

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**MEDIÁTOROK VIZSGÁLATA KERATOCONUSOS
BETEGEK KÖNNYÉBEN**

Dr. Kolozsvári Bence Lajos

Témavezető: Prof. Dr. Berta András



**Debreceni Egyetem
KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2013**

Taratalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	2
1. Bevezetés és irodalmi áttekintés.....	4
2. Célkitűzések.....	12
3. Betegek és módszerek.....	13
4. Eredmények.....	20
5. Megbeszélés	28
6. Az új eredmények összefoglalása.....	36
7. Summary of new results	36
8. A tudományos eredmények.....	37
9. Összefoglalás	39
10. Summary	40
11. Irodalom	40
Hivatkozott közlemények jegyzéke.....	42
Saját közlemények jegyzéke.....	52
12. Tárgyszavak	55
13. Köszönetnyilvánítás	55
14. Függelék.....	55

Rövidítések jegyzéke

AveK	- átlagos K érték
CBA	- cytometric bead array
CCL5/RANTES	- Kemokin(C-Cmotif)ligand 5/Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted
CKI	- Centrális Keratoconus Index
CXCL8/IL-8	- C-X-C kemokin ligand 8/interleukin-8
CXL	- corneális kollagén cross-linking kezelés
EGF	- epidermális növekedési faktor
IHA	- a felső és alsó szaruhártyafél elevációjának aszimmetriája
IL	- interleukin
INF	- interferon
ISV	- felszíni variancia index
K1	- leglaposabb tengely mentén mért törőerő
K2	- legmeredekebb tengely mentén mért törőerő
KI	- Keratoconus Index
MHC	- major hisztokompatibilitási komplex (I., II.)
MMP	- mátrix metalloproteináz
NGF	- idegi növekedési faktor
NK	- természetes ölósejtek (natural killer cells)
OSI	- Oppozíciós Szektor Index
PAI	- plazminogén aktivátor inhibitor
RGP	- rigid gázpermeábilis
Rmin	- minimum rádiusz
SD	- standard deviáció
SDP	- a cornea törőerejének standard deviációja
TH	- T-helper sejt
ThCT	- legkisebb szaruhártya vastagság
t-PA	- szöveti plazminogén aktivátor
VEGF	- vaszkuláris endoteliális növekedési faktor

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

A **keratoconus** eredendően egy nem gyulladásos eredetű corneális ektáziaként tartjuk számon, melyre a szaruhártya strómájának progresszív elvékonyodása és az ezt kísérő irreguláris asztigmatizmus következtében kialakuló látásromlás jellemző. A főleg fiatal felnőttkorban jelentkező, világszerte gyakori, kb. 1/2.000 incidenciájú kórkép jelenleg is a szaruhártya átültetés egyik vezető indikációja (Krachmer 1984, Albert, Rabinowitz 1998, Süveges 1998, Zadnik 1998). A kiváltó okok és a progressziót befolyásoló faktorok pontosan nem ismertek, de a gyakori szemdörzsölésnek és a kontaktlencseviselésnek is szerepet tulajdonítanak, és társulhat atópiás (ekzéma, atópiás dermatitis) és szisztémás (Down-, Ehlers-Danlos-, Marfan-szindróma, osteogenesis imperfecta, stb.) kórképekhez, valamint szemészeti betegségekhez (aniridia, bilaterális szubkapszuláris cataracta, kongenitális cataracta, retinitis pigmentosa, cornea amyloidosis, stb.) (Gasset 1978, Nauheim 1985, Macsai 1990, Zadnik 1998, Bawazeer 2000, Edwards 2001, McMonnies 2003, Jafri 2004, Moon 2006, McMonnies 2007, Kanski 2009). A keratoconus torz- és egyszemes kettőslátást okoz, mely szemüveggel, idővel már nem korrigálható. Előrehaladott stádiumban szabad szemmel látható a centrális cornea kiboltosulása, mely lefelé tekintéskor az alsó szemhéjat V-alakban elődomborítja (Munson-jel), mely nagyfokú látásromlást eredményező astigmatiát indukál a szaruhártya görbületi sugarának egyenlőtlen növekedése által. Réslámpával Vogt-striákat (vertikális, vonalas homályok a stróma mélyebb rétegeiben), Fleisher-gyűrűt (hemosziderin felhalmozódás következtében kialakuló barnás íves vonal vagy gyűrű), epiteliális és subepiteliális hegeket észlelhetünk. A Charleaux, vagy olaj csepp jel előrehaladott állapotban retinoszkópia során látható (Süveges 1998, Kanski 2009).

A cornea műszeres vizsgálatai mind a keratoconus diagnosztikájában, mind a progresszió megítélésében, mind a különböző kezelések hatékonyságának követésében elengedhetetlenek. A corneatopográfiás vizsgálattal a szaruhártyafelszín görbületét és törőerejét vizsgálhatjuk. (Klyce 1984, Rabinowitz 1990, Maeda 1994, Berta 1994, Rabinowitz 1995 és 1998). A Placido-korong egy koncentrikus körökből álló mintázat, amelyet megfelelő távolságból vetít a készülék a szemfelszínre és ezek reflexiója alapján

számolja ki és ábrázolja a szaruhártya elülső felszínének görbületét. Placido-korong elvén működő reflexiós típusú corneatopográf az általunk használt TMS-4 (Tomey Technology, Nagoya, Japan) is. A **corneatomográfia** ezen felül nemcsak a szaruhártya elülső, hanem hátsó felszínének és a szaruhártya vastagságának együttes viszonyáról is információt nyújt. A Pentacam képkalkotása a Scheimpflug-törvény elvén alapszik. A készülék éles rétegfelvételt (tomogram) készít a teljes elülső szegmentumról, a cornea elülső felszínétől a lencse hátsó felszínéig. A nagy felbontású kamera Scheimpflug-képet rögzít azáltal, hogy 2 másodperc alatt 360°-os szögben körbefordul a szem optikai tengelye körül. Több mint 138 000 valódi elevációs pont mérését követően a készülék (Pentacam HR, Oculus Optikgeräte GmbH, Wetzlar, Németország) saját szoftvere (1.17.60 verzió) elkészíti az elülső és hátsó szaruhártyafelszín axiális és tangenciális görbületi, valamint elevációs térképét, megméri a teljes cornea vastagságát, megjeleníti az elülső szegmentum háromdimenziós, forgatható modelljét, valamint adatokat szolgáltat az elülső csarnokról, illetve speciális képelemző programokkal rendelkezik. A Pentacam, szemben a konvencionális topográfokkal, melyek görbületi sugarat mérnek (amit a standardizált keratometriás refraktív index segítségével alakítanak át törőerő értékévé) (Holladay, 1997, Módis 2004, Konstantopoulos 2007, Németh 2011, Szalai 2012), a szaruhártya valódi alakját és felszíni egyenetlenségeit detektálja az eleváció primer mérésével, és a hátsó felszín vizsgálatára is képes. A cornea felszín elemzése, valamint a cornea vastagság, és a szaruhártya legvékonyabb pontján mért hátsó felszíni eleváció értékelése is igazoltan megbízható módszerek a keratoconus diagnózisára, valamint alkalmasak a progresszió megítélésére és a corneális kollagén cross-linking (CXL) kezelés hatásának monitorozására is (Belin 2010, Kránitz 2012, Hassan 2013). A Pentacam saját szoftvere, szabadalmaztatott algoritmusok alapján kalkulálja a hagyományos keratometriás paramétereket, és speciális, csak erre a készülékre jellemző indexeket is létrehoz, melyek a vizsgált cornea állapotának objektív megítélésére alkalmasak (Belin 2010).

A **könny** fehérje-összetételének minőségi és mennyiségi változása fontos mutatója a szem elülső szegmentumát érintő kórképeknek, úgymint a keratoconusnak (Berta 1990, Fini 1998, Nakamura 1998, Csutak 2008, Balasubramanian 2010, Lambiase 2011). A keratoconust tradicionálisan nem gyulladással eredetű betegségnek tartják, azonban több tanulmány rámutatott, hogy a stromális kollagén degenerációja és a betegség

progressziója együtt jár különböző pro-inflammatórikus citokinek, sejtadhéziós molekulák, mátrix metalloproteinázok (MMP-k) és azok inhibitorainak könnybeli megjelenésével és koncentrációjának változásával, amelyek ezáltal fontos szerepet játszhatnak a patogenézisben. Beigazolódott a citokinek egyensúlyának felbomlása, illetve egyéb mediátorok változásáról is beszámoltak a betegségben, úgymint megemelkedett interleukin (IL)-6, epidermális növekedési faktor (EGF), mátrix metalloproteináz (MMP)-1, -3, -7, -9, -13 és mátrix metalloproteináz-1 szöveti inhibitor (TIMP-1), valamint csökkent γ -interferon (INF), IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 (CXCL8), IL-12, IL-13, Kemokin (C-C motif) ligand 5/Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted (CCL5/RANTES), MMP-8, vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) szintek (Zhou 1998, Collier 2001, Kenney 2005, Lambiase 2005, Lema 2005, Matthews 2006, Smith 2006, Lema 2008 és 2009, Pannebaker 2010, Jun 2011, Balasubramanian 2012). Megváltozott tumor nekrozis faktor (TNF)- α és idegi növekedési faktor (NGF) szint, illetve az IL-13 csökkenése volt kimutatható a betegség súlyosbodásával (Saghizadeh 2001, Lema 2005; Mackiewicz 2006, Lema 2009, Liu 2009, Pannebaker 2010, Balasubramanian 2012). A TH17 sejtek jellegzetes citokinjének, az IL-17-nek is felmerült a szerepe, mint a fibroblasztokból és miofibroblasztokból szövetdegradáló proteázokat, pro-inflammatórikus és egyéb mediátorokat felszabadító kardinális citokin (Qiu 2009). A felsoroltakon felül az IL-1 α fokozott kötődése a keratoconusos corneák fibroblasztjaihoz gyulladást is sejtet a betegség kialakulásában illetve progressziójában (Fabre 1991). A keratoconusos könnyekben mért emelkedett mátrix metalloproteináz MMP-9 szint pedig szöveti degenerációra utal - mint a betegség legfontosabb ismérve -, mely megmagyarázhatja a cornea szövetének vékonyodását és gyengülését (Lema 2005 és 2009). A keratoconus kialakulása több okra vezethető vissza, melyek következményeként a strómális kollagén degradációja miatt kialakuló corneális ektáziát pro-inflammatórikus citokinek, sejtadhéziós molekulák és mátrix metalloproteinázok expressziója kíséri, fontos szerepet játszva a betegség patogenézisében. Ma még nem ismerjük ezen mediátorok pontos szerepét a patomechanizmusban vagy a kórfolyamat progressziójában, ahogy a CXL hatása a könny ilyen komponenseire szintén feltáratlan.

A **citokinek** elsősorban intercelluláris kapcsolatokat közvetítő glikoproteinek, melyek fontos szerepet játszanak a szemfelszín gyulladást és egyéb immunológiai folyamatainak

szabályozásában. Termelődésükért elsősorban conjunctivális és corneális epitélisejtek, keratocyták és fibroblasztok, valamint az infiltráló immunkompetens sejtek felelősek (Torres 2001). A citokinek csoportján belül megkülönböztetünk interleukinokat (IL), interferonokat (INF) és kolóniastimuláló faktorokat (CSF). Az immunológiailag kompetens sejtek aktiválásával, ploriferációjának és/vagy differenciálódásának serkentésével vagy gátlásával szabályozzák az immunválasz intenzitását és tartamát, befolyásolják a termelődő ellenanyag mennyiségét, és szerepük van az immunsejtek effektor funkcióiban is (Gergely 2006). A citokinek egymással és egyéb molekulákkal rendkívül bonyolult interaktív hálózatot hoznak létre, és tulajdonságaikból adódik, hogy különböző körülmények között jelentősen eltérő immunválaszt is képesek indukálni. Több citokin egyszerre történő meghatározása ajánlatos. Tulajdonságaikból adódóan a szekréciójuk kis mértékű változása is eltérő immunológiai választ eredményezhet (King 2000). A relatív citokin szintek és arányuk a lokális immunválaszt jobban jellemzi, mint az abszolút koncentrációjuk. Számos betegség esetén vizsgálták a szemfelszín által expresszált citokineket, melyek a gyulladások mediálásán kívül a gyulladásos folyamatok csökkentésében, a szem immun-privilegiumának helyreállításában, továbbá a normál cornea integritásának fenntartásában is kiemelkedő jelentőséggel bírnak (Fleisher 2000, Ohta 2000, Torres 2001). Az **interleukin (IL)-6** a veleszületett immunitás egyik legfontosabb citokinje az IL-1 és TNF- α mellett. Meghatározó szerepük van egyrészt a fertőzést követő gyulladásos reakciók kialakulásában, másrészt a különböző antigénprezentáló sejtekre gyakorolt hatásuk révén a fajlagos immunsejtek aktiválódásának és differenciálódásának szabályozásában. Az IL-6 szerepe különösen a B-sejtek plazmasejteké alakulásában és ellenanyag termelésében fontos. Főként mononukleáris phagocyták, endotélisejtek, fibroblasztok és aktivált T-sejtek termelik (Gergely 2006). Az interleukin-6 egy pro-inflammatórikus, egyben pleiotrópikus citokin, a gyulladások mediálásán és a gyulladásos folyamatok csökkentésén túl a szem immun-privilegiumának helyreállításában is részt vesz (Fleisher 2000, Ohta 2000). A **γ -interferon (INF)** a többi interferonhoz hasonlóan olyan antivirális fehérjék termelődését indukálja a legtöbb sejtben, amely ellenállóvá teszi azokat vírusfertőzéssel szemben, továbbá a γ -INF központi szerepet játszik a celluláris immunválaszban. Fokozza a makrofágok mikrobaölő képességét, stimulálja a NK sejtek cytolitikus aktivitását, és jelenléte szükséges az effektor cytotoxikus T-sejtek éréséhez is. A TH1 sejtek jellemző citokinje (Gergely 2006). Az **interleukin (IL)-13** elsősorban a TH2 sejtek által termelt citokin. Talán a legfontosabb

hatása az, hogy aktiválja a nyugvó B-sejteket, elősegíti a proliferációjukat, és IgG, valamint IgE izotípusú ellenanyagok termelődését váltja ki, ezáltal az allergiás folyamatok fontos mediátora. A TH2 sejtekre visszahatva elősegíti azok proliferációját, továbbá segíti a mátrix metalloproteinázok (MMP-k) felszabadulását és gátolja a makrophagok γ -INF általi aktiválódását is (Gergely 2006). Az **interleukin (IL)-17A** a TH sejtek (köztük a TH17 populáció) által termelt IL-17 egyik típusa. Az IL-17A számtalan hatással rendelkező pro-inflammatorikus citokin, többek között elősegíti az IL-1, IL-6, G-CSF, valamint kemokinek és prosztaglandinok termelődését, szerepet játszik a neutrofilek érésében, nélkülözhetetlen a TH17 sejtek számára, és a fibroblasztokat is stimulálja. Gyakran hozzá kapcsolható allergiás folyamatokkal.

