



ЛЕСОТЕХНИЧЕСКИ УНИВЕРСИТЕТ
ФАКУЛТЕТ „ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНА“
Катедра „Хирургия, рентгенология, акушерство
и гинекология“



СЕВЕН РУЖДИ МУСТАФА

**Изследване на регенеративния потенциал на богата
на тромбоцити плазма и натриев хиалуронат
с декспантенол при експериментално предизвикани
язви на роговицата при зайци**

АВТОРЕФЕРАТ

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

Област на висше образование 6. Аграрни науки и ветеринарна
медицина

Професионално направление 6.4. Ветеринарна медицина

Научна специалност „Хирургия, рентгенология и физиотерапия“

Научен консултант:

доц. д-р Надя Златозарова Златева-Панайотова, д-р

СОФИЯ, 2023

Дисертационният труд съдържа 164 страници, включително 19 таблици и 57 фигури, оформени в увод, литературен обзор, цел и задачи, материал и методи, резултати, обсъждане, изводи, приноси, препоръки за практиката, научни публикации, свързани с дисертационния труд и установени цитирания, както и литературен указател, състоящ се от 336 заглавия, от които 9 на кирилица и 327 на латиница.

Защитата на дисертационния труд ще се проведе на 26.09.2023 г. от 10.30 ч. в зала „Акад. Мако Даков“ в сграда А на Лесотехнически университет, гр. София, бул. „Климент Охридски“ № 10 на открито заседание на научно жури в състав:

Председател: проф. Васил Костадинов Манов, двм

Членове: проф. Богдан Янев Аминков, двмн – рецензент
проф. Динко Недев Динев, двмн – рецензент
проф. Иван Борисов Иванов, двмн
проф. Димитър Савов Димитров, двмн

Материалите по защитата (дисертационен труд, автореферат, рецензии и становища на научното жури) са на разположение в Деканата на ФВМ, гр. София, бул. „Климент Охридски“ № 10 и са публикувани на сайта на Лесотехническият университет (www.ltu.bg).

1. УВОД

Регенеративната медицина е бързо развиваща се интердисциплинарна област с голям потенциал за революционизиране на лекуването на различни заболявания и състояния на организма. Тя се фокусира върху овладяването на регенеративния потенциал на клетките, тъканите и биоматериалите за възстановяване или заменяне на увредени или нефункциониращи тъкани чрез използване на клетки с пролиферативни или диференциращи способности. Офталмологията заема челни позиции в биомедицината, разработването и изследването на лечебния ефект на различни терапевтични средства. Редица изследователски групи по света са фокусирани върху нарушенията на очите, включително възстановяване на роговицата.

Язвите на роговицата, характеризиращи се със загуба на роговичен епител и стромална тъкан, остават значително клинично предизвикателство във ветеринарната офталмология. Те може да бъдат резултат от различни причини като травма, инфекция или подлежащи заболявания на роговицата и може да доведат до значително зрително увреждане, ако не се лекуват ефективно. Третирането на роговичните язви включва насърчаване на оздравителните процеси и регенерацията, за да се възстанови анатомичната цялост и физиологичната функционалност на роговицата. През последните 15 години има нарастващ интерес към изследване на нови терапевтични подходи в офталмологията в световен мащаб, които използват регенеративния потенциал на богатата на тромбоцити плазма (PRP), хиалуроновата киселина (HA) и декспантенола за подобряване на заздравяването на роговичните слоеве.

PRP представлява автоложен кръвен продукт, съдържащ висока концентрация на тромбоцити и свързаните с тях растежни фактори. Тромбоцитите играят решаваща роля в оздравителните процеси, като освобождават различни растежни фактори, цитокини и хемокини, които насърчават възстановяването и регенерацията на тъканите. Хиалуроновата киселина, от друга страна, е естествен полизахарид, намиращ се в изобилие в извънклетъчния матрикс на съединителната тъкан. Притежава уникални високоеластични свойства, насърчава миграцията на клетките и осигурява благоприятна среда за заздравяване на тъканите. Декспантенолът е алкохолен аналог на пантотеновата киселина (витамин B5) – подпомага синтеза на колагена, а също пролиферацията и миграцията на фибробластите. Смята се, че регенеративната си роля дължи на експресия на интерлевкини.

Използването на богата на тромбоцити плазма и комбинацията на хиалуронова киселина с декспантенол в офталмологията привлича значително внимание поради потенциала им да ускоряват процесите на зарастване на роговицата, да намаляват възпалителните реакции и да подобряват цялостно-

то възстановяване на очните тъкани. Многобройни предклинични и клинични проучвания са изследвали ефикасността на PRP и HA при различни очни състояния, включително язви на роговицата. Въпреки обещаващите резултати, регенеративният потенциал на тези средства при язви на роговицата при животните остава недостатъчно проучен. Необходими са допълнителни изследвания за установяване на оптимални протоколи, дозировка и дългосрочни резултати. Приготвянето на автоложни плазмени продукти в хуманната медицина е добре изучена практика, но прилагането им във ветеринарната медицина е по-деликатно поради по-малкия обем на кръв и затова методите на получаване и приготвяне на PRP са с широк научен интерес във ветеринарната медицина.

Зайците са били широко използвани като експериментален модел в офталмологичните изследвания поради приликите в очната анатомия и физиология с хората. Освен това техните роговици имат забележителна способност за регенерация, което ги прави идеален модел за изучаване на зарастването на рани на роговицата. Чрез оценка на регенеративния потенциал на богатата на тромбоцити плазма и комбинацията на хиалуроновата киселина с декспантенол при язви на роговицата при зайци, това научно проучване има за цел да допринесе за разбирането на механизма на роговичното зарастване и за тяхната ефективност при насърчаване на роговичната регенерация.

Стандартизирането на техниките за приготвяне на PRP и оценката на неговата безопасност и ефикасност в по-големи клинични изпитвания са текущи области на проучване. Съвременните изследвания са насочени не толкова към доказване на положителния резултат на терапията с богата на тромбоцити плазма, колкото към проучване на най-ефикасната ѝ форма на приложение при очните заболявания – активирана гел-форма, неактивираната течна форма във вид на очни колири или инжективно въвеждане в различни сегменти на окото при различни патологии във ветеринарната офталмология.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Основната цел на изследването е да се направи сравнителна оценка на скоростта и степента на зарастване на експериментално предизвикани корнеални язви след прилагане на автоложна богата на тромбоцити плазма, натриев хиалуронат с декспантенол и хирургически метод на временното фиксиране на третия клепач при зайци.

За изпълнението на тази цел си поставихме следните основни задачи:

1. възпроизвеждане на язви на роговицата чрез химични и оперативни методи при експериментален животински модел – зайци;
2. проследяване на ефекта от хирургическо лекуване при експериментално предизвикани химични и травматични язви на роговицата чрез клинични, спе-

цифични офталмологични и образно-диагностични методи;

3. проследяване на ефекта от приложението на натриев хиалуронат в комбинация с декспантенол при експериментално предизвикани химични и травматични язви на роговицата чрез клинични, специфични офталмологични и образно-диагностични методи;

4. проследяване на ефекта от приложението на:

а) богата на тромбоцити плазма под формата на очни капки

б) богата на тромбоцити плазма под формата на субконюнктивална инжекция

при експериментално предизвикани химични и травматични язви на роговицата чрез клинични, специфични офталмологични и образно-диагностични методи;

5. хистологична оценка на ефекта от приложените терапии при зарастването на експериментално предизвикани химични и травматични язви на роговицата.

3. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Експерименталните проучвания, свързани с дисертационния труд, бяха проведени през 2022 – 2023 г. в Университетска клиника за дребни животни „Академика“ към ФВМ – ЛТУ; ветеринарни клиники „Св. Георги“ и „Ами Вет“ – София; Очна клиника „Ресбиомед“ – София; Микробиологична лаборатория към ФВМ – ЛТУ; Патохистологична лаборатория към ФВМ – ЛТУ.

3.1. Експериментални животни

В проучването бяха включени 28 броя експериментална линия зайци от породата „Бял новозеландски заек“ (*Oryctolagus cuniculus*), на възраст между 12 и 18 месеца, разпределени поравно от двата пола, със средно тегло $3,1 \pm 0,4$ kg. Храненето на експерименталните животни включваше концентриран фураж за зайци и сено. Достъпът до вода и сено беше без ограничение, а концентрираният фураж беше даван в дажба, препоръчана от производителя. Експериментите бяха проведени в съответствие с Разрешително за използване на опитни животни №337/2022, на Комисията по етика към животните от Българската агенция по безопасност на храните, и съобразно с Европейската конвенция за протекция на гръбначните животни, използвани за експериментални и други научни цели (ETS 123, Consil of Europe, 2007).

След първоначалния период на адаптация и изследвания, клинично здравите животни бяха разпределени в групи, като сформирахме една положителна контрола (служеща като референция) и група за сравнение с известни ефекти) и три експериментални групи ($n=7$). Групите бяха сформирани според тера-

пията, която беше планирана за приложение. По етични съображения експерименталните постановки бяха проведени на два етапа. В първия етап язва на роговицата беше индуцирана чрез химическо изгаряне с алкално вещество на едното око, а 6 месеца по-късно на другото око беше индуцирана травматична язва чрез повърхностна кератектомия.

I етап – предизвикване на язва на роговицата с химично изгаряне чрез натриева основа (-Ch групи):

- Група MNF-Ch – контролна група, при която приложихме оперативна техника на временно фиксиране на третия клепач.
- Група HADP-Ch – експериментална група, при която приложихме натриев хиалуронат и декспантенол чрез накапване.
- Група PRPD-Ch – експериментална група, при която приложихме автоложна богата на тромбоцити плазма чрез накапване.
- Група PRPS-Ch – експериментална група, при която приложихме автоложна богата на тромбоцити плазма чрез еднократна субконюнктивална инжекция.

II етап – предизвикване на язва на роговицата с механична травма (-Tr групи):

- Група MNF-Tr – контролна група, при която приложихме оперативна техника на временно фиксиране на третия клепач.
- Група HADP-Tr – експериментална група, при която приложихме натриев хиалуронат и декспантенол чрез накапване.
- Група PRPD-Tr – експериментална група, при която приложихме автоложна богата на тромбоцити плазма чрез накапване.
- Група PRPS-Tr – експериментална група, при която приложихме автоложна богата на тромбоцити плазма чрез еднократна субконюнктивална инжекция.

3.2. Получаване и съхранение на богата на тромбоцити плазма (PRP)

Кръвните проби, от които беше сепарирана богата на тромбоцити плазма (PRP) на автоложен принцип, бяха получени един ден преди експерименталното предизвикване на корнеалните язви чрез венепункция на *v. cephalica* с игла 20G. От всяко животно получавахме по 8 ml кръв в стерилни епруветки,

съдържащи 3% *антикоагулант цитрат декстроза* – ACD-A (Fresenius Kabi®, Germany). Сепарирането и екстракцията на PRP беше извършено в същия ден по метод, базиран на Okuda et al. (2003) след прехвърляне на венозната кръв в специални епруветки YCELL-BioPRPKit (YCELLBioMedical®, China) за получаване на PRP, посредством двукратно центрофугиране в градиентна центрофуга PRP500 Tabletop Low Speed Centrifuge (Cence®, Xiangyi, China). Първото центрофугиране направихме със скорост 2400 rpm за 10 min, при което основната клетъчна маса се сепарираше от плазмата. Второто центрофугиране беше направено със скорост от 3600 rpm за 7 min за разделяне на богатата на тромбоцити плазма (PRP) от бедната на тромбоцити плазма (PPP). От шийката на епруветката беше аспирирано посредством дълга игла (21G, 0,8 x 50 mm, KDM®) между 0,5 и 0,7 ml неактивирано PRP за накапване в групите PRPD-Ch и PRPD-Tr и за инжектиране в групите PRPS-Ch и PRPS-Tr.

