

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО ОФТАЛМОЛОГИЯ

Д-Р РОЗАЛИЯ ХРИСТОВА ДИМИТРОВА

ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ НА ЛИМБАЛНАТА СТВОЛОВОКЛЕТЪЧНА ИНСУФИЦИЕНЦИЯ

**Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен
„Доктор“**

Област на висше образование: „Здравеопазване и спорт“, шифър 7.1
Научна специалност „Офталмология“, шифър 03.01.36

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ: ПРОФ. Д-Р ИВА ТОДОРОВА ПЕТКОВА, ДМН

СОФИЯ, 2022

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

| | |
|--|-----------|
| СПИСЪК НА ТАБЛИЦИТЕ..... | 5 |
| СПИЦЪК НА ФИГУРИТЕ..... | 7 |
| СПИСЪК НА СЪКРАЩЕНИЯТА..... | 9 |
| ВЪВЕДЕНИЕ..... | 11 |
| ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР..... | 13 |
| 1. Нормална структура на очната повърхност..... | 13 |
| 1.1. Конюнктива..... | 13 |
| 1.2. Роговица..... | 13 |
| 1.2.1. Епител..... | 14 |
| 1.2.2. Бауманова мембрана..... | 14 |
| 1.2.3. Строма..... | 14 |
| 1.2.4. Десцеметова мембрана..... | 15 |
| 1.2.5. Ендотелен слой..... | 15 |
| 1.2.6. Роговична инервация..... | 16 |
| 1.3. Слъзен филм..... | 16 |
| 1.4. Анатомия на лимба..... | 16 |
| 1.5. Нормални регенераторни процеси в роговицата..... | 17 |
| 2. Лимбална стволовокелтъчна инсуфициенция..... | 20 |
| 2.1. Определение..... | 20 |
| 2.2. История..... | 21 |
| 2.3. Етиология..... | 21 |
| 2.3.1. Аниридия..... | 22 |
| 2.3.2. Ектодермална дисплазия..... | 24 |
| 2.3.3. Травми..... | 25 |
| 2.3.4. Цикатризиращ пемфигоид..... | 28 |
| 2.3.5. Стивънс-Джонсън синдром..... | 33 |
| 2.3.6. Ятрогенна лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция..... | 38 |
| 2.3.7. Контактни лещи..... | 38 |
| 2.3.8. Невротрофична кератопатия..... | 39 |
| 2.3.9. Птериgium..... | 40 |
| 2.4. Патоанатомия и патофизиология..... | 40 |
| 2.5. Клинична картина..... | 41 |
| 2.6. Диагноза..... | 43 |
| 2.6.1. Импресионна цитология..... | 43 |
| 2.6.2. Оптична кохерентна томография на преден очен сегмент..... | 44 |
| 2.6.3. Конфокална ин виво микроскопия..... | 45 |
| 2.7. Стадиране на лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция..... | 45 |
| 2.8. Лечение..... | 46 |
| 2.8.1. Консервативно лечение..... | 46 |
| 2.8.2. Оперативно лечение..... | 49 |
| 2.9. Методи за екс виво размножаване на лимбални епителни стволови клетки..... | 52 |
| 2.9.1. Преносители..... | 54 |
| 2.9.2. Растежни среди..... | 54 |
| 2.9.3. Алтернативни източници на стволови клетки..... | 54 |
| ЦЕЛ И ЗАДАЧИ..... | 56 |
| МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ..... | 57 |

| | |
|---|-----------|
| 1. Подбор на пациенти..... | 57 |
| 2. Дефиниране на групи..... | 57 |
| 3. Методи..... | 58 |
| 3.1. Снемане на анамнеза и пълен офталмологичен преглед..... | 58 |
| 3.2. Фотодокументация чрез биомикроскоп..... | 58 |
| 3.3. Оптична кохерентна томография на преден очен сегмент..... | 59 |
| 3.4. Компютърна програма ImageJ..... | 59 |
| 3.4.1. Площ на фиброваскуларната тъкан..... | 59 |
| 3.4.2. Характеризиране на цикатрициалната тъкан от получените ОСТ изображения..... | 59 |
| 3.5. Импресионна цитология..... | 60 |
| 3.6. Естезиометрия..... | 61 |
| 3.7. Бърз тест за възпаление на очната повърхност..... | 62 |
| 3.8. Трансплантация на амниотична мембрана..... | 62 |
| 3.9. Екс виво размножаване на лимбални стволови клетки..... | 63 |
| 3.9.1. Методи за екс виво размножаване на лимбалните клетки..... | 63 |
| 3.9.2. Техника на минимално инвазивна лимбална биопсия..... | 64 |
| 3.9.3. Екс виво размножаване..... | 65 |
| 3.10. Корнео-склерален бутон..... | 65 |
| 3.11. Постоперативен период..... | 66 |
| 3.12. Софтуер за стандартизирана оценка на предно-сегментни изображения (VaHI)..... | 66 |
| 3.13. Статистически анализ..... | 67 |

РЕЗУЛТАТИ

| | |
|--|-----------|
| 1. Резултати по Задача 1..... | 69 |
| 1.1. Демографска характеристика..... | 69 |
| 1.2. Разпределение по етиология..... | 70 |
| 1.3. Разпределение според вида на трансплантираната тъкан..... | 74 |
| 2. Резултати по Задача 2..... | 78 |
| 2.1. Демографски характеристики..... | 79 |
| 2.2. Анамнеза..... | 81 |
| 2.3. Зрителна острота..... | 82 |
| 2.4. Биомикроскопия..... | 83 |
| 2.5. Микробиологични и вирусологични изследвания..... | 85 |
| 2.6. Естезиометрия..... | 86 |
| 2.7. Бърз тест за възпаление на очната повърхност..... | 87 |
| 2.8. Импресионна цитология..... | 87 |
| 2.9. Оптична кохерентна томография..... | 91 |
| 3. Резултати по Задача 3..... | 94 |
| 3.1. Лимбална биопсия..... | 95 |
| 3.2. Техника за екс виво размножаване на лимбалните стволови клетки..... | 97 |
| 3.3. Техника на трансплантация на получения графт..... | 98 |

| | |
|--|------------|
| 3.4. Техника на трансплантация на корнеосклерален бутон..... | 99 |
| 3.5. Постоперативен режим..... | 101 |
| 3.6. Дефиниране на критериите за успех..... | 101 |
| 3.7. Постоперативни резултати..... | 101 |
| 3.7.1. Трансплантация на екс виво размножени лимбални епителни клетки..... | 101 |
| 3.7.2. Корнеосклерален бутон..... | 102 |
| 4. Резултати по Задача 4..... | 103 |
| 5. Резултати по Задача 5..... | 104 |
| 5.1. Групи..... | 104 |
| 5.2. Демографски характеристики и анамнестични данни..... | 104 |
| 5.3. Етиология..... | 108 |
| 5.4. Зрителна острота..... | 108 |
| 5.5. Площ на фиброваскуларната тъкан..... | 109 |
| 5.6. Оптична кохерентна томография на преден сегмент..... | 110 |
| ОБСЪЖДАНЕ..... | 112 |
| ОБОБЩЕНИЕ..... | 133 |
| ИЗВОДИ..... | 133 |
| ПРИНОСИ..... | 134 |
| НАУЧНА АКТИВНОСТ..... | 135 |
| ПУБЛИКАЦИИ..... | 135 |
| УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ..... | 135 |
| НАУЧНИ ПРОЕКТИ..... | 135 |
| РЕЗЮМЕ..... | 137 |
| ABSTRACT..... | 139 |
| REFERENCES..... | 141 |

СПИСЪК НА ТАБЛИЦИТЕ

| | |
|---|----|
| Таблица 1. Класификация на аниридия-асоциирана кератопатия..... | 15 |
| Таблица 2. Класификационни системи за химичните/термични травми на роговицата.... | 17 |
| Таблица 3. Типове цикатризиращ пемфигоид..... | 19 |
| Таблица 4. Класификация на симблефарон..... | 22 |
| Таблица 5. Диференциална диагноза на цикатризиращия пемфигоид..... | 23 |
| Таблица 6. Класификация на еритема мултиформе (ЕМ), Стивънс-Джонсън синдром (SJS) и токсична епидермална некролиза (ТЕН)..... | 24 |
| Таблица 7. Стадии на лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция (модифицирана по Deng и сътр.)..... | 37 |
| Таблица 8. Техники за оптимизиране на очната повърхност..... | 41 |
| Таблица 9. Степени за стандартизирана оценка на компонентите на лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция..... | 57 |
| Таблица 10. Сравнение по възраст и пол на пациентите, на които бе проведено лечение чрез трансплантация на тъкани и клетки в УМБАЛ „Александровка“ за изследвания период...60 | 60 |
| Таблица 11. Сравнение на пациентите в групите с диагноза язва на роговицата, левкома, булозна кератопатия и птериgium според възрастта..... | 61 |
| Таблица 12. Разпределение на пациентите според диагнозата като абсолютен брой и процент..... | 61 |
| Таблица 13. Сравнителен анализ половото разпределение във възрастовите групи при пациенти с язва на роговицата..... | 63 |
| Таблица 14. Разпределение според вида на трансплантираният тъкан като абсолютен брой и процент..... | 65 |
| Таблица 15. Разпределение на трансплантираният тъкан според етиологичната причина.... | 65 |
| Таблица 16. Средна възраст на пациентите по пол според трансплантираният тъкан..... | 66 |
| Таблица 17. Разпределение по пол и средна възраст на пациентите със suspectна лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция..... | 69 |
| Таблица 18. Стойности на индекс на Кронбах от въпросника за субективни симптоми..... | 72 |
| Таблица 19. Сравнение между резултатите от въпросника за субективни симптоми преди и след след лечение..... | 72 |
| Таблица 20. Сравнение на зрителната острота преди и след лечение на пациенти със suspectна лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция..... | 73 |
| Таблица 21. Разпределение на пациентите с неоваскуларизация по групи като абсолютен брой и като процент..... | 74 |
| Таблица 22. Сравнителен анализ на стойностите от естезиометрията преди и след лечение..... | 76 |
| Таблица 23. Корелационен анализ на Spearman за връзка между възрастта и стойностите на естезиометрията..... | 76 |
| Таблица 24. Показатели от импресионната цитология..... | 78 |

| | |
|--|-----|
| Таблица 25. Демографски характеристики на пациентите, при които бе проведено лечение с трансплантация на екс виво размножени лимбални стволови клетки..... | 89 |
| Таблица 26. Демографски характеристики на пациентите, при които бе проведено лечение с трансплантация на корнеосклерален бутон..... | 89 |
| Таблица 27. Сравнителен анализ на зрителната острота преди лечение и на 1ви и 6ти постоперативен месец. | 92 |
| Таблица 28. Сравнителен анализ на промяната в показателите от стандартизирания софтуер за оценка на лимбалната стволочелетъчна инсуфициенция..... | 92 |
| Таблица 29. Статистически анализ на зрителната острота преди и след трансплантация на КСБ..... | 93 |
| Таблица 30. Сравнителен анализ на групите по възраст..... | 95 |
| Таблица 31. Сравнителен анализ на групите по пол..... | 95 |
| Таблица 32. Сравнителен анализ на групите по брой придружаващи заболявания..... | 96 |
| Таблица 33. Сравнителен анализ на изходната зрителна острота между трите групи..... | 99 |
| Таблица 34. Сравнителен анализ на стойностите от разликата между пред- и следоперативната зрителна острота (делта) между трите групи..... | 99 |
| Таблица 35. Сравнителен анализ на стойностите от разликата между пред- и постоперативната площ на фиброваскуларната тъкан за всяка група поотделно..... | 99 |
| Таблица 36. Сравнителен анализ на изходната площ на фиброваскуларната тъкан между трите групи..... | 100 |
| Таблица 37. Сравнителен анализ на стойностите от разликата между пред- и следоперативната площ на фиброваскуларната тъкан (делта) между трите групи..... | 100 |
| Таблица 38. Сравнение в измерените средни стойности на сивата скала при здрави контроли в две отделни визити. | 100 |
| Таблица 39. Сравнителен анализ на стойностите от разликата между пред- и постоперативната ОСТ денситометрия поотделно. | 101 |
| Таблица 40. Сравнителен анализ на ОСТ денситометрия преди и след лечение между трите групи, както и стойностите от промяната между пред- и следоперативната площ на фиброваскуларната тъкан (делта) между трите групи..... | 101 |

СПИСЪК НА ФИГУРИТЕ

| | |
|---|----|
| Фигура 1. Асиметрично деление на стволовите клетки..... | 5 |
| Фигура 2. XYZ хипотеза за обновяване на роговичния епител..... | 11 |
| Фигура 3. Етиология на лимбалната стволовклетъчна инсуфициенция..... | 13 |
| Фигура 4. Клинични прояви на еритема мултиформе..... | 28 |
| Фигура 5. Порочен кръг на роговично увреждане при невротрофична кератопатия..... | 31 |
| Фигура 6. Графично представяне на стадията на лимбална стволовклетъчна инсуфициенция (модифицирана по Deng и сътр.)..... | 37 |
| Фигура 7. Терапевтичен алгоритъм за лечение на лимбална стволовклетъчна инсуфициенция..... | 41 |
| Фигура 8. Графично представяне на оперативните техники за трансплантация на лимбални стволови клетки..... | 43 |
| Фигура 9. Маркиране на роговицата в хоризонталния меридиан и оценка на отделните пискели със средна стойност по сивата скала..... | 50 |
| Фигура 10. Техника на приложение на филтърната хартия, използвана за получаване на проби за импресионна цитология..... | 51 |
| Фигура 11. Техника на извършване на бърз тест за очно възпаление, базиран на нивата на матрксната металлопротеиназа 9..... | 53 |
| Фигура 12. Схематично представяне на системата за култивиране на лимбални епителни стволови клетки (ЛЕСК)..... | 54 |
| Фигура 13. Стандртизиран софтуер за оценка на лимбалната стволовклетъчна инсуфициенция..... | 58 |
| Фигура 14. Разпределение на пациентите във възрастови групи..... | 60 |
| Фигура 15. Разпределение на пациентите според диагнозите в МКБ 10..... | 62 |
| Фигура 16. Разпределение по пол на пациентите в групите с диагноза язва на роговицата, левкома, птериgium и булозна кератопатия..... | 62 |
| Фигура 17. Разпределение по възраст и пол на пациентите с язва на роговицата..... | 63 |
| Фигура 18. Средна възраст на мъжете и жените според диагнозата..... | 64 |
| Фигура 19. Средна възраст на пациентите според вида на трансплантираната тъкан..... | 66 |
| Фигура 20. Разпределение на пациентите по възраст..... | 70 |
| Фигура 21. Графичен вид на разпределение по групи на пациентите с неоваскуларизация..... | 73 |
| Фигура 22. Пациент със смесена повърхностна и дълбока неоваскуларизация (ляво)..... | 74 |
| Пациент с повърхностна неоваскуларизация (дясно). | |
| Фигура 23. Вортикозна кератопатия при пациент след множество хирургични интервенции в областта на лимба..... | 75 |
| Фигура 24. Невротрофична кератопатия..... | 75 |
| Фигура 25. Острови от конюнктивен епител сред роговичните плоски епителни клетки.... | 78 |
| Фигура 26. Кератинизация с PAS+ клетки..... | 78 |
| Фигура 27. Пациент с плоскоклетъчна метаплазия..... | 79 |
| Фигура 28. Атипични роговични клетки при пациент с птериgium..... | 79 |
| Фигура 29. Интрацитоплазмни включвания, корелиращи с вирусна инвазия в епителните клетки (херпетична инфекция)..... | 80 |
| Фигура 30. Нормален роговичен епител, маркиран по класическата методика на Ценг..... | 80 |

| | |
|--|----|
| Фигура 31. Импресионна цитология чрез стандартни цитологични техники при пациент с невротрофична кератопатия след прекаран херпес зостер (Cytocolor, x100)..... | 81 |
| Фигура 32. Пациент с епителен дефект под 1мм..... | 81 |
| Фигура 33. Пациент с обширен епителен дефект след продължителна употреба на топикален анестетик..... | 82 |
| Фигура 34. Липоидна дегенерация след тежка роговична инфекция..... | 82 |
| Фигура 35. Кистични изменения в стромата при двама от пациентите..... | 82 |
| Фигура 36. Стромално изтъняване..... | 83 |
| Фигура 37. Пациент с частично изменен контур на палисадите на Вогт. Пациент с тотална липса на палисади..... | 83 |
| Фигура 38. Формиране на демаркационна линия в стромата след лечение..... | 84 |
| Фигура 39. Графично представяне на резултатите от сравнителния анализ на двата протокола за екс виво размножаване на лимбални стволови клетки..... | 85 |
| Фигура 40. Оптична кохерентна томография в зоната на минимално инвазивна лимбална биопсия..... | 86 |
| Фигура 41. Система от два пръстена, между които се фиксира амниотичната мембрана, съдържаща експланта и изпълвана с растежната среда..... | 87 |
| Фигура 42. Инвертирана фазовокотрастна микроскопия на експланта..... | 88 |
| Фигура 43. Пациент с десцеметоцеле, при който бе проведено биологично покритие с корнеосклерален бутон..... | 90 |
| Фигура 44. Иридокорнеален контакт на пациент преди трансплантация на корнеосклерален бутон..... | 90 |
| Фигура 45. Графично преставяне на броя на пациентите като процент според най-честите придружаващи заболявания..... | 96 |
| Фигура 46. Пациент с роговична язва след лъчетерапия за назофарингелаен карцином..... | 97 |
| Фигура 47. Етиология на заболяванията на очната повърхност, поради които е проведена трансплантация на лимбални стволови клетки (ЛСК), корнеосклерален бутон (КСБ) или амниотична мембрана (АМ)..... | 98 |

СПИСЪК НА СЪКРАЩЕНИЯТА

ААК – аниридия асоциирана кератопатия
АМ – амниотична мембрана
ГАГ – глюкозаминиогликани
КП - кератопластика
КСБ – корнеосклерален бутон
ЛЕСК – лимбални епителни стволови клетки
ЛСК – лимбални стволови клетки
МАЛТ – мукоза-асоциирана лимфоидна тъкан
НСПВС – нестероидни противовъзпалителни средства
ПМН – полиморфонуклеари
ТЕН – токсична епидермална некролиза
ЦП – цикатризиращ пемфигоид

AS-OCT – anterior segment optical coherence tomography
BMZ – basement membrane zone
CALT – conjunctiva associated lymphoid tissue
СК - cytokeratin
CLAU – Conjunctival Limbal Autograft
CLET – cultured limbal epithelial transplantation
COMET – Cultivated Oral Mucosal Epithelial Transplantation
DMEM – Dulbecco’s Modified Eagle Medium
EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF – epidermal growth factor
FGF – fibroblast growth factor
HLA – human leukocyte antigen
ICAM-1 – intercellular adhesion molecule 1
IL-1 – interleukin 1
IL-6 interleukin 6
IPSc – Induced Pluripotent Stem Cells
IVC(C)M – in vivo (corneal) confocal microscopy
IVIG – intravenous immunoglobulin
KID – keratitis ichthyosis deafness
KLAL – keratolimbal allograft
lr-CLAL – Living-related Conjunctival Limbal Allograft
LSCD – limbal stem cell deficiency
MMP-2 – matrix metalloproteinase 2
MMP-9 – matrix metalloproteinase 9
MUC5AC – mucin-5AC
NGF – nerve growth factor
PAS – Periodic acid Schiff
PCR – polymerase chain reaction

SJS – Stevens-Johnson syndrome
SLET – simple limbal epithelial transplantation
SPARC – secreted protein acidic and rich in cysteine
SSCE – Sequential sectoral conjunctival epitheliectomy
TACs – transient amplifying cells
TDCs – terminally differentiated cells
TGF- β – transforming growth factor- β
TNF – tumor necrosis factor
VaHI – Vascularization, Haze, and Integrity
VEGF – vascular endothelial growth factor
WAGR(O) – Wilms tumor, aniridia, genitourinary anomalies, mental retardation, (obesity)

Въведение

Зрението е сетиво, с което човек възприема огромно количество информация от заобикалящата го среда. За нормалната му функция са необходими редица условия, включително прозрачни очни среди. Заболяванията на предния очен сегмент са социално-значим проблем, те влошават качеството на живот на пациента, тъй като силно намаляват зрението са съпроводени от болка, дразнене от светлина и невъзможност за извършване на ежедневни дейности. По данни на Световната здравна организация помътняването на роговицата е една от водещите причини за необратима слепота. При интактен заден очен сегмент в голям процент от случаите лечението на тези заболявания води до отлични резултати по отношение на зрителната острота.

Очната повърхност включва два хистологично и патофизиологично различни видове епител – роговичен и конюнктивен, преминаващи един в друг в зоната на лимба. На това място се намират палисадите на Вогт и специфични структури, наречени лимбални крипти, в които се откриват малки, базално разположени клетки с висок пролиферативен потенциал и характерен фенотип – лимбални стволови клетки (ЛСК).

Протрахирианият клиничен ход на заболяванията на очната повърхност може да доведе до дисбаланс между популацията от лимбални стволови клетки, отговорни за нормалните регенеративни процеси в роговицата от една страна и загубата на тъкани от повърхностните слоеве, от друга. По този начин може да възникне лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция. Инсуфициенцията на лимбалните стволови клетки се определя като частично или тотално засягане на лимба от травма или заболяване с намаление на броя стволови клетки под критичния праг, при който се нарушава равновесието между загубата на клетки от повърхностните слоеве и клетъчната пролиферация. Лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция може да е резултат от засягане на абсолютния брой стволови клетки или на тяхната функция (пролиферация, диференциация) – съответно морфологична или функционална инсуфициенция. Освен това процесът може първично да засегне факторите от специфичната им среда – стволовоклетъчната ниша. Лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция може да се раздели на вродена и придобита, частична и тотална, унилатерална и билатерална.

Характерни клинични прояви са персистиращи епителни дефекти, хронично възпаление, конюнктивализация и неоваскуларизация, с последващите от това намалена прозрачност на роговицата и силно влошаване на зрението, в някои случаи до практическа слепота.

Дефицитът на лимбални стволови клетки участва в патофизиологичните механизми на голям брой заболявания, както и в неуспеха на редица оперативни интервенции, целящи възстановяване на очната повърхност, включително пенетрираща кератопластика.

Лечението на лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция изисква комплексен подход и създаването на оптимална среда за преживяване на лимбалните клетки чрез коригиране на всички придружаващи патофизиологични отклонения, като включва консервативни и оперативни подходи. При частична инсуфициенция, която не засяга

зрителната ос терапевтичното поведение се базира на изкуствени сълзи без консерванти, терапевтични контактни лещи, матрикс регенеративна терапия, хемодеривати – автоложен серум, плазма, богата на тромбоцити, топикален невротрофичен растежен фактор. За редуциране на възпалителната активност се прилагат кортикостероидни препарати и имуномодулатори – локално и системно. При по-напреднали стадии на заболяването със засягане на зрителната ос се предприема оперативно възстановяване на очната повърхност. При частична инсуфициенция първоначално се използва последователната секторна конюнктивна епителиектомия (sequential sectoral conjunctival epitheliectomy - SSCE). На този етап с много добри резултати е биологичното покритие с амниотична мембрана. Нова техника за възстановяване на очната повърхност е простата лимбална епителна трансплантация (simple limbal epithelial transplantation - SLET), при която малка лимбална биопсия се разделя на няколко парчета върху засеганата роговична повърхност, последвана от покритие с амниотична мембрана.

При тотална лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция източник на клетки могат да бъдат автоложни или алогенни конюнктивно-лимбални и кератолимбални трансплантати. Недостатък на всички алогенни трансплантати е възможността за отхвърляне и рецидив на заболяването, за което е необходима продължителна системна имуносупресивна терапия. Това е причина основната насока за лечение на лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция да е разработването на клетъчни продукти с автоложен произход. Техниката включва минимално инвазивна лимбална биопсия, последвана от екс виво размножаване на получените клетки със среди, целящи максимална клонална експанзия, същевременно запазваща пролиферативния и диференциационния потенциал на получените клетъчни култури.

Възстановяването на очната повърхност е комплексно и за оптимален ефект от лечението е необходимо да се следва определен терапевтичен алгоритъм. Необходима е подробна предоперативна оценка с обективизиране на рисковите фактори и коригиране на всички съпътстващи патологични изменения, за да се постигне очакваният резултат – нормална очна повърхност, прозрачна роговица и висока зрителна острота.

I. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. Нормална структура на очната повърхност.

Първата структура на окото, която взаимодейства с околната среда, е повърхностен епителен слой, покриващ роговицата, клепачите и склерата, заедно със слъзния филм. Терминът очна повърхност(1) се отнася именно за този покриващ епител, чиято граница достига до кожата на горния и долния клепачен ръб. Очната повърхност включва два хистологично и патофизиологично различни видове епител – роговичен и конюнктивен, преминаващи един в друг в зоната на лимба.

1.1.Конюнктива

Конюнктивата(2) започва от кожно-лигавичния ръб на клепачите и се простира върху вътрешната им повърхност и булба. Тя може да се раздели на три зони – палпебрална, форниксова и булбова. Палпебралната започва от кожно-лигавичния ръб на клепача и покрива вътрешната му повърхност, като е здраво свързана с подлежащия тарз. Форниксовата конюнктива е хлабава, разположена между булбовата и палпебралната и позволява свободното движение на очната ябълка. Булбовата конюнктива се слива с теноновата капсула и се прикрепя към лимба.

Конюнктивата представлява лигавична мембрана, изградена от многослоен плосък невроговяващ до цилиндричен епител с множество чашковидни клетки и е богата на кръвоносни и лимфни съдове, разположени в тънка субстанция проприя. Лимфната ѝ тъкан е източник на плазмоцити, макрофаги, мастоцити, както и на Т и Б лимфоцити, произхождащи от специализирани агрегати, сходни с МАЛТ-лимфоидната тъкан – наричана още САЛТ – conjunctiva associated lymphoid tissue.

Конюнктивният епител е многослоен, цилиндричен до плосък невроговяващ с дебелина 2-5 слоя. Базалните клетки са кубични и с преминаването си към повърхностните слоеве придобиват плоска полигонална конфигурация. Конюнктивните стволни клетки са различни от роговичните и се намират по протежение на цялата конюнктива, вероятно по-обилно във форниксите. Чашковидните клетки (едноклетъчни лигавични жлези) са разположени предимно медиално в зоната на карункулата и плика семилунарис и липсват в областта на лимба, където се забелязва плавен преход от конюнктивен към роговичен фенотип на епителните клетки.

1.2.Роговица

Роговицата(2)(3) е прозрачна очна тъкан, основна част от диоптричния апарат на окото, която се състои от 5 слоя: епител, Бауманова мембрана, строма, Десцеметова мембрана и ендотел.

1.2.1 Епител

Роговичният епител произхожда от повърхностната ектодерма и представлява многослоен плосък неvroговяващ епител, състоящ се от 5-6 слоя. Понякога в роговичния епител се установяват и други клетки, освен епителни, а именно макрофаги, лимфоцити, меланоцити, както и антиген-представящи Лангерхансови клетки, разположени в периферията. Върху базалната мембрана, граничеща с Баумановата зона на роговицата, се разполага най-вътрешният слой на епитела – 1 ред цилиндрични клетки, прикрепени към нея чрез хемидесмосоми. Над него се разполагат 2-3 реда полигонални „криловидни“ клетки (wing cells). Повърхностните роговични епителни клетки са плоски, свързани чрез zonulae occludentes и притежават микровили по повърхността си. Последните са покрити от гликокаликс, който взаимодейства със слъзния филм, осигурявайки неговата стабилност, а той от своя страна спомага неправилната роговична повърхност да е оптично гладка. Роговичният епител е отоговорен за поддържането на аваскуларитета, секретирайки разтворим VEGF-рецептор-1 (sVEGFR-1, sflt-1), който инактивира VEGF-A(4) и по този начин инхибира разрастването на съдове в роговицата. Чрез здравите връзки между клетките на повърхностните слоеве епителът създава бариера за течности и разтворими вещества, като по този начин защитава роговицата от едем и помътняване.

1.2.2 Бауманова мембрана

Баумановата мембрана е сбор от неправилно подредени колагенови нишки с дебелина 8-12 микрона със задебеляване в периферията. Слойт на Бауман е изграден основно от колаген тип I и е ацелуларен, но през него преминават аксоните на роговичните нерви. Съвременната конфокална *in vivo* микроскопия открива множество кератоцити в Баумановия слой. Стромалните колагенови фибрили се прикрепват към задната повърхност на Баумановия слой, като връзката е много силна и Баумановият слой не може да бъде отпрепариран от стромата.

1.2.3. Строма

Основният обем на роговицата се състои от стромата, която представлява съединителна тъкан от предимно колаген тип I и кератоцити. Колагенът е организиран в колагенови фибрили с периодична стрираност от 25-35 нанометра. Фибрилите са подредени в ламели, паралелни на роговичната повърхност. В централната строма ламелите са ориентирани по вертикалната и хоризонталната ос, а в периферията са разположени пръстеновидно, паралелно на лимба. Колагеновите фибрили са разположени в екстрацелуларен матрикс,

представен основно от протеоглигани. Протеоглиганите представляват полипептидни протеинови ядра, към които са свързани чрез ковалентни връзки глюкозаминоглигани. Глюкозаминоглиганите (ГАГ) са големи полизахаридни групи, съдържащи повтарящи се дизахаридни единици – глюкозамин или галактоземин като първи монозахарид и галактоза, глюкуронова киселина, идуоронова киселина като втори монозахарид. Глюкозаминоглигани, открити в стромата, са кератан сулфат, дерматан сулфат, хондроитин сулфат. Най-обилни протеоглигани са лумиканът, който съдържа кератан сулфат и декоринът, който съдържа хондроитин и дерматан сулфат. Анализи *in vitro* показват, че лумикан и декорин имат инхибиторно въздействие върху колагеновата фибрилогенеза. Основната функция на ГАГ е да поддържат интерфбрилерното пространство и триизмерната структура на стромата.

Най-многобройната клетъчна популация в роговицата е тази на кератоцитите, които имат вретеновидна форма, създават мрежа чрез звездовидни израстъци и имат спиралновидно разпределение в дълбочина на стромата. Те секретират компонентите на екстрацелуларния матрикс в стромата. Активирани кератоцити губят звездовидните си израстъци и участват в репаративните процеси на роговицата, по-рефлексивни са и са способни на голям мотилитет. При нарушение на стромата се наблюдава апоптоза на кератоцитите в съседната зона, вероятно под влияние на контакт с токсични фактори от средата, миграция на клетки на възпалението, пролиферация и миграция на съседни активирани кератоцити. Те синтезират компоненти на екстрацелуларния матрикс, нови колагенови влакна, секретират епидермален растежен фактор, фибробластен растежен фактор, нервен растежен фактор, трансформиращ растежен фактор бета, интерлевкин-1, инсулин и други. Активацията на кератоцитите се свързва с по-голямо разсейване на светлината, с което се обяснява наличието на зрителни феномени след фоторефрактивна кератектомия. Слъзният филм е токсичен за кератоцитите. Репаративните процеси в стромата протичат в два етапа – формиране на стромален цикатрикс (6 месеца) и втора фаза на ремоделиране с подобряване на прозрачността.

1.2.4. Десцеметова мембрана

Десцеметовата мембрана има дебелина от 8-10 микрона при възрастни и играе роля на базална мембрана на ендотелните клетки. Изградена е основно от колаген тип IV. Счита се, че се секретира от ендотелните клетки.

1.2.5. Ендотелен слой

Ендотелният слой е представен от 400-500хил. хексагонални клетки, разположени в един ред. С възрастта борят на ендотелните клетки намалява. Основната функция на ендотела е

обмяна на течности и вещества между роговичната строма и преднокамерната течност като се поддържа оптимално ниво на хидратация.

1.2.6. Роговична инервация

Роговицата е богато сетивно инервирана тъкан от първия клон на n. Trigemini – n. Ophthalmicus. Дългите цилиарни нерви имат циркумферентен ход около корнеоклералния преход и образуват перилимбално нервен пръстеновиден плексус, след което 60-70 нервни влакна навлизат радиално в средната строма губейки миелиновите си обвивки. Под базалната мембрана на епитела се образува нервен плексус, от който започват разклонения, чиито терминални краища завършват на нивото на апикалните епителни клетки. Различават се ноцицептори, механорецептори и рецептори за температура (студено). Роговичната инервация има трофична и протективна функция, като участва в рефлекторната дъга на мигателния рефлекс. Регенерацията на увредени нервни влакна е с около 1мм за 1 месец, като по хода на нервите се формират микроневри.

1.3. Слъзен филм

Нормалният слъзен филм е от голямо значение за правилното функциониране на роговицата. Той се състои от 3 слоя – повърхностен мастен – от мейбомиевите жлези, интермедиерен воднист – от основните и допълнителни слъзни жлези, и дълбок муцинозен слой, произвеждан от чашковидните клетки на конюнктивата. Той защитава очната повърхност от дехидратация, доставя кислород и нутриенти, имуноглобулини, лизозим, лактоферин, както и регулаторни фактори, участващи в нормалните и патологични регенераторни процеси в роговичния епител.

1.4. Анатомия на лимба

Лимбът е преходната зона между роговицата и склерата. Макар анатомичната зона да включва и трабекуларния апарат с Шлемовия канал, терминът обикновено се използва само за повърхностно разположената част, включваща епителът, подлежащата съединителна тъкан и роговично-склералните колагенови ламели.

В зоната на лимба многослойният плосък епител на роговицата преминава в цилиндричния епител на конюнктивата, като този преход демонстрира палисадна подредба – палисади на Vogt. Палисадите са здраво свързани с подлежащата базална мембрана и са богато кръвоснабдени. Заедно с интерпалисадните мрежовидни ивици (interpalisade rete ridges) осигуряват уникалната структура на лимба.

Те имат някои ултраструктурни особености и експресират компоненти от екстрацелуларния матрикс като ламинин $\gamma 3$, SPARC, and tenascin-C(5).

Наскоро са открити единствени по рода си анатомични структури, наречени лимбални епителни крипти, разположени в периферния край на интерпалисадните ивици, наброяващи около 5-7 в човешката роговица, което кореспондира с идеята за ниша или депо на стволови клетки(6). Затова се счита, че тези клетки са разположени именно на това място. Вероятно това е специализирана микросреда, наречена ниша, която създава благоприятни условия за делението на стволовите клетки. Нишата предствлява сборният ефект на други локално разположени клетки, екстрацелуларен матрикс, васкуларитет, особености на базалната мембрана и преобладаването на различни растежни фактори и цитокини. В тази зона са установени сгрупвания на силно пигментирани клетки, които протектират от неблагоприятните въздействия на ултравиолетовата светлина. Освен това зоната е богато кръвоснабдена и инервирана(7,8), което позволява достъп на лимбалните стволови клетки до повече хранителни вещества и кръвни фактори, регулиращи тяхната хомеостаза(9). В тази ниша стволовите клетки най-вероятно са под въздействието и на медиатори от съседни клетки, включително дъщерните и подлежащите мезенхимни клетки. Въпреки това не е доказано съществуването на нативна клетка от нишата „niche cell” и дали такава има роля в клоналната експанзия на стволовите клетки.

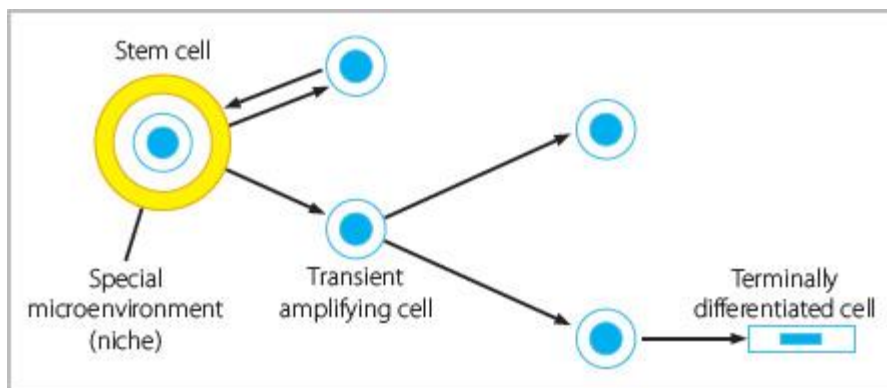
1.5 Нормални регенераторни процеси в роговицата

При изследванията на клетъчната кинетика в самообновяващите се тъкани – хемопоеична система, гастро-интестинален тракт, кожа – е установено, че клетките с потенциал за пролиферация са стволовите и преходно дялящите се клетки (transient amplifying cells - TACs). Стволовите клетки се определят като недиференцирани клетки, които могат да се делят неограничено и да генерират диференцирани клетки. Те имат следните особености: голям пролиферативен потенциал, бавен клетъчен цикъл – дълга G₀ фаза и къса S фаза(10), ниска степен на диференциация, пластицитет – способността да се трансдиференцират при поставянето им в условия, различни от нативната им среда и способността за асиметрично делене. Това асиметрично делене позволява една от дъщерните клетки да остане стволова, докато другата се диференцира в преходно-дяляща се клетка. TACs от своя страна се диференцират в постмитотични клетки докато достигнат крайно диференцирани клетки (terminally differentiated cells). Постмитотичните и TDCs губят потенциала си за клетъчно деление, имат ограничена продължителност на живот и неизменно загиват.

Шермер и сътр. установяват, че някои от епителните клетки, разположени в областта на лимба не експресират 64кДа протеин(11), който се открива в останалите роговични епителни клетки, което води до извода, че те са по-слабо диференцирани. Авторите предлагат следната схема на пролиферация: стволова клетка – базален епителен слой (TACs) – супрабазален роговичен епител (TDCs). И други проучвания са установили уникални за лимба и неговите епителни клетки особености. Както в нормални, така и в патологични условия, честотата на митозите е по-висока в областта на лимба(12), а лимбалните клетки имат най-голям пролиферативен потенциал *in vitro* в сравнение с

останалата част от роговицата(13). Импресионната цитология на лимба показва морфологията на лимбалните клетки, които са по-малки, разположени по-близо едни до други и с по-голямо съотношение ядро-цитоплазма. Установено е, че в горния и долния квадрант на лимба стволовите клетки са повече, отколкото темпорално и назално. Базалният слой лимбални клетки не притежават цитокератин 3, който е маркер за епителна диференциация. Други(14–17) особености включват: наличие на алфа енолаза(18), EGF-рецептори(епидермален растежен фактор), пигменти, цитокератин 3/12 негативен, цитокератин 19 позитивен профил, специфични(19,20) характеристики на базалната мембрана. Конексин 43 (Cx43) е gap junction протеин, експресиран от астроцитите, който вероятно има роля в туморната супресия, атеросклерозата и окулодентодигиталната дисплазия, и се открива във всички роговични клетки с изключение на базалния лимбален слой. Предполага се, че липсата му ограничава влиянието на неблагоприятни въздействия, настъпили в съседни клетки и предпазва стволовите клетки в микросредата на тяхната ниша. Zhao и сътр.(21) откриват, че в присъствието на митогени лимбалните епителни клетки експресират нестин, който е маркер за неврални прогенитори. Транскрипционният фактор рб3, участващ в морфогенезата, е предложен за разпознаване на стволовите клетки, но ролята му все още е спорна. Други маркери, проучвани за хематопоеичните стволови клетки – CD34 и CD 133, се оказват неподходящи за лимбалния епител(22). Един от обещаващите кандидати за маркиране на лимбалните стволкови клетки е АТФ-свързващ cassette транспортен протеин, който се открива в субпопулация от лимбалните клетки със способността да експулсират боята Hoechst 3342. В описаната от Дуа и сътр. лимбална епителна крипта(б) се откриват основно позитивни за този маркер клетки, които вероятно са стволкови и именно там е локализирана тяхната ниша.

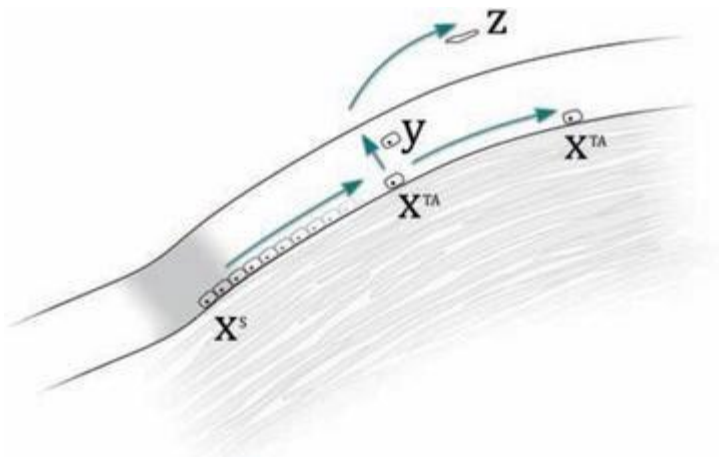
От изложеното дотук се допуска, че в роговицата стволовите клетки се намират в базалния епителен слой в областта на лимба, а ТАСs мигрират центрипетално, намират се в роговичния базален епителен слой и се делят по-често от стволовите клетки, макар да имат по-нисък пролиферативен потенциал. Благодарение на асиметричния начин на делене на стволовите клетки не се стига до редуция на броя им в областта на лимба. Дъщерната стволкова клетка остава в базалния слой на лимба и попълва стволковоклетъчната популация, а другата дъщерна клетка напуска базалния слой на лимба и започва процес на делене и диференциация. Като ТАС клетката мигрира центрипетално в базалния епителен слой на роговицата. С придвижването си към центъра ТАСs преминават в супрабазалните слоеве и се трансформират в постмитотични клетки, отговарящи на криловидните (wing cells). След това постепенно биват изтласквани към повърхността, където придобиват качествата на терминално диференцирани клетки. От повърхностния слой те подлежат на десквамация и отпадат в слъзния филм.



Фигура 1. Асиметрично деление на стволовите клетки.

Роговичният епител постоянно претърпява обновяване, като цялостната му регенерация отнема около 7 дни. Ето защо е необходим източник на материал за непрекънатите процеси на обновление, а именно лимбалните стволови клетки, които освен като резерв, служат и като пролиферативна бариера между роговичния и конюнктивния епител. Някои от постмитотичните клетки не остават в базалния слой на лимба като стволови, но и не се диференцират в ТАС. По все още неизяснени механизми те преминават в поповърхностните слоеве на лимба, като вероятната значимост на този процес е именно създаването на бариера пред конюнктивната тъкан.

Thoft и Friend(23) предлагат така наречената XYZ хипотеза, за да обяснят пролиферацията (X) на базалните роговични епителни клетки, миграцията им суперфициално и центрипетално (Y) и десквамацията (Z) им в слъзния филм. Клетъчният търноувър на роговичния епител е резултат от три независими феномени. X представлява пролиферацията и изтласкването на базалните клетки към центъра. Xs обозначава асиметричното деление на лимбалните стволови клетки, което има за резултат една дъщерна стволова клетка, оставаща в зоната на лимба и друга дъщерна клетка, която мигрира извън тази зона в базалния слой на роговичния епител и се трансформира в ТАС (X^{TA}). Векторът X^{TA} е сумарен за пролиферация и центрипетална миграция на базалните ТАС. С деленето на базалните клетки се формират супрабазалните слоеве, които са обозначени като Y вектор. Z представлява десквамацията на повърхностните епителни клетки. По този начин обновяването на роговичния епител може да се обобщи чрез израза $X+Y=Z$, който означава, че за да се поддържа роговичният епител клетъчната загуба трябва да е в баланс с клетъчната пролиферация.



Фигура 2. XYZ хипотеза за обновяване на роговичния епител.

Процесите на регенерация при тъканно увреждане на епитела протичат по сходен на нормалното обновяване механизъм. При изследването на тези процеси се откриват клинични доказателства за лимбалната локализация на роговичните стволови клетки. Големи епителни дефекти в близост до периферията зарастват по-бързо от по-малки централно разположени такива(24,25). Дефекти, частично засягащи лимба, демонстрират циркуферентна миграция на лимбални клетки под формата на пламъковидни слоеве от двата периферни ръба на увреждането(26). Едва след като е реепителизиран периферният край на дефекта се наблюдава центрипетална миграция на бързоделящи се клетки и се покрива и останалата част от роговичния епител.

В обобщение може да се твърди, че интегритетът на роговичния епител се поддържа от три фактора: нормална функция на стволовите клетки, центрипетално придвижване на TACs и десквамация на повърхностните епителни клетки. Всеки дисбаланс в тези процеси може да доведе до повърхностна пунктатна кератопатия или персистиращи/рецидивиращи епителни дефекти.

2. Лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция.

2.1 Определение:

Инсуфициенцията на лимбалните стволови клетки се определя като частично или тотално засягане на лимба от травма или заболяване с намаление на броя стволови клетки под критичния праг, при който се нарушава равновесието между загубата на клетки от повърхностните слоеве и клетъчната пролиферация. Характерни клинични прояви са персистиращи епителни дефекти, хронично възпаление, конюнктивализация и

неоваскуларизация на роговица, с последващите от това намалена прозрачност на роговицата и силно влошаване на зрението, в някои случаи до практическа слепота.

2.2. История

С възникването на концепцията за стволови клетки в роговицата и тяхната лимбална локализация започват и проучванията на различни заболявания, които водят или са резултат от намален брой стволови клетки. През 1971 – Davanger и Evensen(27) откриват, че епителната миграция и пролиферация води началото си от лимба, през 1983 – Schofield и сътр. предлагат хипотезата за ниша(28), а през 1986 – Schermer и сътр. откриват липсата на експресия на K63 в лимбалната популация клетки(11). Пелегрини и сътр. през 1997г. за първи път съобщават резултати от трансплантация на *ex vivo* размножени лимбални стволови клетки(29).

2.3. Етиология

Дефицитът на лимбални стволови клетки участва в патофизиологичните механизми на голям брой заболявания, както и в неуспеха на редица оперативни интервенции, целящи възстановяване на очната повърхност.

Лимбалната стволочклетъчна инсуфициенция може да е резултат от засягане на абсолютния брой стволови клетки или на тяхната функция – съответно морфологична или функционална инсуфициенция. Освен това тя може да се раздели на частична и тотална, унилатерална и билатерална, вродена и придобита. Настоящата научна работа предлага следната класификация на причините за дефицит на стволовите клетки на лимба:

- I. Според етиологията
1. Вродени/наследствени
 - 1.1. Аниридия
 - 1.2. Дискератозис конгенита
 - 1.3. Епидермална дисплазия
 - Кератит-ихтиоза-глухота синдром (KID)
 - Ектродактилия-ектодермална-дисплазия-схизис синдром
 - 1.4. Множествен ендокринен дефицит, Полигландуларен аутоимунен синдром 1 (ПАС1)
 2. Придобити
 - 2.1. Химична/термична травма
 - 2.2. Стивънс-Джонсън синдром (SJS, токсична епидермолиза)
 - 2.3. Цикатризиращ пемфигоид
 - 2.4. Множествени оперативни интервенции, обхващащи областта на лимба
 - 2.5. Радиотерапия
 - 2.6. Криотерапия
 - 2.7. Антиметаболити (5-Флуороурацил, митомицин С)
 - 2.8. Тежки микробни инфекции, обхващащи лимба
 - 2.9. Хроничен лимбит (вернален/атопичен конюнктивит)
 - 2.10. Продължителна употреба на контактни лещи
 - 2.11. Невротрофичен кератит
 - 2.12. Птериgium и псевдоптериgium
 - 2.13. Периферен язвен кератит (Язва на Moogen)
 - 2.14. Хронична булозна кератопатия
 - 2.15. Идиопатична

- II. Според първичния патофизиологичен момент
1. Намален абсолютен брой стволови клетки - химични/термични травми, SJS, ятрогенно (хирургия и антиметаболити), контактни лещи, тежки микробни инфекции
 2. Нарушение в лимбалната среда (ниша) и функцията на стволовите клетки - аниридия, множествен ендокринен дефицит, невротрофична кератопатия, радиотерапия, хроничен лимбит, птериgium, идиопатично

- III. Според очното засягане
1. Унилатерално
 2. Билатерално

- IV. Според разпространението на процеса
1. Частична (секторна, парциална) инсуфициенция
 2. Тотална (дифузна) инсуфициенция

- V. Стадиране според тежестта на процеса

| | Нормален лимб | Аномален спокоен | Възпален |
|---------------------|--------------------------------------|----------------------------|---|
| 1. Засягане на <50% | ятрогенни, контактни лещи, птериgium | стара лека химична травма | нова лека химична травма, умерен SJS |
| 2. Засягане на >50% | аниридия | стара тежка химична травма | нова тежка химична травма, тежък SJS и цикатризиращ пемфигоид |

Фигура 3. Етиология на лимбалната стволклетъчна инсуфициенция.

2.3.1. Аниридия

Най-честата причина за вродена инсуфициенция е аниридията(30). Аниридията е двустранно, конгенитално заболяване, което засяга множество очни структури и има честота 1/64 000 до 1/96 000, причинявано от мутации в гените PAX6, WT1, BDNF.

Класическото описание на заболяването включва триадата аниридия, фовеална хипоплазия, нистагъм(31). Липсата на ирисова диафрагма е основният белег на заболяването, като пациентите демонстрират различна ирисова анатомия, най-тежката степен на което е тотална липса на ирисова тъкан, а най-леката – умерена стромална хипоплазия с нормална зеница. Всъщност аниридията включва голям спектър от заболявания със засягане на различен брой очни структури – фовеална хипоплазия, хипоплазия на очния нерв, нистагъм, амблиопия, глаукома, катаракта, последните две търпят динамика във времето и могат да се изявят на по-късен етап. Освен това аниридията е общ клиничен белег при някои синдроми – WAGR, WAGRO, асоциирани с тумор на Вилмс, неврно-психическа ретардация, уро-генитални аномалии и други(32–34). Аниридията е сравнително рядко заболяване, което има отношение към педагогическата слепота, като в дестка възраст зрителната функция зависи най-вече от степента на фовеална хипоплазия.

Аниридията, макар да е вродено заболяване, не е статично състояние – с прогресирането на катарактата и глаукомата при тези пациенти може да има и прогресивна загуба на зрение. Друга причина за намаление на зрението е аниридия-асоциираната кератопатия (ААК), която се среща при до 90% от пациентите(35–37) и се проявява през първата декада под формата на неправилно задебелен периферен епител, багрещ се с флуоресцеин, често съпроводен с дискретна повърхностна неоваскуларизация. Характеризира се с бавна центрипетална прогресия и може да покрие цялата роговична повърхност, а без лечение да доведе и до субепителна фиброза и стромални цикатрикси. Tseng и сътр.(38) предлагат модел на инсуфициенция на лимбалните стволови клетки при аниридия-асоциираната кератопатия, който по-късно е доказан от Nishida и сътр.(37) чрез импресионна цитология. Вероятно намаленият брой стволови клетки се дължи на дефекти в ембрионалното развитие, за които в нормални условия е отговорен PAX-6 генът. Освен дисгенезия на ирисовата тъкан, вероятно процесът засяга всички структури на преднокамерния ъгъл, включително лимбалните стволови клетки.

При пациентите с ААК се откриват рецидивиращи ерозии, роговични язви, стромални цикатрикси, хронична болка и слепота. Предложена е класификация на фазите на лимбална недостатъчност при ААК(39):

| Степен | Ерозии/язви | Панус | Симптоми | |
|-----------------------|------------------------|-----------|---|--------------------------------|
| Лека инсуфициенция | Най-много повтарящи | две се | Не повече от 1мм от лимба върху роговицата | Сълзене, лека фотофобия, |

| | | | |
|-----------------------|---|--|---|
| | ерозии/улцерации за 6 месеца | | незначително багрене с флуоресцеин |
| Умерена инсуфициенция | Повече от три се ерозии/улцерации за 6 месеца | >50% от лимба +/- субепителна фиброза | Постоянни нестабилен слъзен филм, инекция, сълзене, фотофобия |
| Тежка инсуфициенция | Постоянно рецидивиращи роговични ерозии/улцерации | Достига централната роговична повърхност | Умерена + намалена на зрителна функция |

Таблица. 1. Класификация на аниридия-асоциирана кератопатия.

В началните фази на корнеално засягане най-честият терапевтичен подход е консервативният – поддържащо лечение с лубриканти, тарзорафия, терапевтични контактни лещи, които всъщност не лекуват основната причина за оплакванията и не предотвратяват прогресията на заболяването до стромални цикатрикси. При по-напреднали случаи често се пристъпва към пенетрираща или ламеларна кератопластика, която извършена самостоятелно поради естеството на заболяването (инсуфициенция на стволови клетки) търпи сериозен неуспех при тези пациенти(40).

При проследяване на зрителната острота при пациенти с аниридия се наблюдава влошаване с времето, което се отдава на прогресия в засягането на роговицата. Това се потвърждава от факта, че пациентите със стабилна очна повърхност имат по-висока зрителна острота(41). Установено е, че при пациенти без стромални цикатрикси кератолимбален алогографт е достатъчен за подобрене на зрението, докато при пациенти с вече развити цикатрикси е необходим кератолимбален алогографт, последван от пенетрираща кератопластика. Затова Holland и сътр. препоръчват провеждане на лечение с кератолимбален алогографт преди началото на цикатризиращия стадий. Резултатите от алогенни кератолимбални и екс виво размножени стволочклетъчни трансплантации са незадоволителни като успехът е значително по-нисък в сравнение с докладваните при други индикации. Допълнителен недостатък е необходимостта от продължителна имуносупресия (включително системна). В експериментална фаза са проучвания на cas9 каспазите и генното модифициране на собствени стволови клетки с коригиране на мутациите в Рах6 гена.

2.3.2 Ектодермална дисплазия

Друга причина за вродена стволочклетъчна инсуфициенция е ектодермалната дисплазия – хетерогенна група от непрогресиращи вродени заболявания, които засягат основно епидермиса и поне един от кератиновите израстъци – коса, нокти, зъби, както и потните жлези(42). Заболяването засяга по различни механизми очните структури, някои от

проявите включват – мадароза, аномалии в мейбомиевите жлези, нарушения в слъзния филм, хипоплазия на лакрималните канали, анкилоблефарон, преригиум, роговична неоваскуларизация и стромални цикатрикси (43). Описани са два типа ектодермална дисплазия с констатирана инсуфициенция на лимбалните стволови клетки (44,45). При един тип се наблюдават роговичен панус и липса на палисади на Vogt, като при биопсия не се откриват лимбални стволови клетки, както и чашковидни клетки. При детайлен преглед на пациенти с т.нар. KID синдром – кератит-ихтиоза-глухота – е открито, че 79% от пациентите с този синдром имат състояние, описано като васкуларизиран кератит, което не се повлиява от повърхностна кератектомия. Предположено е, че причината е дефицит на стволови клетки.

2.3.3. Травми

Най-честите причини за придобит дефицит на лимбални стволови клетки са травматичните увреждания на очната повърхност, в частност химичните и термичните изгаряния. В голяма част от случаите първоначалният момент е остра загуба на стволови клетки, а развитието на възпаление на по-късен етап като резултат от травмата води увреждане на средата със загуба не само на стволови клетки, но и на нормалните условия в тяхната микросреда.