A kemokinek kis molekulatömegű, aminosavsorrendjük tekintve nagy hasonlóságot mutató „csalogató” molekulák, melyek funkciója a leukocyták endoteliális adhéziójának fokozása, kemotaxis indukálása, és az effektor sejtek aktiválása. A limfocyták „homing” folyamataiban is szerepet játszanak. Monocytákon kívül főként endotélsejtek, fibroblasztok, keratinocyták és T-limfocyták termelik őket. Bár szerkezetileg nem hasonlít a legtöbb kemokinre, funkcionális hatásai miatt inkább a kemokinek közé sorolják az IL-8-at is (Gergely 2006). A **C-X-C kemokin ligand 8 (CXCL8 vagy interleukin (IL)-8)**-nak a veleszületett immunfolyamatokban van elsősorban szerepe, úgy is szoktak hivatkozni rá, mint a „neutrophil kemotaktikus faktorra”. Ebből is következik, hogy legfontosabb szerepe elsősorban a neutrophil, másodsorban a többi granulocyta kemotaktikus vonzása a gyulladás helyére, és a fagocitózis elősegítése. Makrofágokra, hízósejtekre, és egyéb sejtekre is képes hatni. Termelését kezdetben a makrofágok végzik, de az immunfolyamatok előrehaladtával epitélsejtek, vagy akár endotélsejtek is részt vesznek a CXCL8 produkcióban. A szemfelszín legjelentősebb kemokinje (Thakur 1998(B), Gergely 2006). A **Kemokin (C-C motif) ligand 5/Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted (CCL5/RANTES)** potens kemokinként hat az eozinofil, és a bazofil granulocytákra, valamint a T-sejtekre. γ -INF és egyéb citokinek jelenlétében aktiválja az NK sejteket, valamint az egyik legismertebb HIV-szuppresszív faktor. Elsősorban különböző T-sejtek termelik (Gergely 2006).

A **mátrix metalloproteináz (MMP)-9 és mátrix metalloproteináz (MMP)-13** inaktív zimogén formában szintetizált, majd proteolízissel aktivált, cink dependens

endopeptidázok. Az MMP enzimcsalád több mint 20 ismert tagból áll, melyeket alapvetően oszteoklasztok, makrofágok, neutrophilek és a kötőszövet sejtjei, főként fibroblasztok szintetizálnak. A cornea szövetében elsősorban az epitél sejtek, stromális sejtek és neutrophil granulocyták felelősek a termelődésükért. Fő hatásuk az extracelluláris mátrix komponenseinek (köztük a kollagéneknek és az elasztinnak) a lebontása, ilyen módon részt vesznek a sebgyógyulás, a szöveti differenciáció és átépülés, az apoptózis, az angiogenesis, és a nem specifikus immunválasz folyamataiban is (Fini 1998, Gergely 2006). A **metalloproteináz-1 szöveti inhibítor (TIMP-1;** tissue inhibitor of metalloproteinases) a szöveti metalloproteináz inhibítor családba tartozó, a szervezet legtöbb sejtje által expresszált glikoprotein. A legtöbb MMP (így a MMP-9 és MMP-13) gátlásán túl széleskörben képes elősegíteni a sejtproliferációt, valamint anti-apoptotikus tulajdonsággal is rendelkezik. Termelését főként citokinek és hormonok szabályozzák (Gergely 2006).

Az **idegi növekedési faktornak (NGF)** fontos szerepe van a szenzoros és szimpatikus idegrendszer fejlődésében és fenntartásában, szükséges az axonnövekedéshez, az idegsejtek túléléséhez és differenciálódásához. A gyulladós reakciókra inkább szupresszor hatással van, valamint a bőr és cornea sebek gyógyulásában is szerepet játszik. Az **epidermális növekedési faktor (EGF)** sokféle biológiai folyamatban vesz részt mint a sejtnövekedés, a ploriferáció és a differenciáció fontos szabályozója. Többek között epitélsejtek és fibroblasztok is képesek a termelésére, számtalan emberi szövetben és testfolyadékban kimutatható. Általában potens mitogén faktora az epidermális és epiteliális sejteknek, így a szaruhártya hámsejtjeinek is, és a corneális endotélre is hasonló hatással van (Gergely 2006).

A **szöveti plazminogén aktivátor (tPA)** az endotélsejtek által termelt és secretált szerin endopeptidáz, melynek elsődleges szerepe az, hogy a plazminogén – plazmin átalakulást katalizálja. Az aktív plazmin elbontja a fibrinogént és a fibrint, ezáltal a tPA fontos szerepet játszik a fiziológiás és patológiás körülmények között keletkező trombusok lízisében (Lijnen 2001). A plazmin részt vesz az extracelluláris mátrix komponenseinek (fibrin, fibronektin, laminin és IV-es típusú kollagén) lebontásában, valamint képes a MMP-k aktiválására is. A **plazminogén aktivátor inhibitor (PAI)-1** főként az endotélsejtek által termelt természetes inhibítora a szöveti plazminogén aktivátornak és az urokináznak (Gergely 2006).

Keratoconusban rigid gázpermeábilis (RGP) **kontaktlencsét** használunk az általában más módon már korrigálhatatlan nagyfokú irreguláris astigmia és fokozódó myopia kezelésére (Krachmer és mtsai, 1984; Rabinowitz és mtsai, 1998). Hasonlóan a szemdörzsöléshez, a kontaktlencséknek is számottevő szerepük lehet a corneális felszín mechanikai irritációjában, mely különböző mediátorok és növekedési faktorok aktiválása révén hozzájárulhat a betegség kifejlődéséhez vagy progressziójához (Thakur 1998 és 2000). RGP kontaktlencse viselők könnyében magasabb koncentrációban mutatható ki az EGF és az IL-8, szilikon-hidrogél kontaktlencsét viselőkhöz, illetve kontaktlencsét nem használókhoz viszonyítva (Jafri 2004, Moon 2006, Kallinkos 2006). RGP kontaktlencse a keratoconusos betegeknél az IL-6, TNF- α , intercelluláris adhéziónak molekulá-1 (ICAM-1) és a vaszkuláris adhéziónak molekulá (VCAM-1) szintjének emelkedését okozza (Lema és mtsai, 2008). A gyulladásos mediátorok felszaporodása a keratociták átrendeződéséhez vagy pusztulásához vezethet (Kallinkos 2006, Lema 2009, Liu 2009). A keratoconusos betegek látásának nem sebészi korrekációjára mai napig a kontaktlencse a rutinszerűen alkalmazott eszköz. A könnyvizsgálatok hasznos információval szolgálhatnak a kontaktlencseviselés hatásairól és bővíthetik tudásunkat a keratoconus patogenezisével kapcsolatban.

A keratoconus progressziója a **corneális kollagén cross-linking (CXL)** eljárással lassítható. A CXL egy viszonylag új, minimálisan invazív műtéti technika a corneális ektáziák (keratoconus, pellucid marginális degeneráció, refraktív sebészeti beavatkozásokat követő, szövődményként megjelenő ektáziák) kezelésére (Wollensak 2003, Raiskup-Wolf 2008, Vinciguerra 2009, Greenstein 2012). A keratoconus a cornea biomechanikai tulajdonságainak megváltozásával jár, amely magában foglalja a stromális kollagén összetételbeli és szerkezeti átalakulását, a kollagén fibrillumok közötti keresztkötések számának ismeretlen eredetű csökkenését (Pron, 2011). A corneális stróma legfontosabb makromolekuláris alkotóeleme az I-es típusú kollagén, habár a III-as, V-ös és VI-os típus is megtalálható a szaruhártyában. A cornea mechanikai stabilitásáért a stróma, azon belül a stróma kollagénjei felelősek. A kollagént a keratociták szintetizálják prokollagén formájában, amely az extracelluláris térben proteolitikus átalakuláson megy keresztül. Az így létrejött kollagén molekulák polimerizálódnak, és a lizin, hidroxilizin aminosavak enzim mediálta oxidációja révén intra- és intermolekuláris kovalens keresztkötések jönnek létre közöttük, létrehozva a kollagén fibrillumokat, majd kollagén

rostokat (Hovakimyan, 2011). A CXL célja ezen keresztkötések regenerálása, és új, más aminosavak közötti kötések létrehozása nem enzimatis úton, UV–A sugárzás segítségével. Az UV–A sugárzás önmagában is képes új keresztkötések létrehozására, azonban kimutatták, hogy a stróma nagyjából a 30%-át képes csak abszorbeálni. Fotoszenzitiváló anyag segítségével az elnyelődés mértéke fokozható, így riboflavin (B2 vitamin) felhasználásával az abszorpció mértéke 95%-osra növelhető (Spoerl, 1998). A riboflavinnal előkezelt cornea abszorpciós csúcsa 370 nm-es hullámhossz környékén van. Az elnyelődő fotonok hatására a riboflavin úgynevezett „triplet” állapotba gerjesztődik, melynek hatására reaktív oxigén gyökök és szuperoxid-anion keletkeznek. Bár a pontos molekuláris mechanizmus nem ismert, valószínűsíthető, hogy ezen reaktív gyökök segítségével új keresztkötések jönnek létre a kollagén molekulák hisztidin, lizin, hydroxilizin, hydroxiprolin, tirozin és treonin aminosavrészei között (Hovakimyan, 2011). A hám eltávolítása a riboflavin hatékonyabb corneális penetrációjának biztosítása miatt szükséges. Nagyszámú klinikai vizsgálat, köztük több a Debreceni Szemklinikáról, bizonyította a CXL hatásosságát: javulást mutattak ki a cornea formáját (beleértve a magasabb rendű aberrációk csökkenését), keratometriás (K) értékeket és corneatopográfias mutatókat illetően (Vinciguerra 2009, Hersh 2011, Greenstein 2011, Asri 2011, Greenstein 2012, Kránitz 2012, Hassan 2013). Keratoconusban a CXL jelentőségét igazolja továbbá az a tény, hogy a terápiás lehetőségek közül jelenleg ez az egyetlen olyan módszer, amely a betegség alapjául szolgáló molekuláris folyamatokba próbál beavatkozni. A keratoconus progressziójában vagy stabilizálásában szerepet játszó mediátorok még mindig nem pontosan ismertek, a CXL kezelés ezen faktorokra kifejtett hatásáról pedig még kevesebb információval rendelkezünk. Igazolták, hogy a CXL kezelés növeli a cornea ellenállását különböző proteolitikus enzimekkel (tripszinek, pepszinek, kollagenázok) szemben (Spoerl 2004). Annak ellenére, hogy a CXL hatására bekövetkező corneális biomechanikai és szerkezeti javulások pontosan ismertek, a könnyfilmben végbemenő folyamatok a mai napig nem tisztázottak. Mivel világszerte a keratoplasztika egyik vezető indikációját képezi a keratoconus (Rabinowitz 1998), ezért különösen fontos az olyan terápiás módszerek kifejlesztése, és kutatása, amelyek még azelőtt képesek megállítani a betegség progresszióját, mielőtt a beteg számára elfogadható látásélesség már csak keratoplasztika segítségével biztosítható. Ezen biomarkerek vizsgálata azért is fontos, hogy megtudhassuk, van-e befolyásoló szerepük a CXL kezelés hatásosságára.

2. Célkitűzések

Tudományos munkánkban a következő célokat tűztük ki:

- I. Összefüggések keresése a könnyben lévő egyes mediátorok és a keratoconus súlyosságát jelző topográfias indexek között, mely segíthet feltárni a könnymediátorok szerepét a keratoconus patogenezisében.
- II. Keratoconusos betegek és kontrollok könnymintáiban lévő mediátorok koncentrációjában bekövetkező változások meghatározása folyamatos kontaktlencseviselés előtt és után, megadott időpontokban. A vizsgált multifunkcionális mediátorok vagy a keratoconusos corneákban lejátszódó degradatív folyamatok képviselői (MMP-9, MMP-13, TIMP-1, szöveti plazminogén aktivátor (t-PA), plazminogén aktivátor inhibitor-1 (PAI-1)), vagy a kontaktlencseviselés kapcsán merült fel a szerepük (IL-6, IL-13, CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES), vagy szabályzó és reparatív folyamatok képviselői (NGF, EGF).
- III. A CXL kezelés keratoconus patogenezisére kifejtett rövid és hosszú távú hatásának vizsgálata a könnymediátorok (IL-6, -13, -17A, γ -INF, CXCL8, CCL5, MMP-9, -13, TIMP-1, t-PA, PAI-1, EGF és NGF) koncentrációjának változásán keresztül, valamint ezen koncentrációváltozások összevetése a keratometriás paraméterek (leglaposabb tengely mentén mért törőerő (K1), legmeredekebb tengely mentén mért törőerő (K2), legkisebb szaruhártya vastagság (ThCT), minimum rádiusz (Rmin), Keratoconus Index (KI), Centrális Keratoconus Index (CKI), a felső és alsó szaruhártyafél elevációjának aszimmetriája (IHA), felszíni variancia index (ISV)) változásával a 12 hónapos nyomon követés során.

3. Betegek és módszerek

A Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum (DEOEC) Szemklinikáján prospektív tanulmányokat végeztünk. A vizsgálatba bevont betegek és egészséges kontrollok nem szedtek olyan gyógyszert, ami befolyásolta volna a könnytermelést, valamint immunológiai eredetű betegségben sem szenvedtek. Tanulmányainkat a Helsinki Deklaráció normáinak megfelelően végeztük, a helyi etikai bizottság engedélyével. A könnyminta-vételhez a betegek írásos beleegyezését kértük.

A keratoconus diagnózisát az alábbi tünetek egyikének önálló vagy csoportos jelenléte esetén állítottuk fel: a cornea stróma állományának centrális vagy paracentrális elvékonyodása, a cornea kónikus elődomborodása, Fleischer-gyűrű, Voght-striák réslámpás vizsgálattal, illetve topográfias eltérések. Súlyosság szempontjából a keratoconus enyhének minősült, ha a legmeredekebb tengely mentén mért törőerő (K2) <45 dioptria (D), közepes, ha a K2 45 és 52 D között, és súlyos, ha $K2 > 52$ D volt. Mivel a K2 értékét megbízható kvantitatív klinikai változónak tartják a keratoconus súlyosságának jellemzésére (Lema 2008, Jun 2011), ezért a keratoconus stádium besorolásához ezt az indexet használtuk.

A vizsgálatokat könnygyűjtés előtt végeztük. Aktív gyulladásos illetve fertőző általános vagy szemészeti betegség, fennálló szisztémás vagy lokális gyógyszeres kezelés, szemcseppek használata, szemdörzsölés, korábbi szemészeti műtét vagy trauma szerepeltek a kizáró kritériumok között. Mindkét szem adatait felhasználtuk, ha a megadott kritériumoknak megfelelt.