Богатата на тромбоцити плазма от всеки заек беше маркирана и съхранявана при хладилни условия +4°C (Boehlen and Clementson 2001), в точно неактивирано състояние, за период от 24 h за групите PRPS-Ch и PRPS-Tr. За групите PRPD-Ch и PRPD-Tr, PRP беше прехвърлено в стерилен контейнер с капков апликатор, съхранявано при хладилни условия +4°C за период от 5 дни. След този период беше приготвяно ново PRP за капково аплициране по същия метод, като винаги беше спазван автоложният принцип за получаване на хемопродуктите. Към полученото и съхранявано в хладилни условия +4°C PRP не бяха добавяни антимикуробни средства или консерванти, а стерилността им беше проследена чрез микробиологични културални изследвания.

Общият брой на тромбоцитите (PLT), еритроцитите (RBC) и левкоцитите (WBC) в цяла кръв и в полученото PRP бяха измерени чрез автоматичен хематологичен анализатор BC-5000 Vet (Mindray®, China), за да се определи обогатяването на богатата на тромбоцити плазма (концентрационен индекс, CI).

3.3. Анестезиологичен протокол

За извършване на хирургическите процедури използвахме съчетана анестезия – комбинация между обща анестезия и локално обезболяване на роговицата.

Премедикация и индукция: *кетамин*ов хидрохлорид (Anaket 10%, Ruchterpharma®) в доза 35 mg/kg и *ксилазин*ов хидрохлорид (Xylazine 2%, Bioveta®) в доза 5 mg/kg, въведени интрамускулно (Lipman et al., 1990).

Локално обезболяване: *проксиметакаин*ов хидрохлорид (Alcaine 0,5%, Alcon®) чрез накапване.

3.4. Експериментален дизайн за индуциране на язва в роговицата

А) Предиизвикване на химична язва чрез алкално изгаряне: Филтърната хартия напоена с 1M NaOH беше поставена върху централната зона на

роговицата за 60 s (Khaksar et al. 2013). След премахване на филтърния диск, останките от епитела на роговицата бяха отстранени със стерилен тампон и очната повърхност беше промита с физиологичен разтвор в продължение на 2 min. По използваната методика беше предизвикана язва с дълбочина до антериорната зона на роговичната строма, което беше потвърдено 24 часа по-късно при офталмологичните прегледи.

Б) Предизвикване на травматична язва чрез повърхностна кератектомия. Беше извършено стандартизирано повърхностно абразиво на централната зона на роговицата, достигащо до стромалния слой, което беше потвърдено 24 часа по-късно при офталмологичните прегледи. За целта беше използван биопсичен пънч (Kruuse®) с диаметър 6 mm, а остатъците от роговичния епител бяха премахнати с корнеален нож на Gill (Zhang et al. 2018).

3.5. Методика на проведените терапии при положителната контрола и експерименталните групи

3.5.1. Терапия чрез пришиване на третия клепач

Оперативното пришиване на третия клепач при положителните контроли MNF-Ch и MNF-Tr беше извършено на следващия ден след предизвикване на роговичната язва и в двата етапа на провеждане на експериментите. Животните бяха анестезирани и фиксирани в странично лежащо положение, като засегнатото око оставаше отгоре. Третият клепач беше издърпан над очната повърхност, към латералния кантус на очната цепка (Kuhns 1981) и беше фиксиран чрез хоризонтален U-образен шев с полидиоксанонов шевен материал в размер 4/0 (PDO, R1 Suture®). Шевът беше задържан за период от 10 дни.

3.5.2. Приложение на натриев хиалуронат в комбинация с декспантенол

Един ден след предизвикване на язвата, и в двата етапа на провеждане на експериментите, при животните от експериментални групи HADP-Ch и HADP-Tr беше приложен натриев хиалуронат и декспантенол (Rogodex®, Bioshield Ltd, Sofia) под формата на готови очни капки три пъти дневно, в продължение на 10 дни. Препаратът съдържа 0,15% натриев хиалуронат с 2% декспантенол (провитамин B5), като не съдържа фосфати и консервиращи средства.

3.5.3. Приложение на богата на тромбоцити плазма (PRP)

А) Приложение на PRP в PRPD групите: Предварително подготвените автоложни капки PRP бяха прилагани 3 пъти дневно по една капка за период от 10 дни при всички животни в групите PRPD-Ch и PRPD-Tr и в двата етапа на провеждане на експериментите. Накапването започваше един ден след предизвикване на язвата.

Б) Приложение на PRP в PRPS групите: Един ден след предизвикване на роговичната язва при групи PRPS-Ch и PRPS-Tr предварително подготвеното PRP в обем от 0,7 ml беше инжектирано еднократно на всяко животно, от което беше получено и в двата етапа на провеждане на експеримента.

3.6. Методи за проследяване на скоростта и характера на зарастване на язвите при положителната контрола и експерименталните групи чрез клинични, параклинични и специфични офталмологични изследвания

При провеждането на ежедневните прегледи (термометриране, инспекция на роговицата с дифузно и фокално осветление, измерване на слъзната продукция и флуоресцеинова проба) беше използван един и същ модел на обозначаване на дните, като за 0-ев ден беше приет денят на предизвикване на язва в роговицата и съответно за 1-ви ден – 24 часа след предизвикването ѝ и т.н. Етапите на развитието и на зарастването на корнеалните язви във всички групи бяха проследени за 10-дневен период.

3.6.1. Измерване на вътрешна телесна температура (ВТТ)

Общото състояние на животните беше проследявано чрез измерване на вътрешната телесна температура (ВТТ) с дигитален термометър Microlife MT 1622 Gold (Microlife AG®, Switzerland) и се регистрираше на 0-вия, 1-вия, 3-тия, 5-ия, 7-ия и 10-ия ден.

3.6.2. Параклинични изследвания

Чрез параклинични изследвания беше извършен хематологичен и биохимичен анализ на кръвта. От всички експериментални животни беше получена венозна кръв в обем 1 ml посредством венепункция на ушна вена на 0-вия, на 1-вия, на 3-тия и на 10-ия ден. Кръвните проби бяха изследвани в деня на получаването им.

3.6.3. Специфични офталмологични изследвания

А) **Офталмоскопия със процепна лампа (slit-lamp):** Всяко разязвено око беше инспектирано с офталмоскоп K180 XHL (HEINE Optotechnik, Germany) с дифузно осветление и с директно фокално осветление със светлинен сноп 3 – 4 mm, както и със слит-лампа HSL 150 (HEINE Optotechnik, Germany) с тесен „кобалтово син“ сноп 1 mm. Засегнатите очи бяха фотографирани на 1-вия, 3-тия, 5-ия и 10-ия ден от терапията, преди използването на багрилни тестове и бяха отчитани данните от инспекцията на роговичната повърхност, склерата и конюнктивата.

Б) **Оценяване на състоянието на роговицата:** Проследяване на 1-вия,

3-тия, 5-тия и 10-тия ден чрез визуална скала за оценка на прозрачност, неоваскуларизация и гладкост на роговицата, фотофобия и изтечения от очната цепка чрез използване на модифицирана точкова скала по Kozák et al.(2002).

Таблица 1. Скала за клинично офталмологично оценяване на окото

Точки	0	1	2	3
Прозрачност на роговицата	Напълно прозрачна роговица	Слабо помътняване на роговица	Помътняване, ириса не се вижда	Помътняване, зеницата не се вижда
Неоваскуларизация на роговицата	Не се установява неоваскуларизация	Повърхностна огнищна неоваскуларизация	Повърхностна дифузна неоваскуларизация	Дълбока неоваскуларизация
Гладкост на роговицата	Не се установява загуба на гладкостта	Загуба на гладкост под 25% от площта	Загуба на гладкост между 25 и 50% от площта	Загуба на гладкост над 50% от площта
Фотофобия и изтечения от окото	Не се установява фотофобия или изтечения от окото	Установява се фотофобия, без изтечения от окото	Установяват се изтечения от окото, без фотофобия	Установяват се фотофобия и изтечения от окото

В) Измерване на слъзната продукция: Измерването на слъзната продукция беше извършвано с Ширмер тест, тип I (Schirmer Tear Test – type I, STT-I) преди накапването на лекарствените средства и багрилата..

Г) Изследване на язвените дефекти с флуоресцеинова проба: На всяко засегнато око се извършваше флуоресцеинова проба чрез флуоресцеинова хартиена лента (I-Glo Fluorescein Dye Strips, JorVet®), навлажнена с няколко капки физиологичен разтвор, поставена в медиалния край на долния клепач. След това окото беше инспектирано с ултравиолетова синя светлина и язвеният дефект беше оценяван според задържането на багрилното вещество. На 1-вия, 3-тия, 5-ия и 10-ия ден флуоресцеиновите проби на роговиците бяха фотодокументирани. Материалите в JPG-формат бяха анализирани чрез софтуерна програма NIH ImageJ version 1.54d (National Institutes of Health, USA).

3.7. Методи за проследяване на зарастването на язвите при положителната контрола и експерименталните групи чрез образна диагностика

Извършени бяха биометрични измервания на предния очен сегмент чрез оптична кохерентна томография (Anterior Segment Optical Coherence Tomography, AS-OCT). Изследвания бяха направени с апарат CASIA2 (Tomey

Corporation, Japan). Специален софтуер (CASIA2 Ver.50.06, Tomey Corporation, Japan) генерира триизмерно 360-градусово реконструиране на предния сегмент на окото, с възможност за гониоскопски изглед от пространството на предната очна камера. Сканиранията бяха извършени на края на терапията, за да се оцени язвата и ефектът от приложеното лекуване.

3.8. Хистологични изследвания на роговиците при положителната контрола и експерименталните групи

Хистологичният анализ на роговиците беше извършен след евтаназия в края на експериментите (10-ия ден). Животните бяха анестезирани и беше въведен препаратът T-61® (MSD, Merck & Co, USA), съгласно Протокол за евтаназия на зайци и дребни гризачи (Underwood and Anthony 2020). След евтаназията беше направена транс-конюнктивална енуклеация по метода на Mitchell (2008). Получените материали бяха фиксирани в 10% буфериран неутрален разтвор на формалин.

3.8.1. Хистологичен анализ

Фиксираните материали бяха подложени на обработка по техника на Bancroft and Gamble (2008). Те бяха дехидратирани чрез преминаване през възходяща алкохолна редица. След обезводняването пробите бяха просветлени в ксилол и бяха включени в парафинови блокчета, които бяха нарязани с ротационен микротом, с дебелина на среза 5 μm . Така подготвените срезове бяха прикрепени към предметни стъкла чрез хистологично лепило и отново бяха обработени с ксилол. След това бяха оводнявани чрез преминаване през низходяща алкохолна редица. Пригответените проби бяха оцветени с хематоксилин-еозин (H&E), след което бяха подложени на микроскопско изследване. Фотографиите бяха направени със светлинен микроскоп Levenhuk D740T (Levenhuk Inc., USA) с интегрирана камера.

3.8.2. Статистически анализ

Получените резултати са представени като средностатистическа стойност \pm стандартно отклонение ($\text{mean} \pm \text{SD}$) и бяха обработени статистически чрез еднофакторен вариационен анализ ANOVA (Predictive Analytics Software PASW, SPSS, Version 19), като за разликите между отделните групи спрямо контролната се използва the least-significant difference (LSD) *post hoc test*. Бяха изчислени коефициент на Фишер и ниво на значимост, като за статистически достоверни бяха приети разликите с ниво на значимост $p < 0,05$. Допълнително непараметричните резултати бяха обработени чрез непараметричен тест на Friedman, като и при този тест за статистически достоверни бяха приети разликите с ниво на значимост $p < 0,05$.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Резултати от качествения анализ на богатата на тромбоцити плазма (PRP)

В полученото PRP, готово за апликация, количеството на левкоцити е минимално – WBC редуцията е 91,8% при PRP за накапване и 91,1% при PRP за инжектиране. Количеството на еритроцитите също е минимално – RBC редуцията е 99,5% при PRP за накапване и 99,4% при PRP за инжектиране. Концентрационният индекс, показващ колко пъти над базовото ниво от WB е набогатена плазмата с тромбоцити, е 4,75 пъти в PRP за накапване и 4,63 пъти в PRP за инжектиране. Тези стойности отговарят на изискванията за чисто PRP с терапевтичен ефект.

