

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Vén-Tóth Noémi

**Új lehetőségek a könny képződiagnosztikájában
és proteomikai vizsgálatában**

DEBRECENI EGYETEM

KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2021

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Új lehetőségek a könny képződiagnosztikájában és proteomikai vizsgálatában

Dr. Vén-Tóth Noémi

Témavezető: Prof. Dr. Csutak Adrienne



DEBRECENI EGYETEM

KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2021

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
1. Bevezetés és irodalmi áttekintés.....	8
1.1. A könnyfilm.....	8
1.2. A könny képkötő vizsgálata	9
1.3. A könny proteomikai vizsgálata.....	12
2. Célkitűzések.....	17
3. Betegek és módszerek.....	17
3.1. Betegcsoportok	17
3.2. Klinikai vizsgálatok.....	18
3.3. Alkalmazott statisztikai módszerek	21
4. Eredmények.....	22
4.1. Képkötő vizsgálat	22
4.2. Proteomikai vizsgálat.....	29
5. Megbeszélés	36
5.1. Képkötő vizsgálat	36
5.2. Proteomikai vizsgálat.....	38
6. Új eredmények összefoglalása	46
7. Summary of new results	47
8. Összefoglalás	48
9. Summary.....	49
10. Irodalomjegyzék	50
11. Tárgyszavak/key words	60
12. Köszönetnyilvánítás.....	61
13. Az értekezés alapjául szolgáló és egyéb közlemények hitelesített listája	62

Rövidítések jegyzéke

4E-BP1=EIF4EBP1- Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1; Eukarióta transzlációs iniciációs faktor 4E-kötő fehérje 1

ADAM-TS13 - ADAM Metallopeptidase with Thrombospondin Type 1 Motif; von-Willebrand faktor hasító proteáz

AMBP - Protein AMBP; AMBP fehérje

ANOVA - Analysis of variance, varianciaanalízis

ARTN - Artemin; Artemin

BNP/NPPB - Natriuretic peptides B; Pitvari natriuretikus peptid B

BUT - Tear film break-up time, Könnyfilm felszakadási idő

CA5A - Carbonic anhydrase 5A, mitochondrial; Karbonát anhidráz 5A, mitokondriális

CASP-8 - Caspase-8; Kaszpáz-8

CCD - Charge-coupled device; Töltés csatolt eszköz

CCL23 - C-C motif chemokine 23; C-C motívumos kemokin 23

CCL3 - C-C motif chemokine 3; C-C motívumos kemokin 3

CD40-L - CD40 ligand; CD40 ligand

CEACAM8 - Carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 8; Karcinoembrionális antigénhez kapcsolódó sejtheadhéziós molekula 8

CV - Coefficient of variation; Variációs koefficiens

CVD - Cardiovascular disease; Kardiovaszkuláris betegség

DECR1 - 2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial; 2,4-dienoil-CoA reduktáz, mitokondriális

DED - Dry eye disease; Száraz szem szindróma

ECM-Extracelullar matrix; Extracelluláris mátrix

EGF- Epidermal growth factor; Epidermális növekedési faktor

EN-RAGE=S100A12 - Protein S100-A12; S100-A12 fehérje

FCGR2B - Fc fragment of IgG receptor IIb; IgG Fc fragmens alacsony affinitású receptora

FGF-19 - Fibroblast growth factor 19; 19-es fibroblaszt növekedési faktor

FGF-23 - Fibroblast growth factor 23; 23-as fibroblaszt növekedési faktor

GIF - Gastric intrinsic factor; Gyomor intrinsic faktor

GLO1 - Glyoxalase I; Glikoxaláz 1

GO - Gene ontology; Gén ontológia

GPC - Gel permeation Chromatography; Géppermeációs kromatográfia

HGF - Hepatocyte growth factor; Hepatocita növekedési faktor

HPLC - High-performance liquid chromatography; Nagy teljesítményű folyadékkromatográfia

ICC - Intraclass correlation coefficients; Osztályon belüli korrelációs együttható

IL - Interleukin; Interleukin

IL-1 alpha - Interleukin-1 alpha; Interleukin-1 alfa

IL-10 - Interleukin-10; Interleukin-10

IL10RA - Interleukin-10 receptor subunit alpha; Interleukin-10 receptor alfa alegység

IL15RA - Interleukin-15 receptor subunit alpha; Interleukin-15 receptor alfa alegység

IL17C - Interleukin-17C; Interleukin-17C

IL-18 - Interleukin-18; Interleukin-18

IL-2 - Interleukin-2; Interleukin-2

IL-20 - Interleukin-20; Interleukin-20

IL20RA - Interleukin-20 receptor subunit alpha; Interleukin-20 receptor alfa alegység

IL22RA1 - Interleukin-22 receptor subunit alpha-1; Interleukin-22 receptor alfa-1 alegység

IL-24 - Interleukin-24; Interleukin-24

IL2RB - Interleukin-2 receptor subunit beta; Interleukin-2 receptor béta alegység

IL-6 - Interleukin-6; Interleukin-6

IL-8 - Interleukin-8; Interleukin-8

INT - Interferometry; Interferometria

IOP - Intraocular pressure, Intraokuláris nyomás

KGF - Keratocyte growth factor; Keratocita növekedési faktor

LEP – Leptin; Leptin

LoA - Limits of agreement; Egyezőségi határérték

LTMH - Lower tear meniscus height; Alsó könnymeniszkusz magasság

MARCO - Macrophage receptor; Makrofág receptor

MAPK - Mitogen-activated protein kinase; Mitogén-aktivált protein kináz

MCP-1=CCL2 - Monocyte chemotactic protein 1; Monocita kemotaktikus fehérje 1

MCP-3=CCL7 - Monocyte chemotactic protein 3; Monocita kemotaktikus fehérje 3

Meib - Meibography; Meibográfia

MeibI - Meibography inferior; Alsó (szemhéj) meibográfia

MeibS - Meibography superior; Felső (szemhéj) meibográfia

MMP - Matrix metalloproteinase; Mátrix metalloproteináz

MMP-1 - Matrix metalloproteinase-1; Mátrix metalloproteináz-1

MMP12 - Matrix metalloproteinase-12; Mátrix metalloproteináz-12

MT - Megbízhatósági tartomány

nanoLC-MS - Nanoscale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry;

Nanométerű folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria

NEMO=IKKBG - NF-kappa-B essential modulator; NF-kappa-B esszenciális modulátor

NF-kappa-B - Nuclear factor kappa B; Nukleáris faktor kappa B

NGF - Neural growth factor; Neurális növekedési faktor

NIBUT - Non-invasive tear film break-up time; Nem invazív könnyfilm felszakadási idő

NPX - Normalized protein expression; Normalizált expressziós egység

OCT - Optical coherence tomography; Optikai koherencia tomográfia

OSCAR - Osteoclast-associated immunoglobulin-like receptor; Oszteoklaszt-asszociált immunglobulin-szerű receptor

PARP-1 - Poly [ADP-ribose] polymerase 1; Poli [ADP-ribóz] polimeráz 1

PDGF - Platelet-derived growth factor; Trombocita eredetű növekedési faktor

PEA - Proximity extension assay

PlgR - Polymeric immunoglobulin receptor; Polimer immunglobulin receptor

PRELP - Prolargin; Prolargin

QC - Quality control; Minőségellenőrzés

qPCR - Real-time polymerase chain reaction; Kvantitatív polimeráz láncreakció

REN – Renin; Renin

SD - Standard deviation; Standard deviáció

SOD2 - Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial; Szuperoxid-dizmutáz [Mn], mitokondriális

SPON2 - Spondin-2; Spondin-2

STAM - Signal transferring adapter molecule; Jelátvivő adapter molekula

TBUT - Traditional tear film break-up time, Hagyományos könnyfilm felszakadási idő

TFOS-DEWS - Tear Film & Ocular Surface Dry Eye Work Shop

TGF-beta-1 - Transforming growth factor beta-1; Transzformáló növekedési faktor béta-1

THPO – Thrombopoietin; Trombopoetin

TNF - Tumor necrosis factor; Tumor nekrosis faktor

TNFRSF10A - Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10A; Tumor nekrosis faktor receptor szupercsalad 10A tagja

TNFRSF11A - Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11A; Tumor nekrosis faktor receptor szupercsalad 11A tagja

TNFSF14 - Tumor necrosis factor ligand superfamily member 14 - Tumor nekrosis faktor ligand szupercsalad 14. tagja

TNF α - TNF-alfa, Tumor nekrosis faktor alfa

UGGT1 - UDP-Glucose Glycoprotein Glucosyltransferase 1; UDP-glukoz glikoprotein glukozil-traszeraz 1

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

1.1. A könnyfilm

A stabil preokuláris könnyfilm az egészséges szem egyik jellemzője, ez képezi a látórendszerbe bejutó fény elsődleges törőfelületét [1], valamint védi és hidrálja a szaruhártyát [2, 3]. A könnyfilmnek három rétegét – két fázisát - különböztetjük meg [4]: a szemfelszínt borító mucinréteg csökkenti a hámsejtek feltételezett hidrofób jellegét, a vizes réteg lubrikálja a szemfelszínt, tápanyaggal látja el és antibakteriális hatású, a lipidrétteg megakadályozza a könnyfilm evaporációját [5].

A szem nyitott állapotában a könnyfilm három terület között oszlik meg, a fornikus területben -amely magába foglalja a fornixot és a retrotarzális teret-, a könnymeniszkuszokban és preokulárisan. A preokuláris könnyfilm az a teljes könnykomponens, ami a szem szabad felszínén terül el [6]. A corneális és conjunctivális epitélisejtek apikális felszínén olyan transzmembrán mucinok találhatók, melyek a víz adhesiózás feszültségét növelve segítik a könny szemfelszínén való terjedését [7]. A szemhéjak záródása biztosítja a könny egyenletes eloszlását és a könnyelvezető csatornába jutását [8].

Termelés szempontjából négy könnytermelési formát különböztettek meg: a bazális/alap szekréciót, amit "nyitott-szemű" könnyfilmnek is nevezhetünk, állandó köpenyként vonja be a szemfelszínt. Száraz szem szindróma (DED) esetén a bazális szekréció zavart szenved. A reflexes szekréció a szemfelszín ingerlésére (pl. hagymapára) vagy a neuronális reflexív ingerlésére (pl. tüszőszűrés követve) termelődik. Az érzelmi könnyek is stimulációra termelődnek, azonban ebben az esetben érzelmi stimuláció hatására. Zárt szemhéj során "zárt-szemű" könnytermelésről beszélhetünk, mely pl. alvás során termelődik, gyűjtése közvetlenül ébredéskor lehetséges [9].

Az oxigén, a metabolitok és az elektrolitok mellett a könnyfilm antimikrobiális peptideket, fehérjéket és oldható immunglobulinokat tartalmaz, amelyek védik a szemfelszínt a fertőzésektől. A könnyet, mint testfolyadékot, széles körben vizsgálják a szembetegségek diagnosztizálására [10]. A könny teljes fehérjekoncentrációja körülbelül 10 mg/ml, ami hozzávetőlegesen hétszer kisebb mint a vérsérumban lévő fehérjéké [11]. A könnyben

található fehérjék, kis szerves molekulák, metabolitok, elektrolitok és lipidek potenciális biomarkerek lehetnek szemészeti és szisztémás betegségekben is [12–14].

1.2. A könny képalkotó vizsgálata

A könnyfilm szerkezetének feltárására az irodalomban különféle módszerekkel találkozhatunk, a hagyományos, fluoreszceinnel festett könnyfilm felszakadási idő (TBUT) és a Schirmer teszt alkalmazásától [15], a fluoreszceinnel festett szemfelszín rotátoros Scheimpflug képalkotó vizsgálatán át (Pentacam, Oculus, Németország) [16] a szimultán fluoreszceinnel festett szemfelszín videós felvételéig, melyet a könnyfilm lipid rétegének képalkotó vizsgálatával kombinálhatnak [17].

A könnyfilm lipid rétegét elsősorban a Meibom mirigyek szekretálják, mely minden pislogáskor a felületi feszültségnek megfelelően kerül a könnyfilmre fontos szerepet játszva a könnyfilm stabilitásában [18]. A pislogások között a könnyfilm elvékonyodása -mely leginkább az evaporáció eredménye [19]-, több különböző vizsgálattal is megfigyelhető [20]. A Meibom-mirigy diszfunkciójának gyanúja esetén meibográfia (Meib) végezhető, azonban a megfelelő diagnózis felállításához további vizsgálatokra (pl. interferometria) és ezek együttes értékelésére lehet szükség [21]. A különböző pontozási skálák, mint például a meiboscore, praktikusak és megbízhatóan használhatóak a klinikai gyakorlatban a magas ismételhetőség miatt [22]. A meibográfia hagyományos technikája a szemhéjak belső oldalának féhérfény-átvilágítása és fekete-fehér film, infravörös film vagy közeli infravörös töltéscsatolt eszköz (CCD) videokamera alapján történő képalkotása. A technológiai fejlődés megkönnyítette a meibográfiát a számítógépekhez csatlakoztatott, korszerűbb, LED (fénykibocsátó dióda) alapú, multifunkcionális eszközök használatával [21].

A lipidréteg interferometriai (INT) technikákkal vizsgálható [23]. Az interferenciaképek színét és fényességét elemezve a lipidréteg vastagságát kapjuk meg, mely 15 nm és 157 nm között van, átlagosan 42 nm [23]. Nemrégiben új eszközöket fejlesztettek ki az INT mérésére, pl. Tearscope Plus[®]; TearScience[®]; LipiView[®]. A Tearscope Plus[®] szélessávú megvilágítással képezi le a könnyfilm lipidrétegének dinamikáját [18, 24]. A LipiView[®] (TearScience Inc., Morrisville, NC) a szemfelszíni interferométer segítségével kiváló színmegjelenítést és képminőséget nyújt és potenciálisan előnyös eszköz lehet a klinikai gyakorlatban [18, 25].

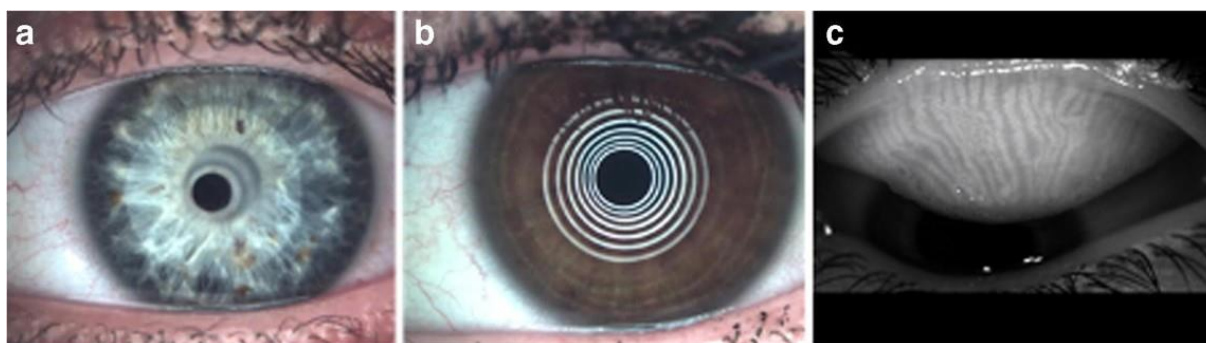
Goto és mtsai. algoritmust generáltak a DR-1 α könny interferencia kamerához (Kowa, Nagoya, Japán) a lipidréteg vastagságának mérésére [26, 27]. A laterális nyíráson (lateral shearing) alapuló interferométer is alkalmazható kutatási célokra, mely gyors Fourier-transzformációt alkalmaz a könnyfilm felületi egyenetlenségeinek elemzésére [21].

A könnysekreációs rátával egyenesen arányos az alsó könnymeniszkusz magasság (LTMH) [28]. Az LTMH mérése kvantitatív értékelést ad a könny vizes fázisáról. A könnytartalom többségét a meniszkuszok tartalmazzák, amely a felső és az alsó szemhéj azon peremrésze ami találkozik a bulbáris conjunctivával [29]. Ez a leginkább direkt eljárás a könnyfilm térfogatának vizsgálatára [30, 31]. Az LTMH előnye, hogy a könnymeniszkusz az alsó szemhéj felett könnyen látható, ezáltal vizsgálható. Az LTMH mérésének hagyományos módja egy mikrométeres skálával ellátott réslámpás vizsgálat; illetve réslámpával készített elülső szegmentum fényképeken történő objektív elemzés. Az LTMH mérésének további módszerei közé tartozik az optikai koherencia tomográfia (OCT), a fundus kamera és a Tearscope® (Keeler, Windsor, Egyesült Királyság). Az OCT egy képalkotó módszer, amely a szövetekből visszavert fény mennyiségén alapul. A funduskamera képeket készít a szem elülső felületéről [32]. A Tearscope® készülék fehérreflex visszaverődéses módszerrel készít fényképeket, melyeket szakemberek elemeznek [33].

A könnyfilm stabilitását a könnyfilm- felszakadási idővel mérjük (BUT). Bár a non-invazív könnyfilm felszakadási időt (NIBUT) egyre szélesebb körben alkalmazzák, a TBUT továbbra is a leggyakrabban alkalmazott teszt [21]. A TBUT kivitelezése nem bonyolult, azonban a kiértékelése nem egyszerű a teszt kivitelezésének számos variációja miatt [34]. Az ismételhetőség javítása céljából számos megközelítés javasolt, úgymint a többszöri mérés átlagolása, a felhasznált fluoreszcein mennyiségének minimalizálása vagy a festés teljes elhagyása [24]. Ez utóbbi megközelítés vezetett a NIBUT-hoz. A NIBUT sokféleképpen mérhető. A megvilágított rácsminta könnyfilmről való visszaverődésének megfigyelése alkalmazható a NIBUT mérésére, azonban a torzulás első jelének értékelése továbbra is szubjektív lehet. A modernebb megoldások magukban foglalják a Placido korong-elvű képelemzést bizonyos típusú szaruhártya topográfiai rendszerekkel. Automatizált értékelési technikák is elérhetők a könnyfilm-stabilitás vizsgálatára, pl. a Keratograph (Oculus, Wetzlar, Németország). Ez az eszköz nagysebességű videokeratoszkópiával érzékeli és lokalizálja a könnyfilm-felszakadásának idejét, megbecsülve a kép közepétől sugárirányban észlelt gyűrűk

szórását. Downie és munkatársai az E300 Corneal Topographer (Medmont International Pty Ltd., Victoria, Ausztrália) felhasználásával a könnyfilm felületének minőségi felszakadási idő mérését olyan algoritmussal értékelik, amely excesszív mozgással távolítja el a képeket és érzékeli a szempillák miatt megjelenő árnyékokat [21, 35].

Az újdonságnak számító LacryDiag® (Quantel Medical, Franciaország) nevű eszköz számos nem-kontakt vizsgálattal diagnosztizálhatja a DED-t, például az LTMH, a felső (MeibS) és az alsó (MeibI) szemhéj meibográfiája, az INT és a NIBUT (**1. ábra**). Az eszköztárában szerepel még számos más lehetőség, amely kiegészítő vizsgálatként szolgálhat, pl. blepharitis és demodex képalkotás, kötőhártya-vörösség, festés (szaruhártya, kötőhártya és szemhéjszél), pupillometria, white-to-white mérés és cornea topográfia. A műszer nyújtotta vizsgálati lehetőségek a "Betegek és módszerek" fejezetben kerülnek részletesen ismertetésre.



1. Ábra Interferometria, alsó könnymeniszkusz magasság (a), nem-invazív könnyfilm felszakadási idő (b) és felső szemhéj meibográfia (c) LacryDiag® műszerrel [36].

Száraz szem szindróma

A DED egy világszerte előforduló gyakori szemészeti betegség, a szem felszínének krónikus, többtényezős eltérése. A rendellenesség kapcsán nem képződik jó minőségű vagy elegendő mennyiségű könny a szem hidratálásához. A DED a következő kategóriákba sorolható: csökkent könnytermeléssel járó száraz szem (vízhiányos) és a könnyfilm fokozott elpárolgásával járó száraz szem, amelyet hiperevaporatív típusként ismerünk. A betegek 10%-ának van vízhiányos DED-je, és több, mint 80%-uk szenved a Meibom mirigy diszfunkcióhoz (MGD) kapcsolódó hiperevaporatív típusban, vagy a kettő kombinációjában [37–39]. A betegség jellemzője a könnyfilm instabilitása, hiperozmolaritása, gyulladása és a szemfelszín következményes károsodása. A 2017. évi Tear Film & Ocular Surface Dry Eye Work Shop (TFOS

- DEWS) II a következőképp definiálta a DED-et: „A száraz szem olyan multifaktoriális szemfelszíni betegség, amelyet a könnyfilm homeosztázisának elvesztése jellemez szemszervi tünetekkel társulva, amelyben a könnyfilm instabilitása és hiperozmolaritása, gyulladás és szemfelszíni elváltozások, valamint neuroszenzoros rendellenességek játszanak etiológiai szerepet” [40]. A felnőtt népesség globális prevalenciája az Egyesült Államokban 5-7%, míg a Távol-Keleten és Afrikában 30-50% [41]. Az európai prevalencia a spektrum közepén helyezkedik el [30, 42–44]. A száraz szem egyidejűleg fellépő tünetei (vörösség, égő érzés, fényérzékenység és túlzott könnyezés) a betegek szemészeti szakemberhez fordulásának egyik leggyakoribb okai. A betegség leginkább a középkorú és az idősebb korosztályt érinti, de az előfordulás növekszik a fiatalok körében is [31, 40, 45]. Ennek következtében a látásélesség csökkenhet, a szubjektív életminőség és a munkahelyi produktivitás is csökken [31, 46]. Ezen fenti okok miatt kulcsfontosságú, hogy a szemészek megbízható diagnosztikai módszerek segítségével ismerjék fel a DED jeleit, valamint a betegkövetés során monitorozni tudják a célzott terápia hatásosságát.

