

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

MEDIÁTOROK VIZSGÁLATA KERATOCONUSOS BETEGEK KÖNNYÉBEN

Dr. Kolozsvári Bence Lajos

Témavezető:

Prof. Dr. Berta András



DEBRECENI EGYETEM

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2013

MEDIÁTOROK VIZSGÁLATA KERATOCONUSOS BETEGEK KÖNNYÉBEN

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Kolozsvári Bence Lajos

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok Doktori Iskolája
(Klinikai Vizsgálatok programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Berta András

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:

Prof. Dr. Zeher Margit, az MTA doktora

tagok:

Prof. Dr. Rácz Péter, az MTA doktora

Prof. Dr. Sipka Sándor, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: 2014. február 07., 12:00

A bírálóbizottság:

elnök:

Prof. Dr. Zeher Margit, az MTA doktora

bírálok:

Dr. Vámosi Péter, PhD

Dr. Szántó Sándor, PhD

tagok:

Prof. Dr. Rácz Péter, az MTA doktora

Prof. Dr. Sipka Sándor, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja:
Debreceni Egyetem ÁOK Belgyógyászati Intézet, „A” épület tanterme
2014. február 07., 14:00

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
MMP	- mátrix metalloproteináz
NGF	- idegi növekedési faktor
NK	- természetes ölősejtek (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 keratoconust eredendően egy nem gyulladásos eredetű corneális ektáziaként tartjuk számon, melyre a szaruhártya stromájának progresszív elvékonyodása és az ezt kísérő irreguláris asztigmatizmus következtében kialakuló látásromlás jellemző. Főleg fiatal felnőttkorban jelentkezik és incidenciája az átlag populációban kb. 1:2000. A kiváltó okok és a progressziót befolyásoló faktorok ismeretlenek, de az atópiás kórképeknek, genetikai eltéréseknek, a szemdörzsölésnek és a kontaktlencseviselésnek tulajdonítanak szerepet.

A könny fehérje összetételének minőségi és mennyiségi változása fontos mutatója a szem elülső szegmentumát érintő kórképeknek, köztük a keratoconusnak - mely kórfolyamatban beigazolódott a citokinek egyensúlyának felbomlása, illetve egyéb gyulladásos és más mediátorok változásáról is beszámoltak a betegségben, mint az interleukin (IL)-6, epidermális növekedési faktor (EGF), Metalloproteináz-1 szöveti inhibitor (TIMP-1) megemelkedett koncentrációja, ugyanakkor alacsonyabb szintet mutat az IL-12, interferon (IFN)- γ , IL-4, IL-13, Kemokin (C-C motif) ligand 5/Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted (CCL5/RANTES) és a vascularis endothelialis növekedési faktor (VEGF). Megváltozott tumor nekrozis faktor (TNF)- α és idegi növekedési faktor (NGF) szint, illetve az IL-13 csökkenése volt kimutatható a betegség súlyosbodásával. A felsoroltakon kívül az IL-1 α fokozott kötődése a keratoconusos corneák fibroblastjaihoz gyulladásos háttérrel is sejtet a betegség kialakulásában illetve progressziójában. Keratoconus betegek könnyében mért emelkedett mátrix metalloproteináz (MMP)-9 szint pedig szöveti degenerációra utal - mint a betegség legfontosabb ismérve -, mely megmagyarázhatja a cornea szövetének vékonyodását és gyengülését.

A keratoconus kialakulása több okra vezethető vissza, melyek következményeként a stromalis kollagén degradációja miatt kialakuló corneális ektáziát pro-inflammatórikus citokinek, sejtadhéziós molekulák és mátrix metalloproteinázok expressziója kíséri, fontos szerepet játszva betegség patogenezisében.

Keratoconusban rigid gázpermeábilis (RGP) kontaktlencsét használunk az általában más módon már korrigálhatatlan irreguláris asztigmatia kezelésére.

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. A keratoconusos betegek látásának nem sebészi korrekciójára mai napig a kontaktlencse a rutinszerűen alkalmazott eszköz. A könny összetevőinek vizsgálata hasznos információval szolgálhatnak a kontaktlencseviselés hatásairól és bővíthetik tudásunkat a keratoconus patogenezisével kapcsolatban.

A keratoconus progressziója a corneális kollagén cross-linking (CXL) eljárással lassítható. Számos klinikai vizsgálat bizonyította hatásosságát: javulást tapasztaltak a cornea morfológiájában (beleértve a magasabb rendű aberrációk csökkenését), a keratometriás (K) értékekben és a corneatopográfias mutatókat illetően. Azok a mediátorok, amelyek a keratoconus progressziójában vagy stabilizálásában szerepet játszanak még mindig nem pontosan ismertek, a CXL kezelés ezen faktorokra kifejtett hatásáról pedig kevés információval rendelkezünk. Annak ellenére, hogy a CXL hatására bekövetkező corneális biomechanikai és szerkezeti javulások pontosan ismertek, a könnyfilmben a CXL hatására létrejövő folyamatok a mai napig tisztázatlanok. Ezen biomarkerek vizsgálata azért is fontos, hogy megtudhassuk, van-e befolyásoló szerepük a CXL kezelés hatásosságára.

