

## **A corneális stromahomály (haze) kialakulásának biokémiai háttere photorefraktív lézerkezelést követően**

### Vállalt feladatok

a) A könny plazminogén aktivátor aktivitás (PAA) - nak, valamint plazminogén aktivátor inhibitor (PAI) szintjének vizsgálata különböző típusú refraktív lézerkezelések kapcsán. Célunk a sebgyógyulás plazminogén aktivátor / plazmin rendszerének, valamint az aktivált keratociták rendszerének – egyensúlyának - tanulmányozása az eltérő típusú műtéti technikák során.

b) Vizsgálataink további részében a PAI 2 eredetére kerestük a választ. A terhesség során már ismert emelkedett vér PAI 2 szint, és a könny PAI 2 szintjének változása közötti kapcsolatot tanulmányoztuk, annak megismerésére, hogy a vér PAI 2 szintje hatással van-e a könny PAI 2 szintjének változására.

c) Állatkísérletben (nyúl) tanulmányoztuk az urokináz típusú plazminogén aktivátor (uPA) génszintű szabályozását szemcsepp formájában alkalmazott uPA pótlással, mellyel célunk az esetlegesen alkalmazható hatóanyag hatásmechanizmusának megismerése volt.

d) Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) – rendszer és az uPA / plazmin rendszer kapcsolatának vizsgálata a könnyben PRK kezelést követően. Tekintettel arra, hogy a corneális stromahomály és a myopiás regresszió hátterében elsősorban a corneális stroma biokémiai folyamatai játszanak kulcsszerepet.

### Háttér

A refraktív lézersebészeti beavatkozások alkalmasak a szaruhártya felszínének re-profilálására mely által lehetőséget biztosítanak a különböző típusú refrakciós hibák – veleszületett vagy szerzett - korrigálására. A leggyakoribb műtéti típusok közé a photorefractive keratectomia (PRK) és a lézer „in situ” keratomileusis (LASIK) tartoznak.

PRK során a corneális epithelium lekaparását követően az excimer lézer evaporálja a szaruhártya stromális rétegének meghatározott részét, melynek eredményeként a szaruhártya felszíne re-profilálódik és az optikai törőerő megváltozik. A re-epithelizáció általában 2-3 napot vesz igénybe.

A posztoperatív komplikációk közül a leggyakoribbak a myopiás regresszió, valamint a vizuális aberrációk (haze, halo, glare) melyek háttérben a corneális transzparencia változása áll a sebgyógyulási folyamatok irregularitásának eredményeként.

LASIK műtét során - mikrokeratom vagy femtosecond lézer segítségével - a stromális rétegben egy 160 vagy 180 $\mu$ m vastagságú flap készül. Az excimer lézer a flap felemelését követően ablálja a stromális réteget és reprofilálja a szaruhártya törőerejét, majd a műtét végén a flap-et eredeti pozíciójába helyezik vissza.

A LASIK típusú műtét fő előnye a PRK eljárással szemben az, hogy a korai posztoperatív időszakban nincsen fájdalomérzet, hiszen az érzőideg végződése a flap visszahelyezésével nem maradnak szabadon. A látásélesség visszanyerése/javulása is gyorsabb, mint PRK kezelés esetén.

A leggyakoribb LASIK komplikációk: flap-hez kapcsolódó problémák, refraktív hiba alulkorrektció, regresszió, asztigmia, decentráció, valamint vizuális problémák (glare, halo és haze). Ezen típusú műtéti beavatkozást követően a szenzoros denerváció időtartama hosszú, mely „száraz szem” kialakulásához vezethet.

A refraktív lézersebészeti beavatkozások elektív műtétek, egészséges szemeken történnek és sok vonatkozásban a kozmetikai műtétekhez hasonlíthatók. Komplikációk ilyen műtétek esetén még kevésbé elfogadhatók, mint sérült illetve beteg szemeken végzett beavatkozások esetében.

A refraktív lézersebészeti beavatkozást esetenként követő transzparencia csökkenés háttérben valószínűleg az aktivált keratociták, valamint az elülső stroma lamellák károsodása áll. A haze kialakulása – amennyiben az kialakul - a kezelést követően néhány héten, illetve hónapon belül következik be. A lefolyás hetek – hónapok között változik, esetenként évekig is elhúzódhat, melynek mind a súlyossági foka mind a lefolyása változó.

