

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**PLAZMINOGÉN AKTIVÁTOR AKTIVITÁS
VÁLTOZÁSA A KÖNNYBEN FOTOREFRAKTÍV
EXCIMER LÉZERKEZELÉS UTÁN**

DR. CSUTAK ADRIENNE



**DEBRECENI EGYETEM ORVOS- ÉS
EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM, ÁLTALÁNOS
ORVOSTUDOMÁNYI KAR SZEMKLINIKA**

1	RÖVIDÍTÉSEK ÉS MOZAIKSZAVAK JEGYZÉKE	3
2	BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK.....	4
3	IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	7
3.1	A refrakciós sebészeti beavatkozások rövid története.....	7
3.2	Az excimer lézerkezelés hatása a cornea különböző rétegeire	9
3.3	A plazminogén aktivátor-plazmin rendszer jelentősége a könnyben.....	12
4	BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	16
4.1	Humán beteganyag	16
4.2	Kísérleti állatok	16
4.3	Lézerkezelés	16
4.4	Posztoperatív kezelés	17
4.5	A corneális sebgyógyulás értékelése.....	18
4.6	Könnymintavétel	18
4.7	Plazminogén aktivátor aktivitás mérés.....	19
4.8	Statisztikai módszerek.....	20
5	EREDMÉNYEK	21
5.1	Humán	21
5.2	Állatkísérletek	27
6	MEGBESZÉLÉS	32
7	AZ ÚJ EREDMÉNYEK ÉS AZOK LEHETSÉGES GYAKORLATI ALKALMAZÁSÁNAK ÖSSZEFOGLALÁSA.....	36
8	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	38
9	IRODALOMJEGYZÉK	39
10	SAJÁT KÖZLEMÉNYEK.....	47
10.1	Publikációk.....	47
10.2	Referált folyóiratban megjelent absztraktok	48
11	MELLÉKLETEK	49
11.1	Az egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés témájához szorosan kapcsolódó, közlés elbírálásra benyújtott angol nyelvű publikációk	49
11.1.1	<i>Plasminogen activator activity and inhibition in rabbit tears after photorefractive keratectomy.....</i>	49
11.1.2	<i>Plasminogen Activator for Promoting Wound Healing After Laser Vision Correction Surgery.....</i>	63

1 RÖVIDÍTÉSEK ÉS MOZAIKSZAVAK JEGYZÉKE

haze	- corneális stromahomály
im.	-intramuszkuláris
IU/ml	-nemzetközi egység/ml
n	-esetszám
LASIK	-laser in situ keratomileusis
p	-statisztikai valószínűség
PA	-plazminogén aktivátor
PAA	-plazminogén aktivátor aktivitás
PAI	-plazminogén aktivátor inhibitor
PMN	-polimorfonukleáris granulociták
Pmn	-plazmin
PRK	-fotorefraktív keratektómia
SD	-standard deviáció
SPI	-szerin proteináz inhibitor
tPA	-szöveti típusú plazminogén aktivátor
uPA	-urokináz típusú plazminogén aktivátor

2 BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A veleszületett és szerzett fénytörési hibák korrekciója az emberiség régi álma, ám az egész életre szóló, tökéletes látóélességet biztosító megoldást a mai napig nem sikerült megtalálni. Napjainkban ezen álmat megvalósítani célzó, nem veszélytelen és nem is korlátlanul ismételhető, refraktív sebészeti módszerek igen látványos fejlődésen mennek keresztül. A medicinának a szemészet az a területe, ahol a világon elsőként alkalmaztak lézer készülékeket, és mind a mai napig a legnagyobb számban alkalmazzák azokat. Schawlow és Townes korai munkásságát követően, Theodore Maiman volt az, aki a gyakorlatban is alkalmazásra került első lézerkészüléket (rubin) az 1960-as években megalkotta.^{1,2} A szaruhártya törőerő befolyásolására is alkalmas lézerek megjelenése azonban még éveket váratott magára. A nemesgáz-halogén molekulák disszociációja során felszabaduló ultraibolya spektrumú elektromágneses sugárzás felfedezését követően (Velazco, 1975), a technika további fejlődésének köszönhetően az 1980-as évek végére jelent meg, az alapvetően új fizikai elven működő excimer lézer.³ Így az irodalom jelenleg több mint 10 éves tapasztalatról számolhat be a fotorefraktív excimer lézerkezelések területén. A fotorefraktív keratektómiának (PRK) a látásélességet is befolyásoló leggyakoribb komplikációi a refrakciós regresszió, valamint a bizonyos dioptria szám feletti korrekciót követően megjelenő szubepiteliális lokalizációjú homályok (haze) a corneában.^{4,5}

A corneális stromahomály megjelenésére általában, az operációt követő első, valamint a harmadik és hatodik hónap közötti időszakban kell számítani. A hámfosztott cornea re-epitelizációja ugyan a 4. posztoperatív napra általában befejeződik, ám az epitélium teljes vastagságát csak a 6. hónapra nyeri vissza.⁶ A re-epitelizációt követő haze kialakulásáért valószínűleg a stromában aktiválódó keratociták és a bevándorló gyulladásosejtek tehetősek felelőssé. Ezen aktivált keratociták olyan kollagén fibrillumokat termelnek, melyek struktúrája eltér a normálistól. Ezáltal a stroma megvastagszik, hiperpláziássá válhat, minek

következtében a corneális törőerő megváltozik, és myopiás regresszió következik be. Természetesen a stromális hiperplázia csak egyik lehetséges oka a myopiás „shift” kialakulásának, hiszen az epitéliumot is érintheti hasonló jellegű elváltozás.^{7,8}

Ismereteink szerint, a sebgyógyulási folyamatokat két nagy rendszer szabályozza aktivátorok és inhibitorok útján. Az első, ún. **plazminogén aktivátor-plazmin rendszer** jelentőségét a degradációban, valamint a károsodott extracelluláris mátrix eltakarításában kifejtett szerepe adja.^{9,10} A másik rendszer az **aktivált keratociták** révén, a károsodott kollagén struktúrák helyére újonnan szintetizálendő kollagén fibrillumok létrehozásáért felelős.¹⁰⁻¹⁵ A fent ismertetett rendszerek megfelelő működése elengedhetetlen a re-epitelizáció szempontjából. Amennyiben a két rendszer egyensúlya bármely okból kifolyólag felborul, egyrészt hegesedés, másrészt elhúzódó sebgyógyulás vagy akár corneális fekélyképződés is lehet a végeredmény.¹⁶⁻¹⁸ Irodalmi adatok alapján ismert a könny plazminogén aktivátor-plazmin rendszerének jelentősége a traumás sérülést követő corneális sebgyógyulási folyamatok során.⁹⁻¹⁸ Ebben a betegcsoportban, a plazminogént aktiváló enzimek szintje az epitel sejtek károsodása következtében igen magas maradhat, ami miatt a sebgyógyulási folyamat hosszasan elhúzódhat vagy egyáltalán be sem következik.¹⁸ Bakteriális és vírusos fertőzések esetén szintén ezen enzimek nagy aktivitása okoz problémát, mely akár fekély kialakulásához is vezethet.¹⁶⁻¹⁸

Munkánk során az alábbiakat tűztük ki célul:

1. Első célunk az volt, hogy a fotorefraktív excimer lézerkezelést követően megvizsgáljuk a plazminogén aktivátor aktivitás szintjének változását a könnyben.
2. Második célunk az volt, hogy összefüggést keressünk az urokináz típusú plazminogén aktivátor (uPA) szintjének változása, valamint a corneális stromahomály (haze) kialakulása között.

3. Célunk volt továbbá az alacsony uPA szint haze kialakulásában játszott szerepének további tanulmányozása, amit szerin proteináz inhibitor (SPI) lokális alkalmazásával, állatkísérletben vizsgáltunk. Fotorefraktív excimer lézerkezelést követően, a könny normál plazminogén aktivátor (PA) szintjének szupresszálásával.
4. Végül a corneális stromahomály szélesebb körű (biokémiai, immunhisztokémiai, szövettani vizsgálatok) tanulmányozására alkalmas új állatmodell létrehozását tűztük ki célul, mely további kutatások alapjául szolgálhat.

3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 A refrakciós sebészeti beavatkozások rövid története

Hét évszázaddal ezelőtt a szemüveg a gazdagság és tanultság jelképe volt. A tehetséges pisai és muranói üvegfúvó mesterek 1286-ban alkották meg az első bikonvex lencsét, mely a presbyopia korrigálására volt alkalmas.^{19,20} Titkukat a céhszabályok szerint szigorúan őrizték, ezért a szemüveg csak lassan kezdett terjedni Európában.¹⁹ Újabb két évszázadnak kellett eltelnie ahhoz, hogy a myopiás fénytörési hibák szemüveggel történő korrigálása is lehetővé váljon.²⁰ Ezek a mesterek az optikai és fénytörési törvényszerűségeket még nem ismerték, ezért csak a legalapvetőbb refrakciós hibákat tudták megközelítő pontossággal korrigálni. Az astigmia korrigálása az újkor hajnaláig váratott magára.²¹ Modern korunkra már a szemüveg viselése mindenki számára elérhetővé vált, s nem jelképe többé a kiváltságos életformának, a tanultságnak. A szemüveg mellett a kontaktlencse bizonyult választható alternatívának, mely optikailag igen jó eredményeket biztosít, de még körültekintő használat mellett is számos szövődménnyel járhat, mint pl. corneális hypoxia, széli neovaszkularizáció, hámsérülés és mikrobiális fertőzés.

A szemüveg és kontaktlencse viselése csak átmeneti (a viselés időtartamára szóló) látásélesség javulással járnak. Ezért nem véletlen, hogy a mikrosebészeti módszerek, hatvanas évek óta bekövetkezett, látványos fejlődése a fénytörési hibák korrigálásában is a végleges megoldást jelentő sebészeti módszerek felé irányította a figyelmet.

Az 1960-as évekre, Schawlow és Townes korai munkásságát követően, Theodore Maiman megalkotta a gyakorlati alkalmazásra is került rubin lézert.^{1,2} 1961-ben Ali Javan, hélium-neon lézert tervezett, majd 1968-ban L'Esperance klinikai alkalmazásban demonstrálta az argon lézer hatásfokát.^{22,23} 3 év elteltével ezek a lézerek általánosan használttá váltak, a választék pedig rohamosan bővült tovább. Ezeket a lézereket azonban

nem a refraktív hibák korrigálására alkalmazták. Az 1980-as évekig a szaruhártya elváltozások terápiája nem került a lézer technika felhasználási területének középpontjába.

Ismert tény, hogy a normál, transzparens cornea minimális abszorpcióval rendelkezik és széles hullámhossz tartományban átjárható a fény számára. Patológiai elváltozások esetén azonban a szaruhártya elveszítheti átlátszóságát, minek következtében abszorbeálhat a látható fény hullámhossz tartományán belül is. Így került sor elsőként az argon (Ar) lézer használatára corneális elváltozások esetében, mint például szaruhártya neovaszcularizáció, lipid keratopátia valamint pigmentált retrocorneális plakk esetén.²⁴⁻²⁷ Az elmúlt 20 évben az infravörös és ultraibolya lézerek olyan fejlődésen mentek keresztül, hogy alkalmazásuk elterjedhetett a szaruhártya refraktív sebészetében. Elsősorban az infravörös tartományban dolgozó széndioxid (CO₂), „erbium:yttrium-aluminium garnet” (Er:YAG), hidrogénfluorid (HF), az ultraibolya tartományon belül dolgozó neodimium, valamint excimer lézerek kerültek az érdeklődés középpontjába.²⁸⁻³⁴

Az excimer lézerek megalkotása és szemészetben történő felhasználása óriási érdeklődést váltott ki, mind a fizikusok, mind a szemészek körében. A módszer a gerjesztett állapotú ArF gázkeverék által kibocsátott 193 nm hullámhosszúságú ultraibolya-C (UV-C) tartományú elektromágneses sugárzás és a cornea szövet kromofor molekuláinak interakcióján alapul.³⁵⁻³⁷ A lézer-szöveti interakció alapját a 6,4 eV-os fotonenergia elnyelődése képezi, amely elegendő a szervezetet felépítő szerves vegyületek kovalens kötéseinek felbontására. Kizárólag az excimer lézer tulajdonsága, hogy az elektromágneses sugárzás extrém rövid UV-C tartományban a lézersugár egyetlen fotonjának is elegendő az energiája, az individuális molekuláris kötések (szén-szén, szén-nitrogén, szén-hidrogén) felbontásához. Amennyiben a lézerfény energiasűrűsége egy bizonyos kritikus szintet meghalad, a felbomlott kémiai kötések nem rekombinálnak, azaz ismételen nem jönnek létre, a szövet ablatív módon lebomlik.³⁵

3.2 Az excimer lézerkezelés hatása a cornea különböző rétegeire

Epitélium

A hagyományos PRK kezelést követően a hámfosztott területen a hámregeneráció néhány óra múlva megkezdődik. Egy rövid látens periódus után a hámfosztott terület széli részein a hámsejtek megnyúlnak, mitotikus aktivitásuk megnő, és kúszni kezdenek a befedendő terület irányába, egy vékony elektronenz membrán (pszeudomembrán) mentén, mely segíti az epitél sejtek gyors bevándorlását. A fotorefraktív kezelést követően, 6 mm-es ablációs zóna esetén, az epitél sejtek ugyan 1-3 napon belül befedik a hámfosztott területet, de a végleges adhéziós struktúrák csak 3 hónap alatt alakulnak ki.

Már a hámregeneráció kezdeti szakaszában, a fotorefraktív kezelést követő első nap után sikerült fibrinogént és fibronektint a műtéti területen kimutatni állatkísérletek során.³⁸⁻⁴⁰ A fibrinogén a regenerálódó hámsejteket mintegy odaragasztja új helyükre. Az újonnan képződött epitél sejtek struktúrájában a legalaposabb morfológiai és immunhisztokémiai vizsgálatok sem tudtak rendellenességet kimutatni.⁴¹⁻⁴⁸ Ennek ellenére, jelenleg még ismeretlen okok miatt, a sebgyógyulás későbbi szakaszában az epitélium hiperpláziássá válhat, amely az elért refrakciós hatást csökkenti. Ezen rendellenesség kivédésére javasolta Pallikaris a Laser In Situ Keratomileusis (LASIK) bevezetését a fotorefraktív kezelések céljára.⁴⁹ A beavatkozás során sebészi mikrotómmal 130-160 µm mélységű corneális lebenyt (flap) készítünk, mely révén a corneális hám és basalmembrán, valamint a Bowman hártya intaktságát a lebeny területén megőrizzzük.⁵⁰⁻⁵² Ezáltal a PRK kezelésből adódó primer hámrendellenesség kialakulása elkerülhető.

Bowman membrán

Ismert tény, hogy a hagyományos PRK kezelést követően a Bowman membrán regenerációjára nincsen lehetőség, valamint a membránt ért mechanikus sérülés minden

esetben a corneális transzparenciát csökkentő hegképződéssel gyógyul. A betegkövetések tapasztalatai, a korábbi feltételezésekkel ellentétben, azonban azt mutatják, hogy 0,5-6,0 D kezelési tartományban a corneális transzparencia fenntartásához nem létfontosságú a Bowman membrán intakt volta.⁵³⁻⁵⁶

Corneális stroma

A PRK kezelést követő sebgyógyulás korai szakaszában végzett morfológiai vizsgálatok a fotoablált felszín területében vékony eletronenz pszeudomembránt mutattak ki, mely alatt az elhelyezkedő kollagén nem mutatott hisztológiai eltérést.⁵⁷⁻⁵⁹ A sebgyógyulás későbbi szakaszában a pszeudomembrán eltűnik, új kollagén és proteoglikán képződés indul meg. Mintegy 24 óra elteltével a PRK kezelés után a stromában polimorfonukleáris granulociták jelennek meg, melyek a könnyfilm felől vándorolnak a stromába. A könnyfilm plazminogén szintje megemelkedik és a plazminogén aktivátor-plazmin rendszer bekapcsolódásával a szöveti és sejtörmelékek eltakarítása, valamint a károsodott kollagén és extracelluláris mátrix kijavítása megkezdődik.⁵ Az epitélium regenerációja szempontjából a keletkező szöveti- és sejtörmelékek eltávolítása hasznos és kívánatos, ugyanakkor a stromális keratociták fokozott szintetizáló tevékenysége hegképződéssel, ezáltal stromahomályok kialakulásával járhat. A normálistól eltérő, abundáns kollagén miatt a cornea megvastagszik, így az elért refrakciós hatás gyengülhet.⁴²⁻⁴⁶

Descemet membrán

A 193 nm hullámhosszúságú excimer UV-C lézersugár penetrációs képessége 1 μm körül van, ezért az ablációs mélység nagy pontossággal szabályozható, így nem kell a Descemet membránban morfológiai elváltozásokra számítani. Nyúlkísérletek során azonban a fotorefraktív kezelést közvetlenül követő morfológiai vizsgálatok szokatlan fibrilláris Descemet választ mutattak ki. Ennek háttere pontosan nem ismert, sokk hullám okozta akut hatást feltételeznek.^{9,42}

Endotélium

A fotorefraktív keratektómiát követő szövettani vizsgálatok morfológiai elváltozást nem igazoltak az endotéliumban.⁶⁰⁻⁶² Természetesen, ha a PRK kezelés olyan mélységben történik, hogy az már megközelíti a Descemet membránt, akkor az endotélium is károsodhat.⁶³

Nyúlkísérletekben viszont, Hanna és munkatársai amorf fibrillogranuláris anyag megjelenését mutatták ki a cornea Descemet membránjában, melyek eredete a mai napig ismeretlen. Az elvégzett immunhisztokémiai vizsgálatok arra utalnak, hogy a fotorefraktív kezelést követően az endotél sejtek és a keratociták aktiválódtak.⁴² A károsodás nem a primer lézerhatás eredménye, hanem valószínűleg szekunder módon a sokk hullám, illetve szekunder ultraibolya fluoreszcencia révén alakul ki.^{9,42}

3.3 A plazminogén aktivátor-plazmin rendszer jelentősége a könnyben

A plazminogén aktivátorok specifikus szerin proteinázok, melyek jelenlegi ismereteink szerint egyedül a plazminogén Arg₅₆₀-Val₅₆₁ közötti kötést képesek hasítani, ezáltal az inaktív plazminogént aktív plazminná alakítani.^{64,65} A plazminogén aktivátoroknak 2 fő típusa ismert: a **szöveti típusú plazminogén aktivátor (tPA)**, valamint az **urokináz típusú plazminogén aktivátor (uPA)**.

