

## **Doktori (PhD) értekezés tézisei**

# **Az öregedés hatása a Pentacammal mért corneális paraméterekre egészségesekben, valamint könnybiomarkerek vizsgálata progresszív és nem progresszív keratoconusban**

Dr Vitályos Géza

Témavezető: Dr. Fodor Mariann, PhD



**DEBRECENI EGYETEM**  
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2021

**Az öregedés hatása a Pentacammal mért corneális paraméterekre  
egészségesekben, valamint könnybiomarkerek vizsgálata  
progresszív és nem progresszív keratoconusban**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
a Klinikai vizsgálatok tudományágban

Írta: Dr Vitályos Géza fogszakorvos

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok doktori iskolája  
(Klinikai vizsgálatok programja) keretében

Témavezető: Dr. Fodor Mariann, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szekanecz Zoltán, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Balla József, az MTA doktora  
Dr. Gurdán Zsuzsanna PhD

A doktori szigorlat időpontja: 2021. 03. 16. 10.00 online

Az értekezés bírálói: Prof. Dr. Bácsi Attila, az MTA doktora

Dr. Felszeghy Szabolcs, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szekanecz Zoltán, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Bácsi Attila, az MTA doktora  
Dr. Felszeghy Szabolcs PhD  
Prof. Dr. Balla József, az MTA doktora  
Dr. Gurdán Zsuzsanna PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2021.03.16. 12.00 online

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze a [vitalydr@gmail.com](mailto:vitalydr@gmail.com) e-mail címre a vitát megelőző nap (2021.03.15.) 17.00 óráig.

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AstigF: elülső felszínen mért asztigmatizmus

AstigB: hátsó felszínen mért asztigmatizmus

AxisF: elülső felszínen mért asztigmatizmus lapos tengelye

AxisB: hátsó felszínen mért asztigmatizmus lapos tengelye

AUC: modellek osztályozási teljesítménygörbéje (ROC) alatti terület (areas under the receiver operating characteristic curves (ROC))

CCL5/RANTES: kemokin (C-Cmotif) ligand 5/aktiváció által szabályozott normál T-sejt expresszált és szekretált citokin (Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted)

CCT: Centrális cornea vastagság (Central corneal thickness)

CKI: centrális keratoconus index (central keratoconus index)

CXCL8/IL-8: C-X-C kemokin ligand 8/interleukin-8

CXL: cornealis cross-linking kezelés

D 10 mm: corneális térfogat az elülső corneális apextől mért 10 mm-es átmérőben

D: dioptria

D-index: Belin-Ambrósio deviációs index

ECM: extracelluláris mátrix

IFN: interferon

IHA: magassági aszimmetria index (index of height asymmetry)

IHD: magassági decentrációs index (index of height decentration)

IL: interleukin

ILC: innate limfoid sejt

ISV: felszíni variancia index (index of surface variance)

IVA: vertikális aszimmetria index (index of vertical asymmetry)

J45 vektor: Jackson keresztcilinder erővektor 45°-os komponense

K1F: leglaposabb tengely mentén mért törőerő az elülső felszínen

K1B: leglaposabb tengely mentén mért törőerő a hátsó felszínen

K2F: legmeredekebb tengely mentén mért törőerő az elülső felszínen

K2B: legmeredekebb tengely mentén mért törőerő a hátulsó felszínen

KC: keratoconus

KI: keratoconus index

Kmax Front: maximális törőerő, maximális keratometria az elülső felszínen

MMP: mátrix-metalloproteináz (matrix metalloproteinase)

NGF: idegi növekedési faktor (nerve growth factor)

NLR: neutrofil-limfocita arány

NPV: negatív prediktív érték (negative predicted value)

Pachy Min: legvékonyabb cornea vastagság, a szaruhártya legvékonyabb pontja (legkisebb pachymetriás érték)

PAI: plazminogén aktivátor inhibitor

PPV: pozitív prediktív érték

ROC: modellek osztályozási teljesítménygörbéje (receiver operating characteristic curves)

SD: standard deviáció, szórás

TIMP-1: metalloproteináz-1 szöveti inhibitor (tissue inhibitor of metalloproteinase 1)

t-PA: szöveti plazminogén aktivátor (tissue plasminogen activator)

## 1. BEVEZETÉS

Az öregedés fiziológiás folyamat, és néha nehéz megkülönböztetni az idő okozta biológiai változásokat a környezeti ártalmak következményeitől. Az életkorfüggő változások a szem minden struktúrájában kialakulnak különböző következményekkel. A cornea öregedése strukturális és funkcionális változásokat okoz, többek között a keratometriás indexek növekedését és az asztigmatizmus tengely rotációját, melyek a szabályos asztigmatizmus szabálytalanná válását eredményezik. A cornea magasabb rendű aberrációinak változása szintén jól ismert. A cornea vastagsága folyamatosan csökken gyermekkorban: körülbelül hároméves korra éri el a felnőttkori vastagságát, és innentől kezdve stabil marad. Azonban a cornea vastagságának életkorral összefüggő változásait vizsgáló tanulmányok eredményei ellentmondásosak. A cornea teljes, és pontos meghatározása magában foglalja a keratometriás, asztigmatikus vektoriális, és pachymetriás jellemzőinek leírását. Számos klinikai szituáció esetén fontos különbséget tennünk a patológiás és a fiziológiás, életkorral bekövetkező változások között. Az ektatikus corneális elváltozások progressziója fiataloknál meghatározza az optimális terápiát.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A keratoconus (KC) egy progresszív ectatikus corneális betegség heterogén klinikai súlyossággal és változatos progresszióval. Prevalenciája körülbelül 1:375 a teljes populációt tekintve, ami jól mutatja közegészségügyi jelentőségét. Patogenezise összetett: genetikai, biomechanikai, biokémiai és környezeti rizikófaktorok (gyulladás, allergia, oxidatív stressz) együttes hatásának eredménye. A corneális crosslinking terápia (CXL) hatékonynak bizonyult a KC progressziójának megállításában és a vizsgálatok eredményei szerint a progresszív KC korai stádiumaiban a leghatékonyabb. Ez a lehetséges kezelés kiemelt fontosságúvá teszi a megfelelő páciensek minél korábbi meghatározását,

Különböző citokinek, enzimek, szabályozó és növekedési faktorok, valamint gyulladásos markerek eltérő szintjét, valamint szöveti sérülés jeleit figyelték meg KC-s páciensek könnyében, illetve corneájában, mely rámutat az immunrendszer kiemelt jelentőségére a KC patogenezisében. Ezek magukban foglalják a proinflammatorikus citokineket (tumornekrózis faktor, interleukin (IL)-1 $\beta$ , és IL-6), gyulladásos kemokineket (C-X-C kemokin ligand 8 /CXCL8/=IL-8, kemokin (C-Cmotif) ligand 5 /CCL5/= aktiváció által szabályozott normál T-sejt expresszált és szekretált citokin/RANTES/), gyulladásos mediátorokat (IL-12, interferon /IFN/ $\gamma$ , IL-17), az IL-10 gyulladásgátló citokint, az allergiás reakciókért felelős citokineket (IL-4, IL-13), enzimeket, és azok szöveti remodellálódásért felelősek kofaktorait (mátrix metalloproteinázok /MMP-k/), metalloproteináz-1 szöveti inhibitor /TIMP-1/, cathepszin B). Szintén leírásra kerültek különböző növekedési faktorok, más enzimek, enzimgátlók, celluláris proteinek, melyek diagnosztikus markerként szolgálhatnak sejt és szöveti sérülések, illetve gyulladás kapcsán, úgymint az epidermális

növekedési faktor, a vasculáris endotheliális növekedési faktor; az inzulin növekedési faktor, idegi növekedési faktor (NGF), lipokalinok, lipofilinek, foszfolipáz A2, cisztatinok, albumin, I-es és II-es típusú keratin, lactoferrin, prolaktin indukált fehérje,  $\alpha$ -fibrinogén,  $\alpha$ 1-antitripszin; apolipoprotein A1, lizozim C, cink- $\alpha$ 2-glikoprotein, metabolikus enzimek (pl. gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz), különböző immunglobulinok (IgA, IgG1, és az Ig könnyű láncának k-izotípusai) és a polimerikus immunglobulin transzport receptor. Ezen molekuláris markerek betegség specifikus változásai diagnosztikus jelentőséggel bírhatnak KC esetében is.

Legjobb tudomásunk szerint eddig nem voltak olyan vizsgálatok, melyek ezen mediátorok könny szintjét vizsgálták annak érdekében, hogy a betegség progresszióját megjósolják. Márpedig a progresszió korai felismerése KC esetén kiemelt jelentőséggel bír, mivel ez teszi lehetővé a korai kezelést, ami a súlyos látásromlás kialakulásának esélyét csökkentheti. Amennyiben a könnybiomarker-profil hamarabb meg tudná jósolni a progressziót, mint a manapság használatos paraméterek, akkor ez egy ideális módszer lehetne a klinikai alkalmazásra is.

