, такими как сахарный диабет, синдром Марфана, мегалокорнеа при врожденной глаукоме, хроническом увеите [71, 77].

По мнению ряда исследователей, конфокальная микроскопия открывает широкие перспективы для изучения роговицы после различных видов керато-рефракционных операций. Среди возможных областей ее применения — оценка клеточных реакций, связанных с процессом заживления, изучение миграции различных клеток и ремоделирования роговицы, процессов реиннервации роговицы, формирования субэпителиальной фиброплазии и рубцевания роговицы, выяснение причин формирования ятрогенной кератэктазии при сохранении достаточной толщины остаточной стромы и еще целый ряд вопросов. Современные конфокальные микроскопы дают возможность измерить толщину роговичного клапана и резидуальной стромы, определить локализацию и протяженность субэпителиальной фиброплазии, измерить утолщение роговицы, вызывающее регресс рефракционного эффекта после фоторефракционной кератопластики, проанализировать характер включений в интерфэйсе [2, 32, 81].

#### *Инфекционные кератиты*

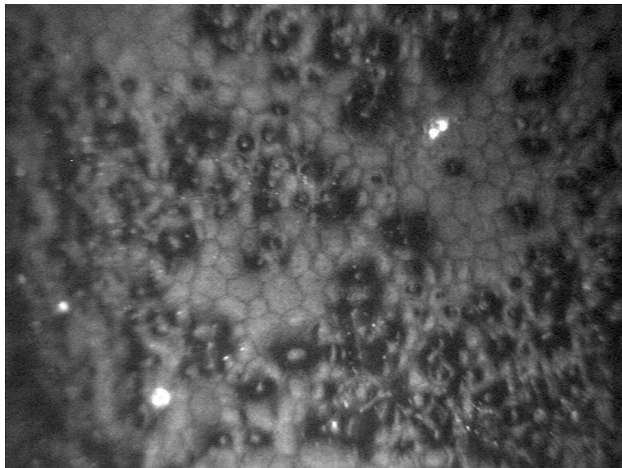
Идентификация возбудителя в максимально ранние сроки у больных с инфекционными кератитами необходима для установления правильного диагноза. Проведенные исследования выявили ценность конфокальной микроскопии в диагностике акантамебного кератита с визуализацией двустеночной круглой цисты и неправильной формы трофозоида в ткани роговицы [7, 16, 17, 51, 68, 86]. Показана возможность диагностики кератитов, вызванных различными видами грибов и обнаружения с помощью конфокальной микроскопии высококонтрастных грибковых гиф [28], в том числе *Aspergillus*-кератита [86]. Cavanagh et al. [16], Rosenberg et al. [72] показали возможность использования конфокальной микроскопии для выявления патологических изменений роговицы при поверхностных формах герпетического кератита, характеризующихся уменьшением плотности поверхностных эпителиальных клеток и увеличением числа гиперрефлективных клеток в стадии десквамации. Особенности применения конфокальной микроскопии для диагностики бактериальных кератитов, связанных с ношением контактных линз, показано в работах Kaufman et al. [40], кристаллического кератита в работах Sutphin et al. [79], смешанного бактериального кератита с визуализацией клеток Лангерганса и дендритформных клеток — Su et al. [78, 85].

#### *Дистрофии роговицы*

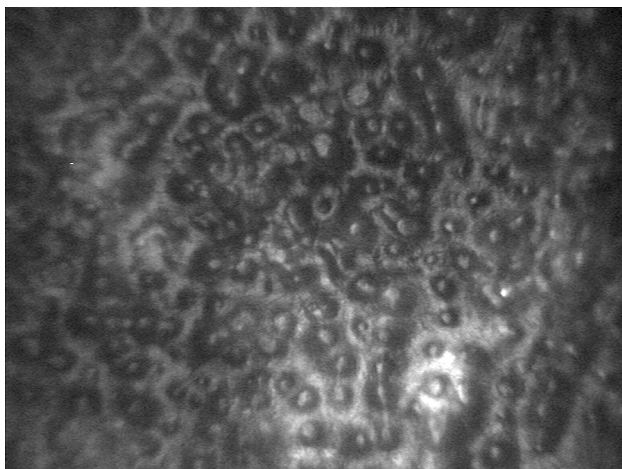
До недавнего времени клиническая оценка и дифференциальная диагностика дистрофий роговицы основывалась на биомикроскопии с помощью щелевой лампы. Однако данный метод является довольно субъективным, его информативность в значительной мере зависит от опыта клинициста,

а получение информации относительно морфологических изменений в ткани роговицы возможно только в материале, полученном при биопсии либо в результате кератопластики с последующей гистологической экспертизой. Существенную помощь в дифференциальной диагностике различных видов первичных (наследственных) дистрофий оказывают данные молекулярно-генетических исследований, позволяющих выявить мутацию, ответственную за развитие конкретного вида дистрофии. Однако эти исследования широкому кругу офтальмологов недоступны. В связи с возможностью конфокальной микроскопии неинвазивно визуализировать изменения в тканях на клеточном уровне, она была применена для диагностики различной патологии эндотелия роговицы. Показано, что для эндотелиальной дистрофии Фукса характерны полимегатизм и плеоморфизм с неровными контурами клеток [18, 33, 38, 57] (Рис. 6.). При задней полиморфной дистрофии визуализируются гипорефлективные зоны на уровне десцеметовой мембраны [17, 19], при иридокорнеальном эндотелиальном синдроме характерно наличие эпителиоподобных эндотелиальных клеток с гиперрефлективными ядрами [16, 19]. Весьма ценна конфокальная микроскопия для дифференциальной диагностики различных видов дистрофий Боуменовой мембраны, основанная на разной степени рефлективности депозитов [42]. Так, более выраженная рефлективность клеток характерна для дистрофии Reis-Bucklers в сравнении с дистрофией Thiel-Behnke. Для дистрофий стромы роговицы характерно наличие гиперрефлективных депозитов, разнонаправленных мелких стрий [80, 83] (Рис. 7).

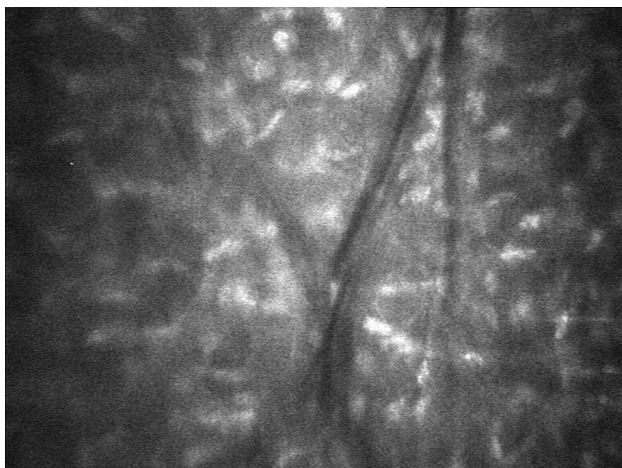
Различные исследования с использованием конфокального микроскопа продемонстрировали значительные качественные и количественные изменения во всех слоях роговицы у пациентов с кератоконусом. Так, прижизненная конфокальная биомикроскопия позволяет обнаружить морфологические изменения роговицы еще на доклинической стадии развития кератоконуса [14]. Проведенное при кератоконусе исследование, сравнивающее *in-vitro* световую микроскопию и *in vivo* конфокальную микроскопию [34] показало, что конфокальная картина позволяет визуализировать такой же уровень структурных изменений как и световой микроскоп [14]. Степень морфологических изменений клеточных элементов и внеклеточных структур позволяет судить о степени повреждения роговицы. В своих исследованиях Somodi et al., Hollingsworth et al. отметили значительное увеличение размеров эпителиальных гиперрефлектирующих клеток у пациентов с кератоконусом со спиралевидным расположением поверхностных эпителиальных клеток [76, 34]. Было доказано, что для кератоконуса характерна ступенчатость границ, деформация



