

СТАНОВИЩЕ

от доц. д-р Яна Манолова Манолова, д.м, вътрешен член на научното жури,
назначена със Заповед на Ректора на МУ-Варна № Р-109-172/20.05.2019г.

относно

дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен
„Доктор“ по научна специалност „Офталмология“, шифър 03.01.36

на тема

**„ОЧНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ С ДЕФИЦИТ НА ЛИМБАЛНИ СТВОЛОВИ
КЛЕТКИ – ДИАГНОСТИКА, МИКРОСТРУКТУРЕН АНАЛИЗ И
ТЕРАПЕВТИЧЕН ПОДХОД.“**

Кратки биографични данни

Д-р Зарка Стойчева е завършила ГПЧЕ „Екзарх Йосиф“, гр. Разград с отличен успех. През 2013г. завършва медицина в Медицински университет гр. Варна. Придобива специалност по очни болести през 2018г. За периода от 2013 - 2019г. д-р Стойчева се оформи като добър специалист със задълбочени познания и умения. Прави впечатление като отговорен към задълженията си лекар, следящ новостите в офталмологията. От 2019г. работи в СБОБАЛ – Варна.

Професионалното и израстване е свързано с посещение на редица конгреси и курсове.

Актуалност на проблема

Лимбът е деликатна, анатомичната зона, мястото на локализация на стволови клетки, участващи в нормалните процеси на реепителизация на роговицата. Различни патологични състояния могат да увредят тази сензитивна тъкан и да доведат до инсуфициенция на лимбалните стволови клетки. С напредване на новите диагностични и технологични възможности и методики, все повече проучвания се правят във връзка с правилното познаване на функцията на лимбалните клетки и заболяванията свързани с техния дефицит. Въпреки това информацията относно демографските характеристики на пациентите с дефицит на лимбални стволови клетки и описанието на основните причини, които могат да доведат до това патологично състояние продължават да са оскъдни. Детайлно им изучаване и анализа на корнео-склералния лимб в норма и при различни патологични състояния е важна стъпка в познанията ни. Навременната диагностика при пациенти с дефицит на лимбални стволови клетки е важна за определяне на правилния терапевтичен подход. Ненавременното и неадекватно менажиране може да доведе до трайно намаляване на зрителната острота и необратими последици свързани с качеството на живот на тези пациенти. В тази връзка авторът е направил задълбочено проучване на литературните данни, оценка на характеристиките на корнеосклералната зона в норма и патология, описание на етиологията на състояния свързани с дефицит на лимбални стволови клетки, както и оценка на субективна симптоматика и обективни признаци при пациенти преминали лечение в СБОБАЛ Варна.

Структура на научния труд

Представеният дисертационен труд притежава обем и структура, отговарящи на приетите стандарти за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“. Той е развит на 208 стандартни страници и е онагледен с 17 таблици и 79 фигури. Библиографската справка включва 358 литературни източника, от които 8 на кирилица и 350 на латиница.

Литературният обзор е изчерпателен и разглежда детайлно анатомията и физиологията на лимбалната зона, различните патологични състояния, които могат да доведат до дефицит на лимбални стволови клетки, методите за диагностика и различните терапевтични подходи актуални към момента.

Цел

Целта на дисертацията е ясно и точно формулирана – на базата на проведения задълбочен литературен обзор да се извърши подробен микроструктурен анализ на състояния свързани с недостатъчност на лимбални стволови клетки и да се направи оценка на клиничната ефективност от приложените терапевтични подходи.

За постигането на тази цел дисертантката си е поставила 6 конкретни задачи, с които прави пълен анализ на резултатите и проведеното лечение :

1. Да се извърши обзор на публикациите в литературата и оценка на съвременните диагностичните подходи при състояния с дефицит на лимбални стволови клетки и терапевтичен подход.

2. Да се направи оценка на етиологията на заболяванията, характеризиращи се с недостатъчност на лимбални стволови клетки при пациенти преминали лечение в СБОБАЛ Варна.

3. Да се направи микроструктурен анализ на зоната на лимба при пациенти с дефицит на лимбални стволови клетки с помощта на *in vivo*

конфокална микрокопия (Heidelberg Rerina Tomograph II Rostock Cornea Module (HRT II-RCM) и предно-сегментна оптична кохерентна томография (RTVue-100; Optovue INC).