A tPA elsősorban a vér fibrinolitikus aktivitásában játszik szerepet és működéséhez fibrin kofaktort igényel, az uPA elsődleges szerepe az extracelluláris proteolízisben, valamint a tumor metasztázis képzésben valószínű, és működéséhez fibrin kofaktorra nincsen szükség.⁶⁶ A plazminogén aktivátorok által aktivált plazmin azonban már széles szubsztrátspecifitású proteináz, mely nemcsak a fibrint, hanem az intakt kollagén kivételével az extracelluláris mátrix proteinjeit (laminin, fibronektin) is képes hasítani.⁶⁶

A plazminogén aktivátor-plazmin rendszer, feltehetően szerepet játszik a fibrin és fibronektin reszorpciójában, a szaruhártya epitél sejtjeinek sérülés utáni regenerációjában, elősegíti az inaktív kollagenáz felszabadulását a szaruhártya epitél sejtjeiből, valamint aktiválja azt.¹⁶ Az aktív kollagenáz jelenléte a könnyben kevésbé specifikus könny proteinázokkal (pl. plazmin) együtt, a szaruhártya alapállományát képező kollagén lebontása révén, szaruhártya fekélyek kialakulásához vezethet.⁶⁷

Számos sejttípus képes sejtenyészeten plazminogén aktivátort termelni.⁶⁸ Immunhisztokémiai módszerrel sikerült plazminogén aktivátort kimutatni a szaruhártya, a kötőhártya és a könnymirigy szöveteiben.⁶⁹ A szaruhártya plazminogén aktivátor aktivitása (PAA) urokináz típusú plazminogén aktivátornak bizonyult, a könnymirigy csak szöveti típusú plazminogén aktivátort képes termelni.^{18,70,71,72} Kötőhártya szövetenyészeten mind a két aktivátort képes termelni: az uPA termelésért az epitél sejtek felelősek míg a tPA forrása a kötőhártya ereinek endotél sejtjei lehetnek.⁷²

Ismert a normál könny igen alacsony proteináz inhibitor tartalma is (α -1-antitripszin, α -2-makroglobulin). Ezzel szemben a szaruhártyafekélyben szenvedő betegek könnyében ezen inhibitorok, lényegesen nagyobb koncentrációban fordulnak elő, melyek a gyógyulás folyamán fokozatosan térnek vissza a normál értékre.⁷³⁻⁷⁵ Az inhibitorok valószínűleg a kötőhártya ereinek permeabilitás fokozódása révén kerülnek a könnybe, hiszen koncentrációjuk a szérumalbumin koncentrációjával párhuzamosan változik, bár az α -1-antitripszin esetében a lokális termelés sem zárható ki.⁷³⁻⁷⁵

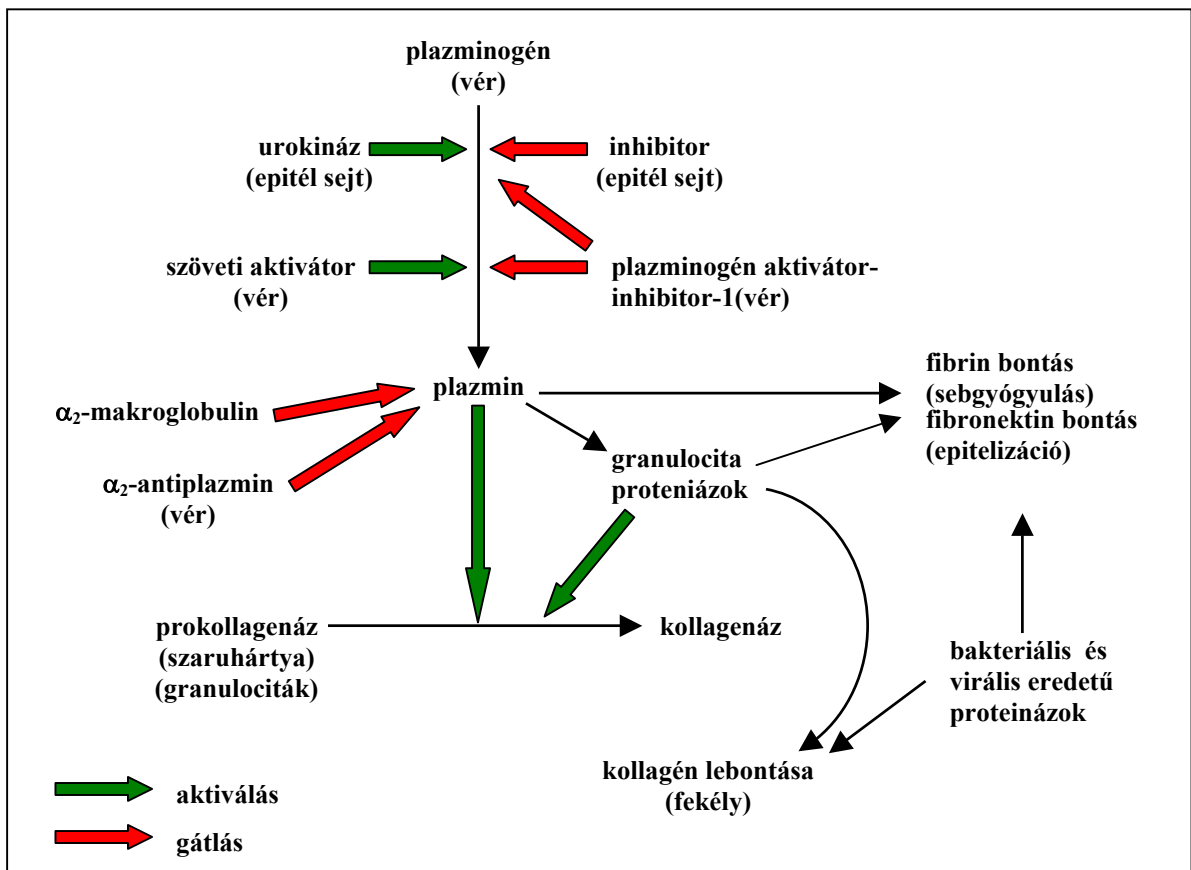
A normál könny nagy mennyiségű urokináz antigént tartalmaz, mely molekula tömege alapján feltehetően szinte kizárólag inhibitorokkomplex formájában van jelen. Az uPA aktivitása viszont kismértékű, és tPA nem detektálható. A könny uPA valószínűleg a szaruhártya és kötőhártya epitél sejtjeiből származik.^{70,72} Mivel plazminogén aktivátor inhibitor (PAI) -1 antigént nem sikerült normál könnyben kimutatni, így valószínűleg más PAI játszhat szerepet a szem elülső szegmentjében keletkező uPA gátlásában, mely forrása vagy a könnymirigy vagy a szem elülső szegmentjében található sejtek.

A szaruhártya és kötőhártya epitél sejtjeinek károsodása következtében nagyobb mennyiségű uPA kerül a könnybe. Patológiás esetekben általában fokozódhat a kötőhártya ereinek permeabilitása is. Így egyrészt proteinázok proenzim formái, másrészt proteináz inhibitorok kerülhetnek a könnybe. Az uPA képes a könnybe kerülő plazminogént aktiválni, míg az urokináz aktivitást a plazma inhibitorok gátolják. A keletkező plazmin egyrészt inaktiválódhat, másrészt számos folyamatot elindíthat a szem elülső szegmentjében. Nagy uPA aktivitás esetén a folyamatosan termelődő plazmin felboríthatja az egyensúlyt a transzudációval a könnybe kerülő inhibitorok kimerítésével, ezért a könny proteolitikusan aktívává válhat.

A plazminogén aktivátor-plazmin rendszer aktiválódása a sebgyógyulási folyamatok során hasznos és kívánatos. Működésük révén valósulhat meg a szöveti és sejtörmelékek

eltakarítása, valamint a károsodott kollagén és extracelluláris mátrix kijavítása. Az egyensúly azonban, ha felborul és a könny PA aktivitása jelentősen megemelkedik, a hatására aktiválódó nagy mennyiségű plazmin további szerepet játszik a prokollagenáz kollagenázzá aktiválásában. Ennek következtében súlyos corneális fekély alakulhat ki. Mindezek alapján úgy tűnik, hogy a szaruhártya és kötőhártya fehérjéinek kóros körülmények közt bekövetkező degradatív lebontásában az uPA-plazmin-kollagenáz proteináz kaszkád alapvető szerepet játszik, hasonlóan az egyéb extracelluláris fehérje bontó folyamatokhoz (pl. sejtinvázió). A plazmin kemotaktikus hatására a granulociták inváziója következhet be. Ezek szintén képesek uPA termelésére, melyet degranuláció révén juttathatnak a környezetükbe. Mindezek mellett a plazmin a fibronectin lebontásával elősegíti a szaruhártya epitél sejtjeinek vándorlását hámhiány esetén.

Az alacsony PAA elhúzódó sebgyógyuláshoz, akár krónikusan fennálló epitél erózióhoz vezethet.^{16,76} A könny proteolitikus aktivitása érzékeny szabályozás alatt áll, melynek felborulása kóros következményekkel járhat. A fentiekben részletezett lépéseket az 1. folyamatábrán összegezve láthatják.



1. ábra *Proteolitikus enzimek és proteinázi inhibitorok a könnyben*

Reményünk szerint a könny proteolitikus aktivitásának és inhibitor tartalmának további vizsgálata újabb ismereteket szolgáltat a sebgyógyulási folyamatok pontosabb megértéséhez és esetlegesen új terápiás módszer alkalmazásának lehetőségét is felveti.

4 BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Humán beteganyag

Munkánk során 42 páciens (26 nő és 16 férfi) 77 szemén végeztünk PRK beavatkozást. A páciensek életkora 17-51 évig terjedt (átlag 27 év), standard deviáció (SD) ± 9 év. Hét páciens kivételével (3 nő és 4 férfi), akik csak az egyik szemből történő mintavételre vállalkoztak, mindkét szem könnymintáit vizsgáltuk. A két szem fotorefraktív excimer lézerkezelése között 1 vagy 2 hét telt el. A tanulmányban való részvétel alapvető feltételét képezte, hogy a páciensről legalább 15 μ l könnymintát tudjunk venni ingerlés nélkül 3 perc alatt.

Kontrollként 20 páciensünk még nem operált szemének könnymintáit használtuk.

Mindezek alapján 77 szem könnymintája (41 jobb, 36 bal) és 20 kontroll minta került analízisre.

A műtét előtti refrakciós hiba tartomány $+5,0$ D értéktől $-10,0$ D értékig terjedt, melynek átlag értéke $-3,0 (\pm 3,0)$ D. A műtét során 18 esetben került sor astigmia korrekciójára is $-1,0$ D- $-2,75$ D refrakció tartományban, átlag $-1,5 (\pm 0,6)$ D. A páciensek közül 17 viselt korábban kontaktlencsét, melyek átlagos hordási ideje $4 (\pm 2)$ év volt.

4.2 Kísérleti állatok

Állatkísérleteink során 8 új-zélandi nyúl (2–3,5 kg, ♀, ♂) mindkét szemén azonos időben végeztünk fotorefraktív keratektómiát és 3 hasonló súlyú állatot használtunk kontrollként a kísérlethez. A kontroll állatokat nem operáltuk.

4.3 Lézerkezelés

A refrakciós hibák kezelését excimer lézerrel (Keratom II ArF [193 nm], Schwind, Kleinostheim, Németország) végeztük a DEOEC Szemklinika területén működő Vital-Lézer KFT-ben. A **humán műtéteket**, lokális érzéstelenítés mellett, minden esetben ugyanaz a

szemész szakorvos végezte. A corneális epitélium eltávolítására keratom kést használtunk, markerként Hoffer trepánt alkalmaztunk, melynek átmérője szférikus korrekció esetén 6,0-6,5 mm, astigmias korrekció esetén pedig 7,5- 8,0 mm volt.

Az epitélium lekaparását a cornea perifériájáról a centrum felé haladva végeztük, nagyon óvatosan, hogy elkerüljük a Bowman membrán sérülését. Az epitélium maradékok eltávolításához steril szivartampont használtunk. Azoknál a pácienseknél, akiknél csak szférikus korrekciót végeztünk az ablációs zóna átmérője 6,0-6,5 mm volt, átlag 6,1 (\pm 0,2) mm. Ahol szükség volt astigmia korrekciójára, az astigmias ablációs maszk átmérője 6,0 – 8,1 mm volt, átlag 7,5 (\pm 0,6) mm, az alkalmazott szférikus maszk átmérője pedig 5,3 – 6,0 mm volt, átlag 5,7 (\pm 0,1) mm. Az ablációs mélység 12-120 μ m között volt, átlag 48 (\pm 22) μ m.

A fotorefraktív keratektómiát **állatkísérleteink** során a nyulak mindkét szemén, általános anesztézia mellett végeztük intravénás ketamin-xylazin (2,2:1,0) alkalmazásával 10 mg/kg dózisban. A kísérlet során a szemkorrekciós műtétekhez $-3,0$ D szférikus refrakciós hibának megfelelő ablációs maszkot használtunk a humán tanulmányban leírtaknak megfelelően.

4.4 Posztoperatív kezelés

A műtét után antibiotikum tartalmú szemcseppet, Ciloxan (Ciprofloxacin HCL 0,3%, Alcon) alkalmaztunk óránként az operáció első napján, melyet napi 5x cseppentés követett további 5 napig. Az első 5 nap után szteroid tartalmú Flucon (Fluorometholone 0,1%, Alcon) és műkönnyet tartalmazó Tears Naturale (Dextran/Hydroxypropyl Methylcellulose, Alcon) használatára tértünk át. Ezeket az első hónapban napi 5x, a második hónapban napi 4x, majd a harmadik hónapban napi 3x cseppentés mellett alkalmaztuk. Betegeink követése minimum 1 éven keresztül történt a mintavételek után 1, 3, 6 hónap és 1 éves kontrollok mellett.

Az állatok posztoperatív kezelése, a humán tanulmányban ismertetteknek megfelelően történt mindkét szemén, azzal a módosítással a baloldalon, hogy a korai posztoperatív

szakban (1 hét), szerin proteínáz inhibitor Gordox (Aprotinin 20.000 IU/ml, Richter Gedeon RT) alkalmazására is sor került az operáció napján óránkénti, majd napi 5x cseppentéssel az első posztoperatív hét folyamán.

4.5 *A corneális sebgyógyulás értékelése*

A haze értékelése mindkét tanulmányban, Hanna féle stádium beosztás alapján történt.¹⁵ Az értékelést végző személy nem rendelkezett előzetes ismerettel a könny plazminogén aktivátor aktivitásáról.

4.6 *Könnymintavétel*

A plazminogén aktivátor aktivitás analízisére a humán könnymintákat, PRK kezelés előtt és után közvetlenül, valamint a 3. és 5. posztoperatív napokon gyűjtöttük, ingerlés nélkül. A mintavétel minden esetben a szemcsepp használata előtt történt, üvegapillárisal (hossza: 10 mm, átmérője: 1 mm) a szemhéjszél alsó marginális vonalának közelében, a praecorneális könnyfilmből réslámpa alatt, vigyázva arra, hogy ne sértsük a kötőhártyát.⁷⁷

A mintavételek időtartamát és a gyűjtött minták mennyiségét feljegyeztük. Ezen értékek alapján a szekréciós ráta 5-15 µl/percnek adódott. Az összes mintát centrifugáltuk (1800-as fordulatszám) közvetlenül a mintavétel után, és a felülúszót -80°C-on tároltuk felhasználásig.

Kontroll mintáink esetében, az operált szem mintavételeivel azonos időben és módon történt a könnyminták gyűjtése.