а



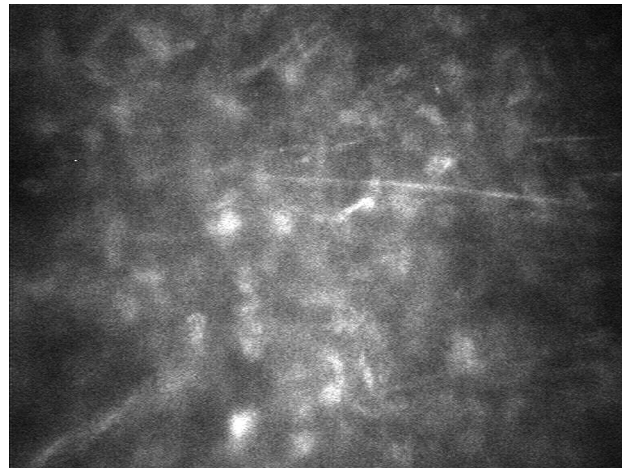
б



в

**Рис. 6.** Конфокальное изображение эндотелия при дистрофии Фукса, а) *Cornea guttata* — начальная стадия, б) *Cornea guttata* — далеко зашедшая стадия, в) складки Десцеметовой мембраны.

клеток и десквамация эпителиоцитов. С помощью конфокальной микроскопии было выявлено значительное снижение плотности нервных волокон роговицы при кератоконусе [74, 62], а недавние ис-



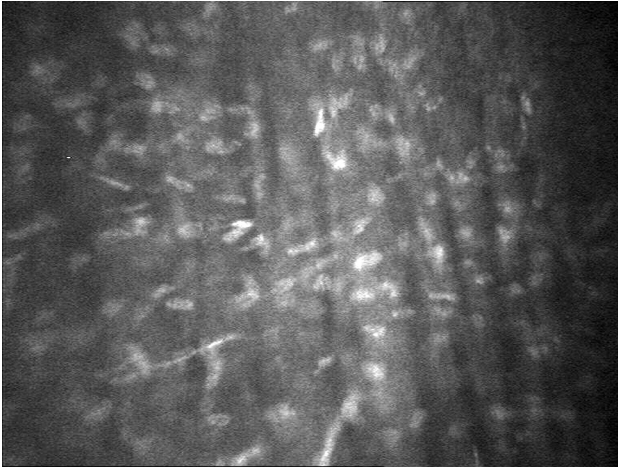
**Рис. 7.** Конфокальное изображение при решетчатой дистрофии роговицы: снижение прозрачности, уменьшение плотности клеток стромы, разнонаправленные тонкие складки.

следования с помощью лазерного конфокального микроскопа обнаружили изменения архитектоники суббазального нервного сплетения при данной патологии [64]. Рефлективность клеток стромы у пациентов с кератоконусом увеличивается [76, 34], однако количество кератоцитов значительно снижается, без существенных изменений эндотелиального полимегатизма [34]. Строма роговицы при кератоконусе всегда вовлечена в патологический процесс: на начальных стадиях наблюдается повышение отражательной способности передних отделов стромы, появление активированных кератоцитов. В развитой стадии изменения кератоцитов становятся более выраженными, наблюдается нарушение прозрачности экстрацеллюлярного матрикса. Отмечается уменьшение количества кератоцитов в задней строме, их дезориентация. Обнаруживаются микрострии задних отделов стромы. По мере прогрессирования заболевания микрострии визуализируются в виде разнородных тонких линий со сниженной отражательной способностью во всех слоях роговичной стромы. Микрострии являются результатом изменений структуры и направленности коллагеновых фибрилл [1] (Рис. 8).

#### *Рефракционная хирургия и дефекты роговицы*

Оценка заживления ран после хирургического вмешательства или травмы представляет значительный клинический интерес. Конфокальная микроскопия незаменима при изучении *in vivo* изменений структуры роговицы после операции и позволяет визуализировать клеточные изменения ее слоев [16, 41]. Проведено исследование качественных и количественных изменений роговой оболочки, и в частности, плотности кератоцитов, субэпителиальных депозитов, изменений стромы и регенерации нервных волокон после фоторефракционной кератэктомии (ФРК) [12, 23, 32, 44, 55].





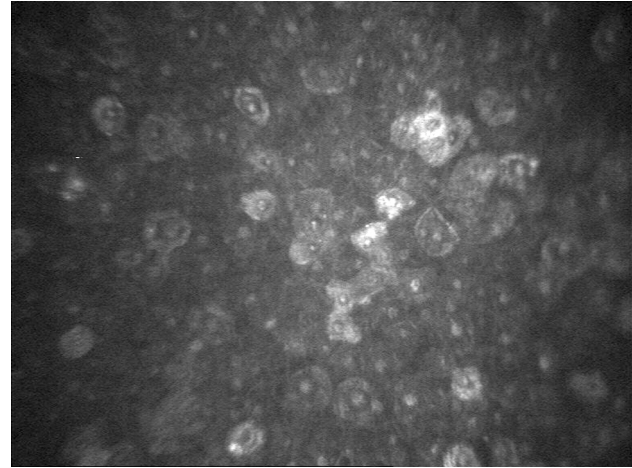
**Рис. 8.** Конфокальное изображение роговицы при развитой стадии кератоконуса. Нарушение прозрачности экстрацеллюлярного матрикса, уменьшение количества кератоцитов в задней строме, их дезориентация. Микрострии задних отделов стромы.

Также изучены изменения нервных волокон роговицы с последующей их реиннервацией после травмы [6, 66] и сквозной кератопластики [22, 69].

В связи с широким применением в офтальмологии лазерного кератомилеза (LASIK) с помощью конфокальной микроскопии был проведен ряд исследований, направленных на оценку пострефракционных изменений. В частности, было показано, что плотность кератоцитов уменьшается после ФПК и LASIK в течение 5 лет [27]. Регенерация суббазальных нервов роговицы после LASIK была изучена количественно и качественно с помощью конфокальной микроскопии [8, 27, 44, 54]. Calvillo et al. [15] сообщили, что количество и плотность суббазальных нервов уменьшились до 90 % в первый месяц после LASIK, а их восстановление началось после 6 месяцев с полной реконвалесценцией через 2 года после операции. В то же время, преимущественно вертикальная ориентация суббазальных нервных сплетений до выполнения LASIK не отличалась от таковой после операции. Erie et al. [27] показали, что восстановление плотности нервов суббазального сплетения до их предоперационного состояния наблюдалось через пять лет после LASIK.