Az urokináz-típusú plazminogén aktivátor -szerin proteáz-, mely megtalálható a normál könnyben és a szaruhártya sejtjeiben. A corneális sebgyógyulás biokémiai folyamatában, az uPA és a PAI igen fontos szerepet játszik mind a szöveti destrukció, mind a szöveti gyógyulás során. A proteolitikus enzimrendszerben az uPA felelős az inaktív plazminogén aktív plazminná történő átalakításáért. A uPA-ra a PAI 1 és PAI 2 gyakorol gátló hatást. A plazmin – egyéb enzimekkel- szerepet játszik az extracelluláris fibronektin és a laminin degradációjában, befolyásolja a sejtváándorlást és a sebgyógyulási folyamatokat. A plazmin aktiválja a látens prokollagenázt kollagenázzá, mellyel elindítja a kollagén molekulák destrukcióját és pozitív visszacsatolással hatva a fibroblasztokra még több uPA-t szekretáltat.

Feladatunkként azt tűztük ki, hogy jobban megismerjük a PRK és LASIK kezelést követő sebgyógyulás folyamatát, ezért a könnyminták uPA aktivitását (uPAA) és PAI szintjét mértük a könnyben a corneális sebgyógyulás folyamán refraktív sebészeti beavatkozások előtt és után.

Az alábbiakban munkánk metódusait és eredményeit ismertetjük.

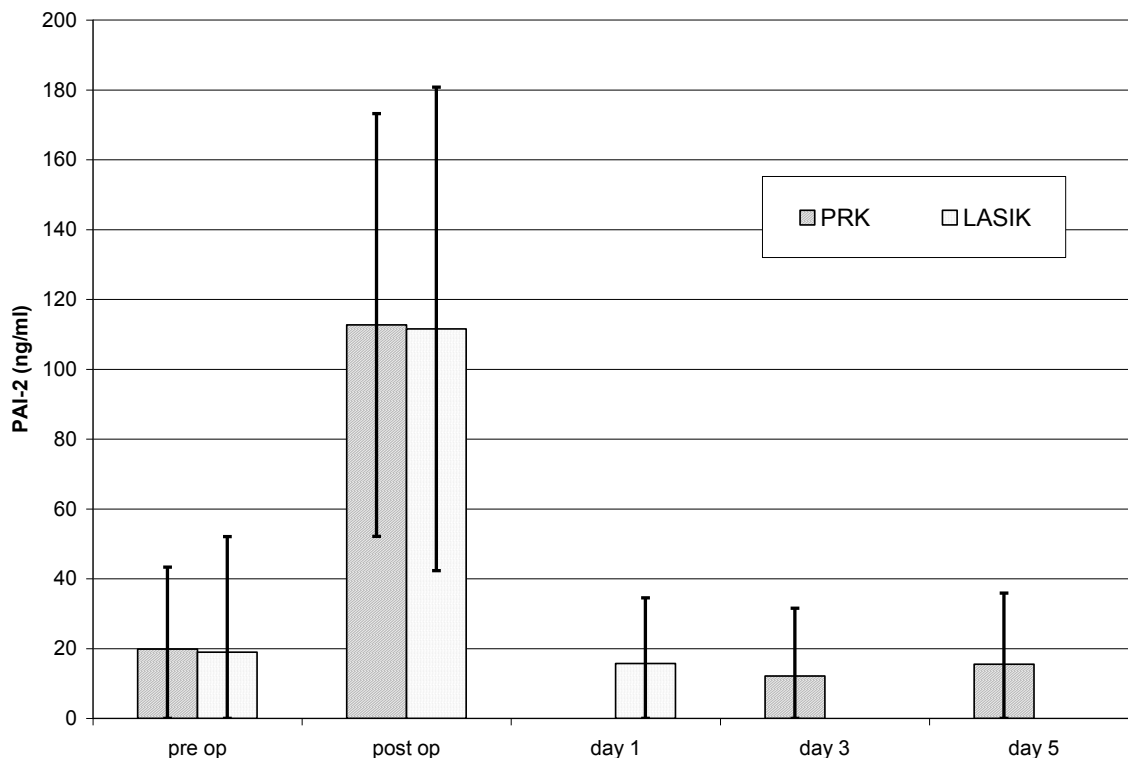
a) A könny plazminogén aktivátor aktivitás (PAA) - nak, valamint plazminogén aktivátor inhibitor (PAI) szintjének vizsgálata különböző típusú refraktív lézerkezelések kapcsán.