1.3. A könny proteomikai vizsgálata

Műszeres vizsgálatok

A modern proteomikai technikák [nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) és tömegspektrometriás vizsgálatok] érzékenysége több mint 1500 fehérje azonosítását tette lehetővé [47]. Ezen fehérjék csoportosíthatók a szérumban is detektálható fehérjékre; csak a könnyben lévő fehérjékre; valamint a könnyben és epitél sejtekben is azonosítható fehérjékre [48]. A tömegspektrometrián alapuló proteomika fejlődése hatalmas lehetőségeket nyitott meg a fehérjék útvonalainak, kölcsönhatásainak, molekuláris struktúráinak és aktivitásainak, valamint az élő rendszerekben zajló számos biológiai folyamatnak a megértésére [49, 50].

A HPLC és a gélpermeációs oszlop (GPC) kombinációja a fehérjéket molekulatömegük alapján különíti el [51, 52]. Lin és mtsai nevéhez fűződik a Raman-alapú diagnosztikai technika kidolgozása, mely során a szaruhártya-fekély vizsgálata szemészeti folyadékok elemzésével történik. A Raman-spektroszkópia jól bevált technika a molekuláris ujjlenyomatok meghatározására különböző területeken. A Raman-spektroszkópia továbbfejlesztett

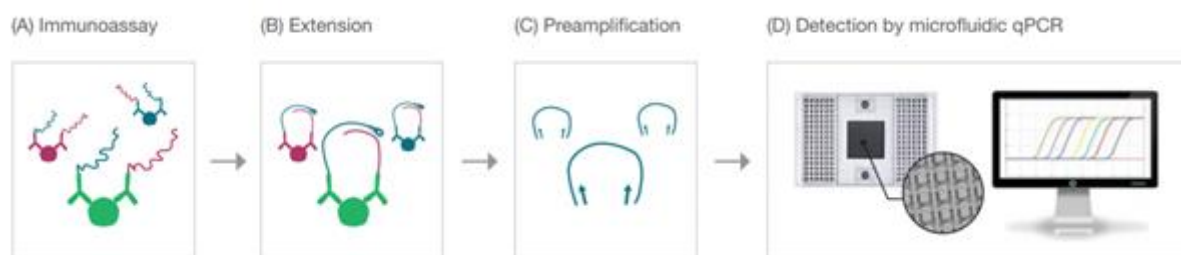
változata, a felületi megerősített Raman-spektroszkópia képes rendkívül kis mennyiségű molekulák kimutatására, akár egy-molekulaszinten is [53–55].

A tömegspektrometriás vizsgálatok nemcsak a könnyű átfogó jellemzését teszik lehetővé hatékonyan, hanem az adatgyűjtés multiplex jellege miatt betekintést nyújthat a biológiai válaszok kulcsfontosságú mediátoraiba és a szemfelszín állapotába is [56]. A nanoméretű folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria (nanoLC-MS) fejlődése, amely a magasabb dinamikai tartománynak és szenzitivitásnak köszönhetően lehetővé teszi a több, mint 1000 fehérje azonosítását, tovább könnyíti a biomarkerek kutatásának lehetőségét [57]. A biomarker megkönnyítheti a diagnózis megállapítását, a prognózis becslését, az utánkövetést, valamint segítheti az új terápiák kifejlesztését is [6]. A kvalitatív proteomikát - mely a fehérje mintában való jelenlétét azonosította - a proteomikai platformok poszttranszlációs módosítások mérésére szolgáló mérőműszerek kifejlesztésével felváltotta a kvantitatív proteomika [58]. A proteomika fejlődésével parallel újultak meg a számítógépes interfészek, beleértve az adatbázisokat, az adatfeldolgozó algoritmusokat és a nagy proteom-adathalmazok adatelemzését [59].

Egyazon mintában több fehérje vizsgálatához multiplex módszerekre van szükség. Ezen módszerek alapulhatnak tömegspektrometrián, immunológiai detektáláson vagy különböző módszerek kombinációján. Az immunológiai detektálás a legtöbb esetben érzékenyebb a tömegspektrometriához képest, de a tömegspektrometria dinamikai tartománya általában meghaladja az immunológiai módszerekkel elérhető, ráadásul ez az egyetlen torzításmentes módszer [60].

A kombinált módszereket alkalmazó megközelítések közé tartozik az antitest-alapú kimutatás és a kvantitatív polimeráz láncreakció (qPCR) kombinációja. A proximity extension assay (PEA) során egy oligonukleotiddal jelölt antitestpár ("szondák") kötődhet a mintában lévő célfehérjéhez. Amikor a két szonda közel kerül egymáshoz, az oligonukleotidok hibridizálódnak. A DNS-polimerizációs esemény révén új PCR célszekvencia jön létre, amely lehetővé teszi a fehérje-specifikus oligonukleotid-szekvenciák mennyiségi meghatározását qPCR segítségével (**2. ábra**). Az eredményeket normalizált expressziós egységekben (NPX) adják meg, amely így lehetővé teszi a fehérjék relatív mennyiségi meghatározását [61]. Ez a módszer két, külön-külön nagy teljesítményű elemzési technika kombinálásával lehetővé teszi több fehérje relatív mennyiségi meghatározását nagyon kis mennyiségű (1µl) minta esetén,

hatékony eszközt biztosítva a kis térfogatban rendelkezésre álló testfolyadékok elemzéséhez [62–64].



2. Ábra Az Olink (Uppsala, Svédország) proximity extension assay technológiájának vázlata. A: 92, DNS-oligonukleotidokkal jelölt antitestpár kötődik a célantigénhez az oldatban. B: Az egymáshoz közel került oligonukleotidok hibridizálódnak, és DNS-polimerázzal meghosszabbodnak. C: Ez az újonnan létrehozott DNS-vonalkód darab PCR segítségével amplifikálódik. D: Az egyes DNS-vonalkódok mikrofluidikus qPCR-rel detektálódnak. [65] qPCR: Kvantitatív polimeráz láncreakció

Könnyminta vételi módszerek

A könny minél pontosabb biokémiai vizsgálatához elengedhetetlen a könnyminta gyűjtés módszerének megfelelő kivitelezése is. A különböző könnyminta vételi eljárások befolyásolhatják a könnyminta minőségét, így a proteomikai elemzés eredményét is [66]. A könny gyűjtése különböző módszerekkel kivitelezhető: Schirmer csíkokkal, üvegapillárisal vagy cellulóz szivacsokkal [67–69]. Irodalmi adatok alapján a Schirmer csíkkal, valamint az üvegapillárisal végzett mintavételt alkalmazzák leginkább [70]. A különböző mintavételi eljárások előnyei és hátrányai ismeretében javasolt a megfelelő módszer kiválasztása és alkalmazása [71].

A Schirmer tesztnél alkalmazott papírcsíkkal az alsó kötőhártya áthajlásba helyezve történik a könnyminta vétel. Ezt követően pufferoldatban inkubálással oldhatóak ki a fehérjék és a metabolitok [72]. A cellulóz szivaccsal történő mintavételhez képest, ezzel a módszerrel az interleukinok (IL) nagyobb mértékű kinyerése valósítható meg [73]. Bár a módszer használata egyszerű elérhetőségéből adódóan kézenfekvőnek tűnhet, a mintavétel során előforduló lehetséges irritációt követő reflexes könnyezés a minta nem kívánt dilúcióját okozhatja [74].

A cellulóz szivacsok meghatározott időtartam alatt (általában 1 perc), az alsó kötőhártya zsákba helyezve gyűjtik össze a könnymintát. Nagy hatékonyságának köszönhetően ez a módszer alacsony könnytermelésű páciensek esetében is alkalmas a

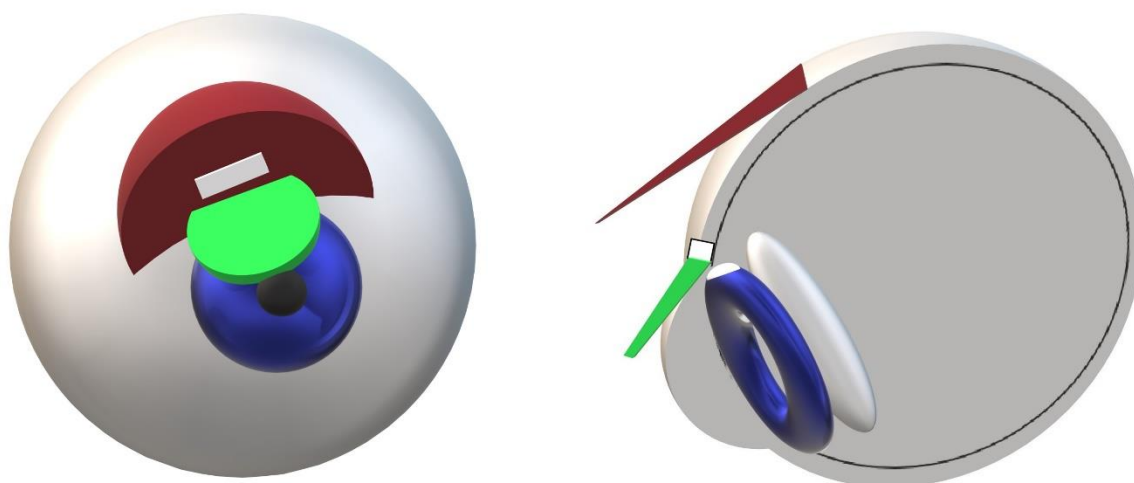
könnymintavételre, nem jár irritációval és jól tolerálható [75]. A különböző szivacs típusok és extrakciós pufferek alkalmazásával azonban a vizsgálatok direkt összehasonlítása nehezített, valamint néhány citokin mérése a szivacshoz történő szoros kötődése miatt nehezebbé válik [76–78].

Az üveg kapilláriscső általi mintavétel a szem temporális alsó meniszkuszából történik, mely időigényes és precíz folyamat eredménye. Helytelen mintavétel során reflexes könnyezés váltható ki, és nem mindig kivitelezhető a klinikai gyakorlatban [76]. A gyűjthető mennyiség korlátozott volta miatt (5-10 µl) [79] szükség lehet a minták csoportszinten történő elegyítésére ('pool'-ozására), mellyel az egyéni jellemzők meghatározásának lehetősége elvész [80].

Sebgyógyulási folyamatok glaukómában

A glaukóma Nyugat-Európában a visszafordíthatatlan vakság második fő oka az időskori makula degeneráció után [81], becslések szerint globális előfordulási gyakorisága a 40-80 év közötti felnőttek körében 3,54% [82]. Az előrejelzések szerint 2040-re a glaukómában szenvedők száma világszerte 111,8 millióra nő, mely aránytalanul nagy mértékben érinti az ázsiai és az afrikai populációt [82]. A betegség főbb kockázati tényezői: az idősödő populáció növekvő életkora, az emelkedett intraokuláris nyomás (IOP), a gyulladás, a nagyfokú rövidlátás és a pozitív családi anamnézis [81, 83]. Tekintettel arra, hogy a betegség pontos patogenezisének megismerése napjainkban is számos kutatás alapját képezi [84], a glaukóma progressziójának megelőzésére az egyetlen hatásosnak bizonyult és általánosan elfogadott kezelési forma a szemnyomás csökkentése, mely történhet gyógyszerekkel, lézeres beavatkozással vagy műtéti úton [81]. A kezelési irányelvek figyelembevétele mellett minden beteget individuálisan kell kezelni.

A trabekulektómia egy olyan műtéti eljárás, mely során a trabekuláris hálózat egy részének eltávolításával mesterséges csatornát képzünk az elülső csarnok és a szubkonjunktivális tér között, ami az IOP csökkenését eredményezheti (**3. ábra**).



3. Ábra A trabekulektómia sémás ábrája.

A trabekulektómia hosszútávú eredményét nagymértékben befolyásolja a szövetek sebgyógyulási képessége; a fokozott episclerális hegesezés jelenti a műtét sikertelenségének egyik legnagyobb kockázatát [85, 86]. A sebgyógyulási zavar megértéséhez, esetleges klinikai modulálásához ismerni kell a gyulladásos válasz folyamatát. A sebgyógyulási folyamat egy szorosan összefüggő jól szervezett kaszkád, melyben a kezdeti koagulációs és inflammatórikus fázist proliferációs és helyreállító (remodelling) fázis követ [87]. A sérült sejtekből felszabaduló adenosin-trifoszfát (ATP) a sérülést követően aktiválódó molekuláris mintázatokkal apoptózist, valamint "toll-like" receptor szignálút vonalat indukál, mely hatására proinflatmatórikus citokinek termelődnek, mint IL-1 α , a β és α tumor nekrozis faktor (TNF α) [88, 89]. Ezen molekulák további citokinek és növekedési faktorok megjelenéséhez vezetnek, lehetővé téve a molekuláris események koordinációját, amely a különböző fázisokra jellemző mind a hám, mind a strómális rétegben. A felszabaduló mátrix metalloproteázok (MMP) hatására az extracelluláris mátrix (ECM) átrendeződik, a fibronektin polimerizálódik, kialakulnak a sejt-sejt kapcsolatok [90, 91]. Ezt követően a bazális membrán kialakítása és a barrierfunkciók helyreállítása történik meg, melyben szerepet játszik a keratinocita növekedési faktor (KGF), az epidermális növekedési faktor (EGF), a trombocita eredetű növekedési faktorok (PDGF), a neurális növekedési faktor (NGF), a transzformáló növekedési faktorok és a különböző citokinek (főképp IL-1, IL-6 és IL-8) [89, 92]. A sebgyógyulás egy lassú

és hosszú, akár egy évig is eltartó remodelációs fázissal zárul, amely normális körülmények között a megfelelő látáshoz szükséges gyógyulással végződik [90, 91, 93]. A folyamat minden lépése sérülhet, ami komplikációkhoz és ezáltal nem megfelelő eredményű sebészeti beavatkozáshoz vezethet. A reepitelizáció jellemzően főként a műtétet követően három-öt napon belül következik be [94, 95], de a szövődmények később, akár hetekkel vagy hónapokkal a beavatkozás után jelentkezhettek. A különböző sebgyógyulási fázisok molekuláris változásainak vizsgálata retrospektív módon, a klinikai gyakorlatban nem invazív módon vett minták vizsgálatával valósítható meg.

2. Célkitűzések

- Kutatásunk célja egy modern könnyfilm képalkotó eszköz megbízhatóságának és klinikai alkalmazhatóságának vizsgálata volt az inter- és intraobszerver különbségek összehasonlításával.
- Vizsgáltuk a hagyományos referencia módszer és a modern diagnosztikai eszköz különbségét a TBUT és a LacryDiag® készülékkel mért NIBUT összehasonlításával.
- A PEA módszer alkalmazásával kvalitatív és kvantitatív könnyanalízist végeztünk nem invazívan gyűjtött könnymintákban.
- A trabekulektómiát követő sebgyógyulási folyamatok pontosabb megértése céljából műtét utáni molekuláris eltérések analízisét végeztük, a lebeny komplikációkra fókuszálva.

3. Betegek és módszerek

3.1. Betegcsoportok

3.1.1. Betegcsoportok a képalkotó vizsgálatban

Tanulmányunkat a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ Szemészeti Klinikáján végeztük. A vizsgálatba bevont 50 egészséges önkéntes (20 férfi és 30 nő) a kutatás ideje alatt,

illetve azt megelőzően nem szenvedett semmilyen általános vagy szemészeti betegségben, nem viseltek kontaktlencsét, valamint nem estek át intraokuláris vagy bármilyen típusú refraktív műtéten. A Helsinki Deklaráció elveinek megfelelően a bevonás előtt minden páciens részletesen tájékoztattunk, majd írásos beleegyezésüket kértük a kutatásba. A kutatás a helyi etikai bizottság jóváhagyásával valósult meg (8362-1/2020).

3.1.2. Betegcsoportok a proteomikai vizsgálatban

A könnymintákat a Debreceni Egyetem Szemklinikáján trabekulektómia műtéten átesett glaukómás betegektől gyűjtöttük. A mintavétel a Helsinki Deklarációnak megfelelően történt, a helyi etikai bizottság jóváhagyásával (4234-2014). A beválogatott 8 beteg (2 férfi és 6 nő) előzetes felvilágosítást követően írásos beleegyezését adta a könnyminta vételbe a trabekulektómia előtt (0. nap), a műtétet követő első napon, második napon, negyedik napon, illetve a posztoperatív harmadik hónapban. Egy esetben 3 hónapos mintavétel helyett 10. hónapos mintavétel történt. A pácienseket retrospektíven két csoportba soroltuk: „szövődményekkel járó” és „szövődménymentes” csoportokba attól függően, volt-e szükség szemnyomás csökkentő szemcsepp alkalmazására a posztoperatív első évben. Három beteg esetében nem értük el a cél IOP értéket a sebészeti beavatkozással, ezért gyógyszeres kiegészítésre volt szükség. A trabekulektómiát követően vizsgálatba bevont betegeknél korai posztoperatív szövődmény nem jelentkezett. Korai posztoperatív szövődménynek a következő eseményeket tartottuk: trabekuláris párna szivárgás, alacsony szemnyomás (hipotónia), vérzés az elülső csarnokban (hiféma), chorioidealis effúzió, vérzés vagy gyulladás (blebitis, endoftalmitisz). Kizárási kritérium volt a különböző autoimmun kórképek megléte, szisztémás gyulladásos állapotok, valamint a glaukómán kívüli egyéb szemfelszíni betegség együttes fennállása.

3.2. Klinikai vizsgálatok

3.2.1. Képalkotó vizsgálat

Átfogó szemészeti vizsgálatot végeztünk: látásélesség mérést követően elülső szegmentum réslámpás vizsgálatot, LacryDiag®-ot (Quantel Medical, Franciaország) és TBUT mérést. A TBUT-t legalább 5 perccel a LacryDiag® vizsgálat után hajtottuk végre [96]. Az eszköz által mért LTMH, MeibS, MeibI, INT és NIBUT paraméterek megfelelnek a TFOS DEWS 2 riport kritériumainak; ezért ezeket a nem-kontakt vizsgálatokat értékeltük tanulmányunkban [97].

A LacryDiag® vizsgálatot és a TBUT mérést ugyanaz a tapasztalt vizsgáló orvos végezte minden beteg esetében. Két független, tapasztalt vizsgáló választotta ki és elemezte az LTMH-t, a MeibS-t, a MeibI-t és az INT-t. A második vizsgáló egy hónappal később újra elemezte az adatokat [98]. A vizsgálat körülbelül 10 percet vett igénybe, és egyik páciens sem panaszkodott fájdalomról, kényelmetlenségről vagy látászavarról.

A LacryDiag® készülékkel az LTMH mérése félautomata módon történik. A vizsgálat során a vizsgáló kaliperrel méri az alsó meniszkuszban összegyűlt könny magasságát. Elemzésünkhöz öt mérés átlagát használtuk.

A Meib során a LacryDiag® készülék a Meibom-mirigyek infravörös leképezését és képelemzését alkalmazza, automatikus határfelismeréssel és szükség esetén manuális korrekciókkal. A technika a kifordított szemhéj fehér fény-átvilágításán alapul [21]. A félautomata módszer során a műszer meghatározza a mirigy veszteség százalékos értékét, miután a vizsgáló manuálisan jelöli ki a vizsgálandó területet.

Az INT a lipidrétteg kvalitatív és kvantitatív elemzését jelenti. Ezzel a módszerrel a vizes fázis felszínén vékony rétegben kiterjedő olajos fázis mutatható ki [21]. Az olajos fázis kinetikája és reflexiós mintázata alapján értékelhető a lipidrétteg vastagsága. A könnyfilm ezen rétegét többnyire a Meibom-mirigyek termelik [99]. A műszer lehetővé teszi a páciens szemfelszínéről készített videófelvételének referencia videókkal való összehasonlítását (7 előre elkészített videófelvétel).

A NIBUT a könnyfilm stabilitását az evaporáció mértéke alapján határozza meg. Alapja a szemfelszínre vetített minta tükröződésének megfigyelése [100]. A NIBUT szoftver automatikusan észleli a pislogást, rögzíti a két pislogás közti intervallumot és kiszámolja a NIBUT értékét. A vizsgáló teendője a felvétel megkezdésére és leállítására korlátozódik és osztályozási feladattal sem jár. A kézikönyv szerint, ha a pislogások közti intervallum eléri a 12 másodpercet, a felvételt le kell állítani. A statisztikai elemzéshez ordinális skálát alkalmaztunk a statisztikai torzítás csökkentése céljából. A két módszer összehasonlítása során a NIBUT és a TBUT ordinális skála cut-off értékének szakirodalom alapján 10 másodpercet határoztunk meg [101–106], azonban a NIBUT-nél 12, a TBUT-nél pedig 8 másodperces cut-off érték jobb diagnosztikai képességet mutatott [102], ezért mindkét cut-off értékkel elvégeztük a statisztikai számítást.

