

**Manuális és femtoszekundumos lézerrel
végzett capsulotomiával eltávolított
lencsetok szövet vizsgálata**

DR. SÜKÖSD ANDREA KRISZTINA

PTE OGYDHT

2021

**Manuális és femtoszekundumos lézerrel végzett
capsulotomiával eltávolított lencsetokszövet vizsgálata**

Doktori (PhD) értekezés

DR. SÜKÖSD ANDREA KRISZTINA

Klinikai Idegtudományok Doktori Iskola

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

Társtémavezető: Dr. Ábrahám Hajnalka, egyetemi docens

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



Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Pécs, 2021

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
BEVEZETÉS	7
Anatómiai és fejlődéstani jellegzetességek a szemlencséről	7
Fejlődéstani ismeretek	7
Szemlencse anatómiája	7
A lencsetok anatómiája	8
Szürkehályog-műtét fejlődése és leírása.....	9
Femtosekundumos lézer használata a szemészetben	12
Femtosekundumos lézerek használata a refraktív sebészetben.....	13
Femtosekundumos lézer és a LASIK műtét	13
Femtosekundumos lézer és az intracorneális gyűrű (ICRS) implantáció.....	13
Femtosekundumos lézer és a presbyopia kezelése	13
Femtosekundumos lézer és az astigmia kezelése	14
Femtosekundumos lézer és a SMILE (small incision lenticule extraction) műtét	14
Femtosekundumos lézerek használata a szemészet egyéb területein.....	14
Femtosekundumos lézer és a keratoplasztika.....	14
Femtosekundumos lézer és a zöldhályog kezelése.....	14
Femtosekundumos lézerasszisztált szürkehályog-műtét	15
Femtosekundumos lézerasszisztált CCI.....	15
Femtosekundumos lézerasszisztált elülső capsulotomia (CCC).....	16
Femtofragmentáció	18
Femtosekundumos lézerasszisztált szürkehályog-műtét leírása	20
Előnyök és hátrányok.....	20
Az elülső capsulotomiás nyílás képzésének módszerei.....	22
Módszerek az elülső capsulotomia kialakítására	22
Első próbálkozások	22
Karácsonyfa capsulotomia	22
Konzervnyitó capsulotomia.....	22
Boríték capsulotomia.....	22
Folyamatos kör alakú capsulorhexis (CCC):	23
Plasma Blade (PB) elülső capsulotomia.....	23
Háromszög elülső capsulotomia.....	23

Lencse-csípő technika	23
Pulse-electron avalanche knife (PEAK) elülső capsulotomia.....	24
Fejlett technikai eszközök által vezérelt elülső capsulotomia kialakítás	24
Femtoszekundumos lézeraszisztált elülső capsulotomia (FLACS).....	24
Precíziós elülső capsulotomia (PPC, Zepto és Aperture Rx)	24
Szelektív lézeraszisztált elülső capsulotomia (SLC, CapsuLaser)	25
Continuous thermal elülső capsulotomia (CTC, ApertureCTC).....	25
Erbium:Yttrium-Aluminum-Garnet (Er:YAG) lézer elülső capsulotomia	25
Segédeszközök az elülső capsulotómias nyílás képzésénél.....	25
Festék asszisztált elülső capsulotomia	25
Tripánkék (Vision Blue):	26
Indocianinzöld (ICG)	27
Autológ vér	27
Fluoreszcein	27
Gentianaibolya	27
Egyéb segédeszközök	27
Wallace capsulorhexis jelző.....	27
Félkör alakú capsulorhexis jelző.....	27
Kör alakú capsulorhexis jelző	27
VERUS capsulorhexis jelző.....	28
Nyitott polymethyl methacrylat (PMMA) gyűrű.....	28
Összetett irányítási rendszerek a szürkehályog-műtétben	28
Az elülső capsulotómias nyílás minőségének jelentősége	28
Intraoperatív nehézségek a lencsetok beszakadása miatt.....	28
A lencsetok beszakadásának posztoperatív következményei	29
Az elülső capsulotómias nyílás és a műlencse helyzete	29
Az elülső capsulotómias nyílás és a posztoperatív hátsó tok fibrosis kialakulása.....	30
Ismeretek a programozott sejthalál és a szemlencse kapcsolatáról	31
Programozott sejthalál és a szemlencse fejlődése.....	31
Programozott sejthalál és a p53 molekula	31
Programozott sejthalál és a szürkehályog:.....	32
Programozott sejthalál és az elülső lencsetok hámsejtek:.....	32
Programozott sejthalál és a posztoperatív hátsó tok fibrosis:	34

