



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΔΥΤΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΟΠΤΙΚΗΣ & ΟΠΤΟΜΕΤΡΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ειδικές απεικονιστικές μέθοδοι κερατοειδή και  
ανάλυση αυτών**

Όνοματεπώνυμο Σπουδαστών

*Ανδρουλάκη Μαρία*

*Κατσανεβάκη Στυλιανή*

Εποπτεύουσα Καθηγήτρια

*Δρ. Δήμητρα Μακρυνιώτη, Οπτικός-Οπτομέτρης, BSc (Hons), M.Sc, PhD*

**ΑΙΓΙΟ, 2014**

## **ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Με την ολοκλήρωση αυτής της πτυχιακής εργασίας θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε αρχικά την υπεύθυνη Καθηγήτρια μας κυρία Δήμητρα Μακρυνιώτη για την πολύτιμη βοήθεια της, τη σωστή καθοδήγηση καθώς και για την αμέριστη κατανόηση που μας έδειξε.

Επίσης θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε από καρδιάς τις οικογένειες μας για την στήριξη, τη βοήθεια, την αγάπη και την κατανόηση που καθημερινά μας προσφέρουν.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός στα πλαίσια αυτής της πτυχιακής εργασίας είναι η ανάλυση των ειδικών απεικονιστικών μεθόδων του κερατοειδή. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία λαμβάνουμε πληροφορίες για κάθε μέθοδο, καθώς και την ανάπτυξή τους και τη χρησιμότητά τους, ώστε να έχουμε μια ολοκληρωμένη εικόνα.

Έτσι ξεκινώντας με μια γενική εισαγωγή περί οφθαλμού και ειδικότερα του κερατοειδή φτάνουμε στην ανάλυση των ειδικών απεικονιστικών μεθόδων του κερατοειδή. Αναλυτικότερα το παρόν κείμενο αναφέρει τη λειτουργία της σχισμοειδής λυχνίας, του οφθαλμόμετρου ( Javal ), καθώς και της τοπογραφίας του κερατοειδούς. Θέση σε αυτές τις μεθόδους λαμβάνει ακόμα και η οπτική τομογραφία συνοχής ( OCT ), το Pentacam και το Oscan καθώς και η σύγκριση μεταξύ των δύο. Έπειτα συμπεριλαμβάνεται αναλυτικά το μικροσκόπιο η αρχή λειτουργίας και τα διάφορα είδη. Ποιο συγκεκριμένα αναλύεται το συνεστιακό μικροσκόπιο και η άμεση χρησιμότητά του σε σχέση με τον κερατοειδή. Τέλος μέσα από τις εικόνες του κειμένου τόσο σε σχέση με το συνεστιακό μικροσκόπιο όσο και σε σχέση με τις διάφορες μεθόδους απεικόνισης του κερατοειδή λαμβάνουμε πληροφορίες για την καλύτερη κατανόηση του κειμένου.

Συμπερασματικά το κείμενο παρέχει πλήρη ενημέρωση για τους ειδικούς μεθόδους απεικόνισης του κερατοειδή, ενώ τονίζει την αποτελεσματικότητα του συνεστιακού μικροσκοπίου και τον σημαντικό ρόλο που λαμβάνει καθημερινά. Τέλος η πτυχιακή αυτή εργασία στηρίχτηκε σε επιστημονικά άρθρα και έγκυρες πηγές πληροφόρησης για την υλοποίησή της.

## **ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΙ-ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ**

Dpt: διοπτρία, μονάδα μέτρησης της οπτικής ισχύς

ΣΚΟ: σκληροκερατοειδές όριο

PNS: Εκτίμηση θολερότητας του φακού

3D: τρισδιάστατος/η/ο

μ: micro μονάδα μέτρησης απόστασης

IVCM: in-vivo συνεστιακή μικροσκοπία

Σ.Δ: Σακχαρώδης διαβήτης

δ.δ : δείκτης διάθλασης

## **ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ**

**ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....σελ.2**

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....σελ.3**

**ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΙ-ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....σελ.4**

### **1.ΚΕΦΑΛΑΙΟ**

**1.1 ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΟΦΘΑΛΜΩΝ.....σελ.8-11**

**1.2 ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΗ.....σελ.11-13**

### **2.ΚΕΦΑΛΑΙΟ**

**2.1 ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΔΑΦΟΡΩΝ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΗ.....σελ.14-20**

- ΣΧΙΣΜΟΕΙΔΗΣ ΛΥΧΝΙΑ
- ΟΦΘΑΛΜΟΜΕΤΡΟ (JAVAL)
- ΤΟΠΟΓΡΑΦΙΑ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΟΥΣ

### **3.ΚΕΦΑΛΑΙΟ**

**3.1ΤΟ ΠΡΩΤΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ.....σελ.21-23**

**3.2 ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΤΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΚΑΙ ΑΠΟ ΤΙ ΑΠΟΤΕΛΕΙΤΑΙ.....σελ.23-26**

**3.3 ΕΙΔΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΩΝ.....σελ.27-31**

**3.4 ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ.....σελ.31-32**

**3.5 ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΟΥ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟΥ.....σελ.32-34**

**3.6 ΤΡΟΠΟΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΟΥ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟΥ.....σελ.34-36**

**3.7 ΜΕΡΗ ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΟΥ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟΥ.....σελ.36-38**

**3.8 ΤΥΠΟΙ ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΟΥ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟΥ.....σελ.38-39**

**3.9 ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ RAMAN.....σελ.39-40**

**3.10 ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΚΑΙ ΟΦΘΑΛΜΟΣ.....σελ.40-44**

**3.11 Ο ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΗΣ ΣΤΟ ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ.....σελ.44-47**

## **4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ**

**4.1 ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΟΠΤΙΚΗ ΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΝΟΧΗΣ.....σελ.48**

**4.2 ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ.....σελ.49-52**

**4.3 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ.....σελ.52**

**4.4 ΠΟΤΕ ΓΙΝΕΤΑΙ ΤΟ OCT.....σελ.52**

**4.5 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΟΥ OCT.....σελ.52-53**

**4.6 OCT ΚΑΙ ΠΑΘΗΣΕΙΣ.....σελ.53-55**

## **5.ΚΕΦΑΛΑΙΟ**

**5.1 ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΤΟ PENTACAM.....σελ.56**

**5.2 ΤΑ ΕΙΔΗ ΤΟΥ PENTACAM.....σελ.57-59**

**5.3 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΟΥ PENTACAM.....σελ.60**

## **6.ΚΕΦΑΛΑΙΟ**

**6.1 ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΤΟ ORBSCAN.....σελ.61-62**

**6.2 ΤΑ ΕΙΔΗ ΤΟΥ ORBSCAN.....σελ.62-63**

**6.3 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΟΥ ORBSCAN.....σελ.63-64**

**6.4 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ PENTACAMΚΑΙ ORBSCAN.....σελ.64**

**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....σελ.65-70**

# 1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ

## 1.1 ANATOMIA ΟΦΘΑΛΜΩΝ

Ο ανθρώπινος οφθαλμός είναι μία αδιαίρετη ενότητα που αποτελείται από το νευρικό σύστημα του εγκεφάλου δηλαδή την οπτική οδό και το οπτικό κέντρο, από τον αισθητήρα αμφιβληστροειδή και από διάφορα διαθλαστικά στοιχεία.

Αναλυτικότερα, από έξω προς τα μέσα ο οφθαλμός περιβάλλεται από 3 χιτώνες: τον ινώδη, τον αγγειώδη και τον αμφιβληστροειδή. Ο ινώδης χιτώνας είναι ο εξωτερικός χιτώνας του ματιού και απαρτίζεται από τον σκληρό χιτώνα ο οποίος είναι αδιαφανής και έχει ως λειτουργία του να προστατεύει μηχανικά τον οφθαλμό και φροντίζει να διατηρεί σταθερό το σχήμα του οφθαλμού και από το κερατοειδή χιτώνα ο οποίος είναι διαφανής, έχει σχήμα ελλειπτικό και αποτελεί το διαθλαστικότερο μέσο του ανθρώπινου οφθαλμού με ισχύ 45 Dpt.

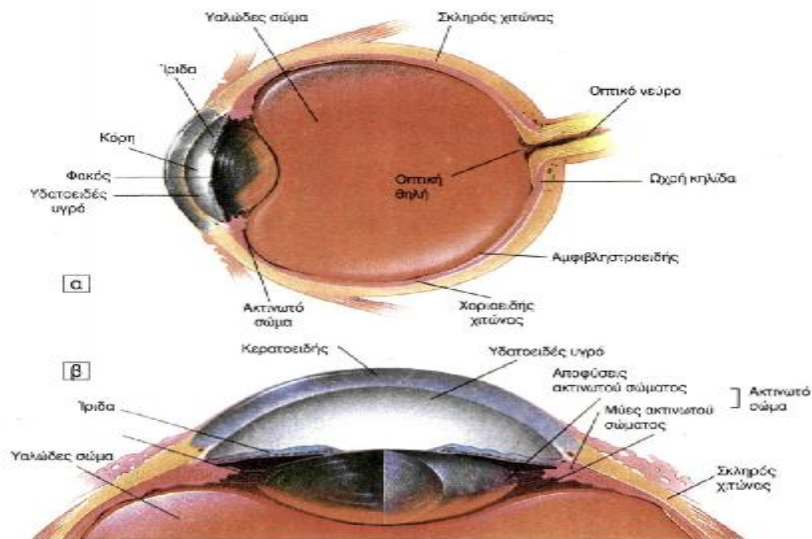
Ο αγγειώδης χιτώνας βρίσκεται στο μέσο τους και αποτελείται από την ίριδα, το ακτινωτό σώμα και το χοριοειδή χιτώνα. Βασικό χαρακτηριστικό του χοριοειδή χιτώνα είναι ότι απαρτίζεται από αγγεία τα οποία είναι υπεύθυνα για την θρέψη του αμφιβληστροειδή.

Η ίριδα είναι το έγχρωμο τμήμα του οφθαλμού και αποτελεί βιομετρικό χαρακτηριστικό για κάθε άνθρωπο. Στο κέντρο της ίριδας υπάρχει ένα κενό κυκλικού σχήματος που ονομάζεται κόρη. Φαίνεται μαύρη λόγω απορρόφησης του φωτός που εισέρχεται από το μελαγχρωστικό επιθήλιο όμως στη πραγματικότητα είναι διαφανής. Βασική λειτουργία της κόρης είναι να ελέγχει το ποσό του φωτός που εισέρχεται στους ανθρώπινους οφθαλμούς χάρη στην αλλαγή της διαμέτρου της αναλόγως τις συνθήκες φωτισμού, καθώς επίσης και το βάθος πεδίου.(Snell,Lemp, 2006)

Το ακτινωτό σώμα τώρα αποτελείται από τις ακτινωτές προβολές και τον ακτινωτό μυ και συμβάλλει σημαντικά στη προσαρμογή των οφθαλμών. Οπίσθια της ίριδας βρίσκεται ο κρυσταλλοειδής φακός του οφθαλμού με σχήμα αμφίκυρτου φακού. Θεωρείται το δεύτερο σημαντικότερο διαθλαστικό μέσο του ανθρώπινου οφθαλμού με ισχύ περίπου 16Dpt και έχει το βασικότερο ρόλο στη λειτουργία της προσαρμογής. Ο φακός και το ακτινωτό σώμα είναι άμεσα



συνδεδεμένα καθώς ο πρώτος συγκρατείται από τις ίνες του Zinn πάνω στο ακτινωτό σώμα και δημιουργεί δύο πόλους στο εσωτερικό του ματιού. Τον πρόσθιο και τον οπίσθιο πόλο.

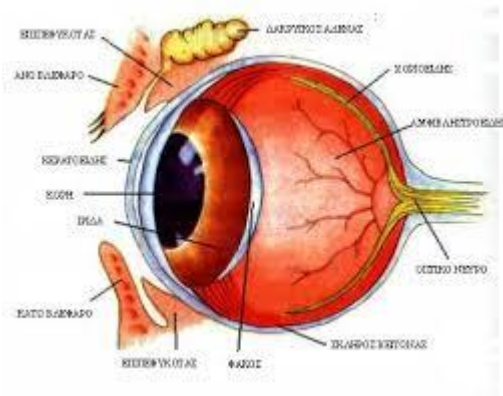


**Εικόνα 1** Ανατομία ανθρώπινου οφθαλμού

Ο πρόσθιος πόλος τώρα χωρίζεται σε πρόσθιο και οπίσθιο θάλαμο. Ο πρόσθιος θάλαμος αποτελείται από την εξωτερική επιφάνεια της ίριδας και του κερατοειδή χιτώνα και ο οπίσθιος θάλαμος ορίζεται από την εσωτερική επιφάνεια της ίριδας, τις ίνες του Zinn, το ακτινωτό σώμα και την πρόσθια επιφάνεια του κρυσταλλοειδή φακού.

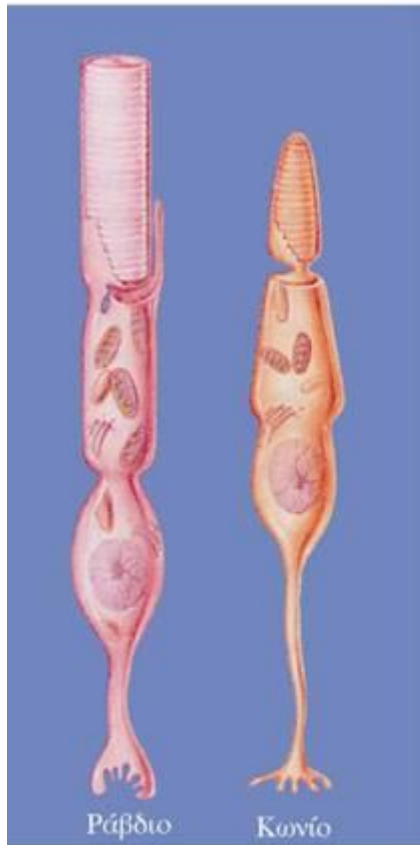
Στον πρόσθιο πόλο των οφθαλμών βρίσκεται το υδατοειδές υγρό. Παράγεται από τις ακτινοειδείς προβολές και έχει σύσταση παραπλήσια με εκείνη του πλάσματος του αίματος. Βρίσκεται σε συνεχή κυκλοφορία κι διοχετεύεται μέσω της κόρης στον πρόσθιο θάλαμο. Το υδατοειδές υγρό αποτελεί τον ρυθμιστή της ενδοφθάλμιας πίεσης, καθώς η ενδοφθάλμια πίεση καθορίζεται από την υγίή ή η παραγωγή και αποχέτευση του υδατοειδούς υγρού.

