

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО ОФТАЛМОЛОГИЯ

Д-Р РОЗАЛИЯ ХРИСТОВА ДИМИТРОВА

**ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ НА ЛИМБАЛНАТА
СТВОЛОВОКЛЕТЪЧНА ИНСУФИЦИЕНЦИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД
ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН
„ДОКТОР“

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

СОФИЯ, 2022

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО ОФТАЛМОЛОГИЯ

Д-Р РОЗАЛИЯ ХРИСТОВА ДИМИТРОВА

АВТОРЕФЕРАТ

НА 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

на тема

ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ НА ЛИМБАЛНАТА СТВОЛОВОКЛЕТЪЧНА ИНСУФИЦИЕНЦИЯ

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

СОФИЯ, 2022

Дисертационният труд съдържа 168 стандартни машинописни страници. За неговото онагледяване са използвани 40 таблици и 47 фигури. Библиографската справка обхваща 346 източника, от които 6 на кирилица и 340 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита от Катедрения съвет на Катедра по Офталмология при Медицински университет – София, проведен на 11.01.2022г.

Публичната защита на дисертационната работа ще се проведе на 14.04.2022г. отч. в, ул. „Св. Георги Софийски“ № 1, гр. София, при спазване на противоепидемичните мерки.

Публичната защита ще бъде проведена дистанционно, в случай че епидемичната обстановка не позволява присъствено провеждане.

Научни жури в състав:

1. Доц. д-р Александър Хуго Оскар, дм
2. Доц. д-р Станислава Костова Иванова, дм
3. Проф. д-р Лъчезар Георгиев Войнов, дм
4. Проф. д-р Зорница Иванова Златарова-Ангелова, дмн
5. Доц. д-р Атанас Димитров Калайджиев, дм

Резервни членове:

1. Проф. д-р Мариета Иванова Конарева-Костянева, дм
2. Доц. д-р Галина Георгиева Димитрова, дм

Материалите по защитата са на разположение в отдел „Наука“ на Медицински факултет към Медицински университет – София.

Забележка: Номерата на фигурите и таблиците в автореферата не съответстват на номерата в дисертационния труд.

Авторът изказва дълбока признателност към семейството си за подкрепата и търпението!

Благодарност и дълбоко уважение към научните ръководители и всички колеги от Клиника по очни болести, Клиника по Обща и клинична патология и Клиника по Клинична имунология на УМБАЛ „Александровска“ и тъканна банка Биорегенерация, с които чрез мултидисциплинарен подход реализирахме трансплантациите на лимбални стволови клетки.

Съдържание

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ.....	9
ВЪВЕДЕНИЕ.....	11
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
3.5. 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
3.10. Корнео-склерален бутон.....	65
3.11. Постоперативен период.....	66
3.12. Софтуер за стандартизирана оценка на предно-сегментни изображения (VaH) (VaH).....	66
3.13. Статистически анализ.....	67
РЕЗУЛТАТИ	
1. Резултати по Задача 1.....	69
2. Резултати по Задача 2.....	78
3. Резултати по Задача 3.....	94
4. Резултати по Задача 4.....	103
5. Резултати по Задача 5.....	104
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

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

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
ЦП – цикатризиращ пемфигоид

AS-OCT – anterior segment optical coherence tomography
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
IVC(C)M – in vivo (corneal) confocal microscopy
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
SSCE – Sequential sectoral conjunctival epitheliectomy
TGF- β – transforming growth factor- β
TNF – tumor necrosis factor
VaHI – Vascularization, Haze, and Integrity
VEGF – vascular endothelial growth factor

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 и 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.

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 $59.26 \pm 18.07SD$. 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

Критерии за включване в групата с трансплантация на амниотична мембрана/ екс виво размножени лимбални стволови клетки/ корнео-склерален бутон:

- Възраст над 18г. и под 90г.
- Проведено лечение с трансплантация на амниотична мембрана/ екс виво размножени лимбални стволови клетки/ 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 слъзи

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.¹.

3.2.Фотодокументация чрез биомикроскоп

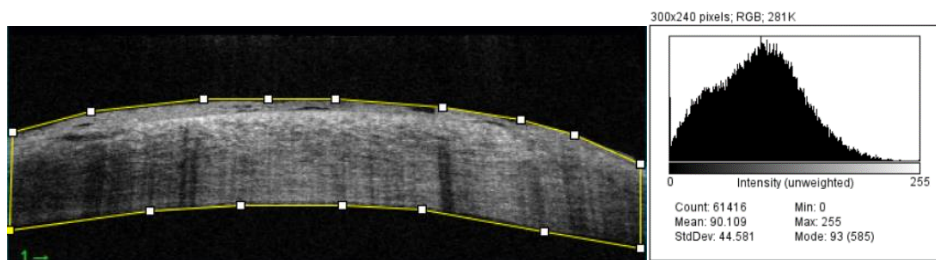
За анализ на фиброваскуларната тъкан в роговицата бе използван биомикроскоп с възможност за заснемане на изображения с добър фокус на получените изображения. Използвана бе директна илюминация с максимална ширина на светлинния източник.

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 Line бе използван за предоперативна оценка на лимбалната морфология и определяне мястото на лимбалната биопсия.

3.4.Компютърна програма ImageJ

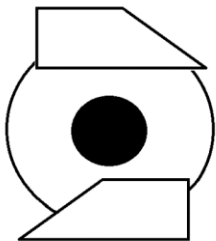
За обработка на получените изображения бе използвана програмата ImageJ v.1.53e. След задаване на мащаб, базиран на хоризонталния роговичен диаметър, зоната на фиброваскуларна цикатрициална тъкан бе маркирана и автоматично изчислена от програмата. След маркиране на роговицата в цяла дебелина на радиалния ОСТ скан от автоматично изчислената хистограма се отбеляза средната стойност на зоната по сивата скала. Сравнени бяха средните стойности на сивата скала в хоризонталния меридиан преди и след лечение.