С най-тежки последици за очната повърхност, а и за останалите очни структури, е увреждането от алкални агенти, поради естеството на действащата нокса. Основите предизвикват коликвационна некроза на тъканите с проникване към по-дълбоко разположени слоеве. Голяма част от химичните изгаряния с основи се случват в битови условия, като най-тежко действат амониевите съединения (амоняк), тъй като най-лесно преминават през роговицата. Амониеви съединения се съдържат в голяма част от домашните почистващи препарати и торове, което ги прави чести причинители на травми при случайно попадане върху открити тъкани. Натриевият хидроксид или сода каустик е друг химичен агент, който се съдържа в препарати за домашна употреба, например за почистване на канализация, и също има способността да преминава през роговицата. Сравнително чести причинители на битови изгаряния са калциевият хидроксид (луга) и калциевият оксид (негасена вар), които се откриват в цимент, гипс и други, но те са с по-малка прониквателна способност по отношение на роговицата, тъй като преципитират в слъзния филм. При случаи на подобни изгаряния е необходимо щателно почистване на всички преципитати.

Алкалните изгарящи агенти действат като предизвикват осапуняване на мастните киселини и протеогликаните в клетъчните мембрани и в резултат клетъчна гибел. Тежки увреждания предизвикват основи с рН по-високо от 11.0, като степента зависи от действащия агент, неговото рН, концентрация, количество и време на експозиция.

Изгарянията с киселини се срещат по-рядко и е възможно да възникнат в криминални условия. Характерно за тях е, че предизвикват преципитация и денатурация на белтъците,

формирайки своеобразна бариера за проникването на агента в по-дълбоко разположени слоеве на тъканите. Въпреки това очната повърхност се засяга тежко, като степента зависи от същите фактори като при алкалните агенти.

Симптомите в момента на травмата включват силна болка, епифора, блефароспазъм и намалено зрение. Признаците са оток на клепачите, воднист секрет, конюнктивна хиперемия, в зависимост от засягането на роговицата – намалена прозрачност, оток, лимбална исхемия.

Способността да се възстанови нормалната очна повърхност зависи от редица фактори, включително степента на загуба на лимбални стволови клетки. Наблюденията показват, че дори големи епителни дефекти се коригират нормално, ако лимбалната стволовоклетъчна популация не е засегната. За съжаление химичните изгаряния обикновено засягат поне частично зоната на лимба. Предложена е следната класификация за оценка на лимбалното увреждане(46):

| Класификация на Roper Hall на изгарянията на очната повърхност | | | | |
|---|-------------------------------|---|--------------------------|---------------------|
| Степен | Прогноза | Роговица | Конюнктива/Лимб | |
| I | Добра | Епително увреждане | Без исхемия | |
| II | Добра | Намалена прозрачност, визуализират се детайли от ириса | <1/3 исхемия | |
| III | Умерено благоприятна | Пълна дезепителизация, силно намалена прозрачност, не се визуализират ирисови детайли | 1/3-1/2 исхемия | |
| IV | Неблагоприятна | Плътено помътнена роговица, не се визуализират ирис и зеница | >1/2 исхемия | |
| Класификация на Dua на изгарянията на очната повърхност | | | | |
| Степен | Прогноза | Клинична находка | Засягане на конюнктивата | Аналогова скала |
| I | Много добра | 0 часови зони обхващане на лимба | 0% | 0/0% |
| II | Добра | < 3 часови зони обхващане на лимба | < 30% | 0.1-3/1-29.9% |
| III | Добра | 3-6 часови зони обхващане на лимба | 30-50% | 3.1-6/31-50% |
| IV | Добра до умерено благоприятна | 6-9 часови зони обхващане на лимба | 50-75% | 6.1-9/51-75% |
| V | Умерено благоприятна до лоша | 9-12 часови зони обхващане на лимба | 75-100% | 9.1-11.9/75.1-99.9% |
| VI | Много лоша | 12 часови зони обхващане на лимба | 100% | 12/100% |

Таблица 2. Класификационни системи за химичните/термични травми на роговицата.

Крайната оценка за тежестта на увреждане на лимбалните стволони клетки се поставя по появата или липсата на нормална роговична повърхност след отшумяване на острата фаза на заболяването. Когато броят на стволоните клетки е силно редуциран и се явят симптомите на хронично очно възпаление се констатира и произтичащите от това усложнения, които се характеризират с конюнктивализация и неоваскуларизация на роговичната повърхност. Често резултат на химичната травма са цикатрици на конюнктивата, симблефарон, анкилоблефарон, субепителна фиброза, скъсяване на форниксите, деструкция на чашковидни клетки и допълнителни слъзни желзи (Волфринг, Краузе). Това води до аномалии в слъзния филм, функцията на който е от изключително значение за поддържането на нормална очна повърхност, а оттам и функция на стволоните клетки. При тежки увреждания може да се развият аномалии в положението на клепачите – ентропион, ектропион, трихиаза, лагофталм и други, които също допринасят за поддържането на възпалена и непълноценна очна повърхност.

При химичните травми освен първичните химични и вторичните механични моменти, действия и особен патофизиологичен механизъм, в основата на който стоят възпалителни реакции на организма. През първите 12-24 часа от нараняването на мястото му от конюнктивните кръвоносни съдове нахлуват полиморфонуклеари (ПМН) които освобождават редица протеолитични ензими, включително колагеназа, както и токсични свободни радикали, допълнително увреждащи тъканите.

Важно за офталмологичната практика е да се има предвид, че след отшумяване на острия момент при химичните наранявания очната повърхност все още не е с нормална анатомофизиология. Необходимо е насочено да се търсят хроничните възпалителни изменения, белези на лимбална стволонклетъчна инсуфициенция, навреме да се коригират фиброзните изменения в конюнктивата и клепачите.

В острата фаза лечението включва локален анестетик, обилна промивка с физиологичен разтвор или Рингер лактат, след еверзия на клепачите, остраняване на некротичните тъкани. След това се включват различни локални медикаменти. Кортикостероидите намаляват възпалението и неутрофилната миграция, но и нарушават стромалните регенераторни процеси чрез инхибицията действието на фибробластите и синтеза на колаген. След 10 ден могат да се заместят от НСПВС. Други медикаменти са антибиотици, циклоплегичи, антиколагеназни агенти – тетрациклини и ацетилцистеин, аскорбинова киселина, която подобрява колагеновия синтез и други. Оперативното лечение включва поставяне на амниотична мембрана, трансплантация на лимбални стволони клетки, кератопластика, на по-късен етап – оперативно коригиране на симблефарон и клепачни аномалии, трансплантация на конюнктивен или лигавичен графт, кератопластика и кератопротезиране.

Термични травми

Термичните травми могат да се разделят на такива, причинени от пламъци и контактни травми, които се причиняват от контакт с нагорещени предмети или течности. Обикновено засягането на предния очен сегмент е минимално, поради протективната роля на клепачите, въпреки това роговицата може да бъде засегната от контактни термични травми, например от горещи течности и нагорещени метални частици. В повечето случаи деструкцията на стволови клетки не е достатъчна, за да предизвика клинично изявена инсуфициенция, а когато такава все пак се констатира, находката и патофизиологичните механизми са сходни с тези при химични травми.

2.3.4. Цикатризиращ пемфигоид

Очният мукозномембранен пемфигоид, известен още като цикатризиращ пемфигоид, представлява сборно понятие за група хронични прогресивни субепителни автоимунни заболявания, характеризиращи се основно с появата на везикули и були по лигавиците на окото, устната кухина и други.

За първи път заболяването е описано от Купър през 1858г., който представя пациент с булозни кожни лезии, симблефарон и ларингеално засягане. По-късно фон Грефе открива, че заболяването представлява по своята същност конюнктивна фиброза(47). И до днес цикатризиращият пемфигоид представлява интерес за офталмолози и дерматолози.

Очният мукозномембранен пемфигоид е рядко заболяване, което се проявява след 50-60 годишна възраст с двустранно асиметрично очно засягане, като засяга 2 пъти по-често женския пол. Точните причини за възникването му все още не са открити, но е доказана определена генетична предиспозиция, асоциирана с някои HLA антигени – HLA-DR2, DR4, DQw7(47–49).

Заболяването може да засегне конюнктивата, гастроинтестиналния, урогениталния тракт, лигавицата на дихателните пътища, както и кожата. Според локализацията на лезиите се различават четири типа цикатризиращ пемфигоид(50–52):

| |
|--|
| 1. Засягане на мукозните мембрани без кожни лезии |
| 2. Изолиран очен цикатризиращ пемфигоид без засягане на други лигавици или кожа |
| 3. Дисеминирана кожна форма – рядко срещана |
| 4. Локализиран пемфигоид по типа Brunsting-Perry, засягащ кожата на скалпа с формиране на остатъчни атрофични цикатрикси |

Таблица 3. Типове цикатризиращ пемфигоид.

Макар механизмите за възникването на цикатризиращия пемфигоид да не са напълно изяснени, автоимунният му характер е доказан, като се счита, че в основата му стои тип 2 цитотоксична реакция на хиперсензитивност (тъканно-специфично антителио медирана), при която антителата(53–56) са насочени към група антигени от зоната на базалната мембрана (BMZ).

Антигените, срещу които са насочени антителата при цикатризиращия пемфигоид все още не са напълно изяснени. Чрез имуноблот и имунопреципитация са идентифицирани няколко различни таргетни антигени, компоненти от различни структури на BMZ, което предполага, че няколко различни механизма водят до една и съща клинична изява, а именно появата на субепителни були(57). Циркулиращи антитела се откриват само в част от серумите на пациенти с ЦП при използване на рутинни диагностични техники, но е доказано, че анти-BMZ антителата играят основна роля в патофизиологията на заболяването.

Един от основните антигени, към които те са насочени е получен от кератиноцити гликопротеинов комплекс, наречен ламинин 5 (епилигрин(58)). Открити са автоантитела от клас IgG срещу алфа 3 субединицата на този комплекс, който представлява голям около 600kD гликопротеин, асоцииран със закотвящите филаменти в човешката епидермална BMZ(59). Ламинин 5 е основен компонент на екстрацелуларния матрикс при клетъчни култури от човешки кератиноцити, в ин витро условия той е предпочитан адхезионен лиганд на интегрин $\alpha\beta 1$ и се открива в подобни на хемидесмозомни структури в близост до интегрин $\alpha\beta 4$., чиято $\beta 4$ субединица също би могла да играе роля на антиген(60).

Друг антиген, асоцииран с хемидесмозомите на базалните кератиноцити, открит при пациенти с ЦП, е 180kD bullous pemphigoid antigen (BPAg2), колаген XVII, екстрацелуларната част на който свързва автоантитела от клас IgG и IgA. При изолирания очен ЦП(61) са открити автоантитела клас IgA срещу 45kD антиген. Друга група пациенти с ЦП са носители на IgG автоантитела, насочени срещу 168kD антиген, изолиран от булажна лигавица(62). Проучвани са и много други таргетни антигени, което говори за сложната функционална структура от множество полипептиди на ниво BMZ, срещу всеки от които може да съществуват различни автоантитела с еднакъв краен резултат.

При свързването на автоантителата с конкретния антиген в зоната на BMZ се активира системата на комплемента, което на директна и индиректна имунофлуоресценция се демонстрира като линейни депозити от имуноглобулини и комплемент (C3) по базалната мембрана. Освобождават се хемо-атрактанти, които водят до инвазия в субепителното пространство на полиморфонуклеари, лимфоцити – включително Т-лимфоцити, положителни за IL-2 рецептор с увеличено съотношение Т helper/Т suppressor, Лангерхансови клетки, макрофаги, плазмоцити, мастоцити, чиито хидролитични ензими водят до образуването на субепителни були. Подобни инфилтрати има както в конюнктивния епител, така и в стромата(53,63).

Основните цитокини, които имат роля в патогенезата на заболяването, са IL-2, platelet-derived growth factor, basic fibroblast growth factor, TNF- α , TGF- β и маркери за пролифериращи клетки като Ki-67, като последните два се откриват в острия стадий на заболяването(64). При пациенти с ЦП се откриват повишени нива на migration inhibitory factor, чиято експресия се индуцира от TNF- α .

Като причина за субепителната фиброза се сочат инфилтриращите макрофаги заедно с конюнктивните фибробласти. Фиброгенни и ангиогенни цитокини като TGF- β , platelet derived growth factor, basic fibroblast growth factor, освобождавани от макрофагите, водят до фибробластна активация, миграция и пролиферация. Последващата хиперпролиферация на фибробластите води до формиране на субепителна фиброза с отлагане на колаген I и III и формиране на цикатрикси(65).

Морфологичните изследвания показват повишена митотична активност на конюнктивните епителни клетки, липса на диференциация и редуциран брой чашковидни клетки. Базалната мембрана е с нарушена структура, неравномерна дебелина, повишена концентрация на десмозоми и дисорганизиран колагенни фибрили(66). Този процес може да доведе до метаплазия, паракератоза и кератинизация на очната повърхност.

Клинично заболяването се извява с асиметрично билатерално засягане и протича като хроничен цикатризиращ конюнктивит. В ранните стадии се характеризира с умерено неспецифично възпаление на конюнктивата със или без мукопурулентна секреция, протичащо с конюнктивна хиперемия, едем и дисфункция на слъзния филм. Субективните симптоми включват дразнене, сърбеж, чувство за чуждо тяло, зачервяване, замъглено зрение и сълзене(67). Появилите се були на конюнктивата бързо се разкъсват и новосформирана съединителна тъкан със способност да се контрахира инвазира субепителното пространство първо в долния конюнктивен форникс под формата на нежни сиво-белезникави линейни ивици под задебелената конюнктива(68). Ранен клиничен белег е засягането на структурите на медиалния кант(69), което води до загуба на нормалната архитектура с изглаждане на конюнктивните гънки, плика и карункула и плитките кантални рецесуси(70).

Цикатризиращият пемфигоид уврежда тежко очната повърхност, като води до силно изразени симптоми на сухо око, зад които се крият няколко патогенетични механизма – фиброзните промени водят до симблефарон, загуба на чашковидни клетки, скъсяване на форниксите, фибротична оклузия на изходните отворстия на слъзната жлеза и мейбомиевите жлези, което има за резултат инсуфициенция и на трите слоя на слъзния филм. В допълнение могат да се развият ентропион, трихиаза, лагофталм, което спомага за развитието на кератинизация на задебелената конюнктива, вторични инфекции и кератопатия. Патогенни микроорганизми са изолирани при 81% от пациентите с ЦП предимно от групата на стафилококите(71).

За развитието на кератопатия при ЦП играят роля няколко фактора – инсуфициенцията на слъзния филм, трихиазата с възникване на роговични абразии, вторичните инфекции. Освен това се наблюдава загуба на лимбални стволови клетки, което клинично се проявява с малки епителни дефекти, прогресиращи към големи роговични улцерации или появата на псевдоптериgium. Резултатът е неоваскуларизация, прогресивно изтъняване и перфорация, а в крайните стадии тотална кератинизация на цялата очна повърхност.

Цикатризиращият пемфигоид се характеризира с хронично-рецидивиращ ход с ремисии и екзацербации, като от основно значение за разпознаването на прогресията в промените са степента на конюнктивно скъсяване и тежестта на възпалителната активност. Засягането на конюнктивата се дефинира като загуба на форникси – дълбочина на долния форникс под 8мм – и нови или увеличаващи размерите си повлекла на симблефарон. Епизодите на остро конюнктивно възпаление могат да ускорят прогресията на конюнктивно скъсяване, клинично се проявяват като локални или дифузни улцерирани зони на конюнктивна хиперемия и едем и могат да бъдат причинени от оперативни интервенции като биопсия, корекция на симблефарон и ентропион, катарактна хирургия.

Съществуващите клинични класификации се базират на степента на конюнктивно скъсяване и наличието на симблефарон(72):

| | Mondino, Brown | Foster |
|------------|---------------------------------------|--|
| I стадий | По-малко от 25% скъсяване на форникса | Хроничен конюнктивит, субепителна фиброза |
| II стадий | 25–50% скъсяване на форникса | Скъсяване на форниксите |
| III стадий | 75% скъсяване на форникса | Формиране на симблефарон |
| IV стадий | Краен стадий ЦП | Ограничена очна подвижност, поради адхезии между клепачите и булба |

Таблица 4. Класификация на симблефарон.

Екстраокулярните прояви на заболяването включват засягане на лигавиците на различни органи и кожата, като животозастрашаващи са цикатриксите и стриктурите по хода на дихателните пътища и гастроинтестиналния тракт.

Диагнозата на очния цикатризиращ пемфигоид се поставя на базата на биопсия от зона на активно засягане на конюнктивата или от долния форникс при дифузно засягане чрез имунофлуоресцентно и имунопероксидазно оцветяване, при което се наблюдава характерното линейно отлагане на IgG, IgA и C3-фракцията на комплемента в зоната на базалната мембрана. В серума на някои пациенти е възможна детекцията на циркулиращи

анти-VMZ антитела. При засягане на други мукозни мембрани и кожа също е необходимо биопсирането на активните зони.

Преобладаващите морфологични изменения при ЦП включват плоскоклетъчна метаплазия на епитела, загуба на чашковидни клетки, различна степен на субепителна васкуларна пролиферация, възпалителен периваскуларен мононуклеарен инфилтрат в стромата и фиброза на субстанция проприа с новосформирана съединителна тъкан. При тежко възпаление се наблюдава фокална некроза и инфилтрация от неутрофили(73).

Сходни са промените и при други булозни състояния, което прави диференциалната диагноза на ЦП обширна и включва постинфекциозни, автоимунни, алергични, травматични и други състояния:

| Инфекциозни | Автоимунни | Алергични | Други |
|---|--|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> · Трахома · Аденовирусни инфекции · Стрептококови инфекции · Инфекции с <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | <ul style="list-style-type: none"> · Цикатризиращ пемфигоид · Саркоидоза · СЛЕ · Склеродермия · Лихен планус · Херпетиформен дерматит · Епидермолизис булоза · Graft-vs-host | <ul style="list-style-type: none"> · Атопичен кератоконюнктивит · Стивънс-Джонсън синдром | <ul style="list-style-type: none"> · Розацея · Химично изгаряне · Травми · Медикаменти · Радиация · Неоплазия |

Таблица 5. Диференциална диагноза на цикатризиращия пемфигоид.

Лечението на заболяването изисква мултидисциплинарен подход, поради засягането на множество органи. В основата му седи имуномодулиращата терапия с различни агенти в комбинация. При преценка за високо-рисков пациент - с множествено лигавично засягане или бърза прогресия на заболяването – терапевтичния подход започва с циклофосфамид и преднизон с доза 1.5-2.0мг/кг/ден. Други възможности при такива пациенти са Etanercept, IVIG, Mofetil Мусорphenolate, Azathioprine и други. При ниско-рискови пациенти подходящ избор е Dapsone. Топикално витамин А има благоприятен ефект върху плоскоклетъчната метаплазия като в определена степен може да намали кератинизацията, при изолиране на патогенни микроорганизми се включват антибиотични мехлеми. Лубрикантите и капки от автоложен серум също имат благоприятен ефект върху очната повърхност. Освен имуномодулацията лечението трябва да е насочено и към локалните очни промени, за да се предотврати прогресията на заболяването към кератопатия. От основно значение е корекцията на налични ентропион, трихиаза, симблефарон, псевдоптеригиум. За форниксова реконструкция се използват различни мукозни транспланти, а за подобряване на слъзния филм се препоръчва оклузия на пунктите. При наличие на лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция комбинацията от лимална трансплантация и амниотична

мембрана с последваща тарзорафия е показала обещаващи резултати(74). При напреднали случаи се пристъпва към кератопластика, за успеха на която са необходими както спокойна очна повърхност, така и нормална функция на лимбалните стволови клетки. При крайните стадии на заболяването алтернатива е кератопротезирането.

2.3.5. Стивънс-Джонсън синдром

Синдромът на Стивънс-Джонсън е рядко инвалидизиращо автоимунно заболяване, част от група остри състояния, характеризирани се с появата на везикули и були по кожата и лигавиците. Първите описания датират от 1866(75), а през 1922 (76)Стивънс и Джонсън описват подробно състоянието. Съществуват множество взаимозаменяеми термини за тази група заболявания, което налага въвеждането на консенсусна класификация(77):

| Класификация | ЕМ минус | ЕММ | SJS | Припокриващ се SJS-ТЕН | ТЕН с петна | ТЕН без петна |
|-------------------------------|----------|-----------|------------|------------------------|----------------|----------------|
| Отделяне на дермиса | не | <10% | <10% | 10-30% | >30% | >10% |
| Разпределение | крайници | крайници | Лице, торс | Лице, торс | генерализирано | генерализирано |
| Мукозно засягане | рядко | + | + | + | + | + |
| Общи симптоми | (+) | + | + | + | ++ | ++ |
| Типични кожни таргетни лезии | + | + | - | - | - | - |
| Атипични кожни таргетни лезии | - | надигнати | плоски | плоски | плоски | - |
| Кожни макули с/без мехури | - | - | + | + | + конфлуиращи | + |

Таблица 6. Класификация на еритема мултиформе (ЕМ), Стивънс-Джонсън синдром (SJS) и токсична епидермална некролиза (ТЕН)

Терминът еритема мултиформе се отнася за остра възпалителна везикулобулозна реакция на кожата и мукозните мембрани. Когато засягането е само кожно използваният термин е erythema multiforme minor, когато са налице лезии по кожата на крайниците и лигавиците се говори за erythema multiforme major. Според най-новите схващания Стивънс-Джонсън синдромът и токсичната епидермална некролиза (ТЕН) са различни прояви на една нозологична единица. В сравнение с ТЕН останалите форми засягат по-млади хора, включително деца, по-често мъже, протичат по-често със засягане на мукозните мембрани и по-нисък леталитет.

Рискови фактори за развитието на тези заболявания са принадлежност към определен HLA генотип (генетично предразположение) и влиянието на външни фактори, които играят роля на отключващ момент. Точният механизъм, водещ до появата на групата булозни

състояния, към които принадлежи Стивънс-Джонсън синдромът, не е уточнен. Установено е, че повечето от тях са свързани със свръхчувствителност към медикаменти, инфекции, малигнитет, съединително-тъканни заболявания или често комбинация от тези фактори. Определена HLA принадлежност – HLA-B12 – е установена при пациенти със SJS с очно засягане и ТЕН(78). При друга група ТЕН с история за лечение със сулфонамиди е установена повишена честота на HLA-A29, -B12 and -DR7, DQw3(79). Предполага се, че е възможно някои HLA генотипи да имат отношение към метаболитни механизми на детоксикация на медикаменти и следователно да създават генетична предиспозиция към SJS и ТЕН(80).

Най-често документираният преципитиращ външен фактор при групата на булозните състояния са лекарствените средства като антибиотици (особено сулфонамиди, цефалоспорици, пеницилин), НСПВС (салицилати), антиконвулсанти, барбитурати, изониазид(81,82). Приемът предхожда появата на симптоми от 7-21 дни. Съществуват данни, че и локалното приложение на лекарствени средства (сулфонамиди, тропикамид) може да отключи заболяване, но при всички докладвани случаи има история за предхождащ системен прием на обвиняваното средство(83). Макар медикаментите да се сочат за основна причина при всички възрастови групи, по-често те причиняват заболяване при деца и млади пациенти до 20-годишна възраст.

Въпреки, че лекарствените средства се смятат за най-честия отключващ фактор, редица инфекциозни причинители също играят роля в патогенезата на заболяването – Herpes simplex virus тип 1 и 2, Mycoplasma pneumoniae, Adenovirus, Streptococcus spp., някои чревни патогенни микроорганизми, антигени, съдържащи се в някои ваксини – Дифтерия/тетанус и Хепатит В(81). Интересни са данните, че до 80% от пациентите с ЕММ са прекарвали инфекция на горните дихателни пътища преди началото на заболяването, в кожните лезии на пациенти с ЕММ е изолирана HSV-ДНК, клинично рецидивите на ЕММ и HSV често се наблюдават симултанно.

Важно е да се отбележи, че при пациенти със СПИН, при които булозните състояния възникват многократно по-често, рискът е по-висок при лечение на пневмония с причинител *Pneumocystis carinii*.

Точният имунологичен механизъм, по който възниква заболяването все още не е идентифициран, но данните, че състоянието възниква 1-3 седмици след прием на определен медикамент, както и наличието на бърза възпалителна реакция след повторна експозиция към него насочва към развитие на тип III хиперсензитивна реакция. Съвременните схващания са, че медикаментозната свръхчувствителност се базира на хаптеновата хипотеза, според която веществата стават имуногенни едва след като са метаболитно активирани. След взаимодействие с клетъчни макромолекули те индуцират продукцията на специфични антитела или активират специфични Т-лимфоцити(84). В процеса участие вземат различни цитокини, секретирани от Т-лимфоцити, макрофаги и кератиноцити по-важните от които

са TNF- α , открит в повишени концентрации в серума на пациенти със SJS, интерлевкин-6 и 18 (IL-6, IL-18), което води до повишена експресия на Fas и FasL или до промотиране на лимфоцитната миграция в кожата чрез увеличен брой адхезионни молекули(85).

При развитие на заболяване от групата на еритема мултиформе, свързана с инфекциозна патология, са констатирани по-различни механизми. При инфекцията с HSV например чрез кръвните моноклеари фрагменти от вирусната ДНК попадат в таргетните органи (кожа, лигавици) и гени, съдържащи се в тези фрагменти се експресират по повърхността на кератиноцитите. Това от своя страна води до инфилтрат от HSV-специфични CD4+ Т-лимфоцити, които секретират γ -интерферон с последваща инфламаторна реакция и секреция на други цито- и хемокини, привличащи на място цитотоксични Т-лимфоцити и NK-клетки(86), които експресират skin-homing receptor и cutaneous lymphocyte-associated antigen(87,88). Тези клетки освобождават перфорин и гранзим В, което води до апоптоза.

Докладвани са противоречиви промени в съотношението CD4+/CD8+ Т-клетки в конюнктивата на пациенти със заболявания от групата на еритема мултиформе. Докато в конюнктивата на здрави индивиди преобладават CD8+ клетки, то при пациенти със SJS Foster и сътр. откриват повишен брой CD4+(89). В друго проучване на ЕММ с тежко очно засягане са констатирани повишени нива на CD8+ клетки(90). Все пак и в двата случая HLA-DR+ клетки са многобройни, като някои от тях са класифицирани като лангерхансови клетки, макрофаги и активирани Т-лимфоцити.

Роля в патогенезата на SJS и ТЕН играе Fas-лиганд (FasL)-медираната апоптоза, като при свързването на FasL към клетъчния Fas рецептор се формират каспази, които водят до клетъчна смърт(91). Апоптозата на епителни клетки е отличителен белег на SJS(92). За разлика от нормалните кератиноцити, при които FasL е слабо експресиран и локализиран вътреклетъчно, в кератиноцити от лезии на пациенти с ТЕН е открита маркатно повишена експресия на мембранно-свързания FasL по повърхността им(93), като кератиноцитният FasL има цитолитична активност. От друга страна е открита и повишена експресия на блокиращия апоптозата Bcl-2 протеин(94), което подсказва, че Fas-медираната апоптоза на кератиноцитите играе роля в патогенезата на SJS(95).

Освен клетъчния имунитет в патогенезата на заболяването участие взема и хуморалния чрез откритите при пациенти с ЕММ IgG антитела срещу дезмоплакин I и II, свързани към епидермиса на кожните лезии(96).

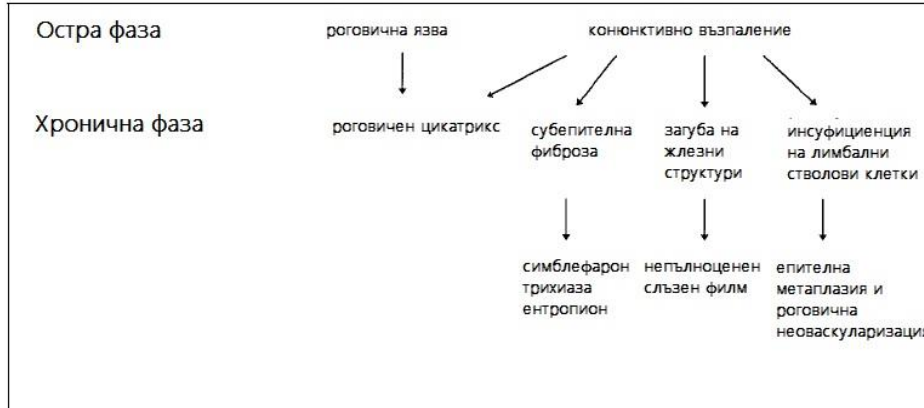
Патохистологичните промени в конюнктивата при пациенти със SJS в остриите стадии се изразяват в неспецифичен моноклеарен инфилтрат в субепителните слоеве на конюнктивата(89), фибриноидна некроза на съдовете и повишена пролиферация на базалните епителни клетки. С прогресията на заболяването се наблюдава подчертано намален брой чашковидни клетки. Хроничното засягане на конюнктивата води до кератинизация на очната повърхност, включително роговицата. Открити са някои разлики

между острите и рецидивиращите случаи на SJS. При изолираните епизоди на SJS се наблюдава епителна кератинизация с намален брой чашковидни клетки и мононуклеарен инфилтрат, както и отлагания от IgG, IgA, IgD, C3, C4 без данни за васкулит, докато при рецидивиращите случаи подобни отлагания не се наблюдават за сметка на наличен васкулит с фибриноидна некроза на съдовете(97).

Клинично заболяването започва остро с фебрилитет, миалгия, артралгия, отпадналост и поява на кожни и/или лигавични лезии. Кожните лезии са с таргетна форма – еритематозен център с блед пръстен около него и периферно разположен еритематозен пръстен с неясни граници, при ЕММ - над нивото на заобикалящата ги кожа и разположени по крайниците. Стивънс-Джонсън синдромът се характеризира с подобни лезии, но плоски, с формиране на централни везикули и обхващащи и трункуса. И двете състояния засягат поне две мукозни мембрани и по-малко от 10% от епидермиса. Много по-драматично протича ТЕН с поява на були по повече от 20% от повърхността на тялото с често засягане на лицето и отпадане на епидермиса по повече от 3см наведнъж. Признакът на Николски е положителен – при механичен натиск върху кожата тя се отделя и свлича. Тежките и понякога животозастрашаващи прояви на ТЕН са бъбречна дисфункция, сепсис, кървене от ГИТ, белодробен тромбемболизъм.

Очно засягане се наблюдава в до 80% от случаите на ЕММ, SJS и ТЕН, като е най-често двустранно, симетрично, може да се развие преди, симултанно с или след появата на кожните лезии(93). Острите очни прояви включват оток и хиперемия на клепачите, крусти и улцерации по клепачния ръб, белези на конюнктивно възпаление, най-често гноен или мембранозен конюнктивит, кератит(71,98,99), възможно е развитието на преден увеит. В началото се развива неспецифичен конюнктивит с мукопурулентен секрет, формират се були на конюнктивата, които след това улцерират(100,101). Роговични язви се развиват при тежко очно засягане и често се усложняват с микробна инфекция(102).

Хроничното засягане на конюнктивата може да протече по общ за възпалителните заболявания на окото път. Субепителното възпаление може да доведе до субепителна фиброза, клинично проявена като цикатризиращ конюнктивит с формиране на симблефарон, скъсяване на долния форникс, кератинизация на клепачния ръб, ентропион, трихиаза и дистрихиаза, роговична неоваскуларизация и кератинизация на очната повърхност с плоскоклетъчна метаплазия на епитела(81). Загубата на чашковидни клетки и други жлезни структури води до образуването на непълноценен слъзен филм(103), развитие на keratoconjunctivitis sicca, увеличен риск за микробна инфекция и формиране на роговичен панус с повишен брой на роговичните клетки от конюнктивен произход. Това предполага инсуфициенция на лимбалните стволови клетки.



Фигура 4. Клинични прояви на еритема мултиформе и свързаните с нея нозологични единици.

Роговицата може да бъде засегната първично през острата фаза на заболяването или като последица от измененията в очната повърхност при хроничната, което се изразява в хронична епителопатия, персистиращи епителни дефекти, формиране на панус, субепителни цикатрикси, стромална неоваскуларизация и изтъняване. Загубата на прозрачна роговична тъкан е основната причина за тежкото намаление на зрението(104,105).

Диагнозата се поставя на базата на клиничните белези на остро начало с типични кожни лезии и свличане на кожния и лигавичния епител, положителна анамнеза за предхождащи инфекции или прием на лекарствени средства. Диференциално диагностично трябва да се вземат под внимание Staphylococcal scaled skin syndrome, toxic shock syndrome, цикатризиращ пемфигоид, трахома и други очни заболявания, протичащи с хронично възпаление.

В острите фази на заболяването лечението зависи от тежестта на процеса – при усложнени форми на SJS/ТЕН се налага хоспитализация в отделение за интензивно лечение с адекватно заместване на алкално-киселинното равновесие, системно приложение на имуномодулатори (циклоспорин, циклофосфамид) и антибиотици в случаи на сепсис. Употребата на кортикостероиди все още е обект на дебати, тъй като те могат да влошат някои от общите прояви на състоянието – инфекции, хеморагии от гастроинтестиналния тракт и други.

В острите фази на очно засягане се прилагат обилно лубриканти, които не съдържат консерванти, или капки от автоложен серум, иригация със стерилни разтвори за отмиване на детрит и задържани секрети, при положителни микробиологични проби и локални антибиотици. При наличие на вътрочно възпаление се добавят циклоплегици без употреба

на кортикостероиди. Оперативно се лизира наличен симблефарон, а при роговична перфорация се налага кератопластика. В хроничния стадий за поддържане на очната повърхност също се използват лубриканти или оклузия на пунктите, добър ефект върху кератинизацията има приложението на витамин А. Основна роля играе хирургичното лечение с корекция на всички клепачни аномалии (трихиаза, ентропион) и симблефарон, като обикновено се комбинира с трансплантация на мукозна или амниотична мембрана и лимбални стволови клетки. При силно намалена роговична прозрачност може да бъде извършена кератопластика след кератолимбална трансплантация, а в много напреднали случаи се прибегва до кератопротезиране.

2.3.6. Ятрогенна лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция

Причина за инсуфициенция на лимбалните стволови клетки могат да бъдат и множествените оперативни интервенции в областта на лимба, както и медикаменти, криотерапия и радиотерапия. По своето естество те са ятрогенни. Шварц и Холанд описват пациенти(106) с хронична периферна прогресираща към центъра епителопатия с дискретна неоваскуларизация, за която не се открива подлежащо заболяване и не се повлиява от стандартно лечение, както и от пълното преустановяване на топикални медикаменти. При тези пациенти се открива, че са претърпели неколкостотни операции в областта на лимба, като най-често засягането е в кореспондираща на оперативната област горен квадрант, който е по-богат на стволови клетки. Макар оперативните интервенции обикновено да не водят до клинично сигнификантна инсуфициенция, дори минималната загуба на стволови клетки е предразполагащ фактор за възникване на такава при поява на допълнителен увреждащ фактор. Например, принос за развитието на стволовоклетъчна недостатъчност имат и топикалните медикаменти, включително пилокарпин, бета-блокери, антибиотици, кортикостероиди, антимераболити. Всички те са токсични за роговичния епител и могат да доведат до заболявания на очната повърхност.

Клинично изязвата на ятрогенната инсуфициенция на стволови клетки е бавнопрогресираща към центъра епителопатия, леко до умерено възпаление, секторно засягане, което води до формиране на клиновиден участък в областта на предхождащите операции и я отличава от останалите форми, които са с тенденция за обхващане на лимба циркулярно. Дефицитът на стволови клетки при тези пациенти има мултифакторна патогенеза и изисква комплексен подход към тяхното състояние.

2.3.7. Контактни лещи

Патогенезата на лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция, асоциирана с употребата на контактни лещи, е мултифакторна. Rossen и сътр. предлагат комбинация от три механизма – микротравма, токсичност на консервантите в разтворите за контактни лещи, възпаление поради хиперосмоларитет и хипоксия(107).

Особеностите на лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция, свързана с употреба на контактни лещи са, че тя е най-често двустранно, засяга по-често женския пол, поради по-честа употреба на контактни лещи и по-чест синдром на сухото око. Установена е корелация между продължителността на носене на контактни лещи и възникването на лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция(108).

Някой от пациентите първоначално са без оплаквания, но при напредване на процеса възникват намалено зрение, сълъзене, дразнене, болка, фотофобия, зачервяване, чувство за чуждо тяло, блефароспазм. Обективните признаци включват нарушение на контура на палисадите, периферна неоваскуларизация, конюнктивализация с наличие на сивкав конюнктивен епител по повърхността на роговицата в типична вортесна конфигурация. Най-често процесът започва от горната част на лимба. Използването на флуоресцеин демонстрира точковидно багрене в началото, което по-късно преминава в линейно и в крайните фази на конюнктивализация дифузно късно багрене.

2.3.8. Невротрофична кертопатия

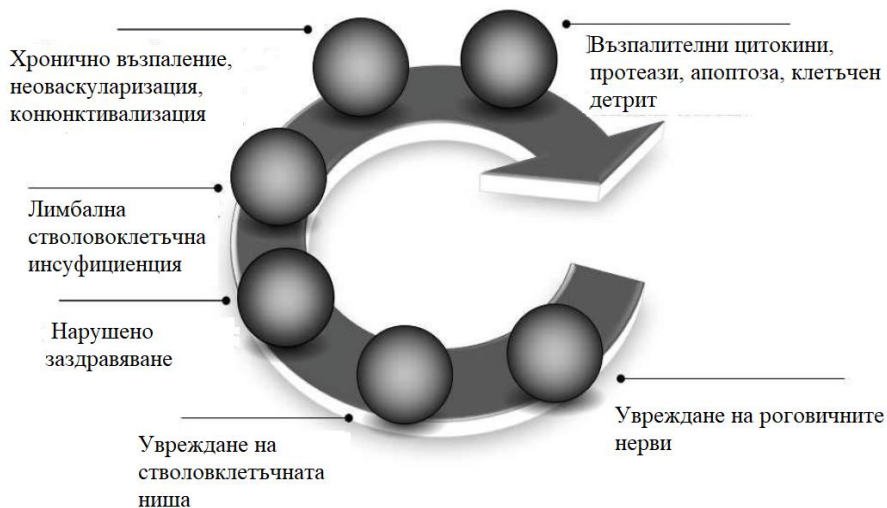
Невротрофичната кертопатия е заболяване, свързано с промени в роговичните нерви водещи до нарушение в сензорната и трофичната функция, засягащо здравето и интегритета на епитела и стромата. Етиологията на невротрофичната кертопатия включва системни и локални състояния. Системна коморбидност за инсулт, диабет, мултипла склероза, болест на Паркинсон, менингиома, парализа на тригеминалния нерв могат до доведат до промени в роговичната инервация. Локалните фактори, които увреждат роговичните нерви включват инфекция с херпетични вируси, големи повтарящи се хирургични интервенции, химични и термични изгаряния, локална ирадиация, топикални медикаменти (особено анестетици)(109,110).

Основният патофизиологичен елемент е увреждането на роговичните нерви от някои от споменатите фактори с дисфункция и нарушена активност на епителните клетки и кератоцитите, активация на матриксни металопротеинази със загуба на екстрацелуларен матрикс, активация на имунни клетки и разпадане на епитела и стромално изтъняване.

Процесът се характеризира с редуцирана роговична сетивност и епителни нарушения. Невротрофичната кертопатия се стадира по класификацията на Mackie в Стадий I с епителни нарушения и хиперплазия, намалена роговична прозрачност, точковидна кертопатия, повърхностна неоваскуларизация и стромални цикатрикси, Стадий II – епителен дефект с гласки и подкопани ръбове и стромален едем и Стадий III – роговична язва, стромално изтъняване и перфорация(111).

Роговичните нерви са от основно значение за поддържане на нормалната лимбална стволовоклетъчна популация, тъй като са елементи на нишата(112). Няколко проучвания демонстрират, че загубата на роговична инервация води до намалена виталност, метаболизъм и митози на епителните клетки(113). Следователно, загубата на трофичната функция на роговичната инервация може да доведе до лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция, която допринася за вече нарушения процес на роговично заздравяване.

Резултатът е порочен кръг с постоянен поток на възпалителни клетки, цитокини и протеази водещи до клетъчна апоптоза и загуба на екстрацелуларен матрикс(114,115) (Фигура 5).



Фигура 5. Порочен кръг на роговично увреждане при невротрофична кератопатия.

Консервативното лечение на невротрофичната кератопатия е подходящо при Стадий I и II и включва топикални либриканти без консерванти, имуномодулатори, терапевтични контактни лещи, автоложен серум, плазма богата на тромбоцити, суха амниотична мембрана. В момента се проучват регенеративни агенти и топикален нервен растежен фактор. При Стадий III се предпочита хирургично лечение за да се предотврати стромалното изтъняване и перфорация. Оперативните интервенции включват тарзорафия, конюнктивно ламбо, трасплантация на амниотична мембрана или роговица, тъканно лепило(116).

2.3.9. Птеригиум

Птеригиумът е често срещана лезия на очната повърхност, започваща от лимбалната конюнктива и напредваща криловидно към центъра на роговицата в палпебралната фисура. Съществуват хипотези, че възникването на птеригиума се дължи на нарушена бариерна функция на лимбалния епител(117). Das и сътр.(118) откриват хистологични сходства между птеригиума (задебелен епител, струпвания от чашковидни клетки, клетъчна хиперплазия, нарушена базална мембрана, неоваскуларизация, лимфоцитна инфилтрация) и лимбалната стволовклетъчна инсуфициенция (неоваскуларизация, епителна хиперплазия, хронично възпаление). Дисрегулацията на елементите от нишата могат да са част от патогенезата на птеригиума или да са резултат от нарушена хомеостаза на лимбалния епител.

2.4. Патоанатомия и патофизиология

Според различните етиологични причини патофизиологията на дефицита на лимбални стволови клетки е различна и бе разгледана при всяка нозологична единица. Докато при генетичните заболявания дефицита се свързва с вроден по-нисък брой на клетките или генетичен дефект водещ до нарушение на пролиферацията и функцията им, придобитите причини се разделят на имуномедиирани (Стивънс-Джонсън синдром, циктризираш пемфигOID, вернален/атопичен кератоконюнктивит) и неимуномедиирани (химични травми, контактни лещи, хирургия, токсичност). Възможно е лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция да е общ патофизиологичен механизъм при редица заболявания.

Хистологично се откриват инвазия и хиперплазия на епител с фенотипни характеристики на конюнктивен, неоваскуларизация, нарушение на базалната мембрана, активна фиброза, инфилтрати от възпалителни клетки. Наличието на чашковидни клетки по роговичната повърхност е характерен за инсуфициенцията белег, но може да не се открива в до 30% от пациентите.

2.5. Клинична картина

Първоначално пациентите могат да нямат оплаквания, но с напредване на процеса се появяват дискомфорт, дразнене, усещане за чуждо тяло, зачервяване, непоносимост към контактни лещи, съзене, сухота, блефароспазъм, болка, фотофобия, намалено зрение. Анамнестичните данни насочват към конкретна етиология – например химично изгаряне, травма, токсичност. Болката обикновено се дължи на рецидивиращи ерозии и нарушена инервация.

Симптомите на лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция включват данни за хронично възпаление („червено око“), намалено зрение, епифора, фотофобия, блефароспазъм, повтарящи се епизоди на дразнене, болка, чувство за чуждо тяло, които настъпват при свличане на нестабилния епител(119). От значение са анамнестични данни за прекарани химични/термични травми, алергии, употреба на контактни лещи, общи заболявания, инфекциозни заболявания, оперативни интервенции, засягащи областта на лимба, прием на медикаменти (антибиотици, антиконвулсанти, НСПВС).

Признаците на лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция включват триадата конюнктивализация, неоваскуларизация, хронично възпаление. Биомикроскопията разкрива епителни дефекти, неравна роговична повърхност, със сектори на хиперпластичен епител, стромални цикатрикси и намалена прозрачност на роговицата. Биомикроскопски могат да се наблюдават промени в положението на клепачите (ентропион-трихиаза), дисфункция на клепачните жлези, хиперемия на конюнктивата, симблефарон, скъсяване на форниксите. Слъзният филм е непълноценен с ускорено време на разкъсване, наличие на филаменти и акумулиране на мукозен секрет. Налице е неправилен роговичен рефлекс, вариабилна дебелина и прозрачност на роговицата, загуба на нормалната структура на лимба, епителни дефекти(120).

В зоната на лимба се открива заличен контур на палисадите на Vogt с хиперемия, задебелен епител и периферна роговична неоваскуларизация. Напредващите центрипетално неосъдове могат да са разположени повърхностно и субепително. Постепенно метапластичен конюнктивен епител напредва от периферията към центъра на роговицата, което води до формиране на демаркационна линия между останалия нормален роговичен епител и абнормния. Последният е с повишена пропускливост, поради което в зоната на демаркационната линия се задържа флуоресцеин, получава се т. нар. точковидно багрене(121–123). Багрелото маркира персистиращи и рекурентни епителни дефекти, резултат от порочен кръг на реепителизация и разпадане на нестабилния новосъздаден епителен слой(124). Възможно е това да се дължи на разпадане на междуклетъчните контакти (tight junctions) под въздействието на медиатори на възпалението (основно матриксните металопроотеинази) по механизъм, сходен с този съобщен от Giebel и сътр(125). Докато повърхностните епителни клетки на роговицата са свързани помежду си чрез плътни връзки (zonula occludens/tight junction), непозволяващи преминаване на водноразтворими молекули между тях, то при конюнктивния епител се наблюдават по-свободни междуклетъчни контакти. Пермеабилитетът на конюнктивния епител за флуоресцеин до 40 пъти по-висок от роговичния. При лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция епителът по повърхността на роговицата може да е с неоваскуларизация и конюнктивен фенотип, само конюнктивен без неоваскуларизация или смесен метапластичен роговичен и конюнктивен епител. Флуоресцеинът позволява да се визуализират както зоните на конюнктивализация, така и зоните на епителна нестабилност. Докато епителните дефекти се багрят едновременно и ясно с флуоресцин, багрелото се разпределя в парацелуларното пространство на конюнктивализираната повърхност и се наблюдава късно багрене до повече от 10 минути(126,127). Дори след иригация с изкуствени сълзи, багренето персистира. Роговичният епител нормално е гладък и плътен, докато конюнктивализацията е неравномерна и тънка. На границата между плътния роговичен епител и тънката конюнктивализация се наблюдава струпване на флуоресцеин (pooling), който подчертава зоната на неоваскуларизация. Типът на багрене и интензитетът зависят от тежестта на процеса. При леките и ранни стадии, често само със сектрона лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция, се наблюдава само точковидно багрене. С напредване на процеса се забелязва нарушен роговичен рефлекс, неравен и непрозрачен епител, повърхностна неоваскуларизация и панус. Възможно е да възникнат дълбоки стромални инфилтрати и дори до перфорация.

В по-тежките случаи дезепителизираната роговица се покрива от плътна фиброваскуларна съединителна тъкан с различна дебелина – панус(128), върху която се разполага задебелен многослен епител с конюнктивен фенотип.

В зоната на лимба палисадите на Vogt се оплоскостяват или изчезват(129). В по-тежките стадии абнормният епител се разпростира в спираловиден ход и се описва като вортекс кератопатия. Появява се субепителна фиброза, фиброваскуларен панус, стромални

цикатрикси, персистиращи и/или рекурентни ерозии и неоваскуларизация (поради липсата на антиангиогенни свойства в конюнктивния епител в сравнение с роговичния). В крайния стадий на заболяването се наблюдават скарификация, частична или тотална кератинизация и последваща калцификация при сравнително спокойни очи, тъй като възпалението вече е затихнало.

2.6. Диагноза

Биомикроскопската находка има своите диагностични ограничения. Затова са необходими допълнителни изследвания, които да потвърдят диагнозата и наличието на съпътстващи състояния като слъзен дефицит, неоваскуларизация, кератинизация и други. Хронично възпаление може да се докаже с наличието на редица маркери на възпалението, които са повишени в проби от слъзен филм или препарати от конюнктивна цитология – човешки левкоцитен антиген (HLA-DR), ICAM-1, тумор некротизиращ фактор алфа (TNF- α), металопротеиназа 9 (MMP9), интерлевкини – IL-1,6,8, интерлевкин-1 рецептор (IL-1Ra), фосфолипаза A2, калгранулин, VEGF и други(130).

Вторият елемент от триадата, характерна за LSCD – неоваскуларизация – представлява нарушение на „ангиогенната привилегия“ на роговицата с наличие на ектопични съдове, започващи от нормалната лимбална съдова мрежа(131,132). Това е резултат от нарушение в баланса между антитангиогенни фактори (ангиостатин, ендостатин) и проангиогенни фактори – съдово-ендотелен растежен фактор (VEGF), основен фибробластен растежен фактор (bFGF), хепатоцитен растежен фактор (HGF), интерлевкин 6 (IL-6), тромбоцитен растежен фактор (PDGF), металопротеинази (MMP2, MMP9, MMP14) и други(133,134). Неоваскуларизацията се наблюдава биомикроскопски и може да бъде обективизирана чрез ангиографски методи за изобразяване на предноsegmentната съдова мрежа – предноsegmentна флуоресцеинова ангиография, компютър асистирана интравитална микроскопия, ретинен функционален изобразител, конфокална In vivo биомикроскопия и други(135–137). По-трудно се потвърждава наличието на лимфангиогенеза, за която се счита, че също има отношение към патофизиологичните процеси в роговицата(138). Наскоро са открити някои специфични за лимфните съдове протеинови маркери, които се изследват в хистологични материали – VEGF-рецептор 3, подопланин и лимфен съдов хуалуронон рецептор 1 (LYVE-1(139)).

2.6.1. Импресионна цитология

Егберт и сътр.(140) през 1977г. въвеждат импресионната цитология като алтернативен на ексцизионната биопсия минимално инвазивен метод за хистологично изследване на очната повърхност. В следствие той намира приложение при изследването на голям брой заболявания, включително плоскоклетъчна метаплазия, кератоконюнктивитис сика, дефицит на витамин А, атопия и вернален конюнктивит, автоимунни заболявания като синдром на Стивънс-Джонсън и очен цикатризиращ пемфигоид, малигнени тумори –

карцинома ин ситу и меланоми, трофични и дегенеративни процеси – инсуфициенция на лимбалните стволони клетки, периферен улцеративен кератит и други(141–149). Получените проби могат да се изследват чрез светлинна и електронна микроскопия и от тях може да се изолира ДНК за генетични изследвания(150). Методът се използва при диагностиката на повърхностни инфекциозни процеси, причинени от хламидия, акантамеба, херпес-вируси и аденовируси(151).

Импесионната цитология се счита за златен стандарт при диагностиката на лимбалната стволонклетъчна инсуфициенция. Методът е прост, неинвазивен и открива наличието на чашковидни клетки по роговичната повърхност. Факторите, които могат да повлияят резултатите са филтърната хартия, която се употребява, силата на импесията върху очната повърхност, локализацията и големината на тестваната зона. По отношение на откриването на остатъчен лимбален епител конфокалната ин виво микроскопия се счита за превъзхождаща импесионната цитология и може да се използва за количествена оценка на лимбалната стволонклетъчна инсуфициенция.

Поради ниската чувствителност на импесионната цитология за чашковидни клетки са въведени имунохистохимични изследвания на получените проби. Цитокератиновият и протеиновият профил на клетките насочва по-точно към диагнозата. Основните маркери за конюнктивализация са СК7, СК13, СК19, MUC1 и MUC5AC, както и метаплазия или загуба на роговичен фенотип – СК3-/СК12-/СК19+(152–154). Използването на reverse transcription PCR (RT-PCR) за същите маркери повишава чувствителността на методиката. При напреднал процес с тежка ксероза и кератинизация на конюнктивния епител маркерите за чашковидни клетки и муцин са отрицателни.

В избрани случаи може да се проведе и хистологично изследване на ексцизиран панус или биопсичен материал, които показват многослоен цилиндричен на места кератинизирал епител, разположен над плътна фиброваскуларна тъкан. Откриване на интраепителни лимфоцити, характерни за конюнктивния епител, също е показателно за конюнктивализация на роговичната повърхност. Това са предимно CD8+/*HML-1+ цитотоксични Т-лимфоцити, експресиращи човешки мукозен лимфоцитен антиген(22,120).

2.6.2. Оптична кохерентна томография на преден очен сегмент

Оптичната кохерентна томография е оптична техника базирана на интерференцията на светлинните лъчи и позволява триизмерно срезово изобразяване на биологични структури с пространствена резолюция от 10 μm . Светлината от ниско-кохерентен източник се разделя на два пътя по дължината на два вектора на интерферометър. Единият вектор е референтен, а другият е тестовият. Светлинните лъчи и по двата пътя преминават през различни оптични елементи (огледала, лещи и други), за да се поддържат специфични свойства на лъчите – форма, дълбочина на фокуса, разпределение на интензитета. Референтният вектор изпраща светлината към референтно огледало и се връща към системата за интерференция.

Светлинните лъчи от тестовият вектор достигат до тъканите, където подлежат на разсейване и отражение. Поради нехомогенната структура елементите имат различни индекси на рефракция, а светлината се разсейва при попадане върху интерфейс между две среди с различен рефрактивен индекс. Връщащите се светлинни лъчи от двата вектора се събират в детектора и генерират определена интерференция, която се записва. За да се формира образа на ОСТ е необходимо да се извършат множество последователни сканирания(155).

Оптичната кохерентна томография е метод за диагностика при лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция, който е неинвазивен, позволява оценка на лимбалните структури и по-голяма площ от роговицата, макар и с по-ниска резолюция. Въпреки че няма същата клетъчна разделителна способност като конфокалната ин виво микроскопия, чрез ОСТ на преден сегмент може да се измери дебелината на роговичния епител, дълбочината на пануса, структурните особености на палисадите на Вогт и лимбалните крипти. На предносегментна ОСТ преходът между нормален хипорефлективен роговичен епител и хиперрефлективния конюнктивен епител при здрави очи е ясно отграничен, а в случаи на лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция неясен при сканове паралелни или перпендикулярни на лимба(156). При лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция се наблюдават частична или пълна загуба на палисадна структура и по-голяма вариабилност в централната роговична епителна дебелина с изтъняване на лимбалния епител(157).

2.6.3. Конфокална ин виво микроскопия

Конфокалната ин виво микроскопия е сравнително нов метод, който носи информация за тежестта на процеса и ефекта от терапевтичните процедури(158). Основният диагностичен признак при лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция е наличието на конюнктивни клетки по роговичната повърхност. Други признаци са изтъняване на епитела, редукция на суббазалния нервен плексус и намалена клетъчна плътност в базалните слоеве. Конфокалната ин виво микроскопия се включва в алгоритъма за диагностика на лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция, но поради високата си цена е по-слабо достъпна.

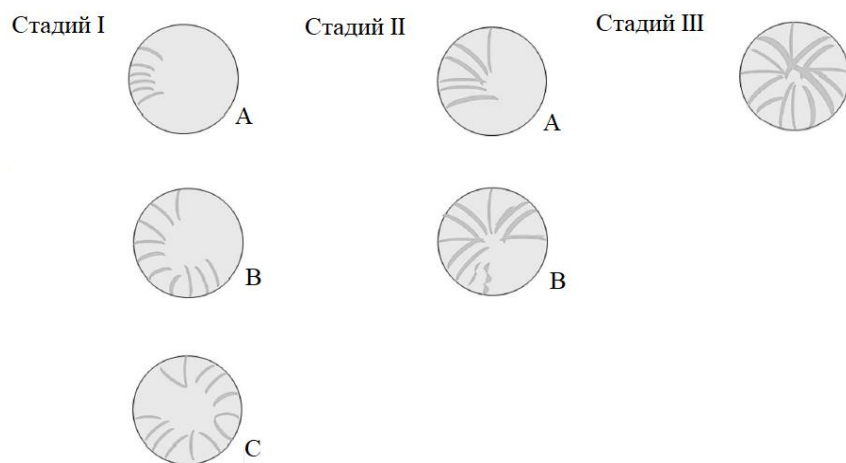
2.7. Стадиране на лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция

Денг и сътр.(159) въвеждат класификация на лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция, като най-важният показател е засягането на централните 5мм от роговицата и зоната от лимба, която е засегната. Стадирането има важно значение за терапевтичното поведение.

| Стадий | А | В | С |
|---|------------------------|----------------------------------|------------------------|
| Нормален роговичен епител в централните 5мм | <50% лимбално засягане | ≥50%, но <100% лимбално засягане | 100% лимбално засягане |

| | | | |
|---|------------------------|----------------------------------|--|
| Ангажиране на централните 5мм от роговицата | <50% лимбално засягане | ≥50%, но <100% лимбално засягане | |
| Ангажиране на цялата роговица | | | |

Таблица 7. Стадии на лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция (модифицирана по Deng и сътр.)