3.2.2. Proteomikai vizsgálat

3.2.2.1. Könnymintavétel

A nem invazív könnygyűjtés steril üvegkapilláris csövekkel (VWR Ltd. Radnor, PA, USA) történt 2 percen keresztül az oldalsó alsó meniszkusból, helyi érzéstelenítés és stimuláció alkalmazása nélkül [107]. Centrifugálást követően (4°C-on 2,4xg-vel 10 perc) a felülúszókat öt µl-es részekre osztottuk, mélyhűtöttük és -70°C-on tároltuk az elemzésig. A könnyminta vételt követően szemészeti vizsgálat történt (látásélesség vizsgálat, szemnyomás mérés, elülső és hátulsó szegmentum réslámpás vizsgálata).

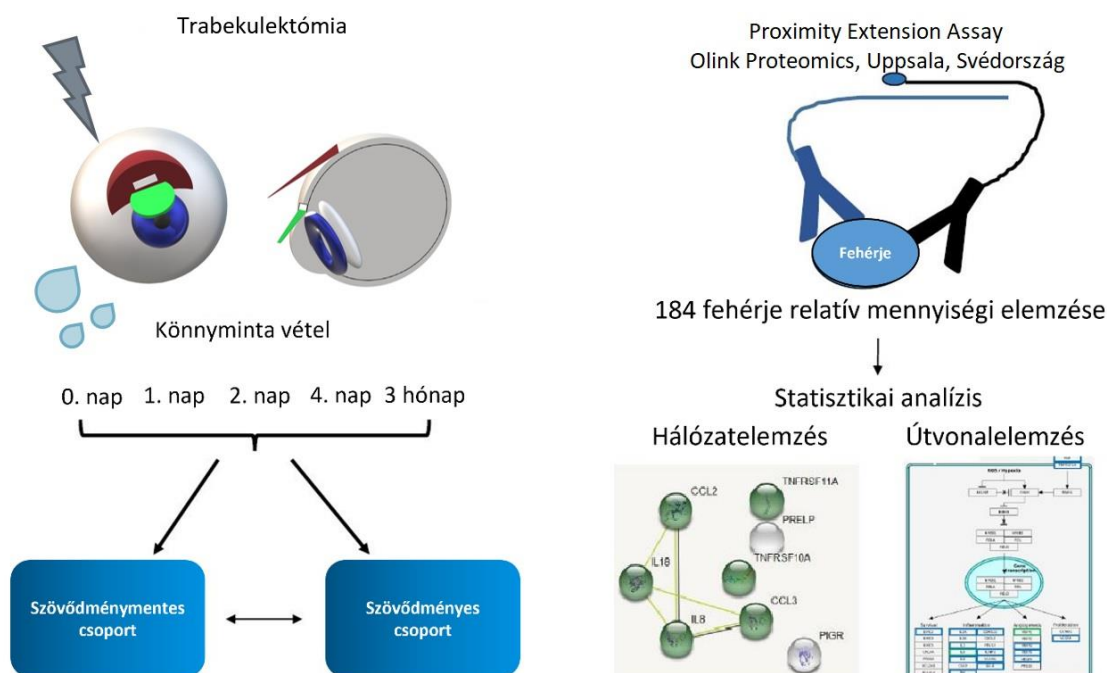
3.2.2.2. Fehérjék relatív mennyiségi meghatározása Proximity Extension Assay segítségével

A PEA vizsgálatokat az Olink Proteomics (Uppsala, Svédország) végezte. A gyulladásos és kardiovaszkuláris betegségek II (CVD II) panelek felhasználásával összesen 184 fehérje relatív kvantitálása történt meg. Előző kutatásaink alapján választottunk ki a vizsgálni kívánt fehérjéket. Ezek a fehérjék a gyulladásos panelben és a CVD II panelben voltak megtalálhatóak, ezért ezen két panelre esett a választás. Az egyes fehérjékre jellemző értékeket NPX egységekben, az Olink Proteomics által bevezetett relatív fehérje mennyiségi egységben kaptuk meg.

3.2.2.3. Funkcionális elemzés

A minták több mint 30%-ában kimutatott fehérjék hierarchikus klaszterezését a Gene Cluster 3.0 (<http://cluster2.software.informer.com/>) programmal végeztük, valamint hőtérkép elemzést végeztünk a Java TreeView 1.1.6r4 verziójával [108]. A klaszterezés előtt nem végeztünk szűrést vagy kiigazítást az adatokon, a távolság/hasonlósági mértékek a Pearson-féle korreláción alapultak, a klaszterezés pedig teljes kapcsolat elemzéssel történt. A kiválasztott fehérjék hálózatát a String 10.5 programmal rajzoltuk meg alapértelmezett beállítások és közepes szigorúság mellett [109, 110] és a véletlenszerű eloszláshoz képest nagyobb arányban reprezentált, azaz feldúsulást mutató gén ontológiai (GO) funkciókat kiemeltük. A String adatbázis egy könnyen használható eszközt biztosít a fehérje-fehérje kölcsönhatási hálózatok elemzéséhez, és információt ad a fehérjék szerkezetéről és funkciójáról. A statisztikailag szignifikáns változásokkal rendelkező fehérjék esetében Wikipathways kereső funkció segítségével útvonal elemzést végeztünk.

(<https://www.wikipathways.org/index.php/WikiPathways>). Az útvonalak értékelése manuálisan történt. A kutatás módszerét a **4. ábra** foglalja össze.



4. Ábra A könnyminták proteomikai vizsgálatának összefoglalása. A könnymintavételt követően a 184 vizsgált fehérje mennyiségét és gyakoriságát lépésről lépésre történő eljárással vizsgáltuk. Először minőségi elemzést végeztünk, majd mennyiségi elemzés, hőterkép-elemzés, hierarchikus klaszterezés és statisztikai elemzés következett. A szövődményes és a szövődménymentes csoportok között megváltozott gyakoriságú vagy mennyiségű fehérjéket funkcionális elemzésnek vetettük alá.

3.3. Alkalmazott statisztikai módszerek

3.3.1. Képkalkuló vizsgálat

A statisztikai elemzést Intercooled Stata for Windows (13.0 verzió) segítségével végeztük. Minden esetben a jobb szem vizsgálati adatait használtuk fel. Leíró statisztika esetén az átlagot, a szórást (standard deviáció, SD) és az átlag 95% megbízhatósági tartományát (95% MT) adtuk meg. Az LTMH, a MeibS és a MeibI esetében osztályon belüli korrelációs együtthatók (intraclass correlation coefficient - ICC) kiszámítása történt a vizsgálók közötti és egy vizsgáló két elemzése közötti megbízhatóság megbecsülésére. A 0,4 alatti ICC rossz, az ICC 0,4 és 0,59 közötti értéke kielégítő, a 0,6 és 0,74 közötti eredmény jó, valamint 0,75 és 1,0 közötti érték kiváló megbízhatóságot jelez [111]. Az INT, valamint a NIBUT és a TBUT közötti egyetértési mutató értékeléséhez ordinális kategóriájuk miatt súlyozott Cohen féle kappa-

statisztikáját alkalmaztuk. A Cohen féle kappa együttható 0,2 alatti értéke alacsony, 0,21–0,40 kielégítő, 0,41–0,60 mérsékelt, 0,61–0,80 lényeges és 0,81–1,0 szinte tökéletes egyetértési mutatót jelent [112]. Bland-Altman ábrázolást végeztünk a kiértékelések közötti különbségek vizualizálására és meghatároztuk az egyezőség határértékét (limits of agreement, LoA; átlagos különbség $\pm$ a különbség szórásának 1,96-szorosa). Ezen diagramokon a középső vonal jelzi az eszközök közötti átlagos különbséget, a felső és az alsó vonal pedig a 95% -os LoA értékeket [113]. A $p < 0,05$ értéket határoztuk meg statisztikailag szignifikánsnak.

3.3.2. Proteomikai vizsgálat

A két csoportra jellemző átlagos NPX-értékek összehasonlítására nem-parametrikus Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztunk. A statisztikai elemzést az SPSS 25.0 (IBM Inc., USA) programmal végeztük. A műtét sikeressége és/vagy az idő relatív fehérjemennyiségekre gyakorolt hatásának vizsgálatához lineáris kevert modellt és varianciaanalízist (analysis of variance; ANOVA) alkalmaztunk az R program lmerTest funkciójának használatával, melyet az Olink (Svédország) cég végzett el [114]. Az elemzésekbe nyolc különböző betegtől származó könnymintát vontunk be, melyeket öt különböző időpontban vettünk. A 30%-nál kisebb detektálhatóságú fehérjéket eltávolítottuk az elemzésből, így 138 fehérje analízise történt a 184-ből.

Az időpontot és a szövődményeket fix hatásként vettük figyelembe, a vizsgálati alany azonosítóját véletlen hatásként vettük figyelembe. A vizsgálatba bevont betegek alacsony száma miatt a nemek hatását nem vizsgáltuk. A rögzített hatásra vonatkozó p-értékeket a szabadságfokok Satterthwaite-féle közelítésével becsültük és Benjamini-Hochberg módszerrel korrigáltuk [115]. Minden szignifikáns vizsgálat esetében post hoc tesztet végeztünk a populációs átlag és a csoportok közötti páros különbségek becslésére. A post hoc p-értékeket a Tukey-módszerrel számoltuk ki [116].

4. Eredmények

4.1. Képalkotó vizsgálat

A vizsgált ötven egészséges önkéntes leíró adatait az **1. táblázat** tartalmazza. A TBUT mérése során az önkéntesek 15,6%-a 8 másodperc alatt és 28,12%-uk 10 másodperc alatt volt.

A NIBUT mérése során a vizsgált személyek 28,12%-a 10 másodperc alatt, és 75%-uk 12 másodperc alatt volt.

1. Táblázat LacryDiag®-gal végzett vizsgálatok leíró statisztikája [36].

		Könnymeniszkusz magasság (mm)		
		I. vizsgáló	II. vizsgáló 1. mérés	II. vizsgáló 2. mérés
Átlag ± SD		0,19±0,01	0,21±0,01	0,20±0,01
95% MT	Alsó határ	0,17	0,18	0,18
	Felső határ	0,22	0,23	0,22
		Interferometria		
		I. vizsgáló	II. vizsgáló 1. mérés	II. vizsgáló 2. mérés
Átlag ± SD		2,82±0,18	3,04±0,14	2,92±0,16
95% MT	Alsó határ	2,45	2,76	2,59
	Felső határ	3,18	3,32	3,24
		Alsó szemhéj meibográfia (%)		
		I. vizsgáló	II. vizsgáló 1. mérés	II. vizsgáló 2. mérés
Átlag ± SD		18,81±2,00	29,63±1,38	31,43±1,34
95% MT	Alsó határ	14,78	26,90	28,73
	Felső határ	22,85	32,45	34,13
		Felső szemhéj meibográfia (%)		
		I. vizsgáló	II. vizsgáló 1. mérés	II. vizsgáló 2. mérés
Átlag ± SD		6,54±1,30	19,69±1,52	21,41±1,44
95% MT	Alsó határ	3,92	16,62	18,51
	Felső határ	9,17	22,76	24,31

MT: Megbízhatósági tartomány

SD: Standard deviáció

Az LTMH esetében mind az inter- mind az intraobszerver variabilitás kiváló volt (interobszerver ICC = 0,805; intraobszerver ICC = 0,868). Két vizsgáló között a Meibl ICC-érték gyenge volt (Meibl ICC = 0,464), azonban a MeibS ICC-érték jó volt (MeibS ICC = 0,666). A Meibl és a MeibS intraobszerver variabilitása kiváló volt (Meibl ICC = 0,760; MeibS ICC = 0,771) (2.

táblázat). Az LTMH, a Meibl és a MeibS Bland-Altman-féle diagramjai a LoA-értékek nagyfokú variabilitását mutatják a csoportok között (**2. táblázat; 5-7. ábra**).

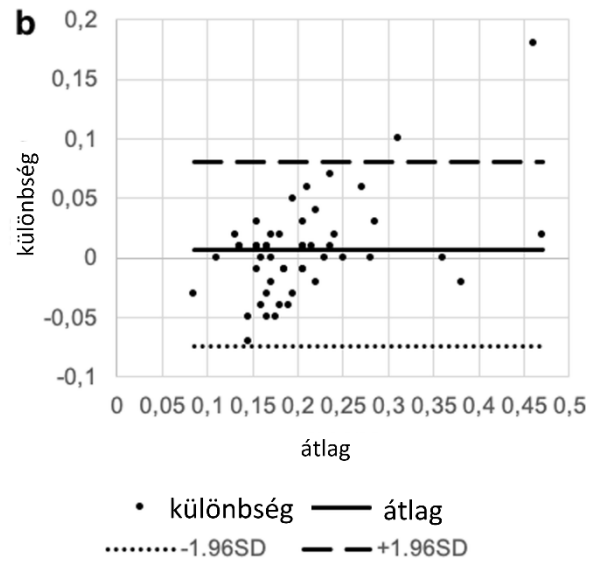
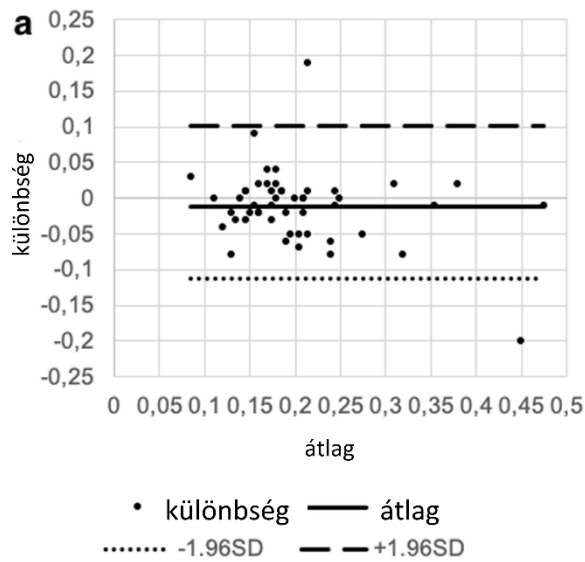
2. Táblázat Inter- és intraobszerver variabilitás az alsó könnyemeniszkusz magasság, az alsó és felső meibográfia vizsgálatánál [36].

Könnymeniszkusz magasság (mm)			
Interobszerver variabilitás	Átlag interobszerver különbség		-0,011
	95% LoA		-0,11–0,101
	ICC		0,805
	95% megbízhatósági tartomány	Alsó határ	0,68
		Felső határ	0,884
	p érték		<0,001
Intraobszerver variabilitás	Átlag intraobszerver különbség		0,006
	95% LoA		-0,07–0,08
	ICC		0,868
	95% megbízhatósági tartomány	Alsó határ	0,778
		Felső határ	0,923
	p érték		<0,001
Alsó szemhéj meibográfia (%)			
Interobszerver variabilitás	Átlag interobszerver különbség		-10,64
	95% LoA		-34,78–24,14
	ICC		0,464
	95% megbízhatósági tartomány	Alsó határ	0,213
		Felső határ	0,658
	p érték		<0,001
Intraobszerver variabilitás	Átlag intraobszerver különbség		-1,72
	95% LoA		-14,40–12,68
	ICC		0,76

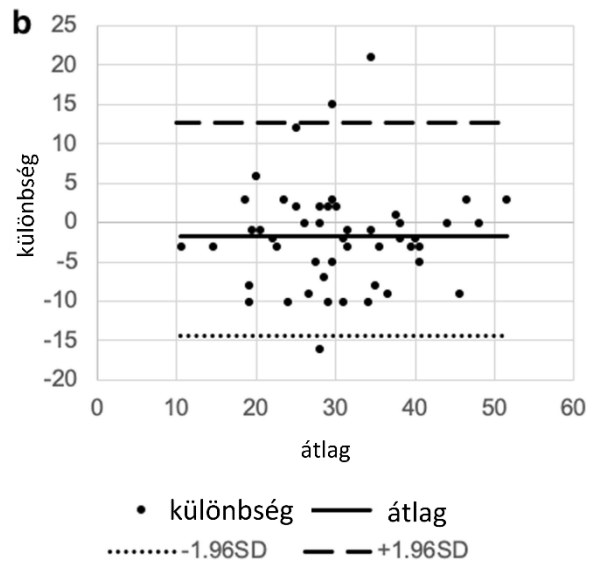
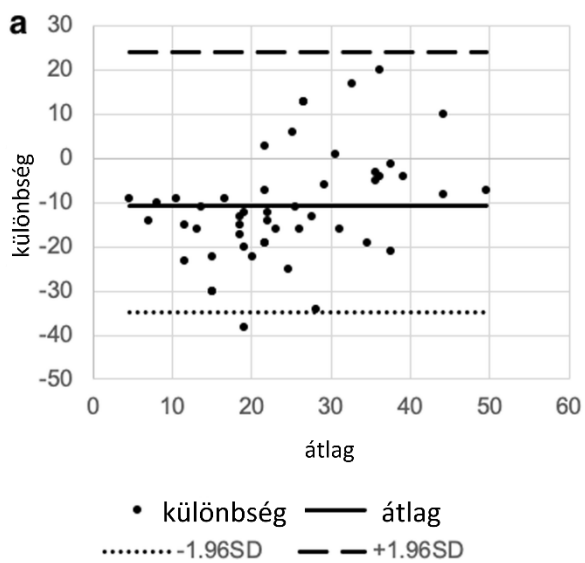
	95% megbízhatósági tartomány	Alsó határ	0,610
		Felső határ	0,857
	p érték		<0,001
Felső szemhéj meibográfia (%)			
Interobszerver variabilitás	Átlag interobszerver különbség		-12,35
	95% LoA		-28,35–16,01
	ICC		0,666
	95% megbízhatósági tartomány	Alsó határ	0,467
		Felső határ	0,800
	p érték		<0,001
Intraobszerver variabilitás	Átlag intraobszerver különbség		-1,61
	95% LoA		-14,40–12,79
	ICC		0,77
	95% megbízhatósági tartomány	Alsó határ	0,622
		Felső határ	0,867
	p érték		<0,001

LoA: Limits of Agreement; egyezőségi határérték

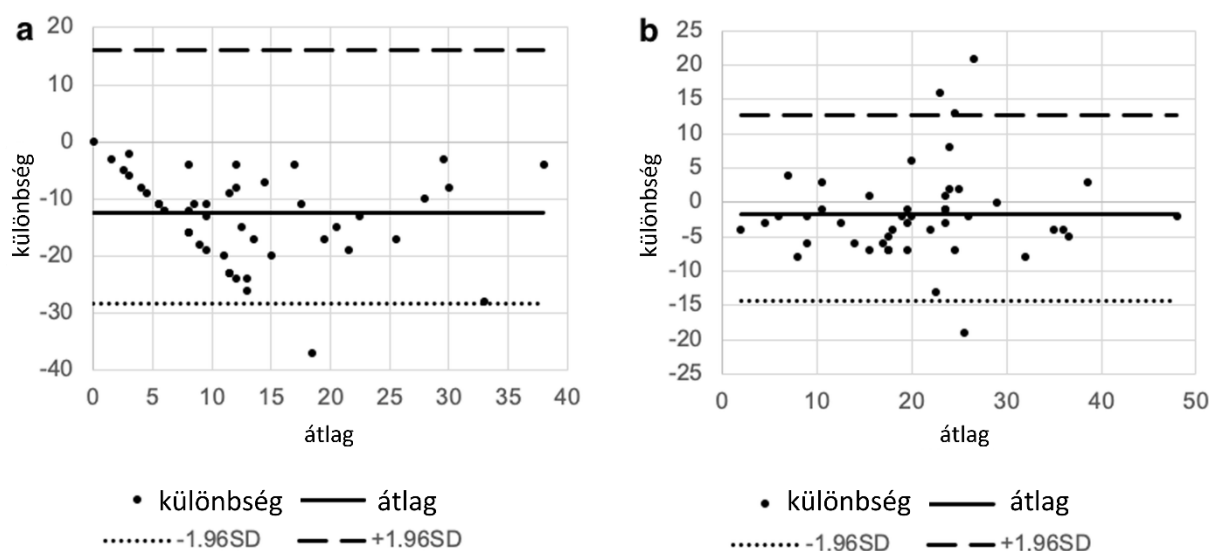
ICC: Intraclass correlation coefficient; osztályon belüli korrelációs együttható



5. Ábra Az alsó könnymeniszkusz magasság mérésének Bland-Altman szerinti ábrázolása két vizsgáló között (a) és egy vizsgáló két mérése (b) között. SD= standard deviáció [36]



6. Ábra Az alsó szemhéj Meibom mirigy veszteség kiértékelésének Bland-Altman szerinti ábrázolása két vizsgáló között (a) és egy vizsgáló két mérése (b) között. SD= standard deviáció [36]



7. Ábra A felső szemhéj Meibom mirigy veszteség kiértékelésének Bland-Altman szerinti ábrázolása két vizsgáló között (a) és egy vizsgáló két mérése (b) között. SD= standard deviáció [36]

A két vizsgáló között, valamint az egy vizsgáló két kiértékelése között az INT kiértékelésének egyetértési mutatója korrekt és mérsékelt volt (INT interobszerver érték = 0,301; $p = 0,0002$; INT intraobszerver értéke = 0,566; $p < 0,001$), azonban az intraobszerver hasonlítás során az egyetértés mutatója magasabb volt (**3. táblázat**). Az INT-hez tartozó Bland-Altman-diagramok a LoA nagyfokú variabilitását mutatják a csoportok között minden paraméter esetében (**3. táblázat; 8.ábra**).