Az MMP-9 és az MMP-13 különböző sejtek által szövet-újraépítődés (sérülések és szöveti gyógyulás) során termelődött kollagenázok. Funkcióik szabályozása direkt, vagy indirekt módon inhibitorok (pl. TIMP-1), vagy aktivátor proteázok, és azok megfelelő aktivátorai és inhibitorai (pl. szöveti plazminogén aktivátor /t-PA/, plazminogén aktivátor inhibitor /PAI-1/) által történik. Az egyéb vizsgált mediátorok különböző típusú gyulladásos folyamatokkal hozhatók összefüggésbe, mint a Th1, vagy az egyes típusú veleszületett limfoid sejt (ILC1) által termelt mediátor, az IFN- $\gamma$ , ami a klasszikus gyulladások makrofág aktivációjában játszik szerepet. Proinflammatorikus citokinek és kemokinek amelyek különböző veleszületett gyulladásos folyamatokban szerepet játszó sejtek által termelődnek: IL-6, CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES. Citokinek, melyek a gyulladás megszüntetésében játszanak szerepet (anti-inflammatorikus citokinek): IL-13, IL-10, melyeket a Th2, vagy ILC2 sejtek termelnek. Az IL-17 $\alpha$  egy olyan gyulladásos citokin, melyet a Th17, vagy az ILC3 sejtek termelnek a neutrofil granulociták által mediált gyulladások esetén és egyéb antimikrobiális védelmi folyamatok során az epitheliális szövetekben. Az NGF szabályozási és gyógyulási folyamatok során játszik szerepet.

### **3. CÉLKITŰZÉSEK**

- I. Corneális paraméterek életkorral összefüggő változásainak longitudinális vizsgálata Pentacam HR készülék segítségével, 14-67 év közötti (kiindulási életkorú) egészségeseknél.
- II. 13 immunmediátor (IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-13, IL-17A, CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, MMP-9, MMP-13, NGF, TIMP-1, t-PA és PAI-1) koncentrációjának meghatározása KC-s páciensek könnymintáiban. A kiválasztott multifunkciós könny mediátor molekulák közrejátszanak a KC-ban bekövetkező corneális degradációban, azonban pontos szerepük még nem ismert.

- III. Ezen mediátorok (IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-13, IL-17A, CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, MMP-9, MMP-13, NGF, TIMP-1, t-PA és PAI-1) változását olyan Pentacam paraméterek változásaival korreláltatni, melyek a KC progressziójának kimutatására szolgálnak.
- IV. Olyan mediátor kombinációk meghatározása, melyek jobban előre jelzik a betegség progresszióját, mint az egyesével vizsgált mediátorok.

## **4. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK**

### **4.1. Páciens kiválasztás és klinikai vizsgálatok**

Tanulmányunk első részébe 35 egészséges európaít vontunk be. Mindegyikük távoli látásélessége 20/20 Snellen ekvivalens volt, alacsony refrakciós hibával (<1,5 dioptria (D)), szemészeti rendellenesség nélkül. A Helsink Deklarációnak megfelelően a vizsgálatba történő bevonást megelőzően minden résztvevővel, illetve kiskorú esetén azok szüleivel beleegyező nyilatkozatot írtunk alá. A vizsgálati protokollt a Debreceni Egyetem Regionális Kutatás-Értékelési Bizottsága (DEOEC-RKEB/IKEB 3313-2011) engedélyezte. A kizárási kritériumok a következők voltak: >1,5D refrakciós hiba, aktív gyulladásos vagy fertőző szisztémás illetve szemészeti betegség, jelenleg zajló szisztémás, vagy lokális gyógyszerkezelés, szemcseppek használata, kontaktlencse viselés, korábbi szemészeti műtéti beavatkozás, lencse vagy retinális abnormalitás réslámpás vizsgálat során, korábbi kémiai sérülés vagy késleltetett epitheliális sebgyógyulás, 14 év alatti életkor, valamint terhesség és szoptatás. A szemészeti vizsgálat előtt minden résztvevő random kiválasztott egy-egy szeméről három felvételt készítettünk nagyfelbontású Pentacam készülékkel (Pentacam HR, Oculus Optikgeräte GmbH, Wetzlar, Németország, szoftver verzió: 1,17r139) 12 mm szélességben, Scheimpflug technikát használva. Minden résztvevő ismételt szemészeti vizsgálatokon esett át az átlagban 3,6 éves követési időszak alatt. Az első és az ezt követő vizsgálatok során minden szemről a következő paramétereket rögzítettük: vizsgálati időpont, látásélesség (Snellen), szférikus ekvivalens. A Pentacam-ból a következő adatokat exportáltuk excel táblázatba (Microsoft Corp, Redmond, Washington): a leglaposabb (K1) és a legmeredekebb (K2) tengely mentén mért Holladay ekvivalens keratometriás érték a cornea elülső (K1F, K2F) és hátulsó felszínén (K1B, K2B), maximális keratometria az elülső felszínen (Kmax Front), elülső és hátulsó felszínen mért asztigmatizmus (AstigF, AstigB), valamint lapos tengelyük (AxisF, AxisB), a szaruhártya legvékonyabb pontján mért vastagság (Pachy Min), corneális térfogat az elülső corneális apextől mért 10 mm-es átmérőben (C Vol D 10 mm), felszíni variancia index (ISV), vertikális aszimmetria index (IVA), magassági aszimmetria index (IHA), magassági decentrációs index (IHD). A Pentacam paraméterek változásait mindig a kiindulási értékekhez hasonlítva vizsgáltuk. Az összes vizsgálatot reggel 8 és 10 óra között végeztük, hogy a cornea vastagság napi változását kiküszöböljük.

#### 4.2. Keratoconusos betegek kiválasztása, Pentacam mérések és könnygyűjtés/analízis

Tanulmányunk második részében egy megfigyeléses kohorsz vizsgálatot végeztünk, amelybe jól definiált KC-s pácienseket vontunk be a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Szemklinikájáról. KC-t abban az esetben diagnosztizáltunk, ha az adott páciens esetén egy, vagy több klinikai jel állt fent a következők közül: a cornea centrális vagy paracentrális sztrómális elvékonyulása, kónikus protrúzió, Fleischer gyűrű, illetve Vogt striák a réslámpás vizsgálat során, valamint topográfias elváltozások. A vizsgálatból kizáró tényező volt a szisztémás vagy a szemet érintő aktív gyulladásos vagy fertőző betegségek megléte (beleértve az atópiás dermatitist is), krónikus, abnormális szemdörzsölés az anamnézisben, illetve a folyamatban lévő helyi vagy szisztémás gyulladásgátló szerek használata. Korábbi szemsebészeti beavatkozásokon (pl: CXL) vagy traumán átesett szemek, valamint terhes illetve szoptató páciensek szintén kizárásra kerültek a vizsgálatból.

Összesen 42 KC-s páciens (átlag (szórás=SD) életkor 36,4 (12,3), 15-68 év) került bele a vizsgálatba. Minden résztvevő mindkét szeme többszörös szemészeti vizsgálaton esett át, ami magában foglalta a kórtörténetet, automata kerato-refraktometriát (KR-8900; Topcon Co, Tokyo, Japan), korrigált- és korrigálatlan távoli látásélesség meghatározását, réslámpás biomokroszkópos vizsgálatot (kis fényerővel vizsgálva a reflexes könnyezés megelőzésére) és rotációs Scheimpflug tomográfiát (Pentacam HR, Oculus Optikgeräte GmbH, Wetzlar, Germany). A betegeket mind a kiinduláskor, mind az egy éves követési időszak leteltével megvizsgáltuk Pentacam HR készülékkel, hogy megállapítsuk a betegség progresszivitását. A következő Pentacam paramétereket exportáltuk excel táblázatba: K1, K2, Kmax Front, AstigF, Pachy Min, Keratoconus index (KI), Centrális Keratoconus Index (CKI), és Belin-Ambrósio deviációs index (D-index). A KC-t progresszívnek definiáltuk abban az esetben, ha a K2 és/vagy a Kmax Front és/vagy az asztigmatizmus minimum 1,0 dioptriával (D) növekedett az eltelt 12 hónap alatt. A KC-t enyhének definiáltuk, ha a K2, mint legmeghatározóbb keratometriás tényező, kisebb volt, mint 45 dioptria, közepesnek, ha a K2 45 és 52 D közé esett, és súlyosnak, ha a K2 értéke nagyobb volt, mint 52 D. Minden páciens esetén a vizsgálat kezdetekor csak az egyik szemet vontuk be a vizsgálatba (melyre teljesültek a bevonási kritériumok, s nem volt kizárási kritérium), kivéve, ha az egyik szem progresszív, míg a másik szem nem progresszív KC-t állapítottunk meg. Ilyen esetben az egyik szemet a progresszív, míg a másikat a nem progresszív csoportba válogattuk be.