#### Anyagok és módszerek

46 páciensünk PRK és 13 páciensünk LASIK kezelését végeztük. A könnymintákat üveg-kapillárisal gyűjtöttük közvetlenül a kezelés előtt és után, valamint az első (LASIK), a harmadik (PRK) és az ötödik (PRK) posztoperatív napokon. Enzim kapcsolt „immunoassay”-t alkalmaztunk a PAI szintek meghatározásához. 61 PRK PAI-1, valamint 146 PRK és 35 LASIK minta PAI-2 meghatározását végeztük. A subepitheliális cornális stromahomály (haze) meghatározása Hanna szerinti stádium beosztás alapján történt.

## Eredmények

A PAI-1 szintje - összes vizsgált mintánkban (PRK) - a detektálható 1 ng/ml érték alatt volt. A PAI-2 szintje (PRK) preoperatív 19,8 (23,4) ng/ml, a műtétet követően 113 (60,5) ng/ml, a 3. posztoperatív napon 12,1 (19,5) ng/ml és az 5. posztoperatív nap 15,5 (20,4) ng/ml értékeket mértünk. Egy páciensünk esetében észleltünk emelkedett preoperatív PAI-2 szintet és haza kialakulását ennél az egy páciensünkénél észleltünk a későbbiekben. LASIK kezelés esetén a PAI-2 szint preoperatív 19,0 (33,1) ng/ml a műtétet követően 112 (69,2) ng/ml és az 1. posztoperatív napon 15,7 (18,8) ng/ml értékeket mértünk.. LASIK kezelést követően corneális stromahomályt nem észleltünk. Az Invest Ophthalmol Vis. Sci. (November 2000, Vol.41:3743-3747) –ben publikált PRK-t követő PAA változások nem mutattak szignifikáns eltérést a LASIK minták vizsgált PAA értékeitől.



1 ábra. A PAI-2 szint időbeni változása PRK és LASIK típusú műtétek során a páciensek könnymintáiban.

	átlag	sigma	maximum	minimum	esetszám
Pre-op	19.8	23.4	113.5	0.0	41
Post-op	112.7	60.5	238.2	8.2	42
3. post-op	12.1	19.5	79.9	0.0	44
5. post-op	15.5	20.4	78.8	0.0	19

1. táblázat: PAI-2 szintek változásai PRK típusú műtéttel operált betegek könnymintáiban (ng/ml).

	mean	sigma	maximum	Minimum	number
Pre-op	19.0	33.1	102.1	0.0	12
Post-op	111.5	69.2	237.6	27.7	12
Day 1	15.7	18.8	59.6	0.0	11

2. táblázat: PAI-2 szintek változásai LASIK típusú műtéttel operált betegek könnymintáiban (ng/ml).

### Konklúzió

PAI-2 antigén szintje mind PRK mind LASIK kezelést követően emelkedett, mely várhatóan befolyásolja a plazminogén aktivátor – plazmin rendszer működését. A két műtéti típus esetében (PRK, LASIK) észlelt hasonló enzimszint-változások, a corneális sebgyógyulási folyamatok azonos enzimatikus válaszreakcióját valószínűsítik. A magas preoperatív PAI-2 szint, mely tanulmányunkban PRK-t követően haze kialakulásához vezetett, prediszpozíciós faktor vagy oki tényező lehet a corneális stromahomály kialakulásában.

### Eredményeink eddigi ismertetése

- 1) Csutak A, Silver DM, Tózsér J, Steiber Z, Bagossi P, Hassan Z, Berta A. (2008): Plasminogen Activator Inhibitor in Human Tears After Laser Refractive

Surgery. Journal of Cataract & Refractive Surgery Jun;34(6):897-901. Impakt faktor:2.285).

- 2) Csutak A, Silver DM, Tözsér J, Berta A. (2007): Wound healing, haze and urokinase plasminogen activator after laser vision correction surgery. Johns Hopkins APL Technical Digest. 27(2):198-207.(Impakt faktor: 0.167).
- 3) Csutak A., Silver DM, Tözsér J, Steiber Z., Hassan Z., Berta A. Plasminogen activator for promoting wound healing after laser vision correction surgery. SOE & DOG, Berlin, Germany, September 2005.

b) A terhesség során ismert emelkedett vér PAI 2 szint, és a könny PAI 2 szintjének változása közötti kapcsolat vizsgálatai.