3. Táblázat Inter- és intraobszerver variabilitás interferometria vizsgálat során, a TBUT és NIBUT módszerek összehasonlítása különböző statisztikai szempontok alapján [36].

Interferometria	Interobszerver megbízhatóság	Átlag interobszerver különbség	-0,28
		95% LoA	-2,66 – 2,38
		Kappa koefficiens	0,301
		p érték	0,0002
	Intraobszerver megbízhatóság	Átlag intraobszerver különbség	0,18
		95% LoA	-1,32 – 1,50

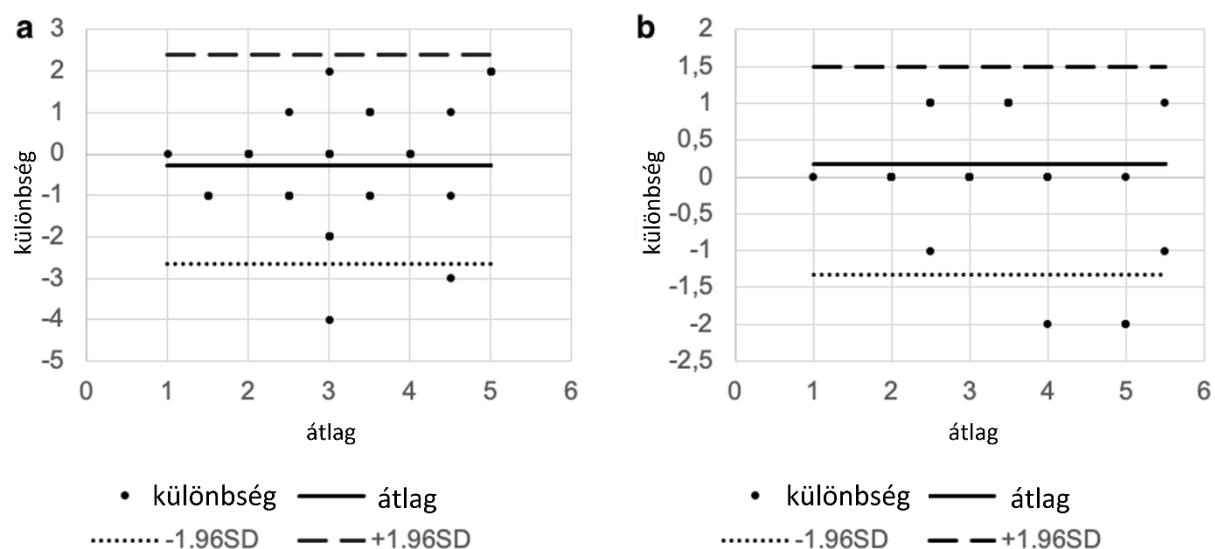
Könnyfilm-felszakadási idő (mp)		Kappa koefficiens	0,566
		p érték	<0,001
	NIBUT cut-off 12 mp, TBUT cut-off 8 mp	Kappa koefficiens	0,075
		p érték	0,099
	NIBUT és TBUT cut-off 10 mp	Kappa koefficiens	0,054
		p érték	0,376

LoA: Limits of Agreement; egyezőségi határérték

NIBUT: non-invasive tear break-up time; nem invazív könnyfilm felszakadási idő

TBUT: Traditional tear break-up time; hagyományos könnyfilm felszakadási idő

mp: másodperc



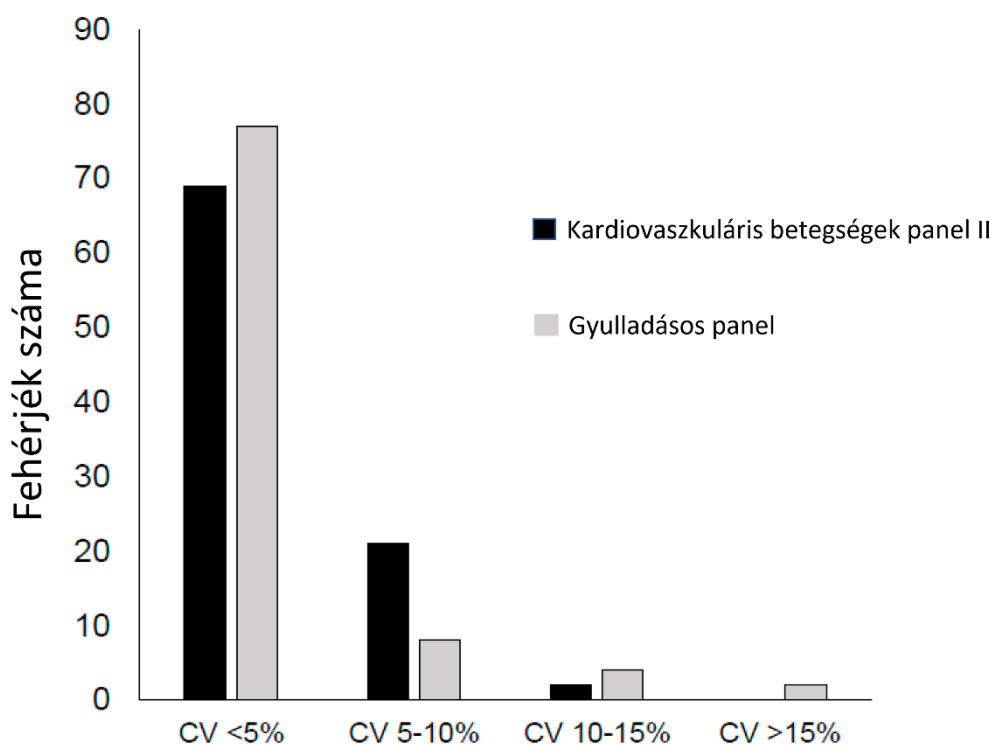
8. Ábra Az interferometria kiértékelésének Bland-Altman szerinti ábrázolása két vizsgáló között (a) és egy vizsgáló két mérése (b) között. SD= standard deviáció [36]

A NIBUT és a TBUT módszerek összehasonlítása során a különböző cut-off értékek esetén csekély volt az egyetértési mutató (NIBUT cut-off 12 mp. TBUT 8 mp: kappa koefficiens = 0,075; p = 0,099; NIBUT és TBUT cut-off 10 mp: kappa koefficiens = 0,054; p = 0,376) (3. táblázat).

4.2. Proteomikai vizsgálat

Könny minta elemzés Proximity Extension Assay módszerrel

A könny mintákat az Olink Proteomics (Uppsala, Svédország) PEA-val elemezte a CVD II és a gyulladásos panelek alkalmazásával. Mindegyik panel 92 fehérjét és négy belső kontrollt tartalmazott, összesen 184 fehérjéről szolgáltatva információt. Az agyból származó neurotrofikus faktor vizsgálatával kapcsolatban technikai probléma adódott, ezért ezen fehérje elemzése nem volt kivitelezhető. Minden egyes mintához belső kontrollokat adtunk a vizsgálat és az egyes minták minőségének ellenőrzésére. A minőségellenőrzést (QC) két lépésben végeztük: i) minden mintalemezt a belső kontrollok SD értéke alapján értékeltünk és csak a minőségellenőrzésen átesett ($SD < 0,2$ NPX) mintalemezek adatait vettük számításba, ii) az egyes minták minőségét a kontrollok medián értékétől való eltéréseivel értékeltük. Azok a minták, amelyek 0,3 NPX-nél kisebb mértékben térnek el a mediántól, átmentek a minőségellenőrzésen. Ez a CVD II esetében 60-ból 55, a gyulladásos panelek esetén 60-ból 57 fehérjét jelentett. A legtöbb fehérjét $<5\%$ -os variációs koefficienssel (CV) lehetett mérni, az intraassay CV jellemzően 4% volt (**9. ábra**). Fentiek alapján a PEA módszer megbízhatósága megfelelőnek és a könny minták vizsgálatára is alkalmazhatónak bizonyult.



9. Ábra Az intraassay variációs koefficiens (CV) eloszlása a gyulladásos és a kardiovaszkuláris betegségek II panel esetén[117].

A fehérjeszint változások vizsgálata trabekulektómia után

A két betegcsoport (szövődményes és szövődménymentes) eredményei között legalább 20% eltérést mutató fehérjéket és ezen fehérjék irodalomban fellelhető funkcióit a **4. táblázatban** jelenítettük meg. Ezt követően a fehérjéket a String hálózatelemző programba vezettük be (**10.ábra**). A szövődményes csoportba tartozó betegek mintáiban kisebb valószínűséggel megjelenő fehérjék hálózata 17 fehérjét tartalmazott. A von-Willebrand faktor hasító proteáz (ADAMTS13), az alfa-1-mikroglobulin/bikunin prekursor (AMBIP), a kemokin (C-C motívum) ligand 3 (CCL3), a CD40 ligand (CD40-L), a CD84 molekula, szénsav anhidráz 5A (CA5A), a 2,4-dienoil-CoA reduktáz 1 (DECR1), az IgG Fc fragmens alacsony affinitású receptora (FCGR2B), a fibroblaszt növekedési faktor 23 (FGF23), a gyomor intrinsic faktor (GIF), a leptin (LEP), a kollagénszerkezetű makrofág receptor (MARCO), a pitvari natriuretikus faktor (BNP/NPPB), a renin (REN), a trombopoetin (THPO), a tumor nekrosis faktor szupercsalád 14-es tagja (TNFSF14) és az UDP -glükóz glikoprotein glükozil-transzferáz 1 (UGGT1) kisebb valószínűséggel található meg a szövődményekkel küzdő betegektől származó mintákban (**10a ábra**). 6 fehérje azonban nagyobb valószínűséggel volt jelen a szövődményes csoportban: az interleukin 17C (IL17C), az interleukin 10 receptor alfa alegység (IL10RA), az interleukin 20

receptor alfa alegység (IL20RA), a 19-es fibroblaszt növekedési faktor (FGF19), az artemin (ARTN) és a tumor nekrosis faktor szupercsalád 11-es tagja (TNFSF11) (10b ábra).

4. Táblázat Eltérő gyakoriságú fehérjék listája a két vizsgált csoport között, biológiai funkciójuk, sebgyógyulásban betöltött szerepük a rendelkezésre álló irodalom alapján. *jelzi a feldúsult GO funkciót #jelzi a String adatbázis által megadott funkciót [117].

Fehérje	Szövődménymentes csoportban a minták %-a	Szövődményekkel járó csoportban minták %-a	A fehérjék mennyiségének változása a szövődménymentes csoporthoz képest	Biológiai funkció	Sebgyógyulásban betöltött szerep
19-es fibroblaszt növekedési faktor	37	64	nő	epesavszintézis szabályozása #	más FGF-ek segítik a sebgyógyulást
2,4-dienoil-CoA reduktáz 1	95	73	csökken	Metabolizmus #	még nem azonosított
23-as fibroblaszt növekedési faktor	89	55	csökken	az immunrendszer folyamatának szabályozása, a mitogén aktivált protein kináz (MAPK) kaskád szabályozása *	más FGF-ek segítik a sebgyógyulást
von-Willebrand faktor hasító proteáz	68	45	csökken	receptor kötődés *	az ADAMTS13 hiánya növeli a neutrofilek extravazációját
AMBP fehérje	84	64	csökken	az immunrendszer folyamatának szabályozása, a MAPK kaskád szabályozása *	Az AMBP hiánya szignifikánsan több patológiásnak tűnő sejthez kapcsolódik a légúti sérülésben
Artemin	47	91	nő	neurotrofikus faktor, a RET receptor ligandja #	elősegíti a sebgyógyulást
C-C motívumos kemokin-3	89	64	csökken	immunrendszeri folyamatok szabályozása, MAPK kaskád szabályozása, citokin-citokin receptor kölcsönhatás, receptor kötődés *	segíti a makrofágok toborzását; csökkent CCL3-szintet figyeltek meg károsodott sebgyógyulásban
CD40 ligand	74	45	csökken	citokin-citokin receptor kölcsönhatás, receptor kötődés *	a CD40-L hiánya túlzott kollagén lerakódáshoz vezet

CD84 molekula	74	27	csökken	az immunsejtek aktiválódásának és differenciálódásának modulációja, a veleszületett és az adaptív immunválasz szabályozása és összekapcsolása #	még nem azonosított
Gyomor intrinsic factor	68	45	csökken	cianokobalamin felszívódása#	még nem azonosított
IgG Fc receptor II-b	47	18	csökken	az immunrendszer folyamatának szabályozása *	még nem azonosított
IL17C	37	64	nő	citokin-citokin receptor kölcsönhatás #	túlzott kifejeződés figyelhető meg pikkelysömörben
Interleukin-10 receptor alegység alfa	5	36	nő	citokin-citokin receptor kölcsönhatás *	elősegíti a myeloid sejtek túlélését
Interleukin-20 receptor alegység alfa	53	82	nő	citokin-citokin receptor kölcsönhatás *	elősegíti a szaruhártya hámszövet gyógyulását
Karbonáтанhidráz 5A	32	0	csökken	Metabolizmus #	a keloid hegekben alacsonyabb szénsav-anhidráz szintet mutattak ki
Leptin	79	36	csökken	immunrendszeri folyamatok szabályozása, MAPK kaskád szabályozása, citokin-citokin receptor kölcsönhatás *	elősegíti a sebgyógyulást
Makrofág receptor	42	9	csökken	az immunrendszer folyamatának szabályozása *	még nem azonosított
Pitvari natriouretikus faktor	47	18	csökken	receptor kötődés *	elősegíti a sebgyógyulást
Renin	84	55	csökken	a MAPK kaskád szabályozása, receptor kötődés *	a körülményektől függően aktiválja vagy gátolja a sebgyógyulást
Trombopoetin	42	0	csökken	immunrendszeri folyamatok szabályozása, MAPK kaskád szabályozása, receptor kötődés *	A THPO receptor agonista enyhe késleltetést okoz a sebgyógyulásban
Tumor nekrosis faktor receptor szupercsaládi tag 11A	16	36	nő	citokin-citokin receptor kölcsönhatás*, sejtproliferáció #	még nem azonosított
Tumor nekrosis faktor szupercsalád 14-es tagja	100	73	csökken	az immunrendszer folyamatainak szabályozása, citokin-citokin receptor kölcsönhatás, receptor kötődés *	a TNFSF14 hiánya elősegíti az immunsejtek felhalmozódását, növeli a citokin szintet, rontja a sebgyógyulást
UDP -glükóz glikoprotein glükózil-transzferáz 1	26	0	csökken	fehérje hajtogatás minőségellenőrzés#	még nem azonosított

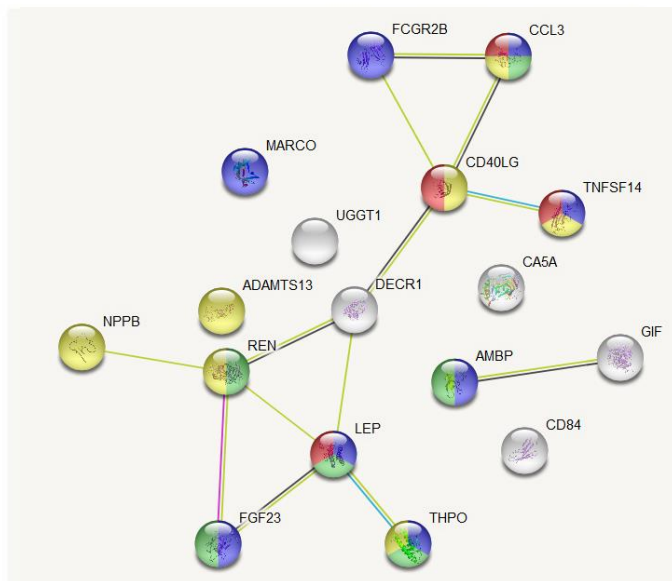
Biological Process (GO)			
pathway ID	pathway description	count in gene set	false discovery rate
GO:0002682	regulation of immune system process	8	0.0187
GO:0043408	regulation of MAPK cascade	6	0.0187

Molecular Function (GO)			
pathway ID	pathway description	count in gene set	false discovery rate
GO:0005102	receptor binding	7	0.0267

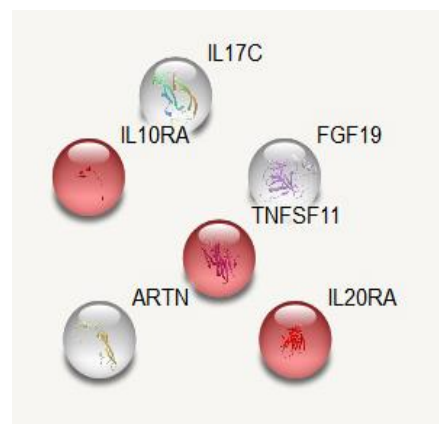
Cellular Component (GO)			
pathway ID	pathway description	count in gene set	false discovery rate
GO:0005615	extracellular space	11	1.4e-07
GO:0044421	extracellular region part	13	2.54e-05
GO:0005576	extracellular region	13	0.00014

KEGG Pathways			
pathway ID	pathway description	count in gene set	false discovery rate
04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	4	0.0118

KEGG Pathways			
pathway ID	pathway description	count in gene set	false discovery rate
04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	3	0.0113



(a)

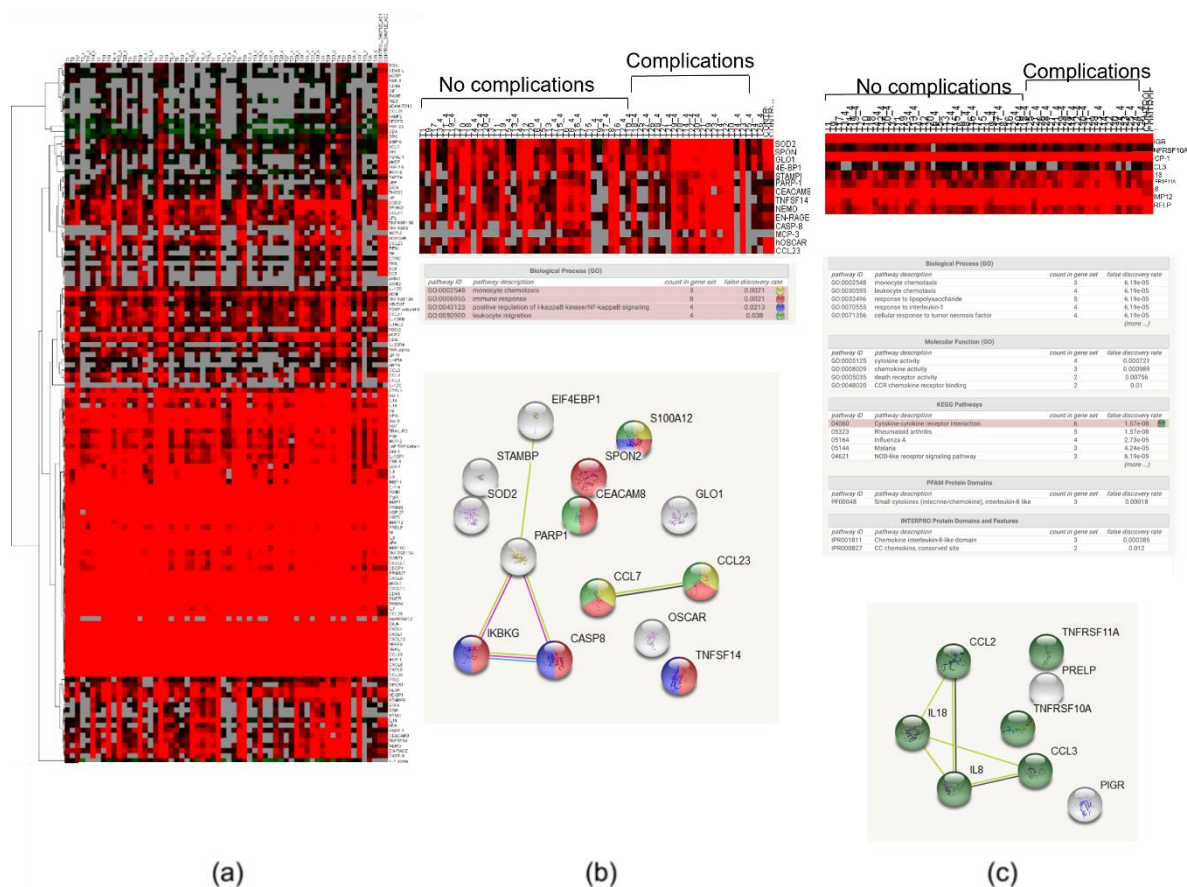


(b)

10. Ábra Különböző gyakoriságú fehérjék megjelenítése String hálózat elemzéssel: fehérjék, melyek kisebb (a), és nagyobb valószínűséggel (b) vannak jelen a szövődményes csoportok mintáiban. Az ábra felső része a String által generált táblázatot mutatja, melyen az útvonal neve, GO kódja, az útvonalhoz tartozó fehérjék száma, és a hamis felfedezési ráta van feltüntetve. Az ábrák alsó részén a String által generált hálózat van feltüntetve, ahol a gömbök egy-egy fehérjét, míg a vonalak a fehérjék közötti kölcsönhatásokat jelölik. A fehérjék színe funkciójukat jelöli: a pirossal színezett fehérjék a citokin-citokin receptor kölcsönhatásban vesznek részt, a kék szín az immunrendszeri folyamatok szabályozásáért felelős fehérjéket, a zölddel színezett fehérjék a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) kaszkád szabályozásában vesznek részt, míg a sárgával színezettek a receptorkötésért felelősek. A fehérjéket génnevükkel ábrázoljuk [117].