CÉLKITŰZÉS.....	36
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	37
Betegek	37
Etikai engedély.....	37
Minták	37
Szövetteni vizsgálat	38
Fénymikroszkópia és transzmissziós elektronmikroszkópia	38
Kvantifikáció.....	38
Molekuláris biológiai vizsgálat	38
Génexpresszió vizsgálata reverz transzkriptáz-polimeráz lánreakció segítségével	38
Sejttenyészet	39
Immunfluoreszcens vizsgálat	41
A minták fixálása és előkezelése	41
p53 jelölése	41
Gliális fibrilláris savanyú protein (GFAP) és Glutamin-szintáz (GS) jelölése.....	41
Eredmények kvantifikálása	42
Aktinhálózat vizsgálata.....	42
Eredmények kvantifikálása	43
EREDMÉNYEK	44
Szövetteni vizsgálatok eredményei	44
Molekuláris biológiai vizsgálatok eredményei.....	49
Génexpresszió vizsgálata reverz transzkriptáz-polimeráz lánreakció segítségével	49
A génexpresszióra vonatkozó eredmények tenyésztett sejtek esetében	51
Immunhisztokémiai vizsgálatok eredményei.....	52
MEGBESZÉLÉS.....	61
Sejtpusztulás és a sejtek túlélése manuális és fetoszekundum lézerrel végzett capsulotomia után	61
A citoskeleton változásai manuális és lézerrasszisztált capsulotomia során	65
A szemészeti beavatkozásoknál használt lézerek sejtkárosító hatása.....	68
ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	72
IRODALOMJEGYZÉK.....	73
PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	92
KONFERENCIA MEGJELENÉSEK JEGYZÉKE	93
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	95

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

BSA: borjú szérum (bovine serum albumin)

CCC: folyamatos kör alakú capsulorhexis (continuous curvilinear capsulorhexis)

CCI: clear cornea technika (clear corneal incision)

CTC: continuous thermal elülső capsulotomia

DAB: 3-3'diamino-benzidin

DALK: mély elülső lamelláris keratoplasztika

DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindol

ECCE: nyitott tokos hályogkivonás

ELP: effektív lencsepozíció

EMT: epithelialis-mesenchymális transzformáció

Er:YAG: Erbium:Yttrium-Aluminum-Garnet lézer

FDA: Szövetségi Élelmiszer- és Gyógyszerengedélyezési Hivatal (Federal Food and Drug Administration)

FLACS: femtoszekundumos lézeraszisztált (elülső capsulotomia) cataracta sebészet

FP: foszfátpuffer

GFAP: gliális fibrilláris savanyú protein (glial fibrillary acidic protein)

GS: glutamin-szintáz

ICCE: zárt tokos hályogkivonás (intra capsular cataract extraction)

ICG: indocianinzöld (indocyanine green)

ICRS: intracorneális gyűrű szegment (intra corneal ring segment)

IL-6: interleukin-6

IL-8: interleukin-8

IOL: intraocularis mülencse (intra ocular lens)

LASIK: laser in situ keratomileusis

NGS: normál kecske szérum

OCT: optikai koherens tomográfia

OVD: viszkoelasztikus anyag (ophthalmic viscosurgical device)

PB: plasma blade elülső capsulotomia

PBS: foszfátpuffer

PCR: polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)

PFA: paraformaldehid

PKP: penetráló keratoplasztika

PMMA: polymethyl methacrylat

PPC: precíziós elülső capsulotomia (precision pulse capsulotomy)

ROS: oxigén szabadgyök

SIA: sebészileg indukált astigmia (surgically induced astigmatism)

SLC: szelektív lézerasszisztált elülső capsulotomia

TEM: transzmissziós elektronmikroszkópia

TGF- β : transzformáló növekedési faktor-béta

BEVEZETÉS

A látás folyamatában központi szerepet játszik a szemlencse. Ezen szerep betöltéséhez két tulajdonsággal rendelkezik. Egyrészt, mint kristálytisza, fényáteresztő gyűjtőlencse fókuszálja a szembe bejutó fényt, másrészt a közeli és távoli fókusz megvalósítása érdekében alakváltoztatásra képes (akkomodáció). A kor előrehaladtával a szemlencse több változáson megy át, melynek végstádiuma az időskori szürkehályog kialakulása lehet. Az öregedő szemlencse eleinte vizuális érintettség nélkül, de nagyobb mértékben szórja a fényt. Később, amikor a szemlencse vastagsága és denzitása is fokozódik, az optikai teljesítőképessége is megváltozik. Végül, a morfológiai változásoknak köszönhetően, a lencse már többé nem kristálytisza, ezért kevesebb fény jut át rajta (Cavalotti és mtsai., 2008). Napjainkban a szürkehályog a reverzibilis vaksági állapotok közé tartozik, melynek egyetlen kezelési lehetősége az elhomályosodott szemlencse műtéti eltávolítása és a megfelelő műlencse beültetése. Ez a humán gyógyászatban az egyik leggyakrabban végzett és legsikeresebb eredményekkel járó műtéti eljárás (Davis, 2016).