Фигура 1. 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 2. Техника на приложение на филтърната хартия, използвана за получаване на проби за импресионна цитология.

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 Цитокolor 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 Естеziометрия

Обективната роговична сетивност бе оценена чрез Cochet-Bonnet естеziометрия. 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 естеziометъра 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^{2,3}. Все още няма данни за динамиката в ензима при лимбална стволочклетъчна инсуфициенция. Тестът бе проведен съгласно инструкциите на производителя.

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. 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. 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. Мембраната бе фиксирана с прекъснат шев 10/0 за роговичната повърхност в областта на лимба.

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 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 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. 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 експлантът 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 3. Схематично представяне на системата за култивиране на лимбални епителни стволови клетки (ЛЕСК).

Базираните на DMEM/НАМ 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. 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.

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 стволови 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. Всеки от трите елемента е разделен на степени от 1 до 3. 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.

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 .

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 ($p=0.519$).



Фигура 4. 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 ($p=0.215$) и левкома ($p=0.558$). В групите с булозна кератопатия и птериgium не бе възможно да се извърши статистически анализ, поради малкия брой пациенти.

1.2. Разпределение по етиология

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. Нашите резултати се различават по честота на индикациите от тези на други разработки в България⁴, 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.

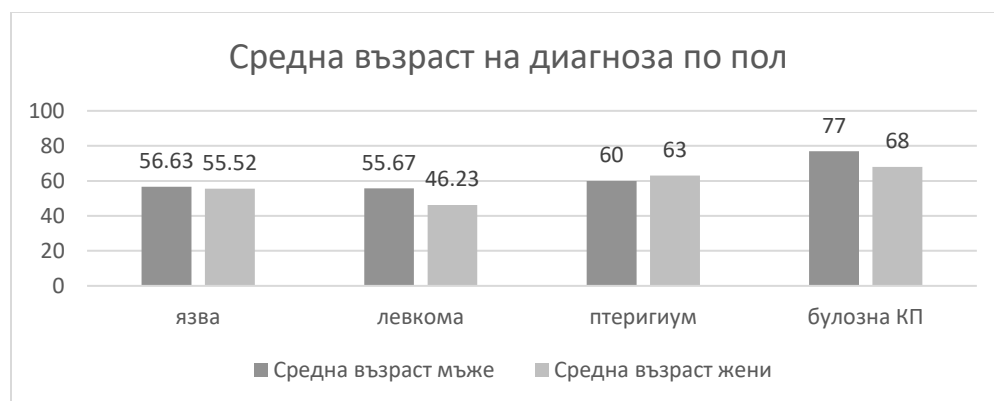


Фигура 5. Разпределение на пациентите според диагнозите в МКБ 10.

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. 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 жени⁵. 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. Анализът на данните не демонстрира статистическа значимост на тази разлика.

Възрастова група (диагноза-язва)		Мъже	Жени	Общо	p
21-40	N	10	3	13	
	%	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 1. Сравнителен анализ половото разпределение във възрастовите групи при пациенти с язва на роговицата.



Фигура 6. Средна възраст на мъжете и жените според диагнозата.

1.3. Разпределение според вида на трансплантираната тъкан

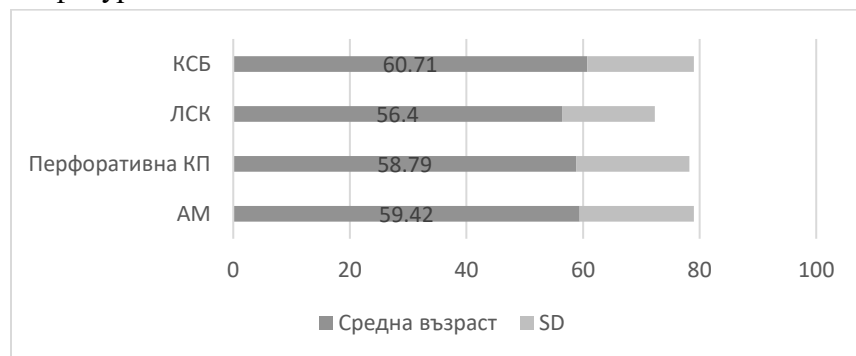
За изследвания период в Клиника по Очни болести, УМБАЛ Александровска са били извършени 14 роговични трансплантации, 59 трансплантации на амниотична мембрана, 15 трансплантации на екс виво размножени стволони клетки и 7 трансплантации на корнеосклерален бутон. В 20 (21,1%) от случаите се е наложила ретрансплантация. 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 2. Разпределение на трансплантираната тъкан според етиологичната причина.

Най-често използваната тъкан бе 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 проучвания⁶. 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 7. Средна възраст на пациентите според вида на трансплантираната тъкан – КСБ – корнеосклерален бутон, ЛСК – лимбални стволови клетки, КП – кератопластика, АМ – амниотична мембрана, SD – стандартно отклонение

Средната възраст на пациентите, при които е проведена трансплантация на амниотична мембрана, както и разпределението по пол, бяха сходни с публикации на други автори^{7,8}. В други публикации се откриват разлики, като по-ниска средна възраст и по-голям брой на пациентите от женски пол⁹. При пациентите с трансплантация на роговица резултатите от настоящото проучване също потвърждават предходни данни за възраст и полово разпределение¹⁰. За пациентите, при които е извършена трансплантация на лимбални стволови клетки Боммерт и сътр.¹¹ 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 литература¹² 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^{13,14} се коментира използване на този тип материали за перфоративна или тектонична кератопластика, а не като биологично покритие. 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 кератопластика¹⁰. 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 повсеметсно разпространена. Групчев⁹ след преглед на въпросници за тенденциите на трансплантацията в България установяват, че едва 2% от извършените трансплантации са ламеларни. 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“.