Резултатите от културалните изследвания показват, че пробите се запазват стерилни при съхранение в хладилни условия в продължение на 5 дни след получаването им. На 7-ия ден от тях се изолират бактерии, макар и само непатогенни микрококи и бацили. На 10-ия ден освен тях се установяват и Грам-отрицателни бактерии от род *Proteus*, които са условно патогенни.

4.2. Резултати от клинични, параклинични и специфични офталмологични изследвания на зайци с язви в роговицата

4.2.1. Резултати от измерване на вътрешна телесна температура (ВТТ)

Таблица 2. ВТТ (°C) на зайци с химична роговична язва, проследена в динамика

		<i>n</i> = 7	0 ден	1-ви ден	3-ти ден	5-и ден	7-и ден	10-и ден
MNF-Ch група	mean±SD		38,8±0,3	39,7±0,2	<u>39,5±0,2###</u>	<u>39,1±0,1#</u>	39,0±0,2	38,8±0,1
	min-max		38,4 – 39,4	39,5 – 40,1	39,3 – 39,8	39,0 – 39,3	38,7 – 39,4	38,7 – 39,0
HADP-Ch група	mean±SD		38,6±0,4	<u>39,3±0,4**</u>	<u>39,3±0,3###</u>	<u>38,8±0,1***</u>	39,1±0,2	38,9±0,2
	min-max		38,3 – 39,4	38,8 – 39,9	38,7 – 39,5	38,6 – 38,9	38,7 – 39,2	38,7 – 39,2
PRPD-Ch група	mean±SD		38,7±0,3	<u>39,3±0,3###</u>	<u>39,1±0,1####</u>	<u>38,9±0,1*</u>	38,9±0,1	38,5±0,4
	min-max		38,5 – 39,1	38,7 – 39,5	38,9 – 39,3	38,9 – 39,2	38,8 – 39,0	38,5 – 38,8
PRPS-Ch група	mean±SD		38,5±0,3	<u>39,4±0,3####</u>	<u>39,0±0,2####</u>	<u>39,0±0,4#</u>	<u>38,9±0,1#</u>	<u>38,5±0,1**</u>
	min-max		38,3 – 39,1	38,7 – 39,6	38,7 – 39,3	38,7 – 39,2	38,7 – 38,9	38,4 – 38,8

$p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; статистическа достоверност на разликите в групата в различните периоди; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; статистическа достоверност на разликите между контролната и опитните групи в различните периоди.

Статистически достоверни разлики във всички проследени дни се установяват в група PRPS-Ch, като такива се установяват и в група PRPD-Ch, но на 1-вия и на 3-тия ден ($p < 0,01$). Същата тенденция се наблюдава и в група

HADP-Ch ($p<0,01$). В група MNF-Ch е измерена и най-високата ВТТ в първия етап на изследванията – 40,1°C на 1-вия ден, но средната стойност за деня няма статистическа достоверност.

Таблица 3. ВТТ (°C) на зайци с травматична роговична язва, проследена в динамика

<i>n</i> = 7		0 ден	1-ви ден	3-ти ден	5-и ден	7-и ден	10-и ден
MNF-Tr група	mean±SD	38,8±0,2	<u>39,3</u> ±0,3 ^{##}	<u>39,1</u> ±0,1 ^{##}	39,0±0,2	38,9±0,1	39,0±0,4
	min-max	38,6 – 39,2	39,1 – 39,9	39,0 – 39,2	38,6 – 39,1	38,8 – 39,0	38,8 – 39,0
HADP-Tr група	mean±SD	38,9±0,4	<u>39,4</u> ±0,3 [#]	<u>39,2</u> ±0,2 [#]	<u>38,7</u> ±0,2 [*]	<u>38,2</u> ±0,1 ^{**}	<u>38,6</u> ±0,1 [*]
	min-max	38,4 – 39,4	39,1 – 39,6	39,1 – 39,6	38,6 – 39,0	38,6 – 38,9	38,4 – 38,8
PRPD-Tr група	mean±SD	38,6±0,2	39,3±0,2	<u>39,0</u> ±0,2 ^{###}	<u>38,9</u> ±0,2 ^{###}	<u>38,8</u> ±0,1 [#]	<u>38,7</u> ±0,1 ^{**}
	min-max	38,5 – 38,9	39,0 – 39,6	38,9 – 39,3	38,7 – 39,2	38,7 – 38,9	38,5 – 38,8
PRPS-Tr група	mean±SD	38,4±0,2	39,4±0,1	<u>39,0</u> ±0,2 ^{###}	<u>38,9</u> ±0,2 ^{###}	<u>38,8</u> ±0,1 ^{###}	<u>38,3</u> ±0,3 ^{**}
	min-max	38,3 – 38,8	39,3 – 39,5	38,7 – 39,3	38,7 – 39,2	38,7 – 38,9	38,4 – 38,6

$p<0,05$; ## $p<0,01$; ### $p<0,001$; статистическа достоверност на разликите в групата в различните периоди; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; статистическа достоверност на разликите между контролната и опитните групи в различните периоди.

Статистически достоверна разлика във всички групи се установява на 3-тия ден, като за група MNF-Tr тя е $p<0,01$, за група HADP-Tr тя е $p<0,05$, а за групите PRPD-Tr и PRPS-Tr тя е $p<0,001$. Отново в група MNF-Tr на 1-вия ден е регистрирана най-високата ВТТ – 39,9°C, със средна стойност за деня 39,3±0,3°C ($p<0,01$).

Резултати от параклинични изследвания

А) Резултати от хематологичния анализ на кръвта

Данните, получени за промените в общия брой на левкоцитите (WBC) при зайците с алкална роговична язва показват достоверни промени във всички групи. Наблюдава се плавно повишаване на показателя в изследвания период, но стойностите остават в референтните граници. В група MNF-Ch общият брой на левкоцитите (WBC) е най-висок на 3-тия – 11,3±1,2 ($p<0,01$) и на 5-ия ден – 12,1±1,2 ($p<0,001$).

Общият брой на еритроцитите (RBC) се понижава на 1-вия ден в групите с получено PRP, съответно в PRPD-Ch – 5,3±0,6 ($p<0,01$) и в PRPS-Ch – 5,4±0,3 ($p<0,01$), като на 10-ия ден стойностите са близки до изходните при всички животни.

Хемоглобинът (HGB) в тези две групи също се понижава на 1-вия ден, с достоверна разлика в PRPS-Ch – 122,5±5,3 ($p<0,001$), като в края на изследвания период не възстановява изходните стойности. Същата тенденция се на-

блюдава и в хематокрита (HCT), но с достоверно понижаване на 3-тия ден при PRPD-Ch – 38,8±2,1 ($p<0,001$). Достоверно повишаване до изходните стойности на HCT се установява при PRPS-Ch на 10-ия ден – 42,0±0,9 ($p<0,05$).

Таблица 4. Динамика на хематологичните показатели на кръвта при зайци с химична роговична язва

Показател	Група (n=7)	0-ев ден	1-ви ден	3-ти ден	10-и ден
WBC, x 10 ⁹ /L (3,0 – 13,5)	MNF-Ch	7,1±1,8	<u>11,3</u> ±1,2 ^{##}	<u>12,1</u> ±1,2 ^{###}	9,3±1,3
	HADP-Ch	6,9±0,7	<u>9,2</u> ±1,3 ^{###}	<u>8,4</u> ±0,6 ^{#####}	9,7±0,6
	PRPD-Ch	7,9±1,4	<u>9,6</u> ±0,9 ^{**}	<u>9,4</u> ±1,1 ^{***}	<u>9,8</u> ±0,7 [#]
	PRPS-Ch	<u>9,0</u> ±0,7 [*]	<u>9,6</u> ±0,8 [*]	<u>9,4</u> ±1,1 ^{**}	9,8±0,7
RBC, x 10 ¹² /L (4,3 – 7,4)	MNF-Ch	6,5±0,4	6,3±0,5	6,1±0,3	6,4±0,6
	HADP-Ch	6,3±0,5	6,6±0,7	6,2±0,6	6,9±1,0
	PRPD-Ch	5,8±0,6	<u>5,3</u> ±0,6 ^{**}	<u>5,4</u> ±0,5 [*]	6,0±0,6
	PRPS-Ch	6,0±0,2	<u>5,4</u> ±0,3 ^{###}	5,7±0,4	6,1±0,3
HGB, g/L (90 – 155)	MNF-Ch	144,7±4,2	150,0±7,5	145,7±8,4	146,7±4,3
	HADP-Ch	144,7±5,7	147,8±8,9	147,5±7,3	147,2±4,9
	PRPD-Ch	150,0±7,9	121,4±5,5	122,3±7,5	128,0±6,0
	PRPS-Ch	143,7±6,9	<u>122,5</u> ±5,3 ^{###}	124,7±4,6	126,2±7,7
HCT, % (28 – 48)	MNF-Ch	43,5±0,6	<u>41,7</u> ±0,5 ^{##}	42,7±0,6	43,0±0,7
	HADP-Ch	43,6±0,7	<u>41,9</u> ±1,0 [#]	<u>42,6</u> ±0,6 [#]	42,7±0,8
	PRPD-Ch	44,0±0,8	32,8±1,5	<u>38,8</u> ±2,1 ^{#####}	38,9±0,4
	PRPS-Ch	43,4±0,7	32,8±1,5	38,2±1,3	<u>42,0</u> ±0,9 [#]
PLT, x 10 ⁹ /L (225 – 905)	MNF-Ch	548±25	<u>473</u> ±71 [#]	537±26	554±33
	HADP-Ch	530±173	<u>569</u> ±32 [*]	557±151	551±91
	PRPD-Ch	519±106	534±49	586±99	523±57
	PRPS-Ch	457±102	544±79	538±57	543±88

$p<0,05$; ## $p<0,01$; ### $p<0,001$; статистическа достоверност на разликите в групата в различните периоди; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; статистическа достоверност на разликите между контролната и опитните групи в различните периоди.

Данните, получени за промените в общия брой на левкоцитите (WBC) при зайците с травматична роговична язва показват достоверни промени във всички групи, освен PRPD-Tr. Наблюдава се плавно повишаване на показателя в изследвания период, но стойностите остават в референтните граници. В група MNF-Ch общият брой на левкоцитите (WBC) е най-висок на 1-вия – 10,7±0,4 ($p<0,001$) и на 3-тия ден – 10,7±1,5 ($p<0,01$). На 10-ия ден най-висок е общият брой на левкоцитите (WBC) в HADR-Tr – 10,0±0,6 ($p<0,01$).

Тенденцията при общия брой на еритроцитите (RBC) е идентична с тази при зайците с алкална язва – наблюдава се понижаване на 1-вия ден в групите с получено PRP, съответно в PRPD-Tr – 5,3±0,3 ($p<0,05$) и в PRPS-Tr – 5,4±0,2

($p < 0,001$), като достоверно понижаване се задържа и на 3-тия ден в същите групи, съответно в PRPD-Tr – $5,5 \pm 0,3$ ($p < 0,05$) и в PRPS-Tr – $5,5 \pm 0,3$ ($p < 0,01$).

