

**KÖNNY ÉS CORNEÁLIS BIOMARKEREK SZEREPE SZEMÉSZETI ÉS SZISZTÉMÁS
BETEGSÉGEK KORAI DIAGNOSZTIKÁJÁBAN**

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

DR. CSUTAK ADRIENNE



PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSI KAR SZEMÉSZETI KLINIKA

Pécs, 2020

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
1 BEVEZETÉS	7
1.1 A humán könny	7
1.2 A könny plazminogén aktivátor-plazminrendszere	8
1.2.1 Enzimkaskád a szaruhártya sebgyógyulási folyamataiban	11
1.3 A szaruhártya refraktív-lézersebészete	12
1.3.1 A szaruhártya refraktív lézersebészeti beavatkozásainak áttekintése	14
1.3.2 Fotorefraktív keratektómia (PRK)	16
1.3.3 Lézer-asszisztált <i>in situ</i> keratomileusis (LASIK)	19
1.4 A diabétesz mellituszról röviden	20
1.4.1 A diabéteszes retinopátia	21
1.4.2 A könnyfehérjék jelentősége diabéteszes retinopátiában	22
1.4.3 A diabétesz okozta szemszövődmények szűrése	22
1.4.4 Potenciálisan alkalmazható új szemészeti szűrőmodszerek	26
1.4.4.1 In vivo konfokális cornea mikroszkópia	26
1.4.4.2 Ultraszéles látószögű oftalmoszkópia	26
2 CÉLKITŰZÉSEK	29
3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	30
3.1 Refraktív célú lézersebészeti beavatkozásokkal kapcsolatos kísérletek	30
3.1.1 Fotorefraktív keratektómia	30
3.1.2 Lézer-asszisztált <i>in situ</i> keratomileusis	31
3.1.3 Könnymintavételek és a kapcsolódó biokémiai vizsgálatok	31
3.1.3.1 Könnymintavételek	31
3.1.3.2 Az urokináz típusú plazminogén aktivátor aktivitásának meghatározása	32
3.1.4 Állatkísérletek a haze tanulmányozására és a kapcsolódó biokémiai vizsgálatok	33
3.1.4.1 Állatmodell a haze indukálására és gátlására, a terhesség, mint rizikófaktor	33
3.1.4.2 Az urokináz típusú plazminogén aktivátor aktivitásának meghatározása	34
3.1.5 Humán vizsgálatok	36
3.1.5.1 A plazminogén aktivátor inhibitor szintek meghatározása refraktív lézersebészeti beavatkozások során	36
3.1.5.2 Plazminogén – aktivátor és inhibitor, valamint hormonszint vizsgálatok terhesség során	37

3.1.6	Statisztikai analízisek a refraktív lézersebészeti beavatkozásokkal kapcsolatosan	38
3.2	Szaruhártyafekély képződéséhez kapcsolódó kísérletek	39
3.2.1	Rekombináns plazminogén aktivátor inhibitor-2	39
3.2.2	Rekombináns plazminogén aktivátor inhibitor-2 alkalmazása állatmodellben	40
3.3	A cukorbetegség diabéteszes szemszövődményeihez kapcsolódó vizsgálatok	41
3.3.1	Diabéteszes retinopátiára jellemző könnyfehérjék azonosítása	41
3.3.2	Tanuló algoritmusok alkalmazhatósága a diabéteszes retinopátia szűrésére	43
3.3.3	Potenciálisan alkalmazható új szűrő módszer a szemészetben	45
3.3.3.1	In vivo konfokális cornea mikroszkópia	45
3.3.3.2	Ultraszéles látószögű pásztázó lézer oftalmoszkópia	47
4	EREDMÉNYEK	50
4.1	Könnyenzimek tanulmányozása a szaruhártya sebgyógyulási folyamataiban	50
4.1.1	Állatmodell alkalmazása a haze hatásmechanizmusának megismerésére, indukálására és gátlására; a vemhesség, mint rizikófaktor.	50
4.1.2	Az aprotinin hatásmechanizmusának tanulmányozása állatmodellben, urokinázt gátló hatása a nyúl szaruhártya sejtjeire refraktív lézerkezelést követően	52
4.1.3	Plazminogén aktivátor inhibitorok a humán könnyben, jelentőségük a haze kialakulásában	54
4.1.3.1	Plazminogén – aktivátor és inhibitor, valamint hormonszint vizsgálatok terhesség során	57
4.1.4	A rekombináns plazminogén aktivátor inhibitor-2 alkalmazása a szaruhártyafekélyek gyógyításában, állatmodellben	61
4.2	Diabéteszes retinopátia szűrése kapcsán elért eredményeink	64
4.2.1	Fehérjekoncentráció mintázat analízise II-es típusú cukorbetegség könnymintáiban	64
4.2.1.1	Könnyfehérjék azonosítása	65
4.2.1.2	GenesSpring analízis	68
4.2.1.3	ROC analízis diabéteszes retinopátia potenciális biomarkereinek kutatásához	69
4.2.2	Gépi tanulórendszerek a diabéteszes retinopátia szűrésében	70
4.2.3	Könnyproteomikai alapú tanuló algoritmusok eredményei	71
4.2.3.1	Kombinált módszertan alkalmazásával kapott eredmények	74
4.2.4	Potenciálisan alkalmazható új vizsgáló eljárások a diabétesz okozta retinopátia szemszövődmények szűrésében	75
4.2.4.1	In vivo konfokális cornea mikroszkópia	75
4.2.4.2	In vivo konfokális cornea mikroszkópia, követéses vizsgálat	80
4.2.4.3	Ultraszéles látószögű pásztázó lézer oftalmoszkópia	83

5	MEGBESZÉLÉS	87
5.1	Könnyenzimek tanulmányozása a szaruhártya sebgyógyulási folyamataiban	87
5.1.1	Állatmodell alkalmazása a haze mechanizmusának megismerésére, indukálására és gátlására; a vemhesség, mint rizikófaktor	89
5.1.2	Az aprotinin hatásmechanizmusának tanulmányozása állatmodellben, urokinázt gátló hatása a nyúl szaruhártya sejtjeire refraktív lézerkezelést követően	92
5.1.3	Plazminogén aktivátor inhibitorok a humán könnyben lézerkezeléseket követően, jelentőségük a haze kialakulásában	94
5.1.4	A plazminogén aktivátor és inhibitor, valamint hormonszint vizsgálatok terhesség során	95
5.1.5	A rekombináns plazminogén aktivátor inhibitor-2 alkalmazása a szaruhártyafekélyek gyógyításában, állatmodellben	97
5.2	A diabétesz okozta szemszövődmények szűrése	97
5.2.1	Könny proteomikai alapú szűrés	98
5.2.2	Informatikai alapú szűrés	99
5.2.3	Kombinált szűrés	100
5.2.4	Potenciálisan alkalmazható új vizsgáló eljárások a diabétesz szemszövődményeinek szűrésében és követésében	101
5.2.4.1	In vivo konfokális cornea mikroszkópia	101
5.2.4.2	Ultraszéles látószögű pásztázó lézer oftalmoszkópia	103
6	ÚJ EREDMÉNYEK	106
6.1	A szaruhártya sebgyógyulási folyamatainak vonatkozásában	106
6.2	A diabétesz okozta szemszövődmények szűrésének vonatkozásában	106
7	AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI JELENTŐSÉGE	107
7.1	A szaruhártya sebgyógyulási folyamatainak vonatkozásában	107
7.2	A diabéteszes szemszövődmények szűrése vonatkozásában	107
8	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	109
9	IDÉZETT IRODALOM	111
10	PUBLIKÁCIÓK	140
	Az értekezés alapjául szolgáló in extenso közlemények, szabadalmak	140
	Az értekezésben nem szereplő in extenso közlemények	142
	Egyetemi doktori (PhD fokozat) megszerzése utáni in extenso közlemények	142
	Egyetemi doktori (PhD fokozat) megszerzése előtti in extenso közlemények	147
	Feltalálói tevékenységhez kapcsolódó egyes iparjogvédelmi eljárások	149
	MTMT tudománymetriai adatok	151

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACC:	Accuracy (pontosság)
AMD:	Age-related macular degeneration (időskori makuladegeneráció)
ArF:	Argon-fluorid
ARM:	Age-related maculopathy (időskori makulopátia)
AUC:	Area under the curve (görbe alatti terület)
CCM:	Confocal corneal microscopy (konfokális cornea mikroszkópia)
CNV:	Chorioretinal neovascularisation (chorioretinális neovaszkarizáció)
cDNS:	Coding desoxyribonucleic acid (kódoló dezoxiribonukleinsav)
D:	Dioptria
DM:	Diabétesz mellitusz
DR:	Diabéteszes retinopátia
EDTA:	Etil-diamin-tetra-acetát
ELISA:	Enzyme-linked immunosorbent assay (enzim-kötött immunoassay)
Epi-LASIK:	Epithel LASer-assistated <i>In situ</i> Keratomileusis (epiteliális lézer-asszisztált <i>in situ</i> keratomileusis)
ESI:	Electrospray ion source (elektrospray ionforrás)
FDA:	Food and Drug Administration (Az Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerellenőrző Hatóság)
GA:	Geographic atrophy (geografikus atrófia)
H:	Healthy (egészséges csoport)
HPLC:	High pressure liquid chromatography (nagy teljesítményű folyadék kromatográfia)
IC:	International classification (nemzetközi klasszifikáció)
i.m.:	Intramuszkuláris
IOP:	Intraocular pressure (szem belnyomás)
iTRAQ:	Isobaric tags for relative and absolute quantification (izobár reagensekkel történő jelölés relatív és abszolút kvantitáláshoz)
KIU:	Kallikrein inactivating unit (kallikrein inaktíváló egység)
kNN:	K-nearest neighbours (k-legközelebbi szomszéd (algoritmus – gépi tanulás))

LASEK:	LASeR -assisted subEpithelial Keratomileusis (lézer-asszisztált szubepiteliális keratomileusis)
LASIK:	LASeR In situ Keratomileusis (lézer-asszisztált <i>in situ</i> keratomileusis)
LC-MS:	Liquid chromatography - mass spectrometry (folyadék kromatográfiával kapcsolt tömegspektrométer)
logReg:	Logistic regression (algoritmus - gépi tanulás)
LRP:	Likelihood ratio positive (pozitív valószínűségi hányados)
LRN:	Likelihood ratio negative (negatív valószínűségi hányados)
MA:	Mikroaneurizma
mRNS:	Messenger ribonucleic acid (hírvivő ribonukleinsav)
MS:	Mass spectrometry (tömegspektrometria)
n:	Esetszám
N:	Normál csoport
NaOH:	Nátrium-hidroxid
NBD:	Nerve branch density (idegelágazódások sűrűsége)
NFA:	Nerve fibre area (idegrost területe)
NFD:	Nerve fibre density (idegrostok sűrűsége)
NFL:	Nerve fibre length (idegrostréteg hossza)
NFW:	Nerve fibre width (idegrost szélessége)
NP:	Nem proliferatív csoport
NPV:	Negative predictive value (negatív prediktív érték)
p:	Statisztikai valószínűség értéke
P:	Proliferatív csoport
PA:	Plazminogén aktivátor
PAA:	Plazminogén aktivátor aktivitás
PAI:	Plazminogén aktivátor inhibitor
PCA:	Principal components analysis (főkomponens analízis)
CR:	Polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)
PED:	Pigment epithelial detachment (pigment epitél leválás)
pH:	pondus Hydrogenii (hidrogénion-kitevő)
PMN:	Polymorphonuclear granulocytes (polimorfonukleáris granulociták)

PREC:	Positive predictive value (pozitív prediktív érték)
PRK:	PhotoRefractive Keratectomy (fotorefraktív keratektómia)
PTK:	Phototherapeutic keratectomy (fototerápiás keratektómia)
RK:	Radial keratotomy (radiális keratotómia)
ROC:	Receiver operating characteristic curve (ROC elemzés, különböző tesztek szenzitivitásának és specificitásának összehasonlítására alkalmas ábrázolási módszer)
Rpart:	Recursive partitioning (rekurzív partícionáló (algoritmus – gépi tanulás))
RGB:	Red - green - blue (vörös, zöld és kék (additív színkeverés modellje))
RNS:	Ribonukleinsav
SBK:	Sub-Bowman's keratomileusis (Keratomileusis a Bowman membrán alatt)
SD:	Standard deviáció (szórás)
SDS-PAGE:	Sodium-dodecyl-sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis (nátrium-dodecil szulfátos poliakrilamid gélelektroforézis technika)
SENS:	Sensitivity (szenzitivitás)
SPC:	Specificity (specificitás)
SPI:	Serin protease inhibitor (szerin proteáz inhibitor)
SVM:	Support vector machine (tartóvektor-gép (algoritmus – gépi tanulás))
T1DM:	I-es típusú diabétesz mellitusz
TBD:	Nerve fibre total branch density (idegrost teljes elágazódásainak sűrűsége)
TE-PRK:	Transepithelial photorefractive keratectomy (transepiteliális fotorefraktív keratektómia)
tPA:	tissue-type plasminogen activator (szöveti típusú plazminogén aktivátor)
uPA:	urokinase-type plasminogen activator (urokináz típusú plazminogén aktivátor)

1 BEVEZETÉS

1.1 A humán könny

A könnyfilm megfelelő mennyiségi és minőségi összetétele elengedhetetlen a tökéletes látásélesség [1], a szaruhártya és kötőhártya védelme és táplálása szempontjából [2], [3]. A szem elülső szegmentjében lévő könnyfilm-réteg számos fehérjét tartalmaz, melyek differenciális megjelenése, illetve mennyiségi változása jellemző lehet az egyes betegségekre [4], [5].

A humán könny víztiszta, enyhén lúgos (pH: 7,2-7,4), sós ízű folyadék. Egyenletes, kb. $3,4 \pm 2,6$ μm vastag filmréteg formájában fedi a szaruhártya (cornea) és kötőhártya (conjunctiva) felszínét. Termeléséért a fő könnymirigy (glandula lacrimalis), a járulékos könnymirigyek, valamint a kötőhártya kehelysejtjei együttesen tehetők felelőssé. Átlagos termelésük mértéke megközelítőleg 2 μl /perc [6]. A könnyfilm a pislogás révén néhány másodpercenként képződik újra. Egyenletes eloszlását - a szaruhártya és a kötőhártya felszínén - a szemhéjak zárása biztosítja, mely elengedhetetlen a könnyfilm könnyutak felé történő tereléséhez és elvezetéséhez [7]. A pislogások közti időintervallum jelentős mértékben meghatározza az evaporáció mértékét.

A könnyfilmnek három rétegét különböztetjük meg. A szaruhártya epitél rétege felől kifelé haladva az első a mucin réteg, mely kb. 0,02-0,05 μm vastag, glikoproteinek, proteoglikánok, glikolipidek alkotják. Eredetét tekintve a kötőhártya kehelysejtjeiből, a Manz-féle mirigyekből és a Henle-kriptákból származik. A szaruhártya felszínéhez a hámsejtek mikrobolyhai kötik, minek eredményeként a hidrofób hámfelszínnek hidrofíllé alakulnak, és ezáltal válnak alkalmassá a vizes réteg megkötésére. Ezen nedvesítés hatására az epitél sejtek közti egyenetlenségek kitöltődnek, ami elengedhetetlen a tökéletes refrakció szempontjából. A második a vizes fázis, mely a könnyfilm kb. 90%-t teszi ki. Egyik határa sem éles - ezért tekintjük kétfázisúnak a könnyfilmet -, mind a mucin, mind a lipid fázissal keveredhet. A könnyfilm jelentős része (kb. 98%) víz, kb. 1%-ban tartalmaz anorganikus sókat (NaCl, KCl), ionokat (Mg^{2+} , Ca^{2+}), nyomokban Fe^{2+} -t, organikus anyagokat, fehérjéket (0,2-0,6%), melyek elsősorban immunglobulinok (IgA, IgG, IgE), albumin, lizozim. Éhgyomri cukor tartalma 3,6 mg/100 ml (0,2 mmol/l), cukorbetegség esetén átlag 16,6 mg/100 ml (0,92 mmol/l) értékre tehető [8]. Eredetét tekintve a kötőhártya strómájában elhelyezkedő járulékos könnymirigyek - Krause és Wolfring-féle mirigyek - termelik. Barrier funkcióján túl, felel a szaruhártya hidratáltságáért, antibakteriális hatású és biztosítja az avaszkuláris szaruhártya anyagcseréjét.

A harmadik a lipid fázis, kb. 0,15-0,2 μm vastag, apoláros viaszészterek és poláros zsírsavészterek alkotják. Termeléséért elsősorban a Meibom mirigyek, valamint kisebb mértékben a Zeiss- és Moll-mirigyek felelősek. Legfontosabb feladata, a könnyfilm evaporációjának a megakadályozása, a szaruhártya felszínének védelme a kiszáradástól [9].

A termelés szempontjából kétféle kiválasztási mechanizmust különböztethetünk meg: alap és reflexes szekréciót. Az alapszekréció akarattól független és főként a járulékos mirigyek termelése felelős érte. A Meibom mirigyek termelése kettős; mind neuronális mind hormonális reguláció alatt áll. A lipidtermelés szempontjából a hormonális reguláció a meghatározó. A reflexes szekréció neuronális beidegzésű; a szaruhártya és a kötőhártya szenzoros idegei vegyi, mechanikus, termikus hatására aktiválódnak, és a fő könnymirigyet és a kötőhártya kehelysejtjeit beidegző paraszimpatikus és szimpatikus efferens rostokon keresztül mucin - és folyadéktermelést indítanak [8], [9].

A könnyfilm megfelelő mennyiségi és minőségi összetétele elengedhetetlen a kötőhártya és a szaruhártya védelme szempontjából, melyben a könnyfehérjék játszanak elsődleges szerepet. A könny fehérjei a könnymirigyek által termelt, a szaruhártya és a kötőhártya sejtjei által szekretált és a vérből átkerülő fehérjékből állnak [10]. Elektroforetikus módszerrel Gachon és mtsai kb. 60 féle fehérjét azonosítottak a könnyben [11], majd a nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) és tömegspektrometriás (MS) módszerek megjelenésével több mint 1500 fehérjét ismerhettünk meg [12]–[14]. Ezen fehérjék három fő csoportba sorolhatóak: i) a szérumban is azonosítható fehérjék ii) csak a könnyben azonosítható fehérjék, iii) a könnyben és epitel sejtekben is detektálható fehérjék. A könnyben detektálható fehérjék legjelentősebb képviselői: a lizozim, a laktoferrin és a könnyspecifikus prealbumin [15].

A szaruhártya sebeinek gyógyulása során, illetve bizonyos betegségekben, generalizált kórképekben a könnyfilmrétegben található fehérjék megjelenése, eltűnése, illetve mennyiségi változása jellegzetes mintázatot és időbeli lefolyást mutat [16]–[19].

1.2 A könny plazminogén aktivátor-plazminrendszere

A szaruhártya sebgyógyulási folyamatait két nagy rendszer szabályozza aktivátorok és inhibitorok útján. A plazminogén aktivátor-plazminrendszer a degradációért és a károsodott extracelluláris mátrix eltakarításáért felelős [20], [21], míg a másik rendszer, az aktivált keratociták révén a károsodott kollagén struktúrák helyére újonnan szintetizálendő kollagén fibrillumok létrehozásáért [21]–[25]. A két rendszer harmonikus működési egyensúlya elengedhetetlen a szaruhártya sérülését követő reepitelizáció szempontjából.

A plazminogén aktivátor-plazminrendszer egyensúlyának felborulása a szaruhártya

sebgyógyulási folyamatait két irányba tolhatja el: egyrészt a szaruhártya hegese, másrészt elhúzódó sebgyógyulás, esetenként szaruhártyafekély kialakulásához vezethet [26]–[28].

A plazminogén aktivátorok (PA) specifikus szerin proteázok, a plazminogén Arg₅₆₀ és Val₅₆₁ aminosav alegységei közötti kötés hasításával aktiválják az inaktív plazmint [29], [30]. A plazminogén aktivátoroknak 2 fő típusát különböztetjük meg, a szöveti típusú plazminogén aktivátort (tPA) és az urokináz típusú plazminogén aktivátort (uPA). A normál könny nagy mennyiségű urokináz antigént tartalmaz, mely valószínűleg kizárólag inhibitor-komplex formájában van jelen, az uPA aktivitása kismértékű míg tPA szint nem detektálható [31]. A könny proteáz inhibitor (α_1 -antitripszin, α_2 -makroglobulin) tartalma igen alacsony [32].

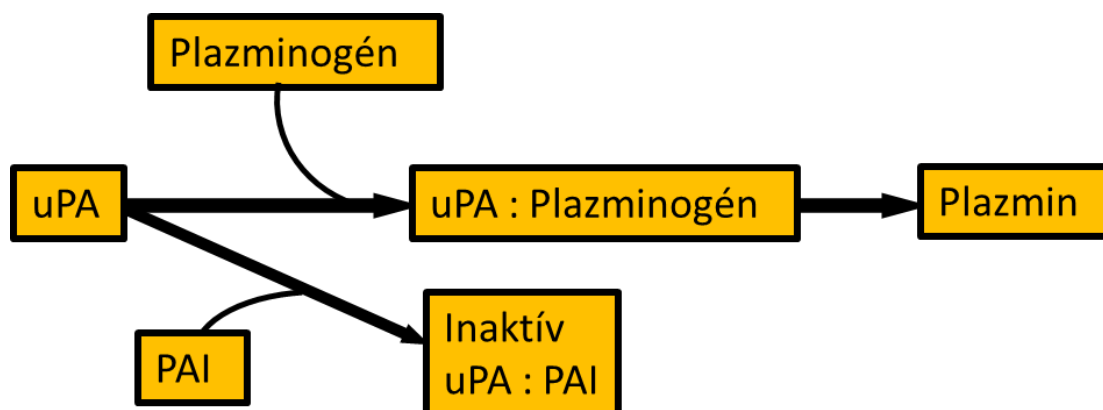
Sejttenyészetben számos sejttípus képes PA-t termelni [33]. A szaruhártya, a kötőhártya és a könnymirigy szöveteiben is kimutatható PA immunhisztokémiai módszerrel [34]. A szaruhártya PA aktivitása urokináz típusú, a könnymirigy csak tPA-t képes termelni [28], [35]–[37]. Kötőhártya szövettenyészetben mindkét aktivátor megtalálható, az uPA termelésért az epitel sejtek felelősek, míg a tPA forrása a kötőhártya ereinek endotél sejtei [37].

A működéséhez fibrin kofaktort igénylő tPA elsősorban a vér fibrinolitikus aktivitásában játszik szerepet. Termeléséért és a vérbe történő szekretálásáért elsősorban a vaszkuláris endotél sejtek felelősek. Gátlásában legfontosabb a plazminogén aktivátor inhibitor 1-es típusa (PAI-1).

Az uPA elsődleges szerepet az extracelluláris proteolízisben játszik és valószínűleg a tumorok metasztázis képzésében, inváziójában is fontos szerepet tölt be. Működéséhez fibrin kofaktort nem igényel [38]. Az uPA-t endoteliális sejtek, makrofágok és különböző típusú leukociták szintetizálják. Megtalálható a könnyben, és feltehetően a kötőhártya és a szaruhártya epitel sejtei szekretálják [35], [37], [39], [40]. PAI-1 antigént nem sikerült normál könnyben kimutatni [41], így valószínűleg más inhibitor játszhat szerepet a szem elülső szegmensében keletkező uPA gátlásában, mely forrása vagy a könnymirigy, vagy a szem elülső szegmensében található sejtek. Az urokináz potenciális leukocita kemoattraktánsként is ismert, és emiatt szerepe lehet sejtadhéziós, migrációs, leukocita extravazációs és szöveti infiltrációs folyamatokban, gyulladásos megbetegedésekben [42], [43].

A szaruhártya és kötőhártya epitel sejteinek károsodása következtében nagyobb mennyiségű uPA kerülhet a könnybe. Patológias esetekben fokozódhat a kötőhártya ereinek permeabilitása is, így egyrészt proteázok proenzim formái, másrészt proteáz inhibitorok kerülhetnek a könnybe. Az uPA képes a könnybe kerülő plazminogént aktiválni - tPA normál könnyben nem detektálható -, míg az urokináz aktivitást a plazma inhibitorok gátolják (1.

ábra)[44]. A keletkező plazmin egyrészt inaktiválódhat, másrészt számos folyamatot elindíthat a szem elülső szegmensében [45].



1. ábra Az uPA aktivitás kinetikai modellje a szaruhártya sebgyógyulási folyamatában. Az inaktív plazminogén aktív plazminná történő átalakításáért az aktivátorai felelősek, deaktiválásukat inhibitorai végzik [44].

A könny proteolitikusan aktívvá válhat az uPA aktivitás megnövekedésével, hiszen a hatására keletkező nagy mennyiségű aktív plazmin felboríthatja az enzimatikus egyensúlyt, a könny inhibitor készleteinek kimerítésével.

A széles szubsztrát specificitású aktív plazmin, már nemcsak a fibrint, hanem az intakt kollagén kivételével az extracelluláris mátrix fehérjéit (laminin, fibronectin) is képes hasítani [38]. A szaruhártya reepitelizációját a fibronectin lebontása segíti elő, ezáltal válik lehetővé az epitel sejtek bekúszása a periféria felől a centrum irányába. A plazmin-indukálta szignalizációs hatás a monociták, makrofágok és egyéb gyulladásos sejtek funkcióira is hatással van. *In vitro* és *in vivo* tanulmányok igazolták, hogy a plazmin képes stimulálni a citokinek, reaktív oxigéngyökök (ROS) és egyéb gyulladásos mediátorok termelődését [46]. A plazmin túlzott aktivációja krónikus gyulladásban vagy autoimmun megbetegedésekben súlyosbíthatja a gyulladásos sejtek aktivációját és a betegség patogenezisét [47].

Az aktív plazminogén aktivátorok deaktiválását inhibitoraik végzik. Tőzsér és Berta elsőként mutatták ki patológiás humán könnyben az uPA természetes inhibitorait: PAI-1 és -2 [48]. Mindkét inhibitor a szerpin családba tartozik, szerkezetük és működésük hasonló, azonban eltérő biológiai funkciókkal rendelkeznek. A PAI-1 szekretálódó inhibitor; a vérlemezkék, a vaszkuláris simaizomsejtek és a májsejtek termelik [49]. A PAI-2 jelentős része nem szekretálódik [50], termeléséért elsősorban a trofoblasztok felelősek és az uPA terhesség alatti gátlásában játszik fontos szerepet [51], továbbá különféle ráktípusokban (mell- és tüdőrák) ismert prognosztikus szerepe [52], [53]. PAI-2 expressziót humán szaruhártya epitel sejtekben [54], valamint a kötőhártya sejtjeiben is sikerült kimutatni [55].

1.2.1 Enzimkaskád a szaruhártya sebgyógyulási folyamataiban

A szaruhártya sebgyógyulási folyamataiban traumás sérülést követően ismert a könny plazminogén aktivátor-plazminrendszerének jelentősége [39], [56]–[59]. A károsodott epitél sejtekből felszabaduló, plazminogént aktiváló enzimek hasznosak, azonban amennyiben enzimszintjük valamilyen ok miatt magasan marad a sebgyógyulási folyamat hosszasan elhúzódhat, vagy esetenként be sem következik [28].

A plazminogén aktivátor-plazminrendszer aktiválódásának kiemelt szerepe van a sejt- és szövettörmelékek eltakarításában, valamint a károsodott kollagén és extracelluláris mátrix kijavításában. A könny uPA aktivitása a refraktív sebészeti beavatkozásokat követően is megemelkedik, mely arra utal, hogy a fibrinolitikus rendszer szerepet játszik a szaruhártya sebgyógyulási folyamataiban (is) [60]. Humán könnymintákban a fotorefraktív keratektómia (PRK) beavatkozást követően, a harmadik posztoperatív napon mért alacsony uPA aktivitási érték és a sebgyógyulás késői (3-6 hónap) posztoperatív időszakában észlelt szubepiteliális homály (haze) kialakulása között szignifikáns összefüggés igazolt [60]. Több, a szaruhártya reepitelizációjával foglalkozó vizsgálat számolt be az uPA és receptorai jelenlétéről keratinocitákban [61], [62]. Tervo és mtsai immunhisztokémiai vizsgálatokkal igazolták az uPA erőteljes, a PAI-1 gyenge és a tPA alig kimutatható jelenlétét a szaruhártya sebzés területében [57]. A plazminogén aktivátor-plazminrendszer feltehetően szerepet játszik a fibrin és fibronectin reszorpciójában, a szaruhártya epitél sejtjeinek sérülés utáni regenerációjában, és elősegíti az inaktív kollagenáz felszabadulását a szaruhártya epitél sejtjeiből, valamint aktiválja azt [26].

Szaruhártyafekély esetén a páciensek könnymintáiban a proteáz (α_1 -antitripszin, α_2 -makroglobulin) inhibitorok szintje jelentősen megnő, mely fokozatosan tér vissza a normál értékre a sebgyógyulás folyamán [63]–[65].

A szaruhártya és a kötőhártya súlyos gyulladásos kórképeiben, illetve mészsérülések esetén jelentős a könny uPA aktivitás emelkedése [28], [66], melyhez a fekélyesedő szaruhártya epitél sejtjei, valamint a polimorfonukleáris leukociták is hozzájárulhatnak [28]. A szem elülső szegmensében mért urokináz szint számos folyamat eredőjeként jöhet létre.

Az inhibitorok a kötőhártya ereinek permeabilitás fokozódása révén kerülhetnek a könnybe, hiszen koncentrációjuk a szérumalbumin koncentrációjával párhuzamosan változik, az α_1 -antitripszin esetében azonban a lokális termelés sem zárható ki [63]–[65]. Amennyiben a károsodás olyan mértéket ölt, hogy az uPA aktivitás a transzudációval a könnybe kerülő inhibitorokat kimeríti, a könny proteolitikusan aktívvá válhat a folyamatos plazmin termelődés következtében. Az aktív plazmin, már széles szubsztrát specificitású proteináz, mely a

prokollagenázt aktiválja. Az aktív kollagenáz szövetkárosodást, a szaruhártya alapállományának proteolitikus lebontását eredményezheti, ezáltal meghatározó szerepet tölt be a szaruhártyafekélyek kialakulásában [26]. A könnyfilm plazmin koncentrációja és az ulceratív folyamat súlyossága közti korreláció ismert [66]. A gyulladásos folyamatok kifejlődésével a plazmin aktivitás megnő és a könnyben mért 1 µg/ml koncentráció értékénél az inflammatorikus sejtek a szaruhártya stróma állományában is kimutathatóak. Magas plazmin aktivitás (2,5-3,0 µg/ml) esetén szaruhártyafekély képződés figyelhető meg és állatkísérletben bizonyítottan sikerrel alkalmazható a sebgyógyulási folyamat elősegítésére lokálisan alkalmazott plazmin inhibitor (Aprotinin, Gordox 10.000 KIE/ml) [59], [66], [67].

Zhou és mtsai leírták natív PAI-2 termelését és tisztítását *Escherichia coli* baktériumsejtekből, azonban a fehérje inklúziós testbe került, ezért csak 8 M urea oldatból történő renaturáció után sikerült aktív fehérjét nyerni [68]. A PAI-1 és mutánsai mellett leírták hexahisztidin tartalmú PAI-2 expresszióját és tisztítását, azonban az egylépéses affinitás kromatográfia csak nagymértékű bakteriális szennyező fehérjét tartalmazó frakciókat eredményezett [69]. Bár a PAI-1 legalább olyan hatékony az uPA blokkolásában, mint a PAI-2, a PAI-1 metastabil és gyorsan inaktív konformációt vesz fel [70], ami terápiás alkalmazhatósága szempontjából kifejezetten hátrányos. A PAI-2 másik előnye, hogy fiziológiás intracelluláris formája nem glikozilálódik, ezért a bakteriálisan exprimált fehérje teljes mértékben megegyezik az eukarióta sejtek által exprimált intracelluláris fehérjével.

A PAI-1 és PAI-2 inhibitoroknak számos terápiás alkalmazhatósági területe ismeretes. A PAI-2 potenciális alkalmazhatósága ismert daganatos megbetegedésekben [71], [72] és pszoriázisban is [73].

A könnyfilm plazminogén aktivátor- és inhibitor szintjeinek, valamint azok változásainak ismerete további információval szolgálhat a szaruhártya sebgyógyulási folyamatáról, és a refraktív lézersebészeti eljárások biztonságosságát is növelheti.

1.3 A szaruhártya refraktív-lézersebészete

A szem törőerejének veleszületett vagy szerzett hibái igen gyakoriak, hozzávetőlegesen 800 millió-2,3 milliárd embert érintenek a világon [74]. Az európai, 25 és 90 év közötti lakosság több mint kétharmada él valamilyen mértékű fénytörési hibával, melynek megoszlása az alábbiak szerint alakul: kb. 31% kis és közepes fokú miópia, nagyfokú miópia 3%, hipermetrópia 25% és 24% asztigmia [75]. A miópia különösen a fiatal felnőttek körében gyakori, becslések szerint Európában 227,2 millió ember rövidlátó. Egyes távolkeleti országokban (Korea, Tajvan, Kína) a fiatal lakosság körében a miópia prevallenciája eléri a 84-97%-ot [76]. A látásélesség tökéletes korrekciójára, legyen az szemüvegrendelés, kontaktlencse

illesztés vagy valamilyen műtéti beavatkozás, rendkívül nagy az igény [75]. A fénytörési hibák hagyományos korrekciós lehetősége a szemüveg rendelése, miópiás esetben konkáv, hipermetrópiás esetben konvex, asztigmia esetén cilindres lencsével. A páciensek egy részénél a kontaktlencse viselése jelent alternatívát, melyek típusai, alapanyagai, tulajdonságai tekintetében rendkívül eltérőek lehetnek.

Számos embernek van azonban igénye vagy szüksége hosszan tartó, segédeszköz nélküli korrekciós megoldásra, munkahelyi, sport, vagy egyéb, kényelmi célból. Számukra jelenthetnek megoldást a látásjavító műtéti megoldások. Szövődménymentes esetben egy jól megválasztott műtéti technika az egyén számára ideális megoldás.

A szem fénytörésének műtéti módosítására alapvetően két lehetőség van. Az egyik, leggyakrabban alkalmazott műtéti technika a szaruhártya törőerejének módosítása, mellyel a szem össztörőereje és a szemtengely hossza között felborult arány kerül korrekcióra, annak érdekében, hogy a szembe bejutó fénysugarak az éleslátás helyén egy fókuszpontban egyesülhessenek a retinán. A szaruhártya „átformálásának” leggyakrabban alkalmazott módja valamilyen típusú lézeres beavatkozás, ezen kívül alkalmazható módszerek a különböző szaruhártyába ültethető eszközök - gyűrűk vagy lencsék - melyek ritkább, súlyosabb fénytörési hiba esetén jelenthetnek optimális segítséget. A másik lehetőség, mely jelenleg egyre nagyobb teret hódít, a szemlencse cseréje optimális törőerővel rendelkező beültethető műanyag lencsére. A beavatkozás gyakorlatilag megegyezik a szürkehályog műtét során végzett szemlencse eltávolítással (fakoemulzifikáció) és műlencse beültetéssel, tiszta szemlencse mellett. A jelen dolgozat a szaruhártya felszíni „átformálásának” leggyakrabban alkalmazott módjaira, a lézeres beavatkozásokra fókuszál.

Az avaszkuláris szaruhártya szövettanilag - kívülről befelé haladva - több rétegből épül fel: a felszíni hám, a Bowman membrán, a stróma, a Dua hártya [77], a Descemet membrán és az endotél sejtréteg. Párhuzamosan futó kollagén rostok alkotják a stróma állományát, mely a szaruhártya kb. 90%-át teszi ki és a szaruhártya formáját/alakját, valamint stabilitását biztosítja. A strómát alkotó kollagén rostok átmérője és egymás közti távolsága azonos (kb. 21-65 nanométer), elrendeződése szabályszerű, minek következtében a stróma átlátszó. A szaruhártyán végzett refraktív célú beavatkozások a stróma állományát érintik, ebből kerül eltávolításra egy precízen, napjainkban gyakorlatilag kizárólag számítógép által megtervezett részlet.

A szaruhártya stabilitásáért a strómális mátrix tehető felelőssé, elaszticitását pedig rostszerkezete és rostközi kapcsolatai határozzák meg. Normál szaruhártya struktúra esetén ezen tulajdonságok természetes egyensúlyban állnak. A szaruhártya szerkezetét továbbá

rigiditása jellemzi, mely biztosítja konzisztenciáját, megakadályozza ellapulását és "stabilan" tartja szöveti szerkezetét. A szaruhártya elülső kétharmada a Bowman membránnak köszönhetően elasztikusabb, mely fontos tényező a biomechanikai stabilitás szempontjából [78]. A szaruhártya stabilitása strukturális változása esetén gyengül, minek következtében a szaruhártya kóros kiboltosulása tágulat, ektázia alakulhat ki. A biomechanikai stabilitást "sértő" hatásokkal elsősorban mély ablációk (pl. lézer-asszisztált *in situ* keratomileusis (LASer In situ Keratomileusis, LASIK), jelentősebb ablációs mélység (pl. jelentősebb refrakciós hiba korrekciója), illetve vékonyabb visszamaradó strómaágy (pl. vékonyabb szaruhártya) esetében kell számolnunk.

1.3.1 A szaruhártya refraktív lézersebészeti beavatkozásainak áttekintése

A refraktív sebészeti beavatkozások elméleti lehetőségének a kidolgozása Lans holland szemorvos nevéhez fűződik, aki 1896-ban írta le a szaruhártya bemetszését, az asztigmia korrekciós lehetőségeként [79]. Sato 1930-ban végezte az első műtétet, mely „hagyományos” vágást jelentett a szaruhártyán a Descemet membrán behasításával. Az alkalmazott módszer körülbelül 6 Dipotria (D) miopia fénytörési hiba korrigálását tette lehetővé. Az alkalmazott technika megítélését a szövödmények jelentős száma azonban kérdésessé tette a [80]. Az első keratomileusist (görög kifejezés, keras: szaru, mileusis: vésés), a szaruhártya átformálását Barraquer végezte 1963-ban. Ez a műtéti technika már a hipermetrópia korrekcióját is biztosította. A szaruhártyából egy előre megtervezett réteg került eltávolításra, melyet fagyasztás formált át, majd az újraformált szaruhártya részlet került visszaültetésre. Az eljárás meglehetősen pontatlan és kezdetleges volt, azonban jóval a LASIK technika megjelenése előtt vetette fel a mikrokeratóm kidolgozásának igényét [80]. Rutinszerű eljárássá a Fjodorov által 1974-ben közölt ún. radiális keratotómia vált, mely során gyémánt késsel ejtettek radiális bemetszéseket a szaruhártyán, a különböző fénytörési hibák korrekciója céljából [80].

Az igazi áttörést a refraktív szemsebészetben a lézerek megjelenése eredményezte, mely sokáig egyet jelentett az ún. excimer lézerek alkalmazásával. Az excimer kifejezés a lézer típusára utal, „*excited dimer*”, valamilyen nemesgáz (pl. xenon dimer) gerjesztésével előállított lézersugárra. Kifejlesztésének célja az 1970-as években először ipari felhasználás, mikrocipek nagy pontosságú előállítása volt. Ekkor figyelték meg, hogy az így előállított lézerfény nagy pontosságú, termális károsodás nélküli vágásra képes, mely ideálissá teszi orvosi sebészeti beavatkozásban történő használatát. Az excimer lézer szemészeti kifejlesztése az 1980-as évek elején kezdődött. Az első, széles körben elterjedt és mind a mai napig alkalmazott, fotorefraktív keratektómia (PhotoRefractive Keratectomy, PRK) típusú lézeres korrekciós műtétet 1987-ben

Trokel végezte el [81], [82]. A módszer 1995-ban kapott engedélyt az Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerellenőrző Hatóságtól (FDA), tehát immár egy negyedszázados múltra tekint vissza. A 193 nm hullámhosszúságú argon-fluorid excimer lézer a refraktív hibák korrigálását a szaruhártya elülső strómális rétegének átformálásával végzi; a környező területek károsítása nélkül, nagy pontossággal képes a szöveteket "elpárologtatni" a szaruhártyából, így kiválóan alkalmas a fénytörési hibák megszüntetésére, csökkentésére és egyes szaruhártya betegségek kezelésére. A lézerekészülék a szaruhártya hámtól megfosztott strómájának finom átalakításával szünteti meg a szem fénytörési hibáját.

A különböző típusú lézeres beavatkozások abban térnek el egymástól, hogy a szaruhártyának a kezelésre alkalmas területét milyen módon érzük el. A diagnosztikus módszerek fejlődésével lehetőség nyílt a szaruhártya és a szem, mint optikai rendszer fénytörésének még pontosabb feltérképezésére, szaruhártya topográfia és a szem ún. magasabb rendű aberrációinak mérésére. Ezen technikákat kombinálva megfelelő számítógépes támogatással a lézersugár a páciens szaruhártyáját egyénre szabottan képes „ideális” alakúvá formálni, így korrigálva a fénytörési hibát.

A fotorefraktív kezelések leggyakrabban alkalmazott típusai az alábbiak:

- Felszíni abláció: fotorefraktív keratektómia (PhotoRefractive Keratectomy, PRK); lézer-asszisztált szubepiteliális keratomileusis (LASer-assisted SubEpithelial Keratomileusis, LASEK); epiteliális lézer-asszisztált *in situ* keratomileusis (epi-Laser- Assisted *in situ* keratomileusis, epi-LASIK); transz epiteliális-PRK (Trans Epithelial- PRK, TE-PRK).
- Lamelláris abláció: közismert nevén lézer-asszisztált *in situ* keratomileusis (LASer-Assisted *in situ* Keratomileusis, LASIK).
- Felszíni lamelláris abláció: Bowman membrán alatt végzett keratomileusis (Sub-Bowman Keratomileusis, SBK).

A műtéttechnika fő különbségei a kezelendő terület elérési technikájából fakadnak:

- **PRK:** az epitélium föllazítása és eltávolítása mechanikusan, 20%-os alkohol alkalmazásával vagy annak mellőzésével történhet.
- **LASEK:** az epitélium föllazítása 20%-os alkohollal történik, melyet felemelnek, megkímélnék és az ablált zóna területére visszahelyeznek.
- **Epi-LASIK:** az epitéliumot mikrokeratómmal emelik föl mechanikus úton, megkímélik majd az ablált zóna területére helyezik vissza a műtét végén.

- *TE-PRK*: az epitélium mechanikus eltávolítására itt nem kerül sor. A refrakciós profiltervezés, az epitélium eltávolítására és a korrigálandó refrakciós hiba korrigálására együttesen történik. A beavatkozás egyik legfontosabb előnye a kiszámíthatóan sima reguláris felszín, a hátránya pedig az, hogy a profil megtervezésénél jól kiszámítható, egységes epitel réteggel számol, mely betegenként azonban eltérő lehet. Az egyéni varianciákból fakadhat a bizonyos esetekben tapasztalható alul tervezés, vagy éppen ennek az ellenkezője, a túlkorrektció.
- *PTK*: terápiás célzattal végzett PRK kezelés. A felszín közeli szaruhártya homályok, valamint bizonyos esetekben a posztoperatív kialakult lebenykomplikációk (mikro és makro striák) kezelésére ajánlott eljárás. A beavatkozás elvégzése előtt optikai koherencia tomográf (optical coherence tomography, OCT) vizsgálat végzése feltétlenül szükséges, hogy a szaruhártya homályok kiterjedését és mélységét meghatározzuk.

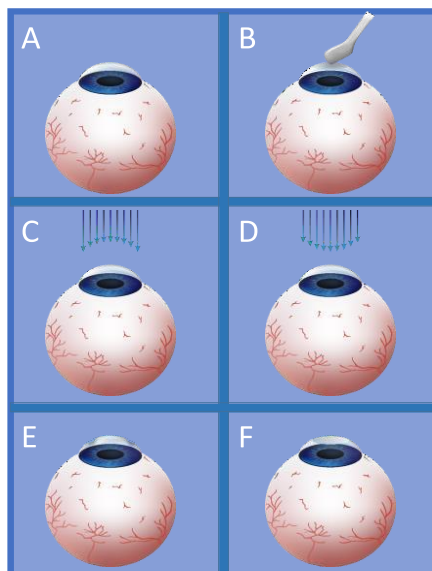
Bármely fent nevezett műtéti beavatkozás mellett szólnak érvek és ellenérvek, vannak előnyei és hátrányai. A megfelelő műtéti technika kiválasztásában fontos tényező a páciens legjobban korrigált látásélessége, magasabb rendű aberrációi, a szaruhártya vastagsága, továbbá a páciens fájdalomtűrő képessége, életvitele, és elvárása a műtétet követő látásélességgel kapcsolatban.

A disszertáció a műtéti technikák teljes bemutatásának igényét nem célozza, elsősorban a leggyakrabban alkalmazott és általunk tanulmányozott technikák ismertetésére fókuszál: a PRK és LASIK kezelésekre. A technikák mindegyikére jellemző, hogy a szaruhártya felszínének lézerrel történő átalakításával biztonságosan, hatékonyan és kiszámíthatóan korrigálják a szem refraktív törési hibáit és egyöntetűen elmondható, hogy refraktív kimenetelüket tekintve tervezhetőek, eredményeik összehasonlíthatóak, és azok igen hasonlóak.

1.3.2 Fotorefraktív keratektómia (PRK)

PRK kezelés során, a szaruhártya epiteliális rétegeinek - meghatározott területű - eltávolítása lokális érzéstelenítés mellett mechanikai, kémiai vagy lézeres úton történhet, melyet a szaruhártya lézerrel történő átalakítása követ. Miópia korrekciója során, a szaruhártya relatív görbületét csökkentjük a lézerkezeléssel - 1 D refrakciós hiba korrigálása kb. 10 µm-es ablációs mélységet igényel 5,5 mm átmérőjű kezelési területen[83]-, minek következtében csökken a szaruhártya fénytörése, és így a szembe beeső fénysugarak fókuszpontja az üvegtesti térből hátrébb helyeződik, optimális esetben a retina felszínére (a makulára). Hipermetrópia kezelése során célunk éppen ellentétes, a szaruhártya relatív görbületét növeljük, és ezáltal

fokozzuk refraktív erejét (2. ábra) [84], [85].

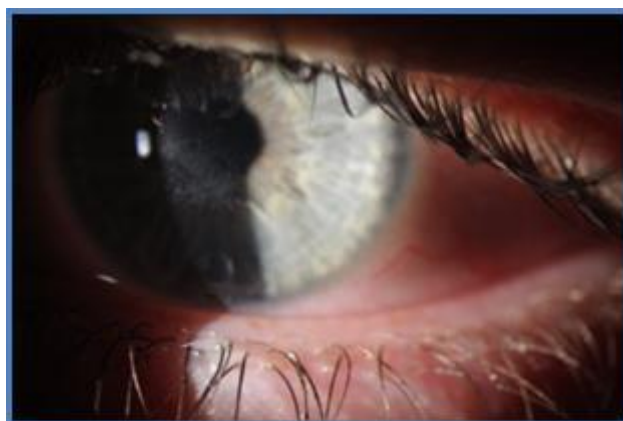


2. ábra A PRK kezelés sematikus ábrája hipermetrópia és miópia esetén.

Ahol (A) normál szem, (B) az epitélium mechanikus eltávolítása. A szaruhártya felszín átalakításához alkalmazott lézertípus profilja (C) hipermetrópia és (D) miópia esetén. Átalakított szaruhártya felszín (E) hipermetrópia (F) miópia esetén.

[Forrás: Sári Erika szerkesztésével készített saját anyagunk] [85].

A PRK kezelés leggyakoribb, esetenként a késői látásélességet is befolyásoló komplikációi a refrakciós regresszió és a haze (3. ábra) kialakulása a szaruhártyában [86]–[90].



3. ábra Haze kialakulása a szaruhártyában a posztoperatív 1. hónapot követően.

[Forrás: Hassan Ziad szerzőtársam saját képanyaga]

A haze kialakulása a lézerkezelést követő első, illetve a 3.-6. hónapok közötti időszakban a legvalószínűbb [91], de később kialakult szubepiteliális homályokról is beszámol az irodalom [92]. Incidenciája igen tág határok között mozog, az irodalomban 0,6%-tól akár 29%-ig is találunk adatokat [93]–[96]. Erre a nagy szórásra elsősorban az alkalmazott lézerek

fejlődése [89] és a pontosabban megválasztott műtéti indikációs terület adhat magyarázatot, minek eredményeként a haze előfordulási gyakorisága csökken. Kialakulását több ismert tényező is befolyásolja, melyek közül a legfontosabb a szükséges refrakciós korrekció nagysága, ezáltal az abláció mélysége. A korrigálandó refrakciós hiba nagyságával a haze kialakulásának valószínűsége nő [88]. PRK típusú műtéti technika elvégzése biztonsággal javasolt közepes és kis fokú miópia esetén [97], valamint 4,25 D hipermetrópia korrekciójáig [98]–[101]. Az életkor nem befolyásolja a haze kialakulását [102], az UV expozíció azonban fokozza a szubepiteliális homály és a miópiás regresszió valószínűségét is [103]. Kialakulásának pontos patomechanizmusa a mai napig nem ismert, de a vastagodás a szaruhártya törőerejének megváltozását okozza és regresszió alakul ki [92]. Hasonló jellegű elváltozások az epitéliumot is érinthetik, mely szintén oka lehet a miópiás és hipermetrópiás regresszióknak [104], [105].

A szaruhártya epitel rétegének eltávolítása, idegvégződéseinek szabaddá válását eredményezi a korai posztoperatív időszakban, mely fényérzékenységet, idegentest érzést, kezdetben erőteljes könnyezést és akár kifejezett homályos látást is eredményezhet. A reepitelizáció már az első 6 órán belül megkezdődik, és az alkalmazott ablációs terület nagyságának függvényében PRK esetében kb. 3-5 napot, TE-PRK esetében pedig 1-3 napot vesz igénybe [106]. A látásélesség az egyéni sebgyógyulási folyamattól függően fokozatosan tér vissza [91]. A potenciális komplikációk ellenére a PRK kezelés hosszú távú prognózisa helyesen megválasztott indikáció esetén, általában kitűnő [107], [108].

A hámfosztott szaruhártya reepitelizációja ugyan a 3-5. posztoperatív napra általában befejeződik, de az epitélium teljes vastagságát csak a 6. hónapra nyeri vissza [106]. A reepitelizációt követő haze kialakulásáért valószínűleg a strómában aktiválódó keratociták és a bevándorló gyulladásos sejtek tehetők felelőssé. Ezen aktivált keratociták olyan kollagén fibrillumokat termelnek, melyek struktúrája eltér a normálistól. Ezáltal a stróma megvastagszik, hiperpláziássá válik, minek következtében a szaruhártya törőereje megváltozik, és miópiás regresszió következik be. Természetesen a strómális hiperplázia csak egyik lehetséges oka a miópiás „shift” kialakulásának, hiszen az epitéliumot is érintheti hasonló jellegű elváltozás [104], [109].

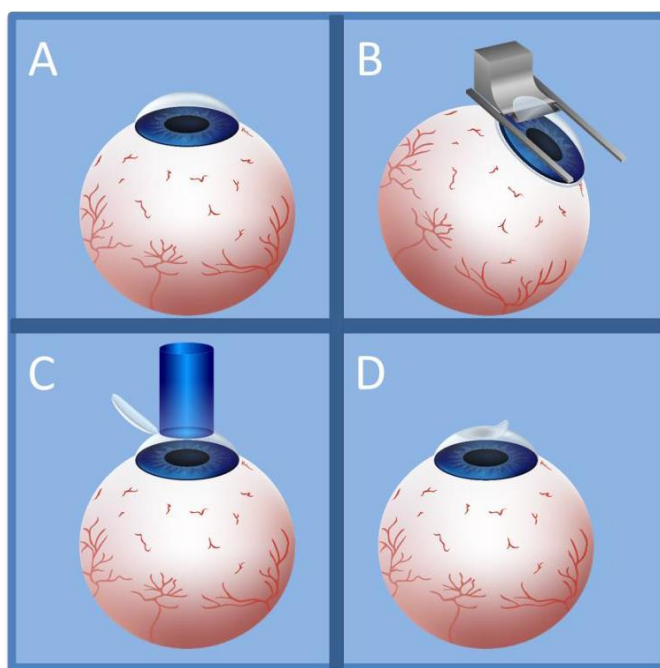
Korábbi kutatási eredményeink igazolták a könny összetételének jelentőségét a PRK típusú lézersebészeti beavatkozást követő sebgyógyulási folyamatokban. Humán könnymintákban, a műtétet követő harmadik posztoperatív napon mért alacsony uPA aktivitási érték szignifikáns összefüggést mutatott a sebgyógyulás késői időszakában észlelt haze kialakulásával [60]. A plazminogén aktivátor-plazminrendszer aktiválódása a sebgyógyulási

folyamatok során hasznos és kívánatos, működése révén valósulhat meg a szövet és sejtörmelék eltakarítása, valamint a károsodott kollagén rostok és az extracelluláris mátrix eliminálása.

1.3.3 Lézer-asszisztált *in situ* keratomileusis (LASIK)

Az ún. lebenyes technikák (pl. LASIK) a haze kialakulásának kiküszöbölése céljából kerültek kifejlesztésre. Bevezetése a görög származású Pallikaris nevéhez fűződik (1992), FDA engedélyt az eljárás 1998-ban kapott.

Az eljárás során egy speciális, mechanikus eszköz (mikrokeratóm) vagy femtoszekundum lézer segítségével képeznek lebenyt a szaruhártya felső rétegeiből. A szaruhártya teljes vastagságának függvényében a javasolt képzett lebeny 160-180 μm . Annak érdekében, hogy a későbbi funkcionális és anatómiai, illetve strukturális stabilitást megőrizzük a kezeletlen (érintetlenül maradó) szaruhártya vastagsága legalább 250 μm kell, hogy maradjon. A szemfelszínen képzett lebeny felhajtatását követően az excimer lézer "elpárologtatja" a kívánt korrekciónak megfelelő strómális szövet mennyiséget, majd a lebeny visszahajtatásra kerül eredeti pozíciójába a szaruhártya felszínére (4. ábra).



4. ábra A LASIK kezelés egyszerűsített ábrája.

Ahol (A) normál szem, (B) szaruhártya lebeny készítés mikrokeratómmal (C) a szaruhártya felszín lézeres átalakítása, (D) a lebeny visszahelyezése.

[Forrás: Sári Erika szerkesztésével készített saját anyagunk] [85].

A LASIK kezelés előnye a PRK-val szemben, a minimális posztoperatív fájdalom, a kisebb mértékű strómális keratocita aktiváció és refrakciós regresszió [110]–[117]. LASIK kezelést követő haze kialakulásáról alig számol be az irodalom [118], [119]. A látásélesség javulása gyors, néhány órát vagy napot vesz igénybe, bár az első néhány héten a látásélesség fluktuációja számos esetben megfigyelhető [120]. Hátrányai lehetnek intraoperatívek, leggyakrabban a lebeny készítésével kapcsolatosak; vékony, irreguláris, "gomblyuk", inkomplett, torz vagy szabad lebeny alakulhat ki. A lebenyes technikából kifolyólag az összefekvő rétegek között ún. "interface" komplikációk alakulhatnak ki (fertőzéses eredetű keratitisz, diffúz lamelláris keratitisz, centrális toxikus keratitisz, marginális steril szaruhártya infiltráció). A gyulladás elérheti a 12,4%-ot és a posztoperatív szakban a látásélesség csökkenését eredményezheti [113]. Hosszabb távon, igen ritkán az epitél sejtek strómaágyba vándorlása következtében epiteliális benövés (a lebeny és a strómaágy közötti sebfelületén) depozitumok alakulhatnak ki, melyek a szaruhártya átlátszóságát veszélyeztethetik [112]. Lebeny okozta ismert, nem kívánt posztoperatív vizuális jelenségek: a káprázás (glare), csillagszórás típusú jelenség (starburst) és a fényforrás körül megjelenő fényudvar (halo); mely akár a kezelt betegek 12%-át is érinti [114]–[116]. A lebeny készítése továbbá a szaruhártya szenzoros denervációját eredményezi, mely száraz szem kialakulásához vezethet [117]. Ezen kívül számoltak már be alulkorrekcióról, regresszióról, asztigmatiáról és igen ritkán ektázia kialakulásáról is. Az Egyesült Államokban a LASIK kezelés a preferáltabb refraktív műtéti eljárás [121], melynek hátterében kulturális különbségek is állhatnak.

1.4 A diabétesz mellituszról röviden

A diabétesz mellitusz (DM) etiológiáját tekintve egy több okra visszavezethető, változatos patogenezisű anyagcsere betegség. Patogenezisének két fő típusa különíthető el: i) az I. típus, autoimmun vagy autoimmun jelleggel bíró szindróma esetében valamilyen immunológiai mechanizmus következtében, vagy ismeretlen okból abszolút inzulinhiány alakul ki, ii) a II. típus, metabolikus szindróma esetében relatív inzulinhiány vagy perifériális inzulin rezisztencia áll a betegség kialakulásának hátterében.

