МОДИФИЦИРАНЕ НА ТЕХНИКАТА ЗА ДЕТЕКЦИЯ И ПРОСЛЕДЯВАНЕ НА ЗАБОЛЯВАНИЯ НА ПРЕДЕН ОЧЕН СЕГМЕНТ ЧРЕЗ МЕТОДА НА КОНЮНКТИВАЛНА АВТОФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ

Евгени Нешкински^{1,2}, Младена Радева², Мария Бояджиева²,
Йордан Андреев¹, Христина Групчева^{1,2}

¹Специализирана болница по очни болести за активно лечение – Варна

²Катедра по очни болести и зрителни науки, Факултет по медицина,
Медицински университет – Варна

MODIFICATION OF THE TECHNIQUE FOR DETECTION AND FOLLOW-UP OF DISEASES OF THE ANTERIOR OCULAR SEGMENT USING THE CONJUNCTIVAL AUTOFLUORESCENCE METHOD

Evgeni Neshkinski^{1,2}, Mladena Radeva^{1,2}, Maria Boyadzhieva^{1,2},
Jordan Andreev¹, Christina Grupcheva^{1,2}

¹Specialized Eye Hospital-Varna

²Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Faculty of Medicine,
Medical University of Varna

Адрес за кореспонденция:

Евгени Нешкински
Факултет по медицина
Медицински университет-Варна
ул. Марин Дринов 55
9002 Варна
e-mail: neshkinski@yahoo.com

Address for correspondence:

Evgeni Neshkinski
Faculty of Medicine
Medical University of Varna
55 Marin Drinov St
9002 Varna
e-mail: neshkinski@yahoo.com

РЕЗЮМЕ

Всеки човек е в непрекъснат контакт с факторите на околната среда. В състава на електромагнитния спектър попадат лъчи с различна дължина на вълната, като късовълновите ултравиолетови лъчи представляват невидим, потенциален източник на увреда. С цел обективно документиране и проследяване на ултравиолетовите изменения по предна очна повърхност е разработен метод за детекция, базиращ се на конюнктивалната автофлуоресценция. Настоящото изложение има за цел да представи модифицирана техника за диагностика на някои често срещани заболявания, както и да демонстрира резултатите от изследването на пациенти с птериgium, проследени в клиниката с камера за детекция на конюнктивална автофлуоресценция.

Ключови думи: УВ светлина, УВ детекция, УВ увреда, камера, очна повърхност

ABSTRACT

Every person is in constant interaction with the environmental factors, with the sun being the highest energy source. The electromagnetic spectrum includes rays of different wavelengths, with shortwave ultraviolet rays being an invisible, potential source of damage. For the purpose of objectively documenting and tracking the UV changes on the anterior ocular surface, a detection method based on conjunctival autofluorescence has been developed. The purpose of this presentation is to present a modified technique for the diagnosis of some common diseases and to demonstrate the results of a study among patients with pterygium monitored in the clinic with a conjunctival autofluorescence detection camera.

Keywords: UV light, UV detection, UV damage, camera, ocular surface

Енергията в природата оказва въздействие върху всички живи организми ежедневно, като човек не прави изключение. Най-високоенергийният естествен източник е слънцето, като ежедневната експозиция го превръща в потенциален източник на увреда. В състава на слънчевата радиация влизат лъчи с различна дължина на вълната.

Човешкото око, като специализиран орган, е в състояние да възприема светлинни дразнения между 400 nm и 700 nm, като този диапазон може да бъде разширен от около 380 nm до 760 nm при определени обстоятелства (1).

Това е една малка част от целия електромагнитен спектър,

Energy in nature affects all living organisms on a daily basis, with no exception. The highest energy source is the sun, and the daily exposure makes it a potential source of damage. The composition of solar radiation includes rays of different wavelengths.

The human eye, as a specialized organ, is able to perceive light stimuli between 400 nm and 700 nm, and this range can be extended from about 380 nm to 760 nm under certain circumstances (1). This is a small part of the entire electromagnetic spectrum, with a large part of the electromagnetic energy remaining hidden for the eye.

Ultraviolet light is set between the X-rays (0.01 nm – 10 nm) and the visible light spectrum (2,3) (Fig. 1).

Fig. 1. Electromagnetic spectrum - wavelength of ultraviolet, visible and infrared light

като огромна част от електромагнитната енергия остава скрита за окото.

Ултравиолетовата светлина заема място между рентгеновите лъчи (0,01–10 nm) и видимия светлинен спектър (2,3) (Фиг. 1).

Ултравиолетовата светлина не е хомогенна по своята характеристика, а е изградена от лъчи с различна дължина:

- UVA – 380–315 nm, достигат земната повърхност, като не се абсорбират от озоновия слой. Класически смятани за относително безвредни, могат да предизвикат генетични промени при определена експозиция (4);
- UVB – 315–280 nm, в по-голямата си част се абсорбират от озоновия слой. Характеризират се с по-голям енергетичен заряд и енергия на единичния електрон около 3,94–4,43 eV. Те могат да бъдат причина за увреждане на окото, дългосрочни промени в кожата и не на последно място – злокачествени новообразувания (5).
- UVC – 280–100 nm – поглъща се изцяло от озоновия слой, поради което естествената UVC радиация на земната повърхност е рядка (6).