Таблица 5. Динамика на хематологичните показатели на кръвта при зайци с травматична роговична язва

Показател	Група (n=7)	0-ев ден	1-ви ден	3-ти ден	10-и ден
WBC, x 10⁹/L (3,0 – 13,5)	MNF-Tr	7,2±1,3	10,7±0,4^{###}	10,7±1,5^{##}	9,0±0,7[#]
	HADP-Tr	7,9±1,0	9,3±0,6^{***}	8,4±0,6[*]	10,0±0,6^{##}
	PRPD-Tr	8,4±0,8	9,7±1,4	9,5±0,9	9,4±1,6
	PRPS-Tr	8,9±0,5[*]	9,7±1,4^{**}	9,4±0,6	9,0±1,3
RBC, x 10¹²/L (4,3 – 7,4)	MNF-Tr	6,4±0,5	6,4±0,5	6,2±0,4	6,4±0,4
	HADP-Tr	6,5±0,6	6,5±0,3	6,0±0,4	6,7±0,7
	PRPD-Tr	6,0±0,4	5,3±0,3^{****}	5,5±0,3^{***}	6,2±0,3
	PRPS-Tr	6,0±0,2	5,4±0,2^{#####}	5,5±0,3^{##}	6,1±0,3
HGB, g/L (90 – 155)	MNF-Tr	141,3±7,9	144,5±8,5	141,6±6,3	146,9±10,2
	HADP-Tr	142,9±6,0	146,0±8,0	146,3±8,2	150,0±8,3
	PRPD-Tr	144,9±5,2	120,5±8,7^{***}	122,5±6,8	126,6±6,3
	PRPS-Tr	144,8±5,6	124,5±2,3^{****}	124,5±7,7	124,7±5,7
HCT, % (28 – 48)	MNF-Tr	43,2±1,1	41,6±1,1[#]	42,3±0,4	42,5±0,7
	HADP-Tr	42,9±1,2	42,0±0,5	42,3±0,5	42,5±0,4
	PRPD-Tr	43,6±0,8	31,8±1,7	37,8±1,1	38,9±0,3
	PRPS-Tr	42,7±0,8	32,2±1,7	39,4±0,9^{#####}	41,5±0,9[#]
PLT x 10⁹/L (225 – 905)	MNF-Tr	540±79	537±49	556±35	525±49
	HADP-Tr	559±54	572±79	495±73	559±45
	PRPD-Tr	498±56	518±63	531±49	516±66
	PRPS-Tr	491±51	499±29	503±50	540±55

$p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; статистическа достоверност на разликите в групата в различните периоди; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; статистическа достоверност на разликите между контролната и опитните групи в различните периоди.

Хемоглобинът (HGB) също следва тенденцията, наблюдавана при алкални-те язви – понижаване на 1-вия ден, с достоверна разлика в PRPD-Tr – $120,5 \pm 8,7$ ($p < 0,05$) и в PRPS-Tr – $124,5 \pm 2,3$ ($p < 0,001$), като в края на изследвания период не възстановява изходните стойности. Хематокритът (HCT) в тези две групи също се понижаване недостоверно на 1-вия ден и плавно се показва в следващите периоди, като в PRPS-Tr за 3-тия ден е $39,4 \pm 0,9$ ($p < 0,001$) и за 10-ия ден е почти до изходната базисна стойност – $41,5 \pm 0,9$ ($p < 0,05$).

Б) Резултати от биохимичния анализ на кръвта

Ензимната активност на чернодробните ензими се променя и при четирите групи на 1-вия ден (24 часа след причиняване на язвите), но със статистическа достоверност това се установява само при аспартат аминотрансферазата

(ASAT) на HADP-Ch – 41,1±5,0 ($p<0,001$). В края на изследвания период всички групи задържат ниски нива на ASAT: MNF-Ch – 12,4±1,2 ($p<0,001$), HADP-Ch – 12,8±1,6 ($p<0,01$), PRPD-Ch – 13,2±2,3 ($p<0,01$) и PRPS-Ch – 16,6±1,7 ($p<0,001$), докато ALAT е около близките изходни стойности, но без статистически достоверни стойности.

Таблица 6. Динамика на биохимичните показатели на кръвта при зайци с химична роговична язва

Показател	Група (n=7)	0-ев ден	1-ви ден	3-ти ден	10-и ден
ALAT, U/L (48 – 80)	MNF-Ch	67,8±12,2	131,0±18,3	71,5±10,0	66,9±10,9
	HADP-Ch	64,0±5,0	129,1±17,4	62,8±15,8	66,3±9,3
	PRPD-Ch	60,6±8,7	127,2±16,8	63,0±8,9	62,5±6,9
	PRPS-Ch	67,2±4,7	118,0±14,9	61,9±12,5	72,7±10,2
ASAT, U/L (14 – 113)	MNF-Ch	20,5±2,8	38,0±4,9	22,5±3,4	12,4±1,2^{###}
	HADP-Ch	21,9±6,0	41,1±5,0^{###}	25,1±5,4	12,8±1,6^{###}
	PRPD-Ch	21,2±3,8	37,9±3,3	22,9±5,7	13,2±2,3^{###}
	PRPS-Ch	23,2±2,7	34,3±2,3	20,3±4,2	16,6±1,7^{#####}
ALP, U/L (4 – 70)	MNF-Ch	53,5±17,9	148,5±14,9	155,9±13,9	163,2±19,1
	HADP-Ch	61,6±15,0	158,2±18,1	157,2±15,3	161,7±20,6
	PRPD-Ch	49,0±21,1	154,9±12,2	155,7±12,7	154,0±8,8
	PRPS-Ch	64,4±19,7	147,7±18,6	165,7±13,2	154,9±13,9
TP, g/L (45 – 79)	MNF-Ch	54,8±0,8	53,5±3,0	53,5±1,8	53,2±2,7
	HADP-Ch	52,9±3,0	51,6±2,5	53,5±1,8	51,4±2,0
	PRPD-Ch	53,7±3,2	52,3±2,3	51,3±2,8	53,0±2,6
	PRPS-Ch	51,6±2,3*	52,4±3,0	51,3±2,0	51,6±2,0
GLU, mmol/L (3,3 – 10,7)	MNF-Ch	7,4±0,4	7,0±0,4	6,9±0,3[#]	7,0±0,2
	HADP-Ch	7,4±0,7	7,0±0,5	6,9±0,3	7,4±0,5
	PRPD-Ch	7,4±0,5	7,2±0,7	7,2±0,5	7,0±0,7
	PRPS-Ch	7,4±0,4	7,0±0,5	7,2±0,4	6,9±0,6
BUN _s mmol/L (2,7 – 10,5)	MNF-Ch	5,3±0,5	19,6±0,4	5,2±0,4	5,3±0,8
	HADP-Ch	5,6±0,6	19,8±0,7	5,6±0,5	5,7±0,4
	PRPD-Ch	6,0±0,6	19,7±0,6	5,4±0,5	5,7±0,5
	PRPS-Ch	5,8±0,5	20,2±1,0	5,6±0,5	5,7±0,7
CRE _s μmol/L (34 – 166)	MNF-Ch	81,3±5,9	110,7±6,1	81,3±2,9	77,9±5,7
	HADP-Ch	81,1±4,0	108,9±4,8	81,0±4,0	77,7±4,6
	PRPD-Ch	78,7±4,0	110,2±6,2	79,0±3,0	78,4±3,5
	PRPS-Ch	82,4±3,9	113,9±5,1	80,7±4,8	80,9±8,5

$p<0,05$; ## $p<0,01$; ### $p<0,001$; статистическа достоверност на разликите в групата в различните периоди; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; статистическа достоверност на разликите между контролната и опитните групи в различните периоди.

Активността на ALP се повишава при всички групи на 1-вия ден и остава с

високи стойности до края на изследвания период. В серумните нива на общия белтък (TP) не се установяват значителни промени за изследвания период в нито една група. Същото се наблюдава и в серумните нива на кръвната захар (GLU). Уреята (BUN) и креатининът (CRE) се повишават на 24-тия час, но без статистическа достоверност, в следващите дни се възвръщат до изходните стойности.

Таблица 7. Динамика на биохимичните показатели на кръвта при зайци с травматична роговична язва

Показател	Група (n=7)	0-ев ден	1-ви ден	3-ти ден	10-и ден
ALAT, U/L (48 – 80)	MNF-Tr	68,3±8,3	129,8±16,8	67,5±9,5	72,0±5,0
	HADP-Tr	66,2±11,0	126,2±11,3	61,5±6,0	67,2±9,3
	PRPD-Tr	61,9±6,9	132,7±5,7	64,8±8,5	66,6±9,8
	PRPS-Tr	69,0±8,4	132,9±16,2	63,2±11,0	68,5±8,6
ASAT, U/L (14 – 113)	MNF-Tr	20,6±2,0	38,8±2,1	21,4±3,0	12,4±1,1
	HADP-Tr	22,1±4,8	40,2±3,6	24,6±4,2	12,3±1,3^{###}
	PRPD-Tr	21,0±2,6	38,7±2,8	22,8±4,5	13,8±2,2^{###}
	PRPS-Tr	22,0±3,2	34,3±1,9	19,8±3,4	17,1±1,7[#]
ALP, U/L (4 – 70)	MNF-Tr	54,5±16,0	153,0±23,8	157,5±19,5	149,8±9,3
	HADP-Tr	62,8±14,4	150,5±12,7	152,5±24,3	159,3±16,2
	PRPD-Tr	52,0±11,3	141,7±21,6	157,3±15,8	160,0±21,6
	PRPS-Tr	63,2±13,2	155,0±36,8^{###}	175,3±29,8	178,3±34,6
TP, g/L (45 – 79)	MNF-Tr	55,1±2,9	51,5±2,5	52,6±1,2	52,9±3,2
	HADP-Tr	52,2±3,1	53,7±2,5	52,4±2,6	51,4±1,6
	PRPD-Tr	52,0±3,0	51,9±2,1	52,9±2,8	51,9±1,8
	PRPS-Tr	52,0±2,7	52,5±3,0	51,2±1,6	51,3±1,8
GLU, mmol/L (3,3 – 10,7)	MNF-Tr	7,0±0,4	7,0±0,3	6,9±0,2	7,1±0,2
	HADP-Tr	7,0±0,4	7,0±0,4	6,9±0,3	7,2±0,4
	PRPD-Tr	6,9±0,4	7,0±0,4	7,1±0,6	7,3±0,5
	PRPS-Tr	7,3±0,5	6,9±0,4	7,2±0,5	7,1±0,3
BUN₂, mmol/L (2,7 – 10,5)	MNF-Tr	5,7±0,5	19,9±0,6	5,9±0,6	5,8±0,2
	HADP-Tr	5,4±0,4	19,9±0,7	5,8±0,5	5,7±0,2
	PRPD-Tr	6,1±0,4	20,5±0,6	6,2±0,4	6,0±0,5
	PRPS-Tr	6,4±0,5	19,5±0,4	5,9±0,5	5,8±0,5
CRE, μmol/L (34 – 166)	MNF-Tr	78,5±5,4	109,0±4,8	77,4±4,5	78,9±5,1
	HADP-Tr	83,1±5,6	112,0±7,0	79,0±3,5	76,2±5,3
	PRPD-Tr	82,3±5,0	111,7±3,7	77,0±2,9	78,3±4,9
	PRPS-Tr	82,5±6,0	110,5±6,7	80,3±4,3	81,0±4,2

$p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; статистическа достоверност на разликите в групата в различните периоди; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; статистическа достоверност на разликите между контролната и опитните групи в различните периоди.

Ензимната активност на чернодробните ензими се променя и при четирите групи на 1-вия ден (24 часа след причиняване на язвите), но без статистическа достоверност. Ниски нива на ASAT остават в експерименталните групи на 10-ия ден: HADP-Tr – $12,3 \pm 1,3$ ($p < 0,01$), PRPD-Tr – $13,8 \pm 2,2$ ($p < 0,001$) и PRPS-Tr – $17,1 \pm 1,7$ ($p < 0,05$).

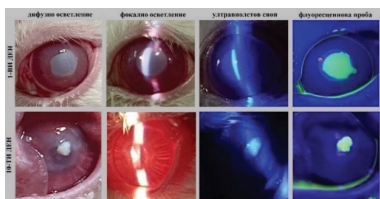
Активността на ALP се повишава при всички групи, но с достоверна разлика на 24-тия час в група PRPS-Tr – $155,0 \pm 36,8$ ($p < 0,001$). Уреята (BUN) и креатининът (CRE) се повишават на 24-тия час, но подобно на зайците с алкална язва – без статистическа достоверност, като в следващите дни се възвръщат до изходните стойности.

4.2.3. Резултати от специалните офталмологични изследвания

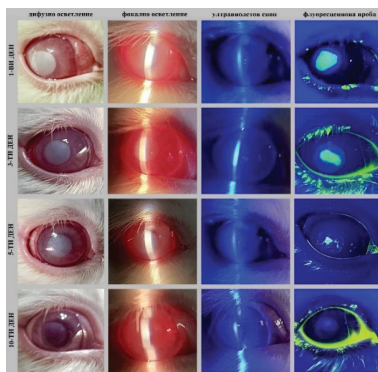
A) Офталмоскопия с процерна лампа (slit-lamp)

В група MNF-Ch на 1-вия ден (Фиг. 1) се установява помътняване на роговицата в централната зона, с пълна непрозрачност и при дифузно и при фокално осветление. На 10-ия ден, след освобождаване на третия клепач, се установява значителна непрозрачност, повлекла по роговичната повърхност и неравности по централната ѝ част. Флуоресцеиновата проба е положителна.

