



**Медицински университет -Варна  
„Проф. Д-р Параскев Стоянов”**

---

**Факултет „Медицина”  
Катедра „Очни болести и зрителни науки“**

**Д-р Зарка Иванова Стойчева**

**Очни заболявания с дефицит на лимбални стволови  
клетки – диагностика, микроструктурен анализ и  
терапевтичен подход**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертационен труд за присъждане  
на образователна и научна степен  
„доктор“

**Научна специалност: „Офталмология“**

**Научен ръководител:**

Проф. д-р Христина Групчева, д.м.н.

**Консултант:**

Доц. д-р Яна Манолова, д.м.

**Официални рецензенти:**

Проф. д-р Лъчезар Войнов, д.м.

проф. д-р Мариета Конарева-Костянева, д.м.

**Варна 2019 г.**

Дисертационният труд съдържа 208 стандартни страници и е онагледен с 17 таблици и 79 фигури. Литературната справка включва 358 литературни източника, от които 8 на кирилица и 350 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на катедрен съвет на Катедрата по Очни болести и зрителни науки при МУ "Проф. Д-р Параскев Стоянов" – Варна на 15.04.2019г.

Научно жури:

Проф. д-р Лъчезар Георгиев Войнов, д.м. – ВМА София

Доц. д-р Христина Николаева Видинова, д.м. – ВМА София

Проф. д-р Мариета Иванова Конарева-Костянева, д.м. – МУ Пловдив

Доц. д-р Бинна Николаева Ненчева, д.м. – МУ "Проф. Д-р Параскев Стоянов" – Варна

Доц. д-р Яна Манолова Манолова, д.м. - МУ "Проф. Д-р Параскев Стоянов" – Варна

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на 25.06.2019г. от ..... часа в.....на открито заседание на Научното жури.

## Съдържание

Увод	5
Цел и задачи	6
Материал и методи	6
Резултати и обсъждане	16
Заключение	79
Изводи	81
Приноси	82
Публикации и участия в научни конгреси, свързани с дисертационния труд	83

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

<b>AM</b>	Амниотична мембрана
<b>БС</b>	Бяла светлина
<b>ЛСК</b>	Лимбални стволови клетки
<b>ОФ</b>	Оцветяване с флуоресцеин
<b>ПОП</b>	Предна очна повърхност
<b>AS-ОСТ</b>	Предно-сегментно ОСТ
<b>СК</b>	Цитокератин
<b>CLAU</b>	Conjunctival–limbal autografting
<b>CLET</b>	Трансплантация на ex vivo размножени лимбални епителни стволови клетки
<b>CNFT</b>	Цилиарен невротрофичен фактор
<b>COMET</b>	Трансплантация на отгледан епител от орална мукоза
<b>EGF</b>	Епидермален растежен фактор
<b>FGF-β</b>	Фибробласт растежен фактор-β
<b>HLA</b>	Човешки лимфоцитарни антигени
<b>HRT II-RCM</b>	Heidelberg Rerina Tomograph II Rostock Cornea Module
<b>IGF-I</b>	Инсулиноподобен растежен фактор I
<b>IVCM</b>	In vivo лазер сканиращата конфокална микроскопия
<b>KGF</b>	Кератиноцит растежен фактор
<b>KLAL</b>	Кератолимбален алографт
<b>LASIK</b>	Лазерно асистиране инситокератомиелиза
<b>LVP</b>	Липопротеини с висока плътност
<b>LR-CLAL</b>	Конюнктивно-лимбален алографт от живи роднини
<b>MUC</b>	Муцин тип
<b>NK</b>	Natural killers (Клетки естествени убийци)
<b>ОСТ</b>	Optical coherence tomography (Оптична кохерентна томография)
<b>ОСТА</b>	ОСТ ангиография
<b>SLET</b>	Обикновена лимбална епителна трансплантация
<b>TAC</b>	Транзиторно амплифициращи се клетки
<b>UV</b>	Ултравioletови лъчи
<b>VEGF</b>	Съдово ендотелен растежен фактор

## УВОД

Зрението е едно от петте сетивни възприятия. Окоето е зрителният орган, чрез който се улавят отразени от обектите светлинни лъчи от видимия спектър на светлината. Зрителната система включва множество компоненти, които вземат участие във възприемане и анализиране на информацията от околния свят. Първата повърхност на окоето, която е в досег с околната среда, е деликатният епителният слой, който покрива предна очна повърхност. Запазването и поддържането на физиологичните особености на предна очна повърхност са от изключително значение за комфорта и зрението на пациентите. Роговичният епител е част от тази биозащитна система на окоето. Клетките са плътно подредени една към друга без междуклетъчни пространства помежду им като по този начин създават механична бариера. Роговицата е считана за „прозореца“ на окоето към света. Тя е брaдитрофна, аваскуларна, прозрачна тъкан. За да може да се осъществи зрителното възприятие, е необходимо роговицата да пропуска безпрепятствено светлинните лъчи. Вследствие на непрекъснатия контакт с околната среда роговичният епител е в постоянен процес на обновяване и регенерация. Най-повърхностно разположените клетки се отлющват и биват отмивани от слъзния филм. Те трябва да бъдат заменени от нови клетки. Това е възможно благодарение на малка популация от стволови клетки, които се намират в зоната на лимба. Лимбът е анатомичната зона, представяща границата между роговица, склера и конюнктивата. Различни патологични състояния могат да увредят тази сензитивна тъкан и да доведат до инсуфициенция на лимбалните стволови клетки. Роговичният епител не е в състояние да поддържа своята цялост. Настъпва инвазия на непрозрачен конюнктивален епител, васкуларизация, при което роговицата губи своята функция и прозрачност. Абнормният роговичен епител е нестабилен и възникват епителни дефекти. В крайните стадии може да се достигне до стромална цикатризация и перфорация. Пациентите имат силно изразени субективни оплаквания от намалено зрение, болка, сълзене, зачервяване, дискомфорт, което оказва негативно влияние върху качеството им на живот.

Необходимо е детайлно изучаване и анализ на корнео-склералния лимб в норма и при различни патологични състояния. Структурата е изключително малка и сензитивна. Навременната диагностика на дефицит на лимбални стволови клетки е важна за определяне на правилния терапевтичен подход. При ненавременна, неправилна диагностика и терапевтичен подход може да се стигне до трайна загуба на зрителна острота.

## Цел и задачи на дисертационния труд

### Цел

Основната цел на настоящия дисертационен труд е 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.

### Задачи

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.

## Материал и методи

### 1. Обект и обхват на изследването

Настоящото проучване 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.

#### **Критерии за подбора на участниците включени в изследването:**

- **Критерии за включване в Група I:**
  - Пациенти с клинична картина отговаряща на дефицит на лимбални стволови клетки;
  - Диагностични критерии, посочена в таблица 5;
  - Пациенти на възраст над 18 год.;
  - Пациенти от Североизточна България;

- **Критерии за изключване от Група I:**
  - Пациенти под 18 год.;
  - Пациенти с активна инфекция;

**Таблица. 1. Диагностични критерии за включване в изследването, базирани на етиологична диагноза за дефицит на лимбални стволови клетки**

<b><i>I. Идиопатични фактори</i></b>
<b><i>II. Травми</i></b>
▪ Химични и термични изгаряния
▪ Перфоративна травма
<b><i>III. Заболявания на очите</i></b>
▪ Птеригиум и псевдоптеригиум
▪ Инфекции/кератити
▪ Сухо око
▪ Булозна кератопатия
<b><i>IV. Ятрогенни</i></b> (необратими състояния причинени от медицинска манипулация)
▪ Очни операции
▪ Интравитреални инжекции
<b><i>V. Системни заболявания</i></b>
▪ Диабет
<b><i>VI. Други</i></b>
▪ Носене на контакти лещи
▪ Ултравioletова радиация
▪ Трансплантация на роговица

- **Критерии за включване в Група II (контролна група участници):**
  - Липса на анамнеза за системна или очна патология;
  - Липса на анамнеза за извършени очни операции;
  - Липса на анамнеза за употреба на топикални офталмологични медикаменти през последните 6 месеца;
  - Липса на анамнеза за носене на контактни лещи;
  - Най-добре коригирана зрителна острота BCVA  $\geq 1.0$
  - Пациенти над 18 години.

- **Критерии за изключване от Група II (контролна група участници):**

При всички пациенти от контролната група е изследвано дясно око.

Всички участници са подробно запознати с естеството на проучването и са подписали информирано съгласие за своето участие. Всички изследвания са проведени при едни и същи условия от един екзаминатор.

## 2. Методика на проучването

### 2.1. Документален метод

Изследване на публикуваните проучвания относно:

- типове диагностични методи;
- микроструктурен анализ на очния лимб в норма;
- микроструктурен анализ на очния лимб при състояния асоциирани с дефицит на лимбални стволови клетки;
- терапевтичните подходи, които се прилагат при пациенти с дефицит на ЛСК и данни за продължителния им успех;

### 2.2. Клинични методи:

- Определяне на най-добре коригираната зрителна острота с помощта на автоматичен тест проектор;
- Оценка на субективните признаци болка, фотофобия, зачервяване, сълзене – на база въпросник;
- Биомикроскопия на предна очна повърхност и оценка на състоянието на структурите ѝ.

С помощта на биомикроскоп се направи оценка на предна очна повърхност и структурите ѝ. По описаните от Dua и сътр. (140) изменения, които се наблюдават се направи оценка на степента на дефицит на лимбални стволови клетки. На бяла светлина за лека степен се приеха загуба на лимбалната анатомия и тънък неправилен епител без видима роговична неоваскуларизация, за умерена степен: неправилен, тънък епител, наличие на филаменти и ерозии и/или фиброваскуларен панус. При оцветяване с флуоресцеин при лека степен се наблюдава точковидно натрупване на багрилото в областта с абнормен епител, докато при умерена степен то е клиновидно или спираловидно с широката основа насочена към лимба. За тежката степен са характерни следните изменения: повърхностна и дълбока роговична васкуларизация, персистиращи епителни дефекти, фиброваскуларен панус, а в крайните стадии и цикатризация, кератинизация и калцификация.

За частична загуба на лимбални стволови клетки се приеха леката и умерена степен, докато тоталната загуба е характерна за тежката степен.

- Предно-сегментна оптична кохерентна томография;

За извършването на предно-сегментна оптична томография (AS-OCT) беше 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). Скоростта на сканиране на апарата е 26 000 А-скана в секунда. Сканиращата равнина е от 256 до 1024 точки по А-скан оста. Аксиалната резолюция е 5µm, а латералната - 15 µm. Дължината на сканиращите линии е от 2 mm до 12 mm. Апаратът разполага със суперлуминисцентен диоден източник на светлина с дължина на вълната  $\lambda = 840 \pm 10 \text{ nm}$ .



За да се измери дебелината на роговичния епител се използва пахиметричен режим на сканиране. Скановете бяха центрирани върху коаксиално фиксиран роговичен светлинен рефлекс определен от централно ярко отражение на ОСТ скана. Вграденият софтуер на AS-ОСТ (версия А6.9.0.27, Optovue, Inc.) автоматично генерира карта на дебелината на епитела. Централната дебелина на епитела обхваща зоната от централните 2mm от роговицата.

Режим на сканиране с кръстосана линия се използва, за да се получат изображения в лимбалната зона във всеки един от четирите квадранта – долен, горен, назален и темпорален. Пациентът поставя брада върху подбрадника и опира чело в приставката, след което насочва поглед в периферно разположен обект, за да се поддържа перпендикулярността на ОСТ лъча върху повърхността на изследваната тъкан. Тази перпендикулярност е от основно значение, за да се получат точни данни относно дебелината лимбалната зона.

За да се измери дебелината на лимбалната зона, е необходимо първо правилното ѝ определяне. По анатомична дефиниция преходната корнеосклерална зона е широка около 1 mm и се разпростира центрипетално от склералната шпора.

При пациенти с дефицит на лимбални стволони клетки склералната шпора не може да се идентифицира поради увеличената рефлексивност на надлежащата фиброваскуларна тъкан. При тях за предна граница на лимба се определи мястото което се намира на 5 mm от центъра на роговицата. За лимбална зона се определи 1mm част от тъкан разположена на отстояние между 5 и 6 mm от центъра на роговицата. За средна дебелина на лимбалния епител приехме средната дистанция между предната и задна повърхност на епитела. За анализ на изображенията и измерването на дебелината на лимбалния епител в тази зона се използва външен софтуер. Това позволи да се генерира стойността на дебелината мануално в определена посочена точка, докато вграденият софтуер на апарата има функцията да калкулира дебелината в две линии.

При всеки един пациент непосредствено след биомикроскопия се извърши предно-сегментна оптична томография, за да се избегнат евентуални артефакти причинени от причинени от директния контакт при изследване с *in vivo* конфокална микроскопия.

- *In vivo* конфокална микроскопия

Лазер сканиращата *in vivo* конфокална микроскопия е неинвазивно изследване, което позволява получаването на послойни изображения на микроструктурно ниво с висока резолюция както на роговицата, така и на други структури на предна очна повърхност. В настоящето проучване се използва HRTII-RCM (Heidelberg Retina Tomograph II – Rostock Cornea Module, Heidelberg Engineering GmbH, Germany). Апаратът разполага със следните технически спецификации:

- Поле на наблюдение: 15° x 15° (транзверзално)
- Дълбочина на сканиране: 1.0 до 4.0 mm (автоматично)
- Оптична резолюция: 10 µm /pixel (транзверзално)

- Повторяемост: 20  $\mu\text{m}$
- Дигитална големина на обекта: 2-D образ: 384 x 384 pixels
- 3-D образ: до 384 x 384 x 64 pixels
- Размер на файла: 30 МВ некомпесиран, 5 МВ компресиран;
- Време за сканиране: 2-D образ: 24 msec
- 3-D образ: 2mm дълбочина на скана
- Обхват на фокуса: -12 до +12 dsph -6 до +6 dcyl
- Минимален зеничен диаметър:  $\geq 1 \text{ mm}$
- Източник на светлина: Диоден лазер 670 nm
- Image alignment/artifact rejection: TruTrack™ софтуер
- Режим на представяне: Единичен кадър, Филм, 2-D, 3-D;
- Операционна система: Heidelberg Eye Explorer and Windows XP

Апаратът работи с диоден лазер с дължина на вълната 670nm, увеличение до 800 пъти и латерална резолюция 1 $\mu\text{m}$  и вертикална - 4 $\mu\text{m}$ . Непосредствено преди да се проведе изследването се поставя топикален анестетик proxymetacaine hydrochloride (Alcaine 0.5%, S.A. ALCON - COUVREUR N.V., Белгия) в долен конюнктивален сак. Еднократна стерилна PMMA аплантационна шапка (Tomo-cap) се изпълва с гел (Corneregel, Bausch & Lomb GmbH, Germany) като свързващ агент между апланационната шапка и лещата на обектива и се поставя на обектива на микроскопа. Пациентът се позиционира внимателно на подбрадника и надчелника на апарата, след което апланационната шапка се въвежда към роговицата. Позицията на окото се наблюдава с камера. На първи етап се изследва централната зона на роговицата, след което всеки един от субектите насочва поглед в периферно разположен обект, за да могат да се изследват съответно горната, долна, назална и темпорална област от лимба. Качествените образи без наличие на артефакти се селектираха внимателно, за да се извърши количествен и качествен анализ. За получаване на данни за дебелината на епитела се измери мануално дълбочината от фокусната позиция на първоначалния образ на най-повърхностните апикални клетки на епитела до последното получено изображение на базалните клетки.

За целите на количествения анализ базалните и криловидни клетки са преброени чрез вградения оригинален софтуер на микроскопа. Данните са представени като гъстота на клетките на квадратен милиметър  $\pm$  стандартното отклонение (клетки/ $\text{mm}^2 \pm \text{SD}$ ).

За анализ на суббазалния нервен плексус се взеха две изображения на ниво суббазален епителен слой на роговицата, след което бяха мануално преброени. Наличието на дендритни клетки и дендритно подобни структури бяха изключени от анализа при преброяване на гъстотата на нервите. На първи етап се преброиха наличието на всички нерви, след което дългите нерви с дължина поне от 200 $\mu\text{m}$  се анализираха. Получената стойност разделена на изследваната област даде общата средна плътност на суббазалния нервен плексус и следователно гъстотата на дългите нерви. Данните са представени като гъстота на нервите на квадратен милиметър.

Данните от предно-сегментната оптична кохерентна томография и *in vivo* конфокална микроскопия се нанасяха в създадени карти за оценка на очен лимб в норма и в карта за оценка на пациентите с очни заболявания с дефицит на лимбални стволови клетки.

### **КАРТА ЗА ОЦЕНКА НА ОЧЕН ЛИМБ В НОРМА**

#### **Демографски данни**

1. Пол  жена  мъж 2. Възраст: ..... г.

#### **3. Предно-сегментна оптична кохерентна томография**

3.1. Дебелина на епител в централната част на роговицата: .....  $\mu\text{m}$

3.2. Дебелина на лимбалния епител в:

- горен квадрант: .....  $\mu\text{m}$
- долен квадрант: .....  $\mu\text{m}$
- назален квадрант: .....  $\mu\text{m}$
- темпорален квадрант: .....  $\mu\text{m}$

#### **4. *In vivo* конфокална микроскопия**

4.1. Дебелина на епител в централната част на роговица: .....  $\mu\text{m}$

4.2. Дебелина на лимбалния епител в:

- в горен квадрант: .....  $\mu\text{m}$
- в долен квадрант: .....  $\mu\text{m}$
- в назален квадрант: .....  $\mu\text{m}$
- в темпорален квадрант: .....  $\mu\text{m}$

4.3. Средна плътност на криловидни клетки в централен роговичен епител: ..... клетки/ $\text{mm}^2$

4.4. Средна плътност на базалните клетки в централен роговичен епител: ..... клетки/ $\text{mm}^2$

4.5. Средна плътност на криловидните клетки на лимбалния епител в:

- горен квадрант: ..... клетки/ $\text{mm}^2$ ;
- долен квадрант: ..... клетки/ $\text{mm}^2$ ;

4.6. Средна плътност на базалните клетки на лимбалния епител в:

- горен квадрант: ..... клетки/ $\text{mm}^2$ ;
- долен квадрант: ..... клетки/ $\text{mm}^2$ ;

4.7. Обща средна плътност на суббазален нервен плексус: ..... нерви/ $\text{mm}^2$ .

4.8. Средна плътност на дългите нерви: ..... нерви/ $\text{mm}^2$ .

### **КАРТА ЗА ОЦЕНКА НА ПАЦИЕНТИ С ОЧНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ С ДЕФИЦИТ НА ЛИМБАЛНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ**

### Демографски данни

1. Пол  жена  мъж

2. Възраст: ..... г.

### Клинична информация

3. Диагноза на пациента:

.....

4. Засегнато око:  Дясно око  Ляво око

5. Субективна симптоматика	Преди терапия	25 ден след терапия
5.1. Болка: 0 – липсва; 1- понякога лека; 2 – постоянно лека; 3 – умерена до тежка; 4 – постоянно тежка		
5.2. Фотофобия: 0 – липсва; 1 – само при силна светлина; 2 – на дневна светлина; 3 – при средна осветеност; 4 – при липса на светлина		
5.3. Зачервяване: 0 – липсва; 1 – леко; 2 – средно; 3 – умерено; 4 – тежко		
5.4. Съзене: 0 – липсва; 1 – само съзене; 2 – понякога секрет; 3 – гноевиден секрет		

### 6. Обективна симптоматика

#### 6.1. Зрителна острога

Преди терапия: ..... 25 ден след терапия: .....

#### 6.2. Стадиране на дефицита на лимбални стволови клетки основана на клиничната находка от биомикроскопия

Лека степен  Умерена степен  Тежка степен

### 7. Предно-сегментна оптична кохерентна томография

7.1. Дебелина на лимбалния епител в горен квадрант: .....  $\mu\text{m}$

7.2. Дебелина на лимбалния епител в долен квадрант: .....  $\mu\text{m}$

7.3. Дебелина на лимбалния епител в назален квадрант: .....  $\mu\text{m}$

7.4. Дебелина на лимбалния епител в темпорален квадрант: .....  $\mu\text{m}$

### 8. *In vivo* конфокална микроскопия

8.1. Дебелина на лимбалния епител при наличие на палисади на Vogt в:

- в горен квадрант: .....  $\mu\text{m}$

- в долен квадрант: .....  $\mu\text{m}$

- в назален квадрант: .....  $\mu\text{m}$

- в темпорален квадрант: .....  $\mu\text{m}$

8.2. Дебелина на лимбалния епител без наличие на палисади на Vogt:

- в горен квадрант: .....  $\mu\text{m}$

- в долен квадрант: .....  $\mu\text{m}$

- в назален квадрант: .....  $\mu\text{m}$

- в темпорален квадрант: .....  $\mu\text{m}$

8.3. Обща средна плътност на суббазален нервен плексус (нерви/ $\text{mm}^2$ ): .....

8.4. Средна плътност на дългите нерви (нерви/ $\text{mm}^2$ )

### 9. Терапевтичен подход:

9.1. Консервативно лечение  Да  Не

9.1.1. Серумни капки  Да  Не

9.1.2. Очни лубриканти  Да  Не

9.1.3. Очни лубриканти в комбинация с терапевтични контактни лещи  
 Да  Не

9.2. Оперативно лечение  Да  Не

9.2.1. Трансплантация на амниотична мембрана  Да  Не

9.2.2. Секторна конюнктивална епителиектомия  Да  Не

9.2.3. Ексцизия на птериgium  Да  Не

### 2.3. Терапевтични методи

След подробно снета анамнеза и провеждане на стандартен офталмологичен преглед, се извършиха високоспециализираните изследвания необходими за целта на дисертационния труд – оптична кохерентна томография и *in vivo* конфокална микроскопия. На базата на данните се определи степента на дефицит на лимбални стволони клетки при всеки един от пациентите, които са включени в проучването. В зависимост от това при някои пациенти с лека и умерена степен на дефицит на първи етап се предприе консервативно лечение с антибиотични капки и очни лубриканти без консервант, а при някои пациенти се поставяха меки терапевтични контактни лещи. При част от болните се изготвиха автоложни серумни капки по описан стандартен оперативен протокол от Geerling и сътр. (301). Пациентите бяха запознати подробно с начина на съхранение и приложение на капките.

При неповлияване на обективната и субективна симптоматика при пациентите, при които е проведено консервативно лечение, както и пациентите с тежка степен на дефицит на лимбални стволони клетки, се осъществи хирургично лечение.

Проведените видове оперативно лечение са:

❖ Трансплантация на криосъхранена амниотична мембрана фиксирана върху нитроцелулозна хартия снабдена от Центъра за транслационна медицина и клетъчна терапия към Медицински Университет град Варна. Използвани са хирургичните техники описани подробно в дисертационния труд на доц. д-р Яна Манолова, д.м. „Трансплантация на амниотична мембрана – логистика, хирургични техники, микроструктурен анализ на резултатите“ към МУ-Варна от 2016г.

❖ Секторна конюнктивална епителиектомия. Техника на извършване – алгоритъм:

1. Поставя топикален анестетик proxymetacaine hydrochloride (Alcain 0.5% collyr, Alcon);
2. Оцветяване с флуоресцеин;
3. На биомикроскоп аномалния епител внимателно се отстранява с помощта на кресцент нож като при необходимост се поставя блефаростат или с помощта на асистент клепачите се поддържат отворени. Конюнктивалната тъкан прораствала върху роговицата се отстранява внимателно включително до 1mm след контактната линия между аномален и здрав от роговичния епител, а подлежащата стромална част се запазва интактна.
4. С помощта на суха абсорбираща хирургична гъба се полира деепителизираната роговична повърхност.
5. Поставя се терапевтична контактна леща

❖ Ексцизия на птеригиум – техника на извършване - алгоритъм:

1. След подготовка на оперативното поле накапване с топикален анестетик proxymetacaine hydrochloride (Alcain 0.5% collyr, Alcon);
2. Поставяне на блефаростат;
3. Поставяне на инфилтративна анестезия с lidocaine 2% (Софарма АД, България) в булбарната конюнктива в близост до птеригиума;
4. Ексцизия на конюнктивалната гънка в назалната част на роговицата до лимбалната зона с помощта на пинцет или кресцент нож;
5. С извита ножица уесткот се извършва тъпа дисекция на конюнктивата заедно с теноновата капсула до оголване на склерата до около 5-6 mm назално от роговицата (в близост до инсерцията на медиален прав мускул);
6. Цялостна резекция на птеригиума с конюнктивата и теноновата капсула;
7. Внимателно полиране на роговицата и лимбалната зона с помощта на инструмент за птеригиум със сферичен диамантен брус с диаметър 3,5 mm (Janach - J3702.20, е. Janach srl, Италия);
8. Чрез кастровеихо калипер се измерва размерът на необходимия конюнктивален графт;
9. Очната ябълка се ротира надолу, за да се достигне незасегнатата горна булбова конюнктива под горен клепач. Отбелязва се размерът конюнктива, който е необходим за трансплантацията и с помощта на извита остра уесткот ножица се отпрепарира конюнктивата внимателно като подлежащата еписклера и тенонова капсула остават интактни. Няма необходимост от поставяне на шев на донорското място;
10. Свободният конюнктивален трансплантат се зашива внимателно с прекъснат шев 10-0 найлон.

Постоперативно, в зависимост от състоянието се предписва терапия включваща следните видове топикални медикаменти: лубриканти, изкуствена сълза капки без

консервант; антибиотици, нестероидни противовъзпалителни; кортикостероиди, матрикс регенерираща терапия и други.

Постоперативния възстановителен период включва прегледи съобразени с конкретния случай – на 8-ми ден, 25-и ден, 2-ри месец, 6-ти месец. Хоспитализираните пациенти с тежко увредена предна очна повърхност се проследяват ежедневно в раките на хоспитализацията. Отстраняването на конците се извърши между 1-3 седмица, след което следва титриране на терапията.

#### 2.4. Статистически методи на изследване

При обработка на данните е използван статистическия софтуерен пакет – IBM SPSS for Windows, v.20.0.

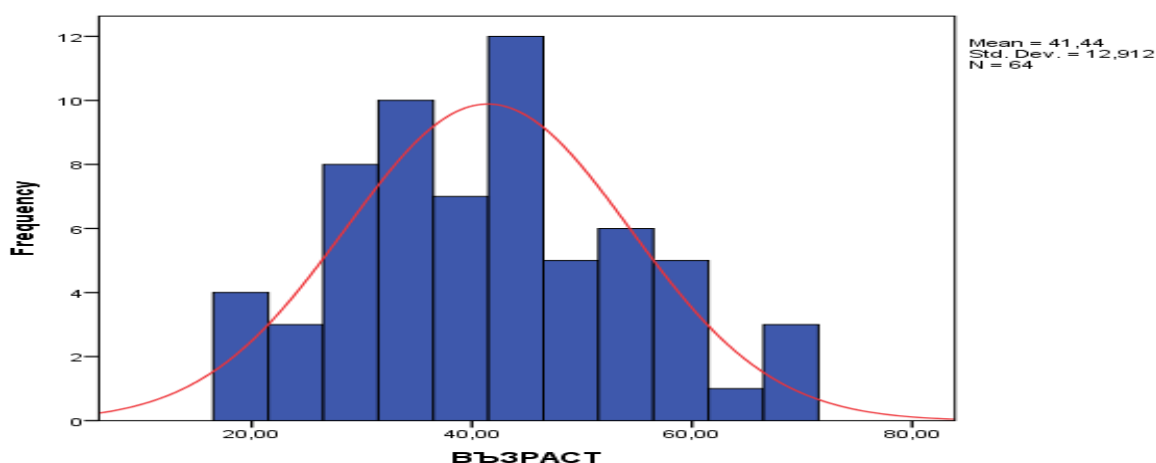
- Дисперсионен анализ (ANOVA) за оценка доколко влиянието на даден фактор е статистически значимо или не
- Вариационен анализ за изследване на количествените характеристики на показателите
- Корелационен анализ за оценка на зависимостта между изследваните показатели. Оценката на силата на зависимостта между променливите се базира на резултатите от коефициента на Пиърсън ( $r$ ) и на Спийрман ( $\rho$ ):
  - $0 < r (\rho) < 0,3$  – слаба корелация
  - $0,3 < r (\rho) < 0,5$  – умерена корелация
  - $0,5 < r (\rho) < 0,7$  – значителна корелация
  - $0,7 < r (\rho) < 0,9$  – висока корелация
  - $0,9 < r (\rho) < 1$  - много висока корелация
- Регресионен анализ за оценка на възможните функционални зависимости между изследваните показатели. Изследване на причинно-следствените връзки.
- Сравнителен анализ (оценка на хипотези) –  $\chi^2$ , t-test Student's за сравняване на количествени и качествени показатели и изследване на разликата между тях
- Графичен и табличен метод на изобразяване на получените резултати

При всички проведени анализи се приема допустимо ниво на значимост  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  при доверителен интервал 95%.

## Резултати и обсъждане

### 1. Оценка на етиологията на състоянията свързани с инсуфициенция на лимбални стволови клетки при пациенти преминали лечение в СБОБАЛ Варна

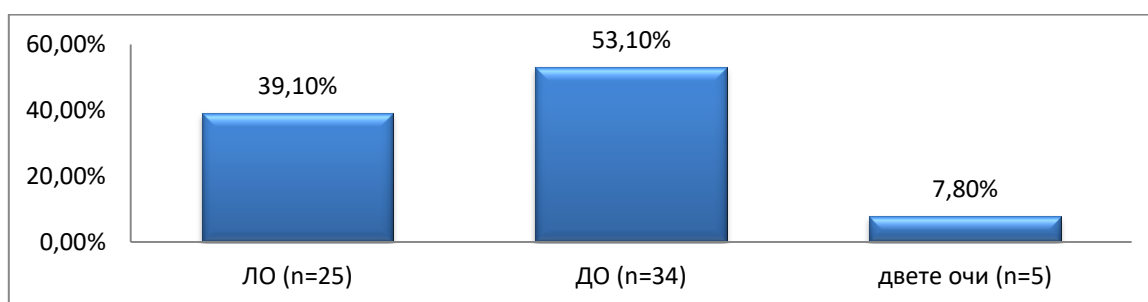
За период от две години през СБОБАЛ Варна са изследвани и проследени 64 пациента с дефицит на лимбални стволови клетки на средна възраст 41,4 г.  $\pm$  12,9 г., като минималната възраст е 19 г., а максималната 70 г. (фиг. 1.). Резултатите показват, че преобладават младите пациенти – 62,50 % на възраст до 44 г. (според класификацията на СЗО – младата възраст е в диапазона 15-44 г.).



Фиг. 1. Честота на пациентите според възрастовия показател

Изследването на половия признак показва, че няма съществена разлика между мъжете и жените (съответно 51,60 % за мъжете и 48,40 % за жените).

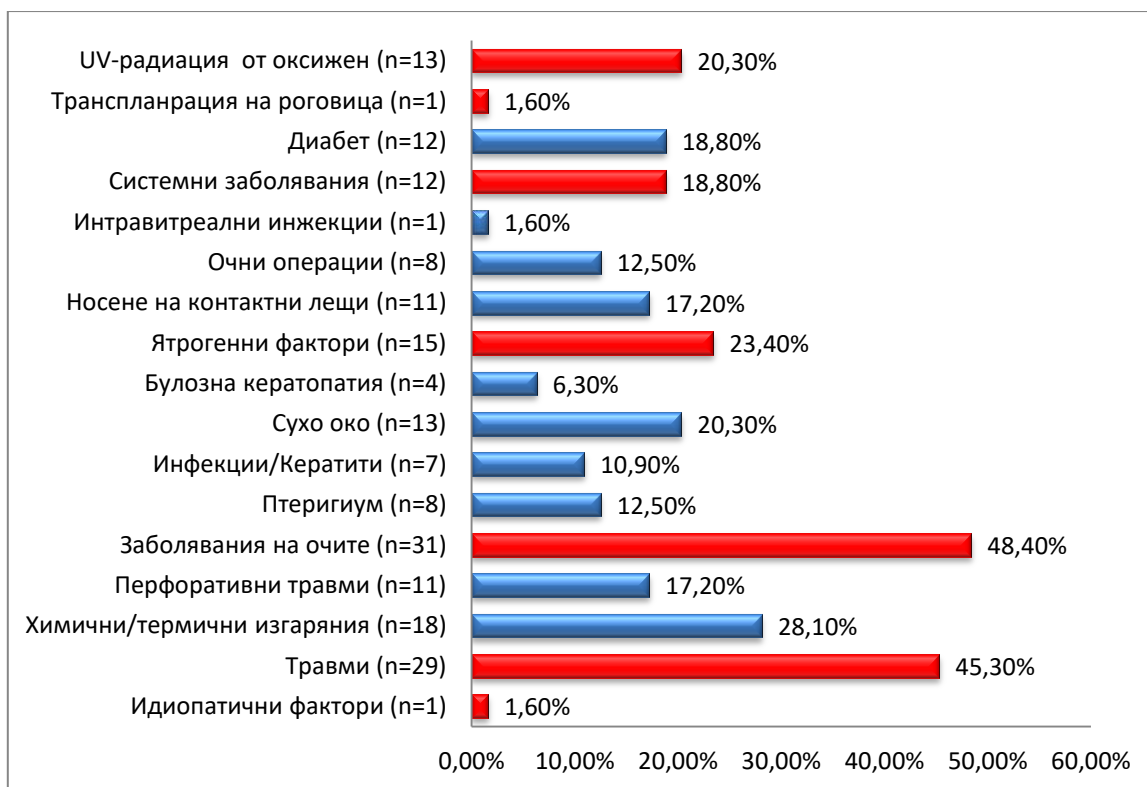
С най-голяма честота на засегнатото око се откроява дясно око с 53,10 % (фиг. 2). Изследването на засягането на двете очи на петте пациента се установи основно при лица на възраст до 45 г., като само един пациент е на възраст 67 г.