Anatómiai és fejlődéstani jellegzetességek a szemlencséről

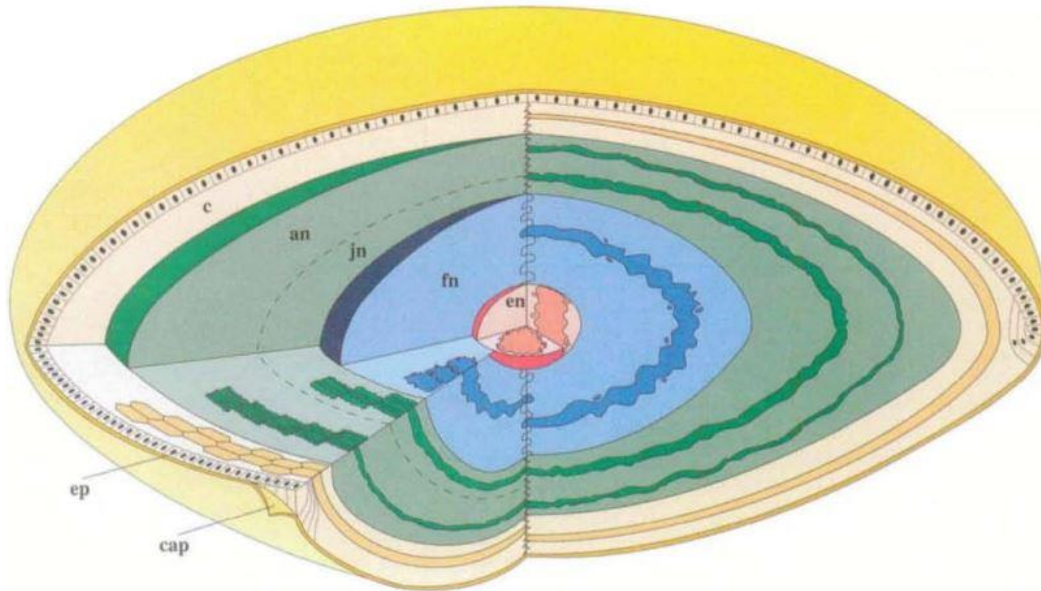
Fejlődéstani ismeretek

A szemlencse fejlődése a 25. gesztációs napon kezdődik, ekkor a lencseplacod érintkezik a szemhólyaggal (Lance, 1988). A lencseplacod sejtjei egyrétegű köbhámsejtek, amelyek lefűződve a lencsehólyagot alkotják (Spemann, 1924). A 33. gesztációs napra a lencsehólyag a szemserlegbe süllyed (Amaya és mtsai., 2003). A lencsehólyag elülső pólusán található epithelsejtek számát a sejtproliferáció mellett apoptózis szabályozza (Morgenbesser és mtsai., 1994). Majd a fejlődő szemlencsét egy vékony bazális membrán veszi körül, később ez alkotja a lencsetokot, amely elsődleges lencserostokat tartalmaz (Kaufmann, 1992).

Szemlencse anatómiája

A szemlencse egy ellipszoid alakú, kristálytisza, ér- és idegmentes szövet, amely a hátsó csarnokban helyezkedik el, két fontosabb részből áll: a magból, amely embrionális elemeket tartalmaz, és a kéregből. A lencsét a lencsetok teljesen körülveszi. A szemlencse elülső felszínén elhelyezkedő epithelsejtek az equatoron átlépve másodlagos lencserostokká alakulnak át (Lance, 1988). Így a felnőtt, rugalmas tokkal körülvett lencse a következő részeket tartalmazza (1. ábra): elülső részen egyrétegű epithelsejtek, felszínes rétegben megnyúlt,

differentiált másodlagos rostok, és a lencsetestet érett elsődleges és másodlagos rostok töltik ki, amelyek magas fehérjetartalommal rendelkeznek (Taylor és mtsai., 1996).



