МИКРОСТРУКТУРЕН АНАЛИЗ НА ВЪЗДЕЙСТВИЕТО НА СЛЪНЧЕВИТЕ ЛЪЧИ ВЪРХУ ПРЕДНАТА ОЧНА ПОВЪРХНОСТ

Младена Радева

Катедра по очни болести и зрителни науки, Факултет по медицина,
Медицински университет – Варна

Научен ръководител: проф. д-р Христина Гручева, д.м.н., FEBO, FICO(Hon), FBCLA, FIACLE; Катедра по очни болести и зрителни науки, Факултет по медицина,
Медицински университет – Варна

MICROSTRUCTURAL ANALYSIS OF THE EFFECTS OF SUNLIGHT ON THE ANTERIOR OCULAR SURFACE

Mladena Radeva

Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Faculty of Medicine,
Medical University of Varna

Mentor: Prof. Christina Grucheva, MD, PhD, DSc, FEBO, FICO (Hon), FBCLA, FIACLE;
Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Faculty of Medicine,
Medical University of Varna

Адрес за кореспонденция:

Младена Радева
Факултет по медицина
Медицински университет-Варна
ул. „Марин Дринов“ 55
9002 Варна
e-mail: mladenaradeva@gmail.com

РЕЗЮМЕ

Цел: Да се оцени въздействието на ултравиолетовите лъчи на микроструктурно ниво върху предната очна повърхност и да се проследи динамиката във времето на евентуалните изменения чрез in-vivo конфокална микроскопия през летния сезон на 43^o градуса географска ширина. Да се направи анализ на слънцезащитните навици и да се проследи връзката им с получените резултати.

Методи: За период от 4 месеца бяха изследвани 50 доброволци (100 очи) на възраст 25±4.2 години с уточнението, че ще прекарат летния сезон изключително в региона на град Варна (43^o градуса географска ширина). Участниците попълниха специални въпросници и бяха подложени на пълен офталмологичен преглед преди и в края на летния сезон, както и една година след първата визита. Бяха извършени и in vivo конфокална микроскопия с HRT II Rostock розовичен модул и като бяха проучени 5 области на роговицата, 4 в булбарна конюнктива и 1 в палпебрална конюнктива на горен клепач и на двете очи.

Резултати: Резултатите от анкетата показват, че 84% (42 участници) смятат, че слънцето е опасно за очите им, но 78% (39 участници) посочват, че опасността е основно през летния период. Микроструктурният анализ на роговицата показва статистически значима редукция на броя на базалната епителна плътност – от 6167±151 клетки/mm² до 5829±168 клетки/mm². Броят на кератоцитите (от повърхностна, средна и дълбока строма), както и гъстотата на ендотелните клетки за периода на проследяване остават числено и статистически непроменени. Анализът на конюнктивата показва характерни муковидни лезии с тъмен център и ярки граници, срещани само при 6 очи (6%) преди и засягащи 30 очи (30%) след летния сезон. Общата площ на кистите е увеличена 20 пъти, а размерът им също е нараснал от 12-78µm преди, до 14-174µm след излагане на лятно слънце. Статистическа обработка на информацията показва негативна връзка между очните слънцезащитни навици и броя на лезиите. Анализът на данните, получени при извършване на изследването една година след първоначалната визита, разкри тенденция за възвръщане към базовите стойности на всички параметри, въпреки че за някои тях не се отчете пълно възстановяване.

Address for correspondence:

Mladena Radeva
Faculty of Medicine
Medical University of Varna
55 Marin Drinov St
9002 Varna
e-mail: mladenaradeva@gmail.com

Заклучение: Излагането на лятно слънце за един сезон, без приложение на адекватни средства за слънцезащита, води до клинично неоткриваеми, преходни микроструктурни промени, засягащи роговицата, булбарната и палпебралната конюнктива. Дългосрочният ефект от тези промени вероятно е "слънчево стареене" на предната очна повърхност, което изглежда е сходно с това на кожата. Резултатите от проведената анкета демонстрират нужда от разработване на превантивна програма и подобряване на информираността на обществото за ултравиолетовите увреждания на очите.

Ключови думи: *предна очна повърхност, UV увреждане, ултравиолетови лъчи, слънцезащита*

ABSTRACT

Aim: The aim of this article is to evaluate the microstructural changes of the ocular surface in response to ultraviolet (UV) exposure, and follow their dynamics using *in vivo* confocal microscopy during the summer season at 43° latitude. It also aims at evaluating the UV protection habits and establishing their relationship with the results.

Methods: For a period of 4 months 50 volunteers (100 eyes), aged 25±4.2 years were recruited with the agreement that they will spend their summer exclusively in the region of the Black Sea coast at 43° latitude. The participants filled out special questionnaires and underwent a comprehensive eye examination before and after the summer season, and one year after the first visit. Laser scanning *in vivo* confocal microscopy was performed with HRT II Rostock corneal module and 5 areas of cornea, 4 in bulbar conjunctiva, and 1 in palpebral conjunctiva of the upper eyelid of both eyes were examined.

