

Manuális és femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomiával eltávolított lencsetok szövet vizsgálata

Doktori (PhD) értekezés



DR. SÜKÖSD ANDREA KRISZTINA

Klinikai Idegtudományi Doktori Iskola

Témavezető: Prof. Dr. Biró Zsolt, egyetemi tanár, MTA doktora

Társtémavezető: Dr. Ábrahám Hajnalka, egyetemi docens

Doktori Iskola vezető: Prof. Dr. Komoly Sámuel, MTA doktora

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Pécs, 2021

BEVEZETÉS

A látás folyamatában központi szerepet játszik a szemlencse. Ahhoz, hogy ezen szerepét betölthesse, a lencsének átlátszónak kell lennie, és képesnek kell lennie a gyors alakváltoztatásra, amikor a közeli és távoli tárgyakra fókuszál. Ugyanakkor a szemlencse a kor előrehaladtával több változáson megy át, melynek végstádiuma az időskori szürkehályog kialakulása. A szemlencse metabolikus zavara miatt fényáteresztő képessége csökken (szürkehályog), és az egyetlen kezelési lehetősége az elhomályosodott szemlencse műtéti eltávolítása és a megfelelő műlencse beültetése. A megbetegedett szemlencse eltávolítása hagyományos módon phacoemulsificációs technikával történik, amit az egyik legbiztonságosabb és legsikeresebb műtétnek tartanak világszerte. Emellett, a phacoemulsificatio megjelenése óta, a szürkehályog-műtét hatalmas fejlődésen esett át.

Az elülső lencsetokon egy nyílás képzése (capsulotomia, CCC), rutin és ugyanakkor kritikus-fontos lépésnek számít a szürkehályog-műtétben. Két típusú CCC-t különíthetünk el: (1) a manuális capsulotomiás nyílás képzése alatt az elülső lencsetok egy részének eltávolítása a lencsetok kézi húzása révén valósul meg. Ezzel szemben a (2) femtoszekundumos lézer-asszisztált CCC esetén az elülső lencsetokon a folyamatos, kör alakú capsulotomiás nyílás lézer segítségével alakítható ki. A műtétnek hármas célja van: a látóélesség gyors és jelentős javítása, refraktív hibák korrigálása, valamint esetenként az akkomodációs képesség helyreállítása. Bár a hagyományos phacoemulsificációs technika továbbra is biztonságos és sikeres műtétnek számít, a femtoszekundumos lézer-asszisztált szürkehályog műtét nagyobb precizitást és stabilitást biztosít a műtét egyes lépéseiben.

A posztoperatív hátsó tok fibrosis (PCO), az extracapsularis szürkehályog eltávolítás után visszamaradt reziduális epithelsejtek migrációja és proliferációja révén alakul ki. Ezen reziduális epithelsejteknek megmarad a proliferációs képességük, és csoportosulnak. Az így kialakult Elschnig gyöngyök, mivel a hátsó lencsetok optikai tengelyében helyezkednek el, látási panaszokat okoznak a fény szórása miatt.

A PCO a leggyakoribb posztoperatív komplikáció capsulotomiát követően, azonban a PCO incidenciájával kapcsolatban megoszlanak az álláspontok. Bár a PCO megjelenését tekintve a lézer-asszisztált műtét enyhén, de nem szignifikánsan jobb, mint a manuális capsulotomia, a femtoszekundumos lézer használata együtt járhat a PCO rizikójának emelkedésével.

A legtöbb olyan klinikai tanulmány, amely a manuális és a lézer-asszisztált műtétet hasonlítja össze, a vágási felszínre, vagy a folyamatos kör alakú capsulorhexis azon paramétereire összpontosít, amely az intraocularis műlencse centrálására hatással lehet. Kevés ismeretünk van arról, hogy a szemlencse epithelsejtjeiben milyen változások történnek CCC után a két műtéti technika esetében. Az eddigi vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy az eltávolított elülső lencsetok vágási felszínén elhelyezkedő epithelsejtek eltérően érintettek femtoszekundumos lézer-asszisztált, illetve manuális capsulotomiás nyílás kialakításakor. Az elülső lencsetok vágási felszíne mentén elhelyezkedő epithelsejtek vizsgálatakor (TUNEL eljárás) több apoptotikus jelet mutató sejtet találtak lézer-asszisztált CCC esetén, mint manuális capsulotomiás nyílás kialakításakor.

Feltételezhetjük, hogy nem csak az elülső lencsetok vágási felszíne mentén jönnek létre változások az epithelsejtekben, hanem a vágás helyétől távolabb elhelyezkedő sejtek is eltérő módon lehetnek érintettek manuális, illetve femtoszekundumos lézer-asszisztált capsulotomia esetén.

Valószínű, hogy az elülső lencsetok eltávolításakor létrejött mechanikai károsodás hozzájárul a PCO kialakulásához, a reziduális epithelsejtek dedifferenciálódása és megnövekedett proliferációja révén. Feltételezésünk szerint a manuális és a femtoszekundumos lézer-asszisztált capsulotomia eltérő mértékű károsodást hoz létre az epithelsejtekben. Ugyanakkor, a fent említett káros hatást nem tudjuk közvetlenül tanulmányozni az emberi reziduális epithelsejtekben. Mintegy alternatívaként, az eltávolított elülső lencsetok epithelsejtjeit tanulmányozva információt kaphatunk arról is, hogy milyen változások jelennek meg a lencsetok reziduális epithelsejtjeiben. Ezért ebben a tanulmányban a fénymikroszkópos és ultrastrukturális morfológiai változásokat térképeztük fel, az eltávolított elülső lencsetok epithelsejtek sejtmagjára és citoplazmájára összpontosítva. Emellett a sejtproliferáció és az apoptózis folyamatában fontos gének expresszióját is vizsgáltuk.