Фигура 6. Графично представяне на стадите на лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция (модифицирана по Deng и сътр.).

2.8. Лечение

Лечението на лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция включва консервативни и хирургични подходи. Всички коморбидности трябва да бъдат адресирани, за да се оптимизира очната повърхност.

2.7.1. Консервативно лечение

При наблюдаван кератит повечето клиницисти започват лечение с антибиотици самостоятелно или в комбинация с кортикостероиди, овлажняващи/епителотонични средства. Някои предпочитат да добавят и локална терапия с витамини от група В, за които се счича, че имат невротрофично действие(160). Големият брой топикални медикаменти натоварва допълнително очната повърхност с кумулативен ефект на съдържащите се консерванти и помощни вещества, поради това при съмнение за засягане на лимбалните стволови клетки следва да се проведе импресионна цитология за уточняване на диагнозата. В случаи на LSCD от основно значение за успеха от терапията е да се създаде оптимална среда за преживяване на останалите стволови клетки при частична инсуфициенция или на

трансплантираните при тотална. Обикновено консервативно лечение се прилага при частична инсуфициенция, когато зрителната ос не е засегната от процеса и активността на възпалението е ниска. Оптимизирането на очната повърхност намира приложение и при последващо оперативно възстановяване на очната повърхност, за да се осигури максимална преживяемост на трансплантирани клетки и наличните остатъчни собствени лимбални клетки, но и да подобри субективните оплаквания на пациента. Използваните средства включват:

- Лубриканти без консерванти
- Оклузия на слъзните пункти
- автоложен серум/тромбоцитно обогатена плазма
- имуномодулатори
- матрикс регенеративна терапия
- нервен растежен фактор

Целта на терапията е да се коригират всички дефицити на слъзния филм (количество, качество, стабилност), клепачи (позиция, възпаление, дисфункция на жлезите), подобрене на роговичната и конюнктивната инервация. Наличното възпаление следва да се коригира своевременно.

Лечението трябва да бъде индивидуализирано според тежестта на процеса и етиологията на лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция. Необходима е корекция на съпътстващите състояния като симблефарон, анкилоблефарон, скъсяване на форниксите, кератинизация, цикатрикси в тарзалната конюнктива, лагофталм, трихиаза и други. В някои случаи е необходима и системна имуномодулираща терапия.

Противовъзпалителна терапия

Противовъзпалителната терапия има важна роля в алгоритъма за лечение на лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция. Освен директен ефект върху стволовоклетъчната популация, възпалението уврежда и компонентите на стволовоклетъчната ниша(161). Допълнително възпалението директно уврежда невротрофичната функция, както бе коментирано при раздела невротрофичната кератопатия(162–164). Съществуват доказателства, че денервацията може значително да наруши функцията на стволовите клетки(165).

Противовъзпалителната терапия може да предотврати необратими увреждания на лимбалните стволови клетки и деструктивната фиброза. Не трябва да се пропуска и антиинфламаторният ефект на амниотичната мембрана, например при асоциираната със синдром на Стивънс-Джонсън кератолиза. Системна противовъзпалителна терапия се използва и в хроничния стадий на лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция, свързан с фиброза и епителиопатия, например при цикатризиращия пемфигоид(166,167). Някои от състоянията предизвикващи лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция са свързани с

хронично възпаление с ниска активност, например вернален кератоконюнктивит, синдром на сухото око, атопичен кератоконюнктивит. Използват се различни топикални средства, включително циклоспорин, такролимус, лифитеграст или кортикостероиди. Системните средства, намаляващи възпалителната активност също имат своето място в терапията с особено значение на имуномодулаторите, тетрациклини и макролиди.

Корекцията на наличен синдром на сухото око е важен принцип в лечението на лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция. Освен лубриканти без консерванти и обогатени с различни витамини, приложение намира и оклузията на слъзните точки (временна или перманентна). Хемодериватите (автоложен серум/тромбоцитно обогатена плазма) се считат за превъзхождащи стандартните изкуствени сълзи, поради наличието на множество трофични и имуномодулиращи фактори и сходството на състава им с човешките сълзи. Съществуват данни, че тези продукти подобряват оздравителните процеси в роговицата, редуцират възпалението и подобряват средата на очната повърхност. Въпреки това, основен недостатък е липсата на стандартизиран протокол за получаване и изработване на серумни капки, а използваните концентрации варират от 20% до 100%(39,168,169). В случаите, когато сухотата персистира е удачно да се приложи тарзорафия или трансплантация на слюнчена жлеза/ биоинженерно създадена слъзна жлеза/мезанхимни стволови клетки от мастна тъкан(170). Приложение намират и средствата за лечение на мейбомиевата дисфункция, включително някои по-нови методи като термална пулсация и интензивна пулсова светлина. Поради голямото значение на витамин А за поддържането на епителната хомеостаза, включването му в състава на лубрикантите е препоръчително при лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция, особено в случаи с ксероза на епитела. Витамин А регулира прилиферацията и диференциацията на роговичните епителни клетки, подпомага възстановяването на конюнктивните чашковидни клетки и муциновата секреция(171). Друг патогенетичен елемент, който може да се повлияе, е роговичната инервация. Както бе посочено, инервацията при лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция играе роля в поддържането на нишата.

Проучванията в последните години относно персистиращи епителни дефекти доказват ефикасността на матрикс регенеративната терапия, която се базира на биополимери, заместващи ендогенните глюкозаминогликани като хепаран сулфат от екстрацелуларния матрикс(172). По този начин се възстановяват свойствата на екстрацелуларния матрикс, които осигуряват подходяща микросреда за нормална тъканна регенерация.

Употребата на медикаменти, възстановяващи роговичните нервни окончания би довела до по-добри резултати от лечението. Основно средство е топикалният рекомбинантен нервен трофичен фактор (Cenegeermin), но данните за употребата му при лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция са ограничени. Установено е, че в ин витро условия добавянето на нервен трофичен фактор води до увеличен клетъчен растеж(173,174). Необходимо е да не се използват топикални средства, съдържащи консерванти, поради токсичното им действие (например антибиотици, антиглаукомни средства). Алтернатива на хирургичното лечение могат да бъдат терапевтичните контактни лещи. Освен че намляват

дразненето от аномалии на клепачите, те спомагат за поддържането на новосформирания епителен слой. Подходящи са при пациенти, които могат да бъдат стриктно проследявани, поради повишения риск от инфекции.

2.7.2. Оперативно лечение

При по-тежки стадии на заболяването със засягане на зрителната ос и липса на ефект от консервативно лечение се предприема оперативно възстановяване на очната повърхност.

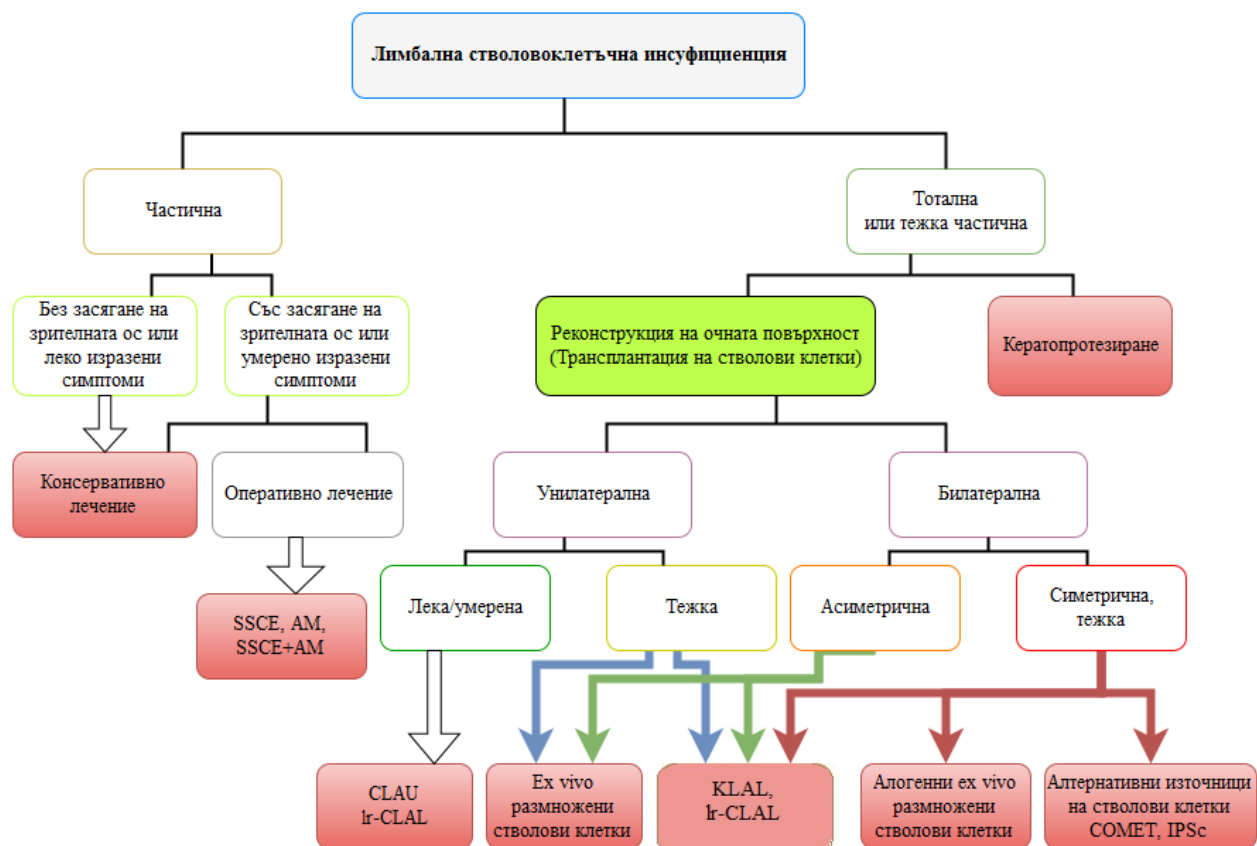
Преди трансплантацията очната повърхност трябва да е стабилна, като чрез различни методики се цели създаване на оптимална среда за заздравяване на очната повърхност (Таблица 8).

| | | |
|------------------|--|--|
| Клепачи | Ентропион-трихиаза, лагофталм, халтав клепач, функция на клепачните жлези | Корекция на аномалии в положението |
| Конюнктива | Скъсяване на форниксите, симблефарон | Автоложна конюнктивна трансплантация или автоложна орална/назална мукоза(175). Реконструкция с амниотична мембрана с или без автоложен конюнктивен епител(176) |
| Слъзен филм | Пълноценност | Заместване с изкуствени слъзи, матриксна терапия, оклузия на слъзните точки, автоложен серум, склерални лещи, нови насоки – трансплантация на биологично създадена слъзна жлеза(170,177), мезенхимни стволови клетки от мастна тъкан |
| Възпаление | Локална/системна имunosупресия | Стероиди, имunosупресори (Циклоспорин), биологични средства, мезенхимни стволови клетки(178,179), антиангиогенни средства. |
| Глаукома | За нормализиране на повишеното вътреочно налягане се препоръчват оперативни техники, за да бъдат елиминирани токсичните ефекти на антиглаукомните топикални средства | Поредочитат се дренажни импланти, тъй като трабекулектомията често се оказва неуспешна поради конюнктивно възпаление |
| Нервни окончания | Възстановяване на нервните окончания | Витамини група В, рекомбинантен нервен растежен фактор (rhNGF) |

| | | |
|----------|---|--|
| Лимб | Възстановяване на лимбалните епителни стволови клетки | CLAU, Ir-CLAL, KLAL, Ex vivo размножаване |
| Роговица | Възстановяване на нормалната структура и прозрачност | Ламеларна кератопластика, Пенетрираща кератопластика |

Таблица 8. Техники за оптимизиране на очната повърхност.

Терапевтичният алгоритъм е комплексен, като все още няма консенсус с ясно определени критерии за различните оперативни методи. Систематизирани и обобщени бяха основните подходи, докладвани в литературата, в следния алгоритъм (модифициран по Фигейредо и сътр.) (Фигура 7)



SSCE – Sequential Sectoral Conjunctival Epitheliectomy, AM – Amniotic Membrane, CLAU – Conjunctival Limbal Autograft, Ir-CLAL – Living-related Conjunctival Limbal Allograft, KLAL – Keratolimbal Allograft, COMET – Cultivated Oral Mucosal Epithelial Transplantation, IPSc – Induced Pluripotent Stem Cells

Фигура 7. Терапевтичен алгоритъм за лечение на лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция.

При частична инсуфициенция с активен възпалителен процес по данни на Дуа и сътр. следва да се провежда дебридмент на мигриращия конюнктивен епител – sequential sectoral

conjunctival epitheliectomy (SSCE(180)). На този етап с много добри резултати е биологичното покритие с амниотична мембрана.

Цел на всички оперативни интервенции за лечение на лимбалната стволовокелтъчна инсуфициенция е да се създаде депозит от лимбални стволови клетки и оптимални условия за тяхното преживяване, следвайки посочената предоперативна подготовка. Първа стъпка при всички методики е перитомия с отстраняване на формиращия панус чрез повърхностна кератектомия с тъпа дисекция. При липса на стромални цикатрикси не е необходима последваща кератопластика за възстановяване на роговичната прозрачност. В случаите, когато такава се налага, обикновено се провежда на втори етап, три-четири месеца след стихване на възпалителните оплаквания, когато рискът за отхвърляне на трансплантата е сведен до минимум(181,182).

При тотална LSCD източник на клетки могат да бъдат конюнктивно-лимбални и кератолимбални трансплантати. При конюнктивно-лимбалните трансплантати материал може да се получи от контралатералното здраво око (Conjunctival Limbal Autograft - CLAU) или от жив донор – роднина на реципиента (Living-Related Conjunctival Limbal Allograft – Ir-CLAL) при билатерална инсуфициенция. Често те се комбинират с трансплантация на амниотична мембрана както на донора, така и на реципиента. Техниката е описана за пръв път от Kenyon и Tseng(128), като включва повърхностна кератектомия с размери 6-7мм по горния и долен лимб, включваща 5мм конюнктива и 1мм роговина тъкан. Въпреки високия процент на успеваемост, докладван в различни проучвания(183), процедурата крие риск от създаване на лимбална инсуфициенция в донорното око. Съобщаваните резултати при Ir-CLAL са с по-ниска успеваемост(184,185). Дори при висока степен на съвместимост между донора и реципиента има вероятност за отхвърляне на трансплантата, което налага продължителна системна имunosупресия.

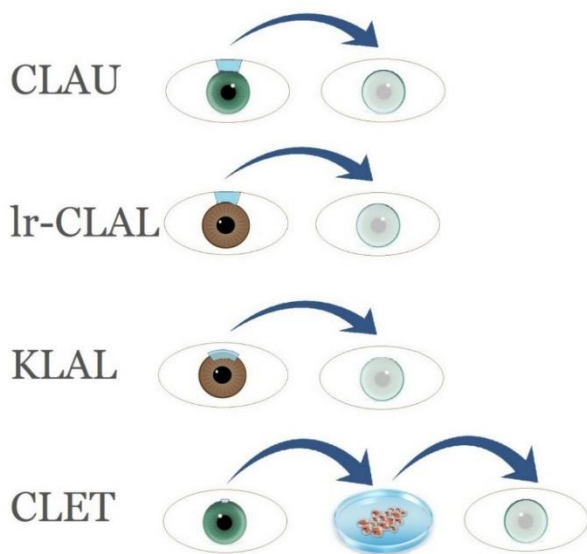
При тежка тотална билатерална инсуфициенция алтернатива е кератолимбалният алогографт, при който се използва материал от трупен донор. При тази методика след перитомия и отстраняване на фиброваскуларния панус се поставя амниотична мембрана с базална мембрана навън, върху която се налага корнеосклералния ръб с отстранена строма. Централният роговичен бутон от донорната тъкан се използва за трансплантация на друг реципиент. Процедурата завършва с покриване на трансплантата с втора амниотична мембрана, контактна леща или по-рядко временна тарзорафия. Тази методика демонстрира по-ниска успеваемост(186), като основната причина за неуспех е отхвърляне на трансплантата, дори при лечение с перорален циклоспорин А за 5 години(74).

Недостатък на всички алогенни кератолимбални и клетъчни трансплантати е именно необходимостта от продължителна системна имunosупресия(187), като данните за ползата от HLA-типизиране на донора и реципиента по отношение на терапията и реакциите на отхвърляне не са категорични(184,188). Високата съвместимост позволява намаляване на

дозата на медикаментите и евентуално води до по-нисък риск за отхвърляне без да го елиминира.

Преживяемостта на трансплантираните донорни клетки все още е обект на дебати. Съществуват данни, че донорните клетки преживяват дълго след трансплантацията(189), както и доклади за заместването им от собствени реципиентни, което според някои автори би ограничило продължителността на имunosупресивната терапия(190). Все пак отхвърлянето на трансплантата остава основна причина за неуспех при всички методики.

Именно затова основната насока е разработването на клетъчни продукти с автоложен произход. Идеята за получаване и култивиране на лимбални стволови клетки се заражда след откриването на лимбалната им локализация в специфична ниша(6). Описаната за пръв път от Pellegrini и сътр.(29) методика претърпява множество модификации, имащи за цел получаването на епителен слой с достатъчен брой лимбални стволови клетки.



CLAU – Conjunctival Limbal Autograft, Ir-CLAL – Living-related Conjunctival Limbal Allograft, KLAL – Keratolimbal Allograft, CLET – cultured limbal epithelial transplantation

Фигура 8. Графично представяне на оперативните техники за трансплантация на лимбални стволови клетки.

2.9. Методи за екс виво размножаване на лимбални епителни стволови клетки

След получаване на материал от минимално инвазивна лимбална биопсия с размер 2мм² от зоната на лимба някои техники включват директното му поставяне върху преносителя – най-често амниотична мембрана. Вариациите между различните протоколи на този етап включват механично раздробяване на биопсията на по-малки части или по-широко възприетото ензимно смилане до единични клетки с трипсин/ЕДТА, диспаза или колагеназа. Chen и сътр. демонстрират, че третирането на препарата с колагеназа запазва

асоциираните с нишата мезенхимни клетки и част от базалната мембрана, което води до получаване на по-голям брой прогениторни клетки, а оттам и повече дъщерни клетки(5). Някои протоколи включват допълнително използване ЗТЗ миши фибробласти като хранещ слой, но тенденцията в нововъведените протоколи е за премахване на всички продукти от животински произход.

Вторият елемент от методиката е изборът на преносител. Най-често се използва амниотична мембрана, поради доказалите се в множество научни публикации предимства при самостоятелното ѝ използване(191). В повечето доклади амнионът се третира предварително с трипсин/ЕДТА и механично се отстранява епителният слой(192,193). Някои автори, включително Pellegrini, предпочитат за преносител да използват модифициран фибринов матрикс(29). Така се елиминира риска от трансмисия на биологични контаминанти, който теоретично съществува при използването на амниотична мембрана.

След поставянето на лимбалната биопсия върху преносителя се добавя растежната среда, която се базира на DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) самостоятелно или в комбинация с Ham F12 и 5-10% телешки или човешки серум. Към тази среда различните автори добавят голямо разнообразие от растежни фактори в различни съотношения и количества – холера токсин, епидермален растежен фактор, хидрокортизон, инсулин и други. При различните среди се запазва тенденцията за премахване на всички продукти от животински произход, с което се постига биологично безопасна технология(194).

В повечето научни публикации времето, необходимо за получаване на клетъчен епителен слой е 2 до 3 седмици, след което се наблюдава спад в процента на прогениторните клетъчни колонии(195).

Tseng и сътр.(196) сравняват методите за ex vivo размножаване на лимбални епителни стволови клетки, които се развиват паралелно в няколко различни посоки. До момента не е въведен единствен протокол, позволяващ оптимална клонална експанзия и съхраняващ връзката със специфични компоненти от клетъчната ниша.

Особен интерес представлява доказването на лимбални стволови клетки в получените култури. Въпреки многобройните изследвания, все още няма стандартен специфичен маркер за доказването им. Някои от проучваните молекули включват ABCG2, CD34, CD133, нестин и други(21,22,197,198). В последни доклади най-информативна е Δ Np63 α изоформата на маркера p63 по отношение на клиничния резултат (трансплантатът трябва да съдържа минимум 3% Δ Np63 α позитивни клетки), което корелира с пролиферативния потенциал на стволовите клетки(199,200).

Техниката на трансплантиране на вече размножените лимбални стволови клетки отново включва перитомия и повърхностна кератектомия на фиброваскуларната тъкан и поставяне на преносителя върху очната повърхност. Някои автори препоръчват покритие с втори слой амниотична мембрана, по който в случаи на повторна неоваскуларизация съдовете прорастват, оставяйки преносителя на стволовите клетки незасегнат.

Оценката на постоперативния резултат включва основни методи на изледване като биомикроскопия и определяне на зрителна острота, както и посочените при диагностиката допълнителни инструментални методи.

Предимствата на ex vivo размножените лимбални стволови клетки са значително по-малък размер на биопсията, което елиминира риска от лимбална инсуфициенция в донорното око, липса на реакция отхвърляне на трансплантата при автоложните култури и оттам премахване необходимостта от продължителна системна имunosупресивна терапия.

Възстановяването на очната повърхност е комплексно и за оптимален ефект от лечението е редно да се следва определен терапевтичен алгоритъм. Необходима е подробна предоперативна оценка с обективизиране на рисковите фактори и коригиране на всички съпътстващи патологични изменения, за да се постигне очаквания резултат – нормална очна повърхност, прозрачна роговица и висока зрителна острота.

2.9.1. Преносители

За преносители на лимбалните стволови клетки са проучени множество субстрати, включително амниотична мембрана, фибринов матрикс, колагенови матрикси, контактни лещи, предна лещена капсула, хидрогелове, копринен фиброин, поликапролактон нанофибрилни субстрати. Въпреки че лабораторно създадените матрикси са биологично безопасни и съвместими, предимството на амниотичната мембрана са растежните фактори, които съдържа, както и доказаните ѝ противовъзпалителни, антиангиогенни, антимикробни и антифиброзни свойства.

2.9.2. Растежни среди

Растежните среди, които се използват за екс vivo размножаване на лимбални епителни стволови клетки са базирани на DMEM/HamF12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) с добавяне на различни растежни фактори, антибиотици, инсулин, ксеногенен/алогенен/автоложен серум и други. Стандартизираните растежни среди, произведени по правилата за Добра медицинска практика съдържат аминокиселини, минерали (селен, манган, цинк), витамини (особено група В), глюкоза, буферирани разтвори, инсулин, хидрокортизон, епидермален растежен фактор, фибробластен растежен фактор, нервен растежен фактор. В някои случаи към културите се добавят хранещи слоеве от 3Т3 миши фибробласти, но за избягване на продукти от животински произход могат да се употребяват мезенхимни стволови клетки, човешки стромални стволови клетки или да не се добавят допълнителни клетъчни слоеве.

2.9.3. Алтернативни източници на стволови клетки

Освен лимбалните епителни стволови клетки, особено в случаи на тотална билатерална инсуфициенция, като алтернативни източници могат да се използват ембрионални, индуцирани плурипотентни, соматични стволови клетки, получени от мастна тъкан клетки, орална мукоза, дентална пулпа, космен фоликул.

В България има съобщения за провеждана трансплантация на лимбални клетки чрез CLAU, Ir-CLAL и KLAL като е постигнат добър клиничен резултат при малки групи пациенти(201). През 2021г. Bommert(202) докладва резултатите от зрителната острота, оптична кохерентна томография и ин виво конфокална микроскопия след трансплантация на екс виво размножени лимбални стволови клетки.

Изводи от литературния обзор:

1. В България досега е провеждана трансплантация на лимбални клетки като е постигнат добър клиничен резултат при малки групи пациенти
2. Най-честата причина за отхвърляне на роговичен трансплантат е васкуларизираната левкома, която може да е израз на лимбална инсуфициенция
3. До момента са публикувани ограничени клинични данни от трансплантация на ех vivo размножени стволови клетки в България
4. В световната литература са съобщени голям брой техники на размножаване с постигнат успешен резултат в 70-100% от случаите.
5. Основна насока е създаване на биологично безопасна технология без добавяне на ксенобиотични продукти, която осигурява максимална клонална експанзия и съхранява недиференциран фенотип на стволовите клетки.
6. Провежданите до момента трансплантации на ех vivo размножени лимбални стволови клетки са предимно при химични изгаряния и автоимунни заболявания на очната повърхност при малки групи пациенти.
7. До момента няма изграден диагностичен и терапевтичен алгоритъм за лимбалната стволочклетъчна инсуфициенция в България.

Научна хипотеза:

Лимбалната стволочклетъчна инсуфициенция участва в патофизиологията на редица заболявания на очната повърхност. Корекцията на наличен дефицит на лимбалните епителни стволови клетки може да подобри състоянието на очната повърхност, роговичния епител, формирането на стромална цикатрициална тъкан и неоваскуларизацията и би заместила или довела до по-добра преживяемост на роговичния трансплантат.

II. Цел и задачи

ЦЕЛТА на настоящия дисертационен труд е да се създаде диагностичен и терапевтичен алгоритъм за лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция въз основа на трансплантация на лимбални стволови клетки.

За постигане на поставената цел бяха формулирани следните задачи:

1. Да се проследят ретроспективно пациентите с роговични заболявания, на които е проведена трансплантация на амниотична мембрана, роговична трансплантация, трансплантация на лимбални стволови клетки в клиника по Очни болести, УМБАЛ «Александровска» ЕАД за период от април 2014г. до април 2021г.
2. Да се проследят проспективно демографските характеристики и промените в очната повърхност при пациенти със суспектна лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция и да се създаде алгоритъм за диагностика на лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция.
3. Да се изготви и оцени протокол за получаване, транспортиране, екс виво размножаване и трансплантация на лимбални стволови клетки при пациенти със заболявания на очната повърхност, асоциирани с лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция.
4. Да се проследи влиянието на криопрезервацията върху пролиферативните и миграционните свойства на лимбалните стволови клетки.
5. Да се сравнят проспективно постоперативните резултати и промените в роговичната тъкан при пациенти с трансплантация на амниотична мембрана, корнеосклерален бутон и на лимбални стволови клетки.

III. Материали и методи

1. Подбор на пациенти

В настоящия дисертационен труд са включени всички пациенти, преминали през Клиника по Очни болести, УМБАЛ Александровска за периода април 2014 – април 2021, при които е проведена трансплантация на амниотична или роговична тъкан. Проучени са честотата на индикациите за трансплантация и разпределението на трансплантирани тъкани. Включени бяха 95 очи на 76 пациенти (38 жени и 57 мъже), при които бе проведена трансплантация на амниотична мембрана, роговична тъкан или лимбални стволови клетки. Средната възраст бе $59.26 \pm 18.07SD$. Най-младият пациент е бил на 5 години, а най-възрастният на 89 години. Средната възраст при жените е $60.74 \pm 16.04 SD$, а при мъжете е $58.28 \pm 19.39SD$. Допълнително бяха включени 49 очи на 48 пациенти на средна възраст 57.71 години (24 мъже и 25 жени) с клинични данни за суспектна лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция. Средната възраст на жените е $56.00 \pm 16.24 SD$, а при мъжете $59.36 \pm 16.89 SD$.

2. Дефиниране на групи

Дефиниция на група пациенти със суспектна лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция

Критерии за включване:

- Пациенти с клинични данни за суспектна лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция (хронично възпаление, неоваскуларизация, конюнктивализация)
- Възраст над 18г.
- Фотодокументация с добро качество на получените образи, обективизираща клиничната находка
- Проведена оптична кохерентна томография на преден очен сегмент

Критерии за изключване:

- Възраст под 18год.
- Лошо качество на получените образи или липсваща фотодокументация
- Пациенти, при които не е проведена оптична кохерентна томография на преден очен сегмент
- Отказ на пациента за участие в изследването

Дефиниция на групите според проведеното лечение

Дефинираха се три групи пациенти според проведеното лечение – чрез трансплантация на амниотична мембрана и трансплантация на тъкани, съдържащи лимбални стволови клетки – трансплантация на екс виво размножени лимбални стволови клетки или корнеосклерален бутон. За контролна група бяха избрани пациенти без данни за заболявания на очната

повърхност и роговицата. Резултатите на пациентите от контролната група бяха използвани за валидиране на приложените методи за оценка на очната повърхност.

Критерии за включване в групата с трансплантация на амниотична мембрана:

- Възраст над 18г. и под 90г.
- Проведено лечение с трансплантация на амниотична мембрана

Критерии за включване в групата с трансплантация на екс виво размножени лимбални стволови клетки

- Възраст над 18г. и под 90г.
- Проведено лечение чрез трансплантация на екс виво размножени лимбални стволови клетки

Критерии за включване в групата с трансплантация на корнео-склерален бутон

- Възраст над 18г. и под 90г.
- Проведено лечение чрез трансплантация на корнео-склерален бутон

Критерии за включване в групата на здравите контроли

- Възраст над 18г.
- Без придружаващи очни заболявания
- Без състояния, свързани със сухо око
- Без данни за прекарани възпалителни, дегенеративни и инфекциозни заболявания на преден очен сегмент, роговица и очна повърхност
- Без данни за системни възпалителни и автоимунни заболявания
- Без употреба на топикални медикамент, с изключение на спорадична употреба на изкуствени сълзи

3. Методи

3.1.Снемане на анамнеза и пълен офталмологичен преглед

При всички пациенти бе снета щателна анамнеза за всички налични очни и общи заболявания. Зададени бяха допълнителни въпроси за субективните оплаквания от очната повърхност, както и давността им. Подробно бяха документирани консервативните мерки и приложените медикаменти в хода на заболяването. Изследването започваше с определяне на зрителната острота. За обективизиране на резултатите от пациенти с много ниско зрение са използвани резултатите от Schulze-Bonzel и сътр.(203) За определяне на вътрочното налягане е използван палпаторен метод, поради невъзможност за точно измерване при цикатрициални промени в роговицата.

3.2.Фотодокументация чрез биомикроскоп

За анализ на фиброваскуларната тъкан в роговицата бе използван биомикроскоп с възможност за заснемане на изображения с добър фокус на получените изображения. Използвана бе директна илюминация с максимална ширина на светлинния източник.

3.3.Оптична кохерентна томография на преден очен сегмент

Оптична кохерентна томография на преден очен сегмент бе проведена използвайки протоколи Line, 3D, Radial на spectral domain OCT (3D OCT-2000FA, Topcon) преди и след лечение. Извърши се оценка на получените изображения за интегритета на епитела, оток, хиперрефлексивност и изтъняване на стромата, формиране на цикатрициална тъкан. Протоколът Radial бе използван за определяне на роговичната дебелина. Протоколът Line бе използван за предоперативна оценка на лимбалната морфология и определяне мястото на лимбалната биопсия.

Радиалните протоколи бяха използвани за оценка на стромалната реакция в хоризонталния скан за измерване на хиперрефлексивността като средна стойност от сивата скала, както и за наличието на демаркационна линия постоперативно.

Хоризонталния меридиан от радиални протоколи при здрави контроли от две различни посещения бяха използвани за верифициране на метода.

3.4.Компютърна програма ImageJ

За обработка на получените изображения бе използвана програмата ImageJ v.1.53e. Програмата позволява обработка на дигитални изображения с автоматизирано измерване на площ с възможност за въвеждане на мащаб, както и цветово измерване на пиксели с резултат в сивата скала със средни стойности, стандартно отклонение, минимални и максимални стойности.

3.4.1. Площ на фиброваскуларната тъкан

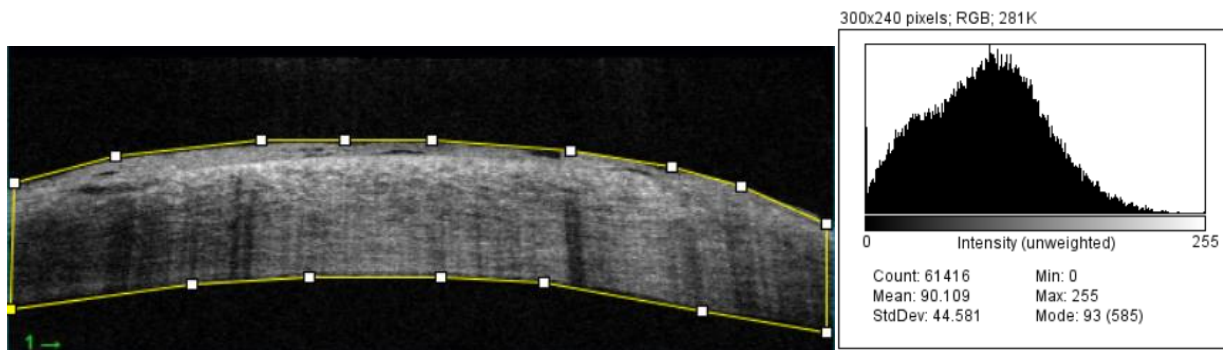
След задаване на мащаб, базиран на хоризонталния роговичен диаметър, зоната на фиброваскуларна цикатрициална тъкан бе маркирана и автоматично изчислена от програмата.

3.4.2. Характеризиране на цикатрициалната тъкан от получените OCT изображения

След маркиране на роговицата в цяла дебелина от автоматично изчислената хистограма се отбелязва средната стойност на зоната по сивата скала.

За валидиране на метода бяха подбрани 44 очи на здрави контроли, при които бе извършен Radial AS-OCT скан в две последователни посещения. Сравнени бяха средните стойности на сивата скала в хоризонталния меридиан между двете посещения.

Извърши се сравнителен анализ между стойностите преди и след лечение в трите групи трансплантирани пациенти.

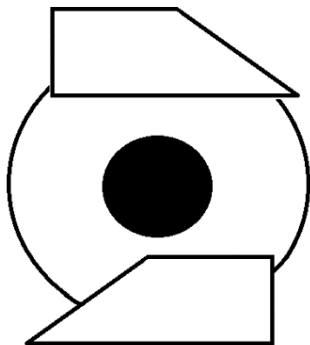


Фигура 9. Маркиране на роговицата в хоризонталния меридиан и оценка на отделните пискели със средна стойност по сивата скала.

3.5 Импресионна цитология

Методиката включва поставяне на топикална анестезия, импресия в областта на изменените участъци от роговичната повърхност с леко притискане на целулозоацетатния филтър, трансфер на получените клетки върху предметно стъкло и фиксиране на филтъра във формалинов разтвор.

За визуализиране на тъканите под светлинна микроскопия бе използван класическият метод чрез маркиране с хематоксилин и еозин, Папаниколау и перйодна киселина на Шиф (Periodic acid Schiff - PAS) директно върху целулозоацетатния филтър. Използваният протокол е представен на фигурата.



Фигура 10. Техника на приложение на филтърната хартия, използвана за получаване на проби за импресионна цитология.

Необходимо е да се избягва ексцесивно сълзене и да се упражнява умерен натиск върху филтъра. Половината от филтъра бе разположен върху роговицата, а другата половина – върху конюнктивата, за да се обхване зоната на лимба. С помощта на форцепса пробата бе внимателно отстранена от очната повърхност, след което бе поставена в контейнер с фиксиращ разтвор със следното съдържание:

Ледена оцетна киселина 5мл

37% Формалдехид 5 мл

70% етилов алкохол 100мл

Докато пробата се съхранява в достатъчно количество фиксиращ разтвор бе годна за изследване.

Протокол за оцветяване:

- Рехидрация със 70% етилов алкохол 2мин
- 10 потапяния във вода
- Периодна киселина 0.5% (Реагент 1) 2 мин
- 10 потапяния във вода
- Реагент на Шиф (Реагент 2) 2мин
- 10 потапяния във вода
- Натриев метасулфит 0.5% (Реагент 3) 2мин
- 10 потапяния във вода
- Хематоксилин 1мин
- 10 потапяния във вода
- Дехидратация с 95% етилов алкохол 10 потапяния
- Модифициран Orange G-6 2мин
- 95% етилов алкохол 3мин
- Модифициран EA (Eosin Azure) 2мин
- 95% етилов алкохол 10мин
- Дехидратация Абсолютен алкохол 5мин
- Ксилен 15мин
- Фиксираща среда (Eukitt)

При цитологичната обработка бяха използвани стандартните техники с Цитоколор и Папенхайм върху материално стъкло след фиксиране (air-drying).

Направена бе оценка за наличие на PAS позитивни клетки в областта на роговицата, възпалителна инфилтрация – лимфоцитна или левкоцитна, кератинизация на епитела, ксероза и вътреклетъчни инклузионни материали.

Използван бе микроскоп на Катедра по Патоанатомия с възможност за дигитално представяне на изображенията.

3.6 Естезиометрия

Обективната роговична сетивност бе оценена чрез Cochet-Bonnet естезиометрия. Естезиометърът представлява апарат, съдържащ тънък подвижен монофиламент с регулируема дължина от 5 до 60мм, промяната на която осигурява налягане от 200mm/gm до 11mm/gm. При млади пациенти най-висока е роговичната сетивност централно, а при по-възрастни – в периферията. Обективната оценка на роговичната сетивност намира приложение в диагностиката на редица състояния свързани с хипо- и анестезия, включително херпетичен кератит, множествена склероза, хирургични интервенции, тумори, цереброваскуларни инциденти, както и при приложението на някои топикални медикаменти. Централната роговичната сетивност бе определена като дължината на монофиламента, при която пациентът усеща 50% от стимулите. Измереният отговор като милиметри от филамента бяха отчетени по приложената към естезиометъра таблица в mm/grms.

3.7 Бърз тест за възпаление на очната повърхност

Ролята на матриксната металопротеиназа 9 (ММР-9) във възпалителните заболявания на очната повърхност е доказана в редица проучвания(204,205). До момента са проследявани промените в концентрацията на този ензим при синдрома на сухо око. Все още няма данни за динамиката в ензима при лимбална стволовклетъчна инсуфициенция, което представлява научен интерес, но вероятно е от значение и за проследяване ефектите от терапията. Тестът се позитивира при нива на ММР-9 над 40ng/ml. Тест тупфера се допира до конюнктивата в долен форникс последователно по цялата му дължина 6-8 пъти поне 2 часа след поставяне на топикални средства. Тупфера се съединява с тест касетата и след това се накапва реактив в ямката. Резултатите се считат за позитивни, когато се появят две линии в тестовото поле.



Фигура 11. Техника на извършване на бърз тест за очно възпаление, базиран на нивата на матриксната металопротеиназа 9.

3.8 Трансплантация на амниотична мембрана

Получаването на амниотична мембрана става след предварително подписване на информирано съгласие от страна на майката, която трябва да има отрицателни серологични тестове за трансмисивни инфекции. По време на планирано оперативно родоразрешение след нормално протекла бременност се отстранява плацентата заедно с клампираната и прерязана пъпна връв при спазване на асептични условия и се поставя в стерилен съд. Извършва се макроскопски оглед на плацентата за патологични промени както от специалиста акушер-гинеколог, водещ раждането, така и от члена на екипа, който приема материала. Следва промивка на плацентата със стерилен разтвор за отстраняване на детрит и кръвни съсиреци. След това внимателно се отделя амниотичната мембрана от хориона с тъпа дисекция. Важно е да се отстранят всички остатъци от хориона. Следва обилна промивка на получената амниотична мембрана. Вземат се проби за провеждане на RT-PCR за вирусни заболявания (херпесни, хепатитни, ХИВ). Получената амниотична мембрана се третира с антибиотични разтвори, след което се разстила върху стерилна нитроцелулозна хартия с епителния слой нагоре, а базалният – плътно прилепнал към хартията. Оформят се транспланти с подходящ за очната практика размери (2x2, 4x4). Получените транспланти се съхраняват при -80°C в разтвор на криопротектор и глицерол. Вземат се проби за микробиологични изследвания за растеж на бактерии и гъби. При отрицателен резултат от микробиологичните и вирусологичните изследвания, получените транспланти се считат за готови за употреба.

При преминаване към трансплантация на амниотична мембрана в Клиника по Очни болести, УМБАЛ „Александровска“ след щателно почистване на оперативното поле с Повидон Йод 10% за кожа и 5% за очната повърхност и форниксите, мембраната бе адаптирана като един слой с епител към стромата или в няколко слоя с епител към повърхността в зависимост от дълбочината на язвата. Не е извършвана ексцизия на панус преди трансплантацията. Мембраната бе фиксирана с прекъснат шев 10/0 за роговичната повърхност в областта на лимба. В края на оперативната интервенция не бе поставяна контактна леща.

3.9. Екс виво размножаване на лимбални стволови клетки

3.9.1. Методи за екс виво размножаване на лимбалните клетки

При създаването на пилотния модел за екс виво размножаване на лимбални епителни стволови клетки се сравниха два различни протокола за *ex vivo* размножаване на лимбални епителни стволови клетки. Първият бе изготвен на базата на описана в литературата методика, включваща класически хранителни среди (Dulbecco's Modified Eagle Medium -

DMEM/HAMF12), различни растежни фактори (Epidermal growth factor - EGF) и серум. След минимално инвазивна лимбална биопсия материалите бяха транспортирани в среда Stem alpha 2 (STEM ALPHA, Rhone-Alpes, France) в рамките на 2 часа от експлантацията. Експлантите бяха директно поставени в специално разработена система за фиксиране на преносителя (амниотична мембрана) в растежната среда. Въпреки че някои автори препоръчват отделянето на лимбалните стволови клетки чрез третиране с трипсин/ЕДТА, нашият протокол не включваше тази стъпка, тъй като целта беше да съхраним компонентите от лимбалната строма. За преносител бе използвана прясна амниотична мембрана, при която не бе отстранен епителния слой. Системата за клетъчни култури, която използвахме, позволяваше т.нар. air-lifting, което доведе до формиране на няколко слоя от клетки. Системата включваше голям и малък стерилен титаниев ринг, като малкият се поставя над големия. Амниотичната мембрана се фиксираше между двата ринга с епителната страна надолу, а в получената суспендирана мембрана се поставяше експлантираният материал. Мембраната не трябва да стои опъната между ринговете, а да се остави свободно, така че да формира ямка. Този аванс се налага, тъй като при растежа на лимбалните епителни клетки мембраната може да се скъса.



Фигура 12. Схематично представяне на системата за култивиране на лимбални епителни стволови клетки (ЛЕСК).

Базираните на DMEM/HAM F12 среди се смесваха с помощта на автоматична пипета с 10мл автоложен тромбоцитен лизат от собствена кръв на пациента взета в деня на биопсията. Добавяха се епителен растежен фактор, хидрокортизон, холера токсин, инсулин. Нативната биопсия се поставяше в средата на разпънатата амниотична мембрана и ямката се изпълваше с хранителната среда, която се сменяше през ден. Не бяха използвани хранещи слоеве от миши фибробласти. Клетките бяха размножени в продължение на 14 дни в инкубатор при температура 37°C с 5% CO₂ и подходяща влажност. Конфлуентността и морфологията на клетките бяха наблюдавани чрез инвертирана фазовоконстрастна микоскопия (Olympus EP50, Olympus LS).

Вторият протокол включваше подобна методика, но бяха използвани иновативни хранителни среди без добавяне на ксенобиотични продукти и разработени в съответствие с Практиката за добро производство със стандартизиран състав, богат на растежни фактори (CnTFrame, CELLnTEC Advanced Cell Systems AG, Bern, Switzerland). Методиката не

изискваше добавяне на серум, тромбоцитен лизат, хранещи слоеве от животински произход.

3.9.2. Техника на минимално инвазивна лимбална биопсия

Лимбалната биопсия бе взета от сектор със сравнително запазен контур на палисадите на Vogt от засегнатото око, определен чрез биомикроскопски анализ и оптична кохерентна томография на лимба. Най-често бе биопсирана зоната между 10 и 2ч., тъй като данните за разпределението на лимбални стволови клетки в нормални условия демонстрира най-голям брой именно в горния квадрант. След щателно почистване на оперативното поле се поставяше локална анестезия с топикален медикамент и субконюнктивно приложение на Лидокаин. Процедурата изискваше внимателна дисекция на лимбален материал с приблизителни размери 2x2мм и 100 микрона дебелина, който включва лимбалните стволови клетки и предна роговична строма. След това протоколът включваше адаптиране на амниотична мембрана по описаната стандартна методика с шев 10/0. По този начин се проведе лечение на засегнатото око и се профилира евентуалния негативен ефект на биопсията върху състоянието на засегнатото донорно око.

3.9.3. Екс виво размножаване

Получената лимбална биопсия бе транспортирана до специализирана тъканна банка с лиценз за работа със клетъчни продукти, амниотична и роговична тъкан от Изпълнителна Агенция по Трансплантация, Министерство на Здравеопазването, България, Международен Акредитационен Форум, Certind сертификат. Използвана бе транспортна среда Stem alpha 2 medium (STEM ALPHA, Rhone-Alpes, France), а времето за транспорт бе 2 часа. Използван бе иновативен протокол, отговарящ на препоръките за Добра Медицинска Практика, който не съдържа и не изисква добавяне на продукти от животински произход или от алогенни източници (CnTFrame, CELLnTEC Advanced Cell Systems AG, Bern, Switzerland). Не бе използван и серум от пациента. Детайлно описание на протокола на производителя може да се открие на https://cellntec.com/wp-content/uploads/pdf/Isolation_Cornea.pdf. Накратко, след получаване на биопсията, материалът се обработва със CnT-PR, а след това с 2 mL of Accutase (CnT-Accutase-100). Към клетъчните култури се добавя CnT-PR в допълнение с IsoBoost (CnT-ISO-50) за 3 дни, след което средата се сменя със стандартна CnT-PR.

За субстрат бе използвана интактна прясна амниотична мембрана, получена от донор след скрининг за трансмисивни инфекции. Мембраната бе фиксирана в системата за потопен експлант с увеличаване на контактната площ между повърхността на мембраната и растежните среди. Получените клетки бяха размножени в продължение на 14 дни в инкубатор на 37 °C с висока влажност и 5% CO₂ концентрация във въздуха. Растежната среда бе подменяна през ден според препоръките на производителя. Конфлуентността и морфологията на клетките се проследяваха ежедневно чрез фазово контрастна микроскопия (Olympus EP50, Olympus LS).

Централната част от получения трансплант съдържащ лимбалните стволови клетки бе внимателно отстранен от системата и адаптиран към роговичната повърхност с епителната

страна нагоре. Графтът бе фиксиран с шев 10/0. Останалата част от използвания амнион бе фиксиран към конюнктивната повърхност чрез шев 8/0. В края на процедурата не бяха използвани контактни лещи.

3.10. Корнео-склерален бутон

Корнео-склералните бутони са получени от донори, обработени по стандартна методика, но поради напреднала възраст на донора (>75г.), време за експлантация >24 часа, напреднал аркус сенилис (>2.5мм), ниска ендотелна бройка (<1500), нисък процент на хексагоналност (<60%), определена чрез спекулярна микроскопия (CellChek 20, KONAN, Sarasota, FL, USA) не са подходящи за перфоративна или ламеларна кератопластика. Техниката на трансплантация включва конюнктивна перитомия, адаптиране на периферната склера от донора към склерата на реципиента с резорбируеми 6/0 конци. Шев на конюнктивата бе извършен с 8/0. В случаи на дълбоки язви с перфорации и стопяване на стромата на широка площ бяха използвани корнео-склералните бутони като биологично покритие, без да се прави класическа перфоративна кератопластика „на горещо“.

3.11. Постоперативен период

Постоперативно бе използвана фиксирана комбинация от топикален стероид и антибиотик четири пъти по една капка за една седмица, след което постепенно бяха намалени заедно с лубриканти четири пъти по една капка дневно. При данни за активно стромално стопяване на първи месец се включи и перорална терапия с Доксициклин 100мг дневно или Метотрексат 10мг седмично.

3.12. Софтуер за стандартизирана оценка на предно-сегментни изображения (VaHI)

Vascularization, Haze, and Integrity (VaHI) софтуерът е стандартизирана свободно достъпна система за оценка на ефекта от лечение чрез трансплантация на лимбални стволни клетки. Кодът на програмата е публикуван с лиценз от Massachusetts Institute of Technology (MIT) и може да бъде свободно свален от <https://github.com/vahicode/>. Детайлни инструкции за работа с приложението могат да се открият на VaHI user guidelines, <http://links.lww.com/ICO/A978>.

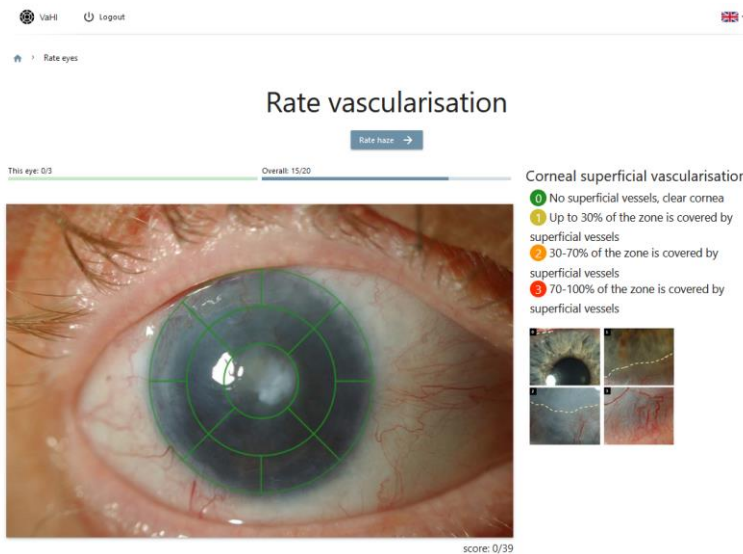
Оценката включва три елемента – повърхностна роговична неоваскуларизация, роговични мътнини, епителен интегритет. След като се зареди изображението върху него се проектира решетка, разделена на 13 различни зони, в които анализиращият може да отбелязва степента на засягане. Периферните сектори са 8, с ширина 2мм и обхващат лимба, средните сектори са 4 с ширина 2мм, а централната е една и обхваща 4мм зона.

Вдясно има референтен образ, който да подпомага процеса. Всеки от трите елемента е разделен на степени:

| Елемент | 0 | 1 | 2 | 3 |
|--|---------------------------------|---|---|---|
| Повърхностна роговична неоваскуларизация | Няма | Съдовете обхващат до 30% от зоната | Съдовете обхващат от 30% до 70% от зоната | Съдовете обхващат от 70% до 100% от зоната |
| Роговични мътнини | Прозрачна роговица | Леко намалена прозрачност, ясно видими детайли на ириса | Умерено намалена прозрачност, затруднена видимост на детайли от ириса | Силно намалена прозрачност, не се визуализират детайли от ириса |
| Епителен интегритет | Негативно багрене с флуоресцеин | Точковидно багрене с флуоресцеин | Вортекс епителиопатия | Епителен дефект |

Таблица 9. Степени за стандартизирана оценка на компонентите на лимбалната стволовклетъчна инсуфициенция.

Във всяка зона от решетката (общо 13) се обозначава съответната степен на засягане (от 0-3). Общият резултат е от 0 (13 зони с резултат 0) до 39 (13 зони с резултат 3) за васкуларизацията и роговичните мътнини. Резултатите от всички изображения се запазват и експортират в таблица на Excel.



Фигура 13. Стандртизиран софтуер за оценка на лимбалната стволовклетъчна инсуфициенция

3.13. Статистически анализ

За статистическа обработка на данните бе използван специализиран статистически пакет SPSS v.26. Избрано бе ниво на критичност $\alpha=0.05$. Нулевата хипотеза се отхвърляше при стойности на P (P-value) по-малки от α .

3.13.1 Дескриптивна статистика

Използвани бяха средни аритметични стойности и медиана за оценка на централната тенденция. Посочени бяха стандартното отклонение (Standard Deviation - SD) и стандартната грешка на средните (Standard error of means - SEM). Резултатите бяха представени като абсолютен брой и като процент от всички пациенти в групата.

3.13.2. Хи квадрат и Точен тест на Фишър - χ^2

Тестовите се основават на кръстосана таблица (таблица на спрегнатост), която изследва разпределението в групите и отношението им към очакваните стойности. В случаите, в които в клетките има очаквани честоти по-малки от 5 и/или една клетка има очаквана честота по-малка от 1 се използваше точният тест на Фишър (Fisher's exact test).

3.13.3. Тест на Shapiro-Wilks – използва се за проверка на честотното разпределение при по-малки извадки.

3.13.4. Т-тест при две зависими или две независими групи. Прилага се при сравняване на средните стойности от две групи, при които се наблюдава нормално разпределение на данните.

3.13.5 ANOVA - тест за сравнение на средните стойности на три и повече зависими или независими групи

3.13.6. Mann-Whitney тест – непараметричен тест, който се използва при сравняване на две независими групи с неправилно разпределение на данните.

3.13.7. Знаковко-рангов тест на Уилкосон – Wilcoxon Signed Rank Test се използва при сравняване на две свързани групи (повторно измерване на един и същи показател преди и след лечение, например) при рангови данни или когато формата на честотно разпределение е различна от нормалната.

3.13.8. Тест на Фридман – сравнява медианите на три и повече свързани групи данни с разпределение, различно от нормалното

3.13.9. Тест на Крускал Уолис – сравнява медианите на три и повече несвързани групи данни с разпределение, различно от нормалното (еквивалент на ANOVA)

3.13.10. Тест на Кронбах – тест за определяне на достоверността на въпросник.

3.13.11. Корелационен анализ на Spearman – прилага се за изследване на възка между две променливи с разпределение на данните, различно от нормалното.

IV. РЕЗУЛТАТИ

1. Резултати по Задача 1

Да се проследят ретроспективно пациентите с роговични заболявания, на които е проведена трансплантация на амниотична мембрана, роговична трансплантация, трансплантация на лимбални стволови клетки в клиника по Очни болести, УМБАЛ «Александровска» ЕАД.

За изпълняване на поставената задача бяха включени всички пациенти с трансплантация на амниотична мембрана, роговична трансплантация и трансплантация на лимбални стволови клетки, извършени в УМБАЛ «Александровска», София за периода от април 2014г до април 2021г. Тъканите за трансплантация са получени от «Н.И. Пирогов» ($n=3$) и Тъканна Банка Биорегенерация ($n=92$).