Ефектите на различните видове лъчи върху биологичните тъкани зависят от много фактори, като на първо място това е дължината на вълната. Допълнителни фактори са времето на експозиция и реакцията на клетките на съответния организъм (7).

Ultraviolet light is not homogeneous in its nature, but made up of rays of different wavelengths:

- UVA – 380 nm – 315 nm, reach the earth's surface without being absorbed by the ozone layer. Classically considered to be relatively harmless, they can cause genetic changes depending on the exposure (4);
- UVB – 315 nm - 280 nm, are mostly absorbed by the ozone layer. They are characterized by a higher energy charge and a single electron energy of about 3.94 eV - 4.43 eV. They can be a cause of eye damage, long-term skin changes and, last but not least, malignancies (5).
- UVC – 280 nm - 100 nm – they are completely absorbed by the ozone layer. Natural UVC radiation on the Earth's surface is rare (6).

The effects of different types of rays on biological tissues depend on many factors, but first and foremost on the wavelength. Additional factors are the exposure time and the cell response of the organism (7).

Documentation of conjunctival ultraviolet autofluorescence zones is a relatively new and innovative method for determining previous UV exposure (8). The early detection method is based on molecules that fluoresce when stimulated by light from the ultraviolet spectrum. The presence of such intracellular molecules gives rise to autofluorescence (9).

In this study, we used an improved version of the prototype camera for detection of autofluorescence by Prof. Minas Coroneo. One of the main elements of the camera is the body of the digital single lens reflex system. As most modern bodies are tuned to operate primarily

Fig. 2. Camera used for detecting ultraviolet autofluorescence in the study

Документирането на зони на конюнктивална ултравиолетова автофлуоресценция е сравнително нов и иновативен метод за определяне на предходна UV експозиция (8). Методът на ранна детекция се базира на молекули, флуоресциращи при стимулация със светлина от ултравиолетовия спектър. Наличието на такива интрацелуларни молекули поражда автофлуоресценция (9).

В настоящото проучване използвахме подобрена версия на прототипа на камера за детекция на автофлуоресценция на проф. Минас Корнео. Един от основните елементи на камерата е тялото на огледално рефлексната система. Тъй като повечето съвременни тела са настроени да работят предимно във видимия спектър и да елиминират „паразитните“ фотони светлина във UV и ИЧ спектър, беше избран Nikon D100, поради добрата разделителна способност, възможността за пряка визуализация след направата на снимка (и повтаряне на некачествените такива) и широкото налагане именно на този модел в UV и астрофотографията като един от най-добрите. Допълнително беше премахнат вграденият филтър пред матрицата, блокиращ UV и ИЧ трансмисия (т.н. горещо огледало).

Методът използва обектив от изцяло кварцови лещи UV-VIS-IR 60 mm 1:4 APO Macro на Coastal Optics. Специализиран за UV и астрофотография, същият пропуска светлина с дължина пог 350 nm до около 290 nm (10) (Фиг. 2).

Като допълнителни елементи на усъвършенстваната от нас камера бяха използвани филтри пред обектива B+W 62 489 и B + W 320, модифицирани светкавици с филтри за UV

in the visible spectrum and to eliminate „parasitic“ photons of light in the UV and IR spectrum, the Nikon D100 was chosen because of its good resolution, the ability to directly visualize the photo after taking it (and repeat the low quality ones) and the widespread use of this model in UV and astrophotography as one of the best. Additionally, the built-in filter in front of the matrix blocking the UV and IR transmission (the hot mirror) was removed.

The method uses an all-quartz lens UV-VIS-IR 60 mm 1: 4 APO Macro by Coastal Optics. Specialized in UV and astrophotography, it transmits light of less than 350 nm to about 290 nm (10) (Fig. 2). Additional elements in our advanced camera were used, the filters B + W 62 489 and B + W 320 in front of the lens, as well as modified flash units with UV transmission filters, wireless synchronizers providing accuracy of up to 1/320 sec (3.12 milliseconds) (11) and a system for moving the camera along the X, Y and Z axes.

The areas that were documented and measured objectively with changes of the anterior ocular surface were clearly visible and were compared with the clinical findings on the native image (Fig. 3).

Documentation allows the measurement of the area of ultraviolet autofluorescence (UVAf) in each patient with these findings, as well as a follow-up over time to seek progression. ImageJ software was used for this purpose. Developed by the US National Institutes of Health (NIH), this program provides numerous options for processing, area calculation and image analysis, from three-dimensional cell presentation to radiological imaging (12).

In addition to documenting and tracking subclinical changes on the anterior ocular surface, the conjunctival autofluorescence method can be used for previously documented diseases such as pterygium and

Fig. 3. Intensive CUAF zones on both eyes

Fig. 4. ImageJ software used to calculate the area of ImageJ and a sample of the results obtained

Fig. 5. Pterygium with CUVAF zone progression in a patient refusing surgery.