3.1. Betegcsoportok és klinikai vizsgálatok

3.1.1. A mediátorok és a topográfias indexek közötti kapcsolat vizsgálata

2010 február és április közötti időszakban kontaktlencse szakrendelésünkön megjelent 11 keratoconusos beteg 14 szeméből gyűjtöttünk könnymintákat (átlag életkor: 29,3 év; tartomány: 19-50 év; standard deviáció (SD): 8,8). Korábban egyikük sem hordott kontaktlencsét. Keratometria, szemüveggel korrigálható legjobb látásélesség meghatározása, réslámpás vizsgálat és cornea topográfia (Topographic Modeling System

corneal topographer, software version 4, Tomey Corp.) történt minden beteg mindkét szemén. Az alábbi keratometriás indexeket vizsgáltuk: legmeredekebb tengely mentén mért törőerő (K2), átlagos K érték (Ave K), Klyce/Maeda Keratoconus Index (KCI), Smolek/Klyce Keratoconus Súlyossági Index (KSI), Oppozíciós Szektor Index (OSI), Központ/Környék Index (CSI), Keratoconus Predikciós Index (KPI), a cornea törőerejének standard deviációja (SDP). A corneatopográfias felvételeket mindig pislogás után 4-9 másodpercel készítettük, mert a könnyfilm ebben az időben a legszabályosabb (Erdélyi 2006). Az alábbiakban rövid áttekintést adunk a vizsgált paraméterekről (Németh 2011):

K2: maximum K érték

Ave K: átlagos K érték

KCI (Klyce/Maeda Keratoconus Index): a keratoconus szűrésében igen hasznos paraméter, bármilyen fokú pozitivitása esetén felmerül a betegség gyanúja és egyéb klinikai módszerek segítségével kell megerősíteni vagy kizárni a diagnózist, szenzitivitása 89%, specificitása 99%

KSI (Smolek/Klyce Keratoconus Súlyossági Index): KCI-nél is hasznosabb index, mivel értéke a keratoconus súlyosságával arányosan növekszik, s szenzitivitása és specificitása egyaránt 100%. Követésre kiválóan alkalmas

OSI (Oppozíciós Szektor Index): paraméter, amely az oktánsokra felosztott corneafelszín egyes oktánsai között fennálló törőerő különbséget adja meg

CSI (Központ/Környék Index): a szaruhártya centruma és környezete közötti törőerő különbsége

KPI (Keratoconus Predikciós Index): KSI-hez hasonlóan fontos paraméter a keratoconus vonatkozásában, amelynek értéke 0,225 felett utal a betegség fennállására

SDP (a cornea törőerejének standard deviációja): a pupilla területében mért törőerő értékek szórását megadó paraméter.

3.1.2. A mediátorok változásának vizsgálata kontaktlencse viselés előtt és után

12 kezdő keratoconusos RGP kontaktlencse viselő 15 szeméből gyűjtöttünk könnymintát (I. csoport) (átlag életkor: 26,5 év; tartomány: 19-50 év; SD: 28,3) az első lencse felhelyezést követő 6 héten keresztül, 5 szem esetében egészen egy éven át.

Két kontroll csoportot képeztünk. A II. csoportban 10 myopiás kezdő lágyszakos kontaktlencse viselő 19 szemét vizsgáltuk (átlag életkor: 21,2 év; tartomány: 15-38 év; SD: 7,2). Könnymintavétel a kontaktlencse illesztést követő 6 héten át, de 13 szemből egy éven keresztül történt. A III. csoportot 5 myopiás vagy hypermetropiás kezdő RGP kontaktlencse viselő páciens 8 szeme alkotta (átlag életkor: 22,6 év; tartomány: 15-30 év; SD: 5,0). A lencseviselés kezdetétől számított hat héten át történt a könnymintavétel.

A vizsgálatba bevont minden páciensünket a kontaktlencse szakrendelésünkről válogattuk be 2010 februárja és 2011 áprilisa között. A betegek korábban nem viseltek kontaktlencsét, azonban a vizsgálatba történt bevonás után legalább napi 8 órán át hordták lencséjüket. Keratometria, szemüveggel korrigálható legjobb látásélesség meghatározása, réslámpás vizsgálat és cornea topográfia (Topographic Modeling System corneal topographer, software version 4, Tomey Corp.) történt minden beteg mindkét szemén. A keratoconusos betegek egyikének sem volt corneális hege és a szemüveggel korrigálható legjobb látásélességük nem érte el az 1,0-t, míg RGP kontaktlencsével ez minden esetben sikerült.

3.1.3 A CXL mediátorokra kifejtett hatásának vizsgálata

23 progresszív keratoconusban szenvedő beteg 26 szemét (átlag életkor: 28,2 év; tartomány: 16-60 év; SD: 10) vontuk be és kezeltük kutatásunk keretében. Minden betegünk átfogó szemészeti vizsgálaton és könny mintavételen esett át CXL kezelés előtt, majd műtét után tervezetten a 4. és 10. napon, valamint 1, 3, 6 és 12 hónappal a kezelés után. Az egészséges kontroll csoportba 12 egyén 12 szemét vontuk be (átlag életkor: 27,8 év; tartomány: 16-67 év; SD: 15,3). Az átlagos követési idő 11 hónapos volt (157 napos a legrövidebb, 494 napos a leghosszabb követési idő) és összesen 18 szemet vizsgáltunk minimum 1 évig a CXL után. 2 szem 1-es stádiumú (8%), 12 szem 2-es stádiumú (46%), 12 szem pedig 3-as stádiumú (46%) volt a keratoconus súlyosságát tekintve.

Minimum 16 éves életkor és a topográfiával egyértelműen igazolható keratoconus voltak a bekerülési kritériumok tanulmányunkba. A vizsgált szemek korábban végzett szemészeti műtét, réslámpás vizsgálaton megállapított szemlencse vagy retinális eltérés, vegyszer okozta sérülés, pachymetriával mérve 300 μm -nél vékonyabb cornea, illetve a tanulmány ideje alatti terhesség, vagy szoptatás szerepeltek kizárási kritériumként. Progresszívnek minősítettük a keratoconust, ha legalább 1 dioptriával (D) növekedett a

legmeredekebb keratometriás érték (K2), vagy legalább 1 dioptriával nőtt a manifeszt cylinder, vagy legalább 0,5 dioptriával nőtt a manifeszt szférikus ekvivalens a kezelést megelőző 24 hónap alatt (Greenstein 2012, Brooks 2012).

Corneális Cross-linking kezelés (CXL) során felületi érzéstelenítést követően először a corneális hám 8 mm-es részét mechanikusan eltávolítottuk. Ezután 30 percig, minden 2. percben 0,1%-os riboflavin (20%-nyi dextrán tartalommal) oldatot csepegtettünk a kezelt corneára és réslámpával ellenőriztük a riboflavin teljes corneális penetrációját, vagyis megjelenését a csarnokvízben. Ha a Pentacam segítségével kivitelezett pachymetriás mérések alapján a cornea vastagsága ezután nem haladta meg a 400 μm -t, hipotóniás riboflavint (0.1% in steril vízben; Medio Cross sine, Medio-Haus Medizinprodukte GmbH) alkalmaztunk 10 másodpercenként. Minden 2 perc után pachymetria történt, és a riboflavin kezelést addig folytattuk, amíg mérés nem igazolta, hogy a cornea már minimum 400 μm -re duzzadt (Brooks 2012, Hafezi 2009). Ezt követően az adott cornea 30 percig 365 nm-es ultraibolya A (UV-A) sugárzásnak volt kitéve (3 mW/cm^2). A CXL kezelés minden esetben InPro CCL-Lix készülékkel (Norderstadt, Németország) történt. A posztoperatív kezelés 7 napig használt antibiotikum szemcsepp (tobramycin), és szteroid szemcsepp (fluorometholone), illetve legalább 3 hónapig használt műkönny kombinációjából állt. A betegek műtét után nem használtak kontaktlencsét.

Komplex szemészeti vizsgálatot végeztünk minden alkalommal, mely során meghatároztuk a legjobb korrigált látásélességet, réslámpát (alacsony fényerősség mellett, elkerülve a reflexes könnyezést), keratometert és Scheimpflug topográfiát (Pentacam HR, Oculus Optikgeräte GmbH, Wetzlar, Germany) használtunk. Az elevációs adatok értékelésekor tórikus-ellipsoid referencia felszínt használtuk. (Kránitz 2012).

Táblázatba (Microsoft Excel, Microsoft Corp, Redmond, Washington) gyűjtöttük az alábbi paramétereket:

K1: leglaposabb tengely mentén mért törőerő

K2: legmeredekebb tengely mentén mért törőerő

ThCT: legkisebb szaruhártya vastagság

Rmin: a minimum rádiusz a teljes mérési terület legkisebb görbületi sugara. Értéke csökken keratoconusban.

KI: keratoconus index a keratoconus súlyosságának jellemzésére használható, általános index, melynek számítása során az aktuálisan mért keratometriás adatok viszonyításra kerülnek a normális értékekhez. Kóros 1,07 felett.

CKI: centrális keratoconus index az előbbihez részben hasonló index, azonban ennek kiszámítása a során a cornea centrális és perifériás területei képezik az arányosítás alapját. Létjogosultságát az adja, hogy jobban alkalmas a centrális lokalizációjú keratoconus súlyosságának jellemzésére, mint a KI. Kóros 1,03 felett.

IHA: felső és alsó szaruhártyafél elevációjának aszimmetriája, azaz a horizontális meridián alapján, alsó és felső félre osztott szaruhártyarészekon mért görbületi sugarak közötti szimmetria mértékét jellemző, az adatok súlyozásával kalkulált paraméter. Értéke emelkedik keratoconusban, 19 felett már kóros.

ISV: felszíni variancia index, mely jellemzi a corneális görbületi sugarak egyéni eltéréseit az átlagos értékekhez viszonyítva, ennél fogva jól megadható vele általánosságban a corneális felszín irregularitásának mértéke. Értéke változik az összes olyan betegségben, mely a cornea alaki torzulásával jár. Abnormális 37 felett.

3.2. Könnygyűjtés menete és a mediátorok mérése

A könnymintákat 2 percig, az alsó könnymeniscusból steril üvegapilláris segítségével gyűjtöttük, érzéstelenítő csepp használata illetve stimulálás nélkül, a szemfelszín és a szemhéj érintését kerülve a reggeli órákban. A levett könny mennyiségét pontosan feljegyeztük, a könnymintákat felhasználásig, centrifugálás nélkül -80°C -on fagyasztva tároltuk (Fodor 2009). A hígítási és pipettázási hibák elkerülése céljából a 4 μl alatti könnyminták ki lettek zárva a vizsgálatból. Egyes esetekben a könnymintavételt a szemszárazság megakadályozta.

Multiplex mikrogyöngy mátrix (Cytometric Bead Array) technológia segítségével, áramlási citométerrel (FACS ArrayTM cytometer, BD Biosciences Immunocytometry Systems, San Jose, CA) mértük meg a különböző mediátorok koncentrációját. Az áramlási citométeres mérésekhez az egyszerre mérhető proteineket összeválogattuk, és a megfelelő FlowCytomixTM Simplex Kit-eket használtuk, kombinációban a megfelelő FlowCytomix Basic Kit-tel, a gyártó (eBioscience, Bender MedSystems GmbH, Bécs, Ausztria) által javasolt felhasználási protokollon minimálisan módosítva. 12,5 μl

könnymintát (szükség esetén hígított könnymintát), vagy az ismert koncentrációjú citokin keverékből, vagyis a standard reagensből készített hígítási sor tagjait adtuk 12,5 µl csapda antitest-mikrogyöngy reagenshez, majd a szintén 12,5 µl biotinnel konjugált anti-citokin antitest hozzáadása után az elegyet 2 órán át inkubáltuk. A phycoerythrin-streptavidin konjugált hozzáadása után további 1 órás inkubáció, és a nem kötött reagensek mosással történő eltávolítása következett a mérés előtt. Az adatokat FlowCytomix Pro 2.3 software-rel értékeltük ki. A standard görbéket a gyártó által szolgáltatott referencia citokin koncentrációk alapján szerkesztettük meg. A gyártó által megadott szenzitivitás IL-6: 1,2 pg/ml, IL-13: 4,5 pg/ml, CXCL8/IL-8: 0,5 pg/ml, CCL5/RANTES: 25 pg/ml, MMP-9: 95 pg/ml, MMP-13: 50 pg/ml, TIMP-1: 28 pg/ml, NGF: 126,8 pg/ml, EGF: 22,7 pg/ml, t-PA: 4,8 pg/ml, PAI-1: 13,5 pg/ml, IL-17A: 2,5 pg/ml és γ -INF: 1,6 pg/ml.

3.2.1. Az IL-6, IL-13, CXCL8, CCL5 (RANTES), MMP-9, MMP-13, TIMP-1, NGF és EGF koncentrációját határoztuk meg.

3.2.2. A könnymintavétel kontaktlencse viselés előtt és után meghatározott időpontokban történt: 10 és 30 perccel a lencse első felhelyezése után, majd 2 és 6 héttel a folyamatos (napi több mint 8 óra) kontaktlencse viselést követően. A lencse első felhelyezését követően egy évvel is tudtunk mintát gyűjteni több betegunktől. A mintavételhez a kontaktlencsét nem vettük le a szemről. Az IL-6, IL-13, CXCL8, CCL5 (RANTES), MMP-9, MMP-13, TIMP-1, NGF, EGF, t-PA és PAI-1 koncentrációját határoztuk meg.

3.2.3. 23 keratoconusos beteg 26 szeméből történt könnymintavétel a CXL kezelés előtt, valamint az azt követő egy éven keresztül minden kontrollvizsgálat során. A 12 kontroll szemből egyszer történt könnymintavétel. A betegek esetén az IL-6, CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, MMP-9, MMP-13, TIMP-1, NGF, t-PA és PAI koncentrációját mind a 157 gyűjtött könnymintából megmértük, ezen felül 105 minta térfogata volt elegendő még egy mérésre, mely során az IL-13, IL-17A, és az EGF koncentrációját határoztuk meg.

3.3. Alkalmazott statisztikai módszerek

A statisztikai elemzéshez a Stata 11-es verzióját használtuk. A szignifikancia kritériuma $\alpha=0,05$ volt.

3.3.1. A változókat átlagukkal és szórásukkal (SD) jellemeztük. A könnyben lévő mediátorok mennyiségét (release) a koncentrációjuk (pg/µl) és a 2 perc alatt gyűjtött könny mennyiség (µl) összeszorozásával számoltuk ki. A könnyminták mediátorszintjének

változóit a normalitás javítása céljából mindig a legjobb hatást elérő módszerrel transzformáltuk. A mediátorok mennyisége (magyarázó változó) és a keratometriás mérési eredmények (kimeneteli változó) közötti összefüggéseket többszörös lineáris regresszióval elemeztük. A mediátorok és a keratometriás változók összes lehetséges párosítására külön modelleket illesztettünk, melyekben az életkort folytonos változóként használtuk, és vagy csak korrekció, vagy a mediátorral képzett interakciós tényezőként is figyelembe vettük. Szignifikáns interakció esetén a mediátorok hatását az életkornak a mintában tapasztalt 10., 50. és 90. percentilisére specifikusan adtuk meg.

3.3.2. A könnyben lévő mediátorok mennyiségét (release) a koncentrációjuk (pg/ μ l) és a 2 perc alatt gyűjtött könny mennyiség (μ l) összeszorzásával számoltuk ki. A folytonos változókat - betegcsoportonként és a teljes mintára vonatkozóan - standard leíró statisztikai mutatókkal jellemeztük. A csoportok között a vizsgálat kezdetén, valamint 1 évvel később fennálló különbségeket varianciaanalízissel vagy annak nem-paraméteres megfelelőjével vizsgáltuk attól függően, hogy fennálltak-e az eloszlások jellegzetességeivel kapcsolatos feltételek. A mediátor release időbeli trendjét lineáris regresszióval vizsgáltuk, amelyben magyarázó változóként szerepelt a betegcsoportból és a mérés napjából képzett interakciós tényező. Mivel egyes betegek esetében mindkét szem adatait figyelembe vettük, a standard hibákat az ún. robusztus számítási eljárással képeztük, a megfigyelések betegeken belüli csoportosulásának (nem független voltának) megfelelő módon. A trendek linearitását kernelsúlyozásos helyi polinomiális simítással nyert tapasztalati trendvonalakkal való összehasonlítás révén vizuálisan vizsgáltuk. A release szintek időbeli (6. hétig tartó) lefutásának csoportok közötti különbségeit többszintű, random és fix hatásokat becsülő lineáris regresszióval elemeztük, a vizsgálat kezdetén mért értékre és korra korrigálva, valamint figyelembe véve a mérések szemeken belüli, és a szemek betegeken belüli csoportosulását. A mérési alkalmak változója lehetett kategorikus (indikátorváltozók az 1., 2. stb. mérés azonosítására) vagy folytonos (a kezdet óta eltelt napok száma), a random hatás megjelenhetett az y tengelyi metszéspont és a meredekség szintjén, és a modell a betegcsoport és a mérési alkalom interakciós tényezőjét is tartalmazta, ha az szignifikáns hatású volt. Ezen opciók legjobb modellilleszkedést biztosító kombinációját kerestük meg minden mediátor esetében. A modelleket valószínűségi hányados-próbákkal hasonlítottuk össze. A változók eloszlását transzformációval közelítettük a normális eloszláshoz, kivéve, ha ez nem vezetett

érzékelhetően jobb illeszkedéshez a standardizált maradékok eloszlásának normalitása alapján megítélve.