Állatkísérleteink során, tekintettel a nyulak igen alacsony könnyszekréciós értékére, 5 mg/kg pilocarpin im. injekció adását követően vettünk könnymintát mindkét szemből, a humán tanulmányban leírtaknak megfelelően. A PRK beavatkozás előtt és után, a corneális sebgyógyulás kezdeti szakaszában (1 hét) minden nap, majd ezt követően 3 hónapon keresztül 4 naponta került sor a könnyminták gyűjtésére. Kontroll mintáinkat az operált szem

mintavételeivel azonos időben és módon gyűjtöttük. A szekréción rása állatkísérleteink során 15-50 µl/percnek adódott.

4.7 *Plazminogén aktivátor aktivitás mérés*

A plazminogén aktivátor aktivitás mérése spektrofotometriás módszerrel történt, humán plazminogén és plazmin specifikus kromogén peptid szubsztrát, D-valin-l-leucil-l-lizil-pNA (S-2251) felhasználásával.⁷⁸ Ez a módszer elsősorban az urokináz típusú plazminogén aktivátor aktivitás meghatározására alkalmas. A kísérleti munka során alkalmazott szubsztrátot (S-2251), valamint plazminogént a Chromogenix (Milano, Olaszország) cégtől szereztük be.

A PA mérésekhez referenciaként használt urokinázt (Choay, Párizs, Franciaország) S-2444-es szubsztráttal kalibráltuk standard urokinázhoz (NIBSC, London, Anglia), Frieberg⁷⁹ szerint. A specifikus aktivitása 100.000 IU/mg-nak adódott, ez megfelel a kereskedelemben kapható legtisztább preparátumok specifikus aktivitásának.

A PAA és plazminszerű aktivitás meghatározását Shimada és munkatársai⁷⁸ módszerének módosításával végeztük, a következők szerint^{18,80}: 5 µl könnyet vagy standard urokinázt inkubáltunk 37°C-on 100 µl 0,05 mol/l Tris pufferben, 7,4 pH, 0,5 mmol/l S-2251 kromogén szubsztrát és 1 µmol/l humán plazminogén jelenlétében. Mintáinkat 4 óra inkubálás után 405 nm-en fotometráltuk (Multiscan MS, Labsystem, Helsinki, Finland). A plazminszerű aktivitás mérése hasonlóan történt, de a reakcióelegy ebben az esetben plazminogént nem tartalmazott.

A könny plazminogén aktivátor aktivitását a plazminogén tartalmú és plazminogént nem tartalmazó minták abszorpciós értékének különbsége adta meg. A plazminszerű aktivitásnak a plazminogént nem tartalmazó minták abszorpciója felelt meg.

A könnyminták esetleges sárgás színük miatt, könny-puffer vak abszorpciós érték meghatározást is végeztünk. A könnyminták plazminogén aktivátor aktivitásának meghatározása urokináz hígítási sor alapján készített logaritmikus diagramm alapján történt. A PA aktivitást urokináz ekvivalensben (IU/ml könny) adtuk meg.

4.8 Statisztikai módszerek

A PAA corneális sebgyógyulás során történő változásának elemzésére standard statisztikai analízist végeztünk.⁸¹ A különböző betegcsoportok összehasonlítása „equal variance” t-teszt segítségével, a kontroll csoportokkal való összevetés páros t-teszt alapján történt.

Szignifikánsnak tekintettük a különbséget akkor, ha $p < 0,05$ és kifejezett szignifikanciáról beszéltünk, ha $p < 0,001$ értéket kaptunk.

5 EREDMÉNYEK

5.1 Humán

Munkánk során 42 páciensünk 77 szemét vizsgálva, 5 páciens (4 nő és 1 férfi) 6 szemén (8%) észleltünk, szubepiteliális corneális stromahomály képződést (Hanna¹⁵ grade 1-2) a posztoperatív 3. és 6. hónap között, mely a látásélesség csökkenésében is megnyilvánult. A korai posztoperatív időszakban illetve a haze kialakulását megelőzőleg semmilyen klinikai eltérés nem volt diagnosztizálható. A posztoperatív corneális stromahomály megjelenését 1 páciensünk mindkét szemén és 4 páciensünk egyik szemén diagnosztizáltuk. A fentiekben ismertetett esetek közül 1 páciensünknél csak az egyik szem operációjára került sor.

Tanulmányunkban 77 operált (41 jobb, 36 bal) és 20 nem operált szem (kontroll) könnymintáinak vizsgáltuk a PAA és plazminszerű aktivitás változását a preoperatív szakban, közvetlenül az operáció után, a 3. posztoperatív, valamint az 5. posztoperatív napokon. Mintáinkban plazminszerű amidolitikus aktivitás ezeken a napokon nem volt detektálható. Ezzel szemben a PAA változás jellegzetes változást mutatott. Ezeket két csoportra oszthattuk.

Az egyik csoportban (71 eset) a könny PAA értéke közvetlenül a műtétet követően szignifikánsan lecsökkent a preoperatív PAA értékhez képest, a 3. posztoperatív napra szignifikánsan megemelkedett, majd az 5. posztoperatív napra visszatért a kiindulási értéktartományba.

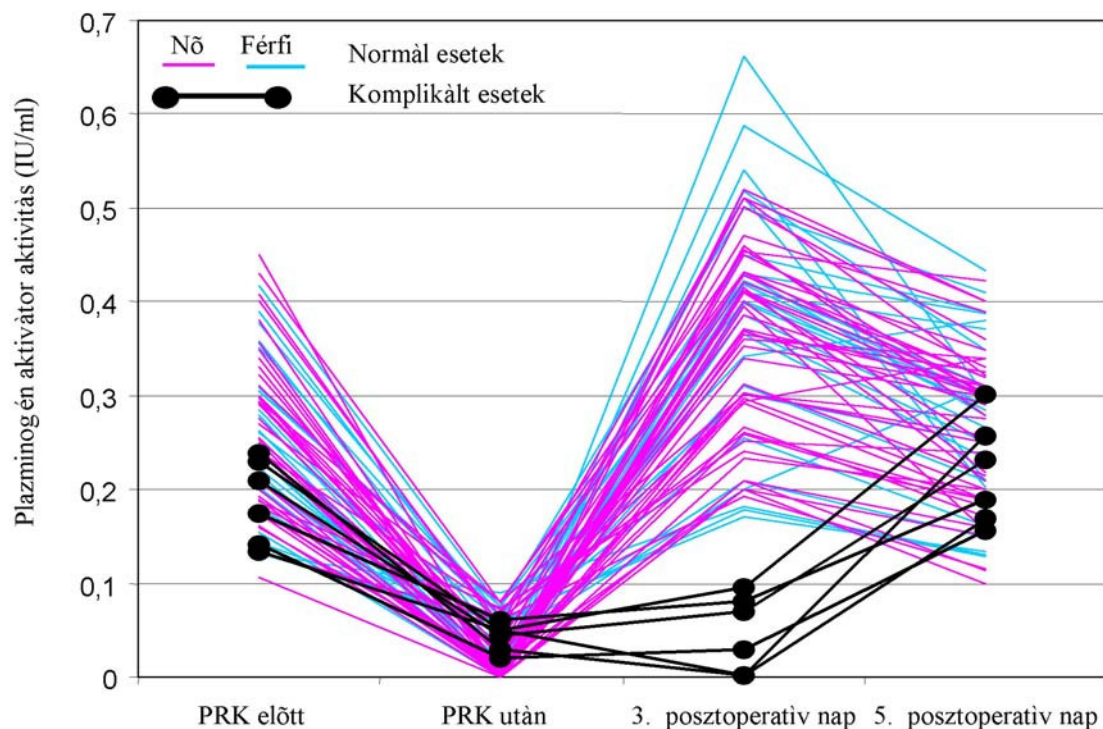
A másik csoportban (6 eset) a könny PAA változása eltért a fentiekben ismertetettektől. Ezekben a könnymintákban a PAA szint a fotorefraktív kezelést közvetlenül követően szignifikánsan lecsökkent, és a 3. posztoperatív napon is ezen alacsony értéken maradt, majd az 5. posztoperatív napra szignifikánsan emelkedve visszatért a kiindulási értéktartományba.

A PAA változás ezen adatait összevetve a klinikai képpel azt találtuk, hogy haze kialakulása csak abban a csoportban volt megfigyelhető, ahol a PAA 3. posztoperatív napon való emelkedése elmaradt.

Ezért ezeket az eseteket (n=6) „komplikált csoport”-ba, míg a többi esetet (n=71) a „normál csoport”-ba soroltuk (lásd I. táblázat és 2. ábra).

	PAA érték PRK előtt (\pm SD) IU/ml	PAA érték PRK után közvetlenül (\pm SD) IU/ml	PAA érték 3. posztoperatív nap (\pm SD) IU/ml	PAA érték 5. posztoperatív nap (\pm SD) IU/ml
Normál csoport (n=71)	0,259 (\pm 0,082)	0,027 (\pm 0,029)	0,366 (\pm 0,109)	0,269 (\pm 0,085)
Komplikált csoport (n=6)	0,188 (\pm 0,045)	0,043 (\pm 0,015)	0,046 (\pm 0,041)	0,218 (\pm 0,056)
Normál csoport ellenoldali szem (n=16)	0,299 (\pm 0,092)	0,297 (\pm 0,086)	0,290 (\pm 0,080)	0,310 (\pm 0,097)
Komplikált csoport ellenoldali szem (n=4)	0,195 (\pm 0,033)	0,192 (\pm 0,024)	0,191 (\pm 0,032)	0,190 (\pm 0,027)

I. táblázat A plazminogén aktivátor aktivitásának változása a betegek könnyében PRK kezelés után
(Zárójelben a SD értékeket tüntettük fel)



2. ábra PRK-t követő PAA változás a könnyben, normál és komplikált sebgyógyulás esetén

A **normál csoportban** a PAA átlagértéke az operáció előtti $0,259 (\pm 0,082)$ IU/ml értékről a fotorefraktív kezelést követően $0,027 (\pm 0,029)$ IU/ml-re csökkent, a 3. posztoperatív napra $0,366 (\pm 0,109)$ IU/ml-re nőtt, majd az 5. posztoperatív napra $0,269 (\pm 0,085)$ IU/ml-re csökkent. A statisztikai analízis kimutatta, hogy az előzőleg leírt PAA átlagérték operációt követő csökkenése illetve a 3. posztoperatív napon mért növekedése szignifikánsan különböztek a műtét előtti értéktől (mindkét esetben $p < 0,001$). Az 5. posztoperatív napon mért PAA átlagérték nem különbözött szignifikánsan a műtét előtti átlagértéktől ($p = 0,15$).

Ezzel szemben a **komplikált csoport** PAA átlagértéke az operáció előtti $0,188 (\pm 0,045)$ IU/ml értékről a fotorefraktív kezelést követően $0,043 (\pm 0,015)$ IU/ml-re csökkent, mely a 3. posztoperatív napra $0,046 (\pm 0,041)$ IU/ml-re nőtt. Az 5. posztoperatív napon mért

PAA átlagérték 0,218 (\pm 0,056) IU/ml-nek adódott. A statisztikai analízis kimutatta, hogy a komplikált csoportban közvetlenül az operációt követően mért PAA érték csökkenése kifejezetten szignifikáns ($p < 0,001$). A normál csoporttal ellentétben a 3. posztoperatív napon a PAA értéke hasonlóan alacsony szinten marad ($p = 0,81$). Az 5. posztoperatív napon mért PAA szint szignifikánsan magasabb volt a műtétet megelőző értékhez képest ($p = 0,02$).

A preoperatív PAA átlagértéke szignifikánsan alacsonyabbnak adódott a komplikált eseteknél a normál csoporthoz képest ($p = 0,04$). A komplikált csoportnál a PRK után közvetlenül mért PAA átlagértékek vonatkozásában szignifikáns statisztikai különbséget nem lehetett kimutatni a normál csoporthoz képest ($p > 0,14$). A 3. posztoperatív napon azonban, a mért PAA átlagértékek közötti különbség igen kifejezett volt a fent említett két csoportnál ($p < 0,001$). A komplikált csoportnál az 5. posztoperatív napon mért PAA átlagértékek vonatkozásában szignifikáns statisztikai különbséget nem lehetett kimutatni a normál csoporthoz képest ($p > 0,15$).

A normál csoportban, a nem operált szemek könnymintáinak PAA átlagértéke az ellenoldali szem műtétét követően, egyik alkalommal sem mutatott szignifikáns eltérést, a fotorefraktív keratektómiát megelőző értékhez képest. A komplikált csoportban a nem operált szemeken a PAA átlagérték hasonlóan változatlan volt. A preoperatív PAA átlagérték, a komplikált csoport nem operált szemén szignifikánsan alacsonyabb volt a normál csoport ugyanezen értékeihez képest.

A normál és komplikált csoport között nem volt kimutatható szignifikáns statisztikai különbség a betegek életkora, kontaktlencse viselése, astigmias és szférikus korrekciója, valamint az ablációs mélység értékeinek vonatkozásában sem (minden esetben $p > 0,05$) (lásd II. és III. táblázat).

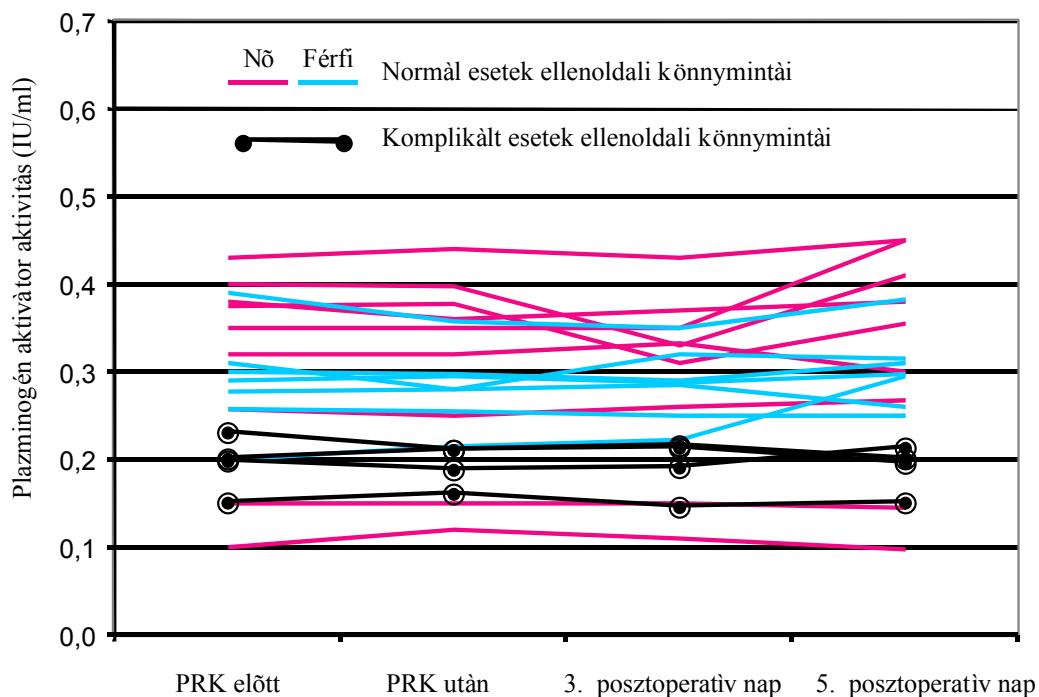
	Életkor években \pm SD	Kontaktlencse viselés időtartama években \pm SD
Normál csoport (n)	27 \pm 9 (40)	4 \pm 2 (15)
Komplikált csoport (n)	23 \pm 5 (5)	5 \pm 2 (4)
p-érték	0,38	0,35

II. táblázat *A páciensek korát és a kontaktlencse viselés időtartamát összegzi*

	PRK előtti astigmia dioptria értéke \pm SD	PRK előtti szférikus refrakciós hiba dioptria értéke \pm SD	Ablációs mélység μ m-ben \pm SD
Normál csoport (n)	-1,6 \pm 0,6 (16)	-2,9 \pm 3,1 (71)	47 \pm 22 (71)
Komplikált csoport	-1,0 \pm 0,0 (2)	-5,1 \pm 1,3 (6)	57 \pm 23 (6)
p-érték	0,24	0,08	0,33

III. táblázat *PRK előtt szükséges refrakciós korrekciót valamint a műtét során alkalmazott stroma ablációs mélységet foglalja össze*

Kontroll könnymintáink egyéni PAA változását a 3. ábrán mutatjuk be, az ellenoldali (operált) szem mintavételének időpontjában. Ezeken a szemeken a követési időtartam alatt mért PAA értékek konstansnak bizonyultak.