A DM a 21. század krónikus népbetegsége, melynek globális prevalenciája 9.3-ra tehető és 2030-ra várhatóan eléri a 10,2%-ot. A csökkent glükóztolerancia előfordulási gyakorisága a Világban 2019-ben 7,5% (374 millió), mely 2030-ra elérheti a 8,0% -ot (454 millió ember) [122]. Az I-es típusú DM az asztma után a második leggyakoribb krónikus gyermekbetegség [123]. A II-es típusú DM előfordulási gyakoriságának emelkedése mind a fejlett (kb. 20%-os emelkedés), mind a fejlődő (kb. 69%-os emelkedés) országokat érinti, melynek hátterében megváltozott életstílusunk, étkezési szokásaink és lecsökkent fizikai

aktivitásunk állhat [124].

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) a cukorbetegséget úgy definiálja, hogy a vénás vérplazma éhomi glükóz koncentrációja $\geq 7,0$ mmol/l, vagy a vénás vérplazma glükóz koncentrációja $\geq 11,1$ mmol/l, melyet 75 g glükóz szájon keresztül történő elfogyasztása után mérnek 2 órával [125]. A cukorbetegség legfontosabb ismérvei: a krónikusan magas vércukorszint, a szénhidrát-, zsír- és fehérje-metabolizmus zavarai, illetve random $11,1$ mmol/l feletti vércukor érték klinikai tünetekkel társulva; melyek háttérében az inzulin szekréció vagy az inzulin hatás, esetleg mindkettő zavara áll [126], [127]. A DM mindkét típusára jellemző, hogy a betegség huzamosabb fennállását követően krónikus szövődmények alakulhatnak ki, amely különösen igaz azon esetekben, amikor a betegség sokáig marad kezeletlenül a késői diagnózis felállítása miatt. A tartós anyagcserezavar következtében kialakuló legsúlyosabb következmények; az ér és idegrendszeri szövődmények megjelenése [128], [129], különböző szervek károsodása, diszfunkciója és akár teljes leállása [130].

Az alapbetegség korai felismerése és adekvát kezelése alapvető a DM krónikus szövődményeinek megelőzésében, súlyosságának csökkentésében [131], [132]. A vércukorszint normál határok között tartása az egyik legfontosabb tényező, mely jelentős mértékben csökkenti a komplikáció kialakulásának valószínűségét [133].

1.4.1 A diabéteszes retinopátia

A diabéteszes retinopátia (DR) a cukorbetegség egyik leggyakoribb szövődménye, mely a cukorbeteg élet folyamán mintegy 90%-ban megjelenik [134]. A fejlett országok munkaképes lakosságának körében a DR a vakság kialakulásának vezető oka [135]. A különböző életkorokban a vezető vaksági ok, a 65 év feletti korosztályban az időskori makuladegeneráció (AMD) a 16-64 év közötti korosztályban a DR számított annak. Háttéré elsősorban vaszkuláris eredetű, melyet az alábbi fundusfotó elváltozások jellemeznek a leggyakrabban: mikroaneurizma (MA), retinális iszkémia, vérzések, exsudátumok, intraretinális mikrovaszkuláris abnormalitások, vénás kaliber ingadozások és neovaszkularizációk, valamint a vaszkuláris permeabilitás fokozódásának jelei [136]. A DR súlyossága szerint több csoportba osztható, az enyhe háttér retinopátiától a kifejezett nem proliferatív retinopátián át, a proliferatív retinopátia kialakulásáig [137]. Szövettanilag a betegség kórjelzője a kapilláris endotél bazális membránjának a megvastagodása. A bazál membrán szerkezetének megváltozása a retina mikrocirkulációjának károsodását eredményezi, mely mellett az alapbetegség okozta anyagcsere eltérések nagymértékű pericita vesztést okoznak, a keringés lelassul és a pericita pusztulás helyén a kapillárisok fala kiboltosul, ezáltal a retinális keringés autoregulációja is károsodik. A patológiás elváltozások kialakulásáért a

retina kis ereinek elzáródása és a kis erek falának permeabilitás fokozódása felelős [138].

A DR progressziója során, a szemfenéki elváltozásoknak két fő stádiumát különböztetjük meg: i) nem proliferatív (enyhe, mérsékelt és súlyos altípus), ii) proliferatív retinopátia (enyhe-közepes és magas rizikójú alcsoport). Makulopátia (iszkémiás vagy non-iszkémiás) a DR nem proliferatív és proliferatív stádiumában egyaránt megjelenhet.

1.4.2 A könnyfehérjék jelentősége diabéteszes retinopátiában

A szem elülső felszínét borító könnyfilmréteg számos fehérjéjének differenciált megjelenése, illetve mennyiségi változása jellemző lehet generalizált kórképekre [16], így a DR-ra, illetve annak stádiumaira [139].

A könny biomarkerek vonatkozásában DR-ban jelenleg nagyon kevés adat áll a rendelkezésünkre. A laktoferrin és a lizozim C szintek vizsgálatát említi a szakirodalom I-es típusú DM-ban szenvedő betegek mintáiban. A könnyminták laktoferrin szintje szignifikánsan nem változik [140], a lizozim C vonatkozásában pedig ellentmondásos adatok állnak rendelkezésünkre, hol alacsonyabb [141], hol magasabb [142] mért értékek kerültek publikálásra. A DR előrehaladásával Kim és munkacsoportja két abundáns fehérje (lipokalin-1, HSP27) mennyiségi csökkenését írta le és ismert a β_2 -makroglobulin szintjének erős növekedése is [143]. A II-es típusú cukorbetegéken két hősokk protein (HSP) szintjének megemelkedését találták szignifikánsnak a könnyben; a HSP 60-at, illetve a HSP70-et azon betegeknél, akiknél a betegség fennállása minimum 8 év volt [144]. Az utóbbi évek kutatásai rávilágítottak arra, hogy nem csupán a könnyfehérjék összetételében [145], hanem a módosult fehérjék megjelenésének vizsgálatával [146] is érdemes foglalkozni a DR korai felismerése céljából.

1.4.3 A diabétesz okozta szemszövődmények szűrése

A vakság kialakulásának relatív kockázata a cukorbetegek körében kb. huszonötször nagyobb, mint az egészséges populációban [147]. A DR prevalenciája és súlyossága függ a cukorbetegség típusától, fennállásának idejétől és a vércukorszint beállítottságától. Egyéb rizikófaktorok, a magas szisztolés és diasztolés vérnyomás értékek, a diszlipidémia, a nefropátia, valamint a fertőzések jelenléte [148]. I-es típusú DM esetén a betegség 15-20 éves fennállását követően az esetek 80-95%-ban fordul elő valamilyen fokú retinopátia, melynek kb. fele proliferatív stádiumú. II-es típusú DM esetén, a betegség 15 éves fennállását követően kb. 58%-ban alakul ki retinális elváltozás, mely 30 év elteltével a páciensek 100%-ban megfigyelhető [149], [150]. II-es típusú DM esetén a páciensek kb. 20%-a csökkent látásélességű már a diagnózis felállításának pillanatában [151], [152]. A DR előfordulási

gyakorisága csökkenthető rendezett cukorháztartással, vérnyomással és vérzsírokkal [151], [152].

A cukorbetegség talaján kialakuló retinopátia progressziója korai felismeréssel és szükség esetén időben alkalmazott szemészeti kezeléssel megelőzhető, illetve jelentős mértékben csökkenthető, így korai felismerésük és kezelésük alapvető fontosságú. Az első szemészeti vizsgálatot II-es típusú DM esetén - a hazai gyakorlatnak (is) megfelelően - a cukorbetegség felfedezését követően azonnal el kell végezni, I-es típusú DM esetén a diagnózis felállítása után 5 évvel, vagy a pubertás bekövetkeztével, amennyiben az hamarabb következne be. A szemfenék vizsgálatát minden esetben tágított pupilla mellett szükséges elvégezni, melyet az alábbi szemészeti vizsgálatok egészítenek ki: legjobban korrigált látóélesség meghatározása, intraoculáris nyomás mérés (IOP), gonioscopia, réslámpás elülső szegmens vizsgálat, az üvegtest állapotának vizsgálata [153].

Számos szemészeti szűrő program indult világszerte a cukorbeteg retinopátiájának időben történő felismerésére, illetve komoly erőfeszítések történtek annak érdekében, hogy a szemészeti szakellátás könnyen hozzáférhető legyen a páciensek számára.

A korai felismerés alapja a veszélyeztetett betegpopuláció rendszeres – lehetőség szerint fotódokumentáció alapú - szűrése. Ezen célra szervezett szűrőprogramok közül az egyik legeredményesebb az „*English National Screening Programme for Diabetic Retinopathy*” [154]. A szűrőprogramokban képzett szakemberek különítik el az egészséges, ill. a DR-a jellemző fundusfotókat és amennyiben szükséges további szakorvosi vizsgálatra irányítják a pácienseket [155].

A retinopátiás szűrővizsgálatoknak kétféle módszertani megközelítése ismert: i) fundus vizsgálat direkt vagy indirekt szemtükrözéssel; ii) retinafényképezés a hozzá kapcsolódó osztályozással [148], [156].

Napjainkra, a klinikai vizsgálatok mindennapi gyakorlatba történő integrálódásával egyre inkább a digitális fényképek alkalmazása kerül előtérbe a rutin szemészeti vizsgálatok részeként (is). A digitális technika lehetővé teszi, a képek könnyű tárolását, transzportálhatóságát és könnyű visszakereshetőséget biztosít. Szükség esetén a fotódokumentált elváltozások utólagos ellenőrzése elvégezhető, illetve a progresszió mértéke objektíven ítélni lehet meg. Mindezen előnyök miatt, a digitális retinafényképezés a klinikai - és szűrővizsgálatok nélkülözhetetlen alapelemévé vált [157].

A retina elváltozásainak dokumentálására és követésére általánosan alkalmazott eljárás a standard fundus fotódokumentáció (**5. ábra**).



5. ábra Diabéteszes retinopátia szűrésére alkalmazott standard fotódokumentáció; a makulára (bal) és a nazális/perifériás régióra centrált (jobb) képek.

[Forrás: A Moorfields Eye Hospital, London, UK Reading Centere, saját készítésű képanyag]

Korábban inkább tekercsfilmeket, napjainkban pedig a digitális technikát alkalmazzák széles körben erre a célra, melyek egymással összevetve jól korrelálnak [151], [158]–[160]. A standard adatrögzítés kritériumai a 30-60°-os látószög alatt készült fundusfotók, melyek kötelező elemei a legtöbb klinikai vizsgálatnak. A képek által biztosított nagyítás általában kielégítő a különféle retinális elváltozás(ok) azonosítására [152]. Magyarországon a jelenleg érvényben levő Szemészeti Szakmai Protokoll szerint a DR kialakulásáig a cukorbeteg évenkénti szemészeti szűrővizsgálata javasolt, majd ezt követően az ellenőrzés gyakoriságát a szemfenéki elváltozások súlyossága alapján határozza meg a szemész szakorvos és szükség esetén dönt a terápiás beavatkozás jellegéről, illetve sürgősségéről [161], [162]. Preproliferatív - súlyos, nem proliferatív - retinopátia, illetve a „fokozott kockázatú” súlyosságot el nem érő proliferatív retinopátia esetén nagy a fokozott kockázatú proliferatív retinopátia kialakulásának a valószínűsége (kb.75%), ezért a kontroll vizsgálatokat 2-4 havonta javasolt elvégezni. Ezekben az állapotokban - amennyiben a beteg 2-4 havonkénti ellenőrzése nem biztosítható - pánretinális lézerkezelés elvégzése szükséges [163]. Fokozott kockázatú proliferatív retinopátia esetén a megfelelő lézerkezelés haladéktalan elvégzése javasolt [163]. A cukorbeteg terhessege esetén szemészeti vizsgálatok az alábbi protokolláris séma szerint javasoltak: fogamzás előtt, az első trimeszterben, majd 12.-40. hét között, a szemészeti állapot súlyosságától függően [163]. A fent ismertetett kezelési sémák időzítése, kivitelezése és hatásossága multicentrikus vizsgálatok

eredményein alapszik. A javasolt kezelési stratégiák mellett más protokollokat is alkalmaznak, illetve fejlesztenek, esetenként egyes alkalmazott gyógyszerek vonatkozásában zajlanak a szükséges vizsgálatok (pl. aszpirin) [163]. Az optimális vércukor-beállítás, vérnyomás- és lipidkontroll esetén az időben alkalmazott szemészeti kezeléssel/kezelésekkel a súlyos látásromlás 60%-ról 2% alá csökkenthető, továbbá a közepesen súlyos látásromlások több mint fele is megelőzhető volna [164]–[169].

Hazánkban központosított szűrőprogram nem működik, azonban jelentős erőfeszítések történtek a szemfenéki fotódokumentáció standardizálása érdekében. Előrehaladott DR esetében a kezelés költségvonzata magas, melyhez a betegséghez kapcsolt szociális kiadások, illetve a cukorbetegség okozta generalizált szöveti, szervi károsodások költségvonzatai is társulnak. A páciens munkából való kiesése és életminőségének romlása további társadalmi terheket eredményez. A betegség megelőzhető magas kezelési költségvonzatai és az egyén életminőségének javítása a szűrőprogram megteremtését alátámasztja [170].

Rein és mtsai 10 milliós (30-84 év kor közötti) DM-es betegpopuláción végeztek költséghatékonysági elemzést, ahol a vizsgált betegcsoport nem, vagy minimális DR-ás elváltozást mutatott [171]. Adatforrásaikat az alábbi tanulmányok képezték: American Academy of Ophthalmology Preferred Practice Patterns, Medicare Payment Schedule, United Kingdom Prospective Diabetes Study, National Health and Nutrition Examination Survey. Elemzéseikből kiemelendő, hogy a telemedicinát akkor találták költséghatékonnak, ha kizárólag DR-ra jellemző elváltozásokra fókuszáltak és a szűréseket évi két alkalommal végezték. A betegbiztosítási rendszer szempontjából az éves egyszeri szűrővizsgálatok nem költséghatékonyak.

A DM esetében az intenzíven vizsgált DR mellett a cukorbetegség egyéb mikrovaskuláris, ill. neuropátiás szövődményei a szemgolyó összes szövetét érintik. A cukorbetegség okozta szaruhártya érintettség régóta ismert, de a jelentősége részben, mint önálló kórkép, részben, mint az alapbetegség prognosztikai markere csak az utóbbi években került előtérbe. A diabéteszes szaruhártya érintettség korai diagnózisa a cukorbetegség felismerésében is szerepet játszhat, illetve a betegség és bizonyos szövődményei progressziójának objektív kvantifikálhatóságában is felmerül a szerepe [172]–[174]. Számos vizsgálat irányult a diabéteszes keratopátia és a cukorbetegség által okozott egyéb szemészeti vagy szisztémás eltérések, elváltozások összefüggéseire [142], [175].

1.4.4 Potenciálisan alkalmazható új szemészeti szűrőmódszerek

1.4.4.1 *In vivo* konfokális cornea mikroszkópia

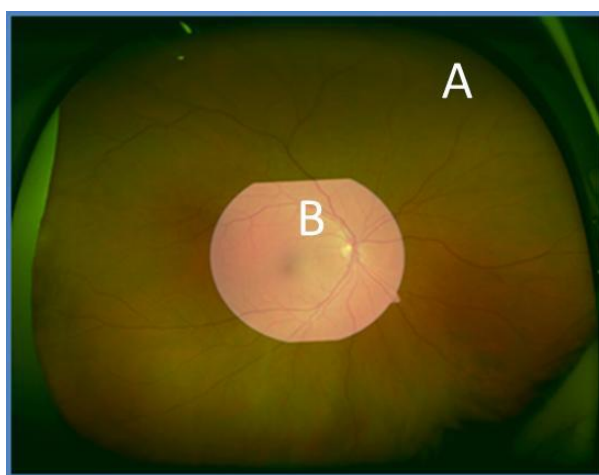
Az *in vivo* konfokális cornea mikroszkópia (corneal confocal microscopy (CCM)) a szaruhártya élőben történő vizsgálatára alkalmas nem-invazív módszer, segítségével a szaruhártya szerkezete, különböző rétegei és sejtjei - a hagyományos szövettani vizsgálathoz hasonlóan - tanulmányozhatóak.

A cukorbetegség a szem minden szövetét érintheti és károsíthatja: retinopátia, neovaszkuláris glaukóma, optikus neuropátia, keratopátia és száraz szem kialakulásához vezethet [176]. A vizsgáló eljárások fejlődésével, az *in vivo* CCM megjelenésével a DR mellett egyre nagyobb jelentőséget kap a szaruhártya cukorbetegség okozta károsodásának a tanulmányozása, melynek hátterében kóros sejtregenerációs mechanizmusok és idegrost-károsodások állnak, mindezek együttesen gátolják a hámosodást, a szaruhártya sebgyógyulási folyamatait. Az *in vivo* CCM nem invazív módon biztosítja a szaruhártya szöveti és sejtszintű vizsgálatait, ezáltal alkalmas lehet a cukorbetegség korai szűrésére, akár gyermekeken is [177], [178]. A szaruhártyában bekövetkező elváltozások tanulmányozása - akár a retinopátiát is megelőzve - a DM-es betegek szűrésében és gondozásában jelentős szereppel bírhat. Alkalmas lehet továbbá az alkalmazott kezelés hatásosságának megítélésében [179].

1.4.4.2 *Ultraszéles látószögű oftalmoszkópia*

Számos, a retinát érintő betegség (pl.: időskori makuladegeneráció, diabéteszes retinopátia) kialakulása és kórlefolyása szempontjából, a középperiféria állapotának megítélése mellett a periférián elhelyezkedő elváltozások (is) kiemelkedő jelentőséggel bírhatnak. Ezen kórképek esetében a kezelési stratégiák kialakítása szempontjából kritikus szerepet tölthet be a retina perifériájának állapota [180]. A perifériára lokalizálódó elváltozások vizsgálata, valamint követése nélkülözhetetlen a kórképek etiológiájának megismerésében, vagy akár a kezelési sémák felállításában és hatásosságának a megítélésében. A perifériák standard vizsgálata céljából alakították ki az ún. hét-mezőjű fotódokumentációk protokollját, melynek köszönhetően a fundus kb. 75°-os látószöge válik láthatóvá, szemben a hagyományos funduskamerák 45°-os látószögével) [181]–[183].

A P200C AF ultraszéles látószögű pásztázó lézer oftalmoszkóp (OPTOS PLC, Dubfermline, UK) megjelenésével lehetővé vált a gyors (0,25 másodperc), nagy látószögű retinális képkészítés (200°), - akár a pupilla tágítása nélkül (**6. ábra**) -, mely biztosíthatja az érzékeny, nehezen kooperáló betegek fundus vizsgálatát. A P200C AF piros (633 nm) és zöld (532 nm) lézerfényt alkalmaz a képkészítéshez, melyek egy nagy konkáv elliptikus tükör felszínéről tükröződnek vissza. Az így létrejött 3000 x 3000-es képpontból álló fundusfotó piros, zöld, vagy a piros-zöld „hamis színek” kombinációjában jelenik meg. A P200C AF ultraszéles látószögű pásztázó lézer oftalmoszkóp, a retina széles körű rendellenességeinek dokumentálására az egyik legújabban elfogadott vizsgáló eljárás; melynek az első verzióját - a P200-at - már használták korábbi tanulmányokban.

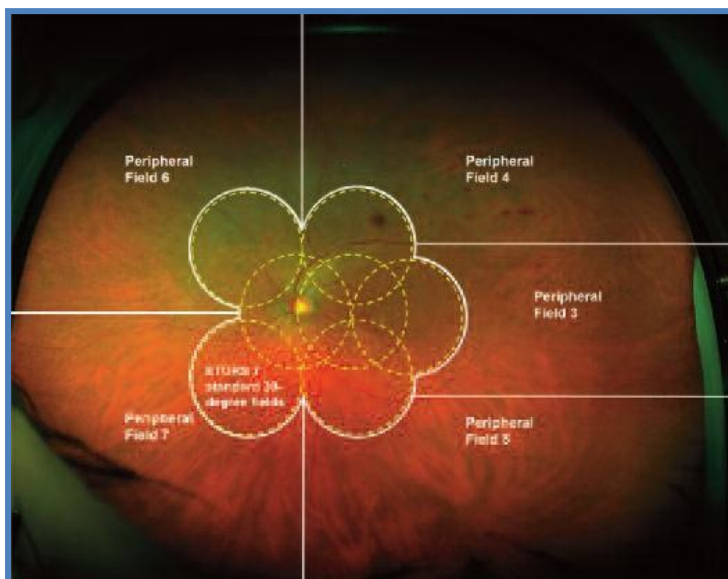


6. ábra Fundusfotók, a P200C AF ultraszéles látószögű pásztázó lézer oftalmoszkóp (OPTOS PLC) 200°-os látószöge (A), viszonyítva a hagyományos funduskamerák 45°-os látószögéhez(B).

[Forrás: A Moorfields Eye Hospital, London, UK Reading Centere, saját készítésű képanyag]

Az új képalkotó eljárások megjelenése elengedhetlenné teszi, hogy a széleskörű alkalmazásukat megelőzően a standard módszereken alapuló és már széles körben elfogadott és alkalmazott (arany standard) képalkotási módszerekkel hasonlítsuk össze. Az ultraszéles látószögű lézer oftalmoszkóp fundusfotóit több munkacsoport vizsgálta és hasonlította össze egyéb, széles körben alkalmazott standardizált leképezési módszerekkel. Silva és mtsai, az ultraszéles látószögű pásztázó lézer oftalmoszkóp fundusfotóit (100°-és 200°-os felvételek) az ETDRS 7-mezős 35 mm-es színes 30°-os felvételeivel és a klinikai vizsgálatok eredményeivel vetették össze DR és a cukorbetegség okozta makula ödéma vonatkozásaiban [181]. Az ultraszéles látószögű lézer oftalmoszkóp - pupillatágítást mellőző - fundusfotói jól megfeleltethetőek az ETDRS 7-mezős standardjainak, korrelációt mutat a DR stádium beosztása (κ -mutató: 0,79; illetve 0,77) és a klinikailag szignifikáns makula ödéma (κ -mutató:

0,73; illetve 0,77) vonatkozásában is (7. ábra).



7. ábra A P200C AF ultraszéles látószögű pásztázó lézer oftalmoszkóp (OPTOS PLC) 200°-os látószögébe ágyazott ETDRS 7 mezős standard fotódokumentációja.

[Forrás: A Moorfields Eye Hospital, London, UK Reading Centere, saját készítésű képanyaga]

Mindkét módszer megfelel a minőségi kritériumoknak, azonban az ultraszéles látószögű lézer oftalmoszkóp fundusfotóinak a területi lefedettsége jelentősebb (200° vs. 45°/75°), ezért diagnosztikus potenciálja magasabb lehet [182].

2 CÉLKITŰZÉSEK

Munkacsoportunk kutatásai során számos generalizált kórkép vizsgálatával foglalkozott (diabétesz, Alzheimer-kór, glaukóma), melyeket neurodegeneratív elváltozásaik kapcsolnak össze. Jelen dolgozat a könny és corneális biomarkerekre fókuszál, nevezetesen i) a szaruhártya fotorefraktív lézerkezelését követő sebgyógyulási folyamatokat és ii) a cukorbetegség szemészeti szövődményei közül a szaruhártyában (cornea) és az ideghártyában (retina) bekövetkező elváltozásokat kísérő fehérjemintázat változás jellegzetességeit és további potenciális biomarkereit vizsgálja.

I. Célul tűztük ki a könnyfilm plazminogén aktivátor- és inhibitor szintjeinek, valamint azok változásainak megismerését - lehetőség szerint befolyásolását - a szaruhártya sebgyógyulási folyamataiban. Egyfelől a leggyakrabban alkalmazott refraktív lézersebészeti (PRK és LASIK) eljárásokat követően, másfelől a szaruhártya elhúzódo sebgyógyulási folyamataiban, a kémiai sérülések esetén/ fekély képződés során. A könny proteolitikus aktivitásának mélyreható tanulmányozása révén célunk volt újabb ismeretanyagot szerezni a szaruhártya sebgyógyulási folyamatainak pontosabb megértéséhez és esetlegesen új terápiás alkalmazás kidolgozásához.

1.1. Szubepiteliális lokalizációjú homályok (haze) háttérmechanizmusának tanulmányozása, indukálása és gátlása állatmodellben.

1.2. Plazminogén aktivátor inhibitorok (PAI) vizsgálata humán könnyben, jelentőségük a haze kialakulásában.

1.3. A plazminogén aktivátorok és inhibitorok változásainak tanulmányozása terhesség során.

1.4. Rekombináns plazminogén aktivátor inhibitor-2 fúziós fehérje előállítása és alkalmazhatóságának vizsgálata szaruhártyafekélyek gyógyításában.

II. A cukorbetegség progressziójával megjelenő könnyfehérjék és corneális sejtes, valamint idegi paraméterek azonosítása és ezek potenciális biomarkerként történő alkalmazhatósága a diabétesz szemszövődményeiben.

2.1. II-es típusú diabéteszes betegek könny fehérje-profiljának meghatározása.

2.2. Azonosított könnyfehérjék szűrőprogramokban történő alkalmazhatóságának vizsgálatai.

2.3. Proteomikai vizsgálatok kombinálása képfeldolgozó algoritmusokkal DR szűrésében.

2.4. Corneális konfokális mikroszkópia és a P200C AF ultraszéles látószögű pásztázó lézer oftalmoszkóp helye a diabéteszes szűrésében, beteg követésben.

3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Humán tanulmányainkat a helyi, Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar (jogelőd intézménye a Debreceni Egyetem Orvos és Egészségtudományi Centrum) Tudományos Bizottságának Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottságának engedélyeivel végeztük. A vizsgálatokba történő beválogatást megelőzően, a vizsgálatokban résztvevők írásos tájékoztatót kaptak, melynek elolvasása és megértése után aláírásukkal önkéntes beleegyezésüket adták a vizsgálatba - 18 éves kor alatt a beteg gondviselője - a Helsinki Deklarációban megfogalmazottaknak megfelelően.

A Moorfields Eye Hospital Reading Center-ben végzett vizsgálatainkat, a "Data Protection Authority" és a "National Bio-Ethics Committee in Iceland" engedélyeivel végeztük, szintén a Helsinki Deklarációban megfogalmazottaknak megfelelően.

Az állatkísérleteink elvégzéséhez a Debreceni Egyetem Orvos és Egészségtudományi Centrum Tudományos Bizottságának Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottságának és az Állatkísérletekre vonatkozó MÁB/DE-MÁB engedélyekkel rendelkezünk. Az állatokat az "ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research" nyilatkozata szerint kezeltük.

3.1 Refraktív célú lézersebészeti beavatkozásokkal kapcsolatos kísérletek

3.1.1 Fotorefraktív keratektómia

Fotorefraktív keratektómia (PRK) kezelés során a refrakciós hibák korrigálása lokális érzéstelenítés alkalmazása mellett történtek excimer lézerkezeléssel (Keratom II ArF (193 nm) Schwind, Kleinostheim, Németország) a 2003-as évig, majd ezt követően a lézerkészülék cseréjéből kifolyólag az Inpro Argon-Fluorid excimer lézert (Intraocular Prosthetic GmbH) alkalmaztuk. A kezeléseket minden esetben ugyanaz a szemész szakorvos végezte (Hassan Ziad a pácienseinken és Csutak Adrienne a kísérleti állatokon) egy adott kísérlet keretén belül ugyanazon lézerkészülék alkalmazásával. A szaruhártya epiteliális sejtrétegének eltávolítására Hockey kést használtunk, markerként Hoffer trepánt alkalmaztunk. A trepánnal jelölt terület átmérője a pupillára centrálva szférikus korrekció esetén 6,0-6,5 mm, asztigmatikus korrekció esetén pedig 7,5-8,0 mm volt. Az epitélium lekaparását a szaruhártya periferiájáról a centrum felé haladva végeztük, ügyelve, hogy lehetőleg elkerüljük a Bowman membrán sérülését. Az epitélium maradékok eltávolításához steril szivartampont használtunk. Szférikus korrekció esetén 6,0-6,5 mm átmérőjű ablációs zónát alkalmaztunk, asztigmatiával történő társulás esetén az alkalmazott szférikus átmérő 5,3-6,0 mm, az asztigmatikus ablációs zóna átmérője pedig 6,0-8,1 mm volt.

A műtét utáni kezelés: antibiotikum tartalmú szemcsepp alkalmazásával, (Ciloxan, Ciprofloxacin HCl 0,3%, Alcon) történt, mégpedig óránként az operáció első napján, melyet napi 5x-i cseppentés követett további öt napig, ami műkönny kezeléssel egészült ki (Tears Naturale, Dextrán/Hidroxipropil Metilcellulóz, Alcon). Az első öt nap után szteroid tartalmú Flucon (Fluorometolon 0,1%, Alcon) szemcsepp és Tears Naturale (Dextrán/Hidroxipropil Metilcellulóz, Alcon) műkönny használatára tértünk át. Ezeket az első hónapban napi 5x-i, a második hónapban napi 4x-i, majd a harmadik hónapban napi 3x-i cseppentés mellett alkalmaztuk. Pácienseink követése minimum 1 éven keresztül történt.

Az állatok (3,0-3,5 kg-os új-zélandi fehér nyúl) PRK kezeléseit a humán protokollt követve végeztük, azzal a módosítással, hogy az állatokon a műtéteket altatásban végeztük.

A kísérletben a haze értékelése a Hanna féle stádium beosztás szerint történt [184]. Az értékelést végző személy nem rendelkezett előzetes ismerettel a könny uPA aktivitásáról.

3.1.2 Lézer-asszisztált in situ keratomileusis

Lézer-asszisztált in situ keratomileusis (LASIK) során a szaruhártyalebeny (flap) készítése Hansatome Model HT 230 mikrokeratóm (Chiron) segítségével, lokális érzéstelenítéssel, Humacain 4 mg/ml szemcsepp (Oxibuprokain, Teva) alkalmazása mellett történt. A lebeny mélysége 180 µm volt azon esetekben, amikor a refraktív korrekciót követően a szaruhártya vastagsága - a lebeny vastagsága, és a lézer által "elpárologtatott" szövetmennyiség levonását követően - legalább 250 µm vastagságú maradt. Azon pácienseink esetében, akiknek a szaruhártyája vékonyabb volt és/vagy jelentősebb refrakciós hiba miatt a szaruhártya strómális állományának nagyobb részlete került elpárologtatásra (1 D körülbelül 10 µm-nek feleltethető meg), s aminek következtében az érintetlenül maradó szaruhártya vastagság - a lebeny vastagságának a kivonását követően - nem érte volna el a 250 µm-et, a lebeny vastagságát 160 µm-re csökkentettük.

A LASIK kezeléseket (193 nm) Inpro argon-fluorid excimer lézerrel (Intraocular Prosthetic GmbH), minden esetben ugyanaz a szemész szakorvos (Hassan Ziad) végezte. A posztoperatív terápia, a PRK kezelésnél ismertetett protokoll szerint zajlott. Pácienseinket egy éven keresztül követtük, ellenőriztük.

3.1.3 Könnymintavételek és a kapcsolódó biokémiai vizsgálatok

3.1.3.1 Könnymintavételek

A humán könnyminták gyűjtése, a szemhéjszél alsó marginális vonalának közelében a precorneális könnyfilmből történt, közvetlenül a refraktív sebészeti beavatkozás előtt és után, valamint az első posztoperatív kontrollok alkalmával. A PRK kezelés esetében a 3. és 5.

posztoperatív napokon, LASIK kezelés esetében pedig az első posztoperatív napon. A mintavételeket ingerlés nélkül, üvegkapilláris segítségével végeztük az alsó áthajlásban, vigyázva arra, hogy ne sértsük meg a kötőhártyát. A késői posztoperatív kontrollok az 1., 3. és a 12. hónapban történtek mindkét műteti típus esetében, ekkor könny minta gyűjtésére már nem került sor. Ahhoz, hogy a pre- és posztoperatív könny mintákat össze tudjuk hasonlítani, ki kellett zárunk a reflexes könnyezést. Azon könny minták kerültek felhasználásra, ahol a szekréciós sebesség 5-15 $\mu\text{l}/\text{perc}$ volt. A mintavétel minden esetben szemcsepp használat előtt történt (megelőző csepp használatához képest minimum két óra elteltével), üvegkapillárisal (hossza: 10 mm, átmérője: 1 mm). Az összes mintát centrifugáltuk (1800-as fordulatszámon) közvetlenül a mintavétel után, és a felülúszót -80°C -on tároltuk felhasználásig. Vizsgálataink során a könny minták gyűjtése és tárolása a fentiek szerint történt, melyekre a későbbiekben külön már nem térünk ki. Felolvasztásukra közvetlenül a méréseket megelőzően egyetlen alkalommal került sor. Kontroll mintáink esetében az operált szem mintavételeivel azonos időben és módon történt a könny minták gyűjtése.

Az állati (3,0-3,5 kg, új-zélandi fehér nyúl) könny minták gyűjtése ingerléssel történt, i.m. pilokarpin hidroklorid (5 mg/kg) alkalmazásával a humán könny minták gyűjtési technikájának egyebekben mindenben megfelelően.

3.1.3.2 Az urokináz típusú plazminogén aktivátor aktivitásának meghatározása

A könny urokináz típusú plazminogén aktivátor (uPA) aktivitásának a meghatározása spektrofotometriás módszerrel történt, humán plazminogén és plazmin-specifikus kromogén peptid szubsztrát, D-valin-L-leucil-L-lizil-p-nitroanilid (S-2251) felhasználásával. Ez a módszer elsősorban az urokináz típusú plazminogén aktivátor aktivitás meghatározására alkalmas. A kísérleti munka során alkalmazott szubsztrátot (S-2251), valamint plazminogént a Chromogenix (Milano, Olaszország) cégtől szereztük be. Az uPA mérésekhez referenciaként használt urokinázt (Choay, Párizs, Franciaország) S-2444-es szubsztráttal kalibráltuk, standard urokinázhoz (NIBSC, London, Anglia), Friberger szerint [185]. A specifikus aktivitása 100.000 IU/mg-nak adódott, ez megfelel a kereskedelemben kapható legtisztább preparátumok specifikus aktivitásának. Az uPA aktivitás és plazminszerű aktivitás meghatározását Shimada és mtsai módszerének [186] módosításával végeztük a következők szerint: 5 μl könnyet, standard urokinázt vagy plazmint inkubáltunk 37°C -on 100 μl 0,05 M Tris-HCl pufferben (pH 7,4), 0,5 mM S-2251 kromogén szubsztrát és 1 μM humán plazminogén jelenlétében. Mintáinkat 4 óra inkubálás után 405 nm-en fotometráltuk (Multiscan MS, Labsystem, Helsinki, Finland). A könny minták uPA aktivitásának meghatározása urokináz hígítási sor alapján

készített logaritmikus diagram alapján történt.

Enzimhez kapcsolt immunoszorbens vizsgálatot (ELISA/Immubind ELISA, American Diagnostica GmbH) végeztünk a könnyminták PAI-1 és PAI-2 mennyiségének meghatározására. A PAI-1 ELISA méréshez egérben termeltetett anti-humán PAI-1 antitestet használtunk, míg PAI-2 ELISA esetén egy poliklonális antitestet alkalmaztunk. A mintákat, a PAI-ellenes antitesttel előre bevont mikrolemezen inkubáltuk, majd a streptavidin-kötött torma peroxidázzal konjugált detektáló antitesteket hozzáadva az így megkötött PAI-1 és -2 molekulákat detektáltuk. A perborát/3,3',3,5'-tetrametilbenzidin szubsztrát hozzáadása és ennek a torma peroxidázzal kialakult végső reakciója kék oldatot eredményezett. A szenzitivitás növelése érdekében, kénsav hozzáadásával leállítottuk a folyamatot, miközben a kék oldat sárgává alakult. Az oldatok abszorbanciáját 450 nm-en, fotométer segítségével mértük le, és a standard hígítási sor alapján felvett görbe segítségével kiszámoltuk a minták PAI-1 ill. PAI-2 koncentrációját. A módszert mind a szabad, mind a proteáz-kötött formák kimutatására alkalmasnak találtuk.

3.1.4 Állatkísérletek a haze tanulmányozására és a kapcsolódó biokémiai vizsgálatok

3.1.4.1 Állatmodell a haze indukálására és gátlására, a terhesség, mint rizikófaktor

Állattanulmányunkba 30 egészséges (3,0-3,5 kg-os új-zélandi fehér nyúl) állatot vontunk be, melyből 27 állat mindkét szemén PRK kezelést végeztünk, három állatot nem operáltunk annak érdekében, hogy egészséges kontrollként szolgálhassanak a kísérlet folyamán. Az operált állatok közül 9 volt vemhes (2. trimeszter). A lézerkezeléseket a korábbiakban ismertetettek szerint végeztük el 27 állat mindkét szemén, altatásban, 6 D miópiás korrekciónak megfelelően (6 mm-es ablációs zóna, 68 µm ablációs mélység).

Az állatok uPA kezelése, a PRK humán protokollja szerint zajlott az alábbiakban részletezett módosítással, mely szerint az alkalmazott antibiotikum - Ciloxan (Ciprofloxacin HCl 0,3%, Alcon) - 50 IU/ml uPA-t (Ukidan, Serono SpA; Unterschleissheim, Germany) is tartalmazott az első posztoperatív hét folyamán. Ezt követően az állatok kezelése mindkét szem esetében a humán protokollnak felelt meg.

Az állatok aprotinin kezelése a PRK humán protokollja szerint zajlott az alábbiakban részletezett módosítással, mely szerint az alkalmazott antibiotikum - Ciloxan (Ciprofloxacin HCl 0,3%, Alcon) - mellett egy csepp 10.000 KIU/ml aprotinin (Gordox, Richter Gedeon Rt., Budapest) alkalmazására is sor került az első posztoperatív hét folyamán. Ezt követően az állatok kezelése mindkét szem esetében a humán protokollnak felelt meg.

Az alábbi táblázat részletesen ismerteti a kísérleti protokollt (**1. táblázat**). A csoport

megnevezést és besorolást a PRK kezelést követően alkalmazott humán terápia mellett alkalmazott kiegészítő kezelés vagy készítmény határozta meg [187].

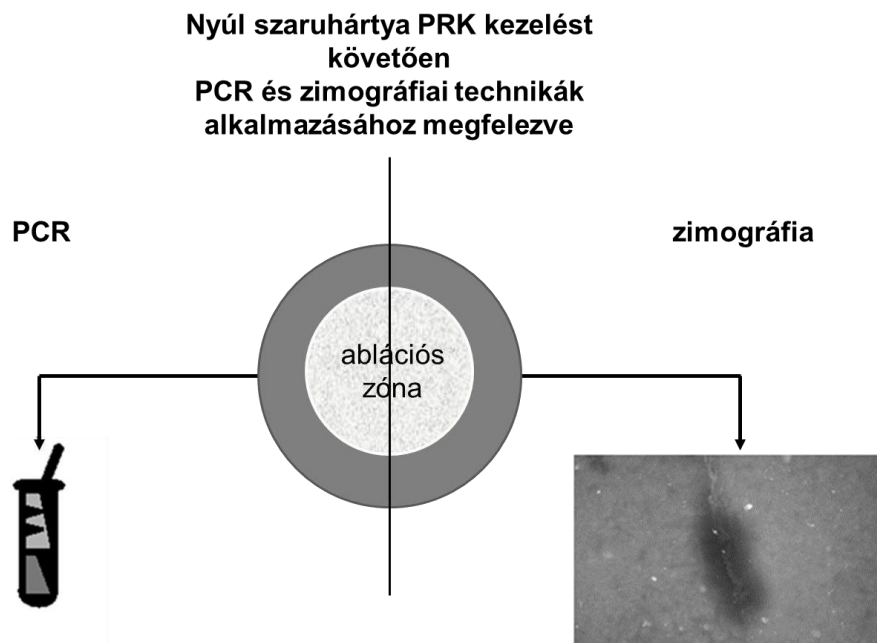
Csoport	Vemhesség	Szem (db)	Könnyminta
Aprotinin kezelés +	-	2	+
Aprotinin kezelés +	+	1	+
Aprotinin kezelés – (ellenoldali szem)	-	2	+
Aprotinin kezelés – (ellenoldali szem)	+	1	+
Nem operált kontroll	-	6	+
uPA kezelt	-	16	-
uPA kezelt	+	8	-
uPA nem kezelt kontroll (ellenoldali szem)	-	16	-
uPA nem kezelt kontroll (ellenoldali szem)	+	8	-

1. táblázat A PRK kezelést követő első posztoperatív hét kísérleti protokollja.

Aprotinin kezelés +: a humán protokoll [Ciprofloxacin HCl 0,3% és Dextrán/Hidroxipropil Metilcellulóz] a kezelések alkalmával egy csepp 10.000 KIU/ml aprotininnal egészült ki. Aprotinin kezelés -: humán protokoll szerint. uPA kezelt: a humán protokoll szerint alkalmazott antibiotikum 50 IU/ml uPA-t is tartalmazott. uPA nem kezelt: a humán protokollal megegyezett [190]

3.1.4.2 Az urokináz típusú plazminogén aktivátor aktivitásának meghatározása

A széles szubsztrát specificitású szerin proteáz inhibitor az aprotinin hatásmechanizmusának tanulmányozására tervezett állatkísérletünk során 22 állat (3,0-3,5 kg-os új-zélandi fehér nyúl) mindkét szemét operáltuk PRK kezeléssel; 3 D miópiás korrekciónak megfelelően 6,0 mm-es ablációs zónával, 34 µm-es mélységben [188]. Az állatok egyik szemét a humán protokollnak megfelelően kezeltük (kontroll szem), a másik szem kezelését pedig a fentiekben részletezett aprotinin kezeléssel egészítettük ki. Az állatokat a kezelést követő különböző időpontokban - 2 és 4 óra, 1. és 3. nap elteltével - altattuk túl és mindkét szemet enukleáltuk. A szaruhártyák trepanálását követően a corneákat megfeleztük, melyek egyik feléből RNS izolálást követően az uPA mRNS mennyiségét határoztuk meg, reverz transzkripció utáni valós idejű kvantitatív PCR technikával (qPCR), a másik felének felhasználásával pedig fagyasztás utáni metszeteken *in situ* zimográfiát végeztünk az uPA aktivitás megjelenítésére az alábbiak szerint (8. ábra).



8. ábra A PRK kezelt nyúl szaruhártyát megfelelően és egyik felén PCR, másik felén zimográfiai vizsgálatokat végeztünk [190]

A kvantitatív PCR-hoz szaruhártya darabokat használtunk fel, mellyel a transzkripció szinten megjelenő uPA mRNS szintjét mértük specifikusan. Az mRNS mennyiségének meghatározásához állat-specifikus primereket terveztünk és készítettünk a teljes hosszúságú nyúl uPA cDNS szekvenciájának ismeretében. A célzott szekvencia két végére tervezett primerek, valamint a próba primerek a „TaqMan” próba kívánalmainak megfelelően készültek. Belső kontrollként 18S riboszomális RNS mennyiségi meghatározásához általánosan használt primereket alkalmaztunk.

A szaruhártyákból a teljes RNS mennyiséget megfelelő, a kereskedelemben a Qiagen cég (CA, USA) által forgalmazott RNeasy kittel vontuk ki, majd SuperScript II reverz transzkriptáz (Invitrogen, MA, USA) segítségével, uPA specifikus primerekkel cDNS-sé fordítottuk át. A valós idejű kvantitatív PCR az előírt puffer körülmények között 40 cikluson keresztül tartott. A PCR során felszabaduló fluoreszcens jelet ABI Prism 7900 HT készülékkel rögzítettük.

Az uPA mennyiségének meghatározásához, az értékelés során az egyes mintáknál azt a PCR ciklus számot vettük alapul, amikor a fluoreszcens emisszió átlépte az érzékelési küszöböt. Ezeket az értékeket ugyanazokból a mintákból származó 18S riboszomális RNS meghatározásakor detektált ciklusszámmal normalizáltuk.

A lefagyasztott szaruhártya másik felének darabjait *in situ* zimográfianak vetettük alá, annak érdekében, hogy a sebgyógyulás során megjelenő uPA kifejeződés helyét tanulmányozzuk és meghatározzuk a kialakult uPA aktivitás mértékét. A fagyasztott

szaruhártya darabokból készült szeletek uPA aktivitását kazein-agar fedő oldat - mint szubsztrát - felhasználásával vizsgáltuk [189]. A fedőoldat a puffer összetevői mellett sovány tejet, agart és aktiválandó plazminogént tartalmazott. Kontroll minták esetén a folyamatot plazminogén hiányában vizsgáltuk - bizonyítandó a plazminogén uPA általi aktivációját -, és ez által a kazein plazmin függő degradációját. A szaruhártya szeleteket tárgylemezen, a kazein oldat hozzáadása után, fedőlappal takartuk, majd páradús környezetben 13 órán keresztül inkubáltuk. A kazein hidrolízis mértékének vizsgálata sötét látóterű mikroszkóppal, a hozzá tartozó területek azonosítása - fázis-kontraszt beállítás mellett - Zeiss Axioskop 2-es mikroszkópon, 10x Plan Achromat objektívvel; a képek dokumentálása a mikroszkópon elhelyezett Zeiss Axiocam kamerával történt.

A kiértékeléshez minden mintát azonos megvilágítás és azonos expozíciós kondíciók mellett rögzítettünk, vigyázva, hogy minden érintett pixel a digitalizációs zónába essen. A sötét látóterű felvételek kvantitatív elemzéséhez a LabVIEW grafikai környezetet biztosító felületen programot írtunk. A küszöbérték beállítása minden felvételnél egyedileg történt, nem hidrolizált, alacsony intenzitású zóna beállításával. Minden szaruhártya mintából 3-3 különböző szeletet vizsgáltunk.

3.1.5 Humán vizsgálatok

3.1.5.1 A plazminogén aktivátor inhibitor szintek meghatározása refraktív lézersebészeti beavatkozások során

A plazminogén aktivátor inhibitorok (PAI-1 és PAI-2) szintjeit humán könnymintákban vizsgáltuk, PRK és LASIK kezelés előtt és után a korai posztoperatív időszakban. A mintavételeket a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Szemklinikáján működő Vitál-Lézer Kft-nél végeztük.

Tanulmányunkban PRK kezelés 46 szemén történt (38 páciens, 8 esetben kétoldali kezelés, átlagéletkor 26 ± 5 év), még LASIK kezelést 13 szemén végeztünk (8 páciens, 5 esetben kétoldali kezelés, átlagéletkor 28 ± 9 év) [190]. Statisztikailag szignifikáns különbség a csoportok között nem volt ($p=0,535$ t-teszttel). A PRK kezelés esetén a műtét előtti refrakciós hiba átlagértéke $-4,11 \pm 2,22$ D, míg LASIK kezelés esetében $-5,13 \pm 1,89$ D volt. Az átlag ablációs mélység a PRK csoport esetében 48 ± 20 mm, a LASIK csoportnál 59 ± 13 mm volt. Statisztikailag kimutatható szignifikáns különbség a 2 csoport között ($p=0,074$ t-teszttel) nem volt.

A könnyminták PAI-1 és PAI-2 mennyiségének meghatározására enzimhez kapcsolt immunoszorbens vizsgálatot (ELISA/Immubind ELISA, American Diagnostica GmbH)

végeztünk a 3.1.3.2 fejezetben részletezett módon: PRK típusú lézerkezelés esetében 61 könny minta PAI-1 és 146 könny minta PAI-2 meghatározása történt. LASIK kezelés esetén 35 könny mintában határoztuk meg a PAI-2 szintjeit, PAI-1 meghatározás nem történt. Az alsó detektálhatósági határ PAI-2 vonatkozásában 100 pg/ml még a PAI-1 esetében 4 ng/ml. Az alkalmazott módszer mind a szabad, mind a proteáz-kötött formákat képes kimutatni.

3.1.5.2 Plazminogén – aktivátor és inhibitor, valamint hormonszint vizsgálatok terhesség során

A PAI-1 és PAI-2 szintek, valamint az uPA szint meghatározására irányuló vizsgálatainkat egészséges várandós önkéntesek bevonásával végeztük. Vizsgálataink során bármely szemészeti megbetegedést, kontaktlencse viselést, illetve gyógyszer szedését kizáró oknak tekintettük, életkoruk a PAI-1 és PAI-2 szintek meghatározása esetén 19-33 (átlag: $27,42 \pm 4,13$) év volt. A könny minták gyűjtése a terhességi trimesztereknek megfelelő szülészeti kontrollok alkalmával történt, és a gyermek megszületését követő 1 héten. A könny mintavételek a már ismertetésre került protokoll szerint történtek a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika ambulanciáján. Pácienseink esetében a terhességek lefolyása zavartalanul zajlott (39-40. hét, egy esetben 37. hét), mely a szülés és az azt követő időszakról is elmondható.

Könny mintáink vizsgálatai során 19 várandós betegünk 56 könny mintáját analizáltuk PAI-2 szint meghatározás vonatkozásában. További 13 várandós nőtől gyűjtött 45 könny minta esetén történt PAI-1 aktivitás mérés. Kontrollként (45 páciens), korban illesztett nem várandós nők könny mintáiban történt PAI-1 és PAI-2 szintek meghatározása.

A könny minták PAI-1 és PAI-2 szintjeinek mérése ELISA módszerrel történt a 3.1.3.2 fejezetben ismertetettek szerint.

A vizsgálni kívánt hormonszinteket (ösztadiol (E2) és progeszteron (P4)) mind a könnyből mind a vérből meghatároztuk. A vérminták gyűjtésére a könny mintavételekkel egyidőben került sor, 17 várandós páciensünk (51 minta) esetében. A v. basilicából 4 ml vért gyűjtöttünk (0,5 ml 0,105 M Na₃-citrát antikoaguláns tartalmú csövekbe), a mintákat azonnal jégre helyeztük, centrifugáltuk (1800-as fordulatszám 10 percig) és a plazmát különválasztva fagyasztottuk le -80°C-ra.

A PAI-1 és PAI-2 szinteket vérplazmából ELISA módszerrel határoztuk meg, összesen 25 várandós páciensünk 87 mintájában végeztünk PAI-2 és 10 páciensünk 20 mintája esetén PAI-1 meghatározást.

Várandós pácienseink könny uPA szintjének vizsgálati felépítését a 2. táblázatban szemléltetjük, melyet a refraktív sebészeti részben leírtaknak megfelelően végeztünk.

	Nem várandós páciens	9 - 12 terhességi hét	14 - 23 terhességi hét	25 - 39 terhességi hét	Szülést követő 1 hét
Átlagéletkor	28,7	34,2	32,6	30,1	32,1
Átlagtól való eltérés (SD)	7,9	5,7	4,5	4,9	5,4
Legidősebb életkor	46	42	39	42	39
Legfiatalabb életkor	17	19	23	21	23
Résztvevők száma	18	19	30	24	10

2. táblázat A vizsgálatba bevont nők számát és életkorát az egyes terhességi korokat a 2. táblázat összefoglalóan tartalmazza

Tanulmányunkban 104 mintavétel történt, melyből 3 mérés eredménye került kizárássra kiugróan eltérő értéke miatt. A minták normális eloszlását és ekvivalenciáját megvizsgáltuk, az alábbi statisztikai analízist végeztük: t-tesztek, medián tesztek, khi-négyzet eloszlás alkalmazás, Yates-korrekción, Mann-Whitney U-tesztek és variancia analíziseket végeztünk.

3.1.6 Statisztikai analízisek a refraktív lézersebészeti beavatkozásokkal kapcsolatban

A szaruhártya refraktív lézerkezelését követő sebgyógyulási folyamatok elemzésére, az uPA aktivitás változásának vizsgálataira (állat és humán), továbbá a várandós páciensek különböző mintavételi szakaszaiban történt könnyminták PAI mintázatának megismerésére standard statisztikai analízist végeztünk. A különböző betegcsoportok összehasonlítására egyenlő varianciákra alkalmazott t-tesztet használtunk, a kontrollcsoportokkal való összevetés pedig párosított t-teszt történt [191]. Szignifikánsnak tekintettük a különbségeket akkor, ha $p < 0,05$ és kifejezett szignifikanciáról beszéltünk $p < 0,001$ érték vonatkozásában. Az egyes kísérletekben, a fentiektől esetlegesen eltérően alkalmazott statisztikai elemzési módszerek esetén a kísérlet leírásához tartozó alfejezetekben kerülnek ismertetésre.

3.2 Szaruhártyafekély képződéséhez kapcsolódó kísérletek

3.2.1 Rekombináns plazminogén aktivátor inhibitor-2

A fúziós fehérje előállítása során egy olyan vektor konstrukciót alkalmaztunk, amely kettős segítő - fehérje/peptid - szekvenciát is tartalmaz. A termeltetett fúziós fehérje N-terminális részén (amely jelen esetben a PAI-2) hexahisztidin szekvencia (His6-tag) helyezkedik el, melyet maltóz kötő fehérje-szekvencia (MBP) követ. A His6-tag a fehérje tisztítását segíti, mégpedig nikkel - kelát kromatográfiás eljárással. Az MBP az expresszió mértékét, és a vele fuzionált formában elhelyezkedő fehérje feltekeredését és aktív formába kerülését segíti elő, de egy második kromatográfiás tisztítási lépés során is kihasználható az amilóz töltetű oszlophoz történő szelektív kötődése. Az MBP, His6-tag és a PAI-2 szekvencia közé dohánymozzaik vírus (TEV) proteáz hasítási helyet klónoztunk be, így a fúziós fehérjéről egy proteolitikus hasítással a segítő-fehérjék/peptidek leválaszthatók.

A rekombináns fúziós fehérje előállításához elkészítettük a PAI-2-t periplazmatikusan expresszáló plazmid klónt. A 89 kDa-os fúziós fehérje expresszióját *Escherichia coli* BL21 törzsben végeztük, melyet előzőleg 37°C-on növesztettünk Luria-Bertani tápoldatban a közepes log fázis eléréséig. Ezután 1 mM IPTG (izopropil-1-tio- β -D-galaktopiranozid) alkalmazásával indukáltuk a fúziós fehérjék termelését. A PAI-2 fehérjerész jelenlétét a fúziós fehérjében anti-PAI-2 antitest felhasználásával (Biopool) elkészített immunoblottal bizonyítottuk. A baktériumok periplazmájából a fehérjéket ozmotikus sokk-eljárással nyertük ki [192], majd nikkel- nitrilotriecetsav (Ni-NTA) töltetű tartalmazó oszlopon affinitás kromatográfiát végeztünk. A fehérjéket 0-150 mM lineáris imidazol grádienssel eluáltuk, majd a frakciók tisztaságát SDS poliakrilamid gélelektroforézissel ellenőriztük. Az imidazol dialízissel történő eltávolítása után a fúziós segítő – fehérje/peptid végek lehasítása dohánymozzaik vírus (TEV) proteázzal történt, mely szintén rendelkezik hexahisztidin véggel, így egy második Ni-NTA affinitáskromatográfia segítségével eltávolítható és kinyerhető a tiszta fehérje. A második tisztítási lépés során a fehérjék aggregálódtak, így az átfolyóban a tiszta fehérjék mellett több komponens is megjelent. Aktivitás-vizsgálataink szerint erre a lépésre nem volt szükség, ezért a kísérleteinkben Amicon Ultra 10 kDa (Millipore) koncentrátorral töményített fúziós fehérjét használtuk. Az így kapott 0,5 mg/ml koncentrációjú oldatokat használtuk a későbbi kísérletekben.

A fent ismertetett módon előállított fehérje urokináz gátló aktivitását mikrotiter lemezes módszerrel ellenőriztük. Az aktivitásméréshez használt oldat összetevői a következők voltak: 140 µl puffer (100 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 8,5), 20 µl 3 mM piro-Glu-Gly- Arg-pNA kromogén szubsztrát (S-2444, Chromogenix), 20 µl 700 IU/ml uPA (Choay). Ehhez az elegyhez 20 µl tisztított PAI-2 fehérjét (illetve kontrollként desztillált vizet) adtunk. Az uPA aktivitását előzőleg S-2444 szubsztráttal kalibráltuk [40]. A reakcióelegyeket 20 percig inkubáltuk 37°C-on, majd a hasított szubsztráthoz köthető színváltozást 405 nm-en Labsystems Multiskan MS mikrolemezes leolvasóval detektáltuk.

