



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна
Факултет „Медицина“

Д-р Димитър Иванов Групчев

КЛЕТЪЧНА И ТЪКАННА ТЕРАПИЯ
НА ПРЕДНА ОЧНА ПОВЪРХНОСТ
Възможности и перспективи

АВТОРЕФЕРАТ

за придобиване на образователна и научна степен „*доктор*“

Област на висшето образование: 7. Здравеопазване и спорт
Професионално направление: 7.1. Медицина

Научен ръководител:

Проф. д-р Зорница Златарова-Ангелова, д.м.н.

Варна 2021 г.

Дисертационният труд е с обем 200 страници и е онагледен с 32 фигури и 17 таблици. Библиографията включва 119 литературни източници.

Дисертационният труд е обсъден и насрочен за защита на заседание на катедрения съвет на Катедра по очни болести и зрителни науки, проведен на 08.01.2021г.

Изследванията по дисертационния труд са проведени в „Специализирана болница по очни болести за активно лечение - Варна“ ЕООД, УМБАЛ „Св. Марина“ - Варна и базите на Медицински университет - Варна.

НАУЧНО ЖУРИ

Председател:

Проф. д-р Зорница Иванова Златарова-Ангелова, д.м.н., МУ-Варна

Членове:

Външни членове:

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

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

Доц. д-р. Марин Ангелов Атанасов, д.м., МУ-Пловдив

Вътрешни членове:

Доц. д-р Бинна Николаева Ненчева, д.м., МУ-Варна

Защитата на дисертационния труд ще се проведе на 05.03.2021г. от 10.30 ч. в лекционна зала 214 на „Специализирана болница по очни болести за активно лечение – Варна“ ЕООД.

СЪДЪРЖАНИЕ

ВЪВЕДЕНИЕ / 5

СПИСЪК НА СЪКРАЩЕНИЯТА, ИЗПОЛЗВАНИ В ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД / 7

РЕЗЮМЕ НА БЪЛГАРСКИ ЕЗИК / 9

РЕЗЮМЕ НА АНГЛИЙСКИ ЕЗИК / 13

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ / 16

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИКА / 17

1. Материал и методики за теоретичен анализ / 17

2. Оценка на клиничните методики за трансплантация на тъкани и клетки в офталмологията / 17

3. Материал и методики за клиничните дейности и анализи / 17

3.1 Оперативно лечение с използване на амниотична мембрана като покритие / 18

3.2 Оперативно лечение – пенетрираща кератопластика / 19

3.3 Оперативно лечение – трансплантация на донорски (алогенни) стволови клетки / 21

3.4 Оперативно лечение – трансплантация на собствени (автоложни) стволови клетки / 21

3.5 Оперативно лечение – трансплантация на преработен биопродукт – алохил / 22

3.6 Подготвяне на фибриново лепило / 22

4. Материал и методики за дейности по трансплантация, свързани с подготовка на донорски материал / 23

4.1 Методика за подготовка на амниотична мембрана / 23

4.2 Методика за подготовка на донорска роговица / 27

5. Материал и методики за експерименталните дейности и анализи / 29

5.1 Методика за подготовка на биологичен продукт – амниотична мембрана със стволови клетки (алохил) / 29

5.2 Децелуларизирана амниотична мембрана / 29

5.3 Подготовка на донорски лимбални епителни клетки / 30

5.4	Преработка на децелуларизирана амниотична мембрана и лимбални епителни клетки / 31
5.5	Оценка на получения биопродукт / 31
6.	Материали и методика за работа с иновативни технологии / 32
6.1	Дигитален оперативен микроскоп с възможности за триизмерна визуализация / 32
6.2	Оптична кохерентна томография в реално време и за оценка на оперативната техника / 34
6.3	Сравнителен анализ на оперативни интервенции на предната очна повърхност с използване на класически и контролиран с оптична кохерентна томография 3D операционен микроскоп / 36
РЕЗУЛТАТИ / 37	
1.	Резултати от анализа на икономическите, правните и социални аспекти на трансплантацията в България / 37
2.	Резултати от оценката на клиничните методики за трансплантация на тъкани и клетки в офталмологията / 46
3.	Алгоритми за трансплантация на роговица, амниотична мембрана и стволови клетки / 55
4.	Оценка на триизмерната ОСТ контролирана хирургия / 57
5.	Структура и стандартни оперативни процедури за очна банка за роговица, склера и лимбални стволови клетки от нов тип / 64
6.	Анализ на предимствата и недостатъците на биологични продукти и медицински изделия. Създаване на прототип / 67
6.1	Създаване на биологичен продукт / 67
6.2	Разработка на медицинско изделие / 68
6.3	Разработка на прототип / 68
ОБСЪЖДАНЕ / 75	
ЗАКЛЮЧЕНИЕ / 84	
ИЗВОДИ / 86	
ПРИНОСИ / 87	
СПИСЪК С ПУБЛИКАЦИИТЕ, СВЪРЗАНИ С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД / 88	

ВЪВЕДЕНИЕ

Трансплантацията на органи, тъкани и клетки е висш пилотаж в медицината. В годините трансплантацията е преминала през множество социални, правни, икономически, политически и религиозни препятствия, за да достигне до днешната си структурирана фаза, в която е символ на хуманност и спасен човешки живот. В Европа, и в частност в България, има много строга регулация, която се урежда законодателно и администрира чрез Изпълнителната агенцията „Медицински надзор“ (ИАМН). ИАМН, чрез Дирекция „Управление и координация на трансплантацията и асистирана репродукция“, е компетентният орган за управление, координация и контрол на трансплантацията в Република България. Агенцията е юридическо лице на бюджетна издръжка със седалище град София и е второстепенен разпоредител с бюджетни кредити към министъра на здравеопазването. Дейността, структурата и организацията на работата на Дирекция „Управление и координация на трансплантацията и асистирана репродукция“ се определят с устройствен правилник, приет от Министерския съвет по предложение на министъра на здравеопазването. Трансплантацията като цяло има два аспекта:

- вземане, обработка, преработка, съхранение и разпространение на тъкани и клетки;
- присаждане на тъкани, клетки и органи.

Тези две основни направления от дейности обичайно се извършват от различни лечебни заведения, а именно банки и хирургически центрове. По закон в България трансплантация може да се извършва само в акредитирани за целта лечебни заведения, които отговарят на съответните стандарти. Отново законодателно се урежда, че трансплантацията може да бъде извършена само като средство на последен избор, когато другите възможни терапевтични средства са изчерпани и неефективни.

Един от най-дискутираните и строго следени проблеми на трансплантацията е възможността за предаване на заболявания от донора на реципиента. Законодателят е уредил този въпрос, но в медицината все още има неизяснени заболявания, както и такива, за които няма диагностични тестове. Независимо че е negliжиран, по-сериозният проблем на трансплантацията е реакцията на отхвърляне на трансплантата. Всеки реципиент носи този риск за цял живот и възможността за настъпване на епизод на реакция на отхвърляне е непредвидим, както са непредвидими и последствията от нея.

В офталмологията трансплантацията датира като методология от 1837 г., когато ирландският офталмолог Самуел Бъгър извършва първата

трансплантация от газела на газела (автоложна трансплантация). От този момент в световен мащаб се работи по различни техники на автоложна трансплантация в офталмологията. В началото на нашето хилядолетие започна активна работа и по създаване на изкуствена роговица. Тук разнообразието е много голямо и се правят опити за изцяло полимерни структури, за хибриди или за биологични продукти, съдържащи собствени или донорски клетки. Независимо че роговицата е сравнително проста структура с добре познати характеристики и елементи, за момента всички тези опити са най-общо казано неуспешни. Последните надежди се възлагаха на 3Д принтирането, но засега и там няма значим успех. В процеса на тези експерименти се оказва, че има възможност за стимулиране на собствените регенеративни възможности на роговицата и така трансплантацията на амниотична мембрана в офталмологията се превърна в алтернатива и дори средство на избор в много ситуации. Първата регистрирана трансплантация на обработена АМ е извършена през 90-те години от Ким и Тсенг. Много години преди това прогресивни офталмолози са използвали необработена мембрана, взета от нормално раждане, като лечение на последен избор. Един от тези пионери в България е патронът на варненската офталмология проф. Никола Константинов.

Всички тези исторически, юридически, политически и правни моменти, на много от които съм бил свидетел през краткия си професионален живот, ме накараха да разработя настоящата дипломна работа, която представя медицинската и правна основа за трансплантация в офталмологията, както и анализ на възможностите за увеличаване на ползите и намаляването на рисковете от трансплантация в офталмологията. Разработката застъпва и перспективите за разработване на нови продукти и възможностите за преработка на тъканите в биологични продукти и медицински изделия.

Не на последно място, нашето поколение има шанса да работи с уникална технология в клиничната практика, като приложението на триизмерна микроскопия и оптична кохерентна томография в реално време, което създава условия за прецизност на хирургията до микрони.

СПИСЪК НА СЪКРАЩЕНИЯТА, ИЗПОЛЗВАНИ В ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

На кирилица:

АМ	Амниотична мембрана
дАМ	Децелуларизирана амниотична мембрана
ИАЛ	Изпълнителна агенция по лекарствата
ИАМН	Изпълнителна агенция „Медицински надзор“
ИАТ	Изпълнителна агенция по трансплантация
ИВКМ	Ин виво конфокална микроскопия
КМ	Конфокален микроскоп
КОСТ (акция)	Акция за европейско сътрудничество в областта на науката и технологията
ЛЕК	Лимбални епителни клетки
ЛЗ	Лечебно заведение
ЛСК	Лимбални стволови клетки
МЗ	Министерство на здравеопазването
МУ-Варна	Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна
ОСТ	Оптична кохерентна томография
ПК	Пенетрираща кератопластика
ПОП	Предна очна повърхност
СБОБАЛ	Специализирана болница по очни болести за активно лечение – Варна
СОП	Стандартни оперативни процедури
ТБ	Тъканна банка
УИН	Уникален идентификационен номер
УМБАЛ „Св. Марина“ - Варна	Университетска многопрофилна болница за активно лечение „Света Марина“

На латиница:

CE	маркировка Знак за съответствие на стоки на европейския пазар
DALK	Дълбока предна ламеларна кератопластика
DMEK	Мембранна ендотелна кератопластика
DSAEK	Автоматизирана ендотелна кератопластика
DSEK	Дълбока ендотелна кератопластика с отстраняване на ендотела

DEWEK	Десцеметорексис без трансплантация на ендотел
EGF	Епидермален растежен фактор
EMA	Европейска агенция по лекарствата
ETDRS (таблица)	Стандартизирана таблица с опто типични за изследване на зрителната острота на база проучването за ранно лечение на диабетна ретинопатия
FGF	Фибробластен растежен фактор
iOCT	Интраоперативна оптична кохерентна томография
HLA	Човешки левкоцитарен антиген
mm	милиметър
μm	микрометър
nm	нанометър
PK	Пенетрираща кератопластика
PDGF	Тромбоцитен растежен фактор
SLET	Проста лимбална епителна трансплантация (simple limbal epithelial transplantation)
TGF-β	Трансформиращ растежен фактор-β

РЕЗЮМЕ

Въведение

Трансплантацията в офталмологията е област с нови и бързо развиващи се перспективи, което ще позволи приложение на хибридни технологии и тъканно инженерство с цел постигане на по-добри оптични резултати и хомеостаза на предната очна повърхност. Към момента роговичната трансплантация се затруднява от липсата на тъкан и неравномерното разпределение на банките за роговична тъкан както в национален, така и в европейски аспект. Трансплантацията на амниотична мембрана (АМ) е една модерна алтернатива без аналог, която обаче не може да замени, а само да подпомогне сложните възстановителни процедури на предната очна повърхност (ПОП). Създаването на иновативни трансплантати, биопродукти и медицински изделия е една относително неразработена в България ниша, която би допринесла за връщане на зрението на много пациенти с трайна инвалидизация.

Цел

Целта на настоящия дисертационен труд е да се направи анализ на възможностите за клетъчна и тъканна терапия на ПОП, като се приложат иновативни технологии и се тестват методики за персонализирано лечение, в резултат на което да се разработят алгоритми за тъканна обработка, съобразени със специфичните условия в България.

Материали и методи

За анализите са използвани общодостъпните регистри на Изпълнителна агенция „Медицински надзор“ (ИАНН), клинични данни на проспективно набирани пациенти, както и ретроспективно – досиета на пациенти, оперирани в базата, където работи и специализира докторантът за последните десет години при спазване на всички нормативни и етични правила и норми. Методиките включват теоретичен анализ на законодателството, клиничен анализ и детайлизирани ръководства за извършване на трансплантацията в България и света. Приложен е въпросник за тестване на тенденциите за извършване на трансплантация в България. Разработени са алгоритми за приложение на трансплантати, биологични продукти и медицински изделия за приложение в офталмологията при конкретните условия в България. Разработени са стандартни оперативни процедури за вземане, обработка, преработка, разпространение, транспорт и приложение на роговица, склера и лимбални стволови клетки (ЛСК), съобразно законодателната уредба в Р България. Осъществено е експериментално „производство“ и приложение на биологичен продукт/медицинско изделие върху предната очна повърхност.

Всички клинични процедури са извършени с приложение на иновативна технология от последно поколение за микроструктурна оценка по време на операция чрез триизмерна микроскопия и оптична кохерентна томография (ОСТ) в реално време.

Резултати

Анализът на регистрите на ИАМН за шестгодишен период показва неравномерно разпределение на трансплантациите в зависимост от териториалното наличие на „очна банка“ с концентрация на роговичните трансплантации в София-град (три очни банки, предоставящи роговица) и на АМ в Университетската специализирана болница по очни болести за активно лечение (на територията на Варна функционира най-активната тъканна банка за АМ). Тази тенденция, освен неблагоприятен здравен ефект, има и икономически последици.

Анализът на въпросниците за тенденциите на трансплантацията в България (38 правилно попълнени от 100 изпратени) показва, че роговичните трансплантации в над 90% от случаите се извършват с класически техники. Само по 2% са случаите на предна и задна ламеларна кератопластика. Комплицираните техники за трансплантация на АМ се ограничават до 10%. Все пак съществува устойчива тенденция за нарастване на броя на трансплантации на АМ в национален мащаб. Интересен е фактът, че в най-натоварения с този вид хирургия център при една трета от случаите е последващо лечение, което подчертава основното предимство на приложението на АМ: поради липса на имуногенност няма ограничения в броя на извършените трансплантации и разпределението им във времето. Впечатление прави и големият брой роговични дистрофии, които се обработват с трансплантация на АМ. Основната индикация за това са рецидивиращите ерозии, а най-често срещаната роговична дистрофия в национален мащаб – латисовата.

Направен е проспективен анализ на 186 трансплантации, от които 28 – трансплантации на роговица. Данните са сравнени с резултатите от ретроспективния анализ на 2050 трансплантации на АМ, извършени от един хирург за последните 10 години.

Трансплантацията на лимбални стволови клетки има дълга медицинска история, но съвременните възможности на тъканното инженерство позволяват тяхното размножаване *ин витро*. Това е основа за изработване на медицинско изделие и/или биопродукт. Практическият анализ показва отлични резултати както с автоложни, така и с алогенни лимбални стволови клетки. На база проспективния опит и ретроспективен анализ са разработени и тествани (при 88 пациенти) алгоритми за извършване на различни видове трансплантация върху ПОП.

Добрата оперативна техника в офталмологията е силно зависима от технологията. Ето защо част от проучването е посветено на ролята и мястото на иновативните технологии, като триизмерната микроскопия и интраоперативната оптична кохерентна томография (iOCT). За целта на проучването са анализирани ретроспективно, на база видеозаписи и документацията на пациентите, 20 последователни трансплантации на АМ, извършени с конвенционален микроскоп Lumera 700 (n=10 случая), както и същият брой случаи, извършени с триизмерна технология на Artevo 800 и задължително приложение на OCT. Резултатите показват, че усложненията при използване на Artevo 800 със задължително приложение на OCT са по-малко, а епителизацията е значително по-добра, което рефлектира в статистически значимото подобрене на зрението. Друг важен момент е по-прецизната визуализация и намаляване на риска от засягане на съдове и кървене, което се дължи както на по-широкото зрително поле, така и на дълбочината на фокуса. Това, което се установява, е и относително еднаквото време за извършване на операцията, което заедно с подобрените клинични резултати е в полза на 3D технологията.

В процеса на подготовка на този труд е разработена концепция за иновативна очна банка с възможност за надграждане с нови технологии. Разработени са стандартни оперативни процедури за вземане, обработка, преработка, съхранение, разпространение и транспорт на роговица и склера, както и за пръв път в България – процедури за вземане, обработка, преработка, съхранение, разпространение и транспорт на лимбални стволови клетки.

Натрупаните знания и практически опит позволяват извършване на анализ за възможностите за разработка на медицински изделия по поръчка и биопродукти. Тези анализи са базирани на световния опит, българското законодателство и конкретния разработен прототип на биопродукт, чрез използване на т.нар. „белгийска методика“. Представени са няколко клинични случая.

Заклучение

Предната очна повърхност е уникална част от нашия организъм и зрителния анализатор. Нейното здраве се изразява в три прости усещания от страна на пациента: зрение, комфорт и липса на зачервяване. Нарушенията, засягащи всяка една от структурите, които я изграждат, водят до засягане по съседство и това отключва порочния кръг на заболяване на ПОП. Предната очна повърхност може да бъде увредена от множество разпространени и редки заболявания. Лечението често е комплексно и изисква време и постоянство. В последните години приложението на иновативни терапии промени значително прогнозата на множество заболявания, водещи до роговична слепота и

цикатризация на ПОП. Хибридните технологии в комбинация с новите разбирания за биохимичните и микроструктурни промени позволяват прилагане на персонализирани терапии с отлични резултати. Независимо от това има много социални, правни, медицински и етични проблеми, които трябва да бъдат дискутирани и променени с цел да се намери разумно решение. Офталмологията е високотехнологична специалност и за хирургическите интервенции и особено за трансплантациите е необходимо приложение на методики, позволяващи микроструктурен анализ в реално време и непрекъснат визуален контрол от целия екип.

ABSTRACT

Introduction

Transplantation in ophthalmology is a field with new and fast developing perspectives, which will allow the implementation of hybrid technologies and tissue engineering with the aim of achieving better optic results and anterior ocular surface homeostasis. At present, corneal transplantation is restricted by the lack of tissue and the uneven distribution of corneal tissue banks both in national and European aspect. The transplantation of amniotic membrane (AM) is a modern alternative unlike any other which, however, cannot replace but only aid the complex recovery processes in the anterior ocular surface. The creation of innovative transplants, bio- and medical products is a relatively underdeveloped niche in Bulgaria, which could contribute to vision restoration in many patients with enduring disabilities.

Aim

The aim of this dissertation work is to analyze the possibilities of cell and tissue therapy of the anterior ocular surface by implementing innovative technologies and testing methodologies for personalized treatment. This would lead to the development of algorithms for tissue processing in accordance with the specific conditions in Bulgaria.

Materials and Methods

The following is used for the analyses: freely available registries of the Executive Agency “Medical Supervision”, clinical data of prospectively recruited patients; a retrospective analysis includes files of patients who have undergone a surgery at the base where the PhD candidate is working and completing a residency, for the last ten years, adhering to all regulatory and ethical rules and norms. The methodologies consist of a theoretical analysis of the legislation, clinical analysis, and detailed manuals on performing a transplantation in Bulgaria and the world. A questionnaire focused on testing the trends in performing transplantations in Bulgaria is added. Algorithms for the use of transplants, bio- and medical products for application in ophthalmology under the specific conditions in Bulgaria have been developed. Standard operative procedures for the recovery, processing, preparation, distribution, transportation, and use of cornea, sclera, and limbal stem cells, following the legislation of the Republic of Bulgaria, have been created. Experimental “production” and implementation of a biological/medical product on the anterior ocular surface have been performed. All clinical procedures have been conducted using state-of-the-art innovative technology for microstructural assessment during surgery by means of 3D microscopy and real-time optical coherent tomography (OCT).

Results

The analysis of the results from the registries of the Executive Agency “Medical Supervision” for a six-year period showed uneven distribution of transplantations depending on the territorial availability of an “eye bank” with a concentration of corneal transplantations in the city of Sofia (three eye banks supplying cornea) and AM transplantations – in the University Specialized Eye Hospital for Active Treatment (the most active bank for AM functions on the territory of Varna). In addition to an unfavorable health effect, this trend also has economic consequences.

The analysis of the questionnaires on the transplantation trends in Bulgaria (38 correctly filled out out of 100 sent) shows that, in 90% of the cases, corneal transplantations are performed using classic techniques. The shares of anterior and posterior lamellar keratoplasty are only 2% each. The complex AM transplantation techniques are limited to only 10%. However, there is still a sustainable trend demonstrating an increase in the number of AM transplantations nationally. Of interest is the fact that in the busiest with this type of surgery center for one third of the cases this is subsequent treatment, which underscores the main advantage of the application of AM: due to the lack of immunogenicity, there is no limit to the number of the performed transplantations and their distribution in time. Noteworthy is also the high number of corneal dystrophies, which are treated with AM transplantation. The main indication for this are recurring erosions, and the most frequent corneal dystrophy nationally is the lattice one.

A prospective analysis of 186 transplantations has been conducted. Of them 28 are corneal transplantations. The data have been compared with that of the retrospective analysis of 2050 AM transplantations performed by a single surgeon in the last 10 years.

The transplantation of limbal stem cells has a long medical history, but the modern abilities of tissue engineering allow their in vitro multiplication. This is a basis for the manufacture of a medical and/or bioproduct. The practical analysis shows excellent results both with autologous and with allogenic limbal stem cells. Based on the prospective experience and retrospective analysis, algorithms for the performance of different types of transplantation on the anterior ocular surface have been developed and tested in 88 patients.

The good operative technique in ophthalmology is strongly dependent on technology. Therefore, part of the study is dedicated to the role and place of innovative technology, such as 3D microscopy and intraoperative OCT. For the purpose of the study, a retrospective analysis, based on video recordings and patient documentation, is conducted on 20 consecutive AM transplantations performed with a conventional Lumera 700 microscope (n=10 cases) and the same number of cases

where Artevo 800 three-dimensional technology is used together with a mandatory OCT. The results show that the complications when using Artevo 800 with a mandatory OCT are fewer and the epithelialization is considerably better, which is reflected in the statistically significant vision improvement. Another important moment is the more precise visualization and the decrease of the risk of damaging vessels and bleeding, which is due both to the wider visual field and to the depth of the focus. It has been established that the time needed for the surgery is relatively the same which, together with the improved clinical results, is in favor of the 3D technology.

In the process of preparing this work, a new concept for an innovative eye bank with the possibility of adding upgrades in the form of new technologies has been developed. Standard operative procedures for the recovery, processing, preparation, storage, distribution, and transportation of cornea and sclera have been created, as well as, for the first time in Bulgaria, procedures for recovery, processing, preparation, storage, distribution, and transportation of limbal stem cells.

The accumulated knowledge and practical experience allow the conducting of an analysis of the possibilities for the development of made-to-order medical products and bioproducts. These analyses are based on international experience, Bulgarian legislation, and the specific bioproduct prototype developed, using the so-called “Belgian methodology”. Several clinical cases are presented.

Conclusion

The anterior ocular surface is a unique part of our organism and the visual analyzer. Its health is measured by three simple patient sensations: vision, comfort, and lack of redness. The impairments affecting each of the structures which are part of it lead to a damage to the neighboring structures and this unlocks the vicious circle of the anterior ocular surface disease. The anterior ocular surface can be impaired by a number of common and rare disorders. Often the treatment is complex and requires time and perseverance. In recent years, the implementation of innovative therapies has significantly changed the prognosis of numerous diseases leading to corneal blindness and anterior ocular surface cicatrization. Hybrid technologies, in combination with the new understanding of biochemical and microstructural changes, allow the application of personalized therapies with excellent results. Nevertheless, there are still many social, legal, medical and ethical problems, which should be discussed and changed with the aim of finding a reasonable solution. Ophthalmology is a high-technology specialty and for surgical interventions, especially transplantations, the application of methodologies allowing real-time microstructural analysis and constant visual control by the entire team is necessary.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел

Да се направи анализ на възможностите за клетъчна и тъканна терапия на предната очна повърхност, като се приложат иновативни технологии и се тестват методики за персонализирано лечение, в резултат на което да се разработят алгоритми за тъканна обработка, съобразени със специфичните условия в България.