Az atraumatikus, stimuláció nélküli könnygyűjtés vékony kapilláris csövekkel az alsó meniscus tájékáról minden esetben ugyanabban a napszakban, reggel 8 és 9:30 között történt, mind a tanulmány kezdetekor, mind pedig az egy éves vizsgálati időszak elteltével. A könny mennyiség meghatározása a gyűjtőcsőben lévő könny hosszának meghatározásával történt mikrométer pontossággal. A könnyminták analízise során meghatároztuk az IL-6, IL-10, IL-13, IL-17A, CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, IFN $\gamma$ , MMP-9, MMP-13, TIMP-1, NGF, t-PA és PAI-1 mediátorok koncentrációját multiplex mikrogyöngy mátrix (Cytometric Bead Array) módszer segítségével. Kombinált FlowCytomix Simplex Kit-et használtunk a megfelelő FlowCytomix™ Basic Kit-tel a gyári használati utasításokhoz képest minimális változtatásokkal (eBioscience,

Bender Med Systems GmbH, Bécs, Ausztria). A következő detektációs limiteket kaptuk: IL-6: 1,2 pg/ml; IL-10: 1,9 pg/ml; IL-13: 4,5 pg/ml; IL-17A: 2,5 pg/ml; IFN $\gamma$ : 1,6 pg/ml; CXCL8 (IL8): 0,5 pg/ml; CCL5 (RANTES): 25 pg/ml; MMP-9: 95 pg/ml; MMP-13: 50 pg/ml; TIMP-1: 28 pg/ml; NGF: 126,8 pg/ml; t-PA: 4,8 pg/ml; és PAI-1: 13,5 pg/ml.

### **4.3. Statisztikai analízis**

#### **4.3.1. Életkorral összefüggő változások**

A Pentacam rendszerből kapott kimeneteli paraméterek többségét a saját mérési skálájukon értelmezett és mértékegységükkel mért transzformálatlan folytonos változóként kezeltük. A kivételek között voltak a corneális tengelyszögek, amelyeket a 0°-tól 90°-ig terjedő tartományba konszolidáltunk, így a tengelyállás oldalfüggetlen, a vízszintestől a függőlegesig futó terjedelmen belüli mutatószámát kaptuk meg, valamint a hátsó corneális asztigmatizmus számértékei, amelyek előjelét megváltoztattuk. A Jackson keresztcilinder erővektor komponenseit (J0 és J45) az elülső corneális felszínre (azaz a szimulált keratometrikus adatokra) vonatkoztatva kalkuláltuk a Thibos és munkatársai által leírt módszer szerint. A követés utáni és a kiindulási mérések korrigálatlan összehasonlítását az eloszlás normalitási feltételének fennállása esetén páros t-próbával, ellenkező esetben Wilcoxon-féle páros előjeles rangpróbával végeztük. A férfi és a nőnemű résztvevőket életkor szempontjából Wilcoxon-féle rangösszegpróbával hasonlítottuk össze. Vegyes hatásmodalitású hierarchikus lineáris regressziót alkalmaztunk a kimeneteli paraméterek követés során beállt változásainak korrigált becslésére. A korrigálás tényezői a kimeneteli paraméter kiindulási értéke, a kiindulási életkor, valamint az életkor és a követési idő, illetve a paraméter kiindulási értéke és a követési idő közötti interakciós tényezők voltak (a nemre korrigálás indokolatlannak bizonyult). Az eredményeket az évenkénti változás becsült értéke és annak 95%-os konfidencia-intervalluma formájában fejeztük ki, vagy a kiindulási változó(k) függvényében (ha, volt szignifikáns interakció), vagy egyetlen átfogó mutatóval (szignifikáns interakciók hiányában), és olyan pontdiagramokon ábráztuk, amelyeken a függőleges tengelyen a kimeneteli paraméter kiindulási értéke, a vízszintesen a kiindulási életkor szerepelt, az adatpontok jelölési módja pedig utalt az időbeni változás irányára, szignifikanciájára és mértékére. A felhasznált statisztikai szoftver a Stata 11-es verziója volt. A szignifikancia kritériumaként az  $\alpha = 0,05$ -öt alkalmaztuk.

#### **4.3.2. Keratoconus progresszió**

Amennyiben egy páciens mindkét szeme ugyanabban a csoportban szerepelt, azaz a nem progresszív, vagy a progresszív csoportban, akkor csak az egyik, random módon kiválasztott szemet vettük be a vizsgálatba. A szem kiválasztása során random értékeket generáltunk Microsoft Excel segítségével úgy, hogy az érintett beteg jobb vagy bal szeme azonos valószínűséggel kerüljön kiválasztásra. Amennyiben a páciensnek az egyik KC-s szemén korábban invazív beavatkozást végeztek (CXL, transzplantáció), ez a szem automatikusan kizáródott a vizsgálatból – ilyen esetben mindig a másik szemet vontuk be a vizsgálatba. Abban

az esetben, ha az egyik szem progresszív, míg a másik nem progresszív volt, akkor mindkettőt bevettük a vizsgálatba. A mediátor koncentrációk és a Pentacam paraméter változók eloszlásának alakját megvizsgáltuk, és indokolt esetben transzformációt végeztünk a normális eloszláshoz közelítés érdekében. A könnymintákban mért mediátorfelszabadulást (release-t) a koncentrációból (pg/ $\mu$ l) és a két perc alatt gyűjtött könny mennyiségéből ( $\mu$ l) kalkuláltuk. Először a kiindulási és a követési periódus végén kapott Pentacam adatokat analizáltuk, hogy meghatározhassuk a betegség progresszióját, és így a vizsgálatban résztvevő 42 páciens szemeit besorolhassuk a két – nem progresszív, illetve progresszív – betegcsoportba. Ezután lineáris regresszió segítségével meghatároztuk a vizsgálati periódus alatt a könnymediátorok szintjében bekövetkezett változások, valamint a Pentacam paraméterekben történt változások közötti statisztikai korrelációkat. Harmadik lépésként logisztikus regressziót alkalmaztunk a könnymediátorok prediktív szerepének meghatározására. Vettük a mediátorok koncentrációjára vonatkozó változók, illetve hasonlóképpen a release változók összes lehetséges párosítását, és rendre folytonos magyarázó változókként használtuk őket – a köztük levő interakciós tényezővel együtt – a ténylegesen megfigyelt progressziót bináris kimenetelként kezelő logisztikus regressziós modellekben. Minden modell illesztése után a megfigyeléseket a progresszió prediktált valószínűsége alapján sorba rendeztük, és vizuális modelldiagnosztikai célból olyan küszöbértékkel dichotomizáltuk őket, hogy a progresszív esetek prediktált és megfigyelt száma azonos legyen. A legalább 50%-os prediktált progressziós valószínűségű megfigyeléseket vettük prediktált pozitívnak a modellek szenzitivitásának, specificitásának, valamint pozitív és negatív prediktív értékének (PPÉ és NPÉ) számszerű becslése során. Az összehasonlítás érdekében egy hasonló modellsorozat a Pentacam paraméterekből képzett lehetséges párokat magyarázó változókként használva is elkészítettünk. Az összehasonlítás alapja az egyes Pentacam alapú modellek osztályozási teljesítménygörbéje (ROC) alatti területnek (AUC) és a két legjobb mediátorfelszabadulás alapú modell ugyanezen mutatójának nemparaméteres eljárással végzett összevetése volt. Ezen modellek esetében nem a magyarázó változók mérési skáláján határoztuk meg az osztályozási küszöbértéket, hanem a modell által legalább 50%-osnak prediktált valószínűségeket tekintettük a progresszív betegség lefolyás pozitív predikciójának.

## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1. Életkorral összefüggő változások

Vizsgálatunk első részébe 35 egészséges, önként jelentkező európai random kiválasztott 35 személyt vontuk be (22 nő, és 13 férfi; 19 jobb és 16 bal szem). A résztvevők többsége nő volt (63%). A nemek között nem volt statisztikailag szignifikáns korkülönbség. Az első vizsgálatkor az átlagéletkor 31,8 év volt (standard deviáció (SD): 12,4, korintervallum: 14,2-66,9 év). A vizsgálatok között átlagosan 3,6 év telt el (SD: 0,92, korintervallum: 2,1-5,7 év). A kontrol időpontjában a résztvevők átlagéletkora 35,4 év volt (SD: 12,3, korintervallum: 16,4-69,2 év).

Mind a K1, mind a K2 értékek az elülső corneális felszínen szignifikáns csökkenést mutattak a megfigyelési időszak alatt ( $p=0,002$  és  $0,048$ ), melyeket nem kísért a  $K_{max}$  változása. A hátsó felszínen nem volt szignifikáns változás a K1 és a K2 értékek tekintetében. Az asztigmatizmus csak a hátsó corneális felszínen változott szignifikánsan az életkorral ( $p=0,022$ ). A lapos tengely szögének horizontálistól való átlagos deviációja a hátsó felszínen (K1 B)  $8,5^\circ$  volt ( $SD=7,3^\circ$ , intervallum:  $0,9-35,4^\circ$ ) a kiinduláskor és  $10,2^\circ$  ( $SD=7,3^\circ$ , intervallum:  $1,6-33,3^\circ$ ) volt a követési periódus végére. A különbség szignifikáns volt ( $p=0,027$ ). A kiinduláskori és a követési időszak végén mért lapos tengely szög az elülső corneális felszínen (K1 F) nem mutatott szignifikáns különbséget. Az elülső felszín erővektorait tekintve a Jackson keresztcilinder erővektor  $45^\circ$ -os komponense gyenge változást mutatott a kor előrehaladtával ( $p=0,047$ ).