2. РЕЗУЛТАТИ ПО ЗАДАЧА 2

Да се проследят проспективно 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 Б. От топикалните антибиотици бяха използвани широкоспектърни препарати от групата на хинолоните, аミノгликозиди. Изполвани бяха Гентамицин и Дексаметазон за субконюнктивно приложение. Научните данни сочат, че Гентамицинът е ефективен в 95% от инфекциозните кератити¹⁵.

2.1. Демографски характеристики

Средната възраст на пациентите 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 3. Разпределение по пол и средна възраст на пациентите със суспектна лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция.

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 инсуфициенция¹⁶, 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 разлики¹⁷ 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 око¹⁸. 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 възпаления¹⁹. От особено значение са пациентите с невротрофична кератопатия, при които по данни на други автори женският пол е по-често засегнат.

2.2. Анамнеза

Оценката на всеки пациент (n=48) със суспектна лимбална створоклетъчна 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 живота²⁰, 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 натоварването 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 нарушенията на толеранса към изкуствено климатизирани помещения.

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

Таблица 4. 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 5. 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 стволовоклетъчна 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 подобрението

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.

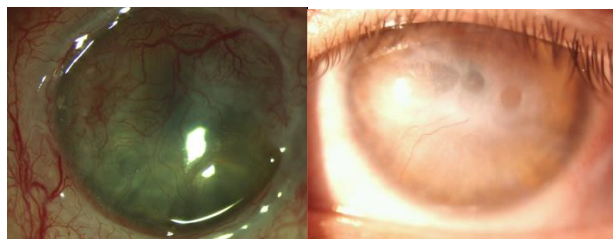
2.4. Биомикроскопия

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 8. Графичен вид на разпределение по групи на пациентите с неоваскуларизация.

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

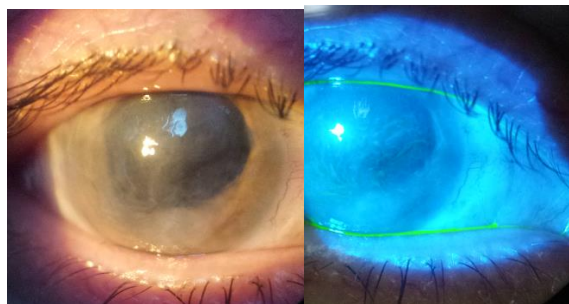


Фигура 9. Пациент със смесена повърхностна и дълбока неоваскуларизация (ляво).

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 23²¹.



Фигура 10. Вортикозна кератопатия при пациент след множество хирургични интервенции в областта на лимба.

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 suspectна 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. Естезиометрия

Средната естезиометрия преди лечение бе 126.88 ± 73.47 , а след $77.12 \pm 58.239 \text{ mg/S}$. Непараметричният анализ чрез Wilcoxon signed rank test показва, че подобрението в сетивността е статистически значимо ($p < 0.001$). Въпреки това при 5 от пациентите не се установи подобрене в сетивността.

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 6. Корелационен анализ на Spearman за връзка между възрастта и стойностите на естезиометрията.		
години	Естезиометрия преди	Естезиометрия 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 влакна²². Zemaitiene и сътр.²³ откриват, че херпетичната вирусна инфекция води до значително намаление на сетивността и неврните 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 месеца²⁴. 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

Само при две от пробите за възпаление на очната повърхност 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 витректомия²⁵). Високите нива на MMP-9 се асоциират със сухо око, възпаление на очната повърхност и роговичната неоваскуларизация. Това потвърждава наличието на множество механизми²⁶, по които се увреждат лимбалните стволони клетки, като в някои случаи възпалителната компонента може да бъде превъзможната и въпреки това увреждането на лимбалните стволони клетки да персистира.

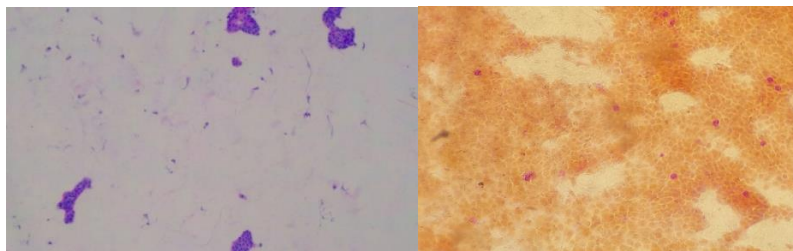
2.8. Импресионна цитология

Изследвани бяха 49 проби на пациенти със суспектна лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция. Извършена бе дескриптивна статистика. Наличие на ПАС+ 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	%
ПАС	37	75,5
Възпалителни клетки	37	75,5
ПАС+Възпалителни клетки	29	59,2
Кератинизация	19	38,8
Дисплазия	6	12,2

Инклузии	3	6,1
Базални	10	20,4

Таблица 7. Показатели от импресионната цитология.



Фигура 11. Импресионна цитология. Ляво. Острови от конюнктивен епител сред роговичните плоски епителни клетки. Дясно. Кератинизация с PAS+ 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 25 дясно).