Results: The survey results showed that 84% (42 participants) considered the sun dangerous for their eyes. However, 78% (39 participants) indicated that the danger was mainly during the summer. Microstructural analysis of the cornea showed a statistically significant reduction in basal epithelial density: from 6167±151 cells/mm² to 5829±168 cells/mm². The number of keratocytes (superficial, mid and posterior stroma) as well as endothelial cell density for the follow-up period remained numerically and statistically unchanged. Conjunctival analysis revealed characteristic cystic lesions with dark centers and bright borders found in only 6 eyes (6%) before and 30 eyes (30%) after the summer season. The total area of cysts was increased 20 times and their size also increased from 12-78 µm before, to 14-174 µm after exposure to summer sun. Statistical analysis of the data showed a negative correlation between eye sun-protection habits and microstructural damage. The analysis of the data obtained during the survey one year after the initial visit revealed a tendency to return to the baseline of all encountered features, although for some of them a complete restoration was not observed.

Conclusion: Exposure to summer sun for one season, without the use of adequate sun protection, leads to clinically undetectable, microstructural changes affecting the cornea, bulbar and palpebral conjunctiva with transient, but possibly cumulative nature. The long-term effect of these changes is probably "solar ageing of the anterior ocular surface", which appears to be similar to the well known skin damage. The results of the survey show a need to develop a preventive program and improve public awareness of UV eye injuries.

Keywords: *anterior ocular surface, UV damage, ultraviolet light, sun protection*

УВОД

Увреждането на кожата в резултат на въздействието на ултравиолетовите (UV) лъчи е добре известен факт (1-3). Промените, възникващи при такова увреждане, са подробно изучени и описани на микроструктурно ниво в научната литература (4-7).

Тъй като клепачите и очната повърхност, като части от лицето са изложени на по-често и по-продължително слънчево облъчване от другите области на тялото, е от особена важност да се установи какви микроструктурни промени настъпват при експозиция на UV лъчи в тази зона.

INTRODUCTION

UV damage of the skin is common knowledge and has been well documented at microstructural level in scientific literature (1-8). As the eyelids and the ocular surface are exposed together with the face more often than other body areas, it is interesting to understand what the microstructural changes at the ocular surface associated with UV exposure are.

Currently, most of the publications are based on conjunctival autofluorescence and provide solid knowledge that there is significant UV damage of the interpalpebral conjunctiva (9-11). Surface diseases such as pinguecula and pterygium also have been associated with solar damage, but interestingly pterygium

Понастоящем повечето публикации са базирани на конюнктивална аутофлуоресценция и осигуряват солидни доказателства, че има значително UV увреждане на междупалпебралната конюнктива (8-10). Повърхностни заболявания като пингвекула и птериgium също са свързвани със слънчево увреждане, но е интересен фактът, че птериgiumът е по-често назален (преобладаване около 7.3%), а пингвекулата засяга почти еднакво назалната и темпоралната конюнктива с преобладаване (независимо в кое око или място) до 69.5% (11,12).

В момента слънчевите очила представляват най-популярната защита на очите от слънчеви увреждания и ултравиолетовите лъчи в частност. Въпреки това, поради непрекъснато променящите се тенденции в стила на рамката, повечето от слънчевите очила се приемат като моден аксесоар, а съображенията относно ефекта върху очното здраве остават на заден план при избора им. Независимо от това, оптичната промишленост обръща значително внимание на защитните свойства на слънчевите очила и коригиращите лещи, а последните резултати показват, че задната повърхност на лещите трябва да има рефлексно покритие за адекватна защита от отразената светлина (13,14).

Като се има предвид липсата на достатъчно знания относно *in vivo* микроструктурните промени, настъпващи след излагане на UV светлина, ние създадохме хипотезата, че трябва да има откриваема чрез *in vivo* конфокална микроскопия микроструктурна характеристика на клетъчно ниво, която да е резултат от слънчева и UV експозиция. Ето защо бе разработено проспективно проучване, в което да се проследят подбрани на случаен принцип млади, активни субекти, които доброволно се излагат на слънце в район, намиращ се на нивото на морското равнище (43° северна ширина) през летния период. Целта на изследването е да се осъществи оценка на навиците за UV защита на участниците, да се установят евентуални микроструктурни изменения на очната повърхност и да се проследи динамиката им чрез *in vivo* конфокална микроскопия.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Проучването бе проведено в катедра „Очни болести и зрителни науки“, Медицински университет – Варна и неговата клинична база „Център за зрение“, гр. Варна. Изследването спазва принципите на Декларацията от Хелзинки и има одобрение от етична комисия (2014 г.).