Ο οπίσθιος πόλος αποτελείται από το ακτινωτό σώμα, τις ίνες του Zinn, την έσω επιφάνεια του κρυσταλλοειδή φακού και τον αμφιβληστροειδή. Στο εσωτερικό του υπάρχει το υαλοειδές ή υαλώδες σώμα ένα παχύρευστο υγρό με ελαστικές ιδιότητες. (Snell,Lemp, 2006)

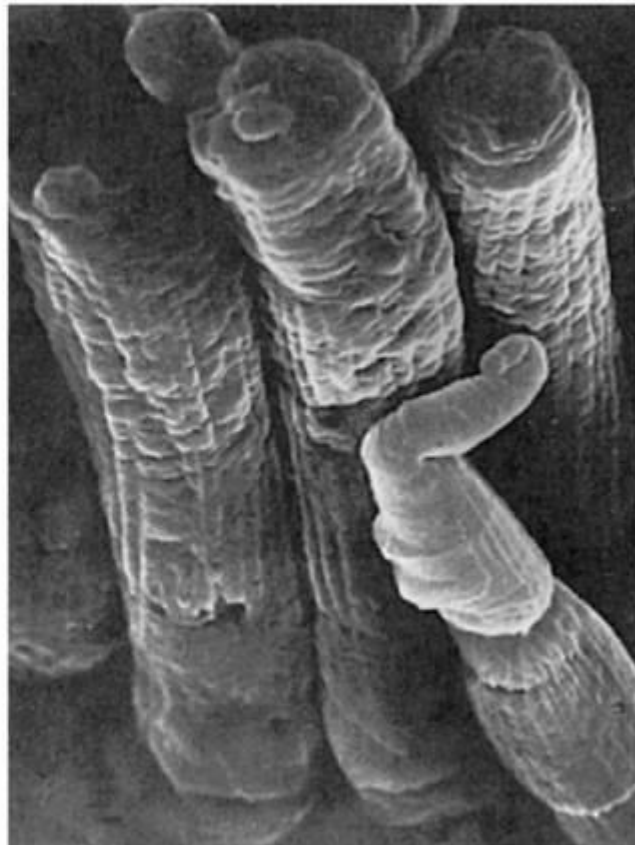


**Εικόνα 2 Κατακόρυφη διατομή του οφθαλμού**

Στο εσωτερικό τώρα του αμφιβληστροειδή και πιο συγκεκριμένα στην ωχρά κηλίδα βρίσκονται οι φωτοϋποδοχείς του οφθαλμού που είναι υπεύθυνοι για την ανίχνευση του φωτός και είναι συνδεδεμένοι με το οπτικό νεύρο το οποίο συμβάλλει στη πορεία μετάδοσης του οπτικού ερεθίσματος προς τον εγκέφαλο. Οι φωτοϋποδοχείς αυτοί είναι τα κωνία και τα ραβδία και πήραν το όνομα τους από το σχήμα τους. Τα κωνία είναι περίπου 5 εκατομμύρια και είναι συγκεντρωμένα στο κέντρο της ωχράς κηλίδας που ονομάζεται κεντρικό βοθρίο. Είναι ευαίσθητα στο φως της μέρας, άρα είναι υπεύθυνα για την όραση μας σε φωτοπικές και μεσοπικές συνθήκες φωτός. Τα ραβδία είναι περίπου 120 εκατομμύρια και βρίσκονται συγκεντρωμένα κυρίως περιφερικά της ωχράς κηλίδας. Είναι ευαίσθητα σε χαμηλό φωτισμό άρα είναι υπεύθυνα για την όραση μας σε σκοτοπικές συνθήκες φωτός. (Ασημέλλης, Μακρυγιώτη, 2008, Snell, Lemp, 2006)



α



β

### Εικόνα 3 Φωτοϋποδοχείς

## 1.2 ANATOMIA ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΗ

Ο κερατοειδής χιτώνας έχει σχήμα οβάλ με πρόσθια οριζόντια διάμετρο περίπου 11,7mm και πρόσθια κατακόρυφη περίπου 10.6mm. Στην οπίσθια επιφάνεια του είναι σχεδόν κυκλικός με διάμετρο περίπου 111.7mm. Το πάχος του στο κέντρο είναι περίπου 520  $\mu\text{m}$  ενώ στη περιφέρεια περίπου 670-700 $\mu\text{m}$ . Η ακτίνα καμπυλότητας της εξωτερικής του επιφάνειας είναι περίπου 7.7mm και της εσωτερικής του περίπου 6.8mm. Επίσης περιβάλλεται εξωτερικά από τη δακρυϊκή στιβάδα η οποία αποτελείται από τη λιπώδη στιβάδα, την βλεννώδη στιβάδα και την υδάτινη στιβάδα.

Η λιπώδης είναι η εξωτερική στιβάδα η οποία καταλαμβάνει το 98% του πάχους της δακρυϊκής στιβάδας και έχει ως ρόλο την προστασία της υδάτινης, αποφεύγοντας δηλαδή την εξάτμιση της υδάτινης και τη διάσπαση όλης της δακρυϊκής στιβάδας. Παράγεται από τους μείβομιανούς αδένες και τους επικουρικούς αδένες του Zeiss και Moll.

Η βλεννώδης είναι η εσωτερική στιβάδα που λειτουργεί ως συνδετικός κρίκος όλης της δακρυϊκής στιβάδας στο επιθήλιο. Παράγεται από τα καλυκοειδή κύτταρα του επιπεφυκότα και από τους επικουρικούς αδένες του Manz.

Η υδάτινη στιβάδα είναι η μεσαία και αποτελεί το βασικό τμήμα των δακρύων. Παράγεται σε ποσοστό 90% στο δακρυϊκό αδένι και 10% στους επικουρικούς δακρυϊκούς αδένες Krause και Wolfring στον ταρσικό επιπεφυκότα.

Κατά μέσο όρο το πάχος της δακρυϊκής στιβάδας είναι περίπου 7  $\mu\text{m}$ . Βασικές λειτουργίες της είναι η εφύγραση και η μηχανική προστασία του κερατοειδή, η μεταφορά αντιμικροβιακών παραγόντων προκειμένου να προστατευθούν οι οφθαλμοί από βακτήρια και μικροοργανισμούς, καθώς και η μεταφορά οξυγόνου από την ατμόσφαιρα στο επιθήλιο του κερατοειδή.

Ο κερατοειδής και ο σκληρός αποτελούν μαζί τον ινώδη χιτώνα του οφθαλμού. Το σημείο όπου τελειώνει ο σκληρός και ξεκινάει ο κερατοειδής χιτώνας ονομάζεται σκληροκερατοειδής όριο (ΣΚΟ). Σε έκταση τώρα ο σκληρός καλύπτει τα 5/6 του ινώδη χιτώνα ενώ ο κερατοειδής μόνο το 1/6. Ο κερατοειδής αποτελείται κυρίως από νερό και ίνες κολλαγόνου. Σε ποσοστό 100% ο κερατοειδής αποτελείται από 78% νερό, 15% ίνες κολλαγόνου και το υπόλοιπο 7% από λοιπές πρωτεΐνες, άλατα, γλυκό-αμινογλυκάνες και άλλα.

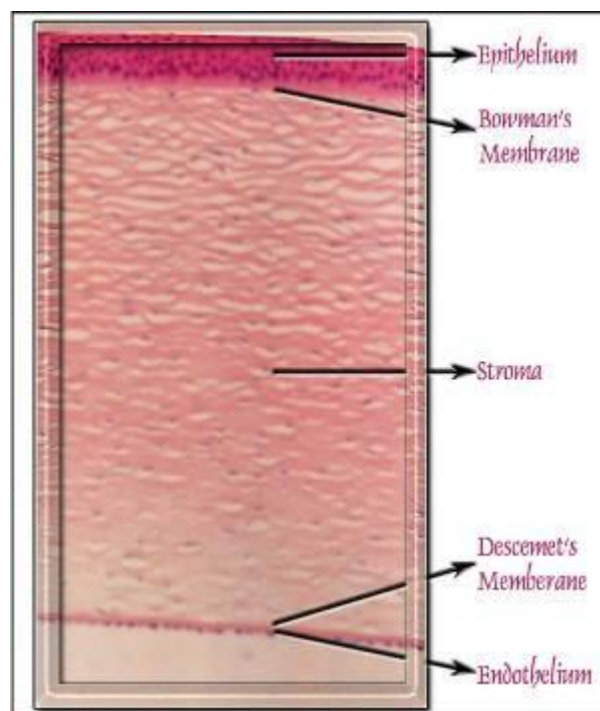
Με βάση την ανατομική του δομή τώρα από έξω προς τα μέσα διακρίνεται σε 5 διαφορετικά τμήματα: επιθήλιο, μεμβράνη του Bowman, στρώμα, μεμβράνη του Descemet και ενδοθήλιο.

Οι πέντε αυτές στιβάδες του κερατοειδή ποικίλλουν και ως προς το πάχος τους και ως προς τη κατανομή τους σε έκταση καθώς καμία δεν είναι όμοια με την άλλη ως προς τη δομή των κυττάρων στα διάφορα τμήματα του κερατοειδή (κέντρο, περιφέρεια, ΣΚΟ).

Η διατροφή και η οξυγόνωση του κερατοειδή είναι ένα αξιοσημείωτο θέμα καθώς δεν έχει αγγεία στη σύσταση του. Τρέφεται λοιπόν από τα αγγεία του

ΣΚΟ, από την επαφή με το υδατοειδές υγρό και από τον αέρα της ατμόσφαιρας. Και έτσι παίρνει τη γλυκόζη που χρειάζεται με διάχυση από το υδατοειδές υγρό. Και η οξυγόνωση του γίνεται με διάχυση από το ατμοσφαιρικό οξυγόνο που βρίσκετε στα δάκρυα. Άλλες πηγές οξυγόνου για το κερατοειδή είναι το υδατοειδές υγρό καθώς και τα αιμοφόρα αγγεία του ΣΚΟ.

Ο κερατοειδής είναι ένας χιτώνας πλούσιος σε νεύρωση, προερχόμενη από το οφθαλμικό νεύρο που αποτελεί το πρώτο κλάδο του τρίδυμου της πέμπτης εγκεφαλικής συζυγίας.(Κατσούλος,Μακρυνιώτη, 2010)



Εικόνα 4 Τα στρώματα του κερατοειδή χιτώνα

## 2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ

### 2.1 ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΗ

#### · ΣΧΙΣΜΟΕΙΔΗΣ ΛΥΧΝΙΑ

Εναλλακτικά η σχισμοειδής λυχνία μπορεί να ονομασθεί βιομικροσκόπιο ή στερεοβιομικροσκόπιο σχισμοειδούς λυχνίας. Αποτελείται από ένα σύστημα φωτισμού με μεταβαλλόμενο μήκος, εύρος, θέση και φωτεινότητα και από ένα μικροσκόπιο. Απαρτίζεται ακόμα από 6 βασικά μέρη: μεγέθυνση, ανύψωση, κίνηση αριστερά/δεξιά και εμπρός/πίσω, ρυθμιστή πλάτους/ύψους σχισμής, κεντράρισμα σχισμής και ύψος/ένταση σχισμής. Παρέχει 3 είδη ειδικών τεχνικών φωτισμού και είναι τα εξής: η άμεση τεχνική φωτισμού, η έμμεση τεχνική φωτισμού και ο φωτισμός διάχυσης.

Και με τα 3 είδη φωτισμού μπορούμε να ελέγξουμε την ίριδα, τα βλέφαρα, το πρόσθιο θάλαμο και το κερατοειδή. Μπορούμε να παρατηρήσουμε τυχόν αδιαφάνειες του κερατοειδή, οίδημα του κερατοειδή και οποιαδήποτε αλλεργία από φακούς επαφής ή μη όπως επιπεφυκίτιδα, κερατίτιδα κτλ.

(Κατσούλος, Ασημέλλης, 2008)



Εικόνα 5 Σχισμοειδής λυχνία

#### · ΟΦΘΑΛΜΟΜΕΤΡΟ (JAVAL)

Το οφθαλμόμετρο αποτελεί το πρώτο και πολύ σημαντικό βήμα για να δούμε αν και κατά πόσο ένας εξεταζόμενος οφθαλμός έχει αστιγματισμό και λειτουργεί ως αφετηρία για τις μετέπειτα αντικειμενικές και υποκειμενικές εξετάσεις που θα γίνουν.

Η μέτρηση γίνεται στα κεντρικά 3 χιλιοστά του κερατοειδή και μπορεί να μας δώσει αποτελέσματα είτε για τυχόν ύπαρξη κερατοειδικού αστιγματισμού, είτε για τις ακτίνες καμπυλότητας του κερατοειδή σε περίπτωση χρήσης φακών επαφής.

Αφού ευθυαστούν τα μάτια του εξεταστή και τα μάτια του εξεταζόμενου, εστιάζει το οφθαλμόμετρο στον εξεταζόμενο κερατοειδή και το κινεί έως ότου τα δύο είδωλα (πράσινο, πορτοκαλί) γίνουν ευκρινή. Όταν τα δύο είδωλα ευθυγραμμιστούν χωρίς όμως να επικαλύπτει το ένα το άλλο τότε έχει βρεθεί ο πρώτος κύριος μεσημβρινός, η ακτίνα καμπυλότητας σε αυτό τον μεσημβρινό και η διαθλαστική ισχύς του κερατοειδή σε αυτό το μεσημβρινό. Αφού περιστραφεί το όργανο κατά 90 μοίρες με την ίδια διαδικασία βρίσκουμε τα ίδια στοιχεία και για τον άλλο μεσημβρινό.

Αυτό συμβαίνει όμως μόνο σε περιπτώσεις ομαλού αστιγματισμού. Όταν δηλαδή η διαφορά μεταξύ των 2 μεσημβρινών είναι 90 μοίρες.

(Κατσούλος, Ασημέλλης, 2008)



**Εικόνα6 Javal**

· **ΤΟΠΟΓΡΑΦΙΑ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΟΥΣ**

Μέσα από τη τοπογραφία κερατοειδή έχουμε τη δυνατότητα λεπτομερούς μελέτης του σχήματος του κερατοειδή με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή και βοηθάει πολύ στη διαδικασία εφαρμογής φακών επαφής, όπως και στη διαθλαστική χειρουργική.



Ουσιαστικά αυτό που παίρνουμε είναι μια χαρτογράφηση της συνολικής επιφάνειας του κερατοειδούς με κώδικα χρωμάτων. Τα θερμά χρώματα (κόκκινα και πορτοκαλί) απεικονίζουν τις πιο κυρτές περιοχές ενώ τα ψυχρά χρώματα (μωβ και μπλε) τις πιο επίπεδες περιοχές. Σε κάθε φυσιολογικό κερατοειδή η κεντρική περιοχή εμφανίζεται πιο κυρτή από την περιφέρεια, λόγω της ασφαιρικότητας στο σχήμα του. Μπορούμε να εκτιμήσουμε την διοπτρική ισχύ σε κάθε σημείο του κερατοειδή αφού τα έγχρωμα τμήματα της τοπογραφίας συσχετίζονται με διοπτρικές δυνάμεις.

Ο τοπογραφία του κερατοειδούς λοιπόν εμφανίζεται ιδιαίτερα χρήσιμη στη διάγνωση αλλά και παρακολούθηση στην εξέλιξη κερατόκωνο, στην αναγνώριση παραμόρφωσης του κερατοειδή από τη λανθασμένη χρήση φακών επαφής, στη διαπίστωση μετεγχειρητικής παραμόρφωσης του κερατοειδούς, στη προεγχειρητική μελέτη αλλά και μετεγχειρητικά ασθενών με διαθλαστικές ανωμαλίες.

Ο τοπογράφος λειτουργεί με τις αντανάκλασεις του κερατοειδή προκειμένου να μετρήσει την ακτίνα καμπυλότητας και έπειτα τη διαθλαστική ισχύ. Εκτιμά τα παραπάνω λαμβάνοντας μια ψηφιακή εικόνα των αντανάκλασεων και στη συνέχεια το λογισμικό του τοπογράφου βρίσκει τα όρια των δακτυλίων των αντανάκλασεων. Οι τοπογράφοι κατηγοριοποιούνται σε χειρός και σε επιτραπέζιους. Επίσης καλό θα είναι να θυμάται κανείς ότι κάθε τοπογράφος έχει το δικό του αλγόριθμο λογισμικού και ακόμα ότι κανένας τοπογράφος δεν μπορεί να θεωρηθεί τέλειος.