Задачи

- 1. Да се направи обзор на правните и икономически аспекти и законодателни разпоредби, свързани с трансплантацията и в частност трансплантацията в офталмологията, както и анализ на дефинициите, определени от закона в контекста на клиничната работа.*
- 2. Да се анализират утвърдените методики за трансплантация на тъкани и клетки в офталмологията и да се направи карта за тяхното приложение в България.*
- 3. Да се обобщят резултатите от клиничния анализ и да се формулират алгоритми за работа в областта на очната трансплантация.*
- 4. Да се анализират предимствата на съвременната триизмерна ОСТ контролирана хирургия на предна очна повърхност.*
- 5. Да се изготвят структура и стандартни оперативни процедури с цел създаване на очна банка от ново поколение на територията на Североизточна България.*
- 6. Да се тества методика за създаване и приложение на биологични продукти и/или медицински изделия в офталмологията. Да се изработят прототипи.*

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИКА

1. Материал и методики за теоретичен анализ

В процеса на реализация на така поставените задачи за извършване на обзор и анализ на правните, икономически, клинични аспекти и законодателни разпоредби, свързани с трансплантацията и трансплантацията в офталмологията в частност, са използвани следните теоретични методи:

- *Документален метод* – прилага се за проучване на теоретичната основа на законодателството у нас и в ЕС.
- *Метод на сравнението* – чрез този метод има възможност да се анализират резултатите през различни отчетни периоди, както и да се съпоставят резултатите в България с тези в ЕС.
- *Графичен способ* – чрез него нагледно се представят резултатите.
- *Статистически методи* – използвани при обработката на данните от анализа.

Материалите, използвани в изследването, са законови уредби, подзаконови уредби, публикации и издания в специализираната офталмологична литература, както и документацията на Центъра по транслационна медицина и клетъчна терапия на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна (МУ-Варна) и СБОБАЛ – Варна ЕООД.

2. Оценка на клиничните методики за трансплантация на тъкани и клетки в офталмологията

За изпълнение на тази задача е използван регистърът на ИАМН, като е направен анализ на всички трансплантации в офталмологията. В допълнение е разработен въпросник, който е раздаден на 100 български офталмолози с придобита специалност по офталмология и изразен интерес към трансплантацията на роговица и АМ. Въпросникът е предоставен като приложение 1.

Втората част от задачата е изпълнена, като са разгледани, анализирани и актуализирани всички протоколи за извършване на трансплантация на АМ, стволови клетки и роговица. Финализираните варианти на избрани протоколи са предоставени като приложения.

3. Материал и методики за клиничните дейности и анализи

За клиничния анализ на дейностите по трансплантация са проследени 206 пациенти за период от три години, от които 28 са с трансплантация на

роговица, 158 са с трансплантация на АМ и 30 с автоложна или алогенна трансплантация на ЛСК.

Пациентите са набирани проспективно в две кохорти. Пациентите за роговична трансплантация са предварително регистрирани в листа на чакащи и са оперирани на принципа на неотложност поради краткия срок, в който материалът може и трябва да бъде използван. Пациентите за АМ са планови и неотложни случаи в съотношение 2:1 (102 планови и 56 неотложни). От неотложните случаи с АМ 12 са оперирани повторно – трансплантация на роговица, а 11 са получили планово втора трансплантация на АМ. Всички пациенти за ало- и автотрансплантация на ЛСК са оперирани планово. Клиничните и демографските характеристики на пациентите са представени в раздела с резултати.

Клиничните изследвания на пациентите включват зрителна острота с използване на стандартна ETDRS таблица (стандартизирана таблица с оптоотипи за изследване на зрителната острота на база проучването за ранно лечение на диабетна ретинопатия) и десетично представяне на резултата, вътреочно налягане с тонометър на Голдман и/или Тонопен, биомикроскопия като част от пълния клиничен преглед (включително и фотография), оптична кохерентна томография по време на оперативната интервенция или в пре/постоперативния период и конфокална микроскопия на живо по преценка.

Поради класическия характер на гореспоменатите методики стъпките в изследването са извършени съобразно алгоритъма, утвърден в Катедрата по очни болести и зрителни науки на МУ-Варна и няма да бъдат представени в детайли в настоящия труд.

Всички пациенти са оперирани по стандартни методики в хирургичното отделение на СБОБАЛ – Варна, като са спазени следните оперативни протоколи:

3.1. Оперативно лечение с използване на амниотична мембрана като покритие

Пациентът е подготвен с локална анестезия – 3 капки през 2 минути. След почистване на оперативното поле и поставяне на стерилен дрейп, клепачите се отварят с блефаростат и се позиционира оперативният микроскоп. Предната очна повърхност се почиства от остатъчни дебри и се полира с инструмент или полираща гъбка. Амниотичната мембрана се изважда по стерилен начин от контейнера и се промива със стерилен физиологичен разтвор (темперирани на стайна температура). Под микроскоп мембраната се отлепва от носителя и се поставя със стромалната част към предната очна повърхност. След позициониране и адаптация се поставя 8.0

викрил като непрекъснат кръгов шев с 8 бода. Възелът остава на 6 часа. Мембраната се промива до пълно прилепване към ПОП и се поставя терапевтична контактна леща (силикон-хидрогелна) с умерен модул на твърдост, с цел осигуряване на оптимална протекция. Поставят се само антибиотични капки и превръзка за минимум 60 минути.

3.2 Оперативно лечение – пенетрираща кератопластика

Пациентът се подготвя за оперативната интервенция с обща анестезия. Позицията на главата се уточнява с анестезиолога. Много е важно ирисовата равнина да е успоредна на пода и полето за работа. След почистване и покриване на оперативното поле се позиционира микроскопът. Взема се последна мярка и се уточнява размерът на трепанините.

Използва се вакуумен трепан на Барон, като донорският е с 0.25 мм по-голям от реципиентния. Това е така заради посоката на трепанация и тенденцията за контракция на колагена, което води до „свиване“ на донорския бутон и „разширяване“ на реципиентното ложе. Първо се трепанира донорската роговица. По този начин, при неблагоприятни явления (неправилна трепанация, увреждане на ендотела), не се достига до трепаниране на реципиента. Трансплантацията се извършва, като се следват стандартните стъпки, утвърдени като методика в лечебното заведение.

Стъпка 1 – трепаниране на донорската роговица:

- *Роговицата се изважда от разтвора и отцежда;*
- *Позиционира се върху донорската платформа, където се поставят 5 маркиращи точки, създават се условия за вакуум чрез натискане на буталото на спринцовката, поставя се протектиращият пръстен и чрез пускане на буталото се създава вакуум;*
- *Позицията на роговицата се оглежда внимателно, при ексцентрично разположение се извършва репозициониране;*
- *Поставя се гилотината с ножа и с едно рязко движение се извършва трепанацията;*
- *Платформата на гилотината се повдига внимателно, отстранява се корнеосклералният пръстен, а донорският бутон остава прикрепен от вакуума;*
- *Задейства се буталото на спринцовката, при което се освобождава донорският бутон и внимателно се премества на стерилна транспортна платформа;*
- *Транспортната платформа се пренася на помощната инструментална маса, поставя се протектираща вискозубстанция върху ендотела и се*

покрива с влажна камера.

Стъпка 2 е трепаниране на реципиентната роговица:

- Преди началото на трепанацията се прави страничен отвор (извън зоната на шевове) и се въвежда кохезивна вискозубстанция;*
- Първо се извършва оглед на трепана и маркиране на точките на вакуумната платформа (съответстват на 12 прекъснати шева);*
- Следва определяне на центъра на трепанацията с цел да се постигне оптимален оптичен резултат;*
- Маркиране на центъра и оценка;*
- Поставяне на платформата и задействане на вакуума (ножът трябва да е в нулева позиция, за да има контрол върху дебелината на пенетрация – една четвърт завъртане съответства на 50 микрона);*
- Проверка на вакуума и позицията (кръстът на трепана трябва да съвпада с маркирания център);*
- Трепанация с бавно завъртане на трепана по посока на часовниковата стрелка;*
- При поява на признак за пенетрация, незабавно освобождаване на вакуума;*
- Довършване на трепанацията с нож или корнеална ножица.*

Стъпка 3 – адаптиране на донорската роговица към реципиентното ложе (изключение правят случаите на комбинирана хирургия, която не е обект на настоящото изложение):

- Трансплантатът се пренася със специална шпатула и атравматично се поставя в реципиентното ложе;*
- Поставят се 4 кардинални шева с цел постигане на оптимална адаптация;*
- Последователно се поставят останалите 12 шева;*
- Промива се предната камера;*
- Поставят се антибиотици (вътрекамерно и субконюнктивално).*

При възникнали интраоперативни отклонения и компликации се вземат специфични мерки. Поставят се антибиотични капки, субконюнктивална инжекция на антибиотик с кортикостероиден препарат и превръзка за минимум 12 часа.

3.3 Оперативно лечение – трансплантация на донорски (алогенни) стволови клетки

Пациентът е подготвен с локална анестезия – 3 капки през 2 минути. След почистване на оперативното поле и поставяне на стерилен дрейп клепачите се отварят с блефаростат и се позиционира оперативният микроскоп. Предната очна повърхност се почиства от дебри и се полира с инструмент или полираща гъбка. Извършва се перитомия в зоната на лимбален дефицит. При нужда се извършва каутеризация на съдовете. Донорският корнеосклерален сегмент се фиксира и ЛСК се отсепарират. Парченцето се разпределя в зависимост от големината на увредената зона. При SLET (проста лимбална епителна трансплантация) се извършва разделяне на парченцето на около 20 равни малки сегмента, които се разпределят равномерно в четирите квадранта. Лимбалните клетки се фиксират с фибриново лепило (виж методиката по-долу) или с помощта на шевове. Повърхността се покрива с АМ. Амниотичната мембрана се изважда по стерилен начин от контейнера и се промива със стерилен физиологичен разтвор (стайна температура). Под микроскоп мембраната се отлепва от носителя и се поставя със стромалната част към ПОП. След позициониране и адаптация се поставя 8.0 викрил като непрекъснат кръгов шев с 8 бода. Възелът остава на 6 часа. Мембраната се притиска до пълно прилепване към ПОП, като подлежащите трансплантати се щадят и манипулират много внимателно. Поставя терапевтична контактна леща (силикон-хидрогелна) с умерен модул на твърдост, с цел осигуряване на оптимална протекция. Поставят се само антибиотични капки и превръзка за 24 часа.

3.4 Оперативно лечение – трансплантация на собствени (автоложни) стволови клетки

Пациентът е подготвен с локална анестезия – 3 капки през 2 минути на двете очи. След почистване на оперативното поле и поставяне на стерилен дрейп, клепачите на окото-донор се отварят с блефаростат и се позиционира оперативният микроскоп. Намира се подходяща зона за вземане на трансплантат, която е препоръчително да е в долноназалния или долнотемпоралния квадрант. Взетият трансплантат се поставя върху стерилно стъклено петри с епителната част нагоре. В окото се поставят антисептични капки. Почиства се другото око и се поставя стерилен дрейп. Предната очна повърхност се почиства от дебри и се полира с инструмент или полираща гъбка. Извършва се перитомия в зоната на лимбален дефицит. При нужда се извършва каутеризация на съдовете. Парченцето се разпределя в зависимост от големината на увредената зона. При SLET се извършва разделяне на парченцето на около 20 равни малки сегмента, които се разпределят равномерно в четирите квадранта. Лимбалните клетки се

фиксира с фибриново лепило (виж методиката по-долу) или с помощта на шевове. Повърхността се покрива с АМ. Амниотичната мембрана се изважда по стерилен начин от контейнера и се промива със стерилен физиологичен разтвор (стайна температура). Под микроскоп мембраната се отлепва от носителя и се поставя със стромалната част към ПОП. След позициониране и адаптация се поставя 8.0 викрил като непрекъснат кръгов шев с 8 бода. Възелът остава на 6 часа. Мембраната се притиска до пълно прилепване към ПОП, като подлежащите трансплантати се щадят. Поставя се терапевтична контактна леща (силикон-хидрогелна) с умерен модул на твърдост, с цел осигуряване на оптимална протекция. Поставят се само антибиотични капки и превръзка за 24 часа.

3.5 Оперативно лечение – трансплантация на преработен биопродукт – алохил

Пациентът е подготвен с локална анестезия – 3 капки през 2 минути на двете очи. След почистване на оперативното поле и поставяне на стерилен дрейп, клепачите на окото-донор се отварят с блефаростат и се позиционира оперативният микроскоп. Предната очна повърхност се почиства от дебри и се полира с инструмент или полираща гъбка. Извършва се перитомия в зоната на лимбален дефицит. При нужда се извършва каутеризация на съдовете/инжектиране на медикаменти (бевацизумаб). Биопродуктът алохил се изважда внимателно от ямката и се промива с физиологичен разтвор със стайна температура. Промиването става внимателно, чрез накапване, за да не се травмират клетките. Пръстенът се адаптира към форникса и мембраната бавно се изрязва с форма, съответна на ПОП. След позициониране и оценка, се поставя 8.0 викрил като непрекъснат кръгов шев с 8 бода. Възелът остава на 6 часа. Поставя се терапевтична контактна леща (силикон-хидрогелна) с умерен модул на твърдост с цел осигуряване на оптимална протекция. Поставят се само антибиотични капки и превръзка за 24 часа.

3.6 Подготовка на фибриново лепило

Фибриновото лепило е автоложен биопродукт, който се изработва експонентно и се прилага самостоятелно или в комбинация с горепосочените методики. Има много и различни варианти, но в Катедрата по очни болести и зрителни науки и СБОБАЛ – Варна е утвърдена следната методика:

Вземане на кръв от пациента:

- *За кръвна плазма (2,7 мл) – два вакутейнера със синя капачка. Кръвта се взима до обозначената марка!*
- *За кръвен серум (5 мл) – един вакутейнер с жълта капачка. Кръвта се взима до обозначената марка!*
- *Центрофугиране на вакутейнерите с кръв при 2500 g за 15 мин на стайна*

температура.

- *Изтегляне на кръвната плазма с инсулинова спринцовка (очаквано количество – приблизително 1.2 мл на вакутейнер). Изтегля се в 2 спринцовки (по 1 на вакутейнер). Не се изтегля целият супернатант, за да се избегне замърсяване с левкоцити!*
- *Изтегляне на кръвен серум с инсулинови спринцовки. Очаквано количество – приблизително 1.5 мл, което се изтегля с една инсулинова спринцовка. Не се изтегля целият супернатант, за да се избегне замърсяване с левкоцити!*
- *В спринцовката с кръвен серум се добавя калциев глюконат в отношение 1:2.6 (към 1.2 мл кръвен серум се добавят 3.12 мл калциев глюконат).*
- *За получаването на фибриново лепило се смесват 1 част от кръвната плазма с 1.7 части от кръвен серум/калциев глюконат (към 1.5 мл кръвната плазма се добавя 2.55 мл кръвен серум/калциев глюконат).*

Фибриновото лепило се приготвя минимум 15 мин преди употреба.

Всички гореспоменати методики са стандартни оперативни протоколи, които се отразяват в историята на заболяването на всеки пациент.

4. Материал и методики за дейности по трансплантация, свързани с подготовка на донорски материал

4.1 Методика за подготовка на амниотична мембрана

Целта на всички процедури е вземане, обработка, съхранение и разпространение на АМ, която да е годна за трансплантация с минимален риск за реципиента.

Процесът е колективен, като всички членове на персонала, които извършват вземането и обработката на АМ, са длъжни да спазват отделните процедури.

Три от основните СОП, адаптирани за настоящата и бъдеща работа, са дадени като приложение 2. Останалите оперативни процедури са на разположение в Отделението „Тъканна банка“ на СБОБАЛ – Варна ЕООД.

Освен стандартното оборудване, важно значение имат веществата и медикаментите за обработка на АМ:

- Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen/Life Technologies, cat# 11885-084 или Sigma-Aldrich, cat# D5546);
- Антибиотичен/антимикотичен разтвор (Invitrogen, cat# 15240062 или Sigma-Aldrich, cat# A5955);
- Транспортна среда: DMEM+1% антибиотик/антимикотик;

- Hanks' balanced salt solution (HBSS, Life Technologies, cat# 24020117) или Phosphate-buffered saline (PBS; Life Technologies, cat# 10010049);
- Среда за съхранение: 50% DMEM с 1% антибиотици/антимикотици, 0.38% натриев бикарбонат (Life Technologies, cat# 25080094), и 50% глицерол (Sigma-Aldrich, cat# G2025);
- Бутилка 125 ml от полипропилен/полиестерен с широко гърло;
- Нитроцелулозна хартия (47 mm или 25 mm): Merck Millipore или Sartorius;
- Лекарства: гентамицин, пеницилин, ципрофлоксацин, амфотерицин В.

След като се осигурят необходимите съставки, трябва да се приготвят и специфичните за вземане, обработка и съхранение на мембраната разтвори, както следва:

- Транспортна среда: към 99 ml DMEM се прибавя 1 ml разтвор на антибиотици/антимикотик 100X;
- Разтвор за измиване: към 99 ml HBSS се прибавя 1 ml разтвор на антибиотици/антимикотик 100X;
- Среда за криосъхранение: 50% DMEM с антибиотици/антимикотици и 50% глицерол: към 100 ml транспортна среда се прибавят 100 ml глицерол [World J Transplant. 2014 Jun 24; 4(2): 111–121. doi: 10.5500/wjt.v4.i2.111.].

Важно е да се знае, че транспортните разтвори, разтворите за промивка и съхраняващите среди, предварително проверени за стерилност, трябва да са налични не повече от 1 ден преди вземането и обработката. Работните разтвори и средите трябва да се приготвят не повече от 7–10 дни с пълна верификация на рН и стерилност.

Самият процес включва няколко последователни стъпки:

- Плацентата се взема от лекар гинеколог в гинекологичната клиника при стерилни условия при планирано цезарово сечение след пълна бременност;
- Мястото, където се извършва обработката на АМ, трябва да е предварително дезинфекцирано, за да е годно за стерилно вземане и обработка;
- Акушер-гинекологът поставя плацентата заедно с клампата на пъпната връв в стерилно легенче (неръждаемо, по възможност с капак);
- Кламтата се оставя до премахването на амниона, за да се предотврати изпълването с кръв;
- Извършва се макроскопски оглед на плацентата с цел изключване на възможните видими патологични промени;
- Извършването на последващите елементи на процедурата се извършва от лекар офталмолог;

- Плацентата се измива със стерилен физиологичен разтвор (студена, течаща вода) за 1 час до отстраняване на кръвните съсиреци;
- Поставя се в нов стерилен леген;
- Ако плацентата не може да бъде обработена веднага, се съхранява в хладилник при 4°C и се обработва в рамките на 24 часа;
- С помощта на тъпа дисекция се извършва внимателно разделяне на АМ от хориона (**Внимание! Това е една от най-важните стъпки за получаване на хомогенен трансплантат, който се адаптира добре към очната повърхност!**);
- Амниотичната мембрана се измива от остатъчните кръвни съсиреци с физиологичен разтвор;
- Остатъците от хориона върху АМ се отстраняват внимателно с помощта на хирургичен пинсет;
- АМ се поставя в 125 ml бутилка с широко гърло с 50 ml транспортна среда в свободно състояние;
- Транспортната среда (DMEM) с добавени 3.3% L-глутамин и антибиотици (50 µg/ml gentamicin, 100 U/ml penicillin, 200 µg/ml ciprofloxacin и 1 mg/ml Amphotericin B) се приготвят в съотношение 1:1;
- Бутилката се обозначава с етикет и се транспортират до лабораторията в хладилна чанта при температура от 2 до 40°C и при следните минимални условия:
 - Времето за транспортиране на АМ от операционната зала до тъканната банка трябва да е по-малко от 1 час при поддържана температура от 2-40°C;
 - Ако времето за транспортиране на плацентата от операционната зала до лабораторията е повече от 1 час: поддържаната температура с помощта на сух лед трябва да е между -60/-85°C;
- Съхранение преди трансплантация – не повече от 24 часа при температура от +2/+8°C;
- В лабораторията обработката се извършва при стайна температура, при стерилни условия в ламинарен бокс;
- Трикратно измиване на АМ от остатъчни кръвни елементи със стерилен физиологичен разтвор в специален стерил леген;
- Внимателно оглеждане и отстраняване на всички елементи от остатъчен хорион с анатомичен пинсет;
- Равномерно разстилане на АМ чрез заглаждане без гънки или разкъсвания върху индивидуално стерилизирана нитроцелулозна хартия със стромата към хартията, а епителния слой/базална мембрана нагоре

(ако е необходимо: изследване на малко парченце от АМ под микроскоп за определяне на епителната страна);

- АМ и нитроцелулозната хартия се измиват в стерилен фосфатно-буфериран разтвор, съдържащ 1000 U/mL penicillin, 20 µg/mL streptomycin и 2.5 µg/mL amphotericin B;
- Изчакване 60 мин АМ да адхерира върху хартията;
- Разрязване на парчета с размери 2 x 2;
- Нитроцелулозната хартия заедно с АМ се поставят в стерилни пластмасови бутилки с капачка на винт и широко гърло и се етикират по обозначения в СОП за съхранение и разпространение на АМ начин;
- При криосъхранение в бутилките се поставя криосъхраняваща среда в съотношение 1:1 стерилен глицерол (стерилизиран с автоклав) и DMEM с 3,3% L-глутамин, 25 µg/ml gentamicin, 50U/ml penicillin, 100 µg/ml ciprofloxacin и 0.5 mg/ml Amphotericin B;
- От случайна бутилка от партидата се взема 5 ml/1 ml от разтвора и се инокулира в 100 ml в brain heart инфузионна среда и 100 ml тиогликолатна хранителна среда/комбинирана среда за проверка на бактерии и гъбички. Инкубират се в продължение на 21 дни и ако не се наблюдава растеж на бактерии или гъбички, партидата трябва да се разглежда като свободна от микробни агенти.
- Бутилките се означават със съответния размер, дата на приготвяне и уникален идентификационен номер.
- Тези, които ще се криосъхраняват, се поставят във фризера на -78/-85°C с продължителност на съхранение до 2 години.

Всяка тъканна банка е длъжна да разполага с точна, навременна и проследима чрез установените процедури информация за всеки трансплант, за да бъде в състояние да оттегли всички тъкани, които могат да бъдат включени в един сериозен медицински инцидент или сериозна нежелана реакция. Това включва и уведомяване на компетентния за страната орган (ИАМН). Служителите на лабораторията трябва да бъдат инструктирани да оценяват необходимостта от изнемване на биологичния материал и обучени за координиране на необходимите действия в случай на нужда.

При предоставяне на криосъхранена АМ трябва да се направи писмено споразумение между клиничния потребител/хирурга и лабораторията. Това споразумение трябва ясно да уточнява отговорностите и задълженията на двете страни. Лабораторията следи за качеството на тъканите по време на тяхното разпределение. Разпределението се прави в съответствие с приложимите нормативни актове.

Първичната опаковка на криоконсервираната АМ трябва да носи етикет, съдържащ изброената по-долу информация:

- тип тъкан, например криосъхранена АМ;
- ID номер или код;
- ID номер на лабораторията (включително адрес и телефонен номер);
- срок на годност.

Цялата информация за всеки квадратен сантиметър/отделна единица АМ трябва да бъде проследима. Това осигурява безопасна работа и добри резултати.

4.2 Методика за подготовка на донорска роговица

Подготовката на донорска роговица е много по-трудоемък и деликатен процес, свързан с по-изразена нужда от координация, бърза реакция и прецизна обработка. Три от основните СОП, адаптирани за настоящата и бъдеща работа, са дадени като приложение 3, а останалите са на разположение в Отделението „Тъканна банка“ на СБОБАЛ – Варна ЕООД.

В най-общи линии се касае за три етапа – оценка и подготовка, извършване на корнеосклералната инцизия и обработка на трупния донор.

Основните стъпки на първия етап започват с оценка, както следва:

- *Извършва се проверка на документацията*, попълнена от координатора по донорство или от отговорното лице, както и проверка на полученото съгласие.
- *Извършва се оглед на очните орбити* с помощта на фенерче (penlight) и тупфер (или клечки с памук).
- Поставят се нестерилни ръкавици и се извършва *оглед на роговиците*.

При одобрение на макроскопското качество на очната роговична тъкан се пристъпва към нейната ексцизия.