2. Célkitűzések

- 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 könnymintáiban lévő mediátorok koncentrációjának változása folyamatos kontaktlencseviselés előtt és után, megadott időpontokban, kontroll csoporttal összehasonlítva. A vizsgált multifunkcionális mediátorok a keratoconusos betegek corneájában lejátszódó degeneratív folyamatok képviselői (MMP-9, MMP-13, TIMP-1, szöveti plazminogén aktivátor (t-PA), plazminogén aktivátor inhibitor-1 (PAI-1)), valamint a kontaktlencseviselés kapcsán merült fel a szerepük

(IL-6, IL-13, CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES), vagy szabályzó és reparatív folyamatokat képviselnek (NGF, EGF).

- III. A CXL kezelés keratoconus patogenezisére kifejtett rövid és hosszú távú hatásának vizsgálata a könnymediátorok (IL-6, -13, -17A, IFN γ , CXCL8, CCL5, MMP-9, -13, TIMP-1, t-PA, PAI-1, EGF and NGF) koncentrációjának változásán keresztül, valamint ezen koncentrációváltozások összevetése a keratometriás paraméterek változásával a 12 hónapos nyomon követés során. Ezek a paraméterek a következők: 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).

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 Helsink Deklaráció normáinak megfelelően végeztük, a helyi etikai bizottság engedélyével. A könnymintavételhez a betegek írásos beleegyezését kértük.

A keratoconus diagnózisát az alábbi tünetek egyikének önálló vagy csoportos jelenléte esetén állítottuk fel: réslámpás vizsgálattal a cornea stroma állományának centrális vagy paracentrális elvékonyodása, a cornea kónikus elődomborodása, Fleischer-gyűrű, Voght striák, illetve topográfias eltérések. Súlyosság szempontjából a keratoconust a következő kategóriákba soroltuk: enyhének, ha a legmeredekebb tengely mentén mért törőerő (K2) <45 dioptria (D), közepes, ha a K2 45 és 52D között, és súlyos, ha K2 >52 D. Aktív gyulladással 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

A kontaktlencse szakrendelésünkön 2010 február és április közötti időszakban megjelent 11 keratoconusos beteg 14 szeméből gyűjtöttünk könnymintákat (átlag életkor: 29,3 év; legfiatalabb 19, a legidősebb 50 éves volt; 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).

3.1.2. A mediátorok változásának vizsgálata kontaktlencseviselés előtt és után

Vizsgálati csoportok

I. Keratoconusos betegek:

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

II. Kontroll csoport:

10 myopiás, kezdő lágyszemű kontaktlencse viselő 19 szemét vizsgáltuk (átlag életkor: 21,2 év; legfiatalabb 15, a legidősebb 38 éves volt; SD: 7,2). Könnymintavétel a kontaktlencse illesztést követő 6 héten át, de 13 szemből egy éven keresztül történt.

III. Kontroll csoport:

5 myopiás vagy hypermetropiás, kezdő RGP kontaktlencse viselő páciens 8 szeme alkotta (átlag életkor: 22,6 év; legfiatalabb 15, a legidősebb 30 éves volt; SD: 5,0). A lencseviselés kezdetétől számított hat héten át történt a könnymintavétel.

A vizsgálatba bevont minden páciensünket a kontaktlencse szakrendelésünkről válogattuk 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 meghatározás, 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 ezt minden esetben sikerült elérni.

3.1.3 A CXL mediátorokra kifejtett hatásának vizsgálata

A vizsgálat során 23 progresszív keratoconusban szenvedő beteg 26 szemét (átlag életkor: 28,2 év; legfiatalabb 16, a legidősebb 60 éves volt; SD: 10) kezeltük. Minden betegünk átfogó szemészeti vizsgálaton és könnymintavételen 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; legfiatalabb 16, a legidősebb 67 éves volt; SD: 15,3). 2 szem 1-es stádiumú (8%), 12 szem 2-es stádiumú (46%), 12 szem pedig 3-as stádiumú (46%) volt a keratoconus súlyosságát tekintve.

Tanulmányunkba minimum 16 éves, topográfiával egyértelműen igazolható keratoconusos betegeket választottunk be. Kizárási kritériumok a következők voltak: a vizsgált szemén korábban végzett szemészeti műtét, réslámpás vizsgálaton megállapított szemlencse vagy retinális eltérés, vegyszer okozta sérülés, pachymetriával mért 300 μm -nél vékonyabb cornea, illetve terhesség, vagy szoptatás. Progresszívnek minősítettük a keratoconust, ha a kezelést megelőző 24 hónap alatt 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.