3.3.3. A változókat a natív mérési skálájukon értelmezett átlaguk és szórásuk (SD) segítségével jellemeztük. Az elemzési műveletek előtt a keratometriás változók és a könnymintákban mért mediátorok változói eloszlását ferdeségkorrekciós logaritmus-transzformációval közelítettük a normálishoz. Kétszélű páros Student-féle t-próbával elemeztük 13 mediátorban és a Pentacam-ból nyert 8 változóban a kiindulási értékhez képest a CXL kezelés utánra megfigyelt változásokat. Vegyes hatásmodalitású hierarchikus lineáris regressziós modellezéssel elemeztük a 13 mediátor koncentrációja és a Scheimpflug-kamerával nyert keratometriás mérések (ThCT, K1, K2, Rmin, KI, CKI, IHA, ISV) közötti összefüggéseket. A mediátorok és a keratometriás változók minden lehetséges párosítására külön modellt illesztettünk; a modelleket kontaktlencseviselésre és könnytérfogatra korrigáltuk, valamint a mérési alkalom és a mediátor-koncentráció közötti interakciós tényezőkkel egészítettük ki.

4. Eredmények

4.1. A mediátorok és topográfias indexek közötti asszociációk meghatározása keratoconusban

Az átlagos topográfias adatok a következők voltak: K2 : 51,7 D, SD: 4,7; Ave K: 48,2 D, SD: 3,4; KCI: 80,7%, SD: 26,5%; KSI: 61,4%, SD: 25,5%; OSI: 9,7, SD: 4,8; CSI: 2,4, SD: 1,5; KPI: 0,4, SD: 0,1; SDP: 4,9, SD: 1,6. A K2 10 szem esetén 45 és 52 D, míg 4 szem esetén 52 D fölötti volt.

A mediátorok könnymintákban mért átlagos koncentrációi a következők voltak: IL-6: 58,8 pg/ml, SD: 162,4; IL-13: 426 pg/ml, SD: 602; CXCL8/IL-8: 699 pg/ml, SD:1632; CCL5/RANTES: 398 pg/ml, SD:413; MMP-9: 39,6 ng/ml, SD:63,7; MMP-13: 1,1 ng/ml, SD: 0,94; TIMP-1: 38,0 ng/ml, SD: 42,0; NGF: 286 pg/ml, SD: 315; és EGF: 7972 pg/ml, SD:7577.

Az átlagos release értékek a könnymintákban a következők voltak: IL-6: 0,64 pg, SD: 1,0; IL-13: 19,7 pg, SD: 33,9; CXCL8/IL-8: 9,5 pg, SD:10,2; CCL5/RANTES: 17,4 pg,

SD:20,8; MMP-9: 674 pg, SD:1089; MMP-13: 38,1 pg, SD: 48,0; TIMP-1: 1225 pg, SD: 1110; NGF: 10,7 pg, SD: 15,1; és EGF: 126 pg, SD:55.

Szignifikáns pozitív összefüggést találtunk a CCL5 és a CSI között; az MMP-13 és a K2, Ave K és a SDP között; valamint az NGF és a K2, Ave K, KSI, OSI, CSI, KPI és az SDP között. Szignifikáns negatív asszociáció mutatkozott az IL-6 és a KCI között. Kor-függő kapcsolat volt megfigyelhető az IL-13 és a KCI, KSI, OSI, KPI között; valamint a CXCL8 és K2, Ave K, CSI, SDP között; szintén a CCL5 és a KSI között; illetve a MMP-13 és a CSI között (1. Táblázat).

	K2	Ave K	KCI	KSI	OSI	CSI	KPI	SDP
IL-6			p=0,02					
IL-13			^{2,3} p=0,02	¹ p<0,001 ^{2,3} p<0,001	^{2,3} p=0,02		^{2,3} p=0,02	
CXCL8 (IL-8)	³ p=0,045	³ p=0,03				¹ p=0,001 ³ p=0,001		³ p=0,04
CCL5 (RANTES)				^{2,3} p=0,04		p=0,04		
MMP-13	p=0,002	p=0,002				^{1,2} p=0,002		p=0,01
NGF	p=0,001	p=0,001		p=0,02	p=0,04	p=0,01	p=0,03	p=0,001

1. táblázat: Szignifikáns asszociációk a mediátorok (interleukin (IL)-6, IL-13, CXCL8 (IL-8), CCL5 (RANTES), mátrix metalloproteináz (MMP-13), idegi növekedési faktor (NGF)) release értéke és a topográfias adatok között (legmeredekebb tengely mentén mért törőerő (K2), átlagos K érték (Ave K), Klyce/Maeda Keratoconus Index (KCI), Smolek/Klyce Keratoconus Súlyossági Index (KSI), Oppozíciós Szektor Index (OSI), Központ/Környék Index (CSI), Keratoconus Predikciós Index (KPI), a cornea törőerejének standard deviációja (SDP) keratoconusban. Az értékeket korra korrigáltuk; a modellek az életkor és a mediátor közötti interakciós tényezőt is tartalmazzák, ha annak hatása szignifikáns. ¹19 évre specifikus; ²30 évre specifikus; ³43 évre specifikus; vastagon szedett betűk a negatív korrelációt jelentik; ahol nem találtunk szignifikáns korrelációt, ott üresen hagytuk a cellákat.

4.2. Mediátorok vizsgálata kontaktlencse viselés előtt és után keratoconusban

11 szem esetén közepes fokú (K2 45,0 és 52,0 D között), négy szem esetén nagyfokú (K2>52,0 D) keratoconust diagnosztizáltunk. A K2 átlag értéke 51,5D (SD:4,7) volt. A vizsgálatba bevont pácienseknél kontaktlencseviselés hatására szövődmény vagy nem várt esemény nem lépett fel.

A csoportok közötti eltérések kontaktlencseviselés előtt (alapérték): a keratoconusos (I csoport) illetve kontroll csoportok (II és III csoport) közötti különbségeket vizsgálva az alábbi eredményeket kaptuk: nem volt korcsoportbeli eltérés a keratoconusos és a kontroll csoportok között, és nem volt eltérés a levett könny mennyiségét illetően sem a három csoport között. Kontaktlencseviselés előtt az MMP-9 és IL-6 release értéke 2x, CCL5 3x, IL-13 4x és a PAI-1 7x volt magasabb, míg a t-PA a keratoconusos csoportban 25% volt (az átlagértékek alapján) a kontrollokhoz viszonyítva (a két kontroll csoportot egybevonva), azonban statisztikailag szignifikáns értéket nem ért el tekintettel a viszonylag alacsony esetszám melletti nagy szórásra. Kontaktlencseviselés előtt az EGF release szignifikánsan alacsonyabb volt a keratoconusos csoportban a kontrollhoz viszonyítva ($p=0,03$).

A lineáris trendek közötti és a kontaktlencse viselés hatására bekövetkező eltérések az egyes csoportok között az első 6 hétben: keratoconusban emelkedő lineáris trend volt megfigyelhető a vizsgált időszakban MMP-9 ($p=0,07$), EGF ($p=0,04$) és CXCL8 esetén ($p=0,01$). Hasonló emelkedés volt megfigyelhető MMP-9 ($p=0,04$), MMP-13 ($p=0,002$), IL-6 ($p=0,04$) és CXCL8 ($p=0,001$) esetén a III csoportban (RGP lencseviselő kontroll). Lágylencseviselésnek (II csoport) nem volt szignifikáns hatása a vizsgált mediátorokra. Szignifikáns különbség volt kimutatható a vizsgált időtartamra vonatkozó lineáris változásokra vonatkozóan az RGP lencseviselő conusos (I csoport) és az RGP lencseviselő ametrop csoport (III csoport) között MMP-13 (mindkettő esetén emelkedett, de a III csoport kifejezettebben ($p=0,01$)) és TIMP-1 vonatkozásában (csökkenés az I csoport és növekedés a III csoport vonatkozásában ($p=0,02$)). Mindezek mellett szignifikáns különbség volt mérhető az RGP lencsét viselő keratoconusos (I csoport) és a lágylencsét viselő ametrop (II) csoport között MMP-9 (csökkenés a II és növekedés az I csoportnál ($p=0,03$)) és a CXCL8 (csökkenés a II és növekedés az I csoport esetén ($p=0,02$)) vonatkozásában. Hasonló szignifikáns különbséget találtunk az ametrop RGP lencseviselők (III csoport) és az ametrop lágylencse viselők között (II csoport) MMP-9 ($p=0,02$), CXCL8 ($p=0,002$) és MMP-13 ($p=0,002$) vonatkozásában, mely az RGP lencse hatásának tulajdonítható és nem a keratoconus okozza.

Az MMP-9 release a 6. héten ($p=0,0001$) és a NGF a 10. percben ($P=0,01$) magasabb, míg a 2. héten az NGF release alacsonyabb ($p=0,04$) volt a keratoconusos csoportban, mint a lágylencse viselőknél (II csoport). Keratoconusban az MMP-13 és a NGF release a 2. héten ($p=0,01$ mindkét esetben) és a 6. héten ($p<0,0001$, $p=0,02$) alacsonyabb volt, mint az RGP lencse viselők esetén, hasonlóan a második héten mért IL-6 és CXCL8 ($p<0,0001$ mindkét esetben) és a minden vizsgálati időpontban kapott PAI-1 ($p=0,02$) értékekhez. Ezzel szemben a TIMP-1 release ($p=0,02$) magasabb volt, mint az RGP lencsét viselők esetén, de csak 10. és 30. percben.

Vizsgálatunkban nem mutatkozott különbség egy év lencseviselést követően a keratoconusos (RGP lencseviselők) és az ametrop (lágylencse viselő) csoport között. Az egy éves kontroll alkalmával gyűjtött könnyminták esetében a keratoconusos 5 darab mintából csak három, míg a levett 13 darab kontroll könnymintából csak 10 volt értékelhető. Az ezekből nyert adatok alapján csökkenés volt kimutatható a TIMP-1 (a kiindulási érték közel felére) és a PAI-1 kapcsán (elérte a kimutathatósági küszöböt a keratoconusos lencseviselők esetében), míg növekedés volt tapasztalható a IL-6 release esetén (4x) a keratoconusos csoportban szemben a kontrollal.

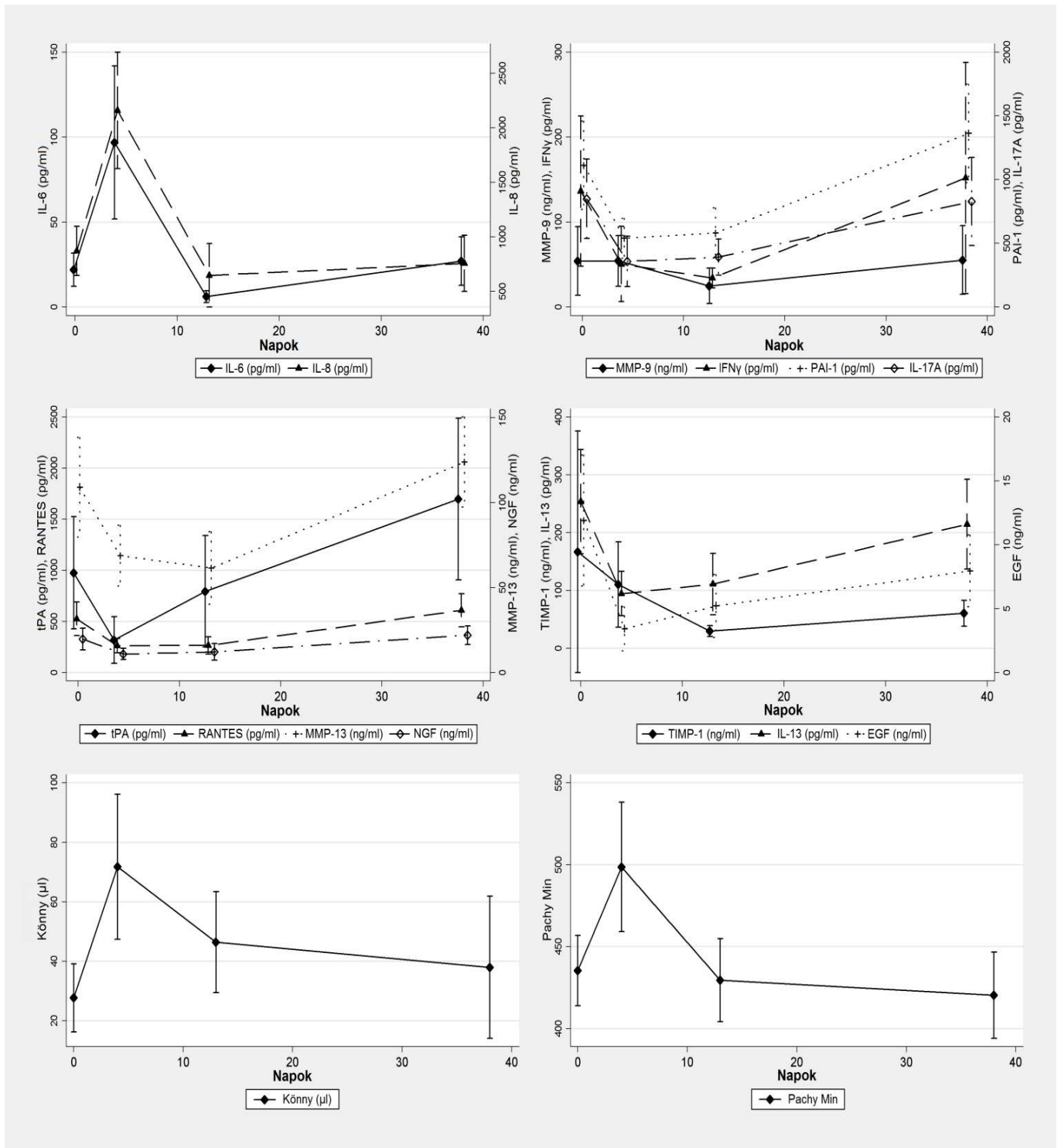
4.3. CXL mediátorokra kifejtett hatásának vizsgálata keratoconusban

A rövid távú eredményeket a 1. ábra mutatja a CXL utáni 38. napig. A gyűjtött könnyminták mennyisége ($p<0,0001$) és a legvékonyabb cornea vastagság ($p=0,0005$) szignifikánsan nőtt 4 nappal a kezelés után. A fokozott könnyezés ellenére, a beavatkozás után 4 nappal statisztikailag erősen szignifikáns növekedést találtunk az IL-6 és CXCL8 ($p<0,0001$) koncentrációjában, a CXL előtti szintekhez képest. Az IL-13 ($p=0,01$), IL-17A ($p=0,001$), γ -INF ($p=0,02$), CCL5 ($p=0,001$), MMP-13 ($p=0,02$), EGF ($p<0,0001$), NGF ($p=0,01$) és PAI-1 ($p=0,001$) koncentrációja szignifikánsan csökkent a kezelés előtti értékekhez képest. Nem tudtunk szignifikáns változást kimutatni a MMP-9, TIMP-1 és t-PA esetén.