3. ábra PAA változása kontroll könnymintáinkban, az ellenoldali szem PRK kezelése előtt és után

5.2 Állatkísérletek

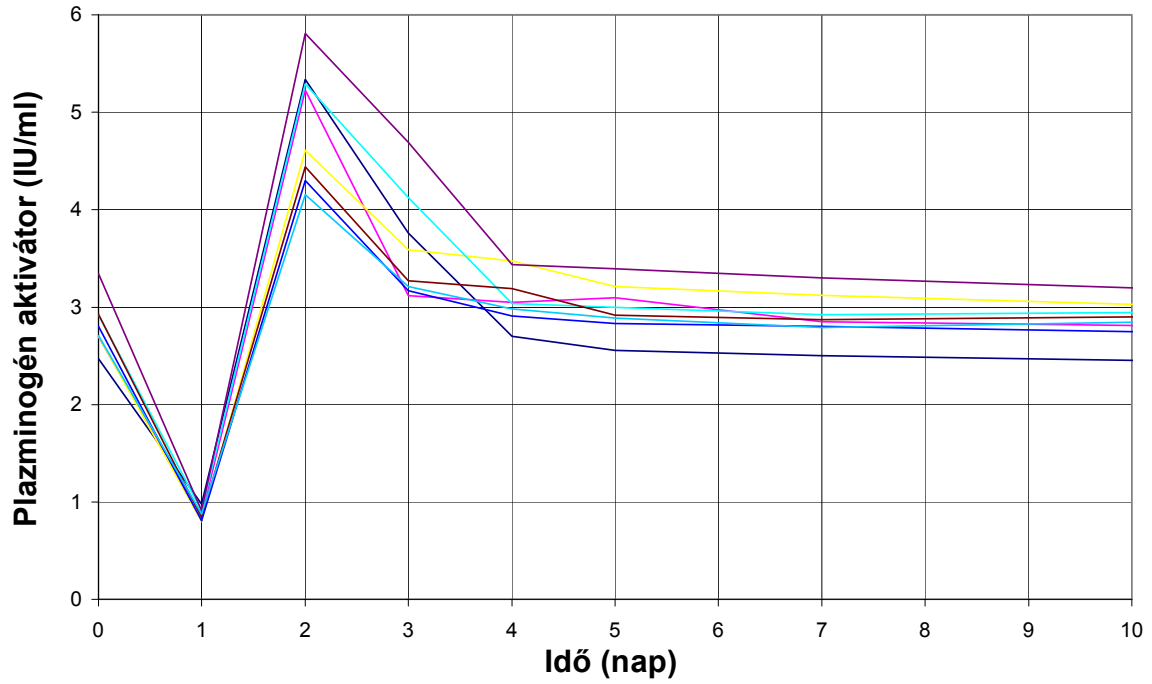
Kísérleti állataink **jobb szemén** a posztoperatív kezelés minden tekintetben, a humán tanulmányban leírtaknak megfelelően történt. A kontroll vizsgálatok során (6 hónapos követés) sem haze sem egyéb komplikációra utaló klinikai jel nem volt látható.

A könny PAA változása ezekben a mintákban a humán normál csoport esetében ismertetett enzimaktivitás változásának felelt meg. A PAA átlagértéke ezekben a könnymintákban az első posztoperatív napon szignifikánsan kifejezetten alacsonyabb még a 2. és 3. posztoperatív napokon szignifikánsan kifejezetten magasabb volt a preoperatív értékhez képest ($p < 0,001$). A 4. posztoperatív napon mért PAA átlagérték szignifikánsan magasabb volt a preoperatív értékhez képest, de kifejezett szignifikancia már nem volt megfigyelhető ($p = 0,02$). Az 5. posztoperatív napra visszatért a kiindulási szintre és tanulmány további követési időtartama során (3 hónap) már nem változott szignifikánsan. (lásd IV. táblázat, 4. és 5. ábra).

Napok	PAA érték SPI alkalmazása nélkül (\pm SD)	PAA érték SPI alkalmazásával (\pm SD)	P érték PAA értékek összehasonlítása
	IU/ml	IU/ml	
0	2,82 (\pm 0,26)	2,77 (\pm 0,26)	0,46
1	0,87 (\pm 0,06)	0,42 (\pm 0,47)	0,03
2	4,90 (\pm 0,60)	0,18 (\pm 0,21)	< 0,001
3	3,62 (\pm 0,56)	0,04 (\pm 0,03)	< 0,001
4	3,10 (\pm 0,26)	0,03 (\pm 0,04)	< 0,001
5	2,99 (\pm 0,25)	0,05 (\pm 0,05)	< 0,001
7	2,89 (\pm 0,24)	0,05 (\pm 0,04)	< 0,001
11	2,86 (\pm 0,21)	2,63 (\pm 0,18)	0,009
15	2,86 (\pm 0,21)	2,76 (\pm 0,18)	0,06
19-91	2,93 (\pm 0,20)	2,88 (\pm 0,22)	0,06

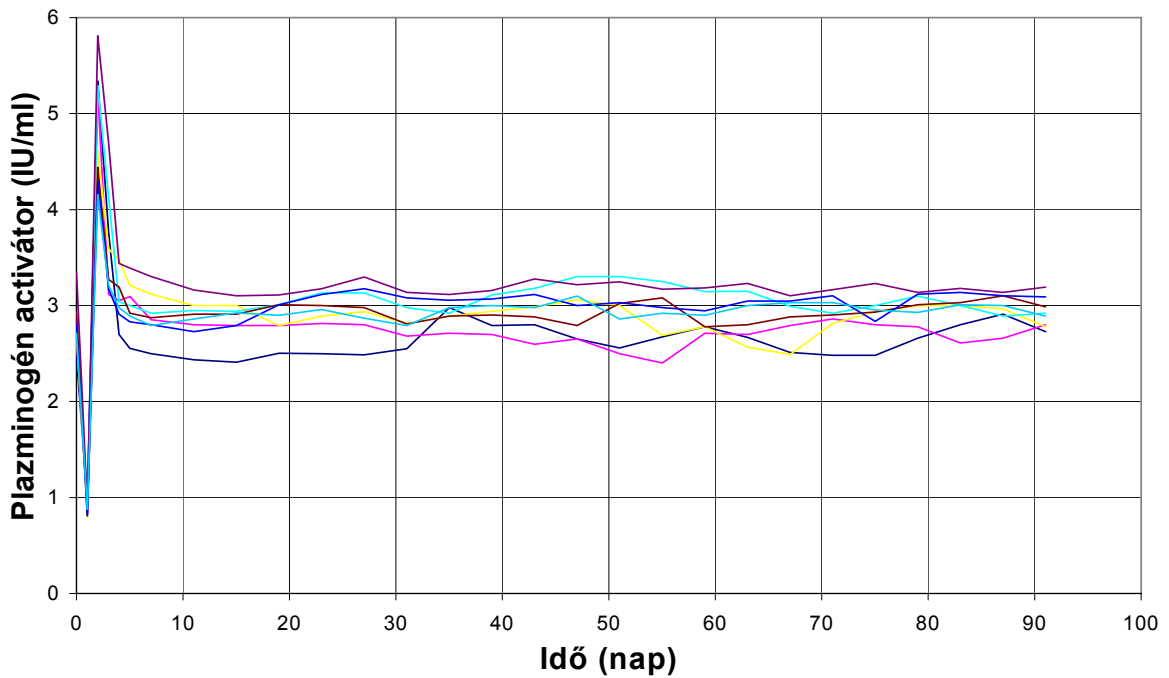
IV. táblázat PAA változása a kísérleti állatok könnymintáiban inhibitor (SPI) posztoperatív terápia alkalmazásával és alkalmazása nélkül. Zárójelben a SD értékeket tüntettük fel.

Operált szemek (inhibitor nélkül)



4. ábra PAA változása nyúl könnymintákban PRK után, a korai posztoperatív szakban, a humán kezelésnek megfelelő terápia alkalmazása mellett

Operált szemek (inhibitor nélkül)

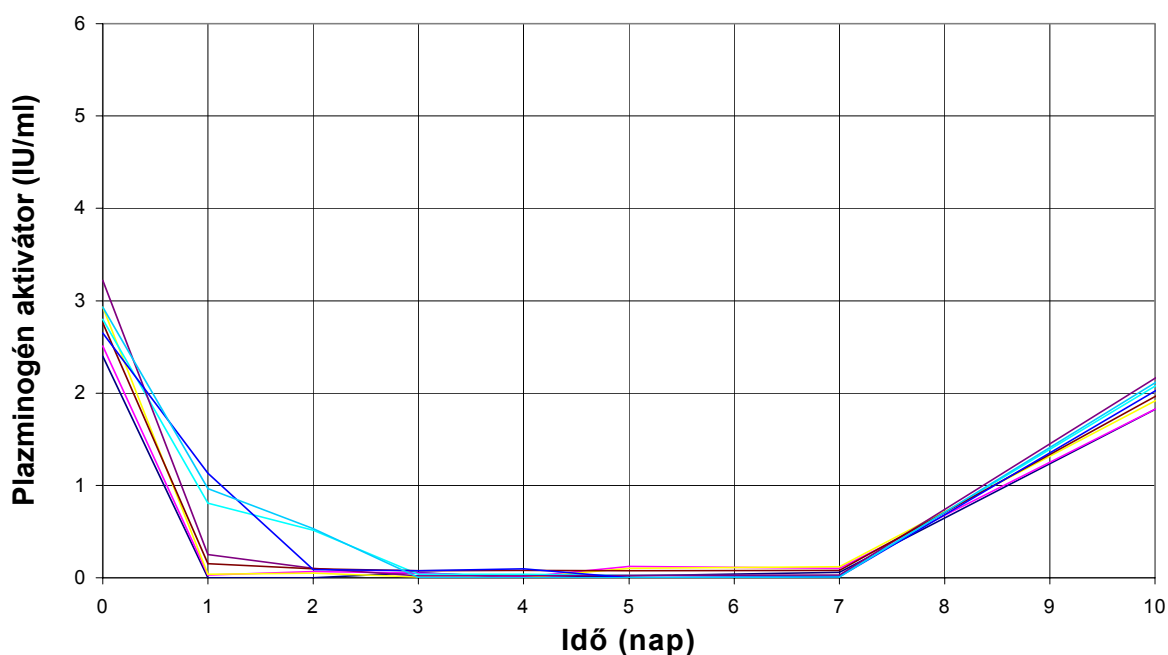


5. ábra PAA változása nyúl könnymintákban, PRK után hosszabb ideig vizsgálva, a humán kezelésnek megfelelő terápia alkalmazása mellett

Ezzel ellentétben a **bal szem**en a fotorefraktív keratektómiát követően, a humán tanulmányban alkalmazott terápiát szerin proteináz inhibitor, Gordox (Aprotinin 20.000 IU/ml, Richter Gedeon RT) alkalmazásával egészítettük ki, a corneális sebgyógyulás kezdeti időszakában (7 nap). A kontroll vizsgálatok során minden kísérleti állat esetében a 2.-3. hónapban corneális stromahomály (haze) volt diagnosztizálható.

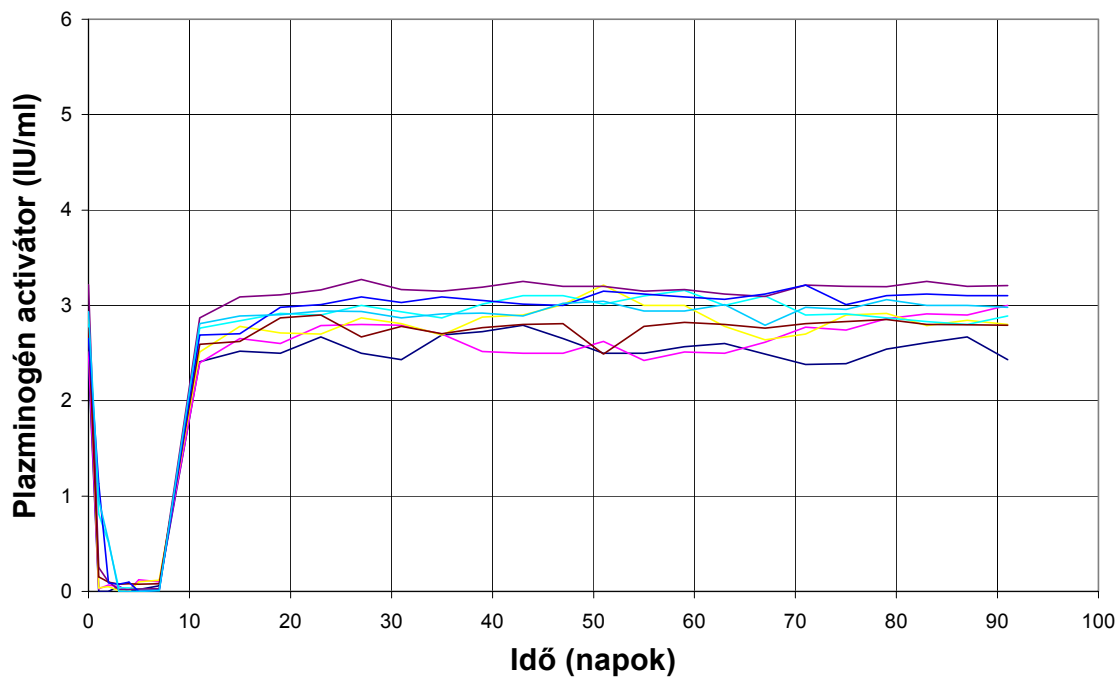
A könnyminták PAA átlagértékei ezeken a szemeken, az első hét folyamán 0,13 (± 0,15) IU/ml-nek adódtak, mely kifejezetten szignifikánsan alacsonyabb volt a preoperatív PAA átlagértékhez képest ($p < 0,001$). A 11. posztoperatív napon mért PAA átlagérték szignifikánsan alacsonyabb volt a preoperatív PAA átlagértékhez képest, de kifejezett szignifikancia már nem volt kimutatható ($p=0,002$). A könnyminták PAA átlagértékei fokozatosan tértek vissza a kiindulási értékre és a 19. naptól aktivitási szintjük stabilizálódott 2,88 (± 0,22) IU/ml. Szignifikáns különbség a 19. posztoperatív nap után már nem volt detektálható a preoperatív PAA átlagértékhez képest ($p=0,18$) (lásd IV.táblázat, 6. és 7. ábra).

Operált szemek (inhibitorral)



6. ábra PAA változása nyúl könnymintákban, PRK után a korai posztoperatív szakban, szerin proteináz inhibitor alkalmazása mellett.

Operált szemek (inhibitorral)

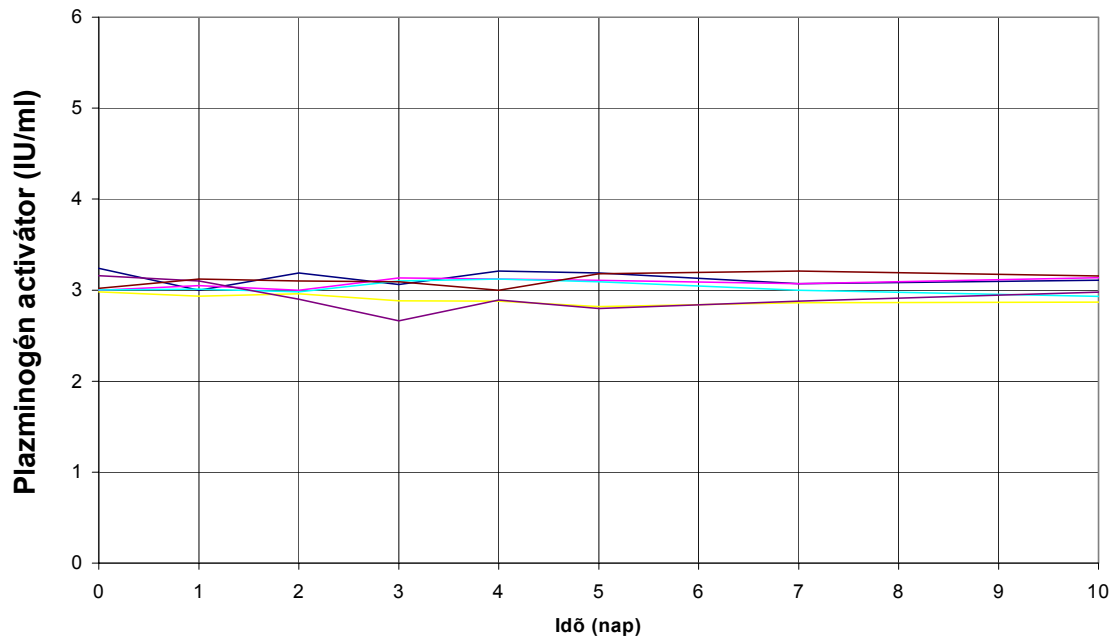


7. ábra PAA változása nyúl könnymintákban, PRK után szerin proteináz inhibitor alkalmazása mellett

Nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni a könnyminták PAA átlagértékeiben a szerin proteináz inhibitorral kezelt, illetve nem kezelt csoportok között sem preoperatíven ($p=0,46$) sem a 19. posztoperatív napot ($p=0,06$) követően (lásd IV. táblázat).