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 (26 szem közül 4 esetben), akkor 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. 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 műkönyv 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), keratométert és Scheimpflug tomográfiát (Pentacam HR, Oculus Optikgeräte GmbH, Wetzlar, Germany) használtunk. Táblázatba (Microsoft Excel, Microsoft Corp, Redmond, Washington) gyűjtöttük az alábbi topográfiás paramétereket: K1, K2, ThCT, Rmin, KI, CKI, IHA, ISV. Az elevációs adatok értékelésekor tórikus-ellipsoid referencia felszínt használtuk.

3.2. Könygyűjtés menete és a mediátorok mérése

A könnymintákat 2 percig, az alsó könnymeniscusból steril üvegkapilláris 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. A hígítási és pipettázási hibák elkerülése céljából a 4 μl alatti könnymintákat a vizsgálatból kizártuk. Egyes esetekben a könnymintavételt a szemszárzság megakadályozta.

Multiplex mikrogöngy mátrix (Cytometric Bead Array) technológia segítségével, áramlási citométerrel (FACS Array™ cytometer, BD Biosciences Immunocytometry Systems, San Jose, CA) mértük a különböző mediátorok koncentrációját. Az áramlási citométeres mérésekhez az egyszerre mérhető proteineket összeválogattuk, és a FlowCytomix™ Simplex Kit-et a FlowCytomix Basic Kit-tel megfelelően kombinálva használtuk, a gyártó (eBioscience, Bender MedSystems GmbH, Bécs, Ausztria) által javasolt felhasználási protokollon minimálisan módosításával. Az adatok kiértékelése a FlowCytomix Pro 2.3 software-rel történt. 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 INF γ : 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 kontaktlencseviselés 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) kontaktlencseviselést követően. A lencse első felhelyezését követően 1 évvel is tudtunk mintát gyűjteni több betegünktől. 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. Összesen 23 keratoconusos beteg 26 szeméből történt könnymintavétel a CXL kezelés előtt, valamint az azt követő 1 éven keresztül minden kontrollvizsgálat során. A 12 kontroll szemből egyszer történt könnymintavétel. A keratoconusos 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, INF γ 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/ μ l) és a 2 perc alatt gyűjtött könny mennyiség (μ l) összeszorzásával 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 korrekciós, 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 után 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 tényezővel egészítettük ki.

4. Eredmények

4.1. A mediátorok és topográfias indexek közötti asszociációk meghatározása keratoconusban

Az átlagos topográfias adatok a következők: 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: 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: 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 ($p=0,04$) között; az MMP-13 és a K2 ($p=0,002$), Ave K ($p=0,002$) és a SDP ($p=0,002$) között; valamint az NGF és a K2 ($p=0,001$), Ave K ($p=0,001$), KSI ($p=0,02$), OSI ($p=0,04$), CSI ($p=0,01$), KPI ($p=0,03$) és az SDP ($p=0,001$) között. Szignifikáns negatív asszociáció mutatkozott az IL-6 és a KCI ($p=0,02$) között. Kor-függő kapcsolat volt megfigyelhető az IL-13 és a KCI ($p=0,02$), KSI ($p<0,001$), OSI ($p=0,02$), KPI ($p=0,02$) között; valamint a CXCL8 és K2 ($p=0,045$), Ave K ($p=0,03$), CSI ($p=0,001$), SDP ($p=0,04$) között; szintén a CCL5 és a KSI ($p=0,04$) között; illetve a MMP-13 és a CSI ($p=0,002$) között.

4.2. Mediátorok vizsgálata kontaktlencseviselés előtt és után keratoconusban

Közepes fokú keratoconust diagnosztizáltunk 11 szem esetén (K2 45,0 és 52,0 D között) és nagyfokú ($K2>52,0$ D) keratoconust diagnosztizáltunk 4 szem esetén. A

K2 átlag értéke 51,5D (SD:4,7) volt. A vizsgálatba bevont pácienseknél kontaktlencse viselés hatására szövődmény vagy nem várt esemény nem lépett fel.

A csoportok közötti eltérések kontaktlencse viselés 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. Kontaktlencse viselés előtt magasabb értékeket mértünk: 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. Kontaktlencse viselés előtt az EGF release szignifikánsan alacsonyabb volt a keratoconusos csoportban a kontrollhoz viszonyítva ($p=0,03$).

A lineáris trend-ek közötti és a kontaktlencseviselés 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). Lágylencse viselésnek (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 a 10. és a 30. percben.

Vizsgálatunkban nem mutatkozott különbség egy éves lencseviselést követően a keratoconusos (RGP lencseviselők) és az ametrop (lágylencse viselő) csoportok között. Az egy éves kontroll alkalmával gyűjtött könnyminták esetén a keratoconusos 5 mintából csak három, míg a levett 13 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 a kontrollal szemben.