Jól ismert, hogy minden műtéti beavatkozás változásokat idéz elő az érintett sejtek szintjén. Mechanikai stressz következtében különböző molekuláris útvonalak aktiválódnak. Bizonyos citokinek, mint például az IL-6 és IL-8 génjeinek expressziója, a mechanikai károsodás miatt fellépő stressz indukálta jelátviteli utak eredményeként eltérőek lehetnek, a két műtéti technika esetén. Más jelátviteli útvonalak aktiválódása révén, a mechanikai stressz miatt a citoskeleton szerkezete, pl. az aktin hálózat is megváltozhat. Feltételezésünk szerint a manuális és a femtoszekundumos lézer-asszisztált CCC eltérő mértékű károsodást hoz létre a citoskeleton szerkezetében. Ezért, az eltávolított elülső lencsetok epithelsejtjeiben megjelenő változásokat hasonlítottuk össze femtoszekundumos lézer-asszisztált és manuális capsulotomia

esetén, különös tekintettel a citoszkeletális változásokra. Az eltávolított elülső lencsetok epithelsejtjeiben megvizsgáltuk az aktin filamentumok mintázatát, valamint az intermedier filamentumok közé tartozó gliális fibrilláris savanyú fehérjét (GFAP), melyet jellegzetesen az éretlen lencsetok hámsejtek termelnek. Ismert, hogy káros hatásokra (pl. mechanikai károsodás, sérülés, stb.) azon fehérjék, amelyek jellemző módon az embrionális fejlődés során jelennek meg, ismét emelkedett expressziót mutathatnak a különböző szervekben, beleértve a szemet is. Ezért, feltételezzük, hogy a GFAP újra expresszálódik az elülső lencsetok epithelsejtjeiben. Más sejtekben, mint például az asztrocitákban, a GFAP valamint a glutamin szintetáz (GS) kolokalizálódik. A szemlencse epithelsejtjeiben GS-szerű fehérje, legsin van jelen, ami kimutatható GS ellenes antitestekkel. A legsin nagy mértékben expresszálják a szemlencse epithelsejtjei, de ezen expresszió csökken az időskori szürkehályog kialakulásakor. A legsin expresszióval kapcsolatos pontosabb ismeretek érdekében GS elleni antitesteket használtunk.

CÉLKITŰZÉS

Munkánk során manuális, illetve femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomia módszerével eltávolított elülső lencsetok szöveteket vizsgáltunk.

Vizsgálni kívántuk:

1. a manuális, illetve femtoszekundumos lézerrel végzett elülső lencsetok eltávolítás esetén a műtéti beavatkozás következtében kialakuló főbb strukturális, degeneratív elváltozásokat fény- és elektronmikroszkóppal.
2. a fény- és elektronmikroszkóppal megfigyelhető szövettani eredmények molekuláris biológiai hátterét. Ennek során az epithelsejtek túlélésére-, és sejthalálra-, illetve a gyulladásra jellemző paramétereket vizsgáltuk.
3. a manuális, illetve femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomia módszerével eltávolított elülső lencsetok sejtek citoszkeletonjában megfigyelhető változásokat.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Minták

Pécsi Tudományegyetem Szemészeti Klinikájának és a Budapesti Optimum Látásjavító Lézerközpont 2014 és 2019-es beteg-anyagából nyert mintákat használtuk. A vizsgálatokat az intézményi Etikai Bizottság engedélyével (Pécsi Tudományegyetem, 5426) végeztük. Ezen kívül a betegek írásban nyilatkoztak arról, hogy az eltávolított lencsetokon a műtét után további vizsgálatokat folytassunk. Manuális és femtoszekundumos lézerrel (VICTUS® Femtosecond Laser, Bausch + Lomb, USA) eltávolított elülső lencsetok szövet epithelsejtjeit tanulmányoztuk (n=110). Az egyes módszerekkel történt vizsgálatokra felhasznált minták számát az 1. táblázat tartalmazza. A femtoszekundumos lézer használatakor a következő paraméterek érvényesültek: 7,2 μ J lézer energia, 6 μ m góc távolság, 4 μ m góc átmérő, 400-550 femtoszekundumos pulzushossz.

1. Táblázat: A kísérletben felhasznált minták

Módszerek	Femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomiával nyert minták száma	Manuálisan eltávolított elülső lencsetokok száma
Szövettani vizsgálat	n=16	n=29
Molekuláris biológiai vizsgálat	n=10	n=10
Immunfluoreszcens vizsgálat	n=11	n=14
Aktin citoskeleton vizsgálat	n=5	n=5
Sejttenyésztés	n=5	n=5

Szövettani vizsgálat

Fénymikroszkópia és transzmissziós elektronmikroszkópia

Szürkehályog műtét során frissen kivett lencsetokokat 2%-os formaldehid és 2,5 %-os glutaraldehid fixálóban tároltuk (foszfát puffer 0,1M pH= 7.4, FP) 24 órán át 4°C-on. Ezután mostuk, majd FP-ben oldott 1%-os ozmium tetroxidban 30 percig szobahőmérsékleten fixáltuk. Ezt követően az elülső lencsetokokat emelkedő koncentrációjú alkoholsorban víztelenítettük. Víztelenítést követően rövid mosás (2x2 perc), és propilén-oxid kezelés következett, majd a mintákat Durcupán ACM gyantába ágyasztuk be (Sigma Aldrich, Budapest, Magyarország). A beágyazott mintákból Leica Ultracut R ultramikrotómmal 700 nm vastag félvékony metszeteket metsztünk, melyeket tárgylemezre helyeztünk és toluidin kézzel festettük (Sigma Aldrich, Budapest, Magyarország), majd fénymikroszkóp segítségével vizsgáltuk (Olympus BX 50 mikroszkóp). Ezek mellett ultra-vékony metszeteket készítettünk, melyeket rácscsokrácsra vettünk fel, majd uranil-acetáttal és ólom-citráttal kontrasztosítottuk és JEOL JEM 1200EX

transzmissziós elektronmikroszkóp (TEM) segítségével vizsgáltuk. A metszetekről digitális képek készültek iTEM software (Olympus, Japán) segítségével.