1. ábra: Felnőtt szemlencse szerkezete (Taylor és mtsai., 1996)

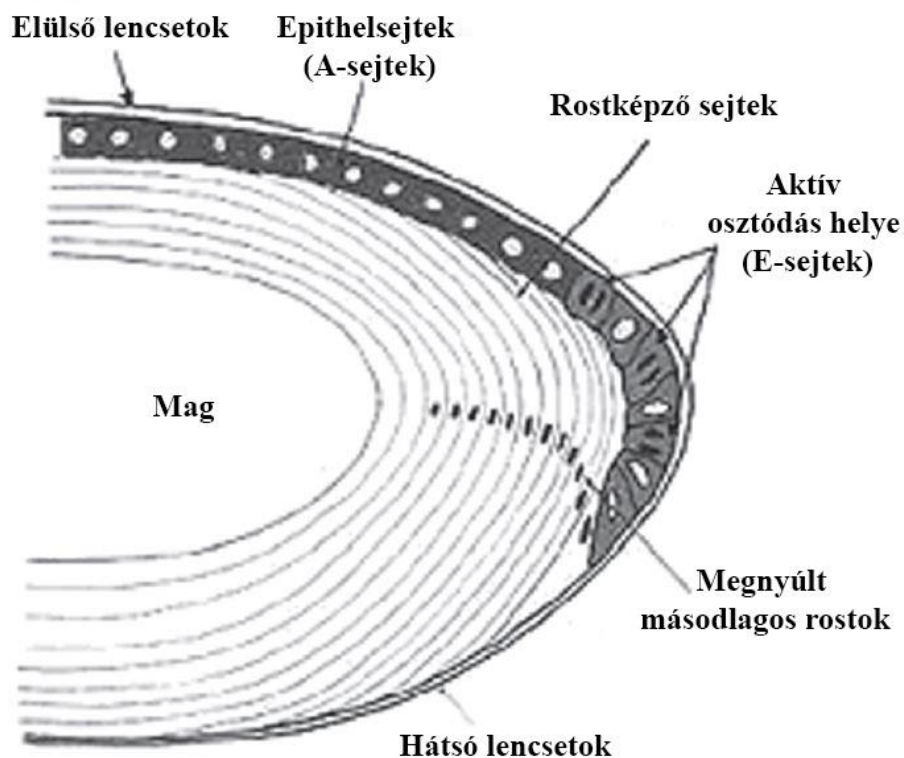
cap: lencsetek, ep: epithelsejtek zónája, c: kéreg, an: öregkori magzóna, jn: külső embrionális magzóna, fn: belső embrionális magzóna, en: embrionális magfelszín

A lencsetek anatómiája

Korábbi, fénymikroszkópos vizsgálatok eredményei alapján ismert, hogy a lencsetek tömött, homogén szerkezetű. Ugyanakkor, elektronmikroszkópos felvételeken bizonyított, hogy a lencsetek szorosan kapcsolódó, tömött, párhuzamos lemezekből áll (Krag és Andreassen, 2003), amelyek a kor előre haladtával eltűnnek. A hátsó lencsetokon ez már gyermekkorban bekövetkezik. Ezzel ellentétben, az elülső lencsetokban a lemezes szerkezet felnőtt korban kezd eltűnni, de folyamatos marad az equatoriális és praeaequatoriális területeknek megfelelően (Hogan és mtsai., 1971; Seland, 1974; Perry és mtsai., 1979).

A szemlencse vastagságának és denzitásának változásával párhuzamosan változik a lencsetek is. Az elülső lencsetok alatt egyrétegű köbhámsejtek (epithelsejtek) alkotnak réteget. (Young és Ocumpaugh, 1966; Von Sallmann és mtsai., 1969; Rafferty és Goossens, 1978). Idővel az epithelsejteken számos morfológiai változás figyelhető meg: alakjuk ellaposodik, a sejtorganelumok száma csökken, az alatta elhelyezkedő mátrix tömöttebbé válik (Perry és mtsai., 1979; Rafferty, 1985). Ezzel szemben a hátsó lencsetok alatt található epithelsejtek már

a magzati életszakaszban eltűnnek (Hogan és mtsai., 1971). Ismert, hogy a lencse epitheliumának központi zónájában található sejtek osztódásra nem képesek, ezért quiescent (nyugalmi) sejteknek is nevezik őket. A sejtek rétege, a lencse epithelium, a lencse azon elülső felszínét takarja, amely a szaruhártya felé néz. A lencse epithelium az elülső felszín pereménél végződik. A központi részében pedig olyan sejteket tartalmaz, amelyek nem osztódnak, nyugalmi állapotban vannak, ezt veszi körül a sejtek germinatív – osztódó zónája, amelyet (az equatoriális peremnél) olyan osztódó sejtek követnek, melyek rostképző sejtekké differenciálódnak. (Cavalotti és mtsai., 2008), (2. ábra).