4.3. CXL mediátorokra kifejtett hatásának vizsgálata keratoconusban

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 ($p=0,001$), INF γ ($p=0,02$), 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 beavatkozás után 6 hónappal 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 tomográfias 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 ($p=0,049$), INF γ ($p=0,017$), CCL5 ($p=0,02$) és PAI-1 ($p=0,011$) között.

5. Megbeszélés

5.1. A keratoconus etiológiája, csakúgy, mint a progressziót előrejelző faktorok nem kellően ismertek. A réslámpával vizsgálható klinika jelek mellett a cornea topográf és tomográf számít a standard vizsgáló eszköznek a keratoconus felismerésében és klasszifikációjában.

Az MMP-k és az ezeket gátló különböző TIMP-ek citokinek és növekedési faktorok hatására szekretálódnak és az extracelluláris matrix fehérjéinek degradációjában vesznek részt. 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 enzimek aktuális aktivitása önmagában is befolyással bír.

A keratoconus patogenezisében a corneális beidegzés zavarának is szerepet tulajdonítanak, és legjobb tudásunk szerint a könny NGF szintjét keratoconusos betegek könnyéből munkacsoportunk vizsgálta először. 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.

Vizsgálatunkban az IL-6 és a KCI között negatív korrelációt találtunk, azonban a K2 viszonylatában nem tudtuk kimutatni szignifikáns összefüggést kimutatni. Úgy tűnik, hogy az MMP-k és a citokinek aktívan együttműködnek, mivel az IL-6 számos MMP termelődését stimulálja. Az IL-13 és a keratoconus súlyossága között, - 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. Eredményeink azt mutatják, 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.

5.2. A keratoconussal kapcsolatos intenzív klinikai és alap kutatások ellenére a kontaktlencseviselés pontos 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. Vizsgálatunk megerősíti azt a hipotézist, miszerint a

kontaktlencseviselés 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 és a CXCL8 szintje keratoconusban kontaktlencseviselés után megemelkedett, az NGF, TIMP-1 és a PAI-1 pedig ezzel egyidejűleg lecsökkent. Ezek a mediátorok feltételezhetően szerepet játszhatnak az extracelluláris mátrix degradációjában, mely folyamat a keratoconusos corneák fő jellemzője. A mediátorok szintjének időbeli változása a keratoconus patogeneze során alátámasztja azt az elképzelést, mely szerint a citokinek, enzimek és azok inhibitorai közötti egyensúly felbomlik, és ez a változás fontos szerepet játszhat a kórkép progressziójában.

Az MMP-9 és MMP-13 szintjének emelkedését RGP kontaktlencsét viselő keratoconusos és kontroll csoportba tartozó betegeknél is kimutattuk, mely különösen a lágyszövet kontaktlencse-viselőkkel összehasonlítva volt jelentős. Mindez azt jelzi, hogy az emelkedett MMP-9 és MMP-13 szintek nem a keratoconus primer jellemzői, hanem az RGP kontaktlencse okozta másodlagos hatások. Vizsgálatunkban a TIMP-1-release még magasabb is volt keratoconusban az RGP kontaktlencse illesztését követő korai szakaszban a kontrollokhoz képest, 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 velejárási 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. Mivel a PAI-release MMP-9 aktivációt okoz, így hiányának jelentősége lehet, mivel az extracelluláris mátrix degradáció mértéke változhat. Eddig a PAI-t kontaktlencseviseléssel kapcsolatban nem vizsgálták, és keratoconusban sem tanulmányozták könnymintákból.

A kontaktlencsék fizikai jelenléte, különösen az RGP lencséké, mechanikai irritációt okoz, mely következményesen megemeli a gyulladási mediátorok szintjét. Kutatásunk során szignifikáns IL-6 emelkedést tudtunk kimutatni RGP kontaktlencse

viselését követően. Ezzel ellentétben egyetlen vizsgált gyulladáscsökkentő citokin szintje sem emelkedett meg lágyszor kontaktlencseviselés hatására. Felvetődik a kérdés, hogy az RGP kontaktlencse okozta megemelkedett IL-6 szint elégséges-e ahhoz, hogy a keratoconus hosszú távú progresszióját befolyásolja. Erre a kérdésre további vizsgálatainkban keresünk választ. Jelen megfigyeléseinkben növekvő lineáris trendet mutattunk ki CXCL8 tekintetében nemcsak RGP kontaktlencsét viselő keratoconusos betegeknél, hanem RGP lencsét viselő kontrolloknál is.

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 kontaktlencseviselés elkezdése után az NGF release szignifikánsan alacsonyabb volt keratoconus esetén. Kontaktlencse viselése előtt keratoconusban szignifikánsan alacsonyabb EGF szintet mértünk, és 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 ezen részének fő limitációja a kis betegszám, és az a tény, hogy nem tudtuk minden betegtől egy éven keresztül könnymintát gyűjteni (mivel a betegek egy része nem jött vissza kontroll vizsgálatokra; corneális cross-linking kezelés történt, ill. a kontaktlencseviselést felfüggesztették a betegek).