Kvantifikáció

A degenerálódott sejtek kvantifikálását a 700 nm vastag félvékony metszeteken végeztük, Olympus BX 50 mikroszkóp (40x-es nagyítás) segítségével. Mindegyik minta minimum 10 mérési blokkot tartalmazott, majd az adatokat Graphpad prism 5,03 program segítségével dolgoztuk fel. Az adatok statisztikai elemzésére Student-t próbát használtunk. Statisztikailag szignifikánsnak azokat az eredményeket fogadtuk el, ahol $p \leq 0,05$. Az eredmények átlagát \pm SEM (standard error mean) értékét mutatjuk.

Molekuláris biológiai vizsgálat

Génexpresszió vizsgálata reverz transzkriptáz-polimeráz láncreakció segítségével

A vizsgált elülső lencsetokokból az össz mRNS-t izoláltuk a NucleoSpin RNA Kit (Macherey-Nagel) protokollja szerint, majd cDNS-t szintetizáltunk a High Capacity cDNA Kit (Life Technologies) alapján. Ezt követően qPCR módszerrel, a StepOnePlusTm and Real Time PCR System (Life Technologies) segítségével vizsgáltuk a PCR termékeket ciklusonként. A fent leírt reakciónál az elegy végső térfogata 20 μ l, amely a következő elemeket tartalmazta: 1 μ l minden primerből (végső koncentráció 500-500 nmol/L) és 10 μ l 2x SensiFAST SYBR Hi-ROX master mix (Bioline Reagents Ltd.). A következő primer párokat használtuk: p53, Bcl-2, cyclin D1, IL-6, IL-8. Minden relatív termék mennyiséget a StepOne Software és a Livak analitikai metódus segítségével határoztuk meg. A β -actint használtuk belső kontrollnak.

A génexpresszió változásokat a 2(-ddCT) módszerrel kvantifikáltuk. A PCR görbe kiértékelése és kvantifikálása StepOnePlusTm and Real Time PCR quantification software 4.1-el történt. Az egyes csoportok összehasonlítása során Student-t próbát használtunk, és a szignifikancia szintet $p=0,05$ -nél határoztuk meg.

A génexpresszió vizsgálata az Applied Biosystems által nyújtott StepOne Software segítségével történt. Relatív mennyiség (RQ) meghatározása a 2^{-ddCt} metódus alapján történt, a következő képlet szerint: $ddCt = dCt$ (manuális) - dCt (lézerrel eltávolított). A dCt érték jelenti a célgén (GOI) Ct értékét, a belső kontroll génhez normalizálva. Ebben az esetben a Ct értéket automatikusan meghatározta a StepOne Software.

Sejtenyészet

Az eltávolított elülső lencsetokokat 14 napig tartottuk fent SAGM tenyésztő médiumban (SAGM basal médium és SAGMTmSingle Quots Suppliment, Lonza, Basel, Svájc). Az epithelsejteket kisméretű Petri csészében standard sejtenyésztési körülmények között (37°C, 5% CO₂) tenyésztettük.

Immunfluoreszcens vizsgálat

A minták fixálása és előkezelése

Az elülső lencsetokokat két órán át, szobahőmérsékleten 4%-os paraformaldehidben (PFA; Sigma, Budapest, Magyarország) fixáltuk, foszfát pufferben (phosphate-buffer saline, PBS, 0,1 M, pH 7,4) hígítva. Majd a szöveteket PBS-ben hígított Triton-X 100-ban (1:1000, Sigma, Budapest, Magyarország) mostuk át. Ezt követően háttérgátlás után a mintákat szobahőmérsékleten a primer antitest jelenlétében inkubáltuk, majd az elsődleges antitestnek megfelelő fluorophorral konjugált szekunder antitestekkel inkubáltuk. Ezután került sor a magfestésre 4', 6-diamidino-2-phenylindollal (DAPI, Sigma, Budapest, Magyarország). Végül Fluoromount-G-vel (Southern Biotech, USA) lefedtük a mintákat. Kontroll mintánkban az elsődleges antitestet kihagytuk, ami az eredmények helyes értelmezését segítette elő.

A munkához az alábbi primer és szekunder antitesteket használtuk:

1. Primer: p53 ellen nyúlban termelt poliklonális antitest (Santa Cruz Biotechnology, USA), (1:50),
Szekunder: Alexa Fluor® 488 anti-nyúl, (1:100, Lifetechnology, Budapest, Magyarország).
2. Primer: GFAP ellen nyúlban termelt poliklonális antitest (1:1000) (Sigma, Budapest, Magyarország)
Szekunder: Alexa Fluor® 568, anti-nyúl (Lifetechnology, Budapest, Magyarország)
3. Primer: GS ellen termelt monoklonális antitest (1:100, Transduction Laboratories, USA)
Szekunder: Alexa Fluor® 488 anti-egér, (1:100, Lifetechnology, Budapest, Magyarország).

A mintákat konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal (Fluoview FV-1000 Laser Confocal Scanning Microscope, Olympus, Japán) vizsgáltuk. Az ábrákat a mikroszkópos felvételekből Adobe Photoshop CS6 programmal készítettük.

Gliális fibrilláris savanyú protein (GFAP) immunhisztokémia

A teljes vastagságú szöveti mintákon a GFAP immunreaktivitást egy másik anti-humán GFAP antitest (egér monoklonális antitest, 1:750, DAKO, Glostrup, Dánia) segítségével is vizsgáltuk. Az elsődleges antitestnek megfelelő, anti-egér biotinilált szekunder antitesttel (1:100) inkubáltuk, majd avidin-biotin peroxidáz (Vector, Burlingame, CA) rendszert használtunk 2 órán át. Kromogénként 3-3'-diamino-benzidint (DAB, Sigma, Budapest, Magyarország) használtunk. Végül a mintákat tárgylemezre helyeztük, víztelenítettük, és DePeX-el (Sigma, Budapest, Magyarország) fedtük. A teljes vastagságú szöveti mintákat fénymikroszkóp (Olympus BX 50 mikroszkóp) segítségével vizsgáltuk.