Роговицата се взема по стерилен начин. Екипът по експлантация облича нестерилна престилка, шапка маска и калцуни. Върху подходяща повърхност се разстила нестерилен чаршаф и се изважда преп-китът от найлоновата опаковка. Разтварят се с голи ръце външният компрес на преп-кита и 2 чифта стерилни ръкавици. Поставя се първият чифт стерилни ръкавици. Със стерилни ръкавици се отваря вътрешният стерилен компрес на преп-кита. Изготвя се 100 ml разтвор на 5% повидон-йодин. В чашата от преп-кита се отпипетират чрез спринцовка 50 ml 10% разтвор на повидон-йодин. Към него се добавят 50 ml стерилен разтвор на 0,9% NaCl (5 амп. x 10 ml). Така изготвеният разтвор се изсипва във ваничката, включена в преп-кита. Ръкавиците се сменят и се поставят нови стерилни ръкавици. Оперативното поле се почиства за всяко око поотделно по стандартна

методика. Следва промиване на конюнктивалния сак със стерилен физиологичен разтвор. Свалят се ръкавиците и с голи ръце се отстранява вътрешният компрес от преп-кита. Изваждат се виалките с консервиращата среда и се надписват за ляво и дясно око. Капачетата се отварят, но не се отстраняват от виалката. Приготвят се два чифта стерилни ръкавици. С голи ръце върху подходяща повърхност се изваждат от него експлантационният пакет и пакетът със стерилните инструменти.

С голи ръце се поставя експлантационният пакет върху първия останал стерилен компрес от преп-кита и се отваря. Инструментите се изсипват върху стерилния компрес. Приготвят се два флакона с NaCl и се отварят. Поставят се двата чифта стерилни ръкавици един над друг. С тупфер (или клечка с памук) се повдига горният клепач на дясното око и се промива с едното шишенце с NaCl остатъка от йодния разтвор по очната повърхност. Попива се със суха стерилна марля. Същата процедура се повтаря с лявото око. Сваля се горният чифт стерилни ръкавици. Поставят се две стерилни марли върху капачките на двете виалки консервираща среда. Поставя се чаршафът с дупка върху лицето на донора. Отварят се инструментите и се подреждат.

Извършването на корнеосклералната ексцизия е ключов момент, който изисква концентрация, щадяща техника и максимална стерилност. **Внимание!** Винаги се започва с дясно око.

Процедурата започва с поставяне на блефаростата. Отпрепарира се конюнктивата на 360° с помощта на пинцет и конюнктивална ножичка. Почиства се склерата от остатъците на конюнктивата в посока от лимба навън. Прави се разрез на склерата на 2 мм от лимба със скалпел и инцизията се довършва с церкумферентен разрез на склерата на 360° с остра извита ножичка, като се оформя корнеосклералният бутон. С помощта на плосък пинцет се отделя корнеосклералният бутон от подлежащите тъкани внимателно – да не се образуват гънки на Десцеметовата мембрана, като се внимава да не се изръси пигмент или кръв върху ендотелната роговична повърхност. След това роговицата се захваща здраво с плоския пинцет, а с другата ръка се повдига капачето на виалката с консервиращата среда и се пуска вътре. Виалката се затваря. Същата процедура се повтаря с лявото око.

Третият етап е за завършване на процедурата. След приключване на корнеалната ексцизия очните протези се поставят върху очите с помощта на пинцет и тупфер. Клепачите се нагласят внимателно надолу в затворено положение и се залепват с медицинско лепило. Лицето се почиства много добре с марля и физиологичен разтвор.

В оперативния протокол на очната банка медицинското лице, което извършва корнеосклералната експлантация, отбелязва срока на годност и

LOT № на всеки разтвор от използваните китове, както и стерилността на инструментариума.

Роговичната тъкан се консервира в специални за целта среди, като се спазват необходимите условия за това. Спазването на изискванията за консервиране в определена среда осигуряват качеството и безопасността на взетата роговична тъкан. Консервирането на роговичната тъкан се извършва в среда Eusol-C, като съхранението се реализира в хладилник на температура от +4°C до +8°C за срок до 14 дни.

5. Материал и методики за експерименталните дейности и анализи

5.1 Методика за подготовка на биологичен продукт – амниотична мембрана със стволови клетки (алохил)

Биологичният продукт се получава чрез преработка на АМ – децелуларизиране и популирането ѝ с лимбални клетки по т.нар. „белгийска методика“, чрез поставяне на лимбалния сегмент, източник на прогениторни клетки, върху мембраната. Теоретично, подобен биологичен продукт може да бъде и индивидуално медицинско изделие. Предимството на втората дефиниция е приложението на регулаторни механизми за медицинско изделие, но за съжаление, в България има известни законодателни препятствия, които трябва да бъдат решени.

Биологичният продукт е съчетание от два елемента – носител и клетки. За носител може да бъде избран различен субстрат, включително и преработен с 3Д принтиране колаген. В конкретния случай на настоящата работа е селектиран носител, с който има опит и който лесно може да бъде получен от преработка на АМ.

5.2 Децелуларизирана амниотична мембрана

Децелуларизираната АМ (дАМ) е преработена АМ до превръщането ѝ в субстрат, който се използва за носител на лимбални епителни клетки (ЛЕК).

Подготовката на дАМ включва следните стъпки:

- Размразяване на съхранената АМ на стайна температура;
- Почистване на ламинарния бокс последователно с разтвори на 6% водороден пероксид и 70% етанол;
- Подготвяне на аликвоти от 25 мл стерилен физиологичен разтвор и стерилен фосфатен буфер в 50 мл стерилни центрофужни епруветки;
- Трикратно промиване на АМ със стерилен физиологичен разтвор за 30 минути на стайна температура при равномерно разклащане на ротационна клатачка;

- Инкубиране на АМ с 1% разтвор на протеолитичен ензим термолизин за 8 минути на стайна температура при равномерно разклащане на ротационна клатачка;
- Трикратно измиване на АМ с 1х фосфатен буфер за 10 минути на стайна температура при равномерно разклащане на ротационна клатачка;
- Установяване ориентацията на дАМ със стерилна марля – дАМ се разпъва върху 10 см стерилно петри и до мембраната се допира стерилната марля. Ако марлята залепне към мембраната, тази страна е фибробластна. Ако не, дАМ се обръща така, че фибробластната страна да застане нагоре.
- дАМ се поставя на стерилна нитроцелулозна хартия и се оразмерява с големина 45 x 45 мм.
- Оразмерените мембрани се съхраняват сухи в 50 мл стерилни центрофужни епруветки на -20°C. Сухите мембрани са годни до 3 месеца след изработването им.

За приложение на децелуларизирана мембрана като носител е необходимо допълнително обработване с цел постигане на ергономични разфасовки както за целуларизация, така и за трансплантация. Направени бяха множество експерименти и се установи, че най-ефективният метод е подготовка на рингове от пластичен материал и мануално фиксиране на мембраната.

Ринговете се подготвят 24 часа преди инокулирането на мембраната с клетки с цел оптимално манипулиране по време на хирургическата процедура. Адаптирането на дАМ към ринга става чрез пришиване с 8:0 викрил хирургически конец. Особено е важно мембраната да има „аванс“, тъй като опънатата АМ може да се скъса при растежа на клетъчната популация. Пришитите дАМ се в поставят в 6-ямкови плаки, съдържащи транспортна среда за 24 часа.

5.3 Подготовка на донорски лимбални епителни клетки

За ЛЕК се използват остатъчни бутони, получени след трепанация за роговична трансплантация. Всеки донор на ЛЕК е регистриран в ИАМН и идва със собствен уникален идентификационен номер (УИН). Разработени са СОП, най-важните 3 от които са представени като приложение 4, останалите се намират на разположение в Отделението „Тъканна банка“ на СБОБАЛ – Варна.

Методология:

- Почистване на ламинарния бокс последователно с разтвори на 6% водороден пероксид и 70% етанол;

За целта на настоящото проучване е адаптирана така наречената „белгийска методика“. При нея сегмент от ЛСК се взема и директно се поставя върху носителя. Стимулирането на растежа се осъществява чрез използване на подходяща среда за култивиране. Опитът показва, че най-добър резултат има при приложение на екс темпоре приготвена среда: към DMEM/HAM F12 се добавят 10 мл серум от човешка АБ кръв и 5 мл антибиотичен/антимикотичен разтвор. Средата за култивиране трябва да се подменя на 3 дена.

5.4 Преработка на децелуларизирана амниотична мембрана и лимбални епителни клетки

Преработката чрез репопулиране с клетки е най-дългият етап и се извършва в инкубатор в продължение на 2-4 седмици. Подготовката за инкубация включва:

- Култивиране на адхезиралите клетъчни експланти до запълване на зрителното поле с клетки;
- Премахване на клетъчните експланти и култивиране в клетъчен термостат до запълване на 80% от повърхността на ринговете;
- Отстраняване на транспортната среда от ринговете с дАМ, намиращи се в 6-ямковите плаки;
- Добавяне на 0.5 мл среда за култивиране;
- Разпределение на преработения лимбален трансплантат (минимум 2 кв.мм), леко ексцентрично;
- Наблюдение на поведението на клетъчния експлант чрез инвертен светлинен микроскоп;
- Подмяна на култивиращата среда на 3-4 дни.

5.5 Оценка на получения биопродукт

Оценката на биопродукта е важен етап преди предоставяне за приложение върху ПОП. Много е важно да се обърне внимание на следните основни индикатори:

- *Наличие на достатъчен брой клетки.* Минимално 80% от повърхността на дАМ ринговете трябва да е популирана с ЛЕК.
- *Интактност на дАМ повърхността.* Полученият материал трябва да има интактна повърхност (минимум 75%); ако се наблюдават нарушения в целостта на повърхността, те трябва да се намират в периферната зона на ринговете.
- *Липса на микробиологично замърсяване.* При индикация за прогресиращо микробиологично замърсяване, дАМ ринговете се унищожават незабавно.

Тази полуколичествена и качествена оценка се извършва с инвертен светлинен микроскоп и чрез микробиологично изследване, което е задължително за всяка „партида“.

При изпълнение на всички условия, биопродуктът алохил е годен за употреба и може да бъде предоставен на лечебно заведение за трансплантация.

6. Материали и методика за работа с иновативни технологии

6.1 Дигитален оперативен микроскоп с възможности за триизмерна визуализация

В последните години микроскопите навлизат все по-широко в хирургичната практика. В офталмологията те имат повече от 50-годишна история, като днес повечето офталмохирургични процедури са немислими без микроскоп. Процесът улеснява визуализацията и допринася за по-прецизна и по-ефективна хирургия, но има негативен ефект върху офталмолозите хирурзи. По литературни данни най-засегнати са витреоретиналните хирурзи, като до 62% от тях съобщават за хронична болка в шийната област и гърба.

Един начин за намаляване на постуралните проблеми е извършването на хирургия с „главата нагоре“, което е възможно благодарение на навлизането на триизмерната технология в хирургията. По правило има две възможности – активно и пасивно триизмерно наблюдение. В офталмологията се използва пасивното, при което двата образа се „разделят“ от поляризирани очила.

За целите на настоящата работа е използван дигитален триизмерен микроскоп Artevo 800, който позволява класическа и триизмерна хирургия, поради което хирургията се нарича „хибридна“. Освен предимството на хирурга да избере с коя технология желае да оперира, микроскопът позволява непрекъснато триизмерно наблюдение от персонала и обучаващите се.

Изображенията, получени с хибридна технология, имат 25% по-добра резолюция, по-голяма дълбочина на фокуса и водят до светлинно натоварване на пациента, по-ниско с 85%. Предимствата на микроскопа включват и възможност за връзка с клауд и пренос на данни от диагностични изследвания, дигитална оптика с автофокус, 4K монитор.

Работата с микроскопа не се отличава логистично от тази със стандартен операционен микроскоп, но изисква предварително запознаване

с функциите на педала (те могат да бъдат кustomизирани за съответния хирург) и дигиталния екран с точ скрийн.

В условията на пандемия от COVID 19 се оказа, че приложението на система с 3Д изображение на монитор, изискваща изправено положение на главата, е не само удачен метод за дистанциране, но и отличен метод за защита от издишания от пациента въздух, в който потенциално се съдържат инфекциозни причинители (фигура 6).

В настоящото проучване е използван дигитален триизмерен микроскоп Artevo 800 и е сравнен с Lumera 700 (стандартен високотехнологичен светлинен микроскоп за оперативна работа в офталмологията), показано на фигура 7.



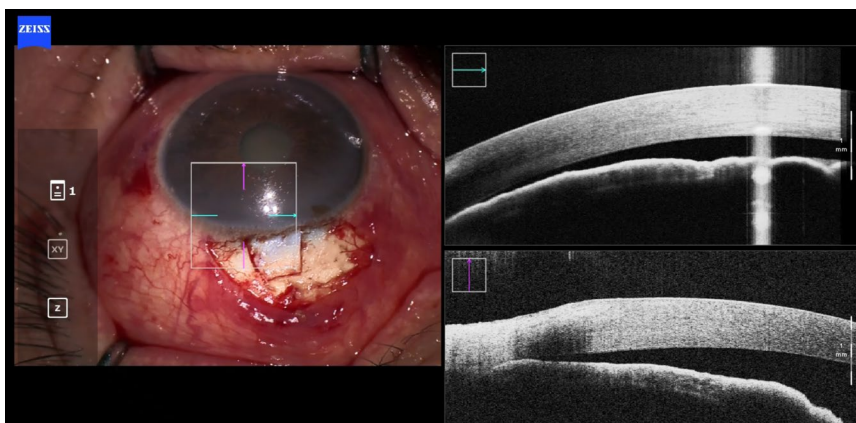
Фигура 6. Работа в условия на COVID 19 – хирургът и персоналът носят корекция, триизмерни очила и предпазна маска, което гарантира оптимална защита



Фигура 7. Работа на стандартен светлинен микроскоп Lumera 700 (а), обърнете внимание на позицията на тялото и главата на хирурга и асистента и на Artevo 800 (б), който позволява наблюдение от всяка точка на операционната на голямо увеличение в триизмерно изображение в реално време

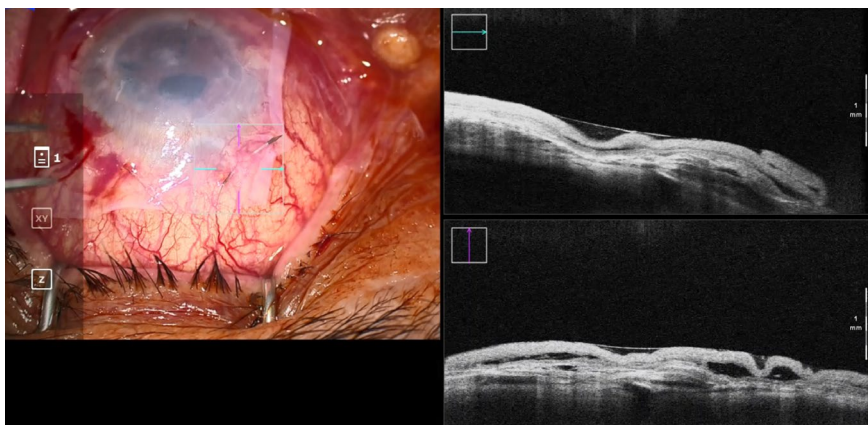
6.2 Оптична кохерентна томография в реално време и за оценка на оперативната техника

Оптичната кохерентна томография (ОСТ) навлиза в клиничната практика през деветдесетте години на миналото столетие. Едва през 2001 г. ръчните апарати насочват технолозите към идеята, че ОСТ може да се използва в легнало положение. В 2009 г. се произвежда първият апарат, приложим по време на предносегментна хирургия. От този момент се въвежда и терминът iОСТ (интраоперативно ОСТ). Съвременните ОСТ апарати са интегрирани в микроскопите и могат да се използват с помощта на педала, като се суспендира X/Y движението от джойстика (фигура 8).



Фигура 8.
Стандартна iОСТ
по време на
антиглаукомна
хирургия.
Демонстрирана е
намалената
дълбочина на
предната камера

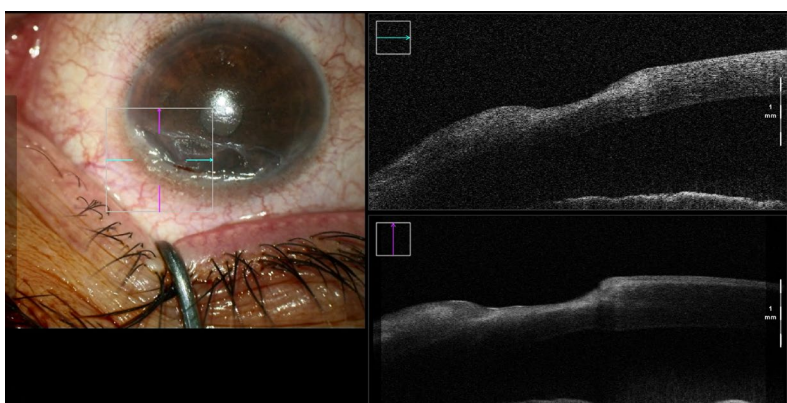
Важно е да се отбележи, че iОСТ е по-скоро качествен, отколкото количествен метод. Един от основните недостатъци е взаимодействието на апарата с използваните за оперативното лечение инструменти и субстанции (фигура 9). Металните инструменти дават хиперрефлектираща сянка, която може да наруши значително изображението в динамика. Друг недостатък е необходимостта от избор на функциите на педала – за работа на микроскопа или за работа на ОСТ, което изисква по-голяма концентрация от страна на хирурга.



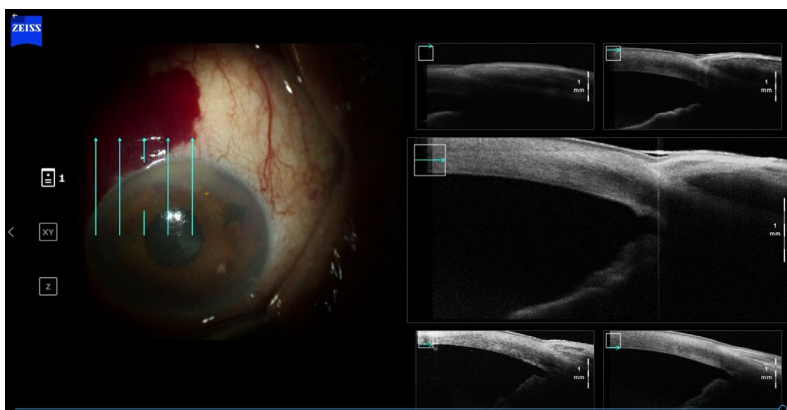
Фигура 9.
Стандартна
iОСТ в зоната на
шева, вижда се
„сянката на
иглата“

Независимо от посочените недостатъци, iOCT е бъдещето на офталмохирургията. В настоящите проучвания са използвани OCT центтражи с 2 и 5 линии с различна дължина с цел да се постигне оптимално изображение, позволяващо детайлизиран анализ на микроструктурно ниво (фигура 10 и 11).

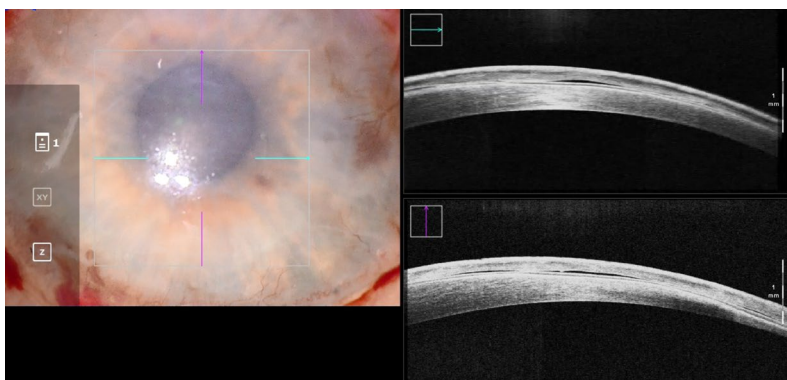
Изображението на OCT може да бъде черно-бяло или оцветено допълнително (фигура 12 и 13). За целта на проучването са използвани паралелно двата варианта с цел да се постигне консенсус за изображението, най-подходящо за преден очен сегмент. За изображение на очното дъно е известно, че поради жълтеникавите отблясъци допълнително оцветените изображения са по-добре видими от хирурга.



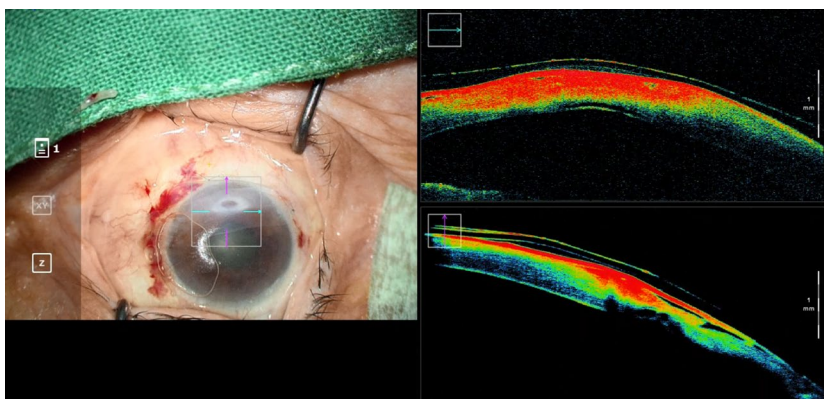
Фигура 10.
Стандартна iOCT
центраж с 2 взаимно
перпендикулярни
линии



Фигура 11.
Стандартна iOCT
центраж с 5
паралелни линии



Фигура 12.
Стандартна iOCT в
черно-бяло,
демонстрира силно
изтънена роговица и
плътно покритие с
амниотична
мембрана



Фигура 13.
Стандартна iOCT с
изкуствено
оцветяване

6.3 Сравнителен анализ на оперативни интервенции на предната очна повърхност с използване на класически и контролиран с оптична кохерентна томография 3D операционен микроскоп

За целта на проучването бяха анализирани ретроспективно, на база видеозаписи и документацията на пациентите, 20 последователни трансплантации на АМ и 10 последователни трансплантации на роговица, извършени от един опитен хирург. Половината от всяка група са извършени с конвенционален микроскоп Lumer 700. Другата половина са извършени с триизмерна технология на Artevo 800 и задължително приложение на ОСТ.

От видеофилмите за трансплантациите на АМ се подготвиха за анализ следните параметри: демографските характеристики на пациентите, диагнозата, средното време за извършване на операцията, интраоперативни усложнения, степен на епителизация на 2-ра седмица, зрителна острота на 4-та седмица.

От видеофилмите за трансплантациите на роговица се подготвиха за анализ следните параметри: демографските характеристики на пациентите, диагнозата, средното време за извършване на операцията, интраоперативни усложнения, брой подменени конци и последователност на тяхната подмяна, зрителна острота със стенопеичен отвор на 24-та седмица, астигматизъм на 24-та седмица.

Важно е да се отбележи, че поради клиничния характер на дисертацията повечето методики са съобразени с клиничните изисквания и възможността да се прилагат директно в реални условия. Поради това, че авторът е бил специалист по време на работата по дисертационния труд, всички клинични манипулации и операции са извършени под контрол и наблюдение на старши лекар преподавател.

РЕЗУЛТАТИ

1. Резултати от анализа на икономическите, правните и социални аспекти на трансплантацията в България

Понастоящем в България има четири банки за роговица, три от които са тъканни банки и предоставят и АМ и една е специализирана само за роговица. Исторически Тъканна банка (ТБ) „Пирогов“ е най-старата институция, предоставяща роговична тъкан от 1998 г. Банката е разположена в лечебно заведение и поради тромавия мениджмънт и липсата на мотивирани решения за подобряване на качеството на работа се отличава с изключително ниско качество на работа. Това определя и ниската цена на обработка на роговичната тъкан от 520 лева, но висока годишна такса от 1000 лева за сключване на договор. По данни на ИАМН броят на роговиците, които се вземат и преработват от ТБ „Пирогов“, не надвишават 30 на година за последните 10 години за цялата страна. Банката има договор с 10 центъра, което означава средно 2-4 роговици на център годишно. Банката взема, преработва и предоставя и АМ. Това отново е традиционно най-старата институция в България, предоставила първата АМ за офталмология през 2005 г. Амниотичната мембрана се съхранява в 50% разтвор на глицерин и се предоставя в свободно състояние, неразкроена. Цената на мембраната е 120 лева и от нея могат да бъдат изработени трансплантати за 4-6 очи. Този начин на разфасовка, освен технически, има и важни медицински и етични недостатъци и несъответствия. Това определя оттеглянето на повечето лечебни заведения от работа с ТБ „Пирогов“ за АМ.

Исторически втората банка е специализирана само за роговична тъкан и носи амбициозното име Международна очна банка. Тя е изцяло частна структура и в последните 4 години продаде капитала си на нов, отново частен собственик. Цената на обработката на роговичната тъкан е 1500 лева, но поради високото качество, квалифицираните специалисти и професионалния мениджмънт, банката е с приоритетно място на сцената на роговичната трансплантация и предоставя над 70% от материала за роговична трансплантация в България.