Фиг. 2. Засегнато око

На фиг. 3 са представени доказаните етиологични фактори за дефицит на лимбални стволови клетки.

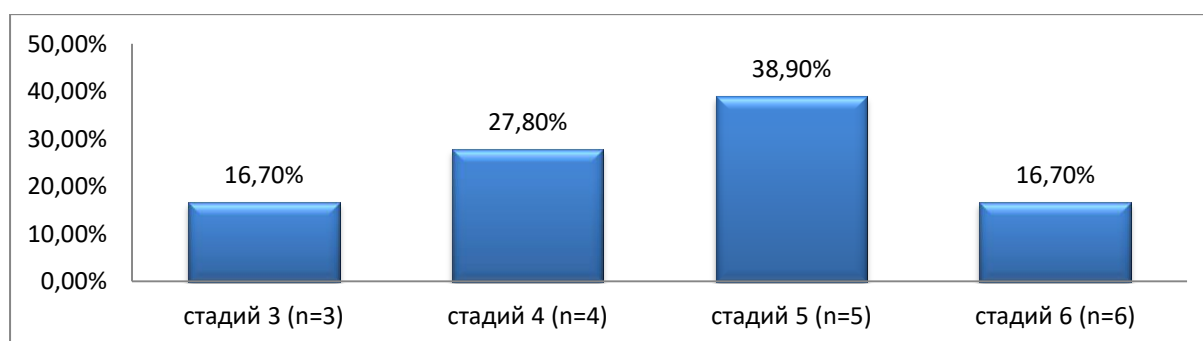




**Фиг. 3. Етиология**

Резултатите показват, че от основните фактори преобладават пациентите със заболявания на очите (48,40 %), следвани от пациентите с травми (45,30 %). Ятрогенните фактори представляват 23,40 % от извадката и се нареждат на трето място по честота. Пациентите изложени на UV радиация са 20,30 %, а тези със системни заболявания са 18,80 %. С най-малка честота са идиопатичните фактори и пациентите с трансплантация на роговица (1,60 %).

Детайлното разглеждане на етиологията според основните групи фактори показва, че в групата на травмите преобладават пациентите с химични или термични изгаряния (28,10 %), като преобладават пациентите с химични изгаряния със стадий 5 – 38,90 % (фиг. 4).



**Фиг. 4. Стадий на химичните изгаряния**

Въпреки, че не се доказва съществена разлика може да се каже, че в групата на травмите преобладават мъжете (51,50 %), докато при жените травмите се срещат в 38,70 % от случаите.

От гледна точка на засегнатото око се установи съществен разлика между засегнатите очи и наличието на травма ( $p < 0,05$ ), като в нашето изследване преобладават пациентите с травма на дясно око (55,0 %), докато при нито един пациент не се установи травма и на двете очи.

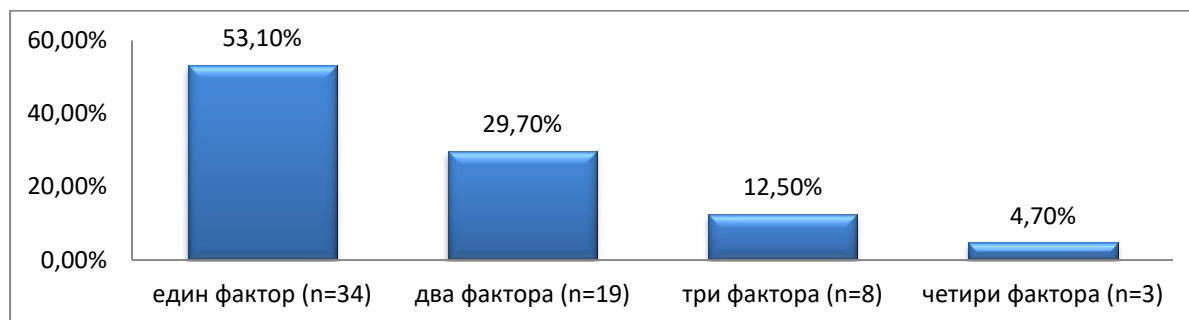
В тази на заболяванията на очите с най-голям относителен дял са пациентите със сухо око (20,30 %). Заболяванията на очите с малко по-висока честота се срещат при жените (съответно 51,60 % за жените и 45,50 % за мъжете).

При ятрогенните фактори най-често срещани са усложненията, породени от носенето на контактни лещи (17,20 %). Това се доказва и от установената разлика между наличието на ятрогенен фактор при пациентите под и над 40 г., където преобладава относителният дял на първата група (37,50 %) към 9,40 % за пациентите над 40 г. ( $p < 0,01$ ).

Ятрогенните фактори са най-често срещани при пациенти със засягане и на двете очи (80,0 %), следвани от тези със засягане само на дясно око (23,50 %). С най-малка честота в тази група са пациентите със засегнато ляво око (12,0 %) ( $p < 0,01$ ).

От гледна точка на системните заболявания може да се каже, че всички пациенти в тази група имат диабет.

При проследяването на броя на етиологичните фактори, при един пациент с дефицит на лимбални стволови клетки установихме, че при малко повече от половината пациенти се наблюдава само един етиологичен фактор (53,10 %) (фиг. 5), основно в групата на пациентите с травми.



**Фиг. 5. Брой етиологични фактори при един пациент**

С най-голяма честота на групите фактори, които се комбинират са заболяванията на очите, като в 26,70 % тази група се комбинира с ятрогенните фактори или с UV – радиацията. В други 13,3 % заболяванията на очите се комбинират със системните заболявания и със същия относителен дял са и комбинацията между заболяванията на очите, ятрогенните фактори, системните заболявания и UV – радиацията.

В два случая се наблюдава комбинация между ятрогенни фактори и системни заболявания, като в единия случай има и допълнителен фактор – трансплантация на роговица.

Идиопатичните фактори се срещат само при един пациент и са в комбинация със системните заболявания.

Травмите се комбинират при трима пациента, като при двама са в комбинация със системните заболявания, а при един с UV – радиация.

От гледна точка на половия признак, въпреки липсата на съществена разлика, установихме, че при мъжете преобладава относителният дял на проявата на един етиологичен фактор (63,60 %), докато при жените въпреки високата честота на проява на един етиологичен фактор (41,90 %) се наблюдава висока честота на проява и на два фактора – 32,30 %. Само при жените се установиха четири етиологични фактора, водещи до дефицит на лимбални стволови клетки.

В нашата извадка преобладават пациентите с частична загуба на ЛСК (59,40 %), като относителният дял на тоталната загуба на ЛСК е 40,60 %.

Въпреки липсата на сигнификантна разлика при частичната загуба на ЛСК преобладават пациентите на възраст над 40 г. (55,30 %), докато тоталната загуба на ЛСК е по-често срещана при лицата под 40 г. (57,70 %).

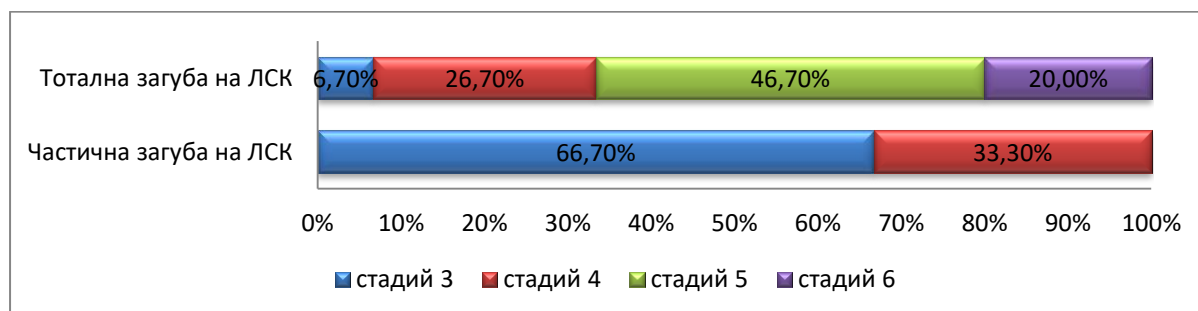
Подобна е тенденцията и по отношение на пола. Частичната загуба на ЛСК е често срещана при жените (52,60 %), а тоталната при мъжете (57,70 %).

От гледна точка на засегнатото око не се наблюдава съществена разлика, като и при ЛО и ДО преобладава честотата на частичната загуба на ЛСК (съответно 52,0 % и 58,8 %). При засягане и на двете очи имаме само частична загуба на ЛСК.

Пациента с идиопатична етиология има тотална загуба на ЛСК.

При пациентите с травми преобладават тези с тотална загуба на ЛСК (58,60 %), докато лицата с частична са 41,40 % от извадката ( $p < 0,01$ ). Наличието на травма е рисков за развитието на тотален дефицит на лимбални стволови клетки ( $OR = 4,09$  (1.42-11.79);  $p < 0.01$ ).

От друга страна значителната част от пациентите с химични или термични изгаряния имат тотална загуба на ЛСК (83,30 %) ( $p < 0,001$ ), като с най- висока честота са пациентите с пети стадий на химичното изгаряне (46,70 %) (фиг. 6).



**Фиг. 6. Загуба на ЛСК и стадий на химическото изгаряне ( $p < 0,05$ )**

При пациентите с перфоративни травми преобладават тези с частична загуба на ЛСК (81,80 %) ( $p < 0,05$ ).

Изследването на риска за тотален дефицит на лимбални стволови клетки, химичните изгаряния се характеризират със значително по-висок риск ( $OR = 15,91$  (3.87-65.34);  $p < 0.001$ ), отколкото перфоративната травма ( $OR = 0,27$  (0.05-1.36);  $p < 0.05$ ).

Съществена разлика се наблюдава и по отношение на загубата на ЛСК и заболяванията на очите като етиологичен фактор за дефицит на лимбални стволови клетки ( $p = 0,001$ ), като този фактор има висок риск за частична загуба на ЛСК ( $OR = 2,85$  (1.36-5.96);  $p < 0.01$ ). Над  $\frac{3}{4}$  от пациентите със заболявания на очите (80,60 %) имат частична загуба на ЛСК.

Всички пациенти с птериgium имат частична загуба на ЛСК. От друга страна 57,10 % от пациентите с инфекции или кератити имат предимно тотална загуба на ЛСК, като наличието на инфекция/кератит носи риск за тотална загуба на ЛСК ( $OR = 2,12$  (0.43-10.39);  $p < 0.05$ ).

Пациентите със сухо око имат основно частична загуба на ЛСК (84,60 %) ( $p < 0,05$ ), като това заболяване се определя като рисков фактор за частичен дефицит на лимбални стволови клетки  $OR = 3,76$  (0.91-15.59);  $p < 0.05$ ).

Всички пациенти с булозна кератопатия имат тотална загуба на ЛСК.

Ятрогенните фактори като група водят предимно до частична загуба на ЛСК (86,70 %) ( $p < 0,05$ ), като имат риск 4,45 (1,09-18,08).

Всички пациенти, които носят контактни лещи в нашата извадка и тези, на които са поставяне интравитреални инжекции имат частична загуба на ЛСК. При очните операции също преобладава делът на лицата с частична загуба на ЛСК (75,0 %).

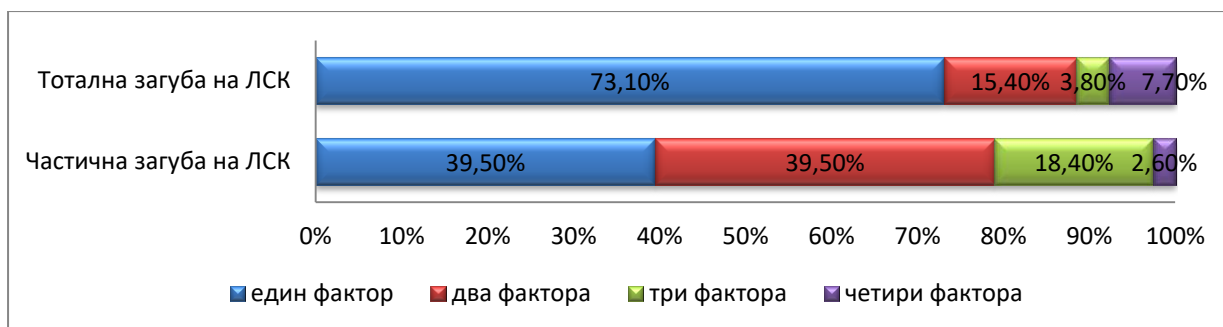
Системните заболявания са рисков фактор за тотална загуба на ЛСК ( $OR = 3,13$  (0.81-12.08);  $p < 0.05$ ), като 63,60 % от пациентите са с тотален дефицит на ЛСК. Всички пациенти, които имат системни заболявания са с диабет.

Пациента с трансплантация на роговица има тотална загуба на ЛСК.

Всички пациенти изложени на изкуствена UV-радиация имат частична загуба на лимбални стволови клетки.

Съществена разлика в загубата на ЛСК беше намерена по отношение на броя на етиологичните фактори при един пациент ( $p < 0,05$ ), като частичната загуба на ЛСК се среща предимно при пациенти с един и два фактора (по 39,50 %), докато тоталната е предимно при пациенти с един фактор (73,10 %) (фиг. 7).

На фиг. 8 е представена степента на дефицит на ЛСК, като резултатите показват приблизително равномерно разпределение на пациентите.

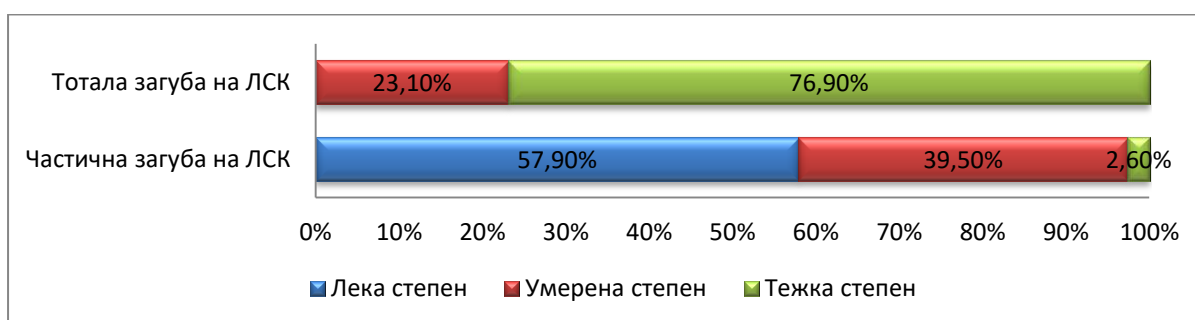


**Фиг.7. Загуба на ЛСК и брой на етиологичните фактори при един пациент**



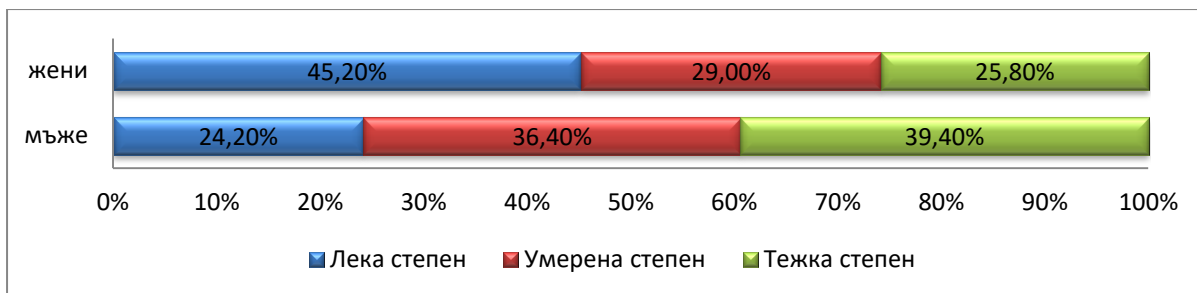
**Фиг. 8. Степен на дефицит на ЛСК**

Резултатите от анализа на загубата на ЛСК и степента на дефицита показва разлика между степените при частична и тотална загуба на ЛСК ( $p < 0,001$ ), като при частичната загуба на ЛСК преобладава леката степен (57,90 %), а при тоталната – тежката степен (76,90 %) (фиг. 9).



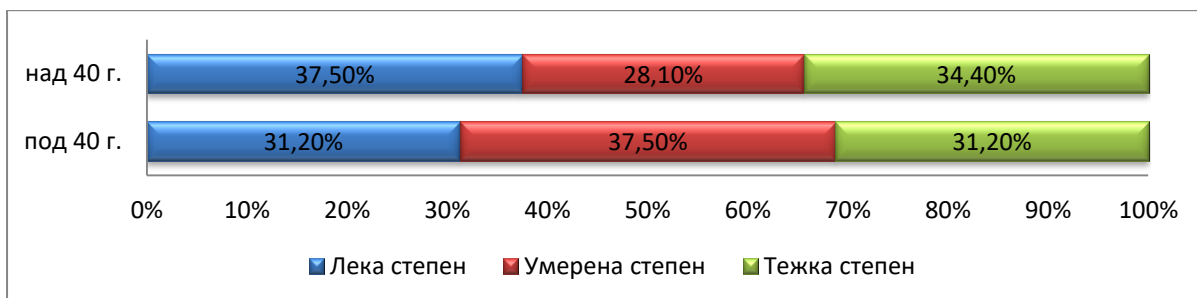
**Фиг.9. Загуба на ЛСК и степен на дефицита**

Въпреки липсата на сигнификантна разлика установихме, че при жените преобладава леката степен на дефицит на ЛСК (45,20 %), докато при мъжете преобладава тежката степен – 39,40 % (фиг. 10).



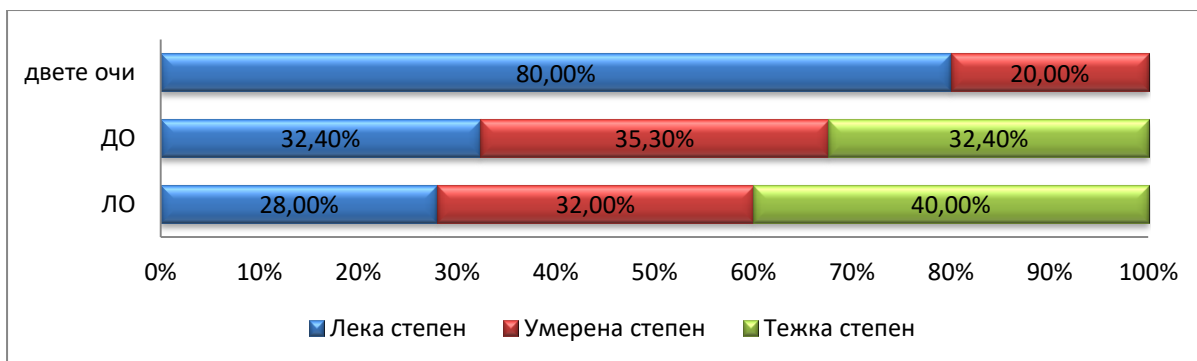
**Фиг. 10. Степен на дефицита на ЛСК според пола**

Възростовия показател също не показва статистическа значима разлика между изследваните групи, но може да се каже, че пациентите на възраст под 40 г. преобладава умерената степен на дефицит на ЛСК (37,50 %), докато при лицата над 40 г. е леката степен (37,50 %) (фиг. 11).



**Фиг. 11. Степен на дефицита на ЛСК според възрастта**

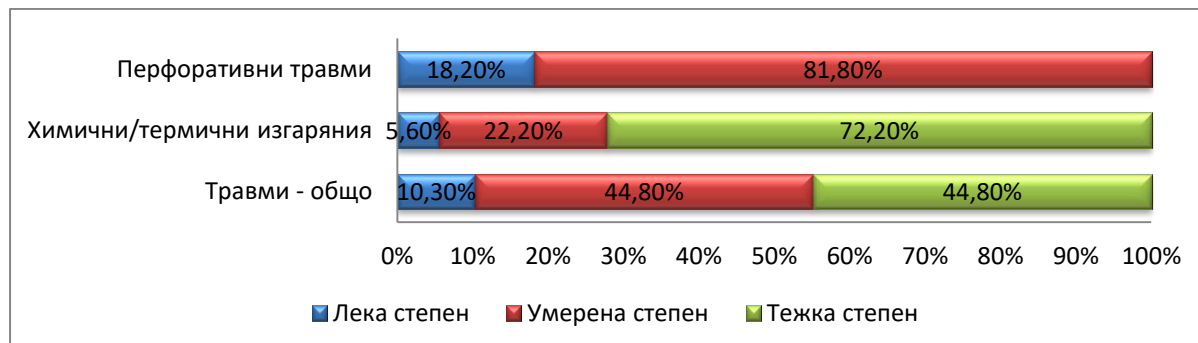
Степента на дефицит на ЛСК според засегнатото око показва, че при ляво око преобладава тежката степен (40,0 %), при дясно око – умерената степен (35,30 %), а при засягане и на двете очи значителен дял има леката степен на дефицит на ЛСК – 80,0 % (фиг. 12).



**Фиг. 12. Степен на дефицита на ЛСК според засегнатото око**

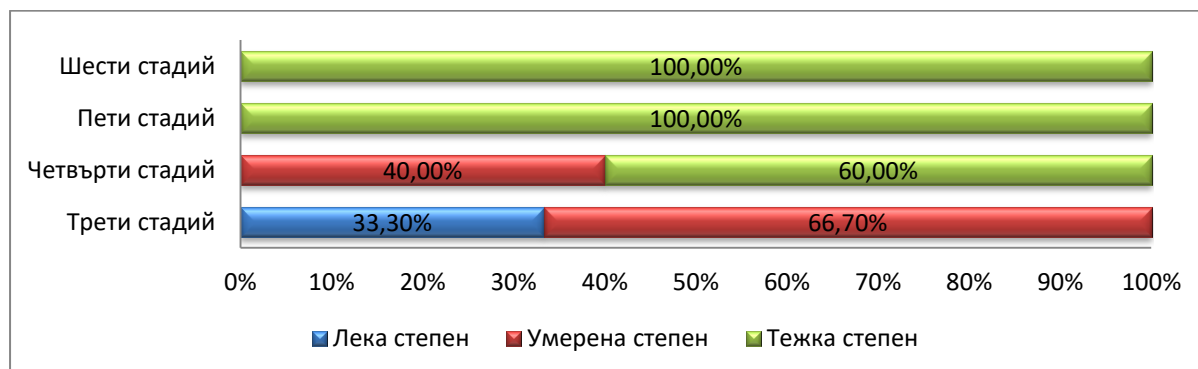
Пациента с идиопатичен фактор има тежка степен на дефицит на ЛСК.

При пациентите с травми се установи съществена разлика ( $p=0,001$ ), като лека степен се наблюдава само при 10,30 % от случаите докато при останалите пациенти степента е предимно умерена и тежка (по 44,80 %) (фиг. 13).



**Фиг. 13. Степен на дефицита на ЛСК при травми**

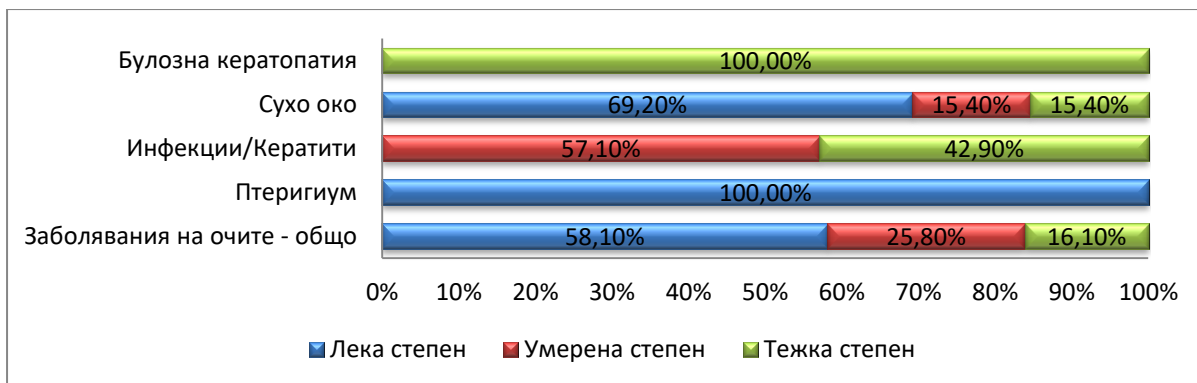
В частност при пациентите с химични или термични изгаряния преобладава тежката степен на дефицит на ЛСК (72,20 %) ( $p<0,001$ ), докато при тези с перфоративни травми – умерената степен (81,80 %) ( $p=0,001$ ) (фиг. 14).



**Фиг. 14. Степен на дефицита на ЛСК при травми според стадия**

Според стадия на химичните изгаряния установихме, че пациентите в трети стадий в 66,70 % от случаите имат умерена степен на дефицит на ЛСК, тези с четвърти стадий имат в 60,0 % от случаите тежка степен на дефицит на ЛСК, а пациентите с пети и шести стадий са само с тежка степен на дефицит на ЛСК ( $p < 0,05$ ) (фиг. 14).

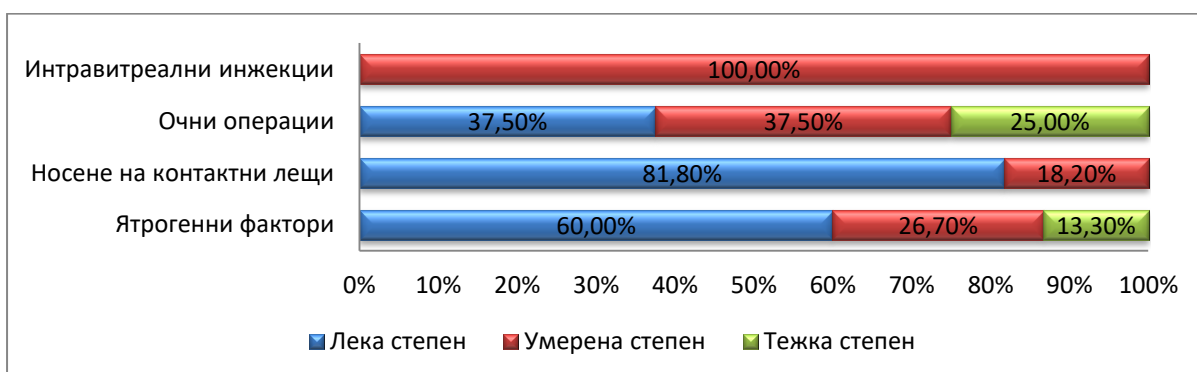
Изследването на заболяванията на очите и степента на дефицит на ЛСК показва наличието на статистическа разлика ( $p < 0,001$ ), като преобладават пациентите с лека степен на дефицит на ЛСК - 58,10 % (фиг. 15).



**Фиг. 15. Степен на дефицита на ЛСК при заболявания на очите**

Пациентите с птериgium са само с лека степен на дефицит на ЛСК. При пациентите с инфекции или кератити, преобладава относителният дял на тези с умерена степен на дефицит на ЛСК (57,10 %). При сухо око висок относителен дял имат пациентите с лека степен на диференциация на ЛСК (69,20 %), докато при булозната кератопатия всички пациенти са с тежка степен на диференциация (фиг. 15).

Изследването на степента на дефицит на ЛСК според ятрогенните фактори също показва, че преобладават пациентите с лека степен на дефицит на ЛСК (60,0 %) ( $p < 0,05$ ) (фиг. 16).



**Фиг. 16. Степен на дефицита на ЛСК според ятрогенните фактори**

Носенето на контактни лещи е свързано с предимно лека степен на дефицит на ЛСК (81,80 %), докато очните операции варират между лека и умерена степен (по 37,50 %). От друга страна интравитреалните инжекции водят до умерена степен на загуба на ЛСК (фиг. 16).

Резултатите показват, че относителният дял на пациентите с тежка степен на загуба на ЛСК в тази група се формира от пациентите с очни операции (фиг. 16).

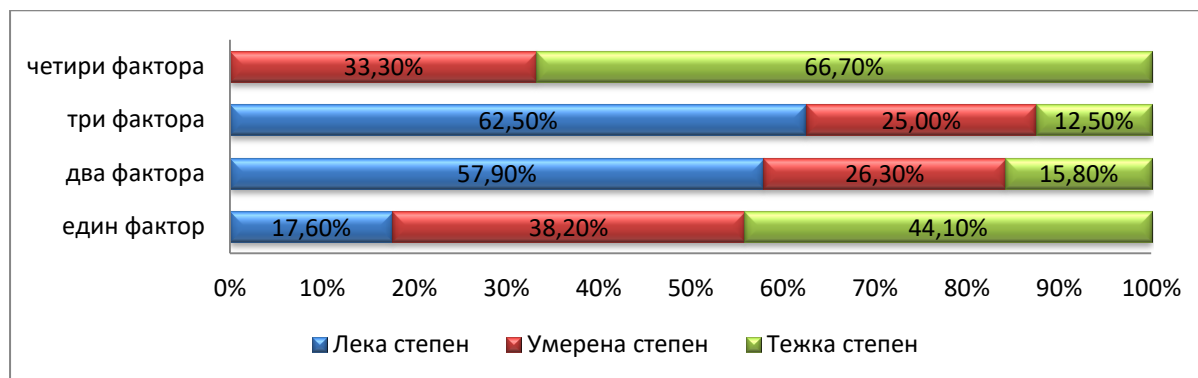
Системните заболявания в нашата извадка са представени предимно от пациентите с диабет, като в тази група се установи висока честота на тежката степен на дефицит на ЛСК (54,50 %), следвана от пациентите с умерена степен (45,50 %) ( $p < 0,05$ ). Не се наблюдаваха пациенти с лека степен на дефицит на ЛСК.



Пациента с трансплантация на роговица има тежка степен на дефицит на ЛСК.

Пациентите, които са били изложени на UV – радиация в над  $\frac{3}{4}$  от случаите имат лека степен на дефицит на ЛСК (76,90 %), а 23,10 % са с умерена степен на дефицит на ЛСК ( $p = 0,001$ ).

Наблюдава се разлика в степента на дефицит на ЛСК според броя на етиологичните фактори при един пациент ( $p < 0,05$ ) (фиг. 17).



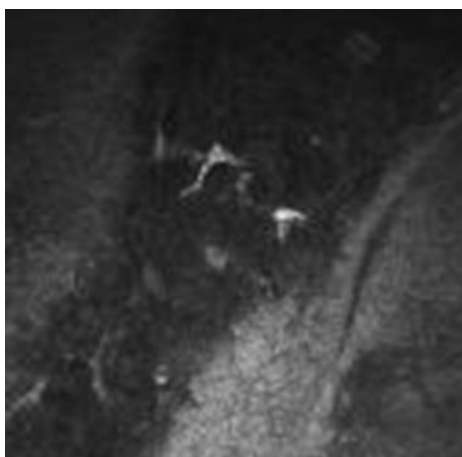
**Фиг. 17. Степен на дефицита на ЛСК според броя на етиологичните фактори при един пациент**

Резултатите показват, че пациентите с един и четири етиологични фактора едновременно имат най-висок относителен дял на тежката степен на дефицит на ЛСК (съответно 44,10 % и 66,70 %), докато пациентите с два и три етиологични фактора показват по-висока честота на леката степен на дефицит на ЛСК (съответно 57,90 % и 62,50 %).

## **2. 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)**

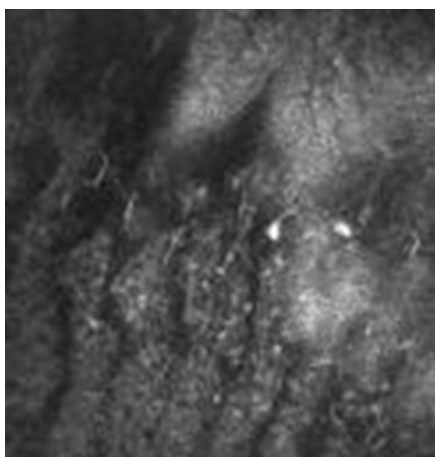
### **2.1. *In vivo* конфокална микрокопия на очен лимб на пациенти от контролната група**

Епителните клетки, които се наблюдават в областта на роговичния лимб са подобни на тези, които са в разположение в централната част на роговицата. Повърхностните клетки се характеризират със светла цитоплазма и ядро. Криловидните клетки са с по-малък размер от повърхностните и имат тъмна цитоплазма и ясно видими граници. Базалните клетки с ясни граници, но още по-малък размер. Впечатление прави наличието на хиперрефлексивни клетки с дендритна морфология, които се визуализират между базалните клетки при част от изследваните пациенти (фиг. 18).