#### Anyagok és módszerek

23 páciensünk könny és vérmintáját vizsgáltuk, a terhes-gondozóban történt megjelenéseik alkalmával - végigkövetve a terhességi trimesztereket, valamint 2-5 nappal a szülést követően ismételt mintavételre került sor. A könnymintákat üvegkapillárisal gyűjtöttük az alsó könnymeniscusból ügyelve arra, hogy a kötőhártyát ne ingereljük a mintavételek közben. Centrifugálást követően -80°C-on tároltuk a mintákat. A vérmintavételekre a szokásos klinikai/laboratóriumi módszerrel került sor, a minták tárolása a könnymintáknak megfelelően történt az analízisig. A PAI szintek meghatározásához enzim kapcsolt „immunoassay”-t alkalmaztunk, 60 minta PAI-1 és 94 minta PAI-2 meghatározását végeztük, könny és vérmintákban. A vérmintákból ösztrogén és progeszteron szint meghatározása is történt párhuzamosan.

## Eredmények

A vér PAI -2 szintje a terhesség első heteiben alig érte el a detektálhatóság határát, vérszintje azonban a terhességi kor előrehaladtával lineárisan növekedett és a 35. gesztációs hétre 150-200ng/ml közötti értéktartományban mozgott. A vér PAI -1 szintje ugyan elmaradt a PAI -2 szintjétől, de már a korai terhességi szakban (1. trimeszter) jól detektálható volt. A könny PAI -1, valamint a PAI-2 szintjének analízise érdemi összefüggést a vérmintákkal nem mutatott, és az egyéni variációkat összevetve változatos mintázatot eredményezett. A vérminták ösztrógen, és progeszteron szintje folyamatos emelkedést mutatott a terhességi kor előrehaladtával, a vártnak megfelelően.

## Konklúzió

Vizsgálati eredményeink jelenleg nem támasztják alá, hogy közvetlen érdemi összefüggés lehet a könnyminták PAI szintje, valamint a vérminták inhibitor szintjei között.

c) Állatkísérletben (nyúl) tanulmányoztuk az urokináz típusú plazminogén aktivátor (uPA) génszintű szabályozását szemcsepp formájában alkalmazott uPA pótlással.

## Anyagok és módszerek

14 állat (nyúl) mindkét szemén Excimer lézerkezelést végeztünk, InPro Intraoculare Laser (PRK/PTK system Gauss, 193 nm) alkalmazásával. Az állatok egyik szemét antibiotikum tartalmú szemcseppel kezeltük, napi 5x (2-3 órás időköz), még az ellenoldali szem antibiotikum és aprotinin (kombinált) kezelést kapott. Abszolút kontrollként, a kísérletbe egy állat került bevonásra, melynek esetében PRK kezelését csak az egyik szemén végeztünk. Ezen abszolút kontroll állat esetében terápiában egyik szem sem részesült. Az állatok túlaltatása különböző időpontokban történt, 2 és 4 óra, valamint 1. és 3. nap, 2 – 4 állat felhasználásával.

A szaruhártyák egyik felét, uPA mRNS szint meghatározására használtuk - Reverz Transzkripciót és „Real Time – Quantitative Polymerase Chain Reaction” -t (RT-

QPCR) követően. A szaruhártyák másik feléből fagyaszott metszetek készültek, az uPA aktivitás „in situ zymographiával” történő detektálására.

### Eredmények

Az operálatlan szemek – abszolút kontroll állatok - vizsgálata során, a corneális sejtekből nyert uPA mRNS értéket alacsonynak találtuk, mely azonban markánsan megemelkedett a PRK kezelést követő 2. és 4. órában vizsgált minták eseteiben. A sebgyógyulás előrehaladtával jól korreláló uPA mRNS „up” regulációt figyeltünk meg, melyet azonban jelentősen befolyásolt – a műtétet megelőző - de-epithelizáció nagysága. Az uPA expresszióját az aprotinin tartalmú szemcsepp alkalmazása szignifikánsan csökkentette és függetlennek bizonyult az „up” reguláció mértékétől. Az „in situ zymographia” megerősítette az aprotinin uPA aktivitást csökkentő hatását.