Най-младата структура, предоставяща роговица, е „Биорегенерация“, тя също е разположена в лечебно заведение, но е независима от него. Тази банка разполага с най-високи технологии за всяка една операция по вземане, обработка, преработка, съхранение и разпространение на роговична тъкан. Банката е асоциирана с биологична лаборатория и има ресурс за научни изследвания. Персоналът е много висококвалифициран в своята област. Поради относителната изолация, както и поради агресивната конкуренция на

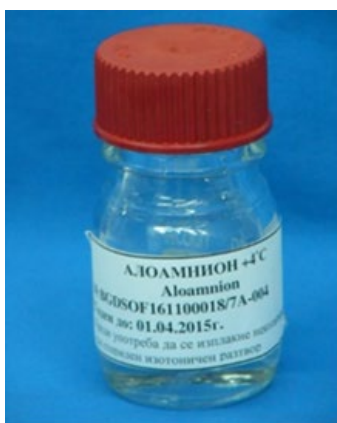
по-старите лечебни заведения, „Биорегенерация“ има изключително малък пазарен дял. Вероятната причина за това е и високата специализация във връзка с основната дейност, а именно ин витро процедури в пълен обем и съхранение на стволови клетки. Цената на обработката на роговична тъкан е 1500 лева, а на АМ – 1.8 на 1.8 см, 80 лева, на изсушена АМ до 300 лева. Банката предлага различни бонус схеми за абонаментно получаване на амниотична тъкан.

Последна в исторически план е тъканната банка на МБАЛ „Св. Марина“. Създадена през 2016 г., банката е специализирана за вземане, обработка, преработка, съхранение и разпространение на АМ. Банката разполага с най-висока технология и произвежда най-съвременния в момента продукт АлоАм в различни размери, но винаги съхранен в специална, разработена от банката, хранителна среда. Особеното на тази среда е, че има индикатор и при настъпване на процеси, можещи да влошат качеството, цветът се променя от ярко розов във виолетов. Цената на обработка за 1 кв. сантиметър АМ е 20 лева. Банката има разрешение за вземане на роговици.

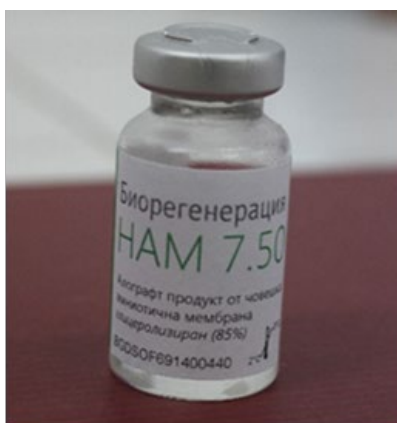
Информацията за предоставяните тъкани за очна трансплантация е обобщена в таблица 3. Вижда се, че пряка конкуренция има само между „Биорегенерация“ и Международна очна банка за роговична тъкан, както и „Биорегенерация“ и Центъра по транслационна медицина и клетъчна терапия за АМ. Продуктите АМ в техните оригинални разфасовки са представени на фигура 14.

Таблица 3. Информация за тъканните банки в България, предоставящи тъкани за трансплантация в офталмологията

Наименование	Асоциация с ЛЗ	Териториално разположение	Роговица	Цена лв.	АМ	Цена
Тъканна банка „Пирогов“	УМБАЛ „Пирогов“	София	ДА	560 лв.	ДА	90 лв. на брой
Международна очна банка	СОБАЛ „Академик Пашев“	София	ДА	1500 лв.	НЕ	-
„Биорегенерация“	УМБАЛ „Надежда“	София	ДА	1500 лв.	ДА	80 лв. за 3.6 кв. см
Център за транслационна медицина и клетъчна терапия	УМБАЛ „Св. Марина“	Варна	Разрешително	-	ДА	20 лв. на кв. см



(а)



(б)



(в)

Фигура 14. Алографт на ТБ „Пирогов“ – съхраняван в глицерол в свободно състояние (а). Алографт на „Биорегенерация“ – върху нитроцелулозна хартия (б). АлоАм на Центъра за транслационна медицина и клетъчна терапия – МУ-Варна върху нитроцелулозна хартия (в)

Според законодателството (национално и европейско) органите и тъканите не могат да бъдат обект на възмездна сделка. Цената, която се заплаща от лечебните заведения и се реимбурсира от Министерството на здравеопазването (МЗ), е за труда и себестойността на вложените материали и консумативи по цялата верига от процеси за вземане, обработка, преработка, съхранение и разпространение на тъкани и органи. Според регламента в 7-дневен срок лечебното заведение изпраща уведомление до ИАМН и МЗ и предоставя на последното финансовата документация [32]. Реимбурсацията се извършва в срок от 20 до 50 дни и съответства на сумата в платежния документ. Ако вземем за пример офталмология, и по-специално роговична трансплантация, реимбурсацията ще бъде почти два пъти по-ниска, ако материалът е взет от ТБ „Пирогов“. Това не е прецедент в международната практика, например тази разлика за трите банки в Холандия може да бъде до 6 пъти [91]. Други европейски държави, като Франция например, имат единен стандарт за реимбурсация и цената на труда за роговична тъкан е еднаква за всички национални банки [92]. Интересно е, че АМ се признава като тъкан за очна трансплантация, регистрира се в ИАМН, но не се реимбурсира. Цената на тъканните банки е различна, но това до голяма степен се определя от начина на обработка и качеството на мембраната. „Биорегенерация“ и Центърът по транслационна медицина предоставят мембрана в индивидуални опаковки на хартиен носител, което определя и относително по-високата цена.

Направен бе обзорен анализ на динамиката на трансплантацията на тъкани в България от 2013 до 2020 г. За този седемгодишен период има

незначителни законодателни, но сериозни пазарни промени. От справка на Изпълнителната агенция по трансплантация (ИАТ) за 2016 г. се вижда че във връзка с промяна на законодателната уредба, като лечебни заведения за база за трансплантация започват да присъстват и медицински центрове. Това в контекста на факта, че медицинските центрове нямат право да работят по пътеките за трансплантация, тъй като те са ограничени до лечебни заведения за болнична помощ, поражда редица въпроси, най-очевидният от които е: как се осъществява финансирането на трансплантацията в медицинските центрове. От интернет ценоразписите се вижда, че роговичната трансплантация е с цена 3000–5000 лева в някои медицински центрове, на други места цената е по запитване. Това очевидно не е „безплатна“ за пациента трансплантация и поставя частните центрове в много по-добра пазарна позиция от лечебните заведения с общинско и държавно участие. Освен това подобно поведение е не само в нарушение на закона за трансплантацията, но потъпква и Конвенцията за защита на правата на човека и човешкото достойнство във връзка с прилагането на постиженията на биологията и медицината. Според споменатата уредба „човешкото тяло и неговите части не могат да бъдат в това си качество източник на печалба“ [93]. Разбира се, тълкуването на тези разпоредби може да бъде различно и това зависи от професионалната етика и морал и от множество социални фактори.

За да подкрепим тази наблюдения, беше направен подробен анализ на трансплантацията на роговица за последните 6 години, като бяха анализирани възможните причини за промяна. Резултатите за всички лечебни заведения с регистрация са представени в таблица 4.

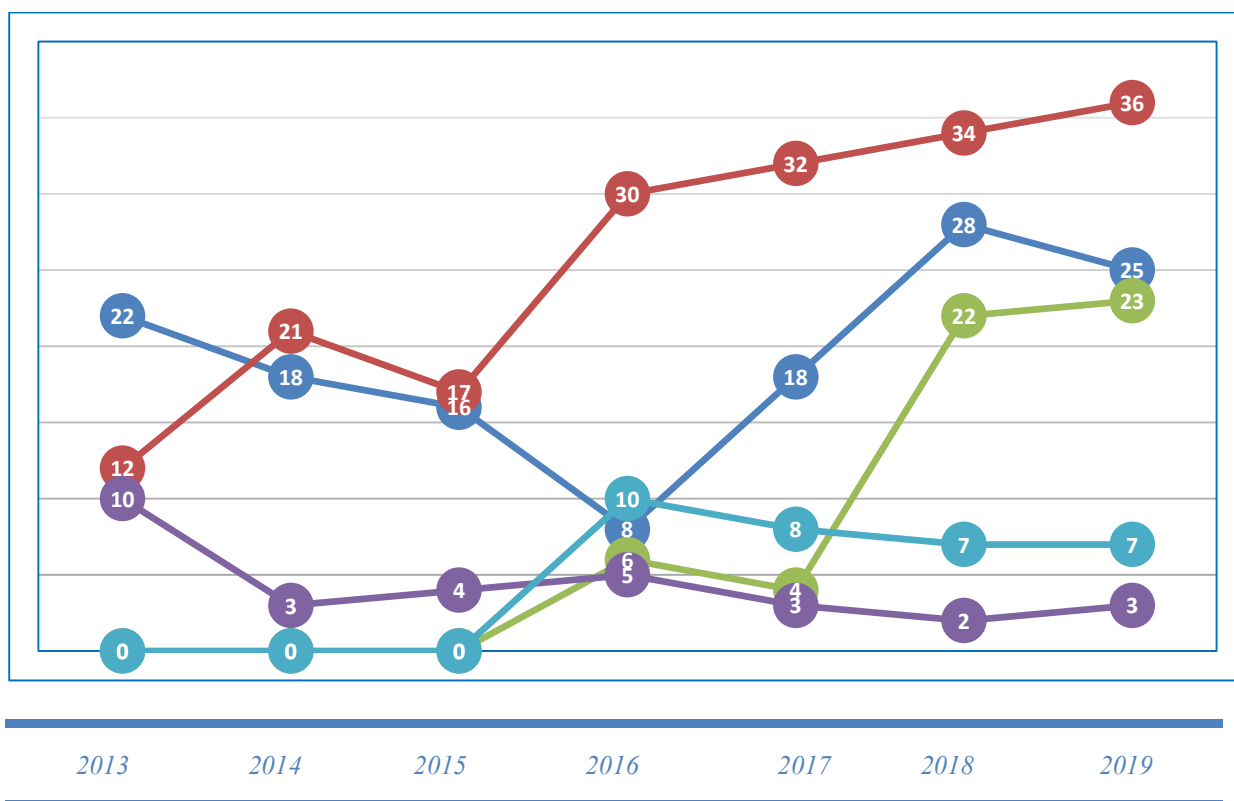
От тази таблица ясно се вижда, че някои лечебни заведения имат относително постоянен брой роговични трансплантации, а други имат вариации. Интересно е, че броят на трансплантациите на СОБАЛ „ДЕН“ ЕООД – София е най-голям. Обяснението, базирано на становище на управителя, е обмен с европейски банки. Това отново поставя въпроса кой плаща разходите по обмена и ако това е пациентът, какво е тълкуването на закона във всеки конкретен случай. По-детайлни данни събрахме за СБОБАЛ – Варна, където ясно се вижда тенденция за намаляване на трансплантациите с най-ниско ниво през 2016 г. Анализът на ситуацията показва, че през 2016 г. лечебното заведение е вземало роговици само от Международна очна банка. Последната, от своя страна, предлага приоритетно роговиците на определени центрове, което налага през 2017 г. СБОБАЛ отново да сключи договори с останалите две банки, с цел да си осигури по-добър достъп до роговичен материал. Проблемът е, че през 2019 г. цената за обработка и предоставяне на роговица се повишава на 1500 лева. Министерството на здравеопазването

обаче реимбурсира съобразно действащата наредба само 1000 лева [94]. Това поставя въпроса кой и по какъв начин компенсира 33.3% дефицит в законоустановената цена за реимбурсация.

Тенденцията през годините за водещите лечебни заведения, осъществяващи трансплантация на роговица, е представена е представена графично на фигура 15.

Таблица 4. Присадени роговици по лечебни заведения в България за периода 2013–2019

Лечебно заведение	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
МБАЛ „Токуда болница“ –София	3	2	4	5	4	5	7
<u>СБОБАЛ – Варна</u>	<u>22</u>	<u>18</u>	<u>16</u>	<u>8</u>	<u>18</u>	<u>28</u>	<u>25</u>
СОБАЛ „Вижън“ – София	0	0	0	4	8	6	6
УМБАЛ „Георги Странски“ – Плевен	7	5	3	5	4	8	10
СОБАЛ „Акад. Пашев“ ЕООД –София	24	19	27	23	17	19	20
СБАЛОБ „Ден“ – София	12	21	17	30	32	34	36
ВМА – София	0	0	0	0	0	0	0
АМЦСМП Очна клиника „Св. Петка“	-	-	-	10	8	7	7
СБАЛОБ „Зора“ ООД – София	-	-	3	5	4	8	12
УМБАЛ „Св. Анна“ – София	2	1	3	4	3	0	0
СБАЛОБ „Зрение“ – София	2	2	2	2	2	1	1
СОБАЛ „Пентаграм“ ЕООД	-	-	-	6	4	22	23
УМБАЛ „Александровска“ – София	10	3	4	5	3	2	3
СОБАЛ „Доц. Георгиев“ ЕООД	2	0	0	0	0	0	0
МЦО „Ресбиомед“	1	3	0	2	1	0	0
Общо	85	74	79	109	108	140	150



Фигура 15. Графично изображение на динамиката на роговичната трансплантация в офталмологията на пет лечебни заведения: СБОБАЛ – Варна (синьо), СБАЛОБ „Ден“ (червено), СОБАЛ „Пентаграм“ (зелено), УМБАЛ „Александровска“ (виолетово) и АМЦСМП Очна клиника „Св. Петка“ (тюркоаз), за годините от 2013 до 2019

Фигурата показва, че национален лидер в момента е СБАЛОБ „Ден“, следван от СБОБАЛ – Варна, но стартовата позиция на частната клиника е значително по-ниска, това се обяснява с възможността на частните болници да осъществяват обмен с очни банки извън България. По-тревожна е друга тенденция, която се наблюдава в столицата, а именно фактът, че двата водещи частни центъра имат 20 пъти повече трансплантации от университетското очно отделение в УМБАЛ „Александровска“. Тази тенденция не е същата за региона на Североизточна България с център Варна, където университетската болница има трикратно по-висок обем на роговична трансплантация.

На база на посочените данни беше изготвена карта на роговичната трансплантация в България, която е представена на фигура 16.

Още по-интересна е ситуацията с присаждането на АМ. СБОБАЛ – Варна, като пионер, запазва своите предимства и прави около 2/3 от трансплантациите на АМ в България (таблица 5). Интересът към този вид трансплантация като цяло се повишава, като лидерът в осъществяването на

тази медицинска услуга запазва тенденцията за лек и стабилен растеж в годините, а останалите лечебни заведения се включват за сметка на разширяване на пазара. Резултатите за трансплантация на АМ са представени във фигура 17.



Фигура 16. Карта на роговичната трансплантация в България. Вижда се ясно, че повече от 2/3 от трансплантациите се извършват в столицата, където са концентрирани и очните банки

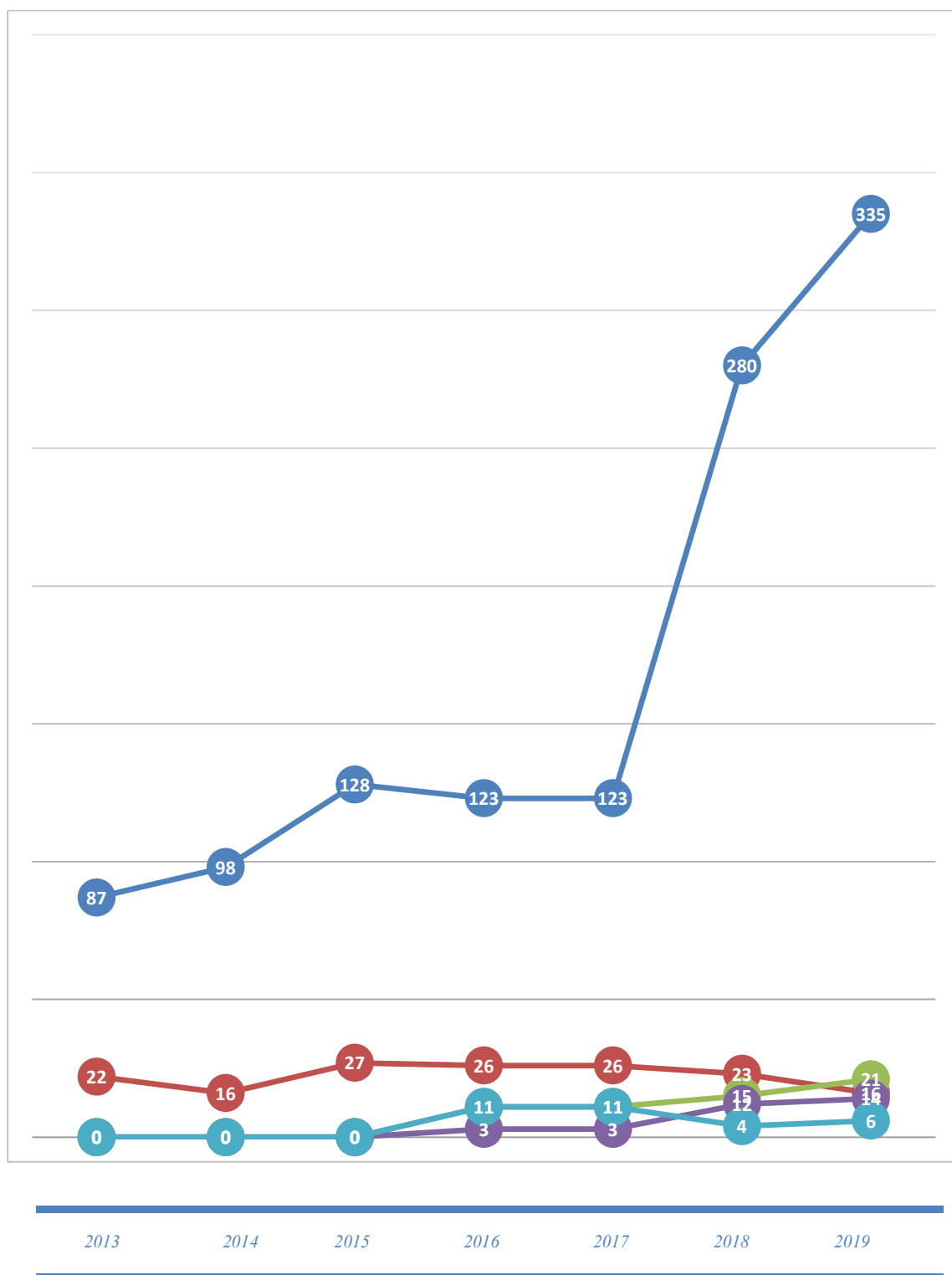
Таблица 5. Присадени амниотични мембрани по лечебни заведения в България за периода 2013–2019 г.

Лечебно заведение	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
МБАЛ „Токуда болница“ – София	0	0	0	0	0	0	3
<u>СБОБАЛ – Варна</u>	<u>87</u>	<u>98</u>	<u>128</u>	<u>123</u>	<u>123</u>	<u>280</u>	<u>335</u>
СОБАЛ „Вижън“ – София	0	0	0	11	11	15	21
УМБАЛ „Георги Странски“ – Плевен	0	0	0	3	3	3	3
СОБАЛ „Акад. Пашев“ ЕООД – София	22	16	27	26	26	23	16
СБАЛОБ „Ден“ – София	0	0	0	3	3	12	14
ВМА – София	0	0	0	3	3	3	4
АМЦСМП Очна клиника „Св. Петка“ АД	-	-	-	0	3	8	9
СБАЛОБ „Зора“ ООД – София	-	-	0	0	0	6	8

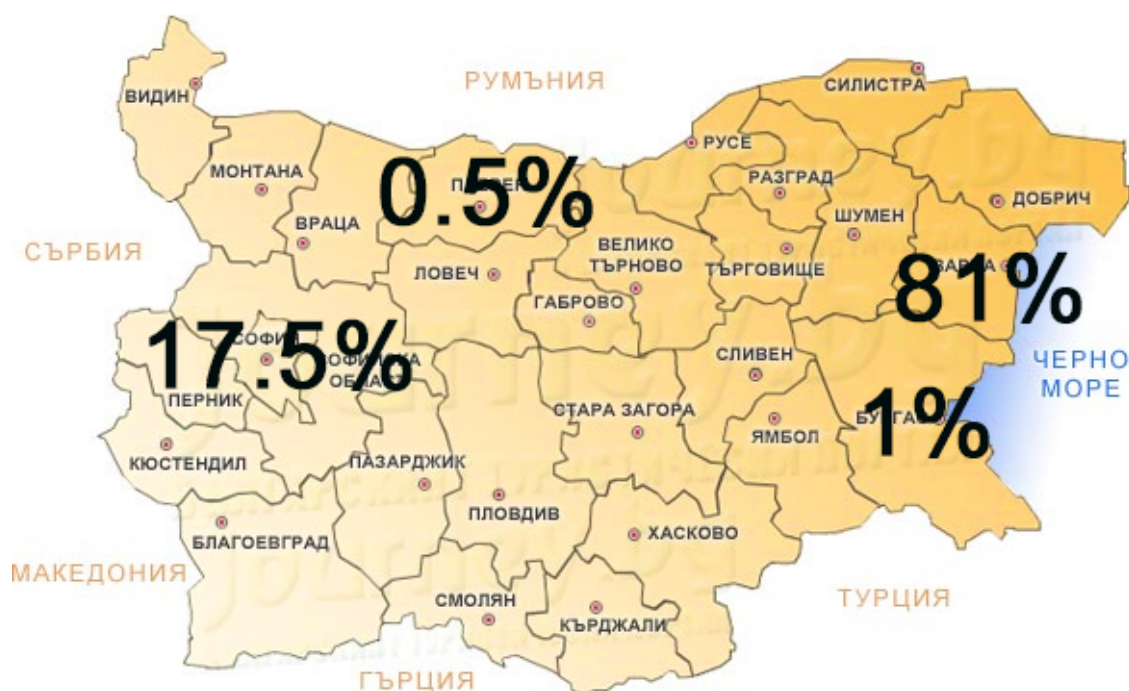
УМБАЛ „Св. Анна“ – София	0	0	0	0	0		
СБАЛОБ „Зрение“ – София	0	0	0	2	2	2	2
СОБАЛ „Пентаграм“ ЕООД	-	-	-	2	2	-	-
УМБАЛ „Александровска“ – София	0	0	0	11	11	4	6
СОБАЛ „Доц. Георгиев“ ЕООД	0	0	0	0	0	0	0
МЦО „Ресбиомед“	0	0	0	0	0	0	0
СОБАЛ – Бургас	0	0	0	0	0	4	6
Общо	109	114	155	184	187	360	427

Предоставената във фигурите и таблиците информация може да се анализира от много гледни точки. Очевидна е тенденцията, че наличието на тъканна банка на територията значително улеснява процеса на трансплантация при равни други условия. Това е и мотивацията за регистриране на Отделение „Тъканна банка“ към лечебното заведение СБОБАЛ – Варна ЕООД, което е единствената специализирана университетска болница в страната. Вторият много важен момент е експертизата за приложение. Като правило в европейски мащаб трансплантацията на АМ е 3–8 пъти по-честа от роговичната трансплантация. Тази тенденция се забелязва и у нас. За 2019 г. роговичните трансплантации са 150, а случаите с трансплантирана АМ са 427. Детайлизираният анализ на тези цифри обаче показва една сравнителна равномерност на трансплантацията на роговица – средно около 25 трансплантации на утвърдените 4 центъра и значителна асиметричност в трансплантацията на АМ. Според представената статистика 79% от трансплантациите на АМ са извършени в СБОБАЛ – Варна ЕООД. Това поставя въпроса дали тази статистика е вярна. Според вътрешните правила на СБОБАЛ – Варна ЕООД всяка извършена трансплантация на АМ се отчита към ИАМН, независимо че разходите за трансплантата не се реимбурсират. Тъй като в тази дейност са включени и частни лечебни заведения, включително медицински центрове, остава въпросът дали тази отчетност се спазва стриктно или остава неотчетена към агенцията дейност поради липса на финансов механизъм за нейното прецизно деклариране.

На база на посочените данни беше изготвена карта на трансплантациите на АМ в България, която е представена на фигура 18.