A cornea pachymetriás jellemzőinek vizsgálata során megállapítottuk, hogy a Pachy Min szignifikáns csökkenést mutatott az életkorral ( $p<0,001$ ). Ezzel összhangban a corneális térfogat a centrális 10 mm-ben mérve szintén szignifikáns csökkenést mutatott a kor előrehaladtával ( $p=0,001$ ). A vizsgálati periódus alatt az IHA és IHD Pentacam indexek szignifikáns növekedést mutattak ( $p<0,001$ ), míg az ISV és IVA nem változott. A kiindulási életkort tekintve, az elülső keratometriás értékek (K1 és K2) jelentősebb mértékű csökkenést mutattak fiatalabb, mint idősebb egyéneknél. Bár a nem korrigált analízis nem mutatott szignifikáns különbséget a K1 és K2 értékekben a cornea hátsó felszínén, a korrigált statisztikai modell azt mutatta, hogy a K1B heterogén módon változik az alapérték, és bizonyos mértékig az életkor függvényében. Az alacsonyabb tartományba eső keratometriás értékek, amelyek fiatalabbaknál figyelhetők meg, szignifikáns növekedést mutattak az idő elteltével, míg a magasabb tartományba eső értékek ezzel ellentétesen változtak. Sem az elülső felszínen mért keratometrikus asztigmatizmus, sem pedig a J0 vektor nem mutatott szignifikáns változást az idő előrehaladtával. Ez a két változó a korrigált analízis során is stabilitást mutatott a kiindulási értékek teljes tartományában, valamint az életkor előrehaladtával is a követési idő során. A Jackson keresztcilinder erővektor  $45^\circ$ -os komponense borderline szignifikáns változást mutatott (korrigálatlan  $p=0,047$ ), melynek magyarázata az idősebbeknél szignifikánsan megnövekedett - alacsonytól a középtartományig terjedő - kiindulási J45 értékek; fiatalabbaknál és középestől a magas tartományba eső kiindulási értékekkel rendelkezőknél az idő előrehaladtával nem tapasztaltunk változást. A hátsó corneális felszín asztigmatizmusának életkorfüggő progresszióját vizsgálva kiindulási érték függő tendenciát láttunk: amennyiben a kiindulási asztigmatizmus alacsony volt, akkor szignifikáns növekedés, míg ha magas volt, akkor szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető a követési idő alatt; ez minden kiindulási korú résztvevőre igaznak bizonyult. A korrigált analízis azt mutatta, hogy mind a centrális 10 mm átmérőjű cornea térfogat, mind pedig a Pachy Min szignifikánsan csökken, különösen magasabb kiindulási értékeknél és bizonyos mértékben a kiindulási életkortól függően. Az alacsonyabb kiindulási értékű, illetve idősebb páciensek esetén kisebb a változás mértéke.

Azt találtuk, hogy a szaruhártya elülső felszínén a K1 és K2 értékek szignifikánsan csökkennek (bár a Kmax érték stabilan marad); a hátsó felszínen azonban csak a K1 magasabb tartományba eső értékei csökkennek szignifikánsan az idő előre haladtával ( $p=0,019$ ). Az elülső asztigmatizmus stabil marad az öregedéssel, míg a hátsó asztigmatizmus magasabb kiindulási abszolút értékei csökkenő tendenciát mutatnak. Az asztigmatizmus elülső tengelyei nem változnak az idővel; a kezdeti horizontális hátsó tengely szignifikánsan eltolódik vertikál felé, a vertikális, valamint ferde kiindulási szögek pedig horizontál felé mozdulnak. Míg a J0 stabil, a J45 szignifikánsan növekszik egy alacsony kiindulási értékről ( $p=0,012$ ). A C Vol D 10 mm és a Pachy Min értékek vastagabb corneákban erősebben csökkennek.

## 5.2 Keratoconus progresszió

42 páciens 45 szemét (átlag (SD) életkor 36,4 (12,3), 15-68 év) vettük be a vizsgálatba. A megfigyelési periódus végén két csoportba: nem progresszív KC (29 szem) és progresszív KC (16 szem) soroltuk a szemeket Pentacam paramétereik alapján. Általánosságban minden páciensnek csak az egyik szemét vettük be a tanulmányba, kivéve három páciens, akiknél az egyik szemük a nem progresszív, míg a másik szemük a progresszív csoportba került. A kiindulásnál a KC súlyossága a nem progresszív és progresszív csoportokban enyhe volt 4, illetve 0 esetben; mérsékelt 18, illetve 8 esetben; valamint súlyos 7, illetve 8 szemnél. Ugyanezen értékek egy év elteltével 5, illetve 0; 17, illetve 8; valamint 7, illetve 8 voltak. A kiindulásakor szignifikáns különbségek mutatkoztak a K2 ( $p=0,035$ ), Kmax ( $p=0,014$ ), a D-index ( $p=0,016$ ) értékekben, de más Pentacam értékekben nem, ide értve az asztigmatizmust is ( $p>0,05$ ). A követési periódus végén szignifikáns különbségek voltak a K2 ( $p=0,007$ ), a Kmax ( $p=0,0008$ ), a D-index ( $p=0,0396$ ), valamint az elülső felszín corneális asztigmatizmusában is ( $p=0,027$ ).

Kiindulásakor nem volt szignifikáns különbség a két csoport között, sem a release-ben, sem a mediátorok koncentrációjában. A vizsgálati periódus végére szignifikáns különbségek voltak az IFN $\gamma$ , IL-13, IL-17A, CCL5, MMP-13 és PAI-1 release-ben a két csoport között; azonban nem volt megfigyelhető szignifikáns különbség a két csoport mediátor koncentrációjában.

Szignifikáns különbségeket figyeltünk meg a progresszív és a nem progresszív csoportok között, hogyha a különböző könnymediátorok szintjét a Pentacam paraméterek változásaival korreláltattuk. A vizsgált nyolc Pentacam paraméterből öt változása mutatott pozitív korrelációt az IFN $\gamma$ , IL-13, IL17A, CXCL8, CCL5, TIMP-1 és t-PA szintek változásaival.

Az összes lehetséges kiindulási mediátor párosítások közül azok esetén mutatkozott jelentős KC progresszivitás előrejelzési potenciál, amelyekben IFN $\gamma$  és NGF, valamint IL-13 és NGF együttesen fordult elő. A progresszió fokozott esélye összefüggést mutatott a felszabadult NGF nagy mennyiségével önmagában, valamint mérsékelt nagy mennyiségével akkor, ha az alacsony IFN $\gamma$  vagy IL-13 mennyiséggel párosult. Az ezen változópárok által meghatározott sík nagyjából felosztható egy nem progresszív és egy progresszív területre. Az IFN $\gamma$  és az NGF felszabadult mennyiségére épülő modellnek elfogadható becslési specificitása és NP értéke, de mérsékelt szenzitivitása és PP értéke volt (ROC AUC = 0,9385), míg a

felszabadult IL-13-ra és NGF-re épülő változatot (AUC = 0,9692) igen magas specificitás és PPV jellemezte magas NPV és elfogadható szenzitivitás mellett.

A Pentacam paraméterpárok előrejelzési potenciálja hasonlóan vagy gyengébbnek mutatkozott (különösen az IL-13 és NGF viszonylatában), mint a könnymediátor párok hasonló potenciáljai AUC értékek szempontjából – melyek 0,3692-től 0,7385-ig terjedtek– az 56 Pentacam viszonylatból 40 szignifikánsan gyengébbnek mutatkozott a mediátorfelszabadulásra alapuló két modellnél.