ADAMTS13 = von-Willebrand faktor hasító proteáz; AMBP= alfa-1-mikroglobulin/bikunin prekursor; CCL3= kemokin (C-C motívum) ligand 3; CD40-L= CD40 ligand; CD84=CD84 molekula; CA5A= szénsav anhidráz 5A; DEC1=2,4-dienoil-CoA reduktáz 1; FCGR2B= IgG Fc fragmens alacsony affinitású receptora; FGF23=fibroblaszt növekedési faktor 23; GIF= gyomor intrinsic faktor; LEP=leptin; MARCO=kollagénszerkezetű makrofág receptor, BNP/NPPB=pitvari natriuretikus faktor; REN=renin; THPO= trombopoetin (THPO), TNFSF14= tumor nekrosis faktor szupercsalád 14-es tagja; UGGT1=UDP -glükóz glikoprotein glükózil-transzferáz 1; IL17C= interleukin 17C; IL10RA=interleukin 10 receptor alfa alegység; IL20RA=interleukin 20 receptor alfa alegység; FGF19=19-es fibroblaszt növekedési faktor; ARTN= artemin; TNFSF11=tumor nekrosis faktor szupercsalád 11-es tagja

A pontosabb elemzés érdekében a minőségi vizsgálatot mennyiségi elemzés követte. 184 fehérjéből 46 fehérje a minták kevesebb mint 30%-ban volt kimutatható, így ezeket a fehérjéket kizártuk a további statisztikai elemzésekből. A fehérjék relatív mennyiségének változásait hő térképen (11a. ábra) tettük láthatóvá. Az adatok hierarchikus klaszterezése azt mutatta, hogy e fehérje mintázatok alapján a szövődményekkel járó csoport nem különíthető el egyértelműen a szövődménymentes csoporttól. Ugyanakkor 14 fehérje esetében nagyobb mennyiséget lehetett megfigyelni a szövődményekkel járó csoportba tartozó mintákban (11b. ábra): kaszpáz 8 (Casp8), S100A12 fehérje, TNF szupercsalád 14-es tagja (TNFSF14), monocita kemotaktikus fehérje 3 (MCP-3/CCL7), kemokin (C-C motívum) ligand 23 (CCL23), nukleáris faktor kappa-B (NF-kappa-B) esszenciális modulátor (NEMO/IKKBG), karcinoembrionális antigénhez kapcsolódó sejtadhéziós molekula 8 (CEACAM8), spondin 2 (SPON2), szuperoxid-dizmutáz (SOD2), glikoxaláz 1(GLO1) oszteoklaszt-asszociált immunglobulinszerű receptor (OSCAR), poli-ADP ribóz-polimeráz-1 (PARP-1), jelátvivő adapter molekula (STAM) és eukarióta iniciációs faktor (EIF4EBP1).



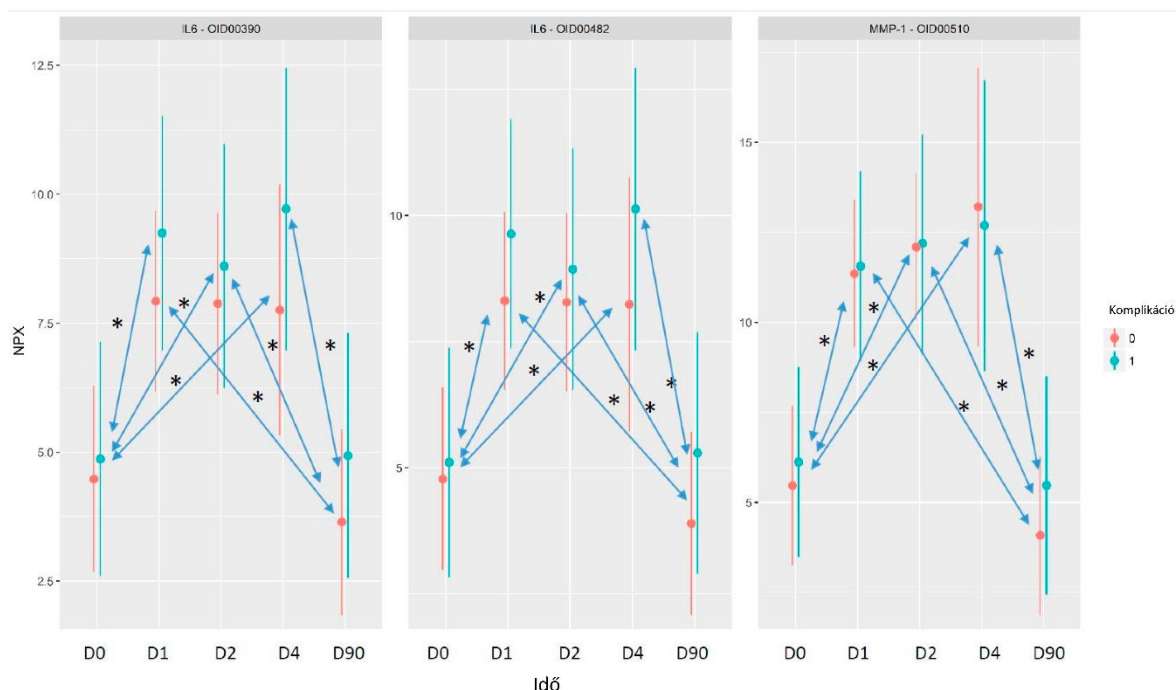
11. Ábra Fehérjék mennyiségi analizisének hő térképe (a); a megnövekedett fehérjék (b) és a statisztikailag szignifikánsan megnövekedett fehérjék (c) mennyiségének String hálózattal történő ábrázolása a szövődményes csoportban. A gömbök egy-egy fehérjét, míg a vonalak a fehérjék közötti kölcsönhatásokat jelölik. A fehérjék színe funkciójukat jelöli: a kék szín az NF-kappa B szignálútban szerepet játszó fehérjéket jelöli, a zölddel színezett fehérjék a leukocita migrációban, a pirossal színezett

fehérjék az immunválasz szabályozásában vesznek részt, míg a sárgával színezettek a monociták kemotaxisáért felelősek. A fehérjéket génnevükkel ábrázoljuk. Megjegyzendő, hogy a b és c panelen ugyanazon fehérje különböző rövidítései (4E-BP1 - EIF4EBP1, EN-RAGE - S100A12, NEMO - IKBKG, MCP-3 - CCL7, MCP-1 - CCL2) a különböző szoftverek által használt különböző fehérjeadatbázisok használatából adódnak.

Casp8=kaspáz 8; S100A12= S100A12 fehérje; TNFSF14= TNF szupercsalád 14-es tagja; MCP-3/CCL7= monocita kemotaktikus fehérje 3; CCL23= kemokin (C-C motívum) ligand 23; NF-kappa-B = nukleáris faktor kappa-B; NEMO/IKKBG esszenciális modulator; CEACAM8= karcinoembrionális antigénhez kapcsolódó sejtadhéziós molekula 8; SPON2= spondin 2; SOD2=szuperoxid-dizmutáz; GLO1= glikoxaláz 1; OSCAR=oszteoklaszt-asszociált immunglobulinszerű receptor; PARP-1= poli-ADP ribóz-polimeráz-1; STAM= jelátvivő adapter molekula; EIF4EBP1 eukarióta iniciációs faktor (EIF4EBP1).

A nem-parametrikus Mann-Whitney U-teszt szerint kilenc fehérje mutatott statisztikailag szignifikáns különbséget a két csoport között: TNFRSF10A $p=0,033$; TNFRSF11A $p=0,018$; IL-18 $p=0,014$; polimer immunoglobulin receptor (PIgR) $p=0,033$; prolargin (PRELP) $0,023$; MMP12 $p=0,016$; IL8 $p=0,03$; MCP-1 $p=0,023$; CCL3 $p=0,019$. A PIgR kivételével valamennyi fehérje mennyisége növekedést mutatott a szövődényes csoportba tartozó mintákban. Az elemzés kevés kapcsolattal rendelkező hálózatot mutatott és a feldúsult útvonalak az immunválaszhoz kapcsolódtak (**11c. ábra**). A String adatbázis vizsgálatunk idején nem tartalmazta az MMP12 fehérjét, így azt a hálózatban ábrázolni nem tudtuk.

Annak érdekében, hogy több információt kapjunk a sebgyógyulást szabályozó eseményekről és nyomon követhessük az idő és/vagy a szövődények hatásait a relatív fehérjeszintekre, szigorú, mélyreható statisztikai elemzést végeztünk lineáris kevert modell segítségével. Ami az idő hatását illeti, az IL-6 és az MMP-1 szintje statisztikailag szignifikáns módon változott. Mindkét fehérje szintje statisztikailag szignifikáns módon emelkedett az első posztoperatív napon, magas maradt a második és a negyedik napon, majd három hónappal a műtéti beavatkozás után visszatért az eredeti szintre (**12. ábra**). A mintavételi napok közötti összehasonlítás tekintetében a változások statisztikailag szignifikánsak voltak (**12. ábra**). A szövődényekkel járó és a szövődénymentes csoport közötti változások statisztikailag nem voltak szignifikánsak.



12. Ábra Az IL-6 és az MMP-1 fehérjék relatív mennyiségének (NPX) változása az idő függvényében. A nyíllal jelölt eredmények közötti statisztikailag szignifikáns különbségeket ($p < 0,05$) "*" -gal jelöltük. [117] NPX=normalizált expressziós egység

5. Megbeszélés

5.1. Képkalkotó vizsgálat

A vizsgálatunkban elemzett paraméterek számos más módszerrel is mérhetők. A meibográfia hasznos eszköz a Meibom-mirigy diszfunkciójának gyanúja esetén, de diagnosztikai értékének megállapításához további vizsgálati eredmények szükségesek [21]. A technológiai fejlődés megkönnyítette a meibográfiát a számítógépekhez csatlakoztatott, korszerűbb, LED alapú, multifunkcionális eszközök használatával [21]. Arita és mtsai. nem invazív, réslámpa alapú meibográfiai rendszert terveztek, amely infravörös szűrőt és infravörös CCD videokamerát tartalmaz. Ez a módszer gyorsabb képkalkotást biztosít, mint más rendszerek [118]. Xiao és munkatársai Keratograph 5M műszerrel végzett meibográfia során mérsékelt és erős egyetértést találtak a műszer kiértékelése során [119], Sirius meibográfival Sevim és munkatársai kiváló megbízhatóságot találtak a vizsgálók között [120]. A LacryDiag® készülék a Meibom-mirigyek infravörös képkalkotó módszerét és képelemzését alkalmazza, automatikus határfelismeréssel és szükség esetén manuális korrekciókkal. A színekódolt grafikus ábra lehetővé teszi mind a négy teszt gyors értelmezését, amely a Lacrydiag®

készülékkel könnyen kivitelezhető. Vizsgálatunkban a Meibl interobszerver variabilitása nem volt kielégítő, a MeibS esetében azonban ez elfogadható volt. Mind a Meibl, mind a MeibS intraobszerver variabilitása nagy volt. A Bland-Altman-diagram a LoA nagy variabilitását mutatta, amely az inter-és intraobszerver mérések közötti alacsony egyetértési mutatóra utal. Emiatt ezt a paramétert ugyanazon szakembernek javasolt értékelnie a megbízható utánkövetés érdekében. A non-kontakt meibográfia viszonylagos reprodukálhatósága és objektivitása ellenére Robin és munkatársai további kutatást javasolnak review munkájukban a műszerrel kapott képek értelmezésének javítása érdekében [121].

Az interferometria széles körben használt nem invazív, gyors és felhasználóbarát diagnosztikai eszköz. Markoulli és mtsai. megállapították, hogy Tearscope-Plus™ használata során a könnyfilm felszakadási kinetikájának vagy a lipidréteg vastagságának mérésekor az eszközben rejlő szubjektivitás korlátozza a mérések megismételhetőségét, ezáltal csökkenti a használhatóságát az objektívebb műszerekhez képest. Továbbá felhívták a figyelmet arra is, hogy mind a LipiView®, mind az Oculus® Keratograph beépített határértékekkel rendelkezik, amelyek jelentősen befolyásolhatják eredményeik értelmezését [122]. A LacryDiag® készülék interferometria vizsgálat kiértékelése előre meghatározott videók osztályozási skálájával való összehasonlításra alapul. Mind az intra-, mind az interobszerver variabilitás alapján elmondhatjuk, hogy ez az eszköz megfelelő egyetértési mutatót biztosított az INT kiértékelése során, azonban az intraobszerver variabilitás értéke magasabb volt.

Az LTMH segítségével az alsó szemhéj feletti meniszkusz réteg könnyen vizualizálható. A mérés hagyományos eszköze egy mikrométeres skálával felszerelt réslámpa, míg a vizsgálat során az elkészített fényképek objektív elemzése történt. A modern módszerek elemzése során Fodor és mtsai. megállapították, hogy nincs különbség a Tearscope®, a réslámpa és a fluoreszcenyes réslámpavizsgálat között LTMH mérés során, de az ismételhetőség jobbnak bizonyult a Tearscope® készülékkel [33]. Wang és mtsai. kutatásai alapján az OCT sokoldalú technika az LTMH mérésére, mivel valós idejű, nem invazív és kiváló minőségű képet nyújt, bár az átlagérték magasabb lehet, mint a hagyományos módszerekkel és a mérés megismételhetősége kedvezőtlen [123]. Kawai és mtsai. funduskamerát használtak a DED diagnosztizálására és nyomon követésére, mely egyszerű és hasznos módszernek bizonyult, mert nemcsak az alsó, hanem felső meniszkusz magasságát is méri [32]. A LacryDiag® készülék előnye, hogy félautomata módon értékeli az LTMH-t öt becslés átlaga alapján, mely

eredményeink szerint kiváló inter- és intragrader variabilitást biztosít az LTMH mérése céljából. A félautomata LTMH mérés ezen adatok alapján megbízható mérési eredményt biztosít az utánkövetés szempontjából különböző szakemberek által végzett kiértékelés mellett is. Ward és mtsai mérsékelt intra-obszerver variabilitást állapítottak meg az LTMH tekintetében LacryDiag®-gal és Oculus Keratograph 5M-mel végzett vizsgálataik során, mely a beteg egy műszerrel javasolt követését erősíti meg [124].

Napjainkban a NIBUT egyre szélesebb körben elterjedt módszer, de jelenleg továbbra is a TBUT a leggyakrabban alkalmazott teszt a könnyfilm felszakadási idő vizsgálatára [21]. Különböző vizsgálatok alapján azonban a nem-invazív módszerek eredményei jobban tükrözik a könnyfilm stabilitását, mint a fluoreszceint tartalmazó hagyományos mérések [20, 36]. A LacryDiag® készülék automatikus NIBUT mérés kivitelezésére képes a szemfelszínről visszaverődő Placido-korong elemzésével. A műszerrel mért átlag NIBUT érték egészséges pácienseinken ($10,60 \text{ sec} \pm 3,24 \text{ sec}$) nagy hasonlóságot mutatott Wars és mtsai [124] Lacrydiagon, valamint Nichols és mtsai [126] Tearscope Plus műszeren végzett NIBUT méréseivel egészséges populáción. Bár Remongin és mtsai [127] Lacrydiaggal végzett vizsgálata alapján a NIBUT értékek korreláltak a TBUT-tal, mégsem javasolja a TBUT NIBUT-tal kiváltását, ugyanis minél stabilabb volt a könnyfilm, annál inkább eltértek a vizsgálati eredmények. A fentiek alapján a beteg nyomonkövetése előnyösebb lehet azonos metodikával végezve.

Összegezve, a LacryDiag® egy nem-invazív, könnyen használható eszköz. A vizsgálat során készült videó- és képfelvételek segítik a száraz szem etiológiájának tisztázását, a száraz szem szindrómában szenvedő betegek nyomonkövetését, illetve a helyes terápia megválasztását.

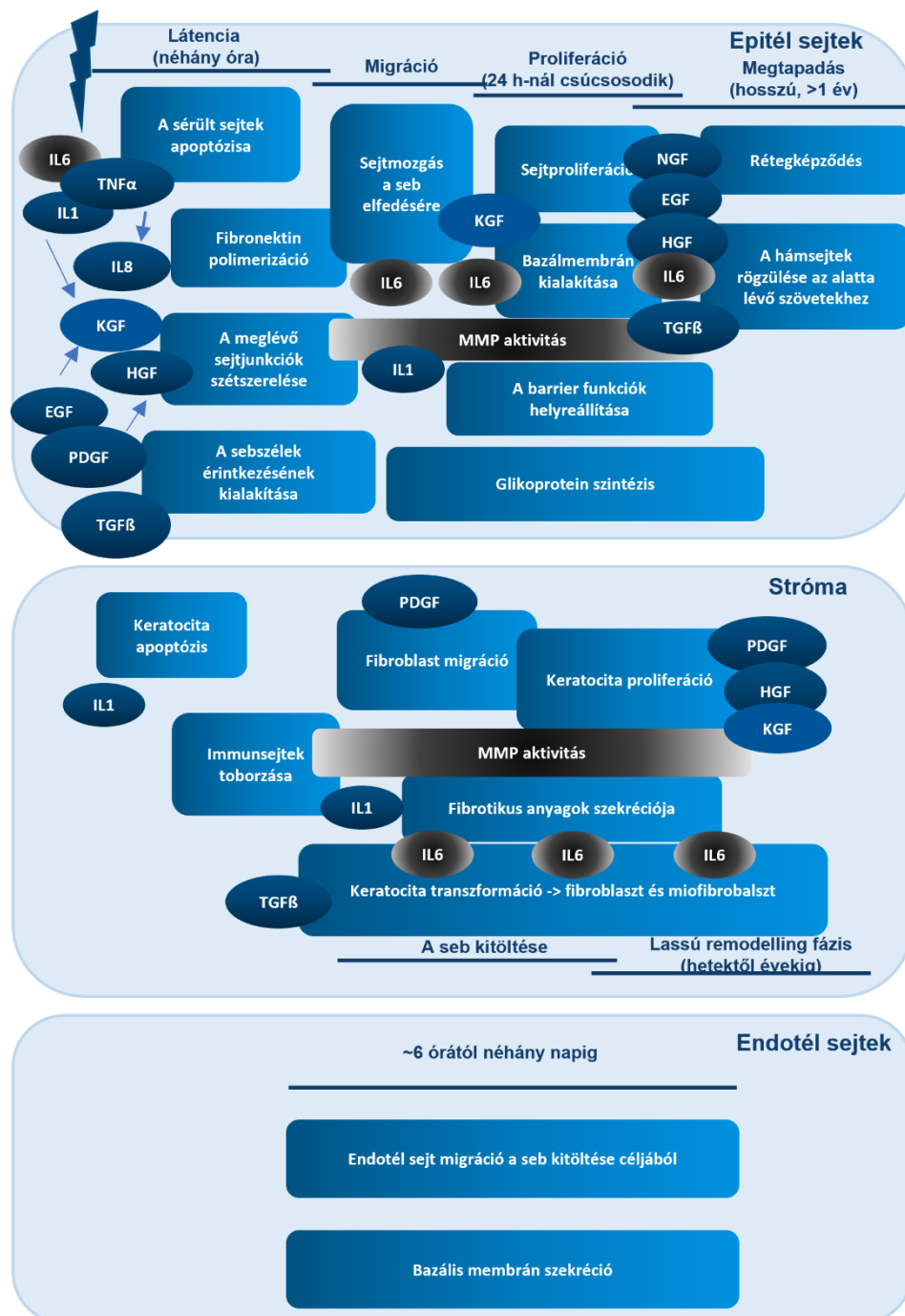
5.2. Proteomikai vizsgálat

Szemészeti sebgyógyulás

A szemészeti sebgyógyulás folyamatainak összefoglalását az általunk vizsgált fehérjék kiemelésével a **13. ábrán** illusztráltuk. A sérülést követő első néhány órában, látencia fázisban a felszabaduló citokinek (elsősorban IL-1, IL-6, TNF- α és IL-8) irányítják a hámsejtek sebgyógyulásának korai eseményeit. A sérült sejtek főként apoptózis útján pusztulnak el, a toborzott immunsejtek pedig segítik a törmelék eltávolítását és az apoptotikus sejtek

kiürítését. Az MMP-eket az IL-1 és más faktorok aktiválják, melyek hatására kiterjedt extracelluláris mátrix átrendeződés kezdődik. A sérülés vagy a citokinek hatására felszabaduló EGF, HGF, KGF, PDGF és NGF segítik a sebgyógyulási folyamatot. A migrációs fázisban a sejtek a seb helyére vándorolnak, hogy befedjék azt. A sérülést követően körülbelül öt órával kezdődő migrációt az IL-6, a KGF, a HGF és a PDGF irányítja, amit a növekedési faktorok erős mitogén hatása által stimulált sejtproliferáció követ [90]. Ezzel egyidejűleg kiterjedt szintetikus folyamatok zajlanak, megtörténik a bazálmembrán kialakulása és a barrierfunkciók helyreállítása [128].