Фигура 17. Графично изображение на динамиката на трансплантации на амниотична мембрана в офталмологията на 5 лечебни заведения: СБОБАЛ – Варна (синьо), СБОБАЛ „Акад. Пашев“ (червено), СБОБАЛ „Вижън“ (зелено), СБАЛОБ „Ден“ (виолетово), УМБАЛ „Александровска“ (тюркоаз) за годините от 2013 до 2019



Фигура 18. Карта на трансплантациите на амниотична мембрана в България. Вижда се ясно, че повече от 80% от трансплантациите се правят във Варна, където функционира най-активната тъканна банка

На база на направените анализи може да се направят следните заключения:

- Роговичната тъкан от съществуващите очни банки е недостатъчна за задоволяване на потребностите и генерира листа на чакащи;
- Трансплантацията на АМ е недостатъчно популярна и липсва активност от страна на лечебните заведения за извършване/отчитане на тази дейност;
- Липсва механизъм за реимбурсация на трансплантацията на АМ;
- Преработката на АМ в биопродукт и/или медицинско изделие би разширила както индикациите, така и кръга на потребителите на решения за лечение на ПОП.

Тези и други важни за развитието на офталмологията акценти са поставени в контекста на международния опит в раздела „Дискусия“.

2. Резултати от оценката на клиничните методики за трансплантация на тъкани и клетки в офталмологията

От предния раздел става ясно, че трансплантацията на АМ е по-широко застъпена и в повече центрове от трансплантацията на роговица.

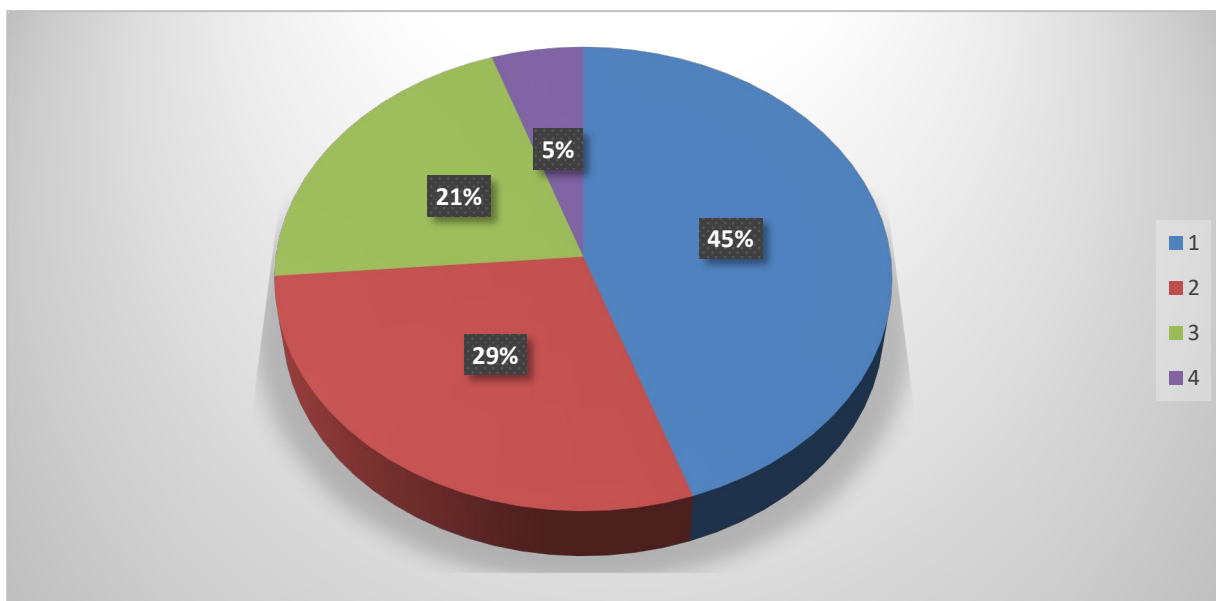
Разработеният въпросник позволи оценка на пенетрацията на трансплантацията, както и предпочитаните техники и методики за приложение в офталмологичната практика. Въпросникът бе раздаден на 100 офталмолози и правилно попълнен и предаден съобразно инструкцията от 38 специалисти с изразен интерес към трансплантацията на роговица и АМ. Резултатите са предоставени в таблица 6.

От таблицата е видно, че трансплантацията на роговица и АМ е концентрирана в София и Варна – градовете, в които има очни и тъканни банки. Частните болници и центрове са сериозна конкуренция на специалистите от университетските центрове (фигура 19). В България повече специалисти извършват трансплантация на АМ. С трансплантация на роговица се занимават само 9 хирурзи от 38 анкетирани. Амниотична мембрана трансплантират всички анкетирани, но 29 (76%) трансплантират максимум 10 случая годишно. Над 101 случая се трансплантират само от 2 специалисти от СБОБАЛ – Варна.

Таблица 6. Резултати от въпросника, насочен към очните хирурзи с интерес към трансплантацията. От разпратените 100 въпросника са правилно попълнени и анализирани 38.

Регион	София град 15, Североизточна България 12, Останали региони 10							
Практика	Университетска болница 17, частна болница 11, медицински център 8, държавна/общинска болница 2							
Индивидуални характеристики	Опит в години		Брой трансплантации годишно		Предпочитана техника	Използвана банка		
Роговица	До 5		До 5	3	Пенетрираща кератопластика 96% DALK 2% DMEK 2%	МОБ*	8	
	6-10		6-10	2		БР**	6	
	11-20	7	11-20	2		ТБП****	2	
	Над 20	2	Над 20	2		Чужбина	1	
Амниотична мембрана	До 5	29	До 10	29	Покритие 90% Пълнител 5% Комбинирана техника 5%	БР**	15	
	6-10 г	2	11-30	6		ТБП****	10	
	11-20 г.	2	31-100	1		ТБ СМ***	8	
	Над 20 г.	5	Над 101	2		Чужбина	2	
Стволови клетки	Автотрансплантация 80%, алотрансплантация от донорски бутон 15%, намножени клетки 5%							

*Международна очна банка – София, ** Биорегенерация-София *** Тъканна банка УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна **** Тъканна банка към УМБАЛЦМ „Н.И. Пирогов“ – София

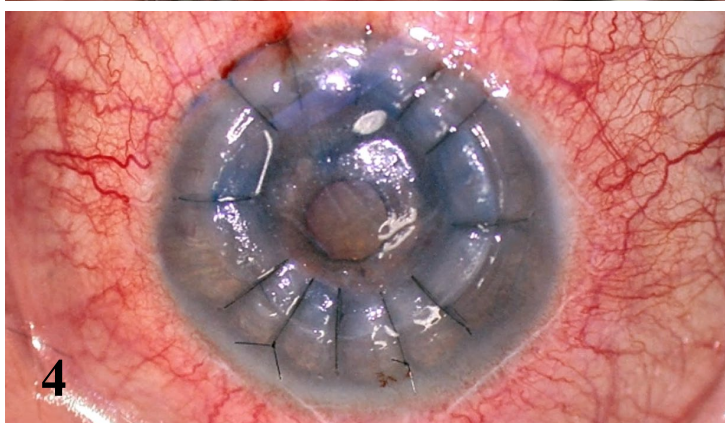
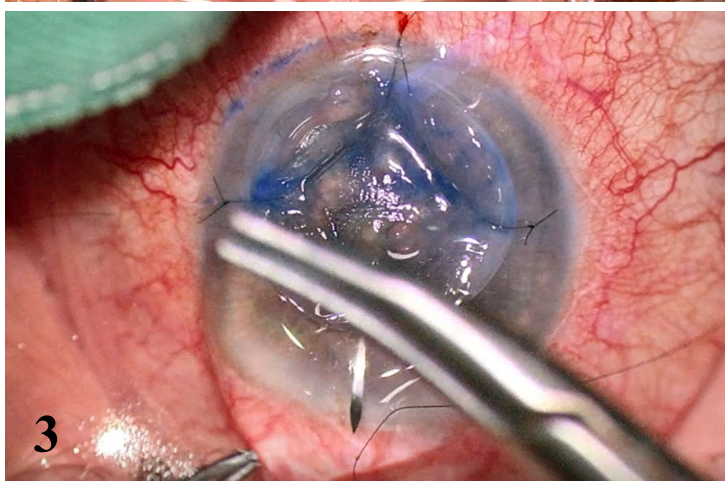
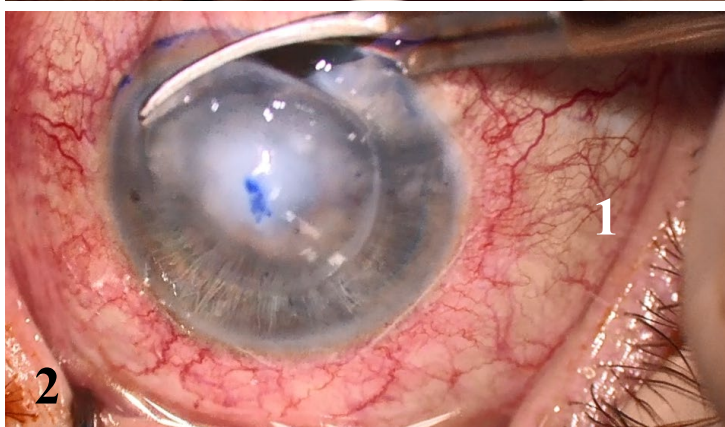
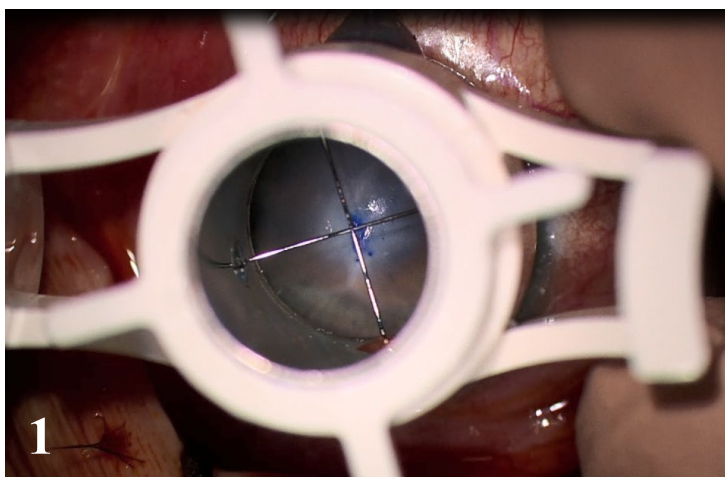


Фигура 19. Разпределение на лечебните заведения, извършващи трансплантация в България: университетска болница (1), частна болница (2), частен медицински център (3), държавна/общинска болница (4)

Интересно е да се отбележи, че в България в над 90% от случаите се извършват класически техники (фигура 20). Само по 2% са случаите на предна и задна ламеларна кератопластика. Комплицираните техники за трансплантация на АМ се ограничават до 10%. Това е една възможност за развитие, която българските очни хирурзи трябва да използват в следващите години.

Неравномерно е и потреблението от различните тъканни банки. За предоставяне на роговичен материал най-голям е делът на Международна очна банка, а най-малък на ТБ към УМБАЛСМ „Н.С. Пирогов“. За трансплантацията на АМ безспорният лидер като брой дистрибутирани трансплантати е УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна, като брой клиенти – ТБ „Биорегенерация“, като е важно да се отбележи че тъканта от УМБАЛСМ „Н.С. Пирогов“ не е разфасована в индивидуални опаковки и е трудно да се прецени какъв брой трансплантации с направени от една предоставена виала.

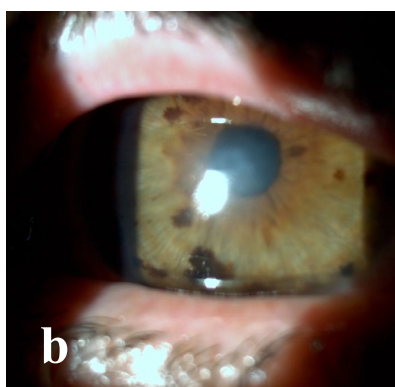
Като резултат от изпълнението на втората част от задачата са разгледани, анализирани и актуализирани всички протоколи за извършване на трансплантация на АМ, стволови клетки и роговица в СБОБАЛ – Варна.



Фигура 20. Основни стъпки на класическата перфоративна кератопластика: трепанация (1), дорязване с корнеална ножница (2), адаптация на транспланта с 4 прекъснати шева (3), фиксиране на транспланта с различни шевни техники, в случая 16 прекъснати шева (4)

Резултатите от анализа, обект на настоящото проучване, обхващат последните 3 години и включват само случаите, в които авторът е участвал като асистент или е работил под ръководството на оторизиран хирург, специалист по очни болести, като част от обучението си. Обемът на работа е около 30% от общия обем на трансплантациите на АМ и 95% от трансплантациите на роговица. Разпределението по демографски характеристики и медицински показания е представено в таблица 7.

От таблицата се вижда, че АМ в около една трета от случаите е последващо лечение, което подчертава нейното основно предимство: поради липса на имуногенност няма ограничения в броя на извършените трансплантации на АМ. Впечатление прави и големият брой роговични дистрофии, които се обработват с трансплантация на АМ. Основната индикация за това са рецидивиращите ерозии, а най-често срещаната роговична дистрофия – латисовата. Впечатление прави, че в 7% от случаите роговичните перфорации първо се обработват с АМ. Ефектът в този случай е не само механична стабилизация на роговицата, но и противовъзпалително и антипролиферативно лечение (фигура 21).



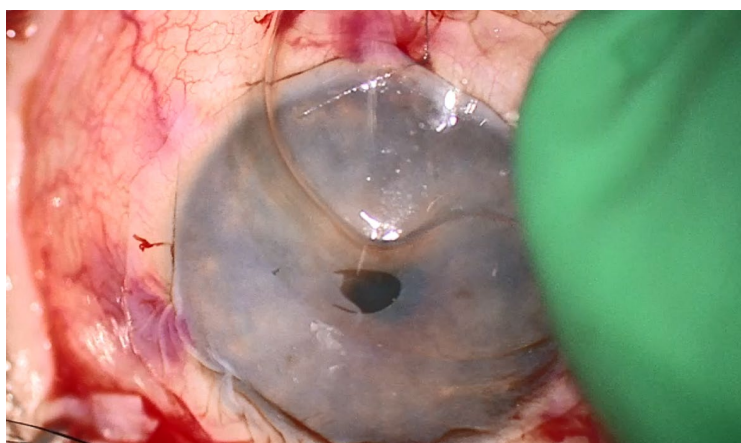
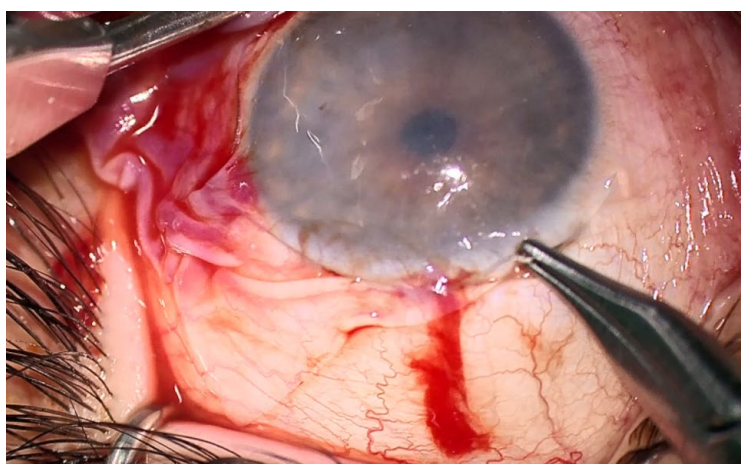
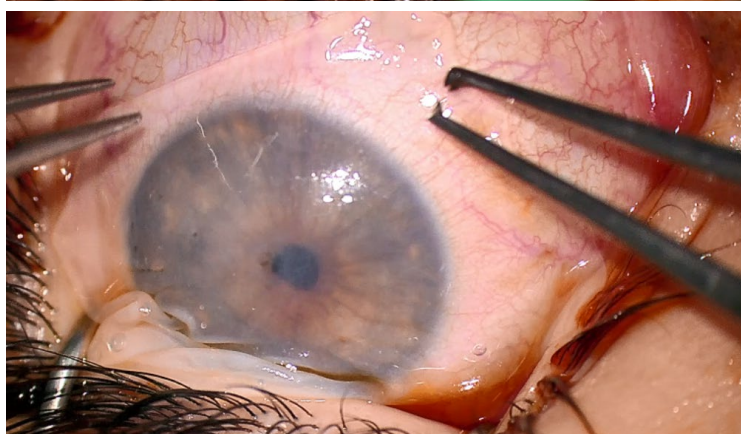
***Фигура 21. Клинична
фотография на
пациент с дистрофия
на Шнайдер (а) и
резултат 3 дни след
кератектомия и
трансплантирана
амниотична мембрана
(б)***

На фона на трансплантацията на АМ трансплантацията на роговица е не само по-рядко извършвана, но носи и много по-големи рискове в интра- и постоперативния период. Липсата на донорски материал също е носител на негативни последици. Отново водеща индикация за кератопластика са дистрофиите на роговицата и отново най-често латисова дистрофия. Прави впечатление, че булозната кератопатия е сравнително рядка индикация, като обяснението за това е както по-добрата оперативна техника на катаракталните хирурзи, така и ефектът на задния десцеметорексис при лека до умерена кератопатия.

Таблица 7. Пациенти, получили лечение с трансплантация на амниотична мембрана или роговица за период от три години (май 2016 – май 2019) – демографски и клинични характеристики

Характеристика	Трансплантация на АМ	Трансплантация на роговица
Общ брой	158	28
Брой извършени като неотложни	56	4
Пол	Мъже 77 Жени 81	Мъже 12 Жени 16
Възраст	47 ± 17	52 ± 12
От община Варна	56	11
От територия, извън Североизточна България	66	8
Работоспособност	Работещи 78 Пенсионери по възраст 28 Пенсионери с инвалидност 33 Безработни 19	Работещи 9 Пенсионери по възраст 6 Пенсионери с инвалидност 8 Безработни 5
Диагноза	Роговична дистрофия 55 Булозна кератопатия 18 Травма 27 Възпаление 48 Заплашваща перфорация 10	Роговична дистрофия 11 Булозна кератопатия 9 Травма 1 Възпаление 1 Заплашваща перфорация 6
Последователност на лечението	Първична 101 Последваща 57	Първична 25 Последваща 3

С оглед позициониране на горепосочените резултати в цялостната лечебна дейност на СБОБАЛ – Варна бе направен и ретроспективният анализ на данните от последните 10 (2009–2019) години, който показва интересни тенденции. Техниката за трансплантиране на АМ е основно класическата техника на покритие. Анализът на архива показва, че броят на трансплантациите на АМ расте устойчиво от 98 през 2009 до 357 през 2019 г. Интересен е фактът, че расте и броят на хирурзите, работещи в СБОБАЛ – Варна, извършващи тази трансплантация – от 1 през 2009 до 12 през 2019 г. Това е една устойчива традиция, която позволява дисеминация на тази техника, решаваща много проблеми на предната очна повърхност. На фигура 22 е показана техниката за трансплантация на АМ като покритие в 4 стъпки.



Фигура 22. Техника за трансплантация на амниотична мембрана като покритие: (А) подготовка на донорското ложе, (Б) адаптиране на амниотичната мембрана, (В) поставяне на непрекъснат шев, (Г) адаптиране на мембраната и поставяне на контактна леща

В таблица 8 са представени техниките за приложение на АМ за периода от 10 години (2009–2019).

Таблица 8. Техники на приложение на амниотична мембрана за период от 10 години (2009–2019)

Трансплантация на АМ – техника	Трансплантация на АМ като покритие	Трансплантация на АМ като запушалка	Трансплантация на АМ – комбинирана техника
Общ брой 1750	1512	210	328
Пол	Мъже 720 Жени 792	Мъже 140 Жени 70	Мъже 184 Жени 144
Възраст	56 ± 16	44 ± 17	38 ± 12
Диагноза	Роговична дистрофия 412 Булозна кератопатия 383 Травма 301 Възпаление 268 Заплашваща перфорация 33 Други 115	Роговична дистрофия 0 Булозна кератопатия 0 Травма 39 Възпаление 65 Заплашваща перфорация 98 Други 8	Роговична дистрофия 12 Булозна кератопатия 4 Травма 112 Възпаление 60 Заплашваща перфорация 121 Други 19

Както се вижда от таблицата, техниката покритие се прилага в 86% от случаите, като техниката с приложение като запушалка се предпочита при заплашващи перфорации и травма.

За съжаление, по отношение на роговичната трансплантация ефектът на натрупването на опит в годините не показва позитивна тенденция на растеж на извършените процедури. Има неравномерно намаляване и увеличаване в броя на кератопластиките за последните 10 години. Това се дължи най-вече на зависимостта на тази лечебна методика от наличие на роговица, годна за трансплантация, в оторизираните очни банки. Тенденцията е отразена в таблица 4, където се вижда, че трансплантацията на роговица не зависи от експертизата, а от готовността на банката да предостави трансплантат. През 2020 г. се наблюдава нова негативна тенденция. Според закона за трансплантация роговичната тъкан се реимбурсира с до 1000 лева. И двете банки с качествена тъкан – Международна очна банка и „Биорегенерация“, увеличават цената на труда на 1500 лева. Това поставя лечебните заведения, работещи със здравна каса, в нерешима ситуация: от една страна, трансплантацията е безплатна по закон, от друга страна – някой, който не може да е МЗ (по закон) и лечебното заведение (поради липса на средства за целта), трябва да покрие недостига от 500 лева. Този казус е много лесен за

частните медицински центрове, където трансплантацията се заплаща, тъй като те не изпълняват тази дейност по договор с НЗОК.

Трансплантацията на стволови клетки от същото или другото око има дълга история. От 1980 г. в лечебното заведение се извършва автотрансплантация на стволови клетки при пациенти с птериgium. Техниката е имплементирана в резултат на обучителна мисия на самолета „Орбис“ и представлява интерес за някои от предноsegmentните хирурзи. През 2012 г. проф. Групчева въвежда техниката на Вандасавера или т.нар. SLET (simple limbal epithelial transplantation). Техниката се състои в отсложаване на лимбален трансплант с размер 2–4 мм и разпределянето му на малки сегменти под АМ.

През 2017–2018 г., като част от КОСТ акция, екип от СБОБАЛ – Варна и МУ-Варна бе обучен в Антверпен, Белгия, за подготовка на преработени стволови клетки върху АМ. След разрешение на Етичната комисия, като част от научен проект, в СБОБАЛ – Варна бяха извършени 30 трансплантации на ЛСК, преработени по белгийската методика. Сравнителният анализ на SLET и трансплантацията на преработени стволови клетки е показан в таблица 9.

Може да се обобщи, че и трите вида трансплантации имат своето място в офталмологията. Роговичната трансплантация е най-стара като методика, но с най-много усложнения и минимална гъвкавост при работа. Трансплантацията на АМ е по-скоро палиативен метод на лечение, но при нарушения на предната очна повърхност дава отлични резултати. Трансплантацията на стволови клетки е най-модерният и иновативен подход, който има най-широка перспектива в бъдеще, тъй като се основава на принципа на регенерация и самовъзстановяване. Независимо от показания анализ за СБОБАЛ – Варна, който демонстрира данни, съответни на най-добрите европейски практики, националната карта е много неравномерно разпределена. По отношение на подготовката и предоставяне на тъкани, роговична тъкан се работи само в гр. София, като има три банки, концентрирани в столицата. Това води и до неравномерното разпределение на трансплантациите в страната, както се вижда от фигура 16.

Тенденцията е по-различна за АМ, като банки за последната има в София и Варна, но лидерството както в подготовката на АМ, така и в трансплантацията е определено във Варна. Резултатите са показани на фигура 17.

За трансплантацията на стволови клетки е трудно и в известен смисъл рано да се направят изводи, тъй като автотрансплантацията не се отчита в ИАМН, а алотрансплантация се прави само в два центъра в България – един университетски във Варна и един частен в София.