## 6. MEGBESZÉLÉS

### 6.1. Életkorral összefüggő változások

Az öregedő corneában változások széles skálája figyelhető meg, ezek némelyike klinikailag releváns lehet a sebészi eljárások, többek között a cornea ektatikus rendellenességeinek kezelési tervében is. A cornea vastagságának életkorral összefüggő változásainak vizsgálati eredményei mégis ellentmondásosnak nevezhetők. A centrális corneális vastagság (CCT) gyerekek esetében másfél éves kor után stabilnak tűnik (a CCT átlagos változása  $-1,9 \pm 14 \mu\text{m}$  volt) míg más tanulmányok nem találtak szignifikáns összefüggést a corneavastagság és az életkor között. Ezzel szemben Rieth és munkatársai keresztmetszeti vizsgálatuk során szignifikáns szaruhártya-vastagság növekedést találtak idősebb korban. Az általunk végzett vizsgálatokkal összhangban, a korábbi tanulmányok túlnyomó többsége is statisztikailag szignifikáns fordított arányosságot talált az életkor és a cornea vastagsága között. Jelen vizsgálatunkban  $14 \mu\text{m}$  átlagos vastagságcsökkenést tapasztaltunk a cornea legvékonyabb pontján mérve, ami az eddigi longitudinális vizsgálatokat tekintve a legerőteljesebb csökkenésnek tekinthető ( $5\text{-}14 \mu\text{m}$  8,2 év alatt,  $3,5 \mu\text{m}$  3,8 év alatt, valamint  $2,6 \mu\text{m}$  5 év alatt Weizer, Brandt, valamint Hashemi kutatócsoportjának vizsgálatai szerint). A longitudinális vizsgálatok indulásakor a résztvevők átlagos életkora 50-től 60 éves korig terjedt, ami magyarázhatja, hogy miért mutatott az általunk vizsgált fiatalabb betegcsoport (átlagéletkor 31,8 év) kifejezettebb corneális elvékonyodást. Ez a megfigyelés azt látszik igazolni, hogy a corneális szövet degradációja erőteljesebb lehet fiatalabb életkorban. Csupán egyetlen olyan tanulmány van, ami Pentacam segítségével analizálja a cornea legvékonyabb pontjának vastagságváltozását. Ezen vizsgálat indulásakor a résztvevők életkora 41 és 64 év között volt (49,9 éves átlagéletkor), átlagos szaruhártya-vastagságuk  $524,9 \mu\text{m}$  (SD 32) volt, ami  $13 \mu\text{m}$ -rel vékonyabb, mint az általunk vizsgált 14-67 éves (31,8 éves átlagéletkor) pácienseké. A két különböző életkorú betegcsoport közötti corneavastagság különbség igazolja a longitudinális vizsgálatunk során megfigyelt életkor-függő cornea elvékonyodást.

A korábbi vizsgálatok során nem fordítottak túl sok figyelmet a cornea térfogatára, pedig érzékenyen követi annak topográfiai és pachymetriai változásait, és ezáltal igen fontos indikátora lehet a corneális egészségnek. Újabb tanulmányok ezen paraméter változását

vizsgálták akkomodáció során phacoemulzifikációval, refraktív sebészettel, és KC-val összefüggésben. Jelen tanulmányunkban életkorral összefüggő corneatérfogát csökkenést találtunk a centrális 10 mm-ben mérve. Érdekes módon ezen változás erőteljesebbnek mutatkozott magasabb kiindulási értékeknél és fiatalabb páciensek esetén. Ez a változás nagyon hasonló a corneális vastagság változásához, azonban az okuk még meglehetősen homályos. A vékonyabb cornea, az idősebbeknél megfigyelhető nagyobb fokú rigiditással összhangban, jó nyom lehet egy fiziológiás cross linking folyamat jelenlétére magasabb életkorú vizsgálati alanyok esetén. A cornea rigiditás életkorfüggő, hosszútávú változásának vizsgálata - ide értve a corneális hiszterézis, a corneális rezisztencia faktor, valamint a Pentacam paraméterek vizsgálatát - sokat segíthet a cornea fiziológiájának, valamint a háttérben zajló folyamatok megismerésében is. Mindazonáltal néhány kutató egy évtized alatt sem tudott szignifikáns változást kimutatni a CCT-ben. Ezen paraméterek fiziológiás, életkorfüggő csökkenését figyelembe kell vennünk a cornea ektatikus betegségeinek progressziójának megítélése során. Fontos, hogy célul tűzzük ki a progresszió megbízható előrejelzését, és a cross-linking terápia hatékonyságának monitorozását a corneális ectasiákban, a cornea fiziológiás, életkorhoz köthető változásainak figyelembe vételével.

Azt találtuk, hogy mindkét keratometriás mutató (K1 és K2) értéke szignifikáns csökkenést mutatott a cornea elülső felszínén a vizsgálati időszak alatt, míg a K max értéke stabil maradt. Adataink korrigált statisztikai analízise felfedte, hogy az elülső felszín keratometriás értékei kifejezettebb csökkenést mutatnak fiatalabb pácienseink esetében, mint idősebbeknél. Másrészt a magasabb K értékek sokkal stabilabbnak igazolódtak az idő múlásával életkortól függetlenül. Egy középkorúakkal és annál idősebbekkel végzett longitudinális vizsgálat során a K max növekedése 0,38 Dioptria ( $p < 0,001$ ) volt 5 év alatt. Ezen eredményekkel ellentétben Orucoglu és munkatársai szignifikánsan pozitív korrelációt találtak az elülső K1 és az életkor között, míg semmilyen összefüggést sem leltek a K2 és az életkor között. Jelen vizsgálatunkban a korrigálatlan analízis nem mutatott szignifikáns változást a hátsó felszín K1 és K2 értékeiben. Azonban a korrigált statisztikai modell felfedte, hogy a hátsó cornea felszín keratometriás értékeinek lapos tengelyen (K1B) mért rátája lehet hogy változik a kiindulási érték és az idő függvényében. Az alacsonyabb keratometriás értékek szignifikánsan növekednek az idő múlásával, míg a magasabb értékek ellenkezőleg változnak, azt sugallva ezzel, hogy a kapott értékek az szélsőséges elosztástól távolodnak.

Fontos, hogy a corneális asztigmatizmust olyan pontosan ismételhető és reprodukálható módszerekkel vizsgáljuk, - mint például a Scheimpflug képalkotás – amik megbízható adatokkal szolgálnak az asztigmatizmus életkorral bekövetkező változásairól, hogy ezáltal javíthassuk az intraokuláris lencsebeültetés és a refraktív sebészet hosszú távú eredményeit. Az asztigmatizmus életkorral bekövetkező változásait vizsgáló korábbi tanulmányok mind keresztmetszeti vizsgálatok voltak, és/vagy más eszközök használatával történtek. A teljes refraktív asztigmatizmus szabályostól szabálytalanig terjedő változását mutatták ki az életkor előrehaladtával a korábbi vizsgálatokban. Ho és Nemeth kutatócsoportja szerint, akik egyaránt Pentacamot használtak vizsgálataik során, egy

életkorhoz kötött csúszás figyelhető meg a szabálytalan és a szabályos asztigmatizmus felé az elülső, illetve a hátsó corneális felszíneken. Legjobb tudomásunk szerint, jelen vizsgálatunk az első olyan longitudinális vizsgálat, ami a keratometriás asztigmatizmus életkorral bekövetkező változásait vizsgálja a cornea elülső és hátsó felszínén. Ezen felül az eddigi vizsgálatok közül a miénk az, amely a populáció legszélesebb életkori sávját öleli fel. Egy keresztmetszeti és egy longitudinális vizsgálatban egyaránt azt tapasztalták, hogy az asztigmatizmus prevalenciája a kor előrehaladtával növekszik, míg más keresztmetszeti vizsgálatok azt mutatták ki, hogy a keratometriás asztigmatizmus szignifikánsan csökken az életkorral mind a cornea elülső, mind pedig a hátsó felszínén. Az általunk kapott eredmények igen hasonlatosak ezekhez, bár tanulmányunkban a keratometrikus asztigmatizmus szignifikáns csökkenése ( $p=0,02$ ) csak a hátsó corneális felszínen volt szignifikáns, míg az asztigmatizmus stabil maradt az elülső felszínen. Ezen felül a hátsó asztigmatizmus a kiindulási értéktől függő szignifikáns növekedést mutatott alacsony kiindulási értékek esetén, míg szignifikáns csökkenést magas kiindulási értékek esetén, a kiindulási életkorral való heterogenitás nem volt bizonyítható. Eredményeink ellentétesen bizonyultak a Nemeth és munkatársai által levont következtetésekkel, miszerint a cornea hátsó felszíne sokkal stabilabb az életkor előrehaladtával, mint az elülső felszín, annak ellenére, hogy a két tanulmány etnikai összetételében és vizsgálati módszereiben nem volt különbség. Az idő elteltével a hátsó keratometriás lapos tengely átlagértéke vertikális, ( $p=0,004$ ) vagy ferde ( $p=0,004$ ) kiindulási síkból horizontális irányba csúszott, ami korábbi vizsgálatok eredményeivel is összecseng, bizonyítva, hogy az elülső corneális topográfias asztigmatizmus a szabályostól a szabálytalan asztigmatizmus irányába változott idősebb páciensek esetében.