A CXL-t követően 38 nappal levett könnymintákban egyik mediátor koncentrációjában sem volt kimutatható statisztikai eltérés a beavatkozást megelőző értékekhez képest, és a 2 perc alatt gyűjtött könnyminták mennyisége lecsökkent a CXL előtti szintekre. A legvékonyabb cornea vastagság viszont szignifikánsan csökkent ($p<0,0001$) a CXL előtt mért vastagságokhoz viszonyítva.

A 2. és 3. táblázatban láthatók a Pentcamos mérések és a mediátor koncentrációk adatai a CXL kezelést követően 6 és 12 hónappal. 6 hónappal a beavatkozás után szignifikáns csökkenést találtunk a ThCT és ISV ($p=0,03$ és $p=0,0005$) esetén, az Rmin pedig szignifikánsan nőtt ($p=0,007$). A 12 hónapos méréseknél az Rmin ismét növekedést mutatott a CXL előtt mért alap értékekhez képest ($p=0,0004$), a K1, a KI és az ISV pedig csökkent ($p=0,0045$, $p=0,0005$, $p=0,002$). A 6 hónapos kontroll alkalmával vett mintákban szignifikánsan nőtt a t-PA koncentrációja ($p=0,023$), és 1 évvel a kezelés után szignifikáns csökkenést tapasztaltunk az IL-6 és CXCL8 ($p=0,005$ és $p=0,047$) koncentrációjában.

Megvizsgáltuk a lineáris összefüggéseket a tomográfiás adatok és a mediátorok koncentrációi között. 3 hónap után a KI negatívan korrelált az IL-17A-val ($p=0,002$) és az MMP-13-mal ($p=0,01$), szintén negatív korreláció volt az IHA és az IL-17A ($p=0,016$) valamint az EGF ($p=0,032$) között. 6 hónap után a CKI és az ISV szignifikánsan pozitívan korrelált az IL-17A-val ($p=0,001$ és $p=0,016$); a CKI az IL-13-mal ($p=0,002$); a ThCT a IL-13-mal ($p=0,01$). 1 év után negatív korreláció volt a ThCT és az IL-6 ($p=0,005$), IL-13 ($p=0,017$), IL-17A ($p=0,049$), γ -INF ($p=0,017$), CCL5 ($p=0,02$) és PAI-1 ($p=0,011$) között.



1. ábra: A corneális kollagén cross-linking kezelés rövid távú hatása a könnyben lévő mediátorok koncentrációjára. a.: az interleukin(IL)-6 és IL-8 (CXCL8) koncentrációja növekedett 4 nappal a kezelés után; b.: a mátrix metalloproteináz (MMP)-9, plazminogén aktivátor inhibitor (PAI-1), IL-17A és interferon gamma (IFN γ) koncentrációjában a kezelés utáni 38. napig nem mutatható ki változás, a kiindulási értékekkel összehasonlítva; c.: a szöveti plazminogén aktivátor (tPA), RANTES (CCL5),

MMP-13 és idegi növekedési faktor (NGF) koncentrációja enyhén emelkedett 1 hónappal a kezelés után, a kiindulási értékekkel összehasonlítva; d.: a metalloproteináz-1 szöveti inhibitor (TIMP-1), IL-13 és epidermális növekedési faktor (EGF) koncentrációja enyhén csökkent 1 hónappal a kezelés után, a kiindulási értékekkel összehasonlítva; e-f.: a gyűjtött könny mennyiség és a legvékonyabb cornea vastagság rövidtávú változásai.

	IL-6 (pg/ml)	IL-13 (pg/ml)	IL-17A (pg/ml)	INF γ (pg/ml)	CCL5 (pg/ml)	CXCL8 (pg/ml)	MMP-9 (ng/ml)	MMP-13 (ng/ml)	TIMP-1 (ng/ml)	tPA (pg/ml)	PAI-1 (ng/ml)	EGF (ng/ml)	NGF (pg/ml)
CXL előtt	22,0 (25,3)	253,6 (205,4)	849,2 (710,2)	136,5 (201,9)	525,7 (427,5)	871 (583)	54,2 (105,1)	108,9 (76,3)	166,9 (543,8)	977 (1425)	1,11 (0,89)	11,91 (11,7)	19,7 (16,6)
6 hónap	30,0 (35,8)	212,0 (103,5)	850,7 (555,3)	122,2 (117,5)	620,2 (506,5)	1089 (1155)	67,3 (119,8)	133,2 (80,6)	203,8 (509,0)	*1843 (2157)	1,38 (1,11)	7,95 (5,9)	23,3 (18,7)
12 hónap	**14,9 (28,8)	249,9 (327,2)	872,6 (864,8)	204,1 (424,5)	455,1 (416,2)	**688 (394)	50,0 (96,8)	108,6 (69,0)	85,6 (163,5)	729 (1314)	1,08 (0,93)	7,70 (7,4)	17,1 (13,6)

2. táblázat: A mediátorok koncentrációjának (átlag, (szórás)) hosszú távú változása. IL=interleukin; CXCL8=IL-8; CCL5=RANTES; MMP=mátrix metalloproteináz; TIMP=metalloproteináz szöveti inhibitor; tPA=szöveti plazminogén aktivátor; PAI=plazminogén aktivátor inhibitor; NGF=idegi növekedési faktor; EGF=epidermális növekedési faktor. *= p<0,05 →szignifikáns változás az alap és 6 hónapos adatok között; **= p<0,05 →szignifikáns változás az alap és 12 hónapos adatok között

	K1 (D)	K2 (D)	Rmin (mm)	ThCT (μ m)	ISV	IHA	KI	CKI
CXL előtt	47,0 (4,4)	52,1 (5,4)	5,69 (0,6)	435,4 (55,9)	116,3 (44,1)	42,0 (23,8)	1,31 (0,13)	1,08 (0,07)
6 hónap	47,3 (4,6)	52,4 (5,4)	*5,74 (0,6)	*424,7 (57,4)	*112,6 (47,4)	38,6 (22,1)	1,31 (0,14)	1,31 (0,14)
12 hónap	**46,7 (3,8)	51,7 (4,9)	**5,83 (0,7)	444,2 (61,8)	**107,9 (59,9)	36,4 (28,0)	**1,29 (0,13)	1,29 (0,14)

3. táblázat: A Pentacam mérések eredményeinek (átlag, (szórás)) hosszú távú változása. K1, K2=a leglaposabb és legmeredekebb tengelyben mért törőerő; Rmin=minimum rádiusz; ThCT=legvékonyabb cornea vastagság; ISV=Felszíni Variancia Index; IHA=A felső és alsó szaruhártyafél elevációjának aszimmetriája; KI=Keratoconus Index; CKI=Centrális Keratoconus Index. *= p<0,05 →szignifikáns változás az alap és 6 hónapos adatok között; **= p<0,05 →szignifikáns változás az alap és 12 hónapos adatok között

5. Megbeszélés

A keratoconus etiológiája, csakúgy, mint a progressziót előrejelző faktorok nem kellően ismertek (Jun 2011, Balasubramanian 2012). A betegségre jellemző corneális szöveti degradáció kapcsán számos gyulladássos mediátor expresszáldhat mint a proinflammatorikus citokinek, sejtadhéziós molekulák és MMP-k, melyek változása a könnyfilmből non-invazív módon vizsgálható (Kao 1982, Zhou 1998, Abalin 2000, Kenney 2005, Lambiase 2005, Lema 2005, Mackiewicz 2006, Maier 2007, Lema 2009, Balasubramanian 2010, Balasubramanian 2012). A réslámpával vizsgálható klinikai jelek mellett a cornea topográf és tomográf számít a standard vizsgálóeszköznek a keratoconus felismerésében, klasszifikációjában és nyomkövetésében (Klyce 1984, Maeda 1994, Smolek 1997, Rabinowitz 1998, Kránitz 2012, Szalai 2012).

A MMP-k és az ezeket gátló különböző TIMP-ek citokinek és növekedési faktorok hatására szekretálódnak és az extracelluláris mátrix fehérjéinek degradációjában vesznek részt (Kao 1982, Zhou 1998, Mackiewicz 2006). Vizsgálatunkban erősen pozitív korrelációt találtunk a keratoconus súlyossága és az MMP-13 szintje között. Ezzel ellentétben az MMP-9 és a TIMP-1 esetében nem tudtunk kimutatni összefüggést, ami jelezheti számunkra, hogy más MMP-k vagy más enzimek még fontosabb szerepet játszanak a keratoconus molekuláris mechanizmusában, sőt az aktuális enzimaktivitása önmagában is befolyással bír.

A keratoconus patogenézisében a corneális beidegzés zavarának is szerepet tulajdonítanak, és legjobb tudásunk szerint a könny NGF szintjét keratoconusos betegek könnyéből munkacsoportunk vizsgálta először (Bonini 2000, Brookes 2003, Lee 2005, Niederer 2008, Lambiase 2011). Az NGF valamennyi életkorban szignifikánsan pozitívan korrelált a vizsgált 8 topográfias indexből 7-tel. Ez a megfigyelés alátámasztja az NGF jelentőségét a keratoconus patofiziológiájában és újabb vizsgálatok elvégzésére ösztönöz a betegség progressziójában betöltött esetleges szerepére vonatkozóan.

Az IL-6 és a KCI között negatív korrelációt találtunk, azonban a K2 viszonylatában nem tudtunk kimutatni szignifikáns összefüggést. Úgy tűnik, hogy az MMP-k és a citokinek aktívan együttműködnek, minthogy az IL-6 számos MMP

termelődését stimulálja (Balasubramanian 2012). Az IL-13 és a keratoconus súlyossága - különösen 30 év felett – és a topográfias indexek progressziója és a CXCL8 között negatív korrelációt mutattunk ki. A CCL5 kemokin pozitívan korrelált a CSI-vel és 30 év fölött negatívan korrelált a KSI-vel. Életkortól függő asszociációkat találtunk az IL-13, CXCL8, CCL5 és az MMP-13 esetében. Mindezek alátámasztják a betegség stádiumának és az életkornak a jelentőségét. Kapott eredményeink jelzik, hogy néhány mediátornak különböző hatása van a betegségre az életkortól és a betegség stádiumától függően. Vizsgálatunk limitációja a páciensek kis létszáma, és az a tény, hogy a bevont betegek főként közepesen súlyos keratoconusban szenvedtek, így nem volt minden stádium egyenlően reprezentálva. Szintén nem zárhatjuk ki annak a lehetőségét, hogy más mediátorok is szerepet játszanak a keratoconus patofiziológiájában, valamint a mediátorok forrását és könnybeli aktivitását nem vizsgáltuk. Számos új korrelációt sikerült azonban kimutatnunk, mely további vizsgálatok alapjául szolgálhat.

A keratoconussal kapcsolatos intenzív klinikai és alap kutatások ellenére a kontaktlencse viselés precíz szerepe a keratoconus patofiziológiájában továbbra sem ismert és nem egyértelmű. Az RGP kontaktlencsék a keratoconusban jellemző látásproblémák korrigálásának rutinszerűen alkalmazott alternatívái, melyek az életminőséget javítják (Ridley 1956, Rabinowitz 1998). Moon és munkatársai rámutattak, hogy a cornea egyes felszíni változásai keratoconusban a kontaktlencseviselésének hatására alakulnak ki (Moon 2006). Hwang közleményében érdekes módon nem valószínűsített ok-okozati összefüggést az RGP kontaktlencseviselése és a betegség progressziója között (Hwang 2010), mivel a lencseviselés előtt és egy éves viselés után (lencse levétele után egy órával) készült tomográfias leletek alapján javulást tapasztaltak, holott a szaruhártya vastagsága csökkent szemben a nem lencseviselő kontroll keratoconusos betegekével. Keratoconusos betegekben újonnan illesztett kontaktlencseviselés hatásáról és a mediátorok szintjének időbeli alakulásáról prospektív vizsgálatok eddig nem születtek. Vizsgálatunk megerősíti azt a hipotézist, miszerint a kontaktlencse viselés hatására számos mediátor szintje megváltozik a könnyfilmben a lencse anyagától és a cornea patológiájától függően. A kontaktlencseviselés kapcsán egyes mediátorok

szintjének megváltozása felveti annak a lehetőségét, hogy a kontaktlencse önmaga is szerepet játszik a keratoconus patogenezisében. Eredményeink szerint az MMP-9, az EGF és a CXCL8 keratoconusban kontaktlencse viselés után megemelkedett, az NGF, TIMP-1 és a PAI-1 pedig ezzel egyidejűleg lecsökkent, melyek feltételezhetően szerepet játszhatnak az extracelluláris mátrix degradációjában, mely a keratoconusos corneák fő jellemzője. A mediátorok időbeli változása alátámasztja azt az elképzelést, mely szerint a citokinek, enzimek és azok inhibitorai közötti egyensúly felbomlik, ami fontos szerepet játszhat a keratoconus progressziójában.

Kimutattuk, hogy az RGP kontaktlencsék hordása emelkedett MMP-9 és MMP-13 szinttel jár mind keratoconusos betegeknél, mind a kontrolloknál, különösen, ha lágyszorpus kontaktlencsét viselővel hasonlítjuk össze. Mindez jelzi, hogy maguk az RGP lencsék okoznak emelkedett MMP szintet, és nem maga a betegség. Ezt nem egy primer jellemzője a keratoconusnak, hanem az RGP kontaktlencse okozta másodlagos hatás. Szemben más szerzőkkel (Fini 1998; Zhou 1998; Kenney 2005) Lema és munkatársai szignifikánsan magasabb értéket találtak olyan keratoconusos betegeknél, akik egyáltalán nem, vagy a vizsgálat előtt egy héttig nem hordtak kontaktlencsét, mely megállapítással jelen tanulmányunk összhangban áll (Lema 2009). Lema másik közleményében kontaktlencseviselés hatását vizsgálta keratoconusos és kontroll myopiás betegeken, kutatásaik alapján mindkét csoportban emelkedett MMP-9 értékeket tapasztaltak, azonban szemben eredményeinkkel kizárólag a kontroll csoportban írtak le szignifikáns emelkedést (Lema 2008). Mackiewicz és munkatársai kontaktlencseviseléstől függetlenül vizsgálták az MMP-13 szintjét keratoconusban, ami eredményeinkkel ellentétben, emelkedettnek bizonyult (Mackiewicz 2006). Vizsgálatunkban a TIMP-1-release még magasabb is volt keratoconusban az RGP kontaktlencse illesztését követő korai szakaszban, azonban a lineáris trend hat hét alatt megfordult: azaz lecsökkent keratoconusban és megemelkedett a kontrolloknál. Ennek az RGP kontaktlencse okozta változásnak keratoconusban nagy jelentősége van, hiszen a degradáló enzimek emelkedése és a velejáró regulatórikus/gátló mediátoroknak a csökkenése az egyensúly felborulását jelzi, és így a betegség progresszióját befolyásolhatja. Keratoconusban a PAI-release sokkal jobban csökken, mint az ammetrop kontrolloknál, olyannyira, hogy 1 évvel a kontaktlencse illesztése után már nem tudtuk kimutatni. A PAI MMP-9 aktivációt

okoz, így hiányának jelentősége lehet, mivel az extracelluláris mátrix degradáció mértéke változhat. Eddig a PAI-t kontaktlencse viseléssel kapcsolatban nem vizsgálták, és keratoconusban sem tanulmányozták könnymintákból. Sajnos a keratoconus progressziójáról nem tudunk nyilatkozni, mert 15-ből csupán 5 szemet tudunk az RGP kontaktlencse illesztése után 1 év elteltével követni.