Fig. 5. Pterygium with CUVAF zone progression in a patient refusing surgery.

трансмисия, безжични синхронизатори, осигуряващи точност до 1/320 сек (3,12 милисекунди) (11), както и подвижна система, осигуряваща движение на камерата по осите X, Y и Z. Зоните, които се документират и измерват обективно при изменение на предна очна повърхност, са ясно видими и се сравняват с клиничната находка на нативна снимка (Фиг. 3). Документирането позволява измерване на площта на УВАФ при всеки пациент с налична такава, както и проследяване във времето с цел търсене на прогресия. За целта е използван софтуер ImageJ. Тази програма е разработена от Националния здравен институт в САЩ (НИН) и дава множество възможности за обработка, изчисляване на площ и анализиране на образи – от триизмерно представяне на клетки, до радиологични образи (12). Освен за документиране и проследяване на субклинични изменения по предна очна повърхност, методът на конюнктивална автофлуоресценция може да бъде използван при вече документирани заболявания като птеригиум и пингвекула. Измерването на площта на конюнктивална УВАФ през определен период от време показва нарастване на дегенеративните изменения, като зоната на светене нараства както по площ, така и по интензитет (Фиг. 5).

pinguecula. Measuring the area of conjunctival UVAF (CUVAF) over a period of time shows an increase in degenerative changes, with the area of autofluorescence increasing both in area and in intensity (Fig. 5). Intensive conjunctival autofluorescence appears in patients with pterygium undergoing surgical treatment prior to surgical removal of the pterygium. The area extends beyond the visible boundaries of the formation. Postoperative imaging shows complete excision and lack of CUVAF (Fig. 6). Diseases of the anterior ocular segment may in certain cases lead to a decrease in patients' vision, thereby significantly reducing their quality of life. For some diseases, such as pinguecula and pterygium, there has been evidence of an etiological link between shortwave electromagnetic radiation and progression. For a number of socially significant diseases such as cataracts that have a complex etiology, ultraviolet rays are a risk factor. The development of a specialized camera for the detection of POP changes provides an additional opportunity for early diagnosis and objective monitoring of these diseases.

При пациентите с птериgium, преминали оперативно лечение, впечатление прави интензивната конюнктивална автофлуоресценция преди оперативното отстраняване на птериgiuma. Зоната се простира и извън видимите граници на образуването. Постоперативното заснемане показва пълна ексцизия и липса на CUVAF (Фиг. 6).

Заболяванията на преден очен сегмент в определени случаи могат да доведат до намаление на зрението на пациентите, с което значително да намалят качеството им на живот. За някои от тях, като пингвекула и птериgium, отдавна има доказателства за етиологичната връзка с късовълновото електромагнитно лъчение. За редица социалнозначими заболявания, като катаракта, които имат комплексна етиология, ултравиолетовите лъчи са рисков фактор. Разработването на специализирана камера за детекция на изменения по ПОП дава допълнителна възможност за ранна диагноза и обективно проследяване на тези заболявания.

REFERENCES

1. Li GY, Fan B, Ma TH. Visible light may directly induce nuclear DNA damage triggering the death pathway in RGC-5 cells. *Mol Vis*. 2011;17:3279-89.
2. Novelline R. Squire's fundamentals of radiology. Harvard University Press. 5th Edition; 1997.
3. What is ultraviolet (UV) radiation? Available at: <https://www.cancer.org/cancer/skin-cancer/prevention-and-early-detection/what-is-uv-radiation.html>.
4. Keyse SM, Tyrrell RM. Heme oxygenase is the major 32-KDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(1):99-103. doi: 10.1073/pnas.86.1.99.
5. Background on UV-B & ozone depletion. Available at: <http://www.yesinc.com/education/intro-uvb.html>.
6. UVA, UVB & UVC Differences. UPMC HealthBeat. Available at: <https://share.upmc.com/2014/07/infographic-abcs-uv-difference-uva-uvb-uvc/>.
7. Cleaver JE. Repair processes for photochemical damage in mammalian cells. *Adv Radiation Biol*. 1974;4:1-75. doi:10.1016/B978-0-12-035404-7.50008-5.
8. Sun C, Pezic A, Mackey DA, Carlin JB, Kemp A, Ellis JA, et al. Conjunctival ultraviolet autofluorescence as a measure of past sun exposure in children. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2017;26(7):1146-53. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-16-0846.
9. Quantum yield - an overview | ScienceDirect topics. Available at: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/quantum-yield>.
10. The Macrolens Collection Database. Available at: http://www.macrolenses.de/ml_detail_sl.php?ObjektiveNr=344.
11. Battery grip,wireless flash trigger,wireless flash transceiver,TTL flash trigger,wireless remote control,battery shaft,connecting cable --PIXEL ENTERPRISE LIMITED. Available at: <http://www.pixelhk.com/products/show/20>.
12. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):671-5.