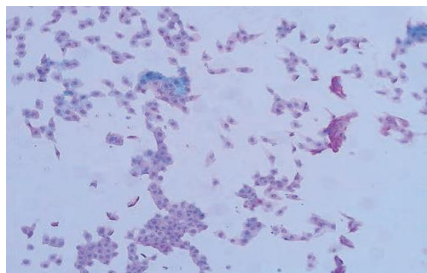
При трима от пациентите бяха наблюдавани интрацитоплазмни включвания, характерни за активна херпетична инфекция. Това представлява интерес и като диагностичен показател за активна херпетична инфекция, потвърдена при трима от пациентите чрез PCR.



Фигура 12. Интрацитоплазмни 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. 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.

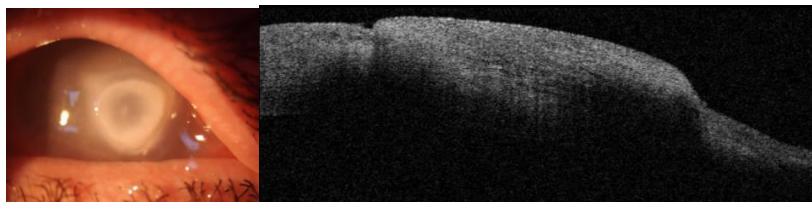
Стандартните хистологични препарати, маркирани с Цитокolor и Папенхайм демонстрираха по-често хипоцелуларитет, типична находка за многослоен плосък невроговяващ епител (Фигура 31). Наблюдавани бяха единични цилиндрични клетки. Клетъчната морфология при възпалителна реакция позволяваше определяне на клетките като лимфоцити или неутрофили.



Фигура 13. Импресионна цитология чрез стандартни цитологични техники при пациент с невротрофична кератопатия след прекаран херпес зостер (Cytocolor, x100).

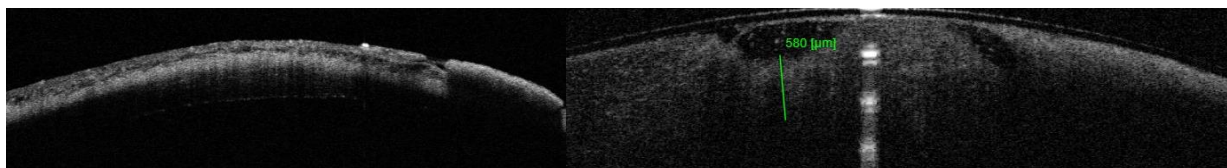
2.9. Оптична кохерентна томография

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. Наблюдавана бе стромална хиперрефлексивност при всички пациенти в различна дълбочина. При двама от пациентите се наблюдаваха плътни конфлуирани зони на стромална хиперрефлексивност, корелиращи с липоидна дегенерация (Фигура 14).



Фигура 14. Липоидна дегенерация след тежка роговична инфекция. Ляво: Плътен белезникав инфилтрат с надигнати ръбове и тенденция за опрозряване в центъра на лезията. Дясно: Оптична кохерентна томография на преден сегмент, демонстрираща надигната зона на стромална хиперрефлексивност със засенчване на дълбоките слоеве.

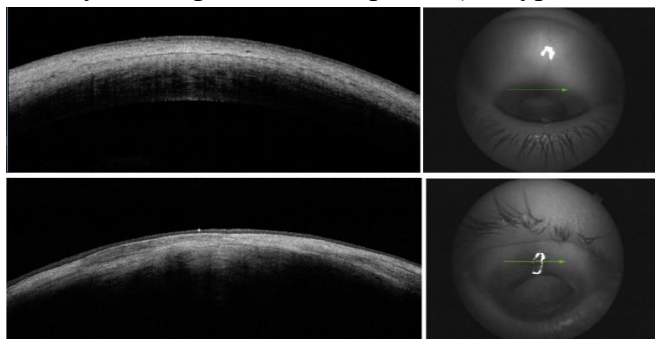
Оток бе установен при 12 пациенти, а стромално изтъняване при 29. При 8 пациенти не се наблюдава изменение в роговичната дебелина. При четирима пациенти се наблюдаваха зони на десцеметоцеле и при двама перфорация в цяла дебелина. При двама пациенти се откриха кистични изменения в предните отдели на стромата.



Фигура 15. Кистични изменения в стромата при двама от пациентите.

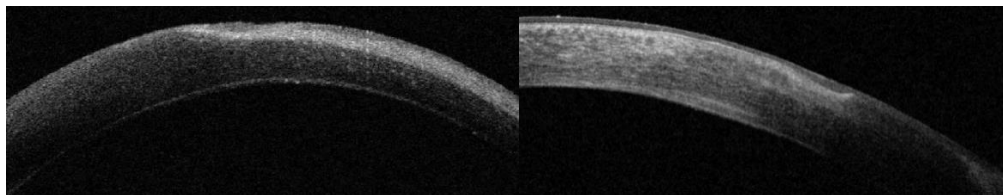
Оптичната кохерентна томография демонстрира частично изменен контур на палисадите²⁷ в 39 очи (Фигура 16, горе). Промените се изразяваха в изтъняване на лимбалния епител и

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 16, долу).



Фигура 16. 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 17. Формиране на демаркационна линия в стромата след лечение.