Eredmények kvantifikálása

A konfokális mikroszkóppal készített felvételeken, melyek a teljes mintát tartalmazták a p53-immunreaktív és immunnegatív sejtek számát meghatároztuk, így az elülső lencsetok epithelsejtjeiben expresszálandó p53 arányt megállapítottuk. Hasonlóan, a képeken lévő GFAP, GS-immunreaktív, és immunnegatív sejtek számát meghatároztuk. Ezután az eredmények átlag értékét \pm SEM (Student-t teszt, statisztikai analízis, $p \leq 0,05$) kiszámítottuk. A statisztikai adatokat GraphPad Prism 5,03-as program segítségével elemeztük.

Aktin hálózat vizsgálata

A vizsgált elülső lencsetokokat foszfát pufferben (PBS, 0,1 M, pH 7,4) mostuk, majd szobahőmérsékleten 10 percig 4%-os PFA-ban fixáltuk. Ezt követően 20 percig inkubáltuk telítő permeabilizálóban (PBS-ben oldva: 0,1% Triton X-100, 0,1% Na-azid, 5% BSA). Majd a lencsetokokat fluoreszcensen jelölt phalloidinnel (Alexa Fluor® 488 Phalloidin, Lifetechnology, Budapest, Magyarország) festettük, ezt követően 45 percet szobahőmérsékleten, sötétben tároltuk. A mintákat ezután PBS-ben mostuk. Ezt követően a sejtmagokat propidium-jodiddal (1:1000, Lifetechnology, Budapest, Magyarország) tettük láthatóvá. Végül a festett mintákat VectaShield médiummal (Vector Laboratories, Burlingame, CA) fedtük le.

Eredmények kvantifikálása

Az aktin hálózat tanulmányozásánál mindkét csoportban 5 mintát vizsgáltunk, mintánként 10 felvételt készítettünk (Zeiss LSM 710, 63x-os nagyítás), majd a felvételeken a sejtek számát meghatároztuk. Az eredmények átlagának \pm SEM (Student-t teszt, statisztikai analízis, $p \leq 0,05$) értékét mutattuk. A statisztikai adatokat GraphPad Prism 5,03-as program

segítségével elemeztük. Az ábrákat a mikroszkópos felvételekből Adobe Photoshop CS6 programmal készítettük.

EREDMÉNYEK

Szövetteni vizsgálatok eredményei

Fénymikroszkópos vizsgálataink során mindkét csoportba tartozó elülső lencsetok epithelsejtjei esetében két típusú sejt volt látható.

Az egyik típusú sejt normál köbhám sejtnek tekinthető, mert világos festődésű sejtmagot és citoplazmát tartalmazott. Továbbá kerek sejtmaggal, és láthatólag jól megőrzött szoros sejtek közötti, illetve a sejt és a bazális membrán közötti kapcsolatokkal rendelkeznek. Ezzel szemben a másik típusú sejt jellegzetessége a sötét, intenzíven festődő sejtmag és citoplazma. Többnyire az epithelsejtek köbös formájának eltűnése és a citoplazma zsugorodása volt látható. Mindezek mellett az epithelsejtek bazális membránról történő leválása szintén látható volt. A zsugorodott, sötét sejtek gyakran tartalmaztak vakuólumokat a citoplazmájukban, az intracelluláris sejtorganelumok duzzadását jelezve.

A kontrollszerű, ép köbhámsejtekre jellemző morfológiával rendelkező sejtekhez képest figyelemre méltó morfológiai eltérések többnyire a manuális capsulotomiával eltávolított elülső lencsetok szövetekben jelentek meg. Ezzel szemben a femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomiával eltávolított lencsetokok epithelsejtjei többnyire a normál sejtekre jellemző képet mutattak.

Az általunk megfigyelt morfológiai jellegzetességek súlyos sejtkárosodásra utalnak. Mindkét módszerrel eltávolított capsulotomia után az elülső lencsetokok epithelsejtjei egyaránt tartalmaztak normális morfológiájú és sötét citoplazmával és sejtmaggal rendelkező sejteket jelezve, hogy mindkét típusú beavatkozás sejtkárosodást okoz. Összességében azt láhattuk, hogy több károsodott sejt volt az elülső lencsetok epithelsejtjeiben manuális eltávolítás esetén, mint femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomia után, de a degeneratív és ép lencsetok hámsejtek arányának a félvékony metszeteken történt meghatározásakor nem kaptunk szignifikáns különbséget a manuális és a lézer-asszisztált CCC alkalmazása után.

A manuális és femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomia, az elülső lencsetok epithelsejtjeire gyakorolt eltérő hatásainak a pontosabb megismeréséhez a továbbiakban transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) vizsgálatokat végeztünk. TEM vizsgálat során, a manuálisan eltávolított elülső lencsetokok epithelsejtjeinek a sejtmagjában súlyos morfológiai eltéréseket láttunk. A kontrollszerű, kerek sejtmagot tartalmazó epithelsejtekkel ellentétben,

melyet leginkább a lézerrel végzett capsulotomia után láttunk, a manuális csoportban található sejtek sejtmagja szabálytalan volt, amely feltételezhetően a sejtmag zsugorodásának köszönhető. Mindezek mellett, a sejtmag hártájára folytonos maradt. Továbbá, a citoplazmát tekintve is különbséget láttunk a két csoport sejtjei között. A lézerrel végzett capsulotomia után a sejtek túlnyomó része jól megőrzött organelumokat és világosabban festődő, elektronáteresztő citoplazmát tartalmaztak, míg a manuális csoportban sok sejt elektronrendezetlen citoplazmát és zsugorodott organelumokat tartalmazott. A sejt zsugorodásnak köszönhetően, ami gyakran megfigyelhető a manuális csoportban, a sejt-sejt közötti, illetve a sejt és extracelluláris mátrix közötti kapcsolatok is károsodtak. A lézerrel végzett műtét után jól megtartott epithelsejtek között látható kapcsolatokkal ellentétben a manuális módon eltávolított lencsetok epithelsejtjeit széles rések választották szét. Több sejt-sejt kapcsolatnál megfigyelhető volt, hogy sötét citoplazmájú sejthez kapcsolódott az ép, világos festődésű sejt, arra utalva, hogy legalább az egyik, esetleg mindkét sejthez tartozó komponense sérült a kapcsolatnak. A lézerrel végzett és manuális capsulotomia után a vizsgált minták közötti különbség nagyobb volt akkor, amikor a sejt és extracelluláris mátrix kapcsolatát vizsgáltuk. Míg a lézerrel végzett műtét után a sejtek többségében megfelelően kapcsolódtak a tokhoz, a manuális módon eltávolított mintákban nagy rések választották el a sejt bazális felszínét a toktól.