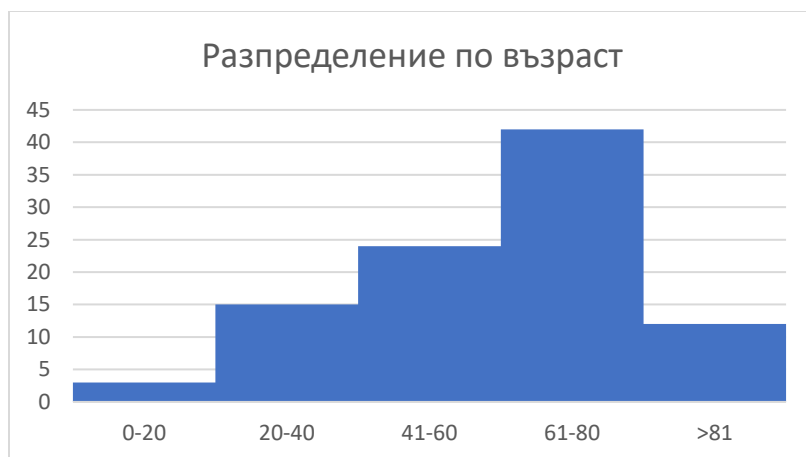
Идентифицирани бяха 95 очи на 76 пациенти, преминали през Клиника по Очни болести, УМБАЛ Александровска за трансплантация на тъкани. При 20 (21.1%) души е извършена ретрансплантация, а при един са оперирани и двете очи.

1.1. Демографска характеристика

От пациентите, включени в групата, 38 са жени и 57 мъже. Средната възраст на пациентите бе $59.26 \pm 18.07SD$. Най-младият пациент е бил на 5 години, а най-възрастният на 89 години. Средната възраст при жените е $60.74 \pm 16.04 SD$, а при мъжете е $58,28 \pm 19.39SD$. Shapiro-Wilk тестът демонстрира нормално разпределение на данните. Т-тест за независими групи не показва статистически значима разлика във възрастта спрямо пола ($p=0.519$).

| Пол | N | % | Възраст | | | | t | df | p |
|------|----|-------|---------|-------|-------|-------|------|----|-------|
| | | | Mean | SD | Min | Max | | | |
| Мъже | 57 | 60,0 | 58,28 | 19,39 | 5,00 | 85,00 | 0,65 | 93 | 0,519 |
| Жени | 38 | 40,0 | 60,74 | 16,04 | 38,00 | 85,00 | | | |
| Общо | 95 | 100,0 | 59,26 | 18,07 | 5,00 | 85,00 | | | |

Таблица 10. Сравнение по възраст и пол на пациентите, на които бе проведено лечение чрез трансплантация на тъкани и клетки в УМБАЛ „Александровска“ за изследвания период.



Фигура 14. Разпределение на пациентите във възрастови групи.

Прави впечатление, че броят на пациентите се увеличава с нарастване на възрастта. По отношение на средната възраст спрямо пола не се установи статистически значима разлика в групите с язва и левкома. В групите с булозна кератопатия и птеригиум не бе възможно да се извърши статистически анализ, поради малкия брой пациенти.

| Диагноза | Възрастова група | | Мъже | Жени | Общо | р |
|-----------|----------------------|---|--------|--------|-------|-------|
| язва | под средната възраст | N | 21 | 10 | 31 | 0,215 |
| | | % | 53,8% | 37,0% | 47,0% | |
| | над средната възраст | N | 18 | 17 | 35 | |
| | | % | 46,2% | 63,0% | 53,0% | |
| левкома | под средната възраст | N | 2 | 3 | 5 | 0,558 |
| | | % | 28,6% | 60,0% | 41,7% | |
| | над средната възраст | N | 5 | 2 | 7 | |
| | | % | 71,4% | 40,0% | 58,3% | |
| булозна | под средната възраст | N | 0 | 1 | 1 | n/a |
| | | % | 0,0% | 25,0% | 20,0% | |
| | над средната възраст | N | 1 | 3 | 4 | |
| | | % | 100,0% | 75,0% | 80,0% | |
| птеригиум | под средната възраст | N | 2 | 0 | 2 | n/a |
| | | % | 40,0% | 0,0% | 28,6% | |
| | над средната възраст | N | 3 | 2 | 5 | |
| | | % | 60,0% | 100,0% | 71,4% | |

Таблица 11. Сравнение на пациентите в групите с диагноза язва на роговицата, левкома, булозна кератопатия и птеригиум според възрастта.

1.2. Разпределение по етиология

За целите на проучването диагнозите бяха разделени в пет групи според честотата на индикацията – язва, левкома, птеригиум, булозна кератопатия и други. В последната група

бяха обединени заболявания като кератоконус, интерстициален кератит, туморни образувания на очната повърхност и травми. Тези диагнози са били индикация за трансплантация при единични пациенти, преминали през Клиника по Очни болести, УМБАЛ Александроска за изследвания период, което е причина да се обединят в една група.

Извърши се дескриптивна статистика по отношение на етиологичната причина за необходимостта от трансплантация на тъкан. Най-голям брой пациенти са диагностицирани с язва на роговицата.

| Диагноза | N | % |
|-----------|----|-------|
| язва | 66 | 69,5 |
| левкома | 12 | 12,6 |
| булозна | 5 | 5,3 |
| птеригиум | 7 | 7,4 |
| други | 5 | 5,3 |
| Общо | 95 | 100,0 |

Таблица 12. Разпределение на пациентите според диагнозата като абсолютен брой и процент.

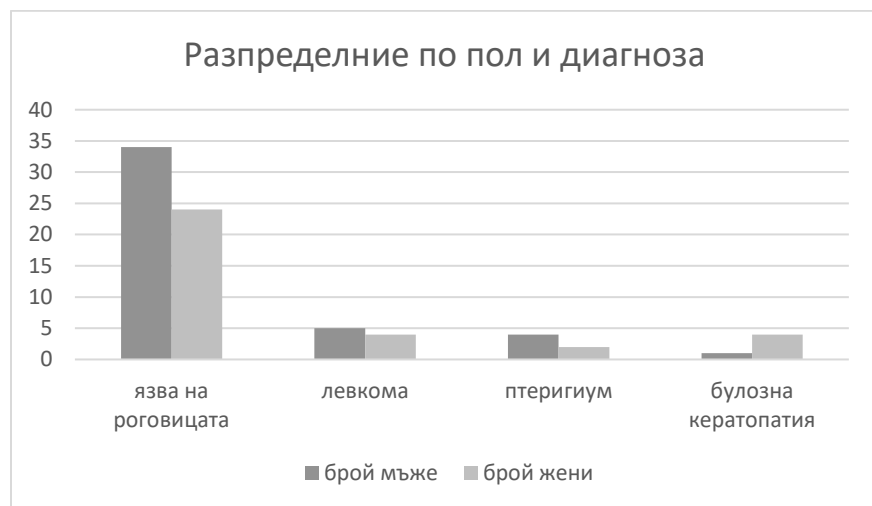
Нашите резултати се различават по честота на индикациите от тези на други разработки в България (206), при които персистиращите дефекти са втори по честота. От друга страна Манолова и сътр. откриват по-висока честота на персистиращите дефекти при мъже, което съвпада с резултатите от настоящото проучване.



Фигура 15. Разпределение на пациентите според диагнозите в МКБ 10.

По отношение на половото разпределение според етиологичната причина за оперативно лечение пациентите демонстрираха по-голям брой на мъжете с диагноза язва на роговицата,

а булозната кератопатия бе диагностицирана по-често при жени, въпреки че резултатите не бяха статистически значими:

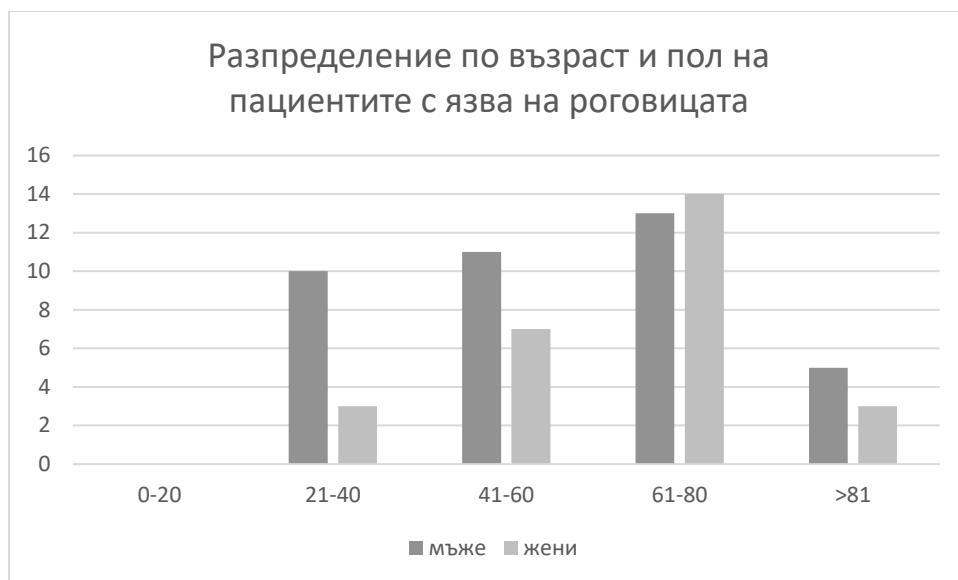


Фигура 16. Разпределение по пол на пациентите в групите с диагноза язва на роговицата, левкома, птеригиум и булозна кератопатия.

Научните публикации сочат, че язвата на роговицата е с малко по-висока честота сред мъжете. Панда и сътр. откриват отношение 1.6:1 на мъже към жени в проучване на 1000 случая с язва на роговицата. Това може частично да обясни преобладаването на мъжкия пол в групата с диагноза язва на роговицата, особено в случаите с анамнестични данни за предшестваща травма. Въпреки това повечето от пациентите имаха данни за тежко протичащи инфекции без анамнеза за травма. Налични са множество променливи фактори като достъп да специализирана помощ, комплайанс към терапията, придружаващи заболявания, които биха могли да окажат влияние върху наблюдаваната по-висока честота на язва на роговицата сред мъжете.

От друга страна по-високият брой пациенти от женски пол в групата с булозна кератопатия могат да се свържат с по-честата клинична изява на ендотелната дистрофия на Фукс при жени(207).

По отношение на язва на роговицата мъжете бяха повече от жените в групата от 21-40 години и 41-60 години с тенденция за постепенно изравняване между половете в по-късна възраст.



Фигура 17. Разпределение по възраст и пол на пациентите с язва на роговицата.

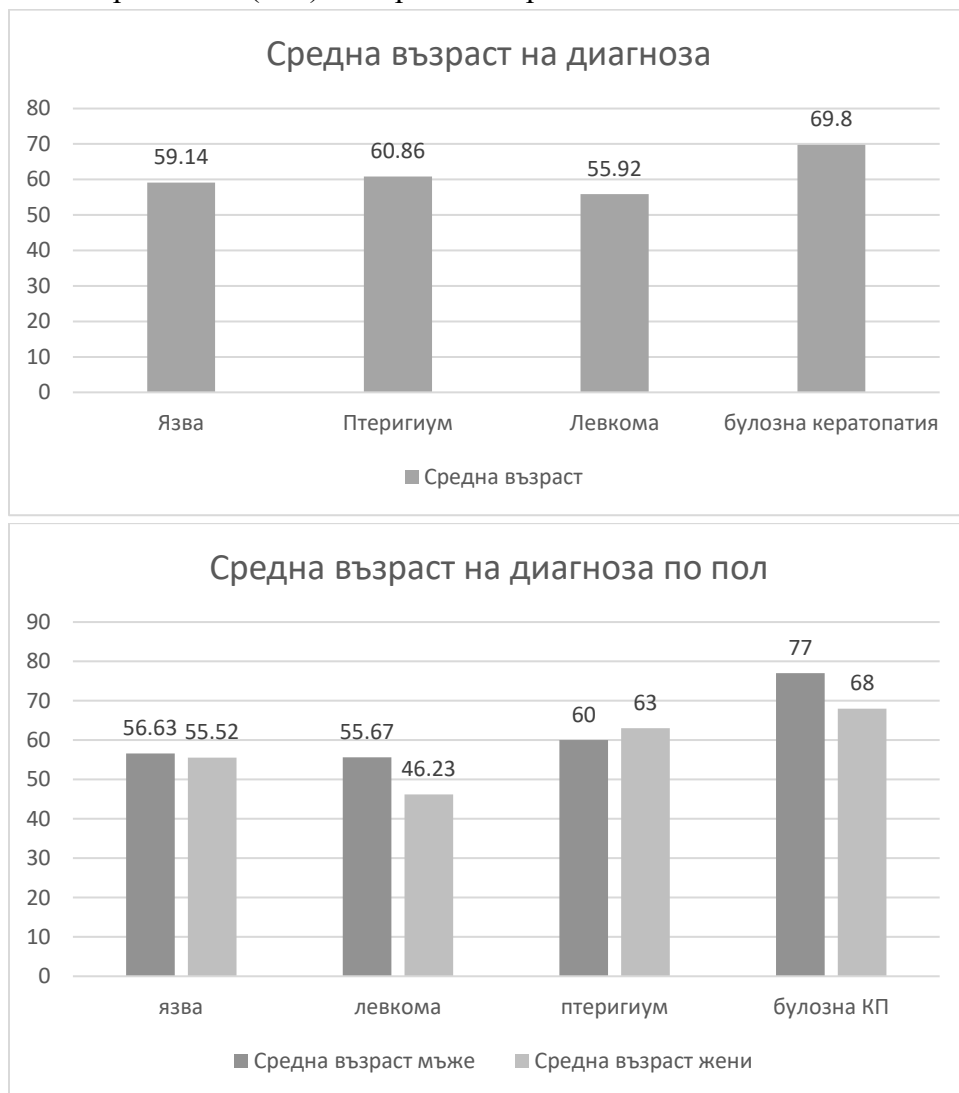
Анализът на данните не демонстрира статистическа значимост на тази разлика.

| Възрастова група (диагноза-язва) | | Мъже | Жени | Общо | р |
|----------------------------------|---|--------|--------|--------|-------|
| 21-40 | N | 10 | 3 | 13 | 0,390 |
| | % | 25,6% | 11,1% | 19,7% | |
| 41-60 | N | 11 | 7 | 18 | |
| | % | 28,2% | 25,9% | 27,3% | |
| 61-80 | N | 13 | 14 | 27 | |
| | % | 33,3% | 51,9% | 40,9% | |
| 80+ | N | 5 | 3 | 8 | |
| | % | 12,8% | 11,1% | 12,1% | |
| Общо | N | 39 | 27 | 66 | |
| | % | 100,0% | 100,0% | 100,0% | |

Таблица 13. Сравнителен анализ половото разпределение във възрастовите групи при пациенти с язва на роговицата.

Птериgium е бил причина за трансплантация по-често при мъже ($n=5$). Впечателение прави установяването на птериgium при млади мъже (21-40 години) и в по-напреднала възраст (71-80), докато при жените птериgium се установява в сравнително по-ранна възраст от повечето мъже (61-70). Възникването на птериgium има редица особености, като излагането на пряка слънчева светлина е един от водещите рискови фактори. В мета-анализ за честотата на птериgiumа Лиу и сътр. (208) откриват по-висока честота сред мъжете и отдават този резултат на професионалната заетост – в земеделска работа, например са ангажирани по-голям брой млади мъже. Левкома е установявана по-често при мъже ($n=6$),

но при жените средната възраст е по-ниска. Булозна кератопатия бе установена при по-голям брой жени ($n=5$) в по-ранна възраст.



Фигура 18. Средна възраст на мъжете и жените според диагнозата.

1.3. Разпределение според вида на трансплантираната тъкан

За изследвания период в Клиника по Очни болести, УМБАЛ Александровска са били извършени 14 роговични трансплантации, 59 трансплантации на амниотична мембрана, 15 трансплантации на екс виво размножени стволови клетки и 7 трансплантации на корнеосклерален бутон. В 20 (21,1%) от случаите се е наложила ретрансплантация.

| Тъкан | N | % |
|---------------------|----|-------|
| Роговица | 14 | 14,74 |
| Амниотична мембрана | 59 | 62,11 |

| | | |
|--------------------------|----|-------|
| Корнео-склерален бутон | 7 | 7,37 |
| Лимбални стволони клетки | 15 | 15,79 |
| Общо | 95 | 100,0 |

Таблица 14. Разпределение според вида на трансплантираният тъкан като абсолютен брой и процент.

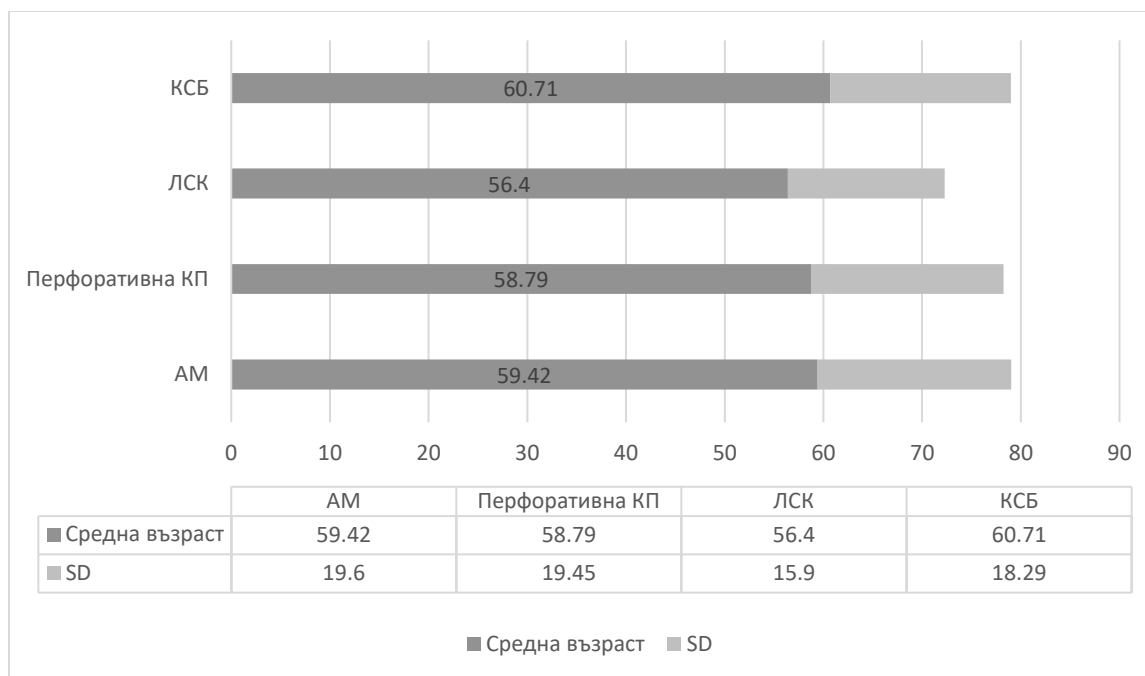
Разпределението на трансплантираните тъкани според етиологичната причина са представени на таблицата.

| Индикации | Брой лечение с амниотична мембрана | Брой лечение с роговица | Брой лечение с лимбални стволони клетки | Брой лечение с корнеосклерален бутон |
|---------------------|------------------------------------|-------------------------|---|--------------------------------------|
| Язва на роговицата | 43 | 4 | 12 | 7 |
| Птериgium | 7 | 0 | 0 | 0 |
| Булозна кератопатия | 1 | 4 | 0 | 0 |
| Левкома | 5 | 4 | 3 | 0 |

Таблица 15. Разпределение на трансплантираният тъкан според етиологичната причина.

Най-често използваната тъкан е амниотичната мембрана. Това най-вероятно се дължи на достъпността на методиката – поради големия брой донори и възможността от един донор да се отделят множество транспланти за нуждите на офталмологичната практика. Допълнително, при персистиращи язви и малки перфорации трансплантацията на амниотична мембрана е достатъчно успешна техника, както сочат резултатите от наличните проучвания(209). Именно това е причина при изследваните пациенти трансплантацията на амниотична мембрана да е извършвана най-често поради язва на роговицата.

Средната възраст на пациентите, при които е извършена съответната процедура са посочени на фигурата.



Фигура 19. Средна възраст на пациентите според вида на трансплантираната тъкан – КСБ – корнеосклерален бутон, ЛСК – лимбални стволови клетки, КП – кератопластика, АМ – амниотична мембрана, SD – стандартно отклонение

| Вид трансплантирана тъкан | Пол | Брой | Средна възраст | SD |
|---------------------------|------|------|----------------|-------|
| АМ | Мъже | 36 | 59,44 | 20,28 |
| | Жени | 23 | 59,39 | 18,92 |
| Перфоративна КП | Мъже | 8 | 57,75 | 20,11 |
| | Жени | 6 | 60,17 | 20,33 |
| ЛСК | Мъже | 6 | 53,83 | 15,05 |
| | Жени | 9 | 58,11 | 17,54 |
| КСБ | Мъже | 6 | 60,17 | 19,97 |
| | Жени | 1 | 64 | - |

Таблица 16. Средна възраст на пациентите по пол според трансплантираната тъкан.

Средната възраст на пациентите, при които е проведена трансплантация на амниотична мембрана, както и разпределението по пол, бяха сходни с публикации на други автори(210,211). В други публикации се откриват разлики, като по-ниска средна възраст и по-голям брой на пациентите от женски пол(212).

При пациентите с трансплантация на роговица резултатите от настоящото проучване също потвърждават предходни данни за възраст и полово разпределение(213).

За пациентите, при които е извършена трансплантация на лимбални стволови клетки Боммерт и сътр.(202) откриват, че средната възраст е 60,10 години, което е сходно с получените резултати в настоящото проучване, като при тях също жените са малко повече.

В световната литература (214) трансплантация на екс виво размножени ЛСК се извършва при пациенти в по-млада възраст, като преобладава мъжкият пол. Това вероятно се дължи на включване на по-голям брой пациенти с химични изгаряния на роговицата, които са по-чести при мъже в по-ранна възраст.

Данни за трансплантация на корнеосклерален бутон от български източници не бяха открити. В международни източници данните също са ограничени, като в повечето публикации(215,216) се коментира използване на този тип материали за перфоративна или тектонична кератопластика, а не като биологично покритие.

Манолова и сътр. откриват, че пациентите с персистиращи дефекти най-често се нуждаят от ретрансплантации на амниотична мембрана, което може да се свърже именно с тотален или частичен дефицит на лимбалните стволови клетки, който да не позволява пълно възстановяване на очната повърхност. В тези случаи трябва да се прилагат методи за диагностициране на лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция и да се дискутира трансплантацията на стволови клетки.

Лечение с трансплантация на роговица в цяла дебелина бе необходимо основно в случаите с булозна каратопатия и левкома. Това съвпада с резултати от предишни проучвания в България за индикациите за кератопластика(213). Не бяха идентифицирани случаи на ламеларна кератопластика в Клиника по Очни болести, УМБАЛ „Александровска“. Въпреки световната тенденция за извършване на по-голям процент ламеларни кератопластики, като начин за преодоляване на дефицита на донорен материал, в България все още методиката не е повсеметно разпространена. Групчев (212)след преглед на въпросници за тенденциите на трансплантацията в България установяват, че едва 2% от извършените трансплантации са ламеларни. Това най-вероятно е свързано от една страна с по-сложната хирургична техника, изискваща допълнителна квалификация на специалистите офталмолози, а от друга страна е необходим и инструментариум, включително фемтосекунден лазер, който значително улеснява провеждането на този тип операции, но изисква финансов ресурс. Друг проблем, който може да доведе до по-нисък брой ламеларни процедури, е необходимостта от координация на двама реципиенти в кратки срокове. Това се дължи и на все още неразвитата система за предварително подготвени донорни материали – в Европа все по-често се говори за ендотелни транспланти, които са изцяло обработени в тъканна банка и са налични като предварително заредени в инжектори. Това би скъсило времето за извършване на ламеларната трансплантация и според някои автори дори води до по-малък риск от увреждане на донорния материал(217). Основна причина за лечение с лимбални стволови клетки е язва на роговицата, която може да е възникнала като следствие на първичен дефицит на лимбални стволови клетки или дефицитът да е вторичен поради продължително персистиране на язвата и лечение с токсични топикални медикаменти. Трансплантация на стволови клетки се налагаше и при

васкуларизирана левкома, която може да е израз на конюнктивализацията при лимбална инсуфициенция.

Лечение с корнеосклерален бутон се налагаше при пациенти с дълбоки и обширни язви на роговицата, при които не бе възможно покритие с амниотична мембрана. Основна цел при големи перфорации е да се извърши първоначално възстановяване на целостта на булба. След като процесът на стромално стопяване претърпи обратно развитие и роговицата достигне достатъчна дебелина се преминава към оперативно възстановяване, за да се адресират мътнините в стромата. Поради дефицитът на донорен материал и високият риск от усложнения (отхвърляне на трансплантата, рецидив на основното заболяване, вторична инфекция) чрез трансплантация на корнеосклерален бутон се цели да се избягва перфоративна кератопластика „на горещо“. Освен това корнеосклералният бутон носи лимбални стволови клетки, които макар и алогенни, биха могли временно да възстановят очната повърхност. Важно е да се подчертае, че лимбалните стволови клетки действат не само анатомично (заместване на стволовоклетъчната популация), но и секретират множество растежни фактори, които подобряват заздравителния процес в роговицата(218,219). От друга страна стромата на донорния корнеосклерален бутон може да действа като субстрат за пролиферация, миграция и диференциация на собствените стволови клетки на пациента с допълнително възстановяване на стромата и повърхността.

ИЗВОД

Индикация за трансплантация на амнион, стволови клетки и КСБ с най-голяма честота е язвата на роговицата. Трансплантацията на амниотична мембрана е най-често провежданата терапевтична процедура. Персистиращите епителни дефекти/язви, както и васкуларизираната левкома могат да са клинична проява на лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция. При всеки отделен случай се налага индивидуализиран подход при избора на трансплантационна техника в зависимост от необходимостта за корекция на подлежаща лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция.

Резултати по Задача 2

Да се проследят демографските характеристики и промените в очната повърхност при пациенти със суспектна лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция

Изследването на промените в очната повърхност се проведе върху 49 очи (48 пациенти) с клинични данни за лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция. При 17 пациенти консервативният подход с локални средства (стероиди, лубриканти, антибиотици) бе успешен за възстановяване на очната повърхност. Изполвани бяха лубриканти с хилуронова киселина, декспантенол, витамин А, витамини група В. От топикалните антибиотици бяха използвани широкоспектърни препарати от групата на хинолоните, аминокликозиди.

Изполвани бяха Гентамицин и Дексаметазон за субконюнктивно приложение. Научните данни сочат, че Гентамицинът е ефективен в 95% от инфекциозните кератити(220).

Това подчертава, че лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция има различни степени и парциалната инсуфициенция може да се лекува консервативно. От особено значение е използването на системен антибиотик. Докато повечето топикални и системни антибиотици са токсични за очната повърхност(221), в нашата практика ние най-често прилагаме перорален Доксициклин(222). Доксициклинът е широкоспектърен антибиотик, който инхибира матриксните металопротеинази, синтеза на IL-1 и колагеназната активност. Въпреки че ролята на доксициклина за лечението на заболявания на очната повърхност е извън темата на дисертацията, нашите наблюдения при включените в групата пациенти сочат към изключително положителен ефект за реконвалесценцията. В случаите, в които наблюдавахме тенденция за стромално изтъняване независимо от проведеното консервативно или оперативно лечение, доксициклинът бе използван като средство за забавяне на процеса. Особен интерес представляваше пациент с перфорирала язва и аталамия, при когото като предоперативна профилактика бе приложен перорален доксициклин. На третия ден от приема непосредствено преди провеждане на оперативното лечение се наблюдава възстановяване на роговичната строма и нормално дълбока предна камера. Първоначално пациентът бе планиран за трансплантация на корнеосклерален бутон, но поради възстановяването на предната камера се предприе лечение с послойно адаптиране на амниотична мембрана.

Въпреки че протоколът за трансплантация на амниотична мембрана с или без лимбални стволови клетки не включваше поставянето на терапевтична мека контактна леща, в случаите на персистиращи епителни дефекти 1 месец след оперативното лечение използвахме склерални терапевтични лещи с диаметър 18мм. Изхождайки от Tear Film and Ocular Surface Society (TFOS) Dry Eye Workshop II (DEWS II) подходящи кандидати са пациентите с невротрофична кератопатия, пунктатни епителни ерозии, кератоневралгия и невралгия. Етиологията при част от изследваните пациенти бе свързана с усложнения след прекарана херпетична инфекция, която често води до невралгия. Това е причина нашите пациенти да се повлияват положително от приложението на склерални контактни лещи.

Склералните контактни лещи покриват изцяло роговицата и лимба, като между лещата и роговичната повърхност остава резервоар, създаващ идеална среда за нормално протичане на епителизацията и регенерацията на роговичните нерви(223).

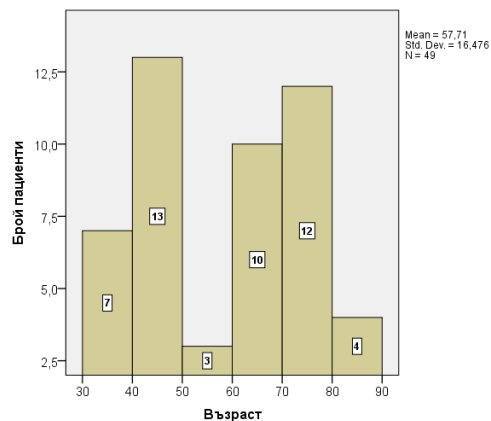
2.1. Демографски характеристики

Средната възраст на всички 49 пациенти със суспектна лимбална инсуфициенция бе 57.71 години. Разпределението по пол и възраст е представено на таблицата.

| Пол | N | % | Средна възраст | SD |
|------|----|------|----------------|--------|
| Мъже | 24 | 49,0 | 59,360 | 16,888 |

| | | | | |
|------|----|-------|--------|--------|
| Жени | 25 | 51,0 | 56,000 | 16,242 |
| Общо | 49 | 100,0 | 57,714 | 16,476 |

Таблица 17. Разпределение по пол и средна възраст на пациентите със суспектна лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция.



Фигура 20. Разпределение на пациентите по възраст.

От тях 10 (20.41%) бяха с билатерална инсуфициенция, а 79.59% с унилатерална инсуфициенция. Само при един пациент с билатерално засягане в проучването бяха включени и двете очи. Унилатерална инсуфициенция се установи при 13 десни очи и 26 леви очи. Нашите резултати съвпадат с изводите на други автори за по-висока честота на унилатералната инсуфициенция(224), но в докладите не се съобщава кое око е засегнато. Данните от други проучвания върху честотата на засягането на ляво или дясно око не показват разлики(225) в случаите на травми, но при роговичните язви се открива по-често засягане на лявото око. Това се различава от данните на други екипи в България, които установяват по-често засягане на дясно око(226).

В изследваната група преобладаваше засягането на ляво око, което може да се обясни с редица фактори(227,228). Една от вероятните причини за по-рядко засягане на дясното око е, че като водещо в по-голям процент от населението (около 70%(229)), при първите симптоми на намалено зрение и дискомфорт пациентите търсят навременна и високо-специализирана медицинска помощ, което води до по-бързо и пълно възстановяване. При изследваните пациенти симптомите персистираха от няколко месеца, а лечението бе продължително и започнато късно след началото на заболяването.

В изследваната група са включени равен брой мъже и жени, което се различава от данните до момента за по-висока честота на лимбалната инсуфициенция при мъже. Вероятно това се дължи на ниския брой химични/термични изгаряния и травми на очната повърхност, тъй като изследваните пациенти бяха диагностицирани основно с персистиращи язви, най-често асоциирани с трофични и токсични фактори след тежки възпаления(230).

От особено значение са пациентите с невротрофична кератопатия, при които по данни на други автори женският пол е по-често засегнат.

От групата пациенти със съмнение за лимбална стволочклетъчна инсуфициенция бе проведено оперативно лечение при 15 пациенти чрез трансплантация на екс виво размножени лимбални стволови клетки, при 10 лечение с трансплантация на амниотична мембрана и при 7 – с трансплантация на корнеосклерален бутон. За контролна група бяха използвани общо 30 пациенти, при които бе проведено лечение с амниотична мембрана. Не при всички пациенти от контролната група бе проведен целият диагностичен алгоритъм за лимбална стволочклетъчна инсуфициенция, включително въпросник за субективните симптоми, естезиометрия, бърз тест за възпаление на очната повърхност и импресионна цитология.

2.2. Анамнеза

Оценката на всеки пациент (n=48) със суспектна лимбална стволочклетъчна инсуфициенция включваше подорбно снемане на анамнеза – анамнеза за общи заболявания, прием на системни медикаменти, локални оплаквания и продължителност, локални медикаменти – брой, вид, продължителност, ефективност. При изследваните пациенти се установиха оплаквания от намалено зрение, дразнене, сълзене, дискомфорт, зачервяване, фоточувствителност, болка, намален толеранс към ежедневни дейности като шофиране, четене, работа с електронни монитори. Оплакванията бяха с давност повече от 1 месец.

Въведен бе въпросник базиран на въпросниците за Индекс на Очния комфорт, Проучване за оценка на очната болка (Ocular Pain Assessment Survey-OPAS) и Качество на живота(231), за да се обобщят данните за субективната симптоматика в подходяща за статистическа обработка форма. Въпросникът бе проведен устно, поради затрудненията на пациентите в продължителната работа на близки дистанции. Получените резултати се отбелязваха в табличен вид. Включени бяха въпроси за субективни симптоми като дискомфорт, парене, сълзене, болка, зачервяване и фоточувствителност. Броят на поставяните медикаменти се определяше като брой отделни флакони без да се взема предвид наличието на комбинирани препарати, тъй като от основно значение за очната повърхност е кумулативното действие на токсичните консерванти. В тези случаи е препоръчително да се използват фиксирани комбинации, именно за да се избегне натоваарването с допълнителни негативно действащи субстанции, а и комплайансът е по-добър. Все пак основната цел при лечението на заболявания на очната повърхност е броят на употребяваните топикални медикаменти да е сведен до минимум и да се използват продукти без консерванти.

Ежедневни активности, определени като най-вероятно засегнати от заболяванията на очната повърхност бяха определени като четене, употреба на телефон, толеранс към употребата на електронен монитор (телевизия, компютър). Социални дейности като шофиране, посещение на ресторант/кино/театър или спортни събития се влияят не само от субективните очни симптоми, но и от психологическият ефект на честата нужда от поставяне на топикални медикаменти в публични пространства, както и нарушения толеранс към изкуствено климатизирани помещения.

Приложимостта и надеждността на въпросника бяха оценени, използвайки индексът алфа на Кронбах, представен на таблицата.

| Таблица 18. Стойности на индекс на Кронбах от въпросника за субективни симптоми | | |
|--|------------------|--|
| | Cronbach's Alpha | Cronbach's Alpha Based on Standardized Items |
| Преди | 0,691 | 0,727 |
| След | 0,601 | 0,668 |

Извърши се сравнителен анализ на показателите преди и след лечение чрез Wilcoxon signed rank тест, поради неправилното разпределение на данните. Всички проучени субективни симптоми демонстрираха статистически значимо подобрение след проведеното лечение.

Таблица 19. Сравнение между резултатите от въпросника за субективни симптоми преди и след след лечение

| Въпрос | Z | Стойност на p |
|--|------|------------------|
| Дразнене, дискомфорт, усещане за чуждо тяло | 6,05 | <0.001 |
| Сълзене | 6,05 | <0.001 |
| Болка | 5,99 | <0.001 |
| Фотофобия (чувствителност към светлина) | 5,73 | <0.001 |
| Хиперемия (зачервяване) | 6,05 | <0.001 |
| Брой топикални медикаменти | 5,94 | <0.001 |
| Четене | 3,07 | 0.002 |
| Телевизия/монитор | 4,72 | <0.001 |
| Шофиране | 2,88 | 0.004 |
| Събития (театър, кино, спортни събития, ресторант) | 3,62 | <0.001 |
| Употреба на телефон | 3,96 | <0.001 |

2.3 Зрителна острота

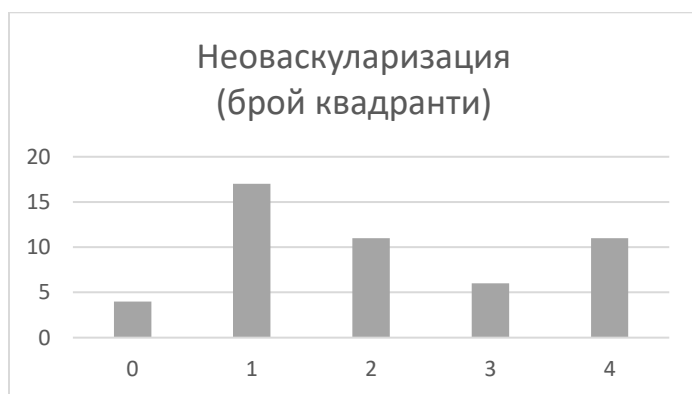
Средната зрителна острота на пациентите със суспектна лимбална ствoловоклетъчна инсуфициенция бе 0.15 ± 0.26 преди лечение. След проведеното лечение средната зрителна острота се подобри до 0.31 ± 0.27 . Непараметричният анализ демонстрира, че подобрието е статистически значимо (Wilcoxon signed rank test, $p < 0.001$), въпреки че при 8 от пациентите не бе отчетена разлика в зрителната острота след лечение.

| зрителна острота | N | Mean | Median | SD | Min | Max | Z | p |
|------------------|----|-------|--------|-------|-------|-------|------|------------------|
| преди | 49 | 0,150 | 0,020 | 0,260 | 0,001 | 1,000 | 5,45 | <0,001 |
| след | 49 | 0,310 | 0,300 | 0,272 | 0,001 | 1,000 | | |

Таблица 20. Сравнение на зрителната острота преди и след лечение на пацинети със суспектна лимбална ствoловоклетъчна инсуфициенция.

2.4. Биомикроскопия

Всички пациенти демонстрираха характерни клинични белези на персистиращи или рецидивиращи роговични язви, персистиращи поне 4 седмици преди приемане в Клиника по Очни болести. При всички пациенти се наблюдаваха различна степен блефароспазъм, оток на клепачите и подчертана конюнктивна хиперемия. Наблюдавани бяха епителни дефекти и инфилтрати в роговичната строма. При 19 (38.76%) от пациентите те бяха разположени периферно, а при 30 (61.22%) централно. Наблюдаваната неоваскуларизация бе класифицирана в пет групи – 0 – без неоваскуларизация, 1 – един квадрант, 2 – два квадранта, 3 – три квадранта, 4 – четири квадранта. Резултатите са показани на Фигура.



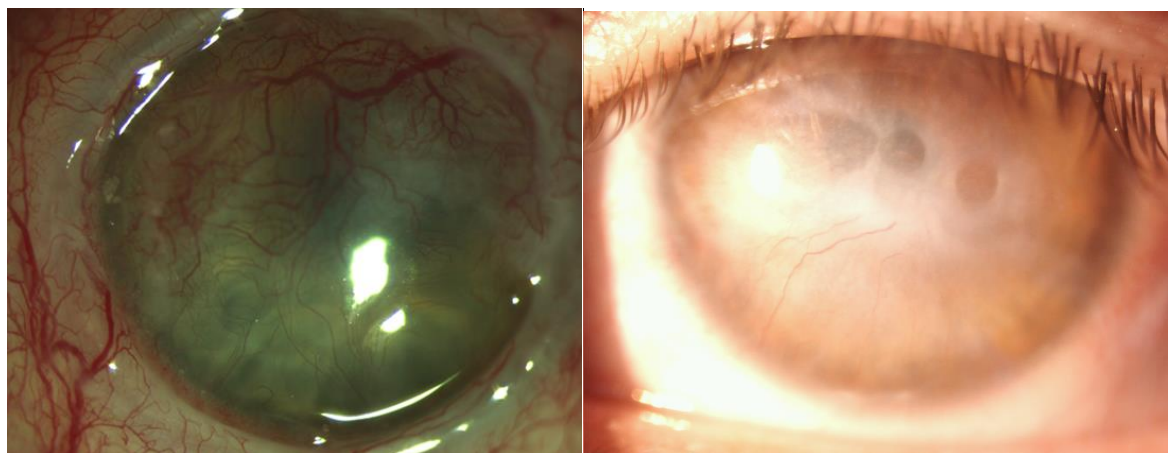
Фигура 21. Графичен вид на разпределение по групи на пациентите с неоваскуларизация.

| брой квадранти | N | % |
|----------------|----|------|
| 0 | 4 | 8,2 |
| 1 | 17 | 34,7 |

| | | |
|------|----|-------|
| 2 | 11 | 22,4 |
| 3 | 6 | 12,2 |
| 4 | 11 | 22,4 |
| Общо | 49 | 100,0 |

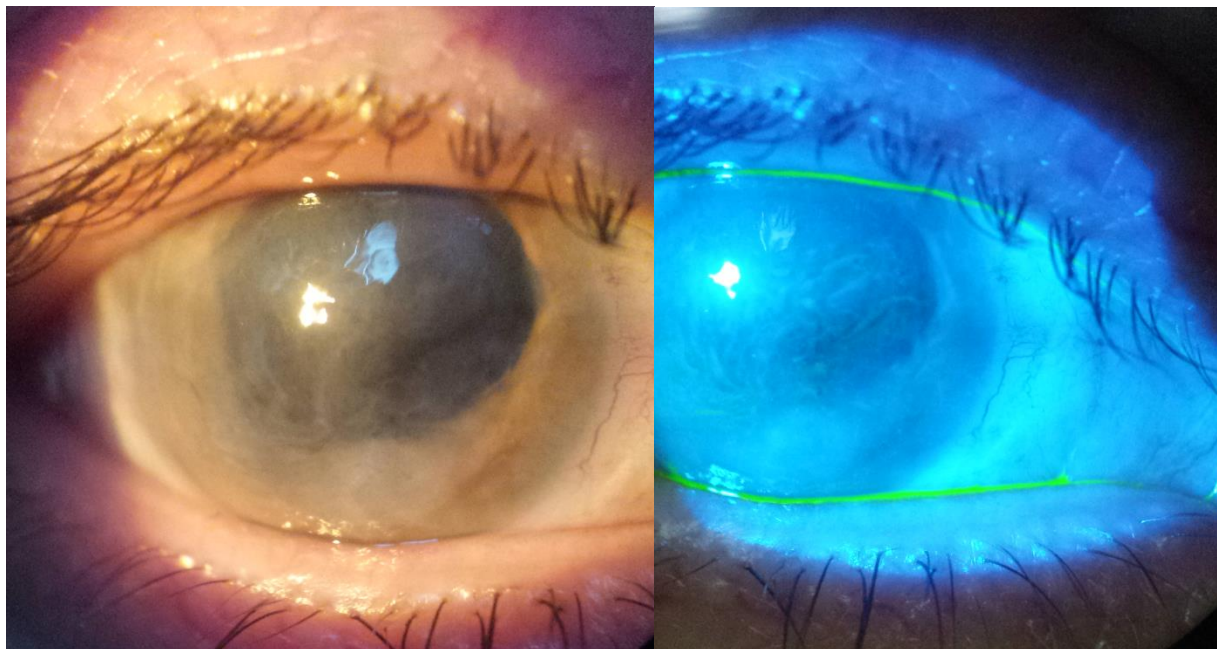
Таблица 21. Разпределение на пациентите с неоваскуларизация по групи като абсолютен брой и като процент.

При 25 пациенти неоваскуларизацията бе определена като повърхностна, а в 20 – като смесена – повърхностна на ниво епител и дълбока стромална.



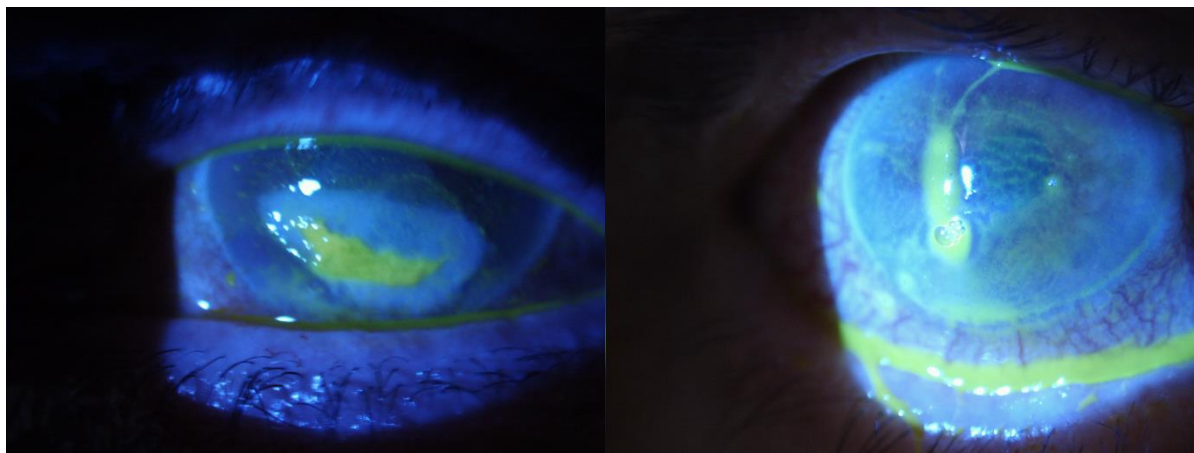
Фигура 22. Пациент със смесена повърхностна и дълбока неоваскуларизация (ляво). Пациент с повърхностна неоваскуларизация (дясно).

Впечатление прави, че при 17 пациенти сме наблюдавали неоваскуларизация само в един квадрант, а при 4 не се наблюдава неоваскуларизация. Това съответства на повлияването от консервативно лечение и подкрепя данните, че парциалната лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция не подлежи задължително на трансплантация на стволови клетки. Въпреки липсата на неоваскуларизация при някои от пациентите се наблюдаваше типичната вортикозна форма на формираната левкома, съобщена в глобалния консенсус за дефиниция, класификация, диагноза и страдиране на лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция, както е показано на Фигура 21(159).



Фигура 23. Вортикозна кератопатия при пациент след множество хирургични интервенции в областта на лимба.

При част от пациентите се наблюдаваше характерната за невротрофична кератопатия клинична находка на епителен дефект със задебелени обли ръбове и заобикаляща зона на епителна нестабилност, представяща се като точковидно багрене с флуоресцеин (Фигура 22).



Фигура 24. Невротрофична кератопатия.

2.5. Микробиологични и вирусологични изследвания

Взети бяха микробиологични проби от очната повърхност при всички пациенти. При 5 от тях се установиха Стрептококи или Стафилококи. При двама се установиха Кандида/ Дрожди. Възможно е изолираните стрептококи да са част от резидентната микрофлора в

областта на клепачите. При предполагаема микотична инфекция от посявките в среда не се установи растеж. Микотичните причинители се идентифицираха на препарати, маркирани по Грам. Това подчертава важността на извършването на натривка за оцветяване по Грам, тъй като микотичните причинители се характеризират с по-трудно култивиране и могат да бъдат пропуснати, особено при коинфекции.

При 15 пациенти със суспектна херпетична вирусна инфекция бе проведен качествен PCR на проби от предна камера. От тях 3 бяха положителни.

При пациентите с положителни микробиологични или вирусологични проби се проведе лечение с трансплантация на тъкани едва след регресия на белезите на инфекция. Предоперативно се повториха микробиологичните изследвания и пациентите бяха включени в по-нататъшния анализ само след отрицателен резултат.

2.6. Естеziометрия

Средната естеziометрия преди лечение бе 126.88 ± 73.47 , а след 77.12 ± 58.23 mg/S. Непараметричният анализ чрез Wilcoxon signed rank test показва, че подобрението в сетивността е статистически значимо. Въпреки това при 5 от пациентите не се установи подобрение в сетивността.

| Таблица 22. Сравнителен анализ на стойностите от естеziометрията преди и след лечение. | | | | | | | | |
|--|----|--------|--------|-------|-------|--------|-------|------------------|
| Естеziометрия | N | Mean | Median | SD | Min | Max | Z | p |
| преди | 49 | 126,88 | 145,00 | 73,47 | 13,00 | 200,00 | 5,720 | <0,001 |
| след | 49 | 77,12 | 75,00 | 58,23 | 12,00 | 200,00 | | |

Цитираната в литературата корелация между сетивността и възрастта не се потвърди при изследването на всички 49 пациенти нито преди, нито след лечение чрез корелационния анализ на Spearman.

| Таблица 23. Корелационен анализ на Spearman за връзка между възрастта и стойностите на естеziометрията. | | |
|---|---------------------|--------------------|
| години | Естеziометрия преди | Естеziометрия след |
| R | -0,009 | 0,106 |
| p | 0,950 | 0,467 |
| N | 49 | 49 |

Това показва, че заболяванията на очната повърхност могат да ускорят нормалния процес на намаляване в броя на роговични сетивни влакна(232). Zemaitiene и сътр.(233) откриват, че херпетичната вирусна инфекция води до значително намаление на сетивността и невритните влакна, които се възстановяват на бти месец, но не достигат нормални стойности. Възможно е възстановяването на сетивността да е непълно или да отнеме повече от 12 месеца(234). Проучване върху възстановяването на сетивността след LASIK открива, че процесът отнема между 9 и 12 месеца, като продължителността зависи от дълбочината на стромата, до която се достига. Това води до предположението, че колкото е по-дълбока една язва, толкова по-бавно е възстановяването на инервацията.

2.7. Бърз тест за възпаление на очната повърхност

Изследването на матриксната металопротеиназа 9 бе използвано при 20 от пациентите с цел да се докаже хроничното възпаление, елемент от триадата за лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция. Само при две от пробите резултатът бе негативен, като причината за суспектната лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция и в двата случая бе множество хирургични интервенции в областта на лимба (напр. усложнена екстракапсуларна екстракция на катаракта комбинирана с парс плана витректомия(106)). Високите нива на MMP-9 се асоциират със сухо око, възпаление на очната повърхност и роговичната неоваскуларизация. Това потвърждава наличието на множество механизми(235), по които се увреждат лимбалните стволови клетки, като в някои случаи възпалителната компонента може да бъде превъзможната и въпреки това увреждането на лимбалните стволови клетки да персистира.

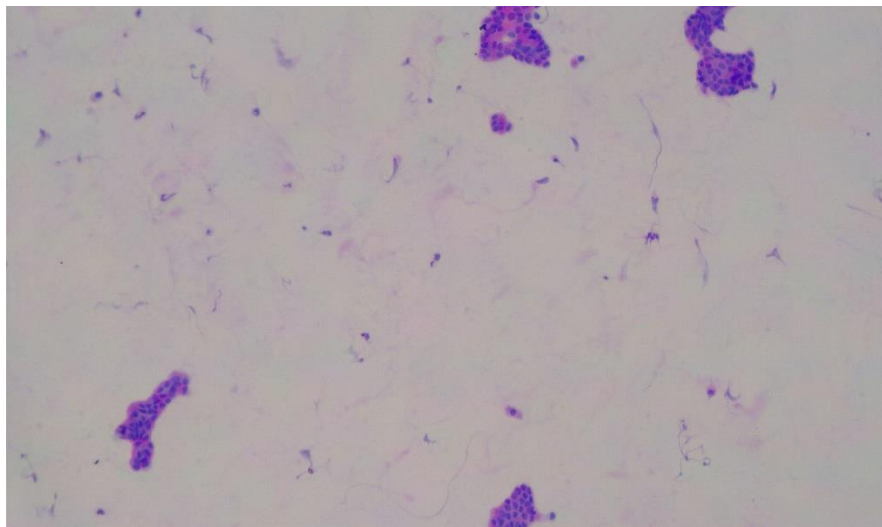
2.8. Импресионна цитология

Изследвани бяха 49 проби на пациенти със суспектна лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция. Извършена бе дескриптивна статистика. Възпалителна инфилтрация бе открита при 75.5% (n=37) от изследваните пациенти, като клетъчните детайли трудно позволяваха да се направи преценка за типа на реакцията (неутрофилна, лимфоцитна и т.н.). Наличие на PAS+ клетки в роговичния епител е белег за конюнктивализация, който бе установен също при 37 пациенти. Пациентите, при които едновременно се наблюдаваха и възпалителни инфилтрати, и PAS позитивни клетки бяха 29 (59.2%), което доказва два от компонентите на типичната за лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция триада – конюнктивализация, неоваскуларизация и хронично възпаление.

| Показател | N | % |
|-------------------------|----|------|
| PAS | 37 | 75,5 |
| Възпалителни клетки | 37 | 75,5 |
| PAS+Възпалителни клетки | 29 | 59,2 |

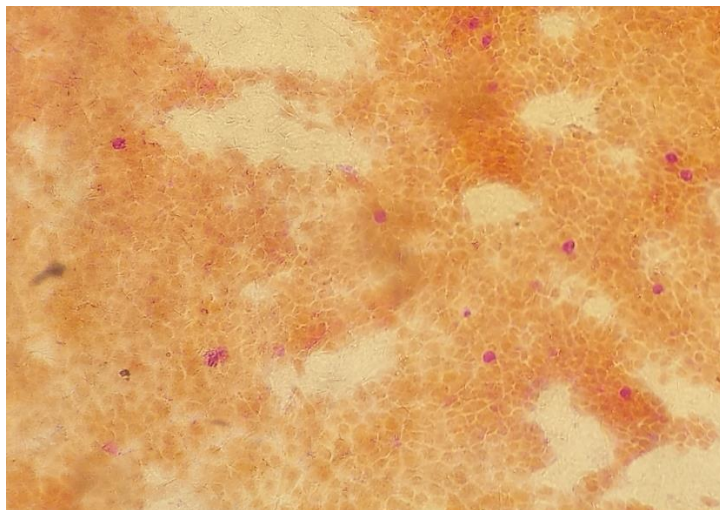
| | | |
|---------------|----|------|
| Кератинизация | 19 | 38,8 |
| Дисплазия | 6 | 12,2 |
| Инклузии | 3 | 6,1 |
| Базални | 10 | 20,4 |

Таблица 24. Показатели от импресионната цитология.



Фигура 25. Острови от конюнктивен епител сред роговичните плоски епителни клетки.

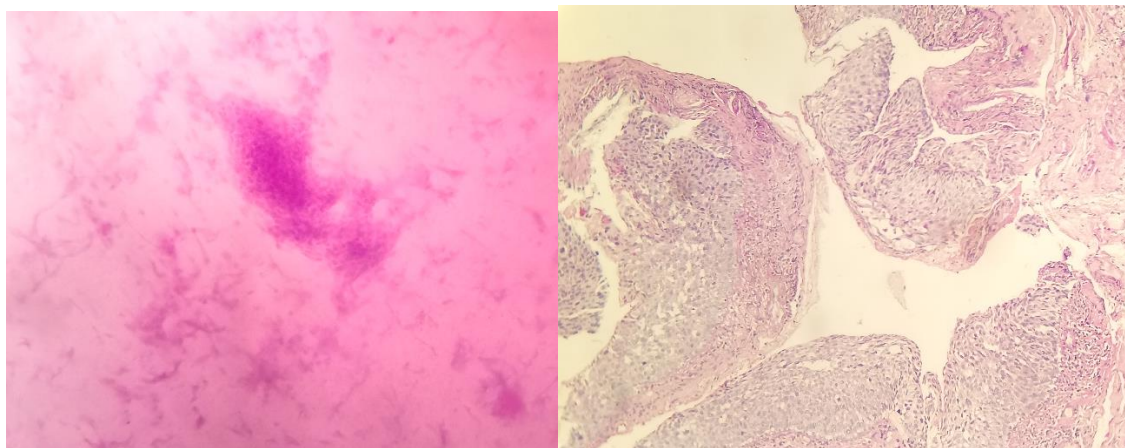
В 38.8% от случаите бе установена тежка ксероза на епитела с метаплазия към многослоен плосък вроговяващ епител (кератинизация), маркирана с реактива на Папаниколау (Фигура 26).