(Κατσούλος, Ασημέλλης, 2008)



Εικόνα 7 Τοπογράφος χειρός



Εικόνα 8 Τοπογράφος αυτόματος

Ναι μεν κάθε τοπογράφος έχει το δικό του λογισμικό παρακάτω θα παρατεθεί όμως ένα τυπικό λογισμικό που λίγο πολύ κάθε τοπογράφος έχει:

1. Κατασκευή εφαπτομετρικών και αξονικών καμπυλομετρικών χαρτών
2. Υπολογισμός κερατοειδικού αστιγματισμού σε διάφορες ζώνες του κερατοειδούς
3. Υπολογισμός της ασφαιρικότητας ή της εκκεντρότητας στις ζώνες του κερατοειδούς
4. Υπολογισμός του χάρτη ανύψωσης
5. Υπολογισμός του κερατοειδικού μετώπου κύματος και των εκτροπών χαμηλής και υψηλής τάξης
6. Προσομοίωση εφαρμογής σκληρών αεροδιαπερατών φακών επαφής
7. Απόδοση καμπυλομετρικών και υψομετρικών χαρτών εμπρόσθιας και οπίσθιας επιφάνειας του κερατοειδούς
8. Παραγωγή παχυμετρικών χαρτών
9. Απόδοση δισδιάστατων και τρισδιάστατων εικόνων του πρόσθιου θαλάμου
10. Απεικόνιση τομών του κερατοειδούς (Κατσούλος, Ασημέλλης, 2008)

### 3.ΚΕΦΑΛΑΙΟ

## ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΕΙΔΙΚΩΝ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΤΟΥ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΗ

### 3.1 Το πρώτο μικροσκόπιο

Ένα πολύ παλιό μικροσκόπιο βρίσκεται στο μουσείο Middelburg κατά σκευασμένο το 1590-1595, με πιθανό κατασκευαστή τον Zacharias Janssen και του πατέρα του Hans. Πρόκειται για ένα αξιόπιστο όργανο αποτελούμενο από δύο συρόμενους σωλήνες η οποίοι προέρχονται από ένα τρίτο εξωτερικό σωλήνα.



**Εικόνα 9 Μικροσκόπιο του 17ο και 18ο αιώνα**

Στα άκρα των σωλήνων είναι τοποθετημένοι οι φακοί, με έναν αμφίκυρτο στον προσοφθάλμιο και έναν επιπεδόκυρτο στον αντικειμενικό. Ωστόσο δεν διαθέτει βάση και κατά συνέπεια επρόκειτο για ένα χειροκίνητο όργανο.

Αρχικά το μικροσκόπιο είχε χρησιμοποιηθεί από τον Γαλιλαίο χωρίς όμως ο ίδιος να δείχνει ενδιαφέρον για βιολογικές έρευνες. Παρόλα αυτά με την χρήση ήρθε στην επιφάνεια ένας <μικρόκοσμος> όπου παρατηρήθηκαν βακτήρια μικροοργανισμοί, πρωτόζωα κτλ.



#### Εικόνα 10 Γαλιλαίος

Εν συνεχεία θέση λαμβάνει ο Ρόμπερτ Χουκ ο οποίος παρατήρησε πρώτος στο φελλό τοιχώματα που περικλείουν κενούς χώρους και αναφέρεται σε αυτά ως Κύτταρα, ενώ αργότερα παρατήρησε την ίδια κυτταρική δομή και στα φυτά.(

<http://www.tovima.gr/science/article/?aid=311400> ,

<http://blogs.sch.gr/vasileiod/files/2013/05/37.-MICROSCOPY.pdf> )



**Εικόνα 11** Ρόμπερτ Χουκ

### **3.2 Τι είναι μικροσκόπιο και από τι αποτελείται:**

Μικροσκόπιο είναι το οπτικό όργανο που επιτρέπει την μεγέθυνση και την παρατήρηση μικροσκοπικών αντικειμένων., που δεν μπορούν να παρατηρηθούν με γυμνό μάτι. Ένα απλό μικροσκόπιο αποτελείται από τρία βασικά συστήματα , το οπτικό , το φωτιστικό και το μηχανικό.



**Εικόνα 12** Ένα από τα πρώτα μικροσκόπια



Το πρώτο σύνθετο μικροσκόπιο ανακαλύφθηκε από τον Χανς Γιάνσεν, Ζακαρίας Γιάνσενκαι, και Χάνς Λιπερσεί. Το 1665 ο Ρόμπερτ Χούκ χρησιμοποιώντας ένα μικροσκόπιο δικής του κατασκευής απεικόνισε για πρώτη φορά κύτταρα κάτω από το μικροσκόπιο. Έτσι με την βοήθεια διαφόρων επιστημόνων τελειοποιήθηκε το μικροσκόπιο στα τέλη του 19ο αιώνα.

**Ένα σύνθετο μικροσκόπιο αποτελείται ονομαστικά από:**

- Φωτισμός
- Βίδες για εστίαση του φωτός
- Φίλτρα
- Διάφραγμα
- Συμπυκνωτής δέσμης
- Βάση
- Αντικειμενικός φακός
- Υψομετρική ρύθμιση του συμπυκνωτή δέσμης
- Μηχανικός έλεγχος της βάσης



- Κοινός έλεγχος εστίασης
- Λεπτός έλεγχος εστίασης
- Προσοφθάλμιοι φακοί

Αναλυτικά αποτελείται από το σταθερό τμήμα που ονομάζεται βάση όπου πάνω σε αυτή είναι προσαρτημένο το οπτικό μέρος καθώς και άλλες διατάξεις όπως η αντικειμενοφόρος πλάκα. Επίσης αποτελείται από ένα σύνολο μηχανισμών κίνησης για εστίαση και η συσκευή φωτισμού.

Φως διέρχεται από το σύστημα φωτισμού στο συναγωγό σύστημα , ένα σύστημα φακών που εξασφαλίζει τον ομοιόμορφο φωτισμό του παρασκευάσματος. Ωστόσο με την βοήθεια διαφράγματος ρυθμίζεται η ένταση της δέσμης. Το σύστημα των δύο φακών που επιτρέπουν τον σχηματισμό ειδώλου του αντικειμένου αποτελείται από:

A. Αντικειμενικό φακό που βρίσκεται κοντά στο προς παρατήρηση αντικείμενο και μας παρέχει είδωλο πραγματικό, αντεστραμμένο και μεγεθυμένο κοντά στο εστιακό επίπεδο του προσοφθάλμιου φακού.

B. Προσοφθάλμιο που βρίσκεται κοντά στο μάτι του παρατηρητή και λειτουργεί ως ένας φακός μεγεθύνσεως, δίνοντας ένα φανταστικό είδωλο που παραμένει αντεστραμμένο.

Οι αντικειμενικοί φακοί είναι τοποθετημένοι σε υποδοχή με δυνατότητα περιστροφής έτσι ώστε να γίνεται ομαλά η αντικατάστασή τους κατά την διάρκεια παρατήρησης και να αυξομειώνεται η μεγέθυνση.

Ωστόσο η τελική μεγέθυνση του ειδώλου

Το οπτικό μικροσκόπιο είναι το πρώτο εργαλείο το οποίο αποκάλυψε πληροφορίες πέρα από αυτές που είναι ορατές με γυμνό μάτι, καθιστώντας το σε όλους τους τομείς της επιστήμης ως < δώρο της φυσικής >

Οπτικά μικροσκόπια αποτελούμενα από διαφόρων ειδών φακούς για μεγέθυνση αναπτύσσοντας ουσιαστικά τους μεγεθυντικούς φακούς, έχοντας μέγιστη μεγέθυνση έως X1600 φορές. Η μεγέθυνση πραγματοποιούνται με την χρήση ενός ειδικού ελαίου , το κερδέλαιο ( συγκεκριμένο δ.δ ) που βρισκόταν ανάμεσα στο φακό και στην πλάκα αντικειμένου .

Ένα μικροσκόπιο μπορεί να είναι μονόφθαλμο, δίοφθαλμο ή τριόφθαλμο



**Εικόνα 13 Οπτικό μικροσκόπιο**

Τον 20ο αιώνα έκαναν την εμφάνιση τους τα ηλεκτρονικά μικροσκόπια και αργότερα μικροσκόπια με την ικανότητα οπτικοποίησης του βάθους γνωστά ως μικροσκόπια ηλεκτρονικής σάρωσης. (

[http://www.uoi.gr/services/lab-net/net-web/Confocal\\_gr.pdf](http://www.uoi.gr/services/lab-net/net-web/Confocal_gr.pdf) ,

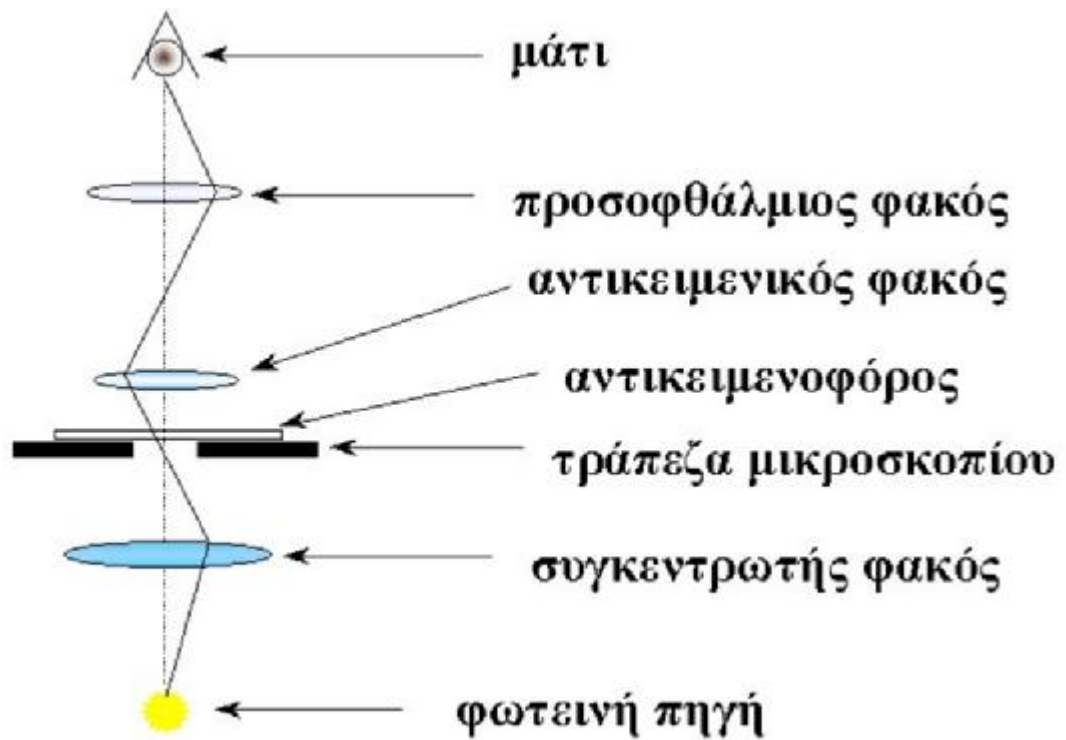
<http://www.pasteur.gr/> )

### 3.3 Είδη μικροσκοπίου:

Με βάση την ακτινοβολία που χρησιμοποιείται στο μικροσκόπιο και χαρακτηρίζεται από διάφορα μήκη κύματος διαχωρίζονται σε

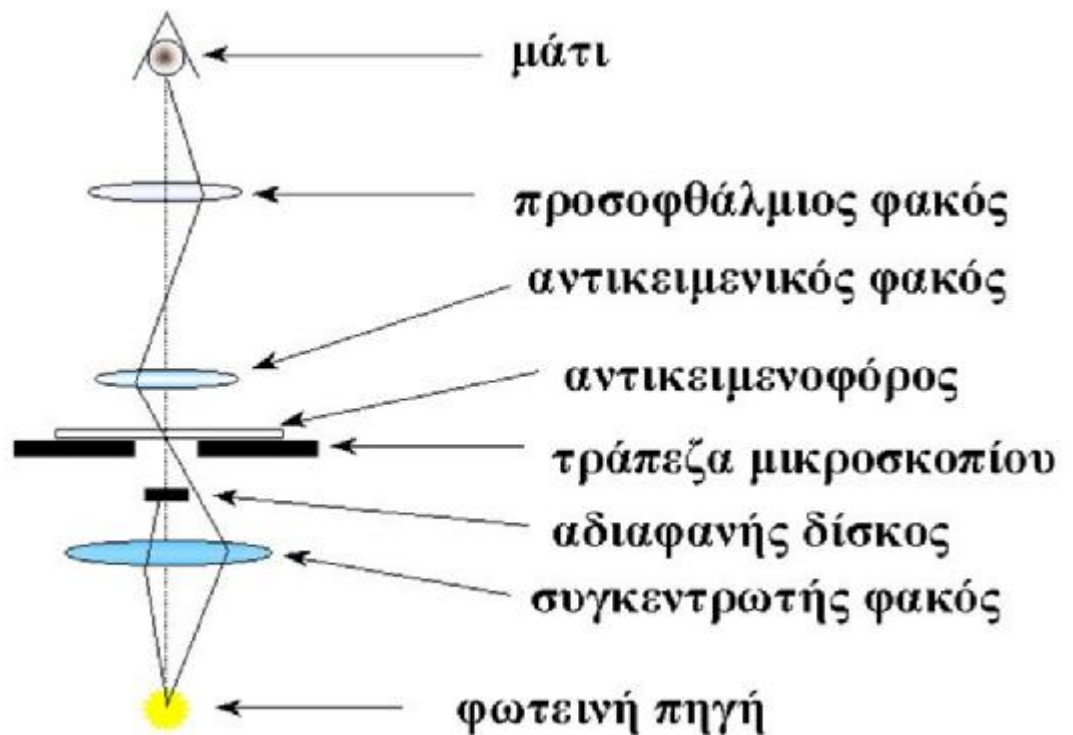
- Φωτεινού πεδίου
- Σκοτεινού πεδίου
- Στερεοσκόπιο
- Πολωτικό
- Αντίθετης φάσης
- Μικροσκόπιο αντίθετης διαφορικής συμβολής
- Μικροσκόπιο φθορισμού
- Μικροφασματομετρικό
- Φασματοσκοπία συσχετιζόμενου φθορισμού
- Συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με ακτίνες laser

I. Φωτεινού πεδίου : Είναι ο πιο απλός τρόπος μικροσκοπίας όπου ο φωτισμός φωτίζει όλο το δείγμα κάνοντας το πεδίο φωτεινό



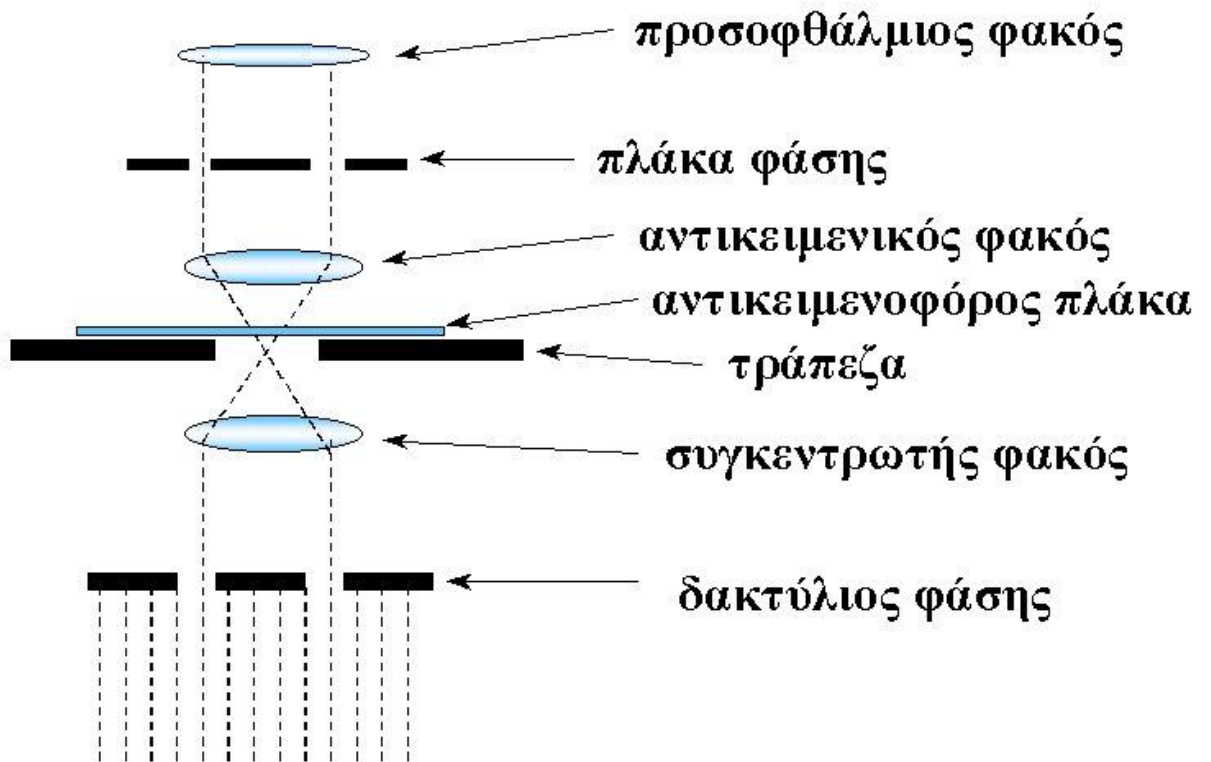
Εικόνα 14 Μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου

- II. Σκοτεινού πεδίου: Φώς Που βρίσκεται έξω από το πεδίο και δεν φτάνει στον αντικειμενικό φακό και έτσι το πεδίο είναι σκοτεινό. Φώς περνάει από το δείγμα αλλάζοντας κατεύθυνση φτάνοντας στον αντικειμενικό φακό. Έτσι το δείγμα είναι φωτεινό σε σκοτεινό φόντο.