Molekuláris biológiai vizsgálatok eredményei

Génexpresszió vizsgálata reverz transzkriptáz-polimeráz láncreakció (RT-PCR) segítségével

A morfológiai elváltozások alapján valószínűsíthető, hogy az epithelsejtekben látott sejtd degeneráció háttérben apoptózis áll. Ennek igazolása érdekében RT-PCR módszerrel olyan gének expresszióját vizsgáltuk, amelyek szerepet játszanak az apoptotikus sejthalálban, illetve a sejt túlélésben és sejtproliferációban. Eredményeink szerint a manuális capsulotomia után enyhén alacsonyabb Bcl-2 mRNS szint mérhető, mint femtoszekundumos lézerrel végzett elülső lencsetok eltávolítás esetén. Emellett magasabb volt a p53 mRNS szint a manuálisan eltávolított elülső lencsetokok epithelsejtjeiben a femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomiás mintákhoz viszonyítva. Ugyanakkor, a két csoport közötti különbség nem volt szignifikáns. Sejtciklus szabályzó cyclin-D1 gén expressziójának vizsgálata során nem találtunk jelentősebb különbséget a két csoport között. Stressz-indukálta mechanikai károsodás következtében gyulladáscsökkentő citokinek expressziója is előfordulhat, mint például az IL-6 és IL-8. Munkánk során a két csoport között összehasonlítottuk ezeknek a citokineknek az expresszióját is. Az elülső lencsetok epithelsejtjeiben az IL-6 és IL-8 gének magasabb mRNS expresszióját

találtuk az elülső lencsetok manuális eltávolítása után, a femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomiához viszonyítva.

A génexpresszióra vonatkozó eredmények tenyésztett sejtek esetében

RT-PCR módszerrel, az előző szakaszban részletezett, a sejtproliferációban és apoptózisban szerepet játszó gének expresszióját a lencsetok epithelsejtek 14 napig tartó tenyésztése után is tanulmányoztuk.

Közvetlenül a capsulotomia után vizsgált elülső lencsetok epithelsejtjeiben mért génexpresszióhoz viszonyítva, mindkét csoportban a tenyésztett epithelsejtekben szignifikánsan csökkent az anti-apoptotikus Bcl-2 expresszió. A fent említett Bcl-2 expresszió csökkenés a manuális capsulotomiával eltávolított lencsetok esetében nagyobb volt, mint amikor a capsulotomiát lézerrel végezték, bár a különbség nem volt szignifikáns. Az eltávolítás után azonnal vizsgált lencsetok epithelsejtjeihez képest, a femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomiával nyert minták tenyésztett epithelsejtjeiben emelkedett a p53 mRNS szintje. Ugyanakkor, a különbség nem volt szignifikáns. Manuális capsulotomia után közvetlenül vizsgált epithelsejtekben a p53 szint enyhén magasabb volt, mint a tenyésztett sejtekben. Mind a manuális, mind a femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomiával nyert mintákban közvetlenül az eltávolítás után, az elülső lencsetokok epithelsejtjei által expresszált cyclin-D1 mRNS mennyiségéhez viszonyítva, a tenyésztett minták epithelsejtjeiben szignifikánsan magasabb cyclin-D1 mRNS szintet mértünk. Ugyanakkor nem találtunk jelentős különbséget a cyclin-D1 expressziót tekintve a manuális és a femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomiával nyert minták tenyésztett epithelsejtjei között.

Immunhisztokémiai vizsgálatok eredményei

A génexpresszió vizsgálata során a manuális capsulotomiával nyert elülső lencsetok epithelsejtjeiben kimutatott magasabb p53 mRNS szint miatt immunhisztokémiai módszerrel is kimutattuk a p53 fehérjét. A teljes vastagságú szöveti mintán, mindkét csoportban az epithelsejtek erőteljes festődést mutattak az elülső lencsetok perifériás területein, ami a centrális területek felé fokozatosan gyengült. A citoplazma egyértelműen immunreaktív volt, ugyanakkor az epithelsejtek sejtmagja többségében immunnegatív maradt. Manuális capsulotomia után a sejtek 48,5%-a volt p53 immunreaktív. Ugyanakkor az elülső lencsetok femtoszekundumos lézerrel végzett eltávolítása után az immunreaktív epithelsejtek aránya 31,42% volt, és a két csoport közötti különbség statisztikailag szignifikánsnak bizonyult.

Szövetteni vizsgálataink során az epithelsejtekben látott morfológiai eltérések a citoszkeleton változására utalhatnak. Ezért munkánk további részében a citoszkeleton egyes elemeit is megvizsgáltuk. Hasonlóan a p53 festődésnél látottakhoz, itt is a teljes vastagságú szöveti mintán végeztük az immunhisztokémiai vizsgálatot. A citoszkeleton elemei közül először az intermedier filamentum GFAP-t és GS-t vizsgáltuk.

Mindkét csoportban az epithelsejtekben mind a GFAP, mind a GS elleni antitesttel végzett immunreakció során erőteljes festődést láttunk az elülső lencsetok perifériás területén, és az immunreaktivitás intenzitása a centrum felé fokozatosan csökkent. Megfigyeléseink szerint a GFAP-t expresszáló sejtek nagy része GS-t is tartalmazott. Mindezek mellett a manuális capsulotomia után, az elülső lencsetok GFAP immunreaktív epithelsejtek morfológiáját, egy másik, anti-humán GFAP antitest segítségével is vizsgáltuk. Az elülső lencsetok epithelsejtjei közt két típusú sejtet különíthettünk el. Egyes GFAP immunpozitív sejtek normális morfológiai megjelenéssel rendelkeztek, ugyanakkor más sejtek formája megváltozott, hosszú vékony nyúlványok voltak megfigyelhetők.