#### ***Изменения роговицы, индуцированные ношением контактных линз***

Ряд исследователей изучали изменения в роговой оболочке, индуцированные ношением контактных линз [26, 33, 37, 59, 61, 63]. Характерным для лиц пользующихся контактными линзами, является нечеткость базального эпителия и псевдокератинизация эпителия, проявляющаяся увеличением количества клеток, их деформацией и гиперрефлексивными ядрами (Рис. 9). С помощью конфокаль-



а



б

**Рис. 9.** Конфокальное изображение эпителия роговицы при ношении контактных линз а) псевдокератинизация эпителия, б) гиперрефлексивные ядра эпителиальных клеток.

ной микроскопии был идентифицирован новый тип хронического изменения стромы роговицы у пациентов, которые носят контактные линзы [13, 35, 39]. Длительное ношение контактных линз приводит к потере кератоцитов [26]. Доказано, что физическое присутствие контактной линзы индуцирует высвобождение медиаторов воспаления, которые могут вызвать дисгенез кератоцитов или их апоптоз [37]. Снижение чувствительности роговицы возникает у пациентов, длительно пользующихся контактными линзами [63]. Однако, как показали исследования Efron et al, Olivera-Soto et al, мягкие контактные линзы ни короткого (ночные) ни длительного (12 месяцев) [26] ношения, по данным конфокальной микроскопии, изменений морфологии роговичных нервов не вызывают [61]. Конфокальная микроскопия роговицы, проведенная у больных сахарным диабетом, пользовавшихся мягкими контактными линзами, показала, что, морфология клеток эндотелия практически не отличалась от таковой у паци-



**Рис. 10.** Конфокальное изображение отложения пигмента на задней поверхности эндотелия роговицы.

ентов, пользующихся контактными линзами и не страдающих сахарным диабетом [59].

#### **Микродепозиты роговицы**

Конфокальная микроскопия была использована для идентификации микродепозитов роговицы (Рис. 10), связанных с различными патологическими состояниями, включая: болезнь Фабри с отложением гликолипидов в ткани роговицы [29], болезнь Вильсона с отложением меди [84], гиперлипидемию [65]. Кроме того, данная методика применялась для выявления побочных эффектов амиодарона [46, 49] и особенностей развития микродепозитов после рефракционной хирургии [12].

#### **Морфология нервов роговицы**

Роговица, как известно, является наиболее плотно иннервируемой частью человеческого тела, содержащей миелинизированные А $\beta$  и немиелинизированные С-волокна. Нормальная морфология нервов роговицы была изучена у здоровых лиц с помощью световой и электронной микроскопии [56], а в последнее время — конфокальной микроскопии [60, 31]. Несколько групп исследователей с помощью конфокальной микроскопии продемонстрировали, что даже незначительные повреждения нервов роговой оболочки являются проявлением тяжести соматической нейропатии [37, 45, 71].

Доказано, что у больных сахарным диабетом наблюдается раннее повреждение нервных волокон роговицы. Степень изменений роговой оболочки более выражена при декомпенсации сахарного диабета и пролиферативной диабетической ретинопатии [3]. Установлено, что у больных с диабетической полинейропатией плотность корнеальных нервных волокон достоверно меньше таковой у здоровых людей (40 нервов/мм<sup>1</sup>) и прогрессивно снижается с повышением степени тяжести диабетической полинейропатии, составляя 15 нервов/мм<sup>3</sup> на стадии тяжелых осложнений [3].

С 2013 г. в ГУ «Институте глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова НАМН Украины» проводится КМ на приборе Confoscan 4 (Nidek). Нами проведена КМ у 69 пациентов, из них с наследственными дистрофиями роговицы — 6, ЭЭД роговицы, включая дистрофию Фукса, *cornea guttata* и псевдоэктофолиативную кератопатию — 15, кератоконусом — 18, ССГ — 12, исходами кератитов — 11 и др.

Анализ данных литературы и результатов собственных исследований позволяет определить следующие показания для проведения конфокальной микроскопии роговицы:

- Воспалительные заболевания роговицы различной этиологии
- Дистрофические заболевания роговицы (кератоконус, пеллюцидная краевая прозрачная дегенерация роговицы, приобретенные (вторичные) и наследственные дистрофии переднего эпителия, стромы и эндотелия)
- Изменения роговой оболочки при синдроме «сухого глаза»
- Состояния после хирургических вмешательств на роговице (различные виды кератопластик, кераторефракционные операции)
- Изменения роговицы, связанные с ношением контактных линз
- Дегенерации роговицы (Зальцмана, лентовидная дегенерация и др).
- Состояние роговицы при соматических заболеваниях (сахарный диабет, системные заболевания соединительной ткани и др.).
- Изучение динамики морфологических изменений в роговице в процессе лечения

Относительным противопоказанием к проведению конфокальной микроскопии роговицы является выраженное раздражение глаза на фоне острого воспалительного процесса.

**Заключение.** Таким образом, конфокальная микроскопия является уникальным диагностическим методом, который может быть использован для диагностики широкого спектра заболеваний роговой оболочки, оценки процессов регенерации роговицы и осложнений после различных видов хирургических вмешательств, в том числе рефракционных, оценки воздействия на роговицу различных фармакологических препаратов, контактных линз, а также имплантов и др. Возможность применения конфокального микроскопа для исследования ткани роговицы *in vivo* на клеточном уровне с визуализацией микроорганизмов, воспалительных и эпителиальных клеток, нервных волокон, фиброза, а также возможность измерения толщины роговицы, в том числе после рефракционных операций, свидетельствует о высоких достоинствах этого аппарата и раскрывает перспективы для его использования в офтальмологии.