4. Да се сравнят резултатите от ефективността на проведеното лечение.

5. Да се оцени субективната симптоматика и зрителна функция при пациенти с дефицит на лимбални стволови клетки преди и след проведено лечение.

6. Да се създаде рисков профил на пациентите с дефицит на лимбални стволови клетки.

Материали и методи

Проучването е проведено в Катедра по очни болести и зрителни науки на Медицински университет – Варна за период от 2 години (от 04.2016 г. до 06.2018 г.) и неговите бази. Всички изследвани пациенти са лекувани в Специализирана болница по Очни болести за активно лечение – град Варна. В проучването са включени общо 109 очи на 104 индивида разделени в две групи. Група I обхваща 64 пациента с дефицит на лимбални стволови клетки. Група II (норма) обхваща 40 индивида. Представени са различни критерии за включване и изключване от проучването, които се базират на различни демографски, диагностични и етиологични фактори.

Методика на проучването

1. Документален метод – посочени са конкретно типовете публикации свързани с литературния обзор

2. Клинични методи:

- a. Определяне на най-добре коригираната зрителна острота с помощта на автоматичен тест проектор;
- b. Оценка на субективните признаци болка, фотофобия, зачервяване, сълзене – на база въпросник;
- c. Биомикроскопия на предна очна повърхност и оценка на състоянието на структурите. Определяне на признаците разделящи различните състояния на лека, умерена, тежка и средна степен на промени вследствие загуба на лимбални стволони клетки. За частична загуба на лимбални стволони клетки е приета леката и умерена степен, докато тоталната загуба е свързана с тежката степен.

3. Функционални изследвания:

- a. Предно-сегментна оптична кохерентна томография. За извършването на предно-сегментна оптична томография (AS-OCT) е използван Фурие-домейн оптичен кохерентен томограф (RTVue-100; Optovue Inc., Fremont, CA, USA) с дълъг адаптер за лещи за преден модул на роговицата (1.96мм сканиране в дълбочина и 8мм сканирана равнина).
 - i. За измерване дебелината на роговичния епител е използван пахиметричен режим на сканиране.
 - ii. Режим на сканиране с кръстосана линия е използван за получаването на изображения в лимбалната зона в долен, горен, назален и темпорален квадранти. При пациенти с дефицит на лимбални стволони клетки поради неясната локализация на склералната шпора са определени различни граници за отчитане, като е използван и външен софтуер за по-точна оценка.

b. In vivo конфокална микроскопия. В проучването е използван HRTII-RCM (Heidelberg Retina Tomograph II – Rostock Cornea Module, Heidelberg Engineering GmbH, Germany). Направено е качествено определяне на характеристиките на централната зона, както и в четирите квадранта в лимбалната зона. Измерена е дебелината на епитела. Извършена е и количествена оценка на базални и криловидни клетки и оценка на плътността на суббазалния нервен плексус.

4. Статистически методи

Резултати и обсъждане

За нуждите на изследването пациентите са преминали пълен офталмологичен преглед с определяне на зрителна острота. Извършена е биомикроскопия на предна очна повърхност и оценка на състоянието на структурите ѝ с помощта на предно-сегментна кохерентна томография и in vivo конфокална микроскопия. Пациентите с клинична картина отговаряща на дефицит на лимбални стволови клетки са попълнили въпросници за оценка на субективната симптоматика преди и след лечение. Терапевтичният подход е бил различен в зависимост от тежестта на лимбална инсуфициенция. В зависимост от това при някои пациенти с лека и умерена степен на дефицит на първи етап е предприето консервативно лечение с антибиотични капки и очни лубриканти без консервант, а при някои пациенти са поставени терапевтични меки контактни лещи. При част от болните са изготвени автоложни серумни капки. При пациентите при които обективната и субективна симптоматика не е повлияна с консервативно лечение, както и при пациентите с тежка степен на дефицит на лимбални стволови клетки е

извършено хирургично лечение. Всички пациенти са били подробно запознати с естеството на проведените изследвания и лечение.

С напредване на възможностите, които ни дават новите технологии и диагностични методи, все повече проучвания се правят във връзка с функцията на лимбалните клетки и заболяванията свързани с техния дефицит.