В група HADP-Ch на 5-ия ден (Фиг. 2) роговицата е все още непрозрачна, но се вижда зеничният отвор, установява се и дифузна неоваскуларизация. На 10-ия ден ирисът вече е видим под отока. Флуоресцеиновата проба на 10-ия ден е негативна.



Фиг. 1. Офталмологично изследване на група MNF-Ch

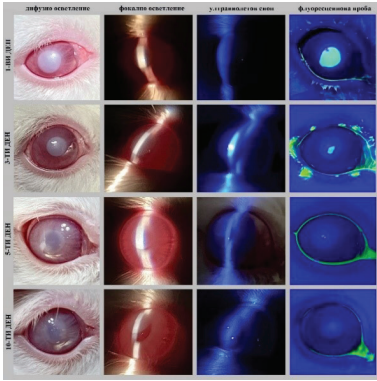


Фиг. 2. Офталмологично изследване на група HADP-Ch

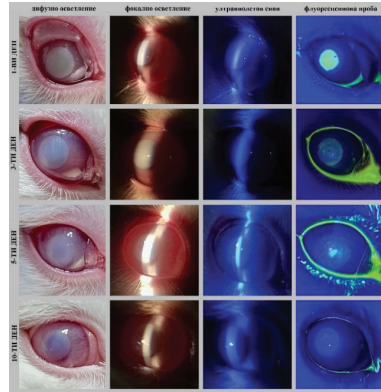
В група PRPD-Ch на 1-вия ден (Фиг. 3) роговицата е плътно непрозрачна, като на 5-ия ден се виждат зеничният отвор и дифузна неоваскуларизация, а язвата е точковидна. На 10-ия ден ирисът става видим. Флуоресцеиновата

проба е негативна. Отокът е запазен и на последния ден.

В група **PRPS-Ch** на 1-вия ден (Фиг. 4) роговицата е плътно непрозрачна, като на 5-ия ден се вижда зеничният отвор, а на 10-ия ден и ирисът става видим. Флуоресцеиновата проба не показва значителна редукция в размера на язвата на 3-тия ден, но показва значително по-малко абсорбирано количество багрило и интензитет на оцветяване. На 5-ия ден флуоресцеиновата проба показва редукция в размера на язвения дефект. Флуоресцеиновата проба е негативна на 10-ия ден.



Фиг. 3. Офталмологично изследване на група PRPD-Ch

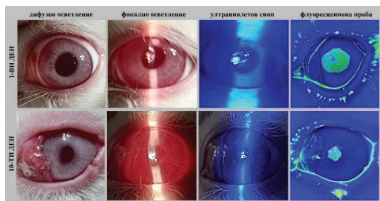


Фиг. 4. Офталмологично изследване на група PRPS-Ch

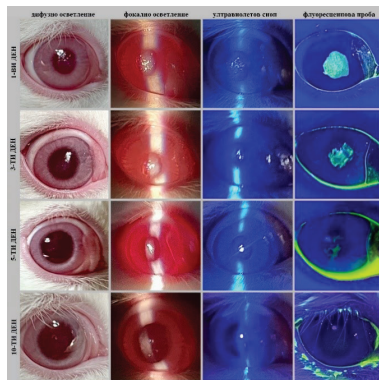
В група **MNF-Tr** роговицата остава прозрачна за целия изследван период, за разлика от алкалните язви от първия етап на експериментите. В 1-вия ден (Фиг. 5) се установява значителна загуба на гладкостта на роговицата, следствие от деепителизацията. Тя се установява при изследване и с дифузно, и с фокално осветление. Слит-ламбата не показва удебеляване на роговицата, а само потвърждава неравната ѝ anteriорна повърхност. Флуоресцеиновата проба е положителна, като язвеният дефект обхваща голяма централна зона от роговицата. На 10-ия ден клепачните ръбове са отекли. След освобождение на третия клепач се установява, че роговицата е запазила прозрачността си, но все още се установява и неравността на anteriорната ѝ повърхност. Слит-ламбата не показва удебеляване на слоевете, но потвърждава грапавата повърхност. Не се установява неоваскуларизация на роговицата. Макар и с редуцирани размери, флуоресцеиновата проба на 10-ия ден е положителна и задържа багрилото с висок интензитет.

В група **HADP-Tr** при изследването с дифузно и фокално осветление се установява нарушаване на гладката структура на роговицата до 5-ия ден

(Фиг. 6), като след това тя възвръща гладкостта си. Редукция на язвения дефект се установява от 3-тия ден при флуоресцеиновата проба, като на 5-ия ден тя е значителна, с нисък интензитет на багрилото, а на 10-ия ден е негативна.

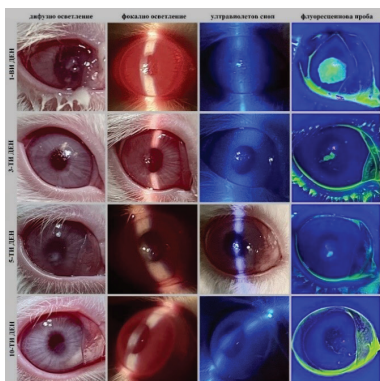


Фиг. 5. Офталмологично изследване на група MNF-Tr

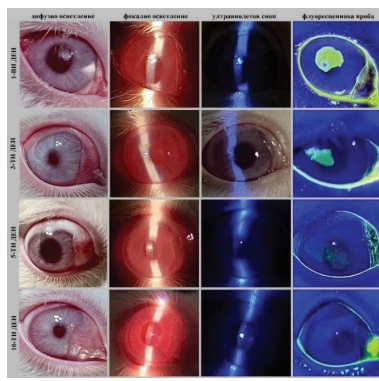


Фиг. 6. Офталмологично изследване на група HADP-Tr

В група PRPD-Tr още на 3-тия ден (Фиг. 7) се установява значителна редукция в размерите на язвите, още по-явна на 5-ия ден. Единични малки кръвоносни съдове се установяват на 3-тия ден, но след 5-ия ден те не са установими. На 10-ия ден не е наблюдавана неоваскуларизация при нито едно животно от групата.



Фиг. 7. Офталмологично изследване на група PRPD-Tr



Фиг. 8. Офталмологично изследване на група PRPS-Tr

В група PRPS-Tr на 3-тия ден (Фиг. 8) има редукция в размерите на язвите, но не толкова изразена като при PRPD-Tr. Гладкостта на роговицата е почти възстановена още на 5-ия ден, като флуоресцеиновата проба е положителна, но с много нисък интензитет на абсорбция на багрилото. На 10-ия ден пробата е негативна.

Б) Оценяване състоянието на роговицата по визуална скала по Kozák

В Таблица 8 са представени данните със средни стойности от визуалната оценка по точковата скала по Kozák et al. (2002), оценяваща прозрачност, неоваскуларизация и гладкост на роговицата, фотофобия и изтечения от очната цепка.

Таблица 8. Клинична офталмологична оценка в динамика при положителната контрола и експерименталните групи с химична роговична язва

Показател	Група (n=7)	1-ви ден	3-ти ден	5-и ден	10-и ден
Прозрачност на роговицата	MNF-Ch	3±0	--	--	2±0
	HADP-Ch	3±0	3±0	3±0	2±0
	PRPD-Ch	3±0	3±0	2±0	2±0
	PRPS-Ch	3±0	3±0	2,33±0,47	2±0
Неоваскуларизация на роговицата	MNF-Ch	0	--	--	1,83±0,37
	HADP-Ch	0	2±0	2±0	1,83±0,37
	PRPD-Ch	0	2±0	2±0	0,33±0,47**
	PRPS-Ch	0	2±0	1,83±0#	0,33±0,47**
Гладкост на роговицата	MNF-Ch	3±0	--	--	2 ± 0
	HADP-Ch	3±0	3±0	1,16±0,37##	0
	PRPD-Ch	3±0	3±0	0,66±0,47##	0
	PRPS-Ch	3±0	3±0	1,5±0,5##	0
Чувствителност на роговицата и изтечения от очното	MNF-Ch	3±0	--	--	2 ± 0
	HADP-Ch	3±0	1±0	0	0
	PRPD-Ch	3±0	1±0	0	0
	PRPS-Ch	3±0	1±0	0,33±0,47	0
ОБЩО (max 12)	MNF-Ch	9	--	--	7,83±0,37
	HADP-Ch	9	9	6,16±0,37	3,83±0,37
	PRPD-Ch	9	9	4,66±0,47	2,33±0,47
	PRPS-Ch	9	9	5,99±1,44	2,33±0,47

p<0,05; ## p<0,01; ### p<0,001; статистическа достоверност на разликите в групата в различните периоди; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; статистическа достоверност на разликите между контролната и опитните групи в различните периоди.

В Таблица 9 са представени данните със средни стойности от визуалната оценка по точковата скала по Kozák et al. (2002), оценяваща прозрачност, неоваскуларизация и гладкост на роговицата, фотофобия и изтечения от очната цепка.

Таблица 9. Клинична офталмологична оценка в динамика при положителната контрола и експерименталните групи с травматична роговична язва

Показател	Група (n=7)	1-ви ден	3-ти ден	5-и ден	10-и ден
Прозрачност на роговицата	MNF-Tr	0	--	--	0
	HADP-Tr	0	0	0	0
	PRPD-Tr	0	0	0	0
	PRPS-Tr	0	0	0	0
Неоваскуларизация на роговицата	MNF-Tr	0	--	--	0,5±0,5
	HADP-Tr	0	0,5±0,5	0,33±0,47[#]	0
	PRPD-Tr	0	0,33±0,47	0	0
	PRPS-Tr	0	0,66±0,47	0,33±0,47	0
Гладкост на роговицата	MNF-Tr	3±0	--	--	2±0
	HADP-Tr	3±0	3±0	0,66±0,47[#]	0
	PRPD-Tr	3±0	3±0	0,66±0,47[#]	0
	PRPS-Tr	3±0	3±0	0	0
Чувствителност на роговицата и изтечения от окоото	MNF-Tr	1±0	--	--	2±0
	HADP-Tr	1±0	1±0	0	0
	PRPD-Tr	1±0	1±0	0	0
	PRPS-Tr	1±0	1±0	0	0
ОБЩО (max 12)	MNF-Tr	4	--	--	4,5±0,5
	HADP-Tr	4	4,5±0,5	0,99±0,94	0
	PRPD-Tr	4	4,33±0,47	0,66±0,47	0
	PRPS-Tr	4	4,66±0,47	0,33±0,47	0

$p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; статистическа достоверност на разликите в групата в различните периоди; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; статистическа достоверност на разликите между контролната и опитните групи в различните периоди.

В) Измерване на слъзната продукция

Усреднените стойности за положителната контрола и за експерименталните групи са представени в Таблица 10 (за роговиците с химични язви в първия етап) и в Таблица 11 (за роговиците с травматични язви във втория етап) за всеки ден от провеждането на експеримента.

В 0-вия ден средната слъзна продукция отчетена за всички животни от първия етап на експеримента е $5,7 \pm 1,0$ mm/min.

Във всички групи се наблюдава значително увеличение на слъзната секреция до 3-тия ден (до $17,1$ mm/min), като най-слабо това се наблюдава в групата PRPD-Ch, с достоверна разлика на 2-рия ден – $11,1 \pm 1,1$ mm/min ($p < 0,001$). В същата група се наблюдава най-бързо и плавно понижаване на лакримацията,

със статистическа достоверност още от 3-тия ден ($p<0,01$).

Най-високо повишаване на лакримацията след причиняване на язвата се отчита в PRPS-Ch ($17,1\pm 0,8$ mm/min), но без статистическо значение. Постепенно понижаване на лакримацията с висока статистическа значимост в самата експериментална група се наблюдава в HADP-Ch между 6-ия и 8-ия ден ($p<0,001$). В третираните групи стойностите достигат нива, близки до изходните базисни, но с висока статистическа значимост в групите с PRP ($p<0,001$). PRPD-Ch групата е единствената, която достига изходните средни стойности от преди операцията, на 9-ия ден с висока статистическа значимост ($p<0,001$).