Таблица 9. Сравнителен анализ на проста лимбална трансплантация (SLET) и трансплантацията на преработени стволови клетки за периода 2017–20 г. в СБОБАЛ –Варна

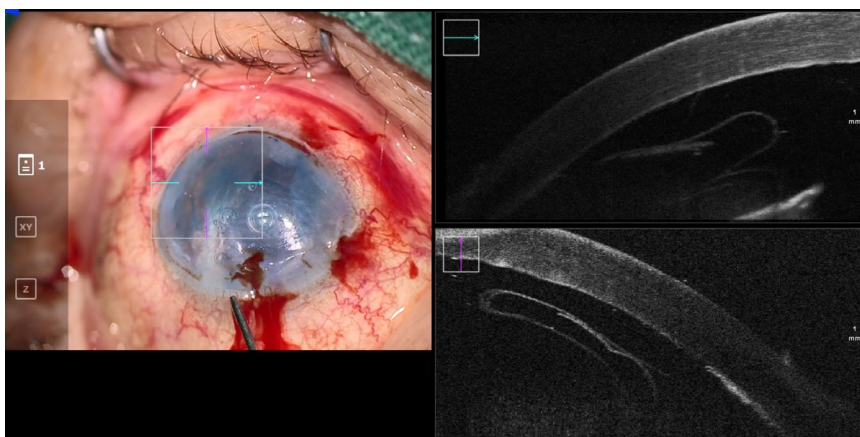
Характеристика	Трансплантация SLET	Трансплантация на преработени стволови клетки
Общ брой	58	30
Пол	Мъже 24 Жени 34	Мъже 14 Жени 16
Възраст	44 ± 17	38 ± 12
От община Варна	22	10
От територия извън Североизточна България	26	12
Работоспособност	Работещи 16 Пенсионери по възраст 2 Пенсионери с инвалидност 22 Безработни 18	Работещи 4 Пенсионери по възраст 1 Пенсионери с инвалидност 10 Безработни 15
Диагноза	Роговична дистрофия 5 Булозна кератопатия 2 Травма 11 Възпаление 10 Заплашваща перфорация 8 Идеопатична лимбална инсуфициенция 12 Автоимунна цикатризация 10	Роговична дистрофия 1 Булозна кератопатия 0 Травма 5 Възпаление 4 Заплашваща перфорация 5 Идеопатична лимбална инсуфициенция 8 Автоимунна цикатризация 7
Последователност на лечението	Първична 1 Последваща 57	Първична 0 Последваща 30
Възстановена полезна зрителна острота	28 (48%)	18 (60 %)3

3. Алгоритми за трансплантация на роговица, амниотична мембрана и стволови клетки

В динамично променящите се условия на работа в медицината очната хирургия също търпи промени. Създаването и използването на алгоритми за работа подобрява ефективността на оперативните процедури и улеснява процеса на оценка особено на нововъведени методики. Всеки алгоритъм се състои от индикации и контраиндикации, подготовка на пациента, оперативна интервенция и постоперативно менажиране на случая.

Кератопластиката е исторически най-старата методика за менажиране на предната очна повърхност, но нейните модификации днес са особено важни както за подобряване на резултатите, така и за оползотворяване на и без това дефицитния роговичен материал.

Засега в България класическата ПК е най-често извършвана от всички процедури за трансплантация на роговица. В Европа мембранната ендотелна кератопластика (DMEK) е основната извършвана процедура. В СБОБАЛ – Варна за периода на подготовка на настоящия труд с участието на автора са извършени 5 процедури с присаждање на ендотел с Десцеметова мембрана (фигура 23). Натрупаният опит е обобщен в „Алгоритъм за извършване на дълбока, мембранна ендотелна кератопластика“, представен като приложение 5.



Фигура 23.
Дълбока
ендотелна
кератопластика
под ОСТ контрол

Трансплантацията на консервирана АМ в България е сравнително нова методика от 2005 г., но нейното развитие претърпя значими промени. Водещата роля на клиничната база на МУ-Варна дава основание за пълен анализ на най-големия обем от такива процедури в България и формулиране на алгоритъм на база световния и локален опит. Последният е обобщен на база личните наблюдения на автора в „Алгоритъм за извършване на трансплантация на АМ като покритие“, представен като приложение 6.

На база на приложения алгоритъм е направен анализ на 38 случая с усложнения след трансплантация на АМ от общо 158 включени в проучването. На пръв поглед 24% е сериозен процент за усложнения, но когато се разгледа в детайли характерът на усложненията, представени в таблица 10, става ясно, че те имат незначителен характер.

Таблица 10. Разпределение на усложненията (n=38) и начина на тяхното менажиране след трансплантация на амниотична мембрана при 158 пациенти

Характеристика	Усложнение	Менажиране
Общ брой	38 (24%)	-
Кръвоизлив/хеморагия на конюнктивата	28 (18%)	Самоограничаващо се усложнение, неизискващо лечение
Кръвоизлив/хеморагия под мембраната	7 (4%)	Може да се наложи допълнителна промивка
Скъсване на шев	3 (2%)	Поставяне на нови шевове

От таблицата е видно, че усложненията са самоограничаващи се, като липсват възпалителни и/или автоимунни реакции. Това е особено важна характеристика на самата процедура, която позволява нейното многократно извършване.

Безспорно най-трудната и подлежаща на непрекъснати корекции е техниката за трансплантация на алогенни стволови клетки. Това предизвикателство е базирано на социални, юридически, биологични и етични фактори, всеки от които трябва да се съобрази в конкретния случай. Независимо от опита с автотрансплантацията, центърът, в който работя, измина много труден път до установяване на стандартизиран метод за трансплантация на алогенни стволови клетки. Този алгоритъм е базиран както на опита на колегите от Университетската клиника по офталмология в регионалната болница в Антверпен, Белгия, така и на много международни срещи и дискусии. Методиката работи, но има своите ограничения и към момента е лечение на последен избор с много добри резултати. Натрупаният до момента опит, пречупен през опита на автора, е обобщен в: „Алгоритъм за извършване на трансплантация на преработени алогенни стволови клетки при пациенти с тежки увреждания на лимба в резултат на травми или заболявания“, представен като приложение 7.

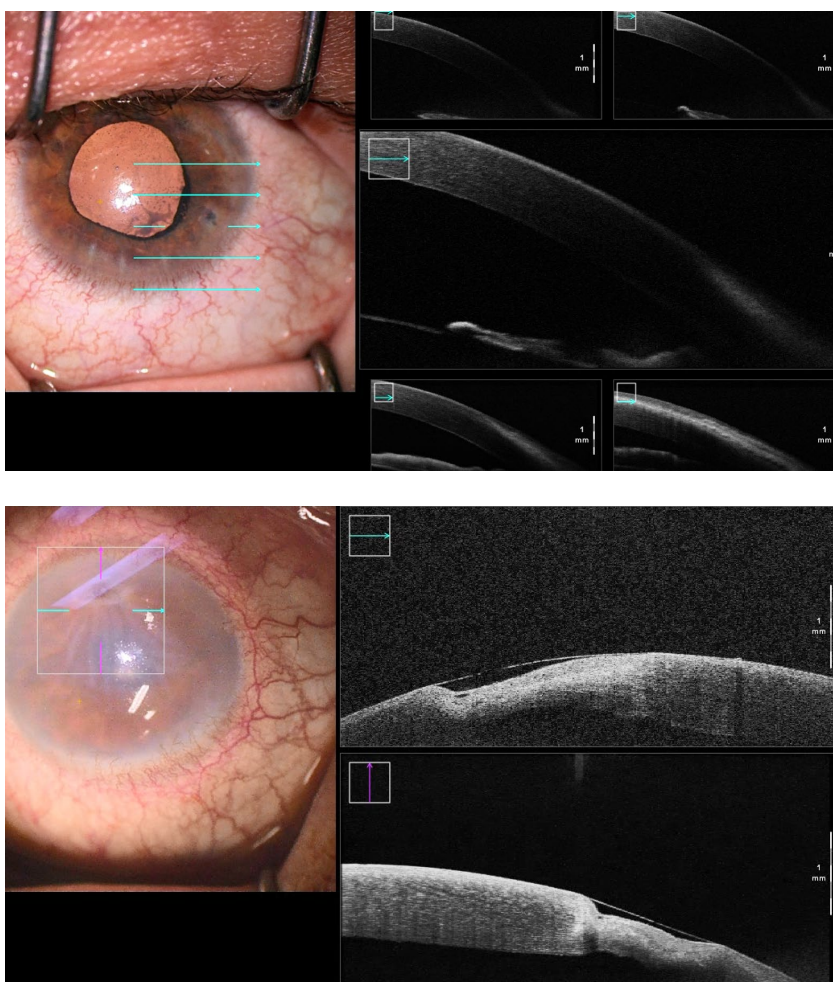
Резултатите от трансплантация на столови клетки са представени в раздела за разработване на прототип.

4. Оценка на триизмерната ОСТ контролирана хирургия

Контролът с ОСТ е сравнително нова клинична методика, за която липсва стандартизация и алгоритъм за работа. С цел прецизиране на интраоперативното приложение на ОСТ в предносегментната хирургия бяха направени сравнителни анализи на изображения с 2 и 5 линии, черно-бели и

изкуствено оцветени изображения и изображения с различна дължина и дълбочина на сканирането (фигура 24).

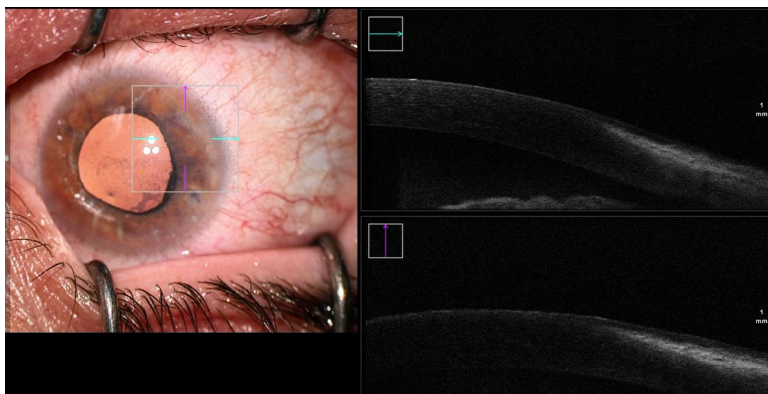
Извършени бяха 20 трансплантации на АМ, при които в рамките на 1 стъпка от операцията (полиране на Баумановия слой) беше приложено сканиране с две и сканиране с пет линии. Резултатите бяха сравнени, както е показано на фигура 25, където ясно се вижда, че сканирането в две линии (подобно на координатна система е подходящо за определяне на триизмерната анатомия на дефекта, ако е с малки размери). Сканирането в пет линии е по-скоро следващ етап, който дава информация за топографското разпространение, но след предварително направен локален анализ с взаимно перпендикулярни линии на сканиране. Двата метода на сканиране се допълват до получаване на по-прецизна топографска информация.



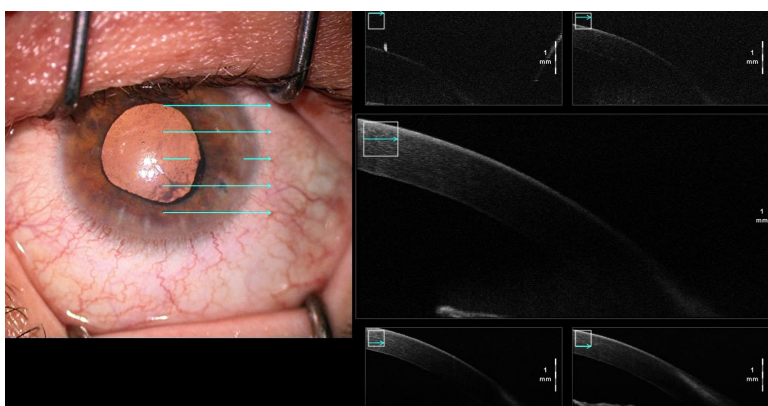
Фигура 24.
*Изображение без
изкуствено
оцветяване с пет
успоредни линии
(горе) и 2
кръстосани линии
(долу) на пациенти с
роговичен оток и
десцеметоцеле*

Изкуственото оцветяване на ОСТ изображенията е много популярно и се предпочита от повечето офталмолози, но неговата диагностична стойност подлежи на дискусия. В оперативна среда, ако имаме добро осветление или жълтеникави отблясъци (при светлинен микроскоп), контрастът на подобно изображение е теоретично по-добър. С въвеждането на микроскопия нуждата

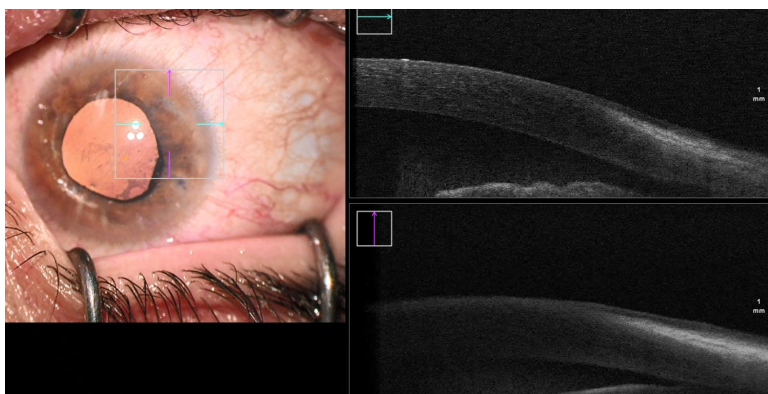
от използване на цветни изображения намалява, поради неутралния характер на дигиталната светлина. На фигура 26 са демонстрирани изображения в двата варианта.



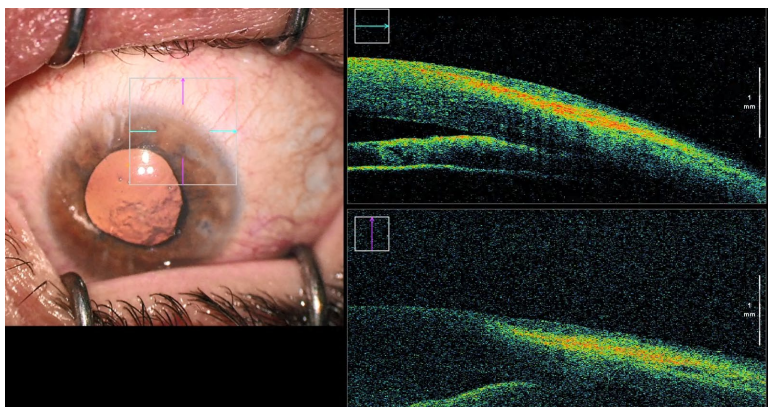
Фигура 25.
Изображение на идентична патология на зона по време на оперативна интервенция с 2 кръстосани (а) и пет успоредни (б) линии.



Ясно се вижда, че двете методики се допълват с цел по-прецизно определяне на дефекта



Фигура 26.
Изображение в идентична зона по време на оперативна интервенция при пациент с остра закритоъгълна глаукома с 2 кръстосани линии, черно-бели (горе) и изкуствено оцветени изображения (долу)



За пълно постигане на целта на проучването бяха анализирани ретроспективно, на база видеозаписи и документацията на пациентите, 20 последователни трансплантации на АМ, извършени с конвенционален микроскоп Lumera 700 (n=10 случая), а другата половина (n=10 случая) са извършени с триизмерна технология на Artevo 800 и задължително приложение на ОСТ. Предимствата на извършване на триизмерна хирургия с използване на ОСТ са демонстрирани с клинични случаи на фигура 27.



Фигура 27. Предимства на извършване на триизмерна хирургия с използване на оптична кохерентна томография: по-широко зрително поле при запазена панорамност и дълбочина на фокуса (А), интраоперативно приложение на ОСТ, позволяващо оценка в реално време на микроструктурно ниво (Б), изправена позиция на главата на хирурга, съпроводена с по-малко постурална умора (В), възможност за наблюдение от повече от един асистент/обучаващ (Г).

От видеофилмите за трансплантациите на АМ се подготвиха за анализ параметри, свързани с терена, на който се работи, както следва: демографските характеристики на пациентите и диагнозата, предоставени в таблица 11.

Таблица 11. Демографски характеристики на пациентите след трансплантация на амниотична мембрана, оперирани в двете технологии Lumera 700 и Artevo 800 със задължително приложение на оптична кохерентна томография

Характеристика	Операции, извършени на Lumera 700	Операции, извършени на Artevo 800 и ОСТ
Общ брой	10	10
Хирург	1 с 20-годишен опит	1 с 20-годишен опит
Пол	Мъже 6, жени 5	Мъже 5, жени 5
Възраст	57 ± 17	52 ± 18
Диагноза	Деформация на роговицата 7 Повърхностна травма 3	Деформация на роговицата 6 Повърхностна травма 4

За оценка на ефекта на двете технологии при трансплантация на АМ беше засечено средното време за извършване на операцията, интраоперативни усложнения, степен на епителизация на 2-ра седмица, зрителна острота на 4-та седмица. Извършен бе и статистически анализ на посочените параметри. Резултатите са представени в таблица 12.

Таблица 12. Оценка на ефекта на Lumera 700 и Artevo 800 със задължително приложение на ОСТ при трансплантация на амниотична мембрана на база средно време за извършване на операцията, интраоперативни усложнения, степен на епителизация на 2-ра седмица, зрителна острота на 4-та седмица. Представени са и резултатите от paired t-test

Характеристика	Операции, извършени на Lumera 700 n=10	Операции, извършени на Artevo 800 и ОСТ n=10	Paired t-test
Средно време за извършване на интервенцията	8.2 ± 2.3 минути	7.9 ± 1.8 минути	p=0.21
Интраоперативни усложнения	Сериозни – не Скъсване на конец – 1 Хеморагия – 2	Сериозни – не Хеморагия – 1	Неприложимо
Степен на епителизация (2-ра седмица)	Непълна – 4 Пълна – 6	Непълна – 1 Пълна – 9	Неприложимо
Средна коригирана зрителна острота (4-та седмица)	0.35 ± 1.2	0.46 ± 1.8	p=0.01

От таблицата е видно, че усложненията при използване на Artevo 800 със задължително приложение на ОСТ са по-малко, а епителизацията е значително по-добра, което рефлектира в статистически значимото подобрение на зрението. Вероятните причини за тези резултати са, на първо място, свързани с по-добрия контрол, дължащ се на ОСТ в реално време, а именно:

- Пълна деепителизация на очната повърхност;
- По-добро полиране на базалната мембрана;
- По-добра адаптация на трансплантата.

Друг важен момент е по-прецизната визуализация и намаляване на риска от засягане на съдове и кървене, което се дължи както на по-широкото зрително поле, така и на дълбочината на фокуса.

Това, което се установява, е и относително еднаквото време за извършване на операцията, което заедно с подобрените клинични резултати е в полза на 3D технологията.

От видеофилмите за трансплантациите на роговица се подготвиха за анализ параметри, свързани с терена, на който се работи, както следва: демографските характеристики на пациентите и диагнозата, предоставени в таблица 13.

Таблица 13. Демографски характеристики на пациентите след трансплантация на роговица, оперирани в двете технологии Lumera 700 и Artevo 800 със задължително приложение на оптична кохерентна томография

Характеристика	Операции, извършени на Lumera 700	Операции, извършени на Artevo 800 и ОСТ
Общ брой	5	5
Хирург	1 с 20-годишен опит	1 с 20-годишен опит
Пол	Мъже 3, жени 2	Мъже 4, жени 1
Възраст	63 ± 8	59 ± 7
Диагноза	Дистрофия на роговицата 5	Дистрофия на роговицата 4 Рекератопластика 1

За оценка на ефекта на двете технологии при извършване на роговична трансплантация беше засечено средното време за извършване на операцията, интраоперативни усложнения, брой подменени конци и последователност на тяхната подмяна, зрителна острота със стенопеичен отвор на 24-та седмица, астигматизъм на 24-та седмица. За съжаление, бройката е много малка

поради наличието на технологията от началото на 2020 г., епидемиологичната обстановка и липсата на достатъчно роговична тъкан. Резултатите са представени в таблица 14.

Това, което се установява при анализа на този малък брой случаи, е и относително еднаквото време за извършване на операцията. Artevo 800 със задължително приложение на ОСТ има интересен ефект по отношение на поставяне на конците. Кардиналните конци, оценени с ОСТ в реално време и по-голяма дълбочина на фокуса, изискват подмяна, но това има позитивен ефект в краткосрочен план (по-малко последващо подменени конци) и дългосрочен план (по-малък астигматизъм 6 месеца след операцията).

Таблица 14. Оценка на ефекта на Lumera 700 и Artevo 800 със задължително приложение на ОСТ при трансплантация на роговица на база средно време за извършване на операцията, интраоперативни усложнения, брой подменени конци и последователност на тяхната подмяна, зрителна острота със стенопеичен отвор на 24-та седмица, астигматизъм на 24-та седмица

Характеристика	Операции, извършени на Lumera 700 n=5	Операции, извършени на Artevo 800 и ОСТ n=5
Средно време за извършване на интервенцията	33 ± 6.8 минути	30 ± 3.8 минути
Интраоперативни усложнения	Сериозни – не Повишено напрежение на иридо-лещената диафрагма 1	Сериозни – не
Подмяна на конци (общ брой за 5-те операции)	Кардинални шевове 2 Други шевове 12	Кардинални шевове 8 Други шевове 4
Средна зрителна острота със стенопеичен (24-та седмица)	0.26 ± 1.4	0.32 ± 1.6
Среден астигматизъм (24-та седмица)	4.6 ± 1.8 D	2.8 ± 1.2 D

Тези първоначални наблюдения очертават основните предимства на триизмерната, ОСТ асистирана хирургия на преден очен сегмент, а именно:

- Еднаква скорост с класическата визуализация, индиректно доказателство за лесната адаптация на хирурга;

- Прецизна обработка на зоните за трансплантация на АМ и роговица, водещи до по-бърз оздравителен процес и равномерно зарастване;
- По-добра визуализация и намаляване на усложненията, предвидими от хирурга;
- Съчетаване на две възможности за оценка в дълбочина – наблюдение в повишена дълбочина на фокуса и В-сканиране с ОСТ;
- По-добри постоперативни резултати и солидна база за въвеждане на нови методики с възможност за контрол и илюстрация с цел одит и обучение.

В настоящата разработка не е изследван ефектът на триизмерната хирургия върху постуралните оплаквания на хирурга поради малкия брой хирурзи, които се възползват от тази технология в СБОБАЛ – Варна.

5. Структура и стандартни оперативни процедури за очна банка за роговица, склера и лимбални стволови клетки от нов тип

В процеса на подготовка на този труд беше разработена концепция за иновативна очна банка с възможност за надграждане с нови технологии. Основните помещения на банката са офис, помещение за получаване и изпращане на материалите, стерилно помещение за обработка и преработка на тъканите и помощни помещения към тях. След внимателен анализ на нуждите на Североизточна България се оказва, че най-подходящо е банката да има възможност за вземане, обработка, преработка съхранение и разпространение на роговица, АМ, стволови клетки и склера. За целта на обработката и оценката са необходими спекуларен микроскоп, ламинарен бокс, биомикроскоп и допълнителни инструменти и материали. За преработката са необходими лиофилизатор и клетъчен инкубатор. Съхранението се извършва във фризер при -70 градуса за АМ и в ламинарен шкаф при -2.0 градуса за роговицата и ЛСК. За извършване на гореспоменатите дейности по вземане, обработка, преработка, съхранение, етикетиране и разпространение на АМ, роговица, ЛСК и склера, освен подходящо оборудвани помещения, са необходими стандартни оперативни процедури (СОП), китове/набори от инструменти и материали и административно разрешение. В задачите на този труд влиза изработването, утвърждаването и административното одобрение на СОП за вземане, обработка, преработка, съхранение, етикетиране и разпространение на роговица и ЛСК. Резултатите от разработените процедури са представени в таблици 15 и 16.

Таблица 15. Наименование на разработените и утвърдени от ИА „Медицински надзор“ стандартни оперативни процедури за вземане обработка, преработка, съхранение етикетиране и разпространение на роговица

Номер на СОП	Наименование на СОП за роговица	Утвърден от ИА „Медицински надзор“
1.	Дефиниции	ДА
2.	Получаване на съгласие за донорство	ДА
3.	Идентификация на донора	ДА
4.	Вземане на кръвни проби	ДА
5.	Предварителен скрининг за инфекции серологичен трансмисивни инфекции	ДА
6.	Интерпретация на резултатите за трансмисивни инфекции	ДА
7.	Определяне хемодилационен статус на донор	ДА
8.	Стандартна оперативна процедура за критерии за медицинска годност на донорски случай за очна тъкан	ДА
9.	Физикален и локален преглед	ДА
10.	Качествен контрол	ДА
11.	Корнеосклерална ексцизия	ДА
12.	Експертиза	ДА
13.	Обработка на роговица	ДА
14.	Преработка на роговица	ДА
15.	Етикетиране	ДА
16.	Съхранение	ДА
17.	Отхвърляне на тъкани за приложение в офталмологията	ДА
18.	Опаковане	ДА
19.	Блокиране, изтегляне и унищожаване на тъкани	ДА
20.	Дистрибуция на роговична тъкан	ДА
21.	Предоставяне и транспортиране на роговична тъкан	ДА
22.	Избор на реципиент по присаждане на роговична тъкан	ДА
23.	Присаждане на роговица/роговична тъкан	ДА
24.	Сериозни инциденти и сериозни нежелани реакции	ДА

Като Приложение 8 са предоставени процедури 11, 13 и 14.