Εικόνα 15 Μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου

- III. Πολωτικό: Κατά την μικροσκοπία πολωμένου φωτός το δείγμα τοποθετείται ανάμεσα σε δύο πολωτές. Σε κάθετους πολωτές μόνο τα δείγματα που περιστρέφουν την πόλωση θα φτάσουν στον ανιχνευτή. Έτσι ορατό γίνεται μόνο το φως που προέρχεται από υλικά διπλής διάθλασης ή από τις άκρες του δείγματος.
- IV. Αντίθετης φάσης: Η μικροσκοπία αντίθετης φάσης ήταν η πρώτη μέθοδος η οποία απεικόνισε ζωντανά- σε δράση κύτταρα. Εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι το φως που διέρχεται από το δείγμα ταξιδεύει πιο αργά από τις άλλες ακτίνες φωτός. Τέλος μας παρέχει μεγαλύτερη αντίθεση σε διαφανή και άχρωμα αντικείμενα. Η μικροσκοπία αντίθετης φάσης αξιοποιεί τα φαινόμενα της διάθλασης και επιβάρυνσης του διερχόμενου φωτός για την δημιουργία αντίθεσης.



**Εικόνα 16 Μικροσκόπιο αντίθετης φάσης**

- V. Μικροσκόπιο αντίθετης διαφορικής συμβολής: Μετατρέπει τις ΔΙΑΦΟΡΕΣ φάσης διαμέσου του δείγματος σε διάφορες εντάσεις του φωτός. Έτσι η εικόνα μοιάζει με 3d ενώ μπορεί να είναι και έγχρωμη με κάποιες μετατροπές.
- VI. Μικροσκόπιο φθορισμού: Πρόκειται για μια πολύ ευαίσθητη διαδικασία , απλή στην εφαρμογή με εξαιρετικά εξελιγμένους δείκτες φθορισμού. Το φως μέσο του συγκεντρωτικού φακού περνά από το φίλτρο διέγερσης. Έπειτα το διχροϊκό κάτοπτρο κατευθύνει το φως διέγερσης στο δείγμα. Το κάτοπτρο αυτό αφήνει μόνο το φθορισμό να εισέλθει.
- VII. Στερεοσκόπιο: Είναι ικανό να δώσει την εντύπωση ανάγλυφου. Όργανο που επιτρέπει την μεταβολή της απόστασης μεταξύ των δύο προσοφθάλμιων παρέχοντας την δυνατότητα αντίληψης δύο διαφορετικών όψεων του ίδιου αντικειμένου , δηλαδή , στερεοσκοπική όραση. (<http://livasperiklis.files.wordpress.com>,

<http://www.eng.ucy.ac.cy>,  
<http://www.biology.uoc.gr>, )

<http://physics.teiath.gr>,

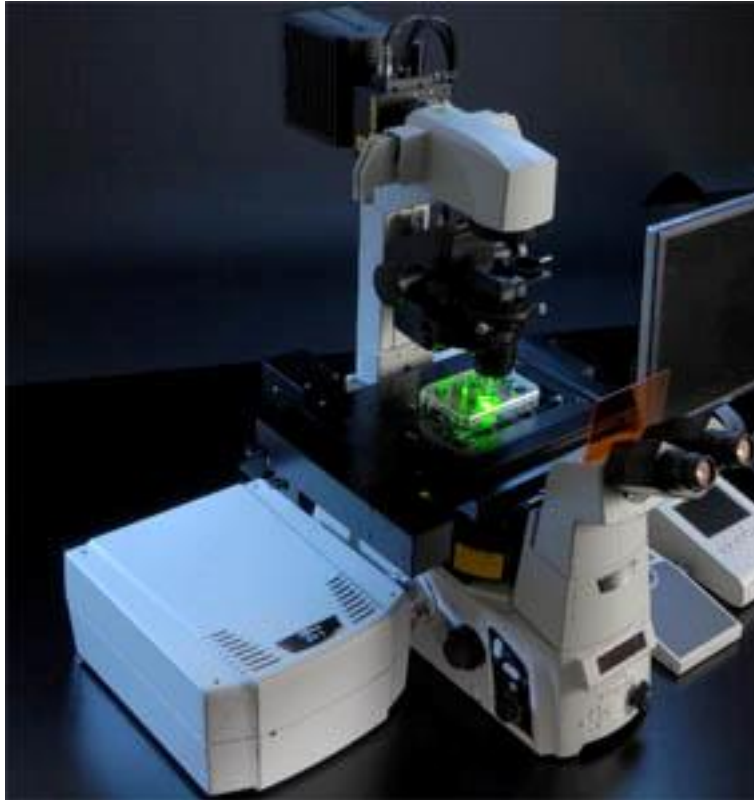


**Εικόνα 17 Στερεοσκόπιο**

### **3.4 Συνεστιακό μικροσκόπιο:**

Το όργανο αυτό έχει την δυνατότητα εστίασης σε ένα επίπεδο αγνοώντας το φως που διαθλάται από τα επίπεδα εκτός εστίασης. Κατά συνέπεια η συνεστιακή μικροσκοπία απορρίπτει σήματα από κοντινά αντικείμενα πάνω ή κάτω από το επίπεδο εστίασης. Μας δίνεται λοιπόν η δυνατότητα παρατήρησης οπτικών τομών του παρασκευάσματος.

Αναλυτικότερα πρόκειται για μια τεχνική οπτικής απεικόνισης που χρησιμοποιείται για την αύξηση της οπτικής αντίληψης και ανάλυσης μιας μικρογραφίας. Ακόμα χρησιμοποιώντας το σημείο φωτισμού και μια χωρική οπή εξαλείφει το out-of εστίασης σε δείγματα παχύτερα από το εστιακό επίπεδο. (<http://www.biology.uoc.gr>, <http://el.wikipedia.org>, )



**Εικόνα 18 Συνεστιακό μικροσκόπιο**

### **3.5 Αρχή λειτουργίας συνεστιακού μικροσκοπίου:**

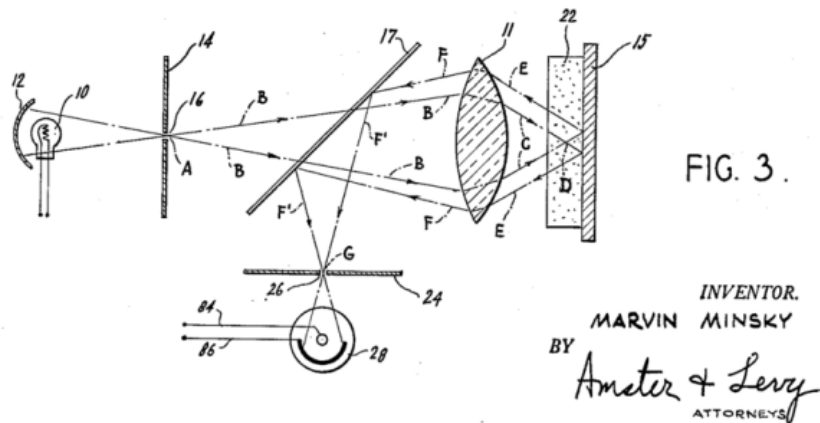
Η αρχή λειτουργίας του συνεστιακού μικροσκοπίου πρωτοπεριγράφη από τον Minski το 1961 παρουσιάζοντας μέχρι και σήμερα σταδιακή εξέλιξη.

Η συνεστιακή μικροσκοπία βασίζεται στο ότι ο φωτισμός αλλά και η παρατήρηση είναι περιορισμένα σε ένα σημείο του παρασκευάσματος, ενώ έχουν τοποθετηθεί διαφράγματα ( pinhole ) στους οπτικούς άξονες του αντικειμενικού αλλά και του συγκεντρωτικού φακού.

Επιτυγχάνεται λοιπόν το ότι το φως που προέρχεται έξω από την περιοχή εστίασης δεν ανιχνεύεται. Φως εκπέμπεται από το επίπεδο εστίασης περνά μέσα από την οπή του διαφράγματος του ανιχνευτή δημιουργώντας μια σημειακή εικόνα στον φωτοπολλαπλασιαστή. Στη συνέχεια ο φωτοπολλαπλασιαστής με



την σειρά του μετατρέπει τα φωτόνια σε ηλεκτρόνια . Τέλος το σήμα ψηφιοποιείται και αποστέλλεται στον ψηφιακό αναλυτή. Σε περίπτωση αδύναμου σήματος μπορεί να ενισχυθεί με ρύθμιση του δυναμικού στον σωλήνα, ενώ είναι δυνατόν να κοπεί σήμα με ειδικό ( background ) ορίζοντας το κατώτατο επίπεδο.



Εικόνα 19 Αρχή λειτουργίας του Minsky

Άρα με το σύστημα του συνεστιακού μικροσκοπίου έχουμε τρία συνεστιακά σημεία.

- I. Μια οπή που επιτρέπει την είσοδο στην πηγή φωτισμού
- II. Ένα επίπεδο εστίασης του φωτός πάνω στο δείγμα
- III. Μια οπή στο επίπεδο ανίχνευσης της εικόνας

Τα τρία αυτά σημεία- δεδομένα θα πρέπει να είναι οπτικά συζυγή και ευθυγραμμισμένα με ακρίβεια το ένα προς το άλλο για τον σχηματισμό της εικόνας. Έτσι λοιπόν προκύπτει και η έννοια < συνεστιακό > .

Κατά συνέπεια ο φωτισμός εκτός εστίασης δεν περνά στον ανιχνευτή άρα δεν συμβάλει και στην τελική εικόνα. Συμπερασματικά η συνεστιακή μικροσκοπία μας δίνει την δυνατότητα απεικόνισης εικόνας μεγάλης ευκρίνειας (sharp ), ενώ

η συνολική εικόνα του δείγματος παράγεται από της οπτικές τομές. Επιτρέπεται λοιπόν η παρατήρηση παχιών δειγμάτων και ταυτόχρονα η μεγαλύτερη ευκρίνεια χωρίς παραβολή του εκτός εστίασης φθορισμού. Σε ένα κοινό απλό μικροσκόπιο ο σχηματισμός της εικόνας είναι αυτόματος.

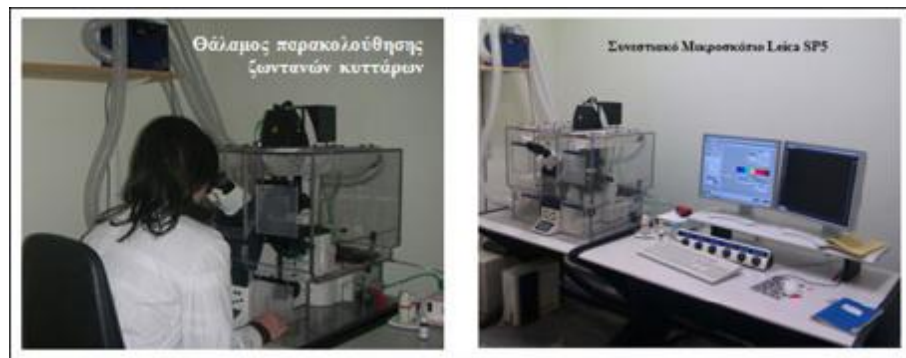
Αντίθετα κατά την συνεστιακή μικροσκοπία ο φωτισμός κατευθύνεται πάνω στο δείγμα σημειακά μέσω ενός διχρικού καθρέφτη σε έναν σαρωτή. Έτσι τόσο ο φωτισμός όσο και η ανίχνευση εξαρτώνται από μια διαδικασία σάρωσης. Η πληροφορία αυτή καθίσταται χρήσιμη για ένα νέο χρήστη στην προσπάθεια του να πάρει την πρώτη εικόνα. (<http://livasperiklis.files.wordpress.com>, <http://www.pasteur.gr> )

### **3.6 Τρόπος λειτουργίας συνεστιακού μικροσκοπίου:**

Το πιο σύγχρονο οπτικό μικροσκόπιο είναι το αποκαλούμενο συνεστιακό, το οποίο χρησιμοποιεί μια ακτίνα λέιζερ για την ανάλυση του δείγματος. Μας δίνει την δυνατότητα οπτικής διείσδυσης στο εσωτερικό του δείγματος σε διάφορα βάθη. Η ακτίνα λέιζερ εστιάζει συγκεκριμένα σε ένα σημείο μέσα στο κύτταρο δημιουργώντας τρισδιάστατη εικόνα ανασύστασης της δομής που μελετάται, ενώ ταυτόχρονα διοχετεύεται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή προκειμένου να προβληθεί.

Ο φωτισμός και η παρατήρηση είναι εστιασμένα σε ένα σημείο του παρασκευάσματος. Αυτό γίνεται με την τοποθέτηση ενός πολύ μικρού διαφράγματος, πιθανότατα μικρότερο από 10  $\mu\text{m}$ , στους οπτικούς άξονες των δύο φακών, δηλαδή, του αντικειμενικού και του συγκεντρωτικού φακού. Με σάρωση όλων των πεδίων του μικροσκοπίου σχηματίζεται η εικόνα.