A strómában a sérülést a keratociták apoptózisa és az immunsejtek toborzása követi. A hámsejtrétegben felszabaduló IL-1 és transzformáló növekedési faktor β (TGF β) a bazálmembrán hibái miatt a stróma felé diffundálva szabályozzák a stróma sebgyógyulásának korai eseményeit. Az immunsejtek és a keratociták főként a TGF β hatására fibroblasztokká és myofibroblasztokká alakulnak át, majd a sérülés helyére vándorolva feltöltik a sebet. A keratociták és a fibroblasztok olyan növekedési faktorokat választanak ki, amelyek segítik a sejtproliferációt mind a strómában, mind a hámsejtes rétegben. A stróma és a hámsejtek sebgyógyulása lassú és hosszú remodelling fázissal zárul. Ebben a fázisban megtörténik a hámsejtek rétegződése és az alatta lévő struktúrákhoz való tapadása. A strómában kiterjedt kollagén remodelling során a miofibroblasztok eltűnnek. Az endotél-sérülés során a sejt-vándorlás a legfontosabb folyamat; az endotélsejtek a sérülés helyére vándorolnak, kitöltik a rést, szükség esetén új bazálmembránt hoznak létre a barrierfunkciók helyreállítása céljából [90, 91, 93].



13. Ábra A személyzeti sebek gyógyulásának fázisai. A késsel jelölt fehérjéket tanulmányoztuk vizsgálatunkban, a feketével jelöltek esetében szignifikáns eltérést tapasztaltunk [117].

IL=interleukin; TNF α =Tumor nekrosis faktor; TGF β =Transzformáló növekedési faktor béta; EGF=Epidermális növekedési faktor; KGF=Keratocita növekedési faktor; PDGF=Trombocita eredetű növekedési faktor; NGF=Neurális növekedési faktor; MMP=mátrix metalloproteáz

Hálózatelemzés

A String elemzés során a feldúsult GO-funkciók a receptorok kötődéséhez, a mitogén-aktivált protein kináz kaszkád (MAPK-kaszkád) szabályozásához és az immunszabályozáshoz kapcsolódnak. A CD84 szerepet játszik az immunsejtek aktivációjának és differenciálódásának modulálásában és a mitokondriális DECR1 és CA5A az anyagcserében. A gyomor parietális sejtjei által termelt intrinsic faktor a B-12 vitamin abszorpciójának fontos kofaktora. A funkcionális elemzés szerint az UGGT1-nek a fehérjék feltekeredésének, foldingjának minőségellenőrzésében van szerepe. A hibás folding felismerését követően reglülkolizálja a fehérjét, majd elősegíti az endoplazmatikus retikulumba történő visszavételét [129]. Tizenegy fehérje a sebgyógyulásban való szerepét már leírták korábbi kutatásokban. Kimutatták, hogy a leptin és az NPPB elősegíti a sebgyógyulást a bőrben [130–132], az FGF-ek pedig elősegítik a sejtek migrációját és regenerációját a sebgyógyulás során [133]. A renin esetében az adatok nem egyértelműek; a renin-angiotenzin rendszer szerepet játszik a sebgyógyulásban, de a körülményektől függően vagy proinflammatorikus, proliferatív és profibrotikus, vagy antiinflammatorikus, antiproliferatív és antifibrotikus irányba tereli a rendszert [134]. A CD40-L, a TNFSF14, a CCL3 és az ADAMTS13 esetében kimutatták, hogy hiányuk vagy csökkent szintjük károsodott sebgyógyuláshoz vezet. A CD40-L hiánya fokozott kollagénlerakódással jár, míg az ADAMTS13 hiánya a sebgyógyulás korai fázisában fokozza a neutrofilek extravazációját [135, 136]. A TNFSF14 hiánya esetén vérlemezke-hiperaktivitást, károsodott sebgyógyulást, immunsejt felhalmozódást, valamint magas citokin szintet figyeltek meg [137, 138]. Károsodott sebgyógyulás esetén a CCL3 csökkenése figyelhető meg [139]. A THPO-nak a trombociták szintézisében van szerepe. Egy tanulmány alapján THPO receptor agonistával történő kezelés enyhén késlelteti a sebgyógyulás ütemét egerekben [140]. A bikunin vagy inter-alfa tripszin inhibitor összefüggést mutat a sebgyógyulás károsodásával; inter-alfa tripszin inhibitor-hiányos egerekben naftalin sérülést követően jelentősen több patológiásnak tűnő sejtet figyeltek meg [141]. A CA5A-ra vonatkozóan nem állnak rendelkezésre adatok, de egy tanulmány alapján CA expresszió igazolható a bőrben sebgyógyulás során, valamint csökkent szintje figyelhető meg keloid hegekben [142]. A szövődményes csoport mintáiban a leptin az NPPB és az FGF23 csökkent előfordulását a jelenleg rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján nem tudjuk összefüggésbe hozni a sebgyógyulási folyamatokkal. A vizsgált fehérjék és a sebgyógyulás közötti kapcsolatról elérhető adatok főként bőrön vagy légutakon végzett vizsgálatokból

származnak, a szemben végbemenő folyamat egyes stádiumai eltérhetnek a test más részein megfigyeltektől.

Kutatásunk során hat fehérje (IL17C, IL10RA, FGF19, TNFSF11, ARTN, IL20RA) nagyobb gyakorisággal jelent meg a szövődményes csoport mintáiban a szövődménymentes betegcsoporthoz képest. A hálózatelemzés azt mutatja, hogy ezek a fehérjék nem képeznek egymással interakciós hálózatot, főként a citokin kötésében vesznek részt. Az IL17C az NF-kappa-B és MAPK útvonalakon keresztül serkenti az antibakteriális és immunmoduláló peptidek termelését [143], fokozott expressziója viszont psoriasiform bőrrel mutat összefüggést [144]. Az IL-20 az IL20RA receptorán keresztül egér szaruhártyában epiteliális sebgyógyulást segít elő [145], az IL10RA a myeloid sejtek túlélését [146], a TNFSF11 pedig az NF-kappa-B ligandjaként a sejtproliferációt fokozza [147]. Az artemin a sebgyógyulásban a migrációs képességet növeli, az FGF családnak pedig számos tagját alkalmazzák a sebgyógyulást segítő gyógyszerként [148, 149]. A szövődményes betegcsoportban a sejtmigrációban, a sejtproliferációban és a sebgyógyulás fokozásában szerepet játszó fehérjék megnövekedett gyakorisága magyarázatot adhat arra, hogy a szövődmény jelenléte a trabekulektómia során keletkezett csatorna korai záródásával összefüggésben lehet.

Mennyiségi analízis

A mennyiségi analízis során 14 fehérje esetében nagyobb fehérjemennyiséget lehetett megfigyelni a szövődményekkel járó csoportba tartozó mintákban a hőtérkép alapján, azonban nem lehet egyértelműen elkülöníteni a két csoportot. Ennek oka valószínűleg az alacsony mintaszám. A Casp8 az apoptózisban játszik szerepet, az S100A12 fehérje, a TNFSF14, az MCP-3/CCL7, a CCL23 és a NEMO/IKKBG pro-inflammatorikus funkcióval rendelkezik, míg a CEACAM8 és a SPON2 a sejtadhézióban játszik szerepet. Az OSCAR részt vesz az oszteoklasztok differenciálódásában, de a neutrofil degranulációban is szerepet játszik és aktiválhatja a TNF- α felszabadulását a gyulladásos monocitákból [150]. A SOD2 és a GLO1 védő szerepet tölthet be a szabad gyökök és a fejlett glikációs végtermékek felhalmozódásának megakadályozásában, csökkent aktivitásuk vagy expressziójuk pedig a sebgyógyulás késleltetésével hozható összefüggésbe [151–154]. Egy szaruhártya sebgyógyulási modellben a PARP-1 expresszióját a fibronektin fokozza, míg a PARP-1 aktiválódása a bőrben a sebgyógyulás késleltetésével járt együtt [155, 156]. A PARP-1, az OSCAR, a SOD2 és a GLO1 megnövekedett mennyisége a szövődményes csoportban ezen molekuláknak a védekezésben

betöltött szerepére utalhat. A STAM kötő fehérje a sejtnövekedést és a sejtproliferációt indítja el, míg az EIF4EBP1 a transzláció szabályozásában játszik szerepet; mindkettő szükséges a sebzárás során kialakult fokozott sejtproliferációhoz [157]. Korai sebgyógyulásra, ezáltal a szövődményes csoportban a trabekulektómia hatástalanságára utalhatnak a sejtproliferációban szerepet játszó molekulák (STAM-kötő fehérje, EIF4EBP1) megnövekedett szintjei, valamint az SOD2, a GLO1 és a PARP-1 megemelkedett mennyisége, melyek alacsonyabb értéke a késleltetett sebgyógyulás indikátora.

Az IL-8, az IL-18, az MCP-1, a CCL3 és a TNF receptor szupercsalád 10A és 11A tagjai részt vesznek a citokin-citokin receptor kölcsönhatásban, míg a PIGR az IgA és IgM kötődésében, a PRELP fehérje pedig az extracelluláris mátrix kialakításában játszik szerepet [158]. Az MMP12-ről megállapították, hogy felelős a szemészeti sebek gyógyulásért, elősegítve a szaruhártya epitélium korai javítási folyamatát az epitélsejtek migrációjának és a neutrofil infiltrációnak fokozásával [159]. Eredményeink alapján a szövődményes csoportban megváltozott gyakoriságú fehérjék az immunválaszban és a sebgyógyulásban játszanak szerepet.

IL-6 és MMP-1 szerepe a szemészeti sebgyógyulásban

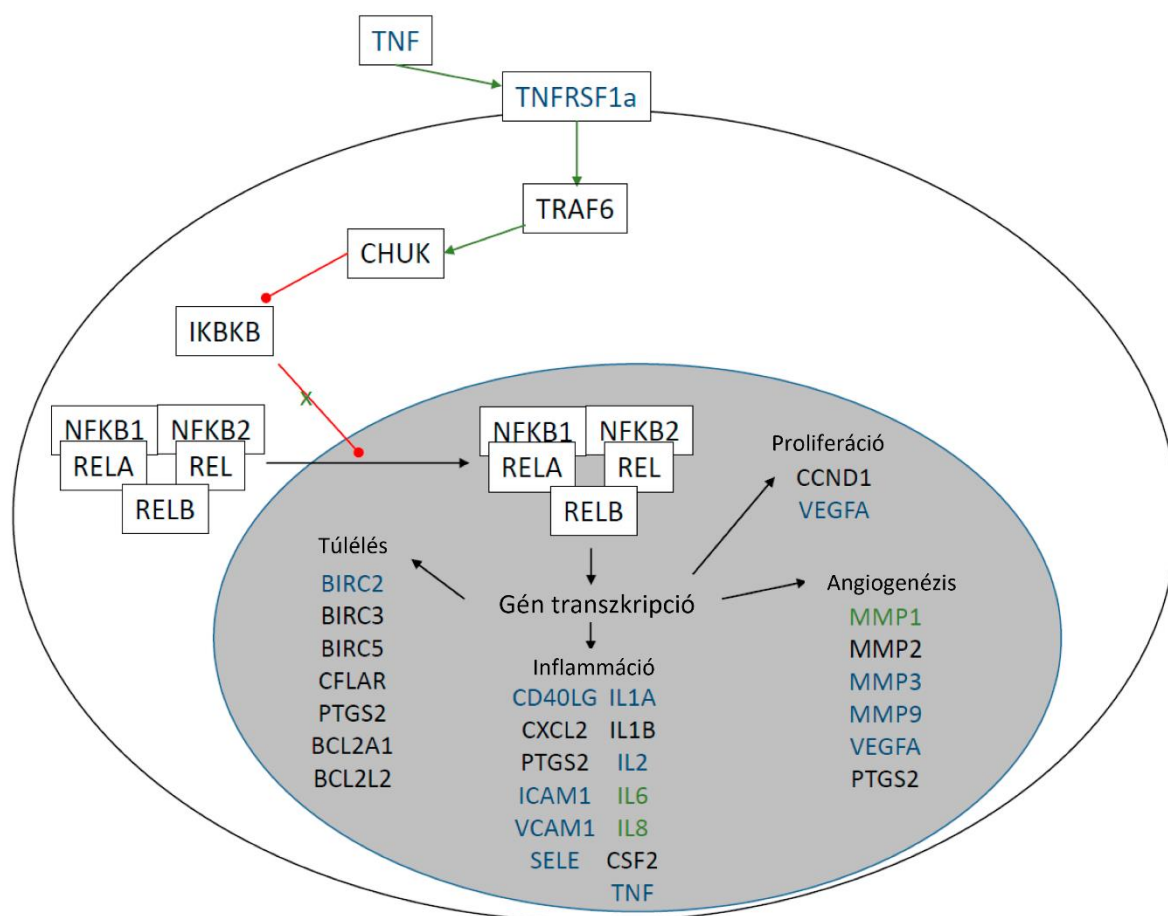
Az IL-6 mindkét panelben jelen volt, ezáltal két különböző alkalommal került le mérésre. Mindkét mérés során az IL-6 hasonló eredményeket mutatott, ami további bizonyítékot szolgáltat a vizsgálatok jó reprodukálhatóságára. Az IL-6 a sebgyógyulás gyulladós részében játszik szerepet és közvetlenül a szemsérülést követően szabadul fel [90]. Ismert, hogy az integrin típusú fibronectin receptor IL-6 szabályozása elősegíti az epitélsejtek migrációját, serkenti a szaruhártya epitélsejtjeinek a IV-es típusú kollagén és laminin mátrixokhoz való kötődését és befolyásolhatja az aktivált keratociták fibrotikus anyag termelését [160]. A könnyben a posztoperatív első, második és negyedik napon megfigyelt megnövekedett IL-6 szint valószínűleg ennek a citokinnek a magasabb szintjét tükrözi, amely a szemben lévő sebek sebgyógyulásának migrációs és proliferációs fázisára jellemző.

Az MMP-k szerepet játszanak az ECM átalakításában, ami szükséges a megfelelő sebgyógyuláshoz. Kiemelkedő szerepük van a migrációs fázisban, segítik a sejt vándorlást, az immunsejtek toborzását és az új fibrotikus kötegek termelését. Az MMP-1 szint növekedését a korai posztoperatív időpontokban figyelhetjük meg, amikor a mátrix metalloproteináz aktivitás elősegíti az ECM átrendeződését, a sejt-ECM kapcsolódási pontok felbomlását, a sejt migráció beindulását.

Adataink szerint az IL-6 és az az MMP-1 a sebgyógyulás látencia- és migrációs fázisában betöltött szerepük mellett fontos tényezők lehetnek a proliferációs fázisban, valamint feltételezésünk szerint a megtapadási és a lassú remodelling fázis korai eseményeiben is.

Útvonal elemzés

Az útvonal elemzés alapján a “fotodinamikus terápia által indukált”, NF-kappa-B jelátvitelen keresztüli interleukin, többek között IL-6 és MMP-1 aktivációt és expressziót is magába foglaló útvonalat találtuk relevánsnak (**14. ábra**). Olyan útvonal keresése volt a cél, ahol a lehető legtöbb, vizsgálatunkban változást mutató fehérje szerepel. Ez az útvonal tumorsejtekben gyulladásához vezet, mely leukocita beáramlást követően a tumorsejtek apoptózist eredményezi [161]. Szemészeti sebek gyógyulása során a sérült sejtek apoptózis és nekrosis útján elpusztulnak, a szöveti regeneráció és az elhalt sejtek eltávolítása céljából pedig immunsejtek infiltrálják a területet [90]. Ezen útvonal fokozott aktivitása lehet felelős a posztoperatív sebgyógyulás első napjaiban észlelhető gyulladásos epizód kialakulásáért.



14. Ábra Fotodinamikus terápia által indukált útvonal. A vizsgálatunk során elemzett fehérjéket kék színnel, a betegcsoportok között szignifikáns különbséget mutató fehérjéket zöld színnel jelöltük. Aktivációt a zöld nyíl, gátlást a piros nyíl jelent. Az útvonalat a Wikipathway WP3617 (www.wikipathways.org/index.php/Pathway:WP3617) alapján rajzoltuk meg [117].

Konklúzió

Eredményeink alapján a CVDII és a gyulladásos panelben megtalálható, elsősorban plazmában előforduló fehérjék kis mennyiségük ellenére megfelelően multiplex módon vizsgálhatóak könnymintában. Ezen felismerés kifejezett jelentőséggel bír, tekintettel a bazális könny mennyiség alacsony voltára, mely limitálja a replikátum mérését a tömegspektrometriai elemzések során. A reflexkönnny nagyobb mennyiségben is gyűjthető, de a minősége jelentősen eltér a bazális könnyhöz képest [162]. A bazális- és reflexkönnny közötti kvalitatív és kvantitatív különbségek, a könnyanalízis során végzett minta összevonás (poolozás) elleni érvek és a megfelelő kontrollok alkalmazása miatt a PEA megfontolandó választás lehet az egyes személyek egyedi könnymintáinak elemzése céljából. A preanalitikai protokoll egységesítésével és a módszer alkalmazásával lehetőségünk nyílna a könny biomarkereinek multicentrikus vizsgálatára.

6. Új eredmények összefoglalása

Lacrydiag®

- A képkotó vizsgálat során a vizsgálat ismételhetősége megbízható volt, és ez az LTMH esetében nagyon jó korrelációt mutatott a két vizsgáló között is. Ellenben a többi paraméter esetén jobb eredményeket kaptunk, ha a vizsgálatot ugyanazon személy végezte, ezért a követéses vizsgálatot javasolt egy személynek végeznie.
- A NIBUT és a TBUT összehasonlításának enyhe egyetértési mutatója miatt érdemes a követést ugyanazon módszerrel végrehajtani.
- A LacryDiag® műszer nyújtott vizsgálatok nem-invazívak, a vizsgálati eredmények video- és képrögzítésével standard módon segítik a beteg nyomon követését.

Proximity extension assay

- Eredményeink azt mutatták, hogy a szövődményes betegcsoport mintáiban a sebgyógyulás különböző fázisaiban szerepet játszó fehérjék kvalitatív és kvantitatív szempontból is emelkedést mutattak a szövődménymentes betegcsoporthoz képest. Mindemellett több, elhúzódó sebgyógyulás esetén kis mennyiségben mérhető fehérje (pl.: GLO1, SOD2) szintjében is emelkedést tapasztaltunk. A sebgyógyulás zavartalan lefolyását reguláló fehérjék viszont ritkábban jelentek meg a szövődményes betegcsoport mintáiban. Összességében elmondható, hogy a könny fehérjéinek vizsgálatával következtetni lehet sebgyógyulás egyensúlyzavarának fennállására, mely késői műtéti komplikációkhoz vezethet.
- Az immunválaszban és a sebgyógyulásban szerepet játszó fehérjék megváltozott mennyiségben és/ vagy gyakoriságban jelennek meg a műtétet követően a két betegcsoport között.
- Elsőként vizsgáltunk könnymintát PEA módszerrel, adataink alapján a PEA alkalmas lehet több száz fehérje relatív mennyiségi meghatározására egyedi könnymintákban.

7. Summary of new results

Lacrydiag®

- The repeatability of the imaging technique was reliable, in addition the LTMH has shown excellent interobserver accuracy as well. However better results were achieved in the case of the other parameters, if the evaluation was performed by the same investigator. These results suggest that follow-up examinations of patients should be performed by the same ophthalmologist.
- The slight disagreement of the NIBUT and TBUT comparisons suggests that follow-up should be performed with the same method.
- The LacryDiag® instrument provides a non-invasive, standard way to help monitor the patient by video and image recording of test results.

Proximity extension assay

- Our results showed that in the samples of the “complications” group, proteins involved in different phases of wound healing showed an increase in both qualitative and quantitative aspects compared to the “no complications” group. In addition, we observed an increase in the levels of several proteins that can be measured at low levels in case of prolonged wound healing (e.g., GLO1, SOD2). However, proteins that regulate the normal progression of wound healing were less abundant in the samples of the “no complications” group. In conclusion, the analysis of tear proteins suggests the existence of wound healing imbalances that may lead to late surgical complications.
- Proteins involved in immune response and wound healing are detected in different amounts and/or frequency after surgery between the two groups of patients.
- We were the first to test tear samples using PEA, and our data suggest that PEA can be used to quantify the relative abundance of hundreds of proteins in individual tear samples.