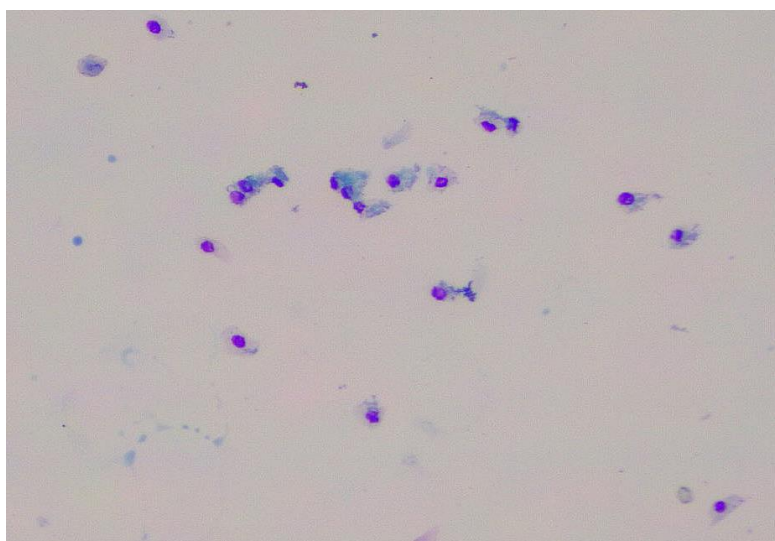
Фигура 26. Кератинизация с PAS+ клетки.

При шестима пациенти (12.2%) се откри дисплазия, която бе потвърдена хистологично при двама от тях. Интересно бе, че в случаи със суспектна розацея и птериgium бяха открити атипични епителни клетки(236,237), което съответства на налични данни в литературата и

подкрепя заключението, че конюнктивализацията наподобява процеса на плоскоклетъчна метаплазия.

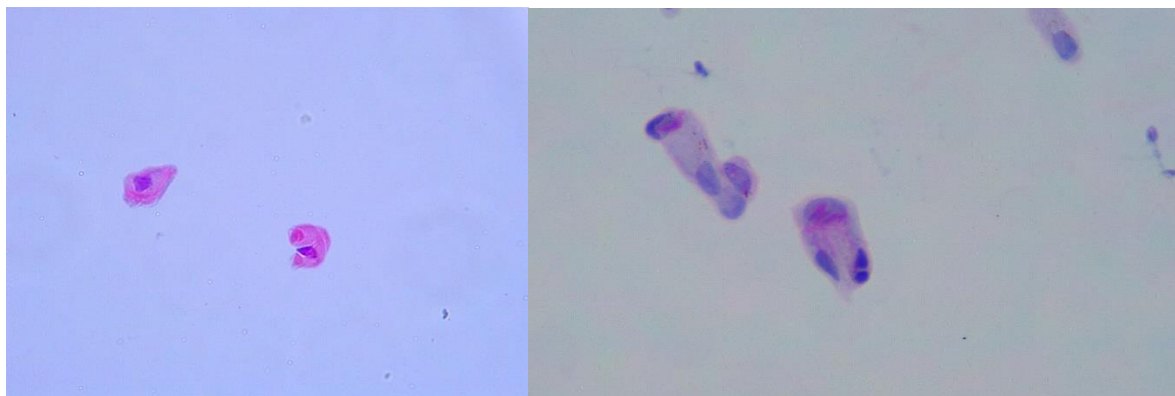


Фигура 27. Пациент с плоскоклетъчна метаплазия: Импресионна цитология (ляво), хистология (дясно).



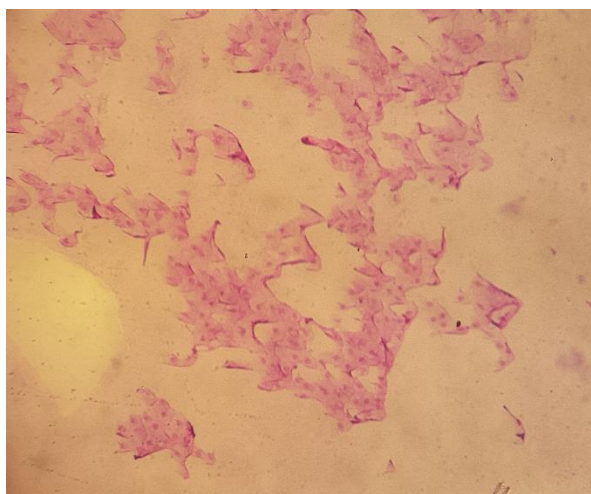
Фигура 28. Атипични роговични клетки при пациент с птериgium.

При трима от пациентите бяха наблюдавани интрацитоплазмени включвания, характерни за активна херпетична инфекция. Това представлява интерес и като диагностичен показател за активна херпетична инфекция, потвърдена при трима от пациентите чрез PCR. В един от случаите получаването на импресии доведе до отстранване на голяма част от роговичните епителни клетки в процес наподобяващ епителен дебридман. След премахването на заразените епителни клетки значително се подобриха прозрачността и епителизацията на роговицата.



Фигура 29. Интрацитоплазмени включвания, корелиращи с вирусна инвазия в епителните клетки (херпетична инфекция).

Пробите, обработени по класическата методика на Ценг, демонстрираха хиперцелуларитет, морфология на конюнктивните и роговични клетки, съответстваща на описаната в литературата (Фигура 30).



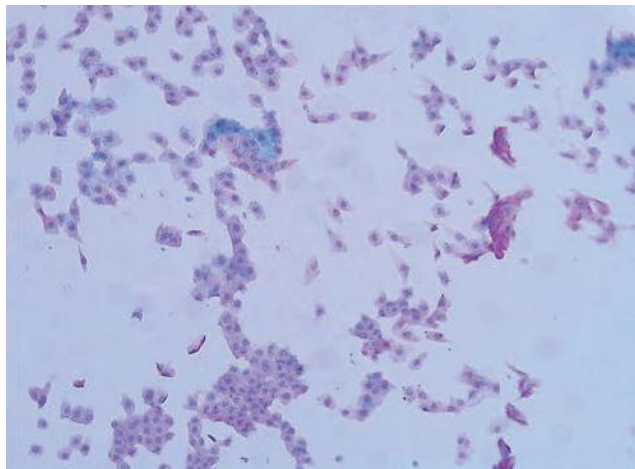
Фигура 30. Нормален роговичен епител, маркиран по класическата методика на Ценг.

При наличие на дълбока язва с епителни нестабилност и оток целулозацетатният филтър бе директно натоварен с клетки от базалните слоеве, без да е необходимо прилагането на консекутивни импресии (n=10).

Недостатък на методиката, който бе установен, е краткотрайното опрозряване на филтърната лента след поставяне в ксилен и фиксиране в хистологичен препарат, налагащо повторно третиране с ксилен за визуализация на клетки без артефакти.

Стандартните хистологични препарати, маркирани с Цитоколор и Папенхайм демонстрираха по-често хипоцелуларитет, типична находка за многослоен плосък невроговяващ епител (Фигура 31). Наблюдавани бяха единични цилиндрични клетки.

Клетъчната морфология при възпалителна реакция позволяваше определяне на клетките като лимфоцити или неутрофили.



Фигура 31. Импресионна цитология чрез стандартни цитологични техники при пациент с невротрофична кератопатия след прекаран херпес зостер (Cytocolor, x100).

Използвани бяха 30 проби от очи на доброволци без данни за очни заболявания, включително сухо око, които не поставят топикални медикаменти, освен спорадична употреба на изкуствени сълзи. При тях се установи нормален конюнктивен и роговичен фенотип с наличие на чашковидни ПАС+ клетки само в конюнктивната част от препаратата.

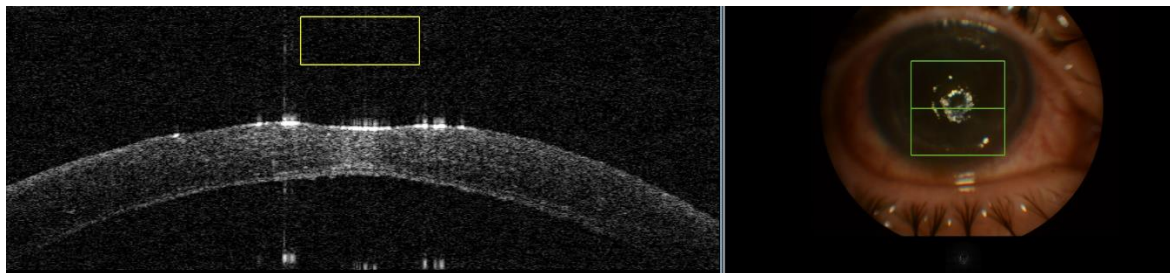
2.9. Оптична кохерентна томография

Оптичната кохерентна томография на преден сегмент бе използвана за визуализиране на дефектите в епитела, хиперрефлексивност, оток и изтъняване в стромата и промените в лимбалните палисади на Вогт.

Епителни дефекти бяха установени при 43 пациенти, като при 14 те бяха единични с размер под 1мм, а при 29 бяха по-големи от 1мм. При всички пациенти бе установена неравномерна дебелина на епитела.

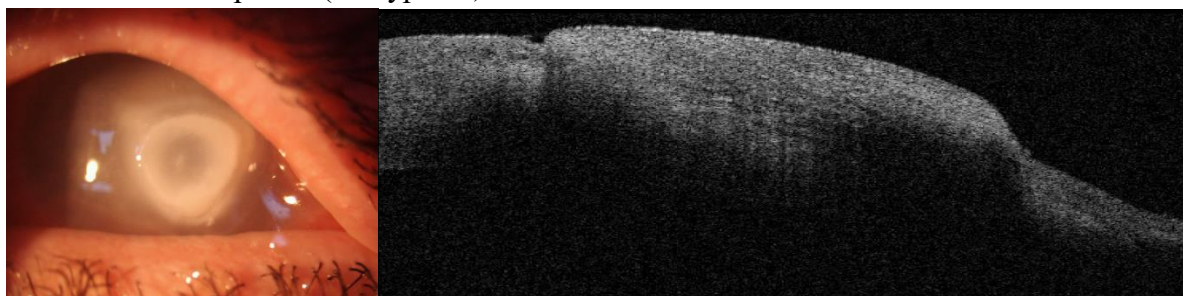


Фигура 32. Пациент с епителен дефект под 1мм.



Фигура 33. Пациент с общирен епителен дефект след продължителна употреба на топикален анестетик.

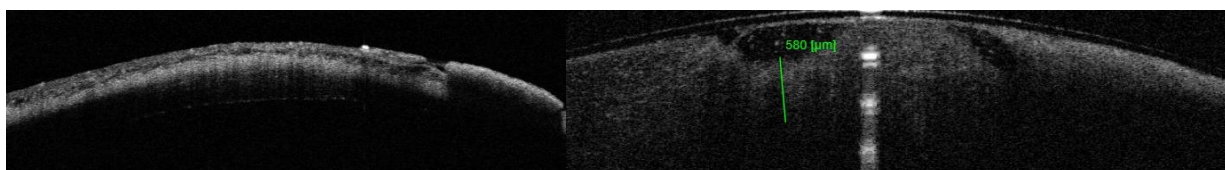
Наблюдавана бе стромална хиперрефлексивност при всички пациенти в различна дълбочина без ясно отграничена демаркационна линия. При двама от пациентите се наблюдаваха плътни конфлуирани зони на стромална хиперрефлексивност, корелиращи с липоидна дегенерация (Фигура 34).



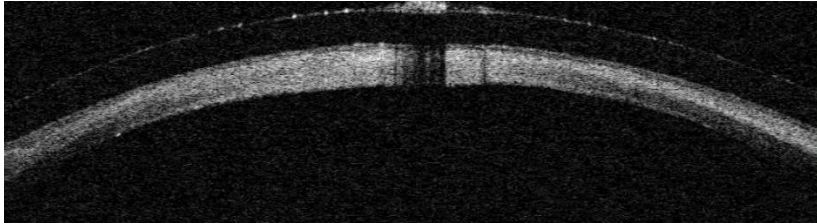
Фигура 34. Липоидна дегенерация след тежка роговична инфекция. Ляво: Плътен белезникав инфилтрат с надигнати ръбове и тенденция за опрозрачаване в центъра на лезията. Дясно: Оптична кохерентна томография на преден сегмент, демонстрираща надигнатата зона на стромална хиперрефлексивност със засенчване на дълбоките слоеве.

Стромалната хиперрефлексивност се отдава на миграция и активация на кератоцитите и възпалителна инфилтрация с продукция на цитокини, екстрацелуларен матрикс и колагенови влакна. Процесът може да е резултат от епителни промени или да е първичния фокус с вторично увреждане на повърхностните слоеве.

Оток бе установен при 12 пациенти, а стромално изтъняване при 29. При 8 пациенти не се наблюдава изменение в роговичната дебелина. При четирима пациенти се наблюдаваха зони на десцеметоцеле и при двама перфорация в цяла дебелина. При двама пациенти се откриха кистични изменения в предните отдели на стромата.

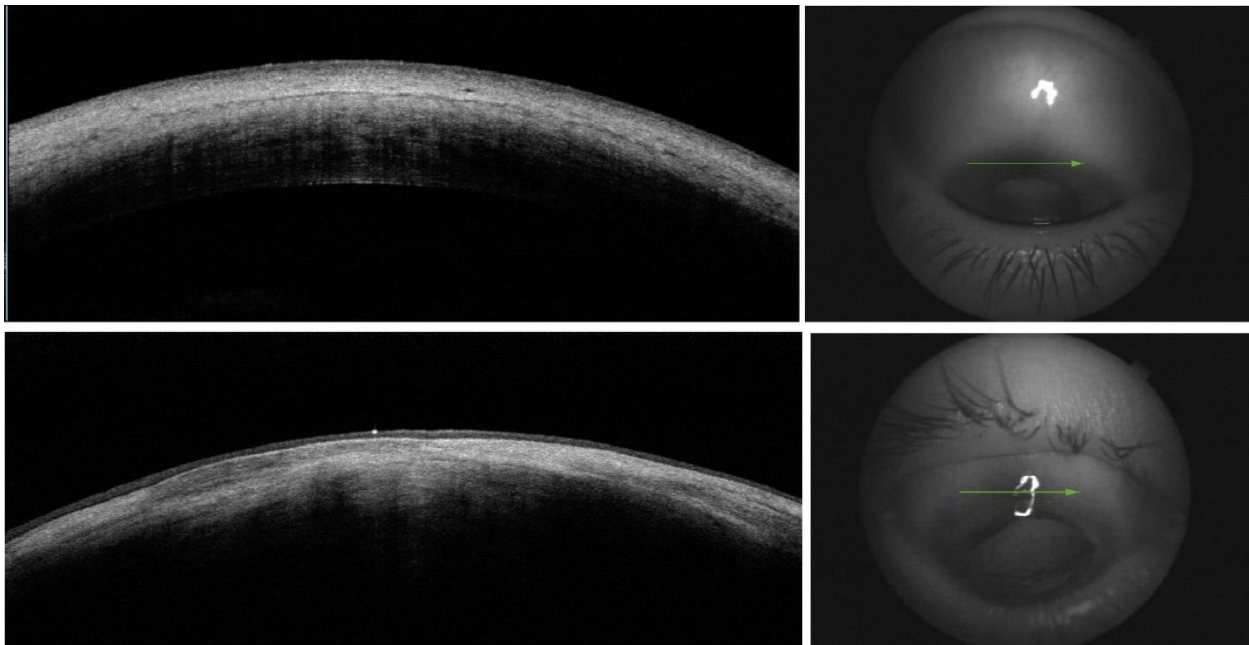


Фигура 35. Кистични изменения в стромата при двама от пациентите.



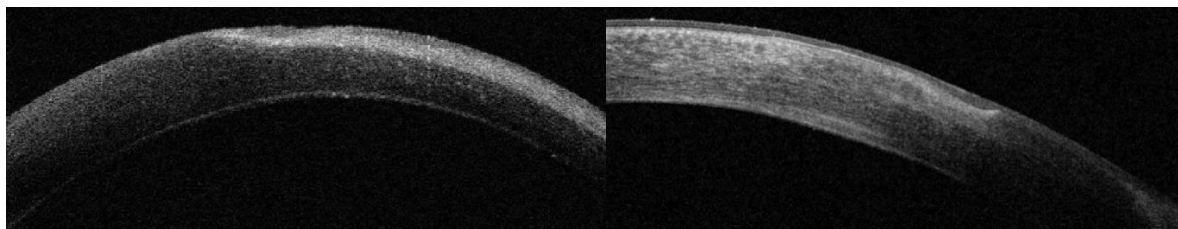
Фигура 36. Стромално изтъняване.

Оптичната кохерентна томография демонстрира частично изменен контур на палисадите(238) в 39 очи (Фигура 37, горе). Промените се изразяваха в изтъняване на лимбалния епител и изглаждане на стромалната депресия в областта на лимба и изгладен контур на палисадите. Пълна липса бе установена при шест очи – при двама след множество оперативни интервенции в областта на лимба, две очи с кератолиза, асоциирана с ревматоиден артрит, пациент с кератолиза, поради предполагаема трофична/токсична кератопатия и пациент с нелекуван инфекциозен кератит (Фигура 37, долу).



Фигура 37. Пациент с частично изменен контур на палисадите на Вогт (горе). Пациент с тотална липса на палисади (долу).

След лечение се проведе ОСТ на преден сегмент за оценка на епителния интегритет и реакцията в стромалната тъкан. При 47 пациенти ОСТ след лечение демонстрира пълна епителизация на роговичната повърхност. При 29 се установи формиране на фина цикатрициална тъкан с демаркационна линия в стромата. Стромалните оток и хиперрефлексивност претърпяха обратно развитие. Процесът на стромално изтъняване бе прекъснат.



Фигура 38. Формиране на демаркационна линия в стромата след лечение.

ИЗВОД

Лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция може да е подлежащ патогенетичен механизъм при персистиращи епителни дефекти/язви. Лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция се доказва чрез биомикроскопия, импресионна цитология, ОСТ. Не всички пациенти с ЛСЦД подлежат на трансплантация на клетки.

РЕЗУЛТАТИ ПО ЗАДАЧА 3

Да се изготви и оцени протокол за получаване, транспортиране, екс виво размножаване и трансплантация на лимбални стволови клетки при пациенти със заболявания на очната повърхност, асоциирани с лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция.

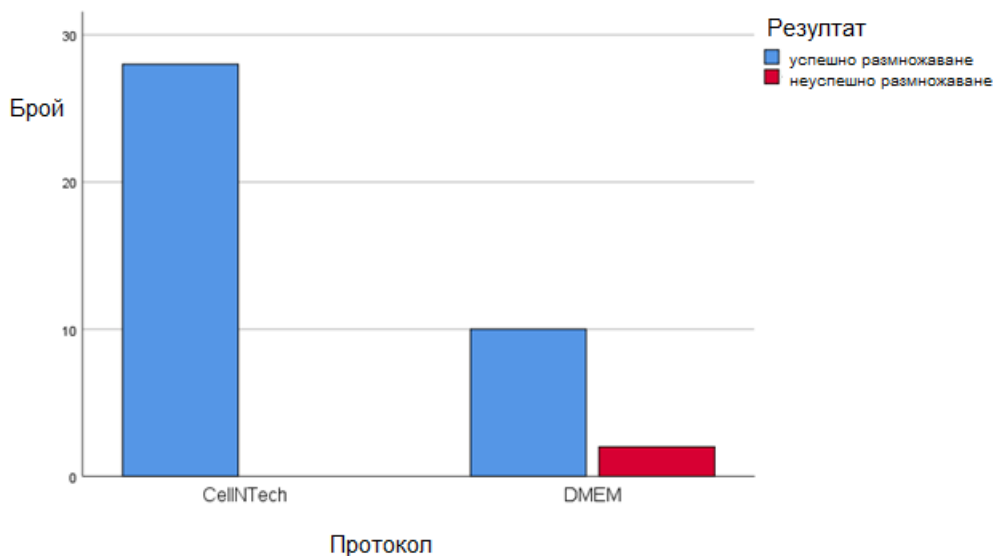
В рамките на настоящото проучване се сравниха два различни протокола за ех vivo размножаване на лимбални епителни стволови клетки. Първият бе изготвен на базата на описана в литературата методика, включваща класически хранителни среди (Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM/HAMF12), различни растежни фактори (Epidermal growth factor - EGF) и телешки серум(196).

По този протокол бяха обработени 8 проби от донорен корнеосклерален бутон и 4 проби от пациенти със заболявания на очната повърхност. Заболяванията включваха постинфекциозна кератопатия след бактериална инфекция (n=1), ятрогенна инсуфициенция, поради множество оперативни интервенции в областта на лимба (n=1) и постинфекциозни усложнения след херпетична инфекция (n=2). От материалите, получени от пациенти с пост-херпетични язви не се наблюдава растеж. Получените транспланти не бяха използвани за лечение на пациенти.

Вторият протокол включваше иновативни хранителни среди без добавяне на ксенобиотични продукти и разработени в съответствие с Практиката за добро производство. След верифициране на протокола чрез използване на 8 материала от корнео-склерален донорен бутон, се предприе опит за размножаване на клетки от минимално инвазивна лимбална биопсия на пациенти с клинични белези на лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция.

По втория протокол бяха размножени 20 материала от пациенти, като при всички се наблюдава успешна пролиферация, миграция и конfluентност на получените транспланти. Етиологията включваше невротрофична кератопатия, предимно свързана с инсулт (n=5), постинфекциозна кератопатия най-често след прекрана херпетична инфекция (n=6), ятрогенен (n=2), комбиниран ятрогенен и постинфекциозен (n=1), стерилна роговична язва при ревматоиден артрит (n=2), токсичен (n=2), радиационен (n=1) и очна розацея (n=1). От получените материали трансплантация на екс виво размножените лимбални стволови клетки бе извършена при 15 пациенти.

Fisher's exact test не показва статистически значима разлика в успеваемостта (p=0.085). Вероятно това се дължи на по-малкия общ брой материали, включени по първия протокол. Резултатите могат да са повлияни и от малката бройка на пациенти с лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция, при които в средите базирани на DMEM/HAMF12 не дадоха растеж.



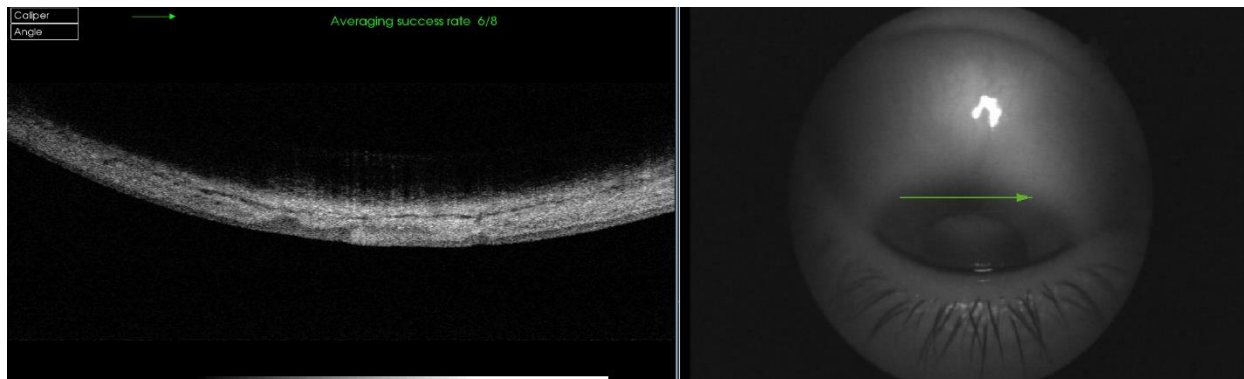
Фигура 39. Графично представяне на резултатите от сравнителния анализ на двата протокола за екс виво размножаване на лимбални стволови клетки.

Въпреки това за пациентите подлежащи на трансплантация бяха предпочетени среди, произведени според стандартите на Добрата Медицинска и Производствена практика, тъй като при тях не се изисква добавянето на продукти от животински произход или серум от пациенти, което прави технологията биологично безопасна. Възможно е съдържанието на растежни фактори, прилагани при размножаването в DMEM среди да не е оптимално, а в стандартизираните среди има точно съотношение на голям брой фактори.

3.1. Лимбална биопсия

Минимално инвазивна биопсия бе проведена при 24 очи с лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция от двама офталмохирурзи с повече от 10 години опит. Биопсията бе извършена в сектор със запазен контур на палисадите на Вогт, определен чрез оптична кохерентна томография. Най-често този сектор беше между 10 и 2 часа, вероятно поради данните за най-голяма популация на лимбалните стволови клетки в горния квадрант(239). В случаите на заличен контур на палисадите бе проведена биопсия на контралатералното око в областта на 12 часа (n=3).

Предоперативната подготовка включваше щателно почистване на оперативното поле с Повидон-Йод 10% и Повидон-Йод 5% във форниксите. Процедурата за получаване на лимбални стволови клетки бе извършена с локална анестезия с топикален анестетик и субконюнктивално приложение на Лидокаин 2%. След това с 15° острие се маркира зона с размери 2x2мм. Извърши се разрез от конюнктивната страна. С помощта на полулунно острие (crescent) се направи дисекция на конюнктивния епител и роговицата с дебелина около 100 микрона (Фигура 40).



Фигура 40. Оптична кохерентна томография в зоната на минимално инвазивна лимбална биопсия на 12 часа с дълбочина около 100 микрона, която обхваща стромата 1 седмица след интервенцията. Зоната демонстрира пълна епителизация без негативни ефекти върху донорното око.

По този начин се обхващат всички епителни слоеве в дълбочина, но и част от стромата, за която се предполага, че също съдържа стволови клетки(240). Клетъчните култури с едновременно съдържание на лимбални стволови клетки и стромални роговични стволови клетки (corneal stromal stem cells) елиминират нуждата от фийдър слоеве с животински произход и поддържат пролиферативните възможности на епителните клетки(241).

След провеждане на лимбалната биопсия на засегнатото око се проведе биологично покритие с амниотична мембрана с епителната страна нагоре, която се фиксира като единичен слой с прекъснат лимбален шев 10/0. В случаите на дълбоки язви се проведе многослойно покритие (n=2). В тези случаи бе проведена и частична тарзорафия. Не бе използвана контактна леща в края на интервенцията.

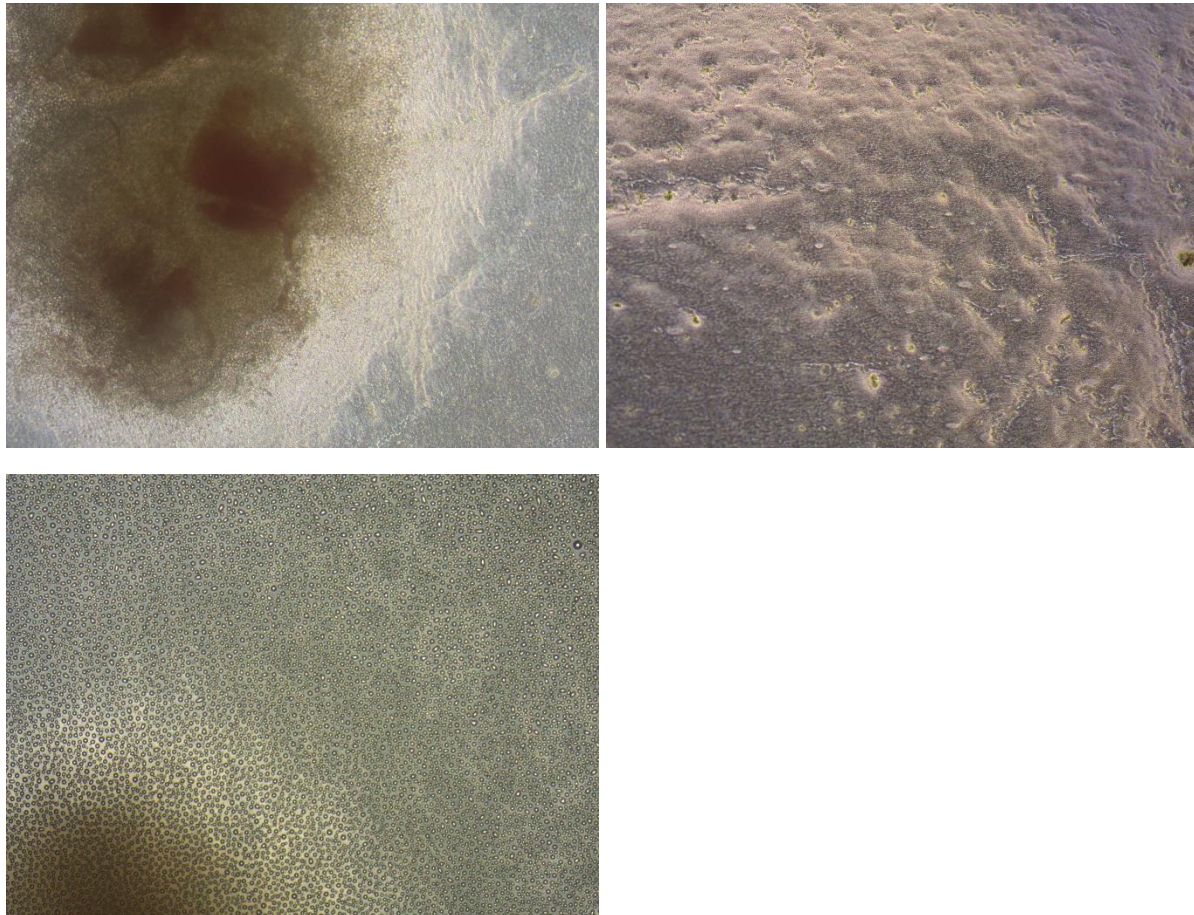
3.2. Техника за екс виво размножаване на лимбалните стволови клетки

Получените експланти съдържащи лимбалните стволови клетки бяха транспортирани до тъканна банка Биорегенерация, сертифицирана от Европейската Агенция по трансплантации, Министерство на Здравеопазването на Република България, Международния акредитационен форум и Certind за работа с клетъчни продукти и тъкани за трансплантация в транспортна среда Stem alpha 2 (STEM ALPHA, Rhone-Alpes, France) в рамките на 2 часа от експлантацията. Експлантите бяха директно поставени в специално разработена система за фиксиране на преносителя (амниотична мембрана) в растежната среда. Въпреки че някои автори препоръчват отделянето на лимбалните стволови клетки чрез третиране с трипсин/ЕДТА, нашият протокол не включваше тази стъпка, тъй като целта беше да съхраним компонентите от лимбалната строма. След поставянето на експлантите в системата клетките бяха размножени в съответствие с препоръките за Добра Медицинска и Производитвена практика чрез протокол без съдържание на животински продукти (включително растежни слоеве, телешки или човешки серум) според инструкциите на производителя (CnTFrame, CELLnTEC Advanced Cell Systems AG, Bern, Switzerland). За преносител бе използвана прясна амниотична мембрана, при която не бе отстранен епителния слой. Препоръките за преносител все още не са еднозначни за обработката на амниотичната мембрана – съществуват публикации, че интактната мембрана позволява по-добра миграция, пролиферация и диференциация на лимбалните епителни стволови клетки(242). Има и данни за обратното (243), според които е по-удачно мембраната да е дезепителизирана. Системата за клетъчни култури, която използвахме, позволяваше т.нар. air-lifting, което доведе до формиране на няколко слоя от клетки. Системата включваше голям и малък стерилен титаниев ринг, като малкият се поставя над големия. Амниотичната мембрана се фиксираше между двата ринга с епителната страна надолу, а в получената суспендирана мембрана се поставяше експлантираният материал. Мембраната не трябва да стои опъната между ринговете, а да се остави свободно, така че да формира ямка. Този аванс се налага, тъй като при растежа на лимбалните епителни клетки мембраната може да се скъса, а и се постига по-голяма контактна площ между повърхността на мембраната и растежните среди.



Фигура 41. Система от два пръстена, между които се фиксира амниотичната мембрана, съдържаща експланта и изпълвана с растежната среда.

Клетките бяха размножени в продължение на 14 дни в инкубатор при температура 37°C с 5% CO₂ и подходяща влажност. Растежната среда бе подменяна през ден. Конфлуентността и морфологията на клетките бяха наблюдавани чрез инвертирана фазовоконтрастна микроскопия (Olympus EP50, Olympus LS). Наблюдаваха се малки кубични клетки, изхождащи от ръба на експланта, които мигрираха и пролиферираха. Съотношението ядро-цитоплазма бе високо и се наблюдаваха митотични фигури (Фигура 42).



Фигура 42. Инвертирана фазовоконтрастна микроскопия на експланта, съдържащ лимбални стволови клетки (горе ляво), миграция и пролиферация на клетките (горе дясно), морфологични характеристики и митотични фигури (долу).

3.3. Техника на трансплантация на получения графт

След формиране на достатъчен брой клетъчни слоеве на 14 ден се предприе трансплантация на получените графтове. Проведена бе трансплантация на 15 екс виво размножени автоложни лимбални стволови клетки. Средната възраст на пациентите бе 56.4 ± 15.9 . Включени бяха 6 мъже и 9 жени. Демографските характеристики са представени в табличен вид.

| Пол | Брой | Процент | Средна възраст | Стандартно отклонение |
|------|------|---------|----------------|-----------------------|
| Мъже | 6 | 40% | 53.83 | 15.05 |
| Жени | 9 | 60% | 58.11 | 17.54 |

Таблица 25. Демографски характеристики на пациентите, при които бе проведено лечение с трансплантация на екс виво размножени лимбални стволови клетки.

Средната зрителна острота преди лечението бе 0.003 ± 0.0052 (медиана \pm СГ) или 0.015 ± 0.022 (средна \pm стандартно отклонение).

Техниката включваше внимателно отстраняване на малкия ринг и освобождаване на амниотината мембрана, съдържаща стволовите клетки. Мембрана се разстиляше върху стерилен дрейп, след което централната част се оформяше с ножица на Westcott, пренасяше се върху централната част от роговицата с епителната страна нагоре и се адаптираше с лимбален шен 10/0. По този начин размножените епителни клетки остават между роговичната повърхност и амниона. Тъй като амниотичната мембрана бе с голям размер, от периферната част се оформяше втори слой, който се адаптираше към конюнктивата с прекъснат шев 8/0.

Вторият слой бе използван като покритие (amniotic membrane patching) с цел да се инхибира протеиназната активност и да осигури допълнителен антиинфламаторен и ангиогенен ефект(244–246). По този начин се забавя разграждането на амниона, преносител на стволовите клетки и се подпомага интегрирането им към тъканите на реципиента.

3.4. Техника на трансплантация на корнеосклерален бутон

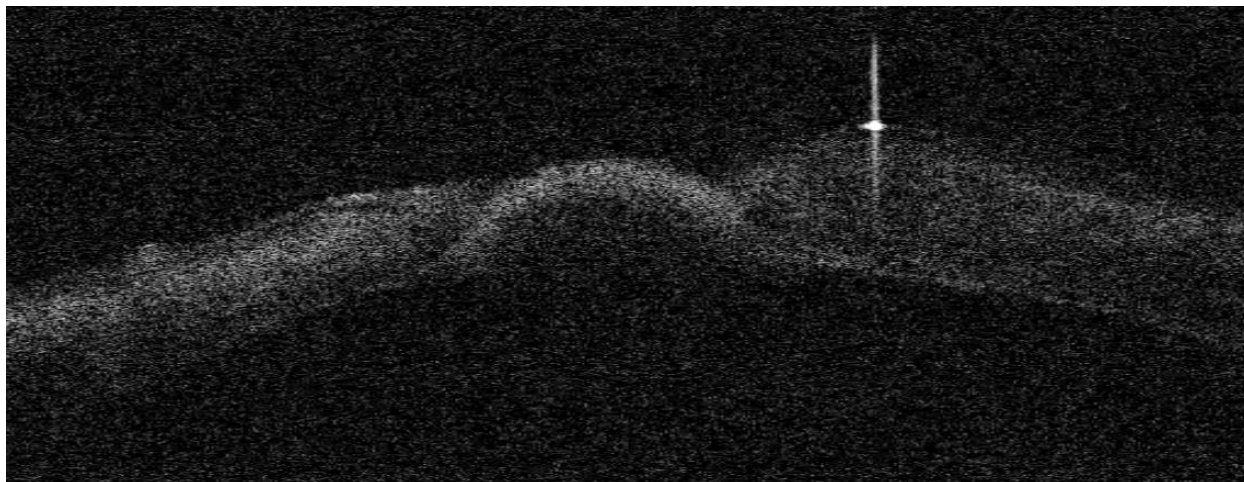
В случаите на роговина перфорация или десцеметоцеле ($n=7$) се предприе трансплантация на корнеосклерален бутон като биологично покритие. Средната възраст на пациентите бе 60.71 ± 18.29 . Демографските характеристики са обобщени на таблицата.

| Пол | Брой | Процент | Средна възраст | Стандартно отклонение |
|-----|------|---------|----------------|-----------------------|
| м | 6 | 85.71% | 60.17 | 19.97 |
| ж | 1 | 14.29% | 64 | 0 |

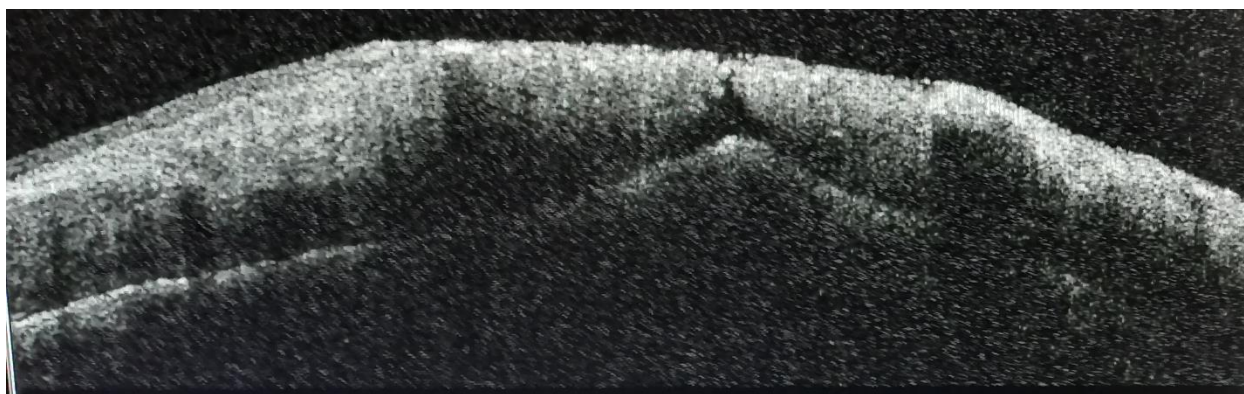
Таблица 26. Демографски характеристики на пациентите, при които бе проведено лечение с трансплантация на корнеосклерален бутон.

Зрителна острота преди лечение с корнеосклерален бутон бе 0.001 при всички пациенти, което отговаря на запазена перцепция и/или проекция на светлина.

Пациентите се характеризираха с инфилтрация, фиброваскуларни изменения и изтъняване в цялата роговица в някои случаи с ангажиране на ирисова тъкан в дълбочина на язвата, съпроводени с атаксия. Преценката за състоянието на предната камера бе трудно, поради намалената роговична прозрачност, но иридокорнеалният контакт се визуализира на ОСТ.



Фигура 43. Пациент с десцетоцеле, при който бе проведено биологично покритие с корнеосклерален бутон.



Фигура 44. Иридокорнеален контакт на пациент преди трансплантация на корнеосклерален бутон.

За материал бяха използвани роговици, които бяха отчетени като неподходящи за класическа перфоративна кератопластика, поради неизпълняване на всички критерии, например с ниска ендотелна бройка (<1500), определена чрез спекулярна микроскопия (CellChek 20, KONAN, Sarasota, FL, USA).

Техниката включваше стандартна подготовка на оперативното поле. Корнеосклералният бутон бе промит с BSS за 5 минути преди да се пристъпи към адаптирането му. Извърши се конюнктивна перитомия на 360°. Склералната повърхност на донорния материал се фиксира за склерата на пациента с шев 6/0. След това конюнктивата се адаптира с шев 8/0.

Трансплантацията на корнеосклерален бутон от една страна замества кератопластика „на горещо“, която е технически предизвикателна, често с незадоволителен резултат и може да влоши преживяемостта на последващи трансплантации(247). От друга страна използвайки целият донорен материал се обхваща и лимба със съдържащите се в него стволни клетки, което замества алогенната кератолимбална трансплантация.

3.5. Постоперативен режим

Пациентите поставяха фиксирана комбинация на преднизолон ацетат и тобрамицин колир четири пъти дневно и компресивна превъзка. След първата седмица поставянето на медикамента постепенно бе намалено по схема до пълното спиране на първия месец. За целия период пациентите поставяха и лубрикант, съдържащ 0.15% натриев хиалуронат, 0,5% полиетиленгликол 8000 (PEG 8000), калиев хлорид, калциев хлорид, магнезиев хлорид, натриев хлорид, витамин В12, вода за инжекции, борна киселина и Oxyd®. Пациентите не приемаха системни антибиотици или имуномодулатори до контролния преглед на първия постоперативен месец.

3.6. Дефиниране на критериите за успех

Критериите за успех бяха дефинирани като пълна епителизация на роговичната повърхност, редукция на фиброваскуларната тъкан или пълното ѝ изчезване, възстановяване на нормални прозрачност, дебелина и рефлекс на роговицата. При интактен заден очен сегмент се включва и подобрението на зрителната острота. Степента на епителизация се определи чрез маркиране с флуоресцеин на 1-ви и 6-ти постоперативен месец. Направи се оценка за нежелани странични ефекти и усложнения, включително инфекция, прогресивно роговично изтъняване, отхвърляне на трансплантата, определено като персистиращи епителни дефекти, неоваскуларизация и намалена прозрачност на роговицата, както и за негативни ефекти от лимбалната биопсия върху състоянието на донорното око.

3.7. Постоперативни резултати

3.7.1. Трансплантация на екс виво размножени лимбални епителни клетки

Критериите за успех бяха изпълнени при всички 15 пациенти. При двама от пациентите нямаше подобрение в зрителната острота, поради съпътстващите очни заболявания. Въпреки това, критериите за успех по отношение на епителизация, редукция на фиброваскуларната тъкан и стабилизиране на стромалното изтъняване бяха изпълнени. Средната постоперативна зрителна острота на 1-ви постоперативен месец бе 0.05 ± 0.0387 (медиана \pm СГ). Знаково-ранговият тест на Уилкоксон показва, че подобрението е статистически значимо ($p=0.001$). На 6-ти постоперативен месец средната зрителна острота бе 0.09 ± 0.04 (медиана \pm СГ). Между първия и шестия месец при двама от пациентите бе проведена перфоративна кератопластика, която доведе до подобрение на зрението. Анализът чрез тест на Фридман показва, че разликата е статистически значима между предоперативната и постоперативната зрителна острота и на 1-ви, и на 6ти месец.

Дескриптивна статистика

| | N | Средна | Стандартно отклонение | Минимум | Максимум |
|------------|----|--------|-----------------------|---------|----------|
| 3Опреди | 15 | .0151 | .02188 | .00 | .05 |
| първимесец | 15 | .1401 | .14612 | .00 | .40 |
| шестимесец | 15 | .1547 | .15604 | .00 | .50 |

Тест на Фридман

| | |
|---------------------|--------|
| N | 15 |
| Chi квадрат | 24.326 |
| Сигнификантност (p) | .000 |

Таблица 27. Сравнителен анализ на зрителната острота преди лечение и на 1ви и 6ти постоперативен месец.

Тестът на Уилкоксон не показва статистически значима разлика между 1ви и 6ти месец ($p=0.059$). Не се наблюдаваха усложнения или нежелани странични ефекти, включително инфекции или отхвърляне на трансплантата. Минимално инвазивната лимбална биопсия не влоши състоянието на очната повърхност.

Извършен бе допълнителен анализ на състоянието на очната повърхност чрез стандартизиран софтуер за оценка на постоперативните резултати след трансплантация на екс виво размножени лимбални стволови клетки. Резултатите от Vascularization, Haze, and Integrity (VaHI) софтуера демонстрираха средна стойност на васкуларизацията преди интервенцията 0.27 ± 0.177 , средна стойност на роговичните мътнини 0.49 ± 0.174 и състояние на епитела 2.73 ± 0.458 . Постоперативните резултати на 6ти месец бяха 0.08 ± 0.056 за васкуларизацията, 0.14 ± 0.071 за роговични мътнини и 0.80 ± 0.862 за състоянието на епитела.

T-тест за зависими данни демонстрира сигнификантна редукция в неоваскуларизацията ($p < 0.001$), степента на роговични мътнини ($p < 0.001$) и обективното състояние на епитела ($p < 0.001$).

| Показател | N | Mean | SD | t | df | p |
|-------------------------|----|--------|---------|-------|----|------------------|
| Неоваскуларизация преди | 15 | 0,2651 | 0,17662 | 4,935 | 14 | <0.001 |
| Неоваскуларизация след | 15 | 0,0769 | 0,05636 | | | |
| Роговични мътнини преди | 15 | 0,4893 | 0,17383 | 7,620 | 14 | <0.001 |
| Роговични мътнини след | 15 | 0,1352 | 0,07145 | | | |
| Епител преди | 15 | 2,7333 | 0,45774 | 9,374 | 14 | <0.001 |
| Епител след | 15 | 0,8000 | 0,86189 | | | |

Таблица 28. Сравнителен анализ на промяната в показателите от стандартизирания софтуер за оценка на лимбалната стволочлетъчна инсуфициенция.

3.7.2. Корнеосклерален бутон

Критериите за успех бяха частично изпълнени при 6 от 7 пациенти (85.71%). При един от пациентите след бти постоперативен месец се наложи евисцерация, поради стопяване на трансплантирания корнеосклерален бутон. При 6 пациенти се постигна епителизация на очната повърхност, с редукция на фиброваскуларната тъкан и анатомично възстановяване на преден очен сегмент при 5 от тях. При един от пациентите се наблюдава персистираща предна синехия. При един от пациентите се наложи експлантация на корнеосклералния бутон на бти месец, поради съмнение за микотична инфекция. Такава не бе потвърдена, а експланта бе подложен на хистологично изследване, което демонстрира фиброзна съединителна тъкан, тапицирана с многослоен плосък епител с фокуси на хроничен неспецифичен възпалителен процес субепително и с васкуларизация. Средната постоперативна зрителна острота на бти месец бе 0.017 ± 0.02 (Средна \pm СО) или 0.008 ± 0.008 (медиана \pm СЕМ). Тестът на Уилкоксон

демонстрира статистически значима разлика ($p=0.027$).

| Дескриптивна статистика | | | | | | Знаково-рангов тест на Уилкоксон | |
|-------------------------|---|--------|-----------------------|---------|----------|----------------------------------|---------------------|
| | N | Средна | Стандартно отклонение | Минимум | Максимум | | ЗОслед - ЗОпреди |
| ЗОпреди | 7 | .00100 | .000000 | .001 | .001 | Z | -2.205 ^b |
| ЗОслед | 7 | .01771 | .022306 | .000 | .050 | Сигнификантност (p) | .027 |

Таблица 29. Статистически анализ на зрителната острота преди и след трансплантация на КСБ.

ИЗВОД:

Използван е протокол, който е изключително ефективен, базиран на биологично безопасна технология без добавяне на ксенобиотични продукти. Той осигури максимална клонална експанзия и едновременно съхрани недиференциран фенотип и пролиферативен потенциал на стволовите клетки. Трансплантация на автоложни екс виво рамножени стволови клетки е безопасна и ефективна технология.

РЕЗУЛТАТИ ЗАДАЧА 4

Да се проследи влиянието на криопрезервацията върху пролиферативните и миграционните свойства на лимбалните стволови клетки

Протоколът за криопрезервация на получените експланти, съдържащи ЛЕСК, включваше употребата на специален криопротектор СпТ-CRYO-50, в който бе прехвърлена биопсията и след това се съхраняваше при температура -80°C .

Материалите от 8 лимбални биопсии и 6 пациенти с лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция бяха презервирани между 1 и 3 месеца. След това се пристъпи към внимателно размразяване и се проведе описаният вече протокол за екс виво размножаване на лимбалните стволови клетки. Чрез фазовоконтрастна микроскопия се наблюдаваха идентична с прясно размножените ЛЕСК морфология, пролиферация и миграция на клетъчните култури. На 14 ден се формираха няколко епителни слоя.

Повечето научни разработки съобщават за първоначално размножаване на ЛЕСК и последващо замразяване(248). Сравнението между първично замразяване на експланти и замразяване на експандирани клетки демонстрира сходни резултати, като първоначално размножените клетки демонстрират 88% виталност на 1 месец(249).

Нашите резултати подкрепят наличните данни, че криопрезервацията не повлиява пролиферативните и миграционни способности на ЛЕСК и създава възможност за създаване на тъканна банка от лимбали материали, позволяваща ало- или автоложна трансплантация в кратки срокове.

ИЗВОД: Криопрезервацията не повлиява значително виталността и способностите за миграция, пролиферация и диференциация на клетките.

РЕЗУЛТАТИ ЗАДАЧА 5

Да се сравнят проспективно постоперативните резултати и промените в роговичната тъкан при пациенти с трансплантация на амниотична мембрана и пациенти с трансплантация на лимбални стволови клетки.

5.1. Групи

Материалите включени в сравнителния анализ включват 15 пациенти, при които бе проведена трансплантация на екс виво размножени лимбални епителни стволови клетки, 7 пациенти, при които е проведена трансплантация на корнеосклерален бутон и 40 пациенти, при които е проведена стандартна трансплантация на амниотична мембрана.

5.2. Демографски характеристики и анамнестични данни

Средната възраст на пациентите в групата с трансплантация на екс виво размножени стволови клетки бе 56.4 ± 15.9 , в групата с корнеосклерален бутон бе 60.43 ± 14.6 , а в контролната група с трансплантация на амниотична мембрана бе 58.33 ± 19.01 . Тестът на Крускал-Уолис не показва статистически значима разлика.

| Показател | Група | N | Mean | Median | SD | Min | Max | p |
|-----------|-------|----|--------|--------|--------|--------|--------|-------|
| години | ЛСК | 15 | 56,400 | 56,000 | 15,901 | 34,000 | 85,000 | 0,766 |
| | КСБ | 7 | 61,429 | 64,000 | 14,604 | 41,000 | 80,000 | |
| | АМ | 40 | 58,325 | 62,500 | 19,007 | 20,000 | 85,000 | |

Таблица 30. Сравнителен анализ на групите по възраст.

Точният тест на Фишър не показва статистически значима разлика в половото разпределение между групите.

| пол | | ЛСК | КСБ | АМ | Общо | p |
|------|---|--------|--------|--------|--------|-------|
| Мъже | N | 6 | 6 | 23 | 35 | 0,133 |
| | % | 40,0% | 85,7% | 57,5% | 56,5% | |
| Жени | N | 9 | 1 | 17 | 27 | |
| | % | 60,0% | 14,3% | 42,5% | 43,5% | |
| Общо | N | 15 | 7 | 40 | 62 | |
| | % | 100,0% | 100,0% | 100,0% | 100,0% | |

Таблица 31. Сравнителен анализ на групите по пол.

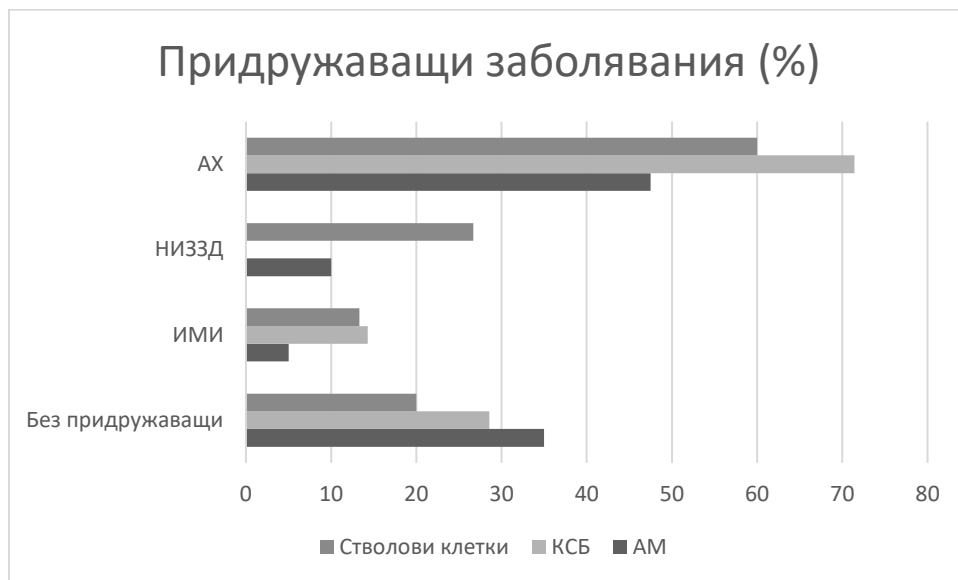
Анамнестичните данни на пациентите, преминали лечение чрез трансплантация на лимбални стволови клетки (n=15) и корнеосклерален бутон (n=7) бяха анализирани допълнително. Направи се сравнителен анализ с контролната група пациенти (n=40), преминали лечение с трансплантация на амниотична мембрана. Този анализ се наложи в хода на проучването, тъй като правеше впечатление увреденото общо състояние на пациентите, при които се доказва инсуфициенция на лимбалните стволови клетки.

Придружаващите заболявания включваха най-често артериална хипертония, неинсулинозависим захарен диабет, инсулт и мозъчно-съдова болест, злокачествени новообразувания в областта на главата. Точният тест на Фишър демонстрира статистически значима разлика в броя на придружаващите заболявания между трите групи, като най-голям процент от пациентите с трансплантация на лимбални стволови клетки бяха с три и повече придружаващи заболявания.

| Брой придружаващи заболявания | | ЛСК | КСБ | АМ | Общо | p |
|-------------------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|
| 0 | N | 3 | 2 | 14 | 19 | 0,003 |
| | % | 20,0% | 28,6% | 35,0% | 30,6% | |
| 1 | N | 1 | 1 | 13 | 15 | |
| | % | 6,7% | 14,3% | 32,5% | 24,2% | |
| 2 | N | 4 | 2 | 12 | 18 | |
| | % | 26,7% | 28,6% | 30,0% | 29,0% | |
| 3 | N | 7 | 2 | 1 | 10 | |

| | | | | | |
|------|---|--------|--------|--------|--------|
| | % | 46,7% | 28,6% | 2,5% | 16,1% |
| Общо | N | 15 | 7 | 40 | 62 |
| | % | 100,0% | 100,0% | 100,0% | 100,0% |

Таблица 32. Сравнителен анализ на групите по брой придружаващи заболявания.



Фигура 45. Графично преставяне на броя на пациентите като процент според най-честите придружаващи заболявания (АХ – артериална хипертони, НИЗЗД – неинсулинозависим захарен диабет, ИМИ – исхемичен мозъчен инсулт), КСБ – корнеосклерален бутон, АМ – амниотична мембрана

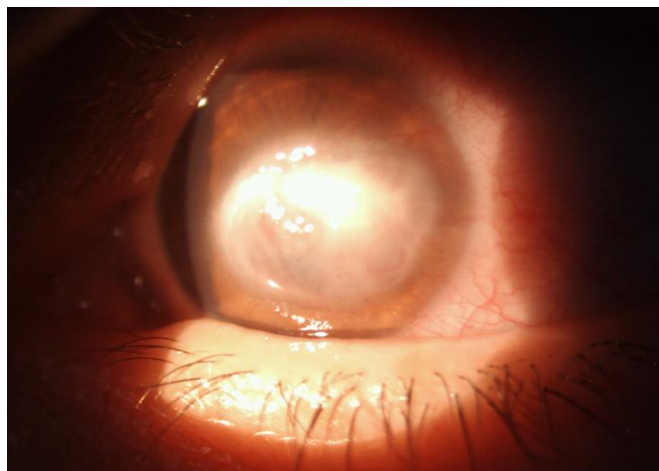
Впечатление прави по-големият процент заболявания в групата на пациенти с трансплантация на стволови клетки и КСБ. Много по-голям брой от пациентите преминали лечение само с амниотична мембрана са без нито едно придружаващо заболяване. Това подчертава значението на общото състояние за поддържане на нормална очна повърхност.