Kontaktlencseviselést megelőzően a keratoconusos csoport könnymintáiban magasabb IL-6 release volt mérhető, mint a kontroll csoport esetében. A kontaktlencsék fizikai jelenléte, különösen az RGP lencséké, mechanikai irritációt okoz, mely következményesen megemeli a gyulladásos mediátorok szintjét (Schultz 2000, Efron 2007). Kutatásunk során szignifikáns IL-6 emelkedést tudunk kimutatni RGP kontaktlencse viselését követően. Ezzel ellentétben egyetlen vizsgált gyulladásos citokin szintje sem emelkedett meg lágysz kontaktlencse viselés hatására. Az, hogy az RGP kontaktlencse okozta megemelkedett IL-6 szint elégséges-e ahhoz, hogy a keratoconus hosszú távú progresszióját befolyásolja, még nem ismert. Növekvő lineáris trendet mutattunk ki CXCL8 tekintetében nemcsak RGP kontaktlencsét viselő keratoconusos betegeknél, hanem RGP lencsét viselő kontrolloknál is.

Az epidermális és idegi növekedési faktor a könny fiziológiás összetevője. Az NGF segíti a cornea idegeinek funkcióját és a beidegzés zavara segítheti a keratoconus kialakulását (Lambiase 2005). Magasabb koncentrációt száraz szemű kontaktlencse viselők esetén mutattak ki a következményes krónikus gyulladás miatt, keratoconusban azonban csökkent szintről számoltak be (Lambiase 2005, Liu 2009). RGP kontaktlencse viselése vizsgálatunkban nem változtatta meg az NGF release-t keratoconusos betegek könnyében, azonban ha az ametrop, RGP kontaktlencsét viselő kontrollokkal hasonlítottuk a betegeket össze, akkor 2 és 6 héttel a kontaktlencse viselés elkezdése után az NGF release szignifikánsan alacsonyabb volt keratoconus esetén. Kontaktlencse viselése előtt keratoconusban szignifikánsan alacsonyabb EGF szintet mértünk, amely mellett szignifikánsan növekvő lineáris trendet mutattunk ki 6 héten át. A kontrolloknál hasonló változás nem volt megfigyelhető. A rigid lencsék viselése keratoconusban olyan mértékű, valószínűsíthetően mechanikai hatással bír a corneális epitheliumra, hogy az már az epidermális növekedési faktor emelkedett szintjében is megmutatkozik. Vizsgálatunk fő limitációja a kis betegszám, és az a tény, hogy nem tudunk minden betegről egy

éven keresztül könnymintát gyűjteni (mivel a betegek egy része nem jött vissza kontroll vizsgálatokra; corneális cross-linking kezelés történt, ill. a kontaktlencse viselést felfüggesztették a betegek).

Legjobb tudásunk szerint a corneális kollagén cross-linking kezelés könnyben lévő mediátorokra kifejtett hatásáról eddig nem történtek vizsgálatok. A CXL morfológiai regressziós hatását korábban már leírták, azonban ez az első olyan kutatás, mely nagyszámú mediátort vizsgál CXL kezelés után (Wollensak 2003, Raiskup-Wolf 2008, Koller 2009, Vinciguerra 2009, Asri 2011, Greenstein 2011, Hersh 2011, Brooks 2012, Greenstein 2012, Kránitz 2012, Mazzotta 2012). Vizsgálatunk során keratoconus esetén végzett CXL kezelést követően 8 darab Pentacam-os index és különböző proteinek koncentrációjának asszociációját határoztuk meg 12 hónapon keresztül. A cornea sebgyógyulási és szövetújjaépítési folyamataiban a citokinek, kemokinek, enzimek és növekedési faktorok fontos szerepet töltenek be, mivel irányítják a sebgyógyulást, apoptózist, sejtosztódást és migrációt, fiziológiás és patológiás folyamatokban egyaránt. Ennek a biomarkerekből álló komplex hálózatnak a szereplői befolyásolhatják a CXL kezelés hatását.

A vizsgálatunk során tapasztalt javulás a K1, KI, ISV, ThCT és Rmin esetén egybevág azokkal a korábbi tapasztalatokkal mely szerint a CXL hatására a cornea alakja szabályosabb lesz, így a kezelés egy hatékony eljárás.

A hámfosztott cornea CXL kezelése azonnali, nagyszámú mediátor felszabadulásával jár és független a beavatkozás hosszútávú hatásától, hiszen a corneát érő mechanikai (hám eltávolítás), kémiai (riboflavin alkalmazása) és a fizikai (UVA besugárzás) stressz következménye. A CXL-t követő kifejezett könnyezés ellenére az IL-6 és CXCL8 koncentrációja szignifikánsan megemelkedett 4 nappal a kezelést követően ($p < 0,0001$), mely a gyulladásos sejtek gyors aktiválódását jelzi. A beavatkozás utáni 4. napon szignifikánsan megnőtt ThCT értéket mértünk ($p = 0,0005$), de ez a duzzadás drámaian lecsökkent a 38. napra ($p < 0,0001$). A CXL kezelést követő korai posztoperatív szakra jellemző cornea ödéma már ismert jelenség (Wollensak 2007). Az erős könnyezés okozta hígulás miatt számos mediátor koncentrációja szignifikánsan esett. A CXL a kollagén molekulák közötti keresztkötések kialakításával csökkenti a keratoconus progresszióját. Bár a kezelés

teljes patofiziológiája még tisztázatlan, a korai klinikai romlás és a mediátorok szintjének átmeneti változása egybesik a hámtávolítás és re-epitelizáció folyamatával és a keratociták posztoperatív apoptózisával és repopulációjával, valamint az új kollagén szintézisével (Wollensak 2007, Mazzotta 2008, Greenstein 2011). Az UVA sugárzás a cornea külső rétegében lévő keratociták pusztulását okozza. Ismert tény, hogy nem lehet keresztkötéseket létrehozni a keratociták károsítása nélkül (Asri 2011). A sejt nekrozis erős gyulladást vált ki, mely együtt jár számos mediátor, köztük kemokinek felszabadulásával. A CXL-t követő korai szakban extrém magas IL-6 és CXCL8 értékeket mértünk, melyek jelentős szerepet játszanak a corneális epiteliális sebgyógyulásban a gyulladást okozó sejtek odavonásával, hiszen a károsodott sejtek eltávolításával megvédik a szöveteket egy túlzott gyulladástól (Ebihara 2011). A CXL-t követően a corneális szövetek gyorsan regenerálódnak, a posztoperatív negyedik napon a hámszövet teljesen begyógyul (Mazzotta 2008). A re-epitelizációt követően, további szövetátalakulás játszódik le, mely során a következő hónapokban új keratociták vándorolnak a cornea centrumába. A CXL utáni korai posztoperatív szakban, 38 nappal a kezelést követően, a mediátorok koncentrációja és a levett könny mennyisége visszatért a kezelést megelőző szintre. A cornea strómájának regenerációja a kezelést követő második és harmadik hónap között indul meg és általában a hatodik hónapra be is fejeződik (Mazzotta 2008).

Az IL-6 koncentrációjának csökkenése ($p=0,005$) 12 hónappal a kezelést követően megegyezik más tanulmányok eredményével. Vizsgálatunkban ezen túl sikerült egy erős negatív korrelációt kimutatnunk az IL-6 és a ThCT között egy évvel a CXL után. Ugyanakkor szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a CXCL8 esetében, mely alátámasztja azt a feltevést miszerint a citokinek és a kemokinek fontos szerepet játszanak a keratoconus patomechanizmusában és hogy a CXL kezelés befolyásolhatja a gyulladást. A CXL-t követő IL-6 és CXCL8 csökkenése a cornea szempontjából pozitív változások lehetnek, mivel a eredményeink azt mutatják, hogy ezek szintje az egészséges kontrollok esetében szignifikánsan alacsonyabb a keratoconusos betegekhez képest. Mindez jelezheti a cornea stabilizálódását és lehetséges szerepüket a betegségben. A hosszútávú asszociációk analízise kapcsán fordított összefüggést mutattunk ki a ThCT és a γ -INF között. Az IL-13 alapvető szerepet játszik a T_H2 válasz erősítésében, így ennek a

citokinek a csökkent szintje felveti, hogy keratoconusban a T_H2 válasz is módosult (Jun 2011). A bőr fibroblasztjainak IL-13 által történő stimulálása a kollagén I és III fokozott produkcióját eredményezi (Bhagal 2008). Az IL-17 elsődlegesen a T_H17 limfociták által termelt citokin, mely szintén képes a fibroblasztok stimulálására, azonban a szöveti degradációt okozó proteázok és citokinek termelésének stimulálására is (Qiu 2009). Kutatásunkban az IL-13 és IL-17 több topográfias értékkel mutatott szignifikáns hosszútávú asszociációt (ISV, CKI, ThCT). Negatív korrelációt találtunk a CCL5 és KI között a kezelés előtt, majd a ThCT-vel 1 évvel a CXL kezelés után, mely felveti a CCL5 jelentőségét a keratoconus patogenezisében.

A MMP-k szekrécióját citokinek és növekedési faktorok befolyásolják, és a könnyen emelkedett MMP szintje keratoconusban jelzi, hogy a szöveti lebontó folyamatok szerepet játszanak a cornea fokozatos elvékonyulásában (Lema 2005 és 2009, Balasubramanian 2012). A MMP-k és a citokinek egymással történő interakciója komplex hálózatot alkot, melynek része az IL-6 által történő MMP-9 és MMP-13 stimuláció (Balasubramanian 2012). A t-PA aktív formája a plazminogént plazminná alakítja, mely számos extracelluláris komponens degradációjáért felelős és aktiválja az MMP útvonalat is. A különböző TIMP-ek és a PAI-k pedig szabályozzák a MMP-eket és a PAI-akat, gátolva ezt a kaskád rendszert, és végeredményképpen ezzel befolyásolják a keratoconus progresszióját. A PAI-1 gént számos növekedési faktor és citokin befolyásolja, és a t-PA enzimek aktivációja gátlóan hat rá. Vizsgálatunk során CXL kezelést követően 6 hónappal és 1 évvel szignifikánsan emelkedett t-PA-t és fordított asszociációt mutattunk ki a ThCT és a PAI-1 között. Emellett negatív korrelációt találtunk kezelés előtt majd 3 hónappal a CXL-t követően az MMP-13 és a KI között. A TIMP-ek a különböző MMP-k természetes inhibitorai, azonban a korábbi közlések ellentmondóak a keratoconusos corneák TIMP-1 expresszióját illetően (Kenney 2005, Matthews 2007, Pannebaker 2010, Balasubramanian 2012). Vizsgálatunkban mi nem tudtunk korrelációt/asszociációt kimutatni a MMP-9 és a TIMP-1 vonatkozásában, mely jelezheti, hogy más MMP-k és ennek megfelelően más enzimek sokkal fontosabb szerepet játszhatnak a CXL kezelést követő molekuláris folyamatokban, és az aktuális enzimaktivitás szintén befolyásolja a végső hatást. A keratociták TIMP-3 által indukált apoptózisát a TIMP-1 eddigi tudásunk szerint gátolhatja, így az a

megfigyelésünk, miszerint a TIMP-1 koncentrációja nem változik CXL kezelés után, előnyös is lehet a keratoconusos betegeknél (Matthews 2007).

A CXL kezelés után az idegi regeneráció nagyon gyors, gyakorlatilag teljes hat hónap után (Wollensak 2007). Vizsgálatunkban a korai posztoperatív periódusban, amikor a reepitelizációs folyamat zajlik, enyhén emelkedett NGF szintet tudtunk kimutatni, azonban CXL kezelés után hosszú-távú asszociációt az NGF koncentrációjában nem találtunk.

Fontos megjegyezni, hogy a szteroid szemcseppek CXL utáni használata és alkalmazásuk hossza is nagyban függ az egyéni szemészeti gyakorlattól (Hafezi 2009, Vinciguerra 2009, Asri 2011, Brooks 2012, Greenstein 2012). Mi a kezelés után minimum 3 hónapig fluorometholone csepp használatát javasoltuk, mely mellett egy esetben sem mértünk emelkedett intraokuláris nyomást. A szaruhártya vastagságát és a ThCT területén mért hátsó elevációt tartják a legmegbízhatóbb paraméternek a keratoconus diagnosztikájában, valamint a CXL kezelés hatásosságának monitorizálásában (Kránitz 2012). Jelenleg a CXL kezelés hosszú távú hatása még nem ismert, azonban eredményeink szerint a szteroid alkalmazása befolyásolhatja a CXL kezelés okozta változásokat (Raiskup-Wolf 2008, Asri 2011). Vizsgálatunkban a ThCT nem csökkent 1 évvel a kezelés után, melynek okát további tanulmányokban kell meghatározni.

A vizsgálat limitációja, hogy a CXL kezelés utáni állapotokat a kezelés előtti állapottal, illetve egészséges kontrollokkal hasonlítottunk össze. Ideális lehetett volna ugyanazoknak a betegeknek a nem kezelt, ugyanolyan súlyosságú szemét, ugyanolyan számban összehasonlítani a keratoconusos kezelt szemekkel, mivel egy potenciálisan progresszív betegségről van szó. Azonban progresszió észlelése esetén beavatkozás történt volna, így hosszú távú eredményeket csak korlátozott számban nyerhettünk volna. Kimutattuk, hogy a keratoconus súlyosságával a mediátorok asszociálnak, de nem tisztázott, hogy mely proteinek tudnák megkülönböztetni a progrediáló formát a nem progrediálótól, ahol a korai CXL kezelésnek igen nagy jelentősége lenne. Nagy előnnyel járhatna, ha megértenénk, hogy mely biomarkerek segíthetnék elő a CXL kezelés hatását. A könny vizsgálata hasznos segítséget nyújt abban, hogy megértsük a CXL kezelés hatására zajló molekuláris mechanizmusokat és a multiplex típusú meghatározás ideális a könnymintákból történő biomarker meghatározáshoz.

6. Az új eredmények összefoglalása

I. Számos korrelációt mutattunk ki könnyből kimutatható különböző mediátorok (IL-6, IL-13, CXCL8, CCL5 (RANTES), MMP-13 és NGF) és több topográfias index (K2, AveK, KCI, KSI, OSI, CSI, KPI, SDP) között, melyek felvetik a mediátorok szerepét a keratoconus patogenezisében. Adatainkból arra következtethetünk, hogy néhány mediátornak a keratoconus súlyosságától és az életkortól függően, különböző hatása van.

II. Igazoltuk, hogy számos mediátor (IL-6, CXCL8, MMP-9, MMP-13, TIMP-1, NGF, EGF és PAI-1) szintje megváltozik a keratoconusos betegek könnyében RGP kontaktlencseviselés hatására, és a különböző mediátorok bonyolult egyensúlyának megbomlása hatással lehet a keratoconus progressziójára.