Основните причини за дефицит на лимбални стволови клетки в проведеното изследване са две – очни заболявания, които включват птериgium, инфекции/кератити, синдром на сухото око, булозна кератопатия и травми.

При изследването на основните причини за дефицит на стволови клетки при пациентите с едноочно и двуочно засягане е установено, че най-честата причина за едноочното засягане са травмите, докато при пациентите с двуочно засягане най-чести причини са синдромът на сухото око, носенето на контактни лещи и наличието на ятрогенни фактори. Изследването на половия признак е показало, че няма съществена разлика между мъже и жени.

Наличието на травма е рисков за развитието на тотален дефицит на лимбални стволови клетки. В частност при пациентите с химични или термични изгаряния се установява тежката степен на дефицит на ЛСК, докато при тези с перфоративни травми – умерена степен.

Детайлизирана микроструктурна оценка на лимбалната зона е извършена с помощта на *in vivo* конфокална микроскопия и предно-сегментна оптична кохерентна томография.

Описан е вида на повърхностните конюнктивални епителни клетки при пациенти както с тотален дефицит, така и в засегнатата роговична зона при пациенти с частичен дефицит на ЛСК - хиперрефлексивни клетки със светло ядро и неясни граници. В дълбочина под конюнктивализираните роговични епителни клетки е визуализирана гъста мрежда от хиперрефлексивни

линеарни и криволинейни структури – стромален колаген. Характерните за конюнктивалната тъкан чашковидни клетки се наблюдават по анормалната роговична епителна тъкан. Те са подредени по модел на розетка – хиперрефлексивни структури с кръгла или овална форма. При един пациент с тотален дефицит на ЛСК не са открити нито конюнктивални, нито роговични епителни клетки. При част от пациентите с лек до умерен дефицит на ЛСК се наблюдават хиперрефлексивни стромални повлекла без наличието на хиперрефлексивни базални епителни клетки. При пациенти с тежка степен на лимбална инсуфициенция в лимбалната зона не са открити палисади на Vogt. Визуализирани са голямо количество дендритни клетки. Характерни са измененията в морфологията и плътността на роговичния суббазален нервен плексус при пациенти с дефицит на ЛСК. В контролната група пациенти суббазалните нерви са с прав ход, а клоновене тангенциални. Установено е, че броя на суббазалните нерви намалява значително дори при лека степен на дефицит на ЛСК. Туртуозитетът им се запазва или е леко увеличен. При пациенти с умерена и тежка степен на лимбална инсуфициенция се наблюдава увеличен туртуозитет, неправилен ход и сегментираност на нервите. Визуализират се дендритно подобни нервни фибри, които са особено често срещани при пациенти с по-тежка степен на лимбална инсуфициенция и тотална липса на нормални дълги нервни фибри. Не е изяснено напълно дали тези структури са всъщност нервни фибри или лангенхарсови клетки.

Описан е и вида на изображенията получени с предно-сегментен оптичен томограф на здрави пациенти с налични палисади на Vogt - ясно видими структури на лимба – роговичния епител, епител на палисадите, роговична строма, лимбална строма. При пациенти с дефицит на ЛСК липсва ясно разграничаване на лимбалните структури.

Направен е сравнителен анализ на дебелината на лимбалния епител в четири квадранта в контролна група и при пациентите с дефицит на ЛСК чрез предно-сегментна оптична кохерентна томография и *in vivo* конфокална микроскопия. При пациентите от контролната група е наблюдавана значително по-голяма дебелина на лимбалния епител, в сравнение с лицата с дефицит на ЛСК, като в различните участъци варира от 5,16 μm в темпорален квадрант до 11,72 μm в долен квадрант. Независимо от установената разлика и в двете групи се установи, че дебелината на лимбалния епител в назалния квадрант е най-малка, а най-голяма дебелина на лимбалния епител се отчете в долен квадрант при лицата от контролната група – 70,53 μm и горен квадрант в клиничната група – 59,68 μm . При пациентите с дефицит на ЛСК е изследвана дебелината на лимбалния епител при наличието и липсата на палисади на Vogt. Резултатите от изследването са показали статистически значима разлика както в отделните квадранти в разглежданите групи, така и между самите групи. Установено е, че при пациенти без палисади на Vogt дебелината на лимбалния епител е значително по-малка в сравнение с групата на пациентите с палисади на Vogt независимо от изследвания квадрант. С най-малка дебелина на лимбалния епител при пациентите с дефицит на ЛСК и с палисади на Vogt е епитела в темпоралния квадрант, докато при другата група изследвани лица с най-малка дебелина на лимбалния епител се откроява назалния квадрант. Най-голяма дебелина на лимбалния епител и в двете групи е горния квадрант.