A femtoszekundumos lézer segítségével eltávolított elülső lencsetokokban az epithelsejtek csak 26,38%-a volt GFAP immunreaktív, míg GS immunreaktivitás pedig az epithelsejtek 46,78%-ban volt megfigyelhető. Ugyanakkor, GFAP és GS együttes expressziója az epithelsejtek 19,07%-ban jelent meg. Ezzel szemben, a manuális capsulotomiás mintákban az epithelsejtek 48,07%-a volt GFAP immunreaktív. A sejtek 45,18%-a GS immunreaktív, a GFAP és GS együttes expressziója az epithelsejtek 28,85%-ban jelent meg. Az eredményekből látható, hogy a GS immunreaktivitás aránya nem mutatott jelentős különbséget a manuális és femtoszekundumos lézer segítségével végzett capsulotomiás mintákban.

A kvantifikációval nyert eredményeket összehasonlítva szignifikáns különbséget találtunk a két csoport között a GFAP pozitív epithelsejtek, és a GFAP-t és GS-t együttesen expresszáló epithelsejtek esetében. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a GFAP expresszió mechanikai károsodást jelezhet mind a manuális, mind a lézerrel végzett capsulotomiás mintákban.

Mivel eredményeink a citoszkeleton érintettségét jelezhetik, ezért a citoszkeleton dinamikus elemeit, nevezetesen a mikrofilamentumokat is vizsgáltuk.

Ennek érdekében manuálisan és femtoszekundumos lézer segítségével elvégzett capsulotomia során eltávolított elülső lencsetok hámsejtekben fluoreszcensen jelölt phalloidin segítségével az aktin citoskeletális hálózatot tettük láthatóvá. Az aktin hálózat vizsgálata során mindkét csoportban az aktin hálózat szabályos mintázata mellett erős kortikális aktin gyűrűt figyeltünk meg. A két csoport között, egyedül az aktin hálózat denzitásában találtunk jelentős

különbséget. A femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomiás mintákban az aktin filamentumok denzitása a normál sejtekben jelen lévő aktin filamentumok denzitásával összehasonlítva nem mutatott eltérést. Ezzel szemben a manuálisan végzett capsulotomia után a minták citoszkeletonjában szembetűnő volt az aktin hálózat átrendeződése. A manuális mintákban a tömött aktin filamentumok helyett aktin szigetek jelentek meg.

A sejtek által képzett szigetek között rések kialakulását figyeltük meg, a rések között pedig az epithelsejteket összekötő csőszerű elemek jelentek meg. Ilyen csőszerű struktúrákat kizárólag manuálisan eltávolított elülső lencsetokok epithelsejtjeiben találtunk. A manuális módon, illetve lézerrel eltávolított mintákon összehasonlítva a két csoport között a csőszerű elemek számát, szignifikáns különbséget kaptunk ($p < 0,0001$). A manuális mintákban ugyanis szignifikánsan nagyobb volt a csövek száma, mint lézer segítségével végzett capsulotomia esetén. Ezek alapján megállapítottuk, hogy az elülső lencsetok manuális eltávolítása jelentős változást eredményez az aktin filamentumok szerveződésében.

MEGBESZÉLÉS

A femtoszekundumos lézer technológia bevezetése a szürkehályog sebészetbe automatizálta a műtéti beavatkozás kritikus pontjait. Ugyanakkor lényeges, hogy enyhe sérülések, beleértve a mechanikai hatást, stresszt jelentenek a sejtek számára. Feltételezésünk szerint minden műtéti beavatkozás befolyásolja az érintett sejteket. Tanulmányunk célja a manuális és femtoszekundumos lézer-asszisztált capsulotomia következtében kialakuló, az elülső lencsetok epithelsejtek sejtülülését és sejtkárosodását szabályzó gének, illetve a citoszkeletális szerkezet változásainak összehasonlítása volt.

Morfológiai vizsgálatunk, beleértve a degenerálódó sejtek kvantifikálását is, arra mutatott rá, hogy a manuális capsulotomia több megváltozott morfológiájú sejtet eredményez, mint a femtoszekundumos lézer-asszisztált elülső lencsetok eltávolítás. Degenerációs jeleket tartalmazó sejtek többsége egyértelműen apoptotikus sejtekre jellemző morfológiát mutatott, mint például a sejt zsugorodása, sötétebbre festődő citoplazma és a sejtmag alakjának a megváltozása. Ezek a fény- és elektronmikroszkóppal nyert eredmények összhangban voltak a molekuláris biológiai eredményeinkkel és a p53 fehérje immuncitokémiai kimutathatóságával.

Bár a különbség nem volt szignifikáns, a p53 pro-apoptotikus fehérje génjének expressziója manuális beavatkozás után magasabb volt, mint femtoszekundumos lézer-asszisztált capsulotomia esetén. Ezzel összhangban, a magasabb p53 gén expresszióhoz

magasabb p53 fehérjeszintézis társult manuális capsulotomia után, mint femtoszekundumos lézer-asszisztált capsulotomia esetén. Korábbi tanulmányok capsulotomia után az epithelsejtek TUNEL pozitivitását mutatták ki, ami szintén apoptózisra jellemző. Két tanulmányban kevesebb apoptotikus sejtet találtak manuális capsulotomia után, mint femtoszekundumos lézer-asszisztált capsulotomia esetén, ugyanakkor ezek a tanulmányok elsődleges célja a sejt károsodás és a femtoszekundumos lézer-asszisztált capsulotomia során felhasznált lézer energiája közötti összefüggés kimutatása volt. Ezek az eredmények látszólag ellentmondanak a mi eredményeinknek. Ennek magyarázata az lehet, hogy a p53 transzkripció faktor nem csak apoptózist, hanem több folyamatot is indukálhat. A károsodástól függően, megállíthatja a sejtciklust, és stimulálhat DNS hibák javítását, és végül, amikor a DNS károsodás túl nagy, apoptózist is indukálhat. Feltételezésünk szerint mindkét csoport epithelsejtjei bizonyos mértékben érintettek voltak, és az enyhe károsodás nem indukált még apoptózist, hanem az esetlegesen kialakult DNS hibák javítása történt. Mivel mi csupán az emelkedett p53 mRNS-t és a p53 fehérje citoplazmatikus jelenlétét tudtuk kimutatni, valószínűleg a transláció során, mintáinkban a p53 pontos szerepe (apoptózis indukálása vagy hibák javítása) nem egyértelmű. Hangsúlyoznunk kell, hogy az elülső lencsetok eltávolítása és az mRNS izolálás közt eltelt idő valószínűleg túl rövid a teljes apoptotikus folyamat lejátszódásához. Ugyanakkor, ez az idő elégséges a p53 fehérje transzkripciójához és translációjához. Patkány szemlencsékben végzett vizsgálat szerint harminc perccel a sérülés után egy korai válasz gén által kódolt transzkripció faktor mRNS-e és fehérjéje már expresszálódik. Eredményeink ezzel a megfigyeléssel összhangban vannak. Mindez arra utal, hogy capsulotomiát követően gyors és markáns változás következik be az elülső lencsetok epithelsejtjei génjének expressziójában.