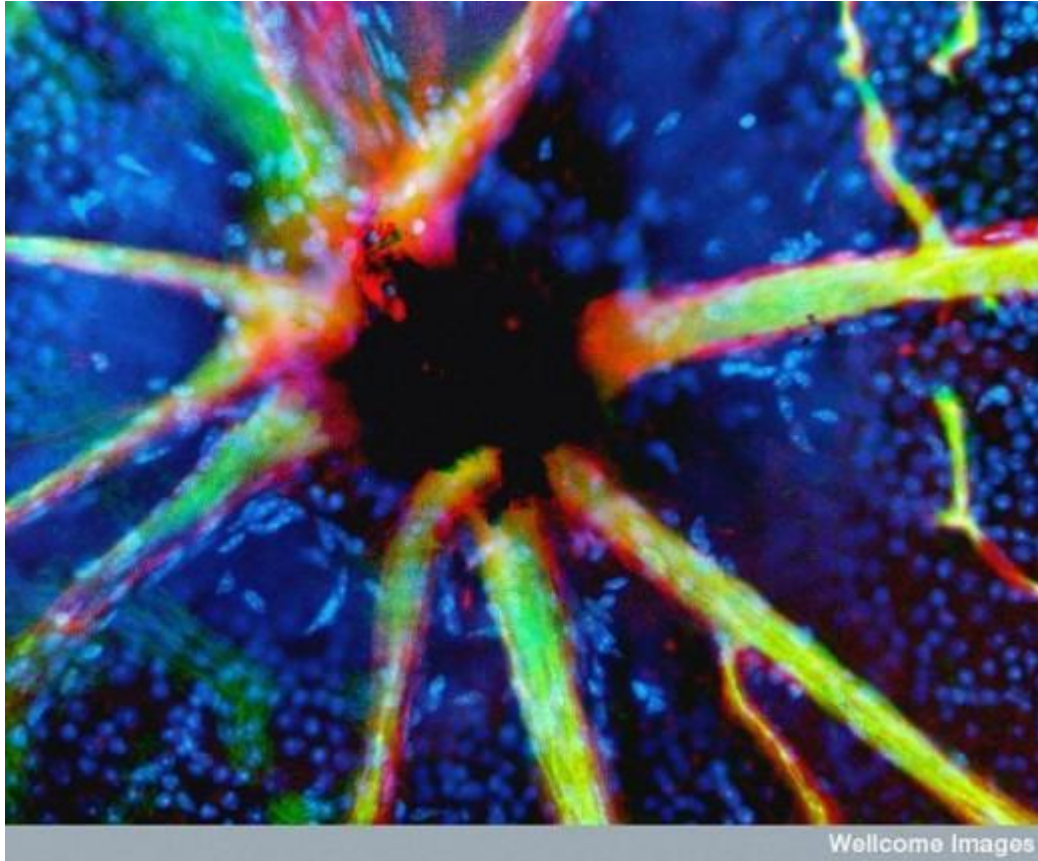
Αναλυτικότερα το παρασκεύασμα παρατηρείται με φώς ορατού μήκους κύματος ή με υπεριώδες . Έπειτα επιλέγεται η ακτίνα λέιζερ Άργους με χρήσιμα μέγιστα στα 488 και 514 nm έτσι ώστε να συμπίπτουν με το μήκος κύματος που είναι ικανό να διεγείρει στο μέγιστο τη φλουοροσκεΐνη και την ροδαμίνη. Έχουμε όμως και την δυνατότητα επιλογής ακτίνας λέιζερ ηλίου – νέου με μέγιστο στα 633 nm για άλλα φθοριοχρώματα ή και τα δύο συγχρόνως. Η παρατήρηση γίνεται στην οθόνη μικροϋπολογιστή του μικροσκοπίου γιατί οι εικόνες δεν είναι άμεσα ορατές και φυσικά μπορούν να αποθηκευτούν σε σκληρό δίσκο ή να τυπωθούν ή να φωτογραφηθούν με συμβατικούς τρόπους.



**Εικόνα 20 Παρατήρηση με συνεστιακό μικροσκόπιο**

Τέλος το συνεστιακό μικροσκόπιο λειτουργεί όπως και ο αξονικός τοπογράφος για διαγνωστικούς σκοπούς τέμνοντας ηλεκτρονικά και διαδοχικά το σώμα του ανθρώπου. Διαφέρουν ωστόσο στο γεγονός ότι το συνεστιακό μικροσκόπιο χρησιμοποιεί μικρότερα δείγματα , ακόμα και ένα μόνο κύτταρο, γεγονός που το καθιστά ένα άκρως πολύτιμο εργαλείο στην κάλυψη αναγκών στην καθημερινότητα της ιατρικής. Έτσι προσαρμόζοντας διαφορετικές τεχνικές με ειδική προετοιμασία είμαστε στην θέση να συλλέξουμε ακόμη και ειδικευμένα αποτελέσματα.

Ας δώσουμε ένα παράδειγμα όπου στο οπτικό μικροσκόπιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της ανοσοιστοχημείας με την οποία είναι δυνατόν να εντοπιστούν συγκεκριμένα στοιχεία του κυττάρου σε μοριακό επίπεδο.



Εικόνα 21 Χρωματισμένα αμφιβληστροειδικά αιμοφόρα αγγεία φαίνονται να αναδύονται από το χρωματισμένο μαύρο οπτικό δίσκο

(<http://www.pasteur.gr/> , <http://www.lifo.gr/> , <http://www.biology.uoc.gr/> )

### 3.7 Μέρη συνεστιακού μικροσκοπίου:

Η συνεστιακή μικροσκοπία περιλαμβάνει:

- I. Ανεστραμμένο μικροσκόπιο ανοφθορισμού αποτελούμενο από τους κατάλληλους φακούς και εξαρτήματα.
- II. Μονάδα συνεστιακής σάρωσης λέιζερ: εξειδικευμένο τμήμα του συστήματος αποτελούμενο από τα βασικά μέρη.

III. μονάδα τεκμηρίωσης αποτελούμενη από υψηλής ποιότητας εκτυπωτή

IV. μονάδα ελέγχου αποτελούμενη από τον ηλεκτρονικό υπολογιστή και τα κατάλληλα προγράμματα για την καλύτερη ανάλυση

Πλεονεκτήματα του συνεστιακού μικροσκοπίου:

Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα τούτου του μικροσκοπίου είναι ότι η μελέτη του δείγματος δεν προϋποθέτει αναγκαία και την καταστροφή του.

Βελτιώνει την διακριτική ικανότητα φτάνοντας στο σημείο που πλησιάζει και το ΗΜΣ

Ενισχύεται η αντίθεση ( contrast ) του παρασκευάσματος και αυτό γιατί ελαττώνονται σημαντικά τα μηνύματα από τα μη εστιασμένα σημεία του παρασκευάσματος. Επομένως χάρις σε αυτό το χαρακτηριστικό επιτρέπετε η σάρωση του παρασκευάσματος όχι μόνο προς τους άξονες  $x$  &  $y$  αλλά και ως προς τον  $z$  . Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την λήψη καλά εστιασμένων τρισδιάστατων εικόνων που παρατηρούνται μέσω μικροϋπολογιστή με ειδικά προγράμματα ψηφιοποίησης και ανακατασκευής της εικόνας.

Το συνεστιακό μικροσκόπιο μας παρέχει οπτικές τομές με κόστος όμως την μεγάλη μείωση του συνολικού ανιχνευόμενου όγκου.

Μπορεί να παράσχει εντυπωσιακές εικόνες με την χρήση ειδικών χρωστικών όπου μας δίνεται η δυνατότητα καταχώρισης διαφορετικού χρώματος στις διάφορες δομές ενός κυττάρου. Έτσι μπορούν να αποτυπωθούν ακόμα και τα νήματα που κινούν τα χρωμοσώματα.



Εικόνα 22 Αιμοφόρα αγγεία στον χοριοειδή χιτώνα του οφθαλμού

(<http://physics.teiath.gr/>, <http://invenio.lib.auth.gr/>, <http://www.pasteur.gr/>)

### 3.8 Τύποι συνεστιακής μικροσκοπίας.

- I. Programmable μικροσκόπια array (PAM) : Επιπρόσθετα χρησιμοποιούν ένα ηλεκτρονικά ελεγχόμενο ηλεκτρονικό διαμορφωτή φωτός ( SLM ). Η SLM περιέχει micro electromechanical καθρέφτες ή υγρών κρυστάλλων συστατικά. Είναι μια συσκευή με μια σειρά από pixel που μπορεί να ρυθμιστή ηλεκτρονικά.
- II. Spinning δίσκο ( nipkow δίσκο ) συνεστιακής μικροσκοπίας: χρησιμοποιούν μια σειρά από κινούμενες τρυπούλες για σάρωση του φωτός. Ξέροντας ότι μια σειρά μικρών οπών σαρώνει μια περιοχή

παράλληλα, κάθε οπή αιωρείται πάνω από μια συγκεκριμένη περιοχή για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα . αποτελεί το πιο συχνά προτεινόμενο σύστημα για την απεικόνιση ζωντανών κυττάρων και οργανισμών.

- III. Συνεστιακό μικροσκόπιο σαρώσεις με λέιζερ: Αποτελούμενο από πολλαπλούς καθρέφτες έτσι ώστε να σαρώσει το λέιζερ το σύνολο του δείγματος.
- IV. Microlens ενισχυμένη ή συνεστιακή μικροσκοπία : μοιάζει με το ομοεστιακό μικροσκόπιο αποτελούμενο όμως από ένα δεύτερο περιστρεφόμενο δίσκο που εμπεριέχει μικρούς φακούς. Οι φακοί αυτοί δρουν για την συλλογή του φωτός και εστίασης κάθε οπής αυξάνοντας σημαντικά την ποσότητα του φωτός που προορίζεται για κάθε οπή και ταυτόχρονα μειώνοντας την ποσότητα του φωτός που μπορεί να εγκλωβιστεί από τον περιστρεφόμενο δίσκο.

### **3.9 Μικροσκόπιο Raman**

#### **Τι είναι η συνεστιακή μικροσκοπία Raman ?**

Η συνεστιακή μικροσκοπία Raman ( ο Raman ανακάλυψε τις ιδιότητες σκέδασης σε υγρά ) στηρίζεται στις αρχές της ανελαστικής σκέδασης φωτονίων σε αντίθεση με την φασματοσκοπία υπέρυθρου που βασίζεται στο φαινόμενο του συντονισμού. Η μικροσκοπία Raman είναι ένα ζευγάρι δηλαδή ένα φασματόμετρο Raman και ένα οπτικό μικροσκόπιο., που επιτρέπουν την υψηλή μεγέθυνση και οπτικοποίηση ενός δείγματος και ανάλυση Raman με μία μικροσκοπική κηλίδα λέιζερ.

Προσθέτοντας όμως μόνο ένα μικροσκόπιο σε φασματόμετρο Raman δεν παρέχεται ελεγχόμενος όγκος δειγματοληψίας για αυτό απαιτείται ένα

χωρικό φίλτρο. Έχει την ικανότητα να φιλτράρει τον όγκο και να αναλύει το δείγμα πλευρικά και σε βάθος. Ωστόσο είναι καλά τεκμηριωμένο ότι χρησιμοποιώντας ένα πραγματικό συνεστιακό μικροσκόπιο Raman είναι δυνατόν να αναλυθούν μεμονωμένα σωματίδια ή στρώματα σε διαστάσεις κάτω από 1 μm. Έπειτα η σχεδίαση από ένα τέτοιο μικροσκόπιο κυρίως καθορίζεται από το μήκος κύματος λέιζερ και την ποιότητα της δέσμης λέιζερ.

### **Πλεονεκτήματα συνεστιακής μικροσκοπίας Raman:**

Ωστόσο έχει αποδειχτεί ότι είναι μία εξαιρετικά δημοφιλής αναλυτική τεχνική με ένα σύνολο πλεονεκτημάτων:

1. Δεν απαιτείται προετοιμασία του δείγματος.
2. Μεγάλη χωρική ανάλυση
3. Καθαρή ποιότητα εικόνας
4. Εξαιρετική χημική διαφοροποίηση
5. Ικανότητα να εκτελεί 3D χαρτογράφηση από ένα όγκο δειγμάτων.

Καθιστάτε τεχνική πολύ χρήσιμη σε πολλούς τομείς της φυσικής έχοντας μεγάλες προοπτικές για μακροπρόθεσμη ανάπτυξη.

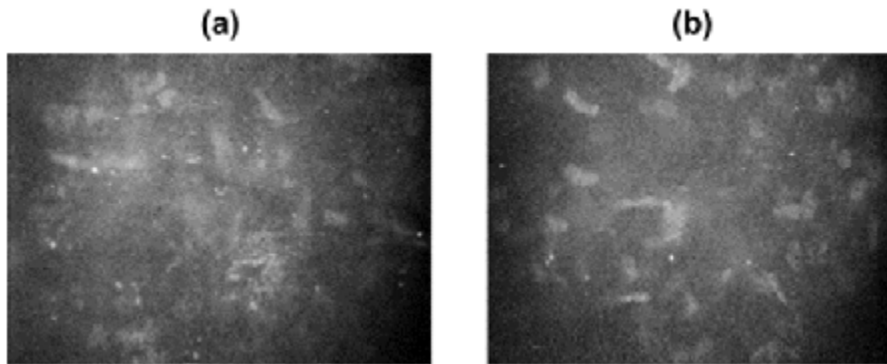
(<http://www.eie.gr>, <http://www.horiba.com/>, )

### **3.10 Συνεστιακή μικροσκοπία και οφθαλμός:**

Η συνεστιακή μικροσκοπία είναι μία κλινική τεχνική η οποία αποσκοπεί στην μελέτη της κυτταρικής δομής του κερατοειδούς δίνοντας την δυνατότητα en-vivo απεικόνισης του. Παρέχει τεράστια κλινική δυνατότητα ερευνώντας πολυάριθμες παθήσεις του κερατοειδούς όπως μολυσματικές δυστροφίες του κερατοειδούς εκτασίες, διεισδυτική κερατίτιδα καθώς και αλλαγές του κερατοειδούς για την προ και



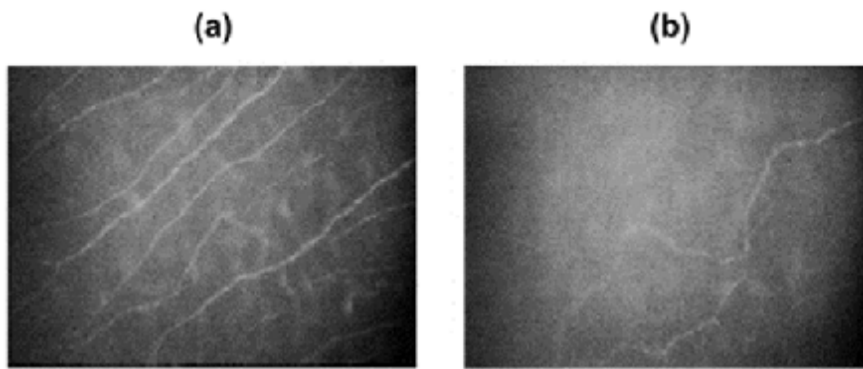
μετεγχειρητική αξιολόγηση σε επεμβάσεις( PRK και LASIK ). Πιο πρόσφατα έχει χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο για περιφερική νευρική βλάβη σε μια ποικιλία από περιφερικές νευροπάθειες.



**Εικόνα 23**Αριστερά ενδοθήλιο μετά από PRK μιας εβδομάδας - δεξιά ενδοθήλιο μετά από PRK 6 μηνών

Το περύγιο είναι μια συχνή κατάσταση άγνωστης προέλευσης χαρακτηριζόμενη από χρόνια φλεγμονή του επιπεφυκότα. Το συνεστιακό λοιπόν μικροσκόπιο έχει την δυνατότητα να εντόπιση σημαντικές αλλοιώσεις των επιφανειακών επιθηλιακών κυττάρων , πολλά δενδρικά κύτταρα καθώς και την απώλεια των ανοσολογικών και διαρθρωτικών αλλαγών του κερατοειδή.

Με την εξέλιξη του in-vivo συνεστιακού μικροσκοπίου μας δίνεται η δυνατότητα γνώσης για τον κερατοειδή τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Έτσι είμαστε σε θέση να εκλέξουμε ακριβή και επαληθεύσιμη ανάλυση των διαφόρων στρωματικών νεύρων του κερατοειδή. Επιπρόσθετα αξίζει να αναφερθεί ότι η IVCΜ προτείνεται ως μη επεμβατική μέθοδος με ιδιαίτερη ακρίβεια στην διάγνωση και την εκτίμηση της προόδου της διαβητικής νευροπάθειας.



**Εικόνα 24** Αριστερά νεύρα στο στρώμα του Bowman σε υγιές άτομο - δεξιά σε διαβητικό άτομο

Η τρισδιάστατη συνεστιακή μικροσκοπία *in-vivo* επιτρέπει την ανάλυση και απεικόνιση της επιφάνειας του κερατοειδή καθώς και την χωρική διάταξη στα επίπεδα του κυττάρου στο επιθήλιο σε παθολογικές και σε φυσιολογικές καταστάσεις δίνοντας έναυσμα για περαιτέρω ανάπτυξη και μελέτη του κερατοειδή.

Καθώς αναπτύσσεται το συνεστιακό μικροσκόπιο είναι σε θέση να απεικονίσει και να οδηγήσει σε μία καλύτερη και λεπτομερέστερη κατανόηση της κυτταρικής μικροδομής, ενώ ταυτόχρονα επιτρέπει την ποσοτική ανάλυση της απόκρισης στον ανθρώπινο κερατοειδή.