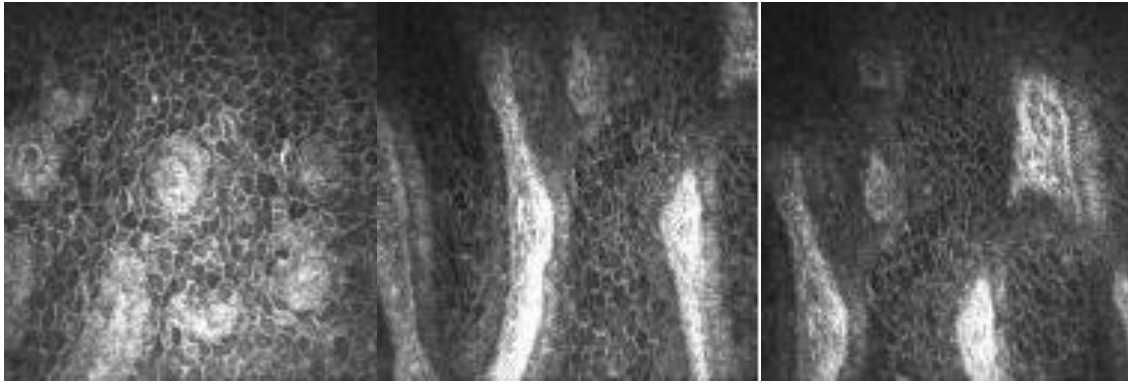
**Фиг. 18. In vivo конфокална микроскопия на очен лимб. Хиперрефлексивни клетки с дендритна морфология, разположени между базални клетки с променена морфология**

Тъмни, криволинейни колони, които прекъсват правилната мозаична структура на базалните клетки се наблюдава от роговичната страна на лимба (фиг. 19)

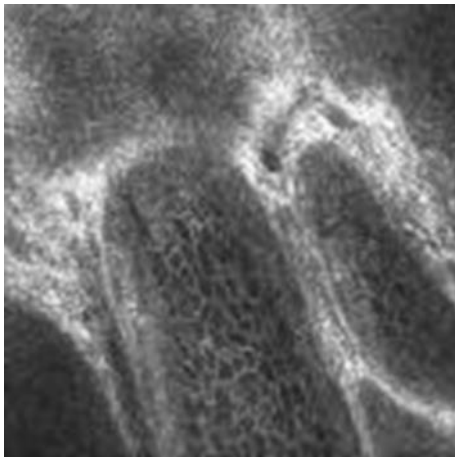


**Фиг. 19. In vivo конфокална микроскопия на очен лимб. Тъмни, криволинейни колони, които прекъсват правилната мозаична структура на базалните клетки, наблюдавани от роговичната страна на лимба**

Палисадите на Vogt най-добре се визуализират в горен и долен квадрант на лимба откъм склералната част. Те представляват хиперрефлексивни, двойно контурирани зони, обикновено с паралелни линии. Те се редуват с острови от епителни клетки, което съответства на интерпалисадните пространства (фиг. 20). Някои палисади са с кръгла или овална форма (фиг. 20). Те са с широка основа откъм конюнктивалната страна и по-малък размер откъм роговичната зона. Близко разположените палисади са свързани помежду си (фиг. 21). От страна на роговицата, в края на палисадите на Vogt, се наблюдават малки розетки съставени от хиперрефлексивни клетки заобиколени от тъмни централни зони.



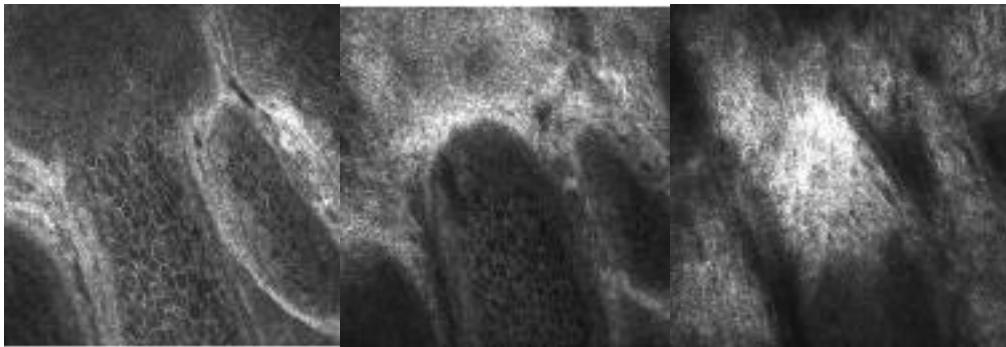
**Фиг. 20. *In vivo* конфокална микроскопия на очен лимб. Палисади на Vogt**



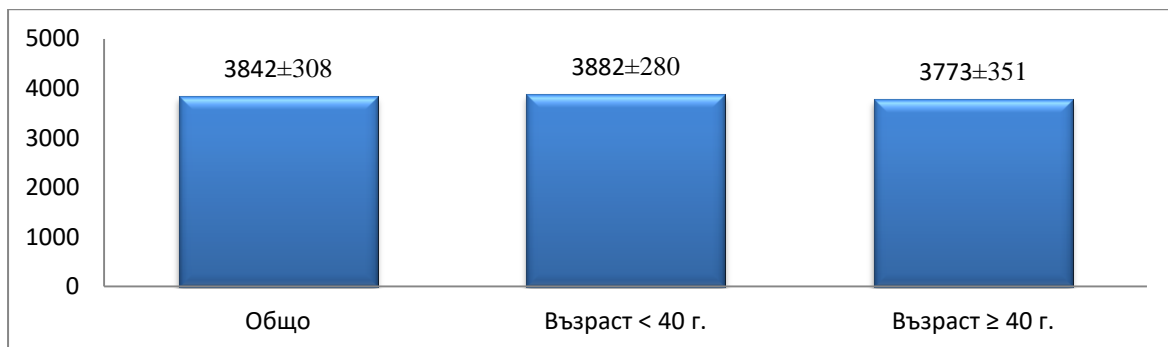
**Фиг. 21. *In vivo* конфокална микроскопия на очен лимб. Комуникация между съседни палисади на Vogt**

Рефлективността на палисадите на Vogt и на интерпалисадните пространства е различна в различната дълбочина на изследване. По-повърхностно (на дълбочина приблизително 65-75 $\mu$ m) палисадите са по-хиперрефлексивни, а клетките в между палисадното пространство по-тъмни. В дълбочина от склералната страна на лимба този модел на рефлективност се изменя - интерпалисадното пространство става хиперрефлексивно, а по-тъмните структури съответстват на по-горе намиращите се палисади. В още по-дълбоките слоеве настъпва промяна в рефлективността на структурите. Интерпалисадните вдълбвания стават хиперрефлексивни в след преминаване на дълбочината на слоя на базалните клетки (при дълбочина на среза от 90  $\mu$ m до 210  $\mu$ m) (фиг. 22).

На фиг. 23 са представени количествените данни за криловидните клетки на централен роговичен епител при пациентите от контролната група, като не се установява съществена разлика между лицата под и над 40 г.

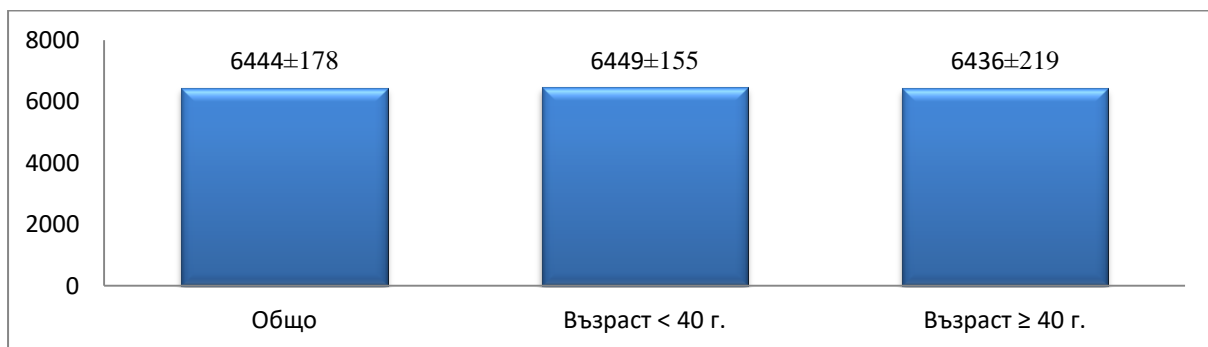


**Фиг. 22.** *In vivo* конфокална микроскопия на очен лимб. Демонстрирани са палисади на Vogt в дълбочина на среза от 90µm до 150 µm



**Фиг. 23.** Количествените данни за централен роговичен епител – криловидни клетки (клетки/mm<sup>2</sup>)

Резултатите от изследването на количествените данни на базалните клетки на централния роговичен епител показаха същата тенденция както, данните за криловидните клетки, като отново не се отчете значима разлика между двете групи пациенти (под и над 40 г.) (фиг. 24).



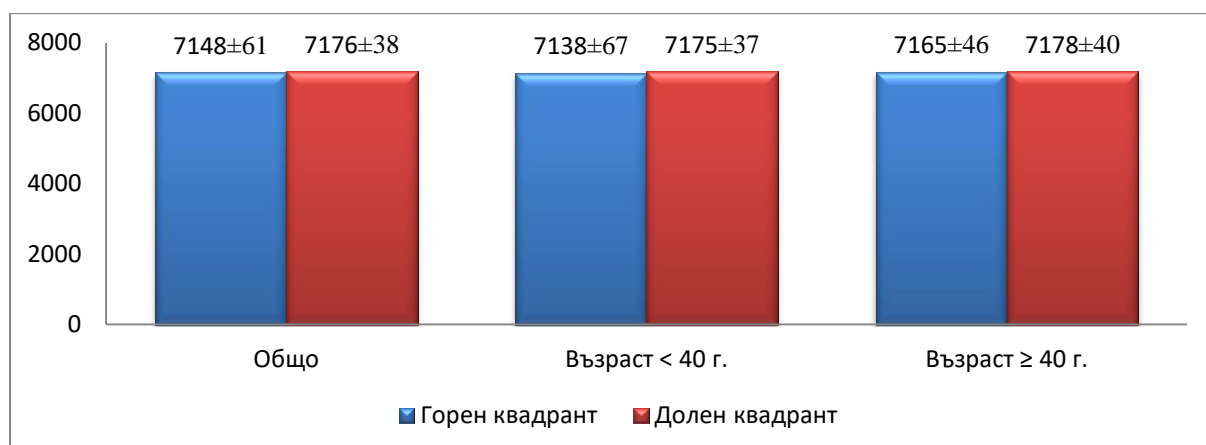
**Фиг. 24.** Количествените данни за централен роговичен епител – базални клетки (клетки/mm<sup>2</sup>)

На фиг. 25 са представени количествените данни за криловидните клетки на роговичен епител на лимба, като не се доказва съществена разлика нито между клетките в горен и долен квадрант, нито между пациентите под и над 40 г.



**Фиг. 25. Количествени данни за роговичен лимбален епител – криловидни клетки (клетки/mm<sup>2</sup>)**

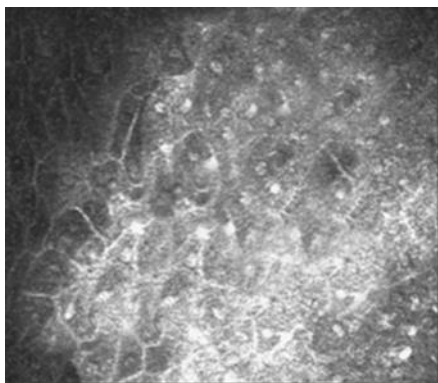
На фиг. 26 са представени количествените данни за базалните клетки на роговичен епител на лимба, като не се доказва съществена разлика нито между клетките в горен и долен квадрант, нито между пациентите под и над 40 г.



**Фиг. 26. Количествени данни за роговичен лимбален епител– базални клетки (клетки/mm<sup>2</sup>)**

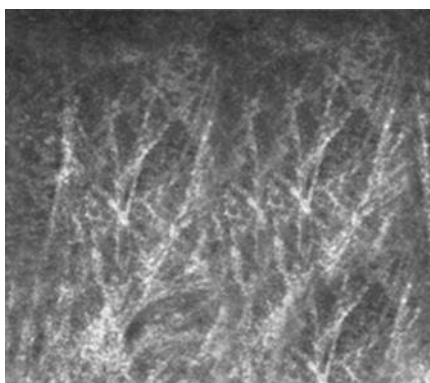
## 2.2. *In vivo* конфокална микроскопия на роговица и очен лимб при пациенти с дефицит на лимбални стволови клетки

Повърхностни конюнктивални епителни клетки се наблюдават при пациенти както с тотален, така и в засегнатата роговична зона при пациенти с частичен дефицит на ЛСК. Клетките са хиперрефлексивни със светло ядро и неясни граници (фиг. 27).



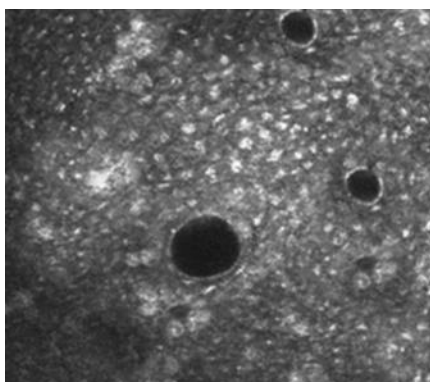
**Фиг. 27.** *In vivo* конфокална микроскопия на роговица с анормален епител при пациент с дефицит на ЛСК. Преходна зона на повърхностно ниво между роговичен епител и конюнктивални епителни клетки. Роговичните епителни клетки са по-тъмни с ясни граници, докато конюнктивалните епителни клетки са с неясни граници и светли ядра

В дълбочина под конюнктивализираните роговични епителни клетки се визуализира гъста мрежа от хиперрефлексивни линейни и криволинейни структури – стромален колаген (фиг. 28).



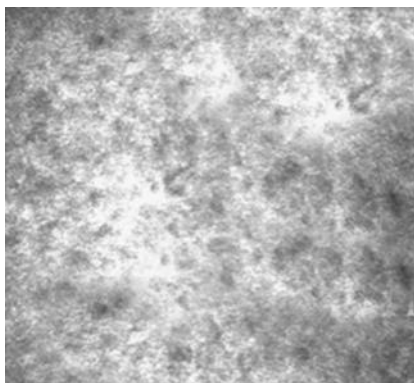
**Фиг. 28.** *In vivo* конфокална микроскопия на роговица при пациент с дефицит на ЛСК. Стромален колаген под конюнктивализираните роговични епителни клетки

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 (фиг. 29).



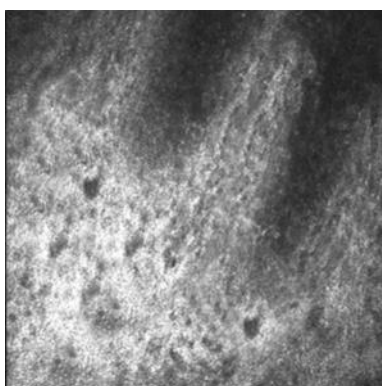
**Фиг. 29.** *In vivo* конфокална микроскопия на роговица при пациент с дефицит на ЛСК. Гоблетови клетки и кистични промени в зоната на анормален роговичен епител

При един пациент с тотален дефицит на ЛСК не се откри нито конюнктивални, нито роговични епителни клетки (фиг. 30).



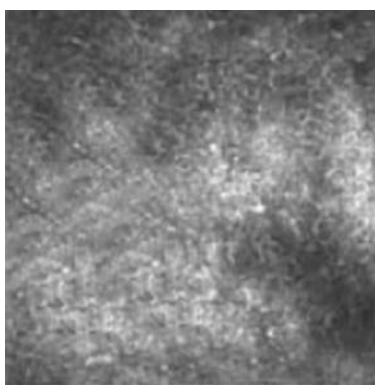
**Фиг. 30. *In vivo* конфокална микроскопия на роговица при пациент с тотален дефицит на ЛСК. Тотална деструкция на предна очна повърхност с невъзможност да се отдиференцират различни клетъчни структури**

При част от пациентите с лек до умерен дефицит на ЛСК се наблюдават хиперрефлексивни стромални повлекла без наличието на хиперрефлексивни базални епителни клетки (фиг. 31).



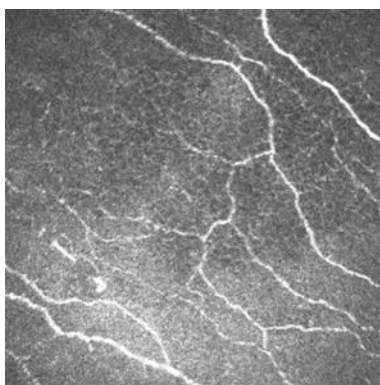
**Фиг. 31. *In vivo* конфокална микроскопия на лимбалната зона при пациент с лека степен на дефицит на ЛСК. Наблюдават се хиперрефлексивни стромални повлекла без наличието на хиперрефлексивни базални епителни клетки**

При пациенти с тежка степен на лимбална инсуфициенция в лимбалната зона не се откриват палисади на Vogt. Визуализират се голямо количество дендритни клетки (фиг. 32).



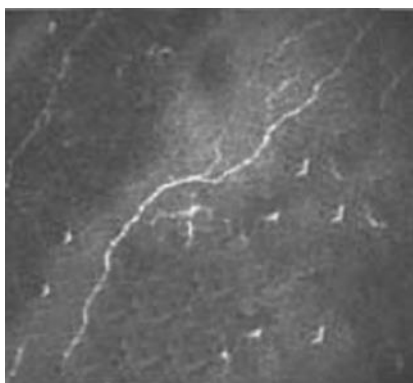
**Фиг. 32. *In vivo* конфокална микроскопия на лимбалната зона при пациент с тежка степен на дефицит на ЛСК. Липсват палисади на Vogt. Наблюдава се голямо количество на дендритни клетки**

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 (фиг. 33).



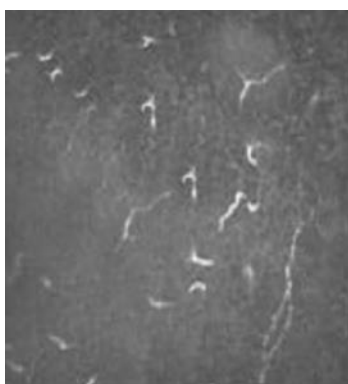
**Фиг. 33. *In vivo* конфокална микроскопия на суббазален нервен плексус на здрав пациент**

Броят на суббазалните нерви намалява значително дори при лека степен на дефицит на ЛСК. Туртуозитетът им е запазен или леко увеличен (фиг. 34).



**Фиг. 34. *In vivo* конфокална микроскопия на суббазален нервен плексус при пациент с лека степен на дефицит на ЛСК**

При пациенти с умерена и тежка степен на лимбална инсуфициенция се наблюдава увеличен туртуозитет, неправилен ход и сегментираност на нервите (фиг. 35). Визуализират се дендритно подобни нервни фибри, които са особено често срещани при пациенти с по-тежка степен на лимбална инсуфициенци и тотална липса на нормални дълги нервни фибри. Не е изяснено напълно дали тези структури са всъщност нервни фибри или лангенхарсови клетки.

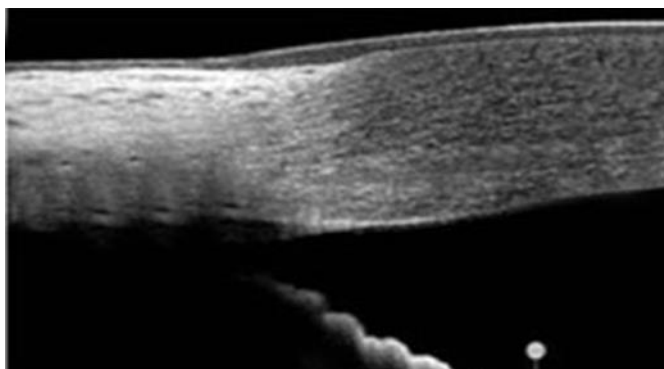


**Фиг. 35. *In vivo* конфокална микроскопия на суббазален нервен плексус при пациент с дефицит на ЛСК**



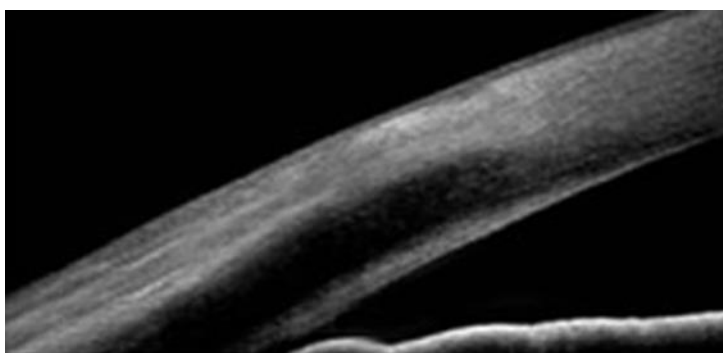
### 2.3. Предно-сегментна оптична кохерентна томография на лимбалната зона

На фиг. 36 е представено изображение на лимбалната зона на здрав пациент с налични палисади на Vogt получено от предно-сегментен оптичен кохерентен томограф. Ясно видими са структурите на лимба – роговичния епител, епителът на палисадите, роговичната строма, лимбалната строма.



**Фиг. 36. Предно-сегментна оптична кохерентна томография на здрав пациент**

На фиг. 37 е представено изображение на лимбалната зона на пациент с дефицит на ЛСК. Липсват ясно разграничаване на лимбалните структури.



**Фиг. 37. Предно-сегментна оптична кохерентна томография на пациент с дефицит на ЛСК – липсва разграничаване на лимбалните структури**

### 2.4. Анализ на количествените данни получени чрез предно-сегментна оптична кохерентна томография и *in vivo* конфокална микроскопия

На таблица 2 са представени резултатите от сравнителния анализ на дебелината на лимбалния епител в четири квадранта в контролна група и при пациентите с дефицит на ЛСК.

Резултатите показват наличието на съществена разлика в дебелината на лимбалния епител както в четирите квадранта на изследваните групи, така и между двете групи пациенти ( $p < 0,001$ ).

Както се вижда от табл. 2 при пациентите от контролната група се наблюдава значително по-голяма дебелина на лимбалния епител, в сравнение с лицата с дефицит на ЛСК, като в различните участъци варира от 5,16  $\mu\text{m}$  в темпорален квадрант до 11,72  $\mu\text{m}$  в долен квадрант. Независимо от установената разлика и в двете групи се установи, че дебелината на лимбалния епител в назалния квадрант е най-малка (съответно 5,37

µm за контролната група и 51,25 µm за клиничната група), 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.

**Таблица. 2. Сравнителен анализ на дебелината на лимбалния епител в четири квадранта измерена чрез предно-сегментна оптична кохерентна томография**

	Горен квадрант	Долен квадрант	Назален квадрант	Темпорален квадрант	F	P
<b>Дефицит на ЛСК</b>	59,68 ± 8,4	58,81 ± 8,8	51,25 ± 6,9	53,05 ± 6,9	18,451	< 0,001
<b>Контролна група</b>	68,42 ± 3,7	70,53 ± 6,5	57,37 ± 4,4	58,21 ± 3,5	39,866	< 0,001
<b>t</b>	6,44	6,35	4,59	4,42		
<b>p</b>	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001		
<b>С палисади на Vogt</b>	68,27 ± 4,2	68,06 ± 3,5	64,86 ± 4,6	62,0 ± 6,88	4,803	0,01
<b>Без палисади на Vogt</b>	56,15 ± 8,6	54,59 ± 9,1	48,98 ± 5,6	50,84 ± 6,22	10,321	< 0,001
<b>t</b>	7,33	8,50	8,40	5,00		
<b>p</b>	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001		

При пациентите с дефицит на ЛСК беше изследвана дебелината на лимбалния епител при наличието и липсата на палисади на Vogt. Резултатите от изследването също показаха статистически значима разлика както в отделните квадранти в разглежданите групи, така и между самите групи ( $p < 0,001$ ).

При пациентите без палисади на Vogt дебелината на лимбалния епител е значителни по-малка в сравнение с групата на пациентите с палисади на Vogt независимо от изследвания квадрант ( $p < 0,001$ ), като разликата варира от 11,64 µm в темпоралния квадрант до 15,88 µm в назалния квадрант в полза на пациентите с наличие на палисади на Vogt.

С най-малка дебелина на лимбалния епител при пациентите с дефицит на ЛСК и с палисади на Vogt е епитела в темпоралния квадрант – 62,0 µm, докато при другата група изследвани лица с най-малка дебелина на лимбалния епител се откроява назалния квадрант – 48,98 µm.

Най-голяма дебелина на лимбалния епител и с двете групи е горния квадрант (съответно 68,27 µm при пациентите с палисади на Vogt и 56,15 µm при пациентите без палисади на Vogt).

На табл. 3 е представена дебелината на лимбалния епител в четири квадранта според етиологията. Резултатите показват, че съществена разлика в изследваните квадранта се наблюдава при травмите и в частност перфоративните травми, заболяванията на очите, включително птериgium и инфекции/кератити, булозна кератопатия, носенето на контактни лещи, системните заболявания, от които е диабета и пациентите, които са били изложени на UV-радиация.

Най-малка дебелина на лимбалния епител в горен, долен и назален квадрант според етиологичния показател се установи при пациентите с трансплантация на

роговица (съответно 46,0  $\mu\text{m}$ , 41,0  $\mu\text{m}$  и 42,0  $\mu\text{m}$ ), а най-голяма – при пациентите, които носят контактни лещи (съответно 68,4  $\mu\text{m}$ , 66,9  $\mu\text{m}$  и 59,5  $\mu\text{m}$ ).

**Таблица. 3. Сравнителен анализ на дебелината на лимбалния епител в четири квадранта според етиологията**

	Горен квадрант	Долен квадрант	Назален квадрант	Темпорален квадрант	P
Идиопатични фактори (n=1)	55,00	42,00	52,00	40,00	-
Травми (n=29)	57,3 $\pm$ 7,8	57,1 $\pm$ 8,7	50,4 $\pm$ 5,8	51,4 $\pm$ 6,7	< 0,05
Химични/термични изгаряния (n=18)	53,8 $\pm$ 7,4	53,8 $\pm$ 8,2	48,6 $\pm$ 6,1	49,2 $\pm$ 6,5	> 0,05
Перфоративни травми (n=11)	62,9 $\pm$ 4,8	62,3 $\pm$ 7,3	53,4 $\pm$ 4,0	55,1 $\pm$ 5,5	< 0,05
Заболявания на очите (n=31)	62,6 $\pm$ 8,2	61,2 $\pm$ 8,2	52,4 $\pm$ 7,9	54,9 $\pm$ 6,8	< 0,05
Птеригиум (n=8)	66,8 $\pm$ 2,8	64,1 $\pm$ 3,8	48,5 $\pm$ 4,3	55,6 $\pm$ 2,8	< 0,05
Инфекции/Кератити (n=7)	56,1 $\pm$ 6,5	56,0 $\pm$ 6,7	50,8 $\pm$ 3,8	53,3 $\pm$ 4,5	< 0,05
Сухо око (n=13)	64,8 $\pm$ 6,6	64,2 $\pm$ 5,5	56,5 $\pm$ 5,8	57,0 $\pm$ 5,4	> 0,05
Булозна кератопатия (n=4)	49,7 $\pm$ 4,6	47,3 $\pm$ 4,9	44,5 $\pm$ 3,8	46,3 $\pm$ 4,0	< 0,05
Ятрогенни фактори (n=15)	63,5 $\pm$ 9,0	62,3 $\pm$ 8,7	55,5 $\pm$ 9,2	55,8 $\pm$ 8,6	> 0,05
Носене на контактни лещи (n=11)	68,4 $\pm$ 4,0	66,9 $\pm$ 3,7	59,5 $\pm$ 6,9	59,9 $\pm$ 5,6	< 0,05
Очни операции (n=8)	58,3 $\pm$ 8,9	58,1 $\pm$ 9,5	50,1 $\pm$ 6,5	50,5 $\pm$ 6,8	> 0,05
Интравитреални инжекции (n=1)	48,0	50,0	44,0	46,0	-
Системни заболявания (n=12)	52,7 $\pm$ 6,2	52,1 $\pm$ 7,6	46,7 $\pm$ 4,3	48,4 $\pm$ 7,7	< 0,05
Диабет (n=12)	53,8 $\pm$ 7,0	53,3 $\pm$ 8,4	47,4 $\pm$ 4,7	49,2 $\pm$ 7,8	< 0,05
Трансплантация на роговица (n=1)	46,0	41,0	42,0	42,0	-
UV-радиация (n=13)	64,2 $\pm$ 5,8	61,9 $\pm$ 5,0	48,5 $\pm$ 4,3	53,2 $\pm$ 5,1	< 0,01

В темпоралния квадрант, най-малка дебелина на лимбалния епител се установи при пациентите с идиопатични фактори (40,0  $\mu\text{m}$ ), а най-голяма – при пациентите, които носят контактни лещи (59,9  $\mu\text{m}$ ).

На табл. 4 са перствени резултатите от изследването на дебелината на лимбалния епител в четири квадранта с палисади на Vogt според етиологията. Резултатите от анализа показват, че средната дебелина на лимбалния епител в горен квадрант при пациенти с палисади на Vogt е по-голяма, като варира от 65,3  $\mu\text{m}$  при пациентите с химични/термични изгаряния до 71,4  $\mu\text{m}$  при лицата с ятрогенни фактори и в частност носене на контактни лещи. Подобна тенденция се наблюдава и в резултатите при изследването на долен и темпорален квадрант, където най-малка дебелина на лимбални епител е отчетена при пациентите с химични/термични изгаряния (съответно 66,3  $\mu\text{m}$  и 55,3  $\mu\text{m}$ ), а най-голяма при пациентите, които са носели контактни лещи (съответно 69,3  $\mu\text{m}$  и 65,6  $\mu\text{m}$ ).

**Таблица. 4. Сравнителен анализ на дебелината на лимбалния епител в четири квадранта според етиологията с палисади на Vogt**

	Горен квадрант	Долен квадрант	Назален квадрант	Темпорален квадрант	Р
Травми	65,5 ± 4,1	67,0 ± 4,2	67,0	57,7 ± 9,6	> 0,05
Химични/термични изгаряния	65,3 ± 6,0	66,3 ± 4,3	67,0	55,3 ± 8,4	> 0,05
Перфоративни травми	65,6 ± 2,5	67,7 ± 4,6	-	69,0	> 0,05
Заболявания на очите	70,1 ± 3,3	69,0 ± 2,7	64,5 ± 4,9	63,8 ± 4,6	< 0,05
Птеригиум	68,5 ± 2,4	68,0 ± 1,4	57,0	59,5 ± 7,8	> 0,05
Сухо око	70,5 ± 4,8	68,0 ± 3,1	62,7 ± 5,3	62,7 ± 6,2	> 0,05
Ятрогенни фактори	71,4 ± 3,5	69,3 ± 3,3	66,0 ± 3,7	65,6 ± 1,8	< 0,05
Носене на контактни лещи	71,4 ± 3,5	69,3 ± 3,3	66,0 ± 3,7	65,6 ± 1,8	< 0,05
Системни заболявания	68,0	71,0	-	60,0 ± 12,7	-
Диабет	68,0	71,0	-	60,0 ± 12,7	-
UV-радиация	68,5 ± 2,4	68,0 ± 1,4	57,0	59,5 ± 7,8	> 0,05

Съществена разлика в дебелината на лимбалния епител в четирите изследвани квадранта беше установена само при пациентите със заболявания на очите и тези с ятрогенни фактори (носене на контактни лещи) ( $p < 0,05$ ) (табл. 4).

За разлика от пациентите с палисади на Vogt, дебелината на лимбалния епител при лицата без палисади на Vogt е значително по-малка (табл. 5).

Резултатите показват наличието на сигнификантна разлика при всички изследвани групи с изключение на пациентите с ятрогенните фактори.