Таблица 10. Динамика на резултатите от STT-I на зайците с химична роговична язва, дадени в mm/min (mean \pm SD)

<i>n</i> =7	MNF-Ch	HADP-Ch	PRPD-Ch	PRPS-Ch	Средно
0-ев ден	5,6 \pm 1,3	5,6 \pm 1,0	5,8 \pm 0,7	5,8 \pm 1,1	5,7 \pm 1,0
1-ви ден	14,8 \pm 1,3	13,6 \pm 1,8	14,6 \pm 1,2	15,5 \pm 0,8	14,7 \pm 1,4
2-ри ден	16,3 \pm 1,5	15,3 \pm 1,3	11,1\pm1,1^{***}	17,1 \pm 0,8	15,0 \pm 2,6
3-ти ден	16,8 \pm 1,4	15,1 \pm 1,8	9,2\pm1,4^{##}	15,5 \pm 1,0	14,2 \pm 3,2
4-ти ден	15,6 \pm 1,3	13,5\pm0,8[*]	9,1 \pm 0,4	13,5\pm0,8[*]	12,9 \pm 2,5
5-и ден	15,3 \pm 0,8	11,8\pm2,0^{####}	6,8 \pm 0,4	11,3 \pm 0,8	11,3 \pm 3,2
6-и ден	14,5 \pm 0,8	9,6\pm1,0^{###}	6,1 \pm 1,1	9,3\pm0,5^{###}	9,9 \pm 3,1
7-и ден	13,6 \pm 0,8	8,8\pm0,7^{###}	5,8 \pm 0,7	8,8\pm0,7^{##}	9,3 \pm 3,1
8-и ден	11,6 \pm 0,8	8,1\pm1,4^{**}	5,8 \pm 1,4	6,8\pm1,7^{***}	8,1\pm2,6^{***}
9-и ден	10,6\pm0,8^{###}	6,8 \pm 0,4	5,6\pm1,5^{***}	6,3\pm1,5^{***}	7,4\pm2,2^{**}
10-и ден	10,3\pm0,5^{###}	5,8 \pm 0,7	5,6 \pm 1,0	6,0 \pm 0,9	6,9\pm2,1^{**}

$p<0,05$; ## $p<0,01$; ### $p<0,001$; статистическа достоверност на разликите в групата в различните периоди; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; статистическа достоверност на разликите между контролната и опитните групи в различните периоди.

В 0-вия ден средната слъзна продукция отчетена за всички животни от втория етап на експеримента е $5,5\pm 0,6$ mm/min.

Във всички групи се наблюдава значително увеличение на слъзната секреция до 2-рия ден (до $16,5$ mm/min), като най-слабо това се наблюдава в група PRPD-Tr ($p<0,05$) и HADP-Tr ($p<0,01$), където средната слъзна продукция е отчетена малко над 13 mm/min. Статистически достоверно най-бързо понижаване се отчита в PRPD-Tr от 2-рия ден ($p<0,05$), като тази тенденция е запазена с достоверност през следващите дни в групата.

Най-високо повишаване на лакримацията след причиняване на язвата се отчита в PRPS-Tr – $16,5\pm 1,2$ mm/min ($p<0,01$). Тенденцията се запазва и на следващия ден със стойност $15,6\pm 1,0$ mm/min ($p<0,01$). Постепенно понижаване на лакримацията с висока статистическа значимост в самата експеримен-

тална група се наблюдава в HADP-Tr между 4-тия и 6-ия ден ($p<0,001$). Стойностите в MNF-Tr група остават по-високи в края на изследването ($p<0,001$) между 8-ия и 10-ия ден. В третираните групи стойностите достигат изходните базисни нива на слъзна продукция още на 8-ия ден, но с висока статистическа значимост само в PRPD-Tr ($p<0,001$).

Таблица 11. Динамика на резултатите от STT-I на зайците с травматична роговична язва, дадени в mm/min (mean±SD)

	n=7	MNF-Tr	HADP-Tr	PRPD-Tr	PRPS-Tr	Средно
0-ев ден		5,5±0,8	5,5±0,8	5,6±0,5	5,5±0,5	5,5±0,6
1-ви ден		14,2±0,4	13,3±0,5**	13,2±0,7*	16,5±1,2**	14,3±1,5
2-ри ден		13,3±0,8	12,7±0,5	11,5±0,9*	15,6±1,0**	13,3±1,7
3-ти ден		13,0±0,6	11,9±1,1	9,0±0,9###	12,7±0,5	11,7±1,8
4-ти ден		12,3±0,8	9,2±0,7####	8,7±0,5	12,2±1,0	10,6±1,9
5-и ден		12,1±1,0	8,9±0,7####	7,3±0,5###	11,5±1,0	10,0±2,0
6-и ден		11,8±1,3	7,3±0,5####	6,3±1,0***	9,3±0,5**	8,7±2,3
7-и ден		10,5±1,0	5,9±0,7	5,7±0,5	8,5±0,5*	7,6±2,1
8-и ден		10,3±1,2###	5,9±0,4	5,5±1,0***	5,5±0,5	6,8±2,2*
9-и ден		9,8±0,4	5,3±0,5	5,3±1,0	5,2±0,4	6,4±2,0
10-и ден		9,3±0,8###	5,1±0,4	5,1±0,7	5,2±0,4	6,2±1,9

$p<0,05$; ## $p<0,01$; ### $p<0,001$; статистическа достоверност на разликите в групата в различните периоди; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; статистическа достоверност на разликите между контролната и опитните групи в различните периоди.

Г) Изследване на язвените дефекти с флуоресцеинова проба

След фотодокументиране на извършените флуоресцеинови проби, снимките бяха анализирани чрез софтуерна програма NIH ImageJ.

Таблица 12. Динамика в площта на язвения дефект в първия етап

Показател	Група (n=7)	1-ви ден	3-ти ден	5-и ден	10-и ден
Площ на язвения дефект, mm²	MNF-Ch	28,54±1,38	--	--	7,55±0,80
	HADP-Ch	29,20±1,12	15,27±1,18***	5,60±1,02	1,08±0,38
	PRPD-Ch	29,60±1,54	9,70±0,99	3,58±1,20	0,23±0,27
	PRPS-Ch	30,02±1,08	7,61±0,80	2,46±0,51	0,09±0,13

$p<0,05$; ## $p<0,01$; ### $p<0,001$; статистическа достоверност на разликите в групата в различните периоди; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; статистическа достоверност на разликите между контролната и опитните групи в различните периоди.

В 1-вия ден средната площ на язвените дефекти е около 29 mm². Статис-

тически достоверно понижаване на площта се установи само при HADP-Ch на 3-тия ден – $15,27 \pm 1,18 \text{ mm}^2$ ($p < 0,001$). В останалите групи се наблюдава статистически недостоверно значително понижаване на площта на язвените дефекти, като за групите, третирани с PRP тя е почти нулева на 10-ия ден. При група MNF-Ch тя остава най-голяма на 10-ия ден ($7,55 \pm 0,80 \text{ mm}^2$), като получените резултати са статистически недостоверни.

Таблица 13. Динамика в площта на язвения дефект във втория етап

Показател	Група (n=7)	1-ви ден	3-ти ден	5-и ден	10-и ден
Площ на язвения дефект, mm ²	MNF-Tr	28,88±1,29	--	--	4,43±0,60
	HADP-Tr	28,99±1,02	11,81±1,65	3,16±0,72	0,67±0,36
	PRPD-Tr	28,87±1,50	7,83±2,08	2,01±0,67	0,30±0,39
	PRPS-Tr	28,53±0,81	5,27±1,18	1,05±0,33	0,08±1,18

$p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; статистическа достоверност на разликите в групата в различните периоди; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; статистическа достоверност на разликите между контролната и опитните групи в различните периоди.

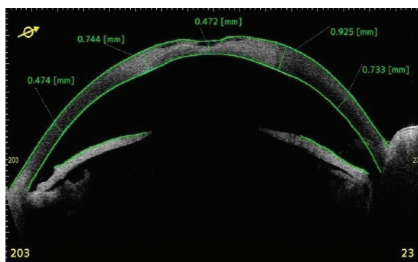
В 1-вия ден средната площ на язвените дефекти е около 28 mm^2 . Във всички групи се наблюдава значително понижаване на площта на язвените дефекти, като на 10-ия ден тя е почти нулева. При група MNF-Ch тя остава най-голяма на 10-ия ден ($4,43 \pm 0,60 \text{ mm}^2$). Получените резултати са статистически недостоверни.

4.3. Резултати от проследяване на скоростта и характера на зарастване на роговицата при положителната контрола и експерименталните групи чрез образно-диагностични изследвания

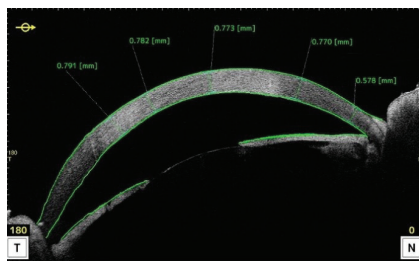
Резултатите са представени чрез аксиален скан на нивото на предната очна камера с роговица в трансверзален срез през централната ѝ част. Отчетени са промените в дебелината на роговицата в пет пункта.

На 10-ия ден при група MNF-Ch централно на мястото на язвата се наблюдава дефект на неправилно възстановяване – т. нар. фасета, с дебелина $472 \mu\text{m}$, със силен периферен оток (под екваторната линия $744 \mu\text{m}$, а над екваторната линия $925 \mu\text{m}$), показващ двукратно удебеляване на роговицата (Фиг. 9). Установява се субепителна вакуолизация около фасетата и повишен интензитет на отражение в стромалния слой. В периферните зони без оток дебелината е $474 \mu\text{m}$.

На 10-ия ден при група HADP-Ch централно на мястото на язвата дебелината е между 815 и $853 \mu\text{m}$, а по периферията е около $500 \mu\text{m}$ (Фиг. 10). Удебеляване на размера на роговицата се констатира във всичките ѝ части.



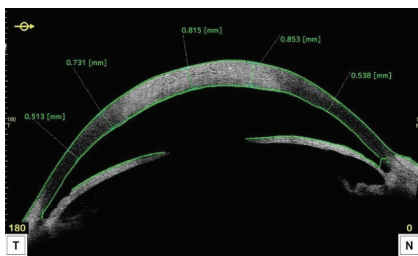
Фиг. 9. AS-OCT аксиален скан на 10-ия ден при група MNF-Ch



Фиг. 10. AS-OCT аксиален скан на 10-ия ден при група HADP-Ch

В група PRPD-Ch на 10-ия ден дебелината ѝ е силно увеличена, поради настъпилия стромален оток. В централната зона тя е между 759 и 785 μm (Фиг.11). В периферията увеличеният размер е около 700 μm .

В група PRPS-Ch на 10-ия ден дебелината ѝ е силно увеличена, поради настъпилия оток в стромата. В централните зони тя е между 770 и 791 μm (Фиг.12). В периферията измерената дебелина е 578 μm .



Фиг. 11. AS-OCT аксиален скан на 10-ия ден при група PRPD-Ch



Фиг. 12. AS-OCT аксиален скан на 10-ия ден при група PRPS-Ch

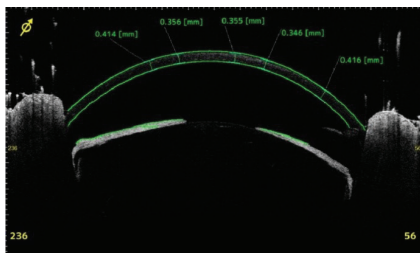
На 10-ия ден при група MNF-Tr Централно на мястото на язвения дефект се наблюдава изтъняване на роговицата – 355 μm , докато в периферията тя е с нормална дебелина и равномерна дебелина около 415 μm (Фиг.13).

На 10-ия ден при група HADP-Tr роговицата е с дебелина между 405 и 420 μm , равномерно по цялата ѝ повърхност (Фиг.14). Не се установява увеличен интензитет на отражение от слоевете ѝ.