Изследването на изменението на плътността на дългите нерви според степента на дефицит на ЛСК е показало, че с нарастване на дефицита на ЛСК, плътността на дългите нерви значително намалява. В проучването не е установена значима разлика в плътността на дългите нерви между пациентите с лека и умерена степен на дефицит. При сравняването на пациентите от

клиничната група с тези от контролната група е установена статистически значима разлика между лицата от контролната група и тези с лека и умерена степен на дефицит на ЛСК, където разликата е над 2 пъти, а при лицата с тежка степен на дефицит на ЛСК разликата е повече от 10 пъти.

Изследването на плътността на суббазален нервен плексус между пациентите от контролната и клиничната група е показала, че средната плътност при лицата от контролната група е повече от 2 пъти по-голяма отколкото тази на пациентите от клиничната група.

При използването на предно-сегментна оптична кохерентна томография са получени по-високи резултати при отчитането на дебелината на епитела във всички изследвани квадранти, отколкото при използването на IVCM. Това е доказало, че тези две техники за измерване на дебелината на епитела имат както своите предимства, така и своите недостатъци като се има предвид, че предно-сегментната оптична кохерентна томография е бърз, неинвазивен, безконтактен метод, докато IVCM е контактен метод, който изисква добре обучен персонал и време, и могат да бъдат взаимно допълващи се при диагностицирането на дефицита на ЛСК.

Изследването на субективната симптоматика е важна част от процеса на лечение, която се свързва с качеството на живот на пациентите. За извършване на задачата пациентите са попълнили въпросници преди и на 8-ми ден след проведеното лечение.

Приблизително една трета от извадката са провели консервативно лечение, като най-често използваните методи са очни лубриканти и комбиниране на меки терапевтични контактни лещи и очни лубриканти. При всички пациенти е проведена и топикална противовъзпалителна терапия. Отчитат се както подобрение в субективната симптоматика, така и подобрение в зрителната острота. При по-голямата част от пациентите в

изследването е проведено хирургично лечение, като най-често използваното лечение е трансплантация на амниотична мембрана.

Направена е оценка на субективното оплакване - болка. Преди лечението основната част от пациентите се оплаквали от умерена болка (43,8%), а 17,2% са посочили, че изпитват постоянна тежка болка. След проведеното лечение при по-голямата част от пациентите болката е значително намалена като преобладавали тези с постоянна лека болка (35,9%), а при пациентите, които са се оплаквали от умерена болка в началото, тя е била редуцирана до 14,1% след проведеното лечение. Втория фактор от субективната симптоматика, който показва влияние върху качеството на живот на пациентите е фотофобията. Значителната част от пациентите (61%) се оплакват от фотофобия при липса на светлина или средна осветеност. След проведеното лечение техния дял е намалял на 15.6%. Според етиологичните фактори най-висока честота на фотофобията в най-тежката група (при липса на светлина) се наблюдава при пациентите с химични/термични изгаряния (55,6%), както и при тези с травми (41,4%). При втората най-тежка група (фотофобия при средна осветеност) - при пациентите със ситемни заболявания (диабет) – 58,3%. След провеждане на терапията е установено значително подобрене на резултатите при всички пациенти, дори и при тези с фотофобия при средна осветеност или липса на светлина. При пациентите с химически изгаряния относителния дял на тези, които се оплакват от фотофобия при липса на светлина намалява 5 пъти и достига 11,1%.

От изследването на зачервяването, фактор който по-скоро е свързан с естетичния вид, преди лечението е установено, че 54,7% от пациентите се оплакват от умерено до тежко зачервяване. След лечението процентът е спаднал на 9,4%. При 59,4% зачервяване е липсвало или е било леко изъвено.