**Таблица. 5. Сравнителен анализ на дебелината на лимбалния епител в четири квадранта според етиологията без палисади на Vogt**

	Горен квадрант	Долен квадрант	Назален квадрант	Темпорален квадрант	Р
Идиопатични фактори	42,0	40,0	41,0	39,0	-
Травми	54,7 ± 8,2	52,1 ± 8,1	49,3 ± 5,5	50,0 ± 5,8	< 0,05
Химични/термични изгаряния	50,6 ± 6,6	48,6 ± 6,3	46,7 ± 4,8	47,7 ± 5,9	< 0,05
Перфоративни травми	61,8 ± 5,2	59,1 ± 6,8	53,4 ± 4,0	53,7 ± 3,1	< 0,05
Заболявания на очите	59,0 ± 7,5	58,5 ± 7,8	49,4 ± 5,2	52,9 ± 5,5	< 0,05
Птеригиум	65,5 ± 2,5	63,4 ± 3,6	47,3 ± 2,8	55,7 ± 2,9	< 0,05
Инфекции/Кератити	54,7 ± 8,6	51,5 ± 7,2	49,3 ± 6,3	51,6 ± 7,4	< 0,05
Сухо око	58,5 ± 10,6	59,7 ± 11,6	51,6 ± 7,3	51,8 ± 7,8	< 0,05
Буозна кератопатия	46,5 ± 4,2	44,0 ± 4,1	42,3 ± 1,3	43,0 ± 2,9	< 0,05
Ятрогенни фактори	57,2 ± 9,6	57,5 ± 10,5	49,2 ± 6,9	49,9 ± 7,4	> 0,05
Носене на контактни лещи	65,0 ± 1,4	65,0 ± 2,7	54,2 ± 3,1	55,3 ± 2,1	> 0,05
Очни операции	55,1 ± 9,9	56,4 ± 11,6	48,7 ± 7,8	49,0 ± 8,1	> 0,05
Интравитреални инжекции	48,0	50,0	44,0	46,0	-
Системни заболявания	48,8 ± 5,2	47,3 ± 5,9	44,5 ± 4,8	43,8 ± 4,2	< 0,05
Диабет	50,4 ± 7,2	49,1 ± 8,2	45,4 ± 5,5	45,2 ± 5,9	< 0,05
Трансплантация на роговица	46,0	41,0	42,0	42,0	-
UV-радиация	62,3 ± 6,0	60,9 ± 4,8	47,8 ± 3,7	53,0 ± 5,2	< 0,01

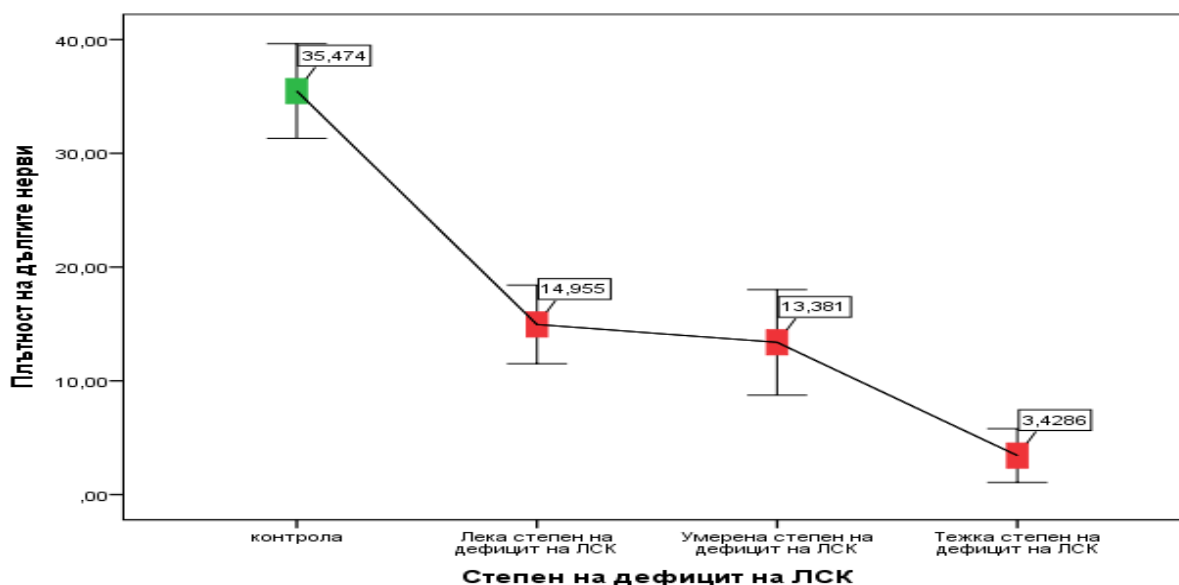
Най-малка дебелина на лимбалния епител във всички изследвани квадранти беше отчетена при пациентите с идиопатични фактори. Най-голяма дебелина на лимбалния епител в горен и темпорален квадрант беше установена при пациентите с

птеригиум (съответно 65,5  $\mu\text{m}$  и 55,7  $\mu\text{m}$ ), в долен и назален квадрант при пациентите, които са носили контактни лещи (съответно 65,0  $\mu\text{m}$  и 54,2  $\mu\text{m}$ ).

На фиг. 38 е представена средната плътност на дългите нерви в клиничната и контролната група. Резултатите показват наличието на съществена разлика ( $p < 0,001$ ), като изследваната плътност на дългите нерви в контролната група е приблизително 3 пъти по-голяма (35,474), отколкото в клиничната група (10,656).

Изследването на изменението на плътността на дългите нерви според степента на дефицит на ЛСК показва, че с нарастване на дефицита на ЛСК, плътността на дългите нерви значително намалява ( $p < 0,01$ ) и от 14,955 в групата на пациентите с лека степен на дефицит на ЛСК плътността намалява с повече от 4 пъти до 3,4286 в групата на пациентите с тежък дефицит на ЛСК (фиг. 38). В нашата извадка не се установи 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 намерихме статистически значима разлика между лицата от контролната група и тези с лека и умерена степен на дефицит на ЛСК ( $p < 0,001$ ), където разликата е над 2 пъти, а с лицата с тежка степен на дефицит на ЛСК разликата е повече от 10 пъти ( $p < 0,001$ ).



**Фиг. 38. Средна плътност на дългите нерви според степента на дефицит на ЛСК**

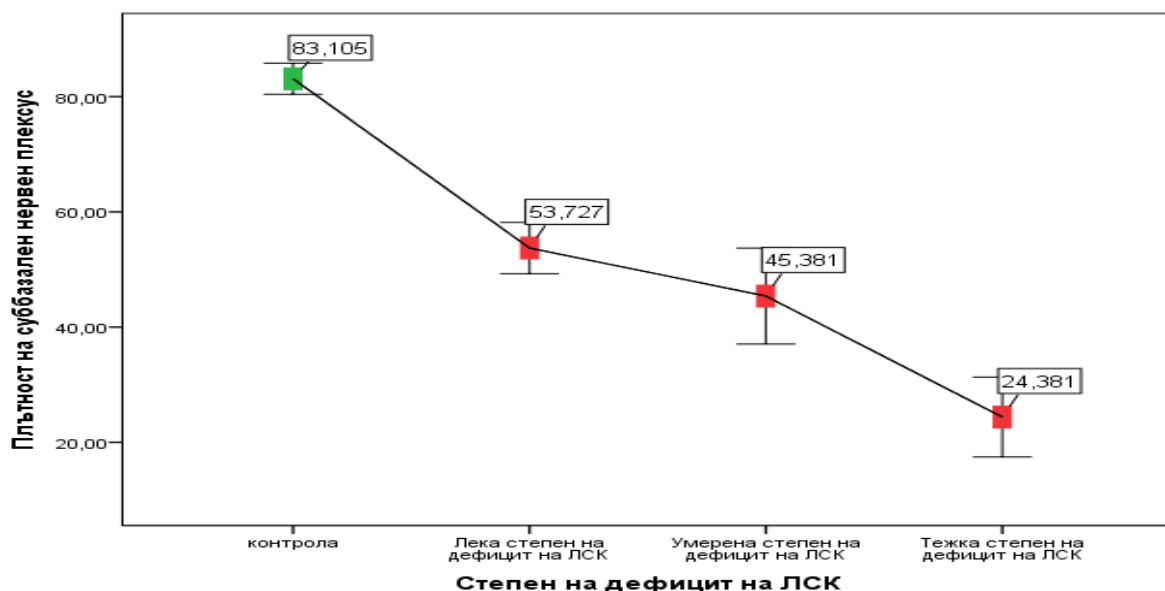
Изследването на плътността на суббазален нервен плексус между пациентите от контролната и клиничната група показва, че средната плътност при лицата от контролната група е повече от 2 пъти по-голяма отколкото тази на пациентите от клиничната група ( $p < 0,001$ ) (фиг. 39).

На фиг. 40 са представени резултатите от анализа на плътността на суббазален нервен плексус според степента на дефицит на ЛСК, като беше намерена съществена

разлика между отделните степени ( $p < 0,001$ ), а разликата в плътността между тежката и леката степен е повече от два пъти.



**Фиг. 39. Средна плътност на суббазален нервен плексус**



**Фиг. 40. Средна плътност на суббазален нервен плексус според степен на дефицит на ЛСК**

Освен между степените на дефицит на ЛСК, разлика в плътността на суббазален нервен плексус беше установена и между пациентите от контролната група и тези с лека степен на дефицит на ЛСК ( $p < 0,001$ ), където разликата не е толкова голяма колкото при плътността на дългите нерви (1,5 пъти). При пациентите с умерена степен на дефицит на ЛСК разликата в плътността на суббазален нервен плексус с контролната група е 1,8 пъти (съответно 45,381 към 83,105;  $p < 0,001$ ), докато при пациентите с тежък дефицит на ЛСК е 3,4 пъти (съответно 24,381 към 83,105;  $p < 0,001$ ) (фиг. 40).

На табл. 6 е представена средната плътност на дългите нерви и на суббазален нервен плексус според етиологията. Резултатите показват, че с най-ниска плътност на

дългите нерви са пациентите с интравитреални инжекции (2,00), а на суббазален нервен плексус са пациентите с идиопатични фактори (10,00).

**Таблица. 6. Плътност на дългите нерви и на суббазален нервен плексус според етиологията**

	Плътност на дълги нерви	Плътност на суббазален нервен плексус
Идиопатични фактори	-	10,0
Травми	10,65 ± 9,26	39,38 ± 19,89
Химични/термични изгаряния	7,78 ± 9,22	32,78 ± 20,29
Перфоративни травми	15,36 ± 7,48	50,18 ± 14,17
Заболявания на очите	11,55 ± 9,73	45,52 ± 17,74
Птеригиум	12,25 ± 6,65	55,00 ± 8,75
Инфекции/Кератити	3,57 ± 6,26	27,43 ± 17,56
Сухо око	14,77 ± 10,10	49,31 ± 18,37
Булозна кератопатия	3,25 ± 3,95	22,00 ± 9,83
Ятрогенни фактори	14,27 ± 11,60	46,33 ± 19,40
Носене на контактни лещи	19,18 ± 9,60	55,09 ± 11,55
Очни операции	6,37 ± 5,71	36,37 ± 18,74
Интравитреални инжекции	2,00	21,00
Системни заболявания	5,82 ± 9,46	26,36 ± 17,66
Диабет	6,33 ± 9,19	28,17 ± 17,96
Трансплантация на роговица	3,00	28,00
UV-радиация	10,07 ± 6,66	47,77 ± 15,92

С най-голяма плътност както на дългите нерви, така и на суббазален нервен плексус са пациентите, които са носили контактни лещи (съответно 19,18 и 55,09).

На фиг. 41 е направено схематично представяне на средната дебелина и разликата в роговичния епител в централна, горна, долна, темпорална и назална част, при използването на двата метода на изследване (AS-OST и IVCМ) при пациенти в контролната група.

Резултатите показват, че при използването на AS-OST се получават по-високи резултати при отчитането на дебелината на епитела във всички изследвани квадранти, отколкото използването на IVCМ.

Съществена разлика между двата метода в нашето изследване беше установена в централен роговичен епител (1,73 μm) и темпоралния квадрант (1,58 μm).

AS-OCT



IVCM



РАЗЛИКА



**Фиг. 41. Схематично представяне на средната дебелина и разликата в роговичния епител в централна, горна, долна, темпорална и назална част, при използването на двата метода на изследване при пациенти в контролната група**

На табл. 7 е представен сравнителен анализ на дебелината на епитела между пациентите на възраст под и над 40 г. в контролната група.

При лицата до 40 г. съществена разлика в дебелината изследвана и по двата метода беше установена само в централния роговичен епител ( $p=0,004$ ). Подобна тенденция се установи и при лицата над 40 г., като освен в централния роговичен епител ( $p=0,007$ ), разлика в дебелината беше установена и в назалния квадрант ( $p=0,05$ ).

Изследването на дебелината на епитела, измерена чрез IVCM показва наличието на съществена разлика при пациентите под и над 40 г. във всички изследвани части с изключение на темпоралния квадрант.

Резултатите от изследването на дебелината на епитела, измерена чрез AS-OCT показаха наличието на съществена разлика във всички изследвани части.

Интересен факт е, че и при двата метода в централния роговичен епител беше установена по-голяма дебелина при лицата над 40 г. (съответно 53,8  $\mu\text{m}$  за IVCM и 55,4  $\mu\text{m}$  за AS-OCT). При останалите изследвани части дебелината на епитела е по-голяма



при лицата под 40 г. Статистически значимите резултати са представени с удебелен шрифт в таблица 7.

**Таблица. 7. Сравнителен анализ на дебелината на епитела между пациентите на възраст под и над 40 г. в контролната група**

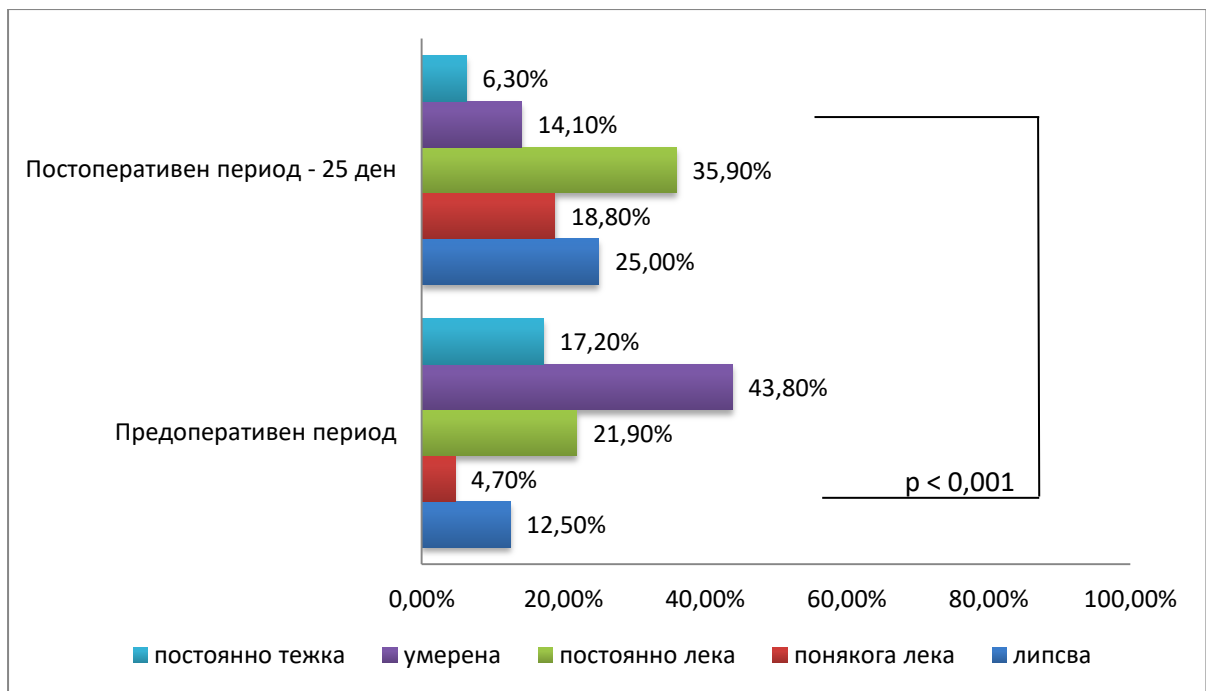
Показател		CC ( $\mu\text{m}$ )	SL ( $\mu\text{m}$ )	IL ( $\mu\text{m}$ )	TL ( $\mu\text{m}$ )	NL ( $\mu\text{m}$ )
< 40 г.	<b>IVCM</b>	<b>51,7 ± 2,3</b>	69,6 ± 3,3	72,8 ± 4,9	57,3 ± 4,0	57,9 ± 4,5
	<b>AS-OCT</b>	<b>53,6 ± 2,1</b>	70,6 ± 2,4	73,8 ± 5,3	59,1 ± 3,9	59,1 ± 4,4
	<b>p</b>	<b>0,004</b>	0,408	0,500	0,121	0,356
≥ 40 г.	<b>IVCM</b>	<b>53,8 ± 1,3</b>	64,7 ± 1,7	63,3 ± 4,3	55,4 ± 2,1	<b>52,7 ± 2,4</b>
	<b>AS-OCT</b>	<b>55,4 ± 1,7</b>	64,7 ± 2,1	64,8 ± 3,6	56,7 ± 1,5	<b>54,4 ± 2,2</b>
	<b>p</b>	<b>0,007</b>	1,0	0,323	0,063	<b>0,05</b>
IVCM	< 40 г.	<b>51,7 ± 2,3</b>	<b>69,6 ± 3,3</b>	<b>72,8 ± 4,9</b>	57,3 ± 4,0	<b>57,9 ± 4,5</b>
	≥ 40 г.	<b>53,8 ± 1,3</b>	<b>64,7 ± 1,7</b>	<b>63,3 ± 4,3</b>	55,4 ± 2,1	<b>52,7 ± 2,4</b>
	<b>p</b>	<b>0,003</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>	0,108	<b>&lt; 0,001</b>
AS-OCT	< 40 г.	<b>53,6 ± 2,1</b>	<b>70,6 ± 2,4</b>	<b>73,8 ± 5,3</b>	<b>59,1 ± 3,9</b>	<b>59,1 ± 4,4</b>
	≥ 40 г.	<b>55,4 ± 1,7</b>	<b>64,7 ± 2,1</b>	<b>64,8 ± 3,6</b>	<b>56,7 ± 1,5</b>	<b>54,4 ± 2,2</b>
	<b>p</b>	<b>0,01</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>0,039</b>	<b>0,001</b>

CC – централна част на роговицата; SL – горен квадрант лимбална зона; IL – долен квадрант лимбална зона, TL – темпорален квадрант лимбална зона; NL – назален квадрант лимбална зона

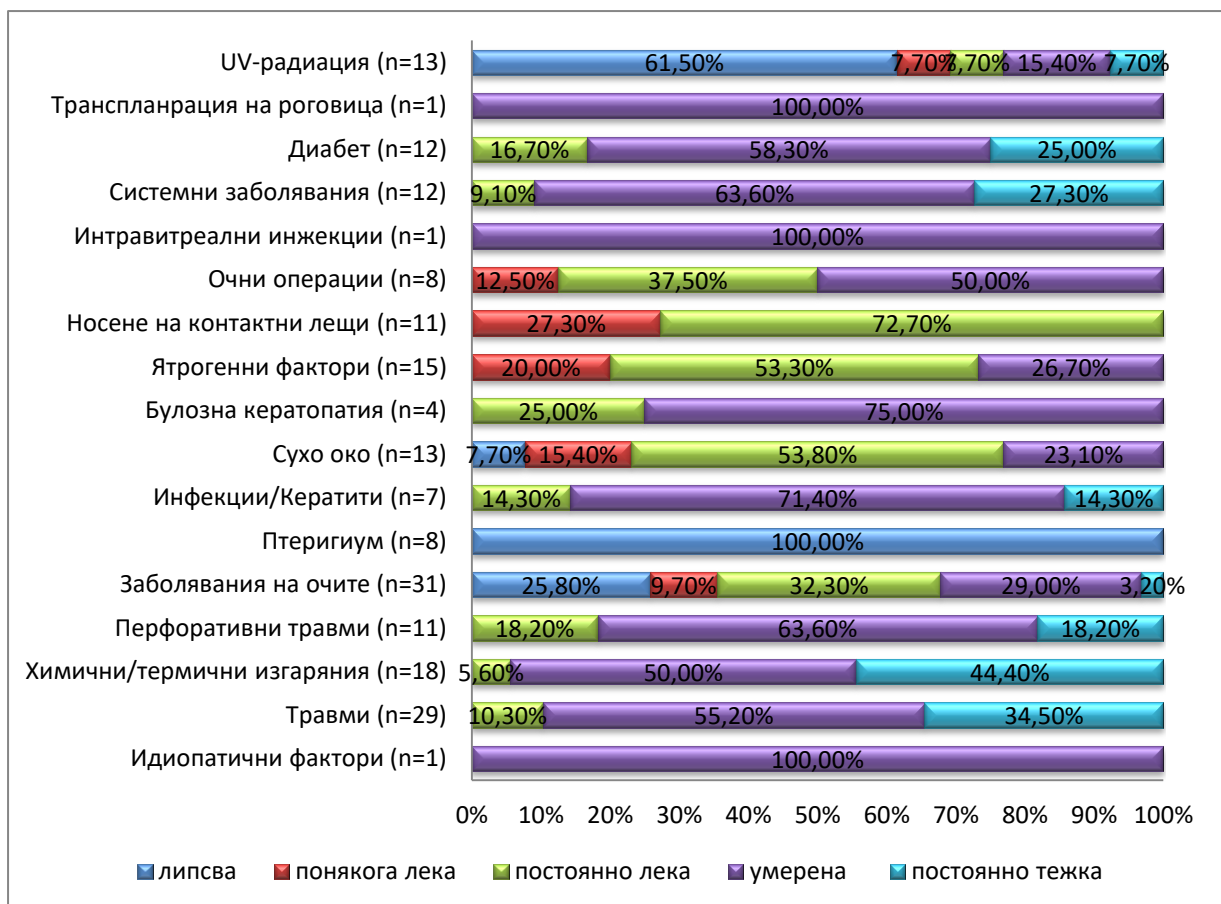
### 3. Оценка на субективната симптоматика и зрителна острота при пациенти с дефицит на лимбални стволови клетки преди и след проведено лечение

При изследването на дефицита на лимбални стволови клетки бяха използвани показатели за субективна симптоматика, които бяха проследени предоперативно и постоперативно на 8 ден. Резултатите от проследяването показват, че в предоперативният период над 60 % от пациентите изпитват умерена и постоянна тежка болка, докато в постоперативния период болката значително намалява на 25-тия ден, където в 43,80 % от случаите болка липсва или понякога се усеща лека болка (Фиг. 42.)

Резултатите представени на фиг. 43 показват, че има сигнификантна разлика във възприятията за болка според етиологичния фактор ( $p < 0,001$ ). С най-ясно изразена болка в предоперативния период са пациентите с травми (34,50 % постоянно тежка) и в частност с изгаряния (44,40 %). С изключение на единичните пациенти, при които болката е умерена до тежка, най-често умерената болка беше установена при пациенти с булозна кератопатия (75,00 %), инфекции/кератити (71,40 %) и пациентите със системни заболявания (63,60 %), от които основен е диабета (58,30 %).



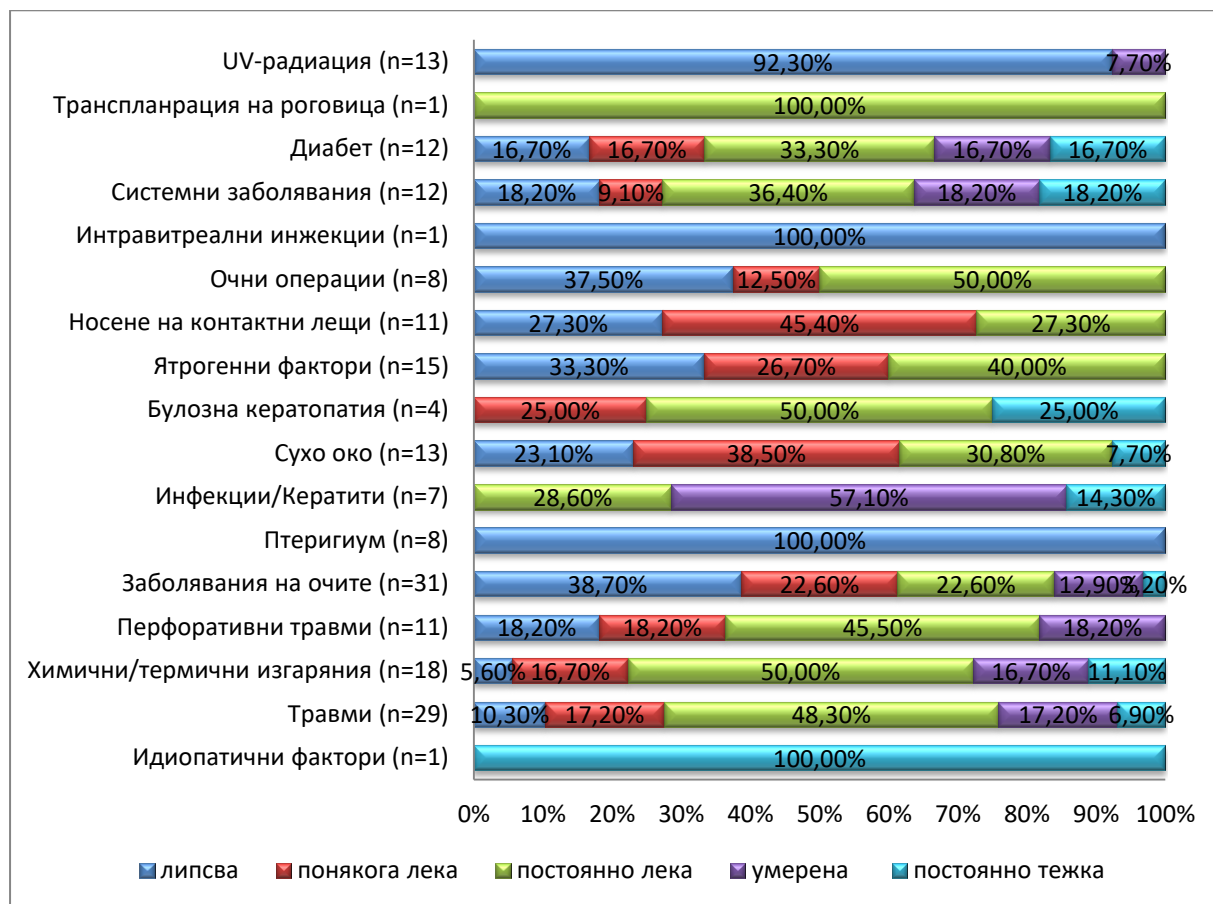
**Фиг. 42. Болка – предоперативна и постоперативна на 25 ден**



**Фиг. 43. Болка в предоперативния период според етиологията**

От лека болка се оплакват пациентите с ятрогенни фактори (53,30 %), от които са носенето на контактни лещи (72,70 %). Друга група пациенти са тези, които имат диагноза сухо око - 53,80 % с постоянно лека болка (фиг. 44).

Впечатление прави, че пациентите с птеригиум не се оплакват от болка, като висок относителен дял на липсата на болка имат и пациентите, които са били изложени на UV-радиация (61,50 %).

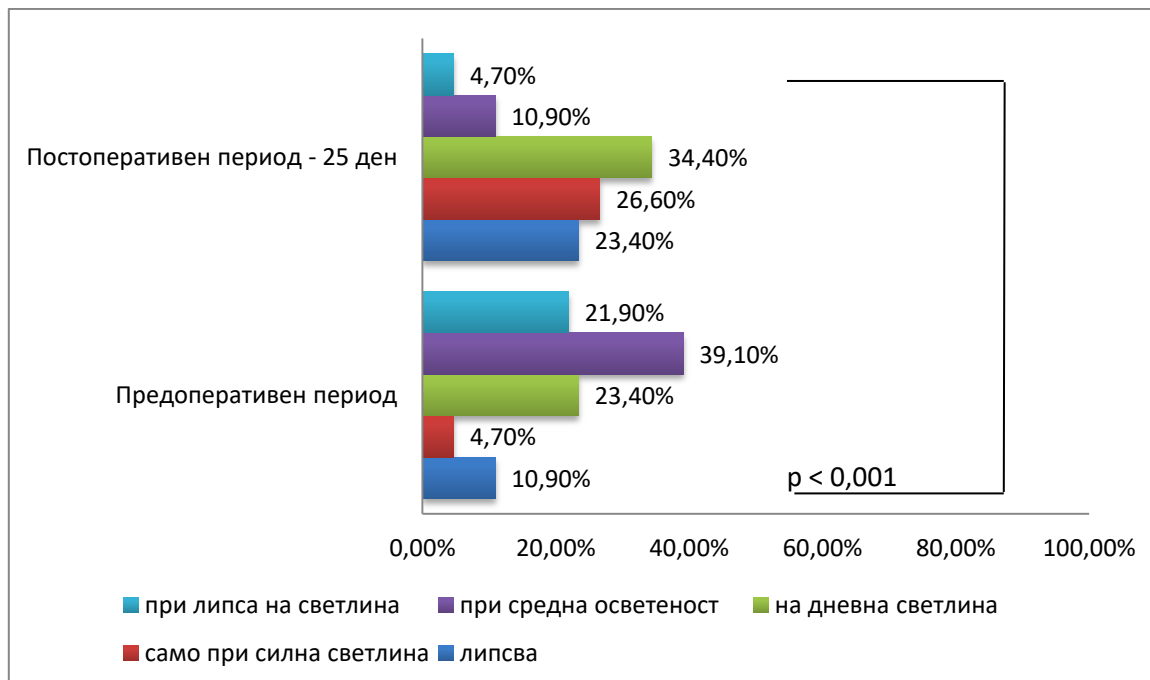


**Фиг. 44. Болка в постоперативния период на 25 ден според етиологията**

Резултатите от фиг. 44 показват значително подобряване на болковия синдром при различните групи пациенти, като при повечето се наблюдава предимно липса на болка или понякога лека болка ( $p < 0,001$ ).

На фиг. 45 е представена оценка на фотофобията в пред- и постоперативен период, като е доказана статистически значима разлика между двата периода ( $p < 0,001$ ). В предоперативния период преобладават пациентите, които се оплакват от фотофобия при средна осветеност (39,10 %), висок относителен дял имат и пациентите с оплаквания при липса на светлина (21,90 %). На 25-я ден след оперативния период се наблюдава повишаване на пациентите с оплаквания от фотофобия при дневна светлина (34,40 %) както и повишаване на тези пациенти, които имат подобни оплаквания само при силна светлина (26,60 %) или въобще липсва

оплакване (23,40 %). Впечатление прави значително по-ниската честота на пациентите с фотофобия при средна осветеност (10,90 %), което е приблизително 2 пъти по-ниска честота и фотофобия при липса на осветеност (4,70 %), което е приблизително 5 пъти по-ниско в сравнение с предоперативния период.



**Фиг. 45. Фотофобия – предоперативна и постоперативна на 25 ден**

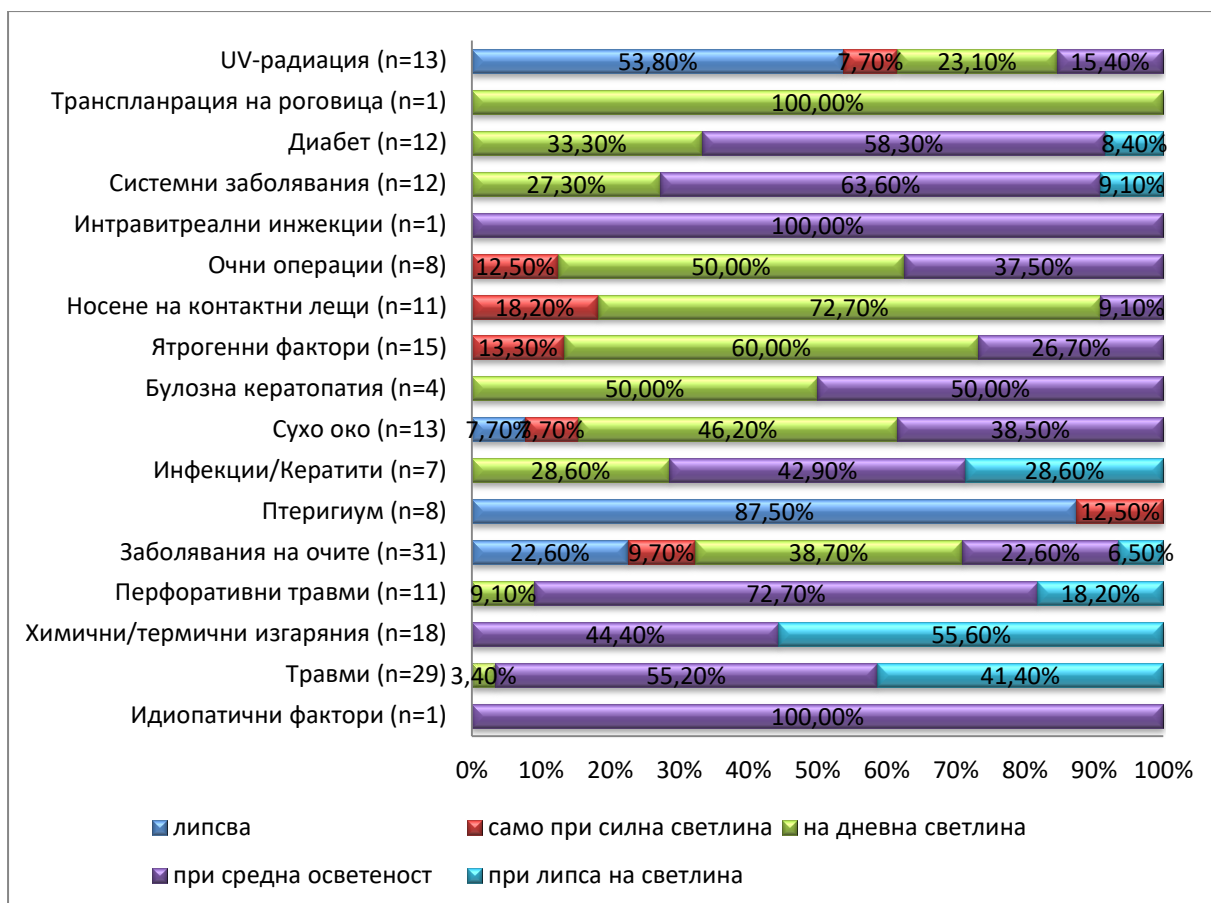
На фиг. 46 е представена фотофобията според етиологията в предоперативния период. Резултатите показват сигнификантна разлика между отделните групи пациенти ( $p < 0,001$ ).