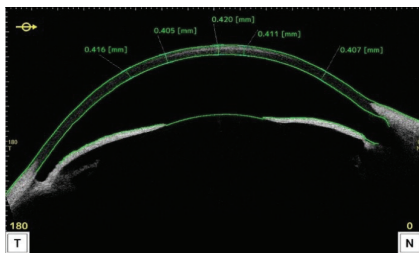
На 10-ия ден при група PRPD-Tr роговицата е с равномерна дебелина между 405 и 424 μm по всичките ѝ зони (Фиг.15). Не се наблюдават аномални отражения в роговичните слоеве.

На 10-ия ден при група PRPS-Tr роговицата е с равномерна дебелина между 411 и 417 μm (Фиг.16). Вдясно на скана се забелязва силната отразителна по-

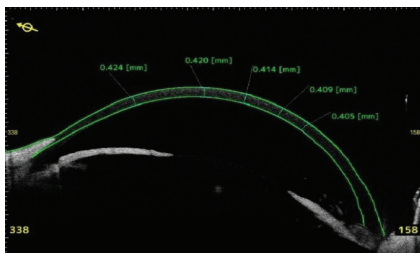
върхност на третия клепащ, който е покрил медиалния полюс към роговицата.



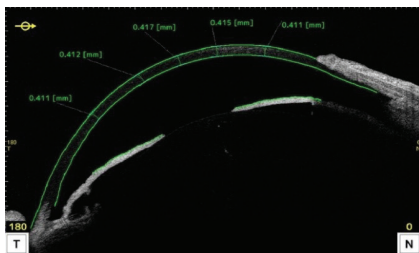
Фиг. 13. AS-OCT аксиален скан на 10-ия ден при група MNF-Tr



Фиг. 14. AS-OCT аксиален скан на 10-ия ден при група HADP-Tr



Фиг. 15. AS-OCT аксиален скан на 10-ия ден при група PRPD-Tr



Фиг. 16. AS-OCT аксиален скан на 10-ия ден при група PRPS-Tr

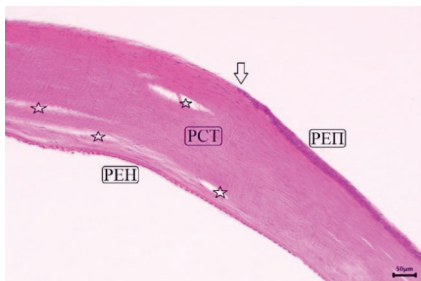
4.4. Резултати от хистологичните изследвания на роговиците при положителната контролна и експерименталните групи

Хистологични препарати на група MNF с алкална роговична язва

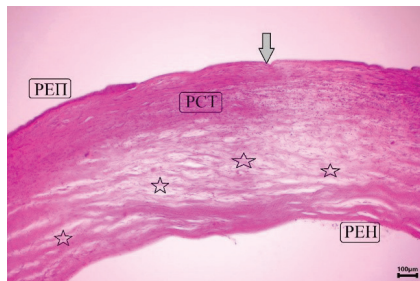
На Фиг. 17 се наблюдава роговичният епител (РЕП), който е реепителизирал до зоната на язвения дефект (бяла стрелка), но все още не го е покрил. В роговичната строма (РСТ) се наблюдават разслоявания на колагеновите влакна (звезда).

На Фиг. 18 се наблюдава епителен дефект с непокрита строма (РСТ), с неравномерно възстановяване (сива стрелка). Роговичната строма (РСТ) е силно удебелена, поради настъпил оток (звезди).

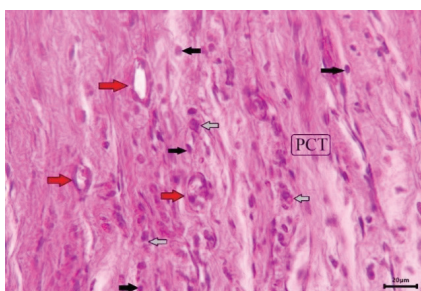
На Фиг. 19 се наблюдават кръвоносни съдове (червена стрелка) в роговичната строма (РСТ), пропита с клетки от възпалителен тип – мононуклеарни клетки (черна трелка) и неутрофилни гранулоцити (сива стрелка).



Фиг. 17. Група MNF-Ch, 10-и ден.
Оцветяване Н&Е, обектив $\times 10$.



Фиг. 18. Група MNF-Ch, 10-и ден.
Оцветяване Н&Е, обектив $\times 4$.

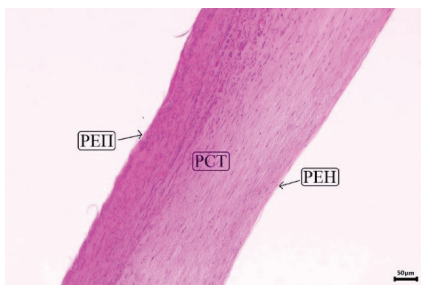


Фиг. 19. Група MNF-Ch, 10-и ден.
Оцветяване Н&Е, обектив $\times 40$.

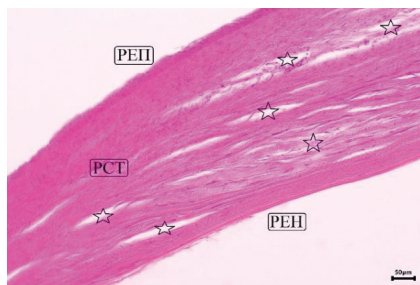
Хистологични препарати на група HADP с алкална роговична язва

На Фиг. 20 се наблюдава роговица с плътно възстановена строма (PCT), виждат се и ендотела (PEH) и възстановеният епител (PEП). В anteriорния край на роговицата се установяват клетки от възпалителен тип.

На Фиг. 21 се наблюдава роговица с възстановен епител (PEП) и строма с разединени колагенови влакна (звезди), поради оток в стромата (PCT).



Фиг. 20. Група HADP-Ch, 10-и ден.
Оцветяване Н&Е, обектив $\times 10$.



Фиг. 21. Група HADP-Ch, 10-и ден.
Оцветяване Н&Е, обектив $\times 10$.

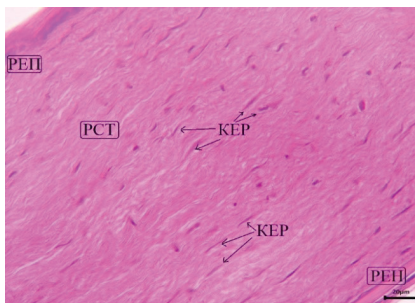
Хистологични препарати на група PRPD с алкална роговична язва

На Фиг. 22 се наблюдава роговица с възстановена строма (РСТ), но все още на места с разединени в слаба степен колагенови влакна. Установяват се и ендотелът (РЕН) и възстановеният епител (РЕП).

На Фиг. 23 се наблюдава роговица с трите основни слоя – епител (РЕП), строма (РСТ) и ендотел (РЕН). Между колагеновите влакна на стромата се установяват разпръснати кератоцити (КЕР).



Фиг. 22. Група PRPD-Ch, 10-и ден.
Оцветяване Н&Е, обектив x10.

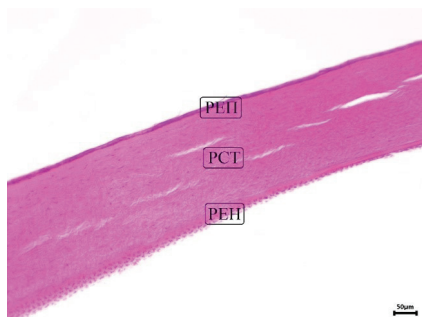


Фиг. 23. Група PRPD-Ch, 10-и ден.
Оцветяване Н&Е, обектив x40.

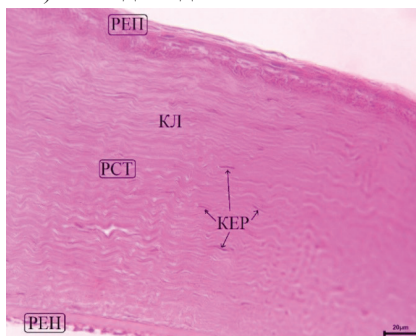
Хистологични препарати на група PRP-S с алкална роговична язва

На Фиг. 24 се наблюдава роговица с възстановена строма (РСТ), но все още на места с разединени в слаба степен колагенови влакна. Установяват се ендотелът (РЕН) и възстановеният епител (РЕП) в пет до седем слоя клетки.

На Фиг. 25 се наблюдава роговица с възстановена строма (РСТ). Установяват се и ендотелът (РЕН) и епителът (РЕП) в пет до седем слоя клетки.



Фиг. 24. Група PRPS-Ch, 10-и ден.
Оцветяване Н&Е, обектив x10.

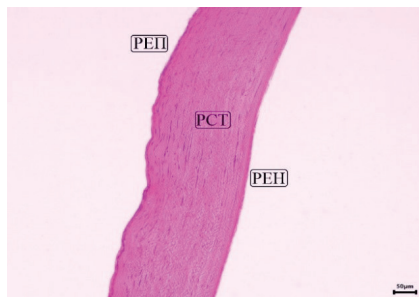


Фиг. 25. Група PRPS-Ch, 10-и ден.
Оцветяване Н&Е, обектив x40.

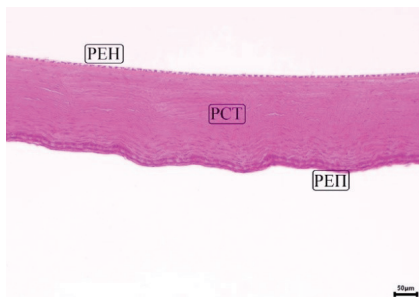
Хистологични препарати на група MNF с травматична роговична язва

На Фиг. 26 се наблюдава язвеният дефект, който е покрит от роговичния епител (РЕП) в много неравномерен и не гладък слой, с оформяне на т.нар. фасета и изтъняване на дебелината на роговицата.

На Фиг. 27 се наблюдава епителизация на язвения дефект (РЕП), без оформяне на фасета, но с неравномерно изпъкване в някои зони. Не се установява оток и разединяване в роговичната строма (РСТ). Няма изменения в роговичния ендотел (РЕН).



Фиг. 26. Група MNF-Tr, 10-и ден.
Оцветяване Н&Е, обектив x10.

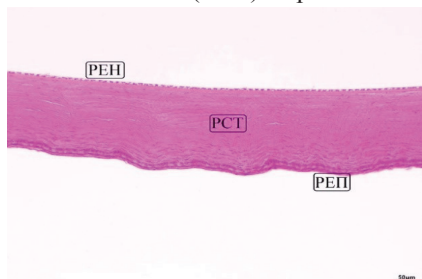


Фиг. 27. Група MNF-Tr, 10-и ден.
Оцветяване Н&Е, обектив x10.

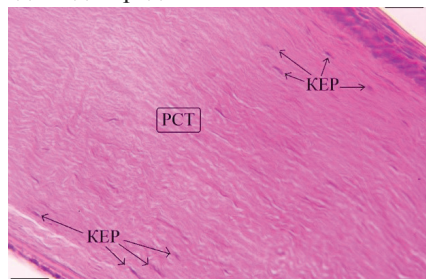
Хистологични препарати на група HADP с травматична роговична язва

На Фиг. 28 се наблюдава роговица с плътно възстановена строма (РСТ), виждат се и ендотелът (РЕН) и възстановеният равномерно епител (РЕП).

На Фиг. 29 се наблюдава роговица с плътно възстановена строма (РСТ), с равномерно разпръснати кератоцити (КЕР) между колагеновите влакна. В епителния слой (РЕП) се различават от до седем реда клетки.



Фиг. 28. Група HADP-Tr, 10-и ден.
Оцветяване Н&Е, обектив x10.



Фиг. 29. Група HADP-Tr, 10-и ден.
Оцветяване Н&Е, обектив x40.