Всички кандидати са набрани проспективно, с помощта на социални медии (Facebook, Twitter) и със съдействието на локалната студентска организация на Медицински университет – Варна. Критериите за включване бяха европейски етнически произход, постоянно местожителство във Варненска област (43° географска ширина), липса на очна патология и рефрактивна грешка (употреба на оптична корекция и контактни лещи), липса на анамнеза за системно заболяване и липса на установена чрез биомикроскопия патология (включително пингвекула или конюнктивални кисти).

is more often nasal (prevalence around 7.3%), and in contrast, pinguecula affects almost equally nasal and temporal conjunctiva with prevalence (in either eye or location) of up to 69.5% (12). Currently, the most popular eye protection is sunglasses. However, due to trends in the frame style, most of the time sunglasses are accepted more like a fashion accessory, and health considerations are not of significant importance. Nevertheless, the optical industry pays significant attention to the protective properties of the sunglasses and corrective lenses, and recent advances have shown that the rear surface of the lenses should have a reflective coating to protect from side reflected light (13,14).

AIM

Considering the lack of knowledge regarding microstructural changes *in vivo* following UV exposure, we created a hypothesis that there should be a detectable feature imaged by *in vivo* confocal microscopy on the anterior ocular surface and/or adjacent adnexal structures, following intensive, consecutive sun and UV exposure. Therefore, a prospective study was designed in order to follow randomly selected young, active subjects, voluntarily exposing themselves to sun at a sea level (43° latitude) during the summer period. The goal of the study is to evaluate the UV protection habits of those subjects, encounter eventual microstructural changes of the ocular surface and follow their dynamics using *in vivo* confocal microscopy.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted in the Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Medical University of Varna and its clinical base Centre for Vision (Vision Protect), Varna Bulgaria. This study adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki and ethical approval was granted by the Ethics Committee (2014).

All subjects were prospectively recruited using social media (Facebook, Twitter) with the assistance of the Students' Council of the Medical University of Varna. The inclusion criteria were Caucasian race, having lived permanently in the Varna region (latitude 43° at sea level) for the last 3 years, general ocular health, no need for optical correction, no contact lens use, and no history of systemic disease and no pathology detected by biomicroscopy (including pinguecula or conjunctival cysts). For a period of 4 months 225 subjects (450 eyes) were recruited with the agreement that they will spend their summer exclusively in the Varna region (beach resort on the Black Sea at 43° latitude) and will be examined before and after the summer season and one year after. After detailed explanation of the benefits and potential risks all participants signed written informed consent forms. The subjects filled in a questionnaire for their eye-protection habits, underwent comprehensive eye examination and, upon confirmation that they fit the criteria, were included in the study. All assigned subjects were invited to have *in vivo* confocal microscopy between 1-30 April, when the outside activities and sun exposure are still limited because of the cold weather. Subsequently, they were invited for a control examination between 1-30 October, after the summer period. All subjects were warned to report immediately if they have any skin sunburn associated with redness and pain, because those

За период от 4 месеца бяха изследвани 50 субекти (100 очи) с уточнението, че доброволците ще бъдат по време на летния сезон изключително във Варненския регион (на крайбрежието на Черно море на 43° географска ширина). На участниците бе разяснено, че ще бъдат подложени на изследване преди и след летния сезон, както и една година по-късно.

След подробно обяснение относно ползите и потенциалните рискове, всички участници подписаха писмени формуляри за информирано съгласие. Доброволците попълниха анкетни карти, включващи демографска информация и въпроси за техните слънцезащитни навици. Всички участници бяха подложени на цялостен задълбочен очен преглед и след потвърждение, че отговарят на гореспоменатите критерии, бяха включени в проучването.

Всички одобрени субекти са изследвани с *in vivo* конфокална микроскопия между 1-30 април, когато все още дейностите на открито и експозицията на слънце са ограничени поради студеното време. Впоследствие е извършен контролен преглед след летния сезон – между 1-30 октомври. Всички участници са инструктирани относно нуждата от докладване на евентуално слънчево изгаряне през летния период, свързано със зачервяване и болка, тъй като тези пациенти следва да се изключат от настоящото проучване и да бъдат изследвани отделно. Всички участници (100 очи) са прегледани отново в рамките на една година (между 1-30 април на следващата година).

Лазер-сканираща *in vivo* конфокална микроскопия е извършена с HRT II Rostock розовичен модул (Heidelberg Engineering GmbH, Dossenheim, Germany) в рамките на 60 минути на субект, тъй като за всяко око са изследвани 5 области в розовицата, 4 в конюнктивата и една в горен клепач. След подробно разяснение на процедурата за изследване и поставяне на капки за анестезия (Alcain, Alcon Inc), конфокалното изследване е извършено както следва: централна розовица; назална, темпорална, горна и долна области в розовицата и булбарната конюнктива; горен клепач след обръщане (от конюнктивалната страна). Поставянето на анестетичните капки е повторено преди изследване на конюнктивата и впоследствие преди изследването на клепачите. Дясното око е изследвано първо. За всички изследвания в проучването е използван обектив с увеличение 400x. Размерът на изображенията е 400 на 400 μm , с латерална резолюция от 2 μm и дебелина на слоя от 5 μm . Изображенията са съхранени в собствена база данни.