## Литература

1. **Аветисов С. Э.** Офтальмология. Национальное руководство. — М., изд. Гэотар — Медиа., 2008.
2. **Алио Х. Л., Хавалой Х., Негри Э. П.** и соавт. Качество интерфейса роговичного лоскута после ЛАСИК. Исследование с помощью конфокального микроскопа // Офтальмология. — 2004. — Том 1, № 3. — С.12–21
3. **Бездітко П. А.** Застосування методу конфокальної мікроскопії у діагностиці діабетичної нейропатії рогівки / П. А. Бездітко, О. В. Заволока, М. Г. Лисенко // Проблеми сучасної медичної науки та освіти. — 2008. — № 3. — С.17–19.
4. **Майчук Д. Ю.** Принцип работы и клиническое применение конфокального микроскопа Confoscan 3 при дифференциальной диагностике заболеваний роговицы // Рефракционная хирургия и офтальмология. — 2004. — том 4. — № 1. — С.35–38
5. **Майчук Д. Ю.** Конфокальная микроскопия — принцип действия, области применения и пример клинического исследования для дифференциальной диагностики патологии роговицы / Федоровские чтения—2006. Научно-практич. конф. «Современные методы диагностики в офтальмологии. Анатомо-физиологические основы патологии органа зрения»: Сб. научн. ст. — М., 2006. — С.351–354.
6. **Auran J. D., Koester C. J., Kleiman N. J.** et al. Scanning slit confocal microscopic observation of cell morphology and movement within the normal human anterior cornea // Ophthalmology. — 1995. — Vol.102. — P.33–41.
7. **Auran J. D., Starr M. B., Koester C. J.** et al. In vivo scanning slit confocal microscopy of Acanthamoeba keratitis. A case report // Cornea. — 1994. — Vol.13. — P.183–5.
8. **Avunduk A. M., Senft C. J., Emerah S.** et al. Corneal healing after uncomplicated LASIK and its relationship to refractive changes: A six-month prospective confocal study // IOVS. — 2004. — Vol.45. — P.1334–9.
9. **Berlau J., Becker H. H., Stave J.** et al. Depth and age-dependent distribution of keratocytes in healthy human corneas // J Cataract Refract Surg. — 2002. — Vol. 28. — P.611–616
10. **Beuerman R. W., Laird J. A., Kaufman S. C.** et al. Quantification of real-time confocal images of the human cornea // J Neurosci Methods. — 1994. — Vol.54. — P.197–203.
11. **Böhnke M., Masters B. R.** Confocal microscopy of the cornea // Prog Retin Eye Res. — 1999. — Vol.18. — P.553–628.
12. **Böhnke M., Thae A., Schipper I.** Confocal microscopy reveals persisting stromal changes after myopic photorefractive keratectomy in zero haze corneas // British Journ of Ophthalmol. — 1998. — Vol.82. — P.1393–400.
13. **Böhnke M., Masters B. R.** Long-term contact lens wear induces a corneal degeneration with microdot deposits in the corneal stroma // Ophthalmology. — 1997. — Vol.104. — P.1887–96.
14. **Brookes N. H., Loh I. P.** et al. Involvement of corneal nerves in the progression of keratoconus // Exper Eye Research. — 2003. — Vol.77. — P.515–24.
15. **Calvillo M. P., McLaren J. W., Hodge D. O.** et al. Corneal reinnervation after LASIK: prospective 3-year longitudinal study // IOVS. — 2004. — Vol.45. — P.3991–6.
16. **Cavanagh H. D., Petroll W. M., Alizadeh H.** et al. Clinical and diagnostic use of in vivo confocal microscopy in patients with corneal disease // Ophthalmology. — 1993. — Vol.100. — P.1444–54.
17. **Chew S. J., Beuerman R. W., Assouline M.** et al. Early diagnosis of infectious keratitis with in vivo real time confocal microscopy // CLAO Journal. — 1992. — Vol.18. — P.197–201.
18. **Chiou A. G. Y., Beuerman R. W., Kaufman S. C.** et al. Confocal microscopy in cornea lattice corneal dystrophy // Graefes Arch.Clin. Ophthalmol. — 1999. — Vol. 237. — P.697–701.
19. **Chiou A. G., Kaufman S. C., Beuerman R.W.** et al. Confocal microscopy in posterior polymorphous corneal dystrophy // Ophthalmologica. — 1999b. — Vol.213. — P.211–13.
20. **Chiou A. G., Kaufman S. C., Beuerman R. W.** et al. Differential diagnosis of linear corneal images on confocal microscopy // Cornea. — 1999c. — Vol.18. — P.63–6.
21. **Ciancaglini M., Carpineto P., Doronzo E.** et al. Morphological evaluation of Schnyder s central crystalline dystrophy by confocal microscopy before and after phototherapeutic keratectomy // J Cataract Refract Surg. — 2001. — Vol.27. — P.1892–1895.
22. **Cohen R. A., Chew S. J., Gebhardt B. M.** et al. Confocal microscopy of corneal graft rejection // Cornea. — 1995. — Vol.14. — P.467–72.
23. **Corbett M. C., Prydal J. I., Verma S.** et al. An in vivo investigation of the structures responsible for corneal haze after photorefractive keratectomy and their effect on visual function // Ophthalmology. — 1996. — Vol.103. — P.1366–80.
24. **Dilly P. N.** Contribution of the epithelium to the stability of the tear film // Trans.Ophthalmol. Soc.U. K. — 1985. — Vol.104 (4). — P.381–389
25. **Dilly P. N.** Tandem scanning reflected light microscopy of the cornea // Scanning. — 1988. — № 10. — P.153–156.
26. **Efron N., Perez-Gomez I., Morgan P. B.** Confocal microscopic observations of stromal keratocytes during extended contact lens wear // Clinical and Experimental Optometry. — 2002. — Vol.85. — P.156–60.
27. **Erie J. C., Patel S. V., McLaren J. W.** et al. Effect of myopic laser in situ keratomileusis on epithelial and stromal thickness: a confocal microscopy study // Ophthalmology. — 2002a. — Vol.109. — P.1447–52.
28. **Florakis G. J., Moazami G., Schubert H.** et al. Scanning slit confocal microscopy of fungal keratitis // Arch. Ophthalmol. — 1997. — Vol.115. — P.1461–1463.
29. **Font R. L., Fine B. S.** Ocular pathology in Fabry's disease. Histochemical and electron microscope observations // Am J Pathol. — 1972. — Vol.97. — P.671.
30. **Furrer P., Mayer J. M., Gurny R.** Confocal microscopy as a tool for the investigation of the anterior part of the eye // J. Ocul. Pharmacol. Ther. — 1997. — Vol.13. — P.559–578.
31. **Grupcheva C. N., Wong T., Riley A. F.** et al. Assessing the sub-basal nerve plexus of the living healthy human cornea by in vivo confocal microscopy // Clinical and Exp Ophthalmol. — 2002. — Vol.30. — P.187–90.
32. **Heinz P., Bodanowitz S., Wiegand W.** et al. In vivo observation of corneal nerve regeneration after photorefractive keratectomy with a confocal videomicroscope // German Journal of Ophthalmol. — 1997. — Vol.5. — P.373–377.
33. **Hollingsworth J. G., Efron N.** Confocal microscopy of the corneas of long-term rigid contact lens wearers // Cont Lens Anterior Eye. — 2004. — Vol.27. — P.57–64.