Таблица 16. Наименование на разработените и утвърдени от ИАМН стандартни оперативни процедури за вземане обработка, преработка, съхранение етикетиране и разпространение на лимбални стволови клетки

Номер на СОП	Наименование на СОП за лимбални стволови клетки	Утвърден от ИАМН
1.	Селекция на донор за ЛСК	ДА
2.	Информирано съгласие на донор на ЛСК	ДА
3.	Изследване и мониториране на инфекциозен статус	ДА
4.	Вземане на ЛСК	ДА
5.	Транспорт до лабораторията на ЛСК	ДА
6.	Обработка на ЛСК	ДА
7.	Преработка на ЛСК	ДА
8.	Съхранение на ЛСК	ДА
9.	Етикетиране на ЛСК	ДА
10.	Опаковане на ЛСК	ДА
11.	Разпространение на ЛСК	ДА
12.	Присаждане на ЛСК	ДА
13.	Избор на реципиент за ЛСК	ДА
14.	Замърсяване на биологичния материал	ДА
15.	Сериозни инциденти и сериозни нежелани реакции	ДА
16.	Транспорт и дистрибуция	ДА
17.	Забрана за търговия	ДА

Като Приложение 9 са предоставени процедури 4, 6, 7 и 8.

Комбинацията на посочените процедури с установените такива за вземане, обработка съхранение и разпространение на АМ създава условия за:

- интегриран подход за трансплантация в офталмологията;
- оптимално използване на взетите очни тъкани за преработка в различни видове продукти за трансплантация;
- създаване на нови продукти и медицински изделия.

На база създадената инфраструктура е изпълнена и последната задача на дисертационния труд.

6. Анализ на предимствата и недостатъците на биологични продукти и медицински изделия. Създаване на прототип

Анализът на двете възможности за иновативна биологична терапия – биопродукт и медицинско изделие, направен в обзора, показва, че често използването на едното или другото средство зависи от законодателната уредба. В България, за съжаление, няма закон за биопродуктите, а в закона за медицинските изделия има непълноти. Независимо от това със съдействието на ИАТ беше получено разрешение през 2017/18 г. за създаване на прототип на биопродукт – алохил.

6.1 Създаване на биологичен продукт

Както се вижда от вече представената дефиниция, АМ може да се преработи в биологичен продукт. Процесът на преработка не е дефиниран, но в конкретния случай най-добър вариант биха били процеси, свързани с нейната лиофилизация. Лيوфилизацията изисква скъпа апаратура и това би променило разходите по създаване на биологичен продукт, обаче законодателят не е дефинирал формирането на цената на биопродуктите. Независимо от това се предполага, че спазвайки законите и етичните правила, цената може да адресира само разходите за труд, ДМА, консумативи и други непреки разходи.

Подобни биологични продукти в момента няма на пазара. Останалите центрове, отново по законодателни причини, са се насочили към медицински изделия. Анализът на ситуацията в България обаче показва, че това е най-удачният вариант.

В тази връзка като начало се оформя предложение за създаване на 2 биологични продукта:

- Лيوфилизирана АМ със срок на годност 2 години при съхранение на стайна температура (приложение 2).
- Децелуларизирана АМ (дАМ) с лабораторно отгледани ЛСК от донорски бутон (приложение 4).

Това е една много разумна стъпка с оглед на приложение на АМ в масовата офталмологична практика. За момента АМ може да бъде прилагана само в болнични заведения или в лечебни заведения за извънболнична помощ, които не се съобразяват с всички правила. Създаването на биологичен продукт би спомогнало за масово приложение в амбулаторни условия, което би увеличило достъпа на повече пациенти до тази ефективна и ефикасна терапия.

6.2 Разработка на медицинско изделие

В Европейския съюз има няколко производители на медицински изделия на база АМ. Най-широко разпространение има омниген. Това е медицинско изделие – лиофилизирана АМ, която се предоставя в различни размери за приложение по време на хирургическа интервенция или в условия на очен кабинет. Друго медицинско изделие е хлороклар, което представлява медицинско изделие по поръчка със собствени или донорски ЛСК [38, 39]. И двете изделия имат СЕ марка, регистрирани са в Европейската агенция по лекарствата (ЕМА) и имат непосилна за българските потребители цена.

Посочените по-горе аргументи налагат идеята, че след като има прецедент в ЕС, това може да се случи и в България. Проблемите обаче са както законодателни, така и икономически [32, 95]. Според нашето законодателство няма ясна дефиниция за медицинските изделия с биологичен произход и правомощията за вземане на решения са предоставени на МЗ. От друга страна, двете организации, за които се предполага взаимодействие в подобна ситуация – ИАТ и ИАЛ, нямат практика за колаборация, нито подобен прецедент. Икономическите трудности идват от факта, че лечебните заведения не могат да произвеждат и предоставят медицински изделия на други лечебни заведения. Не на последно място, цената на СЕ марката (която е свързана с търговия) не е малка.

На база на този анализ се оказва логично да се направи опит само за производство на едно-единствено медицинско изделие по поръчка, а именно дАМ, със собствени за реципиента ЛСК. Това не би било масово производство, защото се ползват собствени клетки и може да получи разрешение на министъра. Проблемът остава в това, че подобно медицинско изделие би могло да се използва само в собствените бази на МУ-Варна.

6.3 Разработка на прототип

Получаването на биологичния продукт чрез преработка на АМ – децелуларизиране и популирането ѝ с лимбални клетки по т.нар. „белгийска методика“, чрез поставяне на лимбалния сегмент, източник на прогениторни клетки, върху мембраната, е описан в детайли в раздела „Методика“. Теоретично подобен биологичен продукт може да бъде и индивидуално медицинско изделие. За момента на проучването това е просто прототип, който в рамките на настоящата работа е приложен, както се вижда от таблица 17, при 30 пациенти: 14 мъже и 16 жени. Важно е да се отбележи, че при 83% от тях има нарушена работоспособност – или са пенсионирани поради заболяване, или са безработни. Седем пациенти са с автоимунно заболяване, а 8 – с идеопатична инсуфициенция, доказана с конфокална микроскопия.

Поради малкия брой пациенти е невъзможно да се направи статистически анализ, но микроструктурният анализ показва редукция на възпалението при автоимунните заболявания и възстановяване на палисадите при лимбалната инсуфициенция. Обобщени резултати са представени на фигури 28-31.

Таблица 17. Приложение на прототип – амниотична мембрана с размножени стволови клетки. Демографски и клинични характеристики

Характеристика	Трансплантация на АМ с размножени стволови клетки
Общ брой	30
Пол	Мъже 14, жени 16
Възраст	47 ± 17
От община Варна	56
От територия, извън Североизточна България	66
Работоспособност	Работещи 78 Пенсионери по възраст 28 Пенсионери с инвалидност 33 Безработни 19
Диагноза	Роговична дистрофия 55 Булозна кератопатия 18 Травма 27 Възпаление 48 Заплашваща перфорация 10
Последователност на лечението	Първична 101 Последваща 57

Клиничен случай 1

Пациент по спешност с тежко изгаряне с разтопен алуминий на дясно око – температура на топене 700 градуса С. Постъпва с тотално изгаряне на кожата на клепачите, 360 градуса исхемия на конюнктивата на 4 мм от лимба, назално и темпорално, на 1 мм горе и на 12 мм долу с ангажиране на целия долен форникс. Лявото око е леко засегнато. В рамките на 4 часа са направени: двустранна трансплантация на АМ с циркуферентна трансплантация на ЛСК от трупен донор на дясно око. Седем дни след трансплантацията – при сваляне на конеца зрението на дясно око е 0.01, на ляво око 1.0. Лявото око остава на лубриканти, а терапията на дясно око продължава с консервативно и хирургическо лечение както следва:

- Втора трансплантация на алогенни ЛСК, размножени върху АМ – 2 седмици след изгарянето;
- Трансплантация на АМ с голям размер и разстилане във долен форникс – 1 месец след изгарянето;
- Трансплантация на АМ с цел подобряване на епителизацията – 2 месеца след изгарянето;
- Трансплантация на АМ и донорски стволови клетки от 5 до 7 часа по повод на изтъняване в долната половина – 4 месеца след изгарянето;
- Трансплантация на лимбален бутон по повод перфорация в комбинация с АМ – 6 месеца след изгарянето;
- Трансплантация на АМ с трикратна подмяна в процеса на възстановяване след перфорацията – 7 месеца след изгарянето.

За посочения период пациентът е използвал антибиотични капки интермитентно в ранните постоперативни периоди, кортизонови капки по схема, икервис (циклоспорин) за 3 месеца от втория месец, екс темпоре приготвени серумни капки 6 месеца с прекъсвания, изкуствени сълзи и гелове за овлажняване.

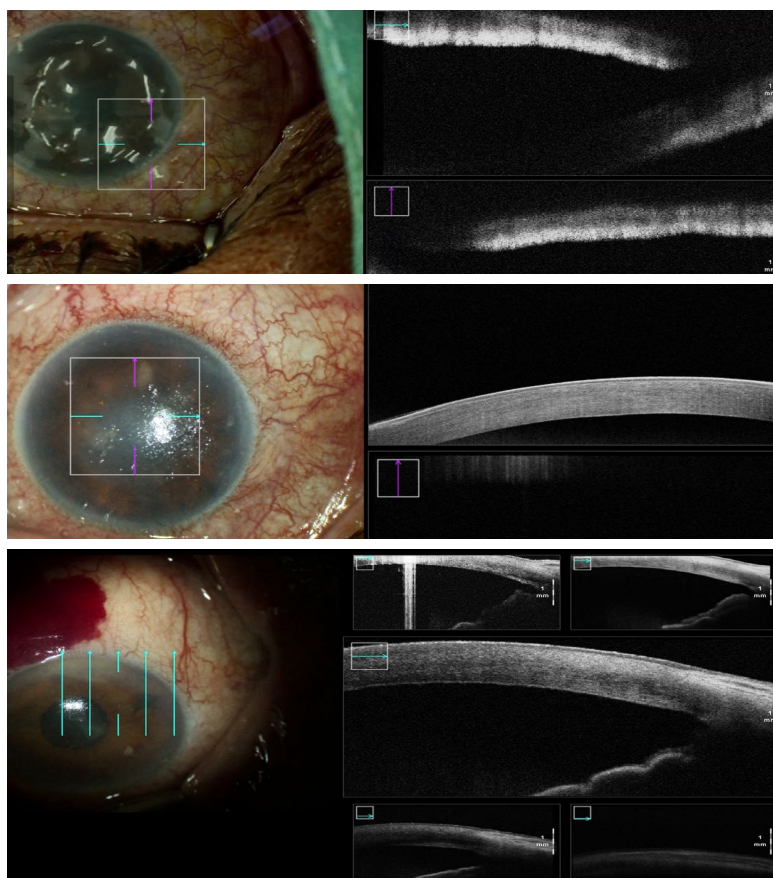
Към момента пациентът е със спокойно око, зрение 0.3 и липса на увреждания извън предния очен сегмент. Анализът показва, че независимо от изключително лошата прогноза за пълна загуба на окото след изгаряне с разтопен метал, регенеративната терапия, включваща 9 трансплантации в рамките на 7 месеца и комбинация на АМ с ЛСК, може да запази не само структурата на очната ябълка, но и значителна функция и полезно зрение. Казуистичен и уникален, този случай е пример за адекватна, навременна, персонализирана регенеративна терапия, довела до спасяване на зрението на второто око. Имайки предвид характера на тези травми и честото, значително увреждане на второто око, може да се заключи, че подобен подход е основополагащ за добрия терапевтичен резултат.



Фигура 28. Клинична, интраоперативна фотография, демонстрираща отлично структурно възстановяване на предния очен сегмент при пациент с тежко изгаряне с разтопен метал

Клиничен случай 2

Четиридесет и седем годишна пациентка с фамилна латисова дистрофия на роговицата се лекува от 15 години по повод на рецидивиращи ерозии. По данни на пациентката в годината тя има между 5–8 „пристъпа“ с болка, нарушено зрение и нужда от лечение с лубриканти. В годините пациентката е пробвала да „реши проблема“ с контактни лещи, от които, по нейни думи, е направила инфекция. Пациентката е диагностицирана с масивна ерозия на епитела на дясно око, обхващаща централната роговица с диаметър 9 милиметра (фигура 30 А) и е предложено оперативно лечение с трансплантация на АМ. Два месеца след интервенцията пациентката не е имала оплаквания, но при преглед е установено багрене на повърхността. Оптичната кохерентна томография не показва дефекти (фиг. 30 Б), но на пациентката е предложена втора трансплантация на АМ. Оперативното лечение протича без усложнения и 6 месеца след него пациентката постъпва за планово лечение на второто око – трансплантация на АМ с цел стабилизиране на предната очна повърхност. В процеса на подготовка е направен оглед на дясното око, което има хеморагия, резултат от скорошна хипертонична криза. Вижда се ясно, че епителът е стабилен, роговицата е със задоволителна прозрачност, а лимбалната зона е спокойна, без активация на съдове и възпаление.



Фигура 29. Пациентка с латисова дегенерация, дясно око по време на ОСТ контролирана оперативна интервенция: след масивна рецидивираща ерозия (горе), след сваляне на контактната леща (средата) и при контролен преглед (долу). Ясно се вижда еволюцията на роговичната прозрачност и структурното възстановяване

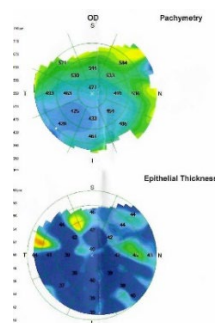
Случаят показва, че персонализираният подход към пациенти с роговични дистрофии може да подобри тяхното качество на живот чрез подобряване на зрителния, перцептуален и козметичен комфорт. Трансплантацията на АМ намалява риска от ерозии на роговицата, особено в случаите на неравности на базалния слой, както е при пациентите с латисова дистрофия. От посочения пример се вижда ясно, че адекватната и навременна трансплантация на АМ може да промени трайно характеристиките на ПОП.

Клиничен случай 3

Пациентка на 45 години получава парализа на лицевия нерв през 2016 г. От тогава има проблем с дясното око. Окоето не се затваря и започва да „изсъхва“. Лекувана е в частен център, където първо ѝ поставят контактна леща с терапевтична цел, впоследствие ѝ съобщават, че е развила катаракта и я оперират. След операцията състоянието ѝ се влошава и тя решава да потърси алтернативна консултация с друг център.

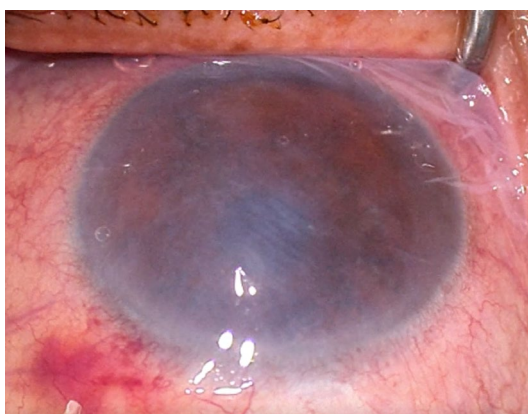
Зрителната острота на дясното око е 0.3. Освен споменатите оплаквания, окоето е зачервено. Епителът е неравен със зони на дефекти, които се оцветяват от флуоресцеин. Предилекцията на тези изменения е в долната 1/3. Интраокуларната леща е на място, а очното дъно е без отклонения.

Тъй като всички признаци и симптоми се държат на лагофталма, на пациентката е предложена АМ. 10 дни след операцията оплакванията намаляват значително и зрителната острота се подобрява до 0.5. Пациентката се чувства добре и е готова да се върне на работа.



Pachymetry OD					
Range (µm)	Min (µm)	Avg (µm)	Max (µm)	St. Dev.	SWT (µm)
0.010	400	471	528	-	-
0.010	400	484	588	111	196
0.010	400	500	600	100	196
Minimum Thickness (µm)		400	500	500	2400
Pachy Min Map (µm)		400	500	500	410

Epithelial Thickness OD					
Range (µm)	Min (µm)	Avg (µm)	Max (µm)	St. Dev.	SWT (µm)
0.010	30	40	50	-	-
0.010	30	41	52	1	3
0.010	30	42	53	1	3
0.010	30	43	54	1	3
Minimum Thickness (µm)		30	40	40	40
Min Map (µm)		30	40	40	40

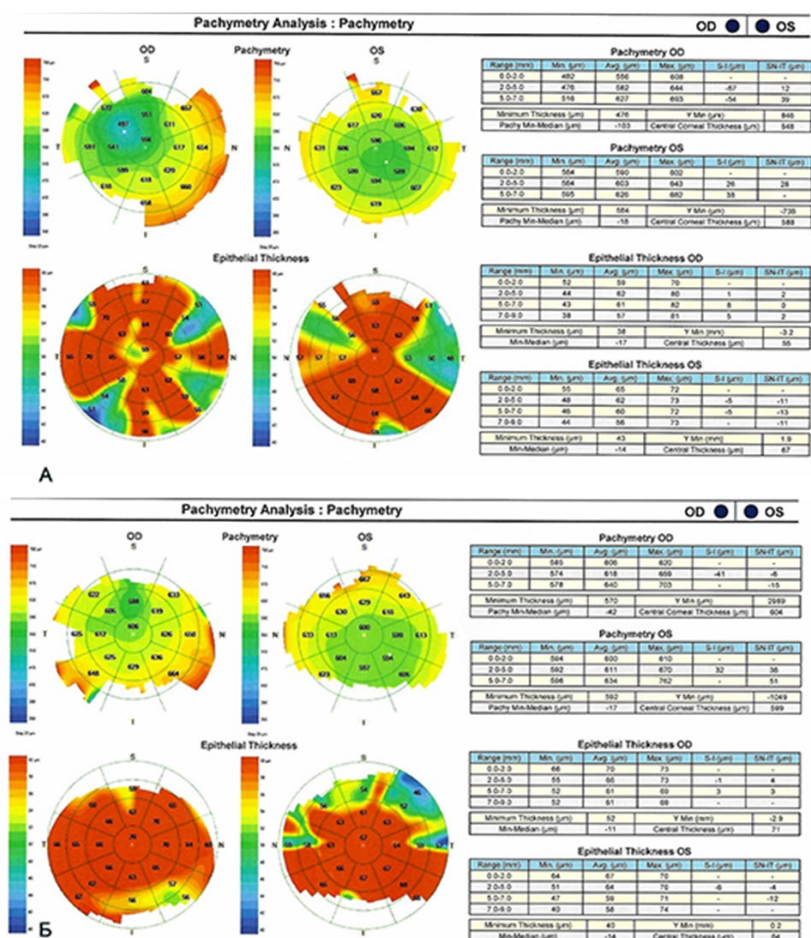


Фигура 30. Пациентка с парализа на Бел и дългосрочни оплаквания от намалено зрение и комфорт. Клиничната фотография демонстрира неравен епител с дефекти. Това се потвърждава и от роговичната томография. На база клиничните признаци е взето решение за трансплантация на амниотична мембрана

Клиничен случай 4

Пациент на 45 години се травмира по време на работа. Прегледан от кварталния офталмолог, който извадил чуждо тяло от дясното око. Пациентът капал капки за 10 дни и „забравил за случката“. Месец след това дясното око започва да се зачервява, зрението намалява и пациентът се оплаква от болезнени епизоди, които зачестяват.

При прегледа е установено леко багрене на ПОП, но без епителни дефекти. На пациента са изписани лубриканти и е оставен за наблюдение. Независимо от липсата на промяна в обективното състояние, пациентът се оплаква от увеличаващо се нарушение на зрителния, перцептуален и козметичен комфорт. Извършен е анализ с роговичен томограф (пентакам) и е установена зона на локално изтъняване с хиперплазия на епитела (фигура 31 А). След оценка на състоянието на пациента е предложена трансплантация на АМ. Двадесет дни след трансплантацията оплакванията на пациента отзвучават, роговичната дебелина започва да се възстановява, а епителът расте равномерно върху цялата очна повърхност (фигура 31 Б). Това е съпроводено с отзвучаване на оплакванията, възстановяване на зрението, нормализиране на времето на разкъсване на слъзния филм и липса на багрене при осветяване с флуоресцеин.



Фигура 31. Роговична томография на двете очи на пациент с травма и оплакване от дискомфорт (зрителен, перцептуален и козметичен) в дясно око. На базовата карта (А) се вижда, че дясното око има локален дефект встрани от центъра на 11 часа, а епителът е неравномерно разпределен. След трансплантация на амниотична мембрана (Б) дефектът е значително по-плътък, е епителът – с нормална дебелина и равномерно разпределение

Подобни случаи изглеждат „безобидни“, но са свързани със сериозно засягане на качеството на живот на тези пациенти. Приложението на АМ е ефективен и ефикасен метод, който освен за подобряване на качеството на живот, има важен принос за възстановяване на работоспособността.

Анализът на цялата група пациенти по отношение на субективните оплаквания показва бързо намаляване на болката в рамките на една седмица. Значително подобрение на перцептуалния и козметичния комфорт в рамките на един месец и подобряване на зрителната острота с 0.2–0.4 в рамките на 6 месеца.

Имайки предвид, че това е прототип, а приложението му е част от научно изследване на уникална терапия за редки заболявания, статистическа обработка на данните е невъзможна. Независимо от това, поради липсата на странични ефекти и значително подобряване на зрителния, перцептуалния и козметичния комфорт в рамките на 6 месеца, приложението на тази иновативна терапия като средство на единствен и/или последен избор е напълно оправдано.

ОБСЪЖДАНЕ

Предната очна повърхност е уникална част от нашия организъм и зрителния анализатор. Нейното здраве се изразява в три прости усещания от страна на пациента: зрение, комфорт и липса на зачервяване. Нарушенията, засягащи всяка една от структурите, които я изграждат, водят до засягане по съседство и това отключва порочния кръг на заболяване на ПОП. Предната очна повърхност може да бъде увредена от множество разпространени и редки заболявания [41, 96]. Лечението често е комплексно и изисква време и постоянство. В последните години приложението на иновативни терапии промени значително прогнозата на множество заболявания, водещи до роговична слепота и цикатризация на ПОП [39, 90, 97, 98]. Хибридните технологии в комбинация с новите разбирания за биохимичните и микроструктурни промени позволиха прилагане на персонализирани терапии с отлични резултати. Независимо от това има много социални, правни, медицински и етични проблеми, които трябва да бъдат дискутирани с цел да се намери разумно решение. Това е причината този труд да бъде посветен на цялостния подход за решение на тези проблеми.

Първата и най-важна задача беше да се направи обзор на правните и икономически аспекти и законодателни разпоредби, свързани с трансплантацията и трансплантацията в офталмологията в частност, както и анализ на дефинициите, определени от закона в контекста на клиничната работа. Оказа се, че най-големият пропуск на българското законодателство е липсата на закон за биопродуктите [32, 95]. Към момента това са основно ваксини, като във връзка със ситуацията с COVID 19 се заговори за биопродукт – клетъчни линии, които да произвеждат антитела срещу вируса. Преработката на АМ и стволови клетки в биопродукт или медицинско изделие би допринесло за решаване на много от проблемите на ПОП.

Лекарствените продукти за персонализирана терапия, включително и биопродуктите, се определят като терапевтични възможности, които се основават на гени или клетки и са предназначени като дългосрочни или постоянни лечебни процедури на остри или хронични човешки заболявания на генетично, клетъчно или тъканно ниво [40]. И в Европа има множество проблеми главно поради незадоволени медицински, клинични нужди на фона на значителен пазарен размер, особено като се вземе предвид цената.