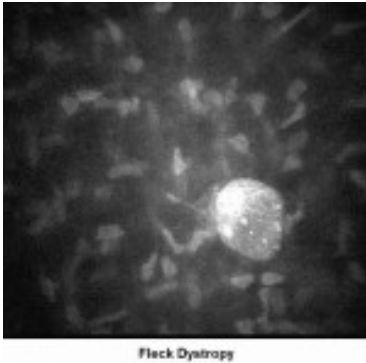
Ωστόσο η *in-vivo* συνεστιακή μικροσκοπία και τομογραφία οπτικής συνοχής καλούνται χρήσιμα εργαλεία για την εκτίμηση της μικροδομής και της διεύθυνσης των χρωματισμένων βλαβών του κερατοειδή.

Το *in-vivo* συνεστιακό μικροσκόπιο (IVCM) αξιολογεί τα μορφολογικά χαρακτηριστικά και τις δυστροφίες του κερατοειδούς σε όλο το πάχος του και έτσι καθιστάτε χρήσιμο στη διάγνωση την εξέλιξη αλλά και στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας της νόσου.

Ακόμα με την *in-vivo* συνεστιακή μικροσκοπία μας δίνεται η δυνατότητα ανίχνευσης της νόσου σε πολύ αρχικά στάδια όσο αφορά τις

αλλαγές στην οφθαλμική επιφάνεια του επιθηλίου, στα κερατοκύτταρα, στους μειβομιανούς αδένες και τα νεύρα του κερατοειδή.

Τέλος το INCM αποδεικνύεται ιδιαίτερα χρήσιμη και επαληθεύσιμη στην εντόπιση της Fleck δυστροφίας του κερατοειδούς δίνοντας εικόνα πιο αξιόπιστη σε σχέση με την σχισμοειδής λυχνία



#### **Εικόνα 25 Fleckδυστροφία**

Το συνεστιακό μικροσκόπιο μας προσφέρει σημαντικές γνώσεις για την καλύτερη κατανόηση του κερατοειδή σε όλα τα επίπεδα παρέχοντας μας εικόνες υψηλής ανάλυσης από όλα τα στρώματα του ζωντανού κερατοειδή. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το συνεστιακό μικροσκόπιο να γίνεται όλο ένα και πιο απαραίτητο αξιόπιστο εργαλείο. Με την βοήθεια του IVCΜ τείνουμε για την ανακάλυψη νέων ανακαλύψεων της παθολογίας του κερατοειδή σε κυτταρικό επίπεδο.

Έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 2008 με σκοπό την αξιολόγηση της μικρομορφολογικής τροποποίησης του κερατοειδή πριν και μετά από θεραπεία με ροβοφλαβίνη UVAέδειξε με την βοήθεια του συνεστιακού μικροσκοπίου την πρόιμη και την όψιμη τροποποίηση της μικροδομής του κερατοειδούς μετά την θεραπεία. Ακόμα ασθενής με προοδευτικό κερατόκωνο υπό την θεραπεία ριβοφλαβίνης UVAέλαβαν μέρος σε θεραπεία όπου παρατηρήθηκαν τα εξής:

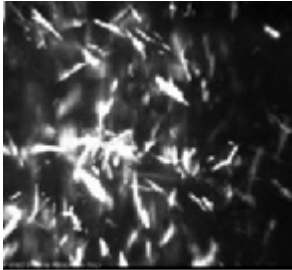
Οι εικόνες που έλαβαν με το συνεστιακό μικροσκόπιο υποδείκνυαν αραίωση των κερατοκυττάρων στο πρόσθιο και ενδιάμεσο στρώμα ,η πυκνότητα αυξήθηκε σταδιακά κατά την μετεγχειρητική περίοδο, ενώ δεν παρατηρήθηκε ενδοθηλιακή βλάβη σε οποιαδήποτε στιγμή.

Η in-vivo συνεστιακή μικροσκοπία παρουσιάζει πρόοδο όλο και περισσότερο και έχει αναδειχθεί κλινικά σε σχέση με τις κληρονομικές παθήσεις του κερατοειδούς, των μολύνσεων του κερατοειδούς, την χρήση φακών επαφής και τα αποτελέσματα μετά από χειρουργική επέμβαση, δίνοντας έμφαση σε ποσοτικά δεδομένα.

Το συνεστιακό μικροσκόπιο παίρνει θέσει και στην μελέτη της νεύρωσης του κερατοειδούς σε ασθενής με ξηροφθαλμία που δεν σχετίζεται με Σ.Δ, χρήση φακών επαφής και LASIK. Η χρήση επέτρεψε την ανίχνευση της παρουσίας νευροπάθειας του κερατοειδούς. Παλαιότερα η εκτίμηση της επανεύρωσης του κερατοειδούς μετά από χειρουργική επέμβαση κατέστη δυνατή μόνο με τεχνικές esthesiometry

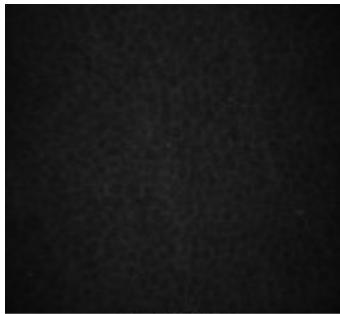
Σε μελέτες που χρησιμοποιείται το συνεστιακό μικροσκόπιο δίνεται η δυνατότητα λεπτομερής ποσοτικής ανάλυσης των νεύρων που έχει ως αποτέλεσμα τη διασαφήνιση της δισδιάστατης αρχιτεκτονικής ενός φυσιολογικού κερατοειδή. Ωστόσο IVCMμελετά την επίδραση του κερατοειδή μετά από χειρουργική επέμβαση όπου παρατηρείται αναγέννηση των νεύρων του κερατοειδή. Έπειτα IVCM έχει προταθεί ως μη επεμβατική μέθοδος με ακρίβεια στην διάγνωση και την εκτίμηση της προόδου της διαβητικής νευροπάθειας.(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://bjo.bmj.com/> )

### **3.11Κερατοειδής στο συνεστιακό μικροσκόπιο:**



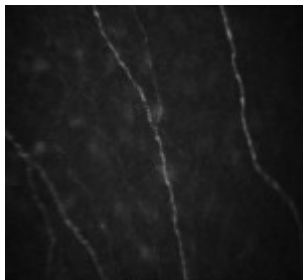
Crystalline Dystrophy

**Εικόνα 26** Κρυσταλλική δυστροφία



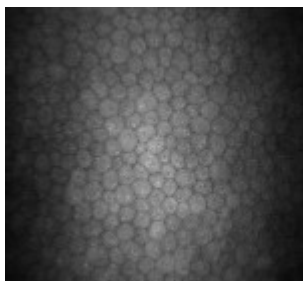
Basal Epithelium

**Εικόνα 27** Βασικό επιθήλιο κερατοειδούς



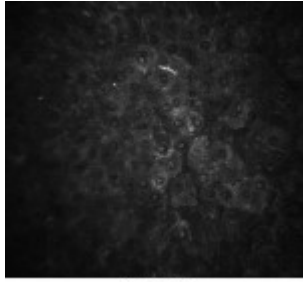
Superficial Nerves

**Εικόνα 28** Νεύρα κερατοειδούς



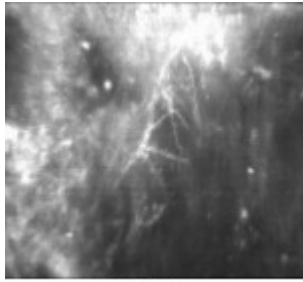
Endothelium

**Εικόνα 29** Ενδοθήλιο κερατοειδούς



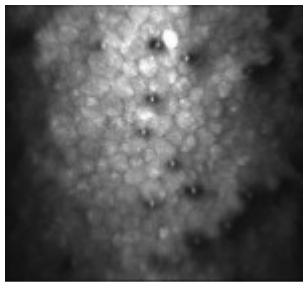
Epithelium

**Εικόνα 30** Επιθήλιο κερατοειδούς



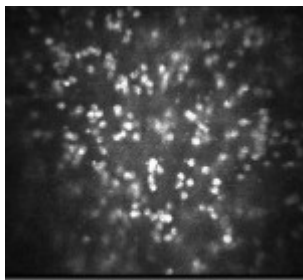
Fusarium

**Εικόνα 31** Fusarium κερατίτιδα



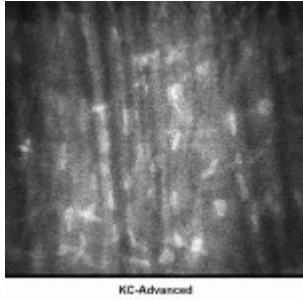
Fuchs'

**Εικόνα 32** Fuchs δυστροφία κερατοειδούς

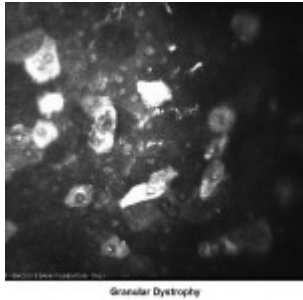


Diffuse Interface Keratitis

**Εικόνα 33** Κερατίτιδα



Εικόνα 34 Κερατόκωνος με ραβδώσεις του Vogt



Εικόνα 35 Κοκκώδης δυστροφία

(<http://link.springer.com>, <http://www.iovs.org>, [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com),  
<http://journals.lww.com>, <http://europepmc.org>,  
<http://onlinelibrary.wiley.com>, <http://bj.o.bmj.com>, <http://usa.nidek.com/> )

## 4.ΚΕΦΑΛΑΙΟ

### 4.1 Τι είναι η οπτική τομογραφία συνοχής?

Είναι μια μη- επεμβατική μέθοδος τρισδιάστατης απεικόνισης της δομής του αμφιβληστροειδούς. Στηρίζεται στην συμβολή οπτικών κυμάτων υπέρυθρου μήκους κύματος τα οποία διεισδύουν και σκεδάζονται στον ιστό του ματιού. Η συμβολή αυτών των σκεδασμένων κυμάτων συλλέγεται από έναν ηλεκτρονικό ανιχνευτή (CCD ) ο οποίος αναπαριστάτε στον αμφιβληστροειδή με ακρίβεια σε τρισδιάστατη αναπαράσταση.

Η Οπτική Τομογραφία – OCT μας παρέχει την δυνατότητα in vivo οπτικής βιοψίας του εξεταζόμενου ιστού. Χρήζει απαραίτητο εργαλείο αφού αποτελεί την κύρια μέθοδο διάγνωσης και συνεχής παρακολούθησης όλων των ασθενειών του αμφιβληστροειδούς όπως η εκφύλιση της ωχράς κηλίδας, η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, η χοριοειδοαμφιβληστροειδοπάθεια, κεντρική ορώδη αμφιβληστροειδοπάθεια, πρόωμη διάγνωση παθήσεων του οπτικού νεύρου όπως το γλαύκωμα αλλά και απεικόνιση του προσθίου ημιμορίου του οφθαλμού

Έτσι μας επιτρέπει την χαρτογράφηση των οπίσθιων δομών του οφθαλμού με κάθε λεπτομέρεια που αντιστοιχεί σε ιστοπαθολογικό παρασκεύασμα. Πραγματοποιεί σάρωση υψηλής διακριτικής ικανότητας της τάξης των 1 – 15μm, ανάλυση η οποία είναι 1 με 2 τάξεις μεγέθους μεγαλύτερη από απεικονιστικές μεθόδους όπως υπερηχογραφία κ.α.

(<http://www.eyecenter.gr/>, <http://www.athensvision.eu/>,  
<http://www.ivo.gr/f>, <http://en.wikipedia.org/> )



## 4.2 Αρχή λειτουργίας:

Για την οπτική τομογραφία συνοχής αναφέρθηκε για πρώτη φορά ο Huang το 1991. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην συμβολομετρία ενώ αρχικά χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό του σημείου της βλάβης σε καλώδια οπτικών ινών.

Η αρχή λειτουργίας του OCT βασίζεται σε λευκό φως ή στην συμβολομετρία χαμηλής συνοχής. Η οπτική εγκατάσταση τυπικά αποτελείται από ένα συμβολόμετρο ( συνήθως Michelson ) με χαμηλή συνοχή και ευρύ εύρος ζώνης στην πηγή φωτός. Η οπτική τομογραφία συνοχής παρομοιάζεται με την Β- υπερηχογραφίας με την διάφορα ότι αντί για ηχητικά κύματα περιλαμβάνει κύματα φωτός ( φάσμα κοντά στο υπέρυθρο και μήκος κύματος περίπου 800 nm ) . Βασίζεται στην μερική σκέδαση και ανάκλασης μιας συνεχούς δέσμης που προβάλλεται επάνω στον αμφιβληστροειδή.

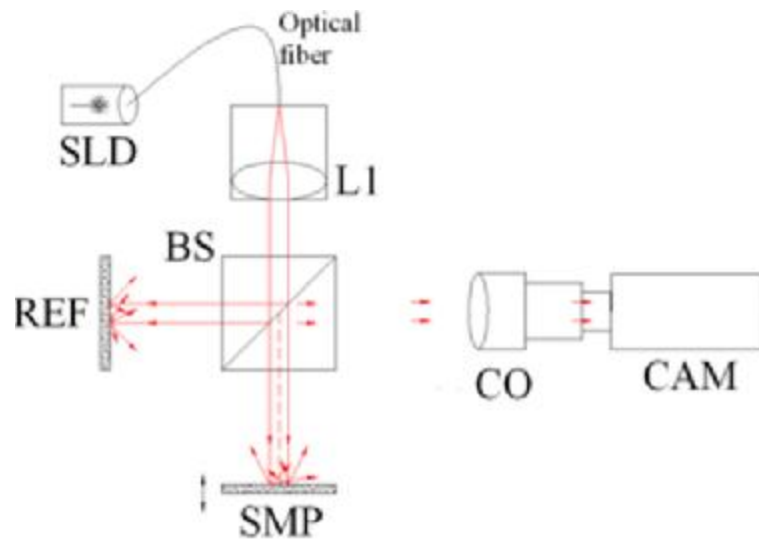
Αρχικά παράγεται δέσμη φωτός από μια φωτοδίοδο, στη συνέχεια η δέσμη αυτή διαχωρίζεται σε δύο άλλες από τον διαχωριστή ακτινοβολίας. Η μια δέσμη ανακλάται από την Υαλοειδοαμφιβληστροειδική επιφάνεια καθώς και από τις διάφορες στοιβάδες του αμφιβληστροειδούς και του χοριοειδούς, ενώ η δεύτερη από ένα κάτοπτρο αναφοράς. Οι δύο πλέον ανακλώμενες δέσμες παίρνουν την ίδια οδό επιστροφής και στο σημείο συνάντησης δημιουργούνται φαινόμενα παρεμβολής, οφειλόμενα στην ασυμφωνία μεταξύ των ανακλώμενων κυμάτων. Η προκύπτουσα δέσμη ανιχνεύεται από έναν ανιχνευτή φωτός. Μετατοπίζοντας το κάτοπτρο μπορούμε να αναλύσουμε τις δομές που βρίσκονται στα διάφορα επίπεδα του αμφιβληστροειδούς και έτσι λαμβάνουμε ένα A-scan. Από τα διάφορα A-

scan προκύπτει ένα B-scan των αμφιβληστροειδών ιστών. Η απεικόνιση γίνεται σε μια κλίμακα από κόκκινο (υψηλή αντανακλαστικότητα ) μέχρι και μπλε χρώμα ( χαμηλή αντανακλαστικότητα ) ή σε μια κλίμακα γκρι χρώματος. Με την σειρά τους τα πιο σύγχρονα OCT επιτρέπουν ταχύτερη απεικόνιση και αυτό γιατί ταυτόχρονα πραγματοποιείται μέτρηση του φωτός που λαμβάνεται από τις διάφορες στιβάδες του αμφιβληστροειδούς.

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται στα πιο σύγχρονα OCT βασίζεται στην εξίσωση του FOYRIER όπου θεωρείται ότι το σήμα συμβολής είναι οπτικό κύμα. Ωστόσο στα τελευταία τύπου OCT δεν απαιτείται μετατόπιση του κατόπτρου που βρίσκεται στην πορεία κατόπτρου αναφοράς.