34. **Hollingsworth J. G., Efron N., Tullio A. B.** In vivo corneal confocal microscopy in keratoconus // *Ophthalmic Physiol Opt.* — 2005. — Vol.25. — P.254–60.
35. **Jalbert I., Stapleton F.** Effect of lens wear on corneal stroma: preliminary findings // *Australian and New Zealand Journal of Ophthalmol.* — 1999. — Vol. 27. — P.211–13.
36. **Jester J. V., Petroll W. M., Garana R. M. R.** et al. Comparison of in vitro and ex vivo cellular structure in rabbit eyes detected by tandem scanning microscopy // *J. Microsc.* — 1992. — Vol.165. — P.169–181.
37. **Kallinikos P., Berhanu M., O'Donnell C.** et al. Corneal nerve tortuosity in diabetic patients with neuropathy // *IOVS.* — 2004. — Vol.45. — P.418–22.
38. **Kaufman S. C., Beuerman R. W., Kaufman H. E.** Diagnosis of advanced Fuchs' endothelial dystrophy with the confocal microscope // *American Journal of Ophthalmology.* — 1993. — Vol.116. — P.652–3.
39. **Kauffmann T., Bodanowitz S., Hesse L.** et al. Corneal reinnervation after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis: an in vivo study with a confocal video-microscope // *German Journal of Ophthalmol.* — 1996. — Vol.5. — P.508–12.
40. **Kaufman S. C., Hamano H., Beuerman R. W.** et al. Transient corneal stromal and endothelial changes following soft contact lens wear: a study with confocal microscopy // *CLAO Journal.* — 1996. — Vol.22. — P.127–32.
41. **Kaufman S. C., Musch D. C., Belin M. W.** et al. Confocal microscopy: a report by the American Academy of Ophthalmology // *Ophthalmology.* — 2004. — Vol.111. — P.396–406.
42. **Kobayashi A., Sugiyama K.** In vivo laser confocal microscopy findings for Bowman's layer dystrophies (Thiel-Behnke and Reis-Bucklers corneal dystrophies) // *Ophthalmology.* — 2007. — Vol.114. — P.69–75.
43. **Ku J. Y., Grupcheva C. N., McGhee C. N.** Microstructural analysis of Salzmann's nodular degeneration by in vivo confocal microscopy // *Clin. Exp. Ophthalmol.* — 2002. — vol.30. — P.367–368.
44. **Linna T., Tervo T.** Real-time confocal microscopic observations on human corneal nerves and wound healing after excimer laser photorefractive keratectomy // *Current Eye Research.* — 1997. — Vol.16. — P.640–9.
45. **Malik R. A., Kallinikos P., Abbott C. A.** et al. Corneal confocal microscopy: a non-invasive surrogate of nerve fibre damage and repair in diabetic patients // *Diabetologia.* — 2003. — Vol.46. — P.683–8.
46. **Mantjarvi M., Tuppurainen K., Ikaheimo K.** Ocular side effects of amiodarone // *Surv Ophthalmol.* — 1998. — Vol.42. — P.360–6.
47. **Masters B. R., Thae A. A.** In vivo real-time confocal microscopy of wing cells in the human cornea: A new benchmark for in vivo corneal microscopy // *Bioimages.* — 1995. — Vol.3. — P.7–11.
48. **Masters B. R., Bohnke M.** Three-dimensional confocal microscopy of the human cornea in vivo // *Ophthalmic Res.* — 2001. — Vol.33. — P.125–135.
49. **Mastropasqua L., Nubile M.** Basic principles of confocal microscopy of the cornea. — Slack Incorporated; USA: 2002. — P.1–5.
50. **Mathers W. D., Lane J. A., Zimmerman M. B.** Assessment of the tear film with tandem scanning confocal microscopy // *Cornea.* — 1997. — Vol.16. — P.162–168.
51. **Mathers W. D., Goldberg M. A.** et al. Coexistent Acanthamoeba keratitis and herpetic keratitis // *Arch Ophthalmol.* — 1997. — Vol.115. — P.714–18.
52. **Maurice D. M.** A scanning slit optical microscope // *Invest. Ophthalmol.* — 1974. — Vol.13. — P.1033–1037.
53. **Minsky M.** Memoir on inventing the confocal scanning microscope // *Scanning.* — 1988. — Vol.10. — P.128–138.
54. **Mitooka K., Ramirez M., Maguire L. J.** et al. Keratocyte density of central human cornea after laser in situ keratomileusis // *Am Journal of Ophthalmol.* — 2002. — Vol.133. — P.307–14.
55. **Moilanen J. A., Vesaluoma M. H., Muller L. J.** et al. Long-term corneal morphology after PRK by in vivo confocal microscopy // *Invest Ophthalmol and Vis Sci.* — 2003. — Vol.44. — P.1064–9.
56. **Müller L. J., Pels L., Vrensen G. F.** Ultrastructural organisation of human corneal nerves // *IOVS.* — 1996. — P.476–88.
57. **Mustonen R. K., McDonald M. B., Srivannaboon S.** et al. Normal human corneal cell populations evaluated by in vivo scanning slit confocal microscopy // *Cornea.* — 1998. — Vol.17. — P.485–92.
58. **Nagel S., Wiegand W., Thae A. A.** Corneal changes and corneal healing after keratomileusis in situ. In vivo studies using confocal slit microscopy // *Ophthalmology.* — 1995. — Vol.92. — P.397–401.
59. **O'Donnell C., Efron N.** Corneal endothelial cell morphology and corneal thickness in diabetic contact lens wearers // *Optom Vis Sci.* — 2004. — Vol.81. — P.858–62.
60. **Oliveira-Soto L., Efron N.** Morphology of corneal nerves using confocal microscopy // *Cornea.* — 2001. — Vol.20. — P.374–84.
61. **Oliveira-Soto L., Efron N.** Morphology of corneal nerves in soft contact lens wear. A comparative study using confocal microscopy // *Ophthalmic and Physiological Optics.* — 2003. — Vol.23. — P.163–74.
62. **Patel S. V., McLaren J. W., Hodge D. O.** et al. Normal human keratocyte density and corneal thickness measurement by using contact microscopy in vivo // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2001. — Vol.42. — P.333–339.
63. **Patel S. V., McLaren J. W., Hodge D. O.** et al. Confocal microscopy in vivo in corneas of long-term contact lens wearers // *Invest Ophthalmol and Vis Sci.* — 2002. — Vol.43. — P.995–1003.
64. **Patel D. V., McGhee C. N.** Mapping the corneal sub-basal nerve plexus in keratoconus by in vivo laser scanning confocal microscopy // *IOVS.* — 2006. — Vol.47. — P.1348–51.
65. **Pe'er J., Vidaurri J., Halfon S. T.** et al. Association between corneal arcus and some of the risk factors for coronary artery disease // *Br J Ophthalmol.* — 1983. — Vol.67. — P.795–8.
66. **Petroll W. M., Jester J. V., Cavanagh H. D.** In vivo confocal imaging // *Int Rev Exp Pathol.* — 1996. — Vol.36. — P.93–129.
67. **Petroll W. M., Yu A., Li J.** et al. A prototype two-detector confocal microscope for in vivo corneal imaging // *Scanning.* — 2002. — Vol.24. — P.163–170.
68. **Pfister D. R., Cameron J. D., Krachmer J. H.** et al. Confocal microscopy findings of Acanthamoeba keratitis // *Am J Ophthalmol.* — 1996. — Vol.121. — P.119–128.
69. **Richter A., Slowik C., Somodi S.** et al. Corneal reinnervation following penetrating keratoplasty: correlation of