A GFAP a központi idegrendszerben az astrocytákban található intermedier filamentum, és ismert, hogy stressz hatására expressziója nő. Ugyanakkor a GFAP más sejtben is megtalálható fiziológias körülmények között, illetve a fejlődés során a szemlencsében is jelen van. Viszont, a sejtek differenciációja után nem detektálható a lencsében. Eredményeink arra utalnak, hogy az elülső lencsetok eltávolítása után a GFAP újra expresszálódni kezd az epithelsejtekben. Két különböző antitestet használtunk a GFAP jelenlétének ellenőrzésére, és mindkettő alátámasztotta annak expresszióját. Immunhisztokémiai vizsgálataink alapján egyértelművé vált, hogy az elülső szemlencsetok manuális eltávolítása nagyobb mennyiségű GFAP-immunreaktív sejtet eredményez, mint a femtoszekundumos lézer-asszisztált capsulotomia. A sejtek sérülését követően több szervben, beleértve a szemet is, a sejtekben az embrionális korban jellemző gének a gyorsabb regeneráció érdekében újra expresszálódhatnak. Az expresszált fehérjék közül néhány, mint például növekedési faktorok és receptoraik

elősegíthetik a regeneráció folyamatát. Mások, mint például a citoszkeleton fehérjéi (GFAP, vimentin vagy nestin) a sejtkárosodás jelenlétét jelzik.

A GFAP-immunreaktív sejtek egy része GS-t is tartalmazott, ami alátámasztja a legsin jelenlétét az elülső lencsetok epithelsejtjeiben. A GS-immunreaktív sejtek aránya nem mutatott jelentősebb eltérést a két műtéti csoport között. Mivel a legsin expressziója csökken az időskori szürkehályog kialakulása során, a hámsejtek közel megegyező mértékű GS-immunreaktivitása, hasonló legsin expresszióra és következésképpen hasonló súlyosságú szürkehályog jelenlétére utal. Ez az általunk két különböző capsulotomiás nyílás kialakítási módszerrel operált betegcsoportok homogenitását jelzi.

Szignifikáns különbséget találtunk a GFAP-immunreaktív sejtek arányát illetően a két csoportban, amely különbség a GFAP és GS együttes expressziója esetén is megfigyelhető. A GFAP-pozitív sejtek száma magasabb volt a manuálisan eltávolított elülső lencsetokokban, mint a lézer-asszisztált capsulotomia után, ami arra utal, hogy erősebb mechanikai károsodás jön létre a manuális capsulotomiát követően, mint femtoszekundumos lézer használata esetén.

Ismert, hogy stressz hatására az aktin mikrofilamentum rendszer átalakul, és stressz hatására a sejt-sejt közötti kommunikáció megváltozik. Sokáig úgy gondolták, hogy a közvetlen sejt-sejt kommunikáció csak réskapcsolatok (gap junctions) és különböző parakrin mechanizmusok révén valósul meg. A közelmúltban egy új, aktin tartalmú csőszerű elemről számoltak be, mely a szomszédos sejteket köti össze. Azóta több sejtípus (például astrocyták, daganat sejtek, az immunrendszer egyes sejtjei stb.) esetén figyeltek meg hasonló képződményeket. Mivel a fent tárgyalt vizsgálataink szerint a két műtéti eljárás az epithelsejtek szintjén eltérő mértékű stresszt okozott, ezért további vizsgálatainkban az aktin hálózat tanulmányozását helyeztük előtérbe. A capsulorhexis körül az epithelsejtekben megfigyelhető aktin mintázat megváltozása a rhexis körüli sejtek megváltozott kontrakciós és migrációs képességét jelezheti. A citoszkeleton aktin hálózatában létrejött változások olyan jelátviteli fehérjék expressziójával járnak együtt, amelyek befolyásolhatják az epithelsejtek károsító hatásra adott válaszát és túlélését. Vizsgálataink során a kortikális aktin hálózat hasonló mintázatú volt a manuálisan eltávolított és a femtoszekundumos lézer-asszisztált capsulotomiás minták esetén. Ezzel szemben az aktin hálózat kompaktságát tekintve jelentős eltérést találtunk manuális capsulotomia után.

Manuális capsulotomiát követően tömött aktin hálózat helyett aktin „szigetek” jelentek meg és az aktin „szigetek” között több esetben kisebb-nagyobb rés képződött. Rések a femtoszekundumos lézeres beavatkozás után nem voltak láthatók, és a rések közötti aktin tartalmú csőszerű elemek kizárólag a manuális capsulotomia esetén voltak láthatóak. A

résképződés feltételezhetően azzal magyarázható, hogy a manuális capsulotomia során a sejteket és azok citoskeletonját nagyobb mechanikai hatás éri. Ezt a fent részletezett fény- és elektronmikroszkópos vizsgálataink eredménye és a megfigyelt magasabb GFAP expresszió is alátámasztja.