5.3. 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.

Vizsgálatunk során CXL kezelést követően keratoconus esetén 8 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, sejt osztódást és migrációt, fiziológiás és

patológiás folyamatokban egyaránt. Ennek a biomarkerekből álló komplex hálózatnak a szereplői befolyásolhatják a CXL kezelés hatását.

A vizsgálatunk során K1, KI, ISV, ThCT és Rmin esetében észlelt javulás megegyezik azokkal a korábbi tapasztalatokkal, melyek szerint a CXL hatására a cornea alakja szabályosabb lesz, így a kezelés egy hatékony eljárásnak minősül.

A hámfosztott cornea CXL kezelése azonnali, nagyszámú mediátor felszabadulásával jár és független a kezelés hosszútávú hatásától, hiszen a corneát érő mechanikai (hám eltávolítás), kémiai (riboflavin alkalmazása) és a fizikai (UVA besugárzás) stressz következménye. A beavatkozást követő kifejezett könnyezés ellenére az IL-6 és CXCL8 koncentrációja szignifikánsan megemelkedett 4 nappal a CXL-et követően ($p < 0,0001$), mely a gyulladós sejtek gyors aktiválódását jelzi. A kezelést követő 4. napon a ThCT szignifikánsan megnőtt ($p = 0,0005$), de ez a duzzadás drámaian lecsökkent a 38. napra ($p < 0,0001$). A CXL kezelést követő korai posztoperatív szakra jellemző cornea ödéma egy már ismert jelenség. Az erős könnyezés okozta hígulás miatt számos mediátor koncentrációja szignifikánsan csökkent. 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 egybeesik a hámtávolítás és re-epitelizáció folyamatával és a keratociták posztoperatív apoptózisával és repopulációjával, valamint az új kollagén szintézisével. Az UVA sugárzás a cornea külső rétegében lévő keratociták pusztulását okozza. Ismert tény, hogy nem lehet keresztkötéseket létrehozni a keratociták károsítása nélkül. A sejt nekrozis erős gyulladós választ 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 és a gyulladós sejtek odavonzásával, hiszen a károsodott sejtek eltávolításával megvédik egy túlzott gyulladós reakció romboló hatásától a szöveteket. A CXL-t követően a corneális szövetek gyorsan regenerálódnak, a posztoperatív negyedik napra a hámhiány teljesen begyógyul. 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 a 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.

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. Ugyanekkor 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 szintek 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 lehetséges szerepüket a cornea stabilizációjában. A hosszútávú asszociációk analízise kapcsán fordított összefüggést mutattunk ki a ThCT és az IFN γ között. IL-13 alapvető szerepet játszik a T_H2 válasz erősítésében, így ennek a citokinnek a csökkent szintje felveti, hogy keratoconusban a T_H2 válasz is módosult. A bőr fibroblasztjainak IL-13 által történő stimulálása a kollagén I. és III. fokozott produkcióját eredményezi. 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. 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-ok szekrécióját citokinek és növekedési faktorok befolyásolják, és a könny emelkedett MMP szintje keratoconusban jelzi, hogy a szöveti lebontó folyamatok szerepet játszanak a cornea fokozatos elvékonyulásában. A MMP-ok és a citokinek egymással történő interakciója komplex hálózatot alkot, melynek része az IL-6 által történő MMP-9 és MMP-13 stimuláció. A t-PA aktív formája a plazminogént plazminná alakítja, mely számos extracelluláris komponens degradációjáért felelős és aktiválja az MMP útvonalat is. A különböző TIMP-ok és a PAI-ok pedig szabályozzák a MMP-okat és a PA-okat, gátolva ezt a kaskád rendszert, és ezzel

befolyásolják a keratoconus progresszióját. A PAI-1 gént számos növekedési faktor és citokin befolyásolja, és a t-PA enzimek aktivációja gátlóan hat. 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-ok a különböző MMP-ok természetes inhibitorai, azonban a korábbi közlések ellentmondóak a keratoconusos corneák TIMP-1 expresszióját illetően. Vizsgálatunkban mi nem tudtunk korrelációt/asszociációt kimutatni a MMP-9 és a TIMP-1 vonatkozásában, mely jelezheti, hogy más MMP-ok 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.

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

Fontos megjegyezni, hogy CXL után a szteroid szemcseppek használata és alkalmazásuk hossza is nagyban függ az egyéni szemészeti gyakorlattól. 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. Jelenleg a CXL kezelés hosszú távú hatása még nem ismert, azonban eredményeink szerint a szteroid alkalmazása befolyásolhatja a CXL kezelés okozta változásokat. 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 progresszív formát a nem progresszívótól, 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 találtunk a könnyből kimutatható 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 kontaktlencse viselés 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, INF γ), 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. A tudományos eredmények hasznosíthatósága

A keratoconus fiatal felnőtteket érintő betegség, mely napjainkban is a szaruhártya átültetés egyik vezető indikációja. Mivel a cornea változása hatással van a könny összetételére, és ezen változások visszahatnak a szemfelszínre, ezért indokolt, hogy a keratoconus patofiziológiájának vizsgálatára a szemfelszínt borító könnyet használjuk.