8. Összefoglalás

A könnykutató klinikai fontossága vitathatatlan, tekintettel arra, hogy a könnyfilm összetételének és felépítésének változása jellegzetes lehet egyes szemészeti és szisztémás betegségekre. A modern képalkotó technikák és proteomikai módszerek kiegészítik egymást, mellyel teljesebb képet kaphatunk a könnyfilm tulajdonságairól.

A szemészeti képalkotó technológia fejlődése lehetővé tette a szemfelszíni változások, könnyfilm paraméterek objektív és reprodukálható értékelését. A LacryDiag® egy nem invazív, könnyen használható diagnosztikai eszköz, amely alkalmas a könnyfilm vizsgálatára és a felvételek mentésével lehetőség nyílik a páciens objektív utánkövetésre.

Tanulmányunkban a képalkotó vizsgálat során a vizsgálat ismételhetősége megbízható volt, és ez az LTMH esetében nagyon jó korrelációt mutatott a két vizsgáló között is. Ellenben a többi paraméter esetén jobb eredményeket kaptunk, ha a vizsgálatot ugyanazon személy végezte. Ezen eredmények alapján a betegek követéses vizsgálatait ugyanazon szemésznek érdemes végeznie. A NIBUT és a TBUT összehasonlításának alacsony egyetértési mutatója miatt érdemes a követéshez ugyanazon módszert alkalmazni.

Megfigyeltük, hogy az immunválaszban és a sebgyógyulásban szerepet játszó fehérjék megváltozott gyakorisággal és/vagy mennyiségben jelennek meg a glaukómaműtétet követő szövődmenyes betegcsoporttól származó mintákban a szövődmenymentes betegektől származó mintákhoz képest. Az általunk elsőként alkalmazott PEA módszer lehetővé teszi egyszerre több tíz, akár száz fehérje relatív mennyiségi meghatározását az egyes könnymintákban. Eredményeink alapján a PEA alkalmas kis mennyiségű könnyminták elemzésére is, ezért a bazális könny vizsgálatában választandó módszer lehet, amely lehetővé teszi több száz fehérje relatív mennyiségi meghatározását az egyes mintákban.

A technológiai fejlesztésekkel várhatóan mind a képalkotó eszközök mind pedig a biokémiai módszerek pontosabb és precízebb információkat fognak szolgáltatni a könny strukturális és funkcionális változásairól, azonban további nagyobb esetszámú vizsgálatok szükségesek ezen módszerek széleskörű klinikai alkalmazását lehetővé tevő irányelvek kidolgozásához.

9. Summary

The clinical importance of tear research is undisputed, given that changes in the composition and structure of the tear film may be characteristic of certain ophthalmic and systemic diseases. Modern imaging techniques and proteomic methods complement each other to provide a more complete picture of tear film properties.

Advances in ophthalmic imaging technology have made it possible to assess changes in the ocular surface and tear film parameters in objective and reproducible ways. LacryDiag® is a non-invasive, easy-to-use diagnostic tool for tear film examination and allows objective follow-up of patients by saving the images.

In our study, the repeatability of the imaging technique was reliable, in addition the LTMH has shown excellent interobserver accuracy as well. However better results were achieved in the case of the other parameters, if the evaluation was performed by the same investigator. These results suggest that follow-up examinations of patients should be performed by the same ophthalmologist. Due to the low agreement rate between NIBUT and TBUT comparisons, it is worth using the same method for follow-up.

We observed that proteins involved in the immune response and wound healing are found with different frequency and/or in different quantity in samples from patients who had complications after glaucoma surgery compared to samples from patients without complications. The PEA method we used allows the relative quantification of tens to hundreds of proteins in each tear sample at the same time. Based on our results, PEA is also suitable for the analysis of small amounts of tear samples and may therefore be the method of choice for the analysis of basal tears, allowing the relative quantification of hundreds of proteins in each sample.

With technological advances, both imaging tools and biochemical methods are expected to provide more accurate and precise information about structural and functional changes in tear, but more case-control studies are needed to develop guidelines for the widespread clinical use of these methods.

10. Irodalomjegyzék

1. Cotlier E (1981) Clinical Biochemistry of Tears. *Surv Ophthalmol* 26:
2. Koh S, Tung CI, Inoue Y, Jhanji V (2018) Effects of tear film dynamics on quality of vision. *Br J Ophthalmol* 102:1615–1620. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2018-312333>
3. Szczotka-Flynn LB, Maguire MG, Ying G, et al (2019) Impact of Dry Eye on Visual Acuity and Contrast Sensitivity. *Optom Vis Sci* 96:387–396. <https://doi.org/10.1097/OPX.0000000000001387>
4. Wolff E (1946) The muco-cutaneous junction of the lid margin and the distribution of the tear fluid. *Trans Ophthalmol Soc U K* 66:291e308:291:308
5. Dartt DA (2011) Formation and function of the tear film. In: LA L, SFE N, J VH, SM W (eds) *Adler's Physiology of the eye*, Eleventh. Elsevier, Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto, pp 350–362.
6. Willcox MDP, Argüeso P, Georgiev GA, et al (2017) TFOS DEWS II Tear Film Report
7. Mantelli F, Mauris J, Argüeso P (2013) The ocular surface epithelial barrier and other mechanisms of mucosal protection: from allergy to infectious diseases. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 13:563–568
8. Wang J, Aquavella J, Palakuru J, et al (2006) Relationships between central tear film thickness and tear menisci of the upper and lower eyelids. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:4349–4355. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-1654>
9. Craig JP, Willcox MDP, Argüeso P, et al (2013) The TFOS International Workshop on Contact Lens Discomfort: Report of the contact lens interactions with the tear film subcommittee. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 54:. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-13235>
10. Spurr-Michaud S, Argüeso P, Gipson I (2007) Assay of mucins in human tear fluid. *Exp Eye Res* 84:939–950. <https://doi.org/10.1016/J.EXER.2007.01.018>
11. Filik J, Stone N (2008) Analysis of human tear fluid by Raman spectroscopy. *Anal Chim Acta* 616:177–184. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2008.04.036>
12. Hagan S, Martin E, Enríquez-de-Salamanca A (2016) Tear fluid biomarkers in ocular and systemic disease: Potential use for predictive, preventive and personalised medicine. BioMed Central Ltd.
13. Salvisberg C, Tajouri N, Hainard A, et al (2014) Exploring the human tear fluid: discovery of new biomarkers in multiple sclerosis. *Proteomics Clin Appl* 8:185–194. <https://doi.org/10.1002/PRCA.201300053>
14. Nandi SK, Singh D, Upadhyay J, et al (2021) Identification of tear-based protein and non-protein biomarkers: Its application in diagnosis of human diseases using biosensors. *Int J Biol Macromol* 193:838–846. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.10.198>
15. Isreb MA, Greiner J V., Korb DR, et al (2003) Correlation of lipid layer thickness measurements with fluorescein tear film break-up time and Schirmer's test. *Eye* 17:79–83. <https://doi.org/10.1038/sj.eye.6700224>
16. Zhuang H, Zhou X, Xu J (2010) A novel method for pachymetry mapping of human precorneal tear film using pentacam with fluorescein. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 51:156–159. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-3265>
17. Ewen King-Smith P, Reuter KS, Braun RJ, et al (2013) Tear film breakup and structure studied

- by simultaneous video recording of fluorescence and tear film lipid layer images. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 54:4900–4909. <https://doi.org/10.1167/iov.13-11878>
18. Bron AJ, Tiffany JM, Gouveia SM, et al (2004) Functional aspects of the tear film lipid layer. *Exp Eye Res* 78:347–360. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2003.09.019>
 19. Nichols JJ, Mitchell GL, King-Smith PE (2005) Thinning rate of the precorneal and prelens tear films. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 46:2353–2361. <https://doi.org/10.1167/iov.05-0094>
 20. Huang J, Hindman HB, Rolland JP (2016) In vivo thickness dynamics measurement of tear film lipid and aqueous layers with optical coherence tomography and maximum-likelihood estimation. *Opt Lett* 41:1981. <https://doi.org/10.1364/ol.41.001981>
 21. Wolffsohn JS, Arita R, Chalmers R, et al (2017) TFOS DEWS II Diagnostic Methodology report. *Ocul. Surf.* 15:539–574
 22. Nichols JJ, Berntsen DA, Mitchell GL, Nichols KK (2005) An assessment of grading scales for meibography images. *Cornea* 24:382–388. <https://doi.org/10.1097/01.icc.0000148291.38076.59>
 23. Ewen King-Smith P, Hinel EA, Nichols JJ (2010) Application of a novel interferometric method to investigate the relation between lipid layer thickness and tear film thinning. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 51:2418–2423. <https://doi.org/10.1167/iov.09-4387>
 24. Nichols K, Mitchell L, Zadnik K (2004) The Repeatability of Clinical Measurements of Dry Eye : Cornea. *Cornea* 23:272–285
 25. Downie LE (2015) Automated Tear Film Surface Quality Breakup Time as a Novel Clinical Marker for Tear Hyperosmolarity in Dry Eye Disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 56:7260–7268. <https://doi.org/10.1167/IOVS.15-17772>
 26. Arita R, Yabusaki K, Yamauchi T, et al (2018) Diagnosis of dry eye subtype by artificial intelligence software based on the interferometric fringe pattern of the tear film obtained with the Kowa DR-1 α instrument. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 59:1965
 27. Arita R, Morishige N, Fujii T, et al Tear Interferometric Patterns Reflect Clinical Tear Dynamics in Dry Eye Patients. <https://doi.org/10.1167/iov.16-19788>
 28. Dartt DA (2002) Regulation of mucin and fluid secretion by conjunctival epithelial cells. *Prog Retin Eye Res* 21:555–576. [https://doi.org/10.1016/S1350-9462\(02\)00038-1](https://doi.org/10.1016/S1350-9462(02)00038-1)
 29. Mainstone JC, Bruce AS, Golding TR (1996) Tear meniscus measurement in the diagnosis of dry eye. *Curr Eye Res* 15:653–661. <https://doi.org/10.3109/02713689609008906>
 30. Akowuah PK, Kobia-Acquah E (2020) Prevalence of Dry Eye Disease in Africa: A Systematic Review and Meta-analysis. *Optom Vis Sci* 97:1089–1098. <https://doi.org/10.1097/OPX.0000000000001610>
 31. Radomska-Leśniewska DM, Osiecka-Iwan A, Hyc A, et al (2019) Therapeutic potential of curcumin in eye diseases. *Cent Eur J Immunol* 44:181–189. <https://doi.org/10.5114/ceji.2019.87070>
 32. Kawai M, Yamada M, Kawashima M, et al (2007) Quantitative evaluation of tear meniscus height from fluorescein photographs. *Cornea* 26:403–406. <https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e318033c242>
 33. Fodor E, Hagyo K, Resch M, et al (2010) Comparison of Tearscope-plus versus slit lamp measurements of inferior tear meniscus height in normal individuals. *Eur J Ophthalmol*

20:819–824. <https://doi.org/10.1177/112067211002000502>

34. Cox SM, Nichols KK, Nichols JJ (2015) Agreement between automated and traditional measures of tear film breakup. *Optom Vis Sci* 92:e257–e263
35. Downie LE (2015) Automated tear film surface quality breakup time as a novel clinical marker for tear hyperosmolarity in dry eye disease. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 56:7260–7268. <https://doi.org/10.1167/iov.15-17772>
36. Tóth N, Szalai E, Rák T, et al (2021) Reliability and clinical applicability of a novel tear film imaging tool. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. <https://doi.org/10.1007/s00417-021-05162-8>
37. Messmer EM (2015) The pathophysiology, diagnosis, and treatment of dry eye disease. *Dtsch Arztebl Int* 112:71–82. <https://doi.org/10.3238/ARZTEBL.2015.0071>
38. Tsubota K, Yokoi N, Watanabe H, et al (2020) A New Perspective on Dry Eye Classification: Proposal by the Asia Dry Eye Society. *Eye Contact Lens* 46:S2–S13. <https://doi.org/10.1097/ICL.0000000000000643>
39. Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, et al (2017) TFOS DEWS II Definition and Classification Report. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2017.05.008>
40. Craig JP, Nelson JD, Azar DT, et al (2017) TFOS DEWS II Report Executive Summary. *Ocul. Surf.* 15:802–812
41. Stapleton F, Alves M, Bunya VY, et al (2017) TFOS DEWS II Epidemiology Report. *Ocul. Surf.* 15:334–365
42. Uchino M, Schaumberg DA (2013) Dry Eye Disease: Impact on Quality of Life and Vision. *Curr Ophthalmol Rep* 1:51–57. <https://doi.org/10.1007/s40135-013-0009-1>
43. Wang MTM, Craig JP (2019) Natural history of dry eye disease: Perspectives from inter-ethnic comparison studies. *Ocul. Surf.* 17:424–433
44. Song P, Xia W, Wang M, et al (2018) Variations of dry eye disease prevalence by age, sex and geographic characteristics in China: A systematic review and meta-analysis. *J Glob Health* 8:. <https://doi.org/10.7189/jogh.08.020503>
45. Gupta PK, Asbell P, Sheppard J (2019) Current and Future Pharmacological Therapies for the Management of Dry Eye. *Eye Contact Lens*. <https://doi.org/10.1097/ICL.0000000000000666>
46. Patel VD, Watanabe JH, Strauss JA, Dubey AT (2011) Work productivity loss in patients with dry eye disease: an online survey. *Curr Med Res Opin* 27:1041–8. <https://doi.org/10.1185/03007995.2011.566264>
47. Zhou L, Beuerman RW (2012) Tear analysis in ocular surface diseases. *Prog Retin Eye Res* 31:527–550. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2012.06.002>
48. Ludány A (2011) A testnedvek fehérje-összetételének diagnosztikus kémlelése. In: Andrea L (ed) *A fehérjekutatás modern módsszertana*. Budapest, pp 294–295.
49. Fung K, Morris C, Duncan M (2002) Mass spectrometric techniques applied to the analysis of human tears: a focus on the peptide and protein constituents. *Adv Exp Med Biol* 506:601–605. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0717-8_84
50. Taormina C, Baca J, Asher S, et al (2007) Analysis of tear glucose concentration with electrospray ionization mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 18:332–336. <https://doi.org/10.1016/J.JASMS.2006.10.002>

51. Suttorp-Schulten M, Luyendijk L, Kok J, Kijlstra A (1989) HPLC analysis of tear proteins in giant papillary conjunctivitis. *Doc Ophthalmol* 72:235–240. <https://doi.org/10.1007/BF00153490>
52. Boonstra A, Breebaart A, Brinkman C, et al (1988) Factors influencing the quantitative determination of tear proteins by high performance liquid chromatography. *Curr Eye Res* 7:893–901. <https://doi.org/10.3109/02713688808997246>
53. Lin CC, Kuo MT, Chang HC (2010) Review: Raman spectroscopy - A novel tool for noninvasive analysis of ocular surface fluid. *J Med Biol Eng* 30:343–354. <https://doi.org/10.5405/JMBE.846>
54. Butler H, Ashton L, Bird B, et al (2016) Using Raman spectroscopy to characterize biological materials. *Nat Protoc* 11:664–687. <https://doi.org/10.1038/NPROT.2016.036>
55. Erckens R, Jongsma F, Wicksted J, et al (2001) Raman spectroscopy in ophthalmology: from experimental tool to applications in vivo. *Lasers Med Sci* 16:236–252. <https://doi.org/10.1007/PL00011360>
56. Zhou L, Beuerman RW (2017) The power of tears: how tear proteomics research could revolutionize the clinic. *Expert Rev Proteomics* 14:189–191. <https://doi.org/10.1080/14789450.2017.1285703>
57. Zhou L, Zhao SZ, Koh SK, et al (2012) In-depth analysis of the human tear proteome. *J Proteomics* 75:3877–3885. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.053>
58. Schubert O, Röst H, Collins B, et al (2017) Quantitative proteomics: challenges and opportunities in basic and applied research. *Nat Protoc* 12:1289–1294. <https://doi.org/10.1038/NPROT.2017.040>
59. Adigal SS, Rizvi A, Rayaroth N V., et al (2021) Human tear fluid analysis for clinical applications: progress and prospects. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 21:767–787
60. Kalló G, Chatterjee A, Tóth M, et al (2015) Relative quantification of human β -defensins by a proteomics approach based on selected reaction monitoring. *Rapid Commun Mass Spectrom* 29:1623–1631. <https://doi.org/10.1002/rcm.7259>
61. Abrahamsson A, Rzepecka A, Dabrosin C (2018) Equal pro-inflammatory profiles of CCLs, CXCLs, and matrix metalloproteinases in the extracellular microenvironment in vivo in human dense breast tissue and breast cancer. *Front Immunol* 8:1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01994>
62. Larsson A, Carlsson L, Lind A-L, et al (2015) The body mass index (BMI) is significantly correlated with levels of cytokines and chemokines in cerebrospinal fluid. *Cytokine* 76:514–518. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.07.010>
63. Björkesten J, Enroth S, Shen Q, et al (2017) Stability of Proteins in Dried Blood Spot Biobanks. *Mol Cell Proteomics* 16:1286–1296. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA117.000015>
64. Lamy R, Farber-Katz S, Vives F, et al (2020) Comparative Analysis of Multiplex Platforms for Detecting Vitreous Biomarkers in Diabetic Retinopathy. *Transl Vis Sci Technol* 9:3–3. <https://doi.org/10.1167/TVST.9.10.3>
65. Our PEA technology - Olink. <https://www.olink.com/our-platform/our-pea-technology/>
66. Rentka A, Koroskenyi K, Harsfalvi J, et al (2017) Evaluation of commonly used tear sampling methods and their relevance in subsequent biochemical analysis. *Ann Clin Biochem* 54:521–529. <https://doi.org/10.1177/0004563217695843>
67. García-Porta N, Mann A, Sáez-Martínez V, et al (2018) The potential influence of Schirmer

- strip variables on dry eye disease characterisation, and on tear collection and analysis. *Cont Lens Anterior Eye* 41:47–53. <https://doi.org/10.1016/J.CLAE.2017.09.012>
68. Lam S, Tong L, Duan X, et al (2014) Extensive characterization of human tear fluid collected using different techniques unravels the presence of novel lipid amphiphiles. *J Lipid Res* 55:289–298. <https://doi.org/10.1194/JLR.M044826>
 69. Small D, Hevy J, Tang-Liu D (2000) Comparison of tear sampling techniques for pharmacokinetics analysis: ofloxacin concentrations in rabbit tears after sampling with schirmer tear strips, capillary tubes, or surgical sponges. *J Ocul Pharmacol Ther* 16:439–446. <https://doi.org/10.1089/JOP.2000.16.439>
 70. Pieczyński J, Szulc U, Harazna J, et al (2021) Tear fluid collection methods: Review of current techniques. *Eur J Ophthalmol*. <https://doi.org/10.1177/1120672121998922>
 71. Bachhuber F, Huss A, Senel M, Tumani H (2021) Diagnostic biomarkers in tear fluid: from sampling to preanalytical processing. *Sci Reports* 2021 11:1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89514-8>
 72. Ma W, Yuen J, Ying, Sze HON, et al (2021) Critical role of mass spectrometry proteomics in tear biomarker discovery for multifactorial ocular diseases (Review). *Int J Mol Med* 47:. <https://doi.org/10.3892/IJMM.2021.4916>
 73. Nättinen J, Aapola U, Jylhä A, et al (2020) Comparison of Capillary and Schirmer Strip Tear Fluid Sampling Methods Using SWATH-MS Proteomics Approach. *Transl Vis Sci Technol* 9:16–16. <https://doi.org/10.1167/TVST.9.3.16>
 74. Stuchell RN, Feldman JJ, Farris RL, Mandel ID (1984) The effect of collection technique on tear composition. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25:374–377
 75. Esmaeelpour M, Cai J, Watts P, et al (2008) Tear sample collection using cellulose acetate absorbent filters. *Ophthalmic Physiol Opt* 28:577–583. <https://doi.org/10.1111/J.1475-1313.2008.00603.X>
 76. Inic-Kanada A, Nussbaumer A, Montanaro J, et al (2012) Comparison of ophthalmic sponges and extraction buffers for quantifying cytokine profiles in tears using Luminex technology. *Mol Vis* 18:2717
 77. López-Cisternas J, Castillo-Díaz J, Traipe-Castro L, López-Solís RO (2006) Use of polyurethane minisponges to collect human tear fluid. *Cornea* 25:312–318. <https://doi.org/10.1097/01.ico.0000183531.25201.0d>
 78. Roman LC, Edwards RP, Kelly LA, et al (2000) Optimization of the Weck-Cel collection method for quantitation of cytokines in mucosal secretions. *Clin Diagn Lab Immunol* 7:45–48. <https://doi.org/10.1128/cdli.7.1.45-48.2000>
 79. Csősz É, Kalló G, Márkus B, et al (2017) Quantitative body fluid proteomics in medicine — A focus on minimal invasiveness. *J Proteomics* 153:30–43. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.08.009>
 80. Green-Church KB, Nichols KK, Kleinholz NM, et al (2008) Investigation of the human tear film proteome using multiple proteomic approaches. *Mol Vis* 14:456–470
 81. Schuster AK, Erb C, Hoffmann EM, et al (2020) The diagnosis and treatment of glaucoma. *Dtsch Arztebl Int* 117:225–234. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2020.0225>
 82. Tham Y-C, Li X, Wong TY, et al (2014) Global Prevalence of Glaucoma and Projections of Glaucoma Burden through 2040: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ophthalmology*