Впоследствие са избрани три изображения за регион, като е извършен морфометричен анализ на клетките и структурите с помощта на софтуер 3.1 (Soft Imaging System, Munster, Germany) и така получените данни са анализирани статистически.

За извличане на основните характеристики на данните от проучването е използван дескриптивен статистически анализ. Съчетанието между слънцезащитни навици и микроструктурни увреждания е извършено с помощта на корелационен анализ на Spearman. Резултатите се считат

subjects were excluded from the current study and followed up separately. All of the subjects (100 eyes) had to repeat the examination procedure in one year's time (between 1-30 April of the following year) (own data).

Laser scanning *in vivo* confocal microscopy was performed with HRT II Rostock corneal module (Heidelberg Engineering GmbH, Dossenheim, Germany) and took up to 60 minutes per subject as 5 corneal, 4 conjunctival, and superior and inferior lid areas were examined for both eyes. After explanation of the examination procedure and instillation of anaesthetic drops (Alcain, Alcon Inc), the confocal examination was commenced as follows: central cornea; nasal, temporal, superior and inferior conjunctiva; and superior lid after eversion (from the conjunctival side). The anesthetic drops were repeated before conjunctival and subsequently before lid examination. The right eye was done first. A 400x lens was used for all examinations of this study. The size of the images was 400 by 400 micrometers, with lateral resolution of 2 micrometers and slice thickness of 5 micrometers. The images were stored within the proprietary database (own data).

Subsequently, three images were selected per region. The images of interest underwent morphometric analysis of cells and structures using software 3.1 (Soft Imaging System, Munster, Germany) and were prepared for statistical analysis. For extraction, the basic features of the data in a study descriptive statistics were used. The correlation between sun-protection habits and microstructural damage was determined using Spearman's correlation analysis. The results were considered to be statistically significant at $p < 0.05$. All analyses were performed with SPSS software, version 19.0 (own data).

RESULTS

The study included 50 subjects (100 eyes), aged 28 ± 7.3 years, with slight female predominance of 58%. From the specially developed questionnaire only the information related to the current analysis will be presented. Not surprisingly 84% (42 participants) of the subjects considered the sun dangerous for their eyes. However, 78% (39 subjects) believed that the danger is exclusively during the summer period. Although 60% (30 subjects) would use sunglasses as eye protection, 44 (88%

Table 1. Demographic and questionnaire data for the 50 subjects participating in the study

Groups	Main Group (N=50 subjects, n=100 eyes)
Age	28 ± 7.3 years
Gender	29 females 21 males
Cautious about sun danger for the eye (based on questionnaire)	42 subjects 84%
Routine usage of sunglasses	30 subjects 60%
Selection of glasses with best protection	4 subjects 13% (of the sunglasses users)

*Data extracted from the baseline questionnaire

Table 2. Variations of the basal epithelial cell densities in the study group (N=50 subjects, n=100 eyes) before and after intensive sun exposure (SE) at 43° latitude, and results one year later (N=50 random subjects, n=100 eyes)

Group	Before SE (cells/mm ²)			After SE (cells/mm ²)			One Year Later (cells/mm ²)		
Eye (E)									
R (right)	RE	LE	BE	RE	LE	BE	RE	LE	BE
L (left)	mean±SD	mean±SD	mean±SD	mean±SD	mean±SD	mean±SD	mean±SD	mean±SD	mean±SD
B (both)									
Study group (n=400)	6158±148	6175±153	6167±151	5776±157	5882±179	5829±168	6002±142	6192±151	6097±147
Statistics	NA			Change is significant to baseline P = 0.011			Change is NOT significant to before SE P = 0.33 Change is significant after SE P = 0.039		

за статистически значими при $p < 0.05$. Всички анализи са извършени с SPSS софтуер, версия 19.0.

РЕЗУЛТАТИ

Проучването включва 50 субекти (100 очи), на възраст 28 ± 7.3 години, с леко превъзходство на женския пол 58%. От специално подготвените въпросници е публикувана само информацията, свързана с предмета на изследването. Резултатите от анкетата показват, че 84% (42 участници) смятат, че слънцето е опасно за очите им, но 78% (39 участници) посочват, че опасността е основно през летния период. Въпреки че 60% (30 лица) биха използвали очила за защита на очите, 44 (88% от потребителите) избират най-актуалния модел, а не този, осигуряващ пълна защита. Останалите 34% никога не използват защита дори на плажа. Все пак нито един от участниците, включени в настоящото проучване, не е имал сериозно (свързано с болка) изгаряне на кожата по лицето

of the users) would choose the trendiest model, as opposed to the one offering complete protection. The rest, 34% would never consider protection even on the beach. However, none of the subjects included in the current study had any serious (associated with pain) skin burn on the face or body during the period of the study. Demographic and questionnaire data are presented in Table 1 (own data).