3. РЕЗУЛТАТИ ПО ЗАДАЧА 3

Да се изготви и оцени протокол за получаване, транспортиране, екс vivo 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 екс vivo размножаване на лимбални епителни стволови клетки. Първият бе изготвен на базата на описана в литературата методика, включваща класически хранителни среди (Dulbecco's

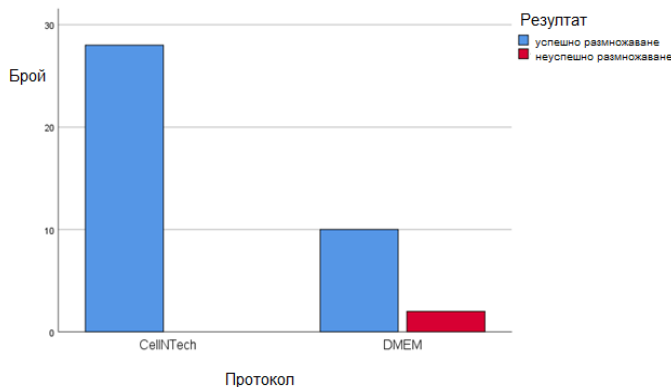
Modified Eagle Medium - DMEM/HAMF12), различни растежни фактори (Epidermal growth factor - EGF) и телешки серум²⁸.

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.

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.



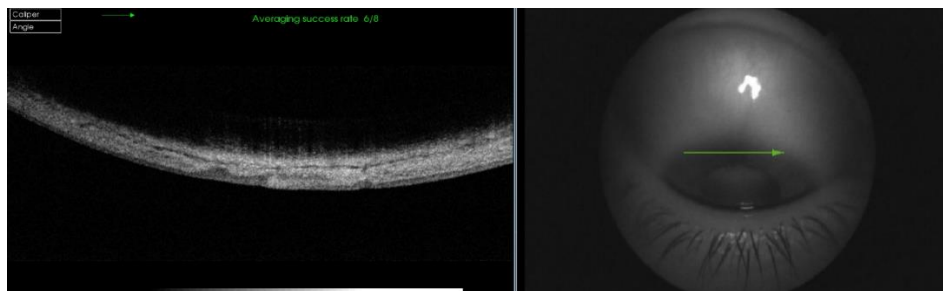
Фигура 18. Графично представяне на резултатите от сравнителния анализ на двата протокола за екс виво размножаване на лимбални стволови клетки.

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 ДМЕМ 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. В случаите на заличен контур на палисадите бе проведена биопсия на контралатералното око в областта на 12 часа ($n=3$). Направи дисекция на конюнктивния епител и роговицата с дебелина около 100 микрона (Фигура 40).



Фигура 19. 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 клетки²⁹. Клетъчните култури с едновременно съдържание на лимбални стволови клетки и стромални роговични стволови клетки (corneal stromal stem cells) елиминират нуждата от хранещи слоеве с животински произход и поддържат пролиферативните възможности на епителните клетки³⁰.

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 експлантите съдържащи лимбалните стволови клетки бяха транспортирани до тъканна банка. След поставянето на експлантите в системата за фиксиране на преносителя клетките бяха размножени в съответствие с препоръките за Добра Медицинска и Производствена 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.

Клетките бяха размножени в продължение на 14 дни в инкубатор при температура 37°C с 5% CO₂ и подходяща влажност. 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).



Фигура 20. Инвертирана фазовокотрастна 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

Проведена бе трансплантация на 15 екс виво размножени аутоложни 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 8. Демографски характеристики на пациентите, при които бе проведено лечение с трансплантация на екс виво размножени лимбални стволови клетки.

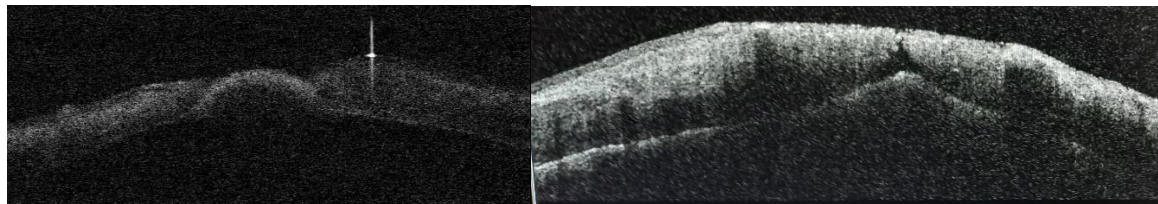
3.4. Техника на трансплантация на корнеосклерален бутон

В случаите на рогочина 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 9. Демографски характеристики на пациентите, при които бе проведено лечение с трансплантация на корнеосклерален бутон.

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 аталамия. Преценката за състоянието на предната камера бе трудно, поради намалената роговична прозрачност, но иридокорнеалният контакт се визуализира на ОСТ.



Фигура 21. ОСТ при пациенти преди трансплантация на КСБ. Ляво. Пациент с десцеметоцеле, при който бе проведено биологично покритие с корнеосклерален бутон. Дясно. Иридокорнеален контакт на пациент преди трансплантация на корнеосклерален бутон.

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 транспланти³¹. От друга страна използвайки целият донорен материал се обхваща и лимба със съдържащите се в него стволови 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 превръзка. След първата седмица поставянето на медикамента постепенно бе намалено по схема до пълното спиране на първия месец. За целия период пациентите поставяха и лубрикант. 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 фиброваскуларна 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. Между първия и шестия месец при двама от пациентите бе проведена перфоративна кератопластика, която доведе до подобрене 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 бти месец ($p < 0.001$). 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. Т-тест за зависими данни демонстрира сигнификантна редукция в неоваскуларизацията ($p < 0.001$), степента на роговични мътнини ($p < 0.001$) и обективното състояние на епитела ($p < 0.001$).

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 ($p = 0.027$).

4. 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 замразяване³². Сравнението между първично замразяване на експланти и замразяване на експандирани клетки демонстрира сходни резултати, като първоначално размножените клетки демонстрират 88% виталност на 1 месец³³.

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.