При пациентите с травми е характерна висока честота на фотофобията при липса на светлина (41,40 % за пациенти с травма и 55,60 % за пациенти с химически изгаряния).

При пациентите със системни заболявания и в частност диабет висока честота има фотофобията при средна осветеност (съответно 63,60 % и 58,30 %).

При пациентите с птериgium и тези, изложени на UV-радиация висока честота има липсата на фотофобия (съответно 87,50 % и 53,80 %).

При останалите пациенти честотата на фотофобията варира в рамките на дневната светлина.



**Фиг. 46. Фотофобия в предоперативния период според етиологията**

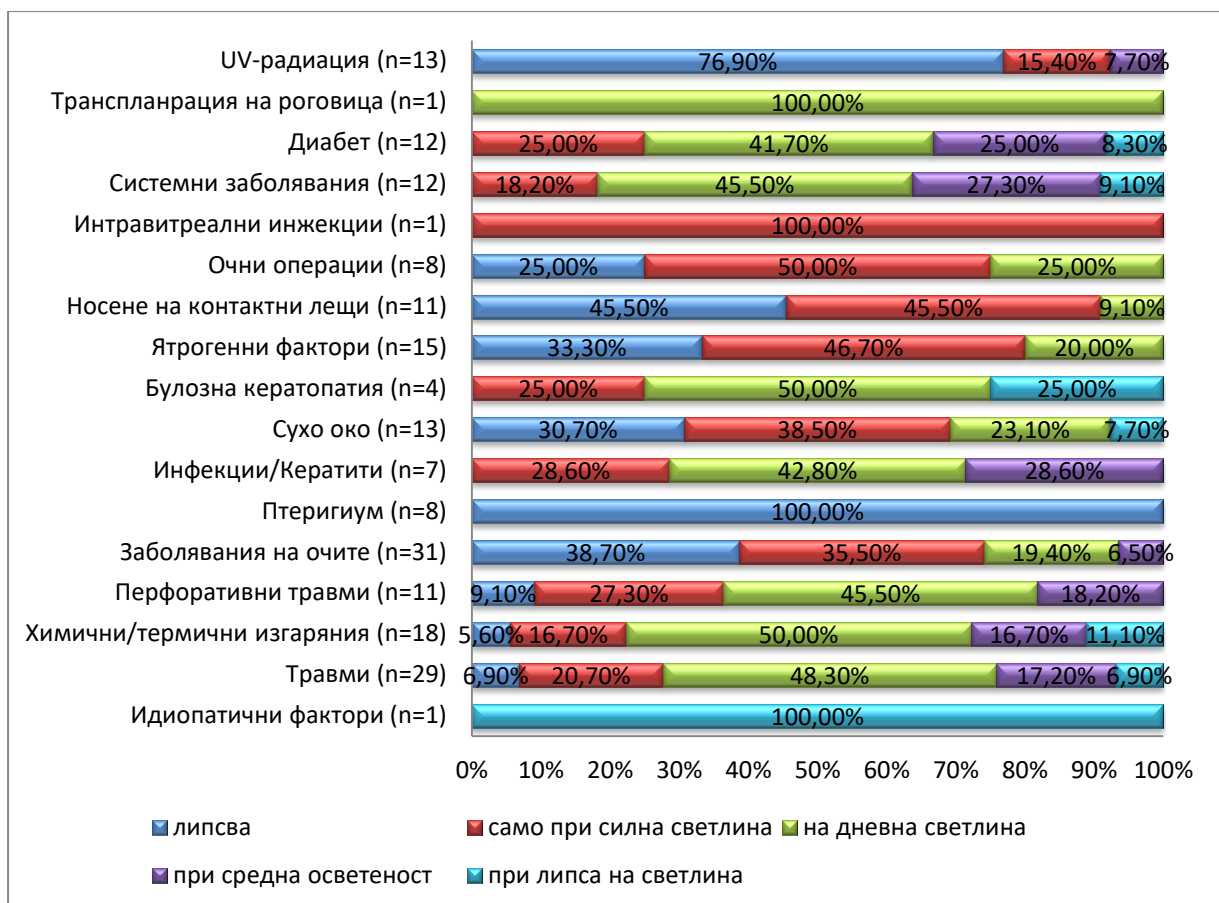
На 25-я ден след оперативен период се наблюдава значителна промяна във фотофобията при всички пациенти ( $p < 0,001$ ), като резултатите варират от липса на фотофобия до проява на дневна светлина (фиг. 47).

Оплакванията от фотофобия при средна осветеност или липса на светлина са значително по-малко в сравнение с предоперативен период (фиг. 47)

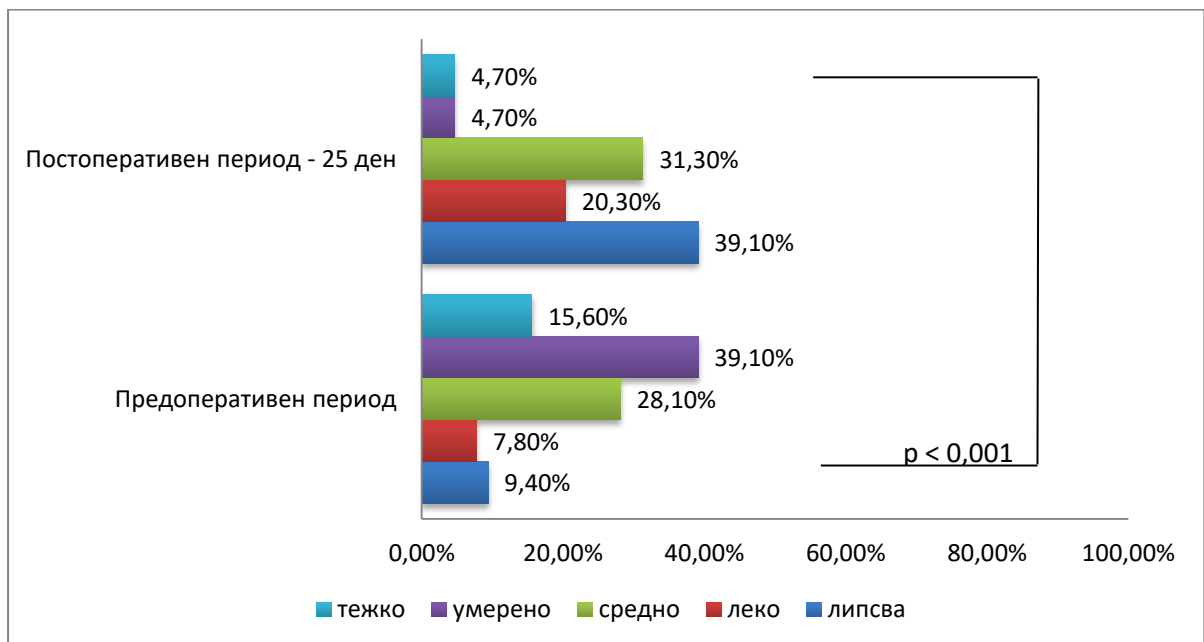
Зачервяването е друг субективен фактор, който сме оценили в нашата извадка от пациенти. Резултатите от сравнителният анализ в преоперативен период и на 25-я ден след лечението показва наличието на съществена разлика ( $p < 0,001$ ), като в предоперативен период над половината от изследваните лица имат умерено или тежко зачервяване (54,70 %), докато на 25-я ден с подобно оплакване са общо 9,40 % (фиг. 48).

Впечатление прави, че на 25-я ден пациентите с липса на зачервяване са 39,10 %, докато в предоперативния период са били само 9,40 %. Подобни са резултатите и по отношение на лекото зачервяване, където в предоперативния период е било 7,80 %, а в постоперативния период е 20,30 %.

Средното зачервяване не показва значителна разлика в предоперативния и постоперативния период.



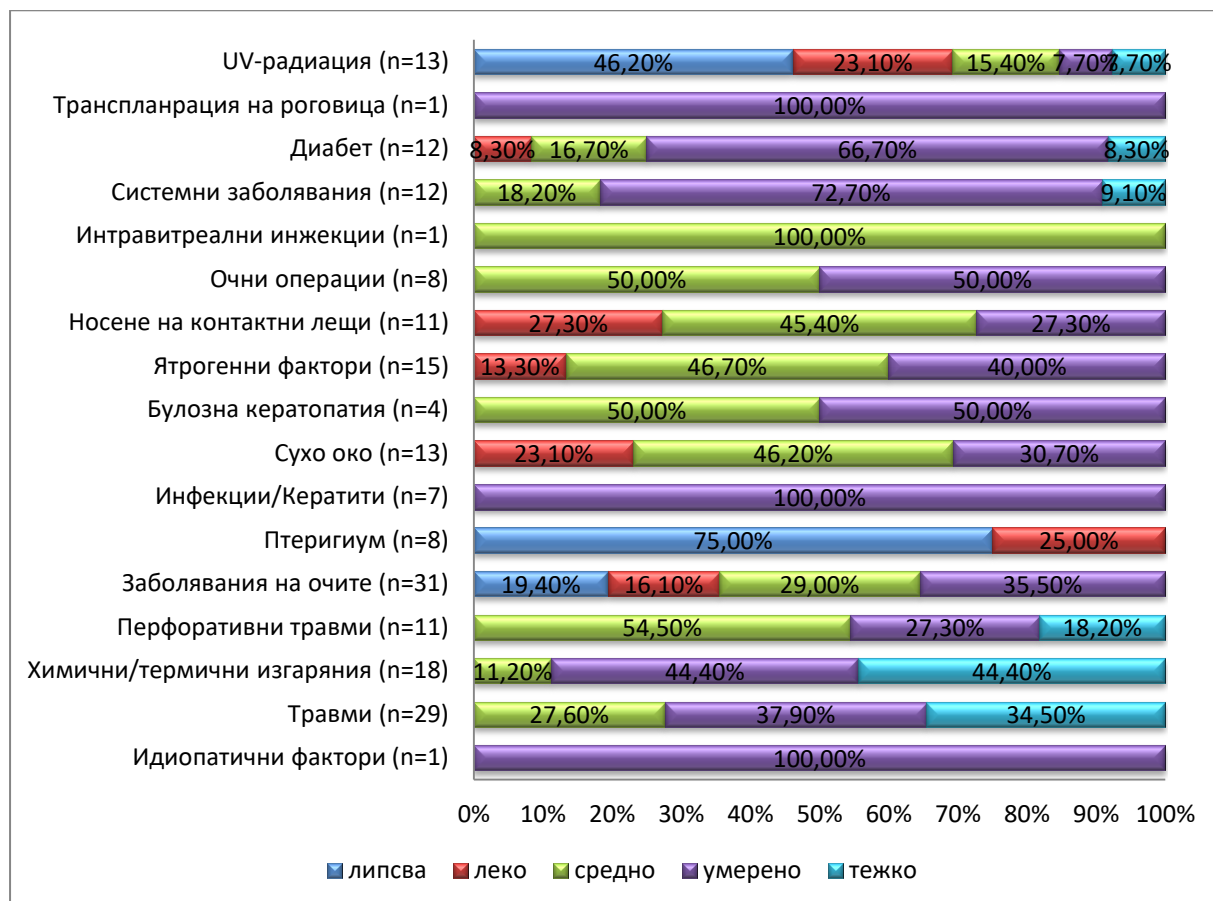
**Фиг. 47. Фотофобия в постоперативния период на 25 ден според етиологията**



**Фиг. 48. Зачервяване – предоперативно и постоперативно на 25 ден**

С изявено тежко зачервяване в предоперативния период се открояват пациентите с травми (съответно 34,50 % и 44,40 % за пациентите с химични изгаряния). При останалите пациенти преобладава относителният дял на средните и умерени зачервявания ( $p < 0,001$ ).

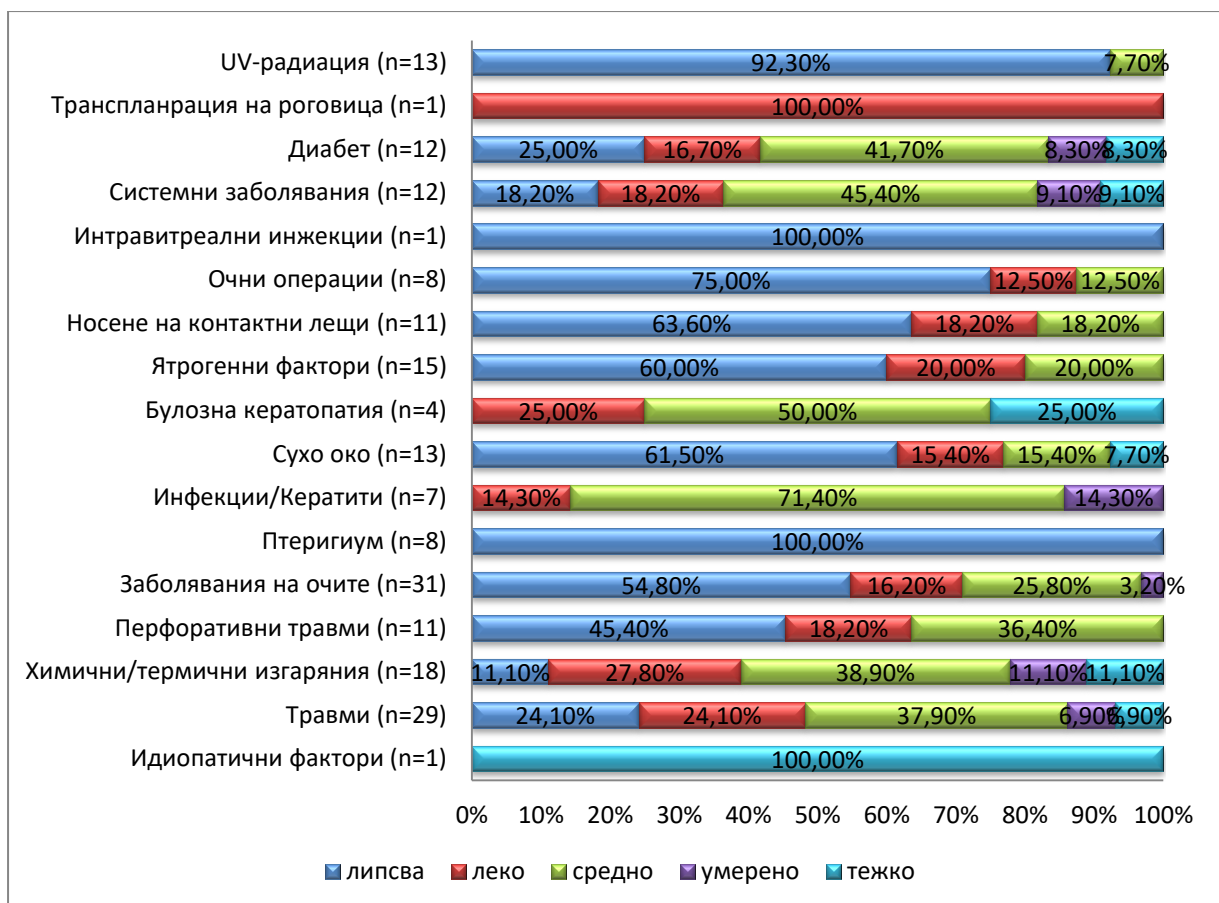
Впечатление прави, че при пациентите с птериgium и тези, изложени на UV-радиация висок относителен дял има липсата на зачервяване (фиг.49).



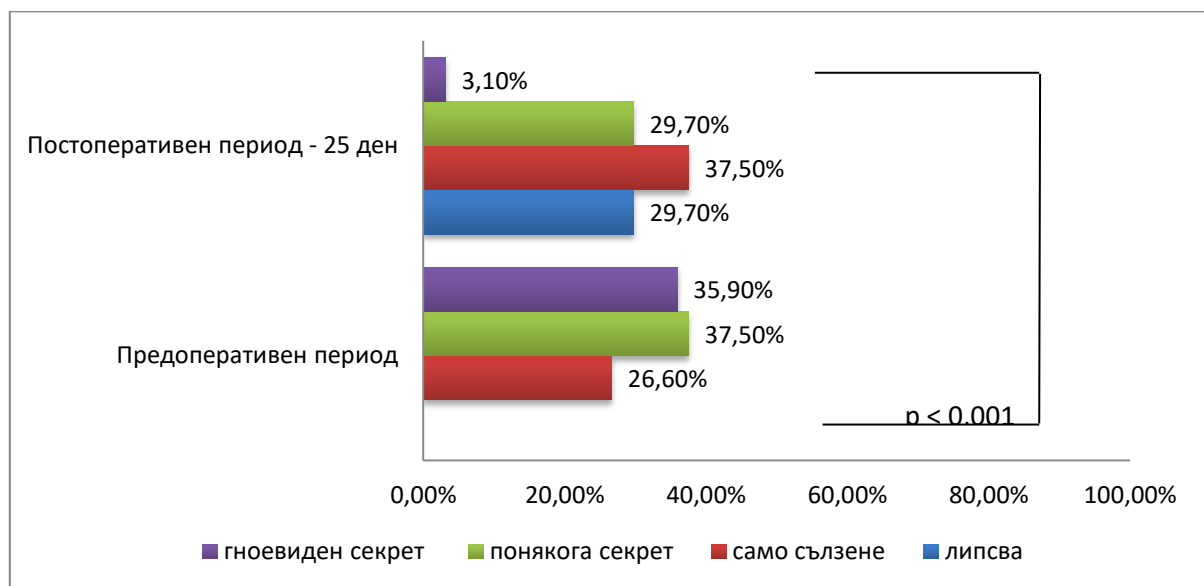
**Фиг. 49. Зачервяване в предоперативния период според етиологията**

На фиг. 50 е представено зачервяването при пациентите на 25-я ден след проведеното лечение. Резултатите показват, че с изключение на травмите, химическите изгаряния, пациентите със системни заболявания и кератити, където преобладава средното зачервяване, при всички останали се отчита подобряване на състоянието и достигане на състояние без зачервяване ( $p < 0,001$ ).

Сълзенето е последният изследван субективен фактор, като се установи съществена разлика между предоперативния и постоперативния период ( $p < 0,001$ ) (фиг. 51). Резултатите показват, че при всички пациенти се наблюдава някаква форма на сълзене в предоперативния период, като преобладават тези със секрет (37,50 %) следвани от пациентите с гноевиден секрет (35,90 %).



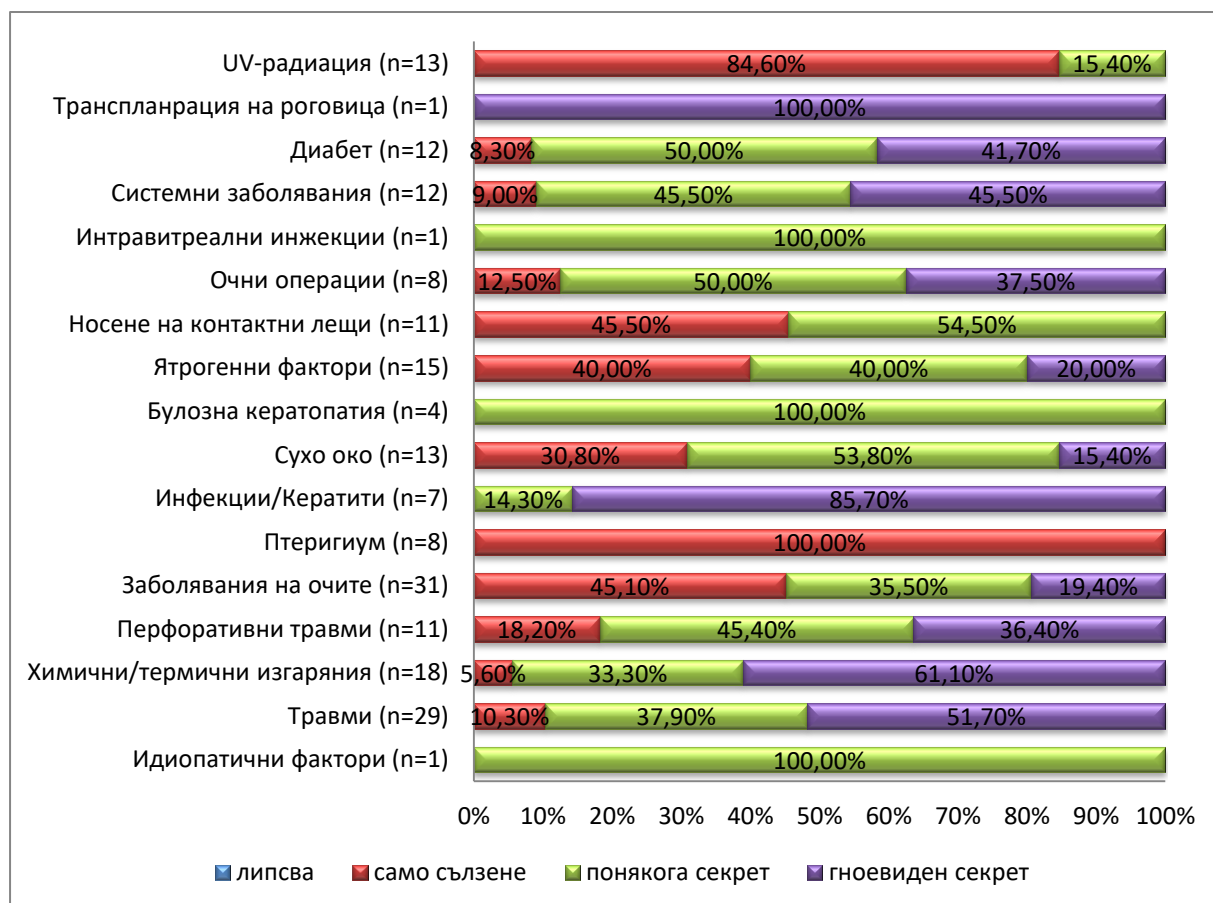
**Фиг. 50. Зачервяване в постоперативния период на 25 ден според етиологията**



**Фиг. 51. Сълзене – предоперативно и постоперативно на 25 ден**



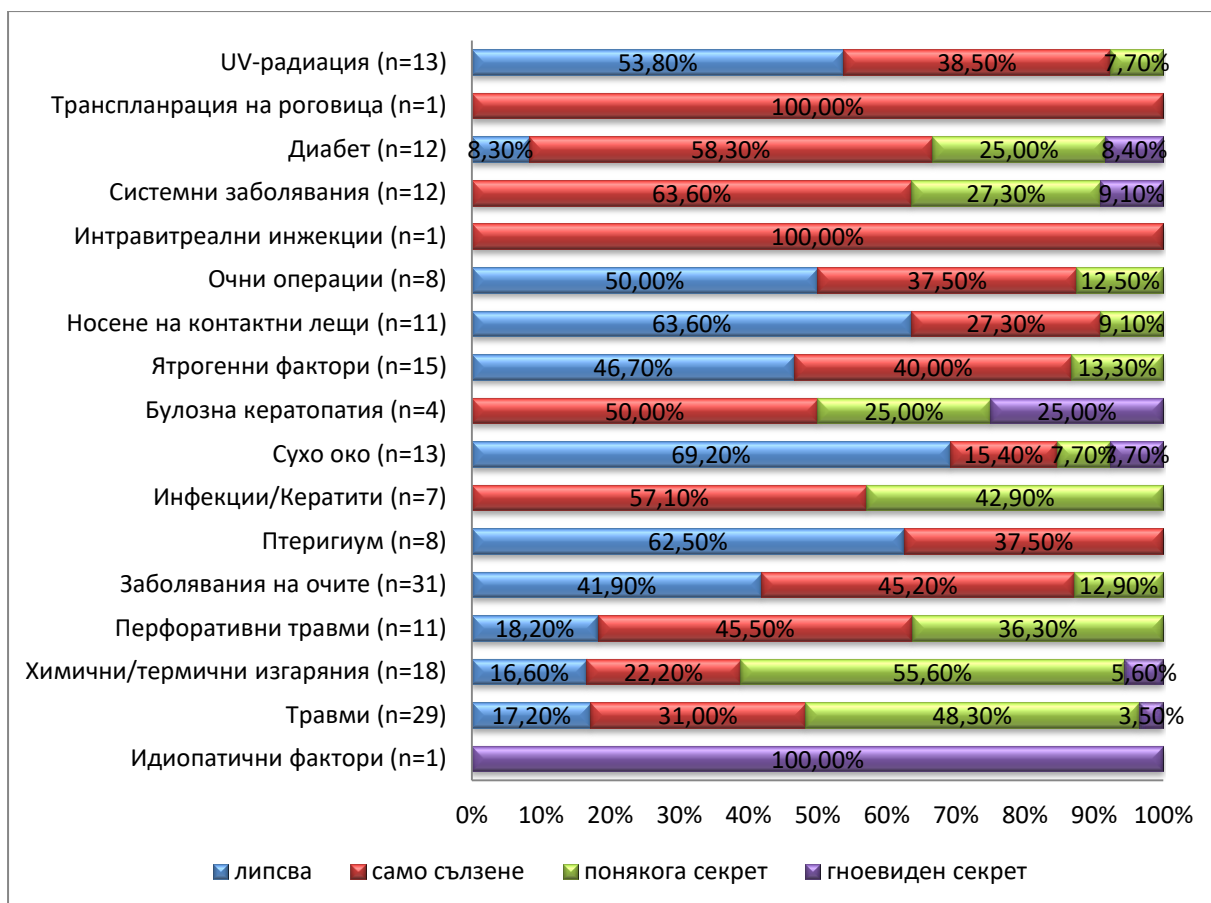
На 25-я ден относителният дял на пациентите с гноевиден секрет намалява повече от 10 пъти на 3,10 %, като съществено се увеличават пациентите само със сълзене – 37,50 % и тези без сълзене (29,70 %).



**Фиг. 52. Сълзене в предоперативния период според етиологията**

Резултатите представени на фиг. 52 показват, че в предоперативния период преобладава предимно появата на секрет или гноевиден секрет при повечето пациенти ( $p < 0,05$ ). Изключение правят само пациентите с птериgium, при които се установява само сълзене и при 84,60 % от пациентите, изложени на UV-радиация.

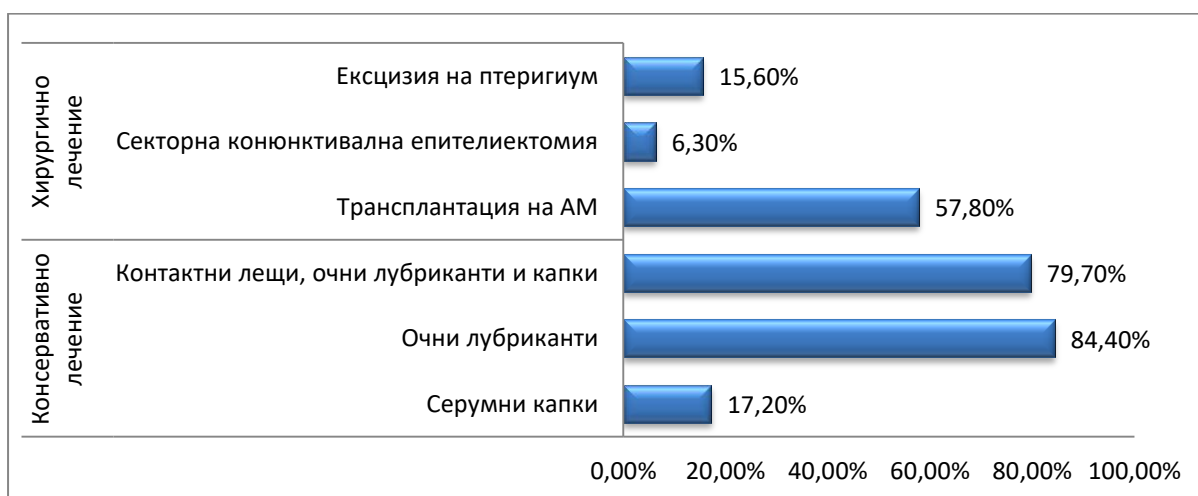
На фиг. 53 е представено изменението в сълзенето на 25-я ден след лечението. Резултатите показват основно липса на сълзене или само сълзене при значителна част от пациентите.



**Фиг. 53. Сълзене в постоперативния период на 25 ден според етиологията**

#### 4. Анализ на резултатите за ефективност от проведеното лечение

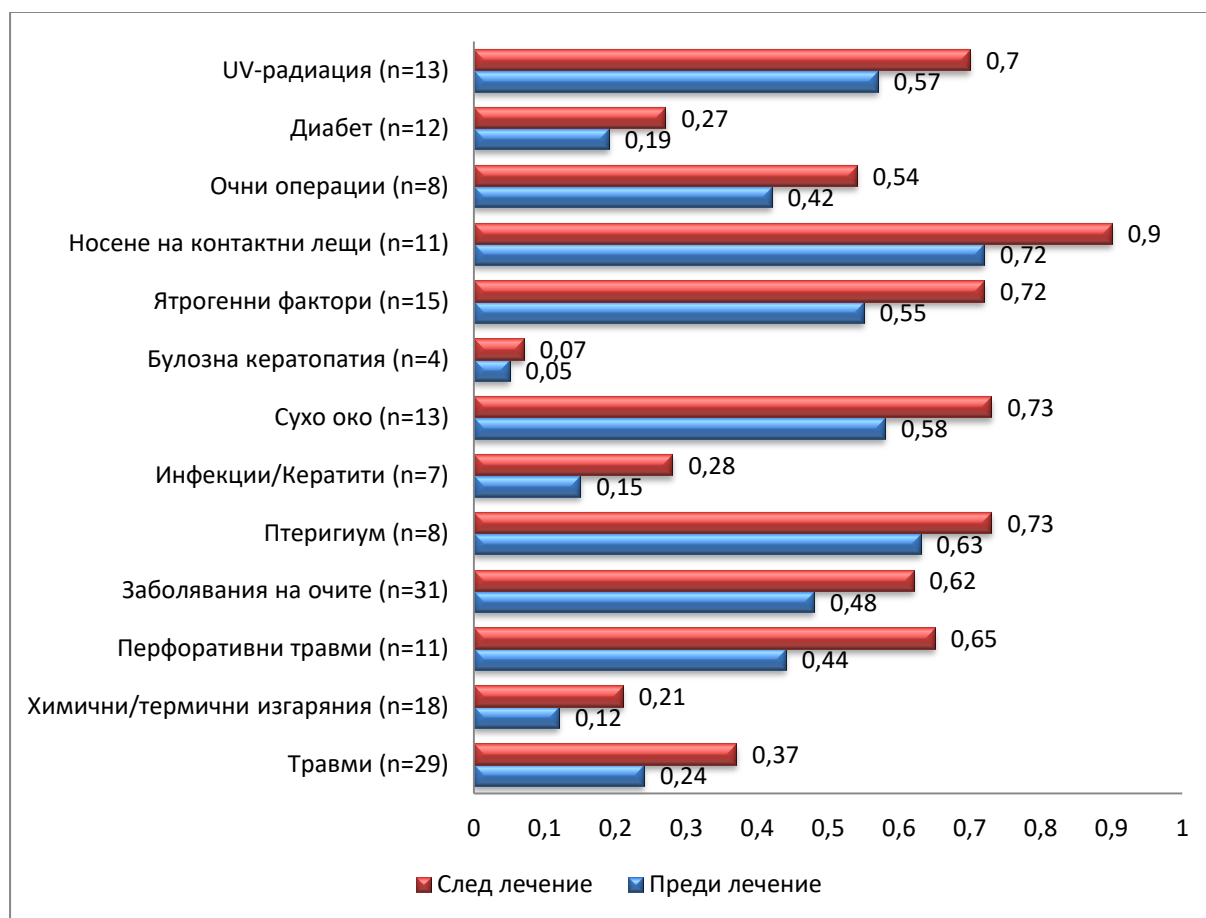
От изследваните лица в клиничната група 29,70 % (19) са провели консервативно лечение, а при 70,30 % (45) се е наложило провеждането на хирургична процедура (Фиг. 54).