Microstructural analysis of the cornea, demonstrated a slightly decreased number of the basal epithelial density – from 6167 ± 151 cells/mm² before the summer period to 5829 ± 168 cells/mm² after the summer period, which was also statistically significant. The results one year after revealed that the epithelial density returned close to the baseline 6097 ± 147 cells/mm². Results for epithelial density are presented in Table 2. The number of keratocytes (from superficial, mid and posterior stroma) for the follow-up period remained numerically and statistically unchanged. This was also the case for the endothelial densities (own data).

Fig. 1. Cystic lesions of the conjunctiva visualized by in vivo confocal microscopy (HRT II corneal module) from superior (S), inferior (I), nasal (N) and temporal (T), before (^b), and after (^a), sun exposure at 43° latitude. Please note that before sun exposure none of the eyes had cysts in the superior region, and the epithelium had normal appearance (S^b)

Table 3. Summary of the conjunctival cyst parameters (number and mean diameter), assisted by *in vivo* confocal microscopy, before and after sun exposure (SE) during the summer season at 43° latitude for the study group of 50 subjects (100 eyes). The results are presented per conjunctival region: superior (Sup), inferior (Inf), temporal (Temp), nasal (Nas), average per eye and as total summary

Parameters	Right Eye (n=50)				Left Eye (n=50)				Total	Statistics
	Sup	Inf	Temp	Nas	Sup	Inf	Temp	Nas		
Number of cysts before SE	0	1	1	2	0	0	1	1	6	NA
Total number per eye before SE	4 (Affected 3 out of 50 eyes)				2 (Affected 3 out of 50 eyes)				(Affected 6 out of 100 eyes)	
Number of cysts after SE	8	2	14	13	5	1	14	18	75	Change is significant to before SE P = 0.043
Total number per eye after SE	37 (Affected 16 out of 50 eyes)				38 (Affected 14 out of 50 eyes)				(Affected 30 out of 100 eyes)	
Average cysts diameter (μm) before SE	32	14	18	12	34	15	16	11	19±9.5 μm	NA
Mean cysts diameter (μm) before SE	19±9 μm				19±10 μm					
Average cysts diameter (μm) after SE	43	46	24	31	43	41	41	40	38.5±5.5 μm	Change is significant to before SE P = 0.022
Mean cysts diameter (μm) after SE	36±9 μm				41±2 μm					
Total affected area (μm²) before SE	253 μm²				209 μm²				462 μm²	NA
Total affected area (μm²) after SE	4 210 μm²				4 850 μm²				9060 μm²	NA

Fig. 2. Schematic demonstration of the distribution of the cysts before (A) and after (B) sun exposure at 43° latitude

или тялото в периода на проучването. Демографските и анкетните данни са представени в Таблица 1.

Микроструктурният анализ на роговицата показва статистически значима редукция на броя на базалната епителна плътност - от 6167 ± 151 клетки/mm² до

Analysis of the conjunctiva demonstrated characteristic cystic lesions with dark centers and bright borders (Fig. 1), encountered in only 6 eyes (6 %) before the summer season. After the summer season their presence increased, affecting 30 eyes (30%). The size of the cysts also increased from 12-78 μm

Table 4. Summary of the conjunctival cyst parameters (number and mean diameter), assisted by *in vivo* confocal microscopy one year later. The results are presented per region: superior (Sup), inferior (Inf), temporal (Temp), nasal (Nas), average per eye and as total summary

Parameters	Right Eye (n=50)				Left Eye (n=50)				Total	Statistics
	Sup	Inf	Temp	Nas	Sup	Inf	Temp	Nas		
Number of cysts one year later	0	1	2	2	0	0	1	2	7 (Affected 9 out of 100 eyes)	
Total number per eye one year later	4 (Affected 4 out of 50 eyes)				3 (Affected 5 out of 50 eyes)					
Average cysts diameter (μm) one year later	26	17	21	14	27	19	17	19	20±6 μm	
Mean cysts diameter (μm) one year later	19.5±3 μm				20.5±9 μm					
Total affected area (μm²) one year later	327 μm²				277 μm²				604 μm²	NA

Fig. 3. Diagram presenting the risk of conjunctival cyst formation before and after the summer season for the 50 subjects (100 eyes)

Fig. 4. Cystic lesions (arrowheads) of the conjunctiva of the upper lid imaged by *in vivo* confocal microscopy (HRT II corneal module), after lid eversion, before (B), and after (A), sun exposure at 43° latitude

5829 ± 168 клетки/ mm^2 . Резултатите от изследването една година по-късно демонстрират възстановяване на епителната плътност близо до изходното ниво в рамките на една година 6097 ± 147 клетки / mm^2 . Резултатите относно епителната плътност са представени в Таблица 2. Броят на кератоцитите (от повърхностна, средна и дълбока строма) за периода на проследяване остава цифрово и статистически непроменен. Такъв е и случаят с плътността на ендотелните клетки.