5. 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 ($p=0.766$). Точният тест на Фишър не показва статистически значима разлика в половото разпределение между групите ($p=0.133$).

Анамнестичните данни на пациентите, преминали лечение чрез трансплантация на лимбални стволни 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 стволни 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 стволни клетки бяха с три и повече придружаващи заболявания.

Брой придружаващи заболявания		ЛСК	КСБ	АМ	Общо	р
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%	

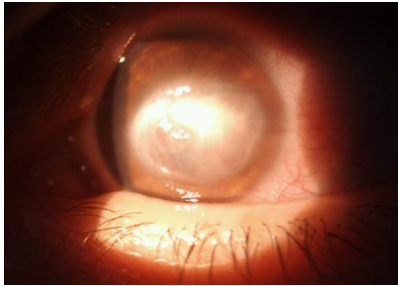
Таблица 10. Сравнителен анализ на групите по брой придружаващи заболявания.

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^{34,35}. Chang и сътр.³⁶ откриват статистически значима по-голяма честота на роговичните язви при пациенти с диабет, като рискът за язва е 1.31 пъти повече.

Двама от пациентите в групата с трансплантация на лимбални стволни клетки и двама от пациентите с трансплантация на корнео-склерален бутон бяха диагностицирани с исхемичен мозъчен инсулт и бяха лекувани в отделение за интензивни грижи³⁷. При изследването на очната повърхност на пациенти, подлежащи на интензивни грижи, Ногг 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. В групата с лимбална стволноклетъчна 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.



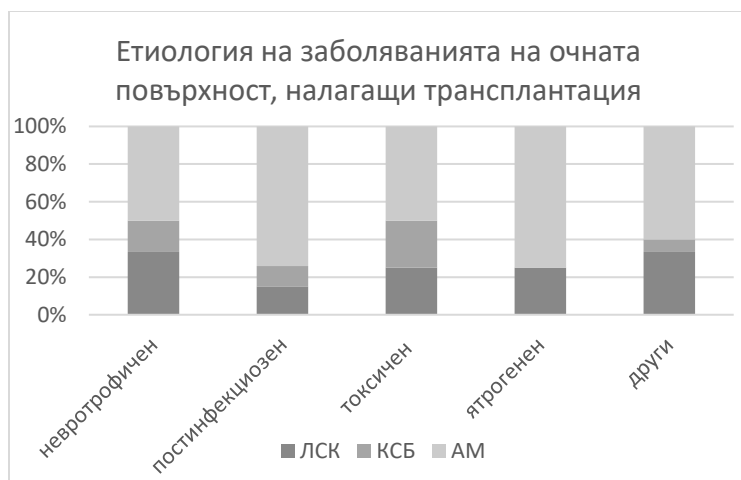
Фигура 22. Пациент с роговична язва след лъчетерапия за назофарингелаен карцином.

В контролната група бе включен пациент с лагофталм и невротрофична кератопатия, следствие от оперативно лечение за акустичен неврином. Mulhern и сътр.³⁸ 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%).

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 стволови 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.



Фигура 23. Етиология на заболяванията на очната повърхност, поради които е проведена трансплантация на лимбални стволови 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 стволови 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 стволови 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 11. 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	ЛСК	15	0,140	0,089	0,147	0,000	0,492	0,045

постоперативната зрителна острота на шести месец (делта)	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 12. 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 13. 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
Предоперативна фиброваскуларна тъкан	КЛЕТ	15	38,765	46,045	17,334	7,622	60,351	<0,001
	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 14. 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 15. 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 16. 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 39). 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 17. 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
	КЛЕТ	15	60,619	56,874	22,268	37,897	130,465	0,143

ОСТ денситометрия преди лечение	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 18. 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 еквивалентни лимбални стволови клетки. Нашето предположение бе, че секретираниите 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 денситометрията³⁹.

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. 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^{4,40}. 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.

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.

Български автори също докладват за по-висока честота на язвата при мъже⁴, както сочат и световни научни публикации⁴¹. 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 мъже⁴²). 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 лещи⁴³, то в държави с по-голям дял на земеделското основен рисков фактор е травмата.

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 екипи⁷.

В световната литература¹² 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. 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.

Данни за трансплантация на корнеосклерален бутон от български източници не бяха открити. В международни източници данните също са ограничени¹³, 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^{4,44,45}. 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^{10,46}.

По отношение на трансплантацията на роговица етиологията включва язва (n=4), булозна каратопатия (n=4), левкома (n=4) и кератоконус (n=2). Подобни са данните от световната литература, при които основни индикации са кератоконус и булозна каратопатия^{47,48}.

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 Групчев⁹). 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. Развитието на тъканното инженерство предоставя технологии за създаване на 3D принтирани ламеларни трансплантати, 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-линкинг⁴⁹. Други научни екипи се фокусират върху възможността за еквиво размножаване на ендотелни клетки, в резултат на което е въведен и нов медикамент за лечение на глаукома⁵⁰, който в последствие намира приложение и при нова ендотелна процедура – Descemet stripping only⁵¹.

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 KPro⁵², 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/енуклеация¹⁴. 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^{53,54}. 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.

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.⁵⁵ за побавна епителизация при жени може да обясни изравняването на половете в настоящия труд. Преобладаване на унилатералната инсуфициенция е съобщено и от други автори¹⁶, 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 живота²⁰, за да се обобщят данните за субективната симптоматика. Резултатите показаха статистически значимо подобрение във всички изследвани показатели след лечение. Макар че основният фокус на специалистите е провеждане на лечение за възстановяване на нормални зрителна функция и анатомичен интегритет, субективното подобрение на пациентите не бива да се подценява. Подобрението на толеранса към работа с електронни монитори, четене, употреба на телефон, както и към посещение на събития преодолява 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 консервантите⁵⁶, 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 подобрение в зрителната острота, макар при 8 пациенти да не бе отчетена разлика.