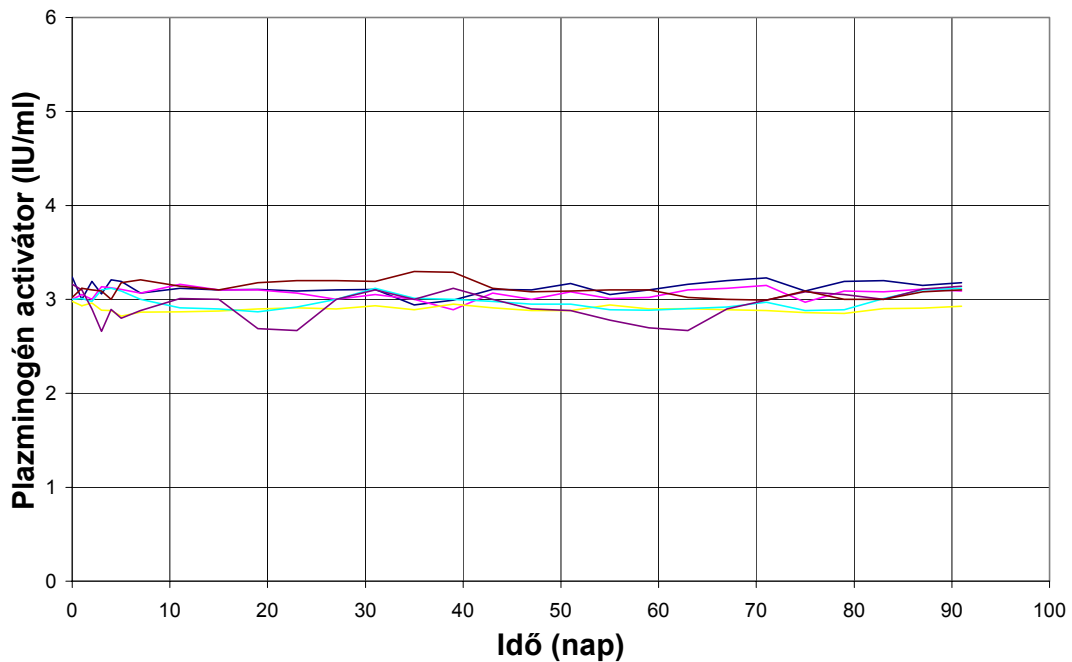
A kontroll állatok könnymintáiban a PAA átlagértéke, a 91 napos követési periódus alatt, mindvégig állandónak $3,1(\pm 0,13)$ IU/ml bizonyult (lásd 8. és 9. ábra).

Kontroll szemek



8. ábra PAA változása a kontroll nyulak könnymintáiban, a korai posztoperatív szakban

Kontroll szemek



9. ábra PAA változása a kontroll nyulak könnymintáiban

6 MEGBESZÉLÉS

A fotorefraktív excimer lézerkezelést követően vett könnyminták vizsgálata során, arra a megállapításra jutottunk, hogy a PAA jellegzetes, és egymástól szignifikánsan különböző változást mutat a normál és a komplikált corneális sebgyógyulási folyamatokban.

Humán tanulmányunkban, a fotorefraktív keratektómiát követő 3. posztoperatív napon a könnyminták PAA aktivitásában kifejezett szignifikáns különbség volt detektálható a fent említett két csoport között (lásd 2. ábra). Normál sebgyógyulás esetén a könny PAA átlagértéke szignifikánsan alacsonyabbnak adódott közvetlenül a fotorefraktív kezelést követően, a preoperatív illetve az 5. posztoperatív napokon mért értékekhez képest, míg a 3. posztoperatív napon, szignifikáns emelkedés volt detektálható. Ezzel szemben corneális stromahomály kialakulása esetén a könnyminták PAA átlagértékei a lézerkezelést követően és a 3. posztoperatív napon szignifikánsan nem különböztek egymástól, szintjük azonban szignifikánsan alacsonyabbnak adódott a preoperatív és az 5. posztoperatív napokon mért aktivátor szintekhez képest (lásd 2. ábra).

Tanulmányunkban 77 esetet követtünk nyomon (71 normál, 6 komplikált). A normál és komplikált csoportot a 3. posztoperatív napon, a könnyben mért PAA érték alapján különítettük el egymástól anélkül, hogy ekkor bármiféle ismerettel rendelkezünk volna a sebgyógyulás kimenetelét illetően. Amennyiben a PAA szint ezen a napon $< 0,1$ IU/ml, az esetet komplikáltnak könyveltük el. Vizsgálataink során 6 páciensünknél találtunk ilyen alacsony aktivitási szintet és ezekben az esetekben a későbbiek folyamán, posztoperatív 3. - 6. hónap, corneális stromahomály (Hanna szerint, grade 1-2) kialakulását diagnosztizáltuk. Komplikált 6 esetünk, tekintettel a 100%-os specificitásra elegendő ahhoz, hogy statisztikai következtetéseket vonjunk le, de természetesen a komplikált esetszám emelése a statisztikai megalapozottságot tovább fokozná.⁸¹

A kontroll szemek könnymintáiban mért PAA értékek közel állandónak bizonyultak az általunk vizsgált 5 napos követési időtartam alatt (lásd 3. ábra). Mindez arra utalhat, hogy a fotorefraktív keratektómiát követően csak minimális kollaterális effektus lép fel a fibrinolitikus aktivitás illetve a könnysekreáció tekintetében az ellenoldalon.

A PAA preoperatív átlagértékei, az általunk vizsgált komplikált csoportban valamint a hozzájuk tartozó ellenoldali, még nem operált szemek könnymintáiban szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyultak a normál csoport ugyanezen értékeihez képest. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a műtét előtt a könnyben mért alacsony PAA szint, mintegy prediszpozíciós faktornak tekinthető a corneális stromahomály kialakulásában.

Fenti megállapításunkat az a tény is alátámasztani látszik, hogy azoknál a pácienseknél, ahol mindkét szemén történt PRK, csak azon a szemén alakult ki corneahomály, ahol a műtétet megelőzően a PAA szint alacsonyabb volt (n=3).

A műtét előtt gyűjtött könnyminták PAA szintjei a normál és komplikált csoportban azonban átfedik egymást (lásd 2. ábra), ezért sajnos a preoperatív aktivátor szintekből önmagukban nem vonhatók le messzemenő következtetések a fotorefraktív excimer lézerkezelést követő sebgyógyulási folyamatra vonatkoztatva.

Állatkísérletünkben sikerült a humán tanulmányunk során tett megfigyeléseinket alátámasztanunk. A nyulak könnyében mért PAA értékek változásait a IV. táblázat mutatja be. Szerin proteináz inhibitor nélkül kezelt csoportunk esetében, a fotorefraktív keratektómiát követően a könnyben mért PAA értékek szignifikáns csökkenést, majd a 2. posztoperatív napra szignifikáns emelkedést mutattak a preoperatív értékekhez képest. A posztoperatív 3. és 4. napon szintjeik emelkedettek maradtak, majd az 5. napra visszatértek a kiindulási értékre. A fent ismertetett plazminogén aktivátor aktivitásváltozás, a humán tanulmányban ismertetett normál csoport PAA változásának felelt meg. A szerin proteináz inhibitorral kezelt csoport szintén jellegzetes PAA változást mutatott (lásd 4. táblázat), mely a humán tanulmányban

komplikált esetként ismertetett PAA változásnak volt megfelelő. A nyulak könnyében a PAA szintet, az első hét folyamán alkalmazott szerin proteináz inhibitor (aprotinin) segítségével sikerült szupresszálnunk, ebben a csoportban. A fotorefraktív keratektómiát követő elhúzódoan alacsony PAA mind a humán mind a nyúlkísérlet során korrelált a corneális stromahomály kialakulásával a későbbiekben.

Corneális sebgyógyulás során a könny PA aktivitásának és plazminszintjének tanulmányozására van Setten és munkacsoportja, anterior keratektómiát követően nyulakon (7 nyúl, 11 szem) végzett hasonló vizsgálatokat. A plazminszint valamint a PAA meghatározása tanulmányukban kazeinolízis alkalmazásával történt, s mintavételkor a könnysekreációs sebesség rögzítésére is sor került.⁷⁶ A kutatócsoport által ily módon detektált enzimszintek változásai a beavatkozást követően, megfeleltek az általunk normál csoport esetében meghatározott PAA változásának. Az anterior keratektómiát követően 2,3-szeres könnysekreáció fokozódás volt detektálható, ezért a műtétet követő PAA szint csökkenéséért a szekréciónak tették felelőssé. A posztoperatív plazminogén aktivátor aktivitás értéke azonban, kb. a preoperatív szint hetedére csökkent, tehát a dilúció önmagában nem adhat kielégítő magyarázatot az aktivitásban tapasztalt változásra.

Humán beteganyagokon végzett tanulmányunk során, a könnysekreáció sebessége 5-15 µl/perc közötti értéknek adódott, mintavételeink során. Ez a vizsgálati eredmény azt támasztja alá, hogy a fotorefraktív excimer lézerkezelés után mért igen alacsony könny plazminogén aktivátor aktivitásért a szekréciónak fokozódása önmagában nem tehető felelőssé.

A fotorefraktív keratektómiát követően, egyes esetekben a corneális sebgyógyulás során megfigyelt komplikációk (haze, myopiás regresszió) pontos mechanizmusa a mai napig nem ismert, de valószínűsíthető az egyéni sajátosságok jelentős szerepe is a kialakulásukban.⁸² Vizsgálataink során a 3. posztoperatív napon igen alacsony PAA volt detektálható a könnyben azon esetekben, ahol a sebgyógyulás késői szakaszában haze illetve myopiás regresszió

alakult ki.⁸³ Eredményeink alapján nem vonhatunk le végleges következtetést vajon az alacsony PAA érték a könnyben kísérő jelensége-e a komplikációk kialakulásának vagy konkrétan felelőssé tehető érte. Ismerve azonban a PA jelentős szerepét a sebgyógyulási folyamatban a fotorefraktív excimer lézerkezelést követően elhúzódóan alacsony könny PAA egy lehetséges oka a műtét utáni komplikációk kialakulásának.

A corneális sebgyógyulás során a plazminogén aktivátor-plazmin rendszer jelentőségének ismerete a fotorefraktív excimer lézerkezelést követően, új terápiás lehetőségeket vet fel a corneális homályok kialakulásának megakadályozására, melyek tanulmányozását a jövőben kívánjuk elvégezni.

7 AZ ÚJ EREDMÉNYEK ÉS AZOK LEHETSÉGES GYAKORLATI

ALKALMAZÁSÁNAK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Fotorefraktív excimer lézerkezelést követően, humán tanulmányunkban sikerült a könny urokináz típusú plazminogén aktivátor szintjében jellegzetes változást igazolni. Normál sebgyógyulás esetén a könny PAA szignifikánsan alacsonyabbnak adódott közvetlenül a műtétet követően a preoperatív, illetve az 5. posztoperatív napokon mért értékekhez képest, míg a 3. posztoperatív napon szignifikáns emelkedés volt detektálható.
2. Corneális stromahomály kialakulása esetén, szintén sikerült jellegzetes PAA változást kimutatnunk a könnyben. Ezekben az esetekben a könny PAA közvetlenül a fotorefraktív kezelést követően és a 3. posztoperatív napon szignifikánsan nem különbözött egymástól, ellenben szignifikánsan alacsonyabb értéket mutatott a preoperatív és az 5. posztoperatív napokon mért aktivátor szintekhez képest.
3. Nyúlkísérletünk során sikerült alátámasztanunk, a humán beteganyagban tett megfigyeléseinket. A szerin proteináz inhibitor nélkül kezelt csoport esetében a könny PAA változása, a humán tanulmányban ismertetett normál csoport PAA változásának felelt meg. Az inhibitorral (aprotinin) kezelt csoport, szintén jellegzetes PAA változást mutatott, mely a humán tanulmányban komplikált esetként ismertetett PAA változásnak volt megfelelő. A re-epitelizáció folyamán szerin proteináz inhibitorral szuppresszáva a könny PA szintjét, corneális stromahomály kialakulását sikerült előidézni.
4. Szerin proteináz inhibitor alkalmazása révén, egy új állatmodell létrehozásával további lehetőséget nyitottunk a fotorefraktív excimer lézerkezelést esetenként követő corneális stromahomály, gyógyszeres befolyásolásának kutatására.

5. Eredményeink alapján egyértelműen nem volt megállapítható, vajon a könny PRK utáni alacsony PAA szintje, a haze kialakulásának kísérő jelensége vagy felelőssé tehető érte. Ismerve azonban a plazminogén aktivátor plazmin rendszer sebgyógyulási folyamatokban betöltött lényeges szerepét, a 3. posztoperatív napon történő könny PAA meghatározása jóval a komplikációk kialakulása előtt hívhatja fel figyelmünket a később kialakuló problémákra. Jövőbeli lehetséges diagnosztikus alkalmazás, a hiányzó enzim pótlása pedig esetleg kivédheti a corneális stromahomályok kialakulását.

8 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Berta András egyetemi tanárnak, valamint Dr. Tózsér József docens úrnak, hogy munkámat folyamatosan figyelemmel kísérték, és messzemenően támogatták. Szeretném kifejezni hálámat Hassan Ziad doktornak, amiért lehetőséget biztosított számomra könnyminták gyűjtésére frissen operált betegeinél. Köszönet illeti Dr. Sefcsik Istvánt az állatkísérletekben nyújtott pótolhatatlan segítségéért, Pető Szilviát gondos asszisztensi munkájáért és Nagy Zoltánt a dokumentáció elkészítésében nyújtott segítségéért. Külön köszönöm David M. Silver professzor úrnak, a munka statisztikai elemzését és Dr. Facskó Andrea tanárnőnek hasznos észrevételeit, mellyel elősegítette értekezésem elkészítését.

Utoljára, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni családomnak, hogy munkám során mindvégig mellettem állt és biztosította számomra azt a családi hátteret, mely nélkül ez a munka nem születhetett volna meg.

9 IRODALOMJEGYZÉK

1. Schawlow AL, Townes CH. Infrared and optical masers. *Phys Rev.* 1940; 1958:112.
2. Maiman TH. Stimulated optical radiation in ruby masers. *Nature.* 1960; 187:493.
3. Velazco JE, Setse DFW. Bound-free emission spectra of diatomic xenon halids. *J Chem Phys.* 1975; 62:1990-1991.
4. Lohmann CP, Gartry DS, Muir MK, Timberlake GT, Fitzke FW, Marshall J. Corneal haze after excimer laser refractive surgery: objective measurements and functional implications. *Eur J Ophthalmol.* 1991; 1:173-180.
5. Lohmann CP, Marshall J. Plasmin- and plasminogen-activator inhibitors after excimer laser photorefractive keratectomy: new concept in prevention of postoperative myopic regression and haze. *Refract Corneal Surg.* 1993; 9:300-302.
6. Lohmann CP, Patmore A, Reischl U, Marshall J. The importance of the corneal epithelium in excimer-laser photorefractive keratectomy. *Ger J Ophthalmol.* 1997; 5:368-372.
7. Fagerholm P, Hamberg-Nystrom H, Tengroth B. Wound healing and myopic regression following photorefractive keratectomy. *Acta Ophthalmol.* 1994; 72:229-234.
8. Mc Donnell PJ. Excimer laser corneal surgery: new strategies and old enemies. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995; 36:4-8.
9. Gaster RN, Binder PS, Coalwell K, Berns M, McCord RC, Burstein NL. Corneal surface ablation by 193 nm excimer laser and wound healing in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1989; 30:90-98.
10. Marshall J, Trokel S, Rothery S, Krueger RR. Long-term healing of the central cornea after photorefractive keratectomy using an excimer laser. *Ophthalmology.* 1988; 95:1411-1421.

11. Marshall J, Trokel S, Rothery S, Krueger RR. Photoablative reprofiling of the cornea using an excimer laser: photorefractive keratectomy. *Lasers Light Ophthalmol.* 1986; 1:21-48.
12. Tuft S, Marshall J, Rothery S. Stromal remodelling following photorefractive keratectomy. *Lasers Light Ophthalmol.* 1987; 1:177-183.
13. Tuft S, Zabel RW, Marshall J. Corneal repair following keratectomy: a comparison between conventional surgery and laser photoablation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1989; 30:1769-1777.
14. Sundarraj N, Geiss MJ, Fantes F et al. Healing of excimer laser ablated monkey corneas: an immunohistochemical evaluation. *Arch Ophthalmol.* 1990; 108:1604-1610.
15. Hanna KD, Pouliquen YM, Savoldelli M et al. Corneal wound healing in monkeys 18 months after excimer laser photorefractive keratectomy. *Refract Corneal Surg.* 1990; 6:340-345.
16. Berman M, Leary R, Gage J. Evidence for a role of the plasminogen activator-plasmin system in corneal ulceration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1980; 19:1204-1221.
17. Berman M. Regulation of collagenase. Therapeutic consideration. *Trans Ophthalmol Soc UK.* 1978; 98:397-405.
18. Tözsér J, Berta A, Punyiczki M. Plasminogen activator activity and plasminogen independent amidolytic activity in tear fluid from healthy persons and patients with anterior segment inflammation. *Clin Chim Acta.* 1989; 183:323-331.
19. Letoche CE. The origin of spectacles. *Survey of Ophthalmol.* 1986; 31:185-188.
20. Rubin ML. Spectacles: Past, present, future. *Survey of Ophthalmol.* 1986; 30:321-327.
21. Nagy ZZs, Süveges I, Németh J, Füst Á. Excimer lézeres fotorefraktív keratectomiák során szerzett tapasztalataink. *Orvosi hetilap.* 1995; 136:1035-1041.