Захарният диабет може да доведе до нарушения в инервацията, сухо око, намалена сетивност, което предразполага към затруднен процес на зарастване на рани, сходно с патогенезата при диабетно стъпало(250,251). Chang и сътр.(252) откриват статистически значима по-голяма честота на роговичните язви при пациенти с диабет, като рискът за язва е 1.31 пъти повече.

Исхемичните мозъчни инсулти могат да засегнат множество елементи, свързани с очната повърхност, включително черепномозъчните нерви V и VII, с нарушени репаративни процеси, мигателен рефлекс, рефлекторно сълзене и редуцирана роговична сетивност. Лечението на пациентите с инсулт в реанимация влошава състоянието на очната повърхност, най-често свързано с експозиционна кератопатия. Двама от пациентите в групата с трансплантация на лимбални стволови клетки и двама от пациентите с трансплантация на корнео-склерален бутон бяха диагностицирани с исхемичен мозъчен

инсулт и бяха лекувани в отделение за интензивни грижи(253). При изследването на очната повърхност на пациенти, подлежащи на интензивни грижи, Hornig и сътр. откриват намалена честота на мигателния рефлекс, поради седация и патология на очната повърхност в 80% от случаите, като при 26.6% се наблюдава кератопатия.

Хирургичното и радиационно лечение на злокачествените новообразувания в областта на главата може да доведе до редица изменения на очната повърхност, включително увреждане на тригеминалния нерв с влошена сетивна и трофична функция на роговичната инервация. Един от предполагаемите механизми е именно увреждане на бързоделещите се лимбални стволови клетки в областта на лимба(254,255). Освен това се счита, че инервацията също се нарушава и води до невротрофична кератопатия. В групата с лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция бе включен един пациент с карцином на назофаринкса, който след лъчетерапия развива тежка персистираща язва. В случая се откриха данни за лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция, което потвърждава ролята на радиотерапията за увреждане на стволовите клетки.



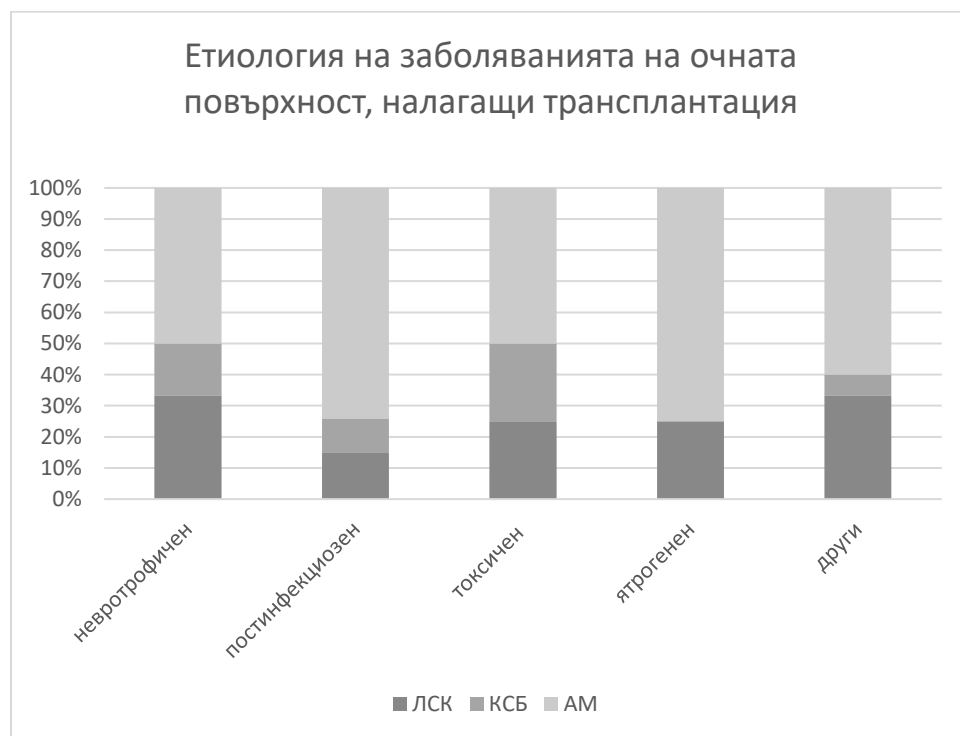
Фигура 46. Пациент с роговична язва след лъчетерапия за назофарингелаен карцином.

В контролната група бе включен пациент с лагофталм и невротрофична кератопатия, следствие от оперативно лечение за акустичен неврином. Mulhern и сътр.(256) откриват, че при пациенти след хирургично лечение на акустичен неврином се наблюдава хипестезия на роговицата, която е свързана с по-висока честота на роговична патология (79%). Лагофталмът увеличава честотата на роговична патология до 80%. В проучването на Mulhern и сътр. 20 от 62 пациенти са претърпяли поне една офталмологична хирургична интервенция за възстановяване на очната повърхност.

Тежките придружаващи заболявания биха могли да оказват негативно влияние върху стволовоклетъчната популация в лимба. Освен избраните механизми, допълнително въздействие биха могли да оказват реологични, имунологични и неврологични промени засягащи пряко или косвено лимбалните стволови клетки и елементите на стволовоклетъчната ниша.

5.3. Етиология

Етиологията на заболяването на очната повърхност, налагащо трансплантация на амниотична мембрана, екс виво размножени стволни клетки или корнео-склерален бутон бе разделена на невротрофична кератопатия, постинфекциозна кератопатия (основно след прекарана херпетична инфекция или тежки бактериални инфекции), токсична кератопатия, поради употреба на топикални медикаменти, ятрогенна след множество хирургични интервенции в областта на лимба и други (птеригиум, туморни образувания на лимба, дегенеративни състояния). Етиологията е графично представена на Фигура 47.



Фигура 47. Етиология на заболяванията на очната повърхност, поради които е проведена трансплантация на лимбални стволни клетки (ЛСК), корнеосклерален бутон (КСБ) или амниотична мембрана (АМ).

5.4. Зрителна острота

Анализът на предоперативната зрителна острота чрез метода на Крускал-Уолис демонстрира статистически значима разлика ($p=0.008$), като стойностите за трите групи бяха съответно 0.015 ± 0.022 в групата на екс виво размножените стволни клетки, 0.001 при всички пациенти от групата с корнеосклерален бутон и 0.16 ± 0.29 при пациентите с трансплантация на амниотична мембрана. Промяната в зрителната острота преди и след лечение в групите с трансплантация на лимбални стволни клетки и корнео-склерален бутон е посочена в резултатите по Задача 3.

| Показател | Група | N | Mean | Median | SD | Min | Max | p |
|--------------------------------|-------|----|-------|--------|-------|-------|-------|--------------|
| зрителна острота преди лечение | ЛСК | 15 | 0,015 | 0,003 | 0,022 | 0,001 | 0,050 | 0,008 |
| | КСБ | 7 | 0,001 | 0,001 | 0,000 | 0,001 | 0,001 | |
| | АМ | 40 | 0,161 | 0,015 | 0,288 | 0,001 | 1,000 | |

Таблица 33. Сравнителен анализ на изходната зрителна острота между трите групи.

Поради различното разпределение в предоперативната зрителна острота между трите групи за сравнителен анализ се използва разликата между пред- и постоперативната зрителна острота (делта) в трите групи. Промяната в зрителната острота демонстрира статистически значима разлика на шестия месец след лечението ($p=0.045$), което бе определено чрез непараметричния метод на Крускал-Уолис. Най-голяма разлика бе установена в групата с трансплантация на екс виво размножени стволови клетки.

| Показател | Група | N | Mean | Median | SD | Min | Max | p |
|--|-------|----|-------|--------|-------|--------|-------|--------------|
| Разлика между пред- и постоперативната зрителна острота на шести месец (делта) | ЛСК | 15 | 0,140 | 0,089 | 0,147 | 0,000 | 0,492 | 0,045 |
| | КСБ | 7 | 0,017 | 0,007 | 0,022 | -0,001 | 0,049 | |
| | АМ | 40 | 0,075 | 0,010 | 0,163 | -0,390 | 0,500 | |

Таблица 34. Сравнителен анализ на стойностите от разликата между пред- и следоперативната зрителна острота (делта) между трите групи.

5.5. Площ на фиброваскуларната тъкан

Извърши се сравнение на площта на фиброваскуларната тъкан преди и след лечение в трите групи по отделно чрез знаково-ранговият тест на Уилкоксон, като резултатите и при трите групи бяха статистически значими.

| Лечение | Група | N | Mean | Median | SD | Z | p |
|-----------------------------------|-------|----|--------|--------|--------|--------|--------------|
| Трансплантация на лимбални клетки | преди | 15 | 38,765 | 46,045 | 17,334 | -3,408 | 0,001 |
| | след | 15 | 16,228 | 15,144 | 13,779 | | |
| Трансплантация на КСБ | преди | 7 | 73,458 | 72,548 | 12,354 | -2,336 | 0,018 |
| | след | 7 | 44,952 | 53,991 | 20,675 | | |
| Трансплантация на АМ | преди | 40 | 36,567 | 34,799 | 19,250 | -3,387 | 0,001 |
| | след | 40 | 30,050 | 33,590 | 22,928 | | |

Таблица 35. Сравнителен анализ на стойностите от разликата между пред- и постоперативната площ на фиброваскуларната тъкан за всяка група поотделно.

Стойностите на измерената площ на фиброваскуларната тъкан предоперативно демонстрираха статистически значима разлика между трите групи.

| Показател | Група | N | Mean | Median | SD | Min | Max | p |
|-----------|-------|----|--------|--------|--------|-------|--------|------------------|
| | КЛЕТ | 15 | 38,765 | 46,045 | 17,334 | 7,622 | 60,351 | <0,001 |

| | | | | | | | |
|--------------------------------------|-----|----|--------|--------|--------|--------|--------|
| Предоперативна фиброваскуларна тъкан | КСБ | 7 | 73,458 | 72,548 | 12,354 | 58,328 | 95,039 |
| | АМ | 40 | 36,567 | 34,799 | 19,250 | 6,121 | 78,325 |

Таблица 36. Сравнителен анализ на изходната площ на фиброваскуларната тъкан между трите групи.

За да се оцени ефектът от проведеното лечение се използваха данните от разликата между пред- и постоперативно измерената площ на фиброваскуларна тъкан (делта). Непараметричният метод на Крускал-Уолис демонстрира статистически значима разлика между трите групи ($p=0,002$), като най-съществено намаление бе отчетено в групата с трансплантация на корнео-склерален бутон.

| Показател | Група | N | Mean | Median | SD | Min | Max | p |
|--|-------|----|--------|--------|--------|---------|--------|--------------|
| Разлика между пред- и постоперативната площ на фиброваскуларната тъкан (делта) | КЛЕТ | 15 | 22,538 | 24,549 | 14,570 | 1,086 | 47,445 | 0,002 |
| | КСБ | 7 | 28,506 | 22,539 | 23,527 | 0,511 | 68,488 | |
| | АМ | 40 | 6,518 | 4,237 | 17,393 | -45,076 | 56,047 | |

Таблица 37. Сравнителен анализ на стойностите от разликата между пред- и следоперативната площ на фиброваскуларната тъкан (делта) между трите групи.

5.6. Оптична кохерентна томография на преден сегмент

Извършен бе анализ на средната стойност по сивата скала от измерване на всички точки в хоризонталния меридиан от Radial Scan на оптична кохерентна томография на преден сегмент с помощта на програма за обработка на изображения (ImageJ). Методът наподобява Scheimpflug денситометрията, който се базира на измерване на разсеяната светлина в 25 зони от роговицата.

За оценка на метода бяха използвани данните от 44 здрави контроли, при които се сравниха стойностите от две отделни посещения. Т-тестът за зависими данни не показва статистически значима разлика между стойностите от двете визити:

| Визита | N | Mean | SD | t | df | p |
|----------|----|-------|------|------|----|-------|
| Визита 1 | 44 | 39,81 | 8,62 | 0,69 | 43 | 0,497 |
| Визита 2 | 44 | 40,73 | 8,50 | | | |

Таблица 38. Сравнение в измерените средни стойности на сивата скала при здрави контроли в две отделни визити.

Извърши се анализ на стойностите преди и след лечение във всяка от групите поотделно чрез знаково-рангов тест на Уилкоксон (Таблица). За разлика от групата здрави контроли,

при която не се откри разлика между две отделни визити, при трите изследвани групи с трансплантация на лимбални стволови клетки, КСБ или АМ се наблюдаваше статистически значима промяна в стойностите от предно-сегментната оптична кохерентна томография.

| Лечение | Група | N | Mean | Median | SD | Z | p |
|-----------------------------------|-------|----|--------|--------|--------|--------|--------------|
| Трансплантация на лимбални клетки | преди | 15 | 60,619 | 56,874 | 22,268 | -2,783 | 0,005 |
| | след | 15 | 50,271 | 50,134 | 12,174 | | |
| Трансплантация на КСБ | преди | 5 | 44,845 | 44,263 | 2,225 | -2,023 | 0,043 |
| | след | 5 | 60,618 | 68,812 | 12,069 | | |
| Трансплантация на АМ | преди | 30 | 53,287 | 52,213 | 21,737 | -2,253 | 0,024 |
| | след | 30 | 58,965 | 56,555 | 18,942 | | |

Таблица 39. Сравнителен анализ на стойностите от разликата между пред- и постоперативната ОСТ денситометрия поотделно.

Непараметричният анализ на Крускал-Уолис демонстрира сходни резултати по отношение на пред и постоперативните резултати, но бе отчетена разлика между абсолютната промяна в измерванията ($p < 0.001$).

| Показател | Група | N | Mean | Median | SD | Min | Max | p |
|--|-------|----|---------|---------|--------|---------|---------|------------------|
| ОСТ денситометрия преди лечение | КЛЕТ | 15 | 60,619 | 56,874 | 22,268 | 37,897 | 130,465 | 0,143 |
| | КСБ | 5 | 44,845 | 44,263 | 2,225 | 42,883 | 48,254 | |
| | АМ | 30 | 53,287 | 52,213 | 21,737 | 30,161 | 118,890 | |
| ОСТ денситометрия след лечение | КЛЕТ | 15 | 50,271 | 50,134 | 12,174 | 30,680 | 69,302 | 0,263 |
| | КСБ | 5 | 60,618 | 68,812 | 12,069 | 47,258 | 69,771 | |
| | АМ | 30 | 58,965 | 56,555 | 18,942 | 33,258 | 91,426 | |
| Разлика между пред- и постоперативната ОСТ денситометрия (делта) | КЛЕТ | 15 | 10,349 | 5,189 | 20,385 | -10,125 | 80,331 | <0.001 |
| | КСБ | 5 | -15,773 | -20,558 | 12,489 | -26,815 | -1,500 | |
| | АМ | 30 | -5,678 | -2,187 | 18,531 | -43,568 | 29,954 | |

Таблица 40. Сравнителен анализ на ОСТ денситометрия преди и след лечение между трите групи, както и стойностите от промяната между пред- и следоперативната площ на фиброваскуларната тъкан (делта) между трите групи.

До момента няма данни за провеждане на денситометрия при трансплантация на екв виво размножени лимбални стволови клетки, наличните данни в литературата касаят състояния след крослинкинг или инфекциозни заболявания. Нашето предположение бе, че секретиранияте от лимбалните стволови клетки растежни фактори биха довели до промяна в стромалната реакция и по-голяма пластичност на кератоцитите, което се потвърждава от промяната в ОСТ денситометрията(257).

Възможно е подобрен ефект да настъпи след по-дълъг период, тъй като първият етап на стромално заздравяване е до бти месец, което беше и периодът на проследяване в нашето проучване. Едва след това във вторият етап настъпват промени в новосформираните колагенови влакна, които да подобрят прозрачността, а оттам и да повлияят на денситометрията(258).

ИЗВОД: Трансплантацията на лимбални клетки води до намаляване на фиброваскуларната тъкан, подобрене на зрителната острота и и редукция в рефлексивността на формираната цикатрициална тъкан.

V. ОБСЪЖДАНЕ

ЗАДАЧА 1

При анализа на пациентите, при които е проведена трансплантация на тъкани се установи, че няма разлика в средната възраст между мъжете и жените. Като полово разпределение прави впечатление, че мъжете са повече (60%), без разликата да е статистически значима. С възрастта броят на трансплантациите се увеличава, като най-голям брой пациенти са включени във възрастовата група 61-80 години.

В настоящото проучване основната етиологична причина за трансплантация е язвата на роговицата, като най-често използваната тъкан е амниотичната мембрана. Това се различава от други научни публикации, при които най-честата диагноза, налагаща трансплантация е травма или птериgium, а персистиращите дефекти и язвите са втори по честота(206,259). От една страна, разликите могат да се дължат на предпочитаната оперативна техника (например ексизия на птериgium без трансплантация на АМ), а от друга страна – на особеностите в попълването на медицинската документация и използваната класификация на болестите.

Средната възраст на мъжете и жените според диагнозата не демонстрира статистически значима разлика при пациенти с диагноза язва на роговицата и левкома. Броят на пациентите с диагноза булозна кератопатия и птериgium не бе достатъчен за статистически анализ на възрастово-половото съотношение. В изследваната група заболявания като кератоконус, интерстициален кератит, туморни образувания на очната повърхност и травми бяха индикации за оперативно лечение в единични случаи. Терапевтичният подход при туморни образувания от очната повърхност включва различни оперативни и консервативни методи на лечение. Неоадювантното приложение на химиотерапевтици (например Митомицин Ц) може да промени избора на оперативна процедура, като намали размерите на тумора и следователно размера на постоперативния дефект. В такива случаи може да избегне трансплантация на амниотична мембрана.

Сред пациентите с диагноза язва на роговицата се наблюдаваше преобладаване на мъжкия пол в по-ранна възраст с тенденция за изравняване на половото разпределение с напредване на възрастта, въпреки че не бе доказана статистически значима разлика. Средната възраст бе 59.14 години, като за мъжете бе 56.63 години, а при жените 55.52 години.

Български автори също докладват за по-висока честота на язвата при мъже(206), както сочат и световни научни публикации(260). Съществуват данни и за преобладаване на женския пол, например Jeng и сътр. откриват засягане на женския пол малко по-често (54,5%) и в по-ранна възраст (40.1 години при жени срещу 46.5 години при мъже(261)). Данните от световната литература зависят от географския регион и професионалната заетост на населението. Докато в някои държави основен рисков фактор за развитието на язва на роговицата е употребата на контактни лещи(262), то в държави с по-голям дял на земеделието основен рисков фактор е травмата. Анализът на рисковите фактори, водещи до язва на роговицата, е извън темата на дисертацията, но част от пациентите имаха данни за тежко протичащи язви без анамнеза за травма или употреба на контактни лещи. Това може да е свързано и с коморбиентността на пациентите включени в проучването, включително диабет, онкологични заболявания, исхемични мозъчни инсулти и други. Тези данни могат частично да обяснят преобладаването на мъжкия пол в групата с диагноза язва на роговицата в по-ранните възрастови групи. Въпреки това някои екипи установяват, че женският пол е рисков фактор за забавено зарастване на епитела(263).

Средната възраст и половото разпределение на пациентите, при които са били проведени трансплантация на амниотична мембрана, роговица и екс виво размножени лимбални стволови клетки са сходни с резултатите на други екипи(210).

В световната литература (214) трансплантация на екс виво размножени ЛСК се извършва при пациенти в по-млада възраст, като преобладава мъжкия пол. Това вероятно се дължи на включване на по-голям брой пациенти с химични изгаряния на роговицата, които са по-чести при мъже в по-ранна възраст. Основна причина за лечение с лимбални стволови клетки е язва на роговицата, която може да е възникнала като следствие на първичен дефицит на лимбални стволови клетки или дефицитът да е вторичен поради продължително персистиране на язвата и лечение с токсични топикални медикаменти. Трансплантация на стволови клетки се налагаше и при васкуларизирана левкома, което може да е израз на конюнктивализацията при ЛСЦД.

Данни за трансплантация на корнеосклерален бутон от български източници не бяха открити. В международни източници данните също са ограничени(215), като в повечето публикации се коментира използване на този тип материали за перфоративна или тектонична кератопластика, а не като биологично покритие.

Като честота на ретрансплантациите в изследваните пациенти се откри значително по-малък брой от съобщените в литературата (206,264,265). Манолова и сътр. откриват, че пациентите с персистиращи дефекти най-често се нуждаят от ретрансплантации на амниотична мембрана, което може да се свърже именно с тотален или тежък частичен дефицит на лимбалните стволови клетки, който да не позволява пълно възстановяване на очната повърхност. В тези случаи трябва да се прилагат методи за диагностициране на лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция и да се дискутира трансплантацията на стволови клетки.

Лечение с трансплантация на роговица в цяла дебелина бе необходимо основно в случаите с булозна кератопатия и левкома. Това съвпада с резултати от предишни проучвания в България за индикациите за кератопластика(213,266).

По отношение на трансплантацията на роговица етиологията включва язва (n=4), булозна кератопатия (n=4), левкома (n=4) и кератоконус (n=2). Подобни са данните от световната литература, при които основни индикации са кератоконус и булозна кератопатия(267,268).

Не бяха идентифицирани случаи на ламеларна кератопластика в Клиника по Очни болести, УМБАЛ „Александровска“. Въпреки световната тенденция за извършване на по-голям процент ламеларни кератопластики, като начин за преодоляване на дефицита на донорен материал, делът на този вид процедури в България все още не е висок около 2% по данни на Групчев (212). Необходимо е да се насочи ресурс като се извършват обучения и се осигури инструментариум в повече центрове за трансплантация, за да бъдат достигнати в България световните и европейски нива на ламеларни процедури. Освен специализираните звена по Очни болести, тъканните банки, предлагащи транспланти, следва да повишат квалификацията си, за да може да се внедрят техниките за предварително подготвени ламеларни транспланти. В Европа все по-често се говори за ендотелни транспланти, които са изцяло обработени в тъканна банка и са налични като предварително заредени в инжектори. Това би скъсило времето за извършване на ламеларната трансплантация и според някои автори дори води до по-малък риск от увреждане на донорния материал(217). Развитието на тъканното инженерство предоставя технологии за създаване на 3D принтирани ламеларни транспланти, заместващи всеки един от слоевете на роговицата. Интерес представляват бъдещите научни разработки с участието на биосинтетична строма, изградена от колаген тип I/III след крос-линкинг(269). Други научни екипи се фокусират върху възможността за екс виво размножаване на ендотелни клетки, в резултат на което е въведен и нов медикамент за лечение на глаукома(270), който в последствие намира приложение и при нова ендотелна процедура – Descemet stripping only (271).

Алтернативите за кератопротезиране също търпят развитие, като особен интерес представлява комбинираният подход между тъканното инженерство и употребата на нови синтетични материали. Наскоро стартира проучване на нов модел кератопротеза – CorNeat

KPro (272), която съдържа биосинтетичен материал, играещ роля на субстрат за пролиферация, миграция и диференциация на собствени клетки от пациента, създавайки оптимални условия за физиологична функция.

Всички тези нови технологии са опит за преодоляване на недостига на донорни материали в световен мащаб и могат да се обект на бъдещи проучвания. Тъй като в България опитът с кератопротезирането и биосинтетичните роговици е ограничен, в случаи с дълбоки и обширни язви на роговицата, при които не бе възможно възстановяване с амниотична мембрана, се проведе трансплантация на корнео-склерален бутон като биологично покритие. Основна цел при големи перфорации бе да се извърши първоначално възстановяване на целостта на булба. В световната литература има данни за употребата на покритие с корнеосклерален бутон при тежки кератити с перфорация като алтернативна на евисцерация/енуклеация(216).

Трансплантацията на роговична тъкан като покритие се съобщава в редица публикации(273), като обикновено се оформя ламбо, съответстващо на дефекта. В настоящия труд пациентите, при които бе проведена трансплантация на корнео-склерален бутон, демонстрираха обширни дефекти, които наложиха употребата на целия донорен материал.

От една страна чрез трансплантация на корнеосклерален бутон се цели да се избягва перфоративна кератопластика „на горещо“. Освен това корнеосклералният бутон носи лимбални стволони клетки, които макар и алогенни, биха могли временно да възстановят очната повърхност. Важно е да се подчертае, че лимбалните стволони клетки действат не само анатомично (заместване на стволонклетъчната популация), но и секретират множество растежни фактори, които подобряват заздравителния процес в роговицата(218,219). От друга страна стромата на донорния корнеосклерален бутон може да действа като субстрат за пролиферация, миграция и диференциация на собствените стволони клетки на пациента с допълнително възстановяване на стромата и повърхността.

Данните от настоящото проучване могат да бъдат обобщени в следния извод: Индикация за трансплантация на амнион, стволони клетки и КСБ с най-голяма честота е язвата на роговицата. Трансплантацията на амниотична мембрана е най-често провежданата терапевтична процедура. Персистиращите епителни дефекти/язви, както и васкуларизираната левкома могат да са клинична проява на лимбална стволонклетъчна инсуфициенция. При всеки отделен случай се налага индивидуализиран подход при избора на трансплантационна техника в зависимост от необходимостта за корекция на подлежаща лимбална стволонклетъчна инсуфициенция.

ЗАДАЧА 2

Извършено бе изследване на 49 очи с клинични данни за лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция. Средната възраст съответства на други публикации, но разпределението по пол в настоящия труд е сходно, докато други автори докладват за по-голям дял на мъжкия пол. Тези резултати могат да се дължат на различните етиологични причини за развитието на лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция. В множество анализи се откроява много по-често засагане на мъжете при травми, докато инфекциозните процеси зависят от географския регион и заетостта на населението. Данните от Коко и сътр.(263) за по-бавна епителизация при жени може да обясни изравняването на половете в настоящия труд.

Преобладаване на унилатералната инсуфициенция е съобщено и от други автори (224), като тези резултати се повлияват значително от основните причини за възникване на лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция при включените пациенти.

Въведен бе въпросник базиран на въпросниците за Индекс на Очния комфорт, Проучване за оценка на очната болка (Ocular Pain Assessment Survey-OPAS) и Качество на живота(231), за да се обобщят данните за субективната симптоматика. Резултатите показаха статистически значимо подобрене във всички изследвани показатели след лечение. Субективните оплаквания на пациентите със заболявания на очната повърхност са обект на множество проучвания. Синдромът на сухото око, например, се асоциира с негативни ефекти върху зрителната функция, ежедневни активности и работоспособност(274). При по-тежките увреждания на очната повърхност, както е при лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция, тези ефекти са дори по-изразени. Макар че основният фокус на специалистите е провеждане на лечение за възстановяване на нормална зрителна функция и анатомичен интегритет, субективното подобрене на пациентите не бива да се подценява. Подобренето на толеранса към работа с електронни монитори, четене, употреба на телефон, както и към посещение на събития преодолжава изолираността на пациентите и им осигурява самостоятелност. Редукцията в броя на употребяваните топикални медикаменти е от особена важност при хронични/рецидивиращи епителни нарушения поради по-ниския кумулативен токсичен ефект на консервантите(275), съдържащи се във всеки отделен препарат. По този начин се осигурява оптимална среда за нормална функция на очната повърхност. Лечението на пациентите със суспектна лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция доведе и до статистически значимо подобрене в зрителната острота, макар при 8 пациенти да не бе отчетена разлика. Дори в някои случаи да не са изпълнени всички критерии за успех, подобренето в субективните оплаквания е достатъчно за подобрене на качеството на живот на пациентите.

Началните фази на лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция се характеризират с периферна неоваскуларизация и формиране на панус, които бяха установени при 19 от нашите пациенти. При по-голяма част от пациентите ($n=30$) бе засегната централната част на роговицата. Това говори за напреднал стадий на заболяването. От друга страна е възможно дълго персистиралите централни язви да са довели до изчерпване на резерва от стволови клетки с вторично възникване на дефицита. Интересно е наблюдението, че при 4

пациенти не бе открита повърхностна неоваскуларизация, а при 17 - само в един квадрант. Това съответства на повлияването от консервативно лечение и подкрепя данните, че парциалната лимбална стволочклетъчна инсуфициенция не подлежи задължително на трансплантация на стволови клетки. Въпреки липсата на неоваскуларизация при някои от пациентите се наблюдаваше типичната вортикозна форма на формираната левкома, съобщена в глобалния консенсус за дефиниция, класификация, диагноза и страдиране на лимбалната стволочклетъчна инсуфициенция. Това подчертава затруднената диагноза на лимбалната стволочклетъчна инсуфициенция въз основа само на клинични данни. През 2018г.(276) е докладван клиничен случай на пациент, предвиден за трансплантация на ЛСК, поради тотална лимбална стволочклетъчна инсуфициенция. Проведената конфокална ин виво микроскопия установява, че в три квадранта лимбалният епител е с нормална морфология, което води до диагнозата частична инсуфициенция със съвсем различен терапевтичен подход. Тъй като достъпът до конфокална ин виво микроскопия е все още ограничен, алтернативен метод е импресионната цитология, която е коментирана по-долу.

Систематичният подход в диагностиката на пациентите със суспектна лимбална стволочклетъчна инсуфициенция изисква провеждането на микробиологични изследвания, за да се прецени необходимостта на антимикробна терапия. Възможно е нарушенията в епитела да позволят на условно патогенни микроорганизми да навлязат в по-дълбоки слоеве и да предизвикат кератит(277–279). При пациентите, включени в проучването, се установиха основно стафилококи и стрептококи. *Staphylococcus epidermidis* се счита за част от нормалната флора и често е непатогенен компонент на конюнктивния и клепачен микробиом. Важно е да се отбележи, че техниката на получаване на материала за микробиологични изследвания оказва влияние върху резултата. Най-често използваният и достъпен метод чрез тупфер за конюнктивален секрет може лесно да бъде контаминиран и с клепачна флора, а конюнктивният секрет може да съдържа микроорганизми, които нямат отношение към роговичната патология. Много по-достоверни са резултатите от материал, получен от роговичната язва, най-често чрез т.нар. *scraping*. По този начин рискът за контаминиране на пробата е минимално. Въпреки това при наличие на дълбоки дефекти съществува опасност от перфорация на роговицата. В такива случаи е уместно микробиологичните проби да се вземат в асептични условия с готовност за оперативна намеса. Оцветяването на получените материали по Грам е от голяма важност за бързото идентифициране на микроорганизмите дори преди да са готови резултатите от посевка. Тъй като прекарана херпетична инфекция на роговицата може да доведе до развитие на невротрофични язви или лимбална стволочклетъчна инсуфициенция(280) в рамките на т.нар. метакератоз, в случаите, в които имаше съмнение за активна инфекция бяха проведени вирусологични изследвания за установяване на ДНК. По този начин противовирусни медикаменти, които са локално и системно токсични, бяха част от терапията само при активна вирусна репликация.

Нова насока за преодоляване на необходимостта и достоверността на микробиологичните култури е приложението на генетични техники, които предоставят

свободен от хипотези подход към диагностиката на очната повърхност(281). Използвайки детекция на 16S rRNA се демонстрира наличието на много по-голям брой микроорганизми, сред които *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* и други дори и при здрави индивиди. Класическите микробиологични техники спомагат за идентифициране на патогенен микроорганизъм в около 40% от случаите. Някои от новите техники за изучаване на микробиома (т.нар. shot-gun metagenomics) позволяват едновременно изследване на вируси, бактериофаги, еукариоти. Докато чревния и кожния микробиом са подробни изучени, метагеномиката на очната повърхност представлява вълнуващ обект на бъдещи проучвания.

В групата пациенти със суспектна лимбална стволочклетъчна инсуфициенция бяха включени пациенти с невротрофична кератопатия, която все още е обект на дискусия. Публикуват се все повече данни за връзката между роговичната инервация и трофиката не само на епитела като цяло(282), а и в стволочклетъчната ниша. Лимбалните стволови клетки и нервните окончания от нишата са в състояние на еквилибриум, при нарушението на който се откриват предпоставки за възникване както на невротрофични язви, така и на лимбална стволочклетъчна инсуфициенция(283). Подобрието в стойностите на естезиометрията, както бе отчетено при пациентите от настоящото проучване след лечение, понякога парадоксално се свързва с влошаване на болковата симптоматика - дизестезия. Обяснение за това може да се открие в данните от конфокалната *in vivo* микроскопия. Увредените нервни окончания губят проводимостта си и способността да отделят невротрансмитери, което се свързва с хипестезия. Benítez-del-Castillo и сътр.(219) наблюдават по-нисък брой на суббазалните нервни окончания при пациенти с по-ниска роговична сетивност. От друга страна увредените нервни окончания регенерират формирайки микроневроми, описани като броеница (beading) или кълнове (sprout). Тези структури са с абнормна възбудимост и се считат за причината за дизестезията и субективните болкови симптоми.

Пациентите, включени в настоящото проучване, демонстрираха намалена сетивност, вероятно поради директна загуба на нервни влакна, както и от токсичния ефект на множеството топикални медикаменти и изменени свойства на слъзния филм. Нормалната зависимост между възрастта и сетивността не бе установена нито преди, нито след лечение. Възстановяването на роговичната инервация в областта на лимбалната стволочклетъчна ниша може да доведе до оптимизиране на процеса на епителизация.

Тези данни подчертават сложната патофизиология на лимбалната стволочклетъчна инсуфициенция и прави предположението, че тя може да е подлежащ патогенетичен механизъм на множество заболявания, все по-актуално. Причината да бъде идентифицирана като отделно заболяване се крие по-скоро в общия терапевтичен подход към това състояние, т.е. независимо от етиологичната причина лечението е чрез възстановяване или заместване на стволочките клетки в лимба.

За да бъде оценена възпалителната активност на очната повърхност бе използван бърз тест за възпаление, базиран на матриксната металопротеиназа 9 (ММР-9). Този тест не

замества данните от импресионната цитология за възпалителна инфилтрация, но предоставя възможност за индивидуализиране на терапията и проследяване на ефекта от нея. Повишени нива на MMP-9 са открити при синдрома на сухо око, роговични язви, инфекциозен кератит, роговична неоваскуларизация, фотокератит, кератоконус. Матриксната металопротеиназа 9 участва в сложна каскада на сигнална трансдукция с индукция от проинфламаторни медиатори на възпалението като интерлевкин-1, тумор некротизиращ фактор алфа, тромбоцит-активиращ фактор, както и от трансформиращ растежен фактор бета, nuclear factor kappa light-chain enhancer of activated B cells (NF-kB) и други. Матриксната металопротеиназа 9 има важна роля в регенераторните процеси в роговицата, като се предполага, че има отношение към синтеза на епителната базална мембрана, миграцията на епителните клетки, протективна роля по отношение на слъзния хиперосмоларитет и активацията на кератоцитите(235). Интересно е, че за размножаване на култури от лимбални стволови клетки е необходима MMP-9, която се открива във водещите клетки по ръба на експанзията(284). Това подчертава, че MMP-9 е обект на сложни механизми на сигнална трансдукция, като е необходимо поддържането на тесни граници на нивата на този ензим за оптимизиране на регенераторните процеси в роговицата.

Като компонент от характерната за лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция триада, хроничното възпаление е важен белег и терапевтичен таргет. Необходима е бърза преценка за активността на възпалението и инициация на противовъзпалителна терапия. В случаите с епителни дефекти употребата на топикални кортикостероидни препарати е относително противопоказана. В някои случаи може да се предприеме субконюнктивно приложение или да се прилагат медикаменти с инхибиращ ефект, например циклоспорин А или доксициклин. Все пак съществува риск от една страна от аквитиране/влошаване на инфекциозен процес, а от друга за прогресия на стромалното изтъняване.

Нова насока в сложния процес на имуномодулация на очната повърхност е употребата на мезенхимни стволови клетки и техния секретом. Ритер и сътр. откриват, че субконюнктивното приложение на алогенни мезенхимни стволови клетки подобрява преживяемостта на роговични транспланти в миши модел(285). Проучване върху пациенти с тежки изгаряния на очната повърхност демонстрират, че субконюнктивното приложение на костномозъчни мезенхимни стволови клетки е безопасна и ефективна терапия(286).

Резултатите от проведената импресионна цитология потвърдиха два компонента от характерната за лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция триада, а именно конюнктивализация и възпаление при 29 (59,2%) от пациентите. Нашите данни съвпадат с резултатите от други сходни проучвания(149), при които инсуфициенция се потвърждава в около 70% от случаите.

Въпреки че откриването на PAS+ клетки по роговичната повърхност е патогномоничен белег за конюнктивализация, отсъствието им не изключва такава. В случаи на тежка ксероза с кератинизация, каквато бе установена при 19 пациенти, цялата очна повърхност е с намален брой на бокаловидни клетки, следователно зони на конюнктивализация не биха демонстрирали типичните за дефицит на ЛСК промени. В тези

случаи новите методики за изследване на повърхностни маркери за конюнктивализация като муцин 5AC и цитокератини 7 и 13 (287,288) биха дали по-точни резултати по отношение на конюнктивния фенотип на епитела. Характерните изменения при конюнктивализация включват и метаплазия или загуба на нормален роговичен фенотип – СК3-/СК12-/СК19+ (153).

Откриването на интраепителни лимфоцити, характерни за конюнктива асоциираната лимфоидна тъкан, също е показателно за конюнктивализация на роговичната повърхност. Предполага се, че това са предимно CD8+/*HML-1+ цитотоксични Т-лимфоцити, експресиращи чивешки мукозен лимфоцитен антиген (120).

От особена важност е изследването на очната повърхност при съмнение за метаплазия и преценка необходимостта от биопсия. Интересно бе, че в случаи със суспектна розацея и птериgium бяха открити атипични епителни клетки, което съответства на налични данни в литературата и подкрепя заключението, че конюнктивализацията наподобява процеса на плоскоклетъчна метаплазия.

Инкорпорирването на генетични методи в изследването на проби от импресионна цитология позволява геномни и транскриптомни анализи, включително на едноклетъчно ниво. Приложението им дава фундаментални познания за патогенезата и взаимодействието между генетични, епигенетични фактори, цитокини и други, участващи в заболяванията на очната повърхност (289).

Ролята на оптичната кохерентна томография на преден очен сегмент бе потвърдена в настоящото проучване. Въпреки че не бе възможно точно определяне на централната епителна дебелина, поради обширните зони на дезепителизация при 29 пациенти, бе наблюдавана неравномерна дебелина в зоните със съхранен епителен слой. Стромалната хиперрефлексивност, която се установи при всички пациенти, се отдава на миграция и активация на кератоцитите и възпалителна инфилтрация с продукция на цитокини, екстрацелуларен матрикс и колагенови влакна. Процесът може да е резултат от епителни промени или да е първичният фокус с вторично увреждане на повърхностните слоеве. Наблюдаваният оток при 12 пациенти може да се обясни с компрометирана бариерна функция на епитела от една страна и с нарушена помпена функция на роговичния ендотел, от друга. Изтъняването на стромата е от особена важност за прогнозата, избора на оперативна техника и проследяване на ефекта от лечение, тъй като в някои случаи имаше заплашваща или вече настъпила перфорация.

Важно е да се проследи морфологията на роговичния и лимбалния епител и да се идентифицират пациенти с нарушен контур на палисадите на Вогт. Загубата на ясната граница между хиперрефлексивния конюнктивен и хипорефлексивния роговичен епител може да насочи към инсуфициенция на лимбалните клетки. Vanayan и сътр.(156) описват и класифицират промените в лимбалната морфология, определена чрез spectral domain OCT. Други автори въвеждат дебелината на лимбалния и роговичния епител като маркер за инсуфициенция. Mehtani и сътр.(290) установяват, че и двете стойности намаляват при пациенти с дефицит на лимбалните стволови клетки, но в тяхното проучване диагнозата е

поставена на база само на клинични белези, без корелация с импресионна цитология или конфокална ин виво микроскопия. Епителната дебелина може да варира при множество състояния (например роговични дистрофии) и не може да се счита за патогномоничен белег. Дефинирането на ОСТ критерии за лимбална инсуфициенция и измерването на епитела зависят и от вида на използвания ОСТ апарат. Някои проучвания се базират на ОСТ със свръх висока резолюция (ultra high resolution ОСТ (291,292)), докато други използват spectral domain (293) или swept source.

Формирането на демаркационна линия слет трансплантацията, наблюдавано при 29 пациенти, е сходно с проемните наблюдавани при пациенти след крослинкинг. Възможно е след провеждане на лечение, особено след трансплантация на амниотична мембрана или лимбални стволови клетки да настъпва спонтанен крослинкинг, който да възпрепятства прогресията на стромално изтъняване както и да подлежи на ремоделиране с подобрение в оптичната плътност(294).

Въпреки че ОСТ на преден сегмент е много информативна, оценката на лимбалната морфология зависи от опита на изследователя и може да се повлияе от субективни фактори. Ролята на стандартните ОСТ техники в диагностиката на лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция е не толкова за доказване на дефицита, колкото за избор на оперативна техника, разположение на лимбалната биопсия и проследяване на ефекта от терапията. Всички пациенти със заболявания на очната повърхност трябва да бъдат изследвани чрез ОСТ, тъй като данните могат да насочат диагностично-лечебния процес, както и да спомогнат за проследяване ефекта от терапията.

При пациентите, включени в настоящото проучване, най-важните белези на подобрение бяха епителизацията на роговичната повърхност и регрес в процеса на стромално изтъняване.

Бъдещи насоки в развитието на ОСТ технологията е приложението на ОСТ ангиография на преден очен сегмент. Биомикроскопската оценка на неоваскуларизацията често не е пълна, тъй като визуализацията на фини съдове в условията на намалена роговична прозрачност е затруднена. Проведени проучвания с оптична кохерентна томография и ангиография на преден очен сегмент потвърждават ролята на методиката при стратифициране на неоваскуларизацията в епитела и стромата, в процесите на отхвърляне на роговичен трансплантат(295) както и корелация между калибъра на неосъдовете и тежестта на засягане(296–298), съответно зрителната острота. Това би позволило да се проследи влиянието на лечението и необходимостта от приложение на анти-VEGF(298) или нови антиангиогенни медикаменти.

Според глобалния консенсус(159) диагнозата на лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция се базира на клиничната картина, импресионна цитология, ОСТ на преден сегмент и конфокална ин виво микроскопия. Клиничната находка е с ниска специфичност и може да бъде подвеждаща, понякога белезите се припокриват с други заболявания, например с активна херпетична вирусна инфекция, а от друга страна лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция има различни клинични проявления и невинаги се

установяват всички компоненти на характерната триада. При наличие на персистираща язва нейното зарастване изисква мобилизиране на резерва от лимбални клетки, но ако заздравителния процес не завърши по различни причини и процесът се повтаря многократно може да се стигне до декомпенсация на стволовите клетки и възникване на лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция.

Методи като естезиометрия, тестове за възпаление на очната повърхност и ОСТ ангиография е необходимо да бъдат включени в оценката на състоянието и да бъде проучена корелацията в промените с данните от конфокална *in vivo* микроскопия, за да се получи възможно най-пълна информация и да се индивидуализира терапевтичния подход.

ЗАДАЧА 3

Персистиращите роговични язви представляват специфично предизвикателство в офталмологичната практика. Трансплантацията на амниотична мембрана е златен стандарт в лечението на заболяванията на очната повърхност, включително роговични язви(299). От друга страна трансплантацията на *ex vivo* размножени лимбални стволови клетки все още е обект на проучвания с множество протоколи и благоприятни резултати(300). Въпреки предимствата на трансплантацията на лимбални стволови клетки е необходима индивидуализирана преценка за приложимостта ѝ поради изисквания висок финансов и човешки ресурс.

Съвременното лечение на лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция е трансплантацията на *ex vivo* размножени автоложни лимбални стволови клетки. В научните съобщения до момента етиологията на лимбалната инсуфициенция при трансплантираните пациенти е свързана с химични/термични изгаряния, цикатризиращ пемфигоид, аниридия или синдром на Stevens-Johnson(301). В настоящото проучване бяха включени пациенти, при които инсуфициенцията е свързана неутротрофична кератопатия, токсични, ятрогенни причини или след тежки инфекциозни кератити. Предимствата на трансплантацията на *ex vivo* размножени стволови клетки са ниският риск от индуциране на инсуфициенция в донорното око, поради минимално инвазивния характер на биопсията и автоложният произход на използваните клетки, което не налага имunosупресивна терапия. При представените пациенти не се наблюдаваха нежелани странични реакции в донорното око, включително инфекция, индуциране или влошаване на лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция, определено като персистиращи епителни дефекти, неоваскуларизация и намалена прозрачност на роговицата.

След въвеждането на методиката от Пелегрини и сътр. през 1997г. (29), трансплантацията на *ex vivo* размножени лимбални стволови клетки е доказано успешна при редица заболявания на очната повърхност, включително химични травми, синдром на Стъвънс-Джонсън, очен цикатризиращ пемфигоид, аниридия-асоциирана кератопатия. В ранните публикации са възникнали множество протоколи, базирани на DMEM/HAM's F12 растежни среди с множество хранещи слоеве, обикновено от 3T3 миши фибробласти(302).

Растежни фактори се осигуряват чрез добавяне на телешки или човешки серум. В момента основният фокус при развитието на технологията е да се изключат животинските продукти, които носят риск от инфекциозна контаминация и имуногенност(303). С прогреса на биоинженерството растежните фактори могат да се произвеждат по безопасна техника без добавяне на животински продукти, т.нар. xeno-free условия. Това води до имплементация на биологично безопасни протоколи, които подлежат на стандартизация според правилата за добра производствена и медицинска практика. Трансплантацията на ex vivo размножени стволови клетки все още е обект на проучвания и до момента има съобщени редица протоколи(304). Основна насока в развитието ѝ е създаване на биологично безопасна технология без добавяне на ксенобиотични продукти. Тя трябва да осигурява максимална клонална експанзия и едновременно да съхрани недиференциран фенотип и пролиферативен потенциал на стволовите клетки.

Сравнени бяха два протокола, като в настоящото проучване стандартизираният протокол бе по-ефективен. Това се различава от данните на други автори. González и сътр.(305) откриват, че най-висока ефективност има при mSHEM средите, но те сравняват експанзията на лимбални клетки от донорни лимбални биопсии получени от роговици без патология. Донорните материали от пациенти без данни за тежка инсуфициенция също демонстрираха експанзия в настоящото проучване, докато при пациентите с тежка лимбална инсуфициенция не демонстрираха растеж. В допълнение използваният протокол за получаване и размножаване на материалите по протокола със стандартизирани среди (CnT, CELLnTEC, Switzerland) не включва всички описани от производителя стъпки. Все пак е възможно е mSHEM средите да са по-ефективни при експанзията на лимбални стволови клетки при биопсии от здрави очи, но е необходимо по-задълбочено проучване върху ефективността на двете техники при очи с инсуфициенция. В настоящото проучване бе използван протокол, отговарящ на всички съвременни изисквания и стандарти. Наблюдава се ефективна клонална експанзия и формиране на епителни слоеве при всички пациенти. Сходни резултати са предствени и от други чуждестранни автори, използващи протоколи без добавяне на ксенобиотични продукти(306).

Успехът от трансплантацията на ex vivo размножени лимбални стволови клетки, установен в настоящото проучване е сходен с докладите на други учени (300). Обикновено резултатите са между 70 и 100% успеваемост. Този процент се повлиява от етиологичните причини за дефицита, например при аниридия-асоциираната кератопатия успехът е много по-нисък (307) като влошаването започва около 18 месеца след процедурата, а на 24-ти месец състоянието се влошава до изходните показатели. Това важи и за всички пациенти, при които се използват алогенни лимбални стволови клетки. Трансплантацията на алогенни стволови клетки изисква и системна имуносупресия, изборът на медикаменти и продължителност на която също варира значително

В настоящото проучване бяха използвани само аутоложни лимбални клетки, което осигурява много по-нисък риск от отхвърляне на транспланта и съответно висока успеваемост. При нашите пациенти не се налагаше системна имуносупресия,

постоперативният режим включваше единствено фиксирана комбинация от антибиотик и стероид, който плавно се редуцира. Възможно е при удължаване на срока за проследяване да се наблюдават рецидиви и съответно ефективността да не е 100%, но в първите 6 месеца пациентите от нашето проучване демонстрираха стабилност по отношение на всички критерии за успех. При двама от пациентите на 12 месец се наблюдаваха рецидивиращи епителни ерозии без стромална реакция, които претърпяха обратно развитие след приложение единствено на лубриканти. Това подчертава нуждата при пациенти с лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция употребата на изкуствени сълзи да е продължителна без да се прекъсва.

Амниотичната мембрана бе избрана за преносител на екс виво размножените стволови клетки, поради утвърдената в клиниката ефективност на класическата трансплантация на АМ, стандартизирания протокол за получаване и обработка, улеснения достъп до този вид тъкан. Добавянето на стволови клетки към мембраната може само да подобри вече доказаното действие на АМ.

Използвана бе прясна интактна амниотична мембрана. Данните за предимства на интактна или дезепителизирана амниотична мембрана все още са противоречащи – някои автори откриват по-добра пролиферация върху интактна (308), а други – при дезепителизирана (242), като са докладвани разлики в профила на пролиферация и диференциация на получените клетъчни култури. Чен и сътр. откриват по-голям процент на диференциация при клутивирание върху интактната АМ и т.нар. air-lifting техника.

Хидрогелните субстрати имат сходни с АМ предимства (биосъвместимост, инертност и биоразградимост), но за разлика от АМ са с еднородна структура. Техните механични и физични свойства могат лесно да се манипулират, повлиявайки насочено пролиферативните, миграционни и диференциационни показатели на лимбалните стволови клетки, а трансплантацията им върху очната повърхност е атравматична и не изисква вирусологични и микробиологични изследвания.

Някои автори използват колагенови матрикси чрез крослинкинг на рекомбинантни колаген тип I и III, които осигуряват оптична прозрачност и стабилна структура с добра пролиферация на лимбалните стволови клетки, но дългосрочната им стабилност е все още обект на проучване (309).

Фибриновите матрикси са отлична алтернатива и намаляват риска от биологична контаминация, но технологията за произвеждането им все още е на висока цена. Те са биоразградими, като след разграждането на натоварени с лимбални клетки мембрани, клетките са напълно интегрирани към роговичната повърхност. През 2015г. Holoclar (Chiesi, Italy) става първата одобрена терапия за лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция. Продуктът се базира на фибринов матрикс, но в технологията все още са включени продукти от животински произход, а по-точно миши 3T3 фибробласти и телешки серум (310).

Човешката амниотична мембрана експресира mRNA за редица растежни фактори – епителен растежен фактор, кератиноцитен растежен фактор, хепатоцитен растежен фактор,

трансформиращ растежен фактор бета и други. Нивата на тези фактори при дезепителизираната АМ са в по-ниска концентрация. От друга страна (311) във фибриновите мембрани се откриват трансформиращ растежен фактор бета, platelet derived growth factor, съдово-ендотелен растежен фактор и други. До момента не е извършван сравнителен анализ между състава и количеството на растежните фактори във фибриновите мембрани и АМ.

Тези резултати водят до заключението, че видът на субстрата може насочено да промени характеристиките на лимбалните стволови клетки и е необходима индивидуализирана преценка на желания резултат за оптимален постоперативен успех.

След трансплантацията на амниотичната мембрана, преносител на *ex vivo* размножените стволови клетки, не се наблюдаваха реакции на отхърляне, съобщени в докладите на редица автори (306,312) като по-чести след предходна трансплантация на амниотична мембрана. Амниотичната мембрана се интегрира към роговичната повърхност като намалява възпалението и последващата цикатризация, като същевременно осигурява оптимални условия на средата за пролиферация и миграция на лимбалните стволови клетки (209). Адаптирането на втори протективен слой (amniotic membrane patching) инхибира протеиназната активност и осигурява антиинфламаторен и антиангиогенен ефект (244–246). По този начин се забавя разграждането на амниона, преносител на стволовите клетки и се подпомага интегрирането им към тъканите на реципиента. Клиничните белези на състоянието се дефинират като прогресивна конюнктивализация на роговичната повърхност и наличие на рецидивиращи епителни дефекти. Успех от процедурата при представените пациенти бе отчетен както по отношение на обективните признаци, така и по субективното подобрене в качеството на живот на пациентите.

Вазирани и сътр. не откриват разлика в *ex vivo* размножаването и постоперативните резултати от лимбални биопсии на ипси- или контралатералното око при пациенти с тежка частична унилатерална инсуфициенция. В настоящото проучване биопсия на контралатералното око се наложи при трима пациенти, при които контура на палисадите на Вогт бе тотално заличен в засегнатото око, като не се наблюдаваха разлики в *ex vivo* размножаването на лимбалните стволови клетки. При тежка парциална унилатерална лимбална инсуфициенция е възможно лимбалната биопсия да се проведе на засегнатото око при условие, че резултатите от ОСТ на преден очен сегмент демонстрират частично съхранени палисади.

Един от въпросите, които все още нямат категоричен отговор, е преживяемостта на трансплантираните лимбални стволови клетки. От една страна това има значение за очаквания постоперативен резултат, а от друга – при провеждане на алогенна трансплантация за продължителността на имуномодулиращата терапия. Все още се откриват противоречиви данни, като според повечето автори клетките преживяват определен период от време, през което се интегрират към централната роговична повърхност, след което генетичният материал на донорните клетки изцяло се заменя от този на реципиента (190,313).

Методите за стандартизирана оценка на постоперативните резултати биха превъзмогнали разликите в докладването на успеха от трансплантацията на екс виво размножени лимбални стволови клетки. В настоящото проучване бе използван софтуер със свободен достъп за стандартизирана оценка Vascularization, Haze, and Integrity (VaHI), който е валидиран в проучване на Behaegel и сътр.(314) Подобен метод е Clinical Outcome Assessment in Surgical Trials of Limbal stem cell deficiency (COASTL)(307), при който обаче оценката се базира в по-голяма степен на субективната оценка на клинична картина. Предимство на VaHI е разделянето на образа на 13 сектора, което дава по-точна оценка на площта в сравнение с COASTL, при който оценката се базира на процент от очната повърхност. Резултатите от стандартизирания софтуер за оценка на трансплантацията на екс виво размножени лимбални стволови клетки при лимбална стволочлетъчна инсуфициенция – Vascularization, Haze, and Integrity (VaHI) потвърждават заключенията на други автори(315).

Нови насоки в развитието на технологията за трансплантация на лимбални стволови клетки са въвеждането на Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) технологиите и търсенето на алтернативни източници на клетки, които да претърпят трансдиференциация в лимбален фенотип. В скорошни проучвания CRISPR/Cas-9 (316) (CRISPR-associated protein) методите се използват за генериране на ин витро модели на аниридия-асоциирана кератопатия, но в бъдеще е възможно генно модифициране на екс виво размножените лимбални епителни стволови клетки за корекция на вродени мутации, които предизвикват аниридия-асоциирана кератопатия или възпалителни заболявания като синдром на Стивънс Джонсън или очен пемфигоид (317).