121:2081–90. <https://doi.org/10.1016/j.opthta.2014.05.013>

83. Evangelho K, Mogilevskaya M, Losada-Barragan M, Vargas-Sanchez JK (2019) Pathophysiology of primary open-angle glaucoma from a neuroinflammatory and neurotoxicity perspective: a review of the literature. *Int. Ophthalmol.* 39:259–271
84. Wang Y, Hou X-W, Liang G, Pan C-W (2021) Metabolomics in Glaucoma: A Systematic Review. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 62:. <https://doi.org/10.1167/IOVS.62.6.9>
85. Van Bergen T, Van de Velde S, Vandewalle E, et al (2014) Improving patient outcomes following glaucoma surgery: state of the art and future perspectives. *Clin Ophthalmol* 8:857–67. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S48745>
86. Holló G (2017) Wound Healing and Glaucoma Surgery: Modulating the Scarring Process with Conventional Antimetabolites and New Molecules. *Dev Ophthalmol* 59:80–89. <https://doi.org/10.1159/000458488>
87. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, et al (2008) Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 16:585–601
88. Eslani M, Movahedan A, Afsharkhamseh N, et al (2014) The Role of Toll-Like Receptor 4 in Corneal Epithelial Wound Healing. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 55:6108. <https://doi.org/10.1167/iov.14-14736>
89. Ljubimov A, Saghizadeh M (2016) Progress in corneal wound healing. *Prog Retin Eye Res* 49:17–45. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.07.002>
90. Ashby BD, Garrett Q, Willcox MD (2014) Corneal Injuries and Wound Healing – Review of Processes and Therapies. *Austin J Clin Ophthalmol* 1:1–25. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019055108>
91. Maycock NJR, Marshall J (2014) Genomics of corneal wound healing: a review of the literature. *Acta Ophthalmol* 92:e170–e184. <https://doi.org/10.1111/aos.12227>
92. Yu FSX, Yin J, Xu K, Huang J (2010) Growth factors and corneal epithelial wound healing. *Brain Res Bull* 81:229–235. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.08.024>
93. Spadea L, Giammaria D, Trabucco P (2016) Corneal wound healing after laser vision correction. *Br J Ophthalmol* 100:28–33. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2015-306770>
94. Olayanju JA, Hassan MB, Hodge DO, Khanna CL (2015) Trabeculectomy-Related Complications in Olmsted County, Minnesota, 1985 Through 2010. *JAAMA Ophthalmol* 133:574–580. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.12.037>
95. Csutak A, Tózsér J, Békési L, et al (2000) Plasminogen activator activity in tears after excimer laser photorefractive keratectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:3743–3747
96. Saleh TA, McDermott B, Bates AK, Ewings P (2006) Phenol red thread test vs Schirmer’s test: A comparative study. *Eye* 20:913–915. <https://doi.org/10.1038/sj.eye.6702052>
97. Quantel Medical. <https://www.quantel-medical.com/products/ophthalmology/dry-eye/lacrydiag-en>
98. Jain RK, Mehta R, Dimitrov R, et al (2011) Atypical ductal hyperplasia: Interobserver and intraobserver variability. *Mod Pathol* 24:917–923. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.66>
99. Craig JP, Tomlinson A (1997) Importance of the lipid layer in human tear film stability and evaporation. *Optom Vis Sci* 74:8–13. <https://doi.org/10.1097/00006324-199701000-00014>

100. Wang MTM, Jaitley Z, Lord SM, Craig JP (2015) Comparison of self-applied heat therapy for meibomian gland dysfunction. *Optom Vis Sci* 92:e321--e326.
<https://doi.org/10.1097/OPX.0000000000000601>
101. Lemp MA, Hamill JR (1973) Factors Affecting Tear Film Breakup in Normal Eyes. *Arch Ophthalmol* 89:103–105. <https://doi.org/10.1001/archopht.1973.01000040105007>
102. Vidas Pauk S, Petriček I, Jukić T, et al (2019) Noninvasive tear film break-up time assessment using handheld lipid layer examination instrument. *Acta Clin Croat* 58:63–71.
<https://doi.org/10.20471/acc.2019.58.01.09>
103. Nichols JJ, Nichols KK, Puent B, et al (2002) Evaluation of tear film interference patterns and measures of tear break-up time. *Optom Vis Sci* 79:363–369.
<https://doi.org/10.1097/00006324-200206000-00009>
104. Bron AJ, Abelson MB, Ousler G, et al (2007) Methodologies to diagnose and monitor dry eye disease: Report of the diagnostic methodology subcommittee of the international Dry Eye Workshop (2007). In: *Ocular Surface*. ETHIS COMMUNICATIONS, INC., pp 108–152
105. Abelson MB, Ousler GW, Nally LA, et al (2002) Alternative reference values for tear film break up time in normal and dry eye populations. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. pp 1121–1125
106. Bhandari V, Reddy JK, Relekar K, et al (2016) Non-invasive assessment of tear film stability with a novel corneal topographer in Indian subjects. *Int Ophthalmol* 36:781–790.
<https://doi.org/10.1007/s10792-016-0186-7>
107. Berta A (1983) Collection of tear samples with or without stimulation. *Am J Ophthalmol* 96:115–6
108. Saldanha AJ (2004) Java Treeview--extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics* 20:3246–3248. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth349>
109. Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, et al (2017) The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res* 45:D362–D368. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw937>
110. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, et al (2015) STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res* 43:D447–D452.
<https://doi.org/10.1093/nar/gku1003>
111. Cicchetti D V. (1994) Guidelines, Criteria, and Rules of Thumb for Evaluating Normed and Standardized Assessment Instruments in Psychology. *Psychol Assess* 6:284–290.
<https://doi.org/10.1037/1040-3590.6.4.284>
112. McHugh ML (2012) Interrater reliability: The kappa statistic. *Biochem Medica* 22:276–282.
<https://doi.org/10.11613/bm.2012.031>
113. Bland JM, Altman DG (1990) A note on the use of the intraclass correlation coefficient in the evaluation of agreement between two methods of measurement. *Comput Biol Med* 20:337–340. [https://doi.org/10.1016/0010-4825\(90\)90013-F](https://doi.org/10.1016/0010-4825(90)90013-F)
114. Kuznetsova A, Brockhoff PB, Christensen RHB (2017) **lmerTest** Package: Tests in Linear Mixed Effects Models. *J Stat Softw* 82:. <https://doi.org/10.18637/jss.v082.i13>
115. Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc B* 57:289–300.
<https://doi.org/10.2307/2346101>

116. Tukey JW (1949) Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics* 5:99–114
117. Csősz É, Tóth N, Deák E, et al (2018) Wound-healing markers revealed by proximity extension assay in tears of patients following glaucoma surgery. *Int J Mol Sci* 19:. <https://doi.org/10.3390/ijms19124096>
118. Arita R, Itoh K, Inoue K, Amano S (2008) Noncontact Infrared Meibography to Document Age-Related Changes of the Meibomian Glands in a Normal Population. *Ophthalmology* 115:911–915. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2007.06.031>
119. Xiao J, Adil MY, Olafsson J, et al (2019) Diagnostic Test Efficacy of Meibomian Gland Morphology and Function. *Sci Rep* 9:. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54013-4>
120. Gulmez Sevim D, Gumus K, Unlu M (2020) Reliable, Noncontact Imaging Tool for the Evaluation of Meibomian Gland Function: Sirius Meibography. *Eye Contact Lens* 46:S135–S140. <https://doi.org/10.1097/ICL.0000000000000651>
121. Robin M, Liang H, Baudouin C, Labbé A (2020) In vivo Meibomian gland imaging techniques: A review of the literature. *J Fr Ophtalmol* 43:. <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2019.11.003>
122. Markoulli M, Duong TB, Lin M, Papas E (2018) Imaging the Tear Film: A Comparison Between the Subjective Keeler Tearscope-Plus™ and the Objective Oculus® Keratograph 5M and LipiView® Interferometer. *Curr Eye Res* 43:155–162. <https://doi.org/10.1080/02713683.2017.1393092>
123. Wang J, Aquavella J, Palakuru J, et al (2006) Relationships between central tear film thickness and tear menisci of the upper and lower eyelids. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 47:4349–4355. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-1654>
124. Ward CD, Murchison CE, Petroll WM, Robertson DM (2021) Evaluation of the repeatability of the lacrydiag ocular surface analyzer for assessment of the meibomian glands and tear film. *Transl Vis Sci Technol* 10:. <https://doi.org/10.1167/tvst.10.9.1>
125. Patel S, Murray D, McKenzie A, et al (1985) Effects of fluorescein on tear breakup time and on tear thinning time. *Optom Vis Sci* 62:188–190. <https://doi.org/10.1097/00006324-198503000-00006>
126. Nichols JJ, Nichols KK, Puent B, et al (2002) Evaluation of Tear Film Interference Patterns and Measures of Tear Break-Up Time. *Optom Vis Sci* 79:363–369
127. Remongin PE, Rousseau A, Best AL, et al (2021) Multimodal evaluation of the ocular surface using a the new Lacrydiag device. *J Fr Ophtalmol* 44:313–320. <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2020.06.045>
128. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, et al (2008) Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*. 16:585–601
129. Roversi P, Marti L, Caputo AT, et al (2017) Interdomain conformational flexibility underpins the activity of UGGT, the eukaryotic glycoprotein secretion checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:8544–8549. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703682114>
130. Tadokoro S, Ide S, Tokuyama R, et al (2015) Leptin promotes wound healing in the skin. *PLoS One* 10:1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121242>
131. Kook H, Itoh H, Choi BS, et al (2003) Physiological concentration of atrial natriuretic peptide induces endothelial regeneration in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284:H1388-97. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00414.2002>

132. Lee TW, Kwon YW, Park GT, et al (2018) Atrial natriuretic peptide accelerates human endothelial progenitor cell-stimulated cutaneous wound healing and angiogenesis. *Wound Repair Regen* 26:116–126. <https://doi.org/10.1111/wrr.12641>
133. Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A (2000) Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr. Relat. Cancer* 7:165–197
134. Bernasconi R, Nystrom A (2018) Balance and circumstance: The renin angiotensin system in wound healing and fibrosis. *Cell Signal* 51:34–46. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.07.011>
135. Lutgens E, Cleutjens KBJM, Heeneman S, et al (2000) Both early and delayed anti-CD40L antibody treatment induces a stable plaque phenotype. *Proc Natl Acad Sci* 97:7464–7469. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.13.7464>
136. Chauhan AK, Kisucka J, Brill A, et al (2008) ADAMTS13: a new link between thrombosis and inflammation. *J Exp Med* 205:2065–2074. <https://doi.org/10.1084/jem.20080130>
137. Dhall S, Karim ZA, Khasawneh FT, Martins-Green M (2016) Platelet Hyperactivity in *TNFSF14/LIGHT* Knockout Mouse Model of Impaired Healing. *Adv Wound Care* 5:421–431. <https://doi.org/10.1089/wound.2016.0687>
138. Krause P, Zahner SP, Kim G, et al (2015) The Tumor Necrosis Factor Family Member TNFSF14 (LIGHT) is Required for Resolution of Intestinal Inflammation in Mice. 146:1752–1762. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.02.010>
139. Lin Q, Fang D, Fang J, et al (2011) Impaired Wound Healing with Defective Expression of Chemokines and Recruitment of Myeloid Cells in TLR3-Deficient Mice. *J Immunol* 186:3710–3717. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003007>
140. Kiang JG, Zhai M, Liao PJ, et al (2017) Thrombopoietin Receptor Agonist Mitigates Hematopoietic Radiation Syndrome and Improves Survival after Whole-Body Ionizing Irradiation Followed by Wound Trauma. *Mediators Inflamm* 2017:. <https://doi.org/10.1155/2017/7582079>
141. Adair JE, Stober V, Sobhany M, et al (2009) Inter- α -trypsin inhibitor promotes bronchial epithelial repair after injury through vitronectin binding. *J Biol Chem* 284:16922–16930. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808560200>
142. Barker H, Aaltonen M, Pan P, et al (2017) Role of carbonic anhydrases in skin wound healing. *Exp Mol Med* 49:e334. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.60>
143. Ramirez-Carrozzi V, Sambandam A, Luis E, et al (2011) IL-17C regulates the innate immune function of epithelial cells in an autocrine manner. *Nat Immunol* 12:1159–1166. <https://doi.org/10.1038/ni.2156>
144. Johnston A, Fritz Y, Dawer SM, et al (2013) Keratinocyte overexpression of IL-17C promotes psoriasiform skin inflammation. *J Immunol* 190:2252–2262. <https://doi.org/10.1002/bmb.20244>
145. Zhang W, Magadi S, Li Z, et al (2017) IL-20 promotes epithelial healing of the injured mouse cornea. *Exp Eye Res* 154:22–29. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2016.11.006>
146. Sziksz E, Pap D, Lippai R, et al (2015) Fibrosis Related Inflammatory Mediators: Role of the IL-10 Cytokine Family. *Mediators Inflamm* 2015:. <https://doi.org/10.1155/2015/764641>
147. Papanastasiou AD, Sirinian C, Kalofonos HP (2012) Identification of novel human receptor activator of nuclear factor- κ B isoforms generated through alternative splicing: implications in

- breast cancer cell survival and migration. *Breast Cancer Res* 14:R112. <https://doi.org/bcr3234> [pii];10.1186/bcr3234 [doi]
148. Hui Q, Jin Z, Li X, et al (2018) FGF Family: From Drug Development to Clinical Application. *Int J Mol Sci* 19:. <https://doi.org/10.3390/ijms19071875>
 149. Song Z, Yang F, Du H, et al (2018) Role of artemin in non-small cell lung cancer. *Thorac cancer* 9:555–562. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.12615>
 150. Barrow AD, Palarasah Y, Bugatti M, et al (2015) OSCAR is a receptor for surfactant protein D that activates TNF- α release from human CCR2+ inflammatory monocytes. *J Immunol* 194:3317–3326. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402289>
 151. Fujiwara T, Dohi T, Maan ZN, et al (2017) Age-associated intracellular superoxide dismutase deficiency potentiates dermal fibroblast dysfunction during wound healing. *Exp Dermatol*. <https://doi.org/10.1111/exd.13404>
 152. Fleming TH, Theilen T-M, Masania J, et al (2013) Aging-dependent reduction in glyoxalase 1 delays wound healing. *Gerontology* 59:427–437. <https://doi.org/10.1159/000351628>
 153. Fleming T, Nawroth PP (2014) Reactive metabolites as a cause of late diabetic complications. *Biochem Soc Trans* 42:439–442. <https://doi.org/10.1042/BST20130265>
 154. Treiber N, Maity P, Singh K, et al (2012) The role of manganese superoxide dismutase in skin aging. *Dermatoendocrinol* 4:232–235. <https://doi.org/10.4161/derm.21819>
 155. Zaniolo K, Gingras M-E, Audette M, Guerin SL (2006) Expression of the gene encoding poly(ADP-ribose) polymerase-1 is modulated by fibronectin during corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:4199–4210. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-0176>
 156. El-Hamoly T, Hegedus C, Lakatos P, et al (2014) Activation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 delays wound healing by regulating keratinocyte migration and production of inflammatory mediators. *Mol Med* 20:363–371. <https://doi.org/10.2119/molmed.2014.00130>
 157. Rodrigues M, Gurtner G (2017) Black, White, and Gray: Macrophages in Skin Repair and Disease. *Curr Pathobiol Rep* 5:333–342. <https://doi.org/10.1007/s40139-017-0152-8>
 158. Li H, Cui Y, Luan J, et al (2016) PRELP (proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein) promotes osteoblastic differentiation of preosteoblastic MC3T3-E1 cells by regulating the β -catenin pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 470:558–562. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.01.106>
 159. Wolf M, Maltseva I, Clay SM, et al (2017) Effects of MMP12 on cell motility and inflammation during corneal epithelial repair. *Exp Eye Res* 160:11–20. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2017.04.007>
 160. Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T (1992) Interleukin 6 promotes epithelial migration by a fibronectin-dependent mechanism. *J Cell Physiol* 153:1–5. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041530102>
 161. Gollnick SO, Evans SS, Baumann H, et al (2003) Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation. *Br J Cancer* 88:1772–1779. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600864>
 162. Zakaria N, Van Grasdorff S, Wouters K, et al (2012) Human tears reveal insights into corneal neovascularization. *PLoS One* 7:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036451>

11. Tárgyszavak/key words

száraz szem betegség / dry eye disease

alsó könnymeniszkusz magasság / lower tear meniscus height

könnyfilm felszakadási idő / tear film break-up time

meibográfia / meibography

interferometria / interferometry

proximity extension assay / proximity extension assay

könny / tear

glaukóma / glaucoma

sebgyógyulás / wound healing

gyulladás / inflammation

12. Köszönetnyilvánítás

Hálás szívvel szeretném megköszönni témavezetőmnek és mentoromnak, Dr. Csutak Adrienne Professzornőnek a magas szintű szakmai támogatását, folyamatos bátorítását és a sok közös munkát, mely a PhD képzést követően is tovább folytatódik.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Berta Andrásnak, hogy a PhD munkám elvégzését lehetővé tette a vezetése alatt álló Klinikán.

Köszönöm Prof. Dr. Tózsér Józsefnek és Dr. Csősz Évának, valamint a DE-ÁOK Biokémiai Intézet Proteomikai laborjának a közös kollaborációt, valamint a munkacsoportba történő befogadásukat.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Németh Gábor Főorvos Úrnak, hogy a TDK hallgató éveim alatt megmutatta a szemészet szépségét és elindított ezen az úton.

Köszönettel tartozom minden szerzőtársamnak, különös tekintettel Dr. Szalai Eszternek.

Köszönöm a Debreceni Egyetem Szemklinika és a Pécsi Tudományegyetem Szemészeti Klinika dolgozóinak, valamint a kutatásban résztvevők türelmét és közreműködését.

Férjem, valamint Szüleim mindvégig mellettem álltak, a felém tanúsított támogatásuk és lelkes ösztönzésük nagyban hozzájárult az elképzeléseim megvalósításához.

13. Az értekezés alapjául szolgáló és egyéb közlemények hitelesített listája



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/438/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Tóth Noémi

Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Tóth, N.**, Szalai, E., Rák, T., Lillik, V., Nagy, A. C., Csutak, A.: Reliability and clinical applicability of a novel tear film imaging tool.
Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 259 (7), 1935-1943, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00417-021-05162-8>
IF: 3.117 (2020)
2. Csósz, É., **Tóth, N.**, Deák, E., Csutak, A., Tözsér, J.: Wound-Healing Markers Revealed by Proximity Extension Assay in Tears of Patients following Glaucoma Surgery.
Int. J. Mol. Sci. 19 (12), 1-19, 2018.
DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms19124096>
IF: 4.183

További közlemények

3. **Tóth, N.**, Silver, D. M., Balla, S., Káplár, M., Csutak, A.: In vivo corneal confocal microscopy and optical coherence tomography on eyes of participants with type 2 diabetes mellitus and obese participants without diabetes.
Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. [Epub ahead of print], 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00417-021-05251-8>
IF: 3.117 (2020)
4. Szalai, E., **Tóth, N.**, Kolkedi, Z., Varga, C., Csutak, A.: Comparison of various intraocular lens formulas using a new high-resolution swept-source optical coherence tomographer.
J. Cataract. Refract. Surg. 46 (8), 1138-1141, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/j.jcrs.0000000000000329>
IF: 3.351





5. Csősz, É., Deák, E., **Tóth, N.**, Traverso, C. E., Csutak, A., Tőzsér, J.: Comparative analysis of cytokine profiles of glaucomatous tears and aqueous humour reveals potential biomarkers for trabeculectomy complications.
FEBS Open Bio. 9 (5), 1020-1028, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/2211-5463.12637>
IF: 2.231
6. Deák, E., Szalai, E., **Tóth, N.**, Malik, R. A., Berta, A., Csutak, A.: Longitudinal changes in corneal cell and nerve fiber morphology 2 in young patients with type 1 diabetes with and without diabetic 3 retinopathy: a 2-year follow-up study.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 60 (2), 830-837, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1167/iops.18-24516>
IF: 3.47
7. Csutak, A., **Tóth, N.**: A száraz szem és a szisztémás betegségek közötti kapcsolat.
Háziorv. továbbk. szle. 23, 15-19, 2018.
8. **Tóth, N.**, Csutak, A., Hassan, Z., Deák, E., Módis, L., Németh, G.: Comparing Refractive and Scheimpflug-image Based Parameters between Right and Left Eyes and between Dominant and Non-dominant Eyes Related to Handedness.
OR. 9 (3), 1-8, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.9734/OR/2018/46026>
9. Csutak, A., **Tóth, N.**: Gyulladt száraz szem.
In: A száraz szem kezelése. Szerk.: Berta András, Csutak Adrenne, Kolozsvári Bence, Módis László, Bauch & Lomb, [s.l.], 4-11, 2017.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 19,469

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
7,3**

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

Debrecen, 2021.09.13.