A vektoranalízis lehetővé teszi az asztigmatizmus karakterisztikájának teljes leírását. Az elülső felszín erővektorainak kiértékelése során a Jackson féle keresztcilinder erővektor  $45^\circ$ -os komponense szignifikáns változást mutatott az életkor előrehaladtával (korrigálatlan  $p=0,047$ ), aminek a magyarázata az idősebb páciensek esetén az alacsonytól közepes tartományba eső kiindulási J45 érték alapvető növekedése; fiatalabb páciensek és közepestől magasabb tartományba eső kiindulási értékek esetén nem volt változás az életkor előrehaladtával. Eredményeink azonosak azokkal a korábbi eredményekkel, miszerint nemcsak az elülső asztigmatizmus, hanem a J0 vektor is stabilnak mutatkozik az öregedéssel. Vizsgálataink alapján egy átlagosan négy éves megfigyelési periódus alatt az elülső asztigmatizmus tengelye nem változott szignifikánsan.

Vizsgálatunk limitációja a szerény mintaszám, ami eleve kizárja a messzemenő következtetések levonását, valamint a tény, hogy csak olyan európai alanyokat vontunk be, akiknek kismértékű refrakciós hibája volt ( $<1,5$  D). Jelen pillanatban nem tudjuk megmondani, hogy az általunk megfigyelt változások lineárisak-e az életkorral. Továbbá, mivel a nagyobb refrakciós hibával rendelkező páciensek nem vettek részt a vizsgálatban, így nem lehet megbecsülni a refraktív sebészet eredményének hatékonyságát a későbbi évtizedekre. Ezen limitációk ellenére nagyon fontos kiemelni, hogy eredményeink rávilágítanak arra a tényre,

hogy a K1F, K2F, K1B, AstigB, Pachy Min, és a corneális térfogat szignifikánsan csökkentek; az IHA, IHD, és a J45 vektor szignifikánsan növekedett, míg az AxisB átlaga szignifikáns változást mutatott az életkorral.

Longitudinális vizsgálatunk erőssége, hogy megbízható, ismételhető adatokat szolgáltat a Pentacam HR készülék által. Ezentúl, a vizsgálati csoportban 14-67 éves életkorú alanyok szerepeltek, ami egy igen széles kortartományt jelent az életkorfüggő változások megbecsléséhez és a különböző kiindulási életkorral való asszociáltatásához. Elsőként figyeltük meg, hogy az életkor és a corneális paraméterek kiindulási értékei hatással vannak az életkorral bekövetkező corneálisváltozásokra. Legjobb tudomásunk szerint, ez az első olyan prospektív hosszú követési idejű longitudinális vizsgálat, mely feltárja az egészséges cornea több paraméterének életkorral bekövetkező változásának klinikailag releváns következményeit Pentacam készülékkel vizsgálva. Összegezve: megfigyeléseink alátámasztják a feltevésünket, és klinikai relevanciával bírnak, mert a cornea elülső és hátulsó felszínének életkorral bekövetkező változásait figyelembe kell vennünk az asztigmatizmus műtéti korrekciójának tervezése során.

## **6.2. Keratoconus progresszió**

Számos korábbi tanulmány rámutatott arra, hogy a gyulladáshoz vezető faktorok kulcsszerepet játszanak a KC patomechanizmusában, és számos összefüggést kimutattak a gyulladáshoz vezető mediátorok szintje és a betegség súlyossága között. A könnymediátor profil, mint a KC noninvaszív biomarkere, prognosztikus jelentőséggel bírhat és elősegítheti ezen heterogén betegség megfelelő időben történő kezelését is. Legjobb tudomásunk szerint eddig nincs olyan longitudinális vizsgálat, amely a könnymediátorok szerepét vizsgálná a KC valós progressziójának előrejelzése érdekében.

Vizsgálataink igazi klinikai jelentőségét az adja, hogy a jelenlegi mediátorszintekből előre megmondható az, hogy a későbbiekben várható-e a KC progressziója. Ez egy olyan megközelítést jelent, ahol a kiindulási szintekből közvetlenül megjósolható a betegség kimenetele, a vizsgálati periódus végének mediátorszintjeinek ismerete nélkül is, ezáltal a KC progressziója bináris kimenetellé válik. Egy másik érdekes aspektus a különböző mediátorok közötti kölcsönhatás lehetősége: előfordulhat, hogy egyetlen mediátornak önmagában nincs prediktív jelentősége, míg egy bizonyos mediátor kombinációnak - pl. egyiknek a magas koncentrációja egy másik alacsony koncentrációjával együtt - érzékeny prediktív hordereje lehet. Eredményeink azt mutatják, hogy egyes mediátorok előre jelezhetik a KC progresszióját, valamint fontos szerepet játszanak a betegség patomechanizmusában is. Későbbi vizsgálatok célja lehet ezen gyulladáshoz vezető faktorok célpontként használata a KC gyógyításában, hogy helyreállíthassuk a KC patogenezisében szerepet játszó szabályozatlan gyulladáshoz vezető mechanizmusokat. Ez megnyithatja bizonyos gyulladáshoz vezető stratégiák felfedezésének lehetőségét, ami elvezethet a KC progressziójának megállításához, vagy lassításához.

Tanulmányunkban az IFN $\gamma$  és az NGF, valamint az IL-13 és az NGF release együtt mutatott jelentős prediktív erőt a KC progressziójának megítélésében: magas és mérsékelt magas NGF alacsony IFN $\gamma$  vagy IL-13 szinttel együtt a KC progressziójával társult. A modellek alapján úgy tűnik, hogy az előrejelzés az IL-13 és NGF release figyelembevételével a leghatékonyabb: 100% specificitást és PPV-t mutatott, 93%-os NPV mellett, és még elfogadható szenzitivitással (80%). Martínez-Abad és munkatársai a KC progresszió megjósolására egy refraktív, topográfias, valamint aberrometriás változásokra alapozó prediktív modellt terveztek. Eredményeink azt sugallják, hogy a Pentacam paraméterekhez viszonyítva a mediátor release szintek meghatározása legalább azonos, de potenciálisan erősebb lehet a KC progressziójának előrejelzésében. Ezt természetesen további vizsgálatoknak kell megerősítenie, melyek ezen kérdés meghatározására összpontosítanak. Karaca és kollégái a szérumban neutrofil-limfocita arányát (NLR) használták a KC progressziójának előrejelzésére, ezen ráció különböző betegségek által okozott szisztémás gyulladások esetén való prediktív képességére alapozva. Bár az NLR egyszerű és olcsó, de a KC progressziójának előrejelzésében csak 71%-os szenzitivitással és 81%-os specificitással rendelkezik.

Véleményünk szerint a könnyminták gyűjtése egy atraumatikus és non-invazív eljárás, ami jól reflektálhatja a lokális patológiás elváltozásokat, például a KC-t. Tanulmányunk eredményeire alapozva úgy tűnik, hogy az IFN $\gamma$ , IL13, IL-17A, CXCL8, CCL5, MMP-13, TIMP-1, t-PA, PAI-1 és NGF mediátorok kulcsszerepet játszanak a KC progressziójában; a predikcióban az IL-13 és az NGF szerepe a legfontosabb. Szignifikáns pozitív összefüggést találtunk a KC-s páciensek könnymintáiban a CCL5, MMP-13 és NGF szintek és számos topográfiai adat között; valamint kimutattuk, hogy az IL-13, CXCL8, CCL5 és MMP-13 mediátoroknak az életkortól függően különböző a hatásuk a betegség súlyosságára. Az életkor befolyásolja az immunválaszt, valamint a KC progresszivitásának természetét is. Szignifikáns különbségeket találtunk az IL-13, CCL5, MMP-13, valamint az IFN $\gamma$ , IL-17A és PAI-1 release-ben a két csoport között, ami ezen mediátorszintek döntő jelentőségét mutatja, nemcsak a KC patomechanizmusában, hanem a progressziójában is. A Th1 sejtek által termelt IFN $\gamma$  összefüggésbe hozható az autoinflammatorikus és autoimmun betegségekkel. Emelkedett IL-13 és IFN $\gamma$  koncentrációt találtunk a KC-s páciensek könnymintáiban. Jun és kollégái kimutatták, hogy KC esetén szignifikánsan magasabb volt a könny IL-17 szintje, míg az IL-13 és CCL5 szintje alacsonyabb volt a normál kontrolhoz viszonyítva. Az IL-17 a legfőbb, T helper 17 sejtek által termelt proinflammatorikus citokin, amely összefüggésben van több, krónikus gyulladásos állapottal. Vizsgálataink alapján az IFN $\gamma$  és az NGF, valamint az IL-13 és az NGF együttes jelenléte prediktív indikátorai a KC progressziójának. Az IFN $\gamma$  sokféle biológiai funkcióval bír, ugyanúgy, mint a Th2 sejtek által termelt IL-13, valamint az IL-10 is. Az IL-13 kulcs szerepet játszik a Th2 válasz felerősítésében, ami KC-ban elfojtott. Balasubramanian és kutatócsoportja KC-s páciensek esetén megnövekedett IL-10 és IL-6 szinteket észleltek, és így a betegséget a gyulladásos elváltozások közé sorolták. Érdekes módon mi nem tapasztaltunk különbséget az IL-6 vagy az IL-10 könny szintjeiben a progresszív- és a nem progresszív KC-s betegcsoportjainkban, míg Lema és munkatársai megnövekedett IL-6, Sorkhabi kutatócsoportja pedig alacsonyabb IL-10 szinteket mért KC-s könnymintákban. Az IL-6 fokozza

a kemokin aktivációt, mint pl. a CXCL8-ét (ami a vizsgálatunkban magasabb volt a progresszív csoportban), az IL-10 pedig gátolja az IL-6-ot. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a citokin interakciók szerepet játszhatnak a patomechanizmusban, de kevesebbnek lehet szignifikáns jelentősége a betegség progressziójában, és csak néhány lehet alkalmas a progresszió predikciójára. Vizsgálatunk célja a KC progressziójának előrejelzésében jelentős biomarkerek azonosítása, ezáltal a progresszió minél korábbi felismerése ebben a látást gyengítő betegségben.