Алтернативни източници на стволови клетки могат да бъдат орална мукоза (cultivated oral mucosal epithelial transplantation – COMET(318)), индуцирани плурипотентни стволови клетки(319), ембрионални стволови клетки(320), стволови клетки от мастна тъкан(161) и други. Общо за повечето от тях предимство е, че могат да бъдат с автоложен произход, което да предотврати нуждата от системна имunosупресивна терапия след трансплантация. Процесът на трансдиференциация все още е обект на задълбочени проучвания, за да се оцени ролята на всички растежни фактори и стимулиращи сигнали, които да доведат до най-голяма фенотипна прилика между получените клетъчни култури от алтернативни източници и лимбалните стволови клетки.

Поради ресурсите, които трансплантацията на екс виво размножени стволови клетки изисква, се налага въвеждане на опростени методи за трансплантация на лимбални стволови клетки, запазвайки предимствата на екс виво размножените стволови клетки за автоложност и минимално инвазивна лимбална биопсия. Простата лимбална епителна трансплантация (Simple limbal epithelial transplantation - SLET) е въведена от Сангван и сътр.(321) през 2012 и предствалвява провеждане на лимбална биопсия, която в последствие се инцизира на помалки парчета, които се поставят равномерно по роговичната повърхност на засегнатото око и се покриват с амниотична мембрана. Успехът от SLET е сравним с този при екс виво размножени стволови клетки или трансплантацията на конюнктивно-лимбален автографт по

отношение на епителизацията и зрителната острота(322). Необходими са по-подробни сравнителни анализи на роговичната тъкан след различните видове трансплантация, за да се оцени ефектът по отношение на формиране на цикатрициална тъкан и репопулация на реципиентния лимб от стволови клетки чрез образни изследвания, включително Scheimpflug денситометрия, ОСТ на преден очен сегмент и конфокална ин vivo микроскопия.

След трансплантация на корнеосклерален бутон като покритие критериите за успех бяха частично изпълнени при 85.71%, което съответства на резултатите от публикации на други автори(323). Въпреки че методиката се използва отдавна, данните в литературата за КСБ като покритие са ограничени. Техниката е описана от Raufique през 1950г. като ламеларно роговично покритие, което може да се използва при роговични перфорации и десцеметоцеле(324). В повечето публикации КСБ се използват или за покритие на малки дефекти(216), или за класическа перфоративна кератопластика, когато се реципиентното ложе е повече от 11мм в диаметър. Трансплантацията на корнеосклерален бутон от една страна замества кератопластика „на горещо“, която е технически предизвикателна, често с незадоволителен резултат и може да влоши преживяемостта на последващи транспланти(247). Използвайки целият донорен материал се обхваща и лимба със съдържащите се в него стволови клетки, което замества алогенната кератолимбална трансплантация. От една страна КСБ може да играе роля на субстрат за пролиферация, миграция и диференциация на собствените клетки на реципиента, но използвайки целия корнеосклерален бутон той също съдържа алогенни лимбални стволови клетки в зоната на донорния лимб. От друга страна трансплантът се явява субстрат за възпалителната инфилтрация и инвазия на новоформирани съдове, върху който действат протеолитичните ензими и имунологичните механизми, позволявайки на подлежащата собствена роговица на реципиента да завърши регенераторните процеси. Chen и сътр. намират отговора на въпроса налични ли са витални клетки в пресните и презервираните донорни КСБ(325), но след трансплантация, по време на която биха могли да се губят повърхностни клетки. Те откриват по-добри постоперативни резултати при презервираните КСБ, въпреки че пресните материали демонстрират дендритни клетки и кератоцити. Обяснението вероятно е, че пресните КСБ имат по-голям риск от индуциране на реакция на отхвърляне на транспланта (в проучването на Chen е установен един случай при пресен роговичен материал). Ke и сътр. решават да комбинираат трансплантацията на роговичен материал като покритие с трансплантация на АМ, като особеното в тяхната техника е, че АМ се поставя първа върху дефекта, така че да го изпълни и да е обърната към предна камера, а върху нея се зашива оформен донорен роговичен материал(326). Нови насоки в развитието на техниката са използването на резидуални материали след ламеларна кератопластика (например DMEK, DSAEK) или след рефрактивна хирургия (например SMILE(327)).

Тъй като трансплантацията на пресен КСБ е алогенна е необходима имуномодулираща терапия в тези случаи. При пациентите, включени в настоящото проучване, терапията с фиксирана комбинация на топикални стероид и антибиотик бе

достатъчна за поддържане на състоянието. Необходима е индивидуализирана оценка на риска за реакция на отхвърляне и приложение по-скоро на системни имуномодулатори(328), тъй като при пациента, при когото се наложи евисцерация поради стопяване на донорния КСБ имаше съмнение за злоупотреба с топикален стероиден медикамент. При повечето пациенти трансплантацията на КСБ доведе до херметизиране на преден очен сегмент, възникване на плътен фиброваскуларен цикатрикс, заздравяване на роговицата с пълна епителизация и статистически значимо подобрене в зрителната острота.

ЗАДАЧА 4

Проучването на възможностите за криопрезервация с последващо екс виво размножаване на автоложни лимбални стволони клетки позволява възстановяване на очната повърхност в различни етапи от развитието на заболяването. Препоръките за провеждане на трансплантация на екс виво размножени лимбални епителни клетки са за овладяване на повърхностното очно възпаление за поне 3 месеца преди трансплантацията, за да се осигурят оптимални условия за преживяване на трансплантираните клетки. Основна цел е да се определят оптималните условия, при които получените транспланти ще имат максимална клонална експанзия със същевременно съхраняване на недиференциран фенотип, който се потвърждава от наличието на $\Delta Np63\alpha$, ABCG2, виментин и цитокератин 3 и 19 положителни клетки. В някои научни публикации първоначално се замразяват лимбалните експланти(249) и след това се пристъпва към размножаване, докато в повечето първоначално размножаване на ЛЕСК и последващо замразяване(248). Предимството на втория метод е, че се скъсява времето за трансплантация, което съвпада с времето за размразяване на готите клетъчни култури.

В настоящото проучване бяха замразени експлантите. При готовност за трансплантация бе необходимо да се изчака 14-дневният период за постигане на клонална експанзия и формиране на няколко слоя епителни клетки. Инвертирана фазовоконтрастна микроскопия демонстрира анатомично-морфологични характеристики, сходни с тези при прясно размножените лимбални експланти. Получените резултати подкрепят наличните данни, че криопрезервацията не повлиява пролиферативните и миграционни способности на ЛЕСК и създава възможност за създаване на тъканна банка от лимбали материали, позволяваща ало- или автоложна трансплантация за срок от 1 до 3 месеца. Недостатък на използваната техника е липсата на фенотипна оценка на получените клетъчни култури. Все пак се прецени, че получените транспланти ще се използват за лечение на пациенти, а добавянето на антитела за клетъчни маркери често са с животински произход и биха могли да окажат влияние върху постоперативните резултати. В допълнение, има натрупан достатъчно голям научен опит, върху който да се базира предположението, че криопрезервацията не оказва влияние върху лимбалните стволони клетки. Оптималните криопротектори все още са обект на изучаване(329). В настоящото проучване бе използван специален криопротектор CnT-CRYO-50 (CELLnTech, Bern, Switzerland) за клетъчни

култури от кератиноцити. Нашите резултати подкрепят наличните данни, че криопрезервацията не повлиява пролиферативните и миграционни способности на ЛЕСК и създава възможност за създаване на тъканна банка от лимбани материали, позволяваща ало-или автоложна трансплантация в кратки срокове.

ЗАДАЧА 5

Извършеното сравнение на придружаващите заболявания на пациентите, при които бяха проведени трансплантация на корнеосклерален бутон или екс виво размножени лимбални стволкови клетки потвърди данните от други автори в България за по-висока коморбидност в тази група (202). От значение са артериална хипертония, неинсулинозависим захарен диабет, инсулт и мозъчно-съдова болест, злокачествени новобразувания в областта на главата. Най-голям брой придружаващи заболявания се откри при пациентите, преминали трансплантация на лимбални епителни стволкови клетки, а най-малък – при пациентите, при които бе проведена трансплантация на АМ. Много по-голям брой от пациентите преминали лечение само с амниотична мембрана са без нито едно придружаващо заболяване. Това подчертава значението на общото състояние за поддържане на нормална очна повърхност. Захарният диабет, исхемичният мозъчен инсулт, туморни образувания в областта на главата, особено лекуваните чрез ирадиация, обширна хирургия, химиотерапия могат да доведат до нарушения в очната повърхност, включително лимбална стволковклетъчна инсуфициенция. Исхемичните мозъчни инсулти могат да засегнат множество елементи, свързани с очната повърхност, включително черепномозъчните нерви V и VII, с нарушени репаративни процеси, мигателен рефлекс, рефлекторно сълзене и редуцирана роговична сетивност. Лечението на пациентите с инсулт в реанимация (253) влошава състоянието на очната повърхност, най-често свързано с експозиционна кератопатия. Нарушенията в роговичната инервация след хирургични интервенции в областта на главата също могат да нарушат рефлекторните процеси, а ирадиацията доказано води до лимбална стволковклетъчна инсуфициенция (254,255). Тежките придружаващи заболявания биха могли да оказват негативно влияние върху стволковклетъчната популация в лимба. Освен избраните механизми, допълнително въздействие биха могли да оказват реологични, имунологични и неврологични промени засягащи пряко или косвено лимбалните стволкови клетки и елементите на стволковклетъчната ниша.

Етиологичните причини за лимбална стволковклетъчна инсуфициенция са многобройни(119). Въпреки че повечето проучвания се фокусират върху химични травми, аниридия и имунологични заболявания на очната повърхност, в настоящото проучване по-чести причини за инсуфициенция бяха невротрофична кератопатия, постинфекциозна кератопатия (основно след прекарана херпетична инфекция или тежки бактериални инфекции), токсична кератопатия, поради употреба на топикални медикаменти, ятрогенна след множество хирургични интервенции в областта на лимба и други (птеригиум, туморни образувания на лимба, дегенеративни състояния). Увреждането на роговичната инервация

води до нарушени репаративни механизми, тъй като нервните окончания от една страна са компоненти на лимбалната стволовоклетъчна ниша, а от друга секретират разтворими фактори, които стимулират епителната пролиферация и диференциация(330). От друга страна епителните клетки произвеждат субстанции, които водят до невротрофичен ефект, включително невронален растежен фактор и глиалноклетъчен невротрофичен фактор(331). Роговичната инервация се уврежда и след прекарана херпетична вирусна инфекция(332), което е честа причина за вторична невротрофична кератопатия. Това води до заключението, че роговичната инервация и епителните клетки от всички слоеве (включително базалния лимбален слой, в който се разполагат стволовите клетки) са в състояние на еквилибриум с механизъм на положителна обратна връзка.

Протрахираните инфекциозни заболявания на роговицата могат да доведат до персистиращи епителни дефекти/язви. За зарастването им е необходимо мобилизиране на лимбалните епителни клетки, но в случаи на непълна епителизация този процес може да доведе до изчерпване на лимбалния резерв. В допълнение обикновено се провежда лечение с антибиотици и други медикаменти, които са токсични за очната повърхност(333). Възможно е и протрахираното протичане на инфекциозния процес да доведе до възникване на имунологични промени с нарушена имунологична привилегия на роговицата, натрупване на имунни комплекси, активиране на комплемента и други, които допринасят за влошаването състоянието на очната повърхност.

Множество топикални медикаменти са токсични за очната повърхност, включително антибиотици, анти-глаукомни препарати, топикални анестетици и други. Прекомерната употреба на анестетици може да причини тежки изменения на очната повърхност, като в настоящото проучване бяха включени няколко пациенти, при които се подозираше или се доказва продължително поставяне на топикален анестетик. Макар данните от български автори да са ограничени, Yagci и сътр.(334) провеждат проучване в Турция, в което правят заключението, че при млади мъже, професионално заети със заваряване или леярство, при които се наблюдават персистиращи епителни дефекти, пръстеновидни кератити и изразена очна болка трябва да се подозира злоупотреба с топикален анестетик.

Ятрогенните причини за лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция най-често се свързват с обширни интервенции в областта на лимба(106). Употребата на антиметаболити и криотерапия също допринасят за възникване на състоянието(335). В пациентите, включени в настоящото проучване, при един пациент, преминал трансплантация на ЛСК и трима с проведена трансплантация на АМ бе установена ятрогенна генеза на заболяването на очна повърхност. При друг пациент с трансплантация на ЛСК механизмът бе определен като комбиниран – ятрогенен и постинфекциозен. Интерес представлява находката на ОСТ на преден сегмент при двама от пациентите с трансплантация на ЛСК, при които се откри тотално заличен контур на палисадите на Vogt. Sun и сътр.(336) откриват особени клинични характеристики на лимбалната инсуфициенция след глаукомна хирургия.

Към дегенеративните състояния на очната повърхност причислихме пациентите с булозна кератопатия. Хроничната булозна кератопатия може да доведе до лимбална

стволовоклетъчна инсуфициенция, поради рецидивиращите ерозии, които също изискват постоянно мобилизиране на лимбалните резерви за епителизация(337). Въпреки че трансплантацията на АМ или ЛСК не е патофизиологично лечение на основния механизъм на булозната кератопатия, Pires и сътр. откриват, че подобно лечение може да облекчи болковата симптоматика, да подобри роговичната епителизация и да съхрани естетичен изглед на засегнатото око.

До момента са провеждани ограничен брой сравнителни анализи на различните трансплантационни методи, в частност АМ и екс виво размножени лимбални стволови клетки. Sharma и сътр.(216) сравняват двата метода при лечение на частична лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция със сходни резултати между двете техники по отношение на конюнктивализацията, васкуларизацията и прозрачността, въпреки че резултатите им са гранични (съответно $p=0.06$, $p=0.08$, $p=0.07$). В допълнение авторите не споменават методите, по които извършват оценка на постоперативната конюнктивализация, но индиректно може да се предположи, че разчитат на клинична оценка, а не на импресионна цитология например. Въпреки това, техните резултати водят до предположението, че в случаи на частична лимбална инсуфициенция трансплантацията на АМ е първи избор на техника, поради достъпността ѝ и много по-добра икономическа ефективност. От друга страна в проучване на Borderie и сътр.(339) се сравняват класическа трансплантация на лимбална тъкан и екс виво размножени лимбални стволови клетки, като последните водят до по-дълготраен ефект по отношение на критериите за успех, по-добър профил на безопасност и по-висока зрителна острота.

В настоящото проучване бе извършен сравнителен анализ на постоперативните резултати след трансплантация на АМ, ЛСК и КСБ. Зрителната острота се подобри и в трите групи, но степента на подобрението, измерена чрез сравнение на разликата между пред- и постоперативната зрителна острота, бе най-изразена в групата с трансплантация на ЛСК. Тези резултати подкрепят предимствата на трансплантацията на ЛСК пред АМ. Най-същественото подобрение на зрителната острота в групата с трансплантация на лимбални стволови клетки може да се обясни с оптимизирането на очната повърхност, секретиранияте растежни фактори от трансплантираните ЛСК, които модулират регенераторните процеси(218,219), както и с установената по-ниска плътност на формираната цикатрициална тъкан.

Редукцията в площта на фиброваскуларната тъкан бе статистически значима и в трите групи след лечение, което вероятно се дължи на намаляване на възпалителната инфилтрация, действието на протеолитичните ензими и намаления брой топикални медикаменти. Превенцията на обширни фиброваскуларни цикатрициални промени в роговичната тъкан е предимство на трансплантационните техники. При трансплантацията на ЛСК този ефект може да се дължи на синергичното действие между свойствата на преносителя (АМ) и секретомата на лимбалните клетки. Интерес представлява установената най-съществена редукция на фиброваскуларната тъкан при пациенти след трансплантация на корнеосклерален бутон. Това може да се дължи както на коментирания вече свойства

на КСБ като субстрат за възпалителна и неоваскуларна инвазия, секретото на алогенните стволони клетки от донорния лимб, така и на инхибиторен ефект на фактори от стромата и/или ендотела(340). Употребата на КСБ като покритие води до по-добър структурен интегритет в сравнение с тъканни адхезиви и премахва действието на некротичните тъкани, които сами стават източник на колагенази и инфламаторни цитокини(324,341).

Методът, който използвахме за определяне на роговичната рефлексивност се базира на обработка на изображения с програмата ImageJ и наподобява Scheimpflug денситометрията. Компютризираният анализ на разсеяната светлина в изображения от Scheimpflug системи е въведен от Smith и сътр. през 1990г. (342) Технологията се развива и съвременните устройства използват charge-coupled device (CCD) чипове, които позволяват бърза обработка на данните(343). Създаването на топографски карти, пахиметрия и дълбочина на предна камера се базира на задълбочен оптичен анализ на разсеяната светлината. Измерване на разсеяната светлина в различни зони на роговицата (т.нар. денситометрична карта) е извършвано при инфекциозен кератит, роговични дистрофии, кератоконус, след лазерни процедури на роговицата (ЛАСИК, крослинкинг(257,344–346)). Денситометрията позволява и сегментиране на анализа в избрани равнини с различна дълбочина в стромата. Въпреки че ОСТ използва различен принцип, получените изображения се базират на промяна в отразената светлина, след като част от нея е била разсеяна от очните структури. Това е причина да бъдат сравнени средните стойности от сивата скала при здрави контроли в две отделни визити. Извършен бе анализ само в хоризонталния меридиан, тъй като при радиалните сканирания линиите минават всеки път през центъра на роговицата и така информацията би се дублирала.

Нормалните стойности на денситометрията се съобщават от Dhubghaill и сътр.(258) и са 19.74 ± 3.89 gray scale units (GSU). Разделяйки роговицата на радиални зони, те установяват, че най-ниска е денситометрията в централната зона без статистически значима разлика в стойностите до 6мм периферно. Предвид, че радиалният срез на ОСТ обхваща не повече от централните 6мм, при фокусиране върху центъра на роговицата можем да приемем, че периферните изменения не са оказали влияние на нашите резултати. Въпреки че лимбалната стволонклетъчна инсуфициенция първоначално засяга периферията, в случаите, при които бе проведено оперативно лечение се касаеше за напреднала инсуфициенция със засягане именно на централните зони, които са и с най-голямо значение за зрителната острота.

Предимствата на проведеното проучване са иновативният мултидисциплинарен подход в диагностиката и лечението на лимбалната стволонклетъчна инсуфициенция. Като недостатъци могат да се определят малкият брой на пациенти, при които бе проведено лечение с ЛСК и КСБ, както и липсата на данни от конфокална ин виво микроскопия. Малкият брой пациенти с трансплантация на ЛСК може да се обясни с изискването на значителен човешки и финансов ресурс, а на КСБ, поради ограничения брой подходящи донорни материали. Въпреки че данните от конфокалната ин виво микроскопия позволяват категорична оценка на лимба, както и на роговичната инервация, този метод все още не е

широко достъпен за разлика от оптичната кохерентна томография, която е незаменима част от всяка офталмологична практика.

VI. ОБОБЩЕНИЕ

Представеният дисертационен труд разглежда проблемите на очната повърхност свързани с лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция. В хода на проучването върху 49 очи със суспектна лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция се установи, че предоперативното приложение на импресионна цитология, естезиометрия, бърз тест за възпаление и оптична кохерентна томография може да докаже лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция, характеризираща се с неоваскуларизация, конюнктивализация и хронично възпаление. Редуцирането на възпалителната активност преди трансплантация на лимбални стволови клетки би довело до оптимални условия на средата за преживяване на клетките.

VII. ИЗВОДИ

1. Индикация за трансплантация на амнион, стволови клетки и КСБ с най-голяма честота е язвата на роговицата. Трансплантацията на амниотична мембрана е най-често провежданата терапевтична процедура. Персистиращите епителни дефекти/язви, както и васкуларизираната левкома могат да са клинична проява на лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция. При всеки отделен случай се налага индивидуализиран подход при избора на трансплантационна техника в зависимост от необходимостта за корекция на съпътстваща лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция.
2. Лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция може да е подлежащ патогенетичен механизъм при персистиращи епителни дефекти/язви. Диагнозата се поставя чрез биомикроскопия, импресионна цитология, ОСТ. Не всички пациенти с лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция подлежат на трансплантация на лимбални стволови клетки.
3. Използван бе протокол, който е изключително ефективен, базиран на биологично безопасна технология без добавяне на ксенобиотични продукти. Той осигури максимална клонална експанзия и едновременно съхрани недиференциран фенотип и пролиферативен потенциал на стволовите клетки. Трансплантацията на автоложни екс виво размножени стволови клетки е безопасна и ефективна методика.
4. Криопрезервацията на лимбалните стволови клетки преди размножаване при -80°C в комбинация с подходящ криопротектор не оказва влияние върху пролиферативните и миграционните им способности
5. Трансплантацията на екс виво размножени ЛСК води до подобрене в зрителната острота, редукция в площта на фиброваскуларната тъкан и формиране на цикатрикс с по-ниска плътност в сравнение с трансплантацията на АМ и КСБ.

Трансплантацията на КСБ води до най-съществена редукция на площта на фиброваскуларната тъкан

VIII. ПРИНОСИ

1. Приноси с научно-теоретичен характер
 - 1.1. Направен бе детайлен обзор на етиологията, класификацията, методите за диагностика и лечение на лимбалната стволочклетъчна инсуфициенция
 - 1.2. Извършена бе задълбочена дискусия върху новите насоки за развитие на базираните на тъканно инженерство методи за лечение на очната повърхност и се формулираха идеи за бъдещи проучвания в областта
2. Приноси с потвърдителен характер
 - 2.1. Доказа се ефективността и безопасността на трансплантацията на екс виво размножени лимбални стволови клетки
 - 2.2. Потвърди се ролята на биомикроскопията, импресионната цитология и оптичната кохерентна томография на преден сегмент за диагностиката на лимбалната стволочклетъчна инсуфициенция
 - 2.3. Чрез методи за стандартизирана оценка (VaHI) се потвърди подобрението в състоянието на очната повърхност след трансплантация на екс виво размножени лимбални стволови клетки
 - 2.4. Криопрезервацията на лимбалните стволови клетки преди размножаване не оказва влияние върху техните пролиферативни и миграционни способности
3. Приноси с научно-приложен характер
 - 3.1. Направи се пълно описание на клиничните резултати от приложението на екс виво размножени лимбални стволови клетки
 - 3.2. Съобщиха се подробни клинични резултати от трансплантация на корнеосклерален бутон като покритие
 - 3.3. Създаден бе алгоритъм за диагностика на лимбалната стволочклетъчна инсуфициенция, включващ биомикроскопия, импресионна цитология, оптична кохерентна томография на преден сегмент
 - 3.4. Установиха се промени в обективно измерената роговична сетивност при пациенти със суспектна лимбална стволочклетъчна инсуфициенция
 - 3.5. За първи път се направи количествена и качествена оценка на фиброваскуларната тъкан след трансплантация на амниотична мембрана, корнеосклерален бутон и екс виво размножени лимбални стволови клетки

IX. НАУЧНА АКТИВНОСТ

1. ПУБЛИКАЦИИ

- 1.1. Hristova, R., Zdravkov, Y., Markov, G., Borroni, D., Oscar, A., Petkova, I. Comparison of amniotic membrane transplantation with and without cultured limbal epithelium for persistent corneal ulcers. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2021, 35, 1, 739-745. IF 1.632
- 1.2. Христова, Р., Здравков, Я., Танев, И.. Трансплантация на ex vivo размножени лимбални стволови клетки, *Български Офталмологичен Преглед*, 2017, 2, 30-38 – Награда Проф. Ст. Дъбов
- 1.3. Христова, Р., Танев, И. Лимбална стволочклетъчна инсуфициенция – същност и лечение, *Български Офталмологичен Преглед*, 2016, 3, 41-54

2. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

- 2.1. Hristova R, Zdravkov Y, Hristova M, Tanev I. Regenerative treatment of persistent corneal ulcer following severe hypopyon keratitis. *ESCRS Winter Meeting, Marrakesh*, 2020
- 2.2. Христова Р, Танев И. Импресионна цитология на очната повърхност при трофични заболявания на роговицата, *Новости в Офталмологията, Правец*, 2016
- 2.3. Христова Р. Трансплантация на ex vivo размножени лимбални стволови клетки, *Новости в Офталмологията, Правец*, 2016 – Награда Проф. Ст. Дъбов
- 2.4. Христова Р. Лечение на митомицин индуцирана лимбална стволочклетъчна инсуфициенция – клиничен случай, XII Конгрес на Българското Дружество по Офталмология, София, 2017

3. НАУЧНИ ПРОЕКТИ

- 3.1. Договор № 18-Д/29.06.2015г. на тема „Трансплантация на ex vivo размножени човешки лимбални стволови клетки с преносител амниотична мембрана“ от конкурса Млад изследовател-2015
- 3.2. Договор № 7-Д/27.05.2016г. на тема „Методи за предоперативна оценка на промените в очната повърхност и определяне степента на значението им за постоперативния резултат“ от конкурса Млад изследовател-2016
- 3.3. Договор № Д-116/02.05.2017г. на тема „Оперативно възстановяване на очната повърхност при пациенти с лимбална стволочклетъчна инсуфициенция чрез трансплантация на ex vivo размножени лимбални стволови“ от конкурса ГРАНТ-2017
- 3.4. Договор № Д-103/23.04.2019г. на тема „Оценка на регенеративните процеси в базалния нервен плексус след трансплантация на лимбални стволови клетки и амниотична мембрана чрез Cochet-Bonnet естезиометрия и оптична кохерентна томография“ от конкурса ГРАНТ-2019

X. РЕЗЮМЕ

Въведение

Лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция е социално-значим проблем, който влошава качеството на живот на пациента, тъй като силно намалява зрението и е съпроводено от болка, дразнене от светлина и невъзможност за извършване на ежедневни дейности. Основната насока за лечение на лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция е разработването на клетъчни продукти с автоложен произход.

Цел

Целта на настоящия дисертационен труд е да се създаде диагностичен и терапевтичен алгоритъм за лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция въз основа на трансплантация на лимбални стволови клетки.

Материали и методи

Проучени бяха честотата на индикациите за трансплантация и разпределението на трансплантирани тъкани сред пациенти, преминали през Клиника по Очни болести, УМБАЛ Александровска за периода април 2014 – април 2021. Включени бяха 95 очи на 76 пациенти, при които бе проведена трансплантация на амниотична мембрана, роговична тъкан или лимбални стволови клетки. Допълнително бяха включени 49 очи на 48 пациенти с клинични данни за суспектна лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция. Проведени бяха стандартни офталмологични изследвания, фотодокументация, оптична кохерентна томография на преден очен сегмент, импресионна цитология, естезиометрия, бърз тест за възпаление на очната повърхност, минимално инвазивна лимбална биопсия, трансплантация на амниотична мембрана или роговична тъкан. За екс виво размножаване на лимбалните епителни клетки бяха сравнени два протокола. За определяне на площта на фиброваскуларната тъкан и оценка средната стойност на роговичната томография по сивата скала бе използвана програмта ImageJ. Проведен бе вървосник за субективните оплаквания на пациентите. За оценка на постоперативните резултати бе използван стандартизиран, валидиран и специализиран софтуер – Vascularization, Haze, and Integrity (VaHI). Статистическият анализ бе извършен с програмата SPSS v.26.

Резултати

За изследвания период са били извършени 14 роговични трансплантации, 59 трансплантации на амниотична мембрана, 15 трансплантации на екс виво размножени стволови клетки и 7 трансплантации на корнеосклерален бутон. Унилатерално засягане при суспектна лимбална инсуфициенция се наблюдава в 79.59%. Установи се поробрение в зрителната острота при всички пациенти със суспектна лимбална стволовоклетъчна

инсуфициенция, както и при всички пациенти преминали лечение с трансплантация на АМ, КСБ и екс виво размножени лимбални стволови клетки. Всички проучени субективни симптоми демонстрираха статистически значимо подобрене след проведеното лечение. Наблюдава се подобрене в показателите на естезиометрията. Само при две от пробите за възпаление на очната повърхност, базирано на MMP-9 резултатът бе негативен. При 29 пациенти се доказаха и възпалителни инфилтрати, и PAS позитивни клетки в проби от импресионна цитология. Оптичната кохерентна томография демонстрира частично изменен контур на палисадите в 39 очи, а пълна липса при шест очи. При 29 пациенти се установи формиране на фина цикатрициална тъкан с демаркационна линия в стромата след лечение. Fisher's exact test не показва статистически значима разлика в успеваемостта ($p=0.085$) при сравнението на двата протокола за екс виво размножаване на лимбалните епителни клетки. Проведена бе трансплантация на 15 екс виво размножени автоложни лимбални стволови клетки, като при всички критериите за успех бяха изпълнени. Т-тест за зависими данни демонстрира сигнификантно подобрене във всички показатели, оценени чрез софтуер VaНI. При изследване влиянието на криопрезервацията върху ЛСК чрез фазовоконтрастна микроскопия се наблюдаваха идентична с прясно размножените клетки морфология, пролиферация и миграция на клетъчните култури. Най-голям брой придружаващи заболявания имаха пациентите с трансплантация на ЛСК. Най-голяма разлика в зрителната острота бе установена в групата с трансплантация на екс виво размножени стволови клетки ($p=0.045$). Най-съществено намаление на площта на фиброваскуларната тъкан бе отчетено в групата с трансплантация на корнео-склерален бутон ($p=0.002$). Най-голяма промяна в рефлективността на роговицата бе установена след трансплантация на ЛСК ($p<0.001$).

Заклучение

Индикация за трансплантация на амнион, стволови клетки и КСБ с най-голяма честота е язвата на роговицата. Трансплантацията на амниотична мембрана е най-често провежданата терапевтична процедура. Диагнозата лимбална стволочетъчна инсуфициенция се поставя чрез биомикроскопия, импресионна цитология, ОСТ. Трансплантацията на автоложни екс виво размножени стволови клетки е безопасна и ефективна методика. Криопрезервацията на лимбалните стволови клетки преди размножаване не оказва влияние върху пролиферативните и миграционните им способности. Трансплантацията на екс виво размножени ЛСК води до подобрене в зрителната острота, редукия в площта на фиброваскуларната тъкан и формиране на цикатрикс с по-ниска плътност в сравнение с трансплантацията на АМ и КСБ. Трансплантацията на КСБ води до най-съществена редукия на площта на фиброваскуларната тъкан.

XI. ABSTRACT

Introduction

Limbal stem cell deficiency is represents a socially significant challenge, they leads to poor quality of life, because of markedly low vision and accompanying pain, photosensitivity and inability to perform everyday activities. The main objective in limbal stem cell deficiency treatment is the development of autologous cellular products.

Aim

The aim of this thesis is to develop a diagnostic and therapeutic algorithm for limbal stem cell deficiency based on limbal stem cell transplantation.

Materials and methods

The frequency of indications and the distribution of transplanted tissues were studied among patients treated in the Department of Ophthalmology, University Hospital Alexandrovska from April 2014 to April 2021. Ninety-five eyes of 76 patients that received AM, corneal or limbal stem cell transplant were included. Additionally, 49 eyes of 48 patients with clinical signs of suspect limbal stem cell deficiency were included. Patients underwent standard ophthalmic examination, photodocumentation, anterior segment optical coherence tomography, impression cytology, esthesiometry, quick test for ocular surface inflammation, minimally invasive limbal biopsy, amniotic membrane and corneal tissue transplantation. Two protocols for ex vivo expansion of limbal stem cells were compared. The area of fibrovascular tissue and the mean value of the corneal tomography in gray scale were estimated using ImageJ program. A subjective symptoms questionnaire was answered by the patients. The standardized, attested and specialized software – Vascularization, Haze, and Integrity (VaHI) was used to asses postoperative results. Statistical analysis was done using SPSS v.26.

Results

For the duration of the study 14 corneal transplantations, 59 amniotic membrane transplantations, 15 transplantation of ex vivo expanded limbal stem cell and 7 corneoscleral button transplantations. Unilateral involvement was seen in 79.59% of patients with suspect limbal stem cell deficiency. Visual acuity improved in all patients with suspect limbal stem cell deficiency, as well as all patients, who underwent treatment with AM, corneoscleral button or ex vivo expanded limbal stem cell transplantation. All subjective symptoms improved significantly following treatment. Esthesiometry readings improved, as well. Only two of the samples from the ocular surface inflammation test based on MMP-9 the results were negative. In 29 patients both inflammatory infiltrates and PAS+ cells were detected on impression cytology samples. Optical coherence tomography revealed partially misshapen palisade contour in 39 eyes and complete loss in six eyes. In 29 patients a fine cicatricial tissue with demarcation line was formed in the stroma following treatment. Fisher's exact test did not show statistical difference in success ($p=0.085$) in the comparison between the two protocols for ex vivo expansion of the limbal stem cells. Fifteen patients received ex vivo expanded limbal stem cell transplants and success criteria were met in

all cases. Paired samples t-test demonstrated significant improvement in all elements assessed in the VaHI software. The results of the influence of cryopreservation on LSCs under phase contrast microscopy the morphology, proliferation and migration of the cultures were identical to those of fresh explants. The highest number of comorbidity was observed in patients, undergoing LSCs transplantation. The most significant improvement in visual acuity was observed in the group with LSCs transplantation ($p=0.045$). Reduction in the area of fibrovascular tissue was most significant in the group with corneoscleral transplantation ($p=0.002$). The highest change in corneal reflectivity was observed following LSCs transplantation ($p<0.001$).

Conclusion

Corneal ulcer was the most frequent indication for AM, limbal stem cells and corneoscleral button transplantation. Amniotic membrane transplantation was the most frequent therapeutic procedure. The diagnosis of limbal stem cell deficiency is determined by biomicroscopy, impression cytology, OCT. Transplantation of autologous ex vivo expanded limbal stem cells is a safe and effective method. Cryopreservation of limbal stem cells before expansion does not influence their proliferative and migratory abilities. Ex vivo expanded LSC transplantation leads to improvement in visual acuity, fibrovascular tissue area reduction and lower density of the scar tissue in comparison to AM and corneoscleral button. Corneoscleral button transplantation leads to highest reduction in fibrovascular tissue.

XII. REFERENCES

1. Tseng SCG, Tsubota K. Important concepts for treating ocular surface and tear disorders. *Am J Ophthalmol* . 1997;(124):825–35.
2. *Fundamentals and Principles of Ophthalmology*, American Academy of Ophthalmology. San Francisco; 1995. 48–278.
3. Yanoff M, Sassani JW. *Ocular pathology*. Edinburgh: elsevier; 2009.
4. Reinhard T, Larkin DFP. *Cornea and External Eye Disease: Corneal Allograft Transplantation, Allergic Disease and Trachoma*. Berlin: Springer; 2010.
5. Chen S-Y, Hayashida Y, Chen M-Y, Xie HT, Tseng SCG. A New Isolation Method of Human Limbal Progenitor Cells by Maintaining Close Association with Their Niche Cells. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2011 May;17(5):537–48.
6. Dua HS. Limbal epithelial crypts: a novel anatomical structure and a putative limbal stem cell niche. *British Journal of Ophthalmology*. 2005 May 1;89(5):529–32.
7. Goldberg MF, Bron AJ. Limbal palisades of Vogt. *Transactions of the American Ophthalmological Society*. 1982;80:155–71.
8. Lawrenson JG, Ruskell GL. The structure of corpuscular nerve endings in the limbal conjunctiva of the human eye. *Journal of anatomy*. 1991 Aug;177:75–84.
9. Zieske JD. Perpetuation of stem cells in the eye. *Eye (London, England)*. 1994;8 (Pt 2):163–9.
10. Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, Sun TT, Lavker RM. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell*. 1989 Apr 21;57(2):201–9.
11. Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *Journal of Cell Biology*. 1986 Jul 1;103(1):49–62.
12. Lavker RM, Dong G, Cheng SZ, Kudoh K, Cotsarelis G, Sun TT. Relative proliferative rates of limbal and corneal epithelia. Implications of corneal epithelial migration, circadian rhythm, and suprabasally located DNA-synthesizing keratinocytes. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1991 May;32(6):1864–75.
13. Ebato B, Friend J, Thoft RA. Comparison of limbal and peripheral human corneal epithelium in tissue culture. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1988 Oct;29(10):1533–7.

14. Dua HS, Azuara-Blanco A. Limbal Stem Cells of the Corneal Epithelium. *Survey of Ophthalmology*. 2000 Mar;44(5):415–25.
15. Lavker RM, Dong G, Cheng SZ, Kudoh K, Cotsarelis G, Sun TT. Relative proliferative rates of limbal and corneal epithelia. Implications of corneal epithelial migration, circadian rhythm, and suprabasally located DNA-synthesizing keratinocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1991;(32):1864–75.
16. Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *Journal of Cell Biology*. 1986 Jul 1;103(1):49–62.
17. Zieske JD, Bukusoglu G, Yankauckas MA. Characterization of a potential marker of corneal epithelial stem cells. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1992 Jan;33(1):143–52.
18. Zieske JD, Bukusoglu G, Yankauckas MA, Wasson ME, Keutmann HT. Alpha-enolase is restricted to basal cells of stratified squamous epithelium. *Developmental biology*. 1992 May;151(1):18–26.
19. Cooper D, Schermer A, Sun TT. Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins: strategies, applications, and limitations. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1985 Mar;52(3):243–56.
20. Lauweryns B, van den Oord JJ, Missotten L. The transitional zone between limbus and peripheral cornea. An immunohistochemical study. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1993 May;34(6):1991–9.
21. Zhao X, Das A v, Thoreson WB, James J, Wattnem TE, Rodriguez-Sierra J, et al. Adult corneal limbal epithelium: a model for studying neural potential of non-neural stem cells/progenitors. *Developmental biology*. 2002 Oct 15;250(2):317–31.
22. Dua HS, Joseph A, Shanmuganathan VA, Jones RE. Stem cell differentiation and the effects of deficiency. *Eye (London, England)*. 2003 Nov;17(8):877–85.
23. Thoft RA, Friend J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1983 Oct;24(10):1442–3.
24. Matsuda M, Ubels JL, Edelhauser HF. A larger corneal epithelial wound closes at a faster rate. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1985 Jun;26(6):897–900.
25. Srinivasan BD, Eakins KE. The reepithelialization of rabbit cornea following single and multiple denudation. *Experimental eye research*. 1979 Dec;29(6):595–600.

26. Dua HS, Forrester J v. The corneoscleral limbus in human corneal epithelial wound healing. *American journal of ophthalmology*. 1990 Dec 15;110(6):646–56.
27. DAVANGER M, EVENSEN A. Role of the Pericorneal Papillary Structure in Renewal of Corneal Epithelium. *Nature*. 1971 Feb;229(5286):560–1.
28. Schofield R. The stem cell system. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 1983;37(8):375–80.
29. Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, de Luca M. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *The Lancet*. 1997 Apr;349(9057):990–3.
30. Holland EJ, Djalilian AR, Schwartz GS. Management of aniridic keratopathy with keratolimbal allograft: a limbal stem cell transplantation technique. *Ophthalmology*. 2003 Jan;110(1):125–30.
31. Nelson LB, Spaeth GL, Nowinski TS, Margo CE, Jackson L. Aniridia. A review. *Survey of Ophthalmology*. 1984 May;28(6):621–42.
32. Ferreira MAT, Almeida Júnior IG de, Kuratani DK, Rosa RFM, Gonzales JF de O, Telles LE de B, et al. WAGRO syndrome: a rare genetic condition associated with aniridia and additional ophthalmologic abnormalities. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. 2019;82(4).
33. Valenzuela A, Cline RA. Ocular and nonocular findings in patients with aniridia. *Canadian Journal of Ophthalmology*. 2004 Oct;39(6):632–8.
34. Lee HJ, Colby KA. A Review of the Clinical and Genetic Aspects of Aniridia. *Seminars in Ophthalmology*. 2013 Sep 18;28(5–6):306–12.
35. Edén U, Riise R, Tornqvist K. Corneal Involvement in Congenital Aniridia. *Cornea*. 2010 Oct;29(10):1096–102.
36. Mayer KL, Nordlund ML, Schwartz GS, Holland EJ. Keratopathy in Congenital Aniridia. *The Ocular Surface*. 2003 Apr;1(2):74–9.
37. NISHIDA K, KINOSHITA S, OHASHI Y, KUWAYAMA Y, YAMAMOTO S. Ocular Surface Abnormalities in Aniridia. *American Journal of Ophthalmology*. 1995 Sep;120(3):368–75.
38. Tseng SCG, Li D-Q. Comparison of Protein Kinase C Subtype Expression Between Normal and Aniridic Human Ocular Surfaces: Implications for Limbal Stem Cell Dysfunction in Aniridia. *Cornea*. 1996 Mar;15(2):168–78.
39. López-García JS, Rivas L, García-Lozano I, Murube J. Autologous Serum Eyedrops in the Treatment of Aniridic Keratopathy. *Ophthalmology*. 2008 Feb;115(2):262–7.

40. Vicente A, Byström B, Lindström M, Stenevi U, Pedrosa Domellöf F. Aniridia-related keratopathy: Structural changes in naïve and transplanted corneal buttons. *PLOS ONE*. 2018 Jun 11;13(6):e0198822.
41. Skeens HM, Brooks BP, Holland EJ. Congenital Aniridia Variant: Minimally Abnormal Irides with Severe Limbal Stem Cell Deficiency. *Ophthalmology*. 2011 Mar;
42. Visinoni ÁF, Lisboa-Costa T, Pagnan NAB, Chautard-Freire-Maia EA. Ectodermal dysplasias: Clinical and molecular review. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2009 Sep;149A(9):1980–2002.
43. Keklikci U, Yavuz I, Tunik S, Ulku Z, Akdeniz S. Ophthalmic Manifestations in Patients with Ectodermal Dysplasia Syndromes. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2014;23(4):605–10.
44. di Iorio E, Kaye SB, Ponzin D, Barbaro V, Ferrari S, Böhm E, et al. Limbal Stem Cell Deficiency and Ocular Phenotype in Ectrodactyly-Ectodermal Dysplasia-Clefting Syndrome Caused by p63 Mutations. *Ophthalmology*. 2012 Jan;119(1):74–83.
45. Messmer EM, Kenyon KR, Rittinger O, Janecke AR, Kampik A. Ocular manifestations of keratitis–ichthyosis–deafness (KID) syndrome. *Ophthalmology*. 2005 Feb;112(2):e1–6.
46. Gupta N, Kalavani M, Tandon R. Comparison of prognostic value of Roper Hall and Dua classification systems in acute ocular burns. *British Journal of Ophthalmology*. 2011 Feb 1;95(2):194–8.
47. Chan LS, Hammerberg C, Cooper KD. Significantly Increased Occurrence of HLA-DQB1*0301 Allele in Patients with Ocular Cicatricial Pemphigoid. *Journal of Investigative Dermatology*. 1997 Feb;108(2):129–32.
48. Ahmed AR, Foster S, Zaltas M, Notani G, Awdeh Z, Alper CA, et al. Association of DQw7 (DQB1*0301) with ocular cicatricial pemphigoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991 Dec 15;88(24):11579–82.
49. Bhol K. Ocular Cicatricial Pemphigoid. *Archives of Ophthalmology*. 1995 Feb 1;113(2):202.
50. Kurzhals G, Stolz W, Maciejewski W, Karpati S, Meurer M, Breit R. Localized cicatricial pemphigoid of the Brunsting-Perry type with transition into disseminated cicatricial pemphigoid. Report of a case proved by preembedding immunogold electron microscopy. *Archives of dermatology*. 1995 May;131(5):580–5.
51. BRUNSTING LA. Benign Pemphigoid? *AMA Archives of Dermatology*. 1957 Apr 1;75(4):489.

52. Moschella SL, Pillsbury DM, Hrley HJ. *Dermatology*. Philadelphia: Saunders; 1975. 466–468.
53. Bernauer W, Wright P, Dart JK, Leonard JN, Lightman S. The Conjunctiva in Acute and Chronic Mucous Membrane Pemphigoid. *Ophthalmology*. 1993 Mar;100(3):339–46.
54. Lazarova Z, Yee C, Darling T, Briggaman RA, Yancey KB. Passive transfer of anti-laminin 5 antibodies induces subepidermal blisters in neonatal mice. *Journal of Clinical Investigation*. 1996 Oct 1;98(7):1509–18.
55. Liu Z, Diaz LA, Troy JL, Taylor AF, Emery DJ, Fairley JA, et al. A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. *Journal of Clinical Investigation*. 1993 Nov 1;92(5):2480–8.
56. Rice BA, Foster CS. Immunopathology of Cicatricial Pemphigoid Affecting the Conjunctiva. *Ophthalmology*. 1990 Nov;97(11):1476–83.
57. Chan LS. Immune-Mediated Subepithelial Blistering Diseases of Mucous Membranes. *Archives of Dermatology*. 1993 Apr 1;129(4):448.
58. Kirtschig G, Marinkovich MP, Burgeson RE, Yancey KB. Anti-Basement Membrane Autoantibodies in Patients with Anti-Epiligrin Cicatricial Pemphigoid Bind the α Subunit of Laminin 5. *Journal of Investigative Dermatology*. 1995 Oct;105(4):543–8.
59. Domloge-Hultsch N, Anhalt GJ, Gammon WR, Lazarova Z, Briggaman R, Welch M, et al. Antiepiligrin cicatricial pemphigoid. A subepithelial bullous disorder. *Archives of dermatology*. 1994 Dec;130(12):1521–9.
60. Chan RY, Bhol K, Tesavibul N, Letko E, Simmons RK, Foster CS, et al. The role of antibody to human beta4 integrin in conjunctival basement membrane separation: possible in vitro model for ocular cicatricial pemphigoid. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1999 Sep;40(10):2283–90.
61. Pazderka Smith E, Taylor TB, Meyer LJ, Zone JJ. Identification of a Basement Membrane Zone Antigen Reactive with Circulating IgA Antibody in Ocular Cicatricial Pemphigoid. *Journal of Investigative Dermatology*. 1993 Oct;101(4):619–23.
62. Zhu X-J, Bystryjn J-C. Heterogeneity of Pemphigoid Antigens. *Journal of Investigative Dermatology*. 1983 Jan;80(1):16–20.
63. Foster CS. Cicatricial pemphigoid. *Transactions of the American Ophthalmological Society*. 1986;84:527–663.
64. Bernauer W, Broadway DC, Wright P. Chronic progressive conjunctival cicatrization. *Eye*. 1993 May;7(3):371–8.

65. Roat MI. Hyperproliferation of Conjunctival Fibroblasts From Patients With Cicatricial Pemphigoid. *Archives of Ophthalmology*. 1989 Jul 1;107(7):1064.
66. Giuri S. [Ocular cicatricial pemphigoid]. *Oftalmologia (Bucharest, Romania : 1990)*. 1999;47(2):13–21.
67. Wright P. Cicatrizing conjunctivitis. *Transactions of the ophthalmological societies of the United Kingdom*. 1986;105 (Pt 1):1–17.
68. Duke-Elder S, MacFaul PA. *System of Ophthalmology*. Vol. 8. London: Henry Kimpton; 1965. 496–527.
69. Wright P. Enigma of ocular cicatricial pemphigoid. A comparative study of clinical and immunological findings. *Transactions of the ophthalmological societies of the United Kingdom*. 1979 Apr;99(1):141–5.
70. Wright P. External diseases in *Clinical Ophthalmology*. Miller S, editor. Bristol: Wright; 1987. 107–128.
71. Mondino BJ. Cicatricial Pemphigoid and Erythema Multiforme. *Ophthalmology*. 1990 Jul;97(7):939–52.
72. Mondino BJ, Brown SI. Ocular Cicatricial Pemphigoid. *Ophthalmology*. 1981 Feb;88(2):95–100.
73. Bernauer W, Elder MJ, Leonard JN, Wright P, Dart JK. The value of biopsies in the evaluation of chronic progressive conjunctival cicatrization. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 1994 Sep;232(9):533–7.
74. TSUBOTA K, SATAKE Y, OHYAMA M, TODA I, TAKANO Y, ONO M, et al. Surgical Reconstruction of the Ocular Surface in Advanced Ocular Cicatricial Pemphigoid and Stevens-Johnson Syndrome. *American Journal of Ophthalmology*. 1996 Jul;122(1):38–52.
75. Hebra F von. Erythema exsudativum multiforme. *Atlas der Hauterkrankungen*. Wien: Kaiserliche Akademie der Wissenschaften; 1866. 54–57.
76. STEVENS AM. A NEW ERUPTIVE FEVER ASSOCIATED WITH STOMATITIS AND OPHTHALMIA. *American Journal of Diseases of Children*. 1922 Dec 1;24(6):526.
77. Bastuji-Garin S, Rzany B, Stern RS, Shear NH, Naldi L, Roujeau JC. Clinical classification of cases of toxic epidermal necrolysis, Stevens-Johnson syndrome, and erythema multiforme. *Archives of dermatology*. 1993 Jan;129(1):92–6.
78. Roujeau JC, Huynh TN, Bracq C, Guillaume JC, Revuz J, Touraine R. Genetic susceptibility to toxic epidermal necrolysis. *Archives of dermatology*. 1987 Sep;123(9):1171–3.

79. Mondino BJ, Brown SI, Biglan AW. HLA Antigens in Stevens-Johnson Syndrome With Ocular Involvement. *Archives of Ophthalmology*. 1982 Sep 1;100(9):1453–4.
80. Wolkenstein P, Charue D, Laurent P, Revuz J, Roujeau JC, Bagot M. Metabolic predisposition to cutaneous adverse drug reactions. Role in toxic epidermal necrolysis caused by sulfonamides and anticonvulsants. *Archives of dermatology*. 1995 May;131(5):544–51.
81. Pleyer U, Haberle H, Baatz H. Acute manifestations of oculo-muco-cutaneous disorders: erythema multiforme major, Stevens–Johnson syndrome, and toxic epidermal necrolysis. In: *Oculodermal diseases*. . Pleyer U, Hartmann Chr, Sterry W, editors. Buren, The Netherlands: Aeolus Press; 1997. 169–191.
82. Chan HL, Stern RS, Arndt KA, Langlois J, Jick SS, Jick H, et al. The incidence of erythema multiforme, Stevens-Johnson syndrome, and toxic epidermal necrolysis. A population-based study with particular reference to reactions caused by drugs among outpatients. *Archives of dermatology*. 1990 Jan;126(1):43–7.
83. Genvert GI, Cohen EJ, Donnenfeld ED, Blecher MH. Erythema Multiforme After Use of Topical Sulfacetamide. *American Journal of Ophthalmology*. 1985 Apr;99(4):465–8.
84. Riley RJ, Leeder JS. *In vitro* analysis of metabolic predisposition to drug hypersensitivity reactions. *Clinical and Experimental Immunology*. 2008 Jun 28;99(1):1–6.
85. Borchers AT, Lee JL, Naguwa SM, Cheema GS, Gershwin ME. Stevens–Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Autoimmunity Reviews*. 2008 Sep;7(8):598–605.
86. Farthing P, Bagan J-V, Scully C. Number IV Erythema multiforme. *Oral Diseases*. 2005 Sep;11(5):261–7.
87. Merot Y. Lymphocyte Subsets and Langerhans' Cells in Toxic Epidermal Necrolysis. *Archives of Dermatology*. 1986 Apr 1;122(4):455.
88. Correia O, Delgado L, Ramos JP, Resende C, Torrinha JA. Cutaneous T-cell recruitment in toxic epidermal necrolysis. Further evidence of CD8+ lymphocyte involvement. *Archives of dermatology*. 1993 Apr;129(4):466–8.
89. Foster CS, Fong LP, Azar D, Kenyon KR. Episodic Conjunctival Inflammation after Stevens-Johnson Syndrome. *Ophthalmology*. 1988 Apr;95(4):453–62.
90. Volkers SM, Meisel C, Terhorst-Molawi D, Burbach GJ, Schürmann D, Suttorp N, et al. Clonal expansion of CD4+CD8+ T cells in an adult patient with *Mycoplasma pneumoniae*-associated Erythema multiforme majus. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*. 2021 Dec 10;17(1):17.

91. Iwai K, Miyawaki T, Takizawa T, Konno A, Ohta K, Yachie A, et al. Differential expression of bcl-2 and susceptibility to anti-Fas-mediated cell death in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and neutrophils. *Blood*. 1994 Aug 15;84(4):1201–8.
92. Abe R, Shimizu T, Shibaki A, Nakamura H, Watanabe H, Shimizu H. Toxic Epidermal Necrolysis and Stevens-Johnson Syndrome Are Induced by Soluble Fas Ligand. *The American Journal of Pathology*. 2003 May;162(5):1515–20.
93. Mockenhaupt M. The current understanding of Stevens–Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Expert Review of Clinical Immunology*. 2011 Nov 10;7(6):803–15.
94. Marzano A v, Frezzolini A, Caproni M, Parodi A, Fanoni D, Quaglino P, et al. Immunohistochemical expression of apoptotic markers in drug-induced erythema multiforme, Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *International journal of immunopathology and pharmacology*. 20(3):557–66.
95. French LE. Toxic Epidermal Necrolysis and Stevens Johnson Syndrome: Our Current Understanding. *Allergology International*. 2006;55(1):9–16.
96. Foedinger D, Anhalt GJ, Boecscoer B, Elbe A, Wolff K, Rappersberger K. Autoantibodies to desmoplakin I and II in patients with erythema multiforme. *Journal of Experimental Medicine*. 1995 Jan 1;181(1):169–79.
97. Tonnesen MG, Harrist TJ, Wintroub BU, Mihm MC, Soter NA. Erythema Multiforme: Microvascular Damage and Infiltration of Lymphocytes and Basophils. *Journal of Investigative Dermatology*. 1983 Apr;80(4):282–6.
98. Power WJ, Ghorraishi M, Merayo-Llodes J, Neves RA, Foster CS. Analysis of the Acute Ophthalmic Manifestations of the Erythema Multiforme/Stevens-Johnson Syndrome/Toxic Epidermal Necrolysis Disease Spectrum. *Ophthalmology*. 1995 Nov;102(11):1669–76.
99. Nelson JD, Wright JC. Conjunctival Goblet Cell Densities in Ocular Surface Disease. *Archives of Ophthalmology*. 1984 Jul 1;102(7):1049–51.
100. ASHBY D. ERYTHEMA MULTIFORME EXUDATIVUM MAJOR (STEVENS-JOHNSON SYNDROME). *The Lancet*. 1951 May;257(6664):1091–5.
101. HOWARD GM. The Stevens-Johnson syndrome. Ocular prognosis and treatment. *American journal of ophthalmology*. 1963 May;55:893–900.
102. PATZ A. OCULAR INVOLVEMENT IN ERYTHEMA MULTIFORME. *Archives of Ophthalmology*. 1950 Feb 1;43(2):244–56.
103. Ralph RA. Conjunctival goblet cell density in normal subjects and in dry eye syndromes. *Investigative ophthalmology*. 1975 Apr;14(4):299–302.