A rekombináns PAI-2 fehérje aktivitását SV-40-transzformált humán corneális epitél sejtek (HCE-T, mely Kaoru Araki-Sasaki ajándéka, az Osaka University, School of Medicine, Osaka, Japan, a Riken Cell Bankon keresztül) tenyészetén is ellenőriztük. A sejteket mikrotenyésztő lemezekre (20000 db sejt/lyuk) raktuk és megfelelő tápfolyadékban (amely, 200 U/ml penicillint és streptomycint, 5% FBS-t, 5% glutamint, 5 µg/ml inzulint, 0,5% dimetil szulfoxide-ot és 10 ng/ml humán epidermális növekedési faktort tartalmazó DMEM/F12 tápfolyadékban) növesztettük. A tápfolyadék eltávolítása után a sejteket PBS-el mostuk, majd az intakt sejtekre 0,8 IU/ml illetve 2 IU/ml PAI-2 fehérjét tartalmazó PBS oldatot (kontrollként PBS-t) mértünk rá. 15 perc 37°C-on végzett inkubáció után a sejteket ismételt PBS-sel mostuk, majd a sejtek uPA aktivitását mértük egyrészt intakt sejteken, illetve a membránkött uPA 10 % Triton-X 100 hozzáadásával történő szolubilizálása után. Az uPA méréséhez a sejtekhez 25 µl 2,5 mM D-Val-Leu-Lys-pNA szubsztrátot (S-2251, Chromogenix), 25 µl plazminogént (2,5 IU/ml, Chromogenix) és 65 µl PBS-t mértünk. A negatív kontroll plazminogén helyett vizet tartalmazott.

3.2.2 Rekombináns plazminogén aktivátor inhibitor-2 alkalmazása állatmodellben

A rekombináns PAI-2 fehérje tartalmú szemcsepp tanulmányozására állatkísérletet végeztünk a kémiai sérülés és ennek következtében fellépő fekélyesedési folyamat modellezésével, melyhez új-zélandi fehér nyulakat (6 kísérleti állat, egyenként 3-4 kg-osak) használtunk. A kémiai sérülést az állatok mindkét szemén 6 mm-es átmérőjű, 0,5 M Nátrium- hidroxid (NaOH) oldattal átitatott szűrőpapír korongnak 20 másodpercig a corneához történő érintésével váltottuk ki. A fájdalom megelőzésére Humacain 4 mg/ml szemcsepp (Oxibuprokain, Teva) szemcseppet alkalmaztunk. A sérülés indukálását követően a corneát és a kötőhártya zsákot a lúg maradéktalan eltávolítása céljából fiziológiás sóoldattal öblítettük, melyet lakmuspapírral ellenőriztünk. Ezután mindkét szemet különbözőképp kezeltük. Az állatok kontroll szemét antibiotikumot (Ciloxan, Alcon) tartalmazó szemcseppel kezeltük 5x-i cseppentéssel naponta, a bakteriális

felülfertőződés megakadályozására. Az ellenoldali szem kezelésére Ciloxan szemcseppben oldott, 5 IU/ml uPA ekvivalens rekombináns PAI-2 fehérjét használtunk naponta 5x-i cseppentés mellett. A szemcsepp dózisének megállapításához meghatároztuk az uPA aktivitást a fentiekben ismertetett kromogén szubsztrátos módszerrel [193] kémiai sérülés utáni, inhibitorral nem kezelt nyúl szemből nyert könnymintákban.

3.3 A cukorbeteg diabéteszes szemszövődényeihez kapcsolódó vizsgálatok

3.3.1 Diabéteszes retinopátiára jellemző könnyfehérjék azonosítása

Tanulmányunkba 119 cukorbeteg (II-es típusú DM) páciensünk került bevonásra. A páciensek a Debreceni Egyetem Általános Orvosi Kar Szemklinikájának rendszeres gondozásában álltak és a nemzetközi standardoknak megfelelően, szemfenéki elváltozásaik alapján három csoportba kerültek besorolásra: i) normál szemfenéki kép, ii) nem proliferatív diabéteszes retinopátia és iii) proliferatív diabéteszes retinopátia.

A szemfenéki elváltozások megállapítására és a diabéteszes retinopátia besorolására minden esetben tágitott pupilla mellett, 90 D-ás lencse alkalmazásával került sor. A vizsgálati csoportokban a nemek aránya és az életkor megoszlás az alábbiak szerint alakult: i) normál csoport: nő és férfi arány közel 1,5:1 (átlagéletkor: 61 év); ii) nem proliferatív diabéteszes retinopátia csoportja: nő és férfi arány közel: 2:1 (átlagéletkor: 56 év); iii) proliferatív diabéteszes retinopátia csoportjában: nő és férfi arány közel: 1:1 (átlag életkor: 64 év). A kontroll egészséges csoportot 26 önkéntes medikushallgató képezte, ahol a nemek arány 1:1 volt (átlag életkor: 22 év).

A könnymintavétel a korábbiakban (3.1.3.1 pontban) ismertetett standard protokoll alapján történt 119 diabéteszes páciensről az alábbi bontásban: i) diabéteszes beteg retinopátiás elváltozások nélkül; ii) nem proliferatív és iii) proliferatív diabéteszes retinopátiás stádiumban lévő betegek egyedi könnymintái, melyeket 26 egészséges önkéntestől gyűjtött könnymintával - együttesen kezelt ("poolozott minta") - vetettünk össze.

Könnyminták fehérjeinek izobár kémiai jelölése tömegspektrometriás analízishez

A könnyminták fehérjetartalmának meghatározásához Bradford módszert használtunk (BioRad). A begyűjtött könnyminták kémiai jelölését (iTRAQ 4plex) végeztük el az ABSciex (Framingham, MA, USA) gyártó utasításai alapján kisebb módosításokkal. A fehérje emésztéséhez és jelöléséhez trietil-ammónium-bikarbonát (TEAB) puffert használtunk. Ezután a fehérjét urea (5,2 M végkoncentrációban) hozzáadásával denaturáltuk, majd 10mM végkoncentrációban adott trisz-(2-karboxietil)-foszfát (TCEP) redukáltuk és 15 mM metil-

metántioszulfonáttal (MMTS) alkiláltuk. Szobahőmérsékleten végzett 10 perces inkubáció után a mintákat TEAB pufferrel (0,25 M vég koncentráció, pH 8,5) kihígítottuk úgy, hogy az urea koncentrációja 2 M legyen. A minták oldatban emésztéséhez 1,6 µg MS minőségű, stabilizált tripszint használtunk (ABSciex), egy éjszakán át folytatott 37°C-os inkubálással. A megemésztett peptideket beszárítottuk, majd 20 µl 0,5 M TEAB pufferrel (pH: 8,5) és 200 µl abszolút etanol hozzáadásával oldottuk fel. A jelölés érdekében 20 µl iTRAQ reagenst adtunk a mintákhoz, mellyel 3 órás szobahőmérsékleten történő inkubálást végeztünk.

Az egészséges csoport egyesített könnyemintáit iTRAQ 114-es, míg az egyedi mintákat a normál csoport esetén iTRAQ 115-ös, a nem proliferatív csoport mintáit iTRAQ 116-os és a proliferatív csoport mintáit iTRAQ 117-es jelzéssel láttuk el. A jelölést követően, a mintákat véletlenszerűen válogattuk ki mindegyik csoportból, majd összekevertük azokat. Az így létrehozott, négyféle módon jelzett, kevert mintákat beszárítottuk és 200 µl 5% acetonitril és 0,1% hangyasav tartalmú oldatban feloldottuk, majd tovább savasítottuk koncentrált hangyasav hozzáadásával. Legvégül 5 percig 14000 rpm fordulatszámon centrifugáltuk. A felülúszót használtuk fel az LC-MS/MS analízisekhez.

LC-MS/MS analízis

A kromatográfiás elválasztáshoz a mintákat Zorbax 300SB-C18 oszlopra (Agilent, Santa Clara, CA, USA) injektáltuk 200 perces acetonitril/víz grádienszt alkalmazva, ahol fokozatosan növeltük az acetonitril koncentrációját 0%-ról 30%-ra 163 perc alatt. Az "A" oldószer 2% acetonitrilt és 0,1% hangyasav vizes oldata volt, míg a "B" oldószer 2% víz 0,1% hangyasav acetonitriles oldatából állt. A vizsgálat során 300 nl/perc-es volt az áramlási sebesség.

LC-MS/MS analízist végeztünk nanoHPLC-vel (Agilent 1100 series) kapcsolt 4000 QTRAP (ABSciex, Framingham, MA, USA) tömegspektrométer segítségével, NanoSpray II MicroIon forrás használatával. Információ - függő adatgyűjtő módszert (Information Dependent Acquisition - IDA) alkalmaztunk, amelynek során egy pásztázást követően kiválasztottuk a két legintenzívebb ún. prekursor ionot, meghatároztuk a prekursor ionok töltöttségét, majd a töltöttség alapján számolt ütközési energiákat alkalmazva a prekursor ionokat fragmentáltuk. A fragmenseket analizáltuk és a felvett MS/MS spektrumokat dokumentáltuk. Mindegyik esetben 2 MS/MS spektrumot adtunk össze és ezt használtuk a fehérje azonosításhoz és kvantitáláshoz. A ciklusidő 4,79 másodperc volt.

Adat- és statisztikai analízisek

A tömegspektrometriás adatokat ProteinPilot 2.0.1. (ABSciex) szoftverrel elemeztük ki, az UniProtKB / Swiss-Prot adatbázis használatával. A fehérje azonosításhoz a szoftverbe épített Paragon módszer ProGroup algoritmusát használtuk. A fehérjék kvantitálása ugyancsak a ProteinPilot 2.0.1. szoftverrel történt; a 114, 115, 116, illetve 117-es jelölő anyagok görbe alatti területeiből az azonosított fehérjék egymáshoz viszonyított, relatív mennyiségét határoztuk meg. Az adatok értékelésénél csak a szoftver által számolt szignifikáns ($p < 0,05$) eltéréseket vettük figyelembe.

Szükségünk volt az adatok normalizálására, mivel a felhasznált 2 μ l mennyiségű könny eltérő mennyiségű fehérjét tartalmazott. A normalizálás során figyelembe vettük az egészséges csoport könnyfehérje tartalmát, valamint a többi jelölési kísérlet során alkalmazott fehérje mennyiségeket.

A normalizált adatokat statisztikailag elemeztük. Az összehasonlításához SPSS 15.0 szoftvert (SPSS Inc. Chicago, USA) használtuk, valamint a nem-paraméteres Mann-Whitney U-tesztet. A részletesebb adatelemzés érdekében az általában microarray adatelemzésre használt GeneSpring 7.3 szoftvert (Agilent Biotechnologies) használtuk, mely során a legalább kétszeres változást mutató fehérjéket vettük számításba. A lehetséges azonosított biomarkerek hasznosságának megállapításához ROC analízist végeztünk.

3.3.2 Tanuló algoritmusok alkalmazhatósága a diabéteszes retinopátia szűrésére

Tanulmányunkban 119 cukorbeteg (II-es típusú DM) páciens, 165 szemét és könnymintáit vizsgáltuk, melyből 46 esetben történt könnymintavétel mindkét szem kötőhártya áthajlásából. A beválogatást kizáró kritériumok az alábbiak voltak: nem diabétesz eredetű generalizált betegség, bármely típusú invazív szemészeti beavatkozás, szemfelszíni vagy egyéb nem diabétesz vonatkozású szemészeti betegség és kooperációs nehézség). A mintavételek és a minták tárolása a korábbiakban ismertetett standard protokollnak felelt meg. A DR diagnosztizálása általános szemészeti vizsgálaton alapult, melyet 7-mezős fundusfotókon alapuló DR stádium beosztás követett, Megaplug Camera Model 1.6i/10 BIT Zeiss (Carl Zeiss Ophthalmic System A6, Jena, Németország) készülékkel készített fotóelemzéssel, két egymástól független szemész szakorvos által.

A könnyminták fehérje meghatározása az előző alfejezetben leírtaknak megfelelően történt, nano HPLC-vel kapcsolt ESI-MS/MS tömegspektrometriás módszerrel.

A MA-ák, mint a DR legfontosabb és informatikailag viszonylag könnyen leírható elváltozására, a fundusfotók képfeldolgozási módszertannal történő elemzéséhez gépi tanulás alapú MA detektort hoztunk létre. A tanulóalgoritmus alapú, automatizálni kívánt képfeldolgozó eljárás inputját a vizsgálni kívánt fundusfotókon azonosított MA-ák száma adta,

kimenetét a DR osztályozása (DR vs. normál fundus/nincs-DR) képezte.

Modellünk megalkotása érdekében az alábbi optimálisan parametrizált gépi tanuló eljárásokat hasonlítottuk össze: Support Vector Machine (SVM), Recursive Partitioning (Rpart), Random Forest (randomForest), Naive Bayes (naiveBayes), Logistic Regression (logReg), K-Nearest Neighbor (k-NN), melyeket röviden az alábbiak jellemeznek.

A felügyelt tanulási módszerek családjába tartozó sokdimenziós adatokon alkalmazható SVM módszer célja olyan szeparáló hipersík keresése, amely a lehető legjobban választja el egymástól a két tanulmányozni kívánt osztály (DR vs. nincs-DR) elemeit. A kifejezetten számítógépes alkalmazásra fejlesztett osztályozó eljárás az Rpart algoritmus végeredménye egy bináris jellegű osztályozó fa struktúra. Az algoritmus mintafelismerésen alapul, azaz a vizsgált minta jelenségeinek azonosítása alapján hozott döntési szabályok sorozatát alkalmazva csoportosítja annak elemeit. A randomForest olyan osztályozó módszer, mely sok változóval rendelkező kicsiny mintaszám esetén is jól alkalmazható. A naiveBayes osztályozó algoritmus, bemenete alapján képes a legnagyobb valószínűség szerint osztályozni, azaz egy elem osztályozásánál azt az osztályt választani, amelynek a legnagyobb a valószínűsége a megfigyelések és az elem további attribútumai alapján. A módszer lényege az, hogy a Bayes-tétel segítségével meghatározható az optimális klasszifikációs szabály. A naiv Bayes osztályozó módszer azt feltételezi, hogy egy osztályon belül az attribútumok feltételesen függetlenek egymástól. A logReg modellek célja, hogy a minta megfigyelési elemeit az előre meghatározott csoportokba besorolják. A módszer azzal a feltételezéssel él, hogy az odds arány logaritmus a lineárisan függ a magyarázó változóktól. A logreg modell alapgondolata, hogy a valószínűség helyett olyan - a valószínűséggel egyenértékű - mérőszámokat használ, amelyeknek értékei nem korlátozódnak a bináris [0,1] tartományra. A k-NN módszer azon alapgondolaton nyugszik, hogy a hasonló attribútumú objektumok hasonló tulajdonságokkal rendelkeznek, és a hasonlóság nagysága távolságfüggvénnyel mérhető. Egy új minta osztályozása esetében az n-dimenziós térben keressük tehát azt a k tanuló mintát, amelyek a legközelebb van(nak) az ismeretlen mintához.

Kombináción alapuló tanuló algoritmusok

Háromféle automatizált monitorozó rendszert fejlesztettünk és teszteltünk tanulmányunkban. Röviden ismertette: i) a könnyfőérje biomarkerek; ii) MA-k detektálásán alapuló algoritmusok digitalizált retinaképeken; iii) a fent említett két módszer ötvözte, kombinált módszer.

Kombinált monitorozási módszerünk tesztelése 52 II-es típusú cukorbeteg páciensünk

74 szemének könnymintái és digitális fundusfotói elemzése alapján történtek (21 ♂/31 ♀; átlagéletkor: 65,19 év; cukorbetegség fennállásának ideje: átlag 16,44 év).

Az informatikai modell felépítéséhez és teszteléséhez az ún. 7-mezős fundusfotókat [194], és a fotódokumentációval egyidőben vett könnymintákat használtuk. Vizsgált pácienseink esetében (74 szem) 56 fundus mutatott DR jellemző elváltozást.

A könnymintákat nano-HPLC kapcsolt ESI-MS/MS tömegspektrometriás készülékkel analizáltuk a 3.3.1. fejezetben leírtaknak megfelelően, majd a kapott proteomikai analízis eredményeit összevetettük a szemfenékről készült fundusfotókkal, valamint a kombinált módszertannal kapott eredményekkel.

3.3.3 Potenciálisan alkalmazható új szűrőmódszer a szemészetben

3.3.3.1 *In vivo* konfokális cornea mikroszkópia

Első vizsgálatunkba I-es típusú cukorbetegségben szenvedő 28 betegünk (15 ♀ és 13 ♂, átlag életkor: 22,86±9,05 év) és 17, korban illesztett kontroll, egészséges fiatal (9 ♀ és 8 ♂, átlag életkor: 26,53±2,43 év) került bevonásra. Második, 2 éves követéses tanulmányunk során a korábbi 28 beteg közül 19 páciens (9 ♀ és 10 ♂) esetében ismételtük vizsgálatainkat. A kontrollcsoport, mind általános mind szemészeti szempontból teljesen egészséges volt és egyik csoportban sem volt kontaktlencse viselő, vagy előzőleg szemészeti beavatkozáson átesett páciens. Az első vizsgálat során az I-es típusú DM-ban szenvedő betegeinket további két csoportra osztottuk: DR-ban nem szenvedő (18 beteg, átlagéletkor: 16,45±2,59 év) és DR-ban szenvedők (10 beteg, átlagéletkor: 32,51±5,99 év) csoportjára. A követéses tanulmány során 12 beteg (16,12±3,24 év) DR-ban nem szenvedett, 7 páciens (36,32±6,18 év) DR-ban szenvedett. A szemészeti vizsgálatok az alábbiakat foglalták magukba: réslámpás vizsgálat, tágításban történő fundus vizsgálat, intraocularis szemnyomás mérés és corneális konfokális mikroszkópia.

Módszerek

Az anamnézis és a látásélesség felvételét követően végeztük el a CCM vizsgálatot mind az első, mind a követéses tanulmány során, melyeket minden páciensünk mindkét szemén kivitelezünk a Heidelberg Retina Tomográf III Rostock Cornea Modul (HRT III RCM, Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Germany) alkalmazásával. Genteal Gél (0,3% hipromellóz; Novartis Ophthalmics, East Hanover, NJ) került behelyezésre egy egyszer használatos steril polimetil-metakrilát kupakba (Tomo-Cap; Heidelberg Engineering GmbH), melyet a lencse objektívra helyeztünk fel. A vizsgálatot egy csepp Tetrakain (Tetrakain

hidroklorid 0,4%) helyi érzéstelenítése után végeztük. A páciens arra kértük, hogy a távolba fixáljon mielőtt a műszer vizsgálófejét a szaruhártya centrumához érintettük. A vizsgálat kb. 5 percet vett igénybe, pácienseink sem ez alatt sem utána nem panaszkodtak fájdalomra, kellemetlenségre vagy a látásélesség változására. Minden vizsgálatot ugyanaz a tapasztalt szemésorvos végezte (Szalai Eszter). A Heidelberg HRT-III mikroszkóp segítségével a szaruhártya centrumának részletei párhuzamos felszíni síkban, 384x384 pixel felbontásban, 1 μm mélységben és 400x400 μm^2 - es látómezőben kerültek dokumentálásra. Analízisre a normál kontrollok és a DR-ban nem szenvedő pácienseink jobb szemének vizsgálati eredményei kerültek. A DR-ban szenvedő pácienseink esetében szintén a jobb szem került bevonásra, kivéve azon esetekben, amikor ezen a szemén műtét történt, ilyenkor a bal szemet elemeztük. A bazális epitélium, a poszterior stróma, az endotélium és a subbazális idegi plexus analíziséhez 3-3 jó minőségű kép került kiválasztásra. A bazális epitéliumnak a Bowman membrán előtti, a poszterior strómának a Descemet membrán előtti három-három éles szelet felelt meg [195], [196]. További összehasonlító vizsgálatainkhoz a kiválasztott képek eredményeinek átlagait használtuk.

Vizsgálataink során a sejtszám meghatározásokat a műszer biztosította szoftverrel végeztük, félautomata sejtsűrűség-meghatározással. Az epitélium, a keratocita és az endotél sejteket az érdekelt területből választottuk ki, amely legalább 50 darab sejtet tartalmazott. Ezt követően a sejteket manuálisan jelöltük ki, melyekből a szoftver automatikusan kalkulálta ki a sejtsűrűséget (sejt/ mm^2). A kiválasztott területek nagysága az epitélium esetén $0,033 \pm 0,001 \text{ mm}^2$, a stróma esetén $0,157 \pm 0,0005 \text{ mm}^2$ és az endotélium esetén $0,032 \pm 0,006 \text{ mm}^2$ volt. A subbazális idegi plexus morfológiájának meghatározására automata analízáló szoftvert alkalmaztunk (ACCMetrics, University of Manchester, Manchester, UK) [197]. Az alábbi paraméterek kerültek kvantifikálásra: az idegrost sűrűsége (Nerve Fibre Density, NFD) - az idegrostok száma/ mm^2 ; az idegelágazódások sűrűsége (Nerve Branch Density, NBD) - az elsődleges elágazódási pontok a fő idegroston/ mm^2 ; az idegrostréteg hossza (Nerve Fibre Length, NFL) - az idegrostok teljes hosszúsága mm/mm^2 ; idegrost teljes elágazódások sűrűsége (Nerve Fibre Total Branch Density, TBD) - elágazódási pontok teljes száma/ mm^2 ; idegrost területe (Nerve Fibre Area ,NFA) - az idegrostok teljes területe mm^2/mm^2 ; idegrostok szélessége (Nerve Fibre Width, NFW) - átlagos idegrost szélesség mm/mm^2 .

A diabéteszes páciensek fundusvizsgálatát minden esetben tágitott pupilla mellett végeztük, fotódokumentáltuk és a DR stádiumának besorolásához nemzetközi standardot alkalmaztunk (International Clinical Diabetic Retinopathy Disease Severity Scale) [198] az alábbiak szerint: 0=DR utaló jel nem látható, 1=enyhe, nem proliferatív DR, 2=középsúlyos,

nem proliferatív DR, 3=súlyos, nem proliferatív DR, 4=proliferatív DR.

Statisztikai analízis

Leíró statisztika alkalmazásával határoztuk meg az eredményeink átlagát, szórását (SD) és a 95%-os megbízhatósági tartományt (confidence interval, CI). A statisztikai analíziseket MedCalc szoftver 10.2.0 és SPSS szoftver 13.0 verziójával végeztük el. A 3 csoport eredményeinek összehasonlítására varianciaanalízist, és post-hoc Tukey-tesztet alkalmaztunk. A folytonos változók vizsgálatára „Student-féle” t-tesztet használtunk két csoport összehasonlításánál, valamint az egyváltozós paraméterekre χ^2 -próbát alkalmaztunk. A kétváltozós paraméterekre Pearson korrelációt használtunk. Minden esetben $p < 0,05$ értéket tekintettünk statisztikailag szignifikánsnak.

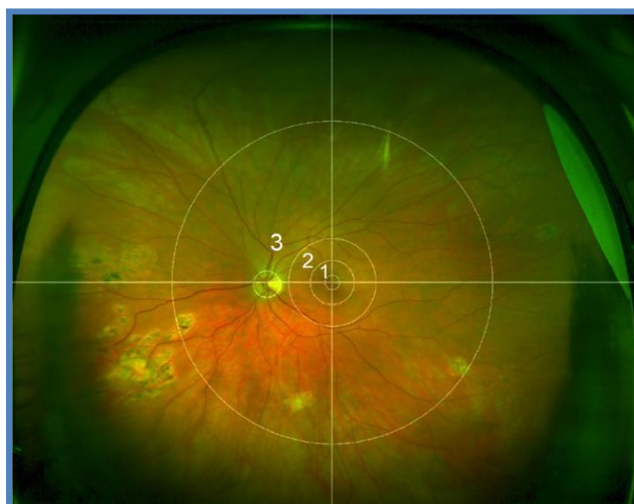
3.3.3.2 Ultraszéles látószögű pásztázó lézer oftalmoszkópia

Munkacsoportunk hagyományos 45° kamerával készült fundusfotókat vetett össze a P200C AF ultraszéles látószögű pásztázó lézer oftalmoszkóp (OPTOS PLC, Dubfermline, UK) kamerájának azonos beteganyagon készített képeivel annak érdekében, hogy validálja a készüléket. A két képalkotó eljárás összehasonlítására a makula vonatkozásában került sor, az időskori makuladegeneráció (AMD) patológiás eltérésein keresztül. Összehasonló vizsgálatainkat nagy betegszámmal kívántuk elvégezni, ezért AMD-s betegek fotódokumentációját alkalmaztuk, mert ilyen jelentős esetszám diabéteszes betegek vonatkozásában nem állt rendelkezésünkre. Ismerve azonban azt a tényt, hogy a DR-ban elsőként megjelenő fundusképi elváltozás a MA (10-100 μm) [199], és az AMD-ben megjelenő drusen méretileg egymással jól korrelál (kemény drusen $< 63 \mu\text{m}$, a közepes méretű drusen méret 63-125 μm) az AMD-s beteganyag alkalmazása megfelelő a validáláshoz [200].

A "Reykjavik Eye Study"-ban végzett tanulmány az 1996-ban elvégzett, 50 év feletti reykjaviki populáció random (1045 páciens) szemészeti vizsgálatait és azok sztereo, film alapú fundusfotó-dokumentációit tartalmazza [201]. Ezen vizsgálati anyag 2008-ban egy 12 éves követési protokollal egészült ki, melyben a korábban vizsgált páciensek 73%-a (573 páciens) vett részt. A részletes szemészeti vizsgálat mellett, 451 páciens esetében készült fundusfotó két képalkotó eljárással: foveára centrált képek digitális kamerával (ZEISS FF 450), és 200°-os fundus-fotódokumentáció a P200C AF ultraszéles látószögű pásztázó lézer oftalmoszkóppal. A fotódokumentációk mindkét képalkotó eljárás esetében tágított pupilla mellett történtek. A digitális képeket egyedi azonosítóval - mely biztosította a beteg anonimitását és a későbbiekben

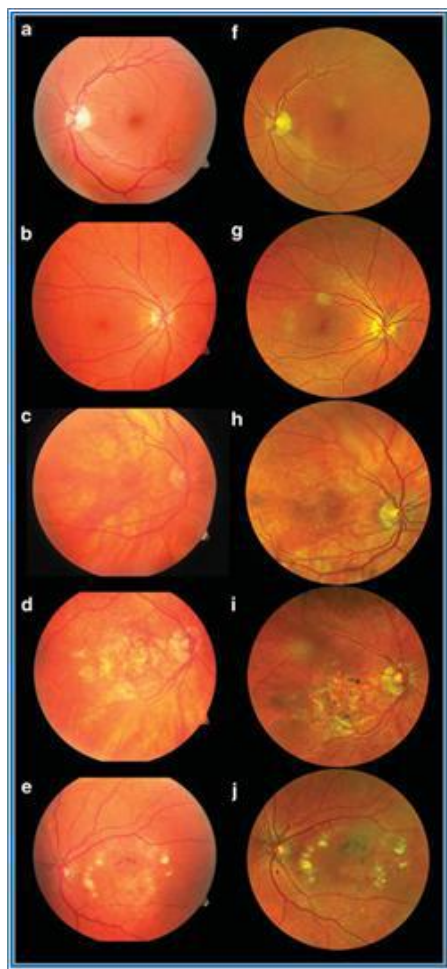
szükség szerinti azonosítását-, a Moorfields Eye Hospital Reading Centre (MEHRC)-be küldték analízisre.

Jelen tanulmányunkba a 12 éves követéses vizsgálat anyagából - az időskori makuladegeneráció elváltozásainak teljes spektrumának lefedésével - 121 szem került beválogatásra. A képek elemzése random módon zajlott, a klinikai információk ismeretének teljes hiányában. A fundusfotók elemzése az Optos V2, DX elemző szoftverével történt mindkét eljárás esetében. Ezen szoftver lehetőséget biztosít egy automata standard elemző rács felhelyezésére (**9. ábra**), miután a képolvasó a makula centrumát, a foveát, továbbá a látóidegfőt azonosítja manuálisan. Az elemző rács felhelyezése biztosítja, hogy a két képalkotó eljárással készült képek vizsgálata során a makula azonos területei kerülnek elemzésre. A két képalkotó eljárással készült képeket az egymásnak megfelelő terület vonatkozásaiban szemlélteti a **10. ábra**.



9. ábra Az Optos V2, DX elemző szoftverével felhelyezett automata, standard elemző rács; melynek felhelyezéséhez a fovea és a látóidegfő manuális azonosítása szükséges.

[Forrás: A Moorfields Eye Hospital, London, UK Reading Centere, saját készítésű képanyag]



10. ábra A Zeiss FF 450 (a-e) konvencionális digitális fundusfotó kamera (45°-os látószög) és az Optos P200C AF (f-j) ultraszéles látószögű kamera egymásnak megfelelőített felvételei a makulára vonatkoztatva: (a-f) patológiai eltérés nélkül; (b-g) korai ARM; (c-h) korai AMD; (d-i) chorioretinális neovaszkularizáció; (e-j) geografikus atrófia [183]

Az elváltozások - léziók, makuláris drusenek - méreteinek meghatározása számítógéppel-asszisztált standard körök felhelyezésével történt. Analízisre az időskori makulopátiához (age-related maculopathy, ARM) vagy AMD-hez kapcsolódó elváltozások kerültek. Az elváltozások fenotípusainak meghatározása a Nemzetközi Klasszifikáció (International Classification, IC) szerint történt mindkét képalkotó eljárás esetében [200]. Az alábbi elváltozások kerültek azonosításra: kemény és puha drusen, geografikus atrófia (geographic atrophy, GA) és chorioretinális neovaszkularizáció (chorioretinal neovascularisations, CNV).

A képelemző önmagához (intra-observer agreement) és más képalkotóhoz (inter-observer agreement) vonatkoztatott egyezése/tévedése is vizsgálatra került. Az elemző önmagához viszonyított egyezésének megítélése érdekében (intra-observer agreement) a már elemzett képek random 10%-át újra elemezte úgy, hogy a képelemzések között minimum 14 nap telt el.

További, részletes képelemzésre került sor kemény drusen, GA és CNV (5 eset minden

fenotípus vonatkozásában), valamint 6 puha drusen vonatkozásában (összesen 21 szem), mindkét képalkotó eljárással. A drusenek elemzése a három elemzett zóna vonatkozásában a nemzetközi klasszifikáció szerint zajlott úgy, hogy minden egyes drusen típus és méret szerint megjelölésre került - az Optos V2, DX elemző szoftver alkalmazásával. Részletes elemzésre kerültek továbbá a retinális pigment epitél (RPE), a CNV és GA típusú elváltozások az utóbbi kettő méretének megadásával. Ezen vizsgálati eljárás megfelelt a "Reykjavik Eye Study"-nak; az alap, majd követéses vizsgálataiban alkalmazott protokollnak annak érdekében, hogy a későbbiekben összehasonlító vizsgálatokat is lehessen végezni [201], [202].

A képelemző önmagához és más képelemzőhöz viszonyított egyezésének megítélése érdekében k-statisztikát végeztünk [203]. A k-statisztikai analízis eredményeit az alábbiak szerint interpretáltuk: $k < 0$, „gyenge egyezés”; k -érték: 0-0,2 „csekély egyezés”; 0,21-0,40 „korrekt egyezés”; 0,41-0,60 „meglehetősen egyezés”; 0,61-0,8 „jelentős egyezés”; és $k > 0,81$, „majdnem tökéletes egyezés” [203]. A statisztikai analízisek a Stata 9.0 (STATA Data analysis and Statistical Software, TX, USA) segítségével történtek.

4 EREDMÉNYEK

4.1 Könnyenzimek tanulmányozása a szaruhártya sebgyógyulási folyamataiban

4.1.1 Állatmodell alkalmazása a haze hatásmechanizmusának megismerésére, indukálására és gátlására; a vemhesség, mint rizikófaktor.

A szemészeti készítmények vizsgálataihoz általánosan alkalmazott kísérleti állat a nyúl. A szaruhártya komplikált sebgyógyulási folyamatainak a tanulmányozására ezidáig nem ajánlott speciális modellt az irodalom. Vemhesség alatt ismert a plazminogén aktivátor inhibitorok plazma koncentrációjának emelkedése, ezért vizsgáltuk, hogy a vemhes állat alkalmazható-e új modellként a refraktív lézersebészeti beavatkozásokat esetenként követő haze tanulmányozására.

Állatkísérleteink eredményeit a **3. táblázat**ban összefoglalva szemléltetjük a könnyebb áttekinthetőség érdekében. A 3. táblázat a PRK kezelést követő korai (1. hét) posztoperatív időszakban alkalmazott széles szubsztrátspecifitású szerin proteináz inhibitor (10.000 KIU/ml aprotinin, Gordox) és az uPA (50 IU/ml uPA, Ukidan) kezelés eredményességét szemlélteti, vemhes és nem vemhes állatok csoportbontásában a késői (1., 3., és 6. posztoperatív hónapokban) haze kialakulásának és stádiumainak függvényében [187].

Csoport	Haze (Hanna)					
	Vemhesség	Szem (db)	Könnyminta	1 hó	3 hó	6 hó
Aprotinin kezelés +	-	2	+	-	2	2
Aprotinin kezelés +	+	1	+	-	2	3
Aprotinin kezelés – (ellenoldali szem)	-	2	+	-	-	-
Aprotinin kezelés – (ellenoldali szem)	+	1	+	2	2	2
Nem operált kontroll	-	6	+	Nem értelmezhető		
uPA kezelt	-	16	-	-	-	-
uPA kezelt	+	8	-	-	-	-
uPA nem kezelt kontroll (ellenoldali szem)	-	14	-	-	-	-
uPA nem kezelt kontroll (ellenoldali szem)	-	2	-	+	1-2	1-0
uPA nem kezelt kontroll (ellenoldali szem)	+	1	-	-	-	-
uPA nem kezelt kontroll (ellenoldali szem)	+	7	-	+	1-2	0,5-1

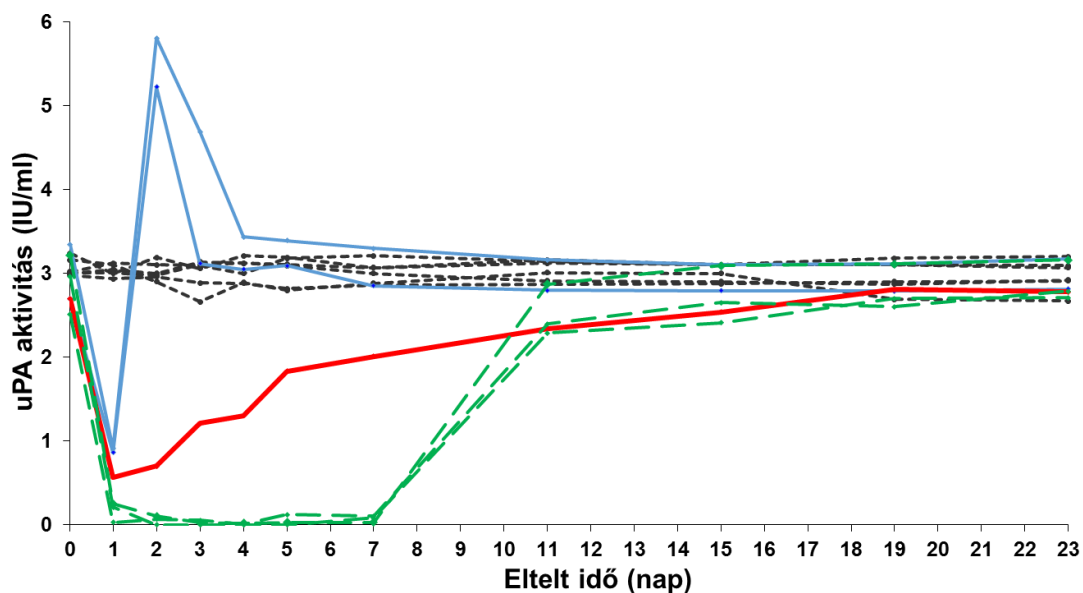
3. táblázat A PRK kezelést követően kialakult haze az alkalmazott kezelések vonatkozásában. Az első posztoperatív hét terápiája;

Rövidítések jelentése: Aprotinin kezelés+: a humán protokoll plusz egy csepp 10. 000 KIU/ml aprotininrel egészült ki a kezelések alkalmával. Aprotinin kezelés-: humán protokoll szerint. uPA kezelt: a humán protokoll szerint alkalmazott antibiotikum 50 IU/ml uPA-t is tartalmazott. uPA nem kezelt: humán protokoll szerint [190].

Az állatok humán protokoll szerint történt kezelése esetében a könnymintáik uPA aktivitás értékeinek változása megfelelt, a humán könnymintákban korábban megfigyelt uPA aktivitás értékek változásainak [60] a korai posztoperatív időszakban. Részletezve, az alábbi változásokat detektáltuk: uPA aktivitás szignifikáns csökkenése az első posztoperatív napon, szignifikánsan emelkedés a 2. posztoperatív napon, preoperatív szintre történő visszaesés a 3.-4. posztoperatív napokra, melyet követően szignifikáns változás már nem volt kimutatható (**11. ábra**).

Szerin proteináz inhibitor (aprotinin) alkalmazása az első posztoperatív héten alkalmasnak bizonyult az állatok könnyében mért uPA aktivitás értékeinek visszaszorítására. Az aprotininrel kezelt állatszemek esetében - minden egyes esetben - haze kialakulása volt megfigyelhető a késői posztoperatív időszakban (**11. ábra**).

Vemhes állat esetében az aprotinin kezeléshez hasonló alacsony uPA aktivitási érték volt kimutatható a könnyfilmben (**11. ábra**).

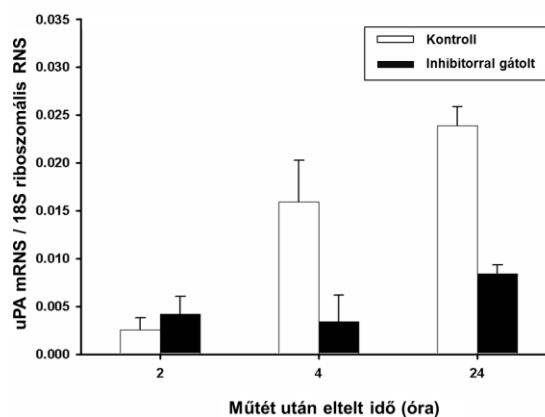


11. ábra Az uPA aktivitás időbeli változása PRK műtétet követően nyulak könnyimintáiban.

Szaggatott zöld vonal: aprotinin kezelés +, nem vemhes állat; Vékony kék folytonos vonal: aprotinin kezelés -, nem vemhes állat; Vastag folytonos piros vonal: aprotinin kezelés -, vemhes állat; Pontozott fekete vonal: kontroll szem, nem operált [190].

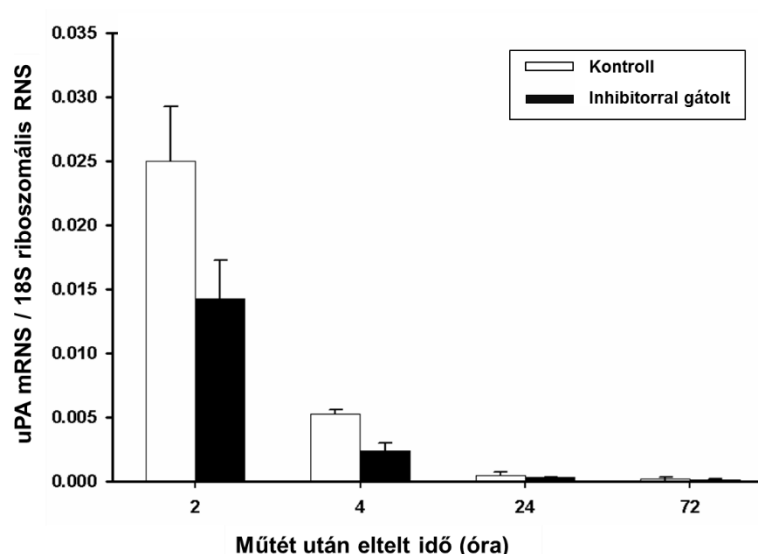
4.1.2 Az aprotinin hatásmechanizmusának tanulmányozása állatmodellben, urokinázt gátló hatása a nyúl szaruhártya sejtjeire refraktív lézerkezelést követően

A PRK kezelés során 7 mm átmérőjű Hoffer trepán alkalmazásával eltávolított epiteliális sejtrétegekben mért uPA expressziót szemlélteti a **12. ábra** 2. óra, 4. óra és 24. óra elteltével; 4 szem szaruhártyájából mind a kontroll, mind pedig az inhibitorral kezelt állatok esetében. A kontroll állatok (humán protokoll szerinti, antibiotikum tartalmú szemcseppel történő kezelés) szaruhártyájában mért uPA mRNS relatív mennyisége alacsony volt 2 órával a műtét után ($n=4$), azonban jelentős mértékű szintemelkedést figyeltünk meg a műtétet követő 4. ($n=4$) és 24. órában ($n=4$) (**12. ábra**).



12. ábra Az uPA mRNS relatív mennyisége nyúl szaruhártyájában a sebgyógyulási időszakban, a kvantitatív RT-PCR analízis alapján (7 mm Hoffer trepán használatakor) [193].

Az uPA expresszió változása eltérő volt abban az esetben, amennyiben módosítottuk az alkalmazott trepán méretét. Az epiteliális sejtréteg eltávolításához használt 6 mm-es átmérőjű Hoffer trepánnal kapott eredményeinket szemlélteti a **13. ábra**.



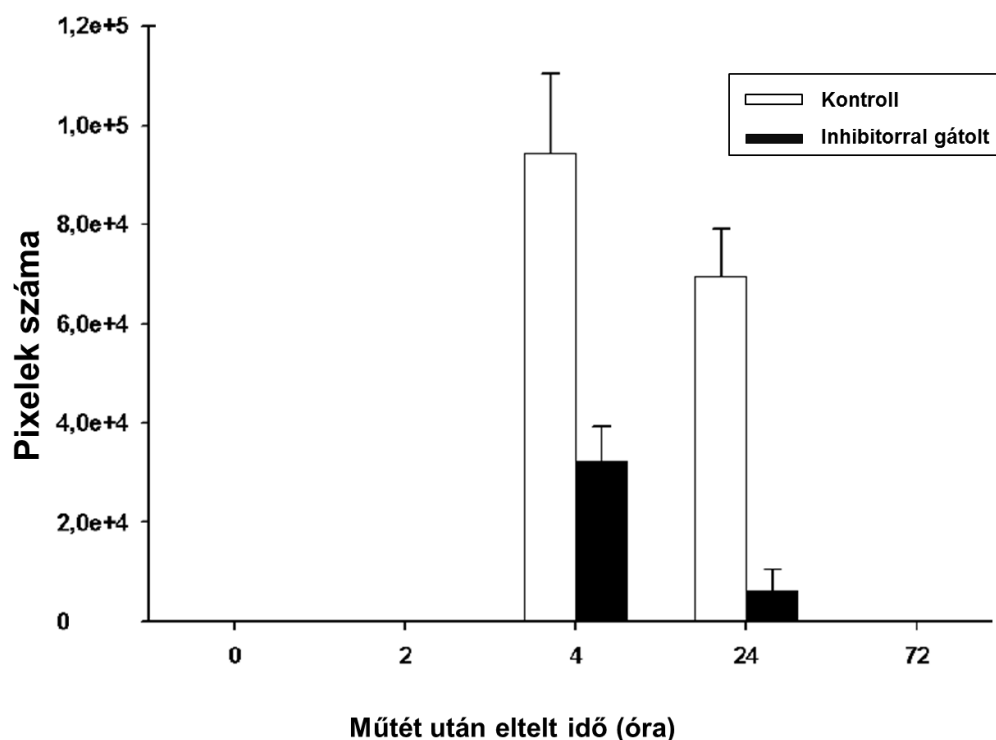
13. ábra Az uPA mRNS relatív mennyisége nyúl szaruhártyában a sebgyógyulási időszakban, kvantitatív RT-PCR analízis alapján (6 mm Hoffer trepán használatakor) [193].

Ezen esetekben a műtét után 2 órával (n=2) gyűjtött kontroll minták esetén jelentősen megemelkedett uPA transzkripciót láthattunk. Az uPA szint körülbelül ötödére csökkent műtét után 4 órával (n=2), és tovább csökkent 24 óra (n=3) elteltével. Hasonló, nagyon alacsony transzkripció szintet figyelhettünk meg 72 óra múlva is (n=3) [188].

A második kísérleti csoportban (6 mm trepán) lefagyasztott szaruhártya darabokat *in situ* zimográfiának vetettük alá azért, hogy a sebgyógyulás alatti uPA kifejeződés helyét tanulmányozzuk és meghatározzuk a kialakult uPA aktivitás mértékét. Miközben plazminogén-független lízist nem tudtunk megfigyelni, a plazminogén-függő kazeinolízis a hámszártás területére korlátozódott, és sokkal hangsúlyosabban jelent meg a vándorló epitélium elülső szegélyén.

A szaruhártya-minták uPA aktivitásának megállapításához a lízis zónák teljes képanalízisét hajtottuk végre. Itt ismét egy jelentős csökkenést figyeltünk meg az aprotininnel kezelt minták esetében (**14. ábra**).

Azt, hogy a kazein hidrolízise az uPA vagy a tPA aktivitása miatt valósult meg egyrészt uPA specifikus amilorid inhibitor hozzáadásával [204], valamint uPA és tPA elleni, gátló hatású poliklonális antitestek alkalmazásával bizonyítottuk [40]. A kazeinolízist az *in situ* zimográfia során a poliklonális anti-uPA antitest részlegesen, míg az amilorid, - amely egy specifikus uPA inhibitor - teljes egészében képes volt gátolni. Poliklonális anti-tPA antitestet alkalmazva gátlást nem tudtunk kimutatni [188].



14. ábra Az uPA aktivitás mértéke a szaruhártya mintákban (6 mm-es trepánt használva) *in situ* zimográfias képelemzést követően [188].

4.1.3 Plazminogén aktivátor inhibitorok a humán könnyben, jelentőségük a haze kialakulásában

Munkánk során a plazminogén aktivátor inhibitor (PAI-1 és PAI-2) szintek változásait vizsgáltuk a humán könnyben fotorefraktív lézerkezeléseket (PRK, LASIK) követően. A preoperatív refrakciós hiba PRK és LASIK kezelésen átesett betegeink esetében kétmintás t-próbával vizsgálva nem mutatott szignifikáns különbséget ($p=0,152$). Azon esetekben, ahol mindkét szem lézerkezelésére sor került, és a könnymintavétel kivitelezhető volt, a két szem közötti refrakciós hiba különbsége $1,2 \pm 1,4$ D-nak adódott. F-próbával, azon csoportok között ahol mindkét szemén, illetve egy szemén történt lézerkezelés a refrakciós hibák vonatkozásában, szignifikáns különbség nem volt kimutatható ($p=0,17$).

Vizsgálataink során a humán könny PAI tartalma kizárólag PAI-2-nek bizonyult. A

PRK kezelés előtt, és a korai posztoperatív időszakban gyűjtött 61 könny minta ELISA módszerrel mért PAI-1 értékei minden esetben a detektálhatósági határ alatt maradtak. Ezen ismeret birtokában a LASIK kezelésen átesett pácienseink könny mintáiból nem történt PAI-1 meghatározás. A PRK kezelések előtt és után a humán könny ELISA-val mért PAI-2 átlagértékeit a **4. táblázat** foglalja össze [190].

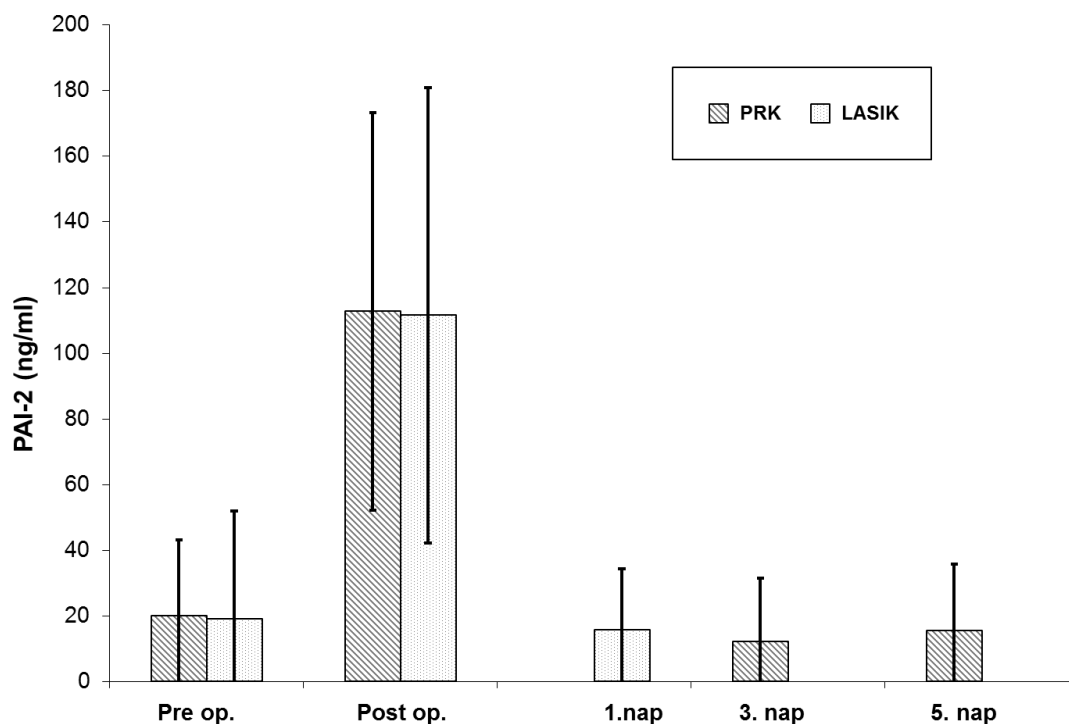
	Átlag	SD	Maximum	Minimum	Esetszám
Műtét előtt	19,8	23,4	113,5	0,0	41
Műtét után	112,7	60,5	238,2	8,2	42
3. posztoperatív nap	12,1	19,5	79,9	0,0	44
5. posztoperatív nap	15,5	20,4	78,8	0,0	19

4. táblázat A PAI-2 átlagértékei (ng/ml) PRK beavatkozások esetében [193].

A PAI-2 ELISA-val történő meghatározásokat 146 PRK, és 35 LASIK kezelésen átesett páciens könny mintáin végeztük el. A **4. táblázat** mutatja az átlag PAI-2 értékeket a PRK csoporton belül 4 mérési időszakban, míg a **5. táblázat** ugyanezt ábrázolja a LASIK csoport esetében 3 mérési időszakban. A **15. ábra** mindkét csoport átlag PAI-2 szintjeit ábrázolja.

	Átlag	SD	Maximum	Minimum	Esetszám
Műtét előtt	19,0	33,1	102,1	0,0	12
Műtét után	111,5	69,2	237,6	27,7	12
1. posztoperatív nap	15,7	18,8	59,6	0,0	11

5. táblázat A PAI-2 átlagértékei (ng/ml) LASIK beavatkozások esetében [193].



15. ábra A PAI-2 szintjének időbeli alakulása PRK és LASIK kezelésen átesett páciensek könnymináiban [190].

Vizsgálataink során a könnyminták PAI-2 értékeiben nem találtunk szignifikáns különbséget a két műtéti típus (PRK, LASIK) vonatkozásában. Az egyénre vonatkoztatott különbségek vizsgálata során azonban a műtétet közvetlenül megelőzően és azt követően mért PAI-2 értékek szignifikánsan eltértek ($p < 0,001$) mindkét típusú beavatkozás esetében. Statisztikailag szignifikáns különbséget nem sikerült azonban kimutatnunk semmilyen egyéb kombinációs vizsgálat során az 1., 3., és 5. posztoperatív napok összehasonlítása vonatkozásában ($p > 0,10$).

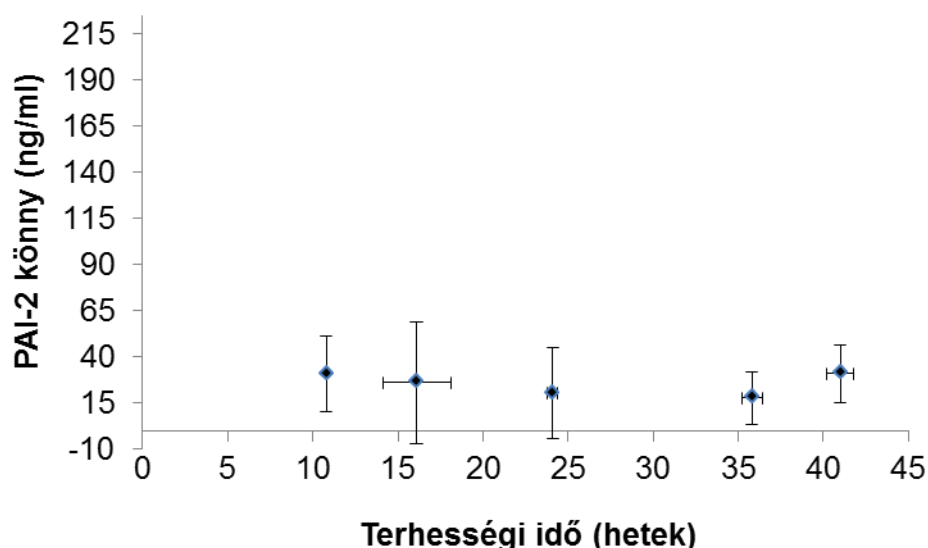
A posztoperatív követési időszakban (3 hónap), PRK (46 szem) kezeléseket követően a szaruhártya sebgyógyulási folyamatai komplikáció nélkül zajlottak 40 szemben (tisztá szaruhártya), egy esetben alakult ki haze (Hanna, 2. stádium). További öt esetben a szaruhártya igen enyhe opálosodását detektáltuk. Ezen esetek közül egy páciensünk könnyében mértünk emelkedett PAI-2 szintet a kezelést megelőzően (2 SD értéket meghaladó), és egy esetben volt hasonlóan emelkedett a mért érték a műtét után közvetlenül. A 3. és 5. posztoperatív napokon ezen esetekben a mért PAI-2 szint a könnyben 1 SD értéken belül maradt. A komplikáció nélkül zajló (tisztá szaruhártya) sebgyógyulási folyamatok esetében a PRK kezelés előtt és után közvetlenül mért PAI-2 szintek 2 SD értéken belül maradtak. A harmadik posztoperatív napon három, az ötödiken egy szem vonatkozásában mértünk 2 SD értéket meghaladó könny PAI-2 szintet. Hasonló eloszlást (2 SD érték alatti) 146 mérés vonatkozásában figyeltük meg.

LASIK kezelést követően haze tanulmányunkban nem volt megfigyelhető. A könnyben egy esetben mértük 2 SD értéket meghaladó PAI-2 szintet preoperatív, valamint az első posztoperatív napon, statisztikai relevancia nélkül.

4.1.3.1 Plazminogén – aktivátor és inhibitor, valamint hormonszint vizsgálatok terhesség során

Várandós páciensek könnymintáiban mért PAI-2 szintek

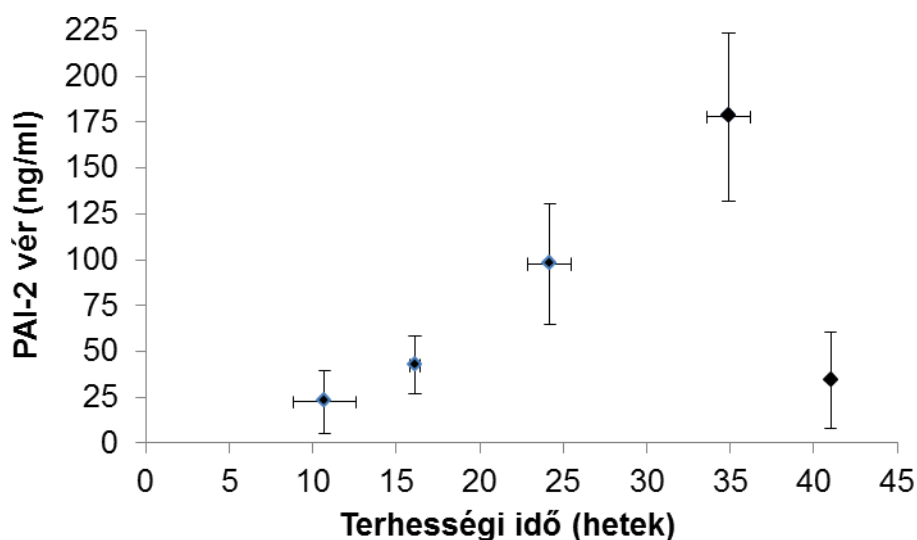
Várandós pácienseink könny PAI-2 átlagértékei nem mutattak szignifikáns különbséget az általunk vizsgált terhességi időszakokban (**16. ábra**). Kontroll csoportunk PAI-2 átlagértékei 26,7 ng/ml (korábbi tanulmányból származó adat), és jelen tanulmányunk mérési eredményei (16. ábra) között szignifikáns eltérés nem volt kimutatható [205].



16. ábra A PAI-2 átlagértékeinek változása a könnymintákban a terhességi idő függvényében. A függőleges oszlopok hibásávjai mutatják az átlag PAI-2 koncentráció átlagtól való eltérését (SD). A vízszintes hibásávok mutatják a terhességi hetek átlagától való eltérését [205].