Έπειτα με το spectral domain-OCT (φασματική οπτική τομογραφία συνοχής ) πραγματοποιείται γρηγορότερη απεικόνιση ( 15.000 – 40.000 A- scan το δευτερόλεπτο ) και υψηλότερη ανάλυση (4-6μικρά σε σχέση με 8-10 ) του time domain-OCT ). Συνδυάζει επιλεκτικά τρεις λέιζερ απεικονίσεις: Υπερύθρων, πράσινης και μπλε ανάκλασης. Αυτό μας παρέχει καθαρότερη εικόνα ενώ μας δίνει την δυνατότητα μέτρηση της απόστασης ανάμεσα στις διάφορες στιβάδες του αμφιβληστροειδούς.

Ακόμα μπορούμε να λάβουμε και 3D απεικόνιση όταν εξεταστούν ταυτόχρονα πολλοί άξονες. Τέλος πρόκειται για μια νέα μέθοδο απεικόνισης της ωχράς κηλίδας και του οπτικού νεύρου, πραγματοποιώντας λεπτομερέστατη χαρτογράφηση των οπίσθιων δομών του οφθαλμού.



Εικόνα 36 Εξαρτήματα OCT

Περιλαμβάνεται από τα εξαρτήματα:

1. SLD : super – φωταύγειας δίοδος
2. L1 : κυρτός φακός
3. BS: διαχωριστής δέσμης
4. CO : αντικειμενικό φακό της κάμερας
5. REF: αναφορά
6. SMP: δείγμα
7. CAM: CMOS-DSP κάμερα

Η κάμερα λειτουργεί ως μια δισδιάστατη διάταξη ανιχνευτών, και με την τεχνική της οπτικής τομογραφίας συνοχής διευκολύνετε η σάρωση σε βάθος. (<http://www.iatrikokentro.gr/>, <http://en.wikipedia.org/>, )

#### **4.3 Πλεονεκτήματα:**

1. Με επεμβατική μέθοδος που σημαίνει ότι λαμβάνουμε εικόνες υψηλής ανάλυσης χωρίς επαφή με τον βολβό.
2. Δυνατότητα ανάγνωσης διαφόρων εσωτερικών μικροδομών του αμφιβληστροειδούς. Έτσι είμαστε σε θέση να διαχωρίσουμε ένα παθολογικό ιστό από τον υγιή εκτιμώντας την εξέλιξη της νόσου. (<http://www.iatrikokentro.gr/> )

#### **4.4 Πότε γίνεται η οπτική τομογραφία συνοχής:**

Το OCT μπορεί να πραγματοποιηθεί για την εντόπιση και τον καθορισμό της βλάβης, αλλά και για την εξέλιξη και την θεραπευτική ανταπόκριση της νόσου. (<http://www.eyecenter.gr/>, <http://www.ntouzgos-ofthalmiatros.gr/>, )

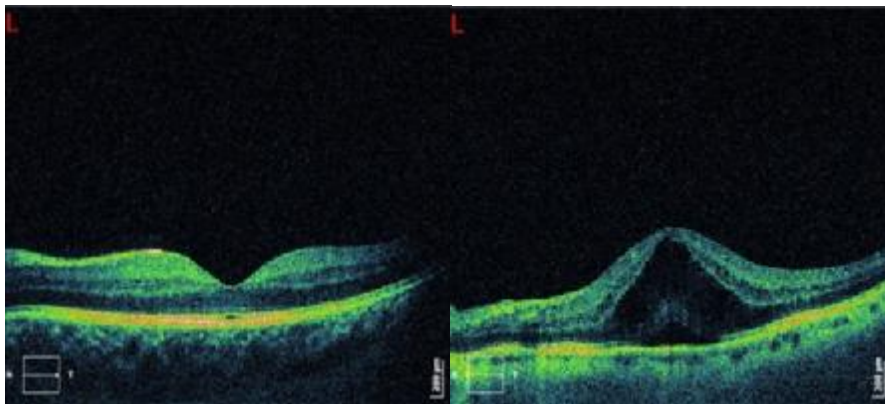
#### **4.5 Εφαρμογές του OCT:**

1. Για την διάγνωση νόσων του βυθού.

2. Στην παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου και στον έλεγχο της ανταπόκρισης για κάθε θεραπεία. (<http://www.iatrikokentro.gr/>)

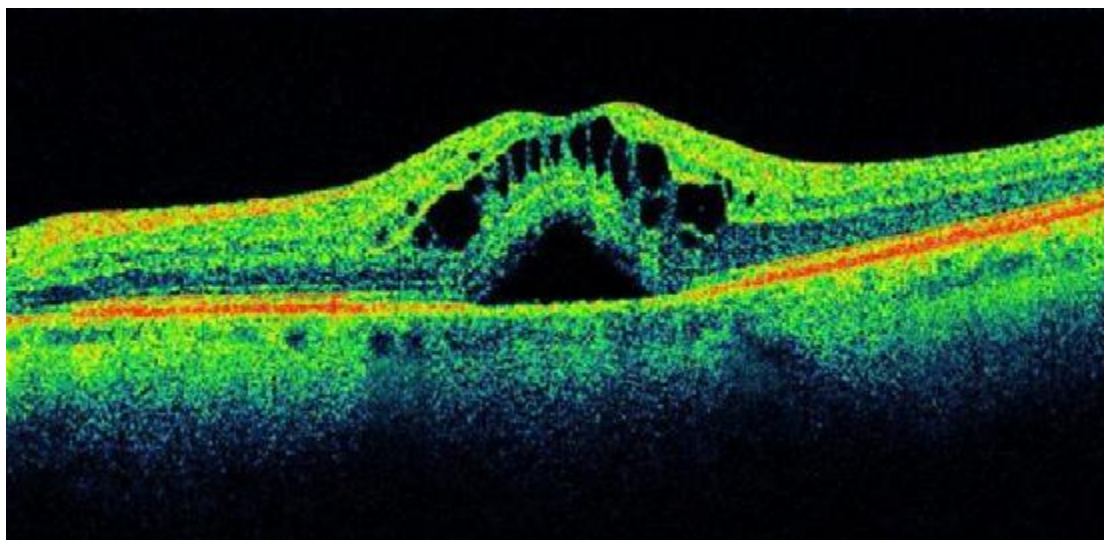
#### 4.6 OCT και παθήσεις:

1. **Κυστοειδές οίδημα της ωχράς:** δυνατότητα διάγνωσης μετεγχειρητικού οιδήματος της ωχράς, άμεσα χωρίς να απαιτείται μυδρίαση.



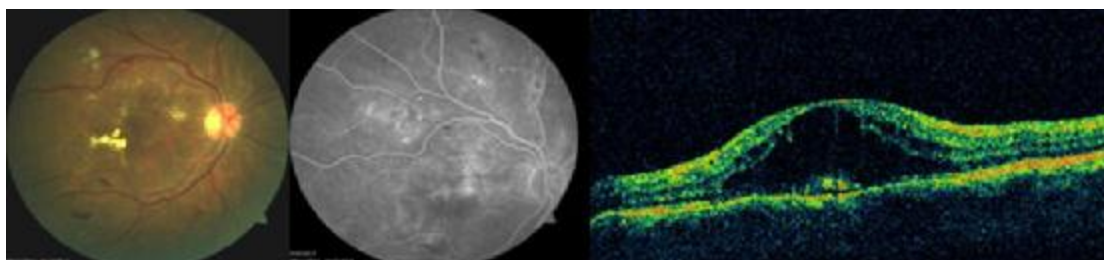
Εικόνα 37 Αριστερά φυσιολογικός οφθαλμός δεξιά παθολογικός οφθαλμός

2. **Παρακολούθηση και διάγνωση ηλικιακής εκφύλισης της ωχράς:** Απολύτως απαραίτητο για την εκτίμηση της ανταπόκρισης της θεραπείας με ενδοϋαλοειδικές εγχύσεις anti-VEGF έτσι ώστε να ληφθεί απόφαση για την επανάληψη της θεραπείας. Έπειτα η ικανότητα εντόπισης ακόμα και ελάχιστου ενδοαμφιβληστροειδικού και υπαμφιβληστροειδικού υγρού είναι καθοριστικής σημασίας για την εκτίμηση της δραστηριότητας της χοροειδικής νεοαγγείωσης.



**Εικόνα 38** Ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς

3. **Διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια:** ικανότητα εκτίμησης του πάχους του αμφιβληστροειδούς και της αντικειμενικής καταγραφής του ενδοαμφιβληστροειδικού οιδήματος καθιστούν το OCT μια πολύ χρήσιμη μέθοδος στην παρακολούθηση. Επιπλέον μπορεί να γίνει εμφανές η συμμετοχή υαλοειδοαμφιβληστροειδικής έλξης στην παθογένεια του οιδήματος, γεγονός που μας βοηθάει στο να καθορίσουμε την κατάλληλη θεραπευτική αγωγή.



**Εικόνα 39** Διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια

4. **Οπή Ωχράς, Επαμφιβληστροειδική Ίνωση, Υαλοειδοαμφιβληστροειδική έλξη :** Σε χειρουργικές παθήσεις όπως οι παραπάνω ο οφθαλμίατρος έχει την δυνατότητα να καταγράψει με ακρίβεια τις μεταβολές του αμφιβληστροειδούς καθώς και να εκτιμηθεί η βαρύτητα της νόσου. Επιπλέον, παρέχει δυνατότητα διαπίστωσης του τύπου της επαμφιβληστροειδικής ίνωσης, και την εκτίμηση της στον υποκείμενο

αμφιβληστροειδή και να διαπιστωθεί το μέγεθος της μεταβολής στη διάρκεια του χρόνου.

5. **Κεντρική ορώδης χοριοειδοαμφιβληστροειδοπάθεια:** Χρήση του OCT για την διάγνωση και την παρακολούθηση. Ακόμα η διαχρονική συγκριτική αξιολόγηση του ύψους και της έκτασης της υπ-αμφιβληστροειδικής συλλογής υγρού οδηγεί στην εκτίμηση ύφεσης ή υποτροπής της νόσου.

6. **Γλαύκωμα:** μελέτη και παρακολούθηση των γλαυκωματικών ασθενών. Πραγματοποιείται ποσοτική καταγραφή του πάχους της στιβάδας των νευρικών ινών περιθύλαια, επιτρέποντας την μορφολογική εκτίμηση των μορφολογικών μεταβολών στην γλαυκωματική αυτή νόσο. Τέλος η περιγραφή της ανατομικής βλάβης του νεύρου στο γλαύκωμα καθιστά το OCT ένα σπουδαίο εργαλείο τόσο για την πρόιμη εντόπιση του γλαυκώματος αλλά και για την βαθμονόμηση και εξέλιξη της. (<http://www.eyecenter.gr/>, <http://www.ntouzgos-ofthalmiatros.gr/> )

## 5.ΚΕΦΑΛΑΙΟ

### 5.1 ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΤΟ PENTACAM

Πρωτοεμφανίστηκε ως ένας αναλυτής πρόσθιου τμήματος που χρησιμοποιεί ως βάση του τη τεχνική της φωτογραφίας Scheimpflug. Η αρχή του τοποθετείται περίπου στο 1906 όταν ο Theodor Scheimpflug είχε εμπλακεί σε αεροφωτογραφίες και επινόησε αυτή τη τεχνική για τη λήψη φωτογραφιών από γωνία. Η νεότερη έκδοση του είναι το PENTACAMYE όπου η ανάλυση των φωτογραφιών έχει βελτιωθεί ακόμα περισσότερο.

Είναι λοιπόν ένας τοπογράφος κερατοειδούς που σε διάρκεια 2 δευτερολέπτων με μία περιστροφή της κάμερας Scheimpflug φωτογραφίζει διατομές του πρόσθιου τμήματος του κερατοειδούς που φωτίζεται διαμέσου της σχισμής σε διάφορους μεσημβρινούς. Δεδομένου ότι όλες αυτές οι σχισμές καλύπτουν η μία την άλλη στο κέντρο του κερατοειδούς αυξάνεται η ακρίβεια που αφορά τις κεντρικές μετρήσεις. Το λογισμικό επεξεργάζεται τα δεδομένα από όλα τα σημεία δημιουργώντας μια τρισδιάστατη εικόνα αναπαράστασης του πρόσθιου θαλάμου και αναγνώσεις των διαφόρων παραμέτρων.(Hashemi,Mehravaran, 2010)



**Εικόνα 40** Τοπογράφος κερατοειδούς Pentacam



## 5.2 ΤΑ ΕΙΔΗ ΤΟΥ PENTACAM

Ο τοπογράφος αυτός χωρίζεται σε 3 είδη:

- το βασικό Pentacam
- το κλασσικό Pentacam
- το HRPentacam

Το βασικό Pentacam παρέχει μια γενική εικόνα του πρόσθιου τμήματος του οφθαλμού σε λίγα μόνο δευτερόλεπτα. Δημιουργεί τοπογραφικά δεδομένα για την ανύψωση και τη καμπυλότητα του κερατοειδούς σε πρόσθια και οπίσθια επιφάνεια και έχει τη δυνατότητα αναβάθμισης αν το επιθυμούμε καθώς υπάρχουν 2 διαθέσιμα λογισμικά.

Το κλασσικό Pentacam είναι εξοπλισμένο με το βασικό λογισμικό και 2 ακόμα πακέτα λογισμικού και έτσι θεωρείται ακόμα πιο ευέλικτο και απαραίτητο για διάγνωση και για χειρουργική προετοιμασία από ότι το βασικό Pentacam. Λόγω των παραπάνω πακέτων λογισμικού που διαθέτει παρέχει όλα τα σημαντικά δεδομένα που απαιτούνται για την προετοιμασία διαθλαστικής προεξέτασης. Επίσης συμβάλλει σημαντικά στην έγκαιρη ανίχνευση, ταξινόμηση και επέμβαση του καταρράκτη. Και αυτό διαθέτει επιπλέον επέκταση λογισμικού.