104. Arstikaitis MJ. Ocular Aftermath of Stevens-Johnson Syndrome. *Archives of Ophthalmology*. 1973 Nov 1;90(5):376.
105. Wright P, Collin JR. The ocular complications of erythema multiforme (Stevens Johnson syndrome) and their management. *Transactions of the ophthalmological societies of the United Kingdom*. 1983;103 (Pt 3):338–41.
106. Schwartz GS, Holland EJ. Iatrogenic Limbal Stem Cell Deficiency. *Cornea*. 1998 Jan;17(1):31.
107. Rossen J, Amram A, Milani B, Park D, Harthan J, Joslin C, et al. Contact Lens-induced Limbal Stem Cell Deficiency. *The Ocular Surface*. 2016 Oct;14(4):419–34.
108. Chan CC, Holland EJ. Severe Limbal Stem Cell Deficiency From Contact Lens Wear: Patient Clinical Features. *American Journal of Ophthalmology*. 2013 Mar;155(3):544-549.e2.
109. Said D, Dua H. Neurotrophic Keratitis: Definition, clinical presentation and diagnosis. *Acta Ophthalmologica*. 2017 Sep;95.
110. Bonini S, Rama P, Olzi D, Lambiase A. Neurotrophic keratitis. *Eye*. 2003 Nov 20;17(8):989–95.
111. Mackie IA. Neuroparalytic keratitis. In: Fraunfelder F, Roy FH, Meyer SM, editors. *Current Ocular Therapy*. Philadelphia, PA: WB Saunders; 1995. p. 452–4.
112. Li W, Hayashida Y, Chen Y-T, Tseng SC. Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. *Cell Research*. 2007 Jan 9;17(1):26–36.
113. SIGELMAN S. MITOTIC AND WOUND-HEALING ACTIVITIES OF THE CORNEAL EPITHELIUM. *AMA Archives of Ophthalmology*. 1954 Jul 1;52(1):46.
114. Baldwin HC, Marshall J. Growth factors in corneal wound healing following refractive surgery: A review. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*. 2002 Jun;80(3):238–47.
115. WILSON SE, HE Y-G, WENG J, LI Q, McDOWALL AW, VITAL M, et al. Epithelial Injury Induces Keratocyte Apoptosis: Hypothesized Role for the Interleukin-1 System in the Modulation of Corneal Tissue Organization and Wound Healing. *Experimental Eye Research*. 1996 Apr;62(4):325–38.
116. Versura P, Giannaccare G, Pellegrini M, Sebastiani S, Campos EC. Neurotrophic keratitis: current challenges and future prospects. *Eye and Brain*. 2018 Jun;Volume 10:37–45.
117. Dushku N. Pterygia Pathogenesis. *Archives of Ophthalmology*. 2001 May 1;119(5):695.

118. Das P, Gokani A, Bagchi K, Bhaduri G, Chaudhuri S, Law S. Limbal epithelial stem-microenvironmental alteration leads to pterygium development. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2015 Apr 6;402(1–2):123–39.
119. Dua HS, Saini JS, Azuara-Blanco A, Gupta P. Limbal stem cell deficiency: concept, aetiology, clinical presentation, diagnosis and management. *Indian journal of ophthalmology*. 2000 Jun;48(2):83–92.
120. Dua HS, Gomes JAP, Jindal VK, Appa SN, Schwarting R, Eagle RC, et al. Mucosa specific lymphocytes in the human conjunctiva, corneoscleral limbus and lacrimal gland. *Current Eye Research*. 1994 Jan 2;13(1):87–93.
121. Dua HS. The conjunctiva in corneal epithelial wound healing. *British Journal of Ophthalmology*. 1998 Dec 1;82(12):1407–11.
122. Huang AJ, Tseng SC, Kenyon KR. Alteration of epithelial paracellular permeability during corneal epithelial wound healing. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1990 Mar 1;31(3):429–35.
123. Huang AJ, Tseng SC. Corneal epithelial wound healing in the absence of limbal epithelium. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1991 Jan;32(1):96–105.
124. Coster DJ, Aggarwal RK, Williams KA. Surgical management of ocular surface disorders using conjunctival and stem cell allografts. *British Journal of Ophthalmology*. 1995 Nov 1;79(11):977–82.
125. Giebel SJ, Menicucci G, McGuire PG, Das A. Matrix metalloproteinases in early diabetic retinopathy and their role in alteration of the blood–retinal barrier. *Laboratory Investigation*. 2005 May 14;85(5):597–607.
126. Dua HS, Gomes JA, Singh A. Corneal epithelial wound healing. *British Journal of Ophthalmology*. 1994 May 1;78(5):401–8.
127. Tseng S, Cheng J, Huang A. Classification of conjunctival surgeries for corneal diseases based on stem cell concept. *Ophthalmol Clin North Am*. 1990;3:595–610.
128. Keivyon KR, Tseng SCG. Limbal Autograft Transplantation for Ocular Surface Disorders. *Ophthalmology*. 1989 May;96(5):709–23.
129. Kim BY, Riaz KM, Bakhtiari P, Chan CC, Welder JD, Holland EJ, et al. Medically Reversible Limbal Stem Cell Disease. *Ophthalmology*. 2014 Oct;121(10):2053–8.
130. Baudouin C, Brignole F, Becquet F, Pisella PJ, Goguel A. Flow cytometry in impression cytology specimens. A new method for evaluation of conjunctival inflammation. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1997 Jun;38(7):1458–64.

131. Ellenberg D, Azar DT, Hallak JA, Tobaigy F, Han KY, Jain S, et al. Novel aspects of corneal angiogenic and lymphangiogenic privilege. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2010 May;29(3):208–48.
132. Azar DT. Corneal angiogenic privilege: angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing (an American Ophthalmological Society thesis). *Transactions of the American Ophthalmological Society*. 2006;104:264–302.
133. Ebrahem Q, Minamoto A, Hoppe G, Anand-Apte B, Sears JE. Triamcinolone Acetonide Inhibits IL-6- and VEGF-Induced Angiogenesis Downstream of the IL-6 and VEGF Receptors. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2006 Nov 1;47(11):4935.
134. Gong Y, Koh D-R. Neutrophils promote inflammatory angiogenesis via release of preformed VEGF in an in vivo corneal model. *Cell and Tissue Research*. 2010 Feb 12;339(2):437–48.
135. Nubile M, Lanzini M, Miri A, Pocobelli A, Calienno R, Curcio C, et al. In Vivo Confocal Microscopy in Diagnosis of Limbal Stem Cell Deficiency. *American Journal of Ophthalmology*. 2013 Feb;155(2):220–32.
136. Meyer PA, Watson PG. Low dose fluorescein angiography of the conjunctiva and episclera. *British Journal of Ophthalmology*. 1987 Jan 1;71(1):2–10.
137. Jiang H, Ye Y, DeBuc DC, Lam BL, Rundek T, Tao A, et al. Human conjunctival microvasculature assessed with a retinal function imager (RFI). *Microvascular Research*. 2013 Jan;85:134–7.
138. Cursiefen C, Maruyama K, Jackson DG, Streilein JW, Kruse FE. Time Course of Angiogenesis and Lymphangiogenesis After Brief Corneal Inflammation. *Cornea*. 2006 May;25(4):443–7.
139. Baluk P, McDonald DM. *Markers for Microscopic Imaging of Lymphangiogenesis and Angiogenesis*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008 May;1131(1):1–12.
140. Egbert PR, Lauber S, Maurice DM. A Simple Conjunctival Biopsy. *American Journal of Ophthalmology*. 1977 Dec;84(6):798–801.
141. Tseng SCG. Staging of Conjunctival Squamous Metaplasia by Impression Cytology. *Ophthalmology*. 1985 Jun;92(6):728–33.
142. MARNER K. ‘SNAKE-LIKE’ APPEARANCE OF NUCLEAR CHROMATIN IN CONJUNCTIVAL EPITHELIAL CELLS FROM PATIENTS WITH KERATOCONJUNCTIVITIS SICCA. *Acta Ophthalmologica*. 2009 May 27;58(5):849–53.

143. Wittpenn JR, Tseng SCG, Sommer A. Detection of Early Xerophthalmia by Impression Cytology. *Archives of Ophthalmology*. 1986 Feb 1;104(2):237–9.
144. Aragona P, Romeo GF, Puzzolo D, Micali A, Ferreri G. Impression cytology of the conjunctival epithelium in patients with vernal conjunctivitis. *Eye*. 1996 Jan;10(1):82–5.
145. Nelson JD. Ocular surface impressions using cellulose acetate filter material. Ocular pemphigoid. *Survey of Ophthalmology*. 1982 Jul;27(1):67–9.
146. Tseng S-H, Chen Y-T, Huang F-C, Jin Y-T. Seborrhic keratosis of conjunctiva simulating a malignant melanomaan immunocytochemical study with impression cytology. *Ophthalmology*. 1999 Aug 1;106(8):1516–20.
147. Nolan GR, Hirst LW, Wright RG, Bancroft BJ. Application of impression cytology to the diagnosis of conjunctival neoplasms. *Diagnostic Cytopathology*. 1994 Oct;11(3):246–9.
148. Paridaens AD, McCartney AC, Curling OM, Lyons CJ, Hungerford JL. Impression cytology of conjunctival melanosis and melanoma. *British Journal of Ophthalmology*. 1992 Apr 1;76(4):198–201.
149. Puangsricharern V, Tseng SCG. Cytologlogic Evidence of Corneal Diseases with Limbal Stem Cell Deficiency. *Ophthalmology*. 1995 Oct;102(10):1476–85.
150. Corrales RM, Calonge M, Herreras JM, Saez V, Chaves FJ. Human Epithelium from Conjunctival Impression Cytology Expresses MUC7 Mucin Gene. *Cornea*. 2003 Oct;22(7):665–71.
151. Sawada Y, Yuan C, Huang AJW. Impression cytology in the diagnosis of acanthamoeba keratitis with surface involvement. *American Journal of Ophthalmology*. 2004 Feb;137(2):323–8.
152. Poli M, Burillon C, Auxenfans C, Rovere M-R, Damour O. Immunocytochemical Diagnosis of Limbal Stem Cell Deficiency. *Cornea*. 2015 Jul;34(7):817–23.
153. Calonge M, Diebold Y, Sáez V, de Salamanca AE, García-Vázquez C, Corrales RM, et al. Impression cytology of the ocular surface: a review. *Experimental Eye Research*. 2004 Mar;78(3):457–72.
154. DART J. Impression cytology of the ocular surface---research tool or routine clinical investigation? *British Journal of Ophthalmology*. 1997 Nov 1;81(11):930–930.
155. Popescu DP, Choo-Smith L-P, Flueraru C, Mao Y, Chang S, Disano J, et al. Optical coherence tomography: fundamental principles, instrumental designs and biomedical applications. *Biophysical Reviews*. 2011 Sep 6;3(3):155–69.

156. Banayan N, Georgeon C, Grieve K, Borderie VM. Spectral-domain Optical Coherence Tomography in Limbal Stem Cell Deficiency. A Case-Control Study. *American Journal of Ophthalmology*. 2018 Jun;190:179–90.
157. Le Q, Yang Y, Deng SX, Xu J. Correlation between the existence of the palisades of Vogt and limbal epithelial thickness in limbal stem cell deficiency. *Clinical & Experimental Ophthalmology*. 2017 Apr;45(3):224–31.
158. Pedrotti E, Passilongo M, Fasolo A, Nubile M, Parisi G, Mastropasqua R, et al. In Vivo Confocal Microscopy 1 Year after Autologous Cultured Limbal Stem Cell Grafts. *Ophthalmology*. 2015 Aug;122(8):1660–8.
159. Deng SX, Borderie V, Chan CC, Dana R, Figueiredo FC, Gomes JAP, et al. Global Consensus on Definition, Classification, Diagnosis, and Staging of Limbal Stem Cell Deficiency. *Cornea*. 2019 Mar 31;38(3):364–75.
160. Romano MR, Biagioni F, Carrizzo A, Lorusso M, Spadaro A, Micelli Ferrari T, et al. Effects of vitamin B12 on the corneal nerve regeneration in rats. *Experimental Eye Research*. 2014 Mar;120:109–17.
161. Galindo S, Herreras JM, López-Paniagua M, Rey E, de la Mata A, Plata-Cordero M, et al. Therapeutic Effect of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in Experimental Corneal Failure Due to Limbal Stem Cell Niche Damage. *Stem Cells*. 2017 Oct 1;35(10):2160–74.
162. Ferrari G, Hajrasouliha AR, Sadrai Z, Ueno H, Chauhan SK, Dana R. Nerves and Neovessels Inhibit Each Other in the Cornea. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2013 Jan 28;54(1):813.
163. Tepelus TC, Chiu GB, Huang J, Huang P, Sadda SR, Irvine J, et al. Correlation between corneal innervation and inflammation evaluated with confocal microscopy and symptomatology in patients with dry eye syndromes: a preliminary study. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2017 Sep 20;255(9):1771–8.
164. Mastropasqua L, Massaro-Giordano G, Nubile M, Sacchetti M. Understanding the Pathogenesis of Neurotrophic Keratitis: The Role of Corneal Nerves. *Journal of Cellular Physiology*. 2017 Apr;232(4):717–24.
165. Ueno H, Ferrari G, Hattori T, Saban DR, Katikireddy KR, Chauhan SK, et al. Dependence of corneal stem/progenitor cells on ocular surface innervation. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2012 Feb 21;53(2):867–72.
166. Sotozono C, Ueta M, Koizumi N, Inatomi T, Shirakata Y, Ikezawa Z, et al. Diagnosis and Treatment of Stevens-Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis with Ocular Complications. *Ophthalmology*. 2009 Apr;116(4):685–90.

167. Fish R, Davidson RS. Management of ocular thermal and chemical injuries, including amniotic membrane therapy. *Current Opinion in Ophthalmology*. 2010 Jul;21(4):317–21.
168. López-García JS, García-Lozano I, Rivas L, Giménez C, Suárez-Cortés T, Acera A. Changes in Corneal Expression of *MUC5AC* after Autologous Serum Eyedrop Treatment in Patients with Limbal Stem Cell Deficiency. *Current Eye Research*. 2019 Sep 2;44(9):934–40.
169. Celebi ARC, Ulusoy C, Mirza GE. The efficacy of autologous serum eye drops for severe dry eye syndrome: a randomized double-blind crossover study. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2014 Apr 25;252(4):619–26.
170. Møller-Hansen M, Larsen A-C, Toft PB, Lynggaard CD, Schwartz C, Bruunsgaard H, et al. Safety and feasibility of mesenchymal stem cell therapy in patients with aqueous deficient dry eye disease. *The Ocular Surface*. 2021 Jan;19:43–52.
171. Toshida H, Odaka, Ohta, Tabuchi, Koike, Suto C, et al. Efficacy of retinol palmitate eye drops for dry eye in rabbits with lacrimal gland resection. *Clinical Ophthalmology*. 2012 Oct;1585.
172. del Buey MA, Casas P, Caramello CM, Esteban O, Martinez M, Sánchez N, et al. Analysis of the efficacy of the tissue regenerating agent (RGTA) 0.01% polycarboxymethylglucose sulfate in the treatment of neurotrophic corneal ulcers and persistent epithelial defects. *Acta Ophthalmologica*. 2015 Oct;93:n/a-n/a.
173. Lambiase A, Micera A, Pellegrini G, Merlo D, Rama P, de Luca M, et al. In Vitro Evidence of Nerve Growth Factor Effects on Human Conjunctival Epithelial Cell Differentiation and Mucin Gene Expression. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2009 Oct 1;50(10):4622.
174. Kolli S, Bojic S, Ghareeb AE, Kurzawa-Akanbi M, Figueiredo FC, Lako M. The Role of Nerve Growth Factor in Maintaining Proliferative Capacity, Colony-Forming Efficiency, and the Limbal Stem Cell Phenotype. *Stem Cells*. 2019 Jan 1;37(1):139–49.
175. Ramos T, Scott D, Ahmad S. An Update on Ocular Surface Epithelial Stem Cells: Cornea and Conjunctiva. *Stem Cells International*. 2015;2015:1–7.
176. Henderson HWA, Collin JRO. Mucous Membrane Grafting. In: *Surgery for the Dry Eye*. Basel: KARGER; 2008. p. 230–42.
177. Hirayama M, Tsubota K, Tsuji T. Bioengineered Lacrimal Gland Organ Regeneration in Vivo. *Journal of Functional Biomaterials*. 2015 Jul 30;6(3):634–49.
178. Beyazyıldız E, Pınarlı FA, Beyazyıldız Ö, Hekimoğlu ER, Acar U, Demir MN, et al. Efficacy of Topical Mesenchymal Stem Cell Therapy in the Treatment of Experimental Dry Eye Syndrome Model. *Stem Cells International*. 2014;2014:1–9.

179. Yao L, Bai H. Review: mesenchymal stem cells and corneal reconstruction. *Molecular vision*. 2013;19:2237–43.
180. Dua HS. The conjunctiva Sequential sectoral conjunctival epitheliectomy. In: Holland EJ, Mannis MJ, editors. *Ocular surface disease medical and surgical management*. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer; 2002. p. 168–74.
181. Espana EM, di Pascuale M, Grueterich M, Solomon A, Tseng SCG. Keratolimbal allograft in corneal reconstruction. *Eye*. 2004 Apr 7;18(4):406–17.
182. Tseng SCG. Amniotic Membrane Transplantation With or Without Limbal Allografts for Corneal Surface Reconstruction in Patients With Limbal Stem Cell Deficiency. *Archives of Ophthalmology*. 1998 Apr 1;116(4):431.
183. Jenkins C, Tuft S, Liu C, Buckley R. Limbal transplantation in the management of chronic contact-lens-associated epitheliopathy. *Eye*. 1993 Sep;7(5):629–33.
184. Rao S. Limbal allografting from related live donors for corneal surface reconstruction. *Ophthalmology*. 1999 Apr 1;106(4):822–8.
185. Santos MS, Gomes JAP, Hofling-Lima AL, Rizzo L v., Romano AC, Belfort R. Survival Analysis of Conjunctival Limbal Grafts and Amniotic Membrane Transplantation in Eyes With Total Limbal Stem Cell Deficiency. *American Journal of Ophthalmology*. 2005 Aug;140(2):223.e1-223.e9.
186. Ilari L, Daya SM. Long-term outcomes of keratolimbal allograft for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology*. 2002 Jul;109(7):1278–84.
187. Tsubota K, Toda I, Saito H, Shinozaki N, Shimazaki J. Reconstruction of the Corneal Epithelium by Limbal Allograft Transplantation for Severe Ocular Surface Disorders. *Ophthalmology*. 1995 Oct;102(10):1486–96.
188. Kwitko S, Marinho D, Barcaro S, Bocaccio F, Rymer S, Fernandes S, et al. Allograft Conjunctival Transplantation for Bilateral Ocular Surface Disorders. *Ophthalmology*. 1995 Jul;102(7):1020–5.
189. Djalilian AR, Mahesh SP, Koch CA, Nussenblatt RB, Shen D, Zhuang Z, et al. Survival of Donor Epithelial Cells after Limbal Stem Cell Transplantation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2005 Mar 1;46(3):803.
190. WILLIAMS KA, BRERETON HM, AGGARWAL R, SYKES PJ, TURNER DR, RUSS GR, et al. Use of DNA Polymorphisms and the Polymerase Chain Reaction to Examine the Survival of a Human Limbal Stem Cell Allograft. *American Journal of Ophthalmology*. 1995 Sep;120(3):342–50.

191. Paolin A, Cogliati E, Trojan D, Griffoni C, Grassetto A, Elbadawy HM, et al. Amniotic membranes in ophthalmology: long term data on transplantation outcomes. *Cell and Tissue Banking*. 2016 Mar 11;17(1):51–8.
192. Sangwan VS, Vemuganti GK, Iftexhar G, Bansal AK, Rao GN. Use of Autologous Cultured Limbal and Conjunctival Epithelium in a Patient with Severe Bilateral Ocular Surface Disease Induced by Acid Injury. *Cornea*. 2003 Jul;22(5):478–81.
193. Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Ang LPK, Koizumi N, Yokoi N, et al. Transplantation of Autologous Serum-Derived Cultivated Corneal Epithelial Equivalents for the Treatment of Severe Ocular Surface Disease. *Ophthalmology*. 2006 Oct;113(10):1765–72.
194. Utheim O, Islam R, Lyberg T, Roald B, Eidet JR, de la Paz MF, et al. Serum-Free and Xenobiotic-Free Preservation of Cultured Human Limbal Epithelial Cells. *PLOS ONE*. 2015 Mar 3;10(3):e0118517.
195. Ghoubay-Benallaoua D, Sandali O, Goldschmidt P, Borderie V. Kinetics of Expansion of Human Limbal Epithelial Progenitor Cells in Primary Culture of Explants Without Feeders. *PLoS ONE*. 2013 Dec 3;8(12):e81965.
196. Tseng SCG, Chen S-Y, Shen Y-C, Chen W-L, Hu F-R. Critical appraisal of ex vivo expansion of human limbal epithelial stem cells. *Current molecular medicine*. 2010 Dec;10(9):841–50.
197. Joseph A, Hossain P, Jham S, Jones RE, Tighe P, McIntosh RS, et al. Expression of CD34 and L-Selectin on Human Corneal Keratocytes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2003 Nov 1;44(11):4689.
198. Watanabe K, Nishida K, Yamato M, Umemoto T, Sumide T, Yamamoto K, et al. Human limbal epithelium contains side population cells expressing the ATP-binding cassette transporter ABCG2. *FEBS Letters*. 2004 May 7;565(1–3):6–10.
199. de Luca M, Pellegrini G, Green H. Regeneration of squamous epithelia from stem cells of cultured grafts. *Regenerative Medicine*. 2006 Jan;1(1):45–57.
200. di Iorio E, Barbaro V, Ruzza A, Ponzin D, Pellegrini G, de Luca M. Isoforms of Np63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005 Jul 5;102(27):9523–8.
201. Бонева Ю, Кирилова Й, Василева П. Какво можем да постигнем с лимбланите стволови клетки? *Правец*; 2016.
202. Bommert C. Therapeutic approach of the anterior ocular surface – Evaluation with in vivo confocal microscopy. [Varna]; 2021.

203. Schulze-Bonsel K, Feltgen N, Burau H, Hansen L, Bach M. Visual Acuties “Hand Motion” and “Counting Fingers” Can Be Quantified with the Freiburg Visual Acuity Test. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2006 Mar 1;47(3):1236.
204. Brown D, Chwa M, Escobar M, Kenney MC. Characterization of the major matrix degrading metalloproteinase of human corneal stroma. Evidence for an enzyme/inhibitor complex. *Experimental Eye Research*. 1991 Jan;52(1):5–16.
205. Acera A, Rocha G, Vecino E, Lema I, Durán JA. Inflammatory Markers in the Tears of Patients with Ocular Surface Disease. *Ophthalmic Research*. 2008;40(6):315–21.
206. Манолова Я. Трансплантация на амниотична мембрана - логистика, хирургически техники и микроструктурен анализ на резултатите. [Варна]; 2016.
207. Panda A, Satpathy G, Nayak N, Kumar S, Kumar A. Demographic pattern, predisposing factors and management of ulcerative keratitis: evaluation of one thousand unilateral cases at a tertiary care centre. *Clinical & Experimental Ophthalmology*. 2007 Jan;35(1):44–50.
208. Liu L, Wu J, Geng J, Yuan Z, Huang D. Geographical prevalence and risk factors for pterygium: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*. 2013 Nov;3(11):e003787.
209. Walkden A. Amniotic Membrane Transplantation in Ophthalmology: An Updated Perspective. *Clinical Ophthalmology*. 2020 Jul;Volume 14:2057–72.
210. Letko E. Amniotic Membrane Inlay and Overlay Grafting for Corneal Epithelial Defects and Stromal Ulcers. *Archives of Ophthalmology*. 2001 May 1;119(5):659.
211. Manolova Y, Stoycheva Z, Yordanov Y, Grupcheva C. Amniotic membrane transplantation - analysis of structural characteristics in amniotic membrane transplant and corneal ulcers. *Scripta Scientifica Medica*. 2017 Apr 3;49(1):12.
212. Групчев Д. КЛЕТЪЧНА И ТЪКАННА ТЕРАПИЯ НА ПРЕДНА ОЧНА ПОВЪРХНОСТ. [Варна]; 2021.
213. Сурчев Н. Влияние на предоперативните рискови фактори върху преживяемостта на роговичния трансплантат при перфоративна кератопластика. [София]; 2013.
214. Fasolo A, Pedrotti E, Passilongo M, Marchini G, Monterosso C, Zampini R, et al. Safety outcomes and long-term effectiveness of ex vivo autologous cultured limbal epithelial transplantation for limbal stem cell deficiency. *British Journal of Ophthalmology*. 2017 May;101(5):640–9.
215. Feilmeier MR, Tabin GC, Williams L, Oliva M. The use of glycerol-preserved corneas in the developing world. *Middle East African journal of ophthalmology*. 2010 Jan;17(1):38–43.

216. Lin H-C, Ong SJ, Chao A-N. Eye preservation tectonic graft using glycerol-preserved donor cornea. *Eye*. 2012 Nov 14;26(11):1446–50.
217. Newman LR, DeMill DL, Zeidenweber DA, Mayko ZM, Bauer AJ, Tran KD, et al. Preloaded Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Donor Tissue: Surgical Technique and Early Clinical Results. *Cornea*. 2018 Aug 31;37(8):981–6.
218. Wright B, Hopkinson A, Leyland M, Connon CJ. The Secretome of Alginate-Encapsulated Limbal Epithelial Stem Cells Modulates Corneal Epithelial Cell Proliferation. *PLoS ONE*. 2013 Jul 24;8(7):e70860.
219. Beni´tez-del-Castillo JM, Acosta MC, Wassfi MA, Di´az-Valle D, Gegu´ndez JA, Fernandez C, et al. Relation between Corneal Innervation with Confocal Microscopy and Corneal Sensitivity with Noncontact Esthesiometry in Patients with Dry Eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2007 Jan 1;48(1):173.
220. Lin A, Rhee MK, Akpek EK, Amescua G, Farid M, Garcia-Ferrer FJ, et al. Bacterial Keratitis Preferred Practice Pattern®. *Ophthalmology*. 2019 Jan;126(1):P1–55.
221. Fraunfelder FW. Corneal toxicity from topical ocular and systemic medications. *Cornea*. 2006 Dec;25(10):1133–8.
222. Smith VA. Doxycycline--a role in ocular surface repair. *British Journal of Ophthalmology*. 2004 May 1;88(5):619–25.
223. Harthan JS, Shorter E. Therapeutic uses of scleral contact lenses for ocular surface disease: patient selection and special considerations. *Clinical Optometry*. 2018 Jul;Volume 10:65–74.
224. Baradaran-Rafii A, Asl NS, Ebrahimi M, Jabbehdari S, Bamdad S, Roshandel D, et al. The role of amniotic membrane extract eye drop (AMEED) in in vivo cultivation of limbal stem cells. *The Ocular Surface*. 2018 Jan;16(1):146–53.
225. Sii F, Barry RJ, Abbott J, Blanch RJ, MacEwen CJ, Shah P. The UK Paediatric Ocular Trauma Study 2 (POTS2): demographics and mechanisms of injuries. *Clinical Ophthalmology*. 2018 Jan;Volume 12:105–11.
226. Стойчева З. Очни заболявания с дефицит на лимбални стволови клетки – диагностика, микроструктурен анализ и терапевтичен подход. [Варна]; 2019.
227. Lakra MD, Pathak AK, Kumari P, Murmu S. Study on Demographic Correlates of Corneal Ulcer among Patients Attending the Tertiary Care Hospital of Jharkhand. *International Journal of Contemporary Medical Research [IJCMR]*. 2020 Jul;7(7).
228. Kunimoto DY. Corneal ulceration in the elderly in Hyderabad, south India. *British Journal of Ophthalmology*. 2000 Jan 1;84(1):54–9.

229. Ehrenstein WH, Arnold-Schulz-Gahmen BE, Jaschinski W. Eye preference within the context of binocular functions. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2005 Sep 19;243(9):926–32.
230. Murray LT, McCormack J, Grobeiu I, Wiklund I, Kimel M, van Nooten F. Development of the neurotrophic keratopathy questionnaire: qualitative research. *Journal of Patient-Reported Outcomes*. 2020 Dec 4;4(1):30.
231. Qazi Y, Hurwitz S, Khan S, Jurkunas U v., Dana R, Hamrah P. Validity and Reliability of a Novel Ocular Pain Assessment Survey (OPAS) in Quantifying and Monitoring Corneal and Ocular Surface Pain. *Ophthalmology*. 2016 Jul;123(7):1458–68.
232. Roszkowska AM, Colosi P, Ferreri FMB, Galasso S. Age-Related Modifications of Corneal Sensitivity. *Ophthalmologica*. 2004;218(5):350–5.
233. Zemaitiene R. Corneal esthesiometry and sub-basal nerves morphological changes in herpes simplex virus keratitis/uveitis patients. *International Journal of Ophthalmology*. 2019 Mar 18;12(3):407–11.
234. Nassaralla BA, McLeod SD, Nassaralla João J. Effect of myopic LASIK on human corneal sensitivity1 1The authors have no financial or proprietary interest related to any methods or materials described herein. *Ophthalmology*. 2003 Mar;110(3):497–502.
235. Jamerson EC, Elhusseiny AM, ElSheikh RH, Eleiwa TK, el Sayed YM. Role of Matrix Metalloproteinase 9 in Ocular Surface Disorders. *Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice*. 2020 Mar;46(2):S57–63.
236. Barros J de N, Almeida SRA de, Lowen MS, Cunha MC da, Gomes JÁP. Impression cytology in the evaluation of ocular surface tumors: review article. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. 2015;78(2):126–32.
237. WANG I-J, LAI W-T, LIOU S-W, CHIU C-Z, HU F-R, KAO WW-Y, et al. Impression Cytology of Pterygium. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2000 Dec;16(6):519–28.
238. Le Q, Yang Y, Deng SX, Xu J. Correlation between the existence of the palisades of Vogt and limbal epithelial thickness in limbal stem cell deficiency. *Clinical & Experimental Ophthalmology*. 2017 Apr;45(3):224–31.
239. Grieve K, Ghoubay D, Georgeon C, Thouvenin O, Bouheraoua N, Paques M, et al. Three-dimensional structure of the mammalian limbal stem cell niche. *Experimental Eye Research*. 2015 Nov;140:75–84.
240. Dziasko MA, Armer HE, Levis HJ, Shortt AJ, Tuft S, Daniels JT. Localisation of Epithelial Cells Capable of Holoclone Formation In Vitro and Direct Interaction with Stromal Cells in the Native Human Limbal Crypt. *PLoS ONE*. 2014 Apr 8;9(4):e94283.

241. Kureshi AK, Dziasko M, Funderburgh JL, Daniels JT. Human corneal stromal stem cells support limbal epithelial cells cultured on RAFT tissue equivalents. *Scientific Reports*. 2015 Dec 4;5(1):16186.
242. Chen B, Mi S, Wright B, Connon CJ. Differentiation Status of Limbal Epithelial Cells Cultured on Intact and Denuded Amniotic Membrane Before and After Air-Lifting. *Tissue Engineering Part A*. 2010 Sep;16(9):2721–9.
243. Koizumi N, Rigby H, Fullwood NJ, Kawasaki S, Tanioka H, Koizumi K, et al. Comparison of intact and denuded amniotic membrane as a substrate for cell-suspension culture of human limbal epithelial cells. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2006 Nov 30;245(1):123–34.
244. Dua HS, Gomes JAP, King AJ, Maharajan VS. The amniotic membrane in ophthalmology. *Survey of Ophthalmology*. 2004 Jan;49(1):51–77.
245. KIM JS, KIM JC, NA BK, JEONG JM, SONG CY. Amniotic Membrane Patching Promotes Healing and Inhibits Proteinase Activity on Wound Healing Following Acute Corneal Alkali Burn. *Experimental Eye Research*. 2000 Mar;70(3):329–37.
246. Tseng SCG, Espana EM, Kawakita T, di Pascuale MA, Li W, He H, et al. How Does Amniotic Membrane Work? *The Ocular Surface*. 2004 Jul;2(3):177–87.
247. Stamate A-C, Tătaru CP, Zemba M. Emergency penetrating keratoplasty in corneal perforations. *Romanian journal of ophthalmology*. 62(4):253–9.
248. Yeh H-J, Yao C-L, Chen H-I, Cheng H-C, Hwang S-M. Cryopreservation of Human Limbal Stem Cells Ex Vivo Expanded on Amniotic Membrane. *Cornea*. 2008 Apr;27(3):327–33.
249. Kaufman SC, Ewel J, Yuan C. Corneal Limbal Stem Cell Cryopreservation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2011;52:5123–5123.
250. Dogru M, Katakami C, Inoue M. Tear function and ocular surface changes in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Ophthalmology*. 2001 Mar;108(3):586–92.
251. DeMill DL, Hussain M, Pop-Busui R, Shtein RM. Ocular surface disease in patients with diabetic peripheral neuropathy. *British Journal of Ophthalmology*. 2016 Jul;100(7):924–8.
252. Chang Y-S, Tai M-C, Ho C-H, Chu C-C, Wang J-J, Tseng S-H, et al. Risk of Corneal Ulcer in Patients with Diabetes Mellitus: A Retrospective Large-Scale Cohort Study. *Scientific Reports*. 2020 Dec 30;10(1):7388.
253. Horng C-T, Chou H-L, Tsai K-L, Hsiao H-Y, Lin S-Y, Huang S-F, et al. The Observation for Ocular Surface Diseases in Respiratory Care Center in One Regional Teaching Hospital in Southern Taiwan. *Life Science Journal*. 2014;11:672–9.

254. Smith GT, Deutsch GP, Cree IA, Liu CSC. Permanent corneal limbal stem cell dysfunction following radiotherapy for orbital lymphoma. *Eye*. 2000 Nov;14(6):905–7.
255. Foster CS. Corneal Manifestations of Neurologic Diseases. In: Thoft R, Smolin G, editors. *The Cornea* (Eds Thoft, RA, Smolin, G. Boston: Little, Brown and Co.; 1983. p. 315–28.
256. Mulhern MG, Aduriz-Lorenzo PM, Rawluk D, Viani L, Eustace P, Logan P. Ocular complications of acoustic neuroma surgery. *British Journal of Ophthalmology*. 1999 Dec 1;83(12):1389–92.
257. Otri AM, Fares U, Al-Aqaba MA, Dua HS. Corneal Densitometry as an Indicator of Corneal Health. *Ophthalmology*. 2012 Mar;119(3):501–8.
258. Ní Dhubhghaill S, Rozema JJ, Jongenelen S, Ruiz Hidalgo I, Zakaria N, Tassignon M-J. Normative Values for Corneal Densitometry Analysis by Scheimpflug Optical Assessment. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2014 Jan 7;55(1):162.
259. Chávez-García C, Jiménez-Corona A, Graue-Hernández EO, Zaga-Clavellina V, García-Mejía M, Jiménez-Martínez MC, et al. Ophthalmic indications of amniotic membrane transplantation in Mexico: an eight years Amniotic Membrane Bank experience. *Cell and Tissue Banking*. 2016 Jun 16;17(2):261–8.
260. Wiranata S, Eka Sutayawan IW, Budhiastra IP. The prevalence of characteristic corneal ulcer patients in sanglah general hospital, in indonesia. *World Journal of Current Medical and Pharmaceutical Research*. 2021 Aug 11;81–4.
261. Jeng BH. Epidemiology of Ulcerative Keratitis in Northern California. *Archives of Ophthalmology*. 2010 Aug 1;128(8):1022.
262. Ibrahim YW, Boase DL, Cree IA. Epidemiological characteristics, predisposing factors and microbiological profiles of infectious corneal ulcers: the Portsmouth corneal ulcer study. *British Journal of Ophthalmology*. 2009 Oct 1;93(10):1319–24.
263. Coco G, Hamill KJ, Troughton LD, Kaye SB, Romano V. Risk factors for corneal epithelial wound healing: Can sex play a role? *European Journal of Ophthalmology*. 2021 Dec 10;112067212110667.
264. LEE S-H, TSENG SCG. Amniotic Membrane Transplantation for Persistent Epithelial Defects With Ulceration. *American Journal of Ophthalmology*. 1997 Mar;123(3):303–12.
265. Azuara-Blanco A, Pillai CT, Dua HS. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *British Journal of Ophthalmology*. 1999 Apr 1;83(4):399–402.
266. Балабанов Ч, Мургова С. Пенетрираща кератопластика. Български офталмологичен преглед. 2006;(2):13–28.

267. Vale I, Trevisol RB, de Oliveira ILI, Matsuo T, Hoyama E. Epidemiological profile of corneal transplant surgeries at Londrina Eye Hospital (HOFTALON), Brazil. In: ARVO Annual Meeting Abstract . 2021. p. 970.
268. Frigo AC, Fasolo A, Capuzzo C, Fornea M, Bellucci R, Busin M, et al. Corneal Transplantation Activity Over 7 Years: Changing Trends for Indications, Patient Demographics and Surgical Techniques From the Corneal Transplant Epidemiological Study (CORTES). *Transplantation Proceedings*. 2015 Mar;47(2):528–35.
269. Matthyssen S, van den Bogerd B, Dhubhghaill SN, Koppen C, Zakaria N. Corneal regeneration: A review of stromal replacements. *Acta Biomaterialia*. 2018 Mar;69:31–41.
270. Inazaki H, Kobayashi S, Anzai Y, Satoh H, Sato S, Inoue M, et al. One-year efficacy of adjunctive use of Ripasudil, a rho-kinase inhibitor, in patients with glaucoma inadequately controlled with maximum medical therapy. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2017 Oct 15;255(10):2009–15.
271. Macsai MS, Shiloach M. Use of Topical Rho Kinase Inhibitors in the Treatment of Fuchs Dystrophy After Descemet Stripping Only. *Cornea*. 2019 May 1;38(5):529–34.
272. Litvin G, Klein I, Litvin Y, Klaiman G, Nyska A. CorNeat KPro: Ocular Implantation Study in Rabbits. *Cornea*. 2021 Sep;40(9):1165–74.
273. Chendran P, Meng Hsien Y, Wan Abdul Halim WH. Multifacet of Cornea Patch Graft in Anterior Segment Diseases. *Case Reports in Ophthalmological Medicine*. 2019 Nov 11;2019:1–5.
274. Hossain P, Siffel C, Joseph C, Meunier J, Markowitz JT, Dana R. Patient-reported burden of dry eye disease in the UK: a cross-sectional web-based survey. *BMJ Open*. 2021 Mar 4;11(3):e039209.
275. Kahook MY, Ammar DA. *In Vitro* Toxicity of Topical Ocular Prostaglandin Analogs and Preservatives on Corneal Epithelial Cells. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2010 Jun;26(3):259–63.
276. Le Q, Samson CM, Deng SX. A Case of Corneal Neovascularization Misdiagnosed as Total Limbal Stem Cell Deficiency. *Cornea*. 2018 Aug 16;37(8):1067–70.
277. Leibowitz HM. Bacterial keratitis. In: Leibowitz HM, editor. *Corneal Disorders: Clinical Diagnosis and Management*. Philadelphia: WB Saunders; 1984. p. 535.
278. Arffa R. Infectious ulcerative keratitis . In: Arffa robert C, editor. *Grayson's Diseases of the Cornea*. St. Louis: CV Mosby; 1991. p. 163–4.
279. Wilson L. Bacterial corneal ulcers. In: Duane T, editor. *Clinical Ophthalmology*. Hagerstown, MD: Harper & Row; 1976.

280. Carreno-Galeano JT, Dohlman TH, Yin J, Dana R. Limbal Stem Cell Deficiency Associated With Herpes Keratitis. *Cornea*. 2021 Aug;40(8):967–71.
281. Borroni D, Romano V, Kaye SB, Somerville T, Napoli L, Fasolo A, et al. Metagenomics in ophthalmology: current findings and future perspectives. *BMJ Open Ophthalmology*. 2019 Jun;4(1):e000248.
282. Garcia-Hirschfeld J, Lopez-Briones LG, Belmonte C. Neurotrophic Influences on Corneal Epithelial Cells. *Experimental Eye Research*. 1994 Nov;59(5):597–605.
283. Figueiredo GS, Baylis OJ, Lako M, Figueiredo FC. Prospective consecutive case series of patients with neurotrophic keratopathy (NK) associated with unilateral total limbal stem cell deficiency (LSCD) caused by severe ocular surface burns. In: *ARVO Annual Meeting Abstract*. 2018. p. 2272.
284. Sun C-C, Cheng C-Y, Chien C-S, Pang J-HS, Ku W-C, Chen PY-F, et al. Role of Matrix Metalloproteinase-9 in Ex Vivo Expansion of Human Limbal Epithelial Cells Cultured on Human Amniotic Membrane. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2005 Mar 1;46(3):808.
285. Ritter T, Donohoe E, Treacy O, Lunch K, Chen X, Fahy G, et al. Subconjunctival injection of low-dose mesenchymal stem cells promotes corneal allograft survival in a mouse cornea transplantation model. In: *ARVO Annual Meeting*. 2019. p. 4282.
286. Liang L, Luo X, Zhang J, Su W, Zhu W, Xie Y, et al. Safety and feasibility of subconjunctival injection of mesenchymal stem cells for acute severe ocular burns: A single-arm study. *The Ocular Surface*. 2021 Oct;22:103–9.
287. Jirsova K, Dudakova L, Kalasova S, Vesela V, Merjava S. The OV-TL 12/30 Clone of Anti-cytokeratin 7 Antibody as a New Marker of Corneal Conjunctivalization in Patients with Limbal Stem Cell Deficiency. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2011 Jul 29;52(8):5892.
288. Poli M, Janin H, Justin V, Auxenfans C, Burillon C, Damour O. Keratin 13 Immunostaining in Corneal Impression Cytology for the Diagnosis of Limbal Stem Cell Deficiency. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2011 Dec 9;52(13):9411.
289. Thia Z-Z, Tong L. Update on the role of impression cytology in ocular surface disease. *Taiwan Journal of Ophthalmology*. 2019;9(3):141.
290. Mehtani A, Agarwal M, Sharma S, Chaudhary S. Diagnosis of limbal stem cell deficiency based on corneal epithelial thickness measured on anterior segment optical coherence tomography. *Indian Journal of Ophthalmology*. 2017;65(11):1120.

291. Wang J, Shousha MA, Perez VL, Karp CL, Yoo SH, Shen M, et al. Ultra-High Resolution Optical Coherence Tomography for Imaging the Anterior Segment of the Eye. *Ophthalmic Surgery, Lasers and Imaging Retina*. 2011 Jul;42(4).
292. Varma S, Shanbhag SS, Donthineni PR, Mishra DK, Singh V, Basu S. High-Resolution Optical Coherence Tomography Angiography Characteristics of Limbal Stem Cell Deficiency. *Diagnostics*. 2021 Jun 21;11(6):1130.
293. Haagdoorens M, Behaegel J, Rozema J, van Gerwen V, Michiels S, Ní Dhubghaill S, et al. A method for quantifying limbal stem cell niches using OCT imaging. *British Journal of Ophthalmology*. 2017 Sep;101(9):1250–5.
294. Spadea L, di Genova L, Tonti E. Corneal stromal demarcation line after 4 protocols of corneal crosslinking in keratoconus determined with anterior segment optical coherence tomography. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*. 2018 May;44(5):596–602.
295. Chan SY, Pan CT, Feng Y. Localization of Corneal Neovascularization Using Optical Coherence Tomography Angiography. *Cornea*. 2019 Jul 19;38(7):888–95.
296. Binotti WW, Nosé RM, Koseoglu ND, Dieckmann GM, Kenyon K, Hamrah P. The utility of anterior segment optical coherence tomography angiography for the assessment of limbal stem cell deficiency. *The Ocular Surface*. 2021 Jan;19:94–103.
297. Kiritoshi S, Oie Y, Nampei K, Sato S, Morota M, Nishida K. Anterior Segment Optical Coherence Tomography Angiography in Patients Following Cultivated Oral Mucosal Epithelial Transplantation. *American Journal of Ophthalmology*. 2019 Dec;208:242–50.
298. Devarajan K, Ong HS, Lwin NC, Chua J, Schmetterer L, Mehta JS, et al. Optical Coherence Tomography Angiography Imaging to monitor Anti-VEGF treatment of Corneal Vascularization in a Rabbit Model. *Scientific Reports*. 2019 Dec 26;9(1):17576.
299. Schuerch K, Baeriswyl A, Frueh BE, Tappeiner C. Efficacy of Amniotic Membrane Transplantation for the Treatment of Corneal Ulcers. *Cornea*. 2020 Apr 7;39(4):479–83.
300. Fernandez-Buenaga R, Aiello F, Zaher SS, Gixti A, Ahmad S. Twenty years of limbal epithelial therapy: an update on managing limbal stem cell deficiency. *BMJ Open Ophthalmology*. 2018 Aug 10;3(1):e000164.
301. Baylis O, Figueiredo F, Henein C, Lako M, Ahmad S. 13 years of cultured limbal epithelial cell therapy: A review of the outcomes. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2011 Apr;112(4):993–1002.
302. Osei-Bempong C, Henein C, Ahmad S. Culture conditions for primary human limbal epithelial cells. *Regenerative medicine*. 2009 May;4(3):461–70.

303. Nieto-Nicolau N, Martínez-Conesa EM, Velasco-García AM, Aloy-Reverté C, Vilarrodona A, Casaroli-Marano RP. Xenofree generation of limbal stem cells for ocular surface advanced cell therapy. *Stem Cell Research & Therapy*. 2019 Dec 4;10(1):374.
304. di Iorio E, Ferrari S, Fasolo A, Böhm E, Ponzin D, Barbaro V. Techniques for Culture and Assessment of Limbal stem Cell Grafts. *The Ocular Surface*. 2010 Jul;8(3):146–53.
305. González S, Chen L, Deng SX. Comparative Study of Xenobiotic-Free Media for the Cultivation of Human Limbal Epithelial Stem/Progenitor Cells. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2017 Apr;23(4):219–27.
306. Sangwan VS, Basu S, Vemuganti GK, Sejpal K, Subramaniam S v., Bandyopadhyay S, et al. Clinical outcomes of xeno-free autologous cultivated limbal epithelial transplantation: a 10-year study. *British Journal of Ophthalmology*. 2011 Nov 1;95(11):1525–9.
307. Shortt AJ, Bunce C, Levis HJ, Blows P, Doré CJ, Vernon A, et al. Three-Year Outcomes of Cultured Limbal Epithelial Allografts in Aniridia and Stevens-Johnson Syndrome Evaluated Using the Clinical Outcome Assessment in Surgical Trials Assessment Tool. *Stem Cells Translational Medicine*. 2014 Feb 1;3(2):265–75.
308. Chakraborty A, Dutta J, Das S, Datta H. Comparison of ex vivo cultivated human limbal epithelial stem cell viability and proliferation on different substrates. *International Ophthalmology*. 2013 Dec 26;33(6):665–70.
309. Liu W, Merrett K, Griffith M, Fagerholm P, Dravida S, Heyne B, et al. Recombinant human collagen for tissue engineered corneal substitutes. *Biomaterials*. 2008 Mar;29(9):1147–58.
310. Rama P, Matuska S, Paganoni G, Spinelli A, de Luca M, Pellegrini G. Limbal Stem-Cell Therapy and Long-Term Corneal Regeneration. *New England Journal of Medicine*. 2010 Jul 8;363(2):147–55.
311. Dohan Ehrenfest DM, Pinto NR, Pereda A, Jiménez P, Corso M del, Kang B-S, et al. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets*. 2018 Feb 17;29(2):171–84.
312. Vazirani J, Basu S, Kenia H, Ali MH, Kacham S, Mariappan I, et al. Unilateral Partial Limbal Stem Cell Deficiency: Contralateral Versus Ipsilateral Autologous Cultivated Limbal Epithelial Transplantation. *American Journal of Ophthalmology*. 2014 Mar;157(3):584-590.e2.
313. Sharpe JR, Daya SM, Dimitriadi M, Martin R, James SE. Survival of Cultured Allogeneic Limbal Epithelial Cells Following Corneal Repair. *Tissue Engineering*. 2007 Jan;13(1):123–32.

314. Behaegel J, Consejo A, Wouters K, Koppen C, de Cock J, Ní Dhubhghaill S. Development and Validation of an Open-Source Grading Tool for Outcome Assessment in Limbal Stem Cell Treatment. *Cornea*. 2020 Jun;39(6):787–92.
315. Behaegel J, Tassignon M-J, Lagali N, Consejo A, Koppen C, Ní Dhubhghaill S. Outcomes of Human Leukocyte Antigen–Matched Allogeneic Cultivated Limbal Epithelial Transplantation in Aniridia-Associated Keratopathy—A Single-Center Retrospective Analysis. *Cornea*. 2022 Jan;41(1):69–77.
316. Roux LN, Petit I, Domart R, Concordet J-P, Qu J, Zhou H, et al. Modeling of Aniridia-Related Keratopathy by CRISPR/Cas9 Genome Editing of Human Limbal Epithelial Cells and Rescue by Recombinant PAX6 Protein. *Stem Cells*. 2018 Sep 1;36(9):1421–9.
317. Mavilio F, Pellegrini G, Ferrari S, di Nunzio F, di Iorio E, Recchia A, et al. Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. *Nature Medicine*. 2006 Dec 19;12(12):1397–402.
318. Eslani M, Baradaran-Rafii A, Ahmad S. Cultivated Limbal and Oral Mucosal Epithelial Transplantation. *Seminars in Ophthalmology*. 2012 Jul 11;27(3–4):80–93.
319. Sareen D, Saghizadeh M, Ornelas L, Winkler MA, Narwani K, Sahabian A, et al. Differentiation of Human Limbal-Derived Induced Pluripotent Stem Cells Into Limbal-Like Epithelium. *Stem Cells Translational Medicine*. 2014 Sep 1;3(9):1002–12.
320. Ahmad S, Stewart R, Yung S, Kolli S, Armstrong L, Stojkovic M, et al. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Corneal Epithelial-Like Cells by In Vitro Replication of the Corneal Epithelial Stem Cell Niche. *Stem Cells*. 2007 May 1;25(5):1145–55.
321. Sangwan VS, Basu S, MacNeil S, Balasubramanian D. Simple limbal epithelial transplantation (SLET): a novel surgical technique for the treatment of unilateral limbal stem cell deficiency. *British Journal of Ophthalmology*. 2012 Jul;96(7):931–4.
322. Jackson CJ, Myklebust Ernø IT, Ringstad H, Tønseth KA, Dartt DA, Utheim TP. Simple limbal epithelial transplantation: Current status and future perspectives. *Stem Cells Translational Medicine*. 2020 Mar 1;9(3):316–27.
323. Hirst LW, Lee GA. Corneoscleral transplantation for end stage corneal disease. *British Journal of Ophthalmology*. 1998 Nov 1;82(11):1276–9.
324. Paufique L, Philips S. Acute Eye Lesions treated by Lamellar Corneal Grafting. *British Journal of Ophthalmology*. 1950 Dec 1;34(12):746–8.
325. Chen W, Lin Y, Zhang X, Wang L, Liu M, Liu J, et al. Comparison of Fresh Corneal Tissue versus Glycerin-Cryopreserved Corneal Tissue in Deep Anterior Lamellar Keratoplasty. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2010 Feb 1;51(2):775.

326. Ke L, Shen D, Wang H, Qiao C, Zeng Q. Lamellar Keratoplasty Combined with Amniotic Membrane Transplantation for the Treatment of Corneal Perforations: A Clinical and In Vivo Confocal Microscopy Study. *BioMed Research International*. 2020 Feb 28;2020:1–8.
327. Bhandari V, Ganesh S, Brar S, Pandey R. Application of the SMILE-Derived Glued Lenticule Patch Graft in Microperforations and Partial-Thickness Corneal Defects. *Cornea*. 2016 Mar;35(3):408–12.
328. Carmichael TR, Gelfand Y, Welsh NH. Topical steroids in the treatment of central and paracentral corneal ulcers. *British Journal of Ophthalmology*. 1990 Sep 1;74(9):528–31.
329. Osei-Bempong C, Ghareeb AE, Lako M, Figueiredo FC, Armitage WJ. Defining the optimal cryoprotectant and concentration for cryopreservation of limbal stem cells. *Cryobiology*. 2018 Oct;84:98–102.
330. Baker KS, Anderson SC, Romanowski EG, Thoft RA, SundarRaj N. Trigeminal ganglion neurons affect corneal epithelial phenotype. Influence on type VII collagen expression in vitro. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1993 Jan;34(1):137–44.
331. Müller LJ, Marfurt CF, Kruse F, Tervo TMT. Corneal nerves: structure, contents and function. *Experimental Eye Research*. 2003 May;76(5):521–42.
332. Rosenberg ME, Tervo TMT, Müller LJ, Moilanen JAO, Vesaluoma MH. In Vivo Confocal Microscopy After Herpes Keratitis. *Cornea*. 2002 Apr;21(3):265–9.
333. Sosa AB, Epstein SP, Asbell PA. Evaluation of Toxicity of Commercial Ophthalmic Fluoroquinolone Antibiotics as Assessed on Immortalized Corneal and Conjunctival Epithelial Cells. *Cornea*. 2008 Sep;27(8):930–4.
334. Yagci A, Bozkurt B, Egrilmez S, Palamar M, Ozturk BT, Pekel H. Topical Anesthetic Abuse Keratopathy: A Commonly Overlooked Health Care Problem. *Cornea*. 2011 May;30(5):571–5.
335. Pires RTF, Chokshi A, Tseng SCG. Amniotic Membrane Transplantation or Conjunctival Limbal Autograft for Limbal Stem Cell Deficiency Induced by 5-fluorouracil in Glaucoma Surgeries. *Cornea*. 2000 May;19(3):284–7.
336. Sun Y, Yung M, Huang L, Tseng C, Deng SX. Limbal Stem Cell Deficiency After Glaucoma Surgery. *Cornea*. 2020 May;39(5):566–72.
337. Uchino Y, Goto E, Takano Y, Dogru M, Shinozaki N, Shimmura S, et al. Long-standing Bullous Keratopathy Is Associated with Peripheral Conjunctivalization and Limbal Deficiency. *Ophthalmology*. 2006 Jul;113(7):1098–101.

338. Sharma N, Mohanty S, Jhanji V, Vajpayee RB. Amniotic membrane transplantation with or without autologous cultivated limbal stem cell transplantation for the management of partial limbal stem cell deficiency. *Clinical Ophthalmology*. 2018 Oct;Volume 12:2103–6.
339. Borderie VM, Ghoubay D, Georgeon C, Borderie M, Sousa C, Legendre A, et al. Long-Term Results of Cultured Limbal Stem Cell Versus Limbal Tissue Transplantation in Stage III Limbal Deficiency. *Stem Cells Translational Medicine*. 2019 Dec 1;8(12):1230–41.
340. Machowicz-Matejko E, Rakowska E, Zagórski Z. [Results of tectonic epikeratoplasty in the management of corneal perforations]. *Klinika oczna*. 2010;112(10–12):296–300.
341. Paufigue L. Indications for the Therapeutic Lamellar Corneal Graft. *American Journal of Ophthalmology*. 1950 Mar;33(3):24–5.
342. Smith GTH, Brown NAP, Shun-Shin GA. Light scatter from the central human cornea. *Eye*. 1990 Jul;4(4):584–8.
343. Wegener A, Laser-Junga H. Photography of the anterior eye segment according to Scheimpflug's principle: options and limitations - a review. *Clinical & Experimental Ophthalmology*. 2009 Jan;37(1):144–54.
344. Elflein HM, Hofherr T, Berisha-Ramadani F, Weyer V, Lampe C, Beck M, et al. Measuring corneal clouding in patients suffering from mucopolysaccharidosis with the Pentacam densitometry programme. *British Journal of Ophthalmology*. 2013 Jul;97(7):829–33.
345. Gutiérrez R, Lopez I, Villa-Collar C, González-Méijome JM. Corneal Transparency After Cross-linking for Keratoconus: 1-Year Follow-up. *Journal of Refractive Surgery*. 2012 Nov;28(11):781–6.
346. Takacs AI, Mihaltz K, Nagy ZZ. Corneal Density with the Pentacam After Photorefractive Keratectomy. *Journal of Refractive Surgery*. 2011 Apr;27(4):269–77.