Анализът на конюнктивата показва характерни кистовидни лезии с тъмен център и ярки граници, срещани само при 6 очи (6%) преди и засягащи 30 очи (30%) след летния сезон (Фиг. 1). Размерът на кистите също се увеличен от 12-78 μm на 14-174 μm след излагане на лятното слънце. Обобщението на резултатите за параметрите на кистите (брой и среден диаметър) е представено в Таблица 3. Освен това кистите демонстрират специфично топографско разположение с по-значимо разпределение по хоризонталния меридиан, което е асиметрично за дясно и ляво око. Топографските характеристики на лезиите са представени схематично на Фиг. 2. Рискът за формиране на кисти съгласно статистическия анализ е представен като диаграма на Фиг. 3. Общата площ на лезиите е изчислена преди и след излагане на лятно слънце, като е установено 20-кратно

at baseline, to 14-174 μm after the summer exposure to sun. The summary of the results for the cyst parameters (number and mean diameter), is presented in Table 3. The cysts also had a specific topographic representation, with higher distribution in the horizontal meridian, which was asymmetrical for the right and left eyes. The topographic characteristics of the lesions are presented schematically on Fig. 2. The risk of cyst formation according to the statistical analysis is presented as a diagram in Fig. 3. The total area of the lesions was calculated before and after the summer sun exposure, and enlargement of 20 times was encountered. The results one year later were similar and presented in Table 4 (own data).

Another interesting observation was encountered on the conjunctiva of the upper lids. Those were again rounded lesions with dark centers and bright borders (Fig. 4), which increased in size and number significantly after the summer period. The total area of the cysts after the summer increased five times. Details for the subjects before and after sun exposure, and one year later are shown in Table 5. The total affected area after sun exposure in these control eyes increased six times after the sun exposure and returned within the normal range within twelve months (own data).

Spearman's correlation was assessed separately for the right and left eye in order to determine the non-parametric rank correlation between sun-protection habits and microstructural damage.

увеличаване. При повторно тестване на субектите една година по-късно резултатите са сходни с изходните и са представени в Таблица 4.

Друго интересно наблюдение е открито в конюнктивата на горен клепач. Описани са окръглени лезии с тъмни центрове и ярки граници (Фиг. 4), които демонстрират значително увеличение след летния период. Общата площ на кистите след лятото е увеличена пет пъти. Подробности относно изследването преди, след слънчева експозиция, както и една година по-късно са показани в Таблица 5. Общата засегната площ след експозиция на слънце при повторното изследване е увеличена шест пъти след излагане на слънце, като е отчетено приравняване в рамките на нормалния диапазон в период от дванадесет месеца.

Корелацията на Spearman е оценена отделно за дясно и ляво око, за да се определи непараметричната ранг корелация между слънцезащитните навици и микроструктурните увреждания. Анализите подчертаха отрицателната зависимост между навиците за употреба на слънчеви очила (отговор „ДА/НЕ нося слънчеви очила през по-голямата част от времето през лятото“) и броя кисти. Стойността на коефициента е -0.542 и -0.373 съответно

Analyses highlighted a negative correlation between the habits to wear sunglasses (answer “YES/NO I wear sunglasses most of the time during summer”) and the number of cysts. The value of the coefficient was -0.542 and -0.373 for the right and left eyes, respectively, and negative correlation between the level of sun protection of the eyes and number of cysts was established (own data).

Further complex analysis of the results one year later demonstrated the tendency to return to the baseline of all encountered features, although some parameters were slightly increased, even eight months after the summer season as presented in Table 4 (own data).

DISCUSSION

The current study demonstrates at microstructural level that UV exposure during the summer season at 43° latitude is associated with significant, progressive changes of the anterior ocular surface including cornea, bulbar and palpebral conjunctiva. The results one year later showed that those changes had a reverse evolution, however, there was no complete restoration to the baseline especially regarding the conjunctiva. Therefore, the cumulative effect of those changes contributes to the “solar ageing of the ocular surface”. If the highlighted structural

Table 5. Summary of the upper lid conjunctival cyst parameters (number and mean diameter), assisted by *in vivo* confocal microscopy, before and after sun exposure (SE) during the summer season at 43° latitude and one year later, for the 50 test subjects (100 eyes). The results are presented as average per eye and as total summary