III. Kimutattuk, hogy számos mediátor, így citokinek (IL-6, CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, IL-13, IL-17A, γ -INF), enzimek (MMP-13, t-PA, PAI) valamint növekedési faktorok (EGF, NGF) koncentrációja szignifikánsan megváltozik a könnyben CXL kezelés után, és ezen változások együtt járnak a keratoconusos corneák alakjának változásával. Feltételezhető, hogy ezek a könnyből kimutatható változások befolyásolhatják a kezelés hatását.

7. Summary of new results

I. Several correlations were observed between the mediators (IL-6, IL-13, CXCL8, CCL5 (RANTES), MMP-13, NGF) and the topographic indices (K2, AveK, KCI, KSI, OSI, CSI, KPI, SDP) suggesting possible roles in the pathophysiology of keratoconus. Our data indicate that some mediators have different effect on the severity of disease depending in an age-dependent manner.

II. We have confirmed that many secreted mediators (IL-6, CXCL8, MMP-9, MMP-13, TIMP-1, NGF, EGF, PAI-1) being altered in the tears of keratoconic patients wearing RGP CLs, and a complex imbalance of various mediators that may have an impact on the development of the disease.

III. We have reveals that many mediators including cytokines (IL-6, CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, IL-13, IL-17A, γ -INF), enzymes (MMP-13, t-PA, PAI) and growth factors (EGF, NGF) being altered in the tears of keratoconic patients after CXL with concomitant changes in the shape of KC corneas. These alterations detected in tear samples may have an impact on the effect of this treatment.

8. A tudományos eredmények hasznosíthatósága

A keratoconus fiatal felnőtteket érintő betegség, mely napjainkban is a szaruhártya átültetés egyik vezető indikációja. Mivel a szemfelszín változása hatással van a könny összetételére, és ezen változások pedig visszahatnak a szemfelszínre, így kínálkozik az a lehetőség, hogy a keratoconus patofiziológiájának vizsgálatára a szemfelszínt borító könnyet használjuk fel.

Keratoconusos betegek könnyében számos mediátor szintjének változását mutattuk ki, ami jól használható a betegség súlyosságának követésében és segítséget nyújthat a betegség progressziójának megértéséhez. Jövőbeli vizsgálatoknak kell tisztázni, hogy a könnyfilmben megtalálható mediátorok komplex hálózatból mely általunk vizsgált, illetve egyéb komponenseknek van szerepe a betegség etiopatogenezisében, valamint, hogy a változásoknak van-e patofiziológiai jelentősége.

A mediátorok pontos szerepének tisztázása elengedhetetlen, és fontos lenne az általunk talált változásokat egy nagyobb betegszámú kutatással igazolni, hogy a keratoconus patomechanizmusát pontosan tisztázzuk, valamint a kontaktlencse és a CXL kezelés okozta eltéréseket jobban feltárjuk. Vizsgálataink felhívják a figyelmet a jövőbeli klinikai és alap kutatások fontosságára, magába foglalva a különböző kontaktlencsék tolerálhatóságának vizsgálatát is. A jövőbeli vizsgálatok CXL kezelés megkezdése előtt meghatározhatják azokat a faktorokat, melyek a kezelés

eredményességét javíthatják vagy ronthatják. Mindemellett olyan vizsgálatokra is szükség lenne, melyek a keratoconus különböző stádiumaiban határozzák meg a mediátorok változásának hatását. Mindezek segíthetnének abban, hogy a patológiás corneális elvékonyulást helyileg tudjuk gátolni, illetve a beteg személyreszabott kezelést kaphasson.

Fontos hangsúlyozni, hogy vizsgálataink megvilágítják azt a tényt, miszerint számos mediátor - többek között citokin, növekedési faktor és enzim - játszik alapvető szerepet a keratoconus bonyolult molekuláris folyamatában.

9. Összefoglalás

A keratoconus (KC) az egyik leggyakrabban előforduló corneális ektázia melynek számottevő közegészségügyi vonzata van. Kiváltó okai széleskörűek és a corneális stróma degradációját számos mediátor expressziója kíséri, többek között pro-inflammatórikus citokinek, sejt adhéziós molekulák mátrix metalloproteinázok. A KC-s betegek látásának javítására rutinszerűen használt rigid gázpermeábilis kontaktlencsék (KL) nagyon jó alternatívát kínálnak és javítják az életminőséget. A KL-k azonban a cornea felszínének mechanikai irritációját okozzák, így használatuknak a betegség patofiziológiájára kifejtett hatása még mindig tisztázatlan. A corneális kollagén cross-linking (CXL) eljárással csökkenthető a KC progressziója, így nagyobb számban kerülhető el a szaruhártya átültetés.

Prospektív vizsgálatokat végeztünk a DEOEC Szemklinikán, melyek során KC-s betegek könnymintáiból IL-6, IL-13, CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, MMP-9, MMP-13, TIMP-1, NGF, EGF, t-PA, PAI-1, IL-17A, INF γ szinteket határoztunk meg, abból a célból, hogy nagyobb rálátást kapjunk a KC patogenezisére; KC-os betegek könnymintáiban lévő mediátorok megváltozott szintjét feltárjuk; információt nyerünk a KL viselés hatásairól; meghatározzuk a könnyben lévő mediátorokra kifejtett hatását a CXL kezelésnek és összefüggéseket keressünk az ezeket kísérő corneális változásokkal.

Számos összefüggést mutattunk ki a mediátorok és a topográfias indexek között, melyek felvetik ezek szerepét a KC patofiziológiájában. Több mediátor szintje eltérő volt a betegség súlyosságától és az életkortól függően. Megállapíthatjuk, hogy a KL viselés befolyásolja a KC-os betegek könnyében mért mediátoroknak szintjét és a dinamikáját, és a mediátorok időbeli változása alátámasztja azt a feltételezést, miszerint az egyensúly a citokinek, enzimek és azok inhibitorai között felborul, és ez a változás fontos szerepet játszhat a betegség progressziójában. CXL kezelést követően a könnyben mért mediátorok változása együtt jár a topográfias indexek módosulásával, rávilágítva arra a tényre, hogy számos mediátor szerepet játszik a CXL-et követő komplex folyamatokban. További kutatások szükségesek a

biomarkerekkel kapcsolatban, annak érdekében, hogy a CXL kezelés hatékonyságát módosító szerepüket megismerjük.

Vizsgálatunk az első lépés annak érdekében, hogy a keratoconusban tapasztalt mediátorok változását megértsük, mely segíthet a betegség aktivitásának követésében és nagyobb rálátást adhat a progresszióra vonatkozóan. Mindez terápiás és prevenciók egyéni kezelésekhöz szolgáltathat alapot, ami a betegek érdekeit szolgálja.

10. Summary

Keratoconus (KC) is the most common primary corneal ectatic disease which has considerable importance on public health. KC is a disease with multivariable origin, and the degradation of stromal collagen is accompanied by expression of several mediators including pro-inflammatory cytokines, cell adhesion molecules, and matrix metalloproteinases. RGP contact lenses (CL) are the routine alternative for adequate correction of the visual impairment in KC and improving the quality of life. As CLs provoke mechanical irritation of the corneal surface, the effect of contact lens wear on the pathophysiology of the disease still remains unknown and ambiguous. Corneal collagen crosslinking (CXL) is a procedure to mitigate the progression of KC and reduce demand for corneal transplantation.

Prospective studies were performed at the Department of Ophthalmology, and the levels of IL-6, IL-13, CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, MMP-9, MMP-13, TIMP-1, NGF, EGF, t-PA, PAI-1, IL-17A, INF γ were determined in tears from patients with keratoconus to expand our knowledge on the pathogenesis of KC; to reveal alterations among the mediators in the tears of patients with KC; to get more information on the effect of CL wear and; to determine the effect of CXL on tear mediators in patients with KC and analyze associations with corneal changes.

We have confirmed several correlations between the mediators and the topographic indices suggesting their roles in the pathophysiology of KC. Our data indicate that some mediators have different levels depending on the severity of the disease in an age-dependent manner. We conclude that contact lens wear can influence the levels and dynamics of various mediators in the tears of keratoconic patients and the time course of levels of the mediators support the concept that there is an imbalance

between cytokines, enzymes and their inhibitors, and this imbalance can play an important role in the progression of the disease. Alterations of mediators in tear fluid after CXL associate with topographic changes highlighting the fact many mediators are involved in the complex mechanisms after CXL. Further studies on biomarkers to investigate their effect on the efficacy of CXL are needed.

This study is a first step toward the establishment of understanding the changes in mediator concentration in KC providing a useful tool for monitoring the severity of the disease and possibly giving a better insight into the course of the progression of the disease. This may allow improved therapeutic and preventive individual treatment modalities, serving for the good of the patients.

11. Irodalomjegyzék

Abalin JH, Dossou H, Colin J, Floch HH. Levels of collagen degradation products (telopeptides) in the tear film of patients with keratoconus. *Cornea*. 2000;19:474-476.

Alberth B. *Szemészet*, 1995; Medicina Könyvkiadó.

Asri D, Touboul D, Fournié P, Malet F, Garra C, Gallois A, Malecaze F, Colin J. Corneal collagen crosslinking in progressive keratoconus: multicenter results from the French National Reference Center for Keratoconus. *J. Cataract Refract. Surg.* 2011;37:2137-2143.

Balasubramanian SA, Mohan S, Pye DC, Willcox MD. Proteases, proteolysis and inflammatory molecules in the tears of people with keratoconus. *Acta Ophthalmol.* 2012;90:e303-9.

Balasubramanian SA, Pye DC, Willcox MD. Are proteinases the reason for keratoconus? *Current Eye Research*. 2010;35:185-191.

Bawazeer AM, Hodge WG, Lorimer B. Atopy and keratoconus: a multivariate analysis. *Br J Ophthalmol*. 2000;84:834-836.

Belin MW, Ambrósio R Jr. Corneal ectasia risk score: statistical validity and clinical relevance. *J Refract Surg*. 2010;26:238-240.

Berta A, Tözsér J, Holly FJ. Determination of plasminogen activator activities in normal and pathological human tears. The significance of tear plasminogen activators in the inflammatory and traumatic lesions of the cornea and the conjunctiva. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1990;68:508-514.

Berta A, Vámosi P, Lampé Zs, Módis L. Videokeratoszkópián alapuló számítógépes corneatopográfia. Szemészet 1994;132:199-203.

Bhogal RK, Bona CA. Regulatory effect of extracellular signal-regulated kinases (ERK) on type I collagen synthesis in human dermal fibroblasts stimulated by IL-4 and IL-13. Int. Rev. Immunol. 2008;27:472-496.

Bonini S, Lambiase A, Rama P, Caprioglio G, Aloe L. Topical treatment with nerve growth factor for neurotrophic keratitis. Ophthalmology. 2000;107:1347-1351.

Brookes NH, Loh IP, Clover GM, Poole CA, Sherwin T. Involvement of corneal nerves in the progression of keratoconus. Exp Eye Res. 2003;77:515-24.

Brooks NO, Greenstein S, Fry K, Hersh PS. Patient subjective visual function after corneal collagen crosslinking for keratoconus and corneal ectasia. J. Cataract Refract. Surg. 2012;38:615-619.

Collier SA. Is the corneal degradation in keratoconus caused by matrix-metalloproteinases? Clin Experiment Ophthalmol. 2001;29:340-344.

Csutak A, Silver DM, Tözsér J, et al. Plasminogen activator inhibitor in human tears after laser refractive surgery. J Cataract Refract Surg. 2008;34:897-901.

Ebihara N, Matsuda A, Nakamura S, Matsuda H, Murakami A. Role of the IL-6 classic-and trans-signaling pathways in corneal sterile inflammation and wound healing. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2011;52:8549-8557.

Edwards M, McGhee CN, Dean S. The genetics of keratoconus. Clin Experiment Ophthalmol. 2001;29:345-351.

Efron N. Contact lens-induced changes in the anterior eye as observed in vivo with the confocal microscope. Prog Retin Eye Res. 2007;26:398-436.

Erdélyi B, Csákány B, Rödönyi G, Soumelidis A, Lang Zs, Németh J. A könnyfilm-dinamika vizsgálata nagy sebességű videotopográfiával. Szemészet. 2006;143:83-87.

Fabre EJ, Bureau J, Pouliquen Y, et al. Binding sites for human interleukin 1 alpha, gamma interferon and tumor necrosis factor on cultured fibroblasts of normal cornea and keratoconus. Curr Eye Res. 1991;10:585-592.

Fini ME, Cook JR, Mohan R. Proteolytic mechanisms in corneal ulceration and repair. Arch. Dermatol. Res. 1998;290:12-23.

Fleisher LN, McGahan MC, Ferrell JB. Rabbit pigmented ciliary epithelium produces interleukin-6 in response to inflammatory cytokines. Exp. Eye Res. 2000;70:271-279.

Fodor M, Gogolák P, Rajnavölgyi É et al. Long-term kinetics of cytokine responses in human tears after penetrating keratoplasty. J Interferon Cytokine Res. 2009;29:375-380.

Gasset AR, Houde WL, Garcia-Bengovhea M. Hard contact lens wear as an environmental risk in keratoconus. Am J Ophthalmol. 1978;85:339-341.

Gergely J, Erdei A. Immunbiológia. 2006. Medicina Könyvkiadó.

Greenstein SA, Fry KL, Hersh MJ, Hersh PS. Higher-order aberrations after corneal collagen crosslinking for keratoconus and corneal ectasia. J. Cataract Refract. Surg. 2012;38:292-302.

Greenstein SA, Fry KL, Hersh PS. Corneal topography indices after corneal collagen crosslinking for keratoconus and corneal ectasia: one-year results. J Cataract Refract Surg 2011;37:1282-1290.

Hafezi F, Mrochen M, Iseli HP, Seiler T. Collagen crosslinking with ultraviolet-A and hypotonic riboflavin solution in thin corneas. *J Cataract Refract Surg* 2009;35:621-624.

Hassan Z, Szalai E, Módis L Jr, Berta A, Németh G. Assessment of corneal topography indices after collagen crosslinking for keratoconus. *Eur J Ophthalmol*. 2013;23:635-40.

Hersh PS, Greenstein SA, Fry KL. Corneal collagen crosslinking for keratoconus and corneal ectasia: One-year results. *J Cataract Refract Surg* 2011;37:149-160.

Holladay JT. Standardizing constants for ultrasonic biometry, keratometry, and intraocular lens power calculations. *J. Cataract Refract. Surg*. 1997;23:1356-1370.

Hovakimyan M, Guthoff RF, Knappe S, Zhivov A, Wree A, Krüger A, Heisterkamp A, Stachs O. Short-term corneal response to cross-linking in rabbit eyes assessed by in vivo confocal laser scanning microscopy and histology. *Cornea*. 2011;30:196–203.

Hwang JS, Lee JH, Wee WR, Kim MK. Effects of multicurve RGP contact lens use on topographic changes in keratoconus. *Korean J. Ophthalmol*. 2010;24:201-206.

Jafri B, Lichter H, Stulting RD. Asymmetric keratoconus attributed to eye rubbing. *Cornea*. 2004;23:560-564.

Jun AS, Cope L, Speck C et al. Subnormal cytokine profile in the tear fluid of keratoconus patients. *PLoS One*. 2011;6:e16437.

Kallinikos P, Morgan P, Efron N. Assessment of stromal keratocytes and tear film inflammatory mediators during extended wear of contact lens. *Cornea*. 2006;25:1-10.