Várandós páciensek vérmintákban mért PAI-2 szintek

Várandós pácienseink vérmintáiban a PAI-2 átlagérték a 10,7 hét és a szülést követő hét (41. hét) összehasonlításában statisztikailag szignifikáns különbséget nem mutatott. A PAI-2 vérszintjeit azonban a várandósság előrehaladtával határozott, és folyamatos emelkedés jellemezte a vizsgálati időpontokban: 16,1 továbbá 24,2 és 34,9 hetek, és ezen értékek vonatkozásában szignifikáns eltérés volt kimutatható a 10,7 és a 41. héten mért PAI-2 átlagértékekhez képest (**17. ábra**).



17. ábra A PAI-2 átlagértékeinek változása a vérmintákban a terhességi idő függvényében.

A függőleges oszlopok hibásávjai mutatják az átlag PAI-2 koncentráció átlagtól való eltérését (SD). A vízszintes hibásávok a terhességi hetek átlagtól való eltérését szemléltetik [205].

A különböző egyénekből származó könnyminták PAI-2 szintjének varianciája 4,95x volt nagyobb, mint az egy adott egyén öt különböző gesztációs periódusában mért PAI-2 szintek varianciája. Így a variancia statisztikailag szignifikáns ($p < 0,01$) különbséget mutatott a különböző egyénekből.

Ezzel párhuzamosan, a különböző egyénekből származó vérminták PAI-2 szintjének varianciája csak 1,06x volt nagyobb, mint az egy adott egyén öt különböző gesztációs periódusában mért PAI-2 szintek varianciája. Így a variancia statisztikailag szignifikáns különbséget nem mutatott a különböző egyénekből ($p = 0,41$).

A terhességi időszakok mérési eltéréseit figyelembe véve és az öt terhességi periódusban mért mérési különbségeket vizsgálva (eltérési hányados=1,66) a könny PAI-2 szintje nem mutatott statisztikailag szignifikáns különbséget ($p = 0,30$) a különböző terhességi időszakokban. A vérben mért PAI-2 esetében az eltérési hányados 1493,43 volt, mely statisztikailag szignifikáns különbség ($p < 0,001$) a különböző terhességi időszakokban végzett mérések között.

A terhességi kor előrehaladtával a vérben mért PAI-2 szint szignifikánsan magasabb volt, mint a könnyben mért átlag érték. A könnyben és a vérben mért értékek azonban nem mutattak korrelációt.

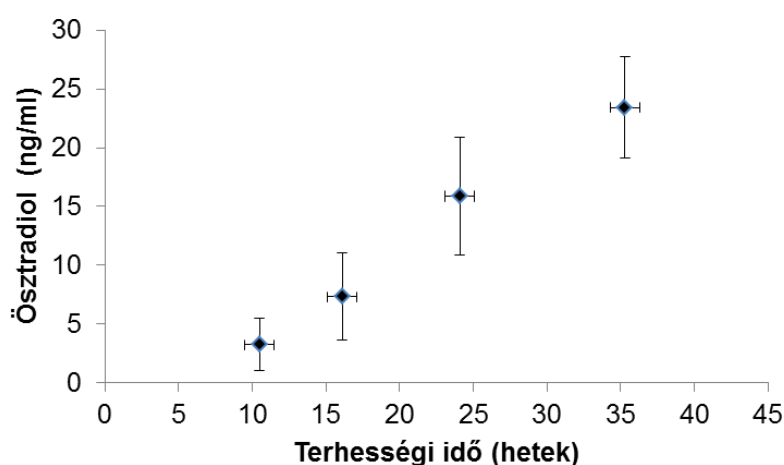
A könnyben mért PAI-1 szintek (20 várandós, 12 nem várandós nő), az ELISA módszer detektálhatósági határa (4 ng/ml) alatt maradtak a terhességi időszak vizsgált időpontjaiban, a szülést követően, valamint a kontrollok alkalmával is. Vizsgáló módszerünk érzékenységi

korláta miatt a PAI-1 szintek változásait a terhesség alatt nem tudtuk igazolni a vizsgát könnymintáinkban [206].

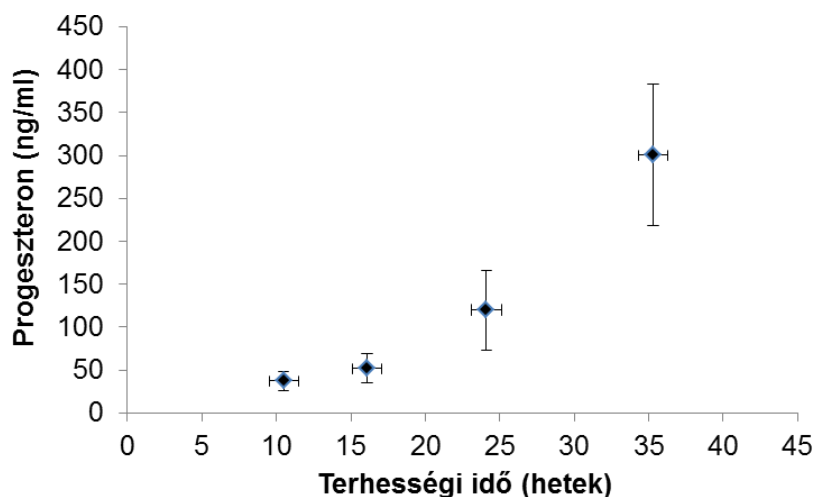
A vérben mért PAI-1 átlagértékei a 11. héten $85,8 \pm 29$ ng/ml; a 16. héten $90,5 \pm 32,2$ ng/ml; és a 24. terhességi héten $125,9 \pm 26,1$ ng/ml volt.

Várandós páciensek ösztradiol és progeszteron szintjei a könnyben és a vérben

Várandós pácienseink vérmintáinak ösztradiol és progeszteron szintjeinek átlagértékeit a **18. és 19. ábra** szemlélteti. Az ábrákon szemléletesen jelenik meg a hormonszintek meredek emelkedése a terhességi kor előrehaladtával, melyek a vérben mért PAI-2 értékekkel is korrelálnak. A könny PAI-2 értékei esetében ilyen korreláció nem volt kimutatható.



18. ábra Az ösztradiol szint változása a vérben a terhességi idő függvényében. A függőleges oszlopok hibásávjai mutatják az átlag PAI-2 koncentráció átlagtól való eltérését (SD). A vízszintes hibásávok a terhességi hetek átlagtól való eltérését szemléltetik [205]



19. ábra A progeszteron szint változása a vérben a terhességi idő függvényében. A függőleges oszlopok hibásávjai mutatják az átlag PAI-2 koncentráció átlagtól való eltérését (SD). A vízszintes hibásávok a terhességi hetek átlagtól való eltérését szemléltetik [205].

uPA szintek a várandósság idején könnymintákban

Jelen tanulmányunk könnymintái a kontroll „nem várandós csoport” vonatkozásában két vizsgálati anyagból származtak, egyrészt 10 korábbi mérési eredményünk, másrészt 8 a jelen tanulmány olyan vizsgálati alanya, akik már a várandósságukat megelőzően bevonásra kerültek. Annak érdekében, hogy mindkét csoport eredményeit felhasználhassuk, t-teszteket végeztünk mintáinkon, hogy a statisztikai szignifikanciákat megvizsgáljuk. Szignifikáns különbség nem volt kimutatható sem a minták uPA értékeinek ($p = 0,63$), sem a résztvevők életkorának ($p = 0,26$) vonatkozásában. A Mann-Whitney U tesztek sem mutattak statisztikailag szignifikáns különbséget jelen és az előző tanulmányunk medián értékeitől ($p > 0,99$). A medián teszt sem mutatott szignifikáns különbséget a két csoport uPA értékeiben ($p = 0,64$). Ezek alapján mindkét csoport egységes alapul szolgált további elemzéseinkhez.

A könnymintákban mért bimodális uPA eloszlás miatt eredményeinket két csoportra osztottuk: nem nulla és nulla - uPA értékek a három gesztációs kategóriában, melyet a **6. táblázat** tartalmaz részletesen.

	Nem várandós páciens	9 - 12 terhességi hét	14 - 23 terhességi hét	25 - 39 terhességi hét	Szülést követő 1 hét
Átlag „nem-nulla” uPA	0,325	0,243	0,309	0,348	0,339
SD „nem-nulla” uPA	0,184	0,129	0,180	0,228	0,217
Maximum „nem nulla” uPA	0,785	0,504	0,780	0,809	0,831
Minimum „nem-nulla” uPA	0,050	0,005	0,076	0,046	0,191
Résztvevők száma („nem-nulla” uPA)	18	16	25	13	10
Résztvevők száma („nulla” uPA)	0	3	5	11	0

6. táblázat A könnymintákban mért uPA eloszlás a várandósságot megelőzően és annak lefolyása során.

A táblázatban ismertetett kategóriák szerint Mann-Whitney U tesztekkel vizsgáltuk a résztvevők életkor szerinti megoszlását, mely nem mutatott statisztikailag szignifikáns különbséget a „nem nulla uPA” és a „nulla uPA” csoportok között a három gesztációs kategóriában: $p = 0,96$, $0,56$ és $0,95$. A „nem nulla uPA” csoportban végzett normál eloszlást vizsgáló statisztikai elemzések az egyes terhességi kategóriákban normális eloszlást igazolnak: mindegyik $R^2 > 0,61$, mely megfelel a normál eloszlás lineáris illeszkedésének.

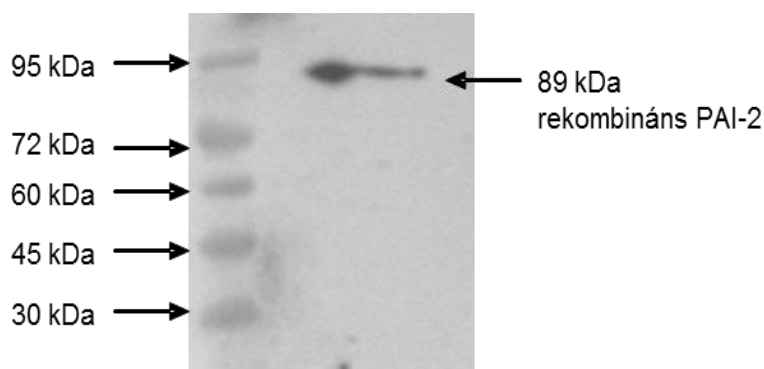
Az átlag „nem nulla uPA”-szint gyakorlatilag a teherbeesést megelőző időszakról végig követve a várandósságot egészen a születésig változatlan maradt. A nulla uPA-érték azonban a

terhességi kor előrehaladtával emelkedett, de mind a terhessét megelőzően, mind azt követően nulla uPA értékek voltak mérhetőek.

4.1.4 A rekombináns plazminogén aktivátor inhibitor-2 alkalmazása a szaruhártyafekélyek gyógyításában, állatmodellben

Rekombináns PAI-2 fúziós fehérje előállítása és aktivitásának vizsgálata

A rekombináns fehérje előállításának részleteit az „3.2.1 fejezetben” fejezetben részletesen ismertettük. A MBP-Histag PAI-2 fúziós fehérje jelenlétét anti-PAI-2 antitest felhasználásával elkészített immunoblottal bizonyítottuk, melynek eredményét mutatja be a **20. ábra** [207]. Jól látható a megfelelő molekulatömegű fehérje jelenléte. A tisztított fúziós fehérjét az aktivitás ellenőrzése után alkalmaztuk állatkísérletekben.



20. ábra A His-taget és MBP-t tartalmazó rekombináns PAI-2 fehérje expressziójának bizonyítása anti-PAI-2 antitest segítségével végzett immunoblottal [207].

Rekombináns PAI-2 fehérje alkalmazhatósága szaruhártyafekélyek gyógyításában, állatmodellben

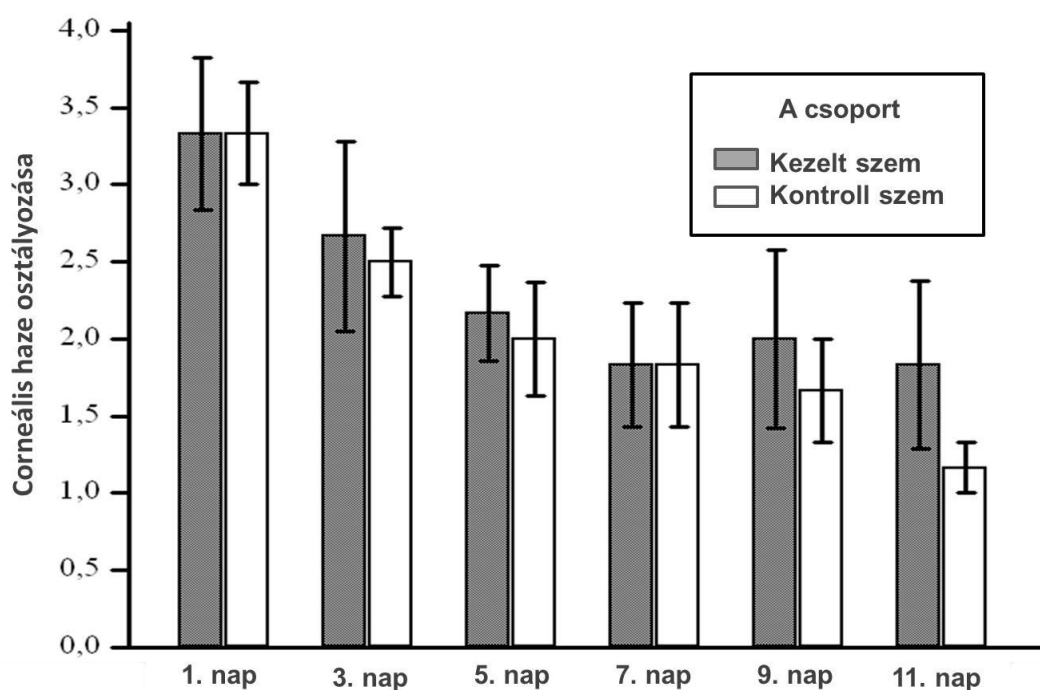
Állatmodellünkben az alkalmazott kezelési sémák kapcsán kialakult haze stádiumait az **5. és 6. táblázat** szemlélteti.

Az „A” csoport kezelési sémáját alkalmazva, a NaOH okozta sérülést követően kialakuló haze vonatkozásban nem találtunk szignifikáns különbséget a kontroll (Ciloxan szemcsepp) és kezelt (Ciloxan, EDTA, cisztein és aprotinin kombinált szemcsepp) állatok között egyik posztoperatív kontroll napon sem (**21. ábra**). Mindkét kezelési séma vonatkozásában az első nap stádiumához képest viszonyított haze képződés szignifikánsan csökkent a követés minden egyes kontroll napján (**7. táblázat**).

	Kontroll -csoport [†] (Ciloxan)	Kezelt csoport [†] (Ciloxan+EDTA+cisztein+aprotinin)	p*
1. nap	3,33±0,49	3,33±0,33	1,00
3. nap	2,67±0,62	2,50±0,23	0,286
p**	0,025	0,004	
5. nap	2,17±0,31	2,00±0,37	0,822
p**	0,013	0,002	
7. nap	1,83±0,40	1,83±0,40	0,771
p**	0,001	0,001	
9. nap	2,00±0,58	1,67±0,33	0,930
p**	0,025	<0,001	
11. nap	1,83±0,54	1,17±0,17	0,638
p**	0,017	<0,001	

7. táblázat Súlyossági pontok a haze kialakulásában a kontroll, illetve a kezelt csoportban (A csoport).

Magyarázat: † Átlag ± standard hiba, *Student-féle t-teszt (kontroll vs. kezelt csoport), **Student-féle t-teszt (1. nappal összehasonlítva) [Forrás: saját készítésű táblázat].



21. ábra Haze súlyossága az „A” csoportban (Kezelt szem: Ciloxan+EDTA+cisztein+aprotinin kezelés; Kontroll szem: Ciloxan kezelés). [Forrás: saját készítésű ábra]

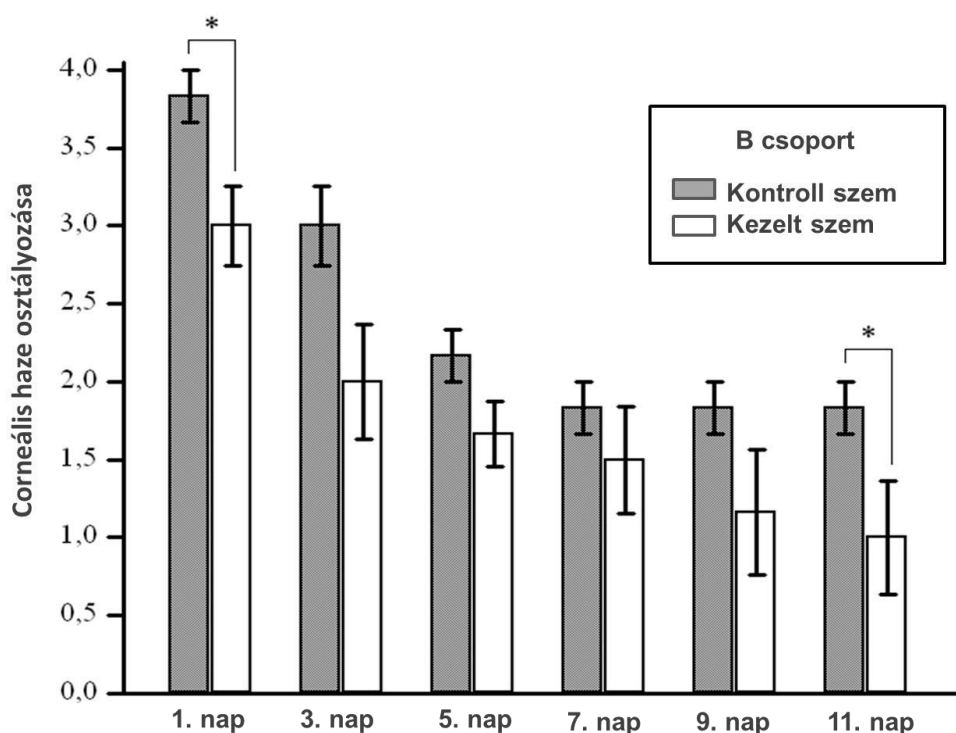
A „B” csoport kezelési protokollját alkalmazva a haze súlyossága a kontroll (Ciloxan szemcsepp) csoportban jelentősebb volt, mint a Ciloxan és rekombináns PAI-2 fehérjével lokálisan kezelt szemek esetében. A haze súlyossága statisztikailag (Student-féle t-teszt)

szignifikánsan különbözött a kezelést követően az első ($p=0,042$) és a 11. posztoperatív napokon ($p=0,042$) (**22. ábra**). A kialakult haze mértéke szignifikánsan csökkent az első posztoperatív naphoz viszonyítva a sérülést követő napokban mind a kontroll, mind a kezelt szemek vonatkozásában (**8. táblázat**).

	Kontrollcsoport [†] (Ciloxan)	Kezelt csoport [†] (Ciloxan+PAI-2)	p^*
1. nap	$3,83 \pm 0,17$	$3,00 \pm 0,26$	$0,042$
3. nap	$3,00 \pm 0,26$	$2,00 \pm 0,37$	$0,076$
p^{**}	$0,004$	$0,012$	
5. nap	$2,17 \pm 0,17$	$1,67 \pm 0,21$	$0,076$
p^{**}	$<0,001$	$0,002$	
7. nap	$1,83 \pm 0,17$	$1,50 \pm 0,34$	$0,363$
p^{**}	$0,031$	$0,001$	
9. nap	$1,83 \pm 0,17$	$1,17 \pm 0,40$	$0,102$
p^{**}	$0,031$	$0,002$	
11. nap	$1,83 \pm 0,17$	$1,00 \pm 0,37$	$0,042$
p^{**}	$0,031$	$<0,001$	

8. táblázat Súlyossági pontok a haze kialakulásában a kontroll, illetve a kezelt csoportban (B csoport). Magyarázat: [†] Átlag $\pm$ standard hiba, *Student-féle t-teszt (kontroll vs. kezelt csoport), **Student-féle t-teszt (1. nappal összehasonlítva)

[Forrás: saját készítésű táblázat].



22. ábra Haze súlyossága a „B” csoportban (Kezelt szem: Ciloxan + PAI-2 kezelés; Kontroll szem: Ciloxan kezelés) [Forrás: saját készítésű ábra].

Az "A" és "B" csoport kezelt szeméinek vonatkozásában a haze stádiumait alapul véve, minden egyes kontroll napon tisztább szaruhártyákat találtunk a Ciloxan és PAI-2 lokális szemcsepp kezelés esetén, szemben a Ciloxan/EDTA/ciszteín/aprotinin szemcsepp kombinált kezelésével. Statisztikailag szignifikáns különbség a haze vonatkozásban nem volt kimutatható az "A" és a "B" kontrollcsoportjainak összehasonlításakor.

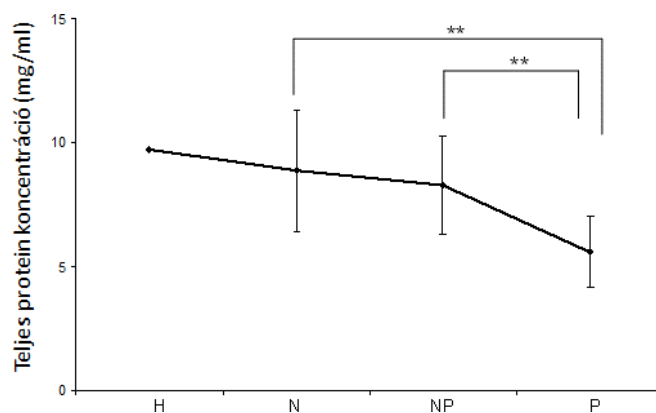
Egyetlen kivételtől eltekintve teljes reepitelizációt figyeltünk meg a kezelést követő 3. napon belül, mindkét kísérleti modell csoportban ("A" és "B" csoportok). Az egyetlen kivétel egy kontroll szem volt, ahol az epitel teljes regenerációja az 5. napra következett be. A kísérleti periódus alatt egyetlen esetben sem alakult ki szaruhártyafekély, vagy perzisztáló epiteliális defektus.

4.2 Diabéteszes retinopátia szűrése kapcsán elért eredményeink

4.2.1 Fehérjekoncentráció mintázat analízise II-es típusú cukorbetegnek könnymintáiban

A könny proteomban bekövetkező változások megismerése érdekében 119 II-es típusú diabéteszes páciensünk 150 könnymintáját vizsgáltuk a diabéteszes retinopátia (DR) súlyossága szerinti csoportbontásban, az alábbiak szerint: nincs-DR (50 könnyminta); nem-proliferatív DR (50 könnyminta); proliferatív DR (50 könnyminta) áll fenn. Kontrollként 26 egészséges önkéntes könnymintáit analizáltuk "poolozva" (egy könnymintaként).

A könnyminták összfehérje koncentrációja súlyosabb DR esetén (nem proliferatív - és proliferatív DR) alacsonyabb (**23. ábra**). Egyénre vonatkoztatva a könnyfehérje koncentrációk jelentősen eltérnek a DR csoporton belül, azonban a normál és proliferatív, valamint a normál és a nem proliferatív csoportok között szignifikáns különbség mutatható ki ($p < 0,05$).



23. ábra A könnyminták átlagos fehérjekoncentrációja. Az összegyűjtött könnyminták fehérje koncentrációját Bradford módszerrel mértük. Jelmagyarázat: H: egészséges kontrollcsoport, N: normál csoport, NP: nem proliferatív csoport, P: proliferatív csoport.

A ** $p < 0,05$ értéket jelez. [139]

4.2.1.1 Könnyfehérjék azonosítása

Tömegspektrometriás analízis során a könny mintákban levő fehérjék azonosítására ProteinPilot 2.0.1 verziójú szoftverbe implementált ProGroup algoritmust használtuk. A legalább 95%-os megbízhatósággal azonosítható fehérjéket alapul véve, így összesen 53 fehérjét tudtunk azonosítani, melyből 50-et több mint 99%-os megbízhatósággal (**9. táblázat**).

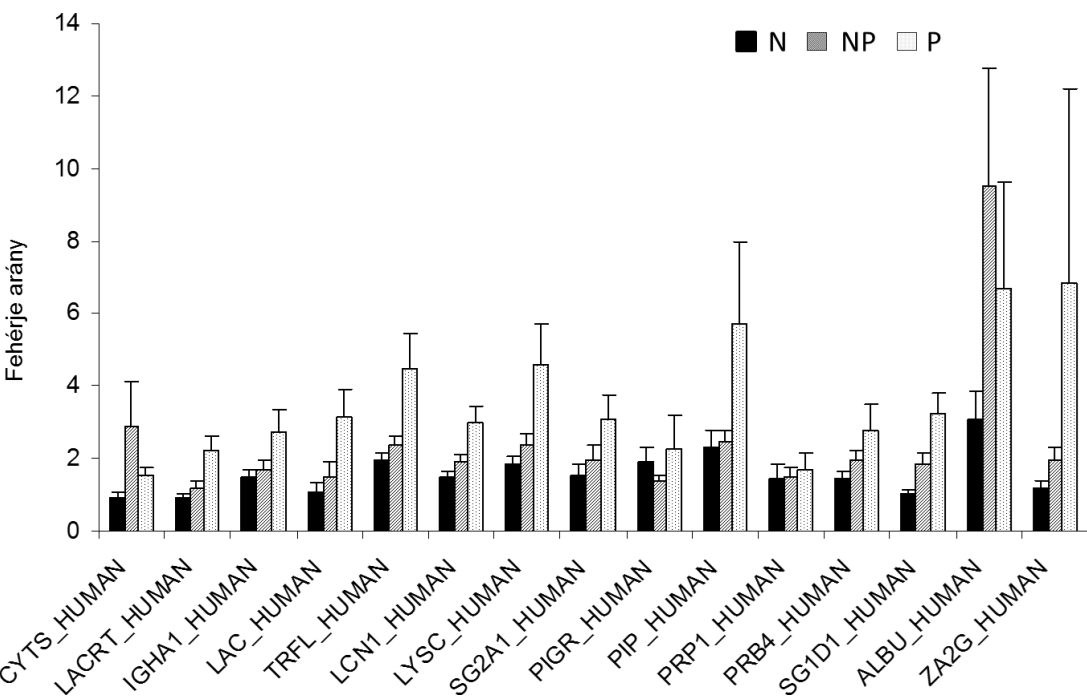
	Protein angol neve	Protein azonosítója	Uniprot kód	Konfidenca%
1	Actin	ACTG_HUMAN	P63261	99
2	Alcohol dehydrogenase 6	ADH6_HUMAN	P28332	96
3	Alpha-1-acid glycoprotein 1	A1AG1_HUMAN	P02763	99
4	ANKRD26-like family C member 1B	POTEF_HUMAN	A5A3E0	99
5	Bactericidal/permeability-increasing protein-like 1	BPIL1_HUMAN	Q8N4F0	99
6	Beta-2-microglobulin	B2MG_HUMAN	P61769	99
7	Clusterin	CLUS_HUMAN	P10909	99
8	Collagen alpha-1(XXV) chain	COPA1_HUMAN	Q9BXS0	99
9	Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1	F120A_HUMAN	Q9NZB2	99
10	C-type lectin domain family 4 member F	CLC4F_HUMAN	Q8N1N0	99
11	Cystatin-C	CYTC_HUMAN	P01034	99
12	Cystatin-S	CYTS_HUMAN	P01036	99
13	Cystatin-SA	CYTT_HUMAN	P09228	99
14	Cystatin-SN	CYTN_HUMAN	P01037	99
15	Deleted in malignant brain tumors 1 protein	DMBT1_HUMAN	Q9UGM3	99
16	Extracellular glycoprotein lacritin	LACRT_HUMAN	Q9GZZ8	99
17	Haptoglobin	HPT_HUMAN	P00738	99
18	Ig alpha-1 chain C region	IGHA1_HUMAN	P01876	99
19	Ig alpha-2 chain C region	IGHA2_HUMAN	P01877	99
20	Ig gamma-1 chain C region	IGHG1_HUMAN	P01857	99
21	Ig heavy chain V-III region	HV305_HUMAN	P01766	99
22	Ig kappa chain C region	IGKC_HUMAN	P01834	99
23	Ig kappa chain V-III region	KV313_HUMAN	P18136	99
24	Ig kappa chain V-IV region	KV403_HUMAN	P06313	99
25	Ig lambda chain C regions	LAC_HUMAN	P01842	99
26	Ig lambda chain V-IV region Hil	LV403_HUMAN	P01717	99
27	Ig mu chain C region	IGHM_HUMAN	P01871	99
28	Immunoglobulin J chain	IGJ_HUMAN	P01591	99
29	Immunoglobulin λ-like polypeptide 1	IGLL1_HUMAN	P15814	99
30	Lactotransferrin	TRFL_HUMAN	P02788	99
31	Lipocalin-1	LCN1_HUMAN	P31025	99
32	Lysozyme C	LYSC_HUMAN	P61626	99
33	Mammaglobin-B	SG2A1_HUMAN	O75556	99
34	Neutrophil defensin 1	DEF1_HUMAN	P59665	99
35	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	NGAL_HUMAN	P80188	99

	Protein angol neve	Protein azonosítója	Uniprot kód	Konfidencia%
36	Polymeric immunoglobulin receptor	PIGR_HUMAN	P01833	99
37	Prolactin-inducible protein	PIP_HUMAN	P12273	99
38	Proline-rich protein 1	PRP1_HUMAN	P04280	99
39	Proline-rich protein 4	PRB4_HUMAN	P10163	99
40	Protein bassoon	BSN_HUMAN	Q9UPA5	99
41	Protein S100-A7	S10A7_HUMAN	P31151	99
42	Protein S100-A9	S10A9_HUMAN	P06702	99
43	Putative lipocalin 1-like protein 1	LC1L1_HUMAN	Q5VSP4	99
44	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma	PTPRG_HUMAN	P23470	96
45	Retinol dehydrogenase 14	RDH14_HUMAN	Q9HBH5	99
46	Secretoglobin family 1D member 1	SG1D1_HUMAN	O95968	99
47	Serum albumin	ALBU_HUMAN	P02768	99
48	Sodium-dependent phosphate transporter 2	S20A2_HUMAN	Q08357	98
49	Transcobalamin-1	TCO1_HUMAN	P20061	99
50	Uncharacterized protein C10orf71	CJ071_HUMAN	Q711Q0	99
51	Uncharacterized protein UNQ773/PRO1567	ZG16B_HUMAN	Q96DA0	99
52	Vacuolar protein sorting-associated protein 13C	VP13C_HUMAN	Q709C8	98
53	Zinc-alpha-2-glycoprotein	ZA2G_HUMAN	P25311	99

9. táblázat A könnyben több mint 95%-os megbízhatósággal azonosított fehérjék, névszerint listázva a SwissProt/Uniprot fehérje nevekkkel és az azonosítás során kapott megbízhatósági százalékkal (Konfidencia %). Félkövér betűvel kiemelve a könnyben korábban még nem azonosított fehérjék [139].

Az Ig κ (kappa)-lánc V-III régió esetében számos szekvenciát azonosítottunk, mint például HIC (P18136), NG9 (P01621), POM (P01624) és VH (P04434), de csak egyiküket jegyeztük fel a 7. táblázatban, mint reprezentatív fehérje. Hasonlóan jártunk el az Ig κ -lánc V-IV régiójában, ahol a B17 (P06314) és JI (P06313) szekvenciákat azonosítottuk [12], [13], [208].

A tömegspektrometriás mérések adatait ProteinPilot 2.0.1 szoftver segítségével kvantitatív szempontból is elemeztük. Azokat a fehérjéket vettük alapul a mennyiségi meghatározáshoz, amelyek megbízhatósága (konfidencia %) legalább 99%-os volt. Az 53 azonosított fehérjéből 47-et kvantifikáltunk. Az adatokat statisztikai analízisnek vetettük alá; kiszámítottuk az átlagértékeket, és Mann-Whitney U-tesztet használtunk a csoportok közötti szignifikáns különbségek megállapítására. Néhány fehérje relatív mennyisége szignifikánsan magasabb volt proliferatív DR esetén, a nem proliferatív DR-hez viszonyítva. Cukorbeteg pácienseink könnymintáiban több mint 10%-ban 15 "jellemző" fehérje jelent meg, az általunk azonosított 53 fehérje közül, melyek relatív mennyisége a betegség progressziójával emelkedett (24. ábra és 10. táblázat).



24. ábra A 15 leggyakrabban előforduló fehérje és azok csoporton belüli megoszlása a diabéteszes retinopátia vonatkozásában. Minden olyan fehérje átlagéréke, amely a különböző csoportok mintáinak több mint 10%-ában jelen volt. [139]

Protein azonosító	N vs NP	NP vs P	N vs P
CYTS_HUMAN	0,01	0,637	0,009
LACRT_HUMAN	0,385	0,01	<0,001
IGHA1_HUMAN	0,854	0,168	0,115
LAC_HUMAN	0,831	0,009	0,036
TRFL_HUMAN	0,082	0,01	<0,001
LCN1_HUMAN	0,076	0,003	<0,001
LYSC_HUMAN	0,334	0,016	0,001
SG2A1_HUMAN	0,559	0,021	0,007
PIGR_HUMAN	0,481	0,79	0,568
PIP_HUMAN	0,508	0,089	0,066
PRP1_HUMAN	0,487	0,7	0,874
PRB4_HUMAN	0,159	0,51	0,041
SG1D1_HUMAN	0,013	0,008	<0,001
ALBU_HUMAN	0,068	0,465	0,251
ZA2G_HUMAN	0,083	0,808	0,107

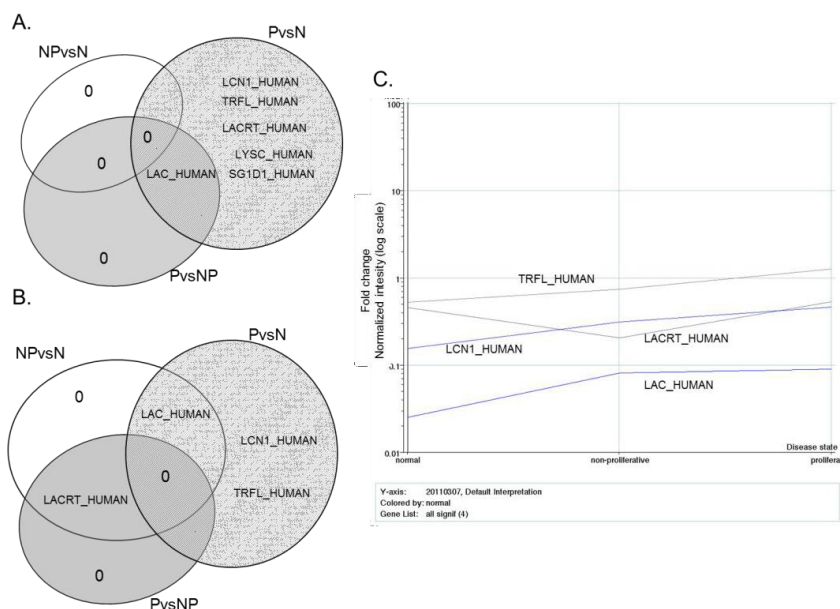
10. táblázat A 15 leggyakrabban előforduló fehérje és azok csoporton belüli megoszlása a diabéteszes retinopátia vonatkozásában. A táblázatban a normál és nem proliferatív (N vs NP), a nem proliferatív és proliferatív (NP vs P), illetve a normális és proliferatív (N vs P) csoportok összehasonlításával kapott p értékeket tüntettük fel. Kiemelve szerepelnek a szignifikánsan eltérő értékek, ahol $p < 0,05$ [139].

Proliferatív DR esetén a lizozim C, mammaglobin B és lipofilin A relatív szintjei szignifikánsan magasabbak voltak a nem proliferatív DR, valamint a normál csoportokhoz viszonyítva. A PRB4 fehérje esetében szignifikáns növekedés csak a normál és proliferatív csoportok között volt kimutatható, míg a lipofilin A esetében a különbség minden csoportban szignifikánsnak bizonyult. A cisztatin S szint szignifikánsan megemelkedett a nem proliferatív DR csoportban a normál csoporthoz képest, valamint szignifikáns csökkenés volt kimutatható a nem proliferatív - és proliferatív DR csoportok között.

Tekintettel arra, hogy a könny teljes fehérje tartalma proliferatív DR esetén szignifikánsan csökken, valamint a laktoferrin és lizozim C szintek a kor előrehaladtával hasonló tendenciát mutatnak, a munkacsoportunk által azonosított 15 fehérje koncentrációinak növekedése potenciális biomarkernek tekinthető a DR progressziójának a megítélésében [209].

4.2.1.2 GenesSpring analízis

Mélyebb részletekbe hatoló adatelemzésünk során - az ún. microarray hibridizációs technikák során adatelemzésre alkalmazott - GeneSpring 7.3 szoftvert (Agilent Biotechnologies) alkalmaztuk. Azokat a változásokat vettük figyelembe, ahol legalább kétszeres változást tapasztaltunk a relatív fehérje mennyiségekben (25. ábra).



25. ábra A könnyfehérjék expressziós változásainak analízise.

(A) A Venn diagrammon ábrázolt fehérjék min. 2x értékre nőttek meg a vizsgált csoportok könnymintáiban. (B) GeneSpring analízissel kapott fehérjék expressziós mintázata és a fehérjék növekedését (C) ábrázoló diagram [139].

Jelmagyarázat: N: normál csoport, NP: nem proliferatív csoport, P: proliferatív csoport.

A könny lakritin tartalma, a nem proliferatív DR csoport normál csoporttal történő összevetésében felére csökkent, míg 2,5x-es növekedése volt igazolható a proliferatív- és nem proliferatív DR csoport összehasonlításának vonatkozásában. Hasonló eredményeket figyelhattunk meg a normál és proliferatív csoportok összehasonlító elemzése során is (**25. ábra**). Az Ig λ lánc C régiója több mint 3x növekedést mutatott amikor a normál és nem proliferatív DR, valamint a nem proliferatív- és proliferatív DR csoportok összehasonlítását végeztük. Szignifikáns különbség volt kimutatható a laktotranszferrin és lipokalin-1 esetében a normál és proliferatív DR csoportok között, mindkét fehérje esetében több mint 2x-es növekedés (**25. ábra B és C részei**) volt megfigyelhető. A GeneSpring analízis mellett, manuális elemzéssel a lipofilin A és lizozim C esetében is több mint 2x-es változás volt kimutatható a proliferatív DR és normál csoportok összehasonlításakor, valamint az Ig λ lánc C régiója esetében a proliferatív- és nem proliferatív DR csoportok összehasonlítása esetében (**25. ábra A része**).

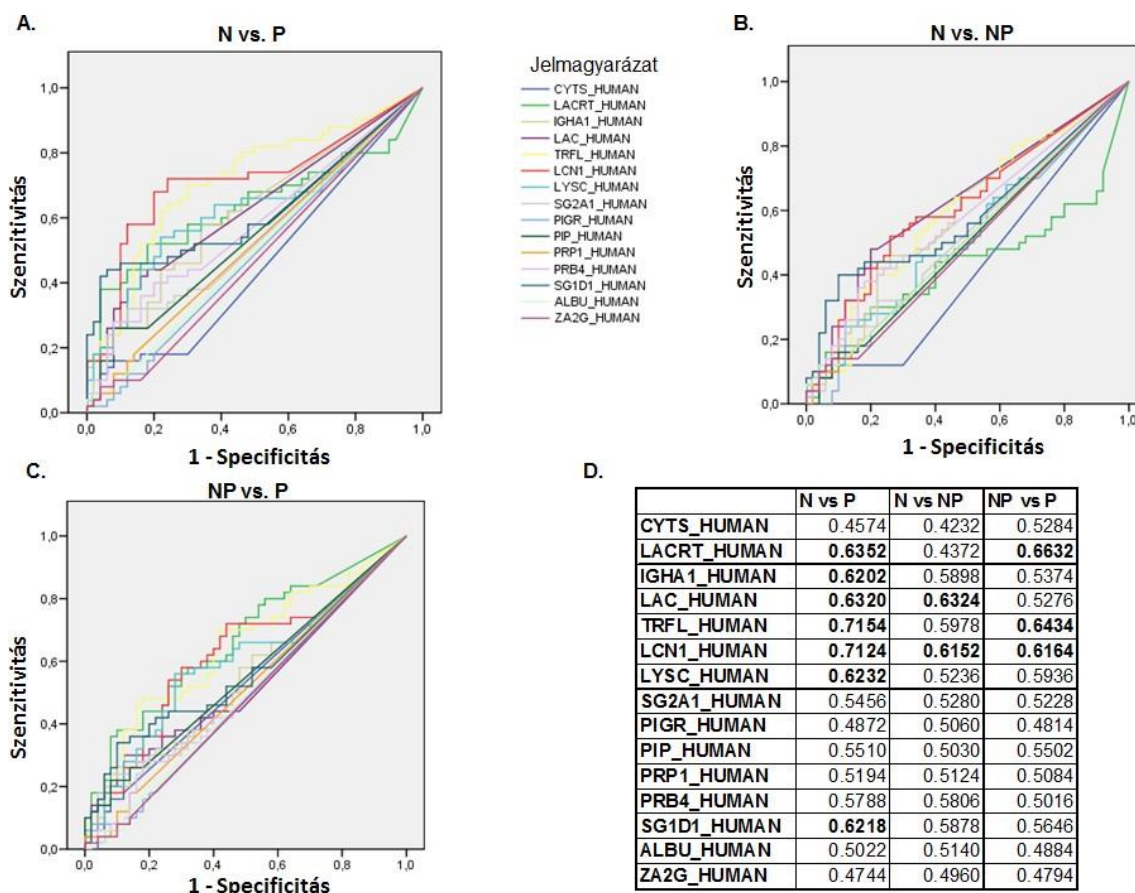
4.2.1.3 ROC analízis diabéteszes retinopátia potenciális biomarkereinek kutatásához

A ProteinPilot 2.0.1. által generált adatok, viszonyított relatív könnyfehérje mennyiségek egészséges kontrollokhoz viszonyítva. Nem szolgáltatnak információt azonban annak vonatkozásában, hogy az adott fehérje potenciális biomarkerként alkalmazható-e. Annak érdekében, hogy felkutassuk a lehetséges biomarkereket ROC analízist végeztünk, és kiszámoltuk a görbék alatti területeket (Area Under the Curve, AUC). Az 1-et megközelítő AUC érték jól használható biomarkerre utal, míg a 0,5-ös értéket közelítő adat azt jelzi, hogy a vizsgált elem nem megfelelő biomarker.

Elemzéseink során referencia alapunk a normál csoport volt, tekintettel arra, hogy ezen csoportba tartozó páciensek cukorbetegség, azonban nem mutatnak DR-ra jellemző szemfenéki elváltozásokat (non- invazív vizsgáló módszerekkel). A ROC elemzés során a normál és proliferatív DR, a normál és nem proliferatív DR, valamint a nem proliferatív- és proliferatív DR csoportokat hasonlítottuk össze (**26. ábra**).

A ROC analízis 0,6-nál magasabb AUC értéket mutat az Ig λ -lánc C régiója és lipokalin-1 esetében a normál és nem proliferatív DR csoportok összehasonlításakor, valamint a lakritin, laktotranszferrin és lipokalin-1 esetében a nem proliferatív- és proliferatív DR csoportok összehasonlítása esetén.

A legmagasabb AUC értékeket a lipokalin-1 (AUC: 0,71) és a laktotranszferrin (AUC: 0,71) esetében kaptuk. A ROC analízis eredménye azt mutatta, hogy a normál és a proliferatív DR csoportok közötti különbség jelentősebb, mint bármely más vizsgált csoport közti különbség. Eredményeink azt is igazolták, hogy a csoportok közti differenciálás megbízhatóbb, amennyiben több biomarkert vizsgálunk.



26. ábra A lehetséges biomarkerek pontosságbecslése ROC görbe analízissel, valamint a szenzitivitás és az 1-specifititás érték összevetése minden lehetséges könnyfehérje biomarkernél.

(A) ROC analízis N és P csoportok között. (B) ROC analízis N és NP csoportok összevetésében. (C) ROC analízis NP és P csoportokra. (D) Az egyes analízisek során számolt AUC értékek, félkövérrel a 0,6-nál nagyobb értékek kiemelve.

Jelmagyarázat: N: normál csoport, NP: nem proliferatív DR csoport, P: proliferatív DR csoport [210].

4.2.2 Gépi tanulórendszerek a diabéteszes retinopátia szűrésében

A DR gépi tanulórendszerekkel történő szűréséhez, az informatikai rendszer által legkönnyebben körülhatárolható, mikroaneurizma (MA) azonosításának gépi tanuló algoritmusát használtuk. A gépi tanulás során a képelemekhez sajátosságvektorokat rendeltünk, ahol az egyes sajátosságokat (skalár értékeket) többnyire szélesebb körben is használt sajátosság kinyerőkkel határoztuk meg. Az egyes sajátosságok redundanciáját, relevanciáját, többváltozós statisztikai módszerekkel (pl.: faktor/regresszió analízissel) ellenőriztük, illetve olyan tanuló-

és osztályozó algoritmusokat alkalmaztunk (pl.: SVM), amely figyelmen kívül hagyta a kevésbé releváns sajátságokat.

Képfeldolgozás alapú döntéshozó rendszerünk a megbízhatóbb eredményesség és jobb reprodukálhatóság érdekében egyféle elváltozás felismerésére fókuszált. Az automata előszűrés működési elveként az *igen/nem* (DR/nincs-DR) döntéshozó mechanizmust alkalmaztuk. Durva közelítéssel azt mondhatjuk, hogyha a képfeldolgozó eljárás alkalmazása során a szemfenéki képen az algoritmus nagy biztonsággal MA-t detektált, akkor a szoftver a vizsgált képet a DR csoportba sorolta. Ezen csoportba kerültek továbbá azon képek is, melyeket az algoritmus valamilyen ok miatt nem tudott az egészséges csoportba sorolni, azaz kétesnek ítélt valamilyen ok miatt (pl. nem megfelelő képminőség). A képelemzés automatizálásának biztonsága érdekében ez utóbbi ismertett döntéshozatali mechanizmus kiemelkedően fontos.

4.2.3 Könnyproteomikai alapú tanuló algoritmusok eredményei

A klasszikus statisztikai módszerekkel azonosított hat marker könnyfehérjét bemeneti adatként használva, az általunk alkalmazott tanuló algoritmusok közül a leghatékonyabbnak az Rpart bizonyult. A tanuló algoritmusok inputjaként alkalmazott hat könnyfehérje (lipokalin 1, laktotranszferrin, lakritin, lizozim C, lipofilin A, Ig λ -lánc) azonosítása a 34 vizsgált könnyfehérje közül statisztikai hipotézis vizsgálat segítségével történt. A fehérje adatok normalitásának Shapiro-Wilk próbával történő vizsgálata során beigazolódott, hogy azok nem normális eloszlásból származtak, így Kruskal-Wallis tesztet végeztünk azon fehérjék azonosítására, amelyek szignifikánsan eltérő koncentráció-értékekkel rendelkeznek a vizsgált csoportokban. Olyan esetekben, ahol az azonos fehérje koncentrációt feltételező nullhipotézist elvetettük, Mann-Whitney tesztet futtattunk a megfelelő párokra. A hipotézisvizsgálat eredményeként előállt szignifikánsan eltérő fehérjekoncentrációk esetén „fold change” szűrést alkalmaztuk, így azok a fehérjék kerültek be az eredmény halmazba és kerültek potenciális markerként azonosításra, ahol a „fold change” érték ≥ 2 volt. Vizsgálatainkat elvégeztük a klasszikus statisztikai analízis segítségével kapott hat fehérje marker, majd a teljes fehérje panel koncentráció értékeinek felhasználásával is.

A **11. táblázat** összefoglalva szemlélteti az általunk alkalmazott tanuló algoritmusokat és azok teljesítmény mutatóit: Support Vector Machine (SVM), Recursive Partitioning (Rpart), Random Forest (randomForest), Naive Bayes (naiveBayes), Logistic Regression (logReg), K-Nearest Neighbor (k-NN).

Felépített modelljeink alapján az Rpart osztályozón alapuló eljárás teljesítménye felülmúlta az összes többi vizsgált modell teljesítményét. Ugyan az Rpart osztályozóval szemben a NaivBayes osztályozó szenzitivitási értéke sokkal magasabbnak bizonyult (0,80;

naiveBayes/marker), specificitás értéke azonban rendkívül alacsonyan maradt (0,38). Az Rpart osztályozó legfontosabb eredményei az alábbiak: 0,74 szenzitivitás, 0,48 specificitás és 0,65 pontosság Rpart/marker esetén.

Hipotézisünk volt, hogy a könnyben proteomikai módszerekkel azonosított teljes könnyfehérje mintázat tartalmaz olyan információkat, amely tovább erősítheti a kiválasztott hat marker fehérje alkalmazásával elérhető teljesítményt. Vizsgálataink során végzett főkomponens analízis (Principal Components Analysis, PCA) alkalmazásával csökkenthető a bemeneti adatmennyiség úgy, hogy megőrizhető a teljes adathalmazban megtalálható információ nagy része, miközben az ezen alapuló modell teljesítménye jelentősen nem változik.

Modell	Dataset	SENS	SPC	ACC	PREC	NPV	F1	LRP	LRN
naiveBayes	Orig	0,699	0,419	0,622	0,760	0,346	0,728	1,203	0,719
	Marker	0,800	0,387	0,506	0,346	0,827	0,483	1,306	0,516
	Pca	0,673	0,337	0,449	0,337	0,673	0,449	1,015	0,971
kNN	Orig	0,671	0,500	0,667	0,981	0,036	0,797	1,342	0,658
	Marker	0,669	0,500	0,667	0,990	0,019	0,798	1,338	0,662
	Pca	0,664	0,308	0,635	0,914	0,077	0,769	0,960	1,091
logReg	Orig	0,692	0,385	0,590	0,692	0,385	0,692	1,125	0,800
	Marker	0,662	0,308	0,603	0,827	0,154	0,735	0,956	1,100
	Pca	0,662	0,000	0,654	0,981	0,000	0,791	0,662	∞
randomForest	Orig	0,693	0,448	0,647	0,846	0,250	0,762	1,256	0,685
	Marker	0,692	0,410	0,622	0,779	0,308	0,733	1,174	0,750
	Pca	0,675	0,364	0,609	0,798	0,231	0,731	1,060	0,894
Rpart	Orig	0,708	0,472	0,654	0,817	0,327	0,759	1,342	0,618
	Marker	0,740	0,481	0,654	0,740	0,481	0,740	1,426	0,540
	Pca	0,694	0,438	0,641	0,827	0,269	0,754	1,233	0,701
SVM	Orig	0,665	0,000	0,660	0,990	0,000	0,795	0,665	∞
	Marker	0,662	0,000	0,654	0,981	0,000	0,791	0,662	∞
	Pca	0,662	0,000	0,654	0,981	0,000	0,791	0,662	∞

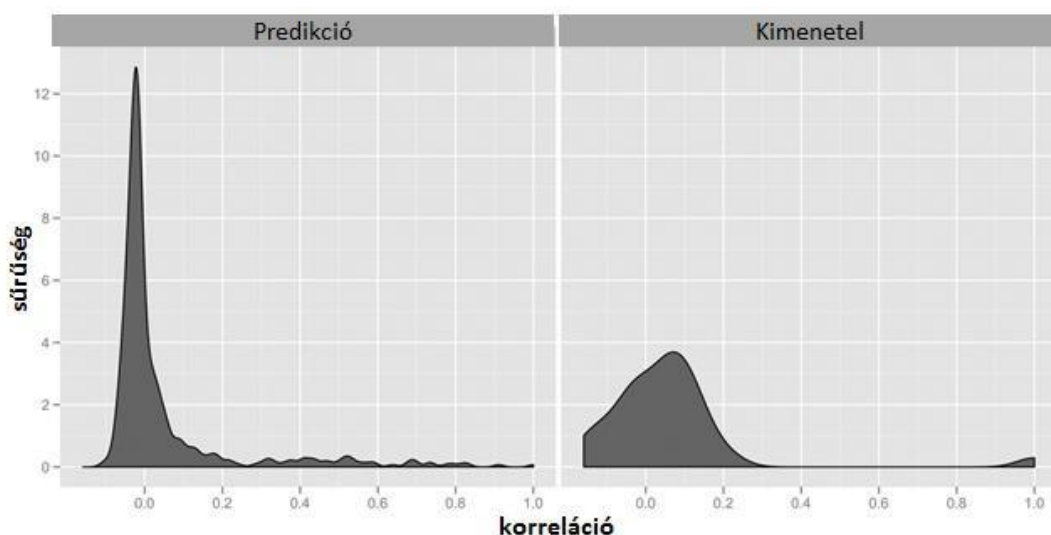
11. táblázat Hat különböző tanuló eljárás teljesítmény mutatóinak összehasonlítása.

A hat osztályozó értékelése során alkalmazott teljesítményindikátorok a különböző inputok elemzése során a globális proteomikai mintázat, a könnyből azonosított 6 marker fehérje és a főkomponens-analízis alkalmazása esetén.

Jelmagyarázat: Orig - teljes adathalmaz; Marker - csak a hat marker fehérje; Pca - PCA által transzformált adatok. SENS - szenzitivitás; SPC - specificitás; ACC - pontosság; PREC - pozitív prediktív érték; NPV - negatív prediktív érték; F1 - F-érték; LRP - pozitív valószínűségi hányados; LRN - negatív valószínűségi hányados [210].

A meghatározott teljesítmény mutatókban szignifikáns különbséget nem tudtunk kimutatni, amennyiben modellünket az általunk kiválasztott 6 fehérje markerre építettük fel, illetve ha a főkomponens-analízissel redukált adathalmaz segítségével történt a modell alkotás; szemben azzal, amikor a teljes proteomikai panelt használtuk.

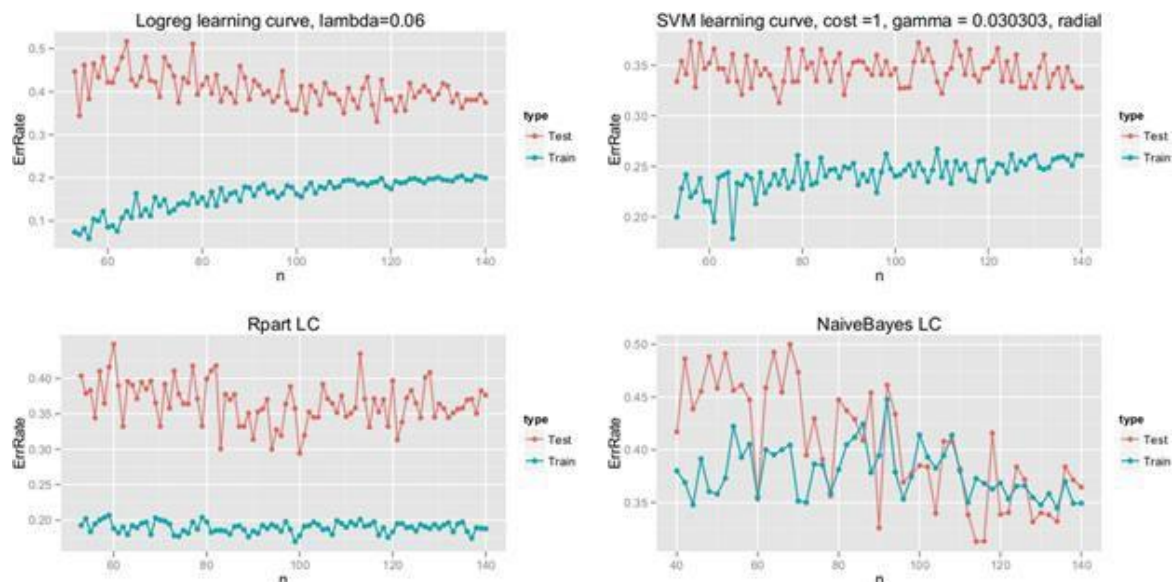
A főkomponens-analízis során kapott első két főkomponens hordozta a teljes fehérjepanel-koncentráció értékek varianciájának 22%-át, így ezt a redukált adathalmazt használtuk ebben az esetben a modellépítésre. A **11. táblázat** eredményeit tovább elemezve látható, hogy az első két főkomponens megtartása esetén a modell teljesítménye érdemileg nem változik. A két főkomponens az egyes fehérjékhez tartozó értékek lineáris kombinációjával, azaz a már meglévőkből újonnan definiált változókból kerül ki. Az adatok megjelenítése érdekében elkészítettük az első két főkomponens szórásdiagramját (**27. ábra**), amely szemlélteti, hogy a DR és nem DR osztályok nem különültek el élesen egymástól [210].



27. ábra A valószínűségi változó sűrűségfüggvénye. Bal oldal: a független változók közötti korrelációs értékek sűrűségfüggvénye. Jobb oldal: a független változók és a kimeneti változók közötti korrelációs értékek sűrűségfüggvénye [210].