Parameters	Right Eye (n=50)	Left Eye (n=50)	Total	Statistical Significance
Number of cysts before SE	5 (Affected 4 out of 50 eyes)	2 (Affected 2 out of 50 eyes)	7 (Affected 6 out of 100 eyes)	NA
Number of cysts after SE	16 (Affected 11 out of 50 eyes)	12 (Affected 9 out of 50 eyes)	28 (Affected 20 out of 100 eyes)	Change is significant to before SE P=0.011
Number of cysts one year later	7 (Affected 5 out of 50 eyes)	3 (Affected 2 out of 50 eyes)	10 (Affected 7 out of 100 eyes)	Change is NOT significant to before SE P = 0.31 Change is significant to after the SE P = 0.009
Average cyst diameter (μm) before SE	$25.5 \pm 5 \mu\text{m}$	$27.5 \pm 6 \mu\text{m}$	$26.5 \pm 5.5 \mu\text{m}$	NA
Average cysts diameter (μm) after SE	$39 \pm 14 \mu\text{m}$	$40 \pm 12 \mu\text{m}$	$39.5 \pm 13 \mu\text{m}$	Change is significant to before SE P = 0.002
Average cyst diameter (μm) one year later	$28 \pm 11 \mu\text{m}$	$32 \pm 8 \mu\text{m}$	$30 \pm 9.5 \mu\text{m}$	Change is NOT significant to before SE P = 0.68 Change is significant to after the SE P = 0.031
Total affected area (μm^2) before SE	$400 \mu\text{m}^2$	$173 \mu\text{m}^2$	$573 \mu\text{m}^2$	NA
Total affected area (μm^2) after SE	$1959 \mu\text{m}^2$	$1507 \mu\text{m}^2$	$3466 \mu\text{m}^2$	NA
Total affected area (μm^2) after 1 year	$615 \mu\text{m}^2$	$301 \mu\text{m}^2$	$916 \mu\text{m}^2$	NA

за дясното и лявото око, като се установи отрицателна зависимост между слънцезащитните навици и броя на кистите.

Допълнителен анализ на параметрите една година по-късно показва тенденцията за възвръщане към изходното ниво на всички отклонения, въпреки че някои параметри са леко завишени, дори осем месеца след летния сезон, както е представено в Таблица 4.

ДИСКУСИЯ

Настоящото изследване демонстрира на микро-структурно ниво, че излагането на ултравиолетови лъчи през летния сезон на 43^o географска ширина е свързано със значителни прогресивни промени на предната очна повърхност, включително роговицата, булбарната и палпебралната конюнктива. При повторно изследване една година по-късно тези промени показват обратна еволюция, но пълно възстановяване до изходното ниво не се наблюдава, особено по отношение на конюнктивата. Следователно кумулативният ефект на тези промени допринася за „слънчевото стареене на очната повърхност“. Ако подчертаните структурни промени се анализират индивидуално, можем да предположим, че всяка от тях има отрицателно въздействие върху целостта на очната повърхност и поради това може да бъде потенциална причина за сухо око, хроничен конюнктивит, хроничен блефарит, намалена прозрачност на роговицата, дефицит на лимбални стволови клетки. Вероятно всички тези структурни промени имат физиологични последици с отрицателен ефект върху целостта на предната очна повърхност и могат да доведат до нейното трайно увреждане и заболяване (15).

От друга страна резултатите от анкетните карти разкриха недостатъчна осведоменост относно въздействието на ултравиолетовите лъчи, средствата за протекция и начина им на употреба. Обезпокоителен е фактът, че 35% от участниците не използват каквато и да било защита от слънце дори на плажа. Въпреки че 60% (30 лица) биха използвали очила за защита на очите, 44 (88% от потребителите) ще изберат най-актуалния модел, а не този, осигуряващ пълна защита. Специалистите по очно здраве трябва да бъдат внимателни при обучението и насочването на вниманието на всеки пациент относно възможностите и ползите от UV защита на очите. В момента в пазарната мрежа съществуват очила, контактни лещи и дори очни капки. Очните капки са предмет на много противоречиви коментари, тъй като тяхното въздействие е временно, обаче, при някои от активностите и липса на друга възможна защита от слънце, редовно прилагане на капки за очи може да бъде отлична възможност за предпазване на очната повърхност. Меките контактни лещи с диаметър над 14.00 mm и адекватно UV блокиране (включително UV A и B) със сигурност ще предотвратят потенциално увреждане на лимба и роговицата. При избор на слънцезащитни очила трябва да се обърне повече внимание на дизайна на слънцезащитната рамка и възможностите за

changes are analysed individually, we may hypothesize that each of them has a negative impact on the ocular surface integrity, and therefore can be a potential cause for dry eye, chronic conjunctivitis, chronic blepharitis, decreased corneal transparency, limbal stem cell deficiency. Obviously, all those structural changes would have physiological consequences with a negative effect on the ocular surface integrity and may trigger disease (15).

On the other hand, the results of the questionnaires revealed insufficient awareness of the impact of ultraviolet rays, the methods of protection and their use. Disturbing is the fact that 34% would never consider protection even on the beach. Although 60% (30 subjects) would use sunglasses as eye protection, 44 (88% of the users) would choose the trendiest model, as opposed to the one offering complete protection. The eye care practitioners should take heed and be meticulous in educating and making each patient aware concerning UV protection of their eyes. Currently, there are glasses, contact lenses and even eye drops available. The eye drops are the subject of many negative comments as their effect is temporary, however, in certain activities especially related to semi-closed eyes and no other sun protection regular application of eye drops might be an excellent opportunity for preservation of the ocular surface. Soft contact lenses with a diameter of over 14.00 mm and proper UV blocking (including UV A and B) certainly will prevent damage to the limbus and peripheral cornea. More attention must also be paid to the sun protection frame design and possibilities for elimination of reflected light in consideration with face anatomy and other morphometric features.