Kanski JJ. *Clinical Ophthalmology*. 2009. Butterworth-Heinemann.

Kao WW, Vergnes JP, Ebert J, Sundar-Raj CV, Brown SI. Increased collagenase and gelatinase activities in keratoconus. *Biochem Biophys Res Commun.* 1982;107:929-36.

Kenney MC, Chwa M, Atilano SR et al. Increased levels of catalase and cathepsin V/L2 but decreased TIMP-1 in keratoconus corneas: Evidence that oxidative stress plays a role in this disorder. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:823-32.

King WJ, Comer RM, Hudde T, Larkin DFP, George AJT. Cytokine and chemokine expression kinetics after corneal transplantation. *Transplantation* 2000;70:1225-1233.

Klyce SD. Computer-assisted corneal topography. High-resolution graphic presentation and analysis of keratoscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1984;25:1426-35.

Koller T, Iseli HP, Hafezi F, Vinciguerra P, Seiler T. Scheimpflug imaging of corneas after collagen cross-linking. *Cornea.* 2009;28:510-515.

Konstantopoulos A, Hossain P, Anderson DF. Recent advances in ophthalmic anterior segment imaging: a new era for ophthalmic diagnosis? *Br J Ophthalmol.* 2007;91:551-557.

Krachmer JH, Eagle RC, Belin MW. Keratoconus and related non-inflammatory corneal thinning disorders. *Surv Ophthalmol.* 1984;28:293-322.

Kránitz K, Kovács I, Miháلتz K, Sándor GL, Knorz MC, Németh J, Nagy ZZ. Corneal changes in progressive keratoconus after cross-linking assessed by Scheimpflug camera. *J. Refract. Surg.* 2012;28:645-649.

Lambiase A, Micera A, Sacchetti M, Cortes M, Mantelli F, Bonini S. Alterations of tear neuromediators in dry eye disease. *Arch Ophthalmol.* 2011;129:981-986.

Lambiase A, Merlo D, Mollinari C, Bonini P, Rinaldi AM, D' Amato M, Micera A, Coassin M, Rama P, Bonini S, Garaci E. Molecular basis for keratoconus: lack of TrkA expression and its transcriptional repression by Sp3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005;102:16795-800.

Lee HK, Lee KS, Kim HC, Lee SH, Kim EK. Nerve growth factor concentration and implications in photorefractive keratectomy vs laser in situ keratomileusis. *Am J Ophthalmol.* 2005;139:965-971.

Lema I, Durán JA, Ruiz C, Díez-Feijoo E, Acera A, Merayo J. Inflammatory response to contact lenses in patients with keratoconus compared with myopic subjects. *Cornea.* 2008;27:758-763.

Lema I, Duran JA. Inflammatory molecules in the tears of patients with keratoconus. *Ophthalmology.* 2005;112:654-659.

Lema I, Sobrino T, Durán JA, Brea D, Díez-Feijoo E. Subclinical keratoconus and inflammatory molecules from tears. *Br J Ophthalmol.* 2009;93:820-824.

Lijnen HR. Elements of the fibrinolytic system. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;936:226-236.

Liu Q, McDermott AM, Miller WL. Elevated nerve growth factor in dry eye associated with established contact lens wear. *Eye Contact Lens.* 2009;35:232-237.

Mackiewicz Z, Määttä M, Stenman M, Konttinen L, Tervo T, Konttinen YT. Collagenolytic proteinases in keratoconus. *Cornea.* 2006;25:603-610. Erratum in: *Cornea.* 2006;25:760.

Macasai MS, Varley GA, Krachmer JH. Development of keratoconus after contact lens wear. *Arch Ophthalmol*. 1990;108:534-538.

Maeda N, Klyce SD, Smolek MK, Thompson HW. Automated keratoconus screening with corneal topography analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994;35:2749-2757.

Maier P, Broszinski A, Heizmann U, Böhringer D, Reinhard T. Active transforming growth factor- β 2 is increased in the aqueous humor of keratoconus patients. *Molecular Vision*. 2007;13:1198-1202.

Matthews FJ, Cook SD, Majid MA, Dick AD, Smith VA. Changes in the balance of the tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMPs)-1 and -3 may promote keratocyte apoptosis in keratoconus. *Exp Eye Res*. 2007;84:1125-1134.

Mazzotta C, Caporossi T, Denaro R, Bovone C, Sparano C, Paradiso A, Baiocchi S, Caporossi A. Morphological and functional correlations in riboflavin UV A corneal collagen cross-linking for keratoconus. *Acta Ophthalmol*. 2012;90:259-265.

McMonnies CW. Abnormal rubbing and keratectasia. *Eye Contact Lens* 2007;33: 265-271.

McMonnies CW, Boneham GC. Keratoconus, allergy, itch, eye-rubbing, hand-dominance. *Clin Exp Optom*. 2003;86:376-384.

Módis L, Vajas A, Tóth E, Kolozsvári B, Berta A. Pentacam (komplett elülső szegmentum elemző készülék). *Szemészet* 2004;141:343-349.

Moon JW, Shin KC, Lee HJ, Wee WR, Lee JH, Kim MK. The effect of contact lens wear on the ocular surface changes in keratoconus. *Eye Contact Lens*. 2006;32:96-101.

Nakamura Y, Sotozono C, Kinoshita S. Inflammatory cytokines in normal human tears. *Curr. Eye Res.* 1998;17:673-676.

Nauheim JS, Perry HD. A clinical study of contact-lens-related keratoconus. *Am J Ophthalmol.* 1985;100:543-546.

Németh J. Szemészeti diagnosztikus képképző eljárások. 2011. Semmelweis. Kiadó.

Niederer RL, Perumal D, Sherwin T, McGhee CN. Laser scanning in vivo confocal microscopy reveals reduced innervation and reduction in cell density in all layers of the keratoconic cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:2964-2970.

Ohta K, Yamagami S, Taylor AW, Streilein JW. IL-6 antagonizes TGF- β and abolishes immune privilege in eyes with endotoxin-induced uveitis. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000;41:2591-2599.

Pannebaker C, Chandler HL, Nichols JJ. Tear proteomics in keratoconus. *Mol Vis.* 2010;16:1949-1957.

Pron G, Ieraci I, Kaulback K. Collagen cross-linking using riboflavin and ultraviolet-A for corneal thinning disorders: an evidence-based analysis. *Ont. Health Technol. Assess. Ser.* 2011;11:1-89.

Qiu Z, Dillen C, Hu J, Verbeke H, Struyf S, Van Damme J, Opdenakker G. Interleukin-17 regulates chemokine and gelatinase B expression in fibroblasts to recruit both neutrophils and monocytes. *Immunobiology.* 2009;214:835-842.

Rabinowitz YS, Garbus J, McDonnell PJ. Computer-assisted corneal topography in family members of keratoconus. *Arch. Ophthalmol.* 1990;108:365-371.

Rabinowitz YS. Keratoconus. *Surv Ophthalmol.* 1998;42:297-319.

Rabinowitz YS. Videokeratographic indices to aid in screening for keratoconus. *J. Refract. Surg.* 1995;11:371-379.

Raiskup-Wolf F, Hoyer A, Spoerl E, Pillunat LE. Collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A light in keratoconus: long-term results. *J Cataract Refract Surg* 2008;34:796-801.

Ridley F. Contact lenses in treatment of keratoconus. *Br J Ophthalmol.* 1956;40:295-304.

Saghizadeh M, Chwa M, Aoki A, Lin B, Pirouzmanesh A, Brown DJ, Ljubimov AV, Kenney MC. Altered Expression of Growth Factors and Cytokines in Keratoconus, Bullous Keratopathy and Diabetic Corneas. *Exp. Eye Res.* 2001;73:179-189.

Schultz CL, Kunert KS. Interleukin-6 levels in tears of contact lens wearers. *J Interferon Cytokine Res.* 2000;20:309-310.

Smith VA, Matthews FJ, Majid MA, Cook SD. Keratoconus: matrix metalloproteinase-2 activation and TIMP modulation. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1762:431-439.

Smolek MK, Klyce SD. Current keratoconus detection methods compared with a neural network approach. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38:2290-2299.

Spoerl E, Huhle M, Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue. *Exp. Eye Res.* 1998;66:97-103.

Spoerl E, Wollensak G, Seiler T. Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion. *Cur. Eye Res.* 2004;29:35-40.

Süveges I. *Szemészet.* 1998. Medicina Könyvkiadó.

Szalai E, Berta A, Hassan Z, Módis L Jr. Reliability and repeatability of swept-source Fourier-domain optical coherence tomography and Scheimpflug imaging in keratoconus. *J Cataract Refract Surg.* 2012;38:485-494.

Thakur A, Willcox MD. Cytokine and lipid inflammatory mediator profile of human tears during contact lens associated inflammatory diseases. *Exp. Eye Res.* 1998;67:9-19.

Thakur A, Willcox MD. Contact lens wear alters the production of certain inflammatory mediators in tears. *Exp. Eye Res.* 2000;70:255-259.

Torres PF, Kijlstra A. The role of cytokines in corneal immunopathology. *Ocular Immunol. Inflamm.* 2001;9:9-24.

Vinciguerra P, Albè E, Trazza S, Seiler T, Epstein D. Intraoperative and postoperative effects of corneal collagen cross-linking on progressive keratoconus. *Arch Ophthalmol.* 2009;127:1258-1265.

Wollensak G, Iomdina E, Dittert DD, Herbst H. Wound healing in the rabbit cornea after corneal collagen cross-linking with riboflavin and UVA. *Cornea* 2007;26:600-605.

Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol* 2003;135:620-627.

Zadnik K, Barr JT, Edrington TB. Baseline findings in the collaborative evaluation of keratoconus (CLEK) study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1998;39:2537-2546.

Zhou L, Sawaguchi S, Twining SS, Sugar J, Feder RS, Yue BY. Expression of degradative enzymes and protease inhibitors in corneas with keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39:1117-1124.

Iktatószám: DEENKÉTK/367/2013.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Kolozsvári Bence Lajos

Neptun kód: ZYJV6S

Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

*1. Fodor, M., **Kolozsvári, B.L.**, Petrovski, G., Kettesy, B., Gogolák, P., Rajnavölgyi, É., Ujhelyi, B., Módos, L., Petrovski, B., Szima, G.Z., Berta, A., Facsók, A.: Effect of contact lens wear on the release of tear mediators in keratoconus.
Eye Contact Lens. 39 (2), 147-152, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/ICL.0b013e318273b35f>
IF:1.461 (2012)

2. **Kolozsvári, B.L.**, Berta, A., Petrovski, G., Miháltz, K., Gogolák, P., Rajnavölgyi, É., Hassan, Z., Széles, P., Fodor, M.: Alterations of Tear Mediators in Patients with Keratoconus after Corneal Crosslinking Associate with Corneal Changes.
PLoS One. 8 (10), e76333-, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0076333>
IF:3.73 (2012)

*3. **Kolozsvári, B.L.**, Petrovski, G., Gogolák, P., Rajnavölgyi, É., Tóth, F., Berta, A., Fodor, M.: Association between mediators in the tear fluid and the severity of keratoconus.
Ophthalmic Res. 51 (1), 46-51, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000351626>
IF:1.562 (2012)



* Megosztott első szerző
" Megosztott utolsó szerző

További Közlemények

- *4. Nagy, V., **Kolozsvári, B.**, Balogh, Z., Csutak, A., Kasza, M., Nagy, B., Kardos, L., Berta, A., Pfliegler, G.: Increased level of platelet P-selectin in nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy. *Graefes Arch. Clin. Exper. Ophthalmol.* 251 (3), 917-922, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00417-012-2196-0>
IF:1.932 (2012)
5. Módis, L., Szalai, E., **Kolozsvári, B.**, Németh, G., Vajas, A., Berta, A.: Keratometry evaluations with the pentacam high resolution in comparison with the automated keratometry and conventional corneal topography. *Cornea.* 31 (1), 36-41, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/ICO.0b013e318204c666>
IF:1.746
6. Fodor M., **Kolozsvári B.**, Rajnavölgyi É., Gogolák P., Petrovski G., Berta A.: Autokeratoplasztika kapcsán végzett citokinmeghatározások. *Szemészet.* 148 (3-4), 101-106, 2011.
7. **Kolozsvári B.**, Fodor M., Szima G.Z., Kettesy A.B., Ujhelyi B., Rajnavölgyi É., Gogolák P., Berta A., Petrovski G., Facskó A.: A kontaktlencse-viselés hatása a könnyben lévő mediátorokra keratoconus esetén. *Szemészet.* 148 (3-4), 129-133, 2011.
8. Szalai E., Berta A., Németh G., **Kolozsvári B.**, Vajas A., Módis L.: A szaruhártya törőerejének vizsgálata Scheimpflug-kamerával, automata kerato-refraktométerrel és korneatopográfákkal. *Szemészet.* 147 (1), 3-8, 2010.
9. Németh G., Módis L., **Kolozsvári B.**, Vajas A., Berta A.: Elülső szegmentum optikai koherencia tomográf alkalmazása a szemészetben. *Szemészet.* 146 (2), 53-58, 2009.
10. Németh, G., Vajas, A., Tsorbatzoglou, A., **Kolozsvári, B.**, Módis, L., Berta, A.: Assessment and reproducibility of anterior chamber depth measurement with anterior segment optical coherence tomography compared with immersion ultrasonography. *J. Cataract. Refract. Surg.* 33 (3), 443-447, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrs.2006.11.013>
IF:2.497

* Megosztott első szerző

11. Németh, G., Vajas, A., **Kolozsvári, B.**, Berta, A., Módis, L.: Anterior chamber depth measurements in phakic and pseudophakic eyes: Pentacam versus ultrasound device.
J. Cataract. Refract. Surg. 32 (8), 1331-1335, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrs.2006.02.057>
IF:2.285
12. Módis L., Vajas A., Tóth E., **Kolozsvári B.**, Berta A.: Pentacam (komplett elülső szegmentum elemző készülék).
Szemészet. 141, 343-349, 2004.

Total IF of journals (all publications): 15.213

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 6.753

The Candidate's publication data submitted to the Publication Database of the University of Debrecen have been validated by Kenezy Life Sciences Library on the basis of Web of Science, Scopus and Journal Citation Report (Impact Factor) databases.

18 November, 2013



12. Tárgyszavak

keratoconus / keratoconus

kontaktlencse / contact lens

mediátorok / mediators

könny / tears

topográfias és tomográfias indexek / topographic and tomographic indices

corneális kollagén cross-linking kezelés / corneal collagen cross-linking

Pentacam /Pentacam

13. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Berta András Professzor Úrnak és Dr. Fodor Mariann Adjunktusnőnek, akik munkámat nagy türelemmel messzemenőig támogatták és segítették. Szeretném elengedhetetlen segítségéért és a hosszú közös munkáért köszönetemet kifejezni Dr. Rajnavölgyi Éva Professzornőnek és Dr. Gogolák Péternek. Köszönettel tartozom minden szerzőtársamnak, különös tekintettel Dr. Hassan Ziadnak és az Orbident Kft. asszisztensnőinek. Végül, de nem utolsó sorban, szeretném megköszönni a segítségét és a türelmét minden munkatársamnak a Szemklinikán, akik lehetővé tették, hogy a tanulmányokra megfelelő mennyiségű időt szakítsak és segítették munkámat.

14. Függelék

Az értekezéshez alapjául szolgáló 3, angol nyelvű közlemény másolata.