През последните години беше постигнат изключителен напредък в клетъчните и генно-базирани терапии, илюстрирани с одобрението на променящи парадигмата на класическото лечение в много терапевтични области, включително онкология, възпаление и офталмология. Все още

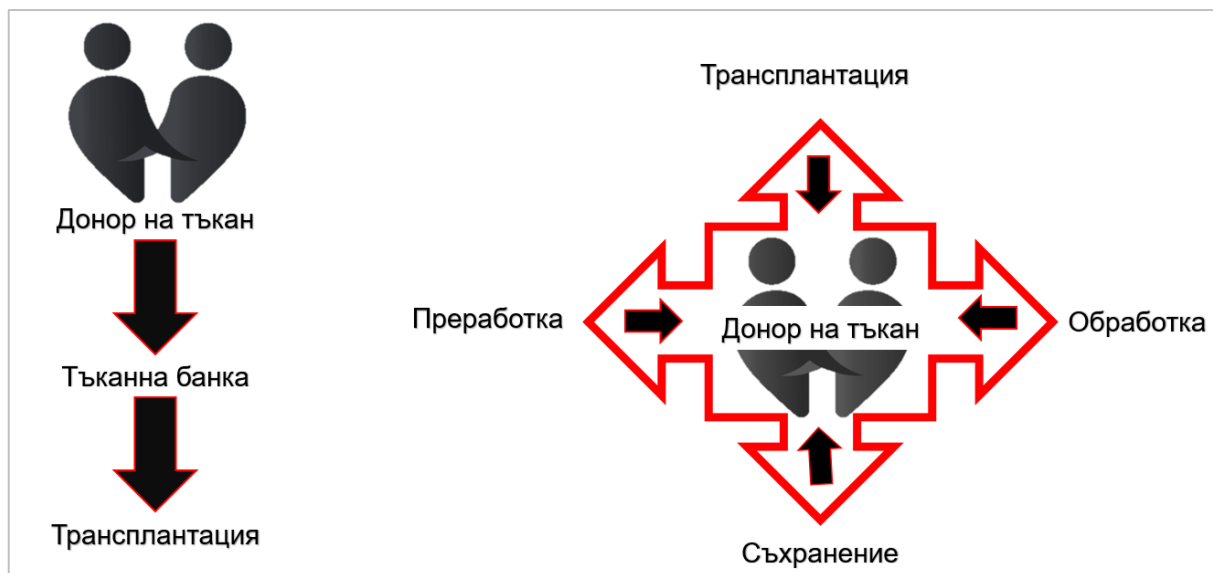
обаче остават много предизвикателства да накарат тези нови фармацевтични методи да заемат своето място в съвременната реимбурсирана от здравните системи медицина [39]. Типичен пример за биопродукти са моноклоналните – революция в схемите на лечение на множество заболявания. Тази терапия е допринесла за удълженото оцеляване и подобреното качество на живот. Следващата революционна стъпка в здравеопазването несъмнено е тази на регенеративната медицина, основана на реализирането на потенциала на гените и живите клетки като лекарства [40, 99]. Последните са надеждата на офталмологията. Независимо от уникалните резултати, все още тези терапии не са навлезли широко в клиничната практика, най-вече поради тяхната цена. За правилна оценка е необходимо да се внедрят иновативни модели за възстановяване на разходите, тъй като настоящият модел е явно неприспособен към уникалния характер на ефективността на някои биопродукти, например като еднократно лечение за лечение на хронични заболявания или за подобряване на качеството на живот за продължителен период от време. В България това е сериозен проблем, който рефлектира негативно върху офталмологията. Независимо от наличието на биотерапия, няма система за реимбурсация на подобно иновативно лечение. В световен мащаб създателите на политики и регулаторните агенции вече са увеличили темпото на новата революция в здравеопазването, илюстрирано от въвеждането и активното прилагане на нови регулаторни пътища, които отговарят на спешността, като същевременно гарантират безопасност и ефикасност [41].

В сектора на здравеопазването режимът за комбиниране на терапевтични условия, последователно или паралелно, е от изключително значение за продължителността и ефикасността на лечението. Подходът на комбинираните терапии вече е постигнал огромно въздействие в здравеопазването на Европа, като онкологичните иновации са отличен пример за това. В офталмологията подобни стратегии са все още в процес на развитие.

Много подходящ пример е ситуацията с АМ в офталмологията. Понастоящем АМ се прилага в България като трансплантат. Това законодателно създава много технически пречки за нейното по-широко приложение. Лечебното заведение трябва да има регистрация и разрешение за трансплантация в ИАМН, трябва да има договор със здравна каса и специалисти с нужната квалификация. Алтернативен биопродукт от АМ може да се фиксира с контактна леща или даже да се прилага под формата на капки [80, 82, 100-104]. По този начин трансплантацията може да се превърне в технология, както е показано на фигура 32.

Може да се обобщи, че независимо от празнотите в законодателната

уредба, лечебните заведения и водещите институции трябва да се обединят около идеята за приложение на новите технологии за преработка на донорската тъкан в биопродукти, медицински изделия и други терапевтични форми, които да осигурят надеждност, достъпност и икономическа ефективност на прилаганата терапия.



Фигура 32. Сравняване на съвременния вертикален подход на трансплантация с възможностите за интегрален подход с въвеждане на нови технологии. Ефективността и икономическият ефект на втория подход са многократно по-високи

СБОБАЛ – Варна ЕООД е лидер в трансплантацията на АМ в България [105, 106]. Методиката е въведена през 2004/5 г. и от тогава нейното развитие е довело до налагането ѝ като ефикасен и ефективен метод за лечение на ПОП в България. Опитът с наличието на собствен източник на тъкан показва, че териториалното разположение на очните банки е от особено значение за ефективното функциониране. Ето защо, като практическа задача на настоящия дисертационен труд е разработването и внедряването на СОП за вземане, обработка, преработка и съхранение на роговица и склера. Това практическо приложение на труда е вече във финална фаза и Отделението „Очна банка“ е в процес на регистрация в МЗ.

Един от най-големите центрове за трансплантация на АМ в Германия се намира в Тюбинген, където методиките за вземане, обработка, съхранение и приложение са много сходни с тези в СБОБАЛ – Варна [8]. За периода 2001–16 г. авторите отчитат четирикратно увеличение на трансплантациите в центъра с разширение на индикациите и доказване на много нови възможности чрез активация на растежни фактори и потискане на неоваскуларизацията. В настоящото проучване се наблюдава същата

тенденция, само че за периода 2013–19 г., където броят на трансплантациите е нараснал от 87 на 335. Това е свързано с отчитане на положителния ефект по отношение на субективната и обективна симптоматика, публикувано от нашата широка колаборативна група [105, 106]. При анализ на извършените в СБОБАЛ – Варна трансплантации по повод на язва на роговицата е установено значимо повлияване на големината на язвата, като значително намаляване на размера има при трансплантациите тип покритие, тип пълнител (еднослоен) и тип пълнител (двуслоен) ($p < 0,001$). При 98% пациентите, на които е извършена трансплантация тип покритие, на 25-ия постоперативен ден се наблюдава възстановяване на роговичния дефект под 2 mm. Същият ефект (92%) се наблюдава и при пациентите с еднослойна комбинирана трансплантация. Повлияването на дълбочината на язвата показва резултати, подобни на тези, свързани с големината. Повлияването е значително по-изразено ($p < 0,001$), като варира от 93,70% при трансплантация тип покритие до 57,70% за тип пълнител (двуслоен) на 25-ия ден от постоперативния период. При най-тежките форми с изходен дефект над 50% са 71% от случаите. При тях е извършена трансплантация тип пълнител многослоен. На 8-ия ден 15% от пациентите са със под 50% дълбочина на дефекта, а на 25-ия ден наблюдаваме повлияване на дълбочината между 20-50% в 68%. При пациентите с изгаряния едва на 25-ия ден дефектът намалява при 63% от случаите [107].

Независимо от тези успехи, в национален, европейски и световен мащаб съществуват значителни различия по отношение на подхода и лечението на ПОП чрез трансплантация. Настоящото проучване показва, че ПК е все още водеща методика в България. Проучване на Палма-Карваджал и съавтори показва, че в Испания водеща методика за последните пет години е ДМЕК. Авторите посочват, че това е достъпен, лесен и бърз за възстановяване начин с по-малко натоварване на здравната система [108]. Подобна е тенденцията за Франция, където Биган и съавтори докладват, че за последните 10 години основната техника е задна ламеларна кератопластика, за която основната индикация е дистрофията на Фукс. По отношение на втората най-честа индикация за кератопластика – кератоконуса, основната използвана методика е DALK [109]. Немското дружество по офталмология публикува детайлизиран анализ на тенденциите в Германия, като Флокерзи и съавтори анализират тенденциите и тренда за периода 2001–16 г. От 2001 г. насам броят на трансплантациите на роговицата се е увеличил 1,5 пъти, от 4730 пенетриращи кератопластики през 2001 г. до 7325 пенетриращи и ламеларни кератопластики през 2016 г. Преминаването от пенетриращи към ламеларни процедури започва през 2006 г. През 2014 г. ламеларните процедури (231 [4%] предни и 2883 [49%] задни ламеларни кератопластики) надминават

пенетриращите процедури (2721, 47%) за първи път. Основни показания за кератопластика в Германия (2016) са ендотелната дистрофия на роговицата (46%), псевдофакична булозна кератопатия (13%), повторна кератопластика след неуспех на присадката (11%), кератоконус (8%) и цикатрикси на роговицата (6%; други: 16%). Броят на мембранните ендотелни кератопластики (DMEK) е 12 пъти по-висок (3850, 53%) от автоматизирани ендотелни кератопластики (DSAEK, 319, 4.4%) през 2016 г. Делът на дълбоките предни ламеларни кератопластики (DALK) е относително постоянен и не надвишава 6% (269 през 2011 г.) [110].

На база анализа на извършените роговични трансплантации за последните 3 години става ясно, че в България, и по-специално в СБОБАЛ – Варна, има незначителна тенденция за преминаване от пенетриращи към послойни процедури. Независимо от малкия брой, анализът показва, че причините за това са следните:

- напреднали стадии на заболяването, когато става въпрос за дистрофия на Фукс или тежка цикатризация на роговицата в случаите с булозна кератопатия;
- липса на банка за подготовка на трансплантата за DMEK и практическа негодност на корнеосклералния бутон за обработка экс темпоре;
- някои технологични пречки: инструменти, липса на опит и нежелание на пациента за спазване на постоперативния режим.

На база направения анализ са подготвени СОП за подготовка на донорски материал за DMEK, което би улеснило работата на хирурга. Друг важен момент е наличието на материал в ранните етапи от развитието на булозната кератопатия и работа с хирурзите, които трябва да реферират своите пациенти навреме.

Формулирани са двете основни индикации за послойна кератопластика, а именно:

- ендотелиална недостатъчност при запазена строма (клинично и с конфокална микроскопия) със или без епително увреждане – DMEK;
- промяна в предните 2/3 на стромата, включително изтъняване без цикатризация, задължително при липса на възпаление – DALK;
- всички случаи на цялостно увреждане на роговицата, възпаление и заплашваща перфорация – ПК.

Независимо че за извършването на кератопластиката е отчетена технологична пречка, от една година базата разполага с технология за извършване на оперативните интервенции без аналог, а именно дигитален микроскоп с възможност за триизмерна хирургия и ОСТ в реално време.

Към момента триизмерната хирургия се използва основно за оперативно

лечение на задния очен сегмент, като там са изтъкнати предимствата, както следва:

- интегрирана технология, позволяваща визуализация iOCT без външен монитор;
- подобрена ергономичност и незабавна обратна връзка на хирурзите чрез окуляри на микроскопа при нужда;
- подобрена визуализация на подлежащите тъканни структури и по-широко оперативно поле [111-115].

На база публикуваната литература, опитът с приложението на триизмерната хирургия на преден очен сегмент е сравнително лимитиран [116-118]. Вейнсток и съавтори изследват ретроспективна серия от случаи, включващи 2320 очи, които са оперирани за катаракта, използвайки триизмерна система за показване ($n = 1,673$ очи) (3D група) или традиционен бинокулярен микроскоп ($n = 647$ очи) (традиционна група) [116]. Тяхното заключение е, че двата метода работят еднакво добре, без значима разлика в усложненията или отчетените от хирурга проблеми. По-интересни са заключенията на Хисато Оно, който заключава, че триизмерната хирургия има следните предимства: способността да се наблюдават ясно предната камера и камерният ъгъл, без да се налага често регулиране на фокуса, подчертания стереоскопичен ефект, както и положителен ефект върху стойката на хирурга. Авторът смята, че триизмерната хирургия е със съществени предимства за миниинвазивна катарактална и глаукомна хирургия [119].

Обзорът на литературата не показва публикации за приложение на триизмерната технология с iOCT за множеството и комплицирани процедури за лечение на ПОП. Опитът със системата на автора и неговите колеги и учители показва значителни предимства на тази технология за всяка една стъпка от лечението на преден очен сегмент.

На първо място технологията е незаменима за позициониране и правилно фиксиране на АМ. При дълбочинни дефекти се прилага iOCT с две линии на сканиране, а при цялостна оценка на мембраната като покритие iOCT с пет линии на сканиране. Тази технология дава информация за дебелината на мембраната, нейното разпределение и апозиция и евентуални дефекти в зоната на интерфейса. Особено полезно е приложението на технологията при комбинирана техника на Ханада, където се оценява нивото на запълване на дефекта, а след това и правилната позиция на покритието.

Приложението на АМ при травматични случаи много често е „на сляпо“ с цел да се запази интегритетът и да се намали възпалението. Контролът с iOCT позволява оценка на увреждането на предния очен сегмент и вземане

на адекватно решение за позициониране на шевовите и разполагане на покритието.

Няма съмнение че iOCT и триизмерната технология са нова ера в послойната кератопластика. За момента основният недостатък е липсата на количествена (числена) оценка на големината и дебелината на структурите, но независимо от това, методиката е незаменима за определяне на дълбочината и ориентацията както при предна, така и при задна ламеларна кератопластика.

И при предния, и при задния сегмент iOCT технологията има проблем с инструментите. Опитът показва, че за предния сегмент този проблем е по-лесно решим, тъй като инструментът може да се отстрани за кратък период от време и да се направи оценка на ситуацията. Независимо от това усилията са насочени към създаване на нови материали, позволяващи по-малко засенчване и по-детайлна оценка в реално време.

Триизмерната технология с iOCT има много логистични предимства. Те могат да бъдат групирани в две категории: обучение и участие на екипа в оперативната интервенция. Няма съмнение, че обучението никога не е било по-реалистично и по-адекватно. Триизмерната технология позволява множество обучаващи се да наблюдават процедурата в реално време и да имат същата „гледна точка“ като хирурга. Това важи и за обратния случай: хирургът да наблюдава действията на обучаващия се и може да направи демонстрация, без да си сменя мястото с обучаваания.

В последните години в обучението по офталмология много масово навлязоха симулаторите. Независимо от тяхното технологично развитие, те могат да подобрят микродвиженията и да осъществят контрол, но не могат да осигурят „реалистичност“ на усещанията и истинско съпротивление. Триизмерната хирургия е нов етап в обучението на млади специалисти, която осигурява прецизност, сигурност, по-ефективно обучение и ускорено привикване към реалните хирургически предизвикателства.

Не на последно място, триизмерната хирургия интегрира целия екип в реално време, като включва операционната, циркулиращата сестра и анестезиолога в процеса на оперативната интервенция. Това е особено полезно за операционните сестри, които трябва да следят всички стъпки от хода на операцията и да вземат бързи и ефективни решения с цел подпомагане на хирурга. Към момента тази методика осигурява условия за оптимално участие на целия екип.

През всички етапи и фази на дисертационния труд изключително ясно се открояваше проблемът с ограничението от доставка и правилна обработка на тъкан за очна трансплантация. Повечето банки в световен мащаб извършват

прецизна подготовка на различни продукти за трансплантация. В България роговицата се разпространява като корнеосклерален бутон, което изключително затруднява работата на очния хирург и на практика намалява шансовете за извършване на послойна кератопластика. Това е и причината практическата насоченост на този труд да бъде посветена на създаването на тъканна банка от ново поколение с акцент върху преработка на тъканите преди тяхното разпространение.

В Европа и света има множество банки, които освен обработка, осъществяват и преработка на тъканите и ги разпространяват като биопродукти или медицински изделия. Предимството на подобен процес е масовата употреба на крайния продукт и неговото приложение в амбулаторни условия без нужда от специални разрешения. Имайки предвид неравномерното разпределение на трансплантацията на роговица и АМ, демонстрирано в резултатите на този труд, подобна стъпка би улеснила по-равномерното разпространение и по-добрата грижа за пациенти с проблемна ПОП. Съобразявайки факта, че 4% от българската популация има роговични дистрофии и до 30% от тях са симптоматични, можем да формулираме хипотезата, че подобна стъпка ще осигури по-масов мениджмънт на рецидивиращите ерозии и ще подобри качеството на живот на тези пациенти.

Разработените оперативни процедури за АМ, роговица, склера и ЛСК е стъпка напред в очното банкиране на национално ниво. Това е една солидна основа за последваща научно-изследователска и развойна дейност, която ще позволи следващия етап, а именно разработка на персонализирани медицински изделия.

В тази връзка бе разработен и първият прототип, който авторът приложи клинично при 30 случая и бяха сравнени резултатите с много по-популярната и лесно изпълнима SLET техника. Още повече, резултатите показват че техниката с култивиране на собствени клетки по-бързо и по-ефективно води до подобряване на зрителния резултат и структурната интеграция на роговицата. Един от основните недостатъци е цената. SLET със собствени или донорски клетки е на практика „безплатна“ процедура, неизискваща допълнителни консумативи, апаратура и труд. Прототипът със собствени клетки, култивирани върху АМ, има висока себестойност. Реактивите и апаратурата формират цена около 900 лева, като към това трябва да се добави и трудът на лаборанта и биолога в продължение на 14 дни. Независимо от това себестойността на подобен продукт би била под 1000 евро, което е 10 пъти по-ниска от цената на комерсиалния аналог холоклар.

Не на последно място, роговицата и ПОП са отлични кандидати за „заместители“ или „изкуствени“ деривати, продукт на тъканното

инженерство. Популярността на DMEK не е случайна, тъй като много се работи върху култивиране на ендотелни клетки, които да заместят трансплантатите от трупни донори. Това е и причината, поради която структурата на кератопластиките в България трябва да се промени. Това е и обект на очевиден парадокс – липса на тъкан, но и липса на процедури за нейното оптимално оползотворяване.

Опитът на тъканната банка в УМБАЛ „Св. Марина“ показва, че научният подход е важен за практическия успех. Трансплантацията на тъкани в офталмологията е пример за транслационна медицина в действие, а именно:

- научна хипотеза за продукт;
- неговата лабораторна разработка;
- приложение в практиката;
- връщане в лабораторията за усъвършенстване;
- приложение на подобреното изделие/методика в практиката.

Другото съществено предимство на офталмологията е малкият размер на окото и на нужните трансплантати, което позволява използване на лаборатории в рамките на университетски и/или болнични структури.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Трансплантацията е важна медицинска интервенция, която има животно-и органосъхраняващ ефект. В България регулаторният орган на всички дейности по трансплантация на тъкани, органи и клетки е ИАМН. Развитието на науката, новите технологии и персонализираните подходи променят класическите разбирания за трансплантация. Все по-големи ще бъдат възможностите за частично изкуствени органи, получени от клетки или тъкани. Това важи и за офталмологията. Прегледът на законодателната уредба показва, че тя не е достатъчно пластична да се адаптира към динамиката на технологичния прогрес в областта на трансплантацията. Това създава пречки, които са особено непреодолими в национален мащаб. В България няма идея за колаборация между институции като ИАМН и ИАЛ, няма закон за биологичните продукти.

Независимо от това, дори при сега действащите закони могат да се намерят варианти за внедряване на прогресивни идеи за терапевтични намеси върху ПОП. Частично неблагоприятната ситуация се дължи на липсата на офталмологично лоби в организациите за трансплантация и донорство. За да следва европейската тенденция, България трябва да внедрява нови технологии и да намира източници за тяхното финансиране. Липсата на такова създава условия за нарушение на правилата, като типичен пример е заплащане на АМ (понастоящем трансплант) от пациента. Независимо дали е медицинско изделие, биологичен продукт или трансплантат, вложен в АМ и получени деривати, трябва да се реимбурсира от МЗ. Това ще намали риска от нарушения и ще регулира пазара на медицинската услуга, свързана с този процес.

Базите на МУ-Варна са безспорни лидери както във вземането, обработката, преработката и разпространението на АМ, така и в трансплантацията с всичките и възможни приложения. Разширяването на дейността и функциониране на комплексна очна банка би подобрило неравномерната концентрация на роговична трансплантация в София-град. Трансплантацията на роговица е важен елемент от терапевтичния процес в офталмологията и подобряването на инфраструктурата за осигуряване на преработени трансплантати е от особено значение за развитието на тази високоспециализирана медицинска дейност.

В България все още преобладава техниката на ПК, която е по-ниско технологична и не позволява оптимално оползотворяване на оскъдния донорски роговичен материал. В България има значителна териториална зависимост между наличието на тъканна банка и обема на извършваните

дейности по трансплантация, ето защо е особено важно да се развие комплексна тъканна банка в Североизточна България.

Трансплантацията на АМ е новият-стар подход в лечение на заболяванията на ПОП. Петнадесетгодишният опит на институцията и четиригодишният опит на автора показват резултати, сравними с най-добрите световни тенденции. Иновативният подход към техники за регенерация и трансплантация на стволови клетки е бъдещето на офталмологията и по-специално на лечението на патологичните изменения в ПОП. Това е и икономически ефективен метод, особено като се направи ценови анализ на медицинските изделия в Европа.

Новите технологии имат важно място в офталмохирургията както като средство за обучение, така и като условие за по-качествена и ефективна офталмохирургия. Триизмерната технология, комбинирана с ОСТ, има множество ергономични, технически и технологични предимства, които позволяват хирургическо лечение от ново поколение. Комбинацията на нови хирургически техники с нови технологии позволява развитието на офталмохирургията и постигане на по-добри, по-бързи и по-дефинитивни лечебни резултати.

ИЗВОДИ

България има потенциал за развитие на трансплантацията на роговица и АМ в офталмологията, както и в създаване на биоаналози.

Амниотичната мембрана може да бъде преработена в медицинско изделие и биологичен продукт с цел да разшири достъпността на тази процедура в различните лечебни заведения за третиране на пациенти със заболяване на ПОП.

Създаването на трансплантат от дАМ със собствени/донорски ЛСК има важно значение за развитие на персонализираните терапии за лечение на ПОП.

В България няма пълна законодателна уредба, която да дефинира биологичните продукти. Законът за медицинските изделия не адресира в детайли медицинските изделия за масово производство на база биологичен материал.

Независимо от лидерската си позиция по отношение на АМ, университетските болници на МУ-Варна имат множество юридически и икономически пречки за технологично развитие.

Поради асиметрията във вземане и доставка на роговична тъкан е наложително функциониране на комплексна очна тъканна банка в региона на Североизточна България.

Възможностите за развитие на терапията с АМ и ЛСК са създаване на биологични продукти и медицински изделия, което ще разшири пенетрацията на тази методика.

Колаборативната работа с институциите на база направените анализи ще доведе до по-бързо решение на описаните проблеми.

Бързото въвеждане на нови методики за лечение на ПОП има важно значение за подобряване на качеството на живот и зрението на пациентите.

Приложението на новите технологии при оперативно лечение на ПОП осигурява по-голяма ефективност и по-добро качество на работа.

Обучението на офталмохирурзите за възможностите на регенеративната терапия и трансплантацията е важна предпоставка за подобряване на офталмологичната грижа.

ПРИНОСИ

Приноси с научно-приложен характер

Изготвена е карта за интензитета и разпространението на трансплантацията в България и се анализираха работните параметри за разпространение и употреба на донорска тъкан в офталмологията.

Създадени са алгоритми за работа на интегрирана тъканна банка за роговица, склера, ЛСК и АМ.

Създадени са прототипи и е приложен първият биопродукт за лечение на ПОП чрез използване на лабораторно размножени ЛСК.

Установени се предимствата и недостатъците на триизмерната хирургия, интегрирана с iOCT, при оперативно лечение на преден очен сегмент.

Приноси с научно-теоретичен характер

Извършен е анализ на трансплантацията в България и са установени разликите с добрите практики в Европа и света.

Извършен е анализ на техниките за трансплантация на роговица и АМ, както и предимствата и недостатъците на утвърдените в България методики.

Анализиран е ефектът от приложение на iOCT в предносегментната хирургия.

Приноси с потвърдителен характер

Направен е анализ на публикуваната литература и са установени съвременните „добри практики“ в очната трансплантация.

Доказани са негативните последици от предимствено извършване на ПК в сравнение със съвременните ламеларни техники.

Направен е анализ на регистъра към ИАМН и са установени силните и слабите страни на всички процеси по вземане, обработка, съхранение и разпространение на тъкани.

СПИСЪК С ПУБЛИКАЦИИТЕ СВЪРЗАНИ С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Simova J, Radeva M, Grupchev D, Grupcheva C. Bromfenac 0.09% ophthalmic solution for postoperative pain and ocular discomfort after cataract surgery with phacoemulsification. *Bulgarian Review of Ophthalmology* 2018, 62 (3), 47-57.
2. Simova J, M Radeva, D Grupchev, C Grupcheva. Assessment of sclerocorneal incision architecture after phacoemulsification using AS-OCT. *Scripta Scientifica Medica* 2018, 12(31), 20-6.
3. Grupchev D, Radeva M, Georgieva M, Grupcheva CN. In vivo confocal microstructural analysis of corneas presenting Kayser-Fleischer rings in patients with Wilson's disease. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. 2018, 81(2), 137-143.