A vizsgált adathalmaz változói között található összefüggéseket tovább elemeztük. A korrelációs értékek sűrűségfüggvényeit adtuk meg a független változók (fehérje koncentráció értékek), valamint a független változók és a kimeneti változók (DR/nem DR) között. Elemzéseink azt mutatták, hogy a független változók és a független változók/kimenet közötti korreláció nagyon alacsony [210].

Választ kerestünk arra, hogy a tanuló adathalmaz méretének növelése milyen hatást gyakorol a modellek teljesítményére. A kiértékeléséhez minden egyes modell esetén elkészítettük a tanulási görbéket (**28. ábra**), melyek az egyes modellekre engedtek rálátást; jellemző torzításra és szórásra, valamint a modell jövőbeni teljesítményének javítási lehetőségeire.



28. ábra Tanulási görbék.

A Logistic Regression (Logreg), a Support Vector Machine (SVM), Recursive Partitioning (Rpart) és a Naive Bayes (naiveBayes) osztályozók tanulási görbéje különböző méretű adathalmazokra vonatkozóan [210]

A tanulási görbék segítségével ábrázolható a különböző méretű tanulóhalmazok mellett kapott tanulási és tesztelési lépés során tapasztalható hiba. Az SVM és az Rpart algoritmusok esetében jelentős a távolság a tanuló- és a teszt halmaz esetén tapasztalt hibaszázalékok között, ami arra utal, hogy ezen osztályozók alkalmazása esetén a szórása nagy, azaz a modell teljesítménye fokozható a tanuló adathalmaz méretének növelésével. A Logreg és a naiveBayes osztályozók esetén modellünk túlságosan egyszerűnek bizonyult, számottevő különbséget nem láttunk a tanulási görbék között, valamint a tanuló- és teszthalmaz esetén is magas hibaszázalékot észleltünk.

4.2.3.1 Kombinált módszertan alkalmazásával kapott eredmények

A fentiekben ismertetett könnyproteomikai, illetve MA detektorokra épülő rendszerek bemeneteit kombináltan felhasználni képes új modellt építettünk fel. Kutatásunk során ezen

három modell teljesítményét hasonlítottuk össze a **12. táblázatban**. Az eredmények értékelése során látható, hogy az egy adattípusra alkalmazott modellek teljesítményének vonatkozásában a MA-detektor jobban teljesített a proteomikai alapú módszertannál. Pontosság tekintetében a kombinált módszertan felülmúlta mindkét egyéni modell teljesítményét. A MA-detektor specificitási mutatói jobbak voltak még a kombinált modellhez képest is.

Szűrő eljárás		SENS	SPC	ACC	PREC	NPV	F1	LRP	LRN
Képfeldolgozás	<i>Átlag</i>	0,84	0,81	0,84	0,94	0,63	0,89	4,42	0,20
	<i>SD</i>	0,11	0,04	0,10	0,13	0,11	0,11	2,36	0,11
Proteomika	<i>Átlag</i>	0,87	0,68	0,82	0,89	0,63	0,88	2,72	0,19
	<i>SD</i>	0,17	0,12	0,11	0,21	0,15	0,16	1,24	0,12
Kombinált eljárás	<i>Átlag</i>	0,93	0,78	0,89	0,93	0,78	0,93	4,23	0,09
	<i>SD</i>	0,18	0,19	0,15	0,23	0,22	0,18	1,32	0,07

12. táblázat A három modell teljesítmény mutatóinak összefoglalása

A képfeldolgozás, a proteomikai, illetve a kombinált szűrőeljárás teljesítmény mutatóinak bemutatása. Jelölések: SENS-szenzitivitás; SPC-specificitás; ACC-pontosság; PREC-pozitív prediktív érték; NPV-negatív prediktív érték; F1-F-érték; LRP-pozitív valószínűségi hányados; LRN-negatív valószínűségi hányados [210].

Informatikai rendszer alapú MA modellünk teljesítmény mutatói: szenzitivitása 0,84; specificitása 0,81. Proteomikai adatokra épülő modellünk teljesítmény mutatói: szenzitivitása 0,87; specificitása 0,68. A kombinált eljárás teljesítménye mindkét modellünk teljesítményét meghaladta, teljesítmény mutatói: szenzitivitása 0,93; specificitása 0,78.

4.2.4 Potenciálisan alkalmazható új vizsgáló eljárások a diabétesz okozta retinopátia szemszövődmények szűrésében

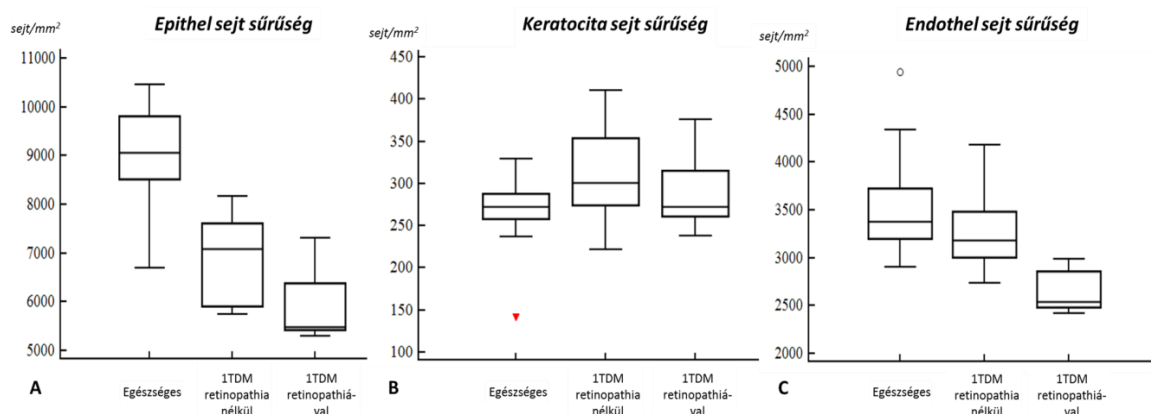
4.2.4.1 In vivo konfokális cornea mikroszkópia

Diabéteszes pácienseink kiindulási vizsgálatának klinikai adatait a **13. táblázat** összefoglalva szemlélteti. Statisztikailag szignifikáns eltérés nem volt kimutatható a betegek átlagéletkorában az I-es típusú diabéteszes betegek (T1DM), és a kontrollcsoportok összehasonlításakor ($p=0,08$). Az T1DM betegek csoportjában a páciensek megoszlása a DR vonatkozásában az alábbiak szerint alakult: 15 páciensnél nincs DR-ra utaló jel, DR-2-es stádium 2 páciens, DR-3-as stádium 1 esetben, és DR-4-es stádium 7 páciensünk esetében volt diagnosztizálható. A retinopátiás betegek csoportjában 9 esetben (átlag életkor: $31,26 \pm 4,52$) történt pánretinális lézerkezelés.

T1DM betegek			<i>p</i>
	DR nélkül	DR	
DM fennállása (év)	5,8±2,6	21,6±6,4	<0,0001
HbA_{1c} (%)	7,9±0,9 (7,4-8,4)	9,4±3,2 (6,7-12,0)	0,11
Koleszterin (mmol/L)	4,0±0,8 (3,5-4,5)	5,6±1,1 (4,2-6,9)	0,004
Triglicerid (mmol/L)	0,8±0,2 (0,7-0,9)	4,1±2,8 (0,6-7,6)	0,0002
HDL (mmol/L)	1,7±0,3 (1,6-1,9)	0,9±0,5 (0,3-1,6)	0,0001
eGFR (mL/min/1,73m²)	>90	69,6±28,27 (45,9-93,3)	0,024
Hipertenzió	0/18	3/10	0,505
Mikroalbuminúria	0/18	2/10	0,478

13. táblázat I-es típusú diabéteszes betegeink (retinopátiás és nem retinopátiás) klinikai adatai és azok összehasonlítása. Magyarázat: Átlag±SD (95%-os megbízhatósági tartomány) [177].

A szaruhártya sejtek vizsgálata során statisztikailag szignifikánsan alacsonyabb volt a T1DM páciensek bazális epitél (p<0,001) és endotél (p=0,001) sejtszáma a kontrollcsoporthoz viszonyítva (**29. ábra** és **14. táblázat**). A poszterior strómában a keratocita sejt sűrűséget szignifikánsan magasabbnak találtuk (p=0,001) az T1DM betegek esetén a kontrollcsoporttal összehasonlítva. A bazális epitélium- (p<0,0001) és az endotél (p=0,02) sejtsűrűség szignifikánsan alacsonyabbnak, míg a keratocita sejt sűrűség (p=0,02) magasabbnak bizonyult a retinopátia nélküli T1DM betegeknél a kontroll személyekkel összehasonlítva. Az epitél- (p=0,04) és az endotél (p=0,004) sejtsűrűség a retinopátiás T1DM esetén szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a nem retinopátiás T1DM páciensekkel összehasonlítva.

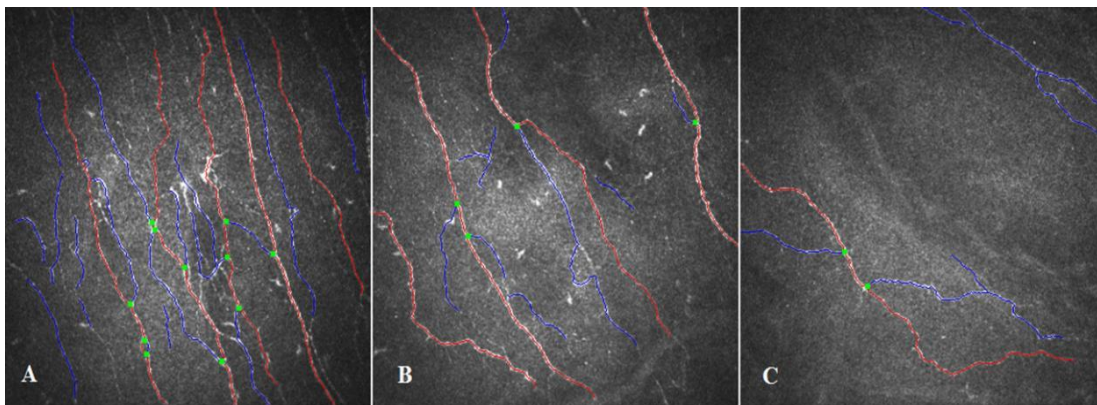


29. ábra Bazális epítél sejtszám (A), keratocita sejt sűrűség (B) és az endotél sejtszám (C) értékei mm²-re vonatkoztatva a kontroll, a nem retinopátiás és a retinopátiás I-es típusú diabéteszes páciensek esetén [177].

	Egészséges kontroll	T1DM betegek		p*
		DR nélkül	DR	
Epítél sejtszám (sejt/mm ²)	9024,76±962,83 (8529,72-9519,8)	6942,73±881,04 (6504,6-7380,86)	5923,14±739,88 (5238,87-6607,42)	<0,0001
p [†]		<0,0001	0,04	
Keratocita sejtszám (sejt/mm ²)	268,84±40,09 (248,23-289,45)	314,11±52,98 (287,76-340,46)	289,13±44,85 (251,63-326,62)	0,024
p [†]		0,02	0,258	
Endotél sejtszám (sejt/mm ²)	3497,62±519,84 (3230,34-3764,9)	3250,36±421,49 (3007,0-3493,72)	2639,17±227,49 (2400,44-2877,9)	0,001
p [†]		0,02	0,004	

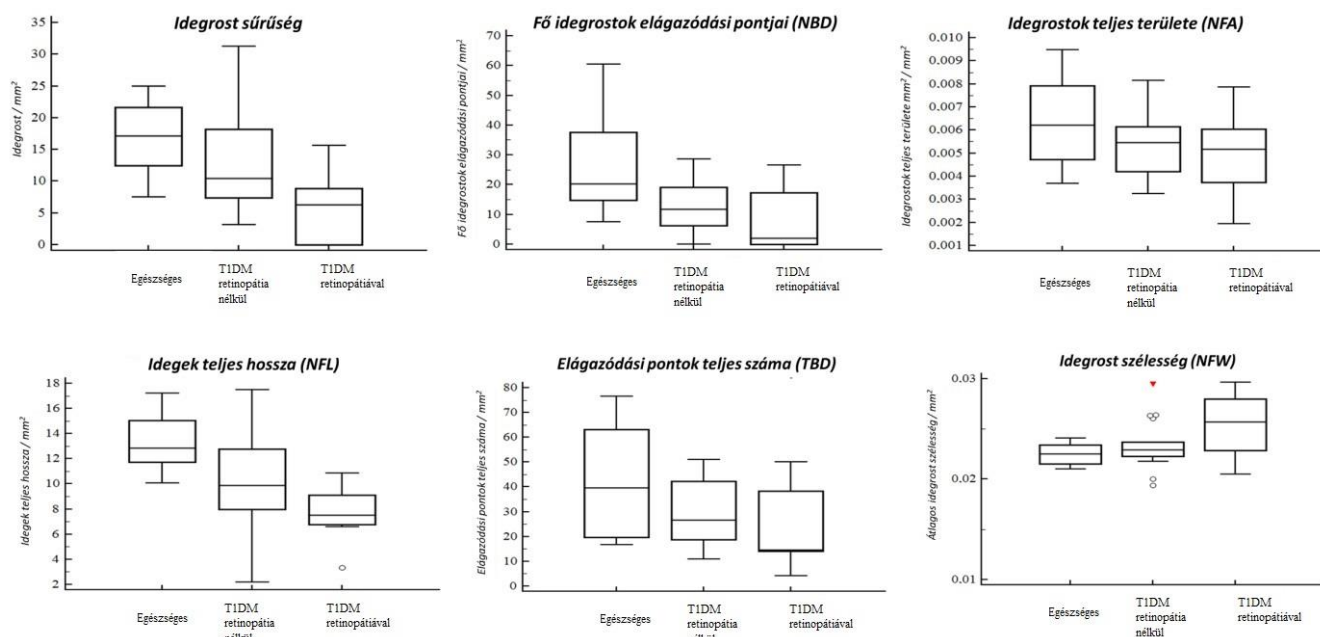
14. táblázat A szaruhártya mikrostrukturális változásainak az összehasonlítása egészséges személyek, retinopátiás és nem retinopátiás T1DM páciensekkel.

Magyarázat: Átlag ± SD (95%-os megbízhatósági tartomány). * ANOVA analízis a 3 csoport összehasonlítására. † Post hoc analízis eredménye az egészséges kontrollcsoport és a nem retinopátiás T1DM páciensek összehasonlítására, valamint a retinopátiás és a nem retinopátiás I-es típusú diabéteszes betegek összehasonlítására [177].



30. ábra ACCMetrics szoftverrel kiértékelt képek a subbazális idegkötegekről. Egészséges egyén idegrost hálózata (A) összehasonlítva egy (B) 10 éve (HbA1C: 9,8%) fennálló T1DM beteg idegrost hálózatával retinopátiás elváltozások nélkül és egy (C) 27 éve (HbA1C: 8,7%) fennálló, súlyos retinopátiával járó T1DM beteggel [177].

Statisztikailag szignifikáns eltérést találtunk a szaruhártya idegrostréteg változásainak vizsgálata során az NFD ($p=0,004$), az NBD ($p=0,004$), az NFL ($p=0,001$) és a TBD ($p=0,04$) paraméterekben az T1DM betegek és a kontroll személyek között (**30-31. ábrák, 15. táblázat**). A NFA értékeit tekintve nem találtunk szignifikáns eltérést a 3 csoport összehasonlításakor ($p=0,144$). Szignifikánsan magasabb NFW értéket ($p=0,04$) találtunk azonban az T1DM esetén a kontrollal összevetve. Post-hoc analízissel az NFD értékeiben nem találtunk eltérést ($p=0,256$), de alacsonyabb NBD ($p=0,02$) és NFL ($p=0,04$) értékeket találtunk a nem retinopátiás T1DM esetén a kontrollokkal összehasonlítva. Az NFD ($p=0,003$), az NBD ($p=0,001$), az NFW ($p=0,03$) és a TBD ($p=0,05$) értékek szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyultak retinopátiás T1DM betegek esetén a kontrollokhöz képest. Az NFD ($p=0,03$) értékekben is szignifikáns eltérést találtunk a retinopátiás és a nem retinopátiás T1DM pácienseket összehasonlítva.



31. ábra A kontrollcsoport, a retinopátiás és nem retinopátiás I-es típusú diabéteszes betegek idegrostrétegeinek összehasonlítása. (A) az idegrost sűrűség (NFD), (B) az idegelágazódás sűrűsége (NBD), (C) az idegrost területe, (D) az idegrost hosszúsága (NFL), (E) a teljes idegelágazódások sűrűsége (TBD) és (F) az idegrost szélességének ábrázolása a három vizsgálati csoportban [177].

	Egészséges kontroll (n=17)	T1DM betegek		
		DR nélkül (n=18)	DR (n=10)	
Idegrost/mm ² (NFD)	16,92±5,61 (13,15-20,69)	12,79±7,72 (8,82-16,76)	6,13±5,37 (2,00-10,26)	0,004
<i>p</i> [†]		0,256	0,003	
Fő idegrostok elágazódási pontjai/mm ² (NBD)	27,24±17,82 (15,27-39,22)	13,04±7,59 (8,99-17,09)	8,74±11,00 (0,28-17,19)	0,004
<i>p</i> [†]		0,02	0,682	
Idegsejtek teljes hossza (mm/mm ²) (NFL)	13,30±2,27 (11,78-14,83)	10,28±3,85 (8,36-12,19)	7,65±2,13 (6,01-9,28)	0,001
<i>p</i> [†]		0,04	0,112	
Idegrostok elágazódási pontjainak teljes száma/mm ² (TBD)	43,04±22,11 (28,19-57,89)	28,80±13,74 (21,96-5,63)	24,42±15,72 (12,34-36,50)	0,04
<i>p</i> [†]		0,086	0,804	
Idegrostok teljes területe (NFA) (mm ² /mm ²)	0,0064±0,0021 (0,0045-0,0082)	0,0054±0,0013 (0,0045-0,0061)	0,0049±0,0017 (0,0036-0,0063)	0,144
<i>p</i> [†]		0,272	0,801	
Átlagos idegrost szélesség (mm/mm ²) (NFW)	0,0224±0,0011 (0,0215-0,0236)	0,0234±0,0024 (0,0223-0,0247)	0,0252±0,0033 (0,0210-0,0282)	0,04
<i>p</i> [†]		0,564	0,147	

15. táblázat A szubvizuális idegi plexus morfológiájának összehasonlítása az egészséges kontrollok, a retinopátiás és nem retinopátiás I-es típusú diabéteszes betegekkel összehasonlítva.

Magyarázat: Átlag ± SD (95%-os megbízhatósági tartomány). * ANOVA analízis a 3 csoport összehasonlítására. † Post hoc analízis eredménye az egészséges kontrollcsoport és a nem retinopátiás T1DM páciensek összehasonlítására, valamint a retinopátiás és a nem retinopátiás I-es típusú diabéteszes betegek összehasonlítására [177].

A retinopátiás T1DM pácienseknél szignifikáns fordított korrelációt véltünk felfedezni az NFD ($r=-0,428$; $p=0,029$) és az NFL ($r=-0,387$; $p=0,046$) értékekben. Az T1DM betegek szérumszintje fordított korrelációban áll az NFL ($r=-0,511$; $p=0,025$) és az NFW ($r=-0,450$; $p=0,047$) értékekkel. A cukorbetegség fennállása, a HbA_{1c}, a szérumszint triglicerid, a HDL koleszterin és az eGFR értékeket összevetve a morfológiai elváltozásokkal azonban nem tudtunk szignifikáns korrelációt kimutatni ($p>0,05$).

4.2.4.2 In vivo konfokális cornea mikroszkópia, követéses vizsgálat

A diabéteszes betegek legfontosabb klinikai és metabolikus jellemzőit a **16. táblázat** foglalja össze. A totális koleszterol szint szignifikánsan csökkent a DR csoportban ($p=0,04$), amíg a trigliceridek, HDL koleszterol, eGFR, vérnyomás és microalbuminuria nem mutatott szignifikáns változást a 2 éves követés végén.

	Első NDR (n=12)	Követés NDR (n=12)	# p	Első DR (n=7)	Követés DR (n=7)	# p
Diabétesz fennállása (év)						
Átlag	6	9		22	24	
± szórás	3	3		7	7	
HbA_{1c} (%)			0,278			0,894
Átlag	7,82	8,14		8,29	8,43	
± szórás	1,09	1,22		0,93	2,05	
(95% KI)	(7,1-8,5)	(7,4-8,9)		(7,4-9,2)	(6,5-10,3)	
Koleszterol (mmol/L)			0,123			0,042
Átlag	4,03	4,37		5,23	5,10	
± szórás	0,51	0,73		0,59	1,35	
(95% KI)	(3,7-4,4)	(3,9-4,9)		(4,3-6,2)	(1,7-8,5)	
Trigliceridek (mmol/L)			0,067			0,317
Átlag	0,83	0,73		2,43	1,45	
± szórás	0,27	0,18		1,80	0,78	
(95% KI)	(0,7-1,0)	(0,6-0,9)		(-2,0-6,9)	(-5,5-8,4)	
HDL koleszterol (mmol/L)			0,320			0,578
Átlag	1,73	1,84		1,93	1,85	
± szórás	0,25	0,28		1,21	0,07	
(95% KI)	(1,6-1,9)	(1,7-2,0)		(-1,1-4,9)	(1,2-2,5)	
eGFR (mL/perc/1,73m²)			0,801			0,943
Átlag	>90 minden	>90 minden		81,71	80,71	
± szórás	betegnél	betegnél		21,92	24,57	
(95% KI)				(61,4-101,9)	(57,9-103,4)	
Hipertonia	0	0		2	2	
Inzulin pumpa használat	5	5		0	0	
Mikroalbuminuria	0	0		2	2	

16. táblázat A DR-ben nem szenvedő (NDR) és szenvedő (DR) diabéteszes csoport klinikai és metabolikus adatai az első vizsgálaton és a 2 éves követés végén. NDR: DR-ben nem szenvedő csoport; DR: DR-ben szenvedő csoport; KI: konfidencia intervallum; #p érték: páros t-próba az első és a követéses vizsgálat eredményeinek összehasonlítására [178].

Nem volt kimutatható jelentős változás az epitél, keratocita és endotél sejtszámban, valamint a centrális szaruhártya vastagságban a diabéteszes és kontrollcsoportok között (**17. táblázat**). Szintén nem állapítottunk meg szingifikáns eltérést a corneális idegrost morfológiai paraméterekben a DR-ban nem szenvedő T1DM betegek és az egészséges személyek között. A NFL szignifikánsan alacsonyabb értéket mutatott DR-ban szenvedő betegeknél, mint az egészségeseknél ($p=0,002$). A 2 éves követés alatt a NBD ($p=0,03$) és NTBD ($p=0,04$) szignifikánsan csökkent a NFA ($p=0,08$) és NFW ($p=0,07$) paraméterekkel együtt a DR-ban nem szenvedő betegeknél (**32. ábra**). A NFD ($p=0,04$) szintén szignifikánsan alacsonyabbnak adódott a DR-ban szenvedő betegek csoportjában (**18. táblázat**). A szérum trigliceridek fordítottan korreláltak a NFW értékével ($r=-0,339$, $p=0,04$), de nem volt szignifikáns összefüggés a diabétesz fennállása, a HbA1c, a HDL, és eGFR, valamint bármely corneális idegi paraméter között a T1DM csoportokban.

	Csoportok					
	KNDR (n=12)	Első NDR (n=12)	Követés NDR (n=12)	KDR (n=7)	Első DR (n=7)	Követés DR (n=7)
Epitél sejtsűrűség (sejt/mm²)						
Átlag	6248,33	6333,72	6514,74	6327,58	6048,71	5743,95
± szórás	639,62	1290,25	877,19	650,76	671,17	772,87
(95% KI)	(5818,6-6678,0)	(5513,9-7153,5)	(5925,4-7104,1)	(5783,5-6871,6)	(5428,0-6669,5)	(5029,2-6458,7)
p ^{§, #}	0,845 [§]		0,701 [#]	0,894 [§]		0,446 [#]
Keratocita sejtsűrűség (sejt/mm²)						
Átlag	475,73	414,62	466,40	385,00	439,38	472,40
± szórás	168,97	115,21	140,48	70,14	148,27	105,18
(95% KI)	(362,2-5889,2)	(337,2-492,0)	(372,0-560,8)	(311,4-458,6)	(302,3-576,5)	(375,1-569,7)
p ^{§, #}	0,334 [§]		0,356 [#]	0,668 [§]		0,639 [#]
Endotél sejtsűrűség (sejt/mm²)						
Átlag	2977,95	2980,48	2980,70	2384,50	2343,53	2652,37
± szórás	406,53	292,12	490,10	442,18	445,26	464,62
(95% KI)	(2551,3-3404,6)	(2736,3-3224,7)	(2604,0-3357,4)	(1680,9-3088,1)	(1790,6-2896,4)	(2075,5-3229,3)
p ^{§, #}	0,989 [§]		0,999 [#]	0,429 [§]		0,315 [#]
Centrális cornea vastagság (µm)						
Átlag	551,54	562,067	560,00	545,06	560,46	576,86
± szórás	28,21	25,48	34,89	20,21	23,55	33,28
(95% KI)	(532,6-570,5)	(545,8-578,3)	(538,4-582,7)	(528,1-562,0)	(538,7-582,2)	(546,1-607,6)
p ^{§, #}	0,358 [§]		0,907 [#]	0,196 [§]		0,308 [#]

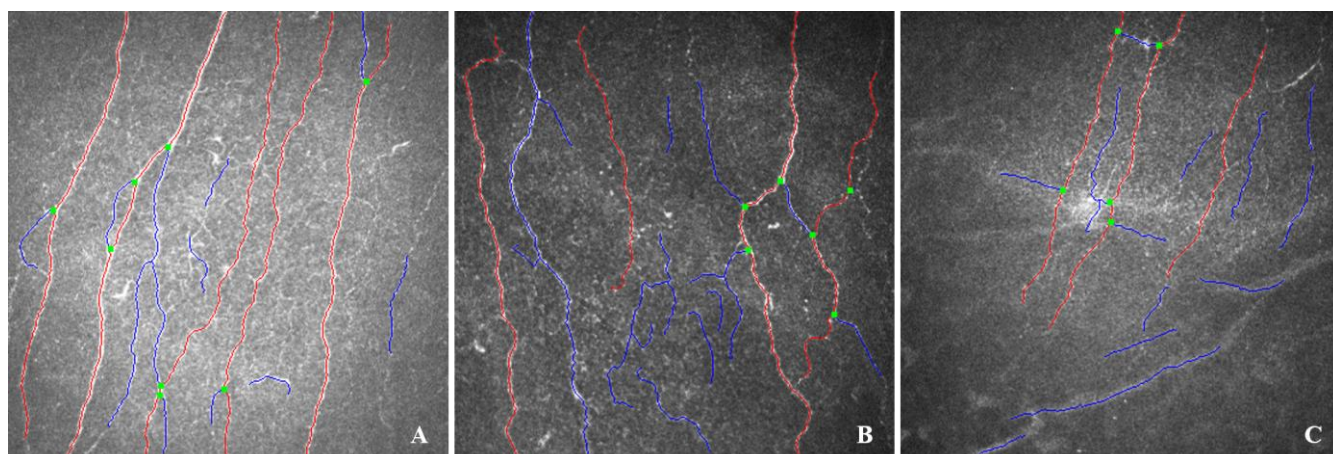
17. táblázat A szaruhártya sejtsűrűségei és vastagsága a diabéteszes és kontrollcsoportban a 2 éves követés elején és végén.

KNDR: kontroll a DR-ben nem szenvedő csoporthoz (NDR); KDR: kontroll a DR-ben szenvedő csoporthoz (DR); KI: konfidencia intervallum; §p érték: Student t-próba az első vizsgálat során a diabéteszes és kontrollcsoport összehasonlítására; #p érték: páros t-próba az első és a követéses vizsgálat eredményeinek összehasonlítására [178].

	Csoportok					
	KNDR (n=12)	Első NDR (n=12)	Követés NDR (n=12)	KDR (n=7)	Első DR (n=7)	Követés DR (n=7)
Idegrost/mm² (NFD)						
Átlag	13,97	10,81	10,76	16,93	14,58	6,60
± szórás	7,36	11,09	9,26	4,45	7,36	3,59
(95% KI)	(9,0-18,9)	(0,5-21,1)	(1,0-20,5)	(13,2-20,7)	(5,4-23,7)	(2,8-10,4)
p ^{§, #}	0,530 [§]		0,173 [#]	0,485 [§]		0,043 [#]
Fő idegrostok elágazódási pontjai/mm² (NBD)						
Átlag	12,59	12,36	6,25	16,66	16,25	6,25
± szórás	7,48	9,50	5,43	5,59	12,79	5,43
(95% KI)	(7,6-17,6)	(3,6-21,2)	(0,5-11,9)	(11,9-21,3)	(0,4-32,1)	(0,5-11,9)
p ^{§, #}	0,196 [§]		0,029 [#]	0,936 [§]		0,114 [#]
Idegsejtek teljes hossza (mm/mm²) (NFL)						
Átlag	10,33	10,67	8,58	12,52	8,43	7,71
± szórás	3,19	4,98	3,49	0,85	2,96	1,44
(95% KI)	(8,2-12,5)	(6,1-15,3)	(6,2-10,9)	(11,8-13,2)	(5,7-11,2)	(6,4-9,1)
p ^{§, #}	0,494 [§]		0,153 [#]	0,002 [§]		0,573 [#]
Idegrostok elágazódási pontjainak teljes száma/mm² (TBD)						
Átlag	28,50	28,82	20,36	31,44	21,73	20,83
± szórás	12,93	14,44	10,67	10,64	13,28	12,15
(95% KI)	(19,8-37,2)	(15,5-42,2)	(13,2-27,5)	(22,5-40,3)	(9,5-34,0)	(9,6-32,1)
p ^{§, #}	0,214 [§]		0,035 [#]	0,140 [§]		0,898 [#]
Idegrostok teljes területe (mm²/mm²) (NFA)						
Átlag	0,0047	0,0057	0,0047	0,0053	0,0046	0,0051
± szórás	0,0020	0,0013	0,0012	0,0001	0,0017	0,0019
(95% KI)	(0,003-0,006)	(0,005-0,007)	(0,004-0,006)	(0,005-0,006)	(0,003-0,006)	(0,003-0,007)
p ^{§, #}	0,160 [§]		0,086 [#]	0,404 [§]		0,694 [#]
Átlagos idegrost szélesség (mm/mm²) (NFW)						
Átlag	0,0235	0,0240	0,0260	0,0220	0,0240	0,0250
± szórás	0,0028	0,0031	0,0038	0,0019	0,0031	0,0044
(95% KI)	(0,022-0,025)	(0,021-0,027)	(0,023-0,028)	(0,021-0,024)	(0,021-0,028)	(0,021-0,028)
p ^{§, #}	0,839 [§]		0,074 [#]	0,239 [§]		0,760 [#]

18. táblázat A szubbazális idegrost morfológia paraméterei a diabéteszes és egészséges csoportokban az első vizsgálat során és a követés végén.

KNDR: kontroll a DR-ben nem szenvedő csoporthoz (NDR); KDR: kontroll a DR-ben szenvedő csoporthoz (DR); KI: konfidencia intervallum; §p érték: Student t-próba az első vizsgálat során a diabéteszes és kontroll csoport összehasonlítására; #p érték: páros t-próba az első és a követés vizsgálat eredményeinek összehasonlítására [178].



32. ábra Az ACCMetrics szoftver által szegmentált és elemzett felvételek (piros: idegrostok; kék: elágazódások; zöld: elágazódási pontok). (A) Normális idegrost morfológia egy korazonos egészséges személynél; (B) Első vizsgálat során látott idegrost morfológia egy DR-ban nem szenvedő diabéteszes betegnél; (C) A 2 éves követés során látott csökkent idegrost morfológia ugyanazon személynél, ekkor már diabéteszes retinopátia kialakult.

[Forrás: saját készítésű ábra]

4.2.4.3 Ultraszéles látószögű pásztázó lézer oftalmoszkópia

Az ultaszéles látószögű lézer szkennning oftalmoszkóp (P200C AF) szűrés céljára - ARM és AMD - történő alkalmazhatósági vizsgálata érdekében kétlépcsős analízist végeztünk. Első lépésként a makula patológiás elváltozásait osztályoztuk; 121 szem (a képi adatbázis 10,56%-a) fotódokumentációját elemeztük, melyeket egy képolvasó (Csutak Adrienne) analizált minden esetben, mind a hagyományos digitális képeken, mind a P200C AF képalkotó által készített képeken. A hagyományos digitális technikával készült képek közül kilenc kép nem volt alkalmas minőségileg az analízisre, míg az ultraszéles látószögű képek vonatkozásában ilyen probléma nem merült fel.

A két képalkotó eljárás összehasonlítására a maradék 112 szem fundus fotódokumentációit használtuk. Végállapotú AMD esetében (19 szem) a két eljárás összehasonlításakor 96,43%-os egyezést ($k=0,93$) találtunk; a két képalkotó közti egyetlen eltérést, egy az ultraszéles látószögű képen CNV-ként, míg a hagyományos digitális képen drusenoid pigment epitél leválásként (PED) osztályozott szemfenéki kép eredményezte. Drusen kategóriában; a hagyományos digitális képek alapján 77 szemet, még a P200C AF képek osztályozása alapján 74 szemet soroltunk. A két képalkotó eljárás közti különbségért ebben a csoportban három szem volt a felelős, melyeket a P200C AF képalkotó alapján normálként osztályoztunk, 96,11% egyezéssel ($k=0,00$). Normál fundusképek összehasonlításakor nem találtunk eltérést a két modalitás elemzése között (16 szem).

Második lépésként két független képolvasó (Pető Tünde és Csutak Adrienne) végzett részletes képelemzést az alábbi elváltozások vonatkozásaiban (5-5 fundusfotó): kemény drusen, GA, CNV, valamint puha drusen (6 fundusfotó). Az osztályozás alapjául a Nemzetközi Klasszifikáció szolgált. Az **19–21. táblázatokban** ismertetjük a képolvasó által alkalmazott osztályozási kategóriákat, a pontos egyezéseket az alkalmazott két vizsgálóeljárás között, illetve a k -statisztikák eredményeit [183]. Tekintettel arra, hogy klinikailag releváns eltérés nem volt kimutatható a két képolvasó vizsgálati eredményei között, az általunk végzett részletes osztályozásokat egységesként kezeltük és a két képalkotó eljárást hasonlítottuk össze. Minden egyes vizsgált kategóriában jelentős volt az egyezés, a két képalkotó eljárás között, kivéve a kemény ($<63\ \mu\text{m}$), a közepes méretű lágy ($63\text{--}125\ \mu\text{m}$) drusenek, illetve a drusen által lefedett területek esetében. Ezen kategóriákban az egyezés enyhe - alacsony besorolású volt (**19. táblázat**).

	<i>Zóna 1</i>	<i>Zóna 2</i>	<i>Zóna 3</i>
Drusen < 63 µm (kemény drusen)	62% κ=0,26 p=0,0027	60% κ=0,37 p=0,0003	38% κ=0,15 p=0,035
Drusen 63-125 µm (lágy drusen)	79% κ=0,54 p<0,0001	83% κ=0,75 p<0,0001	74% κ=0,62 p<0,0001
Drusen 125-250 µm (félkemény drusen különálló, szubkonfluens, konfluens)	95%, 95%, 95% κ=0,0, κ=0,0, κ=0,0 NLK, NLK, NLK	83%, 93%, 98% κ=0,29, κ=0,36, κ=0,84 p=0,015, p=0,0079, p<0,0001	91%, 95%, 100% κ=0,69, κ=0,81, κ=1,0 p<0,0001, p<0,0001, p<0,0001
Drusen 250-500 µm (félkemény drusen különálló, szubkonfluens, konfluens)	95%, 95%, 95% κ=0,0, κ=0,0, κ=0,0 NLK, NLK, NLK	100%, 100%, 95% NLK, NLK, κ=0,00 NLK, NLK, p<0,0001	100%, 98%, 98% κ=1,0, κ=0,00, κ=0,00 p<0,0001, p=0,5, p=0,5
Drusen > 500 µm (nagy, félkemény drusen különálló, szubkonfluens, konfluens)	95%, 95%, 93% κ=0,0, κ=0,0, κ=-0,02 NLK, NLK, p=0,59	100%, 95%, 95% NLK, κ=-0,02, κ=0,48 NLK, p=0,56, p<0,0001	100%, 98%, 98% NLK, κ<0,01, κ=0,66 NLK, p=0,5, p<0,0001
Krisztallin drusen	95% κ=0,65 p<0,0001	90% κ= -0,04 p=0,61	98% κ=0,88 p<0,0001
Szerogranularális drusen	95% κ=0,49 p<0,0001	N/A	N/A
Drusennel fedett terület	67% κ=0,43 p<0,0001		
Predomináns fenotípus	95% κ=0,94 p<0,0001		
Képminőség	59% κ=0,30 p=0,0018		

19. táblázat Az ultrazéles látószögű (200°) kamera fundusfotóinak összehasonlítása a hagyományos funduskamerák 45° -os látószögű képeivel. Magyarázat: NLK, nem lehetséges kiszámítani [183].

A képolvasók megbízhatósága mindkét képalkotó eljárás vonatkozásában erőteljes szignifikanciát mutatott, kivéve a kemény drusen (<63 µm) és a közepes méretű lágy drusen (63-125 µm) eseteit (**20. táblázat**). A képolvasó önmagához viszonyított megbízhatóságát úgy határoztuk meg, hogy az általa már vizsgált és osztályozott képeket újrakezeltük a vizsgálati alkalmak között legalább 14 nap különbséggel. A képolvasó önmagához viszonyított

megbízhatósága minden vizsgált kategóriában magas volt, kivéve a drusenek egyes eseteit (**21. táblázat**). Ezt az eltérést következetesen egy fundusfotó eredményezte, melyet az első osztályozás alkalmával maga a képolvasó sem tartott megfelelő minőségűnek a képelemzésre.

	<i>Zóna 1</i>	<i>Zóna 2</i>	<i>Zóna 3</i>
Drusen <63 µm (kemény drusen)	67% κ=0,36 p<0,0001	64% κ=0,45 p<0,0001	62% κ=0,46 p<0,0001
Drusen 63-125 µm (közepes méretű lágy drusen)	83% κ=0,64 p<0,0001	74% κ=0,60 p<0,0001	74% κ=0,62 p<0,0001
Drusen 125-250 µm (félkemény drusen különálló, szubkonfluens, konfluens)	100%, 100%, 100% κ=1,0, κ=1,0, κ=1,0 p<0,0001, p<0,0001, p<0,0001	79%, 93%, 98% κ=0,08, κ=0,36, κ=0,84 p=0,257, p=0,0079, p<0,0001	71%, 91%, 95% κ=0,18, κ=0,61, κ=0,00 p=0,02, p<0,0001, NLK
Drusen 250-500 µm (félkemény drusen különálló, szubkonfluens, konfluens)	100%, 100%, 100% κ=1,0, κ=1,0, κ=1,0 p<0,0001, p<0,0001, p<0,0001	100%, 100%, 95% NLK, NLK, κ=0,00 NLK, NLK, NLK	95%, 98%, 98% κ=0,0, κ=0,00, κ=0,00 NLK, p=0,5, p=0,5
Drusen > 500 µm (félkemény drusen különálló, szubkonfluens, konfluens)	100%, 100%, 97% κ=1, κ=1, κ=0,66 p<0,0001, p<0,0001, p<0,0001	100%, 95%, 91% NLK, κ= -0,024, κ= - 0,018 NLK, p=0,56, p=0,61	100%, 98%, 93% NLK, κ=0,000, κ=0,00 NLK, p=0,5, NLK
Krisztallin drusen	100% κ=1,0 p<0,0001	95% κ=0,48 p<0,0001	98% κ=0,87 p<0,0001
Szerogranuláris drusen	95% κ=0,49 p<0,0001	N/A	N/A
Drusennel fedett terület	79% κ=0,63 p<0,0001		
Predomináns fenotípus	95% κ=0,94 p<0,0001		
Képminőség	55% κ=0,23 p=0,0103		

20. táblázat A képelemzők egymáshoz viszonyított variabilitása, a tanulmányozott két képalkotó eljárással készített fundusfotókon: az ultraszéles látsszögű (200°) retinális képek és a hagyományos funduskamerák 45°-os képeinek vizsgálatakor.

Magyarázat: NLH, nem lehetséges kiszámítani [183].

	<i>Zóna 1</i>	<i>Zóna 2</i>	<i>Zóna 3</i>
Drusen <63 µm (kemény drusen)	76% $\kappa=0,59$ $p<0,0001$	81% $\kappa=0,71$ $p<0,0001$	76% $\kappa=0,67$ $p<0,0001$
Drusen 63-125 µm (közepes méretű lágy drusen)	95% $\kappa=0,90$ $p<0,0001$	81% $\kappa=0,73$ $p<0,0001$	86% $\kappa=0,79$ $p<0,0001$
Drusen 125-250 µm (félkemény drusen különálló, szubkonfluens, konfluens)	100%, 100%, 100% $\kappa=1,0$, $\kappa=1,0$, $\kappa=1,0$ $p<0,0001$, $p<0,0001$, $p<0,0001$	95%, 90%, 88% $\kappa=-0,01$, $\kappa=-0,02$, $\kappa=-0,02$, $p=0,5628$, $p=0,6105$, $p=0,6287$	93%, 79%, 83% $\kappa=-0,02$, $\kappa=-0,02$, $\kappa=-0,02$, $p=0,5895$, $p=0,6883$, $p=0,6603$
Drusen 250-500 µm (félkemény drusen különálló, szubkonfluens, konfluens)	100%, 98%, 100% $\kappa=1,0$, $\kappa=0,66$, $\kappa=1,0$ $p<0,0001$, $p<0,0001$, $p<0,0001$	95%, 95%, 98% $\kappa=-0,01$, $\kappa=-0,00$, $\kappa=-0,00$, $p=0,5628$, $p=NLK$, $p=0,5$	95%, 95%, 98% $\kappa=-0,0120$, $\kappa=0,00$, $\kappa=0,00$ $p=0,5628$, $p=NLK$, $p=0,5$
Drusen > 500 µm (félkemény drusen különálló, szubkonfluens, konfluens)	100%, 100%, 98% $\kappa=1,0$, $\kappa=1,0$, $\kappa=0,66$ $p<0,0001$, $p<0,0001$, $p<0,0001$	TKOK, 98%, 98%, 91% NLK, $\kappa=0,00$, $\kappa=0,49$, NLK, $p=0,5$, $p<0,0001$,	TKOK, TKOK, TKOK, $\kappa=NLK$, $\kappa=NLK$, $\kappa=NLK$, $p=NLK$, $p=NLK$, $p=NLK$
Drusennel fedett terület	95% $\kappa=0,92$ $p<0,0001$		
Predomináns fenotípus	100% $\kappa=1,0$ $p<0,0001$		
Képminőség	52% $\kappa=0,3$ $p=0,0005$		

21. táblázat A képelemző önmagához viszonyított variabilitása a tanulmányozott két képalkotó eljárással készített fundusfotókon: az ultraszéles látómezőű (200°) retinális képek és a hagyományos funduskamerák 45°-os képeinek vizsgálatakor. Magyarázat: NLK: nem lehetséges kiszámítani, TKOK: túl kevés osztályozási kategória [183].

5 MEGBESZÉLÉS

A szem törőerejének veleszületett, vagy szerzett hibája igen gyakori, az európai 25 és 90 év közötti lakosság körében. Megoszlását tekintve több mint 30%-a rövidlátó, kb. 25%-a távollátó és kb. 24%-a szenved asztigmatikus fénytörési hibában. A miópia különösen a fiatal felnőttek körében gyakori, becslések szerint Európában 227,2 millió ember rövidlátó [75], [211]. A fénytörési hibák korrekciójára legyen az szemüvegrendelés, kontaktlencse illesztés vagy valamilyen típusú műtéti beavatkozás rendkívül nagy az igény. Tekintettel arra, hogy a műtétek szinte "egészséges", mindössze refraktív fénytörési hibával rendelkező szemeken történnek, felmerülő komplikáció kevésbé elfogadható, mint beteg szemek kezelése esetén. A szaruhártya refraktív lézerrel történő látásjavító műtéteinek térhódító emelkedése a 2001-es év körül elérte csúcsát [212], az elvégzett beavatkozások aránya LASIK vs. PRK vonatkozásában országonként is eltérő lehet. A fejlett országokban domináns kezelés a LASIK, mely napjainkra arányában csökkenő tendenciát mutat, míg a PRK kezelések számának visszaesése nem ennyire szembeötlő [212]. Kétségtől, a piacon megjelenő egyéb technikai vívmányok (pl. Ortho-K lencse, speciális intraoculáris lencsék) a LASIK kezelések térhódítását visszaszorították. A PRK kezelés, eredményeit tekintve ugyanolyan biztonságosnak és hatásosnak tekinthető, mint a LASIK és bizonyos esetekben előtérbe is részesítendő választás (pl. egyes foglalkozások, profi sport, olyan életmód, ahol a leány elmozdulás kockázata magas).

5.1 Könnyenzimek tanulmányozása a szaruhártya sebgyógyulási folyamataiban

Refraktív lézersebészeti tanulmányainkat excimer lézer alkalmazásával végeztük a szaruhártya fénytörési hibájának korrekciója és/vagy modellezése (állatkísérletek) céljából annak érdekében, hogy a kezelést követő sebgyógyulási folyamatokat pontosabban megismerjük, enzimatisz szinten tanulmányozzuk és esetlegesen befolyásoljuk.

A szaruhártya sebgyógyulási folyamatainak komplexitása a lézerkezelést követően mind a mai napig nem ismertek pontosan, esetenként előre nem várt biológiai válaszreakciók alakulhatnak ki. A lézerkezelés eredményeként az elülső stróma extracelluláris mátrixának szerkezete, valamint a sejtek sűrűsége és fenotípusa is megváltozik, amelynek következtében csökken a szövetsi transzparencia és haze alakulhat ki. Az operált páciensek jeletős százaléka teljesen panaszmentes, az esetenként csökkent transzparencia nem éri el a klinikailag szignifikáns szintet, azonban - elsősorban jelentősebb refraktív fénytörési hibák korrekciója során - akár számottevővé is válhat és a fény kóros szóródását, a szaruhártya transzparenciájának a csökkenését eredményezheti [213].

A haze kialakulása általában az első posztoperatív hónapokban figyelhető meg.

Fennállásának időtartalma néhány héttől néhány hónapig is eltarthat, de kivételes esetekben több mint egy évig is elhúzódhat. Előfordulási gyakorisága az irodalomban igen széles skálán mozog [214], saját anyagunkban - 2000 előtt végzett műtétek alapján - a PRK kezeléseket követően 7-8%-os előfordulását tapasztaltuk [60], azonban ez az előfordulási gyakoriság tovább csökken(t) a kezeléseknél alkalmazott lézerek és az alkalmazott kezelések fejlődésével.

A refraktív lézerkezeléseket esetenként követő, komplikált sebgyógyulási folyamatok mögött húzódó pontos mechanizmusok napjainkban sem ismertek még teljesen [215], [216]. Feltételezhető, hogy az egyének közötti varianciák kiemelt jelentőséggel bírnak a szaruhártya sebgyógyulási folyamataiban és azok komplikációinak kialakulásában. Ilyen varianciák figyelhetők meg például a könny biokémiai összetevőiben, melyek szerepet játszanak a korai és késői sebgyógyulási folyamatokban a refraktív lézerkezelést követően. Számos faktort feltételez az irodalom a haze kialakulásának hátterében: a reepitelizációhoz szükséges időtartamot, az abláció mélységét, a posztoperatív strómális felszín egyenetlenségét, az epiteliális bazális membrán és/vagy a Bowman membrán eltávolítását [88], [92], [217]–[221]. Egyértelmű bizonyíték egyelőre azonban a fenti teóriák egyikét sem támasztja alá.

A lézerkezelést esetenként követő haze megelőzésére nincs elfogadott kezelési protokoll, habár a mitomycin C helyi alkalmazása széles körben alkalmazott a haze visszaszorítására [222].

A szaruhártya sebgyógyulási folyamatait a szem elülső szegmensében lévő könnyfilmréteg számos fehérjéjének differenciális megjelenése, illetve mennyiségi változása jellemzi. Sérülése következtében a felszabaduló uPA szerin proteázként a könny, valamint a szaruhártya epitelsejtjeinek normál alkotója és a biokémiai kaszkádok fontos eleme. Szerepet játszik mind a szövetek pusztulásában, mind azok helyreállításában. Az uPA felelős az inaktív plazminogén aktív plazminná történő átalakításáért a proteolitikus hasításon keresztül. A széles szubsztrát specificitású plazmin egyéb anyagokkal együtt gyengíti a fibronektint és laminint az extracelluláris mátrixban elősegítve a sejtek kúszását/migrálását, és ezáltal fontos szerepet tölt be a sebgyógyulásban. Mindemellet a plazmin a prokollagenázt aktiválja, mely a kollagén molekula lebomlását eredményezi, valamint részt vesz a fibroblaszt sejtek aktiválásában, ezáltal további uPA szekrécióhoz is hozzájárul.

Korábbi tanulmányainkból ismert a könny uPA aktivitás értékeinek változása a PRK kezelést követő reepitelizációs folyamatokban [60]. A könny uPA szintjeit pácienseink könnymintáiban vizsgálva kimutattuk, hogy PRK kezelést követően, a korai posztoperatív időszakban elmaradó uPA aktivitásemelkedés a késői posztoperatív időszakban haze képződéséhez vezethet[60]. Klinikai szempontból a műtéti kimenetel tervezhetősége és elvart

eredményeinek precízebb megítélése érdekében fontosnak tartottuk a haze kialakulásának előrejelzését, továbbá lokálisan alkalmazható biztonságos készítmények kifejlesztését a haze kialakulásának megakadályozására, illetve kezelésére.

5.1.1 Állatmodell alkalmazása a haze mechanizmusának megismerésére, indukálására és gátlására; a vemhesség, mint rizikófaktor

A humán könny összetételének uPA-ra vonatkoztatott ismeretében tanulmányoztuk az enzimszintek jelentőségét és befolyásolhatóságát, melynek érdekében a tanulmányunkba bevont állatok mindkét szemét PRK kezelésnek vetettük alá. A posztoperatív kezelés a humán protokollnak megfelelően zajlott azzal a módosítással, hogy az egyik szemet - a könny uPA szintjének a visszaszorítása céljából -, kiegészítő aprotinin (szerin proteáz inhibitor) kezelésben is részesítettük a PRK kezelést követő első 7 napban [193]. A humán protokollnak megfelelően kezelt szemek esetében haze nem alakult ki (100%), és az első héten mért uPA aktivitási minta az egészséges humán szemhez hasonló mintázatot mutatta. Az ellenoldali, szerin proteináz inhibitorral kezelt állatszem esetében, ahol az alkalmazott aprotinin gátolta az uPA aktivitást haze kialakulását (100%) észleltük a posztoperatív 2.-3. hónapban.

Állatkísérletünk során véletlenül fedeztük fel vemhes nyúl könnymintájában, azt hogy az uPA aktivitás mintázata a PRK kezelést követően, a korábbi kísérletünkben alkalmazott szerin proteáz inhibitor mintázatnak felelt meg, mely a késői posztoperatív időszakban haze kialakulásához vezetett [187]. Állatkísérletek vizsgálati eredményei alapján a könnyben mért uPA aktivitás értékei $2,0 \pm 0,6$ IU/ml [223] és $4,0 \pm 2,5$ IU/ml [40] között detektálhatóak, nem operált egészséges állatokban [187]. Az általunk mért uPA aktivitás értékei az állatok könnymintáiban a publikált adatoknak felelnek meg (kb. 3 IU/ml).

Véletlenszerű megfigyelésünk tudományos alátámasztásaként vemhes és nem vemhes nyulat vizsgáltunk. Azt a feltételezést kívántuk bizonyítani, hogy a vemhesség során a nyulak könnymintáiban csökken az uPA aktivitás szintje, ezáltal nő a posztoperatív haze kialakulásának valószínűsége. Az alkalmazott lokális uPA pótlása (szemcsepp formájában) az első posztoperatív napokban meggátolhatja, ill. csökkentheti a haze kialakulásának a valószínűségét. A kísérlet során az állatok mindkét szemén PRK kezelést végeztünk.

Az uPA szemcsepp alkalmazása megakadályozta a haze kialakulását a PRK kezelésen átesett állatszemen (100%), ezzel szemben az ellenoldali, uPA-val nem kezelt szemek esetében 12,5%-nál alakult ki szubepiteliális homály. Állatkísérletünk eredményei alátámasztják, hogy a vemhesség kockázati tényezőként szerepel a posztoperatív haze kialakulásában, vemhes nyulaink esetében 49-es esélyhányadossal emelkedett a kockázat nem

vemhes társaikhoz viszonyítva. A humán protokoll mellett alkalmazott uPA kezelés (szemcsepp formában) profilaktikusan hatékony terápiának bizonyult állatmodellünkben a késői posztoperatív időszakban esetlegesen kialakuló haze megelőzésére.

Humán pácienseink és állatmodelljeink könnymintáit tanulmányozva a 2-3. posztoperatív napon mért uPA aktivitás értékei, valamint a későbbiekben esetlegesen kialakuló haze szoros korrelációt mutatott. A korai posztoperatív időszakban a könnyben mért alacsony uPA aktivitási értékek összefüggtek a haze későbbi kialakulásával. Az uPA aktivitás 3. posztoperatív napon bekövetkezett szignifikáns emelkedése összefüggésbe hozható a késői posztoperatív időszak transzparens, tiszta szaruhártyájával.

Állatokon végzett kísérleteink egyrészt bizonyították, hogy szerin proteináz inhibitor alkalmazásával haze indukálható; másrészt, hogy a szubepiteliális homály kialakulása tekintetében fokozott kockázattal rendelkező vemhes nyulak esetében az alkalmazott uPA kezelés a poszt-PRK szubepiteliális homály előfordulását jelentős mértékben csökkenti.

Kísérleteink eredményei alapján valószínűsíthető, hogy az uPA fiziológiás szintjének megemelkedése a könnyben, segít a posztoperatív időszak sebgyógyulási folyamatában fenntartani a szaruhártya transzparenciáját és az uPA lokális szemcsepp formában történő alkalmazása kompenzálja a teljes kiürülést ezen időszak alatt. A fentiekből arra következtethetünk, hogy az uPA lokális alkalmazása a korai posztoperatív időszakban segíthet a késői posztoperatív időszakban esetenként kialakuló haze mérséklésében és/vagy megakadályozásában. Publikált eredmények bizonyítják, hogy a megfelelő dózisban alkalmazott uPA kezelés nem gyakorol káros hatást a szaruhártyára. Hull és mtsai elektronmikroszkópiás vizsgálatokkal bizonyították, hogy az uPA kezelés 1000-5000 IU/ml dózisban alkalmazva semmilyen káros hatását nem fejt ki a szaruhártya endotél sejtjeire [224]. Tekintettel arra, hogy a haze kialakulására semmilyen előzetes információ nem áll rendelkezésünkre, ezért a páciensek profilaktikus alapon történő kezelése (is) javasolt lehet.

Tanulmányunkban szemcsepp formájában alkalmaztuk az uPA-t 50 IU/ml koncentrációban: az első posztoperatív napon óránkénti cseppentést alkalmazva, melyet 2 óránkénti alkalmazásra váltottunk és az 5. posztoperatív napig tartottuk fent. Az alkalmazott dózist úgy választottuk meg, hogy az állatok könnyében mért normál érték felett, de a publikált biztonságos értékek között maradjunk. *In vitro* kísérletek alapján az uPA 2500 IU/ml dózisban történő alkalmazása a corneát nem károsítja [87]. További állatkísérletek támasztják alá, hogy az uPA 1000 IU/ml, 2500 IU/ml és 5000 IU/ml koncentrációban történő *in vitro* perfúziójának három órán keresztül történő alkalmazása sincsen hatással az endotéliumra, corneális ödéma nem keletkezik, elektronmikroszkóppal pedig normál endoteliális sejtszerkezet látható [224].

Az állatkísérletek adatainak humán értékekkel történő extrapolációja ahhoz a következtetéshez vezetett [224], hogy az uPA 2500 IU/ml koncentrációban biztonságosan alkalmazható a szem elülső csarnokában levő vérzés öblítésére anélkül, hogy az szaruhártya károsodást okozna közvetlenül. Állatkísérleti eredményekre alapozva az uPA általunk választott 50 IU/ml koncentrációban történő alkalmazása terápiás vagy profilaktikus cézzal elfogadhatónak és alátámasztottnak tűnik [187], [224].

Felszíni és határfelületi egyenetlenségeket PRK és LASIK kezelések után is ismert a szakirodalom [225]. Farah és mtsai, a LASIK kezelést követő határfelületi törmelékek és felületi egyenetlenségek kialakulását 6,8%-os, még a haze kialakulását 8,7%-os előfordulási gyakoriságúnak találták a szakirodalmi adatok áttekintése alapján [226]. A PRK és LASIK kezelések összehasonlításának vonatkozásában a haze előfordulása PRK kezeléseket követően gyakrabban fordul elő [214].