- esthesiometry and confocal microscopy // *Ger J Ophthalmol.* — 1996. — Vol.5. — P.513–17.
70. **Rosenberg M. E., Tervo T. M., Muller L. J.** et al. In vivo confocal microscopy after herpes keratitis // *Cornea.* — 2002. — Vol.21. — P.265–9.
  71. **Rosenberg M. E., Tervo T. M., Immonen I. J.** et al. Corneal structure and sensitivity in type 1 diabetes mellitus // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* — 2000. — Vol.41. — P.2915–21.
  72. **Rothstein A., Auran J., Wittpenn J.** et al. Confocal microscopy in Meretoja syndrome // *Cornea.* — 2002. — Vol.21. — P.364–367.
  73. **Ruckhofer J., Bohnke M., Alzner E.** et al. Confocal microscopy after implantation of intrastromal corneal ring segments // *Ophthalmology.* — 2000. — Vol.107. — P.2144–2151.
  74. **Simo Mannion L., Tromans C., O'Donnell C.** An evaluation of corneal nerve morphology and function in moderate keratoconus // *Cont Lens Anterior Eye.* — 2005. — Vol.28. — P.185–92.
  75. **Slowik C., Somodi S., Richter A., Guthoff R.** Assessment of corneal alteration following laser in situ keratomileusis by confocal slit scanning microscopy // *Ger J Ophthalmol.* — 1997. — № 15. — P.526–531.
  76. **Somodi S., Hahnel C., Slowik C.** et al. Confocal in vivo microscopy and confocal laser-scanning fluorescence microscopy in keratoconus // *Ger. J. Ophthalmol.* — 1997. — Vol.5. — P.518–525.
  77. **Sultan G., Baudouin C., Auzerie O.** et al. Cornea in Marfan disease: Orbscan and in vivo confocal microscopy analysis // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2002. — Vol.43. — P.1757–1764.
  78. **Su Pei-Yuang, Fung-Rong Hu, Yen-Ming Chen,** et al. Dendritiform cells found in central cornea by in-vivo confocal microscopy in a patient with mixed bacterial keratitis // *Ocul Immunol Inflamm.* — 2006. — Vol.14. — P.241–4.
  79. **Sutphin J. E., Kantor A. L., Mathers W. D.** et al. Evaluation of infectious crystalline keratitis with confocal microscopy in a case series // *Cornea.* — 1997. — Vol.16. — P.21–6.
  80. **Vesaluoma M. H., Linna T. U., Sankila E. M.** et al. In vivo confocal microscopy of a family with Schnyder crystallin corneal dystrophy // *Ophthalmology.* — 199. — Vol.106. — P.944–951.
  81. **Vinciguerra P., Torres I., Camesasca F. I.** Applications of confocal microscopy in refractive surgery // *J. Refract. Surg.* — 2002. — Vol.18. — P.378–381.
  82. **Werner L. P., Issid K., Werner L.,** et al. Salzmann's corneal degeneration associated with epithelial basement membrane dystrophy // *Cornea.* — 2000. — Vol.19. — P.121–123.
  83. **Werner L. P., Werner L., Dighiero P.** et al. Confocal microscopy in Bowman and stromal corneal dystrophies // *Ophthalmology.* — 1999. — Vol.106. — P.1697–704.
  84. **Wiebers D. O., Hollenhorst R. W., Goldstein N. P.** The ophthalmologic manifestations of Wilson's disease // *Mayo Clin Proc.* — 1977. — Vol.52. — P.409–16.
  85. **Wilson S. E., Kim W. J.** Keratocyte apoptosis: implications on corneal wound healing, tissue organization, and disease // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 1998. — Vol. 39. — P.220–226.
  86. **Winchester K., Mathers W. D., Sutphin J. E.** et al. Diagnosis of Acanthamoeba keratitis in vivo with confocal microscopy // *Cornea.* — 1995. — Vol.14. — P.10–17.

Поступила 19.02.2014

### Литература

1. **Аветисов С. Э.** Офтальмология. Национальное руководство // М., изд. Гэотар-Медиа., 2008.
2. **Алио Х. Л., Хавалой Х., Негри Э. П.** и соавт. Качество интерфейса роговичного лоскута после ЛАСИК. Исследование с помощью конфокального микроскопа // *Офтальмология.* — 2004. — том 1, № 3. — С.12–21
3. **Бездітко П. А.** Застосування методу конфокальної мікроскопії у діагностиці діабетичної нейропатії рогівки / П. А. Бездітко, О. В. Заволока, М. Г. Лисенко // *Проблеми сучасної медичної науки та освіти.* — 2008. — № 3. — С. 17–19.
4. **Майчук Д. Ю.** Принцип работы и клиническое применение конфокального микроскопа Confoscan 3 при дифференциальной диагностике заболеваний роговицы // *Рефракционная хирургия и офтальмология.* — 2004. — том 4. — № 1. — С.35–38
5. **Майчук Д. Ю.** Конфокальная микроскопия — принцип действия, области применения и пример клинического исследования для дифференциальной диагностики патологии роговицы / Федоровские чтения — 2006. Научно-практическая конференция. «Современные методы диагностики в офтальмологии. Анатомо-физиологические основы патологии органа зрения»: Сб. научн. ст. — М., 2006. — С.351–354.
6. **Auran JD, Koester CJ, Kleiman NJ,** et al. Scanning slit confocal microscopic observation of cell morphology and movement within the normal human anterior cornea. *Ophthalmology.* 1995;102:33–41.
7. **Auran JD, Starr MB, Koester CJ,** et al. In vivo scanning slit confocal microscopy of Acanthamoeba keratitis. A case report. *Cornea.* 1994; 13:183–5.
8. **Avunduk AM, Senft CJ, Emerah S,** et al. Corneal healing after uncomplicated LASIK and its relationship to refractive changes: A six-month prospective confocal study. *IOVS.* 2004;45:1334–9.
9. **Berlau J., Becker H.-H., Stave J.** Et al. Depth and age-dependent distribution of keratocytes in healthy human corneas. — *J/ Cataract. Refract. Surg.* — 2002. — vol.28. — P.611–616
10. **Beuerman RW, Laird JA, Kaufman SC,** et al. Quantification of real-time confocal images of the human cornea. *J Neurosci Methods.* 1994;54:197–203. [
11. **Böhnke M, Masters BR.** Confocal microscopy of the cornea. *Prog Retin Eye Res.* 1999;18:553–628.
12. **Böhnke M, Thae A, Schipper I.** Confocal microscopy reveals persisting stromal changes after myopic photorefractive keratectomy in zero haze corneas. *British Journal of Ophthalmology.* 1998;82:1393–400.
13. **Böhnke M, Masters BR.** Long-term contact lens wear induces a corneal degeneration with microdot deposits in the corneal stroma. *Ophthalmology.* 1997;104:1887–96.