CONCLUSION

In conclusion, summer sun exposure for one season at 43^o latitude leads to clinically undetectable, microstructural changes affecting the cornea, bulbar and palpebral conjunctiva with transient nature. The long-term (cumulative) effect of those changes would lead to "solar ageing of the anterior ocular surface", which appears to be similar to the well known skin damage. The results of the questionnaires demonstrated the need of development of a preventive program and improving the public awareness of UV eye damage.

REFERENCES

1. Amaro-Ortiz A, Yan B, D'Orazio JA. Ultraviolet radiation, aging and the skin: Prevention of damage by topical cAMP manipulation. *Molecules*. 2014;19(5):6202-19. doi: 10.3390/molecules19056202.
2. Godic A, Poljsak B, Adamic M, Dahmane R. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:860479. doi: 10.1155/2014/860479.
3. Panich U, Sittithumcharee G, Rathviboon N, Jirawatnotai S. Ultraviolet radiation-induced skin aging: The role of DNA damage and oxidative stress in epidermal stem cell damage mediated skin aging. *Stem Cells Int*. 2016;2016:7370642. doi: 10.1155/2016/7370642.
4. Ichihashi M, Ueda M, Budyanto A, Bito T, Oka M, Fukunaga M, et al. UV-induced skin damage. *Toxicology*. 2003;189(1-2):21-39. doi:10.1016/S0300-483X(03)00150-1

елиминирани на отразената светлина, като се вземе предвид анатомията на лицето и други морфометрични особености.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Излагането на лятно слънце за един сезон, без приложение на адекватни средства за слънцезащита, води до клинично неоткриваеми, преходни микроструктурни промени, засягащи роговицата, булбарната и палпебралната конюнктива. Дългосрочният ефект от тези промени вероятно е "слънчево стареене" на предната очна повърхност, което изглежда е сходно с това на кожата. Резултатите от проведената анкета демонстрират нужда от разработване на превантивна програма и подобряване на информираността на обществото за UV уврежданията на очите.

5. Armstrong BK, Kricger A. The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B*. 2001;63(1-3):8-18. doi:10.1016/S1011-1344(01)00198-1
6. Yaar M, Gilchrist BA. Photoageing: Mechanism, prevention and therapy. *Br J Dermatol*. 2007;157(5):874-87. doi:10.1111/j.1365-2133.2007.08108.x
7. Matsumura Y, Ananthaswamy HN. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004;195(3):298-308. doi:10.1016/j.taap.2003.08.019
8. Sherwin JC, McKnight CM, Hewitt AW, Griffiths LR, Coroneo MT, Mackey DA. Reliability and validity of conjunctival ultraviolet autofluorescence measurement. *Br J Ophthalmol*. 2012;96(6):801-5. doi: 10.1136/bjophthalmol-2011-301255.
9. Wolfssohn JS, Drew T, Sulley A. Conjunctival UV autofluorescence - prevalence and risk factors. *Cont Lens Anterior Eye*. 2014;37(6):427-30. doi: 10.1016/j.clae.2014.07.004.
10. Kearney S, O'Donoghue L, Pourshahidi LK, Richardson PM, Saunders KJ. The use of conjunctival ultraviolet autofluorescence (CUVAF) as a biomarker of time spent outdoors. *Ophthalmic Physiol Opt*. 2016;36(4):359-69. doi: 10.1111/opo.12309.
11. Panchapakesan J, Hourihan F, Mitchell P. Prevalence of pterygium and pinguecula: the Blue Mountains Eye Study. *Aust N Z J Ophthalmol*. 1998;26 Suppl 1:S2-5. doi:10.1111/j.1442-9071.1998.tb01362.x
12. Mimura T, Usui T, Obata H, Yamagami S, Mori M, Funatsu H, et al. Severity and determinants of pinguecula in a hospital-based population. *Eye Contact Lens*. 2011;37(1):31-5. doi: 10.1097/ICL.0b013e3181f91f2f.
13. Krutmann J, Behar-Cohen F, Baillet G, de Ayguavives T, Ortega Garcia P, Pena-Garcia P, et al. Towards standardization of UV eye protection: What can be learned from photodermatology? *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2014;30(2-3):128-36. doi: 10.1111/phpp.12089.
14. Behar-Cohen F, Baillet G, de Ayguavives T, Garcia PO, Krutmann J, Pena-Garcia P, et al. Ultraviolet damage to the eye revisited: Eye-sun protection factor (E-SPF®), a new ultraviolet protection label for eyewear. *Clin Ophthalmol*. 2014;8:87-104. doi: 10.2147/OPHT.S46189.
15. Grupcheva CN, Grupchev DI, Radeva MN, Hristova EG. UV damage of the anterior ocular surface – microstructural evidence by in vivo confocal microscopy. *Cont Lens Anterior Eye*. 2018. doi:10.1016/j.clae.2018.06.004.