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 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. Това подчертава затруднената диагноза на лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция въз основа само на клинични данни. През 2018г.⁵⁷ е докладван клиничен случай на пациент, предвиден за трансплантация на ЛСК, поради тотална лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция. Проведената конфокална ин vivo микроскопия установява, че в три квадранта лимбалният епител е с нормална морфология, което води до диагнозата частична инсуфициенция със съвсем различен терапевтичен подход.

Систематичният подход в диагностиката на пациентите със суспектна лимбална стволовоклетъчна 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 кератит⁵⁸⁻⁶⁰. 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. 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 стволовоклетъчна инсуфициенция⁶¹ в рамките на т.нар. метахерпес, 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 повърхност⁶². 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 стволовоклетъчна 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 цяло⁶³, а и в стволовоклетъчната 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 стволовоклетъчна инсуфициенция⁶⁴. Подобренето 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 ин виво микроскопия. Увредените нервни окончания губят проводимостта си и способността да отделят невротрансмитери, което се свързва с хипестезия. Benítez-del-Castillo и сътр.⁵⁴ 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.

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.

Матриксната металлопротеиназа 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 трансформираща растежен фактор бета, nuclear factor kappa light-chain enhancer of activated B cells (NF-kB) и други. Матриксната металлопротеиназа 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 кератоцитите²⁶. Интересно е, че за размножаване на култури от лимбални стволови клетки е необходима MMP-9, която се открива във водещите клетки по ръба на експанзията⁶⁵. 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 аквйтиране/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 модел⁶⁶. Проучване върху пациенти с тежки изгаряния на очната повърхност демонстрират, че субконюнктивното приложение на костномозъчни мезенхимни стволови клетки е безопасна и ефективна терапия⁶⁷.

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 проучвания⁶⁸, 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 5АС и цитокератини 7 и 13^{69,70} 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+⁷¹.

Ролята на оптичната кохерентна томография на преден очен сегмент бе потвърдена в настоящото проучване. 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. Вапауан и сътр.⁷² 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.⁷³ установяват, че и двете стойности намаляват при пациенти с дефицит на лимбалните стволони клетки, но в тяхното проучване диагнозата е поставена на база само на клинични белези, без корелация с импресионна цитология или конфокална *in vivo* микроскопия. Епителната дебелина може да варира при множество състояния (например роговични дистрофии) и не може да се счита за патогномоничен белег.

Формирането на демаркационна линия след трансплантацията, наблюдавано при 29 пациенти, е сходно с промените наблюдавани при пациенти след крослинкинг. Възможно е след провеждане на лечение, особено след трансплантация на амниотична мембрана или лимбални стволони клетки да настъпва спонтанен крослинкинг, който да възпрепятства прогресията на стромално изтъняване както и да подлежи на ремоделиране с подобрение в оптичната плътност⁷⁴.

Всички пациенти със заболявания на очната повърхност трябва да бъдат изследвани чрез OCT, 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 OCT технологията е приложението на OCT 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 трансплантат⁷⁵ както и корелация между калибъра на неосъдовете и тежестта на засягане⁷⁶⁻⁷⁸, съответно зрителната острота. Това би позволило да се проследи влиянието

на лечението и необходимостта от приложение на анти-VEGF⁷⁸ или нови антиангиогенни медикаменти.

Според глобалния консенсус²¹ диагнозата на лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция се базира на клиничната картина, импресионна цитология, ОСТ на преден сегмент и конфокална *in vivo* 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.

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 терапевтичният подход.

ЗАДАЧА 3

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-Johnson⁷⁹. 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.⁸⁰, 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 фибробласти⁸¹. 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 имуногенност⁸². С прогреса на биоинженерството растежните фактори могат да се произвеждат по безопасна техника без

добавяне на животински продукти, т.нар. xenofree 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 протоколи⁸³. 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.⁸⁴ 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 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 продукти⁸⁵.

Успехът от трансплантацията на *ex vivo* размножени лимбални стволови клетки, установен в настоящото проучване е сходен с докладите на други учени⁸⁶. 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-нисък⁸⁷. Това важи и за всички пациенти, при които се използват алогенни лимбални стволови клетки. Трансплантацията на алогенни стволови клетки изисква и системна имunosупресия, изборът на медикаменти и продължителност на която също варира значително.

Амниотичната мембрана бе избрана за преносител на *ex vivo* 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 интактна⁸⁸, а други – при дезепителизирана⁸⁹, като са докладвани разлики в профила на пролиферация и диференциация на получените клетъчни култури. Чен и сътр. откриват по-голям процент на диференциация при клутивиране върху интактната АМ и т.нар. air-lifting техника.

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 страна⁹⁰ 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^{85,91} 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 клетки⁶. Адаптирането на втори протективен слой (amniotic membrane patching) инхибира протеиназната активност и осигурява антиинфламаторен и антиангиогенен ефект⁹²⁻⁹⁴. По този начин се забавя разграждането на амниона, преносител на стволовите клетки и се подпомага интегрирането им към тъканите на реципиента. Успех от процедурата при представените пациенти бе отчетен както по отношение на обективните признаци, така и по субективното подобрение в качеството на живот на пациентите.

Вазирани и сътр. не откриват разлика в екс виво 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 екс виво 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^{95,96}.