### Konklúzió

A PRK kezelést követő re-epithelizációs időszakban az aprotinin „down” regulációt fejt ki az uPA gén expressziójára a nyúl cornea sejtjeiben.

### Eredményeink eddigi ismertetése

- 1) A. Csutak, DM. Silver, T. Sperka, J. Kádas, Gy. Vereb, A. Berta, J. Tőzsér. Urokinase downregulation by aprotinin in rabbit corneal cells after photorefractive keratectomy. Current Eye Res. *bírálat alatt*
- 2) Csutak A., Silver DM, Tőzsér J, Steiber Z., Hassan Z., Berta A. Haze prevention after laser vision correction surgery. World Ophthalmology Congress, Sao Paulo, Brazil, February 2006.



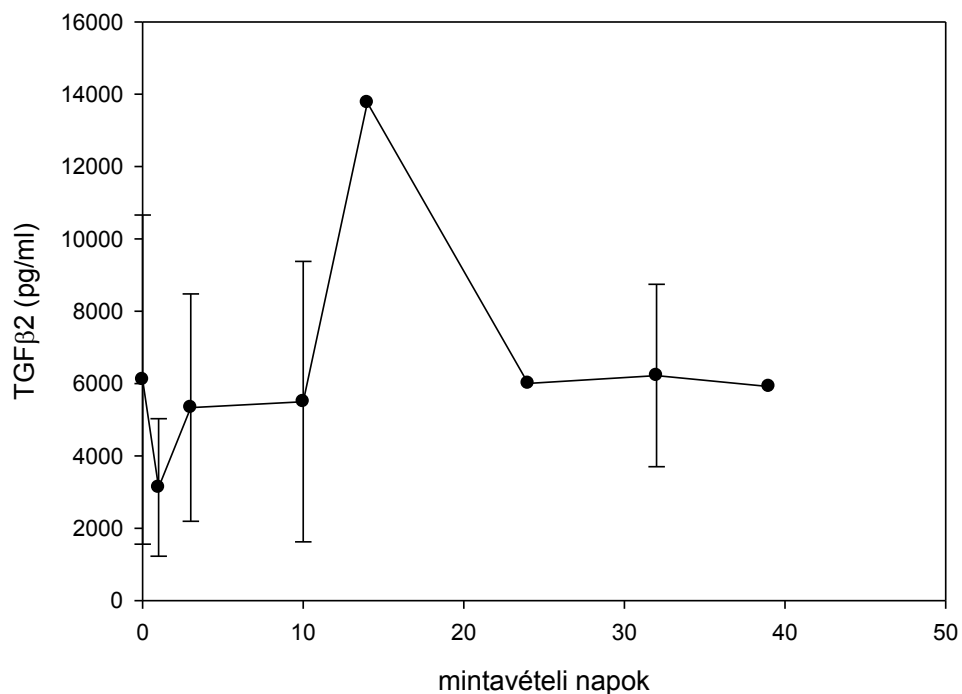
d) Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) – rendszer és az uPA / plazmin rendszer kapcsolatának vizsgálata a könnyben PRK kezelést követően.

Anyagok és módszerek

13 PRK típusú műtéten átesett páciensünk könnymintáinak TGF $\beta$  2-szintjét vizsgáltuk pre és posztoperatív, TGF $\beta$  2 specifikus KIT alkalmazásával.

Eredmények

10 páciensünk esetében a műtétet követően közvetlenül mért TGF $\beta$  2-szint csökkent, 3 páciensünk esetében azonban változást nem tudtunk detektálni. A posztoperatív időszakban - műtét utáni 3–32 nap - 9 páciensünk esetében jelentősen nőtt a TGF $\beta$  2-szintje, még 4 páciensünk esetében ezzel szemben csökkenés volt detektálható.



2. ábra: A TGF $\beta$  2 szintjének változása pácienseink könnymintáiban.

## Konklúzió

A TGFB 2-szintjének változására vonatkozó biokémiai folyamatok megértéséhez további ELISA, valamint western blott vizsgálatok szükségesek.

Támogatásukat ezúton is hálásan köszönjük!

Dr. Csutak Adrienne

Debrecen, 2010. január 22.