A haze kezelésére különféle hatóanyagokat alkalmaztak kísérleti és terápiás cézzal is: szteroidok, nem-szteroid tartalmú gyulladáscsökkentők, növekedési faktorok, a bazális sejtmembrán összetevői, kollagén struktúra regulátorai, aldóz reduktáz inhibitorok, antioxidánsok, immunmodulátorok, antiallergének és antimikrobiális szerek. Állatkísérleti tapasztalatok szerint a metalloproteináz szintetikus inhibitora nyúl corneákban csökkenti a szubepiteliális homály kialakulását, a III-as típusú kollagén szintézisének gátlásán keresztül [227]. A betametazon (kortikoszteroid) helyi alkalmazása csökkenti a haze súlyosságát nyúl szaruhártyákban, de nem eliminálja azt [228]. A mitomicin C - mint antineoplasztikus és antibiotikus aktivitású alkiláló szer - a keratociták proliferációjának gátlása révén csökkenti a szubepiteliális homály kialakulását a PRK kezelés után [229]–[231]. A transzformáló növekedési faktor (TGF β) megemelkedett szintje összefüggésben áll a patkányokban megfigyelt szubepiteliális homály kialakulásával [232]. Kimutatták továbbá, hogy az E vitamin tartalmú hidrokortizon acetát csökkenti a sebgyógyulási válaszreakciókat nyúl szaruhártyában a PRK kezelést követően [233].

Jelenlegi ismereteink szerint a poszt-PRK haze kialakulása szempontjából a vemhesség fokozott kockázati tényező az uPA-val nem kezelt nyúl szaruhártyák esetében. Állatkísérleteink alapján a vemhes nyúl hasznos modell lehet a haze kezelésére alkalmas hatóanyagok, valamint a kezelés hatékonyságának vizsgálatára a PRK kezelést követően. A vemhes állatok PRK kezelése során a haze alacsony ablációs mélység alkalmazása esetében is kialakul (vemhes nyúl kísérletünkben 3 D miópiás korrekciónak megfelelően).

Tanulmányunkban az uPA-val nem kezelt szemek 38%-ában alakult ki haze; míg az uPA-val kezelt csoport esetén a szubepiteliális homály hiánya a szaruhártyában azt

bizonyíthatja, hogy az uPA hatásos a haze előfordulásának eliminálására/redukálására PRK kezelést követően. Korábbi munkáink eredményei alapján, a PRK kezelést követő korai posztoperatív időszakban kialakuló alacsony uPA-szint összefüggésbe hozható a késői posztoperatív időszakban kialakuló haze képződésével mind humán [60], mind nyúl corneákban [193]. Jelen vizsgálataink megfigyelései szerint az állatok (vemhes nyúl) PRK kezelését követően, lokálisan alkalmazott uPA pótlása a posztoperatív első hét folyamán hajlamosító tényezők esetén is alkalmas lehet a szaruhártya szubepiteliális homályképződésének a megakadályozására.

5.1.2 Az aprotinin hatásmechanizmusának tanulmányozása állatmodellben, urokinázt gátló hatása a nyúl szaruhártya sejtjeire refraktív lézerkezelést követően

A nyúl általánosan elfogadott állatmodell a szaruhártya sebgyógyulási folyamatainak a tanulmányozására. Humán és nyúl könnymintákon végzett proteomikai tanulmányok is igazolták a szaruhártya sebzése következményeként a védekezési mechanizmusok jelenlétét [234]. A nyulak könnymintáiban mért - a humán könnyminták uPA szintjével összehasonlítva - magasabb normál uPA szint ellenére [40] a nyúl szem elülső szegmense elfogadott modell a proteolitikus események tanulmányozására a szaruhártya sebgyógyulási folyamatában [58]. Kísérleteink láncolatában, a nyúl modell igen hasznos volt humán eredményeink igazolásában és a sebgyógyulás folyamán bekövetkező uPA aktivitás változásainak, valamint a szaruhártya sebgyógyulási folyamataival kapcsolatos korrelációk tanulmányozásában [187]. Tudomásunk szerint jelenleg nem áll rendelkezésre közvetlen összehasonlító érték az mRNS expresszió szintjének vonatkozásában sem humán, sem nyúl szaruhártyákban.

A korábbiakban ismertetett eredményeinkkel összhangban a kvantitatív PCR vizsgálatainkkal szerzett ismereteink a PRK kezelés által előidézett uPA növekedést (up-regulációt) írtak le a nyúl szaruhártya sejtjeiben. *In situ* zimográfiás tanulmányaink alátámasztották az uPA kifejeződését az epiteliális defektusoknál az irodalomban korábban már leírtaknak megfelelően [56], [58], [188], [235]. Kvantitatív PCR segítségével bizonyítottuk, hogy a PRK kezelést követő sebgyógyulás során az aprotinin csökkenti az uPA expressziót transzkripció szinten (is). Szaruhártya metszeteken *in situ* zimográfiával a sebgyógyulás korai szakaszában kimutattuk a csökkent uPA aktivitást. Érdekes, hogy a természetes plazminogén aktivátor inhibitor-2 (PAI-2) mennyiségének növekedését figyeltük meg a humán könnyben közvetlenül a PRK és a LASIK kezelések után, de a PAI-2 szintek visszatértek a normális preoperatív szintekre a műtétet követő első posztoperatív napon [190].

A teljes lízis zónák képelemzése (**14. ábra**) az uPA mRNS aktivitással (**15. ábra**) hasonló mintázatot mutat, az idő előrehaladtával pedig az uPA szint csökkenése figyelhető meg

PRK kezelést követően. Ugyanakkor, az uPA mRNS relatív mennyisége a kontroll minták esetében jelentősen csökken 24 óra elteltével, míg az uPA aktivitás mértéke ekkor még jelentős. Azt feltételezzük, hogy ez a körülbelül egy napos időeltolódás és az aktivitás a már meglévő, aktív és még nem degradálódott uPA az mRNS szintjének köszönhető.

A 7 mm-es trepánnal kezelt szemek esetében az uPA mRNS szintje a műtét utáni 24. óráig növekszik (**12. ábra**), ugyanakkor csökkenő trendet mutat a 6 mm-es trepánnal kezelt szemeknél (**13. ábra**). Nem egyértelmű a magyarázat erre a különbségre. Amennyiben a kezelés során 7 mm-es trepánt alkalmazunk, az újrarahamosodás hosszabb idejű megfigyelése szükséges, tekintettel a reepitelizáció hosszabb volta. Tanulmányunkban, a két különböző átmérőjű trepán alkalmazását összevetve (6 mm/7 mm) az eltávolított epitel területének a vonatkozásában 36% volt a különbség.

Kimutatható, hogy a Bikunin amely egy Kunitz-típusú proteáz inhibitor csökkenti az uPA aktivitást humán kondroszarkóma sejtekben [236]. Az uPA a saját expresszióját gerjeszti egér tüdő epiteliális sejtekben [237], így az uPA aktivitás aprotininnel történő gátlása (közvetlen vagy közvetett módon az aktiváció blokkolásával) okozhat uPA szint csökkenést. Az aprotinin uPA-t csökkentő hatása még 2 órával az első aprotinin adag beadása után is nyilvánvaló, messze meghaladva a lejegyzett 50-60 perces átlag aprotinin tartózkodási idejét a nyúl szaruhártyában [238].

Korábbi munkánkban [193] a könnyű uPA aktivitás mérései bizonyítékul szolgáltak az uPA aprotinin által történő gátlásához. Ez lehetett egyrészt az aprotinin uPA molekulákkal történő gátló interakciók eredménye, másrészt az uPA mRNS szint indirekt modulációja a transzkripció gátlás miatt, vagy az uPA mRNS stabilitásának megváltoztatása miatt. A kvantitatív PCR eredmények kimutatták, hogy az aprotinin csökkenti a szaruhártyában az uPA mRNS szintet, és ezáltal csökkenhetett az uPA aktivitás a könnyben és a vizsgált szaruhártya metszeteken. Ezt a hatást inkább gén szupresszió eredményének tulajdonítjuk, mint közvetlen uPA gátlásnak. A kisebb uPA termelés további következménye az uPA-plazminogén-plazmin enzim rendszer termelésének csökkenése. Az aprotinin alkalmazására számos irodalmi adat létezik, gyakran alkalmazzák szeptikus sokk kezelésére. Koszorúér műtétek során is leírták használatát, csak úgy, mint rákkezelésben a különböző proteázok, mint például uPA és plazmin gátlására [239]. Ugyanakkor, csak a proteáz aktivitáson tapasztalható normál hatást szokták figyelembe venni. Megállapításaink, miszerint az aprotinin csökkenti az uPA kifejeződését (down reguláció) mRNS szinten nagyobb rálátást engednek az aprotinin uPA-plazminogén-plazminrendszer működésére, és ezzel hozzájárulnak a sebgyógyulási folyamatok jobb megértéséhez.

5.1.3 Plazminogén aktivátor inhibitorok a humán könnyben lézerkezeléseket követően, jelentőségük a haze kialakulásában

Régi feltételezés, hogy a proteolitikus enzimek generalizáltan vesznek részt a sebgyógyulási folyamatokban, beleértve a szaruhártya reepitelizációját is. Weimar szerint a sérült szaruhártya hámszöveve szerin proteázokat szabadít fel [240]. Az uPA-plazminogén-plazminrendszer kulcsszabályozónak tűnik a sebgyógyulási folyamatokban. A sejt felépülés és invázió során generalizáltan is jelentős szerepet játszik [56], [241]. A posztoperatív corneális sebgyógyulási komplikációk alapjául szolgáló pontos mechanizmusok ismeretlenek, ugyanakkor általánosan valószínűsíthető, hogy a szaruhártya sebgyógyulási folyamatainak egyéni variációi szerepet játszhatnak a posztoperatív refraktív regresszió és a haze kialakulásában [242].

A klasszikus modell alapú elképzelés azt feltételezi, hogy az uPA fő szerepe az inaktív plazminogén aktív plazminná történő átalakítása a migráló sejtek felszínén. Ismereteink szerint a plazmin több sejtfelszíni adhézis fehérjét és néhány bazális membrán fehérjét degradál. Emellett aktiválja a mátrix metalloproteázokat, amelyek a plazminnal együtt bontják a környező mátrix barriert, és ezáltal hozzájárulhatnak a sejtek vándorlásához. A plazminogén aktivátor inhibitorok feltételezhetően az uPA-plazminogén-plazminrendszer kontroll mechanizmusában játszanak szerepet [243].

Humán tanulmányaink eredményei a PAI-1 antigén hiányát mutatták a könnyben PRK kezelés előtt és után. A PAI-2 antigén azonban mérhető koncentrációban volt jelen mindkét típusú - PRK és LASIK - refraktív lézersebészeti beavatkozás előtt és után. A LASIK kezelésen átesett csoportban a PAI-2 szintje a műtétet követően szignifikánsan megemelkedett, majd a preoperatív értékre esett vissza az első posztoperatív napon (**15. ábra**). PRK kezelésen átesett pácienseink esetében az első posztoperatív nap PAI-2 értékének vonatkozásában nincs információnk, azonban a harmadik posztoperatív napra a preoperatív szintnek felelt meg. A PRK és LASIK kezelések pre- és posztoperatív PAI-2 mintázatai egymásnak megfeleltethetők (**15. ábra**) [190].

Feltételezéseink szerint a PRK és LASIK kezeléseket követő PAI-2 mintázatok között fellelhető általános hasonlóság az enzimatisz kontroll egységes mivoltát jelzi annak ellenére, hogy a sebkészítési technikák jelentős mértékben eltérnek a két refraktív műtéti típus között. A PRK és LASIK típusú műtéti technikák egyik fő különbsége az epiteliális seb mértéke és lokalizációja. PRK kezelés során az epitélium centrális területe kerül eltávolításra (deepitelizáció), ezzel szemben LASIK kezelés során egy körkörös vágást ejtenek rajta. Másik fő különbség, hogy a PRK kezelés során nincsen strómális vágás, szemben a LASIK

strómaágyat érintő lebenyképzési technikájával. A szaruhártya "felesleg" lézeres evaporációja során mindkét műtéti technika esetében strómális abláció jön létre. PRK kezelés során az elülső stróma ablációja történik, míg LASIK esetében a 160 vagy 180 µm vastagságú lebeny alatti terület stróma [244] .

A **15. ábrán** szemléltetett humán könny PAI-2 mintázata komplementere a korábbi humán PRK tanulmányunk uPA aktivitási mintázatának [60], [193]. Tanulmányaink alapján [60], [193] normál sebgyógyulás esetén a könny PAI-2 szintje és uPA aktivitása fordított arányban állnak egymással, azaz amikor a könny PAI-2 szintje alacsony, akkor az uPA aktivitása magas és fordítva. A 3. posztoperatív napra fennmaradó alacsony könny uPA aktivitás esetén a késői posztoperatív időszakban haze kialakulására lehet számítani [60]. A PRK kezelést követően esetenként kialakuló alacsony uPA aktivitás és a posztoperatív szubepiteliális homály kialakulása közötti kapcsolat a csökkent uPA kifejeződésnek, a magasabb PAI-2 koncentrációnak, vagy esetlegesen mindkettőnek egyszerre köszönhető. Tanulmányunkban a PRK kezelésen átesett csoportban a 3. és 5. posztoperatív napokon, a LASIK kezelésen átesett csoportban pedig az 1. posztoperatív napon megnövekedett könny PAI-2 koncentrációk (>2 SD az átlag felett) voltak megfigyelhetők, azonban egyik esetben sem alakult ki szubepiteliális homály a késői posztoperatív időszakban. PRK kezelésen átesett szemek esetében, - ahol a későbbi posztoperatív időszakban haze kialakulását észleltünk - a PAI-2 szintek 1 SD átlagérték alatt voltak mind a 3. és az 5. posztoperatív napokon. Megfigyeléseink szerint a könnyminták posztoperatív PAI-2 szintjei nem kontrolláló mechanizmusok a haze kialakulásában, ezzel szemben az uPA csökkent expressziója kulcsfontosságú. Korábbi könnykutatásaink uPA-ra vonatkozó eredményeit figyelembe véve, arra következtethetünk, hogy az uPA korai posztoperatív napokban történő pótlása - az uPA deficit legyőzésével - kielégítő terápiás eredményhez vezethet [60], [187], [193].

5.1.4 A plazminogén aktivátor és inhibitor, valamint hormonszint vizsgálatok terhesség során

Normál terhesség lefolyása során a hemosztázis jelentős változása figyelhető meg [245]–[248]. Trombózis kialakulása az első trimeszterben nem valószínű, a terhesség előrehaladtával azonban előtérbe kerülnek a koagulációs, és fibrinolitikus folyamatok. Ezeknek a változásoknak a kontrollált egyensúlyi változása szükséges a normál terhesség lefolyásához, a hyperkoagulációs állapot kialakulásához, melyben a plazminogén aktivátor inhibitor rendszer kulcsszerepet tölt be. Normál lefolyású terhesség során a koagulációs aktivitás egyensúlyban van a tPA, uPA, PAI-1 és PAI-2 vérszintjeinek jelentős változásai ellenére [249]–[251] .

Normál könnyben a plazminogén aktivátor inhibitor szintek változásai nem mutathatóak ki [48], [252], a PAI-1, PAI-2, és uPA megemelkedett szintjei mérhetőek azonban bizonyos

szembetegségekben [48], [67]. Kóros állapotokban, sebzés során vagy műtétet követően, a kötőhártya véredényeinek permeabilitása fokozódhat, ezáltal proteázok és proteáz inhibitorok proenzim formái transzszudáció útján kerülhetnek a könnybe [253]. A könny-specifikus fehérjék mellett szérumban fehérjék is megjelenhetnek [251], [254]. A könny PAI szintjének megemelkedését okozhatja továbbá a könnyfilmben jelenlévő, vagy a károsodott szemfelszíni epitél sejtekből felszabaduló komplexek. A kötőszöveti epiteliális sejtek és a szervezet hormonális változásai is hatással vannak a szaruhártya állapotára [55], [255], [256].

Várandós nők könnymintáin végzett vizsgálataink azt mutatták, hogy a könny PAI-2 szintje sebzés vagy műtét beavatkozás hiányában a terhesség során nem emelkedik meg. A szemfelszín sérülése azonban beindítja a helyi PAI-2 szintemelkedésért felelős mechanizmusokat, melyek kifejezettebbek lehetnek terhesség alatt.

A várandós nők vérmintáinak plazminogén aktivátor aktivitás értékei szoros korrelációt mutatnak a gesztációs kor előrehaladtával, mely értékek a szülést követően visszatérnek a várandósságot megelőző normál értékekre [186], [257]–[260]. Tanulmányunk, mely a könnymintákra is irányult két fő csoportra hívta fel a figyelmet: „nulla uPA” és „nem nulla uPA” értékek a könnyben. Ezen utóbbi csoport viselkedés mintázata független a terhességi kortól, annak előre haladtától. Mindez feltételezhetően arra utal, hogy az uPA vonatkozásában a könny lokális forrással is rendelkezik. Hasonló következtetésekre jutottunk, amikor a könnyből származó PAI-2 mintázatokat vizsgáltuk [205], és a könnyminták PAI-2-szintjeit függetlennek találtuk a terhességi kortól, míg a vérmintákból származó PAI-2 szoros korrelációt mutatott a gesztációs korrall.

A fentiek ismeretében terhesség kockázati tényezőnek tekinthető a haze kialakulása szempontjából refraktív sebészeti beavatkozást követően, melynek elvégzése ilyenkor nem javasolt [187], [261]. A refraktív sebészeti beavatkozások esetében minimum három hónapot javasolt várni szülés és/vagy szoptatás után, mert a hormonális változások hatást gyakorolhatnak a refrakciós hibákra és a szaruhártya sebgyógyulási folyamatára is. Esetenként azonban a várandós nők szaruhártya műtéten eshetnek át trauma miatt, vagy a terhesség igen korai, még nem azonosított szakaszában [262], [263]. A terhesség során bekövetkező enzimikus változásokról szerzett ismeretanyag segítheti a corneális sebgyógyulási folyamatok pathomechanizmusának pontosabb megismerését [264], [265].

ÖSSZEFOGLALVA: az uPA a könny egyik normál komponense, melynek koncentrációját a szaruhártya biokémiai változásai befolyásolják. Humán tanulmányaink és állatkísérleteink eredményei alapján a refraktív sebészeti műtétet követő korai

posztoperatív szakban mért alacsony uPA aktivitás - természetes előfordulás vagy gátlás útján - korrelációt mutat a késői posztoperatív időszakban észlelt haze kialakulásával. A lokálisan (szemcsepp) alkalmazott uPA alkalmasnak bizonyult a haze megelőzésére állatkísérleteinkben PRK kezelést követően. Tanulmányaink eredményei alapján az uPA terápiás alkalmazása a sebgyógyulási folyamatok szabályozásának klinikai gyakorlatában további kutatásokat igényel. A refraktív sebészeti beavatkozásokat esetenként követő haze kialakulását előre jelezni jelenleg nem tudjuk. A megfelelő dózisban (hatásos és biztonságos) alkalmazott lokális uPA kezelés egészséges szaruhártyákon is alkalmazható, ezért profilaktikus alapú kezelése is felmerülhet a jövőben. A haze megelőzésére jelenleg nincsen elfogadott terápiás lehetőség. Konvencionálisan elfogadott álláspont szerint a proteáz inhibitorok megfelelő sebgyógyulást elősegítő anyagok. Az uPA terápiás alkalmazása újszerű felfogás, melynek kiaknázására további kísérletek, és kontrollált klinikai vizsgálatok elvégzése szükséges.

5.1.5 A rekombináns plazminogén aktivátor inhibitor-2 alkalmazása a szaruhártyafekélyek gyógyításában, állatmodellben

A PAI-2 hatásosságát vegyi sérülések gyógyításában - mint uPA inhibitor - rekombináns módon előállítva vizsgáltuk állatmodellben. Az így alkalmazott fehérje előállítási technika számos gyártástechnológiai előnyt hordoz. A fúziós PAI-2 fehérje előállításakor a két segítő szekvencia (His-tag és MBP) a fehérje tisztítás során és a megfelelő fehérje foldingban is segítségünkre van, és a fehérjéről specifikusan le is választhatóak. Jelenlegi ismereteink szerint munkacsoportunk elsőként állított elő szemcsepp formában alkalmazható rekombináns fehérjét.

Állatmodellben bizonyítottuk, hogy a rekombináns PAI-2 fehérje hatásos a vegyi sérülések kezelésében, hatásosabb, mint az aprotinin szemcsepp alkalmazása. A haze stádiumaiban szignifikáns különbség volt megfigyelhető a kezeléseket követően. Az általunk alkalmazott PAI-2 terápia csökkenti a kémiai sérülés után kialakuló haze súlyosságát és lehetőséget biztosít a gyorsabb gyógyulásra.

A munkacsoportunk által sikeresen termelt és tisztított rekombináns PAI-2 fúziós fehérje további vizsgálatok után lehetőséget biztosíthat a szaruhártyafekélyek gyógyításának klinikai alkalmazásában. Az eljárást szabadalmi oltalmi anyagunk védi [72], [207].

5.2 A diabétesz okozta szemszövődmények szűrése

A cukorbetegség a szervezet anyagcseréjének krónikus megbetegedése, melynek a szövődményeként kialakuló DR, valamint esetenként a makulopátia az aktív életkorban bekövetkező látásvesztés leggyakoribb oka [266]. Időben történő felismerése és kezelése a DR és a makulopátia progresszióját lassíthatja, illetve javulhat a retina állapota. A fentiek

ismeretében a diabéteszes páciensek időszakos szűrése elengedhetetlen.

A cukorbetegség számának ugrásszerű emelkedése és a betegek hajlandósága szűrőprogramokban történő részvételre, mely a szűrőcentrumok leterheltségét jelentős mértékben fokozza, felveti az igényt a normál (DR jeleit nem mutató) fundusfotók kiszűrésére. A szűrőprogramok terheltsége a DR jeleit nem mutató képek kiválogatásával kb. 60-70%-ban volna csökkenthető [267]. Munkánk során olyan eljárásokat igyekeztünk fejleszteni, melyek alkalmasak lehetnek a diabéteszes páciensek előszűrésére. Ezen feladat megvalósítása három tanuló algoritmus alkalmazásán alapult, a felhasznált adatfészeségek tekintetében alapjaiban eltérő modellek kidolgozásával: i) proteomikai adat alapú, ii) digitális képfeldolgozás alapú, és iii) kombinált rendszer alapú.

5.2.1 Könny proteomikai alapú szűrés

A DR potenciális biomarkereinek megtalálása érdekében, a releváns szakirodalmat áttekintve szűrtük ki azokat, melyek egyéb klinikai kórképekkel is összefüggésbe hozhatóak [139]. A vizsgálat fehérjék közül kiemelendő a lakritin, lizozim, Ig κ -lánc VIII, cisztatin SA és prolaktin indukált fehérje, melyek szemhéjszéli gyulladás esetén 50%-al alacsonyabb szintet mutatnak [268] a könnyfilmben. kizárási kritériumként szerepeltek tanulmányunkban. Száraz szem szindróma esetén a prolaktin-indukáló fehérje, a lipokalin-1, laktotranszferrin és a lizozim C szintjei csökkennek [269].

Irodalmi áttekintéseink és saját könnyproteomikai vizsgálataink eredményei alapján a könny lipokalin-1, laktotranszferrin, lakritin, lizozim C, lipofilin A és Ig λ -lánc C régiójának szintjének változásai nincsenek kapcsolatban a szakirodalomban felsorolt és áttekintett gyakoribb kórképekkel, azonban specifikusan megjelennek DR-ban, mely alkalmassá teheti őket biomarkerként való alkalmazásra. A laktotranszferrin és Ig λ szintjeinek megemelkedései összefüggésbe hozhatóak az abnormális érképződéssel, vérzéssel. A lakritinre szükséges továbbá a könnytermeléshez, valamint számos sejttípus osztódásához, mely proliferatív környezet kialakulásához vezethet, és valószínűleg hozzájárul a betegség progressziójához [266]. A lipokalin-1 lipid hordozó fehérje, amely képes megkötni kis hidrofób molekulákat, mint például a retinoid és retinsav [270]. A retinoidok megemelkedett szintje több retinoid- kötő fehérje [271] termelődéséhez vezethet. A megnövekedett szérumban retinoid-kötő fehérjéről [272], a szérumban és üvegtestben apelin szintjeiről [273] bebizonyosodott, hogy lehetséges biomarkerek DR esetén.

A DR proliferatív szakaszának az előrejelzése kritikus a látásélesség megmentése szempontjából. Proliferatív DR kialakulása II-es típusú DM esetén, a páciens kardiovaszkuláris betegségei szempontjából is prognosztikus értékű, ezért fontos ezen páciensek nagy kockázatú

csoportba történő átsorolása a kardiovaszkuláris betegségek előfordulása szempontjából is [274].

A könnymintavétel gyors és olcsó nem invazív eljárás, mely akár rutinszerűen egyszerű körülmények között is elvégezhető. A könnyproteomikai vizsgálatokra önállóan alapozott modellünk azonban szenzitivitási és specifitási értékei alapján nem alkalmas a klinikai gyakorlatban történő alkalmazásra. Ezen vizsgálatok azonban az elsők a maguk nemében, és számos lehetőség kínálkozik a módszer teljesítményének fokozására. A tanuló adathalmaz méretének növelése a további fejlesztésekhez nélkülözhetetlen. Az alkalmazott MS/MS módszertan jelenleg igen költséges, azonban a technika fejlődésével a mérések kivitelezési költségeinek csökkenése várható, így elérhetővé válhat a klinikai rutin számára is [275].

5.2.2 Informatikai alapú szűrés

A DR automatikus szűrését célzó informatikai képfeldolgozó eljárások, komoly publikációs múltra tekintenek vissza. Ezek a módszerek ígéretes teljesítményük ellenére is lassan terjednek a klinikai gyakorlatban, melynek hátterében elsősorban a humán képolvasókhoz viszonyított (alig) gyengébb szenzitivitási és specifitási mutatói, valamint jogi kérdések állnak.

Az automata vizsgálatok nagy előnye, hogy a szoftverek az adott vizsgálóhelyen és adott betegpopuláción stabilan hozzák a beállításkor mért teljesítmény értékeket, míg a humán vizsgálók eredményei számos egyéni és szubjektív tényezőtől függhetnek [276]–[278]. Az egyes fejlesztői csoportok eredményeinek összehasonlítása céljával a University of Iowa MA detektor fejlesztői versenyt szervezett (International Retinopathy Online Challenge), melyen munkacsoportunk tagjai a legjobban teljesítő algoritmus díját szerezték meg 2010-ben [279].

A retinát érintő DR-ra jellemző elváltozások variábilis megjelenése miatt az automata rendszerek fejlesztése során kifejlesztett algoritmusok olyan elváltozások detektálására fókuszálnak, amelyek könnyen leírhatóak, konzekvens megjelenésűek és érzékeny, korai indikátorai a retinopátiának, mint például a MA. A MA a DR legkorábbi tüneteinek egyike, és jelenléte nélkül a diagnózis sem állítható fel [280], [281]. A MA mellett gyakoriak továbbá a világos (fehéres/sárgás) elváltozások detektálására és osztályozására kidolgozott eljárások [282], [283].

Abramoff és mtsai többféle képfeldolgozás alapú módszertant kombináltak. A rendszerük MA detektor mellett a bevérzések, a gyapottépésszerű gócok, és a kemény exszudátumok jelenlétét detektálja egy 874 DM-ban szenvedő pácienseket tartalmazó populáción. A módszertant irreguláris léziók (mint a nagy bevérzések, illetve a neovaszkularizáció) felismerésére is felkészítették. Szenzitivitása 96,8%-os, azonban

specifitása 59,4%, mely a rendszer használhatóságát sokáig jelentősen korlátozta [284].

Gotman és mtsai a negatív, normál képek elkülönítését tűzték ki célul a képadatbázisból annak érdekében, hogy csökkentsék a humán vizsgáló által áttekintendő adatbázis méretét, ezáltal a szűrés humánerőforrás igényét. A kombinált képfeldolgozás alapú módszert a MA detektálása mellett a foltszerű vérzések és exszudátumok azonosítására is kidolgozták. Céljuk a 100%-os szenzitivitás elérése volt, mely a specificitás értékeinek „feláldozásával” párosult. A módszertan előszűrő eljárásaként alkalmazva a képek 26,4%-át (MA/foltszerű vérzések/exszudátumok; ún. két-mezős vizsgálat), illetve 38,1%-át (MA, makula centrált kép vizsgálata) volt képes eltávolítani - mint biztosan negatív - a szűrésre kerülő képadatbázisból [285].

5.2.3 Kombinált szűrés

A DR szűrését szolgáló kombinált módszertanunk azon a hipotézisen alapult, hogy az eltérő típusú adatforrásokból származó információk kombinált alkalmazása a szűrő eljárásokban javítja a modell teljesítményét, mely meghaladja a csak egy adat típusa fókuszáló modellekét.

A munkacsoportunk által kialakított eljárások alkalmasak arra, hogy a proteomikai adatokkal párhuzamosan egyéb adatféléseket is bemeneti információként alkalmazzanak a szűrővizsgálatok során. A bemeneti adatok széles skálán mozognak, az anamnesztikus klinikai információktól egészen a képi anyagokig. A bementként alkalmazott adatfélések számának emelése – természetesen megfelelő kombinációk esetén - az eljárás teljesítményét szignifikánsan fokozhatja. Kombinált diagnosztikai módszertanokat már alkalmaznak a szűrő eljárások teljesítményének javítására. Ilyen például az emlőtumor szűrésére használt genetikai teszt (BRCA1 mutáció) és az MRI felvételek kombinációja [286]. A képfeldolgozás és a könny proteomikai alapú markereinek szűrésben történő alkalmazása, alapjaiban teljesen eltérő adatforrást reprezentál, így a DR-ás szemre nézve eltérő típusú információt hordoznak, ezáltal egymás hibáinak kiküszöbölésére/javítására lehetnek képesek.

A DR-szűrés által (jelenleg) elérendő célértékek, a humán vizsgálok által elért 0,8-as szenzitivitási, és 0,95-ös specificitási értékek. Kombinált modellünk, elért eredményei 0,93-as szenzitivitás és 0,78-as specificitás, melyek a humán vizsgálok eredményességét közelítik.

Modellünk legoptimálisabban a vizsgálni kívánt fehérjék számának további csökkentésével fejleszthető, mely lehetővé teheti az MS/MS módszertan egyszerű gyorsesztre (bed-side kit) történő kiváltását. Ezen módszertől egy igen/nem választ várnánk a vizsgálat során feltett kérdésre. A szűrővizsgálatokat ezáltal egyszerűbbé, gyorsabbá, és költséghatékonyabbá lehetne tenni. A DR szűrővizsgálatként a könnyproteomikai alapú szűrés

ugyan jelen formájában, önállóan nem alkalmazható eljárás, azonban a képfeldolgozás-alapú eljárások teljesítményét jelentős mértékben fokozhatja [287]. Az eltérő típusú bemeneti forrásadatok együttes alkalmazásának a predikció pontosságára gyakorolt kedvező hatását más irodalmi adatok is megerősítik [288], [289].

A kombinált eljárás teljesítménye mindkét modellünk teljesítményét meghaladta, mely feltételezhetően annak köszönhető, hogy a két eltérő adatfészeség egymástól független, egymást kiegészítő információt biztosított az osztályozáshoz. Teljesítmény mutatói: szenzitivitása 0,93; specificitása 0,78.

Az Abramoff és mtsai által validált rendszert a DR szűrésére 2018-ban hagyta jóvá az FDA a klinikai gyakorlatban (ClinicalTrials.gov NCT02963441) [290]. A vizsgálat eredményei alapján az egészségügyi szolgáltatók számára engedélyezésre került a DR egyes stádiumainak és diabéteszes makulaödéma szűrését szolgáló validált mesterséges intelligencia alkalmazása.

5.2.4 Potenciálisan alkalmazható új vizsgáló eljárások a diabétesz szemszövődímenyenek szűrésében és követésében

5.2.4.1 *In vivo* konfokális cornea mikroszkópia

Az emberi szaruhártya érző idegrostokban gazdag szövet, melyek a háromosztatú agyideg (V. agyideg) és a felső nyaki ganglionból eredő szimpatikus axonokból származnak. A strómális idegrostok a szaruhártyát a limbusnál érik el, és a Bowman membrán penetrációja előtt alakítják ki a subepiteliális plexust [198]. Miután számos kisebb idegvégződésé ágazódik, a subbazális idegi plexus beidegzi a corneális epitéliumot majd az V. agyideggé alakul, melynek sűrűsége a szaruhártya centrumában jelentősebb, mint a periférián [198], [291]. A szaruhártya idegrostrétege fontos szerepet játszik a szemfelszín funkcionális és morfológiai integritásának megtartásában [292], továbbá védő, és trófikus funkciókat (is) szolgáltató.

Az *in vivo* corneális konfokális mikroszkópia (CCM): gyors, nem-invazív szemészeti képalkotási technika, mellyel a szaruhártya sejtszintű változásai nyomon követhetőek különböző patológias kórkepekben [293], [294]. Széles körben alkalmazott a diabéteszes neuropátia klinikai detektálására [295], [296] és súlyosságának meghatározására [297] felnőttek esetében, valamint a klinikai neuropátia kialakulásának előrejelzésére [298], [299], továbbá a terápia utáni gyógyulási folyamatok követésére [300]. Korábbi tanulmányok alapján ismert,

hogy mind az I-es, mind a II-es típusú cukorbetegségben a DR-ban nem szenvedő betegeknel már kimutathatóak a szaruhártya idegrostrétegében bekövetkező változások [301], [302].

Gyermekekkel, illetve serdülőkorúakkal kapcsolatosan korlátozottan lelhetőek fel ilyen típusú vizsgálati eredmények, longitudinális vizsgálatot pedig elsőként végeztünk fiatal diabéteszes betegeken. Pacaud és mtsai nemrég közölt tanulmányukban, ismertetik az I-es típusú diabéteszes gyermekeken alkalmazott CCM vizsgálatuk jó reprodukálhatóságú eredményeit [303]. Sellers és mtsai a szaruhártya idegrostréteg morfológiájában nem tudtak elváltozásokat kimutatni I-es és II-es típusú diabéteszes betegeket CCM-el vizsgálva [304]. Hasonló eredményekkel zárultak Elhabashy és mtsai vizsgálatai, ahol OCT készüléket alkalmaztak az idegrostréteg és a ganglion sejtréteg elváltozásainak kimutatására [305]. A gyermekpopuláció korai diabéteszes neuropátiájának a szűrésére az érzékszervi tesztek - pl. rezgés érzékelési küszöb, tapintási érzékelési tesztek - ma már önmagukban alkalmazva nem tekinthetőek elegendőnek [306], [307].

Előzetes ismereteinkre alapozva mely szerint részben ismert az abnormális corneális idegrost morfológia felnőtt DM-ban szenvedő betegek esetében, minimális neuropátia jelenlétében, illetve annak hiányában is [295], [297], [298] CCM vizsgálatokat végeztünk fiatal, I-es típusú cukorbetegben. Széles körű corneális mikroszerkezeti változást mutattunk ki I-es típusú diabéteszes betegeken, mely DR esetén szignifikánsan megváltozott. DM esetén, mind gyermek [308] mind felnőtt [172], [302] vizsgálati csoportokban a bazális epitélium, valamint az endotél sejtek száma lecsökkent. Tanulmányunkban a poszterior strómában lévő keratocita sejtsűrűséget magasabb számban detektáltuk I-es típusú diabéteszes betegeknel az egészséges kontrollokhoz képest. Ezzel ellentétben, más vizsgálók nem találtak szignifikáns különbséget a keratocita sejtszámban a kontroll, és a II-es típusú diabéteszes beteg csoportokat összehasonlítva [302]. A keratociták felelősek a strómális extracelluláris mátrix fenntartásáért, és kulcsszerepet játszanak a szaruhártya sebgyógyulásában. Az inzulin felgyorsíthatja a corneális stróma fenntartását sebzést követően [309]. Korábban már találtak némi különbséget a normál és a diabéteszes keratociták génexpressziójában a jelátviteli útvonalakkal kapcsolatban. Ezek a megváltozott jelátviteli utak talán nagyobb jelentőséggel is bírnak, mint a keratociták sejtsűrűsége [310]. Tanulmányunkban kimutattuk a corneális idegrostrétegek rendellenességeit (is): alacsonyabb számú idegelágazódást és hosszúságot találtunk a fiatal diabéteszes retinopátiás betegeken, illetve mikroalbuminuriát, megerősítve ezzel a korábban leírt eredményeket az I-es és a II-es diabéteszes betegeknel [301], [302]. Továbbá, az automata analízis segítségével a diabéteszes betegeknel kevesebb főidegrost elágazódási pontot tudtunk detektálni, megerősítve ezzel a korai idegelágazódási pontok elvesztését, a nagyobb idegrost

szélességgel és a távolabbi ágak elvékonyodásával összhangban [301], [302], [311]. Érdekes módon a teljes idegrostterület hasonló képet mutatott a kontroll és a diabéteszes betegek esetében, feltehetően a főbb idegrostok korai relatív megkíméltsége, és az elágazódások számának csökkenése következtében.

Követéses vizsgálatunk során nem figyeltünk meg szignifikáns változást a szaruhártya epitél, keratocita és endotél sejtszámában a 2 év alatt. Az idegrost morfológiát tekintve szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a disztális elágazódásokban (NBD és NTBD) a DR-ban nem szenvedő diabéteszesek követése során, valamint ugyanilyen tendenciát észleltünk a DR-ban szenvedő betegek proximálisabb elágazódásaiban (NFD) a 2 éves követés végére. Ezzel összhangban korábbi szerzők a neurodegeneráció retrográd lefolyását figyelték meg, amikor is az inferior idegi elágazódások hossza nagyobb mértékben csökkent, mint a centrális NFL [312]. Stem és mtsai az NFL paraméter jelentősebb csökkenéséről számolt be T1DM során, mint T2DM-ben szenvedő páciensek esetén [313]. Továbbá megfigyelték, hogy T2DM esetén olyan több támadáspontú intervenció, amely a vérnyomás és testsúly mérséklését célozta meg, a corneális idegrostok regenerációjára is hatással volt [314].

Tanulmányunk eredményei összhangban vannak a korábbi publikált ismeretekkel, miszerint a corneális idegrostok elváltozásai összefügghetnek a retinopátia jelenlétével, illetve súlyosságával. Továbbá elsőként dokumentáltuk fiatal diabéteszes betegek longitudinális vizsgálata során észlelt korai és progresszív corneális idegrost morfológia károsodást. Vizsgálataink eredményei alapján a CCM alkalmas lehet az I- és típusú diabéteszes betegek szubklinikai állapotának a vizsgálatára, a betegség korai stádiumában történő szűrési céllal történő alkalmazásra.

5.2.4.2 Ultraszéles látószögű pásztázó lézer oftalmoszkópia

Számos, a retinát érintő betegség (pl.: időskori makuladegeneráció, diabéteszes retinopátia) kialakulása és kórlefolyása szempontjából a középperiféria állapota mellett a periférián elhelyezkedő elváltozások is kiemelkedő jelentőséggel bírnak. Ezen kórképek esetében a perifériára lokalizálódó elváltozások vizsgálata és követése nélkülözhetetlen a kórképek etiológiájának megismerésében, a kezelési sémák felállításában és hatásosságának megítélésében. A perifériák standard vizsgálata céljából alakították ki az ún. hét-mezőjű fotódokumentációk protokollját, melynek köszönhetően a fundus kb. 75°-os látószöge válik láthatóvá [181]–[183]. A P200C AF (Optos, Dunfermline, UK) ultraszéles látószögű pásztázó lézer oftalmoszkóp megjelenése azonban már a retina 200°-os vizsgálatát is lehetővé teszi

A P200C AF modell, 250 ms expozíciós idő alatt készít fotódokumentációt, mely

lehetővé teszi a rossz kooperációs képességű páciensek vizsgálatát is, akár pupillatágítás nélkül. Ezen új képalkotó eljárás piros (633 nm) és zöld (532 nm) lézerfényt használ, melyek egy nagy konkáv elliptikus tükrő felszínéről tükröződnek vissza, és az így létrehozott képek csak piros, csak zöld, vagy a piros-zöld „hamis színek” kombinációjában ábrázolódnak. A P200C AF az ultraszéles látószögű oftalmoszkóp legújabb verziója, mely közös képalkotási platformot használ a retina széles körű rendellenességeinek dokumentálására.

Az új képalkotó eljárásokat széleskörű alkalmazásukat megelőzően, standard módszereken alapuló széles körben elfogadott, és alkalmazott képalkotási módszerekkel kell összehasonlítani. Az ARM (időskori makulopátia) és AMD (időskori makuladegeneráció) patológiai eltéréseinek osztályozására a nem sztereoszkópikus hagyományos digitális fundusfotó (45°) megfelelő mértékben érzékeny, megbízható és standardizált eljárás [315].

Az ultraszéles látószögű (200°) pásztázó lézer oftalmoszkóp digitális fundusképeinek összehasonlítsa ezért ezen hagyományos képalkotó eljárással történt a makula vonatkozásában, az ARM és AMD vonatkozású patológiai eltéréseken keresztül, nemzetközi klasszifikáció alapján [200]. Ismert tény továbbá, hogy a DR-ban elsőként megjelenő fundusképi elváltozás a MA (10-100 μm) [316] és az AMD-ben megjelenő drusen méretileg egymással jól korrelál (kemény drusen <63 μm , a közepes méretű drusen méret 63-125 μm) [200]; így a validáció a DR fundusképeinek szempontjából is értékes információkat hordoz. Tanulmányunk képanyagát, a reykjavíki szemészeti klinikai vizsgálat nagyszámú beteganyaga képezte. Vizsgálatunk az első, mely a P200C AF verzióval foglalkozik, azonban előző típusát (P200) már használták korábbi tanulmányokban [317]–[320]. Ultraszéles látószögű képeket korábban nem alkalmaztak az ARM és AMD osztályozására, bár a makula patológiai rendellenességeinek a jelenlétét már korábban lejegyezték [321].

Vizsgálatunkban minden egyes szemről készített ultraszéles látószögű kép megfelelő minőségű volt az osztályozáshoz, azonban kilenc hagyományos kép nem felelt meg a kívánt kritériumoknak. A képek minőségi problémáit elsősorban a szürkehályog okozta törőközeg homályosság eredményezte, mely egyik ismert rizikó tényezője a cukorbetegség [322]; továbbá a betegek pozícionálási problémái. A lézer alapú képalkotó eljárásokat kevésbé zavarja a törőközegek homályossága [323], [324], így képminőségük mind az élesség, mind a kontraszt tekintetében meghaladja a magas felbontású digitális képek minőségét. A képelemzőnek tisztában kell lennie az alkalmazott módszer nagy mélységélesség eredményezte műtermékekkel (pl.: szemhéjak, szempillák, úszkáló üvegtesti homályok, intraokuláris lencsék optikája és haptikája). Továbbá, az ultraszéles látószög alatt készült kép az általánosan alkalmazott fehér fény megvilágítása helyett zöld és piros lézerfényt használva jön létre, mely

első ránézésre igen ismeretlen képforma az elemző számára. Vizsgálati eredményeink alapján megfelelő képalkotási technikával és tapasztalattal minimalizálható, illetve esetenként teljes mértékben kiküszöbölhetőek ezen aspektusok. Az ultraszéles látószög alatt alkalmazott lézer alapú technika további előnye, hogy a kamera könnyűszerrel mozgatható és így a páciens mozgatására nincsen szükség, mely igazi előny az idősebb populáció vizsgálatában. Ezen képalkotó eljárás rutinszerűen nem igényel pupillatágítást, bár nehezen kooperáló beteg esetében a képminőséget jelentősen javíthatja.

Tanulmányunk azonos fenotípusokra vonatkoztatva nagyon magas egyezést mutatott a vizsgált képi modalitások között. A P200C AF ultraszéles látószögű oftalmoszkóp által készített képek megbízhatóan alkalmazhatóak a szemfenéki elváltozások detektálására és az elváltozások meghatározására. A képolvasók egymáshoz viszonyított és a képolvasó önmagához viszonyított variabilitása alacsony volt (magas egyezés) mindkét képalkotó eljárás esetén. Annak ellenére, hogy a képelemzőknek nem állt hosszasan tanulási periódus rendelkezésükre a P200C AF képalkotó által készített fundusfotók interpretálására, kellő mértékű ismereteket szereztek a különféle léziók azonosításához és az artefaktumok elkülönítéséhez. A két képalkotó eljárás által készített, és a képelemzők által osztályozott fundusfotók egyezése magas volt, kiugró K értékekkel. Kivételt azon esetek képeztek, ahol túl kevés kategória állt rendelkezésre az összehasonlításához. A képelemzés kezdeti szakaszában, a kis kemény drusenek azonosítása okozott nehézséget (elsősorban), melyet feltételezhetően a drusen és a pixel méretek közötti hasonlóság eredményezett az ultraszéles látószögű oftalmoszkóp által készített képeken. Ezt tükrözi az alacsonyabb egyezés és K érték. Az AMD korai jele lehet a RPE kis hiper-, és hipo-pigmentációja, azonban a pigment abnormalitások osztályozása nehéz digitális képeken, melyet jelen tanulmányunk is igazolt. Sem a hagyományos, sem az ultraszéles látószögű képalkotó eljárással nem készültek olyan minőségű fundusképek, hogy a kis pigment elváltozásokat megbízhatóan osztályozhassuk.

A makula vizsgálata során végzett, hagyományos (45°) és ultraszéles látószögű (200°) digitális képek osztályozása szignifikáns egyezést mutatott az általunk vizsgált elváltozások eseteiben. Ezen vizsgálat a jövőbeni alapját képezi az ultraszéles látószögű képek periférikus retinális elváltozásainak elemzéseinek, melyek korábban fel nem ismert rendellenességeket tárhatnak fel a retina perifériáján, továbbá hozzájárulhatnak a különböző kórképek (pl. AMD és DR) kialakulásának és patológiai rendellenességeinek megértéséhez.

6 ÚJ EREDMÉNYEK

6.1 A szaruhártya sebgyógyulási folyamatainak vonatkozásában

- Megállapítottuk, hogy a szaruhártya refraktív lézerkezelését követő sebgyógyulási folyamatok során a páciensek könnymintáinak urokináz uPA szintje jellegzetes mintázatot mutat a korai posztoperatív időszakban, és ez a mintázat szignifikánsan különbözik normál, illetve komplikált sebgyógyulás (haze) során, mely utóbbról igazoltuk, hogy szerin proteináz inhibitor alkalmazásával indukálható.
- Igazoltuk az állatmodell és a humán könnyminták uPA mintázatának hasonlóságát – normál, illetve komplikált sebgyógyulás esetén - és bizonyítottuk, hogy a nyúl kiváló modell a corneális sebgyógyulási folyamatok tanulmányozására, miközben vemhessége a posztoperatív haze kialakulásának valószínűségét jelentős mértékben fokozza. A haze kialakulását egyaránt eredményezheti az uPA csökkent expressziója és/vagy a PAI-2 emelkedett koncentrációja, és szignifikánsan csökkenthető kialakulási valószínűsége az uPA lokális (szemcsepp) pótlásával.
- Rekombináns PAI-2 szemcseppet állítottunk elő, mely állatkísérletben vegyi sérülést követően alkalmazva csökkenti a haze súlyosságát.

6.2 A diabétesz okozta szemszövődmények szűrésének vonatkozásában

- Elsőként azonosítottuk a DR-ban szenvedő betegek könnyfilm-rétegében megjelenő specifikus fehérjéket és izoláltuk közülük azokat, amelyek a könnyből történő DR szűrésére potenciálisan alkalmazhatóak, valamint igazoltuk, hogy az automatizált szűrőprogramok kombinálása a könny-proteomikai elemzéssel javíthatja a szűrőprogramok találati pontosságát.
- Kombinált eljárásunk vizsgálati körülmények között elérte 0,93-as szenzitivitás és 0,78-as specificitás értékeit, mely közelíti a humán vizsgálók szűrési célértékeit (0,80-as szenzitivitás és 0,95-as specificitás).
- In vivo corneális konfokális mikroszkópiával 1-es típusú diabétesz mellitusban szenvedő fiatalok szaruhártyáinak vizsgálatakor morfológiai eltéréseket állapítottunk meg, amelyek összefüggést mutattak a retinopátia jelenlétével, illetve súlyosságával. Továbbá, elsőként dokumentáltuk fiatal diabéteszes betegek longitudinális vizsgálata során a korai és progresszív corneális idegrost morfológia károsodását.
- A makula vizsgálata során végzett, hagyományos (45°) és ultraszéles látószögű (200°) digitális képek osztályozása szignifikáns egyezést mutatott az általunk vizsgált

elváltozások eseteiben. Ezen vizsgálat a jövőbeni alapját képezi az ultraszéles látószögű képek periférikus retinális elváltozásainak elemzéseinek, melyek korábban fel nem ismert rendellenességeket tárhatnak fel a retina perifériáján, továbbá hozzájárulhatnak a különböző kórképek (pl. AMD és DR) kialakulásának és patológiai rendellenességeinek megértéséhez.

7 AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI JELENTŐSÉGE

7.1 A szaruhártya sebgyógyulási folyamatainak vonatkozásában

Eredményeink közül a szaruhártya refraktív lézersebészeti beavatkozását követően a klinikai gyakorlatában közvetlenül is hasznosíthatónak az alábbiakat gondoljuk:

- A 3. posztoperatív napon mért alacsony uPA aktivitás a késői posztoperatív szakban kialakuló haze prediktív jele lehet.
- Az uPA lokális (szemcsepp) pótlása csökkentheti az esetenként kialakuló posztoperatív haze valószínűségét.
- Az általunk szabadalmaztatott eljárással előállított rekombináns PAI-2 fúziós fehérje további állatkísérletes és klinikai vizsgálatok után lehetőséget biztosíthat szaruhártyafekélyek gyógyításában történő felhasználására a klinikai gyakorlatban.

7.2 A diabéteszes szemszövdímenyek szűrése vonatkozásában

Eredményeink közül a diabétesz szűrésében, a klinikai gyakorlatban közvetlenül is hasznosíthatónak az alábbiakat gondoljuk:

- A könny proteomika alapú vizsgálatokat digitalizált retina képek automatizált feldolgozásával kombinálva a cukorbetegségben szenvedő, de DR eltérését nem mutató páciensek előszűrése. A kombinált eljárás bemeneti adatforrásai a digitális fundusfotón azonosított MA-k száma, valamint a könny fehérjék koncentráció értékei. A vizsgáló eljárás pontossága (0,93/0,78-as szenzitivitás/specifititás) erősen közelíti azt a minimum értéket, melyet a British Diabetic Association a szűrőprogramok számára meghatároz (0,80/0,95-ös szenzitivitás/specifititás).
- Az in vivo konfokális mikroszkópia alkalmas az I- és típusú diabéteszes betegek, szubklinikai állapotának a vizsgálatára, a betegség korai stádiumában történő szűrésére, valamint az új terápiás modalitásokból származó egészségnyereség monitorozására.
- A P200C AF ultraszéles látószögű pásztázó lézer oftalmoszkóp (OPTOS PLC, Dubfermline, UK) által készített fotódokumentációk a „gold standard” hagyományos

kamera (45°) rendszerek által készített képeknek megfeleltethetők és alkalmazhatóak rutin klinikai ellátásban.

8 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném köszönetemet kifejezni egykori főnökömnek és mentoromnak, Berta András Professzor Úrnak, hogy bevezetett a könnykutatás témakörébe és a szemészeti szakma szépségeibe, hasznos tanácsaival segítette mind kutatói mind szemészeti pályafutásom. Biztatott az egyetem egyik első spin-off cégének létrehozásában, és ösztönzött arra, hogy ez az értekezés létrejöjjön.

Külön köszönöm Tőzsér József Professzor Úrnak, a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet igazgatójának a laboratóriumi munka csodáival való megismertetést, hasznos tanácsait, mellyel mindvégig segítette kutató munkáinkat. Külön köszönöm, hogy spin-off cégünk létrehozásában és működtetésében mindvégig támogatott kitartó munkájával. A nehézségek során mellettem állt, újabb és újabb pályázatok benyújtására biztatott, melyek megvalósításában elengedhetetlen segítséget nyújtott.

Baráti köszönettel tartozom David Silver Professzor úrnak (Johns Hopkins University, APL, Baltimore, USA) statisztikai elemzéseiert, közleményeink és szabadalmaink elkészítésében nyújtott elengedhetetlen segítségéért.

Hassan Ziad doktor úrnak, hogy biztosította számomra a humán tanulmányok és az állatkísérletek elvégzéséhez szükséges refraktív sebészeti feltételeket. Ezen vizsgálatok elvégzésében mérhetetlen segítséget nyújtott számomra Sefcsik István, a Debreceni Egyetem állatorvosa.

A könnyminták proteomikai vizsgálataiért Csősz Évának a Proteomika Szolgáltató Laboratórium vezetőjének tartozom köszönettel, és hálás vagyok a sorsnak, hogy munkáink egyre szorosabban fonódhattak össze az évek során. Nagy megtiszteltetés számomra, hogy közösen alapíthattuk meg a proteomikai munkacsoportunkat és könnykutatásaink ezáltal egyre szélesebb körű proteomikai platformra helyeződtek.

Köszönöm Hajdú Andrásnak, az Informatikai Tanszék igazgatójának, hogy érdeklődésemet a cukorbeteg páciensek fundusképéinek elemzését illetően informatikai síkra terelte, és az általunk tanulmányozott két kutatási területet összefonva is vizsgálhattuk.

Ezen vizsgálatok ösztönzésében kiemelt támogatást kaptunk egykori főnökömtől, Pető Tünde Professzor Asszonytól (Ophthalmology Department, Queen's University, Belfast), akinek baráti köszönettel tartozom a diabéteszes retinopátia szűrésébe történő bevezetésért.

Hálás vagyok Szalai Eszter kolléganőmnek, hogy érdeklődésemet a szemfenéki képek vizsgálatairól a szaruhártyára irányította, és közös kutatásainkat szakmai tudásával segítette elő.

Köszönöm a Debreceni és a Pécsi Szemklinika, a Debreceni Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, a Proteomika Szolgáltató Laboratórium, az Informatikai Kar, Kutatócsoportunk, Társszerzőim, PhD hallgatóim, és az InnoTears Kft. valamennyi dolgozójának támogatását, hasznos tanácsait, sokoldalú szakmai támogatásukat.

Végezetül, de nem utolsó sorban mindenek felett hálás vagyok szüleimnek, hogy feltételek nélkül támogattak pályafutásom során és mindvégig mellettem álltak az élet nehéz pillanataiban. Ezen bátorítás és támogatás eredménye ez a munka is. Köszönöm családomnak, férjemnek és gyermekeimnek, hogy szeretetükkel mindvégig mellettem álltak.

9 IDÉZETT IRODALOM

- [1] E. Cotlier, “Clinical Biochemistry of Tears,” *Surv. Ophthalmol.*, vol. 26, no. 2, 1981.
- [2] S. Koh, C. I. Tung, Y. Inoue, and V. Jhanji, “Effects of tear film dynamics on quality of vision,” *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 102, no. 12, pp. 1615–1620, Dec. 2018, doi: 10.1136/bjophthalmol-2018-312333.
- [3] L. B. Szczotka-Flynn *et al.*, “Impact of Dry Eye on Visual Acuity and Contrast Sensitivity,” *Optom. Vis. Sci.*, vol. 96, no. 6, pp. 387–396, Jun. 2019, doi: 10.1097/OPX.0000000000001387.
- [4] G. Kalló *et al.*, “Changes in the Chemical Barrier Composition of Tears in Alzheimer’s Disease Reveal Potential Tear Diagnostic Biomarkers,” *PLoS One*, vol. 11, no. 6, p. e0158000, Jun. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0158000.
- [5] A. Lebrecht, D. Boehm, M. Schmidt, H. Koelbl, R. L. Schwirz, and F. H. Grus, “Diagnosis of Breast Cancer by Tear Proteomic Pattern - PubMed,” *Cancer GenomicsProteomics*, vol. 6, no. (3), pp. 177--182, Jun. 2009, Accessed: Jun. 25, 2020. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19487546/>.
- [6] J. L. Prabha, “Tear Secretion-A Short Review,” vol. 6, no. 3, pp. 155–157, 2014.
- [7] J. Wang, J. Aquavella, J. Palakuru, S. Chung, and C. Feng, “Relationships between central tear film thickness and tear menisci of the upper and lower eyelids,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 47, no. 10, pp. 4349–4355, 2006, doi: 10.1167/iovs.05-1654.
- [8] D. K. Sen and G. S. Sarin, “Tear glucose levels in normal people and in diabetic patients,” *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 64, no. 9, pp. 693–695, 1980, doi: 10.1136/bjo.64.9.693.
- [9] D. A. Dartt, “Formation and function of the tear film,” in *Adler’s Physiology of the eye*, Eleventh., L. LA, N. SFE, V. H. J, and W. SM, Eds. Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto: Elsevier, 2011, pp. 350--362.
- [10] J. M. Tiffany, “The normal tear film,” *Dev. Ophthalmol.*, vol. 41, pp. 1–20, 2008, doi: 10.1159/000131066.
- [11] A. M. Gachon, P. Verrelle, G. Betail, and B. Dastugue, “Immunological and electrophoretic studies of human tear proteins,” *Exp. Eye Res.*, vol. 29, no. 5, pp. 539–553, 1979, doi: 10.1016/0014-4835(79)90154-4.
- [12] N. Li *et al.*, “Characterization of human tear proteome using multiple proteomic analysis techniques,” *J. Proteome Res.*, vol. 4, no. 6, pp. 2052–2061, Jan. 2005, doi: 10.1021/pr0501970.
- [13] G. A. de Souza, L. M. F. Godoy, and M. Mann, “Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors,” *Genome Biol.*, vol. 7, no. 8, p. R72, Jan. 2006, doi: 10.1186/gb-2006-7-8-R72.