**Фиг. 54. Проведено лечение**

На фиг. 55 са представени резултатите в изменението на зрителната острота преди и след проведено лечение според етиологичните фактори. Резултатите показват наличието на съществени разлики при всички групи пациенти с изключение на пациентите с булозна кератопатия (изменение само с 0,02 в зрителната острота).

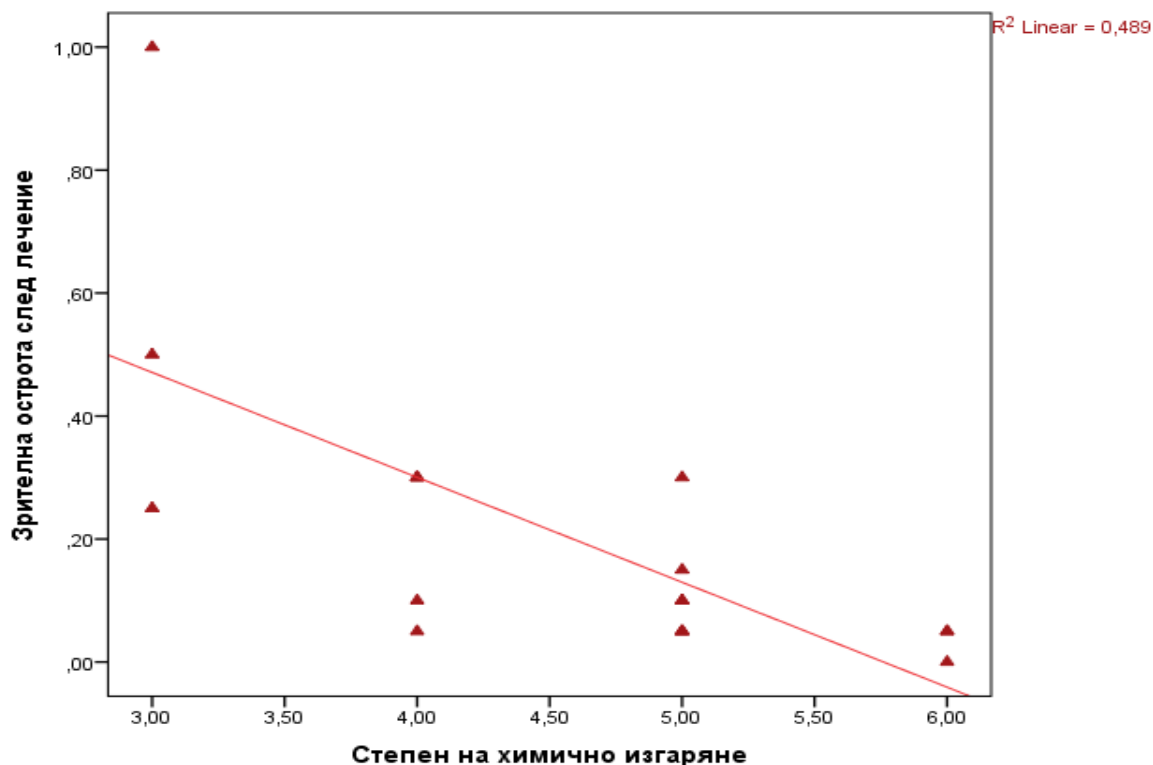
Най-добри резултати са отчетени при пациентите, които носят контактни лещи. Пациентите с диабет, инфекции и кератити, химични/термични изгаряния и травми въпреки проведената терапия остават със слабо зрение. Това показва, че независимо от проведената терапия и напредъка на медицината в лечебно-диагностичните методи, успехът от проведеното лечение до голяма степен зависи и от тежестта на увреждането.



**Фиг. 55. Изменение в зрителната острота преди и след лечение**

Класически пример за изследване на тежестта на увреждането върху зрителната острота е анализа на влиянието на степента на химичното изгаряне (фиг. 56). Резултатите показват, че независимо от проведеното лечение, при пациентите с тежка степен на химичното изгаряне не могат да се постигнат значителни резултати и те остават със зрителна острота близко до слепотата. От друга страна при пациентите в по-леката степен на изгаряне се наблюдава значително подобрение на зрението. Може

да се каже, че резултатите от лечението и подобрието на зрителната острота в 23,90 % зависят от степента на химическото изгаряне.



**Фиг. 56. Регресионен анализ между степента на химично изгаряне и зрителна острота след лечение**

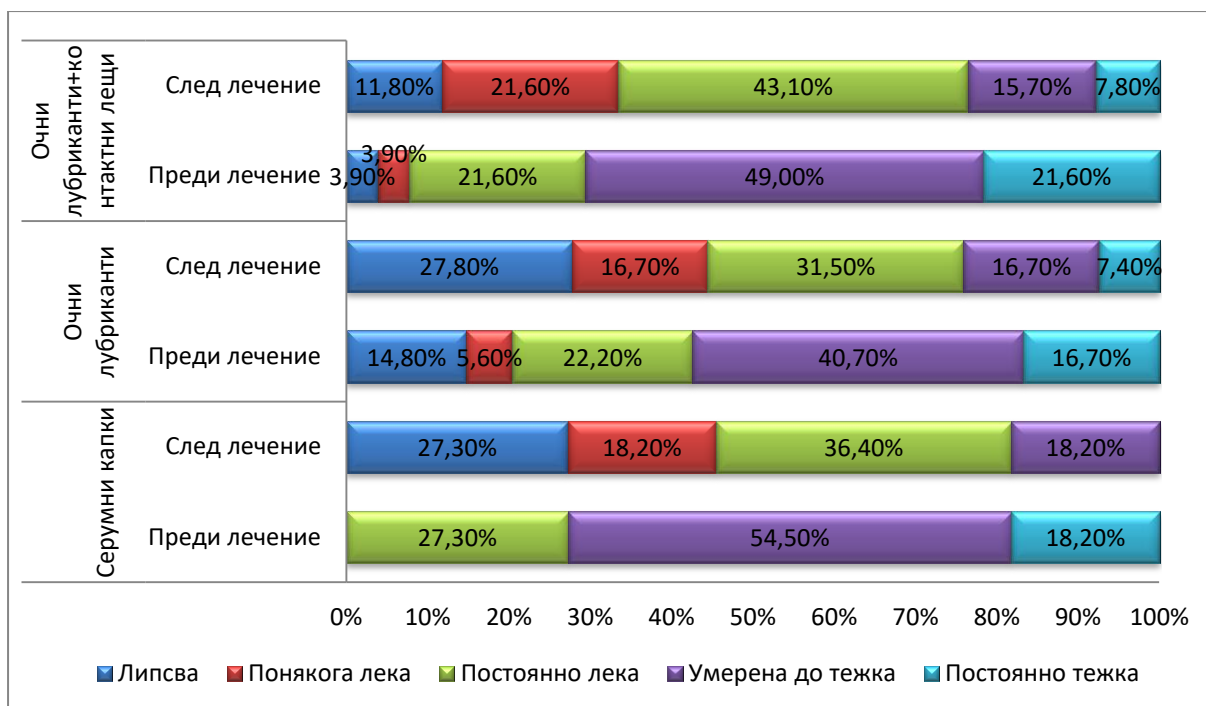
На фиг. 57, 58, 59 и 60 са представени измененията в субективната симптоматика при приложението на различните видове консервативно лечение.

От трите вида консервативно лечение приложението на серумни капки показва най-добри резултати по отношение на контролиране на болката, като след лечение нито един пациент не се оплаква от този симптом, докато при другите две лечения продължава да има пациенти, които изпитват постоянно тежка болка и след лечение ( $p < 0,05$ ) (фиг. 57).

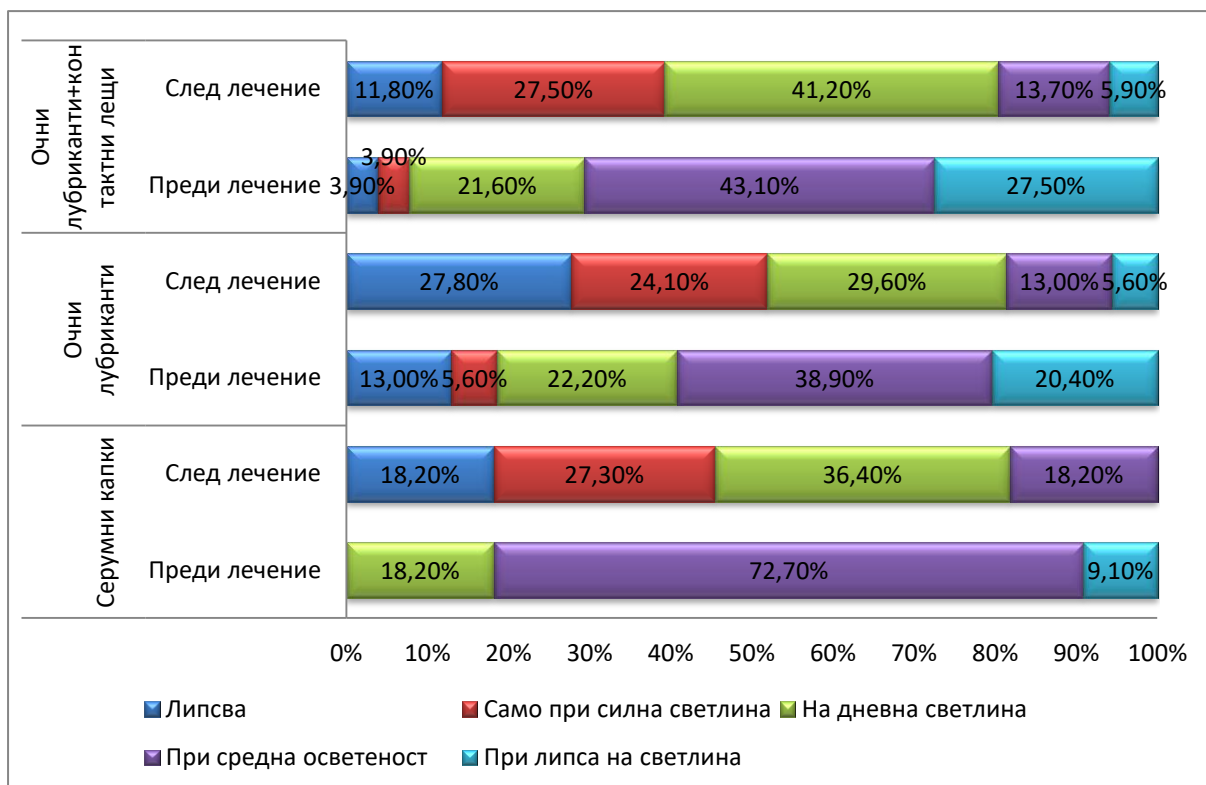
Лечението с очни лубриканти е следващото по успех лечение в тази група.

Фотофобия е вторият субективен показател, при който са изследвани измененията преди и след проведено лечение (фиг. 58). При този симптом употребата на серумни капки отново показва много добри резултати, като след лечение липсват пациенти с оплаквания дори при липса на светлина ( $p < 0,05$ ). Но само при 18,20 % пациента е постигната липса на симптома. От друга страна при приложението на очни лубриканти има 5,60 % от пациентите, които се оплакват от фотофобия при липса на светлина, но при 27,80 % е постигната липса на симптома.

Приложението на очни лубриканти с контактни лещи също показва подобрения при по-голямата част от пациентите.



**Фиг. 57. Изменение в субективната симптоматика – болка при провеждане на различни видове консервативно лечение**

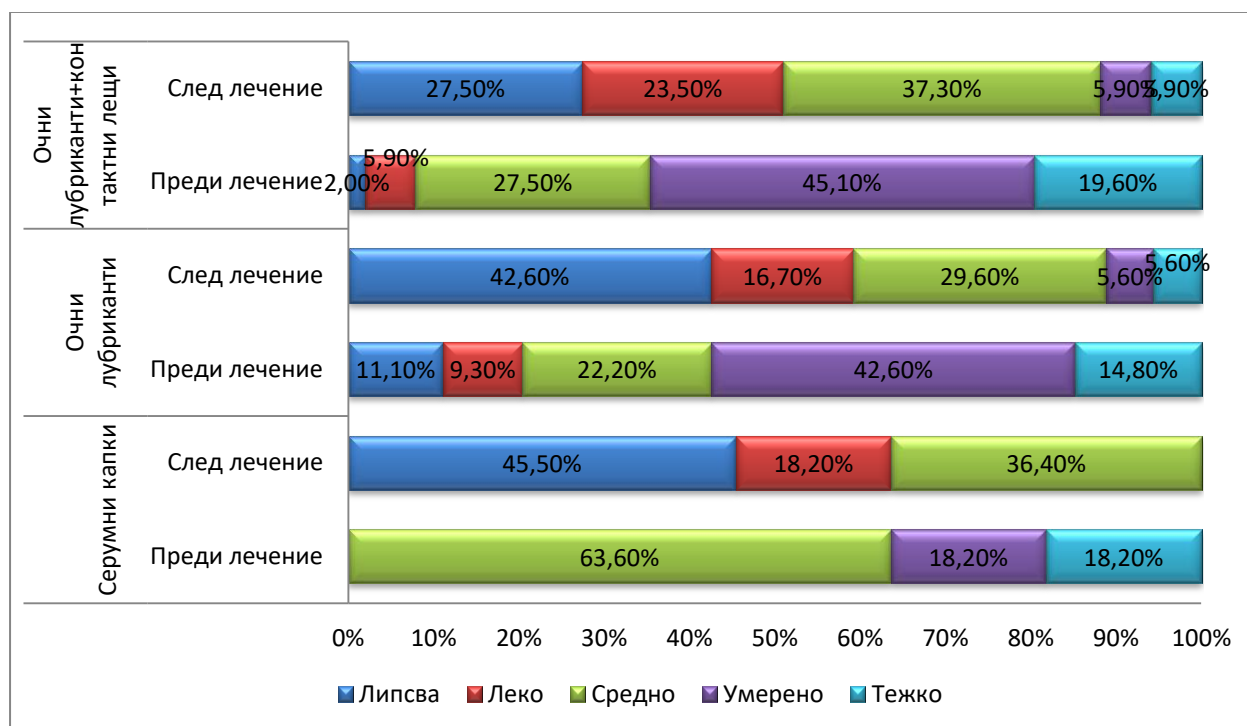


**Фиг. 58. Изменение в субективната симптоматика – фотофобия при провеждане на различни видове консервативно лечение**

Приложението на серумни капки оказва изключително добро влияние по отношение на зачервяването, като 45,50 % от пациентите след лечение вече не проявяват този симптом (фиг. 59). Всички пациенти, които са се оплакали от тежко зачервяване преди лечението със серумни капки след лечението показват значително подобрене.

Очните лубриканти също показват добри резултати, като 42,60 % от пациентите след лечение не проявяват този симптом, но при 5,60 % остава тежкото зачервяване дори и след лечение.

Комбинацията на очни лубриканти с контактни лещи показва най-лоши резултати относно контролирането и ограничаването на зачервяването.



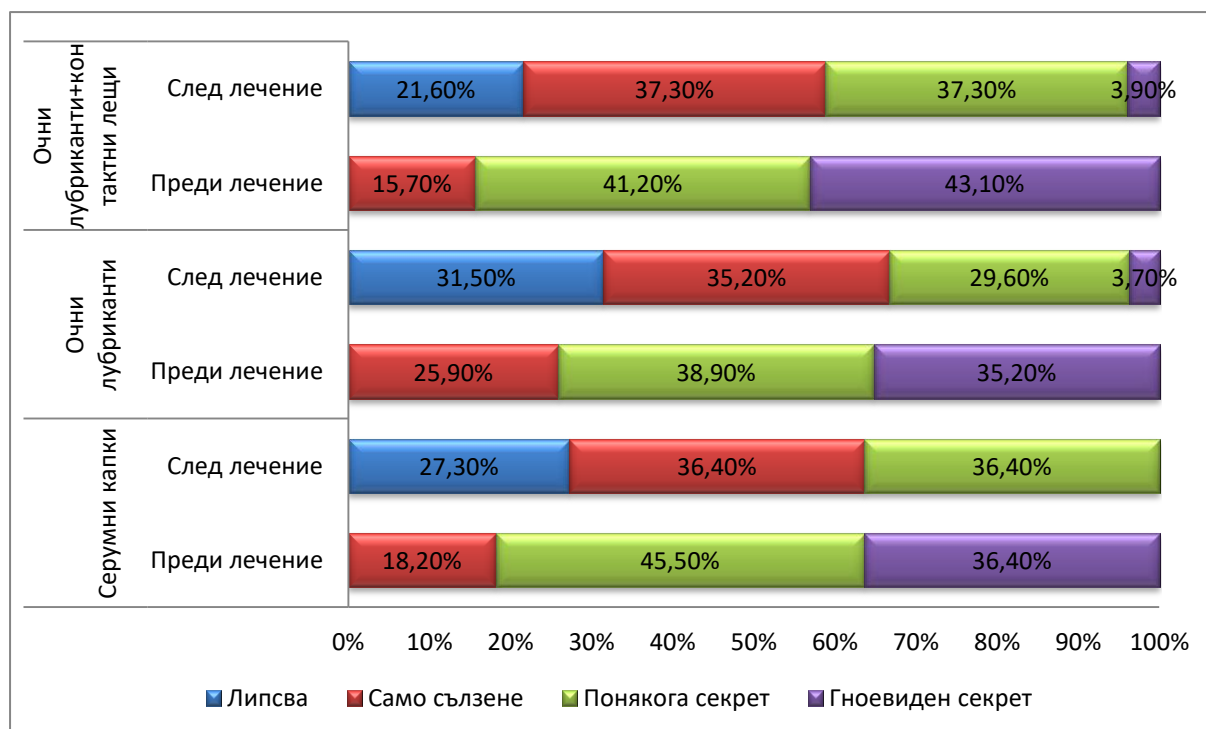
**Фиг. 59. Изменение в субективната симптоматика – зачервяване при провеждане на различни видове консервативно лечение**

На фиг. 60 изследваме съзването. Резултатите показват, че преди лечение и в трите групи пациенти има проява на симптома.

При приложението на серумните капки след проведеното лечение не установихме да има пациенти с гноевиден секрет, а при 27,30 % този симптом изчезва ( $p < 0,05$ ).

Въпреки, че беше отчетен по-висок относителен дял на пациентите, при които съзването изчезва след лечението с очни лубриканти в тази група пациенти все още има и такива, при които се установява гноевиден секрет.

Комбинацията на очни лубриканти с контактни лещи показва както наличието на по-малко пациенти с липса на сълзене, така и такива, при които е останал гноевидният секрет.



**Фиг. 60. Изменение в субективната симптоматика – сълзене при провеждане на различни видове консервативно лечение**

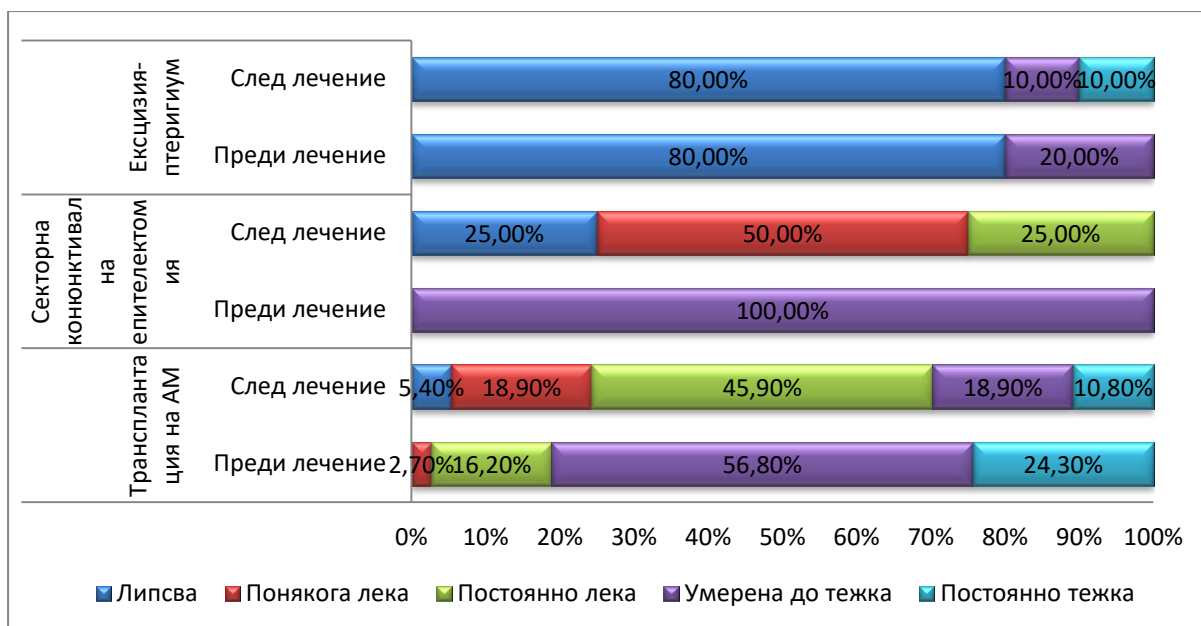
На фиг. 61, 62, 63 и 64 са представени измененията в субективната симптоматика и приложението на различните видове хирургично лечение.

По отношение на болката резултатите показват съществена разлика при всички видове хирургично лечение ( $p < 0,05$ ) с изключение на ексцизията на птериgium (фиг. 61).

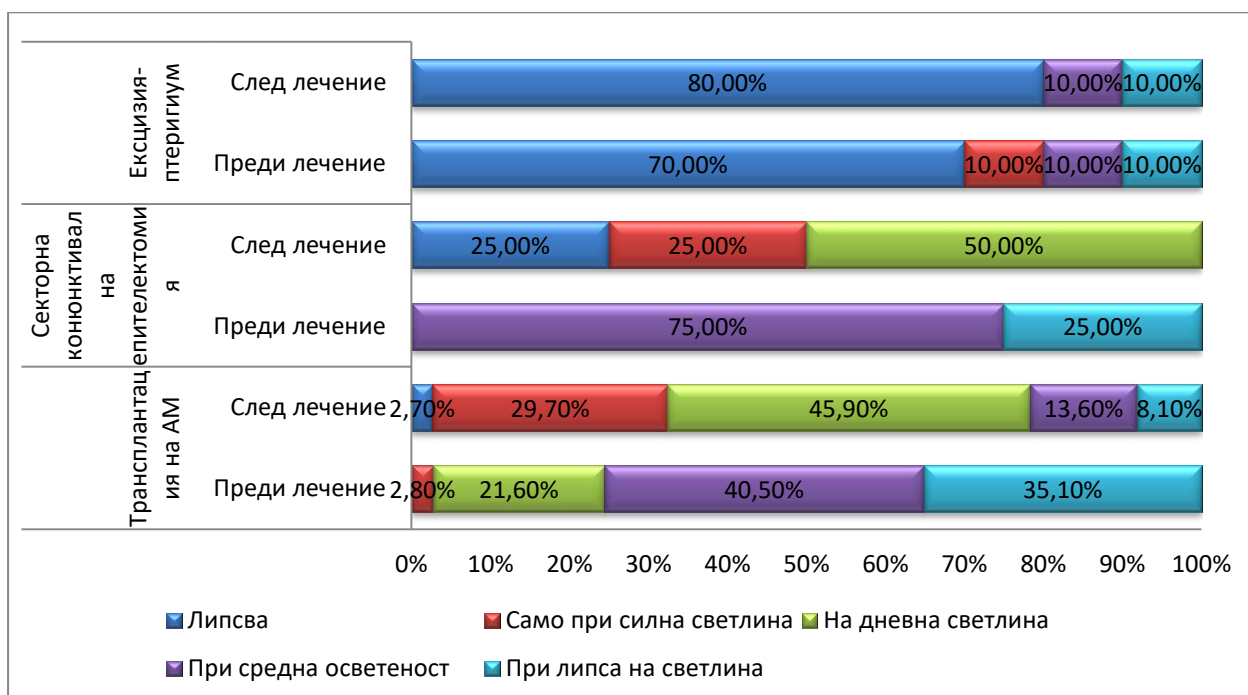
Най-добри резултати се отчитат при приложението на секторната конюнктивална епителектомия.

При ексцизията на птериgium при 10,0 % от пациентите се наблюдава усложнение на състоянието, които от умерена до тежка болка достигат постоянно тежка болка.

Фотофобията е вторият симптом, при които се отчита съществена разлика в състоянието на пациентите след приложението на различните видове хирургично лечение ( $p < 0,05$ ). При пациентите, при които е била извършена селективна конюнктивална епителектомия показват най-добри резултати от проведеното лечение, като при 25,0 % симптома изчезва, а при половината се наблюдават оплаквания само при дневна светлина.



**Фиг. 61. Изменение в субективната симптоматика – болка при провеждане на различни видове хирургично лечение**

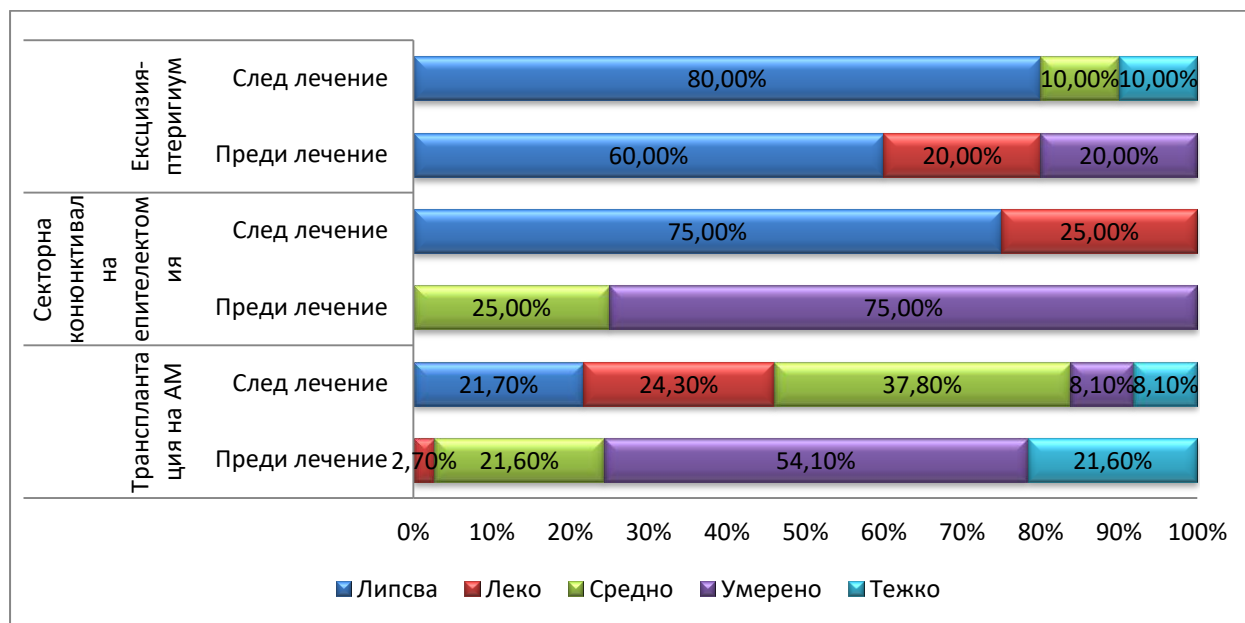


**Фиг. 62. Изменение в субективната симптоматика – фотофобия при провеждане на различни видове хирургично лечение**

При пациентите с ексцизия на птеригиум се запазва относителният дял на тези с фотофобия при средна осветеност и при липса на светлина и след проведеното лечение (фиг. 62).

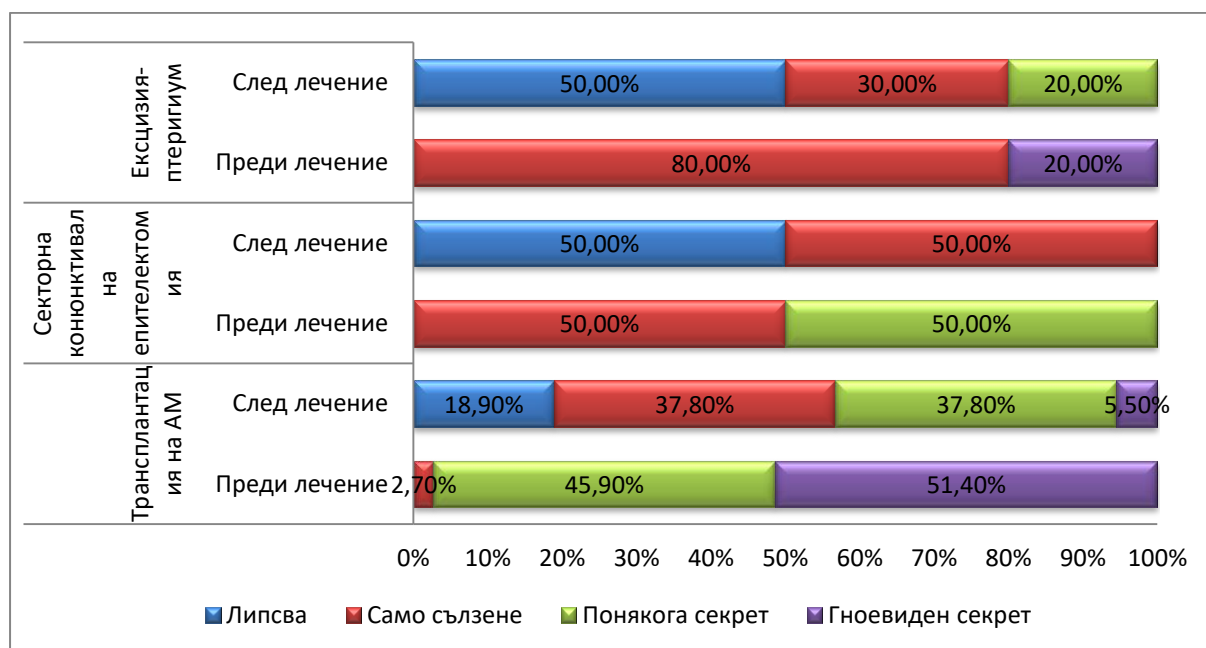


Резултатите от фиг. 63 показват, че секторната конюнктивална епителектомия и трансплантацията на АМ показват най-добри резултати относно овладяването и контрола на зачервяването ( $p < 0,05$ ).



**Фиг. 63. Изменение в субективната симптоматика – зачервяване при провеждане на различни видове хирургично лечение**

На фиг. 64 са представени резултати при последния субективен симптом - зачервяване.

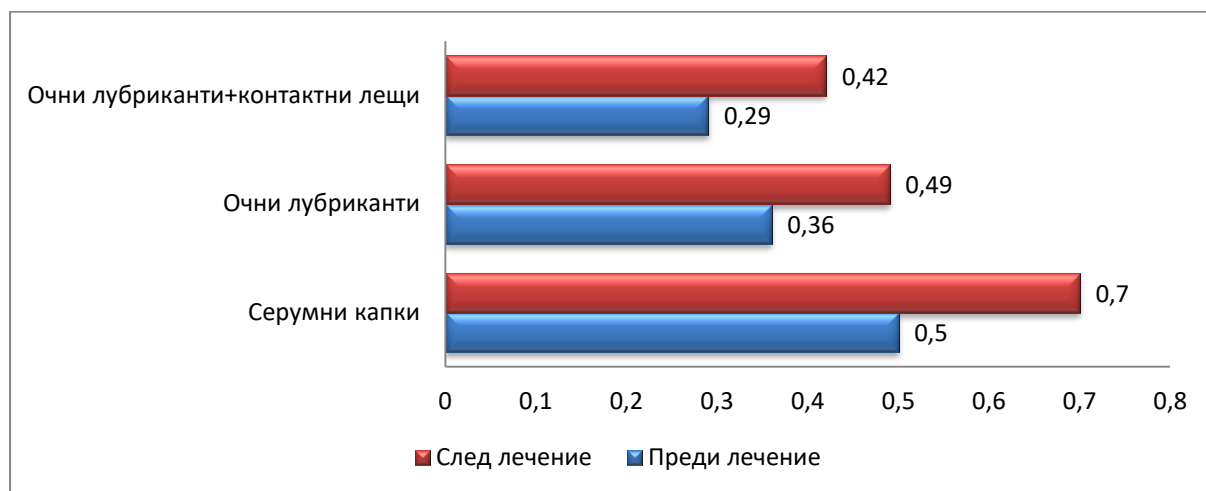


**Фиг. 64. Изменение в субективната симптоматика – съзлене при провеждане на различни видове хирургично лечение**

Резултатите показват, че най-добри резултати има при пациентите, при които е проведена секторна конюнктивална епителектомия.

При пациентите лекувани с трансплантация на АМ, при нито един не се установи изчезване на сълзенето.

От преведените анализи на измененията на субективната симптоматика установихме, че от консервативното лечение най-добри резултати се отчитат при приложението на серумни капки, докато при хирургичното лечение е използването на секторна конюнктивална епителектомия.