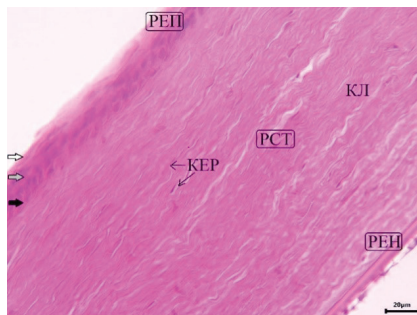
Хистологични препарати на група PRPD с травматична роговична язва

На Фиг. 30 се наблюдава роговица с плътно възстановена строма (PCT). Установяват се и ендотелът (PEH) и възстановеният епител (PEП).

На Фиг. 31 се наблюдава роговица с трите основни слоя. В епителния слой (PEП) се разграничават първият ред от кубоидни базални клетки (черна стрелка), полиго-налните криловидни клетки (сива стрелка) и най-повърхностно плоските клетки, подлежащи на стратификация (бяла стрелка).



Фиг. 30. Група PRPD-Tr, 10-и ден.
Оцветяване Н&Е, обектив x10.



Фиг. 31. Група PRPD-Tr, 10-и ден.
Оцветяване Н&Е, обектив x40.

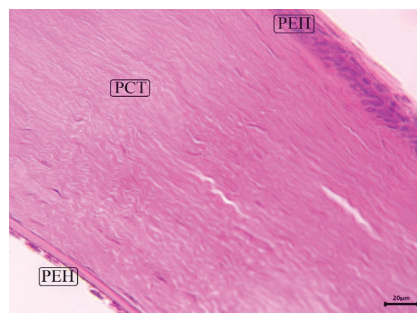
Хистологични препарати на група PRPS с травматична роговична язва

На Фиг. 32 се наблюдава роговица с възстановена строма (PCT) и плътно подредени колагенови влакна. Установяват се ендотелът (PEH) със звездовидни клетки и възстановеният епител (PEП) с гладка повърхност.

На Фиг. 33 се наблюдава роговица с възстановена строма (PCT). Установяват се и еднослоен ендотел (PEH) и многослоен епител (PEП) в пет до седем слоя клетки.



Фиг. 32. Група PRPS-Tr, 10-и ден.
Оцветяване Н&Е, обектив x10.



Фиг. 33. Група PRPS-Tr, 10-и ден.
Оцветяване Н&Е, обектив x40.

ИЗВОДИ

1. Направеното сравнително изследване върху експериментални зайци показва, че третирането на травматични язви на роговицата с автоложна богата на тромбоцити плазма, приложена под формата на капки или като субконюнктивална инжекция, е високоефективен метод за лекуването им. При язвите на роговицата, получени в резултат на химични изгаряния, приложението на богата на тромбоцити плазма също е ефективен метод, но изисква по-дълъг период за възстановяването им.

2. Приложението на автоложна богата на тромбоцити плазма под формата на капки или чрез субконюнктивална инжекция намалява значително площта на язвите (повече от 67%) още на 3-тия ден, независимо от етиологичния фактор, предизвикващ язвите, като това е най-добре изразено при субконюнктивалното инжектиране.

3. Травматичните язви на роговицата при зайци зарастват по-бързо и без усложнения в сравнение с химичните язви. Причината за това вероятно е наличието на изразен стромален оток, деструкция на колаген и загуба на прозрачност при роговиците с химични язви и минималната изява на тези признаци при травматичните язви.

4. Оптичната кохерентна томография е метод с висока диагностична стойност, тъй като предоставя възможност за неинвазивно изследване на предния очен сегмент, измерване на дебелината на роговицата и прецизна оценка на основните показатели, характеризиращи състоянието на роговицата като сферичност и гладкост.

5. Язвите на роговицата при зайци предизвикват повишена слъзна секреция (между 12 и 16,5 mm.min⁻¹), продължаваща повече от седем дни, независимо от вида на язвата (химична или травматична).

6. Приложението на натриев хиалуронат с декспантенол и PRP-терапията имат сходни клинични резултати, но хистологичното изследване показва изразен прогнотивовъзпалителен ефект само при зайците, третирани с тромбоцитна плазма.

7. Хистологичната оценка на язвите на роговицата показва организирана стромална регенерация и равномерна епителизация само при животните, лекувани с богата на тромбоцити плазма, което не се наблюдава при останалите методи на третиране.

6. ПРИНОСИ

А) Приноси с оригинален характер

1. Направено е комплексно сравнително експериментално проучване при два вида язви на роговицата при зайци, третирани с автоложна богата на тромбоцити плазма, натриев хиалуронат с декспантенол и пришиване на третия клепащ.

2. За пръв път във ветеринарната офталмология в България е използвана оптична кохерентна томография. Конструирани са 3D-модели, позволяващи детайлно проследяване на състоянието на предния очен сегмент на зайци с язви на роговицата.

3. Установено е, че автоложната богата на тромбоцити плазма стимулира възстановяването и зарастването на язвите на роговицата, независимо от етиологичния фактор.

4. Доказано е, че възстановяването при язви с травматичен произход е по-бързо в сравнение с язви, предизвикани от химично изгаряне, независимо от използвания терапевтичен подход.

5. Установено е, че двукратното центрофугиране на кръв за получаване на богата на тромбоцити плазма с първи по-продължителен цикъл на ниски обороти и втори по-кратък цикъл на високи обороти улеснява сепарирането на клетъчните слоеве и позволява получаване на 0,5 – 0,7 ml богата на тромбоцити плазма от 8 ml венозна кръв при зайците.

6. Направена е хистологична оценка на ефекта от различните приложени терапии с продължителност 10 дни на роговиците на зайци.

Б) Приноси с потвърдителен характер

1. Химичните изгаряния на роговицата предизвикват сериозни изменения по корнеалната повърхност, съпроводени с тежки деструктивни и възпалителни процеси.

2. Получаването на кръв за сепариране на богата на тромбоцити плазма не представлява риск за развитие на анемия при зайците.

3. Двукратното центрофугиране на кръв е сравнително лесен и достъпен метод за получаване на богата на тромбоцити плазма с терапевтичен ефект при роговични язви.

4. Едномолярният (1M) разтвор на NaOH може да се използва за предизвикване на експериментални химични язви на роговицата при зайци.

7. ПРЕПОРЪКИ ЗА ПРАКТИКАТА

1. Корнеалните язви може да се лекуват с автоложна богата на тромбоцити плазма.

2. При тежки увреждания на роговицата оптичната кохерентна томография може да се използва като неинвазивен метод за прецизна диагностика и оценка на състоянието на предния очен сегмент.

3. Получената богата на тромбоцити плазма, предназначена за третиране на язви на роговицата, трябва да се използва до 7-ия ден, като се съхранява при хладилни условия.

4. Обемът на кръвта, предназначен за получаване на богата на тромбоцити плазма, трябва да бъде десетократно по-голям в сравнение с желаното количество PRP, необходимо за третиранията.

8. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Mustafa, S., N. Mehandzhiyski. Application of platelet-rich plasma (PRP) in corneal lesions – a review. – In: Tradition and Modernity in Veterinary Medicine, 2021, vol. 6, No 1(10), 55 – 64 (ISSN 2534-9333) (e-ISSN 2534-9341).

2. Mustafa, S., N. Zlateva-Panayotova. Mechanism of corneal healing and the role of the growth factors in the eye – a review. – In: Tradition and Modernity in Veterinary Medicine, 2023, vol. 8, No 1(14), 95 – 109 (ISSN 2534-9333) (e-ISSN 2534-9341).

3. Mustafa, S., N. Zlateva-Panayotova. Changes in Lacrimation in Experimentally Induced Corneal Ulcers in Rabbits, treated with third eyelid flap, Hyaluronic Acid and Platelet-Rich Plasma products. – In: Advance Research Journal of Multi-disciplinary Discoveries, 2023, 80(2), 8 – 14 (e-ISSN-2456-1045).

9. УСТАНОВЕНИ ЦИТИРАНИЯ НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Mustafa, S., N. Mehandzhiyski. Application of platelet-rich plasma (PRP) in corneal lesions – a review. – In: Tradition and Modernity in Veterinary Medicine, 2021, vol. 6, No 1(10), 55 – 64 (ISSN 2534-9333) (e-ISSN 2534-9341):

1.1. Sharun, K., D. Chandran, K. Manjusha, P. Mankuzhy, R. Kumar, A. Pawde, K. Dhama. H. El-Husseiny, A. Amarpal. (2023). Advances and prospects of platelet-rich plasma therapy in veterinary ophthalmology. – In: Veterinary Research Communications 46(4), online 06.01.2023 Springer Nature B.V. 2023.

IF: 2.816

10. БЛАГОДАРНОСТИ

Искам да изкажа своята сърдечна благодарност към научния ми консултант, доц. д-р Надя Златева-Панайотова за ценните съвети, корекции и професионална помощ по отношение на разработвания труд, за съдействието ѝ при документалната и процедурната организация.

На всички млади колеги от Факултета, които ми помогнаха не само физически в експерименталните постановки, но и за предоставените материали и съвети за оформянето на дисертационния труд като цяло.

На доц. Андрей Куртенов, който ми преотстъпи модулните клетки за експерименталните животни.

На екипите на ветеринарни клиники „Св. Георги“ и „Ами Вет“ за предоставената апаратура и възможност да извърша лабораторните си изследвания.

На очна клиника „Ресбиомед“ и инж. Явор Ангелов за отзивчивостта и възможността да използвам тяхната ОСТ-апаратура.

На д-р Георги Попов и Софийка Маркова за помощта в изготвянето и интерпретацията на хистологичните материали.

На проф. Теодора Попова за отзивчивостта, която проявява всеки път и за това, че извърши микробиологичните изследвания.

Благодарен съм и на доц. Николай Механджийски, който прегърна идеята за този труд и разпали интереса ми в офталмологията.

Искам да благодаря на семейството си и близките ми за безрезервната подкрепа, която получавах от тях и най-вече на моя спътник в живота – Надежда Терзийска, за търпението и разбирането през целия период на подготовка на дисертационния труд.

EXAMINATION OF THE REGENERATIVE POTENTIAL OF PLATELET-RICH PLASMA AND SODIUM HYALURONATE WITH DEXPANTHENOL IN EXPERIMENTALLY INDUCED CORNEAL ULCERS IN RABBITS

SEVEN RUZHDI MUSTAFA

The present study aimed to make a comparative assessment of the healing process of experimentally induced corneal defects after administration of autologous platelet-rich plasma, sodium hyaluronate with dexpanthenol, and the surgical method of temporary third eyelid flap in rabbits.

The study included 28 New Zealand White rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) aged 12 – 18 months, weighing 3.1 ± 0.4 kg following the authorization for use of experimental animals №337/2022, entered in BFSA Register, and under the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals.

After inducing corneal ulcers with alkaline burn and mechanical debridement and treating them with a third eyelid flap, eyedrops with hyaluronic acid and dexpanthenol, platelet-rich plasma as an eye drop and subconjunctival injection (MNF, HADP, PRPD, PRPS), clinical and laboratory examinations were performed during the 10 days of the experiment. We were collecting blood for evaluation of all the patient's blood parameters in dynamics – before the ulcer induction, on the 1st day, 3rd day and 10th day after the procedure. The regeneration and corneal healing process were observed by AS-OCT on the 10th day. Histological analyzes were performed after euthanasia according to the recommended protocol for rabbits and small rodents from the American Veterinary Medical Association (AVMA) on the 10th day.

Based on the obtained results, the efficacy of the platelet-rich plasma and sodium hyaluronate with dexpanthenol were compared. The effectiveness of the studied regenerative therapies, evaluated in time, speed and quality of healing is similar in both ways of application of PRP, with a slight advantage to the eye drops which showed faster ulcer reepithelization time, leading to activation, stimulation and acceleration of mitogenic and differential potential of corneal stromal and epithelial cells. Sodium hyaluronate eye drops with dexpanthenol are suitable, where the eye also showed a rapid decrease in accompanying clinical signs. The third eyelid flap did not show complete healing of the ulcers for the period studied.

The application of PRP is suitable for alkali burns and traumatic ulcers in veterinary practice. The experimental results obtained from the present study

provide a basis for expanding research for the clinical use of regenerative therapies in veterinary ophthalmology.

Key words: PRP, sodium hyaluronate, corneal ulcer, rabbit, AS-OCT.