Keratoconusos betegek könnyében számos mediátor szintjének változását mutattuk ki, mely adatok jól használhatóak a betegség súlyosságának követésében, és a betegség progressziójának megértéséhez nyújthat segítséget. Jövőbeli vizsgálatoknak kell tisztázni, hogy a könnyfilmben megtalálható mediátorok komplex hálózatából 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, valamint a különböző kontaktlencsék tolerálhatóságának vizsgálatára. A CXL kezelés megkezdése előtt meg kellene határozni azokat a faktorokat, melyek a kezelés eredményességét javíthatják vagy ronthatják. Olyan vizsgálatokra is szükség lenne, melyek a keratoconus különböző stádiumaiban meghatározzák a mediátorok változásának hatását. Mindezek segíthetnének abban, hogy a patológiás corneális elvékonyulást helyileg tudjuk gátolni, illetve a beteg személyre szabott 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.

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., Facskó, 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)

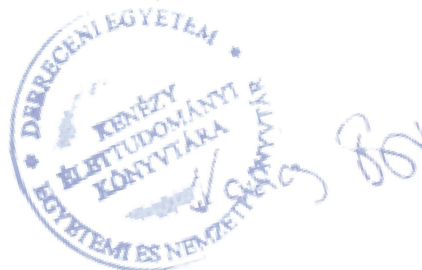
*3. **Kolozsvári, B.L.**, Petrovski, G., Gogolák, P., Rajnavölgyi, É., Tóth, F., Berta, A., Fodor, M.: Association between mediators in the tear fluid and the severity of keratoconus.

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 korneatopográfval. *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.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 15.213

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 6.753

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2013.11.18.



Az értekezés témájához kapcsolódó előadások jegyzéke

Fodor M., **Kolozsvári B.**, Kettesy B., Ujhelyi B., Berta A., Rajnavölgyi É., Gogolák P., Szima G., Facskó A.: Kontaktlencse által kiváltott könnyben lévő mediátorok vizsgálata, különös tekintettel keratoconus esetén. 2011.03.18. Magyar Műlencse Implantációs és Refraktív Sebészeti Társaság Kongresszusa (SHIOL); Keszthely.

Kolozsvári B., Fodor M., Petrovski G., Kettesy B., Petrovski B., Rajnavölgyi É., Gogolák P., Berta A., Szima G., Facskó A.: Effect of contact lens wear on soluble tear mediators in patients in keratoconus/ Kontaktlencse viselés könnyben lévő mediátorokra kifejtett hatása keratoconus esetén. 2012.06.08. HARVO-AARVO Szimpózium, Magyar Szemorvostársaság Kongresszusa; Siófok.

Kolozsvári B., Fodor M., Petrovski G., Kettesy B., Gogolák P., Berta A.: Kontaktlencse-viselés hatása könnyfilmben lévő mediátorokra keratoconusban. 2012.09.29. Magyar Kontaktológiai Társaság V. Továbbképző Tanfolyama és Kongresszusa a Magyar Szemorvostársaság Cornea Társasága részvételével; Budapest.

Fodor M., **Kolozsvári B.**, Petrovski G., Gogolák P., Rajnavölgyi É., Berta A.: Keratoconus súlyossága és a könnyben lévő fehérjék közötti összefüggés vizsgálata. 2012.09.29. Magyar Kontaktológiai Társaság V. Továbbképző Tanfolyama és Kongresszusa a Magyar Szemorvostársaság Cornea Társasága részvételével; Budapest.

Az értekezés témájában megjelent idézhető absztraktok és poszterek

B. L. Kolozsvári, M. Fodor, G. Petrovski, B. Kettesy, B. Petrovski, E. Rajnavölgyi, P. Gogolák, A. Berta, G. Szima, A. Facsko: Effect Of Contact Lens Wear On Soluble Tear Mediators In Patients With Keratoconus. 2011.05.1-5. ARVO, Fort Lauderdale; USA.
(*poszter*)

Kolozsvári B., Fodor M., Petrovski G., Kettesy A. B., Petrovski B., Rajnavölgyi É., Gogolák P., Berta A., Szima G. Z., Facskó A.: Kontaktlencse-viselés könnyben lévő mediátorokra kifejtett hatása keratoconus esetén. Szemészet 2012; 149(S): 39-40.

Egyéb idézhető absztraktok

Kolozsvári B., Nagy V., Berta A.: Tompa sérülés által kiváltott ischaemiás retinopathia. Szemészet 2005; 142(S):65.