- [14] L. Zhou *et al.*, “In-depth analysis of the human tear proteome,” *J. Proteomics*, vol. 75, no. 13, pp. 3877–3885, Jul. 2012, doi: 10.1016/j.jprot.2012.04.053.
- [15] A. Ludány, “A testnedvek fehérje-összetételének diagnosztikus kémlelése,” in *A fehérjekutatás modern módsszertana*, L. Andrea, Ed. Budapest, 2011, pp. 294–295.
- [16] G. Kalló *et al.*, “Changes in the Chemical Barrier Composition of Tears in Alzheimer’s Disease Reveal Potential Tear Diagnostic Biomarkers.,” *PLoS One*, vol. 11, no. 6, p. e0158000, Jun. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0158000.
- [17] É. Csősz, E. Deák, N. Tóth, C. E. Traverso, A. Csutak, and J. Tózsér, “Comparative analysis of cytokine profiles of glaucomatous tears and aqueous humour reveals potential biomarkers for trabeculectomy complications,” *FEBS Open Bio*, vol. 9, no. 5, pp. 1020–1028, May 2019, doi: 10.1002/2211-5463.12637.
- [18] H. Kim, P. Kim, H. Yoo, and C. Kim, “Comparison of tear proteins between healthy and early diabetic retinopathy patients.,” *Clin. Biochem.*, vol. 45, no. 1–2, pp. 60–7, Jan. 2012, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2011.10.006.
- [19] D. Böhm *et al.*, “Comparison of tear protein levels in breast cancer patients and healthy controls using a de novo proteomic approach.,” *Oncol. Rep.*, vol. 28, no. 2, pp. 429–38, Aug. 2012, doi: 10.3892/or.2012.1849.
- [20] R. N. Gaster, P. S. Binder, K. Coalwell, M. Berns, R. C. McCord, and N. L. Burstein, “Corneal surface ablation by 193 nm excimer laser and wound healing in rabbits.,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 30, no. 1, pp. 90–98, Jan. 1989, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2912916>.
- [21] J. Marshall, S. L. Trokel, S. Rothery, and R. R. Krueger, “Long-term healing of the central cornea after photorefractive keratectomy using an excimer laser.,” *Ophthalmology*, vol. 95, no. 10, pp. 1411–1421, 1988, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3226689>.
- [22] J. Marshall, S. Trokel, S. Rothery, and R. Krueger, “Photoablative reprofiling of the cornea using an excimer laser, Photorefractive keratectomy.,” *Lasers Ophthalmol.*, vol. 1, pp. 21–48., 1986.
- [23] S. J. Tuft, R. W. Zabel, and J. Marshall, “Corneal repair following keratectomy. A comparison between conventional surgery and laser photoablation.,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 30, no. 8, pp. 1769–1777, Aug. 1989, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2759791>.
- [24] N. SundarRaj *et al.*, “Healing of excimer laser ablated monkey corneas. An immunohistochemical evaluation.,” *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)*, vol. 108, no. 11, pp. 1604–1610, Nov. 1990, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1700895>.
- [25] K. D. Hanna *et al.*, “Corneal wound healing in monkeys 18 months after excimer laser

- photorefractive keratectomy.,” *Refract. Corneal Surg.*, vol. 6, no. 5, pp. 340–345, Jan. 1990, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2257258>.
- [26] M. Berman, R. Leary, and J. Gage, “Evidence for a role of the plasminogen activator--plasmin system in corneal ulceration.,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 19, no. 10, pp. 1204–1221, 1980, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6252112>.
- [27] M. Berman, “Regulation of collagenase. Therapeutic considerations.,” *Trans. Ophthalmol. Soc. U. K.*, vol. 98, no. 3, pp. 397–405, 1978, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/89726>.
- [28] J. Tózsér, A. Berta, and M. Punyiczki, “Plasminogen activator activity and plasminogen independent amidolytic activity in tear fluid from healthy persons and patients with anterior segment inflammation.,” *Clin. Chim. Acta.*, vol. 183, no. 3, pp. 323–331, Aug. 1989, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2805358>.
- [29] D. Collen, “On the regulation and control of fibrinolysis. Edward Kowalski Memorial Lecture.,” *Thromb. Haemost.*, vol. 43, no. 2, pp. 77–89, 1980, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6450468>.
- [30] O. Saksela, “Plasminogen activation and regulation of pericellular proteolysis.,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 823, no. 1, pp. 35–65, Nov. 1985, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2413894>.
- [31] A. Berta, J. Tózsér, and F. Holly, “Determination of plasminogen activator activities in normal and pathological human tears. The significance of tear plasminogen activators in the inflammatory and traumatic lesions of the cornea and the conjunctiva.,” *Acta Ophthalmol.*, vol. 68, no. 5, pp. 508–14, Oct. 1990.
- [32] A. Berta, P. Vamosi, and J. Tozser, “A New Method for Semi-Quantitative Alpha 1-antitrypsin Determination in Human Tear Fluid,” *Fortschr Ophthalmol.*, vol. 86, no. (6), pp. 773–776, 1989, Accessed: Jun. 25, 2020. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2625314/>.
- [33] A. Kadouri and Z. Bohak, “Production of plasminogen activator by cells in culture.,” *Adv. Biotechnol. Processes*, vol. 5, pp. 275–299, Jan. 1985, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3910065>.
- [34] M. Pandolfi and T. Astrup, “A histochemical study of the fibrinolytic activity. Cornea, conjunctiva, and lacrimal gland.,” *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)*, vol. 77, no. 2, pp. 258–264, Feb. 1967, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4959958>.
- [35] M. Pandolfi and E. Lantz, “Partial purification and characterization of keratokinase, the fibrinolytic activator of the cornea.,” *Exp. Eye Res.*, vol. 29, no. 5, pp. 563–571, Nov. 1979, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/393529>.

- [36] L. Thörig, G. Wijngaards, and N. J. Van Haeringen, “Immunological characterization and possible origin of plasminogen activator in human tear fluid,” *Ophthalmic Res.*, vol. 15, no. 5, pp. 268–276, Jan. 1983, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6685845>.
- [37] E. Lantz and M. Pandolfi, “Fibrinolysis in cornea and conjunctiva: evidence of two types of activators,” *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, vol. 224, no. 5, pp. 393–396, Jan. 1986, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3530882>.
- [38] K. Tryggvason, M. Höyhty, and T. Salo, “Proteolytic degradation of extracellular matrix in tumor invasion,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 907, no. 3, pp. 191–217, Nov. 1987, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2823896>.
- [39] S. Barlati, E. Marchina, C. A. Quaranta, F. Vigasio, and F. Semeraro, “Analysis of fibronectin, plasminogen activators and plasminogen in tear fluid as markers of corneal damage and repair,” *Exp. Eye Res.*, vol. 51, no. 1, pp. 1–9, 1990, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2115456>.
- [40] J. Tózsér and A. Berta, “Urokinase-type plasminogen activator in rabbit tears. Comparison with human tears,” *Exp. Eye Res.*, vol. 51, no. 1, pp. 33–37, 1990, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2373178>.
- [41] A. Csutak *et al.*, “Urokinase downregulation by aprotinin in rabbit corneal cells after photorefractive keratectomy,” *Curr. Eye Res.*, vol. 35, no. 9, pp. 806–811, Sep. 2010, doi: 10.3109/02713683.2010.490319.
- [42] A. Leonardi *et al.*, “Urokinase Plasminogen Activator, uPa Receptor, and Its Inhibitor in Vernal Keratoconjunctivitis,” *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 46, no. 4, p. 1364, 2005, doi: 10.1167/iovs.04-1196.
- [43] C. A. Reichel, S. M. Kanse, and F. Krombach, “At the interface of fibrinolysis and inflammation: the role of urokinase-type plasminogen activator in the leukocyte extravasation cascade,” *Trends Cardiovasc. Med.*, vol. 22, no. 7, pp. 192–196, 2012, doi: 10.1016/j.tcm.2012.07.019.
- [44] D. M. Silver, A. Csutak, A. Berta, and J. Tozser, “Plasminogen activator to prevent corneal and subepithelial haze after laser vision correction surgery.” Google Patents, 2007, [Online]. Available: <https://www.google.com/patents/US7179461>.
- [45] T. Tervo *et al.*, “Elevation of tear fluid plasmin in corneal disease,” *Acta Ophthalmol.*, vol. 66, no. 4, pp. 393–399, May 2009, doi: 10.1111/j.1755-3768.1988.tb04029.x.
- [46] T. Dejouvencel *et al.*, “Fibrinolytic cross-talk: a new mechanism for plasmin formation,” *Blood*, vol. 115, no. 10, pp. 2048–2056, 2010, doi: 10.1182/blood-2009-06-228817.
- [47] T. Syrovets, O. Lunov, and T. Simmet, “Plasmin as a proinflammatory cell activator,” *J. Leukoc.*

- Biol.*, vol. 92, no. 3, pp. 509–519, 2012, doi: 10.1189/jlb.0212056.
- [48] J. Tözsér and A. Berta, “Plasminogen activator inhibitors in human tears.,” *Acta Ophthalmol.*, vol. 69, no. 4, pp. 426–431, Aug. 1991, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1750309>.
- [49] J. P. Tsikouris, J. A. Suarez, and G. E. Meyerrose, “Plasminogen activator inhibitor-1: physiologic role, regulation, and the influence of common pharmacologic agents.,” *J. Clin. Pharmacol.*, vol. 42, no. 11, pp. 1187–1199, Nov. 2002, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12412817>.
- [50] R. L. Medcalf and S. J. Stasinopoulos, “The undecided serpin. The ins and outs of plasminogen activator inhibitor type 2.,” *FEBS J.*, vol. 272, no. 19, pp. 4858–4867, 2005, doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04879.x.
- [51] B. Astedt, I. Lecander, T. Brodin, A. Lundblad, and K. Löw, “Purification of a specific placental plasminogen activator inhibitor by monoclonal antibody and its complex formation with plasminogen activator.,” *Thromb. Haemost.*, vol. 53, no. 1, pp. 122–125, Feb. 1985, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3922076>.
- [52] C. Bouchet, F. Spyrtos, P. M. Martin, K. Hacène, A. Gentile, and J. Oglobine, “Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitors PAI-1 and PAI-2 in breast carcinomas.,” *Br. J. Cancer*, vol. 69, no. 2, pp. 398–405, Feb. 1994, [Online]. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1968685&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [53] C.-Y. Su *et al.*, “Plasminogen Activator Inhibitor-2 Plays a Leading Prognostic Role among Protease Families in Non-Small Cell Lung Cancer.,” *PLoS One*, vol. 10, no. 7, p. e0133411, Jan. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0133411.
- [54] D. L. Williams *et al.*, “Plasminogen activator inhibitor type 2 in human corneal epithelium.,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 40, no. 8, pp. 1669–1675, 1999, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10393034>.
- [55] M. Massaro-Giordano, C. M. Marshall, R. M. Lavker, P. J. Jensen, and B. C. Risse Marsh, “Plasminogen activator inhibitor type 2 (PAI-2) is present in normal human conjunctiva.,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 205, no. 2, pp. 295–301, Nov. 2005, doi: 10.1002/jcp.20398.
- [56] K. Hayashi, M. Berman, D. Smith, A. El-Ghatit, S. Pease, and K. R. Kenyon, “Pathogenesis of corneal epithelial defects: role of plasminogen activator.,” *Curr. Eye Res.*, vol. 10, no. 5, pp. 381–398, 1991, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1909616>.
- [57] T. Tervo, K. Tervo, G. B. van Setten, I. Virtanen, and A. Tarkkanen, “Plasminogen activator and

- its inhibitor in the experimental corneal wound.,” *Exp. Eye Res.*, vol. 48, no. 3, pp. 445–449, 1989, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2494049>.
- [58] M. Watanabe *et al.*, “Up-regulation of urokinase-type plasminogen activator in corneal epithelial cells induced by wounding,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 44, no. 8, pp. 3332–3338, Aug. 2003, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Watanabe+M,+Yano+W,+Kondo+S+et+al.+Up-regulation+of+urokinase-type+plasminogen+activator+in+corneal+epithelial+cells+induced+by+wounding.+Invest+Ophthalmol+Vis+Sci.+2003;+44:3332-3338>.
- [59] A. Berta, F. J. Holly, J. Tözsér, and T. F. Holly, “Tear plasminogen activators--indicators of epithelial cell destruction. The effect of scraping, n-heptanol debridement, and alkali burn of the cornea on the plasminogen activator activity of rabbit tears.,” *Int. Ophthalmol.*, vol. 15, no. 6, pp. 363–369, Nov. 1991, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1778666>.
- [60] A. Csutak *et al.*, “Plasminogen activator activity in tears after excimer laser photorefractive keratectomy.,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 41, no. 12, pp. 3743–3747, Nov. 2000, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11053271>.
- [61] J. Grøndahl-Hansen, L. R. Lund, E. Ralfkiaer, V. Ottevanger, and K. Danø, “Urokinase- and tissue-type plasminogen activators in keratinocytes during wound reepithelialization in vivo.,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 90, no. 6, pp. 790–795, 1988, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3131440>.
- [62] B. M. Schäfer, K. Maier, U. Eickhoff, R. F. Todd, and M. D. Kramer, “Plasminogen activation in healing human wounds.,” *Am. J. Pathol.*, vol. 144, no. 6, pp. 1269–80, Jun. 1994.
- [63] J. U. Prause, “Serum albumin, serum antiproteases and polymorphonuclear leucocyte neutral collagenolytic protease in the tear fluid of patients with corneal ulcers.,” *Acta Ophthalmol.*, vol. 61, no. 2, pp. 272–282, 1983, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6192677>.
- [64] M. B. Berman, J. C. Barber, R. C. Talamo, and C. E. Langley, “Corneal ulceration and the serum antiproteases. I. Alpha 1-antitrypsin.,” *Invest. Ophthalmol.*, vol. 12, no. 10, pp. 759–770, 1973, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4361492>.
- [65] N. V Nielsen, J. U. Prause, and J. S. Eriksen, “Lysozyme, alfa-1-antitrypsin and serum albumin in tear fluid of timolol treated glaucoma patients with and without symptoms of dry eyes.,” *Acta Ophthalmol.*, vol. 59, no. 4, pp. 503–509, Aug. 1981, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6976056>.
- [66] J. Cejková, Z. Lojda, S. Dropcová, and D. Kadlecová, “The histochemical pattern of

- mechanically or chemically injured rabbit cornea after aprotinin treatment: relationships with the plasmin concentration of the tear fluid.,” *Histochem. J.*, vol. 25, no. 6, pp. 438–445, 1993, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7689549>.
- [67] A. Berta, J. Tözsér, and F. J. Holly, “Determination of plasminogen activator activities in normal and pathological human tears. The significance of tear plasminogen activators in the inflammatory and traumatic lesions of the cornea and the conjunctiva.,” *Acta Ophthalmol.*, vol. 68, no. 5, pp. 508–514, 1990, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2275342>.
- [68] A. Zhou, X. Jiang, F. Dou, D. Zhu, and X. Xu, “Renaturation, purification, and characterization of human plasminogen activator inhibitor type 2 (PAI-2) accumulated at high level in *Escherichia coli*.,” *J. Biochem.*, vol. 121, no. 5, pp. 930–4, May 1997.
- [69] N. Arroyo De Prada *et al.*, “Interaction of plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) with vitronectin.,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 269, no. 1, pp. 184–192, Jan. 2002, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11784312>.
- [70] J. Mottonen *et al.*, “Structural basis of latency in plasminogen activator inhibitor-1.,” *Nature*, vol. 355, no. 6357, pp. 270–273, Jan. 1992, doi: 10.1038/355270a0.
- [71] A. C. Webb and P. E. Auron, “Arg-Serpin human plasminogen activator inhibitor designated PAI-2.” Google Patents, 1990.
- [72] J. Tözsér, A. Berta, A. Csutak, and G. Miklóssy, “Use of Urokinase Type Plasminogen Activator Inhibitors for the Treatment of Corneal Disorders.” Google Patents, 2011.
- [73] C. L. Bunn and P. J. Sharp, “Protease inhibitors for use in the treatment of psoriasis.” Google Patents, 2001.
- [74] D. Dunaway and I. Berger, “Worldwide Distribution of Visual Refractive Errors and What to expect at a particular location.,” 2014. .
- [75] K. M. Williams *et al.*, “Prevalence of refractive error in Europe: the European Eye Epidemiology (E(3)) Consortium.,” *Eur. J. Epidemiol.*, vol. 30, no. 4, pp. 305–315, 2015, doi: 10.1007/s10654-015-0010-0.
- [76] B. A. Holden *et al.*, “Myopia: a growing global problem with sight-threatening complications.,” *Community eye Heal.*, vol. 28, no. 90, p. 35, 2015, Accessed: Jun. 25, 2020. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26692649>.
- [77] H. S. Dua, L. A. Faraj, D. G. Said, T. Gray, and J. Lowe, “Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet’s layer (Dua’s layer).,” *Ophthalmology*, vol. 120, no. 9, pp. 1778–85, Sep. 2013, doi: 10.1016/j.opthta.2013.01.018.
- [78] D. G. Dawson, J. L. Ubels, and H. F. Edelhauser, “Cornea and sclera,” in *Adler’s Physiology of*

- the eye*, Eleventh., L. LA, N. SFE, V. H. J, and W. SM, Eds. Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphi, St Louis, Sydney, Toronto: Elsevier, 2011, pp. 71--92.
- [79] A. Agarwal, A. Agarwal, and S. Jacob, *Refractive Surgery*, Second Edi. Jaypee Brothers Publishers, 2009.
 - [80] C. Cursiefen, L. M. Heindl, A. M. Joussen, A. Jünemann, C. Y. Mardin, and U. Schlötzer-Schrehardt, *Applied Pathology for Ophthalmic Microsurgeons*, ISBN 978-3. Springer, 2008.
 - [81] S. L. Trokel, R. Srinivasan, and B. Braren, "Excimer laser surgery of the cornea.," *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 96, no. 6, pp. 710–715, Dec. 1983, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6660257>.
 - [82] S. Trokel, "Evolution of excimer laser corneal surgery.," *J. Cataract Refract. Surg.*, vol. 15, no. 4, pp. 373–383, 1989, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2778684>.
 - [83] C. R. Munnerlyn, S. J. Koons, and J. Marshall, "Photorefractive keratectomy: a technique for laser refractive surgery.," *J. Cataract Refract. Surg.*, vol. 14, no. 1, pp. 46–52, Jan. 1988, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3339547>.
 - [84] P. E. Cutarelli, D. S. Durrie, and B. B. W. S, "Considerations for Excimer Laser Refractive Surgery," in *Refractive surgery*, W. HK, T. VM, S. RF, S. SG, and H. PS, Eds. New York, Suttgart: Thieme, 1999, pp. 285–293.
 - [85] A. Csutak, D. M. Silver, J. Tózsér, and A. Berta, "Wound Healing, Haze, and Urokinase Plasminogen Activator After Laser Vision Correction Surgery," *John Hopkins APL Tech. Dig.*, vol. 27, no. 3, pp. 198–207, 2007.
 - [86] C. P. Lohmann, D. S. Gartry, M. K. Muir, G. T. Timberlake, F. W. Fitzke, and J. Marshall, "Corneal haze after excimer laser refractive surgery: objective measurements and functional implications.," *Eur. J. Ophthalmol.*, vol. 1, no. 4, pp. 173–180, Jan. 1991, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1821211>.
 - [87] C. P. Lohmann and J. Marshall, "Plasmin- and plasminogen-activator inhibitors after excimer laser photorefractive keratectomy: new concept in prevention of postoperative myopic regression and haze.," *Refract. Corneal Surg.*, vol. 9, no. 4, pp. 300–302, Jan. 1993, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8398976>.
 - [88] T. Møller-Pedersen, H. D. Cavanagh, W. M. Petroll, and J. V Jester, "Corneal haze development after PRK is regulated by volume of stromal tissue removal.," *Cornea*, vol. 17, no. 6, pp. 627–639, Nov. 1998, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9820944>.
 - [89] M. Goggin, P. Kenna, and F. Lavery, "Haze following photorefractive and photoastigmatic refractive keratectomy with the Nidek EC5000 and the Summit ExciMed UV200.," *J. Cataract Refract. Surg.*, vol. 23, no. 1, pp. 50–53, Jan. 1997, [Online]. Available:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9100107>.

- [90] M. Böhnke, A. Thaer, and I. Schipper, “Confocal microscopy reveals persisting stromal changes after myopic photorefractive keratectomy in zero haze corneas,” *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 82, no. 12, pp. 1393–1400, Dec. 1998, [Online]. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1722439&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [91] C. P. Lohmann, A. Patmore, D. O’Brart, U. Reischl, C. Winkler Mohrenfels, and J. Marshall, “Regression and wound healing after excimer laser PRK: a histopathological study on human corneas,” *Eur. J. Ophthalmol.*, vol. 7, no. 2, pp. 130–138, Jan. 1997, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9243215>.
- [92] I. C. Kuo, S. M. Lee, and D. G. Hwang, “Late-onset corneal haze and myopic regression after photorefractive keratectomy (PRK),” *Cornea*, vol. 23, no. 4, pp. 350–355, 2004, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15097128>.
- [93] L. Chen, L. Zhou, E. C. Y. Chan, J. Neo, and R. W. Beuerman, “Characterization of the human tear metabolome by LC-MS/MS,” *J. Proteome Res.*, vol. 10, no. 10, pp. 4876–4882, 2011, doi: 10.1021/pr2004874.
- [94] L. Chen, T. Ye, and X. Yang, “Evaluation of the long-term effects of photorefractive keratectomy correction for myopia in China,” *Eur. J. Ophthalmol.*, vol. 21, no. 4, pp. 355–362, Jan. 2011, doi: 10.5301/EJO.2011.6226.
- [95] L. Spadea, F. Verboschi, V. De Rosa, M. Salomone, and E. M. Vingolo, “Long term results of no-alcohol laser epithelial keratomileusis and photorefractive keratectomy for myopia,” *Int. J. Ophthalmol.*, vol. 8, no. 3, pp. 574–579, Jan. 2015, doi: 10.3980/j.issn.2222-3959.2015.03.25.
- [96] G. Kim, S. M. Christiansen, and M. Moshirfar, “Change in keratometry after myopic laser in situ keratomileusis and photorefractive keratectomy,” *J. Cataract Refract. Surg.*, vol. 40, no. 4, pp. 564–574, 2014, doi: 10.1016/j.jcrs.2013.09.016.
- [97] Z. Z. Nagy, O. Fekete, and I. Süveges, “Photorefractive keratectomy for myopia with the Meditec MEL 70G-Scan flying spot laser,” *J. Refract. Surg.*, vol. 17, no. 3, pp. 319–326, 2001.
- [98] Z. Z. Nagy, I. Palágyi-Deák, A. Kovács, E. Kelemen, and W. Förster, “First results with wavefront-guided photorefractive keratectomy for hyperopia,” *J. Refract. Surg.*, vol. 18, no. 5, pp. S620-3, 2002.
- [99] Z. Z. Nagy *et al.*, “Photorefractive keratectomy for hyperopia in 800 eyes with the meditec MEL 60 laser,” *J. Refract. Surg.*, vol. 17, no. 5, pp. 525–533, 2001.
- [100] Z. Z. Nagy, I. Süveges, J. Németh, and A. Füst, “Refractive results after photorefractive excimer laser treatment in mild myopic and in mild hyperopic eyes,” *Acta Chir. Hung.*, vol. 35, no. 3–4,

pp. 315–324, 1995.

- [101] I. C. Kuo, “Trends in refractive surgery at an academic center: 2007-2009.,” *BMC Ophthalmol.*, vol. 11, no. 1, p. 11, 2011, doi: 10.1186/1471-2415-11-11.
- [102] L. Hefetz *et al.*, “Influence of patient age on refraction and corneal haze after photorefractive keratectomy.,” *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 81, no. 8, pp. 637–638, Aug. 1997, [Online]. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1722288&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [103] Z. Z. Nagy *et al.*, “Ultraviolet-B Enhances Corneal Stromal Response to 193-nm Excimer Laser Treatment,” *Ophthalmology*, vol. 104, no. 3, pp. 375–380, Nov. 2015, doi: 10.1016/S0161-6420(97)30305-4.
- [104] P. Fagerholm, H. Hamberg-Nyström, and B. Tengroth, “Wound healing and myopic regression following photorefractive keratectomy.,” *Acta Ophthalmol.*, vol. 72, no. 2, pp. 229–234, 1994, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8079630>.
- [105] C. P. Lohmann, U. Reischl, and J. Marshall, “Regression and epithelial hyperplasia after myopic photorefractive keratectomy in a human cornea.,” *J. Cataract Refract. Surg.*, vol. 25, no. 5, pp. 712–715, 1999, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10330651>.
- [106] C. P. Lohmann, A. Patmore, U. Reischl, and J. Marshall, “The importance of the corneal epithelium in excimer-laser photorefractive keratectomy.,” *Ger. J. Ophthalmol.*, vol. 5, no. 6, pp. 368–372, Nov. 1996, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9479520>.
- [107] I. Brunette *et al.*, “Functional outcome and satisfaction after photorefractive keratectomy. Part 2: survey of 690 patients.,” *Ophthalmology*, vol. 107, no. 9, pp. 1790–1796, 2000, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10964847>.
- [108] M. S. Rajan, P. Jaycock, D. O’Brart, H. H. Nystrom, and J. Marshall, “A long-term study of photorefractive keratectomy; 12-year follow-up.,” *Ophthalmology*, vol. 111, no. 10, pp. 1813–1824, 2004, doi: 10.1016/j.ophtha.2004.05.019.
- [109] P. J. McDonnell, “Excimer laser corneal surgery: new strategies and old enemies.,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 36, no. 1, pp. 4–8, Jan. 1995, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7822157>.
- [110] A. J. Kanellopoulos and G. Asimellis, “Refractive and keratometric stability in high myopic LASIK with high-frequency femtosecond and excimer lasers.,” *J. Refract. Surg.*, vol. 29, no. 12, pp. 832–837, Dec. 2013, doi: 10.3928/1081597X-20130924-02.
- [111] T. Miyamoto, S. Saika, A. Yamanaka, Y. Kawashima, Y. Suzuki, and Y. Ohnishi, “Wound healing in rabbit corneas after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis.,” *J. Cataract Refract. Surg.*, vol. 29, no. 1, pp. 153–8, Jan. 2003.

- [112] G. Kamburoğlu and A. Ertan, “Epithelial Ingrowth After Femtosecond Laser-Assisted In Situ Keratomileusis,” *Cornea*, vol. 27, no. 10, pp. 1122–1125, Dec. 2008, doi: 10.1097/ICO.0b013e3181731439.
- [113] F. H. de Paula, C. G. Khairallah, L. M. Niziol, D. C. Musch, and R. M. Shtein, “Diffuse lamellar keratitis after laser in situ keratomileusis with femtosecond laser flap creation,” *J. Cataract Refract. Surg.*, vol. 38, no. 6, pp. 1014–1019, 2012, doi: 10.1016/j.jcrs.2011.12.030.
- [114] C. Villa, R. Gutiérrez, J. R. Jiménez, and J. M. González-Méijome, “Night vision disturbances after successful LASIK surgery,” *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 91, no. 8, pp. 1031–1037, Aug. 2007, doi: 10.1136/bjo.2006.110874.
- [115] S. C. Schallhorn, S. E. Kaupp, D. J. Tanzer, J. Tidwell, J. Laurent, and L. B. Bourque, “Pupil size and quality of vision after LASIK,” *Ophthalmology*, vol. 110, no. 8, pp. 1606–1614, Aug. 2003, doi: 10.1016/S0161-6420(03)00494-9.
- [116] M. Pop and Y. Payette, “Photorefractive keratectomy versus laser in situ keratomileusis: a control-matched study,” *Ophthalmology*, vol. 107, no. 2, pp. 251–257, 2000, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10690820>.
- [117] L. Battat, A. Macri, D. Dursun, and S. C. Pflugfelder, “Effects of laser in situ keratomileusis on tear production, clearance, and the ocular surface,” *Ophthalmology*, vol. 108, no. 7, pp. 1230–1235, 2001, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11425680>.
- [118] P. K. Vaddavalli, V. Hurmeric, J. Wang, and S. H. Yoo, “Corneal haze following disruption of epithelial basement membrane on ultra-high-resolution OCT following femtosecond LASIK,” *J. Refract. Surg.*, vol. 28, no. 1, pp. 72–74, Jan. 2012, doi: 10.3928/1081597X-20111202-01.
- [119] I. I. A. Amany and S. W. Khaled, “Evaluation of haze formation after thin-flap microkeratome LASIK for myopia,” *J. Refract. Surg.*, vol. 28, no. 11, pp. 749–750, Nov. 2012, doi: 10.3928/1081597X-20121011-10.
- [120] Y. Murakami and E. E. Manche, “Prospective, randomized comparison of self-reported postoperative dry eye and visual fluctuation in LASIK and photorefractive keratectomy,” *Ophthalmology*, vol. 119, no. 11, pp. 2220–2224, Nov. 2012, doi: 10.1016/j.optha.2012.06.013.
- [121] R. J. Duffey and D. Leaming, “US trends in refractive surgery: 2003 ISRS/AAO survey,” *J. Refract. Surg.*, vol. 21, no. 1, pp. 87–91, Jan. 2005, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15724690>.
- [122] P. Saeedi *et al.*, “Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition,” *Diabetes Res. Clin. Pract.*, vol. 157, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.diabres.2019.107843.
- [123] E. A. M. Gale, “The rise of childhood type 1 diabetes in the 20th century,” *Diabetes*, vol. 51, no.

- 12, pp. 3353–3361, Dec. 2002, [Online]. Available:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12453886>.
- [124] N. Richter, G. Juckel, and H.-J. Assion, “Metabolic syndrome: a follow-up study of acute depressive inpatients.,” *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.*, vol. 260, no. 1, pp. 41–49, 2010, doi: 10.1007/s00406-009-0013-5.
- [125] World Health Organization, “WHO | About diabetes.,” *World Health Organization*, 2015. .
- [126] Egészségügyi Minisztérium, “Az Egészségügyi Minisztérium szakmai irányelve a diabetes mellitus kórismézéséről, a cukorbetegség kezeléséről és gondozásáról a felnőttkorban,” *Egészségügyi Közlöny*, vol. LIX., pp. 2935--2990., 2010, [Online]. Available:
<http://www.kozlonyok.hu/kozlonyok/index.php?m=2&p=0260&k=6>.
- [127] K. Romesh and G. George, “Type 2 Diabetes Mellitus.” p.
<http://emedicine.medscape.com/article/117853--over>, 2015, [Online]. Available:
<http://emedicine.medscape.com/article/117853-overview>.
- [128] D. Jee, W. K. Lee, and S. Kang, “Prevalence and risk factors for diabetic retinopathy: the Korea National Health and Nutrition Examination Survey 2008-2011.,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 54, no. 10, pp. 6827–6833, 2013, doi: 10.1167/iovs.13-12654.
- [129] L. M. Ruta, D. J. Magliano, R. Lemesurier, H. R. Taylor, P. Z. Zimmet, and J. E. Shaw, “Prevalence of diabetic retinopathy in Type 2 diabetes in developing and developed countries.,” *Diabet. Med.*, vol. 30, no. 4, pp. 387–398, 2013, doi: 10.1111/dme.12119.
- [130] World Health Organization, “The World Health Report 1999: Making a Difference,” *World*, no. <http://www.who.int/whr/1999/en>, p. 136, 1999, [Online]. Available:
<http://www.who.int/whr/1999/en/>.
- [131] D. M. Nathan *et al.*, “Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes.,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 353, no. 25, pp. 2643–2653, Dec. 2005, doi: 10.1056/NEJMoa052187.
- [132] T. D. C. Group, C. T. Research, The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, T. D. C. Group, and C. T. Research, “The Effect of Intensive Diabetes Therapy on the Development and Progression of Neuropathy,” *Ann. Intern. Med.*, vol. 122, no. 8, pp. 561–568, 1995, doi: 10.7326/0003-4819-122-8-199504150-00001.
- [133] P. King, I. Peacock, and R. Donnelly, “The UK prospective diabetes study (UKPDS): clinical and therapeutic implications for type 2 diabetes.,” *Br. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 48, no. 5, pp. 643–8, Nov. 1999.
- [134] R. A. Kowluru and M. Mishra, “Contribution of epigenetics in diabetic retinopathy.,” *Sci. China. Life Sci.*, vol. 58, no. 6, pp. 556–563, 2015, doi: 10.1007/s11427-015-4853-0.

- [135] D. C. Klonoff and D. M. Schwartz, “An economic analysis of interventions for diabetes.,” *Diabetes Care*, vol. 23, no. 3, pp. 390–404, 2000, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10868871>.
- [136] T. Wong, C. Cheung, M. Larsen, S. Sharma, and R. Simó, “Diabetic retinopathy.,” *Nat. Reviews Dis. Prim.*, p. Article number: 16012, doi: 10.1038/nrdp.2016.12.
- [137] T. D. L. Keenan, R. L. Johnston, P. H. J. Donachie, J. M. Sparrow, I. M. Stratton, and P. Scanlon, “United Kingdom National Ophthalmology Database Study: Diabetic Retinopathy; Report 1: prevalence of centre-involving diabetic macular oedema and other grades of maculopathy and retinopathy in hospital eye services.,” *Eye (Lond.)*, vol. 27, no. 12, pp. 1397–1404, Dec. 2013, doi: 10.1038/eye.2013.196.
- [138] A. Berta and A. Csutak, “Diabeteses retinopathia,” in *Az endokrin és anyagcsere-betegségek gyakorlati kézikönyve*, Közlésre e., L. A, N. VE, P. Gy, and R. K, Eds. Budapest: Medicina, 2015.
- [139] É. Csősz *et al.*, “Quantitative analysis of proteins in the tear fluid of patients with diabetic retinopathy,” *J. Proteomics*, vol. 75, no. 7, pp. 2196–2204, Apr. 2012, doi: 10.1016/j.jprot.2012.01.019.
- [140] O. L. Jensen, B. S. Gluud, and H. S. Birgens, “The concentration of lactoferrin in tears of normals and of diabetics.,” *Acta Ophthalmol.*, vol. 64, no. 1, pp. 83–87, 1986, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3962624>.
- [141] A. Moll, K. Wyka, W. Młynarski, and A. Niwald, “[Level of selected antibacterial tear proteins in children with diabetes type 1].,” *Klin. Oczna*, vol. 113, no. 10–12, pp. 336–340, Jan. 2011, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22384651>.
- [142] T. R. Stolwijk, A. Kuizenga, N. J. van Haeringen, A. Kijlstra, J. A. Oosterhuis, and J. A. van Best, “Analysis of tear fluid proteins in insulin-dependent diabetes mellitus.,” *Acta Ophthalmol.*, vol. 72, no. 3, pp. 357–362, 1994, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7976268>.
- [143] H.-J. Kim, P.-K. Kim, H.-S. Yoo, and C.-W. Kim, “Comparison of tear proteins between healthy and early diabetic retinopathy patients.,” *Clin. Biochem.*, vol. 45, no. 1–2, pp. 60–7, Jan. 2012, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2011.10.006.
- [144] S. S. S. S. Ghosh, S. S. S. S. Ghosh, M. Azharuddin, S. Bera, H. Datta, and A. Dasgupta, “Change in tear protein profile in diabetic retinopathy with duration of diabetes,” *Diabetes Metab Syndr*, vol. 8, no. 4, pp. 233–235, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.dsx.2014.09.019.
- [145] B. Li *et al.*, “Tear proteomic analysis of patients with type 2 diabetes and dry eye syndrome by two-dimensional nano-liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry.,” *Invest.*

- Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 55, no. 1, pp. 177–186, Jan. 2014, doi: 10.1167/iovs.13-12080.
- [146] T. Nguyen-Khuong, A. V Everest-Dass, L. Kautto, Z. Zhao, M. D. P. Willcox, and N. H. Packer, “Glycomic characterization of basal tears and changes with diabetes and diabetic retinopathy.,” *Glycobiology*, vol. 25, no. 3, pp. 1–15, 2014, doi: 10.1093/glycob/cwu108.
- [147] R. E. Washington, R. M. Andrews, and R. Mutter, “Emergency Department Visits for Adults with Diabetes, 2010.,” *Statistical Brief #167*, Feb. 2013. .
- [148] N. Cheung, P. Mitchell, and T. Y. Wong, “Diabetic retinopathy,” *Lancet*, vol. 376, no. 9735, pp. 124–136, 2010, doi: 10.1016/S0140-6736(09)62124-3.
- [149] B. Jerneld and P. Algvare, “Relationship of duration and onset of diabetes to prevalence of diabetic retinopathy,” *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 102, no. 4, pp. 431–437, Oct. 1986, doi: 10.1016/0002-9394(86)90069-3.
- [150] K. Hietala, V. Harjutsalo, C. Forsblom, P. Summanen, and P. H. Groop, “Age at onset and the risk of proliferative retinopathy in type 1 diabetes,” *Diabetes Care*, vol. 33, no. 6, pp. 1315–1319, 2010, doi: 10.2337/dc09-2278.
- [151] P. Nyirkos, “Diabeteses szembetegség, különösképpen a diabeteses retinopathia,” in *Tényeken Alapuló Orvostudomány Módszertani Ajánlások*, Melania Kiadói Kft., 2005.
- [152] I. Kovács and G. Salacz, “A diabétesz szemészeti szövödményei,” *Hippocrates*, vol. V. évfolya, no. 5. szám, pp. 290–292., 2003.
- [153] Hoskins Center for Quality Eye Care, “Diabetic Retinopathy Preferred Practice Pattern.,” *American Academy of Ophthalmology*, 2016. .
- [154] A. Csutak, Z. Török, É. Csősz, and T. Pető, “Látásmentő új szűrés,” *Természettudományi Közöny*, vol. 145., no. 5, pp. 207–210, 2014.
- [155] A. Csutak, A. Biró, F. Salló, and T. Pető, “Képelemző centrumok működése és jelentősége a szemészeti kórképek standard elemzésében és a klinikai gyógyszerkutatásban.,” *Szemészet*, vol. 149 (2), pp. 68–74, 2012, [Online]. Available: <http://szemorvostarsasag.hu/cikkek/kepelemzo-centrumok-mukodese-es-jelentosege-a-szemeszeti-korkepek-standard-elemzeseben-es-a-klinikai-gyogyszerkutatásban-szem>.
- [156] D. A. Antonetti, R. Klein, and T. W. Gardner, “Diabetic retinopathy.,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 336, no. 13, pp. 1227–1239, 2012, doi: 10.1056/NEJMra1005073.
- [157] H. Q. Ontario, “Continuous glucose monitoring for patients with diabetes: an evidence-based analysis.,” *Ont. Health Technol. Assess. Ser.*, vol. 11, no. 4, pp. 1–29, Jan. 2011, [Online]. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3377575&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- [158] T. Pető, I. Jano, B. Tóth, R. Degi, and L. Kolozsvári, “A diabetes mellitus szerepe a vakság kialakulásában, Csongrád megyében 1999-ben.” p.
http://www.informed.hu/?tPath=/view/&documentview_, [Online]. Available:
http://www.informed.hu/?tPath=/view/&documentview_type=save&documentview_site=1&documentview_id=4902.
- [159] J. Nemeth *et al.*, “Vaksági okok Magyarországon 1996 és 2000 között,” *Szemészet*, vol. 142. évföl, pp. 127--133., 2005.
- [160] “International Diabetes Federation,” *IDF Diabetes Atlas 6th edn.* p. Brussels, Belgium.
<http://www.idf.org/diabetesatla>, 2013.
- [161] M. Schneider and I. Süveges, “[Diabetic retinopathy: epidemiological data for Hungary].,” *Szemészet*, vol. 11/2004, no. (141);, pp. 441--444., 2004.
- [162] “Szemészeti Szakmai Kollégium. Az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokollja: A szemészeti szövődmények terápiája diabetes mellitusban.” .
- [163] “Preferred Practice Pattern: Diabetic retinopathy,” *Am. J. Ophthalmol.*, vol. Updated Ja, p.
<http://www.aao.org/preferred--practice--pattern/di>, 2014, doi: 10.1016/S0140-6736(09)62124-3.
- [164] L. M. Aiello, “Perspectives on diabetic retinopathy.,” *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 136, no. 1, pp. 122--135, 2003, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12834680>.
- [165] “Focal photocoagulation treatment of diabetic macular edema. Relationship of treatment effect to fluorescein angiographic and other retinal characteristics at baseline: ETDRS report no. 19.,” *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)*, vol. 113, no. 9, pp. 1144--1155, 1995, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7661748>.
- [166] B. E. Klein, S. E. Moss, R. Klein, and T. S. Surawicz, “The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. XIII. Relationship of serum cholesterol to retinopathy and hard exudate.,” *Ophthalmology*, vol. 98, no. 8, pp. 1261--1265, Aug. 1991, [Online]. Available:
https://www.researchgate.net/publication/21233354_Klein_B_E_Moss_S_E_Klein_R_Surawicz_T_S_The_Wisconsin_Epidemiologic_Study_of_Diabetic_Retinopathy_XIII_Relationship_of_serum_cholesterol_to_retinopathy_and_hard_exudate_Ophthalmology_98_1261-1265.
- [167] R. Klein, B. E. Klein, and S. E. Moss, “Relation of glycemic control to diabetic microvascular complications in diabetes mellitus.,” *Ann. Intern. Med.*, vol. 124, no. 1 Pt 2, pp. 90--96, Jan. 1996, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8554220>.
- [168] R. Klein, B. E. Klein, S. E. Moss, and K. J. Cruickshanks, “Relationship of hyperglycemia to the long-term incidence and progression of diabetic retinopathy.,” *Arch. Intern. Med.*, vol. 154, no. 19, pp. 2169--2178, 1994, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7944837>.
- [169] R. Klein, “Prevention of visual loss from diabetic retinopathy.,” *Surv. Ophthalmol.*, vol. 47

- Suppl 2, pp. S246--52, Dec. 2002, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12507626>.
- [170] M. Larsen *et al.*, “Automated detection of fundus photographic red lesions in diabetic retinopathy,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 44, no. 2, pp. 761–766, Feb. 2003, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12556411>.
- [171] D. B. Rein *et al.*, “The cost-effectiveness of three screening alternatives for people with diabetes with no or early diabetic retinopathy,” *Health Serv. Res.*, vol. 46, no. 5, pp. 1534–1561, 2011, doi: 10.1111/j.1475-6773.2011.01263.x.
- [172] M. J. Quadrado, M. Popper, A. M. Morgado, J. N. Murta, and J. A. Van Best, “Diabetes and corneal cell densities in humans by in vivo confocal microscopy,” *Cornea*, vol. 25, no. 7, pp. 761–8, Aug. 2006, doi: 10.1097/01.ico.0000224635.49439.d1.
- [173] M. Tavakoli, P. A. Kallinikos, N. Efron, A. J. M. Boulton, and R. A. Malik, “Corneal sensitivity is reduced and relates to the severity of neuropathy in patients with diabetes,” *Diabetes Care*, vol. 30, no. 7, pp. 1895–1897, 2007, doi: 10.2337/dc07-0175.
- [174] U. Rehany, Y. Ishii, M. Lahav, and S. Rumelt, “Ultrastructural changes in corneas of diabetic patients: an electron-microscopy study,” *Cornea*, vol. 19, no. 4, pp. 534–8, 2000.
- [175] T. R. Stolwijk, J. A. van Best, J. A. Oosterhuis, and W. Swart, “Corneal autofluorescence: an indicator of diabetic retinopathy,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 33, no. 1, pp. 92–97, Jan. 1992, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1730550>.
- [176] Y. Kaji, “Prevention of diabetic keratopathy,” *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 89, no. 3, pp. 254–5, Mar. 2005, doi: 10.1136/bjo.2004.055541.
- [177] E. Szalai *et al.*, “Early Corneal Cellular and Nerve Fiber Pathology in Young Patients With Type 1 Diabetes Mellitus Identified Using Corneal Confocal Microscopy,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 57, no. 3, pp. 853–8, Mar. 2016, doi: 10.1167/iovs.15-18735.
- [178] E. A. Deák, E. Szalai, N. Tóth, R. A. Malik, A. Berta, and A. Csutak, “Longitudinal changes in corneal cell and nerve fiber morphology in young patients with type 1 diabetes with and without diabetic retinopathy: A 2-year follow-up study,” *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 60, no. 2, pp. 830–837, Feb. 2019, doi: 10.1167/iovs.18-24516.
- [179] M. Popper, M. Resch, and Z. Z. Nagy, “A diabéteszes keratopathiáról,” *Ophthalmol. Hungarica*, vol. 152., no. 3., 2015.
- [180] I. Lengyel, A. Tufail, H. Al Hosaini, P. Luthert, A. C. Bird, and G. Jeffery, “Association of Drusen Deposition with Choroidal Intercapillary Pillars in the Aging Human Eye,” *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 45, no. 9, p. 2886, 2004, doi: 10.1167/iovs.03-1083.
- [181] P. S. Silva, J. D. Cavallerano, J. K. Sun, J. Noble, L. M. Aiello, and L. P. Aiello, “Nonmydriatic

- ultrawide field retinal imaging compared with dilated standard 7-field 35-mm photography and retinal specialist examination for evaluation of diabetic retinopathy.,” *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 154, no. 3, pp. 549–559.e2, 2012, doi: 10.1016/j.ajo.2012.03.019.
- [182] M. Kernt *et al.*, “Assessment of diabetic retinopathy using nonmydriatic ultra-widefield scanning laser ophthalmoscopy (Optomap) compared with ETDRS 7-field stereo photography.,” *Diabetes Care*, vol. 35, no. 12, pp. 2459–2463, Dec. 2012, doi: 10.2337/dc12-0346.
- [183] A. Csutak *et al.*, “Agreement between image grading of conventional (45°) and ultra wide-angle (200°) digital images in the macula in the Reykjavik Eye Study.,” *Eye (Lond.)*, vol. 24, no. 10, pp. 1568–75, Oct. 2010, doi: 10.1038/eye.2010.85.
- [184] K. D. Hanna, Y. M. Pouliquen, G. O. Waring, M. Savoldelli, F. Fantes, and K. P. Thompson, “Corneal wound healing in monkeys after repeated excimer laser photorefractive keratectomy.,” *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)*, vol. 110, no. 9, pp. 1286–1291, 1992, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1520118>.
- [185] P. Friberger, “Chromogenic peptide substrates. Their use for the assay of factors in the fibrinolytic and the plasma kallikrein-kinin systems.,” *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.*, vol. 162, pp. 1–298, Jan. 1982, [Online]. Available: <http://europepmc.org/abstract/med/6221396>.
- [186] H. Shimada *et al.*, “Source of increased plasminogen activators during pregnancy and puerperium.,” *Thromb. Res.*, vol. 54, no. 2, pp. 91–98, 1989, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2501902>.
- [187] A. Csutak, D. M. Silver, J. Tózsér, Z. Hassan, and A. Berta, “Urokinase-type plasminogen activator to prevent haze after photorefractive keratectomy, and pregnancy as a risk factor for haze in rabbits.,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 45, no. 5, pp. 1329–1333, 2004, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15111585>.
- [188] A. Csutak *et al.*, “Urokinase down-regulation by aprotinin in rabbit corneal cells after photorefractive keratectomy.,” *Curr. Eye Res.*, vol. 35, no. 9, pp. 806–811, Sep. 2010, doi: 10.3109/02713683.2010.490319.
- [189] A. P. Sappino, J. Huarte, J. D. Vassalli, and D. Belin, “Sites of synthesis of urokinase and tissue-type plasminogen activators in the murine kidney.,” *J. Clin. Invest.*, vol. 87, no. 3, pp. 962–970, 1991, doi: 10.1172/JCI115104.
- [190] A. Csutak *et al.*, “Plasminogen activator inhibitor in human tears after laser refractive surgery.,” *J. Cataract Refract. Surg.*, vol. 34, no. 6, pp. 897–901, 2008, doi: 10.1016/j.jcrs.2008.02.024.
- [191] M. Bland, *An introduction to Medical Statistics.*, (2nd ed.). Oxford, UK: Oxford University Press, 1995.
- [192] H. C. Neu and J. Chou, “Release of surface enzymes in Enterobacteriaceae by osmotic shock.,”

- J. Bacteriol.*, vol. 94, no. 6, pp. 1934–1945, Dec. 1967, [Online]. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=276925&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [193] A. Csutak, D. M. Silver, J. Tózsér, A. Facskó, and A. Berta, “Plasminogen activator activity and inhibition in rabbit tears after photorefractive keratectomy,” *Exp. Eye Res.*, vol. 77, no. 6, pp. 675–680, Dec. 2003, doi: 10.1016/j.exer.2003.08.012.
- [194] J. Cavallerano, S.-E. Bursell, and L. M. Aiello, “Validated Telemedicine for Diabetic Retinopathy,” *Retin. Physician*, 2007, [Online]. Available: <http://www.retinalphysician.com/articleviewer.aspx?articleid=101007>.
- [195] R. L. Niederer, D. Perumal, T. Sherwin, and C. N. J. McGhee, “Laser scanning in vivo confocal microscopy reveals reduced innervation and reduction in cell density in all layers of the keratoconic cornea,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 49, no. 7, pp. 2964–70, Jul. 2008, doi: 10.1167/iovs.07-0968.
- [196] J. C. Erie, S. V Patel, J. W. McLaren, C. B. Nau, D. O. Hodge, and W. M. Bourne, “Keratocyte density in keratoconus. A confocal microscopy study,” *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 134, no. 5, pp. 689–695, 2002, doi: 10.1016/S0002-9394(02)01698-7.
- [197] M. A. Dabbah, J. Graham, I. N. Petropoulos, M. Tavakoli, and R. A. Malik, “Automatic analysis of diabetic peripheral neuropathy using multi-scale quantitative morphology of nerve fibres in corneal confocal microscopy imaging,” *Med. Image Anal.*, vol. 15, no. 5, pp. 738–47, Oct. 2011, doi: 10.1016/j.media.2011.05.016.
- [198] C. F. Marfurt, J. Cox, S. Deek, and L. Dvorscak, “Anatomy of the human corneal innervation,” *Exp. Eye Res.*, vol. 90, no. 4, pp. 478–92, Apr. 2010, doi: 10.1016/j.exer.2009.12.010.
- [199] K. J. Corcoran, “Macroeconomic landscape of refractive surgery in the United States,” *Curr. Opin. Ophthalmol.*, vol. 26, no. 4, pp. 249–54, Jul. 2015, doi: 10.1097/ICU.0000000000000159.
- [200] A. C. Bird *et al.*, “An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group,” *Surv. Ophthalmol.*, vol. 39, no. 5, pp. 367–374, Jan. , [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7604360>.
- [201] F. Jonasson, “The Prevalence of Age-Related Maculopathy in Iceland,” *Arch. Ophthalmol.*, vol. 121, no. 3, p. 379, 2003, doi: 10.1001/archopht.121.3.379.
- [202] F. Jonasson, A. Arnarsson, T. Peto, H. Sasaki, K. Sasaki, and A. C. Bird, “5-year incidence of age-related maculopathy in the Reykjavik Eye Study,” *OPHTHALMOLOGY*, Jan. 2005, [Online]. Available: <http://discovery.ucl.ac.uk/183649/>.
- [203] J. R. Landis and G. G. Koch, “The measurement of observer agreement for categorical data,”

- Biometrics*, vol. 33, no. 1, pp. 159–174, 1977, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/843571>.
- [204] J. D. Vassalli and D. Belin, “Amiloride selectively inhibits the urokinase-type plasminogen activator.,” *FEBS Lett.*, vol. 214, no. 1, pp. 187–191, 1987, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3106085>.
- [205] Z. Steiber *et al.*, “Plasminogen Activator Inhibitor Type 2 in Human Tears and Blood during Pregnancy,” *Int. J. Ophthalmol. eye Sci.*, vol. 03, no. IJOES-2332-290X-03-702, pp. 121–125, 2015, [Online]. Available: <http://scidoc.org/IJOES-2332-290X-03-702.php#collapseTwo>.
- [206] X. Zhang, G. Dimeski, and C. Punyadeera, “Validation of an immunoassay to measure plasminogen-activator inhibitor-1 concentrations in human saliva.,” *Biochem. medica*, vol. 24, no. 2, pp. 258–265, Jan. 2014, doi: 10.11613/BM.2014.028.
- [207] J. Tőzsér, G. Miklóssy, A. Berta, and A. Csutak, “Rekombináns plazminogén aktivátor inhibitor-2 fúziós fehérje előállítása és szemcseppként történő alkalmazása korneális szaruhártya fekélyek gyógyításában [Process for producing plasminogen activator inhibitor-2 fusion protein and use thereof as eye drop.] MSZH, Budapest, 2007.
- [208] L. Zhou, R. W. Beuerman, Y. Foo, S. Liu, L. P. K. Ang, and D. T. H. Tan, “Characterisation of human tear proteins using high-resolution mass spectrometry.,” *Ann. Acad. Med. Singapore*, vol. 35, no. 6, pp. 400–7, Jun. 2006.
- [209] M. M. Moschos, A. A. Rouvas, S. Papadimitriou, A. Kotsolis, N. Sitaras, and M. Apostolopoulos, “Quantitative determination of glycosaminoglycans in tears of diabetic patients.,” *Clin. Ophthalmol.*, vol. 2, no. 3, pp. 581–584, 2008, [Online]. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2694000&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [210] Z. Török *et al.*, “Tear fluid proteomics multimarkers for diabetic retinopathy screening.,” *BMC Ophthalmol.*, vol. 13, no. 1, p. 40, Jan. 2013, doi: 10.1186/1471-2415-13-40.
- [211] K. M. Williams *et al.*, “Increasing Prevalence of Myopia in Europe and the Impact of Education.,” *Ophthalmology*, vol. 122, no. 7, pp. 1489–97, Jul. 2015, doi: 10.1016/j.ophtha.2015.03.018.
- [212] W. Bethke, “What You Can Expect From the Cachet Lens,” Mar. 2011. <https://www.reviewofophthalmology.com/article/what-you-can-expect-from-the-cachet-lens> (accessed Jun. 25, 2020).
- [213] M. V Netto, R. R. Mohan, S. Sinha, A. Sharma, W. Dupps, and S. E. Wilson, “Stromal haze, myofibroblasts, and surface irregularity after PRK.,” *Exp. Eye Res.*, vol. 82, no. 5, pp. 788–797, 2006, doi: 10.1016/j.exer.2005.09.021.

- [214] J. Tomás-Juan, A. Murueta-Goyena Larrañaga, and L. Hanneken, “Corneal Regeneration After Photorefractive Keratectomy: A Review.,” *J. Optom.*, vol. 8, no. 3, pp. 149–69, Jan. 2015, doi: 10.1016/j.optom.2014.09.001.
- [215] I. C. Kuo, “Corneal wound healing.,” *Curr. Opin. Ophthalmol.*, vol. 15, no. 4, pp. 311–315, Aug. 2004, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15232470>.
- [216] M. V Netto, R. R. Mohan, R. Ambrósio, A. E. K. Hutcheon, J. D. Zieske, and S. E. Wilson, “Wound healing in the cornea: a review of refractive surgery complications and new prospects for therapy.,” *Cornea*, vol. 24, no. 5, pp. 509–522, 2005, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15968154>.
- [217] X. Tang and Z. Liao, “[A clinical study of correlation between ablation depth and corneal subepithelial haze after photorefractive keratectomy].,” *Zhonghua. Yan Ke Za Zhi.*, vol. 33, no. 3, pp. 204–206, 1997, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10437037>.
- [218] P. Vinciguerra, M. Azzolini, P. Airaghi, P. Radice, and V. De Molfetta, “Effect of decreasing surface and interface irregularities after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis on optical and functional outcomes.,” *J. Refract. Surg.*, vol. 14, no. 2 Suppl, pp. S199–203, 1998, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9571553>.
- [219] Y. Nakamura, C. Sotozono, and S. Kinoshita, “The epidermal growth factor receptor (EGFR): role in corneal wound healing and homeostasis.,” *Exp. Eye Res.*, vol. 72, no. 5, pp. 511–517, 2001, doi: 10.1006/exer.2000.0979.
- [220] S. Serrao, M. Lombardo, and F. Mondini, “Photorefractive keratectomy with and without smoothing: a bilateral study.,” *J. Refract. Surg.*, vol. 19, no. 1, pp. 58–64, Jan. , [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12553608>.
- [221] B. M. Stramer, J. D. Zieske, J.-C. Jung, J. S. Austin, and M. E. Fini, “Molecular mechanisms controlling the fibrotic repair phenotype in cornea: implications for surgical outcomes.,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 44, no. 10, pp. 4237–4246, 2003, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14507867>.
- [222] M. A. Teus, L. de Benito-Llopis, and J. L. Alió, “Mitomycin C in Corneal Refractive Surgery,” *Surv. Ophthalmol.*, vol. 54, no. 4, pp. 487–502, Jul. 2009, doi: 10.1016/j.survophthal.2009.04.002.
- [223] G. B. van Setten *et al.*, “Plasmin and plasminogen activator activities in tear fluid during corneal wound healing after anterior keratectomy.,” *Curr. Eye Res.*, vol. 8, no. 12, pp. 1293–1298, Dec. 1989, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2534068>.
- [224] D. S. Hull and K. Green, “Effect of urokinase on corneal endothelium.,” *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)*, vol. 98, no. 7, pp. 1285–1286, 1980, [Online]. Available:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6994704>.