Eredményeink alapján a lézeres beavatkozás kisebb műtéti stresszt jelent az epithelsejtek számára, mint a manuális capsulotomia. A markáns morfológiai, citoskeletális változások és a megváltozott génexpresszió manuális capsulotomia után a sejt-sejt kommunikáció változását, a sejtek megváltozott kontrakciós és migrációs képességét jelzi, ami epithelialis-mesenchymális átalakulást és posztoperatív hátsó tok fibrosis kialakulását eredményezheti. Femtoszekundumos lézer-asszisztált capsulotomia után enyhébb morfológiai és citoskeletális változások jelentek meg, ami alapján valószínűleg kevesebb, a lencsetokban esetlegesen visszamaradt epithelsejtben történhet epithelialis-mesenchymális átalakulás, ami csökkentheti a posztoperatív hátsó tok fibrosis kialakulásának kockázatát.

ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Kimutattuk, hogy a szürkehályog műtét során eltávolított elülső lencsetokban több epithelsejt esetében figyelhető meg degeneráció az elülső capsulotomiás nyílás manuális képzése esetén, mint lézer-asszisztált capsulotomia után, de a különbség nem volt szignifikáns.

A manuális capsulotomia során az epithelsejtek nagyobb arányában detektáltuk apoptotikus folyamatokra jellemző molekulák expresszióját.

Megfigyeltük, hogy a manuálisan elvégzett capsulotomia során fellépő mechanikai stressz jelentős hatást fejtett ki a lencsetok epithelsejtek citoskeletonjára. Kimutattuk, hogy a femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomia után az epithelsejtek citoplazmájában megfigyelhető aktin citoskeleton a normál aktin citoskeletonhoz hasonlított, szemben a manuálisan elvégzett műtéttől származó mintákkal, ahol a sejteken belül aktin szigeteket, a sejtek között pedig résképződést láttunk. Feltételezzük, hogy a fenti eltérések a manuális műtét során alkalmazott az elülső lencsetok feszítése és nyújtása miatt alakultak ki.

Eredményeink egyértelműen arra utalnak, hogy bár mindkét módszer tökéletesen alkalmas a szürkehályog műtét során alkalmazott capsulotomia elvégzésére, a femtoszekundumos lézerrel végzett bemetszés kisebb mechanikai stresszt jelent a sejtek számára.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm az operáló orvosok és a műtő dolgozóinak a minták gyűjtésében a segítséget, továbbá az önkéntesek hozzájárulását, illetve a PTE ÁOK Elektronmikroszkópos Laboratórium dolgozóinak segítségét a minták feldolgozásában.

Köszönöm témavezetőimnek: Dr. Biró Zsolt professzor úrnak a PTE KK Szemészeti Klinika korábbi igazgatójának és dr. Ábrahám Hajnalkának a PTE ÁOK Orvosi Biológiai Intézet és Központi Elektronmikroszkópos Laboratórium intézetigazgatójának segítő útmutatásait a PhD tanulmányi éveim alatt.

Az Olympus Fluoview FV-1000 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal végzett munkában köszönöm ifj. dr. Sétáló György segítségét. Továbbá köszönöm prof. dr. Seress Lászlónak, és prof. dr. Pongrácz E. Juditnak a kezdeti nehézségek közötti támogató hozzáállásukat. Ez a munka nem jöhetett volna létre dr. Szabadfi Krisztina, dr. Feller Diána, dr. Rapp Judit barátsága, és gyakorlati segítsége nélkül.

Végül, de nem utolsó sorban, köszönöm családomnak, hogy mindig mindenben mellettem álltak, és támogattak.

A munkát részben a PTE ÁOK belső kutatási alapja, (ÁOK-KA-2013-14/24) támogatta, valamint az EFOP-3.6.1-16-2016-00004 projekt az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009, a GINOP-2.3.2-15-2016-00036 támogatta, valamint a TKP2020-IKA-08 számú projekt, amely a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból biztosított támogatással, a Tématerületi Kiválósági Program 2020 (2020-4.1.1-TKP2020) pályázati program finanszírozásában valósult meg.

PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A dolgozat alapját képező publikációk:

Andrea Krisztina Sükösd, Judit Rapp, Diána Feller, György Sétáló Jr, Beáta Gáspár, Judit E. Pongrácz, Hajnalka Ábrahám, Zsolt Biró. Cell death and survival following manual and femtosecond laser-assisted capsulotomy in age-related cataract – International Journal of Ophthalmology (2018) 11:(9) 1440-1446 IF: 1.189

Andrea Krisztina Sükösd, Krisztina Szabadfi, Edina Szabó-Meleg, Beáta Gáspár, Pavel Stodulka, György Sétáló Jr, Róbert Gábiel, Miklós Nyitrai, Zsolt Biró, Hajnalka Ábrahám. Surgical stress and cytoskeletal changes following manual and femtosecond laser-assisted capsulotomy - International Journal of Ophthalmology (2020) 13:(6) 927-934 IF: 1.33 (2019)
Összesített impakt faktor: 2.519 IF

A dolgozathoz kapcsolódó publikációk:

Sükösd Andrea Krisztina, Kerek Andrea, Gáspár Beáta, Palotás Csilla, Kovács Orsolya, Ifj. Sétáló György, Varga Judit, Ábrahám Hajnalka, Biró Zsolt. A sejtkárosodás morfológiai jeleinek vizsgálata manuális és femtoszekundum lézeres capsulorhexis után az elülső lencsetok epithelsejtjein – Szemészet (2016)1: 22-27

Sükösd Andrea Krisztina, Feller Diána, Rapp Judit, Kerek Andrea, Gáspár Beáta, Palotás Csilla, Kovács Orsolya, Pongrácz E Judit, Ábrahám Hajnalka, Biró Zsolt. Túlélési képességet mutató génexpresszió vizsgálata manuális és femtoszekundum lézeres capsulorhexis után az elülső lencsetok epithelsejtjein - Szemészet (2017) 154:(3) 132-136

A dolgozathoz nem kapcsolódó publikáció:

Sükösd Andrea Krisztina, Bálint András, Szabó Ilona, Biró Zsolt. Vasoproliferatív tumorok differenciál diagnosztikai nehézségei - Szemészet (2018) 155:(1) 29-34