Az NGF magasabb könnykoncentrációja a progresszív KC-ban szenvedő pácienseknél összhangban van ennek a neuromediátornak a jól ismert neuroszenzitizáló hatásával. Kolozsvári és kutatótársai nem csak betegség specifikus mediátorokat mutattak ki a könnyből, de még a könnymediátorok, például NGF és a KC súlyossága között is asszociációkat találtak. Az NGF köztudottan a könnymirigyekben termelődik, innen szabadul fel, vagyis ez a szerv felel az NGF-ért, ami a könnyfilm normál összetevője. Az NGF könny szintje és a cornea károsodásának mértéke közötti korreláció jól ismert a szemszárazságban szenvedő páciensek esetén, ezentúl az is ismert, hogy az NGF szerepet játszik a cornea gyógyulásában mind fiziológiás, mind pedig patológiás körülmények között, valamint a cornea sérülései maguk is indukálják a lokális NGF termelődést, valamint az NGF receptorokat, hogy stimulálják az epitheliális sebgyógyulást. Ezek a megfigyelések azt sugallják, hogy az NGF szerepet játszhat a lokális szövetkárosodásban. A proinflammatorikus citokinek, proteolitikus enzimek, proteáz inhibitorok, gyulladáscsökkentő modulátorok és antioxidánsok közötti kiegyensúlyozatlan viszony a metalloproteinázok megnövekedett aktivitásához vezethet. Számos tanulmány vizsgálta a proteolitikus enzimek, mint pl. az MMP-k szerepét KC-ban. Az MMP-k szerepet játszanak az extracelluláris mátrix (ECM) degradációjában, valamint a celluláris apoptózis aktiválásában. KC-ban a cornea megnövekedett MMP-13 szintet mutat, és a könny MMP-1, -3, -7, valamint -13 mennyisége is emelkedett. Az MMP-k enzimatis aktivitása a TIMP mennyiségétől függ, ami az MMP-k egyik lehetséges inhibitora. Pouliquen és munkatársai azt találták, hogy egyes citokinek, köztük a CXCL8, szabályozzák a proteáz kaskád - ide értve a plazmin rendszert, a t-PA-t és PAI-t is, valamint az MMP-eket, ami KC-ban az ECM változásaihoz vezethet.

Mivel a KC progressziója súlyos, visszafordíthatatlan látásromlást okozhat, ezért nagyon fontos lehet azoknak a mediátoroknak a meghatározása, amelyek időben és érzékenyen előrejelzik a betegség lehetséges jövőbeni progresszivitását azért, hogy a progresszív betegek időben CXL kezelésben részesülhessenek. Vizsgálatunk limitációja, hogy az nem kizárható, hogy egyéb, nem vizsgált mediátorok is részt vesznek a KC-s cornea progressziójában, valamint a mediátorok forrásának és aktivitásának a meghatározása sem történt meg. A könnyminták nélkülözhetetlen tényezői a progresszió molekuláris mechanizmusainak megértéséhez és a multiplex platform pedig ideális eszköz a könnymintákból származó biomarkerek meghatározásához. Ideális esetben mivel a betegség progressziója meg fog állni egy ponton, amit a mediátorszintek megváltozása kísérhet, pl. az NGF és IL-13 csökkenése, hasznos lenne a progresszív KC-ek szemét monitorozni kezelés nélkül hosszabb ideig; azonban tanulmányunkban a progresszív KC-s szemek CXL terápiát

igényeltek és kaptak, ezáltal a hosszú távú megfigyelést lehetetlenné téve. Ezen limitációk ellenére is fontos kiemelni, hogy vizsgálatunk rámutatott arra a tényre, hogy nagyszámú mediátor játszik szerepet a KC progressziójának összetett mechanizmusában. További vizsgálatok lennének szükségesek arra vonatkozóan, hogy az általunk vizsgáltak közül, vagy esetleg más mediátorok lennének-e a legalkalmasabbak a KC progressziójának előrejelzésében.

Következtetésképpen megállapítható, hogy tanulmányunk eredményei megerősítik azt, hogy a könnyben megtalálható különböző mediátorok előrejelezhetik a KC progresszivitását. Eredményeink alátámasztják az NGF és IL-13 fontos szerepét, melyek együttes előfordulással hasznosnak látszanak a KC progressziójának előrejelzésében 100%-os specificitással és PPV-vel, 93%-os NPV-vel, valamint 80% szenzitivitással. A lokálisan felszabaduló mediátorok kiegészítő bizonyítékot adnak a CXL kezelések indikálásához a KC progressziójának megakadályozásában. Következő lépésként ezen mediátorok kritikus szintjének, valamint a prediktív biomarkerek pontos szerepének egy nagyobb betegcsoporton történő meghatározása szükséges. Ezek a vizsgálatok azt is lehetővé tennék, hogy ezeket az anyagokat már ne csak diagnosztikus biomarkerként, hanem terápiás lehetőségként is felhasználhassuk a jövőben. A biomarkerek potenciálisszerepe, hogy a valódi életben részesei legyenek a KC progressziót előrejelző rendszernek egyéb Pentacam paraméterekkel, az életkorral, s további elérhető adatokkal együtt.

## **7. ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA**

- I. Egészségesekben számos összefüggést találtunk a corneális Scheimpflug-paraméterek életkorral változó prospektív analízise során az életkor és a cornea szerkezetének változás között. Elsőként figyeltük meg, hogy az életkor és a corneális paraméterek kiindulási értékei hatással vannak az életkorral bekövetkező corneális változásokra.
- II. Meghatároztuk 13 különböző immun mediátor (IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-13, IL-17A, CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, MMP-9, MMP-13, NGF, TIMP-1, t-PA és PAI-1) koncentrációját KC-s betegek könnymintáiból, és a vizsgálati periódus végére szignifikáns különbségeket találtunk az IFN $\gamma$ , IL-13, IL-17A, CCL5, MMP-13 és PAI-1 release-ben a progresszív és nem progresszív csoportok között.
- III. Vizsgáltunk során öt Pentacam paraméter változása mutatott pozitív korrelációt az IFN $\gamma$ , IL-13, IL17A, CXCL8, CCL5, TIMP-1 és t-PA szintek változásaival.
- IV. Az összes lehetséges kiindulási mediátor párosítások közül azok esetén mutatkozott jelentős KC progresszivitás előrejelzési potenciál, amelyekben IFN $\gamma$  és NGF, valamint IL-13 és NGF együttesen fordult elő. Magas és mérsékelten magas NGF alacsony IFN $\gamma$  vagy IL-13 szinttel együtt a KC progressziójával társult. A modellek alapján úgy tűnik, hogy az előrejelzés az IL-13 és NGF release figyelembevételével a leghatékonyabb: 100% specificitást és PPV-t mutatott, 93%-os NPV mellett, és még elfogadható szenzitivitással (80%).

## 8. ÖSSZEFOGLALÁS

Az öregedés fiziológiás folyamat, és néha nehéz megkülönböztetni az idő okozta biológiai változásokat a környezeti ártalmak következményeitől. Az életkorfüggő változások a szem minden struktúrájában kialakulnak, eltérő következményekkel. Számos korábbi tanulmány vizsgálta a corneális paraméterek normál, életkorral összefüggő változásait, ezek többsége keresztmetszeti vizsgálat volt, nem pedig longitudinális.

A KC a cornea progresszív, ectatikus megbetegedése heterogén klinikai súlyossággal és változatos progresszióval. A legutóbbi tanulmányok azt sugallják, hogy pathogenezise összetett, genetikai, biomechanikai, biokémiai és környezeti rizikófaktorok /gyulladás, allergia, oxidatív stressz/ hatásának eredménye lehet.

Célul tűztük ki a corneális Scheimpflug-paraméterek életkorral változó prospektív analízisét egészségesekben, valamint olyan immunmediátor kombinációk meghatározását, amelyek érzékenyen kimutathatják a KC progresszióját.