- [225] P. Vinciguerra, M. Azzolini, P. Radice, M. Sborgia, and V. De Molfetta, “A method for examining surface and interface irregularities after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis: predictor of optical and functional outcomes.,” *J. Refract. Surg.*, vol. 14, no. 2 Suppl, pp. S204-6, Apr. 1998.
- [226] S. G. Farah, D. T. Azar, C. Gurdal, and J. Wong, “Laser in situ keratomileusis: literature review of a developing technique.,” *J. Cataract Refract. Surg.*, vol. 24, no. 7, pp. 989–1006, 1998, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9682123>.
- [227] J. H. Chang, M. C. Kook, J. H. Lee, H. Chung, and W. R. Wee, “Effects of synthetic inhibitor of metalloproteinase and cyclosporin A on corneal haze after excimer laser photorefractive keratectomy in rabbits.,” *Exp. Eye Res.*, vol. 66, no. 4, pp. 389–96, Apr. 1998, doi: 10.1006/exer.1997.0415.
- [228] Y. Kaji *et al.*, “Effect of anti-inflammatory agents on corneal wound-healing process after surface excimer laser keratectomy.,” *J. Cataract Refract. Surg.*, vol. 26, no. 3, pp. 426–31, Mar. 2000.
- [229] J. H. Talamo, S. Gollamudi, W. R. Green, Z. De La Cruz, V. Filatov, and W. J. Stark, “Modulation of corneal wound healing after excimer laser keratomileusis using topical mitomycin C and steroids.,” *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)*, vol. 109, no. 8, pp. 1141–6, Aug. 1991.
- [230] H. Xu, S. Liu, X. Xia, P. Huang, P. Wang, and X. Wu, “Mitomycin C reduces haze formation in rabbits after excimer laser photorefractive keratectomy.,” *J. Refract. Surg.*, vol. 17, no. 3, pp. 342–9, Jan. 2001.
- [231] F. Carones, L. Vigo, E. Scandola, and L. Vacchini, “Evaluation of the prophylactic use of mitomycin-C to inhibit haze formation after photorefractive keratectomy.,” *J. Cataract Refract. Surg.*, vol. 28, no. 12, pp. 2088–95, Dec. 2002.
- [232] C. Chen *et al.*, “Measurement of mRNAs for TGF β s and extracellular matrix proteins in corneas of rats after PRK.,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 41, no. 13, pp. 4108–16, Dec. 2000.
- [233] K. Bilgihan, S. Ozdek, C. Ozoğul, G. Gurelik, A. Bilgihan, and B. Hasanreisoglu, “Topical vitamin E and hydrocortisone acetate treatment after photorefractive keratectomy.,” *Eye (Lond)*, vol. 14 (Pt 2), pp. 231–7, Apr. 2000, doi: 10.1038/eye.2000.60.
- [234] L. Zhou *et al.*, “Proteomic analysis of rabbit tear fluid: Defensin levels after an experimental corneal wound are correlated to wound closure,” *Proteomics*, vol. 7, no. 17, pp. 3194–3206, 2007, doi: 10.1002/pmic.200700137.
- [235] M. Berman, “The pathogenesis of corneal epithelial defects.,” *Acta Ophthalmol. Suppl. (Oxf.)*,

- vol. 192, pp. 55–64, Jan. 1989, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2554658>.
- [236] M. Suzuki, H. Kobayashi, and M. F. et Al., “Kunitz-type protease inhibitor bikunin disrupts phorbol ester-induced oligomerization of CD44 variant isoforms containing epitope v9 and subsequently suppresses expression of urokinase-type plasminogen activator in human chondrosarcoma cells,” *J. Biol. Chem.*, no. 277:, pp. 8022--8032., 2002, [Online]. Available: <http://www.jbc.org/content/277/18/16346.full>.
- [237] S. Shetty, U. R. Pendurthi, P. K. S. Halady, A. O. Azghani, and S. Idell, “Urokinase induces its own expression in Beas2B lung epithelial cells,” *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 283, no. 2, pp. L319--28, Aug. 2002, doi: 10.1152/ajplung.00395.2001.
- [238] N. B. Chesnokova, T. P. Kuznetsova, and N. E. Sosulina, “Pharmacokinetics of polyvalent proteinase inhibitor (aprotinin) in eye tissues,” *Doc. Ophthalmol.*, vol. 85, no. 3, pp. 275–280, Jan. 1994, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7523051>.
- [239] S. D. Dunbar, D. L. Ornstein, and L. R. Zacharski, “Cancer treatment with inhibitors of urokinase-type plasminogen activator and plasmin,” *Expert Opin. Investig. Drugs*, vol. 9, no. 9, pp. 2085–2092, 2000, doi: 10.1517/13543784.9.9.2085.
- [240] V. Weimar, “Polymorphonuclear invasion of wounded corneas. Inhibition by topically applied sodium salicylate and soybean trypsin inhibitor,” *J. Exp. Med.*, vol. 105, pp. 141--152., 1957, [Online]. Available: <http://jem.rupress.org/content/105/2/141.full.pdf+html>.
- [241] F. Blasi, “uPA, uPAR, PAI-1: key intersection of proteolytic, adhesive and chemotactic highways?,” *Immunol. Today*, vol. 18, no. 9, pp. 415–417, 1997, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9293155>.
- [242] T. Møller-Pedersen, H. F. Li, W. M. Petroll, H. D. Cavanagh, and J. V Jester, “Confocal microscopic characterization of wound repair after photorefractive keratectomy,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 39, no. 3, pp. 487–501, 1998, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9501858>.
- [243] M. L. Ramsby and D. L. Kreutzer, “Fibrin induction of tissue plasminogen activator expression in corneal endothelial cells in vitro,” *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 34, pp. 3207–3219, 1993, [Online]. Available: <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2160744>.
- [244] O. Giledi, M. G. Mulhern, M. Espinosa, A. Kerr, and S. M. Daya, “Reproducibility of LASIK flap thickness using the Hansatome microkeratome,” *J. Cataract Refract. Surg.*, vol. 30, no. 5, pp. 1031–1037, May 2004, doi: 10.1016/j.jcrs.2003.09.070.
- [245] B. Astedt, C. Lindoff, and I. Lecander, “Significance of the plasminogen activator inhibitor of placental type (PAI-2) in pregnancy,” *Semin. Thromb. Hemost.*, vol. 24, no. 5, pp. 431–435, Jan.

- 1998, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9834009>.
- [246] M. Hellgren, “Hemostasis during normal pregnancy and puerperium.,” *Semin. Thromb. Hemost.*, vol. 29, no. 2, pp. 125–130, 2003, doi: 10.1055/s-2003-38897.
- [247] B. Brenner, “Haemostatic changes in pregnancy.,” *Thromb. Res.*, vol. 114, no. 5–6, pp. 409–414, Jan. 2004, doi: 10.1016/j.thromres.2004.08.004.
- [248] C. Hui *et al.*, “Changes in coagulation and hemodynamics during pregnancy: a prospective longitudinal study of 58 cases.,” *Arch. Gynecol. Obstet.*, vol. 285, no. 5, pp. 1231–1236, 2012, doi: 10.1007/s00404-011-2137-x.
- [249] E. K. Kruithof *et al.*, “Fibrinolysis in pregnancy: a study of plasminogen activator inhibitors.,” *Blood*, vol. 69, no. 2, pp. 460–466, 1987, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2432970>.
- [250] J. W. van Wersch and J. M. Ubachs, “Blood coagulation and fibrinolysis during normal pregnancy.,” *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, vol. 29, no. 1, pp. 45–50, Jan. 1991.
- [251] A. M. Gachon, J. Richard, and B. Dastugue, “Human tears: normal protein pattern and individual protein determinations in adults.,” *Curr. Eye Res.*, vol. 2, no. 5, pp. 301–8, Jan. 1982.
- [252] K. Hayashi and K. Sueishi, “Fibrinolytic activity and species of plasminogen activator in human tears.,” *Exp. Eye Res.*, vol. 46, no. 2, pp. 131–137, Feb. 1988, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3127227>.
- [253] T. Kosugi *et al.*, “Interaction of fibrinolytic activity between the tracheobronchial secretion and circulating blood of rats.,” *Laryngoscope*, vol. 94, no. 3, pp. 386–390, 1984, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6538252>.
- [254] R. N. Stuchell, J. J. Feldman, R. L. Farris, and I. D. Mandel, “The effect of collection technique on tear composition.,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 25, no. 3, pp. 374–377, 1984, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6698755>.
- [255] M. Macaluso *et al.*, “Cytoplasmic and nuclear interaction between Rb family proteins and PAI-2: a physiological crosstalk in human corneal and conjunctival epithelial cells.,” *Cell Death Differ.*, vol. 13, no. 9, pp. 1515–1522, 2006, doi: 10.1038/sj.cdd.4401835.
- [256] B. Stringer, E. A. Udofa, and T. M. Antalis, “Regulation of the human plasminogen activator inhibitor type 2 gene: cooperation of an upstream silencer and transactivator.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 13, pp. 10579–10589, 2012, doi: 10.1074/jbc.M111.318758.
- [257] M. Coolman *et al.*, “Concentrations of plasminogen activators and their inhibitors in blood preconceptionally, during and after pregnancy.,” *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, vol. 128, no. 1–2, pp. 22–28, Jan. 2006, doi: 10.1016/j.ejogrb.2006.02.004.
- [258] M. Uszyński, M. Perlik, W. Uszyński, and E. Żekanowska, “Urokinase plasminogen activator

- (uPA) and its receptor (uPAR) in gestational tissues,” *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, vol. 114, no. 1, pp. 54–58, May 2004, doi: 10.1016/j.ejogrb.2003.12.006.
- [259] C. L. S. Koh, O. A. C. Viegas, R. Yuen, S. E. Chua, B. L. Ng, and S. S. Ratnam, “Plasminogen activators and inhibitors in normal late pregnancy, postpartum and in the postnatal period,” *Int. J. Gynecol. Obstet.*, vol. 38, no. 1, pp. 9–18, May 1992, doi: 10.1016/0020-7292(92)90723-V.
- [260] A. Carpintero, M. M. Sánchez-Martín, M. J. Cabezas-Delamare, and J. A. Cabezas, “Variation in serum arylesterase, β -glucuronidase, cathepsin L and plasminogen activators during pregnancy,” *Clin. Chim. Acta*, vol. 255, no. 2, pp. 153–164, Nov. 1996, doi: 10.1016/0009-8981(96)06403-0.
- [261] K. S. Bower and F. Woreta, “Update on contraindications for laser-assisted in situ keratomileusis and photorefractive keratectomy.,” *Curr. Opin. Ophthalmol.*, vol. 25, no. 4, pp. 251–257, 2014, doi: 10.1097/ICU.0000000000000055.
- [262] M. J. López-Prats, J. J. Hidalgo-Mora, E. Sanz-Marco, A. Pellicer, A. Perales, and M. Díaz-Llopis, “Influence of pregnancy on refractive parameters after LASIK surgery.,” *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.*, vol. 87, no. 6, pp. 173–8, Jun. 2012, doi: 10.1016/j.oftal.2011.09.021.
- [263] K. Sharif, “Regression of myopia induced by pregnancy after photorefractive keratectomy.,” *J. Refract. Surg.*, vol. 13, no. 5 Suppl, pp. S445–6, Aug. 1997, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9286790>.
- [264] S. W. Reeves, E. A. Davis, and M. R. Dana, “Pregnancy and the eye.,” in *Principles and Practice of Ophthalmology*, 3rd ed., D. M. Albert, J. W. Miller, D. T. Azar, and B. A. Blodi, Eds. Saunders-Elsevier, 2008.
- [265] T. Ness and W. Paulus, “Eye and pregnancy.,” *Ophthalmologe*, vol. 107, no. 9, pp. 863–72; quiz 873, Sep. 2010, doi: 10.1007/s00347-010-2203-y.
- [266] A. Sjödin, D. Guo, S. Sørhaug, L. Bjørner, R. Henriksson, and H. Hedman, “Dysregulated secretoglobin expression in human lung cancers.,” *Lung Cancer*, vol. 41, no. 1, pp. 49–56, Jul. 2003.
- [267] N. Gabric and P. Rastegorac, “Digital Teleretinal Screening.,” in *Teleophthalmology in Practice*, K. Yegesan, S. Kumar, L. Goldschmidt, and J. Cuadros, Eds. Springer, 2006, p. 163.
- [268] B. Koo, D. Lee, H. Ha, J. Kim, and C. Kim, “Comparative analysis of the tear protein expression in blepharitis patients using two-dimensional electrophoresis.,” *J. Proteome Res.*, vol. 4, no. 3, pp. 719–24, Jan. 2005, doi: 10.1021/pr0498133.
- [269] L. Zhou *et al.*, “Identification of tear fluid biomarkers in dry eye syndrome using iTRAQ quantitative proteomics.,” *J. Proteome Res.*, vol. 8, no. 11, pp. 4889–905, Nov. 2009, doi: 10.1021/pr900686s.
- [270] J. Wang *et al.*, “Restricted epithelial proliferation by lacritin via PKC α -dependent NFAT and

- mTOR pathways.,” *J. Cell Biol.*, vol. 174, no. 5, pp. 689–700, Aug. 2006, doi: 10.1083/jcb.200605140.
- [271] D. R. Flower, “The lipocalin protein family: structure and function.,” *Biochem. J.*, vol. 318 (Pt 1, pp. 1–14, Aug. 1996.
- [272] J. A. Gimeno-Orna, E. Faure-Nogueras, F. J. Castro-Alonso, and B. Boned-Juliani, “Ability of Retinopathy to Predict Cardiovascular Disease in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus.,” *Am. J. Cardiol.*, vol. 103, no. 10, pp. 1364–1367, May 2009, doi: 10.1016/j.amjcard.2009.01.345.
- [273] Y. Tao *et al.*, “Apelin in Plasma and Vitreous and in Fibrovascular Retinal Membranes of Patients with Proliferative Diabetic Retinopathy.,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 51, no. 8, p. 4237, Aug. 2010, doi: 10.1167/iovs.09-4466.
- [274] N. Noy, “Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action.,” *Biochem. J.*, vol. 348 Pt 3, pp. 481–95, Jun. 2000.
- [275] F. M. White, “The potential cost of high-throughput proteomics.,” *Sci. Signal.*, vol. 4, no. 160, p. pe8, Jan. 2011, doi: 10.1126/scisignal.2001813.
- [276] A. D. Fleming, K. A. Goatman, S. Philip, G. J. Prescott, P. F. Sharp, and J. A. Olson, “Automated grading for diabetic retinopathy: a large-scale audit using arbitration by clinical experts.,” *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 94, no. 12, pp. 1606–1610, Dec. 2010, doi: 10.1136/bjo.2009.176784.
- [277] M. Bouhaimed, R. Gibbins, and D. Owens, “Automated detection of diabetic retinopathy: results of a screening study.,” *Diabetes Technol. Ther.*, vol. 10, no. 2, pp. 142–148, 2008, doi: 10.1089/dia.2007.0239.
- [278] N. Larsen, J. Godt, M. Grunkin, H. Lund-Andersen, and M. Larsen, “Automated detection of diabetic retinopathy in a fundus photographic screening population.,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 44, no. 2, pp. 767–771, Feb. 2003, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12556412>.
- [279] M. Niemeijer *et al.*, “Retinopathy online challenge: automatic detection of microaneurysms in digital color fundus photographs.,” *IEEE Trans. Med. Imaging*, vol. 29, no. 1, pp. 185–195, Jan. 2010, doi: 10.1109/TMI.2009.2033909.
- [280] D. G. Cogan, D. Toussaint, and T. Kuwabara, “Retinal vascular patterns. IV. Diabetic retinopathy.,” *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)*, vol. 66, pp. 366–378, 1961, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13694291>.
- [281] N. Ashton, “Studies of the retinal capillaries in relation to diabetic and other retinopathies,” *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 47, pp. 521–538, 1963, [Online]. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=505844&tool=pmcentrez&rendertyp>

e=abstract.

- [282] M. Niemeijer, B. van Ginneken, S. R. Russell, M. S. A. Suttorp-Schulten, and M. D. Abràmoff, “Automated detection and differentiation of drusen, exudates, and cotton-wool spots in digital color fundus photographs for diabetic retinopathy diagnosis.,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 48, no. 5, pp. 2260–2267, 2007, doi: 10.1167/iovs.06-0996.
- [283] M. Niemeijer, B. van Ginneken, J. Staal, M. S. A. Suttorp-Schulten, and M. D. Abràmoff, “Automatic detection of red lesions in digital color fundus photographs.,” *IEEE Trans. Med. Imaging*, vol. 24, no. 5, pp. 584–592, 2005, doi: 10.1109/TMI.2005.843738.
- [284] M. D. Abràmoff *et al.*, “Automated early detection of diabetic retinopathy.,” *Ophthalmology*, vol. 117, no. 6, pp. 1147–1154, 2010, doi: 10.1016/j.ophtha.2010.03.046.
- [285] K. Goatman, A. Charnley, L. Webster, and S. Nussey, “Assessment of automated disease detection in diabetic retinopathy screening using two-field photography.,” *PLoS One*, vol. 6, no. 12, p. e27524, Jan. 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0027524.
- [286] J. M. Lee *et al.*, “Cost-effectiveness of breast MR imaging and screen-film mammography for screening BRCA1 gene mutation carriers.,” *Radiology*, vol. 254, no. 3, pp. 793–800, 2010, doi: 10.1148/radiol.09091086.
- [287] Z. Torok *et al.*, “Combined Methods for Diabetic Retinopathy Screening, Using Retina Photographs and Tear Fluid Proteomics Biomarkers,” *J. Diabetes Res.*, vol. 2015, pp. 1–8, 2015, doi: 10.1155/2015/623619.
- [288] L. Kuncheva and C. J. Whitaker, “Measures of Diversity in Classifier Ensembles and Their Relationship with the Ensemble Accuracy,” *Mach. Learn.*, vol. 51, no. 2, pp. 181–207, 2003, doi: 10.1049/ic:20010105.
- [289] P. Sollich and A. Krogh, “Learning with ensembles: how overfitting can be useful.,” *Adv. Neural Inf. Process. Syst.*, vol. 8, pp. 190–196., 1996.
- [290] M. D. Abràmoff, P. T. Lavin, M. Birch, N. Shah, and J. C. Folk, “Pivotal trial of an autonomous AI-based diagnostic system for detection of diabetic retinopathy in primary care offices,” *npj Digit. Med.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–8, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41746-018-0040-6.
- [291] J. He, N. G. Bazan, and H. E. P. Bazan, “Mapping the entire human corneal nerve architecture.,” *Exp. Eye Res.*, vol. 91, no. 4, pp. 513–23, Oct. 2010, doi: 10.1016/j.exer.2010.07.007.
- [292] L. J. Müller, C. F. Marfurt, F. Kruse, and T. M. T. Tervo, “Corneal nerves: structure, contents and function.,” *Exp. Eye Res.*, vol. 76, no. 5, pp. 521–42, May 2003, Accessed: Apr. 24, 2017. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12697417>.
- [293] G. Bitirgen, A. Ozkagnici, R. A. Malik, and R. Oltulu, “Evaluation of contact lens-induced changes in keratoconic corneas using in vivo confocal microscopy.,” *Invest. Ophthalmol. Vis.*

- Sci.*, vol. 54, no. 8, pp. 5385–91, Aug. 2013, doi: 10.1167/iovs.13-12437.
- [294] G. Bitirgen, A. Ozkagnici, B. Bozkurt, and R. A. Malik, “In vivo corneal confocal microscopic analysis in patients with keratoconus.,” *Int. J. Ophthalmol.*, vol. 8, no. 3, pp. 534–9, Jan. 2015, doi: 10.3980/j.issn.2222-3959.2015.03.17.
- [295] C. Quattrini *et al.*, “Surrogate markers of small fiber damage in human diabetic neuropathy.,” *Diabetes*, vol. 56, no. 8, pp. 2148–54, Aug. 2007, doi: 10.2337/db07-0285.
- [296] R. A. Malik *et al.*, “Corneal confocal microscopy: a non-invasive surrogate of nerve fibre damage and repair in diabetic patients.,” *Diabetologia*, vol. 46, no. 5, pp. 683–8, May 2003, doi: 10.1007/s00125-003-1086-8.
- [297] I. N. Petropoulos *et al.*, “Corneal nerve loss detected with corneal confocal microscopy is symmetrical and related to the severity of diabetic polyneuropathy.,” *Diabetes Care*, vol. 36, no. 11, pp. 3646–51, Nov. 2013, doi: 10.2337/dc13-0193.
- [298] N. Pritchard, K. Edwards, A. W. Russell, B. A. Perkins, R. A. Malik, and N. Efron, “Corneal confocal microscopy predicts 4-year incident peripheral neuropathy in type 1 diabetes.,” *Diabetes Care*, vol. 38, no. 4, pp. 671–5, Apr. 2015, doi: 10.2337/dc14-2114.
- [299] L. E. Lovblom *et al.*, “In vivo corneal confocal microscopy and prediction of future-incident neuropathy in type 1 diabetes: a preliminary longitudinal analysis.,” *Can. J. diabetes*, vol. 39, no. 5, pp. 390–7, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.jcjd.2015.02.006.
- [300] M. Tavakoli *et al.*, “Corneal confocal microscopy detects early nerve regeneration in diabetic neuropathy after simultaneous pancreas and kidney transplantation.,” *Diabetes*, vol. 62, no. 1, pp. 254–260, 2013, doi: 10.2337/db12-0574.
- [301] I. N. Petropoulos *et al.*, “Corneal confocal microscopy detects neuropathy in patients with type 1 diabetes without retinopathy or microalbuminuria.,” *PLoS One*, vol. 10, no. 4, p. e0123517, Jan. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0123517.
- [302] G. Bitirgen, A. Ozkagnici, R. A. Malik, and H. Kerimoglu, “Corneal nerve fibre damage precedes diabetic retinopathy in patients with Type 2 diabetes mellitus,” *Diabet. Med.*, vol. 31, no. 4, pp. 431–438, Apr. 2014, doi: 10.1111/dme.12324.
- [303] M. Tavakoli *et al.*, “Normative Values for Corneal Nerve Morphology Assessed Using Corneal Confocal Microscopy: A Multinational Normative Data Set,” *Diabetes Care*, vol. 38, no. 5, pp. 838–843, May 2015, doi: 10.2337/dc14-2311.
- [304] E. A. C. Sellers, I. Clark, M. Tavakoli, H. J. Dean, J. McGavock, and R. A. Malik, “The acceptability and feasibility of corneal confocal microscopy to detect early diabetic neuropathy in children: a pilot study.,” *Diabet. Med.*, vol. 30, no. 5, pp. 630–1, May 2013, doi: 10.1111/dme.12125.

- [305] S. A. Elhabashy, N. S. Elbarbary, K. M. Nageb, and M. M. Mohammed, “Can optical coherence tomography predict early retinal microvascular pathology in type 1 diabetic adolescents without minimal diabetic retinopathy? A single-centre study.,” *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, vol. 28, no. 1–2, pp. 139–46, Jan. 2015, doi: 10.1515/jpem-2013-0499.
- [306] G. Hirschfeld *et al.*, “Difficulties in screening for peripheral neuropathies in children with diabetes,” *Diabet. Med.*, vol. 32, no. 6, pp. 786–789, Jun. 2015, doi: 10.1111/dme.12684.
- [307] D. Nelson *et al.*, “Comparison of conventional and non-invasive techniques for the early identification of diabetic neuropathy in children and adolescents with type 1 diabetes,” *Pediatr. Diabetes*, vol. 7, no. 6, pp. 305–310, Dec. 2006, doi: 10.1111/j.1399-5448.2006.00208.x.
- [308] B. Urban, D. Raczynska, A. Bakunowicz-Łazarczyk, K. Raczynska, and M. Krętowska, “Evaluation of corneal endothelium in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus.,” *Mediators Inflamm.*, vol. 2013, p. 913754, Jan. 2013, doi: 10.1155/2013/913754.
- [309] K. Musselmann, B. Alexandrou, B. Kane, and J. R. Hassell, “Maintenance of the keratocyte phenotype during cell proliferation stimulated by insulin.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 38, pp. 32634–9, Sep. 2005, doi: 10.1074/jbc.M504724200.
- [310] J.-E. Lee, J. S. Lee, and S. H. Hwang, “Microarray for genes associated with signal transduction in diabetic OLETF keratocytes.,” *Korean J. Ophthalmol.*, vol. 21, no. 2, pp. 111–9, Jun. 2007, doi: 10.3341/kjo.2007.21.2.111.
- [311] E. Nitoda *et al.*, “Correlation of diabetic retinopathy and corneal neuropathy using confocal microscopy.,” *Curr. Eye Res.*, vol. 37, no. 10, pp. 898–906, Oct. 2012, doi: 10.3109/02713683.2012.683507.
- [312] A. Kalteniece *et al.*, “Greater corneal nerve loss at the inferior whorl is related to the presence of diabetic neuropathy and painful diabetic neuropathy,” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-21643-z.
- [313] M. S. Stem *et al.*, “Differential reduction in corneal nerve fiber length in patients with type 1 or type 2 diabetes mellitus,” *J. Diabetes Complications*, vol. 28, no. 5, pp. 658–661, 2014, doi: 10.1016/j.jdiacomp.2014.06.007.
- [314] F. Ishibashi, M. Taniguchi, A. Kosaka, H. Uetake, and M. Tavakoli, “Improvement in neuropathy outcomes with normalizing HbA 1c in patients with type 2 diabetes,” *Diabetes Care*, vol. 42, no. 1, pp. 110–118, Jan. 2019, doi: 10.2337/dc18-1560.
- [315] H. P. N. Scholl *et al.*, “What Is Lost by Digitizing Stereoscopic Fundus Color Slides for Macular Grading in Age-Related Maculopathy and Degeneration?,” *Ophthalmology*, vol. 111, no. 1, pp. 125–132, 2004, doi: 10.1016/j.opthta.2003.05.003.
- [316] M. D. Abramoff, M. Niemeijer, M. S. A. Suttorp-Schulten, M. A. Viergever, S. R. Russell, and

- B. van Ginneken, "Evaluation of a system for automatic detection of diabetic retinopathy from color fundus photographs in a large population of patients with diabetes.," *Diabetes Care*, vol. 31, no. 2, pp. 193–8, Feb. 2008, doi: 10.2337/dc07-1312.
- [317] A. Kaines, I. Tsui, D. Sarraf, and S. Schwartz, "The use of ultra wide field fluorescein angiography in evaluation and management of uveitis.," *Semin. Ophthalmol.*, vol. 24, no. 1, pp. 19–24, 2009, doi: 10.1080/08820530802520095.
- [318] A. Kaines, S. Oliver, S. Reddy, and S. D. Schwartz, "Ultrawide angle angiography for the detection and management of diabetic retinopathy.," *Int. Ophthalmol. Clin.*, vol. 49, no. 2, pp. 53–59, Jan. 2009, doi: 10.1097/IIO.0b013e31819fd471.
- [319] R. E. Coffee, A. Jain, and T. a McCannel, "Ultra wide-field imaging of choroidal metastasis secondary to primary breast cancer.," *Semin. Ophthalmol.*, vol. 24, no. 1, pp. 34–36, 2009, doi: 10.1080/08820530802520194.
- [320] S. P. Shah, A. Jain, I. Tsui, and T. A. McCannel, "Optos Optomap Panoramic 200MA imaging of a serous choroidal detachment responsive to furosemide.," *Semin. Ophthalmol.*, vol. 24, no. 1, pp. 40–42, 2009, doi: 10.1080/08820530802520236.
- [321] S. C. K. Cheng, M. K. H. Yap, E. Goldschmidt, P. G. Swann, L. H. Y. Ng, and C. S. Y. Lam, "Use of the Optomap with lid retraction and its sensitivity and specificity.," *Clin. Exp. Optom.*, vol. 91, no. 4, pp. 373–378, 2008, doi: 10.1111/j.1444-0938.2007.00231.x.
- [322] R. Raman, S. S. Pal, J. S. K. Adams, P. K. Rani, K. Vaitheeswaran, and T. Sharma, "Prevalence and risk factors for cataract in diabetes: Sankara Nethralaya Diabetic Retinopathy Epidemiology and Molecular Genetics Study, report no. 17.," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 51, no. 12, pp. 6253–61, Dec. 2010, doi: 10.1167/iovs.10-5414.
- [323] J. N. Kirkpatrick, A. Manivannan, A. K. Gupta, J. Hipwell, J. V Forrester, and P. F. Sharp, "Fundus imaging in patients with cataract: role for a variable wavelength scanning laser ophthalmoscope.," *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 79, no. 10, pp. 892–899, 1995, doi: 10.1136/bjo.79.10.892.
- [324] A. Neubauer, A. Yu, C. Haritoglou, and M. Ulbig, "Peripheral retinal changes in acute retinal necrosis imaged by ultra widefield scanning laser ophthalmoscopy.," *Acta Ophthalmol. Scand.*, vol. 83, no. 6, pp. 758–60, Dec. 2005, doi: 10.1111/j.1600-0420.2005.00532.x.

10 PUBLIKÁCIÓK

Az értekezés alapjául szolgáló in extenso közlemények, szabadalmak

Közlemények:

E. Deák, E. Szalai, N. Tóth, R.A. Malik, A. Berta, **A. Csutak**

Longitudinal Changes in Corneal Cell and Nerve Fiber Morphology in Young Patients With Type 1 Diabetes With and Without Diabetic Retinopathy: A 2-Year Follow-up Study

Invest. Ophthalmol. Vic. Sci. 1;60(2):830-837, 2019

DOI: 10.1167/iov.18-24516.

IF: 3.812 (2018)

A. Csutak, Z. Steiber, J. Tőzsér, A. Jakab, A. Berta, D.M. Silver

Plasminogen activator activity in tears of pregnant women.

PloS One. 12(5): e0177003, 2017.

DOI: 10.1371/journal.pone.0177003

IF: 2.766

E. Szalai, E. Deák, L. Módis, G. Németh, A. Berta, A. Nagy, E.N. Felszeghy, R. Káposzta, R. A. Malik, **A. Csutak**

Early Corneal Cellular and Nerve Fiber Pathology in Young Patients With Type 1 Diabetes Mellitus Identified Using Corneal Confocal Microscopy.

Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 57 (3), 853-858, 2016.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1167/iov.15-18735>

IF: 3.303

Z. Steiber, J. Tőzsér, D.M. Silver, A. Jakab, G. Németh, A. Berta, **A. Csutak**

Plasminogen activator inhibitor type 2 in human tears and blood during pregnancy.

Int. J. Ophthalmol. Eye Res. 3 (7), 121-125, 2015.

DOI: 10.19070/2332-290X-1500026

Z. Török, T. Pető, É. Csősz, E. Tukacs, Á. Molnár, A. Berta, J. Tőzsér, A. Hajdu, V. Nagy, B. Domokos, **A. Csutak**

Combined methods for diabetic retinopathy screening, using retina photographs and tear fluid proteomics biomarkers.

J. Diabetes Res, 501: Paper 623619. 8 p. 2015.

DOI: 10.1155/2014/623619

IF: 2.431

Z. Török, T. Pető, É. Csősz, E. Tukacs, Á. Molnár, Z. Maros-Szabó, A. Berta, J. Tőzsér, A. Hajdu, V. Nagy, B. Domokos, **A. Csutak**

Tear fluid proteomics multimarkers for diabetic retinopathy screening.

BMC Ophthalmol. 13 (1), 2013.

DOI:10.1186/1471-2415-13-40

IF: 1.075

É. Csősz, P. Boross, **A. Csutak**, A. Berta, F. Tóth, S. Póliska, Z. Török, J. Tőzsér
Quantitative analysis of proteins in the tear fluid of patients with diabetic retinopathy.

Journal of Proteomics.75 (7), 2196-2204, 2012.

DOI: 10.1016/j.jprot.2012.01.019

IF: 4.088

A. Csutak, D.M. Silver, T. Sperka, J. Kádas, G. Vereb, A. Berta, J. Tőzsér

Urokinase down-regulation by aprotinin in rabbit corneal cells after photorefractive keratectomy.

Curr. Eye Res.35 (9), 806-811, 2010.

DOI: 10.3109/02713683.2010.490319

IF: 1.36

A. Csutak, D. M. Silver, J. Tőzsér, Z. Steiber, P. Bagossi, Z. Hassan, A. Berta

Plasminogen activator inhibitor in human tears after laser refractive surgery.

J. Cataract. Refract. Surg.34 (6), 897-901, 2008.

DOI: 10.1016/j.jcrs.2008.02.024

IF: 2.508

A. Csutak, D.M. Silver, J. Tőzsér, A. Berta

Wound Healing, Haze and Urokinase Plasminogen Activator After Laser Vision Correction Surgery.

Johns Hopkins APL Tech. Dig.27 (2), 198-207, 2007.

IF: 0.132

A. Csutak, D.M. Silver, J. Tőzsér, Z. Hassan, A. Berta

Urokinase-Type Plasminogen Activator to Prevent Haze after Photorefractive Keratectomy, and Pregnancy as a Risk Factor for Haze in Rabbits.

Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.45 (5), 1329-1333, 2004.

DOI: 10.1167/iovs.03-0881

IF: 3.577

Szabadalmak:

J. Tőzsér, G. Miklóssy, A. Berta, **A. Csutak**

Cím: Rekombináns plazminogén aktivátor inhibitor-2 fúziós fehérje előállítása és szemcseppként történő alkalmazása korneális szaruhártya fekélyek gyógyításában

Ügyszám: P0700769

Benyújtás éve: 2007.-Közzététel éve:2009

A szerzők kontribúciója azonos mértékű

J. Tőzsér, A. Berta, **A. Csutak**, G. Miklóssy

Cím: Use of urokinase type plasminogen activator inhibitors for the treatment of corneal disorders

Elsőbbségi év: 2007. Benyújtás éve: 2008.

Közzététel éve: 2012. Közzététel száma: EP2224949B1

Lajstromszám: Ep 2224949

A szerzők kontribúciója azonos mértékű

Az értekezésben nem szereplő in extenso közlemények

Egyetemi doktori (PhD fokozat) megszerzése utáni in extenso közlemények

Sokszerzős vagy csoportos szerzőségű szakcikk

T2347 Study Group* (Kollaborációs szervezet) ; Aptel, Florent* ; Pfeiffer, Norbert ; Schmickler, Stefanie ; Clarke, Jonathan ; Lavín-Dapena, Cosme ; Moreno-Montañés, Javier ; Żarnowski, Tomasz ; **Csutak, Adrienne** ; Jugaste, Tiia et al. Non-inferiority of Preservative-free versus BAK-preserved Latanoprost-timolol Fixed Combination Eye Drops in Patients with Open-angle Glaucoma or Ocular Hypertension

J Glaucoma 28 : (6) pp. 498-506. , 9 p. 2019

DOI: 10.1097/IJG.0000000000001248

IF: 1.661

Összefoglaló cikk:

Csosz, E ; Kallo, G ; Markus, B ; Deak, E ; **Csutak, A** ; Tozser, J

Quantitative body fluid proteomics in medicine - A focus on minimal invasiveness.

J Proteomics pp. 30-43. , 14 p. 2017

DOI: 10.1016/j.jprot.2016.08.009

IF: 3.722

A Berta, E Tóth-Molnár, **A. Csutak**

Új nemzetközi konszenzusnyilatkozat a száraz szem definíciójáról, felosztásáról, etiológiájáról, diagnosztikájáról és terápiájáról

Orvosi Hetilap 159 : (20) pp. 775-785. , 11 p. 2018

IF: 0.564

Szakcikk:

É. Csász, E. Deák, N. Tóth, C.E. Traverso, **A. Csutak***; J. Tózsér*

*azonos kontribúció

Comparative analysis of cytokine profiles of glaucomatous tears and aqueous humour reveals potential biomarkers for trabeculectomy complications

Febs Open Bio 9 : (5) pp. 1020-1028. , 9 p. 2019

DOI: 10.1002/2211-5463.12637

IF: 1.959 (2018)

A. Csutak, N. Tóth

A száraz szem és a szisztémás betegségek közötti kapcsolat

Háziorvos továbbképző szemle 23 pp. 15-19., 5 p, 2018

É. Csősz, N. Tóth, E. Deák, **A. Csutak***, J. Tőzsér*

*azonos kontribúció

Wound-Healing Markers Revealed by Proximity Extension Assay in Tears of Patients following Glaucoma Surgery

International Journal of Molecular Sciences 19 : (12) Paper: 4096 , 19 p. 2018

DOI: 10.3390/ijms19124096

IF: 4.183

L. Csicsik, T. J. MacGillivray, E. Flynn, E. Pellegrini, G. Papanastasiou, N. Barzegar-Befroei, **A. Csutak**, A.C. Bird, C. W. Ritchie, T. Pető et al.

Peripheral Retinal Imaging Biomarkers for Alzheimer's Disease: A Pilot Study

Ophthalmic Research 59 : (4) pp. 182-192. , 11 p. 2018

DOI: 10.1159/000487053

IF:1.685

B. Antal, M.K.G.S. Tavares, L. Kovács, B. Harangi, I. Lázár, B. Nagy, Gy. Kovács, J. Szakács, J. Tóth, T. Pető, **A. Csutak**, A. Hajdu.

Data analysis applied to diabetic retinopathy screening: performance evaluation

Annales Mathematicae et informaticae 49 pp. 3-9. , 7 p. 2018

DOI: <http://doi.org/10.33039/ami.2018.10.002>

Orosz, O ; Rajta, I ; Vajas, A ; Takacs, L; **Csutak, A** ; Fodor, M ; Kolozsvari, B ; Resch, M ; Senyi, K ; Lesch, B et al. Myopia and Late-Onset Progressive Cone Dystrophy Associate to LVAVA/MVAVA Exon 3 Interchange Haplotypes of Opsin Genes on Chromosome X 40. 41. 42. 43. 44. 45.

Investigative Ophthalmology and visual science 58 : (3) pp. 1834-1842. , 9 p. 2017

DOI: 10.1167/iovs.16-21405

IF: 3.388

Kasza, M; Meleg, J ; Vardai, J ; Nagy, B Jr ; Szalai, E ; Damjanovich, J ; **Csutak, A** ; Ujhelyi, B ; Nagy, V

Plasma E-selectin levels can play a role in the development of diabetic retinopathy

Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology 255 pp. 25-30. , 6 p. 2017

DOI: 10.1007/s00417-016-3411-1

IF: 2.249

É. Csősz, E. Deák, G. Kalló, **A. Csutak**, J. Tőzsér

Diabetic retinopathy: Proteomic approaches to help the differential diagnosis and to understand the underlying molecular mechanisms.

J Proteomics. 6;150:351-358, 2017

DOI: 10.1016/j.jprot.2016.06.034

IF: 3.722

Zs. Balogh, M. Kasza, J. Várdai, I. Reznek, J. Damjanovich, **A. Csutak**, A. Berta, V. Nagy
Analysis of optic disc damage by optical coherence tomography in terms of therapy in non-arteritic
anterior ischemic optic neuropathy

International Journal of Ophthalmology (English version) 9 : (9) pp. 1352-1354. , 3 p. 2016

DOI: 10.18240/ijo.2016.09.20

IF: 1.177

D. Pásztor, B. L. Kolozsvári, **A. Csutak**, A. Berta, H. Ziad, B. Kettesy, P. Gogolák, M.
Fodor: Scheimpflug Imaging Parameters Associated with Tear Mediators and Bronchial Asthma in
Keratoconus.

J. Ophthalmol. 2016; 2016:9392640. Epub 2016 Jan 12. DOI: 10.1155/2016/9392640.

IF: 1.712

D. Pásztor, B. L. Kolozsvári, **A. Csutak**, A. Berta, Z. Hassan, B. Ujhelyi, P. Gogolák, M. Fodor
Tear Mediators in Corneal Ectatic Disorders.

PLoSOne.11 (4), e0153186-, 2016.

DOI: 10.1371/journal.pone.0153186

IF: 2.806

I. Lengyel, **A. Csutak**, D. Florea, I. Leung, A. C. Bird, F. Jonasson, T. Pető

A Population Based Ultra-Widefield Digital Image Grading Study for AMD-like Lesions at the
Peripheral Retina.

Ophthalmology.122 (7), 1340-1347, 2015.

IF: 6.750

G. Kalló, A. Chatterjee, M. Tóth, É. Rajnavölgyi, **A. Csutak**, J. Tőzsér, É. Csősz:
Relative quantification of human beta-defensins by a proteomics approach based on
selected reaction monitoring.

Rapid Commun. Mass Spectrom.29 (18), 1623-1631, 2015.

IF: 2.226

M. Kasza, Z. Balogh, L. Bíró, B. Ujhelyi, J. Damjanovich, **A. Csutak**, J. Várdai, A. Berta, V. Nagy:
Vascular endothelial growth factor levels in tears of patients with retinal vein occlusion.

Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.253, 1581-1586, 2015.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00417-015-3030-2>

IF: 1.991

V. Nagy, Z. Balogh, M. Kasza, B. Ujhelyi, **A. Csutak**, I. Reznek, J. Damjanovich, A. Berta, G.
Pfliegler

Cardiovascular and thrombophilic risk factors in retinal vein occlusion.
Exp. Clin. Cardiol.20 (1), 238-244 (2014), 2014.

V. Nagy, B. L. Kolozsvári, Z. Balogh, **A. Csutak**, M. Kasza, B. Nagy, L. Kardos, A. Berta, G. Pfliegler
Increased level of platelet P-selectin in nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy.
Graefes Arch. Clin. Exper. Ophthalmol.251 (3), 917-922, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00417-012-2196-0>
IF: 2.333

G. Németh, Z. Hassan, **A. Csutak**, E. Szalai, A. Berta, L. Módos: Repeatability of ocular biomechanical data measurements with a Scheimpflug-based noncontact device on normal corneas.
J. Refract. Surg.29 (8), 558-563, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3928/1081597X-20130719-06>.
IF: 2.781

B. Antal, A. Hajdu, Z. Maros-Szabó, Z. Török, **A. Csutak**, T. Pető: A two-phase decision support framework for the automatic screening of digital fundus images.
J. Comput. Sci.3 (5), 262-268, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jocs.2012.01.001>

Csutak, A. Biró, F. Salló, T. Pető
Képelemző centrumok működése és jelentősége a szemészeti kórképek standard elemzésében és a klinikai gyógyszerkutatásban.
Szemészet.149 (2), 68-74, 2012.

F. Salló, **A. Csutak**, L. Kolozsvári, T. Pető
Az időskori maculadegeneráció etiológiája.
Szemészet.147 (3-4), 121-125, 2010.

S. Benkő, J. Tózsér, G. Miklóssy, A. Varga, J. Kádas, **A. Csutak**, A. Berta, É. Rajnavölgyi
Constitutive and UV-B modulated transcription of Nod-like receptors and their functional partners in human corneal epithelial cells.
Mol. Vis.14 (187-188), 1575-1583, 2008.
IF: 2.464

P. Pagani, G. Campanile, **A. Csutak**, G. Bricola, C. E. Traverso
A fibrin-based substrate for in vitro reconstruction of cultured corneal endothelial cells.
Minerva Biotechnol.18 (3), 129-135, 2006.
IF: 0.396

Z. Lampé, L. Békési, **A. Csutak**, A. Berta
Two cases of Terrien's marginal degeneration treated with peripheral full thickness keratectomy, and followed-up by computer- assisted corneal topography.

Klin. Monatsbl. Augenheilkd.220 (6), 404-410, 2003.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-2003-40271>

IF: 0.495

További tudományos mű:

N. Tóth, **A. Csutak**, Z. Hassan, E. Deák, L. Módis, G. Németh

Comparing Refractive and Scheimpflug-image Based Parameters between Right and Left Eyes and between Dominant and Non-dominant Eyes Related to Handedness

Ophthalmology Research: An International Journal 9 : (3) Paper: OR.46026 , 8 p. (2018)

DOI: 10.9734/OR/2018/46026

Könyvfejezet:

Berta, András ; **Csutak, Adrienne**

Diabeteses retinopathia In: Leövey, A; Nagy, VE; Paragh, Gy; Rácz, K (szerk.)

Az endokrin és anyagcsere-betegségek gyakorlati kézikönyve Budapest, Magyarország : Medicina Könyvkiadó Zrt., (2017) pp. 576-580. , 5 p.

Csutak, Adrienne ; Tóth, Noémi

Gyulladt száraz szem

In: Berta, András; Csutak, Adrenne; Kolozsvári, Bence; Módis, László (szerk.)

A száraz szem kezelése

Budapest, Magyarország : Baush & Lomb (HU), (2017) pp. 4-11. , 8 p.

Konferenciaközlemény:

Renato, Besenczi ; Kristof, Szitha ; Balazs, Harangi ; Adrienne, Csutak ; Andras, Hajdu Automatic Optic Disc and Optic Cup Detection in Retinal Images Acquired by Mobile Phone In: Loncaric, S; Lerski, D; Eskola, H; Bregovic, R (szerk.) ISPA 2015 : 9th International Symposium on Image and Signal Processing and Analysis Zagreb, Croatia, September 7-9, 2015 Zagreb, Horvátország : Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc., (2015) pp. 193-198. , 5 p.

Antal, I. Lázár, A. Hajdu, Z. Török, **A. Csutak**, T. Pető

Evaluation of the grading performance of an ensemble-based microaneurysm detector.

In: Conference proceedings: Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Boston, MA, 5943-5946, 2011.

B. Antal, I. Lázár, A. Hajdu, Z. Török, **A. Csutak**, T. Pető

A multi-level ensemble-based system for detecting microaneurysms in fundus images.

In: Soft Computing Applications (SOFA), 2010

4th International Workshopon, Arad, Románia, 137-142, 2010.

B. Antal, A. Hajdu, **A. Csutak**, T. Pető

A two-phase pre-filtering approach to the automatic screening of digital fundus images.

In: 5th International Conference on Signal Processing and Multimedia Applications: SIGMAP 2010, Athén, Görögország, 155-158, 2010.

B. Harangi, R. J. Qureshi, **A. Csutak**, T. Pető, A. Hajdu

Automatic Detection Of The Optic Disc Using Majority Voting In A Collection Of Optic Disc Detectors. Proc. IEEE Int. Symp. Biomed. Imaging. 1329-1332, 2010.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1109/ISBI.2010.5490242>

Hajdu, A ; Peto, T ; Biro, A ; Harangozo, R ; Hulvely, J ; Torok, Z ; **Csutak, A**

Extracting Metadata from Fundus Images for the Screening of Diabetic Retinopathy In: IEEE (szerk.) WISP 2009 : IEEE International symposium on Intelligent Signal Processing New York (NY), Amerikai Egyesült Államok : IEEE, (2009) pp. 259-263. , 5 p.

Egyetemi doktori (PhD fokozat) megszerzése előtti in extenso közlemények

A. Csutak, D.M. Silver, J. Tőzsér, A. Facskó, A. Berta

Plasminogen activator activity and inhibition in rabbit tears after photorefractive keratectomy. Exp. Eye Res. 77 (6), 675-680, 2003.

DOI: 10.1016/j.exer.2003.08.012

IF: 2.611

A. Csutak, J. Tőzsér, Z. Hassan, D.M. Silver, A. Berta

A plazminogén aktivátor aktivitás változásának jelentősége a könnyben fotorefraktív excimer lézerkezelés (PRK) után.

Szemészet. 139 (1), 61-65, 2002.

A. Csutak, J. Tőzsér, Z. Hassan, D.M. Silver, A. Berta

Fotorefraktív excimer lézerkezelést (PRK) követő corneális stromahomályok.

Endosc. Minim. Invazív Ter. 5 (2), 19-22, 2002.

L. Módis, G. Németh, L. Takács, **A. Csutak**, B. Kettesy, A. Berta

Corneakonzerváló folyadékok összehasonlító vizsgálata.

Szemészet. 138 (1), 5-10, 2001.

A. Csutak, J. Tőzsér, L. Békési, Z. Hassan, A. Berta, D.M. Silver

Plasminogen activator activity in tears after excimer laser photorefractive keratectomy.

Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 41 (12), 3743-3747, 2000.

IF: 4.373

L. Takács, **A. Csutak**, E. Balázs, L. Módis, A. Berta

Expression of beta IG-H3 is lower than normal in keratoconus corneas but in creases with scarring.
Cornea.18 (5), 599-605, 1999.

IF: 1.198

L. Takács, **A. Csutak**, E. Balázs, A. Berta

Immunohistochemical detection of beta IG-H3 in scarring human corneas.

Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.237 (7), 529-534, 1999.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s004170050275>

IF: 1.177

Feltalálói tevékenységhez kapcsolódó egyes iparjogvédelmi eljárások



DEBRECENI EGYETEM KUTATÁSHASZNOSÍTÁSI ÉS TECHNÓLOGIATRANSZFER KÖZPONT

Csutak Adrienne

feltalálói tevékenységéhez kapcsolódó egyes iparjogvédelmi eljárások

Magyar szabadalmi bejelentések (Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala, SZTNH)

BERTA A, CSUTAK A, SPERKA T, TŐZSÉR J

Cím: Eljárás és kit a fibrinolitikus rendszer állapotának mérésére

Ügyszám: P0600891

Benyújtás éve: 2006. – Közzététel éve: 2008.

TŐZSÉR J, MIKLÓSSY G, BERTA A, CSUTAK A

Cím: Rekombináns plazminogén aktivátorinhibitor-2 fúziós fehérje előállítása és szemcseppként történő alkalmazása korneális szaruhártya fekélyek gyógyításában

Ügyszám: P0700769

Benyújtás éve: 2007. – Közzététel éve: 2009.

TŐZSÉR J, BERTA A, CSUTAK A

Cím: Peptidaldehid inhibitor használata a szem elülső szegmentjében lejátszódó urokináz mediálta proteolitikus degradációs folyamatok blokkolására

Ügyszám: P0700770.

Benyújtás éve: 2007. – Közzététel éve: 2009.

Európai szabadalmi bejelentések (European Patent Office, EPO)

SILVER DM, CSUTAK A, BERTA A, TŐZSÉR J

Cím: Plasminogen activator to prevent corneal and subepithelial haze after laser vision correction surgery

Elsőbbségi év: 2000. Benyújtás éve: 2001.

Közzététel éve: 2009. Közzététel száma: EP1324767 B1

Lajstromszám: EP 1324767

BERTA A, CSUTAK A, SPERKA T, TŐZSÉR J

Cím: Process and kit for measuring the condition of the fibrinolytic system

Elsőbbségi év: 2006. Benyújtás éve: 2007.

Közzététel éve: 2009. Közzététel száma: EP2097011 A2

TOZSER J, BERTA A, CSUTAK A, MIKLOSSY G

Use of urokinase type plasminogen activator inhibitors for the treatment of corneal disorders

Elsőbbségi év: 2007. Benyújtás éve: 2008.

Közzététel éve: 2012. Közzététel száma: EP2224949 B1

Lajstromszám: EP 2224949



DEBRECENI EGYETEM
KUTATÁSHASZNOSÍTÁSI ÉS
TECHNOLÓGIATRANSZFER KÖZPONT

USA-beli szabadalmi bejelentések (US Patent and Trademark Office, USPTO)

SILVER DM, CSUTAK A, BERTA A, TŐZSÉR J
Plasminogen activator to prevent corneal and subepithelial haze after laser vision correction surgery
Elsőbbségi év: 2000. Benyújtás éve: 2001.
Közzététel éve: 2007. Közzététel száma: US7179461 B2
Lajstromszám: US Patent 7,179,461

SILVER DM, CSUTAK A
Method and apparatus for reducing visual aberrations
Bejelentés száma: US 11/497,063
Elsőbbségi év: 2005. Benyújtás éve: 2006.
Közzététel éve: 2007. Közzététel száma: US20070025118 A1
Lajstromszám: US Patent 7,455,408

BERTA A, CSUTAK A, SPERKA T, TŐZSÉR J
Process and kit for measuring the condition of the fibrinolytic system
Bejelentés száma: US 12/474,705
Elsőbbségi év: 2006. Benyújtás éve: 2009.
Közzététel éve: 2010. Közzététel száma: US20100068745 A1

TŐZSÉR J, BERTA A, CSUTAK A, MIKLÓSSY G
Use of urokinase type plasminogen activator inhibitors for the treatment of corneal disorders
Bejelentés száma: US 12/745,165
Elsőbbségi év: 2007. Benyújtás éve: 2008.
Közzététel éve: 2011. Közzététel száma: US20110028397 A1

A fenti adatok megegyeznek a Debreceni Egyetemen vezetett szabadalmi nyilvántartás adataival és az interneten elérhető publikus szabadalmi adatbázisok (EPO, USPTO) adataival.
A lista nem tartalmazza a szabadalmi bejelentések / szabadalmi oltalmak státuszát.

Dr. Bene Tamás
központvezető



Debrecen, 2016. június 27.

MTMT tudománymetriai adatok

Csutak Adrienne tudományos és oktatási közleményeinek összefoglalása
MTA V. Orvostudományi Osztály (2020.07.02)

Tudományos és oktatási közlemények	Szám		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Folyóiratcikk²	45	---	---	---
szakcikk nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű	---	35	414	485
szakcikk, hazai idegen nyelvű	---	1	0	0
szakcikk, magyar nyelvű	---	6	1	1
szakcikk, sokszerzős, érdemi szerzőként ³	---	1	1	1
összefoglaló közlemény	---	2	27	31
rövid közlemény	---	0	0	0
II. Könyv	1	---	---	---
a) Szakkönyv, kézikönyv, tankönyv szerzőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv	---	0	0	0
b) Szakkönyv, kézikönyv, konferenciakötet, tankönyv szerkesztőként	1	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	---	---
magyar nyelvű	---	1	---	---
bb) Felsőoktatási tankönyv	---	0	---	---
III. Könyvrészlet	2	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	2	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet	---	0	0	0
IV. Konferenciaközlemény⁴	6	---	42	53
Oktatási közlemények összesen (II.aa.bb-III.cc)	---	0	0	0
Tudományos közlemények összesen (I-IV.)	---	54	485	571
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)	54	---	485	571
V. További tudományos művek	17	---	---	---
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikket és a nem ismert lektoráltsági folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikket is	---	4	0	1
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	0	0	0
Olthalmak, szabadalmak	---	13	0	0
VI. Hivatkozott absztraktok⁵	1	---	1	1
Összes hivatkozás¹	---	---	486	573
Hirsch index⁶	16	---	---	---
g index⁶	24	---	---	---

Speciális tudománymetriai adatok	Száma	Összes hivatkozás
Első szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	12	74
Utolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	9	96
A tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (2002) teljes tudományos folyóiratcikkek száma	39	467
Az utolsó 10 év (2010 - 2020) tudományos, teljes, lektorált tudományos folyóiratcikkeinek száma	32	403
A legmagasabb hivatkozottságú közlemény hivatkozásainak száma (az összes hivatkozás százalékában)	96	16,75%
Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben	---	105
Jelentés, guideline	0	0
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő ⁷	0	0

Megjegyzések:

1. a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli, a WoS és/vagy Scopus rendszerben nyilvántartott adatok
2. lektorált, tudományos folyóiratban
3. a szerző írásban nyilatkozik, hogy érdemi szerzői hozzájárulásával készültek szerzőként jegyzett közleményei, és az érdemi hozzájárulást dokumentálni tudja
4. konferenciaközlemény folyóiratban, könyvben vagy egyéb konferenciakötetben
5. nem-hivatkozott absztrakt itt nem kerül az összesítésbe
6. a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli összes hivatkozással számolva. A Hirsch és a g index definíciója
7. közreműködés esetén a csoportos szerzőségű közlemények hivatkozottsága külön értékelendő, és nem számítható be az összesített hivatkozások közé

n.a. = nincs adat

Készült: 2020. július 2. 11:41