22. Javan A, Bennett WT, Merriott TR. Population inversion and continuous optical maser oscillation in a gas discharge containing He and Ne. *Phys Rev Letters*. 1961; 6:106.
23. L'Esperance SA Jr. Ophthalmic argon laser photocoagulation system: design construction and laboratory investigation. *Trans Am Acad Ophthalmol*. 1968; 6:827-904.
24. Cherry PM, Faulkner JD, Shaver RP, Wise JB, Witter SL. Argon laser treatment of corneal neovascularization. *Ann Ophthalmol*. 1973; 5:911-920.
25. Marshall RJ, Marshall J. Treatment of lipid keratopathy with argon laser. *Br J Ophthalmol*. 1982; 66:127-135.
26. Snip RC, Green Wr, Kreutzer EW, Hirst LW, Kenyon KR. Posterior corneal pigmentation and fibrous proliferation by iris melanocytes. *Arch Ophthalmol*. 1981; 99:1232-1238.
27. Sugar J, Jampol LM. Photocoagulation of a pigmented retrocorneal plaque. *Ophthalmic Surg*. 1982;13:562-563.
28. Fine BS, Fine S, Peacock GR, Geeraets WJ, Klein E. Preliminary observations on ocular effects of high-power continuous CO₂ laser irradiation. *Am J Ophthalmol*. 1967;64:209-222.
29. Beckman H, Rota A, Barraco R, Sugar HS, Gaynes E. Libectomies, keratectomies and keratostomies performed with a rapid-pulsed carbon dioxide laser. *Am J Ophthalmol*. 1971;71:1277-1283.
30. Esterowitz L, Hoffman CA, Tran DC et al. Advantages of the 2.94 micron wavelength for medical laser applications. Paper Tull. Technical Digest, Conference on Laser and Electronic Optics. San Francisco, California, June 9-13, 1986.
31. Loertscher H, Mandelbaum S, Parrish RK 2d, Parel JM. Preliminary report on corneal incisions created by hydrogen fluoride laser. *Am J Ophthalmol*. 1986;102:217-221.
32. Seiler T, Marshall J, Rothery S, Wollensak J. The potential of an infrared hydrogen fluoride (HF) laser for corneal surgery. *Lasers Ophthalmol*. 1986;1:49-60.

33. Hoh H, Becker KW. Intrastromal keratorhexis with the Nd:YAG laser-a possible method of refractive surgery? *Klin Monatsbl Augenheilkd.* 1990;197:480-487.
34. Taboado T, Poirier RH, Yee KW. Intrastromal PRK with a new optically coupled laser probe. *Res Corneal Surg.* 1992;8:339-402.
35. Garrison BJ, Srinivasan R. Laser ablation of organic polymers: microscopic models for photochemical and thermal process. *J Appl Phys Lett.* 1982;41:576-578.
36. Taboada J, Mikesell GW, Reed RD. Response of the corneal epithelium to KrF excimer laser pulses. *Health Phys.* 1981;40:677-683.
37. Trokel SL, Srinivasan R, Baren B. Excimer laser surgery of the cornea. *Am J Ophthalmol.* 1983;96:710-715.
38. Barlati S, Marchina E, Quaranta CA, Vigasio F, Semeraro F. Analysis of fibronectin, plasminogen activators and plasminogen in tear fluid as markers of corneal damage and repair. *Exp Eye Res.* 1990;51:1-9.
39. Gipson IK, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS. Anchoring fibrils form a complex network in human and rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1987;28:212-220.
40. Gipson IK, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS. Reassembly of the anchoring structures of the corneal epithelium during wound repair in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1989;30:425-434.
41. Malley DS, Steinert RF, Puliafito CA, et al. Immunfluorescence study of corneal wound healing after excimer laser anterior keratectomy in the monkey eye. *Arch Ophthalmol.* 1990;108:1316-1322.
42. Hanna KD, Pouliquen Y, Warning GO III, et al. Corneal stromal wound healing in rabbits after 193-nm excimer laser surface ablation. *Arch Ophthalmol.* 1989;107:895-901.

43. Gastner RN, Binder PS, Coalwell K, et al. Corneal surface ablation by 193-nm excimer laser and wound healing in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1989;30:90-98.
44. Marshall J, Trokel SL, Rothery S, et al. Long-term healing of the central cornea after photorefractive keratectomy using an excimer laser. *Ophthalmology.* 1988;95:1411-1421.
45. Tuft Sj, Zabel TW, Marshall J. Corneal repair following keratectomy: a comparison between conventional surgery and laser photoablation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1989;30:176-1777.
46. Fantes FE, Hanna KD, Waring GO III, et al. Wound healing after excimer laser keratomileusis (photorefractive keratectomy) in monkeys. *Arch Ophthalmol.* 1990;108:665-675.
47. Sundar Raj N, Geiss MJ III, Fantes F, et al. Healing of excimer laser ablated monkey corneas: an immunohistochemical evaluation. *Arch Ophthalmol.* 1990;108:1604-1610.
48. Reidy JJ, Jacobson MS, Thompson HW, et al. Comparison of corneal epithelial wound healing after photorefractive and lamellar keratectomy. *J Refract Surg.* 1996;12:352-357.
49. Pallikaris IG, Siganos DS. Excimer laser in situ keratomileusis and photorefractive keratectomy for correction of high myopia. *J Refract. Corneal Surg.* 1994;10:498-510.
50. Krwawicz T. Experimental operations of partial lamellar excision of corneal stroma for correction of myopia. *Klin Oczna* 1963;33:574-579.
51. Krwawicz T. Lamellar corneal stromectomy. *Am J Ophthalmol.* 1964;57:828.
52. Pureskin N. Weakening ocular refraction by means of partial stromectomy of the cornea under experimental conditions. *Vestn Ophthalmol.* 1967;8:1-7.
53. Seiler T, Derse M, Pham T. Repeated excimer laser treatment after photorefractive keratectomy. *Arch Ophthalmol.* 1992;110:1230-1233.

54. Ehlers N, Hjortdal JO. Excimer laser refractive keratectomy for high myopia. 6-month follow-up of patients treated bilaterally. *Acta Ophthalmol.* 1992;70:578-586.
55. Kim JH, Hahn TW, Lee YC, et al. Photorefractive keratectomy in 202 myopic eyes: one year results. *Refract Corneal Surg (Suppl).* 1993;9:11-16.
56. Caubet E. Cause of subepithelial corneal haze over 18 months after photorefractive keratectomy for myopia. *Refract Corneal Surg.* 1993;9:65-70.
57. Marshall J, Trokel S, Rothery S, et al. An ultrastructural study of corneal incisions induced by an excimer laser at 193 nm. *Ophthalmology.* 1985;92:749-758.
58. Sinbawy A, McDonnell PJ, Moreira H. Surface ultrastructure after excimer laser ablation: expanding vs contacting apertures. *Arch Ophthalmol.* 1991;109:1531-1533.
59. Kerr-Muir MG, Trokel SL, Marshall J, et al. Ultrastructural comparison of conventional surgical and argon fluoride excimer laser keratectomy. *Am J Ophthalmol.* 1987;103:448-453.
60. Koch JW, Lang GK, Kolkmeier J, Nauman GOH. Korneale Wundheilung nach perforierender und nichtperforierender Excimerlaserkeratektomie. *Fortschr Ophthalmol.* 1990;87:615-622.
61. Koch JW, Lang GK, Nauman GOH. Endothelial reaction to perforating and non-perforating excimer laser excisions in rabbits. *Refract Corneal Surg.* 1991;7:214-222.
62. Dehm EJ, Puliafito CA, Adler CM, Steinert RF. Corneal endothelial injury in rabbits following excimer laser ablation at 193-nm and 248-nm. *Arch Ophthalmol.* 1986;104:1364-1368.
63. Zabel RW, Tuft S, Marshall J. Excimer laser photorefractive keratectomy: endothelial morphology following area ablation of the cornea. *Arch Ophthalmol.* 1989;107:895-901.
64. Collen D. On the regulation and control of fibrinolysis. *Thromb Hemostas.* 1980;43:77-89.

65. Saksela O. Plasminogen activation and regulation of pericellular proteolysis. *Biochim Biophys Acta*. 1985;823:35-65.
66. Tryggvason K, Höyhty M, Salo T. Proteolytic degradation of extracellular matrix in tumor invasion. *Biochim Biophys Acta*. 1987;907:191-217.
67. Berman M. Collagenase and corneal ulceration. In: Woolley D, Evanson J, eds. *Collagenase in normal and pathological connective tissues*. New York, John Wiley and Sons. 1980;p.141-174.
68. Kaoduri A, Bohak Z. Production of plasminogen activator by cells in culture. In: Mizrahi A, van Wezel A.L, eds. *Advances in biotechnological processes 5*. New York, Alan R. Liss Inc. 1985;p.275-299.
69. Pandolfi M, Astrup T. A histochemical study of the fibrinolytic activity. Cornea, conjunctiva and lacrimal gland. *Arch Ophthalmol*. 1967;77:258-267.
70. Pandolfi M, Lantz E. Partial purification and characterization of keratokinase, the fibrinolytic activator of the cornea. *Exp Eye Res*. 1979;29:563-571.
71. Thörig L, Wijngaards G, van Haeringen N.J. Immunological characterization and possible origin of plasminogen activator in human tear fluid. *Ophthalmic Res*. 1983;15:268-276.
72. Lantz E, Pandolfi M. Fibrinolysis in cornea and conjunctiva: evidence of two types of activators. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1986;224:393-396.
73. Prause J.U. Serum albumin, serum antiproteases and polymorphonuclear leukocyte neutral collagenolytic protease in the tear fluid of patients with corneal ulcers. *Acta Ophthalmol*. 1983;61:272-282.
74. Berman M.B, Barber J.C, Talambo R.C, Langley C.E. Corneal ulceration and the serum antiproteases. I. Alpha-1 antitrypsin. *Invest Ophthalmol*. 1973;12:759-770.

75. Sen D.K, Sarin G.S. Tear and serum alpha-1-antitrypsin levels in corneal and conjunctival diseases. In: Holly F.J.eds. The preocular tear film in health disease and contac lens wear. Dry Eye Inst. Lubbock, Texas. 1986;p192-199.
76. van Setten GB, Salonen EM, Vaheri A, et al. Plasmin and plasminogen activator activities in tear fluid during corneal wound healing after anterior keratectomy. Curr Eye Res. 1989;8:1293-1298.
77. van Haeringen NJ, Glasius E. The origin of some enzymes in tear fluid, determined by comparative investigations with two collection methods. Exp Eye Res. 1976;22:267-272.
78. Shimada H, Mori T, Takada A et al. Use of chromogenic substrate S-2251 for determination of plasminogen activator in rat ovaries. ScandJ Clin Lab Invest. 198;42(suppl)162:31-61.
79. Freibrger P. Chrmogetic peptide substrates: their use for the assay of factors in the fibrinolytic and plasma kallikrein-kinin systems. Thrombos Haemostas (Stuttgart). 1981;46:507-510.
80. Tözsér J, Berta A. Urokinase-type plasminogen activator in rabbit tears. Comparison with human tears. Exp Eye Res. 1990;51:33-37.
81. Bland M. An introduction to medical statistics. Second Ed. Oxford: Oxford University Press: 1995.
82. Moller-Pedersen T, Li HF, Petroll WM, Cavanagh HD, Jester JV. Confocal microscopic characterization of wound repair after photorefractive keratectomy. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1998;39:487-501.
83. Csutak A, Tözsér J, Békési L, Hassan Z, Berta A, Silver D. Plasminogen activator activity in tears after excimer laser photorefractive keratectomy. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000;41:3743-3747.

10 SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

10.1 Publikációk

1. **Csutak A**, Tózsér J, Békési L, Hassan Z, Berta A, Silver D. (2000): Plasminogen Activator Activity in Tears after Excimer Laser Photorefractive Keratectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41:3743-3747 (Impact factor: 4.858).
2. Takács L, **Csutak A**, Balázs E, Módis L, Berta A. (1999): Expression of β IG-H3 is lower than normal in keratoconus, but increases upon scarring. *Cornea* 18: 599-605 (Impact factor: 1.198).
3. Takács L, **Csutak A**, Balázs E, Berta A. (1999): Epithelial cells and fibroblasts of scarring human corneas secrete increased amounts of β IG-H3. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 237:529-534 (Impact factor: 1.177).
4. Módis L, Németh G, Takács L, **Csutak A**, Kettesy B, Berta A. (2001): Corneakonzerváló folyadékok összehasonlító vizsgálata. *Szemészet* 138:5-10.
5. **Csutak A**, Silver D, Tózsér J, Facskó A, Berta A. (2001): Plasminogen activator activity and inhibition in rabbit tears after photorefractive keratectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (submitted for publication).
6. Silver D, **Csutak A**, Tózsér J, Berta A. (2001): Chemical kinetic model of plasminogen activator activity in corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (submitted for publication).
7. **Csutak A**, Tózsér J, Hassan Z, Berta A, Silver D. (2001): Plazminogén aktivator aktivitás változásának jelentősége a könnyben Photorefractive Excimer Lézerkezelés után. *Szemészet* (közlésre elfogadva).

10.2 Referált folyóiratban megjelent absztraktok

1. Radics E, Békési L, **Csutak A**, Berta A. (1997): Introduction of Clinical Laboratory Methods Indicating Graft Rejection Following Perforating Keratoplasty. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 211:Suppl5 3-12 (Impact factor: 0,423).
2. **Csutak A**, Berta A, Radics E, Hassan Z, Békési L. (1998): Low plasminogen activator activities in the tears of patients with prolonged wound healing following excimer laser PRK. *Invest Ophthalmol Vis Sci. Suppl.* (Impact factor: 4,858).
3. Berta A, Radics E, Békési L, **Csutak A**. (1998): Increased levels of cytokines detected by ELISA in the tears of patients with corneal graft rejection. *Invest Ophthalmol Vis Sci.Suppl.*(Impact factor: 4,858).
4. **Csutak A**, Silver D, Tózsér J, Hassan Z, Berta A. (2000): Plasminogen activator activity in rabbit tears after excimer laser photorefractive keratectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.Suppl.*41 (Impact factor: 4,858).
5. Silver D, **Csutak A**, Tózsér J, Berta A. (2000): Chemical kinetic model of plasminogen activator activity in corneal wound healing. *Invest Ophthalmol.Suppl.*,41 (Impact factor: 4,858).

11 MELLÉKLETEK

11.1 Az egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés témájához szorosan kapcsolódó, közlés elbírálásra benyújtott angol nyelvű publikációk

11.1.1 Plasminogen activator activity and inhibition in rabbit tears after photorefractive keratectomy

Adrienne Csutak MD¹, David M. Silver PhD², József Tózsér PhD³, Andrea Facskó MD, PhD¹, András Berta MD, PhD, DSc¹

¹Department of Ophthalmology, ³Department of Biochemistry and Molecular Biology, University Medical School of Debrecen, Debrecen, Hungary

²The Johns Hopkins University, Applied Physics Laboratory, Laurel, Maryland, USA

Short Title: Plasminogen activator in rabbit tears after PRK

Number of words in text: 2500; also, 2 Figures and 1 Table enclosed with article.

ARVO Section Codes: (CO) Cornea, (BI) Biochemistry/Molecular Biology

Key Words: plasminogen activator, photorefractive keratectomy, refractive surgery, corneal wound healing, rabbit tears

Corresponding author: David M. Silver, Ph D, Johns Hopkins University, Applied Physics Laboratory, 11100 Johns Hopkins Road, Laurel, MD 20723-6099. Phone: 240-228-6265, Fax: 240-228-6904, E-mail: David.M.Silver@jhuapl.edu

Commercial relationships: N

Abstract

Purpose. To determine whether inhibitor-induced low levels of plasminogen activator activity (PAA) during corneal re-epithelialization after excimer laser photorefractive keratectomy (PRK) correlates with the eventual occurrence of haze in rabbit eyes.

Methods. Tear samples were collected with glass capillaries from 16 eyes of 8 New Zealand rabbits, using i.m. injection of pilocarpine hydrochloride for stimulation. Tears were collected before and after PRK surgery, and then daily for five days, and every fourth day thereafter for three months. Both eyes underwent PRK treatment, but one eye of each rabbit was treated with a serine protease inhibitor (SPI) over the first 7 days. PAA in the tear samples was measured by a spectrophotometric method using human plasminogen and chromogenic peptide substrate S-2251.

Results. For 8 eyes of 8 rabbits after PRK, the PAA values were significantly lower (day 1) and higher (days 2 and 3) than the equilibrium PAA ($p < 0.001$). The corneas remained clear in each of these eyes. For the 8 contralateral eyes after PRK, the PAA values on days 1-7 were significantly lower than the equilibrium PAA ($p < 0.001$). All 8 of these eyes developed corneal haze after two months. The difference between the equilibrium PAA for the two groups of eyes after 19 days was not significant ($p = 0.06$).

Conclusion. Corneal wound healing abnormality (haze) develops in rabbit eyes after PRK when PAA levels are reduced using SPI for a week following PRK.

Purpose

The cornea is responsible for two thirds of the refracting power of the eye, making it a candidate for surgical procedures aimed at refractive correction. The qualities of the wounds made by the ArF excimer laser suggested the concept of using such a laser to directly photoablate the cornea after removal of the epithelial layer¹. The effect is to reprofile the surface of the cornea, defining a new anterior radius of curvature, thereby altering the optical power of the cornea. Marshall et al¹ termed this technique photorefractive keratectomy (PRK). The procedure is a reasonably safe, effective and predictable technique for correcting low to moderate myopia. Nevertheless, the most frequently reported complications include glare, haloes, difficulty with night vision, decreased contrast sensitivity, transient increases in intraocular pressure, mild subepithelial haze and myopic regression^{2,3}.