14. **Brookes NH, Loh I-P**, et al. Involvement of corneal nerves in the progression of keratoconus. *Experimental Eye Research*. 2003;77:515–24.
15. **Calvillo MP, McLaren JW, Hodge DO**, et al. Corneal re-innervation after LASIK: prospective 3-year longitudinal study. *IOVS*. 2004;45:3991–6.
16. **Cavanagh HD, Petroll WM, Alizadeh H**, et al. Clinical and diagnostic use of in vivo confocal microscopy in patients with corneal disease. *Ophthalmology*. 1993;100:1444–54.
17. **Chew SJ, Beuerman RW, Assouline M**, et al. Early diagnosis of infectious keratitis with in vivo real time confocal microscopy. *CLAO Journal*. 1992;18:197–201.
18. **Chiou AG.-Y, Beuerman RW, Kaufman SC.**, et al. Confocal microscopy in cornea lattice corneal dystrophy // *Graefes Arch.Clin. Ophthalmol.* — 1999. — vol.237. — P.697–701.
19. **Chiou AG, Kaufman SC, Beuerman RW**, et al. Confocal microscopy in posterior polymorphous corneal dystrophy. *Ophthalmologica*. 1999b;213:211–13.
20. **Chiou AG, Kaufman SC, Beuerman RW**, et al. Differential diagnosis of linear corneal images on confocal microscopy. *Cornea*. 1999c;18:63–6.
21. **Ciancaglini M., Carpineto P., Doronzo E.** et al. Morphological evaluation of Schnyder's central crystalline dystrophy by confocal microscopy before and after phototherapeutic keratectomy // *J. Cataract. Refract. Surg.* — 2001. — vol.27. — P.1892–1895.
22. **Cohen RA, Chew SJ, Gebhardt BM**, et al. Confocal microscopy of corneal graft rejection. *Cornea*. 1995;14:467–72.
23. **Corbett MC, Prydal JI, Verma S**, et al. An in vivo investigation of the structures responsible for corneal haze after photorefractive keratectomy and their effect on visual function. *Ophthalmology*. 1996;103:1366–80.
24. **Dilly P. N.** Coontribution of the epithelium to the stability of the tear film // *Trans.Ophthalmol. Soc.U. K.* — 1985. — vol.104(4). — P.381–389
25. **Dilly P. N.** Tandem scanning reflected light microscopy of the cornea // *Scanning.* — 1988. — N10. — P.153–156.
26. **Efron N, Perez-Gomez I, Morgan PB.** Confocal microscopic observations of stromal keratocytes during extended contact lens wear. *Clinical and Experimental Optometry*. 2002;85:156–60.
27. **Erie JC, Patel SV, McLaren JW**, et al. Effect of myopic laser in situ keratomileusis on epithelial and stromal thickness: a confocal microscopy study. *Ophthalmology*. 2002a;109:1447–52.
28. **Florakis G. J., Moazami G., Schubert H.** et al. Scanning slit confocal microscopy of fungal keratitis // *Arch. Ophthalmol.* — 1997. — vol. 115. — P.1461–1463.
29. **Font RL, Fine BS.** Ocular pathology in Fabry's disease. Histochemical and electron microscope observations. *Am J Pathol*. 1972;97:671.
30. **Furrer P., Mayer J. M., Gurny R.** Confocal microscopy as a tool for the investigation of the anterior part of the eye // *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* — 1997. — vol.13. — P.559–578.
31. **Grupcheva CN, Wong T, Riley AF**, et al. Assessing the sub-basal nerve plexus of the living healthy human cornea by in vivo confocal microscopy. *Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2002;30:187–90.
32. **Heinz P, Bodanowitz S, Wiegand W**, et al. In vivo observation of corneal nerve regeneration after photorefractive keratectomy with a confocal videomicroscope. *German Journal of Ophthalmology*. 1997. — vol.5. — P.373–377.
33. **Hollingsworth JG, Efron N.** Confocal microscopy of the corneas of long-term rigid contact lens wearers. *Cont Lens Anterior Eye*. 2004;27:57–64.
34. **Hollingsworth JG, Efron N, Tullo AB.** In vivo corneal confocal microscopy in keratoconus. *Ophthalmic Physiol Opt*. 2005;25:254–60.
35. **Jalbert I, Stapleton F.** Effect of lens wear on corneal stroma: preliminary findings. *Australian and New Zealand Journal of Ophthalmology*. 1999; 27:211–13.
36. **Jester J. V., Petroll W. M., Garana R. M. R.** et al. Comparison of in vitro and ex vivo cellular structure in rabbit eyes detected by tandem scanning microscopy // *J. Microsc.* — 1992. — vol.165. — P.169–181.
37. **Kallinikos P, Berhanu M, O'Donnell C**, et al. Corneal nerve tortuosity in diabetic patients with neuropathy. *IOVS*. 2004; 45:418–22.
38. **Kaufman SC, Beuerman RW, Kaufman HE.** Diagnosis of advanced Fuchs' endothelial dystrophy with the confocal microscope. *American Journal of Ophthalmology*. 1993; 116:652–3.
39. **Kauffman T, Bodanowitz S, Hesse L**, et al. Corneal re-innervation after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis: an in vivo study with a confocal videomicroscope. *German Journal of Ophthalmology*. 1996; 5:508–12.
40. **Kaufman SC, Hamano H, Beuerman RW**, et al. Transient corneal stromal and endothelial changes following soft contact lens wear: a study with confocal microscopy. *CLAO Journal*. 1996;22:127–32.
41. **Kaufman SC, Musch DC, Belin MW**, et al. Confocal microscopy: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology*. 2004;111:396–406.
42. **Kobayashi A, Sugiyama K.** In vivo laser confocal microscopy findings for Bowman's layer dystrophies (Thiel-Behnke and Reis-Bucklers corneal dystrophies) *Ophthalmology*. 2007;114:69–75.
43. **Ku J. Y., Grupcheva C. N., McGhee C. N.** Microstructural analysis of Salzmann's nodular degeneration by in vivo confocal microscopy // *Clin. Exp. Ophthalmol.* — 2002. — vol.30. — P.367–368.
44. **Linna T, Tervo T.** Real-time confocal microscopic observations on human corneal nerves and wound healing after excimer laser photorefractive keratectomy. *Current Eye Research*. 1997;16:640–9.
45. **Malik RA, Kallinikos P, Abbott CA**, et al. Corneal confocal microscopy: a non-invasive surrogate of nerve fibre damage and repair in diabetic patients. *Diabetologia*. 2003;46:683–8.
46. **Mantjarvi M, Tuppurainen K, Ikaheimo K.** Ocular side effects of amiodarone. *Surv Ophthalmol*. 1998;42:360–6.
47. **Masters BR, Thaer AA.** In vivo real-time confocal microscopy of wing cells in the human cornea: A new benchmark for in vivo corneal microscopy. *Bioimages*. 1995;3:7–11.
48. **Masters BR, Bohnke M.** Three-dimensional confocal microscopy of the human cornea in vivo // *Ophthalmic. Res.* — 2001. — vol.33. — P.125–135.
49. **Mastropasqua L, Nubile M.** Basic principles of confocal microscopy of the cornea. *Slack Incorporated; USA*: 2002. pp. 1–5.
50. **Mathers WD, Lane J. A., Zimmerman M. B.** Assessment of the tear film with tandem scanning confocal microscopy // *Cornea.* — 1997. — vol.16. — P.162–168.