Преди лечение най-тежко е било зачервяването при пациентите с химични/термични изгаряния (44,4%) следвани от тези с травми (34,5%). При всички останали зачервяването варира от средно до умерено. След лечението при значителната част от пациентите зачервяването изчезва. По-малка е групата на пациентите с умерено и тежко зачервяване, като това са предимно пациенти с травми, химични/термични изгаряния, инфекции/кератити, булозна кератопатия и системни заболявания.

Сълзенето е последния фактор от тази група, който предизвиква значителен дискомфорт у пациентите и е свързан с влошаване качеството на живот. Това е единствения симптом който присъства при всички пациенти . Установено е също така, че този симптом е с най-висок относителен дял при пациентите в тежките групи (поява на секрет – 37,5% и гноевиден секрет – 35,5%). След лечение липса на сълзене е установено при 29,7%, а при 3,1% са персистирали оплакванията от гноевиден секрет. Преди провеждането на лечение най-висок процент на пациентите с гноевиден секрет са тези с инфекции/кератити (85,7%), следвани от пациентите с термични/химични изгаряния (61,1%) и тези с травми (51,7%). При значителната част от пациентите се наблюдава липса на този показател или има само сълзене.

Въз основа на получените резултати най-често срещаният профил на пациентите с дефицит на лимбални стволови клетки е установено, че е млад мъж с намалена зрителна острота на засегнатото око. Последиците от това заболяване в толкова млада възраст могат да доведат до прогресия на усложненията и намаляване на зрението в още по-голяма степен като в краен стадии да се стигне до тотална слепота. Именно поради тази инвалидизация, която може да последва, навременната диагноза и подходящ терапевтичен подход са от изключително значение. Последиците от настъпила патология на предна очна повърхност при лимбална инсуфициенция са тежки и много

често необратими, като в краен стадии може да се стигне до трансплантация на роговица или кератопротезиране, което значително понижава качеството на живот на тези пациенти. Данните от демографските проучвания насочват към изводът, че най-често от лимбална инсуфициенция са засегнати пациенти в активна възраст, при които обективната и субективна симптоматика и настъпилите усложнения водят до влошаване качеството на живот, което поставя заболяването в групата на важните социало-икономически заболявания.

Изводи:

На базата на проведените изследвания и анализи авторът е направил следните изводи:

1. Очните заболявания с дефицит на лимбални стволови клетки изискват извършването на прецизна диагностика и изборът на подходящ терапевтичен подход. Съвременната медицина предлага различни алтернативи в тази област.

2. Ограничен брой са проучвания в съвременната литература на лимбалната зона при заболявания водещи до дефицит на ЛСК относно комбинирано изследване на микроструктурното ниво чрез различни технологии, техният сравнителен анализ и оценка на различните терапевтични подходи и придружаващата симптоматика. Също така липсва създаден алгоритъм за диагностика и лечение според рисковия профил.

3. При проведеният анализ и направената оценка на етиологията на заболяванията характеризиращи се с недостатъчност на лимбални стволови

клетки е установено, че най-голяма е честота на пациентите с очните заболявания като птериgium, инфекции/кератити, синдром на сухото око и булозна кератопатия, следвани от състояния предизвикани вследствие на механична или химическа травма, като най-често засегнато е едното око, като в повечето случаи това е дясно око.

4. Извършеният микроструктурен анализ на зоната на лимба е показал, че резултатите от проучването не се различават съществено от тези на другите автори, като средната плътност на дългите нерви е $10,6 \text{ нерва}/\text{mm}^2$, а средната плътност на суббазалния нервен плексус е $41,4 \text{ mm}/\text{mm}^2$.

5. Не е установена съществена разлика между средния брой на базални клетки в централния роговичен епител от гледна точка на възраст и в различните квадранти на роговичния епител на лимба.

6. При извършения сравнителен анализ на дебелината на епитела между пациентите на възраст под и над 40 години чрез IVCM и AS-OCT, се установи наличието на съществена разлика в средните стойности в отделните зони, като резултатите при пациентите над 40 години са сигнификантно пониски.

7. Анализът на проведените терапевтични подходи показва, че малко повече от две трети от пациентите са претърпели хирургична намеса, като най-често е прилагано лечението чрез трансплантация на амниотична мембрана, което се откроява с по-висока ефективност по отношение на регенерирането на роговичната повърхност, ограничаване на прогреса на конюнктивизацията, развитието на персистиращи епителни дефекти и инфекции, като в повечето случаи не се налага повтаряне на процедурата.