**Фиг. 65. Зрителна острота преди и след проведеното консервативно лечение**

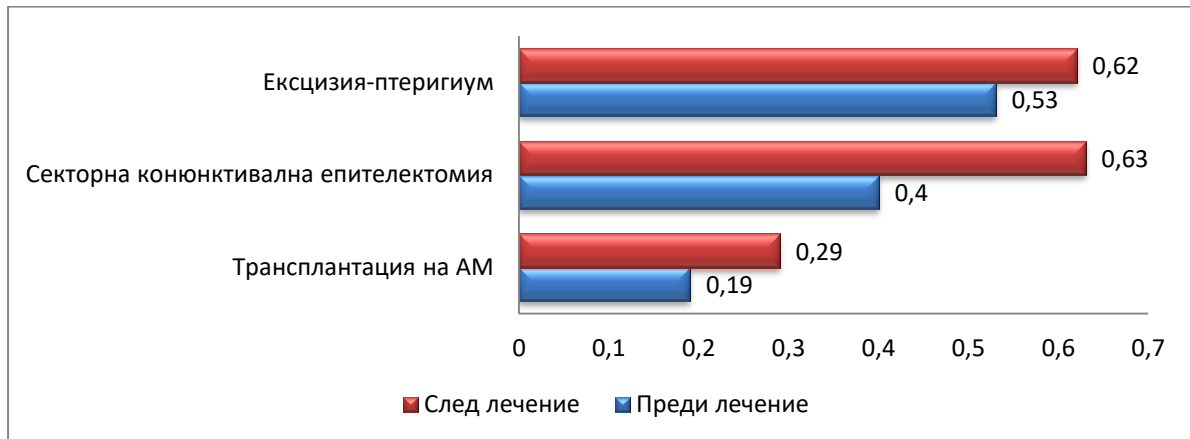
На фиг. 65 е представена средната стойност на зрителната острота преди и след проведеното консервативно лечение. Резултатите показват наличието на съществена разлика и при трите групи пациенти ( $p < 0,05$ ), като приложението на очни лубриканти и комбинацията им с контактни лещи показва еднакво изменение (0,13). Пациентите, при които са били приложени серумни капки имат по-добра изходна зрителна острота и съответно са постигнати значително по-високи резултати с най-голям изменение преди и след лечение (0,20).

На фиг. 66 е представен анализа на средната зрителна острота преди и след проведеното хирургично лечение, като се установи съществена разлика при всички видове лечение.

Впечатление прави резултата на пациентите с ексцизия на птериgium, които имат най-висока изходна зрителна острота, но след лечение се постигат резултати близки до тези на пациентите със секторна конюнктивална епителектомия.

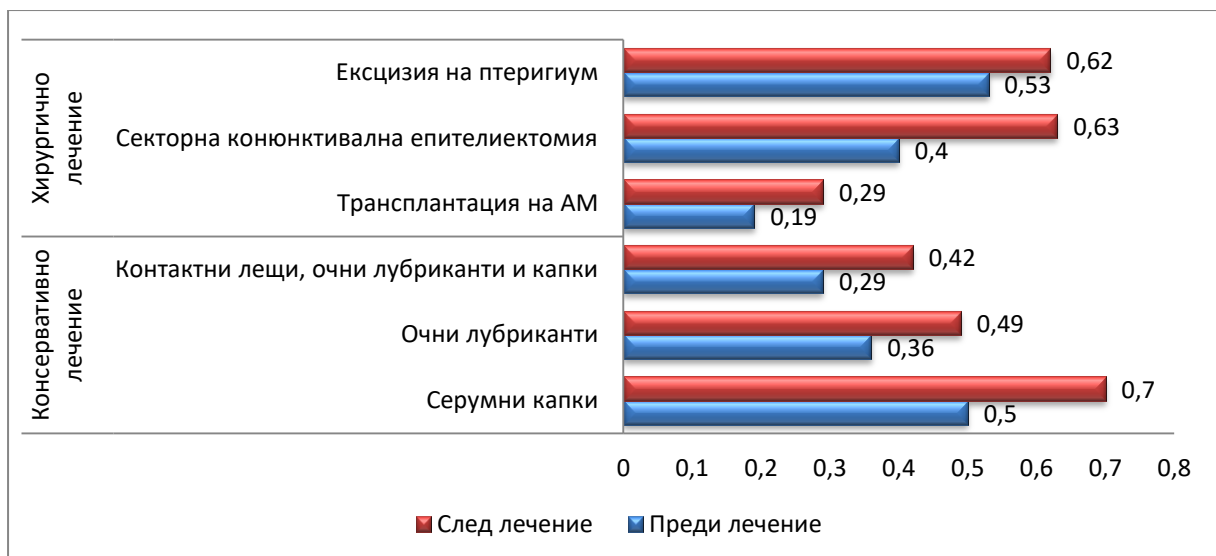
При изследване на зрителната острота според вида на проведеното лечение установихме, че пациентите при, които е било проведено консервативно лечение изходната зрителна острота е била  $0,45 \pm 0,26$ , като след лечението стойностите са се повишили на  $0,61 \pm 0,35$ . При оперативното лечение също установяваме разлика между първоначалната зрителна острота и тази след проведената терапия (съответно  $0,32 \pm$

0,28 и  $0,43 \pm 0,32$ ), като пациентите, които са претърпели хирургична интервенция са с по-ниска зрителна острота.



**Фиг. 66. Зрителна острота преди и след проведеното хирургично лечение**

На фиг. 67 са представени резултатите за изменението на зрителната острота преди и след проведените лечения.



**Фиг. 67. Средна стойност на зрителната острота преди и след проведено лечение**

## 5. Рисков профил на пациентите с дефицит на лимбални стволови клетки

Рисковият профил на пациентите с лека степен на дефицит на ЛСК е създаден въз основа на резултатите от проведените анализи за оценка на риска при анализирането на някои демографски и етиологични фактори. Като основен рисков фактор се открояват носенето на контактни лещи, които имат умерена зависимост ( $r=0.455$ ;  $p<0.001$ ) и носят висок риск от развитие на лека степен на дефицит на ЛСК ( $RR=13.85$  (2.65 - 72.46)) следвано от излагането на UV радиация, която също корелира

умерена с лека степен на дефицит на ЛСК ( $r=0.452$ ;  $p<0.001$ ) и също носи висок риск ( $RR=10.83$  (2.56 - 45.87)). Третият фактор са заболяванията на очите с умерена корелация ( $r=0.483$ ;  $p<0.001$ ) и висок риск ( $RR=10.04$  (2.38 - 35.58)) за развитие на лека степен на дефицит на ЛСК. От тази група заболявания в нашата извадка 100% риск за развитието на лека степен на дефицит на ЛСК има птеригиума. Химичните и термични изгаряния са следващият по сила според оценката на риска фактор водещ до загуба на ЛСК ( $RR=8.91$  (1.26 – 62.57)). Заболявания свързани със сухота на очите са поредния рисков фактор за лека степен на дефицит на ЛСК като в нашата извадка установихме умерена зависимост ( $r=0.371$ ;  $p=0.003$ ) и наличието на висок риск ( $RR=6.57$  (1.73-25.01)). Последният фактор с висок риск са травмите, където оценката на риска е 4.54 (1.55 – 13.34). Установихме и няколко фактора, които са с по-нисък риск – перфоративни травми ( $RR=2.36$  (0.56 – 9.98)), очни операции ( $RR=1.16$  (0.25 – 5.42)) и възраст до 40 години ( $RR=1.15$  (0.67 – 1.98)).

Някои етиологични фактори като инфекции, кератити, булозна кератопатия и диабет нямат връзка с леката степен на дефицит на ЛСК. В предвид фактът, че силата на влияние на разглежданите фактори е предимно умерена, то при изследването на броя на етиологичните фактори, които действат едновременно, установихме че, 50% от пациентите с лека степен на дефицит на ЛСК имат комбинация от 2 фактора – UV радиация и носене на контактни лещи.

Основен рисков фактор при пациентите с умерена степен на дефицит на ЛСК, са перфоративните травми, които имат умерена зависимост ( $r=0.475$ ;  $p<0.001$ ) и значително висок риск ( $RR=15.37$  (2.92 – 81.01)). Значително по-нисък риск беше установен при наличието на инфекции и кератити ( $RR=3.14$  (0.63-15.55)), травми ( $RR=2.75$  (0.94-8.04)), сухо око ( $RR=2.68$  (0.65 – 11.04)) и носенето на контактни лещи ( $RR=2.19$  (0.52 – 9.28)). При останалите фактори беше установен нисък риск. Въпреки ниският риск, който носят химичните изгаряния ( $RR=1.71$  (0.64 – 4.56)), степените на химично изгаряне имат значителна корелация с умерения дефицит на ЛСК ( $r=0.593$ ,  $p=0.01$ ), като често срещани са III-та и IV-та степен. Птеригиумът и булозната кератопатия не са сред факторите, оказващи влияние на умерена степен на загуба на ЛСК.

При тежката форма на дефицит на ЛСК и анализът от оценката на риска, показва че основен рисков фактор са химичните и термични изгаряния, които имат значителна корелация ( $r=0.525$ ;  $p<0.001$ ) с тежката форма на дефицит на ЛСК и носят изключително висок риск ( $RR=12.35$  (3.43 – 44.53)) за нейното настъпване. Степените на химично изгаряне също показват наличието на силна зависимост ( $r=0.738$ ;  $p<0.001$ ) с тежката форма на дефицит на ЛСК като преобладава V-тата степен на изгаряне с 53.80%. Интересното в случая, е че от демографските фактори, за разлика от леката степен на дефицит на ЛСК, при тежката форма на дефицит преобладава мъжкия пол, но възрастовият показател е без значение.

От субективната симптоматика, болката има право пропорционална значителна зависимост ( $r=0.694$ ;  $p<0.001$ ) със степента на дефицит на ЛСК, която показва, че с

увеличаването на дефицита на ЛСК се увеличава и тежестта на симптомите. 40.9% от пациентите с лека степен на дефицит на ЛСК се оплакват от постоянна лека болка, а при 36.40% тя липсва. От друга страна значителната част от пациентите с умерена и тежка степен на дефицит на ЛСК се оплакват от умерена до тежка болка (57.10% за умерена степен на дефицит на ЛСК и 61.9% - тежка степен на дефицит на ЛСК). При фотофобията също установихме право пропорционална зависимост ( $r=0.632$ ;  $p<0.001$ ) като 36.40% от пациентите с лека степен на дефицит на ЛСК имат фотофобия при дневна светлина. При умерената степен на дефицит на ЛСК 57.10% се оплакват от фотофобия при средна осветеност. 47.6% от лицата с тежка степен на дефицит на ЛСК имат фотофобия при липса на светлина. Зачервяването е третият фактор, при който се установи право пропорционална значителна зависимост ( $r=0.662$ ;  $p<0.001$ ) между субективната симптоматика и степента на тежест на дефицит на ЛСК. Като лицата с лека степен на дефицит на ЛСК предимно се оплакват от средна степен на зачервяване (31.8%), докато тези с умерена и тежка степен на дефицит на ЛСК се оплакват от умерено зачервяване съответно 52.40% и 47.6%. Сълзенето е последният фактор, при които отново бе установена право пропорционална зависимост ( $r=0.584$ ;  $p<0.001$ ) със степента на дефицит на ЛСК. При леката степен на дефицит на ЛСК в 54.5% от случаите има само сълзене, докато в умерената и тежка степен се наблюдава предимно гноевиден секрет (съответно 42.9% и 61.9%).

## Дискусия

През 70-те и 80 години на миналия век за първи път се появява теорията, че клетъчната популация от клетки, които се намират в лимбалната зона има важно значение за поддържането на роговичния епител.

През 1971г. Davanger първи описва ролята на перикорнеални папиларни структури, които възстановяват роговичния епител(5). Към момента вече тези структури са ни известни като палисади на Vogt. С напредване на възможностите, които ни дава технологията и новите диагностични методи, все повече проучвания се правят във връзка с 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 описание на основните причини, които могат да доведат до това патологично състояние продължават да са оскъдни. Подобна информация се съобщава основно при проучвания, които отчитат резултатите от конкретен терапевтичен подход, като например трансплантация на лимбални стволови клетки. Фокусът на тези проучвания е насочен към резултатите от лечение като случаите, които не са били подлагани на лечение не се описват в тези изследвания. Това налага нуждата от описание на демографските особености и основните причини водещи до дефицит на лимбални стволови клетки. В тази връзка ние изследвахме за период от 2 години 64 пациента с дефицит на лимбални стволови

клетки като се опитахме да направим характеристика на етиологията свързана със заболяването.

Със засягане на едното око в нашата извадка са 92,20% (n=59) като преобладава делът на пациентите със засегнато дясно око (53.1%). Със засягане и на двете очи са само 7,80% от извадката. J.Vazirani и сътр. (2018г.) описват 10 годишно изследване обхващащо 1331 пациента с дефицит на лимбални стволови клетки (309). Те установяват, че пациентите със засягане на едното око са 59,4% (n=791), а със засягане и на двете очи са 40,6% (n=540). Сравняването на резултатите от двете изследвания показва, че преобладава процента на пациентите със засягане само на едното око, като трябва да се отбележи различната етиология на нашите изводи. Средната възраст на пациентите от проучването е 41,4г., която е приблизително два пъти по-голяма, отколкото средната възраст на пациентите в изследването на J. Vazirani и сътр. (24г.). Съществена разлика се наблюдава и по отношение на средната възраст на пациентите с едноочно засягане (съответно 41,3г. в нашата извадка и 23г. в тази на J. Vazirani и сътр.), както и на тези с двуочно засягане, където отново преобладава високата възрастова граница в нашата извадка (42,6г. за нашето изследване и 25г. за това на другите автори). От гледна точка на половия признак ние установихме съществена разлика в нашето изследване като разпределението на мъжете и жените е почти равномерно (51.6% мъже и 48.4% жени). Подобна тенденция се установява и от Chan и сътр. (2015г.), при които 54,3% от извадката са жени, а 45,7% са мъже. За разлика от нас, J. Vazirani и сътр. установяват, че мъжете са два пъти повече от жените.

Средната зрителна острота на пациентите преди проведено лечение в нашето изследване е приблизително 0,3. Ние отчитаме по-висока изходна зрителна острота от тези на J. Vazirani и сътр. Те отчитат стойности приблизително 0,1. От друга страна и в двете извадки преобладават пациентите със зрителна острота  $\leq 0,1$  (39,10% за нашата извадка и 86,4% за J. Vazirani и сътр.).

Основните причини за дефицит на лимбални стволови клетки в нашето изследване са две – очни заболявания (48,4%), които включват птериgium, инфекции/кератити, синдром на сухото око, булозна кератопатия и травми (45,3%). Chan и сътр. изследват 48 очи като основен фактор за лимбална инсуфициенция посочват носенето на контактни лещи (31,3%) следвано от очни оперативни интервенции (29,2%). Синдромът на сухото око в тяхната извадка (18,75%) по честота се доближава до тази при нашите пациенти (20,3%). От друга страна химическите изгаряния са над четири пъти по-малко (6,3%) от колкото в нашата извадка. J. Vazirani и сътр. установяват, че най-честата причина за дефицит на лимбални стволови клетки в тяхното проучване са химичните/термични изгаряния (53,57%). В нашето изследване с този вид етиология са 28,1% от извадката. В 5,55% от случаите J. Vazirani и сътр. посочват, че лимбалната инсуфициенция се дължи на механична травма, излагане на UV радиация, очна хирургия, периферен улцеративен кератит, ксеродерма пигментоза, трахома и херпесни очни заболявания. За разлика от тях механичните травми, както вече споменахме, са водеща причина сред нашата извадка. Хроничното излагането на

UV радиация естествена и изкуствена като етиологичен фактор се наблюдава при 20,3% от пациентите. Още през 1990г. Coroneo и сътр. доказват вредното действие на албедро фокусна светлина върху назалната лимбална зона. Това твърдение той доказва теоретично при измервания с UV лъчи (310). Клетъчното увреждане на лимбалната ниша от UV радиация предизвиква появата на секторен дефицит на ЛСК, както е при птериgium (89), (311), (312). Das и сътр. (2013г.) провеждат експериментално изследване върху мишки и действието на експозицията им с UV-B лампа с дължина на вълната 280–320nm, поставена на разстояние от 20cm (126). Ежедневно за период от 10 седмици мишките са подлагани на лъчението. Изчислено е, че при поставените условия всяка една мишка е била облъчена с  $0.549 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$  UV-B дневно, което е еквивалент на излагане на човек на слънце между 4 и 5 часа. Клинично установяват, че се наблюдава неоваскуларизация в областта на лимба и помътняване на роговицата. Хистологичните изследвания показват епителна хиперплазия, образуването на нови кръвоносни съдове, стромални изменения. С помощта на оптичен микроскоп установяват микроструктурните изменения, които настъпват в областта на лимба при мишките, изложени на UV-B радиация, които не се наблюдават при контролната група. Техният експеримент дава ясни доказателства, че хроничната UV-B експозиция води до промяна в микросредата на лимбалната ниша и следователно до дефицит на лимбални стволови клетки.

Очните операции, в това число и трансплантация на роговицата обхващат 14,1% от пациентите. При изследването на основните причини за дефицит на стволови клетки при пациентите с едноочно и двуочно засягане установихме, че най-честата причина за едноочното засягане са травмите (45,30%), докато при пациентите с двуочно засягане се наблюдава синдромът на сухото око и носене на контактни лещи в 100% и наличието на ятрогенни фактори и очни заболявания в 80%. За разлика от нас, J. Vazirani и сътр. установява, че както при едноочно, така и при двуочно засягане основния етиологичен фактор за лимбална инсуфициенция са изгарянията на предна очна повърхност - 83,73% за едноочно засягане и 29,95% за двуочно засягане.

При сравнителния анализ между дефицитът на лимбални стволови клетки в нашето изследване и в това на J. Vazirani и сътр. установихме наличието на съществена разлика ( $p \leq 0,05$ ), която показва, че в нашето изследване преобладават пациентите с частична загуба на лимбални клетки (59,4%), докато в това на другите автори преобладава тоталната загуба (67%). Подобни на нашите резултати с преобладаване на частична загуба съобщават и Chan и сътр., където пациентите с частична загуба на лимбални стволови клетки са 87,5%.

Интересен факт е, че при пациентите със засягане на двете очи преобладава лека степен на лимбална инсуфициенция. В нашето проучване установихме, че носенето на контактни лещи е свързано с предимно лека степен на дефицит на лимбални стволови клетки, което обяснява именно двуочното засягане. Машабно изследване на Morgan (2010г.) за период от 8 години – от 2000г. до 2008г. обхващащо 90,000 пациенти, които носят контактни лещи от Австралия, Канада, Япония, Холандия, Норвегия,

Обединеното Кралство и САЩ описва характерните им демографски характеристики. Те установяват, че жените носят контактни лещи в по-голям процент (59-73%). Подобни резултати показват и Termote и сътр. (2017г.), докато в проучване на Martin и сътр. 10 години по-рано (2007г.) почти 90% от пациентите са жени, за разлика от нашите резултати, при които разпределението по пол е почти по равно съответно 54,5% за жени и 45,5% за мъже. Малко са проучванията, които описват връзката на лимбална инсуфициенция с носене на контактни лещи (109), (114), (313), (314), (315), (316). Установена е положителна връзка между продължителността на носене на контактни лещи и дефицитът на ЛСК (144), (316). Въпреки това някои проучвания доказват наличието на изменения в зоната на лимба при пациенти, които са носили контактни лещи едва 6-12 месеца (144), (317) като в повечето случаи са използвани меки контактни лещи (144), (315), (318). При някои пациенти липсва субективна симптоматика въпреки наличието на обективна такава (319). Най-честите оплаквания, ако има такива, са неспецифични като наличие на болка, фотофобия, зачервяване, дразнене, намалено зрение и сълзене (144), (318), (319), (320), които се отчитат и в нашето изследване. Етиопатогенезата на лимбална инсуфициенция вследствие на носене на контактни лещи е мултифакторна (315), (319), (318). Механичната травма се счита за водеща причина (114), (315), (316), (319). Мигателните движения, които извършват клепачите предизвикват непрекъснато движение на лещата по очната повърхност, което води до изсушаване (321) и хронична травма най-вече в горен лимбален квадрант (315), (316), (322), (323). По-рядко могат да се наблюдават изменения водещи до лимбална инсуфициенция в долен квадрант поради по-слабия натиск, който оказва долния клепач върху зоната (319). Правилното напасване както и материалът, от който са изработени контактните лещи също оказват влияние върху механичната травма на предна очна повърхност. Контактни лещи изградени от по-малко флексибилен материал като например силикон хидрогел, лещи с по-висока кислородна проводимост, силно изтънен ръб и по-стръмна кривина могат да имат по-силно механично триене по предна очна повърхност (319), (321), (324) да доведат до дефицит на лимбални стволови клетки. Установено е, че контактни лещи с по-голям диаметър, каквито са склералните, могат да се използват за лечение на състояния на лимбална инсуфициенция (315). Състоянието на слъзния филм е от изключително значение за запазване интегритета на роговицата. При пациенти, които носят контактни лещи неправилното напасване на лещата предизвиква изсушаване на предна очна повърхност вследствие на намаляване на слъзния филм между лещата и задната повърхност на лещата. Създава се по-тънък и по-малко стабилен слъзен филм, променя се неговия осмоларитет и състав, при което се стига до състояние водещо до синдром на сухото око (325). Това предизвиква допълнително по-голямо механично триене между лещата и роговицата (326).

Важен момент в етиопатогенезата на лимбалната инсуфициенция вследствие на носене на контактни лещи са разтворите за дезинфекция и техния състав. Доказано е, че тимерозалът, консервант, който в миналото широко присъстваше в разтворите за



почистване на контактните лещи, води до редица роговични епителиопатии (327). Martin и сътр. предполагат, че въпреки, че е премахнат от състава на разтворите от години, някои пациенти са били изложени на действието му, което е довело до появата на увредания на лимбалните им стволови клетки. Консервантите, които към момента се използват могат да предизвикват реакция на свръхчувствителност или нарушаване на цялостта на епитела при по-продължителен престой на лещите в разтвора (328), (329). За мултифакторната етиопатогенеза на дефицита на лимбални стволови клетки при пациенти носещи контактни лещи свидетелства фактът, че често засягането на двете очи е асиметрично, въпреки че е използван един и същи разтвор.

Необходимо е да се проведат допълнителни изследвания за точната причина, която може да доведе до лимбална инсуфициенция при пациенти, които носят контактни лещи и защо при едни се развива, а при други не. Chan и Holland (2013г.) описват хипотеза, според която освен прякото вредно въздействие на контактните лещи, са необходими и предразполагащи фактори като дисфункция на мейбомиевите жлези, розацея, хронични алергични заболявания на предна очна повърхност и други.

Въпреки, че носенето на контактни лещи за корекция на аметропия са рисков фактор за развитието на лимбален дефицит на стволови клетки, терапевтичните меки контактни лещи се използват за подпомагане оздравителния процес при пациенти с персистиращи епителни дефекти, булозна кератопатия, роговични дистрофии и следователно като консервативен метод при състояния на лимбална инсуфициенция (80), (159), (330), (331). В допълнение към терапевтичния им ефект, контактните лещи се използват като субстрат в тъканното инженерство, алтернатива на амниотичната мембрана или фибрин за култивиране на стволови клетки (108), (332) (333). Pellegrini и сътр. 1997г. култивират автоложни лимбални клетки на двама пациенти с дефицит на лимбални стволови клетки *ex vivo* върху пластмаса от тъканна култура, след което поставят клетъчния слой върху роговичната повърхност на пациентите чрез контактна леща, която служи и като защитна превръзка. Десет години по-късно, през 2007г. Girolamo и сътр. описват адхеренцията на епителни клетки върху повърхността на контактни лещи при пациенти оперирани за птериgium (334). 2013г. екипът на Bhalekar чрез хистологичен и имунохистологичен анализ доказват наличието на роговични епителни клетки прикрепени върху повърхността на двама пациента, при които е проведена обикновена лимбална епителна трансплантация (SLET) (335). Girolamo и сътр. 2009г. докладват за 100% успех при лечението на трима пациента с дефицит на лимбални стволови клетки, при които са култивирани прогениторни клетки *ex vivo* върху контактни лещи в присъствието на автоложен серум (336). Различни проучвания изследват способността за клетъчна адхезия, делене и пролиферация на повърхността на контактните лещи от различен материал (337), (338). За разлика от класическите субстрати използвани в тъканното инженерство като фибрин и амниотична мембрана, контактните лещи са синтетични, неимуногенни, липсва риск от прехвърляне на инфекции от донорската тъкан, няма необходимост от прикрепване за предна очна повърхност с помощта на шевове и възможните усложнения от хирургичната

интервенция. Pellegrini и сътр. (2013г.) провеждат мултицентрично проспективно проучване върху ефектът от лечението с автоложни култивирани лимбални клетки върху фибрин и миши 3T3 фибробласти при 152 пациента с лимбална инсуфициенция. Те установяват, че за крайния ефект от лечението от изключително значение е качеството на биопсията от лимбална тъкан взета за отглеждане *ex vivo*. Задълбоченото проучване на микроструктурно ниво на лимбалната зона е от важно значение както за терапевтичния резултат, така и за правилната и навременна диагностика.

Лимбалните стволови клетки са разположени в лимбалната зона. За поддържането на прозрачността на роговицата и изпълняване на функциите ѝ са необходими наличието на достатъчен брой функциониращи лимбални стволови клетки. Предполага се че лимбът изпълнява ролята на бариера между епителните клетки на роговицата и конюнктивата и предотвратява мигрирането на конюнктивалните епителни клетки върху повърхността на роговицата. Увреждането на зоните на лимба от оперативни интервенции, носене на контактни лещи, химични изгаряния, хронични възпаления и др. могат да доведат до различни степени на лимбална инсуфициенция. *In vivo* конфокалната микроскопия е неинвазивен диагностичен инструмент, при който се получават изображения с висока разделителна способност с дълбочинна селективност. Това позволява измерване на микроструктурните промени при различни условия. При пациентите с дефицит на лимбални стволови клетки се съобщава за значителни промени в микроструктурата, които включват намаляване на плътността на базалния епител, дебелината на епитела и суббазален нервен плексус и морфологични промени свързани със степента на дефицит на ЛСК. Наличието на чашковидни клетки в роговичния епител се счита за патогномичен белег при дефицит на ЛСК (155), но да се визуализират и анализират правилно при *in vivo* конфокалната микроскопия зависи от опита за правилното провеждане на изследването, както и знанията на лекаря. Освен това към момента няма единно мнение за морфологичните характеристики на чашковидните клетки при изследване с лазер сканиращ микроскоп на живо. Efron и сътр. (2009г.) ги описват като структури с хипо-рефлексивна цитоплазма, докато една година по-късно Zhu и сътр. и Hong и сътр. в две пручвания независими един твърдят, че чашковидните клетки са с хиперрефлексивна цитоплазма. Тези вариации могат да бъдат и вследствие на секреторния статус на клетките. Това налага необходимостта от създаването на нови параметри, които да определят и засекат измененията, които настъпват на микроструктурно ниво дори и в по-ранните стадии на лимбална инсуфициенция. Епителните роговични и лимбални клетки се изменят както количествено, така и качествено. Стават с по-малко отчетливи граници и добре видими ядра в леките степени на дефицит, а при по-напреднал стадии стават метапластични, с увеличен размер, но по-малък брой. Възниква васкуларизация. В стромата се натрупват възпалителни и дендритни клетки, а понякога и кръвоносни съдове. Не могат да се открият палисади на Vogt. Siamak и сътр. 2011г. описват структура подобна на лакуна, в която се вижда струпване на добре организирани лимбални епителни клетки.

Наблюдават ги в лимбалната строма на дълбочина от 100µm при пациенти с частичен дефицит на ЛСК. Те предполагат, че тези структури съответстват на по-рано описаните от Dua и сътр. (2005г.) лимбални крипти.

При проведени имунохистохимични излседвания от Wiley и сътр. (1991г.) се установява значителна регионална хетерогенност в лимба. С по-голям брой стволови клетки са били горен и долен квадрант на лимба, а в назалната и темпорална област стволовите клетки са били значително по-малко (339). В друго проучване се установява, че в областта на горен и долен квадрант има по-висока плътност на наличието на лимбални крипти, където са били открити р63A+ клетки (66). Констатациите свързани с дефицита на ЛСК потвърждават, че палисади на Vogt е вероятно да бъдат идентифицирани в областта на горен и долен лимбален квадрант. В сравнение с тях, назален и темпорален квадрант са по-малко защитени от клепачите и имат по-голяма вероятност да бъдат изложени на външни фактори като например UV лъчения и химични/термични изгаряния. Това може да обясни различията на дебелината на лимбалния епител в различните квадранти.

Роговичните нервни окончания имат важна сетивна функция, но освен това имат есенциално значение в поддържането на интегритета на роговицата чрез освобождаване на трофични субстанции, които подпомагат корнеалната епителна хомеостаза, продукцията на слъзен филм и мигателните движения. Вследствие на това увреждане на нервните окончания в роговицата могат да доведат до временна или дълготрайна промяна във функционалния интегритет на предна очна повърхност. Поради тази причина детайлното им изследване и промени при дефицит на ЛСК е от значение. През последните години се публикуваха редица количествени проучвания на параметрите на суббазалния нервен плексус при различни състояния на предна очна повърхност чрез *in vivo* конфокална микроскопия (340), (341), (342), (343), (344), (345), (346). Начинът на измерване на плътността на нервите е различен при различните изследователи. По-голяма част (Групчева 2002г., Zhang 2005г., Hosal 2005г., Villani 2007г., Patel 2009г.) определят плътността на суббазалния нервен плексус като измерват цялата дължина на нервите, които са видими в определена зона (mm/mm<sup>2</sup> или µm/mm<sup>2</sup>), а Erie и сътр. (2005г.) включва само нервни влакна, които са по-дълги от 50µm. Многото вариации създават затруднения при анализиране на данните между различните автори. Това налага създаването на унифицирани протоколи и методи на изследване, за да правилния анализ на резултатите.

На таблица 8 е представен сравнителен анализ на средната плътност на дългите нерви и степента на дефицит на ЛСК в нашето излседване и в това на Chuephanich и сътр. от 2017г. И в двете излседвания са измервани нерви с дължина поне 200µm, а дендритни и дендрито подобни клетки, които са характерни като изменения в микроструктурния анализ на роговицата при състояния на лимбална инсуфициенция, са изключени.

**Таблица. 8. Сравнителен анализ на средната плътност на дългите нерви и степента на дефицит на ЛСК**

Степента на дефицит на ЛСК	Р. Chuephanich et al. (2017г.)	Собствено проучване, (2018г.)
Контролна група	35,3 ± 25,3	35,5 ± 12,7
Група на пациенти със степен на дефицит на ЛСК	9,7 ± 10,9	10,6 ± 9,4
Лека	18,1 ± 11,8	14,9 ± 7,8
Умерена	6,6 ± 8,8	13,3 ± 10,2
Тежка	3,9 ± 5,6	3,4 ± 5,2

Резултатите по отношение на контролната група не показват значима разлика в двете изследвания. В групата на пациентите с тежка степен на дефицит на ЛСК няма съществена разлика. Според степента на увреждане пациентите с лека и умерена степен на дефицит на ЛСК не показват значима разлика в средната плътност на дългите нерви (съответно 14,9 нерва/mm<sup>2</sup> и 13,3 нерва/mm<sup>2</sup>) докато пациентите с тежка степен имат значително по-ниска плътност (3,4 нерва/mm<sup>2</sup>). За разлика от нашето изследване резултатите на Chuephanich и сътр. Показват значително по-висока плътност на дългите нерви при пациентите с лека степен на дефицит на ЛСК (18,1 нерва/mm<sup>2</sup>) в сравнение с пациентите с умерена и тежка степен (съответно 6,6 и 3,9 нерва/mm<sup>2</sup>).

Морфологията на суббазалния нервен плексус при пациенти с дефицит на ЛСК има различни изменения, като например тяхното сегментиране, неправилен ход, увеличен тургуозитет или липса.

Някои от изследваните нервни фрагменти имат сегментно увеличен диаметър и много къса дължина. В резултат на тези промени суббазалния нервен плексус може да бъде погрешно оприличен на дендритни клетки.

Резултатите от проучването показват, че средната плътност на суббазалния нервен плексус намалява при пациенти с дефицит на ЛСК (табл. 9), като се установява право пропорционална корелация между средната плътност на суббазалния нервен плексус и степента на дефицит на ЛСК.