Kolozsvári B., Berta A., Módis L.: Négy tonométer összehasonlító vizsgálata. Szemészet 2006; 143(S):62.

Kolozsvári B., Németh G., Vajdas Attila., Berta A., Módis L.: Cornealis endothelialis sejtsűrűség meghatározása spekulár és konfokális korneamikroszkóppal. Szemészet 2007; 144(S):60.

Kolozsvári B., Berta A., Módis László.: Pseudotumor orbitae-hez társuló dislocatio bulbi speciális esete. Szemészet 2008; 145(S):63.

Vajdas A., Facskó A., Nagy V., **Kolozsvári B.,** Papp E., Berta A.: Tapasztalataink intravitrealis ranibizumab-kezeléssel nedves típusú, korfüggő maculadegenerációban. Szemészet 2008; 145(S):100.

Kolozsvári B., Módis L., Berta A. (moderátor): Keratoprothesis kurzus. Szemészet 2010; 147(S):120.

Papp E., Vajdas A., Facskó A., Nagy V., Kettesy B., Losonczy G., **Kolozsvári B.,** Ujhelyi B., Berta A.: Intravitrealis ranibizumab-injekciót követő intraocularis szemnyomásváltozások időbeni lefolyása. Szemészet 2009; 146(S):67.

Szalai E., Németh G., **Kolozsvári B.,** Vajdas A., Berta A., Módis L.: Pentacam HR-rel végzett keratometriás vizsgálat összehasonlítva automata keratométer és konvencionális corneatopográf mérési eredményeivel. Szemészet 2010; 147(S):76.

Kolozsvári B., Fodor M., Berta A.: A keratoplasztika egy speciális esete. Szemészet 2011; 148(S):81.

Módis L., **Kolozsvári B.,** Szalai E., Nagyné Szőke E., Berta A.: Előzetes eredmények femtoszekundum lézeres keratoplasztikával. Szemészet 2012; 149(S):67.

Egyéb poszter prezentációk

Kolozsvári B., Németh G., Vajdas A., Berta A., Módis L.: Corneális sejtsűrűség meghatározása spekulár és konfokális lézer „scanning” mikroszkóppal, 2009.04.20. DEOEC Szemklinika bemutató napja; Debrecen.

B. Kolozsvári, G. Németh, A. Vajas, A. Berta, L. Módis.: Determination of corneal endothelial cell density by specular and confocal microscopy in healthy individuals, 2009.06.24-26. Magyar Szemorvostársaság Kongresszusa/6th Congress of South-East European Ophthalmological Society; Budapest

Egyéb előadások jegyzéke

Kolozsvári B., Módis L., Berta A.: Corneatopográfias vizsgálatok keratoprotéziseken. 2004.04.02. Magyar Műlencse Implantációs Társaság és Refraktív Sebészeti Társaság Kongresszusa; Keszthely.

Berta A., **Kolozsvári B.**, Módis L., Vámosi P., Alberth B.: Hazai fejlesztésű keratoprotézis. 2004.04.02. Magyar Műlencse Implantációs Társaság és Refraktív Sebészeti Társaság Kongresszusa; Keszthely.

Vajas A., Hassan Z., **Kolozsvári B.**, Németh G., Berta A., Módis L.: A rotációs Scheimpflug képalkotás elvén működő Pentacam használhatósága a refraktív sebészetben. 2005.04.01. Magyar Műlencse Implantációs Társaság és Refraktív Sebészeti Társaság Kongresszusa; Keszthely.

Kolozsvári B., Berta A.: Keratoprotézises betegeken végzett látótérvizsgálatok. 2005.04.01. Magyar Műlencse Implantációs Társaság és Refraktív Sebészeti Társaság Kongresszusa; Keszthely.

Kolozsvári B., Nagy V., Berta A.: Tompa sérülés által kiváltott ischaemiás retinopathia. 2005.06.10. Magyar Szemorvostársaság Kongresszusa; Szeged.

Kolozsvári B., Berta A., Módis L.: Négy tonométer összehasonlító vizsgálata. 2006.06.15. Magyar Szemorvostársaság Kongresszusa; Sopron.

Kolozsvári B.: A thrombosis venae centralis retinae tünetei és diagnosztikája. 2006.10.13. Továbbképző előadás, DEOEC Szemklinika; Debrecen.

Kolozsvári B., Németh G., Vajas Attila., Berta A., Módis L.: Cornealis endothelialis sejtsűrűség meghatározása spekulár és konfokális korneamikroszkóppal. 2007.06.21. Magyar Szemorvostársaság Kongresszusa; Debrecen.

Kolozsvári B.: Diagnosztikus eljárások a szemészetben: Szemnyomás mérés – látótér. 2007.11.16. Továbbképző előadás, DEOEC Szemklinika; Debrecen.