8. Оценката на субективната симптоматика и зрителната функция при пациентите с дефицит на лимбални стволови клетки е показала, че в най-голяма степен влияние оказва болката следвана от фотофобията, които след

провеждането на лечението с трансплантация на амниотична мембрана намаляват значително, като симптоматиката е сведена до минимум.

9. Основните рискови фактори за тотален дефицит на лимбални стволови клетки са химическите изгаряния и травмите, а рискови фактори за частична загуба са ятрогенните фактори и синдрома на сухото око.

10. Според резултатите от нашето изследване най-често срещаният рисков профил с дефицит на лимбални стволови клетки е млад мъж с намалена зрителна острота на засегнатото око, при който обективната и субективна симптоматика и настъпилите усложнения водят до значително намаляване на зрението до достигането на слепота и вследствие на това влошаване на качеството на живот.

Приноси с познавателен характер

1. Направен е подробен обзор на научната литература за анатомията, етиологията, диагностиката, лечението и възможностите, които съвременната медицина предоставя при пациенти с недостиг на лимбални стволови клетки.

Приноси с научно приложен характер

1. Направен е анализ на пациентите с дефицит на лимбални стволови клетки преминали лечение в СБОБАЛ Варна.

2. Извършен е анализ на етиологията, субективната симптоматика и зрителната функция, както и микроструктурен анализ в зоната на лимба чрез съвременни методи за диагностика и ефектът от проведеното лечение.

3. Въз основа на задълбочените и всеобхватни анализи на проведените терапевтични подходи се установи, че лечението с

трансплантация на амниотична мембрана показва най-висока ефективност и ефикасност при пациентите с дефицит на лимбални стволови клетки, което значително възстановява зрителната им функция и подобрява качеството им на живот.

4. Установени са рисковите фактори, имащи отношение към частичната и тотална загуба на лимбални стволови клетки.

Приноси с практически характер

1. За първи път е направен подробен анализ и оценка на етиологията, диагностиката и лечението на пациенти с дефицит на лимбални стволови клетки.

2. Изведени са рисковите фактори свързани с частичната и тотална загуба на лимбални стволови клетки като е създаден рисков профил на пациента.

3. Установени са предимствата на лечението чрез трансплантация на амниотична мембрана като най-добрата, икономически изгодна и лесно достъпна алтернатива на съвременната офталмология за лечение на пациенти с дефицит на лимбални стволови клетки.

Публикации по темата на дисертационния труд:

С дисертационния труд са свързани 4 публикации.

1. Manolova Y., Stoycheva Z., Yordanov Y., Grupcheva Ch. Amniotic membrane transplantation - analysis of structural characteristics in amniotic membrane transplant and corneal ulcers. Scripta Scientica Medica, vol. 49, No. 1, 2017, pp. 12-20

2. Manolova Y., Stoycheva Z. Integration of amniotic membrane – clinical case. International journal of innovative trends in engineering. 2017, 28, issue 45, p.1-4

3. Стойчева З., Манолова Я., Йорданов Й., Ненчева Б. Оценка на субективната симптоматика при пациенти с дефицит на лимбални стволови клетки. Варненски медицински форум – под печат.

4. Стойчева З., Манолова Я., Йорданов Й., Ненчева Б. Рискови фактори за частична и тотална загуба на лимбални стволови клетки. Журнал на Медицински колеж – Варна – под печат.

Дисертацията на д-р Стойчева има голямо практическо значение. Стволовите клетки, скрити в лимбалната зона са били винаги обект на голям интерес. Познанията за тяхното поведение в норма и патология, правилния диагностичен и терапевтичен подход са от важно значение по пътя към създаването на съвременен поглед за поведение при пациенти с частичен или тотален лимбален дефицит. Дисертацията е една стъпка която ще даде тласък към нови проучвания в посока борба с роговичната слепота.

Всичко това, заедно с впечатленията ми от клиничната и научната работа на докторанта ми дава основание да предложа на Научното жури да гласува положително за присъждане на д-р Зарка Стойчева на научната степен „Доктор“ по специалността очни болести.

Доц.д-р Яна Манолова Манолова, д.м.