Vizsgálatunk első részébe 35 önként jelentkező (14-67 év) egy-egy szemét vontuk be egy átlagosan 3,6 éves időintervallum alatt. Corneális paraméterek és indexek változását vizsgáltuk. A K1F és K2F szignifikáns csökkenést mutatott a megfigyelési időszak alatt, fiataloknál jelentősebb mértékben, mint időseknél. A magasabb értékek nagyobb stabilitást mutattak. A K1B értéke szignifikánsan csökkent az eltelt idő alatt. A csökkenés mértéke a kiindulási értéktől, illetve a vizsgált egyén korától függött: fiatalok esetében az alacsony értékek növekedtek, míg a magas értékek csökkentek. Az AstigB szignifikánsan csökkent, és egy kiindulási értékektől függő szignifikáns növekedést mutatott az alacsonyabb, valamint szignifikáns csökkenést mutatott a magasabb kezdeti értékek esetén. Az átlagos AxisB érték szignifikáns változást mutatott az eltelt idő alatt. A Pachy Min és CV értékek szignifikánsan csökkentek az életkor előrehaladtával, különösen a magasabb kiindulási értékű fiatal páciensek esetén. Az IHA és az IHD szignifikánsan növekedett.

Tanulmányunk második részében 42 KC-s páciénstől gyűjtöttünk könnymintákat a kiindulási vizsgálatkor, valamint az egy éves kontrolkor. 13 mediátor koncentrációját vizsgáltuk CBA (cytometric bead array) segítségével. A Pentacam HR vizsgálat eredményei alapján a vizsgálatban részt vevő szemeket két csoportba: a non-progresszív, illetve a progresszív csoportba osztottuk. A megfigyelési periódus végén szignifikáns változásokat figyelhettünk meg az INF $\gamma$ , IL-13, IL-17A, CCL5, MMP-13, valamint a PAI-1 felszabadulásban a két csoport között. A változások öt Pentacam paraméterben pozitív korrelációt mutattak az INF $\gamma$ , IL-13, IL-17A, CXCL8, CCL5, TIMP-1 és t-PA változásaival. Azt találtuk, hogy a könny IL-13 és NGF koncentrációjának együttes vizsgálata a KC progresszióját 100%-os specificitással, és 80%-os szenzitivitással képes megjósolni.

Első longitudinális tanulmányunk eredményei azt sugallják, hogy mindkét corneális felszín változik az életkorral. Eredményeink az elsők, melyek bemutatják, hogy az életkor, illetve a kiindulási értékek befolyásolják az életkorfüggő corneális változásokat. Második longitudinális vizsgálatunk eredményei hangsúlyozhatják a könny NGF és az IL-13 szint fontosságának szerepét a KC progressziójában.

Ahhoz, hogy a jövőben további fejlődésre legyenek lehetőségeink, szükséges, hogy teljesen megértsük a cornea normál öregedésének komplex mechanizmusát és patológias állapotait. Az öregedéssel járó elváltozások létrejöttének magyarázatára az egyik alapvető elmélet a szabadgyök teória. Ez alapján a szabadgyökök - reaktív oxigén gyökök - az öregedés okai, az általuk okozott oxidatív sejtkárosító hatás által. Másrészt az oxidatív stressz-indukálta sejtkárosodás alapvető szerepet játszik a KC patomechanizmusában is. Ezen megfigyeléseinkhez igazodva, további könnyvizsgálatokra van szükség, hogy megérthessük a szabadgyökök szerepét a fiziológias öregedési folyamatok, illetve a cornea ektatikus elváltozásainak progressziója során is.

## 9. FÜGGELÉK



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/290/2020.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Vitályos Géza

Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Fodor, M., **Vitályos, G.**, Losonczy, G., Hassan, Z., Pásztor, D., Gogolák, P., Kolozsvári, B. L.: Tear Mediators NGF along with IL-13 Predict Keratoconus Progression. *Ocul. Immunol. Inflamm.* [Epub ahead of print], 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/09273948.2020.1716024>  
IF: 2.112 (2019)
2. **Vitályos, G.**, Kolozsvári, B. L., Németh, G., Losonczy, G., Hassan, Z., Pásztor, D., Fodor, M.: Effects of aging on corneal parameters measured with Pentacam in healthy subjects. *Sci Rep.* 9 (1), 3419, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-39234-x>  
IF: 3.998

### További közlemények

3. Pintér, Z., Rill, L., **Vitályos, G.**, Borbásné Farkas, K., Kolarovszki, B., Frank, D.: A Moyers-féle vegyes fogazati analízis alkalmazhatóságának vizsgálata a magyarországi lakosság körében. *Orv. hetil.* 160 (50), 1984-1989, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2019.31571>  
IF: 0.497
4. **Vitályos, G.**, Takács, A., Borbásné Farkas, K., Faragó-Ládi, E., Kolarovszki, B., Bártfai, D., Frank, D.: Comparison of the effect of premolar extraction and non-extraction on the position and developmental changes of the lower third molars. *Int. Orthod.* 16 (3), 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ortho.2018.06.007>
5. Bakó, J., Kelemen, M., Szalóki, M., **Vitályos, G.**, Radics, T., Hegedűs, C.: Fogsor alaplmezéből kioldódó allergének kötődésének vizsgálata Fourier-Transzformációs Felületi Plazmon Rezonancia (FT-SPR) módszerrel. *Fogorv. Szle.* 108 (1), 13-18, 2015.





6. Szepesi, M., Radics, T., **Vitályos, G.**, Hegedűs, C.: Fogászati anyagokkal szemben kialakuló allergiás megbetegedések és ellátásuk hatékonyságának vizsgálata az észak-alföldi régióban.  
*Fogorv. Szle. 107 (4), 135-139, 2014.*
7. **Vitályos, G.**, Török, J., Márton, I., Szepesi, M., Radics, T., Hegedűs, C.: Allergiás betegek fogszabályozó kezelésének lehetőségei: esetismertetés.  
*Fogorv. Szle. 100 (2), 71-76, 2007.*
8. **Vitályos, G.**, Török, J., Hegedűs, C.: A preprotetikai ortodoncia jelentősége a felső kismetszők hiányának interdiszciplináris terápiájában: esetismertetés.  
*Fogorv. Szle. 98 (6), 223-228, 2005.*
9. Hegedűs, C., Lampé, I., **Vitályos, G.**, Daróczy, L., Beke, D. L.: A titán es alkalmazhatóságának sajátosságai fémallergiás betegek fogpótlásának készítésénél.  
*Fogorv. Szle. 97 (6), 239-246, 2004.*
10. Madlén, M., **Vitályos, G.**, Marton, S., Nagy, G.: Effect of chlorhexidine varnish on bacterial levels in plaque and saliva during orthodontic treatment.  
*J. Clin. Dent. 11 (2), 42-46, 2000.*
11. Szentkirályi, P., **Vitályos, G.**, Szilágyi, A., Marton, S., Keszthelyi, G., Madlén, M.: Turner-szindrómás betegek kefalometriai analízise.  
*Fogorv. Szle. 93 (12), 355-364, 2000.*

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 6,607**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
6,11**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2020.10.15.



## 10. TÁRGYSZAVAK

betegség progresszió  
öregedés  
keratoconus  
könny  
mediátorok  
Scheimpflug paraméterek  
Pentacam  
longitudinális vizsgálat  
topográfias és tomográfias indexek

## 11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni és végtelen hálámat kifejezni témavezetőmnek, Dr. Fodor Mariannak, a DEKK Szemklinika igazgatónőjének áldozatos segítségnyújtását, ezen a hosszú úton adott bátorítását, magas szintű szakmai irányítását és értékes tanácsait, melyek nélkülözhetetlenek voltak számomra munkám elkészítése során. Köszönöm Dr. Polyák-Pásztor Dorottyának, a DEKK Szemklinika orvosának, hogy PhD értekezésem elkészítése során mindig segítséget nyújtott és megosztotta velem tapasztalatait, valahányszor szükségem volt rá. Köszönettel tartozom minden szerzőtársamnak, különösen Dr. Kolozsvári Bence barátomnak, a DEKK Szemklinika adjunktusának, hogy végig biztatott munkám során és szakmai tapasztalatait hasznosíthattam. Köszönöm Dr. Hassan Ziadnak, és az Orbident Kft. asszisztensnőinek, hogy lehetővé tették számomra a Pentacam használatát. Köszönöm a DEKK Szemklinika asszisztenseinek a könnyminták gyűjtése során nyújtott segítségét. Köszönet Dr. Kardos Lászlónak, a nélküle, számomra bizonyára kivitelezhetetlen statisztikai számítások rendszeres és igényes formában történő elvégzéséért. Szeretném megköszönni a DEKK Fogorvostudományi Kar dékánjának, Dr. Bágyi Kingának, hogy lehetővé tette számomra munkám elvégzését és befejezését. Köszönöm a DEKK FOK Fogszabályozási Tanszéken dolgozó közvetlen munkatársaimnak a türelmet. Végül, de nem utolsó sorban, hálásan köszönöm az összes kutatásban résztvevőnek a részvételt, valamint feleségemnek, Dr. Cserháti Andreának, kislányomnak Dálának, barátaimnak és családom többi tagjának a sokrétű és nagyon türelmes támogatását és szeretetét.