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.⁹⁷ Подобен метод е Clinical Outcome Assessment in Surgical Trials of Limbal stem cell deficiency (COASTL)⁸⁷, 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 трансплантация на екс виво размножени лимбални стволови клетки при лимбална стволочклетъчна инсуфициенция – Vascularization, Haze, and Integrity (VaHI) потвърждават заключенията на други автори⁹⁸.

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. Алтернативни източници на стволови клетки могат да бъдат орална мукоза (cultivated oral mucosal epithelial transplantation – COMET⁹⁹), индуцирани плурипотентни стволови клетки¹⁰⁰, ембрионални стволови клетки¹⁰¹, стволови клетки от мастна тъкан¹⁰² и други. Общо за повечето от тях предимство е, че могат да бъдат с автоложен произход, което да предотврати нуждата от системна имуносупресивна 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.¹⁰³ през 2012 и предствалява провеждане на лимбална биопсия, която в последствие се инцизира на по-малки 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 трансплантация на конюнктивно-лимбален автографт по отношение на епителизацията и зрителната острота¹⁰⁴. 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.

След трансплантация на корнеосклерален бутон като покритие критериите за успех бяха частично изпълнени при 85.71%, което съответства на резултатите от публикации на други автори¹⁰⁵. 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 десцеметоцеле¹⁰⁶. В повечето публикации КСБ се използват или за покритие на малки

дефекти¹⁴, или за класическа перфоративна кератопластика, когато реципиентното ложе е повече от 1 mm в диаметър. Използвайки целият донорен материал се обхваща и лимба със съдържащите се в него стволови клетки, което замества алогенната кератолимбална трансплантация. Chen и сътр. намират отговора на въпроса налични ли са витални клетки в пресните и презервираните донорни КСБ¹⁰⁷, 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). Нови насоки в развитието на техниката са използването на резидуални материали след ламеларна кератопластика (например DMEK, DSAEK) или след рефрактивна хирургия (например SMILE¹⁰⁸). 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 стволови клетки позволява възстановяване на очната повърхност в различни етапи от развитието на заболяването. 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 експланти³³ и след това се пристъпва към размножаване, докато в повечето първоначално размножаване на ЛЕСК и последващо замразяване³². Предимството на втория метод е, че се скъсява времето за трансплантация, което съвпада с времето за размразяване на готовите клетъчни култури.

В настоящото проучване получените 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 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, които често са с животински произход и биха могли да окажат влияние върху постоперативните резултати. Оптималните криопротектори все още са обект на изучаване¹⁰⁹.

ЗАДАЧА 5

Извършеното сравнение на придружаващите заболявания на пациентите, при които бяха проведени трансплантация на корнеосклерален бутон или екс виво размножени лимбални стволони клетки потвърди данните от други автори в България за по-висока коморбидност в тази група ¹¹. От значение са артериална хипертония, неинсулинозависим захарен диабет, инсулт и мозъчно-съдова болест, злокачествени новообразувания в областта на главата. Най-голям брой придружаващи заболявания се откри при пациентите, преминали трансплантация на лимбални епителни стволони клетки, а най-малък – при пациентите, при които бе проведена трансплантация на АМ. 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 стволонклетъчна 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, рефлукторно сълъзене и редуцирана роговична сетивност. Нарушенията в роговичната инервация след хирургични интервенции в областта на главата също могат да нарушат рефлукторните процеси, а ирадиацията доказано води до лимбална стволонклетъчна инсуфициенция ^{110,111}. Тежките придружаващи заболявания биха могли да оказват негативно влияние върху стволонклетъчната популация в лимба.

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 ¹¹². 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. 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 доказа продължително поставяне на топикален анестетик. Макар данните от български автори да са ограничени, Уагси и сътр. ¹¹³ 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.

Към дегенеративните състояния на очната повърхност причислихме пациентите с булозна кератопатия. Хроничната булозна кератопатия може да доведе до лимбална стволонклетъчна инсуфициенция, поради рецидивиращите ерозии, които също изискват постоянно мобилизиране на лимбалните резерви за епителизация ¹¹⁴. 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.¹¹⁶ 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 резултатирезултати 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 ЗО, 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^{53,54}, 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. 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^{106,117}.

Методът, който използвахме за определяне на роговичната рефлексивност се базира на обработка на изображения с програмата ImageJ и наподобява Scheimpflug

денситометрията. 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^{39,118-120}). 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.¹²¹ 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 стволовоклетъчна 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 стволовоклетъчна 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 стволовклетъчна инсуфициенция. При всеки отделен случай се налага индивидуализиран подход при избора на трансплантационна техника в зависимост от необходимостта за корекция на съпътстваща лимбална стволовклетъчна инсуфициенция.
2. Лимбалната стволовклетъчна 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 стволовклетъчна 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 подобрение 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 стволовклетъчна 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 стволовоклетъчна инсуфициенция
- 2.3. Чрез методи за стандартизирана оценка (VaHI) се потвърди подобрието в състоянието на очната повърхност след трансплантацията 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 трансплантацията на корнеосклерален бутон като покритие
- 3.3. Създаден бе алгоритъм за диагностика на лимбалната стволовоклетъчна 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 стволовоклетъчна инсуфициенция
- 3.5. За първи път се направи количествена и качествена оценка на фиброваскуларната тъкан след трансплантацията 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 ех vivo размножени лимбални стволови клетки, *Български Офталмологичен Преглед*, 2017, 2, 30-38 – Награда Проф. Ст. Дъбов
- 1.3. Христова, Р., Танев, И. Лимбална стволовоклетъчна 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 стволовоклетъчна 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 стволовоклетъчна 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 нервнен 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 върпосник 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 ($p<0.001$).

Заключение

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, редуция 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 редуция 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.