**Таблица. 9. Сравнителен анализ на средната плътност на суббазален нервен плексус и степента на дефицит на ЛСК**

Степента на дефицит на ЛСК	Р. Chuephanich et al. (2017г.)	Собствено проучване, (2018г.)
Контролна група	97,3 ± 29,9	83,1 ± 8,3
Група на пациенти със степен на дефицит на ЛСК	48,0 ± 34,2	41,4 ± 19,2
Лека	63,3 ± 20,0	53,7 ± 10,0
Умерена	44,8 ± 38,1	45,4 ± 18,3
Тежка	25,8 ± 28,6	24, 4 ± 15,2

При пациентите от контролната група се установи разлика в нашето изследване и това на Chuephanich и сътр. като резултатите в нашата извадка са по-ниски

(съответно 83,1 и 97,3). Marfurt и сътр. през 2009г. публикуват детайлно имунохистохимично изследване върху анатомията на инервацията на 16 донорски роговици взети от роговични банки на пациенти на възраст вариваща от 19г. до 81г. Те установяват, че плътността на суббазалния нервен плексус в централната част на роговицата е със средна стойност  $45,94 \pm 5,20 \text{ mm/mm}^2$ .

При пациентите със степен на дефицит на ЛСК също установихме по-ниски резултати в нашата извадка (41,4 към 41,8). Резултатите относно степента на дефицит на ЛСК показват, че с прогресия на дефицита намалява средната плътност на суббазалния нервен плексус като резултатите при леката степен се различават съществено между двете изследвания като при умерена и тежка степен няма съществена разлика в средната плътност на суббазалния нервен плексус в нашето изследване и това на Schuerphanich и сътр. Изследването на средната плътност на суббазалния нервен плексус има и своите ограничения предвид фактът, че оценката се извършва посредством визуализиране на нервните влакна. Конфокални изображения с ниско качество на образа или слаба видимост на роговичните слоеве вследствие на роговичен екстрацелуларен матрикс, могат да попречат на визуализацията на нервните фибри, с което да се компрометира измерването им. При тежка степен на дефицит на ЛСК се наблюдават конюнктивални клетки и клетки на възпалението, които също възпрепятстват евентуалната визуализация на налични нервни окончания. Също така въпреки добрата резолюция на *in vivo* конфокалния микроскоп, той дава прецизни изображения на много малки на диаметър суббазални нервни окончания (30). В заключение средната плътност на суббазалния нервен плексус и дълги нерви е значително повишена при пациенти с дефицит на ЛСК. Загубата на нерви е налице при пациенти с тежка степен на ЛСК. Плътността на дългите нерви и суббазалния нервен плексус в комбинация с измерването на базалния епител и дебелината на епитела могат да се използват за определяне степента на дефицит на ЛСК. Обект на бъдещи изследвания може да бъде дали промените в нервите са обратими след успешна терапия чрез трансплантация на ЛСК.

Изследването на морфометричните данни за централен роговичен епител при здрави пациенти показва, че няма съществена разлика в броя на клетките на централния роговичен епител според възрастта както в нашето изследване така и в проучването на Miri и сътр. от 2012г. (табл. 10).

**Таблица. 10. Сравнителен анализ на морфометричните данни за централен роговичен епител (клетки/ $\text{mm}^2$ ) според възрастта**

Централен роговичен епител	A. Miri et al., 2012 (n=46)		Собствено проучване, 2018 (n=40)	
	< 40 г.	≥ 40 г.	< 40 г.	≥ 40 г.
Криловидни клетки	3767±431	3797±441	3882±280	3773±351
Базални клетки	6543±537	6523±522	6449±155	6436±219

Установи се съществена разлика по отношение на броя на криловидните и базалните клетки, като и в двете проучвания независимо от възрастта се наблюдава по-висок брой на базалните клетки. От гледна точка на изследваните квадранти на роговичния епител получихме идентични резултати за броя на клетките (криловидни и базални клетки) за горен и долен квадрант независимо от възрастта. Разликата отново е по отношение на броя на базалните клетки спрямо броя на криловидните клетки от горен и долен квадрант на роговичния епител (табл.11).

**Таблица 11. Сравнителен анализ на морфометричните данни за роговичен епител на лимба (клетки/mm<sup>2</sup>) според възрастта**

Проучване	Възрастова група	Квадрант	Криловидни клетки	Базални клетки
А. Miri и сътр., 2012 (n=46)	< 40 г.	Горен	3789±431	7202±597
		Долен	3791±441	7212±617
	≥ 40 г.	Горен	3795±458	7118±526
		Долен	3779±411	7127±513
Собствено проучване, 2018 (n=40)	< 40 г.	Горен	3748±49	7138±67
		Долен	3765±55	7175±37
	≥ 40 г.	Горен	3757±37	7165±46
		Долен	3778±23	7178±40

В съвременната медицина съществуват редица методи за измерване на дебелината на епитела, включително предно-сегментна оптична кохерентна томография, ултравукова биомикроскопия, многовисоко честотен дигитален ултразвук и *in vivo* конфокална микроскопия. От тези методи през последните години за измерване на централния роговичен епител и лимбалния роговичен епител най-широко в практиката се използва предно-сегментната оптична кохерентна томография. Тази безконтактна техника осигурява повторяем и високовъзпроизводим начин на изследване на дебелината на централния роговичен епител и лимбалния епител като показва по-висока скорост на възпроизвеждане на образа и по-лесно сътрудничество от страна на пациентите. От друга страна *in vivo* конфокалната микроскопия осигурява измерване на дебелината на епитела чрез изчисляване на разстоянието между дълбочината на повърхностните епителни клетки на роговицата и базалните епителни клетки. Недостатък на този метод, е, че се изисква да има контакт между сондата и очната повърхност, което може да доведе до смущения в резултатите. На таблица 16 са представени резултатите от измерването на средната дебелина на епитела между пациентите на възраст под и над 40 години като се сравняват резултатите от двата метода на изследване.

**Таблица. 12. Сравнителен анализ на дебелината на епитела между пациентите на възраст под и над 40 години**

Показател		Q. Le et al., 2016 (n=38)					Собствено проучване, 2018 (n=40)				
		CC (µm)	SL (µm)	IL (µm)	TL (µm)	NL (µm)	CC (µm)	SL (µm)	IL (µm)	TL (µm)	NL (µm)
< 40 г.	IVCM	52,2 ± 4,4	77,2 ± 13,6	74,6 ± 14,5	58,2 ± 9,5	58,9 ± 13,5	51,7 ± 2,3	69,6 ± 3,3	72,8 ± 4,9	57,3 ± 4,0	57,9 ± 4,5
	AS-OCT	54,9 ± 4,0	73,6 ± 6,0	76,1 ± 9,9	61,8 ± 7,6	60,0 ± 6,9	53,6 ± 2,1	70,6 ± 2,4	73,8 ± 5,3	59,1 ± 3,9	59,1 ± 4,4
	p	0,282	0,064	0,701	0,346	0,725	0,004	0,408	0,500	0,121	0,356
≥ 40 г.	IVCM	51,6 ± 5,2	67,3 ± 14,7	67,6 ± 14,9	53,2 ± 8,6	52,3 ± 10,5	53,8 ± 1,3	64,7 ± 1,7	63,3 ± 4,3	55,4 ± 2,1	52,7 ± 2,4
	AS-OCT	56,3 ± 3,8	76,9 ± 8,1	74,5 ± 12,5	60,3 ± 5,6	62,4 ± 4,9	55,4 ± 1,7	64,7 ± 2,1	64,8 ± 3,6	56,7 ± 1,5	54,4 ± 2,2
	p	0,006	0,005	0,007	0,001	0,003	0,007	1,0	0,323	0,063	0,05
IVCM	< 40 г.	52,2 ± 4,4	77,2 ± 13,6	74,6 ± 14,5	58,2 ± 9,5	58,9 ± 13,5	51,7 ± 2,3	69,6 ± 3,3	72,8 ± 4,9	57,3 ± 4,0	57,9 ± 4,5
	≥ 40 г.	51,6 ± 5,2	67,3 ± 14,7	67,6 ± 14,9	53,2 ± 8,6	52,3 ± 10,5	53,8 ± 1,3	64,7 ± 1,7	63,3 ± 4,3	55,4 ± 2,1	52,7 ± 2,4
	p	0,731	0,044	0,077	0,104	0,165	0,003	< 0,001	< 0,001	0,108	< 0,001
AS-OCT	< 40 г.	54,9 ± 4,0	73,6 ± 6,0	76,1 ± 9,9	61,8 ± 7,6	60,0 ± 6,9	53,6 ± 2,1	70,6 ± 2,4	73,8 ± 5,3	59,1 ± 3,9	59,1 ± 4,4
	≥ 40 г.	56,3 ± 3,8	76,9 ± 8,1	74,5 ± 12,5	60,3 ± 5,6	62,4 ± 4,9	55,4 ± 1,7	64,7 ± 2,1	64,8 ± 3,6	56,7 ± 1,5	54,4 ± 2,2
	p	0,28	0,178	0,656	0,511	0,235	0,01	< 0,001	< 0,001	0,039	0,001

Резултатаите от нашето изследване са сравнени с тези на Q. Le и сътр. Дебелината на епитела е измерена в пет сегмента като при пациентите до 40г. в нашето изследване установихме съществена разлика само при резултатите от изследването на дебелината на централния роговичен епител, които показват по-високи стойности при използване на предно-сегментна оптична кохерентна томография. При изследването на Q. Le и сътр. в тази възрастова група не беше установена съществена разлика в резултатите при използването на двата метода при пациентите над 40г. Резултатаите от изследването на Q. Le и сътр. показват съществена разлика при използването на двата метода във всички изследвани сектори като стойностите получени посредством предно-сегментна оптична кохерентна томография са сигнификантно по-високи. В нашето изследване значителна разлика беше отчетена само по отношение на дебелината на централния роговичен епител и назалния лимбален квадрант. Интерес представлява фактът, че в изследването на Q. Le и сътр. резултатите получени посредством използването на предно-сегментна оптична кохерентна томография не показват значима разлика при пациентите под и над 40г., а *in vivo* конфокалната микроскопия показва наличието на статистическа разлика само по отношение на горен лимбален квадрант. В нашето изследване беше установена сигнификантна разлика при използването на двата метода с изключение на темпорален квадрант при използването на *in vivo* конфокалната микроскопия. Значителна разлика при използването на двата метода в нашето изследване беше установена само по отношение на централен роговичен епител (1,73µm) и темпорален квадрант (1,58µm). В изследването на Q. Le и сътр. съществена разлика в резултатите между двете изследвания освен в централен роговичен епител (3,68 µm) и темпорален квадрант (5,3µm) както и в назален квадрант (5,1µm). Резултатаите както в нашето изследване, така и в това на Q. Le и сътр. имат две ограничения. Първото е свързано с малкия брой болни. Това възпрепятства подробния

анализ на свързаните с възрастта промени в дебелината на епитела. Другото ограничение е свързано с вариацията в анатомията на лимбалната зона и точното ѝ определяне. Лимбът е граничната зона между роговица и склера с размери от 1 до 1,5мм. Средната дебелина на лимбалния епител е тясно свързан с анатомичните размери на лимба. Нещо повече – диапазонът на дебелина на лимбалния епител при здрави хора не е установен, тъй като публикуваните проучвания в тази област са проведени при различни раси с използването на различни методи за измерване. За да има ясна представа за нормалния диапазон на дебелината на лимбалния епител, е необходимо да се извърши по-мощно проучване включващо лица от различна раса и на различна възраст. Установяването на нормалния диапазон на дебелината на лимбалния епител е от значение, за да могат да се определят и промените при патологични състояния.

На таблица 13 сме направили сравнителен анализ на дебелината на лимбалния епител в четири квадранта при пациенти с лимбална инсуфициенция и контролна група в нашето изследване и това на други автори.

**Таблица. 13. Сравнителен анализ на дебелината на лимбалния епител в четири квадранта**

	Q. Le et al., 2016						Собствено проучване, 2018					
	Горен квадрант	Долен квадрант	Назален квадрант	Темпорален квадрант	F	P	Горен квадрант	Долен квадрант	Назален квадрант	Темпорален квадрант	F	P
Дефицит на ЛСК	55,9 ± 11,6	54,8 ± 13,7	49,2 ± 7,3	51,1 ± 9,4	3,704	0,019	59,68 ± 8,4	58,81 ± 8,8	51,25 ± 6,9	53,05 ± 6,9	18,451	<0,001
Контролна група	69,8 ± 16,7	71,5 ± 15,6	57,1 ± 14,3	59,1 ± 9,7	15,229	<0,001	68,42 ± 3,7	70,53 ± 6,5	57,37 ± 4,4	58,21 ± 3,5	39,866	<0,001
t	7,994	9,158	5,916	6,624			6,44	6,35	4,59	4,42		
p	0,008	0,006	0,01	0,01			<0,001	<0,001	<0,001	<0,001		
С палисади на Vogt	68,12 ± 4,5	70,1 ± 8,3	55,9 ± 3,4	57,9 ± 3,2	13,381	<0,001	68,27 ± 4,2	68,06 ± 3,5	64,86 ± 4,6	62,0 ± 6,88	4,803	0,01
Без палисади на Vogt	50,4 ± 9,6	50,2 ± 11,6	48,7 ± 7,3	49,9 ± 9,8	0,221	0,881	56,15 ± 8,6	54,59 ± 9,1	48,98 ± 5,6	50,84 ± 6,22	10,321	<0,001
t	7,741	6,082	2,588	2,902			7,33	8,50	8,40	5,00		
p	0,009	0,01	0,09	0,06			<0,001	<0,001	<0,001	<0,001		

Резултатите и в двете изследвания показват наличието на разлика в дебелината на лимбалния епител, както при пациентите с дефицит на лимбални стволови клетки, така и в контролната група в горен, долен, назален и темпорален квадрант. Въпреки че няма съществена разлика при пациентите с дефицит на ЛСК резултатите в нашето проучване са по-високи от тези съобщени от Q. Le и сътр. от 2016г. По отношение на контролната група резултатите в двете изследвания са почти идентични. При сравняването на всеки един от квадрантите при пациентите с дефицит на ЛСК и контролната група, както в нашето проучване, така и в това на другите автори се установява статистически значима разлика. При изследването на пациентите с и без палисади на Vogt също показва сигнификантна разлика в нашето изследване, докато Q. Le и сътр. Не съобщават за наличието на съществена разлика в дебелината на



лимбалния епител в четирите квадранта при пациентите без палисади на Vogt. При по-детайлен анализ можем да кажем, че резултатите по отношение на дебелината на лимбалния епител при пациенти с палисади на Vogt се доближават до резултатите на контролната ни група. За подобни резултати съобщават и Q. Le и сътр. От друга страна при пациентите без палисади на Vogt отчетената средна дебелина на лимбалния епител и в четирите квадранта е по-малка в сравнение с пациентите с дефицит на ЛСК. Изследването на разликата в дебелината на лимбалния епител по квадранти при пациентите с и без палисади на Vogt показва сигнификантна разлика и в четирите разглеждани квадранта в нашето проучване, докато в изследването на Q. Le сигнификантна разлика е уснатовена само в горен и долен квадрант. С този резултат ние доказваме, че палисадите на Vogt корелират с дефицита на ЛСК. Атрофията или загубата на палисади е показател за увреждане на средната, загуба на ЛСК свързана предимно с травми, които значително повишават риска от прогресивен дефицит. Следователно намалената дебелина на епитела в лимба без палисади може да бъде индикатор за намален брой или тотална загуба на ЛСК. Отчитането на изтъняване на епитела може да бъде свързано с увреждане на функцията на ЛСК. Това твърдение се подкрепя от наблюдения на други автори, които доказват че дебелината на лимбалния епител при пациенти с инсуфициенция на ЛСК и степента на намаляване корелира с тежестта на клиничната изява. Заместването на роговичния епител с конюнктивален епител е отличителен белег за дефицит на ЛСК. Епителът на роговицата се състои от 5-6 слоя стратифициран плоскоклетъчен епител, докато конюнктивалния епител е стратифициран епител съставен от 2-3 клетъчни слоя. Дебелината на булбовия конюнктивален епител, измерена чрез предно-сегментна оптична кохерентна томография, е от 42,0 до 44,9 $\mu$ m (193), (347), (348). Тя е значително по-тънка от епитела в роговицата или лимбалния епител. Заместването на епитела на роговицата с конюнктивален епител в лимбалната област също обяснява отчетените стойности на изтъняване на дебелината на лимбалния епител.

Стойностите на дебелината на епитела в централната част на роговицата са измерени чрез *in vivo* конфокален микроскоп са по-ниски от тези получени чрез използването на предно-сегментна оптична кохерентна томография, докато стойностите на дебелината на епитела в лимбалната зона имат по-добра корелация помежду си в изследването на Q. Le и сътр. В нашето изследване има значима разлика както в стойностите на дебелината на епитела в централната част на роговицата, така и в стойностите на епитела в лимбалната зона. Това доказва, че тези две техники за измерване на дебелината на епитела имат както своите предимства, така и своите недостатъци и могат да бъдат взаимно допълващи се, а не взаимно изключващи се при диагностицирането на дефицита на ЛСК.

С напредване на технологията все по-детайлно могат да се изследват структурните изменения. Оптичната кохерентна томографна ангиография ни позволява да изследваме кръвоносните съдове. Въпреки, васкуларизация на роговицата настъпва при по-напреднали стадии на лимбална инсуфициенция, този нов метод на изследване

може да даде информация за наличие и размер на съдовете при тотален дефицит и левкома, както и да се следи детайлно ефекта от лечение при такива състояния.

Правилната и навременна диагностика на лимбална инсуфициенция и нейната тежест, е от значение за избора на терапевтичен подход и крайния резултат от проведеното лечение.

Приблизително една трета (29,7%) от нашата извадка са провели консервативно лечение, като най-често използваните методи са очни лубриканти (84,3%) и комбиниране на меки терапевтични контактни лещи и очни лубриканти (79,7%). При всички пациенти е проведена и топикална противовъзпалителна терапия. Отчитат се както подобрение в субективната симптоматика, така и подобрение в зрителната острота. Подобни резултати при приложение на медикаментозна терапия отчитат и Kim и съдр. (2014г.) Терапевтичният ни подход при тези пациенти бе на първо място да се отстранят рисковите фактори, които са довели до лимбалната инсуфициенция, след което да се оптимизира състоянието на слъзния филм с приложението на очни лубриканти, които да са без наличен консервант. Поради възпалителната компонента, която се наблюдава при етиопатогенезата на синдромът на сухо око не е изненадващ фактът, че пациентите се повлияват добре при наличие на топикален кортикостероид или нестероидно противовъзпалително средство.

При по-голямата част от пациентите в нашето изследване е проведено хирургично лечение (70,3%) като най-често използвано лечение е трансплантация на амниотична мембрана (43,8%).

Tamhane и сътр. (2005г.) в проспективно проучване на пациенти с химични изгаряния установяват, че трансплантацията на АМ подпомага епителизацията и намалява субективните оплаквания от болка, но не и рискът от развитие на дефицит на ЛСК или подобряване на зрителната острота в сравнение с контролна група, които са били подложени на консервативно лечение. Westekemper и сътр. достигат до подобни изводи в проучване от 2017г. Те описват ефектите от проведено лечение с трансплантация на АМ при пациенти с химични изгаряния като групират пациентите в три групи ( първа група – трансплантация на АМ извършена до 1 ден след инцидента, втора група – от 2 до 6 дни, трета група – над 6 дни) и доказват, че рискът от загуба на зрение се увеличава с удължаване на времето между изгарянето и трансплантацията на АМ. Авторите доказват, че пациентите, при които е приложено лечение възможно най-рано, имат по-високи шансове да запазят своето зрение, ако степента на химичното изгаряне е в по-ниски граници. Те установяват, че при тежки изгаряния (V-а и VI-а степен) трансплантацията на АМ няма ефект върху развитието на лимбална инсуфициенция в тази група пациенти, нито може да окаже влияние върху възстановяването на зрителната острота. Приложението на АМ до 5-ти ден след инцидента и при пациенти с II-ра и III-та степен изгаряне води до по-бърза епителизация и по-нисък риск от развитие на дефицит на ЛСК (349).

Приложението на АМ в комбинация с повърхностна кератектомия положителния ефект за възстановяване прозрачността на роговицата при пациенти с

частична лимбална инсуфициенция (233), (243). Въпреки това Kanomi и сътр. (2013г.) проучват дълготрайния ефект от трансплантацията на АМ при пациенти с частичен дефицит на ЛСК. Те потвърждават, че АМ подпомага реепителизацията, но в дългосрочен план не осигурява стабилна и прозрачна роговица.

През последните години се правят проучвания за ефикасността от приложението на капки за очи, които са приготвени от лиофилизирана АМ с цел намаляване на възпалението, неоваскуларизацията и подпомагане на роговичната епителизация (242), (350). Baradaran-Rafii и сътр. (2017г.) описват ролята капки екстракт от криосъхранена АМ при *in vivo* отглеждане на лимбални стволони клетки. Те изследват пациенти с едностранен тотален дефицит на ЛСК вследствие на химично изгаряне. Вземат лимбална биопсия с размери 2x1mm. Извършват 360° конюнктивална перитомия на засегнатото око като премахват колкото се може повече от субконюнктивалната цикатрициална тъкан и роговичния панус. При пациентите със стромални мътнини извършват пенетрираща кератопластика. Покриват цялата предна очна повърхност с 3x3mm<sup>2</sup> АМ със стромалната страна и я пришиват с три паралелно вървящи шева. Първият еписклерален шев фиксира свободните краища на мембраната и конюнктивата, а другите два – на 3mm от зоната на лимба и един в лимбалната зона. Разрязват лимбалният трансплантат взет от здравето око и го пришиват за корнеално и склерално ложе в лимбалната зона в горен квадрант, след което поставят мека терапевтична контактна леща, оклузират горна и долна слъзна пункта и извършват латерална тарзорафия. В следоперативния период към терапията включват капки с екстракт от АМ. Те установяват, че на втората седмица след операцията няма пациент от клиничната група с епителен дефект, за разлика от контролната група, а 2-3 месеца по-късно има значително подобрение в роговичната прозрачност, стабилност и зрение.

Трансплантацията на АМ е хирургична техника, която може да се прилага както самостоятелно като биологично покритие, така и в комбинация с различни видове тъканни трансплантати (CLAU, ir-CLAU и KLAL), служеща като клетъчен носител за *ex vivo* (CLET и COMET) или *in vivo* клетки (SLET и allo-SLET) култивиране на лимбални епителни стволони). При всеки един от случаите качествата на АМ (противовъзпалителни, антиангиогенни и антицикатрициални) оказват ефект върху състоянията свързани с дефицит на ЛСК.

В ретроспективно мултицентрично клинично проучване от 2016г. обхващащо 68 очи на 68 пациента и проследяване в рамките на минимум 6 месеца те отчитат успех от проведеното лечение. Подобни са резултатите и на Queiroz и сътр. от 2014г. Това са подобни или по-добри резултати в сравнение с публикациите при извършване на CLAU или CLET.

Basu и сътр. 2016г. публикуват проучване, което обхваща 125 пациента с унилатерален дефицит на ЛСК на които е извършена обикновена лимбална епителна трансплантация. Постоперативен период на проследяване е между 1 и 4 години. Те установяват, че при 76% от субектите, роговичната повърхност е успешно

регенерирана, без прогресиране на конюнктивизацията ѝ, развиване на персистиращи епителни дефекти, инфекции или необходимост от повтаряне на процедурата.

67% успех от извършен CLET на 572 субекта публикуват Zhao и сътр. 2015г. в подробен мета анализ на процедурата като не отчитат съществена разлика между автоложни и алогенните трансплантати.

Важен момент е отглеждането на клетките *ex vivo*, за което е необходима специално разработена лаборатория и обучен персонал. Това я прави изключително скъпа и трудоемка, докато SLET може да се извърши лесно, като единствената необходимост е хирургът да е добре запознат с техниката на изпълнение на процедурата, а при необходимост да се повтори.

Резултатите от нашето проучване показват важната роля на лечението на лимбалната инсуфициенция като състоянието, в предвид своята етиология, често е свързано с възникване на усложнения, забавено възстановяване и риск от настъпване на пълна слепота. Изследването на субективната симптоматика е важна част от процеса на лечение, която се свързва с качеството на живот на пациентите, което в последните години се превръща в основен проблем и започва да се изследва в почти всички области на медицината. Важна част от дискомфорта на пациента независимо от вида на заболяването е болката, която оказва влияние върху психоемоционалното им състояние. В нашето изследване преди провеждане на лечението основната част от пациентите се оплакват от умерена болка (43,8%), а 17,2% посочват, че изпитват постоянна тежка болка. След проведеното лечение при по-голямата част от пациентите болката е значително намалена като преобладават тези с постоянна лека болка (35,9%), а при пациентите, които са се оплаквали от умерена болка в началото, тя е редуцирана до 14,1% след проведеното лечение. В групата на пациентите с постоянно тежка болка намалението е почти три пъти, като 6,3% са посочили, че са запазили първоначалното си състояние. Основно значение за контрола на болката освен провежданото лечение има и етиологията на състоянието, където установихме, че с изключение на птеригиума и носенето на контактни лещи при всички пациенти се наблюдава висок относителен дял на тези с умерена болка, като и не липсват такива с постоянно тежка болка особено при пациентите с травми и химични/термични изгаряния. След провеждане на лечението установихме, че се наблюдава подобрене на този симптом, като при повечето пациенти изчезва умерената и постоянно тежка болка, а при други тяхната честота е значително намалена. Интерес представлява само един пациент с идиопатичен фактор, при които преди лечение болката е била умерена, но след лечението тя е еволюирала до постоянно тежка. Най-добро повлияване на болката установихме при очните заболявания, носенето на контактни лещи, сухо око, ятрогенните фактори и очните операции.

Фотофобията е вторият фактор от субективната симптоматика, който оказва влияние върху качеството на живот на пациентите. Значителната част от пациентите (61%) се оплакват от фотофобия при липса на светлина или средна осветеност. След проведеното лечение техния дял намалява 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) имаме при пациентите със системни заболявания (диабет) – 58,3%. След провеждане на терапията се установява значително подобряване 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%. При тези с травма намалява 6 пъти (6,9%). Пациентите с диабет, които преди лечението показват най-висок процент на фотофобия при средна осветеност, след лечението намаляват два пъти и достигат 25%. При пациентите изложени на UV радиация се постига 76,9% липса на този фактор, а при тези с птеригиум лиспата му е на 100%. При останалите пациенти преобладава фотофобията само при силна светлина или на дневна светлина.

Зачервяването е друг субективен фактор, който по-скоро е свързан с естетичния вид и може да не предизвиква дискомфорт, както болката, фотофобията или сълзенето. В нашата извадка преди лечение 54,7% от пациентите се оплакват от умерено до тежко зачервяване. След лечението процентът пада на 9,4%. При 59,4% зачервяването липсва или е леко изявено. Преди лечение най-тежко е 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, като при много малка част се наблюдават пациенти, при които все още има 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 пациента и е свързан с влошаване качеството на живот. Единствено при този фактор преди лечение няма пациенти, при които този симптом на липсва като също единствено тук установихме и най-висок относителен дял на пациентите в тежките групи (поява на секрет – 37,5% и гноевиден секрет – 35,5%). След лечение липса на тази симптоматика се установи при 29,7%, а 3,1% остават с оплаквания от гноевиден секрет. Появата на секрет не се изменя съществено, което според нас се дължи на преместването на пациентите от групата на тези с гноевиден секрет в предходната група, тоест с поява само на бистър секрет. Преди провеждането на лечение най-висок процент на пациентите с гноевиден секрет имат тези с инфекции/кератити (85,7%) следвани от пациентите с термични/химични изгаряния (61,1%) и тези с травми (51,7%). Има един пациент с трансплантация на роговица, който преди лечението имаше гноевиден секрет. След лечение гноевидния секрет изчезва при значителната част от пациентите, а при други остава под 10%, с изключение на пациентите с булозна кератопатия, при които се наблюдават усложнения и 25% имат гноевиден секрет след лечение. При значителната част от пациентите се наблюдава липса на този показател или има само сълзене.

При изследването на рисковия профил на пациентите за частичен и тотален дефицит на лимбални стволони клетки се установява, че при пациентите с тотален дефицит основен рисков фактор са химичните изгаряния (OR=15,91 (3,87-65,34)) следвани от травмите (OR=4,09 (1,42-11,79)). Основен риск за частична загуба на лимбални стволони клетки носят ятрогенните фактори (OR=4,45 (1,09-18,08)) следвани от синдрома на сухото око (OR=3,76 (0,91-15,59)). Интересен факт е, че 73,1% от случаите на тотална загуба на лимбални стволони клетки има влияние само един етиологичен фактор, докато при частична загуба относителния дял на пациентите с влиянието на един и два етиологични фактора е равен (по 39,5%). Според степента на дефицит на лимбални стволони клетки не се установи съществена разлика между трите групи пациенти с лека, умерена и тежка степен, като се доказва, че пациентите с тотална загуба на лимбални стволони клетки имат основно тежка степен на дефицит, а тези с частична имат от умерена до лека степен. В изследването на Chan и сътр. се съобщава за висока честота на пациентите с умерена степен на дефицит - 52,1%, следвани от пациентите с лека степен (37,5%), докато тежката степен се наблюдава само при 10,4% от извадката. Също така бе установено, че няма съществена разлика в степента на дефицит на лимбални стволони клетки според възрастта на пациентите, а при мъжете преобладават предимно умерена и тежка степен, докато при жените е по-характерна леката степен.

Въз основа на получените резултати най-често срещаният профил на пациентите с дефицит на лимбални стволони клетки е млад мъж с намалена зрителна острота на засегнатото око. Последниците 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. Последниците 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 социално-икономически заболявания.

## 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. В съвременната литература има ограничен брой проучвания изследващи лимбалната зона и използването на нови технологии за извършването на микроструктурен анализ, оценката на различен вид лечение и субективната симптоматика при пациенти с дефицит на лимбални стволови клетки, като липсва алгоритъм за диагностика и лечение според рисковия профил на тази група пациенти.
3. При проведеният анализ и направената оценка на етиологията на заболяванията характеризиращи се с недостатъчност на лимбални стволови клетки установихме, че с най-голяма честота са пациентите с очните заболявания като птериgium, инфекции/кератити, синдром на сухото око и булозна кератопатия следвани от състояния след 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 показва, че резултатите от нашето проучване не се различават съществено от тези на другите автори, като средната плътност на дългите нерви е  $10,6 \text{ нерва/mm}^2$ , а средната плътност на суббазалния нервен плексус е  $41,4 \text{ mm/mm}^2$ .
5. Не беше установена съществена разлика между средния брой на клиновидните базални клетки в централния роговичен епител от гледна точка на възраст и на квадранта при 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 по-ниски.
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 стволони клетки показва, 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 минимална изява.
9. Основните рискови фактори за тотален дефицит на лимбални стволони 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 стволони 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.



## Заклучение

В съвременната медицина с напредващите технологии и възможности се полагат все повече усилия за разработване и подобряване на техниките за диагностика на лимбален дефицит на стволови клетки. Освен клиничният преглед с биомикроскопия, IVCM като контактен метод, който в детайли изследва на клетъчно ниво на морфологичните промени, дава задълбочена информация за състоянието на роговицата и лимбалната зона. AS-OCT на роговица и лимба е алтернативна и много полезна, бърза и безконтактна техника за изследване. Приложението им в комбинация позволява точен и обширен анализ на очи както в норма, така и в патология свързана с недостига на лимбални стволови клетки. Макар че повечето етиологични причини за възникването на това заболяване са склонни да прогресират до тежки последствия въпреки проведено лечение, други са реверсивни. Следователно подходящата диагноза и правилният подход на лечение може да забави или обърне това състояние.

По-доброто познаване на лимбалните стволови клетки може да помогне не само за разбирането на патогенезата на състоянията свързани с дефицитът им, но може и да подобри диагностиката, лечението и следователно прогнозата на пациентите. Навременната диагноза позволява правилен и своевременно терапевтичен подход. При частичен недостиг и диагностицирането на ранни състояния свързани с дефицит на лимбални стволови клетки консервативното лечение може да бъде достатъчно. Това води до по-добри икономически резултати, подобряване на субективната симптоматика като болка, дразнене, фотофобия, зачервяване и следователно качеството на живот. Трансплантацията на амниотична мембрана като хирургичен метод към момента остава златен стандарт в лечението на състояния свързани със заболявания на ПОП, каквото е и недостигът на лимбални стволови клетки. Бъдещи проучвания най-вероятно ще разкрият допълнителните ползи от приложението на АМ след като продължават да се откриват нови механизми на действие и клиничен потенциал.

## **Приноси**

### **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, свързани с дисертационния труд

1. Manolova Y., Stoycheva Z., Yordanov Y., Grupcheva Ch. Amniotic membrane transplantation - analysis of structural characteristics in amniotic membrane transplant and corneal ulcers. Scripta Scientifica 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

## **Благодарности**

Изказвам своята признателност на **проф. д-р Христина Групчева** за предоставените възможности и доверие, за примера, който ми даде в постигане на целите и мечтите.

## **Безкрайно благодаря**

На **семейството** ми за безрезервната подкрепа, разбиране и любов!

На **доц. д-р Яна Манолова** - една невероятна, истинска и достойна жена и професионалист, на която искрено се възхищавам и безкрайно уважавам. Благодаря за подкрепата, помощта в реализирането на проекта и ценните съветите.