Το HRPentacam θεωρείται το επαγγελματικό μοντέλο αυτού του τοπογράφου. Προσφέρει την απόλυτη ποιότητα εικόνας με υψηλή ευκρίνεια. Διαθέτει τη κάμερα Scheimpflug, παρέχει εντυπωσιακές παρουσιάσεις IOLS, παραμορφώσεις και τραυματισμούς του κερατοειδούς. Επίσης διαθέτει πρόγραμμα τοποθέτησης φακών επαφής που χαρακτηρίζεται από μια

ολοκληρωμένη βάση δεδομένων με πάνω από 65.000 φακόγεωμετρίες.(Hashemi,Mehrvaran, 2010)



**Εικόνα 41 Το βασικό Pentacam**



Εικόνα 42 Το κλασσικό Pentacam



Εικόνα43 ΤοHRPentacam

### 5.3 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΟΥ PENTACAM

Κάποιες από τις βασικές λειτουργίες του Pentacam είναι οι παρακάτω:

- Τοπογραφικοί χάρτες πρόσθιας και οπίσθιας επιφάνειας του κερατοειδούς
- Χάρτες παχυμετρίας
- PNS και 3D ανάλυση καταρράκτη
- Τομογραφία πρόσθιου θαλάμου
- Ανάλυση κερατοειδούς με Wavefront
- Τοποθέτηση φακών επαφής

## 6. ΚΕΦΑΛΑΙΟ

### 6.1 ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΤΟ ORBSCAN

Το Orbscanείναι ένας άλλος τοπογράφος κερατοειδούς που πρωτοεμφανίστηκε το 1995 στην απλή του μορφή και σιγά σιγά εξελίχθηκε. Για να λειτουργήσει χρησιμοποιεί την αρχή της προβολής. Προβάλλονται πάνω στο κερατοειδή 40 σχισμές σάρωσης δηλαδή 20 δεξιά και 20 αριστερά και έτσι λαμβάνουμε έως και 240 μονάδες δεδομένων που εξάγονται ανά σχισμή. Το οπισθοσκεδαζόμενο φως λαμβάνεται από μια βιντεοκάμερα υπό γωνία 45 μοιρών για τη σάρωση του κερατοειδούς και για μετράμε ανεξάρτητα και τις τιμές X,Y,Z. Οι μονάδες δεδομένων υποβάλλονται στο λογισμικό του τοπογράφου και έτσι έχουμε 40 εικόνες σχισμής που αποκτήθηκαν μέσα σε 0,7 δευτερόλεπτα. Κάθε μια από αυτές τις 40 εικόνες σχισμής εμφανίζει ένα κομμάτι της οφθαλμικής επιφάνειας σε απόσταση της μίας από την άλλη περίπου 250μ κατά μέσο όρο. Οι εικόνες χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της πρόσθιας και της οπίσθιας επιφάνειας του κερατοειδούς, της ίριδας και της πρόσθιας επιφάνειας του φακού. Παρέχει επίσης στοιχεία σχετικά με τη παχυμετρία του κερατοειδούς και το βάθος του πρόσθιου θαλάμου.(Hashemi,Mehravarán, 2010)

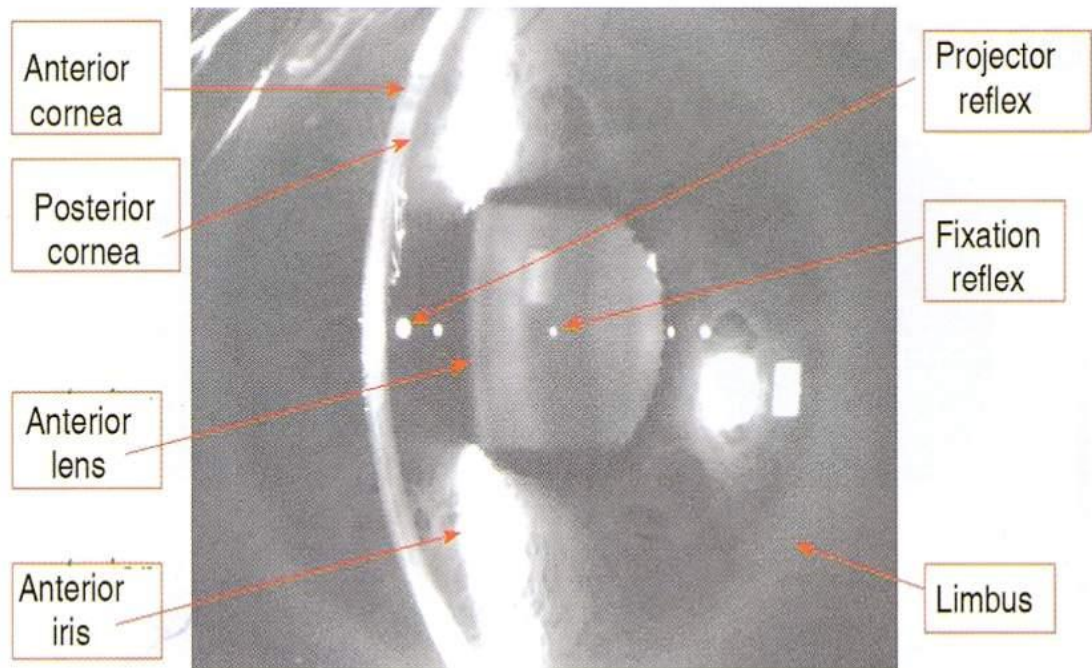


FIGURE 4.6: Detailed orbscan examination

**Εικόνα 44** Λεπτομερής εξέταση πρόσθιου τμήματος κερατοειδούς με Orbscan

## 6.2 ΤΑ ΕΙΔΗ ΤΟΥ ORBSCAN

Οτοπογράφος κερατοειδούς Orbscan χωρίζεται σε 2 είδη:

- Το Orbscan I
- Το Orbscan II

Το Orbscan I διαθέτει μόνο σχισμή σάρωσης τοπογράφου.

Το Orbscan II διαθέτει σχισμή σάρωσης τοπογράφου ( όπως το Orbscan I ) και επιπρόσθετα έχει προσαρτηθεί και Placidodisk.



Εικόνα 45 Τοπογράφος κερατοειδούς Orbiscan I



Εικόνα 46 Τοπογράφος κερατοειδούς Orbiscan II

### 6.3 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΟΥ ORBSCAN

Κάποιες από τις βασικές λειτουργίες του Orbiscan είναι οι παρακάτω:

- Καλύτερη τοποθέτηση σφαίρας

- Κανονική ζώνη κλίμακας
- Αξονικός χάρτης
- Χάρτης παχυμετρίας
- Υψομετρικός χάρτης
- Οπίσθιος υψομετρικός χάρτης

(Hashemi,Mehravaran, 2010)

#### **6.4 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ PENTACAM ΚΑΙ ORBSCAN**

Όσο αναφορά την παρατήρηση από λευκό σε λευκό του κερατοειδούς και οι δύο τοπογράφοι είχαν το ίδιο καλά αποτελέσματα οπότε κανείς δεν υπερκάλυψε κανέναν.

Σε ανασκόπηση που έγινε σε χειρουργημένα και μη μάτια και με τους δύο τοπογράφους για την εκτίμηση του βάθους του πρόσθιου θαλάμου και τα δυο και πάλι είχαν το ίδιο καλά αποτελέσματα. Το Pentacam εμφάνισε σταθερές μετρήσεις όσο αναφορά την οπίσθια καμπυλότητα του κερατοειδούς σε σχέση με το Orbscan, κανένας όμως από τους δυο τοπογράφους όμως δεν συσχέτισε την πρόσθια με την οπίσθια καμπυλότητα του κερατοειδούς κάτι που ήταν πολύ βασικό.

Σε περίπτωση σύγκρισης τώρα του πάχους του κερατοειδούς στο κέντρο και στη περιφέρεια. Με την ύπαρξη του ακουστικού παράγοντα οι μετρήσεις ήταν παρόμοιες για τους δυο τοπογράφους. Όταν όμως έφυγε ο ακουστικός παράγοντας το Orbscan έδωσε πιο ακριβείς και πιο έγκυρες μετρήσεις σε σχέση με το Pentacam τόσο για το πάχος της περιφέρειας, όσο και για το πάχος στο κέντρο του κερατοειδούς.

( Salouti,Nowroozzadeh, 2013 Conzalez-Pere,Conzalez-Meijome, 2011Kim,Sun, 2009Ha,Kim, 2009 Lackner,Schmidinger, 2005)



## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Κατσούλος,Κ. Μακρυνιώτη,Δ. Ασημέλλης,Γ. Καραγεωργιάδης, Λ  
Κωσταντακόπουλος, Σ. Σαπουνάκης, Η. Φωτεινάκης, Β.(2010)**ΦΑΚΟΙ  
ΕΠΑΦΗΣ Α΄ ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ. Α΄ ΤΟΜΟΣ.  
ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΓΝΩΣΗ.**

Snella, R. S. Lemp, M. A. Σκανδαλάκης, Π. Βεργάδος,  
Ι.(2006)**ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΟΥ ΟΦΘΑΛΜΟΥ. ΙΑΤΡΙΚΕΣ  
ΕΚΔΟΣΕΙΣ Π.Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗ ΕΠΕ.**

Ασημέλλης, Γ. Κατσούλος, Κ. Καραγεωργιάδης, Λ. Μακρυνιώτη, Δ.  
Βασιλείου, Ν. Μουσαφειρόπουλος, Θ. Μπαχάρης, Κ.(2008)**ΟΠΤΙΚΗ  
ΚΑΙ ΥΠΕΡΟΡΑΣΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΛΑΣΣΙΚΗ ΟΠΤΙΚΗ ΣΤΙΣ  
ΣΗΜΕΡΙΝΕΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ. ΔΕΥΤΕΡΗΕΚΔΟΣΗ.  
ΣΥΓΧΡΟΝΗΓΝΩΣΗ.**

Κατσούλος, Κ. Ασημέλλης, Γ.(2008) **ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΔΙΑΘΛΑΣΤΙΚΗ  
ΕΞΕΤΑΣΗ. ΣΥΓΧΡΟΝΗΓΝΩΣΗ.**

Hashemi, H. Mehravaran, S. (2010) Day to Day Clinically Relevant  
Corneal Elevation, Thickness, and Curvature Parameters Using the  
Orbscan II Scanning Slit Topographer and the Pentacam Scheimpflug  
Imaging Device. **ΜΕΑJO. 17.**(1), 44-55.

Salouti, R. Nowroozzadeh, M. H. Zamani, M. Ghoreyshi, M. Khoaman, A. R.(2013) Comparison of Horizontal corneal diameter measurements using the Orbscan II and Pentacam systems. **CORNEA. 32.** (11), 1460-4.

Gonzalez-Pere, J. Gonzalez-Meijome, J. M. Rodriguez Ares, M. T. Parafita, M. A.(2011) Topographic paracentral corneal thickness with Pentacam and Orbscan systems. **EYE CONTACT LENS.37.** (6), 348-53.

Kim, S. W. Sun, H. J. Chang, J. H. Kim, E. K. (2009) Anterior segment measurements using Pentacam and Orbscan II 1 to 5 years after refractive surgery. **J.REFRACT SURG. 25.** (12), 1091-7.

H, B. J. Kim, S. W. Kim, E. K. Kim T.I. (2009) Pentacam and Orbscan II measurements of posterior corneal elevation before and after photorefractive keratectomy. **J. REFRACT SURGERY. 25.** (3), 290-5.

Lackner, B. Schmidinger, G. Skorpik, C. (2005) Validity and repeatability of anterior chamber depth measurements with Pentacam and Orbscan systems. **OPTOMETRY VIS SCIENCE. 82.** (9), 858-61.

Alhatem, A. Cavalcanti, B. Hamrah, P. (2012) In vivo confocal microscopy in dry eye disease and related conditions. **Semin Ophthalmol. 27.** (5-6),138-48.

Can, E. Kan, E. Akgün ,Hİ. (2013) Clinical features and in-vivo confocal microscopic imaging of fleck corneal dystrophy. **Semin Ophthalmol.28.** (4), 239-41

Chen, WL. Sun, Y. Lo,W., Tan, HY. Dong, CY. (2008) Combination of multiphoton and reflective confocal imaging of cornea. **Microsc ResTech. 71.** (2),83-5

Kobayashi, A. Sugiyama, K. Li,W. Tseng, S. (2008 ) In vivo laser confocal microscopy findings of cryopreserved and fresh human amniotic membrane. **Ophthalmic Surg Lasers Imaging,39.** (4),312-8

Tavakoli, M. Hossain, P. Malik, R. (2008) Clinical applications of corneal confocal microscopy. **Clin Ophthalmol. 2.** (2),435-45

Papadia,M. Barabino,S. Ronaldo,M. (2008) In vivo confocal microscopy in a case of pterygium. **Ophthalmic Surg Lasers Imaging. 39.** (6),511-3

Zhivov,A. Stachs,O. Stave,J. Guthoff,R. (2009) In vivo three-dimensional confocal laser scanning microscopy of corneal surface and epithelium. **Br J Ophthalmol. 93.**(5),667-72

Steven,P. Muller,M. Koop,N. Rose,C. Huttman,G. (2009) Comparison of Cornea Module and DermaInspect for noninvasive imaging of ocular surface pathologies. **J Biomed Opt.14.** (6),064040

Evie,J. McLaren,J. Patel,S. (2009) Confocal microscopy in ophthalmology. **Am J Ophthalmol. 148.** (5),639-46

Szaflik,JP. Oldak, M. Ulinska, M. Tesla, P. Szaflik, J. (2009) OCT and in vivo confocal microscopy of a pigmented corneal tumor-like lesion. **Ophthalmic Surg Lasers Imaging. 40.** (6),586-6

Shukla, AN. Cruzat, A. Hamrah, P. (2012) Confocal microscopy of corneal dystrophies. **SeminOphthalmol 27.**(5-6),107-16

Ρόζις,Ν. Ντεμολάρι,Θ. ( 2012 )Μικροσκόπιο: η ιστορική αναδρομή και η συμβολή του στην ανάπτυξη της βιολογίας

Τσώλη, Θ.(2010) Τα μικροσκόπια στο μικροσκόπιο.**ΤοΒήμα.** Σελίδα 1.

M.E. Andersen, RZ Muggli, Analytical Chemistry, 1981, 53 (12), σελ. 1772-1777

Αδάμου, Α. (2007) Μελέτη φυτικών ιστών με μεθόδους σύγχρονης μικροσκοπίας σελίδα 14-32, 55

<http://www.eie.gr/>

<http://www.horiba.com/>

<http://www.uoi.gr/>

<http://www.pasteur.gr/>

<http://www.biology.uoc.gr/>

Αδρασκέλας, Α. (2011) Οπτικό μικροσκόπιο. σελίδα 6,13,15

<http://www.eng.ucy.ac.cy/>

<http://invenio.lib.auth.gr/>

Παναγιωτόπουλος, Π. Οπτική και όραση σελίδα 8,18

<http://www.biomed.ntua.gr/>

<http://www.aua.gr/>

Robert, R. S ΕγκυκλοπαίδειαBritannica online. (2010 )

<http://www.eyecenter.gr/>

Φασσέας, Κ. Οπτικά ( φωτονικά ) μικροσκόπια , γενικές αρχές

<http://www.biology.uoc.gr/>

<http://physics.teiath.gr/>

<http://usa.nidek.com/>

Ελευθεριάδου, Ι. (2009 ) Μεταβολές του πάχους της ωχράς μετά από εγχείρηση καταράκτη σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη με τη χρήση οπτικής τομογραφίας συνοχής. Σελίδα 44.

<http://www.opthalmica.gr/>

<http://www.athenseyehospital.gr/>

<http://www.ntouzgos-ofthalmiatros.gr/>

<http://en.wikipedia.org/>

Μειδάνη, Α. (2012 ) Οπτική τομογραφία (OCT ) – ένα σύγχρονο διαγνωστικό εργαλείο στην οφθαλμολογία. Σελίδα 43-45

<http://www.athensvision.eu/>

<http://www.eyedayclinic.gr/>

<http://www.uhasselt.be/>

<http://www.temple.edu/>

McGhee, CNJ. (2008 ) In vivo confocal microscopy of human corneal nerves in health, in ocular and systemic disease, and following corneal surgery. **British Journal of ophthalmology**.93 ( 7), σελίδα 1

Hahnel, C. Somodi, S. Weiss, D. (2010 ) The Keratocyte Network of Human Cornea: A Three-Dimensional Study Using Confocal Laser Scanning Fluorescence Microscopy. **CORNEA the journal of cornea and external disease**. 19 ( 2 ) , σελίδα 185- 193.

Dipika, V.P. Charles, N.J. McGhee, P. ( 2007 ) Contemporary in vivo confocal microscopy of the living human cornea using white light and laser scanning techniques. **Clinical & experimental Ophthalmology**. 35 (1 ).

Richer, A. Slowik, C. Somodi, S. Vick, H.P. Guthoff, R. (1996 ) Corneal reinnervation following penetrating keratoplasty--correlation of esthesiometry and confocal microscopy.**Europe Pubmed Central**. 5 (6 , σελίδα 513-517.

Balestrazzi, A. Caporossi, A. Cosimo, M. Traversi, C. Baiocchi, Tomaso, M.D. Cristina, M.D. (2007 ) Treatment of Progressive Keratoconus by Riboflavin-UVA-Induced Cross-Linking of Corneal Collagen: Ultrastructural Analysis by Heidelberg Retinal Tomograph II In Vivo Confocal Microscopy in Humans. **Cornea the journal of cornea and external disease**.26 (4 ) σελίδα 390-397.

Cosimo, M. Traversi, C. Baiocchi, O. Bovone, C. Sparrano, M. Balestrazzi, A. Caporossi, A. (2008 ) Corneal Healing After Riboflavin Ultraviolet-A Collagen Cross-Linking Determined by Confocal Laser Scanning Microscopy In Vivo: Early and Late Modifications. **American Journal of ophthalmology**. 146 ( 4 ) σελίδα 527-533.