51. **Mathers WD, Goldberg MA**, et al. Coexistent Acanthamoeba keratitis and herpetic keratitis. *Arch Ophthalmol.* 1997;115:714–18.
52. **Maurice D. M.** A scanning slit optical microscope // *Invest. Ophthalmol.* — 1974. — vol.13. — P.1033–1037.
53. **Minsky M.** Memoir on inventing the confocal scanning microscope // *Scanning.* — 1988. — vol.10. — P.128–138.
54. **Mitooka K, Ramirez M, Maguire LJ**, et al. Keratocyte density of central human cornea after laser in situ keratomileusis. *American Journal of Ophthalmology.* 2002;133:307–14.
55. **Moilanen JA, Vesaluoma MH, Muller LJ**, et al. Long-term corneal morphology after PRK by in vivo confocal microscopy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science.* 2003;44:1064–9.
56. **Müller LJ, Pels L, Vrensen GFJM.** Ultrastructural organization of human corneal nerves. *IOVS.* 1996:476–88.
57. **Mustonen RK, McDonald MB, Srivannaboon S**, et al. Normal human corneal cell populations evaluated by in vivo scanning slit confocal microscopy. *Cornea.* 1998;17:485–92.
58. **Nagel S., Wiegand W., Thaeer A. A.** Corneal changes and corneal healing after keratomileusis in situ. In vivo studies using confocal slit-microscopy // *Ophthalmology.* — 1995. — vol.92. — P.397–401.
59. **O'Donnell C, Efron N.** Corneal endothelial cell morphology and corneal thickness in diabetic contact lens wearers. *Optom Vis Sci.* 2004;81:858–62.
60. **Oliveira-Soto L, Efron N.** Morphology of corneal nerves using confocal microscopy. *Cornea.* 2001;20:374–84.
61. **Oliveira-Soto L, Efron N.** Morphology of corneal nerves in soft contact lens wear. A comparative study using confocal microscopy. *Ophthalmic and Physiological Optics.* 2003;23:163–74.
62. **Patel SV, McLaren JW, Hodge DO**, et al. Normal human keratocyte density and corneal thickness measurement by using contact microscopy in vivo // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2001. — vol.42. — P.333–339.
63. **Patel SV, McLaren JW, Hodge DO**, et al. Confocal microscopy in vivo in corneas of long-term contact lens wearers. *Investigative Ophthalmology and Visual Science.* 2002;43:995–1003.
64. **Patel DV, McGhee CN.** Mapping the corneal sub-basal nerve plexus in keratoconus by in vivo laser scanning confocal microscopy. *IOVS.* 2006;47:1348–51.
65. **Pe'er J, Vidaurri J, Halfon ST**, et al. Association between corneal arcus and some of the risk factors for coronary artery disease. *Br J Ophthalmol.* 1983;67:795–8.]
66. **Petroll WM, Jester JV, Cavanagh HD.** In vivo confocal imaging. *Int Rev Exp Pathol.* 1996; 36:93–129.
67. **Petroll W. M., Yu A., Li J.** et al. A prototype two-detector confocal microscope for in vivo corneal imaging // *Scanning.* — 2002. — vol.24. — P.163–170.
68. **Pfister DR, Cameron JD, Krachmer JH**, et al. Confocal microscopy findings of Acanthamoeba keratitis. *Am J Ophthalmol.* 1996;121:119–128.
69. **Richter A, Slowik C, Somodi S**, et al. Corneal reinnervation following penetrating keratoplasty: correlation of esthesiometry and confocal microscopy. *Ger J Ophthalmol.* 1996;5:513–17.
70. **Rosenberg ME, Tervo TM, Muller LJ**, et al. In vivo confocal microscopy after herpes keratitis. *Cornea.* 2002;21:265–9.
71. **Rosenberg ME, Tervo TM, Immonen IJ**, et al. Corneal structure and sensitivity in type 1 diabetes mellitus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:2915–21.
72. **Rothstein A., Auran J., Wittmann J.** et al. Confocal microscopy in Meretoja syndrome // *Cornea.* — 2002. — vol.21. — P.364–367.
73. **Ruckhofer J., Bohnke M., Alzner E.** et al. Confocal microscopy after implantation of intrastromal corneal ring segments // *Ophthalmology.* — 2000. — vol.107. — P.2144–2151.
74. **Simo Mannion L, Tromans C, O'Donnell C.** An evaluation of corneal nerve morphology and function in moderate keratoconus. *Cont Lens Anterior Eye.* 2005;28:185–92.
75. **Slowik C., Somodi S., Richter A., Guthoff R.** Assessment of corneal alteration following laser in situ keratomileusis by confocal slit scanning microscopy // *Ger/ J/ Ophthalmol.* — 1997. — № 15. — P.526–531/
76. **Somodi S, Hahnel C, Slowik C**, et al. Confocal in vivo microscopy and confocal laser-scanning fluorescence microscopy in keratoconus // *Ger. J. Ophthalmol.* — 1997. — vol.5. — P.518–525.
77. **Sultan G., Baudouin C., Auzerie O.** et al. Cornea in Marfan disease: Orbscan and in vivo confocal microscopy analysis // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2002. — vol.43. — P.1757–1764.
78. **Su Pei-Yuang, Fung-Rong Hu, Yen-Ming Chen**, et al. Dendritiform cells found in central cornea by in-vivo confocal microscopy in a patient with mixed bacterial keratitis. *Ocul Immunol Inflamm.* 2006;14:241–4.
79. **Sutphin JE, Kantor AL, Mathers WD**, et al. Evaluation of infectious crystalline keratitis with confocal microscopy in a case series. *Cornea.* 1997; 16:21–6.
80. **Vesaluoma M. H., Linna T. U., Sankila E.** — M. et al. In vivo confocal microscopy of a family with Schnyder crystallin corneal dystrophy // *Ophthalmology.* — 199. — vol.106. — P.944–951.
81. **Vinciguerra P., Torres I., Camesasca F. I.** Applications of confocal microscopy in refractive surgery // *J. Refract. Surg.* — 2002. — vol.18. — P.378–381.
82. **Werner L. P., Issid K., Werner L.**, et al. Salzmann's corneal degeneration associated with epithelial basement membrane dystrophy // *Cornea.* — 2000. — vol.19. — P.121–123.
83. **Werner LP, Werner L, Dighiero P**, et al. Confocal microscopy in Bowman and stromal corneal dystrophies. *Ophthalmology.* 1999;106:1697–704.
84. **Wiebers DO, Hollenhorst RW, Goldstein NP.** The ophthalmologic manifestations of Wilson's disease. *Mayo Clin Proc.* 1977;52:409–16.
85. **Wilson SE, Kim W.-J.** Keratocyte apoptosis: implications on corneal wound healing, tissue organization, and disease // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 1998. — vol.39. — P.220–226.
86. **Winchester K, Mathers WD, Sutphin JE**, et al. Diagnosis of Acanthamoeba keratitis in vivo with confocal microscopy. *Cornea.* 1995;14:10–17.