Numerous laboratory investigations, principally utilizing rabbit and monkey models, have generally demonstrated rapid and stable re-epithelialization over the area of excimer laser ablation. After injury, reformation of the basement membrane and anchoring fibril network is necessary for tight adhesion of the epithelium to the stroma, and the healing epithelium must synthesize and assemble these structures^{4,5}. After mechanical keratectomy wounding, full re-assembly of the adhesion complex generally requires 1 to 2 months in rabbits⁵. In both rabbit and monkey eyes the ablation zone is initially clear, but a diffuse reticular haze, sometimes accompanied by a localized or diffusely dense scar, has been commonly observed⁶⁻⁸. Loss of transparency peaks at approximately 1 month and then slowly diminishes over 6 or more months. Opacification may completely disappear, but some degree of light scattering may persist throughout a follow-up period in most animal studies.

The human cornea exhibits less dense opacification than animal corneas, but has a similar time course of onset and resolution. Most clinical series report maximal, although generally mild, haze developing within 1 to 2 months after treatment, marked improvement in

haze by 6 months, and even further improvement with little or no haze by 12 months⁹⁻¹¹. In addition to the results with animal studies, early experience suggested that haze in humans was correlated with ablation depth¹² and smaller ablation zones. In particular, there were patient complaints about haloes and glare under dim illumination. Surprisingly, the human cornea tolerates an increased ablation depth associated with a larger diameter ablation zone as evidenced by an overall reduction in haze as well as less refractive regression and improved predictability^{13,14}.

Additional risk factors for haze have been discussed^{2,3,15-17}. These include higher levels of myopic correction, noncompliance with postoperative steroid medication, steroid-induced intraocular pressure response and collagen vascular disease and other autoimmune diseases.

Although the exact mechanisms underlying post-PRK complications are unknown, it is generally suspected that individual variations in corneal wound healing play a significant role in post-PRK refractive regression and haze formation¹⁸. In a previous human study¹⁹, low plasminogen activator activity sustained over a period of three days, evidenced in tear fluid, was an accompanying sign of the six PRK cases that developed haze. The normal plasminogen activator activity pattern seen in seventy-one eyes included a higher than normal plasminogen activator activity level on the third postoperative day and no subsequent haze. In that study, it was not possible to distinguish whether the low plasminogen activator activity was a primary phenomenon or was a result of some other primary event. However based on its known importance in the wound healing process, the low plasminogen activator activity could have been a possible cause of the defective corneal healing resulting in haze.

The aim of this study is to determine whether low levels of plasminogen activator activity could induce haze formation after PRK surgery. This is accomplished by using a serine protease inhibitor to artificially suppress plasminogen activator activity during the

period of re-epithelialization after PRK surgery in rabbit eyes. Analysis of frequently sampled tears provides a quantification of the plasminogen activator activity.

Methods

Sixteen eyes of eight normal healthy New Zealand rabbits (3.0-3.5kg) underwent PRK surgery for spherical correction using the Schwind Keratom II ArF excimer laser (193nm), performed by the same surgeon at Vital-Laser LLC, Department of Ophthalmology, University Medical School of Debrecen. Animals were handled and treated in adherence to the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. De-epithelialization was performed with a blunt Keratome Blade knife after epithelial marking with a 6.0-6.5 mm Hoffer trephine. The epithelium was scraped gently from periphery to center. Residual epithelial debris was removed with a sterile microsponge.

Topical anesthetic (0.4% oxybuprocaine hydrochloride) eyedrops were administered twice before the surgery. General anesthesia was accomplished by intravenous injection of ketamine-xylazine (2.2: 1 ratio, 10mg/kg). The PRK surgeries were performed on the morning of day 1. The postoperative treatment included antibiotic eyedrops, Ciloxan (Alcon), twelve times (hourly) on day 1 and five times (every two hours) on five additional days (postoperative days 2-5 and 7). Flucon (Alcon) and Tears Naturale (Alcon) were given 5 times daily (every two hours) during the first postoperative month, reduced to 4 times daily (every three hours) for the second month and 3 times daily (every four hours) for the third month. All rabbits received follow-up examinations at 1, 3 and 6 months following the PRK procedure.

In addition, the left eye of each rabbit received 1 drop of 20,000 IU/ml serine protease inhibitor (SPI), aprotinin (Gordox, Richter Gideon Rt., Budapest), twelve times (hourly) on day 1 and five times (every two hours) on five additional days (postoperative days 2-5 and 7). This was designated the "With-SPI" group. The right eyes were not treated with SPI and were

designated the “No-SPI” group. After the seventh day, identical treatment was used on both eyes. No other treatment was used during the six month follow-up period.

Tear samples for plasminogen activator activity analyses were obtained on the day before the PRK surgery (day 0). Tear samples were collected within minutes after PRK (day 1), before treatment with any eyedrops. Daily on postoperative days 2-5, on postoperative day 7 and every fourth day thereafter for three months, tears were sampled in the morning prior to the administration of any eyedrops on the given day.

Samples consisted of tears collected with glass capillaries^{20,21} using i.m. injection of pilocarpine hydrochloride (5 mg/kg) for stimulation. Tears were taken from the lower tear meniscus and care was taken not to touch the conjunctiva. The same collection method was used throughout the study. The duration of the sampling time was recorded and the secretion rate was calculated in $\mu\text{l}/\text{min}$, dividing the obtained tear volume by the time of sample collection. Samples used in this investigation had secretion rates of 15-50 $\mu\text{l}/\text{min}$. Samples were centrifuged (1800 rpm) for 8-10 minutes right after sample collection and supernatants were deep-frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ and were thawed only once for measurements.

Plasminogen activator activity was measured in the sample tears by a spectrophotometric method using human plasminogen and a plasmin-specific chromogenic peptide substrate, D-valyl-L-leucyl-L-lysine-p-nitroanilide (S-2251)²². This assay is sensitive predominantly to urokinase-like plasminogen activator²⁰. Plasminogen and the S-2251 were purchased from Chromogenix (Milan, Italy). Urokinase standard was purchased from Choay (Paris, France). This assay is suitable to measure plasmin activity but can also be used for determining plasminogen activator activity by adding plasminogen to the reagents. Plasminogen activator activity was measured as described by Shimada and coworkers²² with the modifications of Tözsér and coworkers^{19,20,23}.

Determination of haze was made without any knowledge of the plasminogen activator levels for any of the rabbits. The haze grading system of Hanna was adopted²⁴.

Standard statistical procedures were used to compare plasminogen activator activities within and between different groups using t-tests for means with unequal variances and paired t-tests to compare results on contralateral eyes. Differences having probability, p , less than 0.05 are considered significant, and $p < 0.001$ is considered highly significant.

Results

Figure 1 shows the time course of the plasminogen activator activity over the 91 days after PRK for the No-SPI rabbit eyes. Table 1 gives mean values of the plasminogen activator activity for the early measurement days and the average plasminogen activator activity for days 19-91. In Table 1 and the Figures, “day 0” represents the day before PRK surgery, “day 1” is the day of the surgery, and the succeeding days follow. The mean plasminogen activator activity value before surgery (day 0) was not significantly different ($p = 0.16$) than the 19-91 day equilibrium plasminogen activator activity level. The plasminogen activator activity values were significantly ($p < 0.001$) lower (day 1) and higher (days 2 and 3) than the equilibrium plasminogen activator activity level. The plasminogen activator activity on day 4 was significantly ($p = 0.02$) higher than the equilibrium level, but from day 5 and beyond, there were no significant differences with the equilibrium value. The corneas remained clear in these eyes over the six-month follow-up period.

Figure 2. shows 91 days of plasminogen activator activity for the contralateral With-SPI eyes. Individual mean plasminogen activator activity levels for various measurement days are given in Table 1. The SPI suppressed the plasminogen activator activity to a mean value averaged over days 1-7 of 0.13 (0.15) IU/ml. The mean plasminogen activator activity prior to surgery (day 0) was not significantly different ($p = 0.18$) than the equilibrium plasminogen activator activity level of 2.88 (0.22) IU/ml, averaged over days 19-91. Plasminogen activator

activity on days 1-7 were significantly ($p < 0.001$) lower than the equilibrium plasminogen activator activity level. The mean plasminogen activator activity on day 11 remained significantly lower ($p = 0.002$) than the equilibrium plasminogen activator activity level, but from day 15 onwards, there were no significant differences with the equilibrium plasminogen activator activity value. All 8 of these eyes developed corneal haze after two months.

The difference between the presurgical (day 0) mean plasminogen activator activity for the two groups was not significant ($p = 0.46$) nor was the equilibrium (days 19-91) mean plasminogen activator activity significantly different ($p = 0.06$) for the two groups.

Discussion

Plasminogen activator is a normal component of tear fluid whose concentration is influenced by biochemical transformations in the cornea. Normal values of plasminogen activator activity in rabbit tears is seen in Figures 1 and 2 on day 0, prior to PRK and in the later months following the surgery. The two groups, No-SPI and With-SPI, consist of contralateral eyes and therefore the plasminogen activator activities before surgery (day 0) and the equilibrium levels (days 19-91) are expected (and observed) to be not significantly different.

The tear samples were collected from the rabbits in the early morning 8-15 hours after the previous administration of any eyedrops from the previous day and prior to the instillation of eyedrops on the given day. The measurements of plasminogen activator activity in the tear samples demonstrate the effectiveness of the SPI in inhibiting plasminogen activator activity.

The influence of corneal wounding (PRK) is seen in Figure 1 for the No-SPI group of rabbit eyes. First there is a drop in plasminogen activator activity after surgery (day 1). This is followed by an overshoot to a level above the initial plasminogen activator activity on day 2 and lasting for a few days. Finally, there is a return to the initial plasminogen activator activity level. This pattern of plasminogen activator activity seen in Figure 1 for the No-SPI

group resembles the pattern seen for humans who experience normal wound healing without the occurrence of haze¹⁹. In the case of humans, the plasminogen activator activity fell to a level near zero after PRK, then rose above initial levels on postoperative day 3 and returned to the initial level by postoperative day 5. The plasminogen activator activity pattern in Figure 1 is also consistent with that reported for rabbits with normal wound healing following anterior keratectomy²⁵.

In contrast, the plasminogen activator activity pattern found in Figure 2 for the With-SPI group was engineered to resemble the pattern found in humans who presented abnormal wound healing and experienced haze¹⁹. In the human abnormal healing case, the plasminogen activator activity fell to near zero after PRK and remained low through the third postoperative day. By the fifth postoperative day, the plasminogen activator activity was below but returning to the initial level. Here, the plasminogen activator activity level was deliberately suppressed using SPI in the With-SPI group of rabbit eyes over a period of seven days, as shown in Figure 2.

Naturally occurring low levels of plasminogen activator activity for several days after PRK in human tears correlated with the development of corneal wound healing abnormality (haze)¹⁹. The inhibitor-induced low levels of plasminogen activator activity for a week following PRK in rabbit tears also correlate with the development of corneal haze.

References

1. Marshall J, Trokel S, Rothery S, Kreuger RR. Photoablative reprofiling of the cornea using an excimer laser: photorefractive keratectomy. *Laser Ophthalmol* 1986;1:21-48.
2. Chan TK, Ashraf MF, Azar DT. Photorefractive keratectomy (PRK) outcomes and complications. In: Azar DT, Steinert RF, Stark WJ, eds. *Excimer Laser Phototherapeutic Keratectomy*. Baltimore, MD: Williams & Wilkins; 1997:157-173.
3. Hadden OB, Ring CP, Morris AT, Elder MJ. Visual, refractive, and subjective outcomes after photorefractive keratectomy for myopia of 6 to 10 diopters using the Nidek laser. *J Cataract Refract Surg* 1999;25:936-942.
4. Gipson IK, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS. Anchoring fibrils form a complex network in human and rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28:212-220.
5. Gipson IK, Spurr-Michaud S, Tisdale AS. Reassembly of the anchoring structures of the corneal epithelium during wound repair in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30:425-434.
6. Marshall J, Trokel SL, Rothery S, Krueger RR. Long-term healing of the central cornea after photorefractive keratectomy using excimer laser. *Ophthalmology* 1988;95:1411-1421.
7. Gaster RN, Binder PS, Coalwell K, Burns M, McCord RC, Burstein NL. Corneal surface ablation by 193-nm excimer laser and wound healing in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30:90-98.
8. Hanna KD, Pouliquen Y, Waring GO III, et al. Corneal stromal wound healing after 193-nm excimer laser surface ablation. *Arch Ophthalmol* 1989;107:895-901.
9. Dutt S, Steinert RF, Raizman MB, Puliafito CA. One-year results of excimer laser photorefractive keratectomy for low to moderate myopia. *Arch Ophthalmol* 1994;112:1427-1436.

10. Gartry DS, Kerr-Muir MG, Marshall J. Photorefractive keratectomy with an argon fluoride excimer laser: a clinical study. *Refract Corneal Surg* 1991;7:420-435.
11. Seiler T, Wollensak J. Myopic photorefractive keratectomy with the excimer laser: one year follow up. *Ophthalmology* 1991;98:1156-1163.
12. Moller-Pedersen T, Cavanagh HD, Petroll WM, Jester JV. Corneal haze development after PRK is regulated by volume of stromal tissue removal. *Cornea* 1998;17:627-639.
13. Sher NA, Barak M, Daya S, et al. Excimer laser photorefractive keratectomy in high myopia. A multicenter study. *Arch Ophthalmol* 1992;110:935-943.
14. O'Brart DP, Corbett MC, Lohmann CP, Kerr Muir MG, Marshall J. The effects of ablation on the outcome of excimer laser photorefractive keratectomy. *Arch Ophthalmol* 1995;113:438-443.
15. Azar DT, Hahn TW, Khoury JM. Corneal wound healing following laser surgery. In: Azar DT, ed. *Refractive Surgery*. Stamford, CT: Appleton & Lange; 1997:41-61.
16. Carones F, Fiore T, Brancato R. Mechanical vs. alcohol epithelial removal during photorefractive keratectomy. *J Refract Surg* 1999;15:556-562.
17. Siganos DS, Katsanevaki VJ, Pallikaris IG. Correlation of subepithelial haze and refractive regression 1 month after photorefractive keratectomy for myopia. *J Refract Surg* 1999;15:338-342.
18. Moller-Pedersen T, Li HF, Petroll WM, et al. Confocal microscopic characterization of wound repair after photorefractive keratectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:487-501.
19. Csutak A, Tözsér J, Békési L, Hassan Z, Berta A, Silver DM. Plasminogen activator activity in tears after excimer laser photorefractive keratectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:3743-3747.

20. Tózsér J, Berta A, Punyiczki M. Plasminogen activator activity and plasminogen independent amidolytic activity in tear fluid from healthy persons and patients with anterior segment inflammation. *Clin Chim Acta* 1989;183:323-331.
21. van Haeringen NJ, Glasius E. The origin of some enzymes in tear fluid, determined by comparative investigations with two collection methods. *Exp Eye Res* 1976;22:267-272.
22. Shimada H, Mori T, Takada A, et al. Use of chromogenic substrate S-2251 for determination of plasminogen activator in rat ovaries. *Thrombos Haemostas (Stuttgart)* 1981;46:507-510.
23. Tózsér J, Berta A. Urokinase-type plasminogen activator in rabbit tears. Comparison with human tears. *Exp. Eye Res* 1990;51:33-37.
24. Hanna KD, Pouliquen YM, Savoldelli M, et al. Corneal wound healing in monkeys 18 months after excimer laser photorefractive keratectomy. *Refract Corneal Surg* 1990;6:340-345.
25. van Setten GB, Salonen EM, Vaheri A, et al. Plasmin and plasminogen activator activities in tear fluid during corneal wound healing after anterior keratectomy. *Curr Eye Res* 1989;8:1293-1298.

Figure Legends

Figure 1. Plasminogen activator activities in rabbit tears following PRK, for the No-SPI group that was not treated with SPI.

Figure 2. Plasminogen activator activities in rabbit tears, for the With-SPI group that was treated with SPI for seven days following PRK.