Módis L., Németh G., **Kolozsvári B.**, Vajas A., Berta A.: Elülső szegmentum OCT és ultrahang pachymetria szaruhártya-átültetést követően. 2008.03.29. Magyar

Műlencse Implantációs Társaság és Refraktív Sebészeti Társaság Kongresszusa; Keszthely.

Kolozsvári B.: Diagnosztikus eljárások a szemészetben: Perforáló keratoprothesisek. 2008.04.18. Továbbképző előadás, DEOEC Szemklinika; Debrecen.

Kolozsvári B., Németh G., Berta A., Módis L.: Műlencsetervezési hiba vizsgálata különböző módszerekkel meghatározott tengelyhossz értékek esetén. 2008.03.29. Magyar Műlencse Implantációs Társaság és Refraktív Sebészeti Társaság Kongresszusa; Keszthely.

Németh G., **Kolozsvári B.,** Berta A., Módis L.: Tengelyhossz mérés ismételhetségének és megbízhatóságának vizsgálata különböző módszerekkel. 2008.03.29. Magyar Műlencse Implantációs Társaság és Refraktív Sebészeti Társaság Kongresszusa; Keszthely.

Kolozsvári B., Berta A., Módis László.: Pseudotumor orbitae-hez társuló dislocatio bulbi speciális esete, 2008.05.30. Magyar Szemorvostársaság Kongresszusa; Pécs.

Vajas A., Facskó A., Nagy V., **Kolozsvári B.,** Papp E., Berta A.: Tapasztalataink intravitreális ranibizumab-kezeléssel nedves típusú, korfüggő maculadegeneratióban. 2008.05.30. Magyar Szemorvostársaság Kongresszusa; Pécs.

Kolozsvári B., Berta A., Módis L.: Keratoprothesis és látótér – tapasztalatok és lehetőségek, 2009.03.20. Magyar Műlencse Implantációs Társaság és Refraktív Sebészeti Társaság Kongresszusa; Keszthely.

Kolozsvári B.: Az OCT jelentősége a macula területének diagnosztikájában, 2009.03. 24. Továbbképző előadás, DEOEC Szemklinika; Debrecen.

Kolozsvári B.: Keratoprothesis és a látótér – tapasztalatok és lehetőségek. 2009.04.20. DEOEC Szemklinika bemutató napja; Debrecen.

Kolozsvári B.: Keratoprothesis és a látótér – tapasztalatok és lehetőségek. 2009.06.29. A Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola 2009. évi Ph.D. Szimpóziuma; Debrecen.

Kolozsvári B., Módis L., Berta A. (moderátor): Keratoprothesis kurzus. 2010.06.25. Magyar Szemorvostársaság Kongresszusa; Szeged.

Szalai E., Németh G., **Kolozsvári B.,** Vajas A., Berta A., Módis L.: Pentacam HR-rel végzett keratometriás vizsgálat összehasonlítva automata keratométer és konvencionális corneatopográf mérési eredményeivel. 2010.06.25. Magyar Szemorvostársaság Kongresszusa; Szeged.

Kolozsvári B.: Az asztigmatizmus és kezelési lehetőségei. 2011.02.04. Továbbképző előadás, DEOEC Szemklinika; Debrecen.

Kolozsvári B., Fodor M., Berta A.: A kertoplasztika egy speciális esete. 2011.06.17. Magyar Szemorvostársaság Kongresszusa; Siófok.

Kolozsvári B.: Lézerek a szemészetben. 2011.11.06. Továbbképző előadás, DEOEC Szemklinika; Debrecen.

Kolozsvári B.: A száraz szem terápiája. 2012.03.23. Továbbképző előadás, DEOEC Szemklinika; Debrecen.

Módis L., **Kolozsvári B.,** Szalai E., Nagyné Szőke E., Berta A.: Előzetes eredmények femtoszekundum lézeres keratoplasztikáva. 2012.06.08. Magyar Szemorvostársaság Kongresszusa; Siófok.

Kolozsvári B.: Debreceni tapasztalatok a módosított Konstantinov keratoprothesis beültetésével. (Keratoprotézis beültetés a klinikai gyakorlatban c. kurzus) Moderátor: Berta A. 2012.06.08. Magyar Szemorvostársaság Kongresszusa; Siófok.

Kolozsvári B.: Refraktív szemsebészet (PRK, LASIK). 2012.11.17. Továbbképző előadás, DEOEC; Debrecen.

Kolozsvári B.: Lézerek a szemészetben. 2012.11.30. Posztgraduális képzés, szakasszisztensi képzés (A klinikai elektrofiziológiai asszisztensek, szakasszisztensek feladatai a szemészeti ellátás során). DEOEC; Debrecen.

Kolozsvári B.: Visus, látótér, színlátás, elektrofiziológia diagnosztika a szemfenéki kórképeken. 2013.11.07. Továbbképző előadás, DAB-DEOEC ; Debrecen.