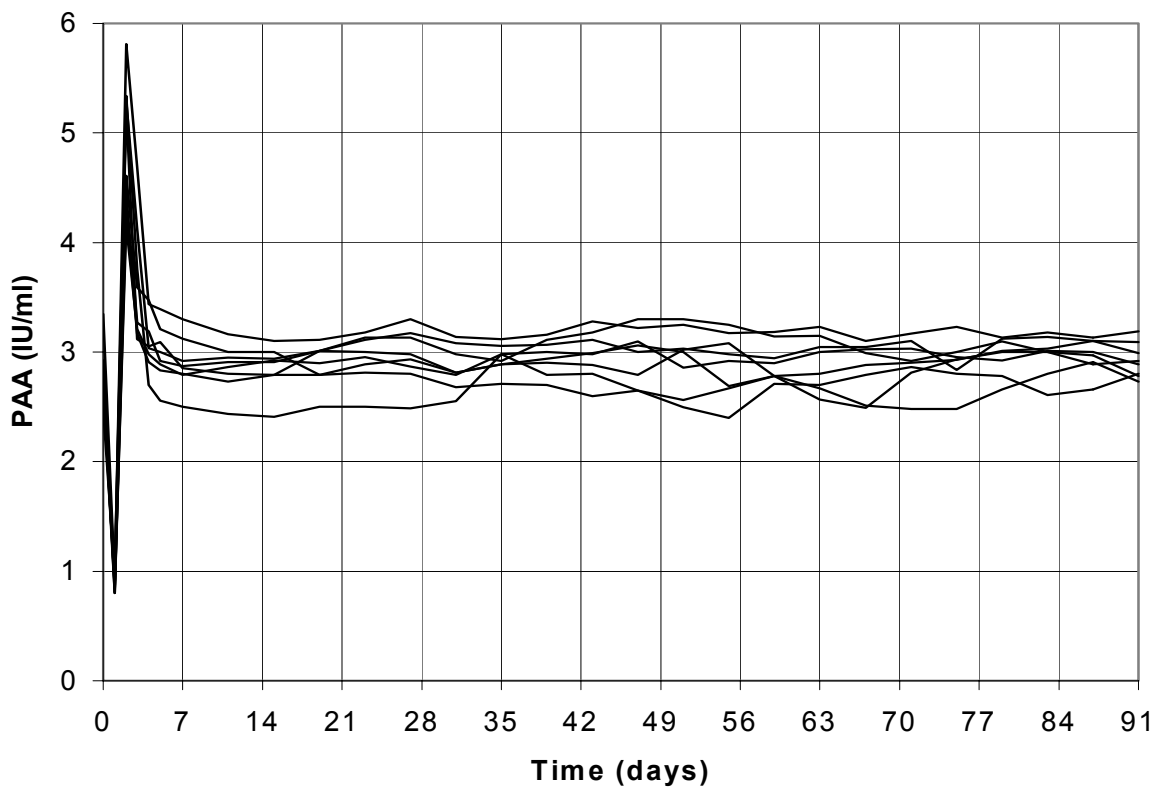


Figure 1. Plasminogen activator activities in rabbit tears following PRK, for the No-SPI group that was not treated with SPI.

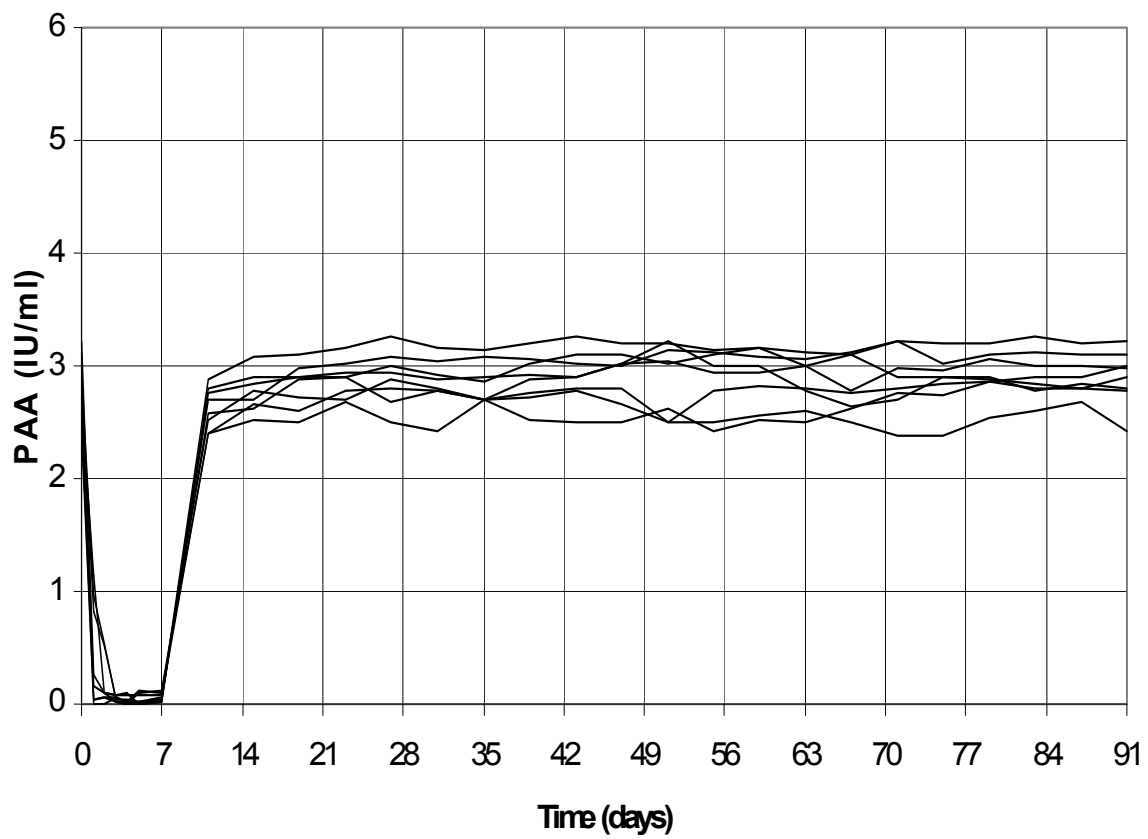


Figure 2. Plasminogen activator activities in rabbit tears, for the With-SPI group that was treated with SPI for seven days following PRK.

11.1.2 Plasminogen Activator for Promoting Wound Healing After Laser Vision Correction Surgery

David M. Silver PhD¹, Adrienne Csutak MD², József Tózsér PhD³, András Berta MD, PhD, DSc²

¹The Johns Hopkins University, Applied Physics Laboratory, Laurel, Maryland, USA

²Department of Ophthalmology, ³Department of Biochemistry and Molecular Biology, University Medical School of Debrecen, Debrecen, Hungary

Summary

Laser refractive surgery is performed in increasing numbers on completely healthy eyes where adverse surgical effects are less acceptable than for diseased eye treatments. Complications due to abnormal wound healing include central vision haze. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) plays a critical role in the biochemical wound healing cascade and is present in normal corneal cells and tear film. In humans and rabbits, prolonged depletion of uPA in the few days following laser surgery correlates with later occurrence of haze. Providing uPA in the form of eyedrops is a novel suggestion as a therapeutic remedy to prevent or reduce haze formation.

Laser refractive surgery is performed on the cornea of the eye using an excimer laser to correct myopia and other refractive errors. With photorefractive keratectomy (PRK), the corneal epithelium is removed and the excimer laser is applied to the Bowman layer and the anterior stroma. An ablation depth of approximately 10 microns corrects 1 Diopter of myopia. The resultant reshaping of the cornea alters its optical power. Re-epithelialization of the cornea occurs usually within two to three days postoperatively. Alternatively, laser in situ keratomileusis (LASIK), uses a suction ring and a microkeratome to create a thin flap from the central corneal surface. The underlying stromal bed is treated with the excimer laser and the flap is repositioned. In the majority of PRK and LASIK cases, the refractive outcome is within ± 0.5 Diopter of that intended. Post-surgical complications include excessive myopic regression and disturbances in corneal transparency (haze, cloudiness, scarring) due to irregularities in the wound healing process. Flap-related complications can also occur with LASIK. Efficacy outcomes in the long term are generally similar between the two procedures.¹

We emphasize that laser refractive surgery is elective and resembles cosmetic surgery since it is performed on completely healthy eyes. Complications in healthy eyes are even less acceptable than in diseased eyes. The number of laser vision correction surgeries continues to increase exponentially. We expect that most medical practitioners will have patients who have had laser refractive surgery.

Subepithelial haze or cloudiness following laser refractive surgery occurs as a result of the disrupted structure of the anterior stromal lamellae. When haze occurs, it is observed after a few weeks to a few months postoperatively. Its duration can be from weeks to months, with some occurrences lasting over a year. Its severity can be mild to strong. There is a wide variability in the reported prevalence of haze. In a recent study,² we found an 8% occurrence of mild haze following PRK. A literature review indicated an 8.7% occurrence of haze of

various degrees of severity with LASIK.³ Diagnostic test to determine when haze will occur and a therapeutic remedy to prevent or ameliorate its occurrence would be desirable. Reduction of haze formation, even though it occurs in only a fraction of the surgical cases, would nevertheless be significant.

Tear fluid is an easily accessible medium for studying corneal wound healing. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) is a serine protease found as a normal component of tear fluid,⁴ whose origin is conjunctival and corneal epithelial cells. uPA is important in the biochemical cascades leading to both tissue destruction and repair, being responsible for the activation, through proteolytic cleavage, of plasminogen to plasmin. Once formed, plasmin among other substances degrades fibronectin and laminin in the extracellular matrix, facilitating cell sliding and healing. Plasmin also activates latent procollagenase to collagenase resulting in collagen molecule degradation, and participates in feedback to fibroblast cells inducing them to secrete more uPA. Normal corneas contain cells with uPA, and epithelium, keratocytes and polymorphonuclear neutrophils of ulcerating corneas are capable of releasing uPA.

In our attempts to understand the wound healing process, we measured the levels of uPA activity (uPAA) in tear fluid during corneal re-epithelialization after excimer laser PRK.² Tear samples were collected with glass capillaries from 77 eyes of 42 human patients before and during the 5-day period after PRK. In twenty patients, the contralateral eye was similarly sampled as control. In another study,⁵ we collected tear samples with glass capillaries from 16 eyes of 8 New Zealand rabbits, using i.m. injection of pilocarpine hydrochloride for stimulation. Tears were collected immediately before, after, five more days in the first week, and every fourth day thereafter for three months after PRK surgery. Both eyes underwent PRK treatment, but one eye of each rabbit was treated with a serine protease inhibitor (SPI) to suppress uPA over the first 7 days. uPAA in both the human and rabbit tear samples was

measured by a spectrophotometric method using human plasminogen and chromogenic peptide substrate S-2251.

In both humans and rabbits (Figures 1-2), tear uPAA was lower immediately after PRK compared to preoperative values. For 71 human eyes and 8 rabbit eyes with normal wound healing (clear corneas), uPAA was significantly elevated above the preoperative level on the third (human) or second (rabbit) postoperative day and then returned to the preoperative level by the fifth (human) or fourth (rabbit) postoperative day. In contrast, tear uPAA remained low through the third postoperative day in the six human eyes that eventually developed haze after three to six months. For the eight contralateral rabbit eyes where uPA was suppressed with SPI, corneal haze developed after two to three months.

In our human and rabbit studies, low levels of uPAA, extending a few days beyond the surgery, correlate with the later development of corneal healing abnormality (haze). This suggests that providing replacement values (eyedrops) of uPA might serve as a therapeutic measure for reducing or preventing the occurrence of haze. Since haze formation cannot be predicted prior to surgery and since the uPA is expected to have a benign effect on healthy corneas, patients might be treated on a prophylactic basis. There is no current alternative preventative. Conventional wisdom considers protease inhibitors as wound healing substances. The use of a protease, uPA, as the beneficiary player is a novel concept needing further experimentation and clinical verification.

References

1. Hersh PS, Brint SF, Maloney RK, et al. Photorefractive keratectomy versus laser in situ keratomileusis for moderate to high myopia. A randomized prospective study. *Ophthalmology* 1998;105:1512-1523.
2. Csutak A, Tözsér J, Békési L, Hassan Z, Berta A, Silver DM. Plasminogen activator activity in tears after excimer laser photorefractive keratectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:3743-3747.
3. Farah SG, Azar DT, Gurdal C, Wong J. Laser in situ keratomileusis: literature review of a developing technique. *J Cataract Refract Surg* 1998;24:989-1006.
4. Barlati S, Marchina E, Quaranta CA, et al. Analysis of fibronectin, plasminogen activators and plasminogen in tear fluid as markers of corneal damage and repair. *Exp Eye Res* 1990;51:1-9.
5. Csutak A, Silver DM, Tözsér J, Facskó A, Berta A. Plasminogen activator activity in rabbit tears after excimer laser photorefractive keratectomy. Submitted for publication, 2001.

Figure captions

Figure 1. Observed uPAA in human tears following PRK: 71 eyes had normal uPAA pattern and had no haze; 6 eyes had low uPAA levels through the third day after PRK and had haze.

Figure 2. Observed uPAA in rabbit tears following PRK: 8 eyes had normal uPAA pattern and had no haze; 8 eyes had suppressed uPAA levels caused by treatment with SPI for seven days and had haze.

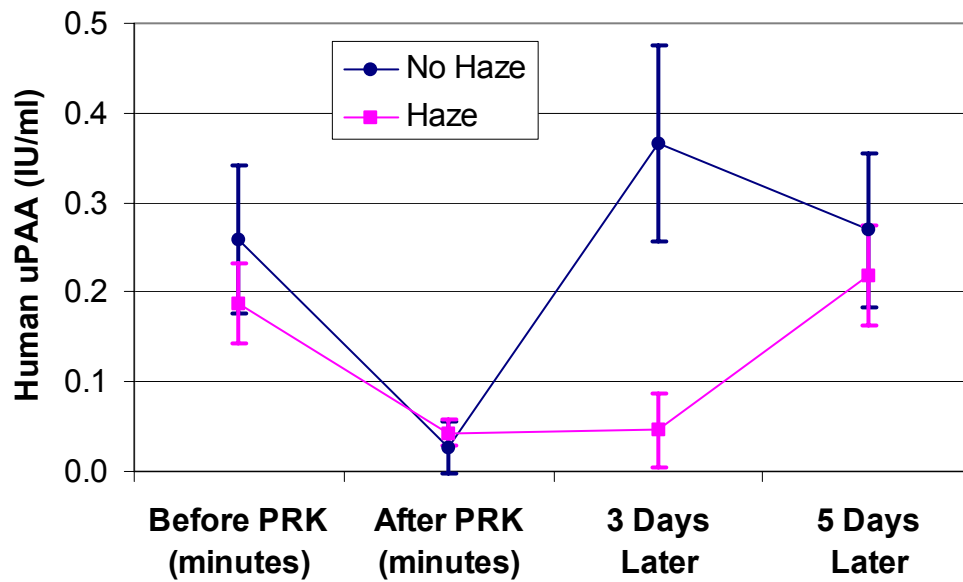


Figure 1. Observed uPAA in human tears following PRK: 71 eyes had normal uPAA pattern and had no haze; 6 eyes had low uPAA levels through the third day after PRK and had haze.

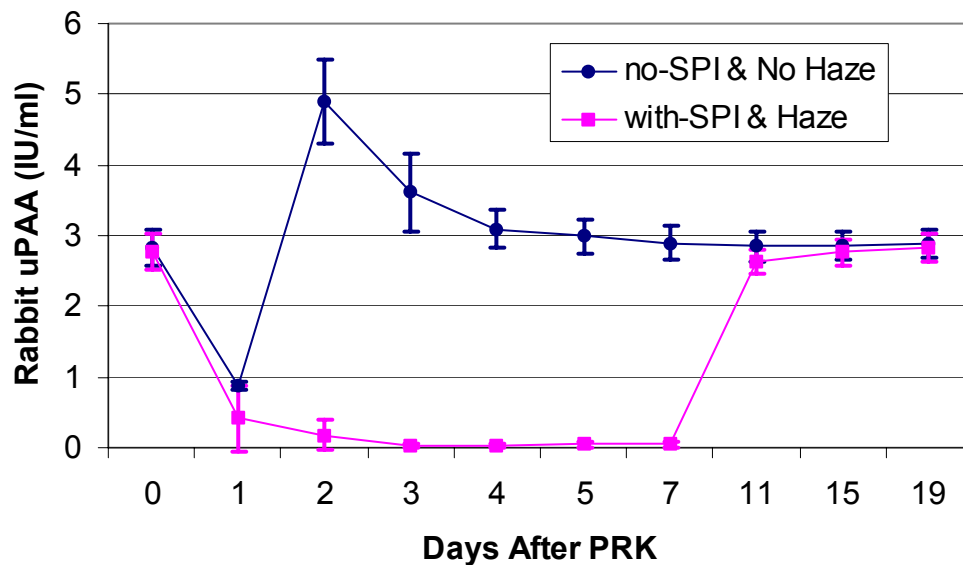


Figure 2. Observed uPAA in rabbit tears following PRK: 8 eyes had normal uPAA pattern and had no haze; 8 eyes had suppressed uPAA levels caused by treatment with SPI for seven days and had haze.

Table 1. Mean values (SD) and comparison of plasminogen activator activity in rabbit tears after PRK for the No-SPI and With-SPI groups (significant difference when $p < 0.05$).

Day	PAA: No-SPI IU/ml	PAA: With-SPI IU/ml	PAA Comparison No-SPI vs With-SPI p
0	2.82 (0.26)	2.77 (0.26)	0.46
1	0.87 (0.06)	0.42 (0.47)	0.03
2	4.90 (0.60)	0.18 (0.21)	< 0.001
3	3.62 (0.56)	0.04 (0.03)	< 0.001
4	3.10 (0.26)	0.03 (0.04)	< 0.001
5	2.99 (0.25)	0.05 (0.05)	< 0.001
7	2.89 (0.24)	0.05 (0.04)	< 0.001
11	2.86 (0.21)	2.63 (0.18)	0.009
15	2.86 (0.21)	2.76 (0.18)	0.06
19-91	2.93 (0.20)	2.88 (0.22)	0.06