2. ábra: Lencsetok szerkezete (Cavalotti és mtsai., 2008)

Az epithelium a különböző zónáknak megfelelően eltérő sejteket tartalmaz. A központi zónában olyan sejtek vannak, amelyek nem osztódnak, a germinatív zónában osztódó sejtek, és az equatoriális területen differenciált sejtek láthatóak. A megnyúlt másodlagos rostok területe jelzi az elülső és hátsó lencsetok határát.

Szürkehályog-műtét fejlődése és leírása

A szürkehályog-műtét azon mikrosebészeti beavatkozások közé tartozik, amelynek fejlődése az utóbbi 2-3 évtizedben rendkívüli mértékben felgyorsult, és ez napjainkban is folytatódik. Az első írásos feljegyzések szerint, az ókorban egy bronztű, vagy tűske segítségével

az üvegtesti térbe luxálták a szemlencsét. A görög feljegyzések alapján, ebben a korban, a szürkehályogot egyfajta kóros folyadékgyülemnek tekintették (Grom, 1985). A fent részletezett eljárást napjainkban hályogszűrés (recnlatio lentis) néven ismerjük, és Kr. e. 2050-ből származnak a leírások erről a műtéti beavatkozásról (Snyder, 1964). A szürkehályog valódi anatómiai és patofiziológiai megismerését elsősorban a boncolások tették lehetővé, így Briseau és Maitre-Jean egymástól függetlenül írták le a szürkehályog lényegét a XVIII. század elején (Marsovszky, 2013). Ezt követően, 1747-ben, Jacques Daviel, elvégezte az első nyitott tokos hályog kivonást (ECCE), amelyben az elülső lencsetok behasítása után, a lencse magot eltávolította egy nagy, 10 mm-es seben keresztül. Sajnálatos módon, a posztoperatív műtéti eredményeket leginkább a hátsó tok fibrosis kialakulása rontotta, ugyanakkor Daviel rámutatott a corneális sebészítés alkalmazásának lehetőségére, amit napjainkban is használunk (Grósz és Hoor, 1910; Daviel, 1753). A posztoperatív műtéti eredmények korlátozottsága ellenére, egészen a XIX. századig az ECCE számított az elfogadott szürkehályog-műtétnek. Ugyanakkor, a fejlett műtéti eszközökkel, jól meghatározott klinikai esetekben, és megfelelő műtéti tapasztalatokkal, tudással, még napjainkban is használatos az ECCE.

1953-ban, Sharp végezte az első zárt tokos hályog kivonást (ICCE), amelyben egy nagy limbális seben keresztül, a lencse magot tokkal együtt kihajtotta a bulbuszból, és ezzel együtt a lencsefüggesztő rostokat is behasította, a lencse finom mozgatása révén (Hubbell és Sharp, 1904). A lencsefüggesztő rostok védelmének további finomítása Barraquer nevéhez kötődik. Ő, a műtét alatt alfa-kimotripszin enzimet használt, így fagyasztás után a lencse mag és tok sokkal gyengédebben kihajtható volt a bulbuszból. Ezt az eljárást cryo-extractiónak nevezik (Barraquer, 1966). Sajnálatos módon, a posztoperatív műtéti eredményeket, a látás elvesztésével is fenyegető szövődmények rontották (üvegtest prolapszus, retinaleválás, macula ödéma, cornea dekompenzáció). A posztoperatív műtéti eredmények korlátozottsága ellenére, egészen az 1970-es évekig az ICCE számított az elfogadott szürkehályog-műtétnek. Ugyanakkor, a fejlett műtéti eszközökkel, jól meghatározott klinikai esetekben, és megfelelő műtéti tapasztalatokkal, egyes országokban, még napjainkban is használatos az ICCE.

Mivel, ECCE esetén jobb vizuális rehabilitáció volt várható, mint ICCE-ben, idővel az ICCE háttérbe szorult, és a standard szürkehályog-eltávolítás ismét az ECCE-t jelentette. A második világháború alatt Ridley felismerte, hogy önmagában az elhomályosodott szemlencse eltávolítása, a szürkehályog kezelés felét jelenti. Ennek köszönhetően, 1949-ben elvégezte az első ECCE-t, amely során műlencse (IOL) implantáció is történt (Moore és mtsai., 2010). Akkoriban a műlencse intraocularis helyzete vita tárgyát képezte, ezért ez a műtéti technika nem örvendett nagy népszerűségnek.

Végül 1967-ben, a phacoemulsificatio bevezetésével, Kelman forradalmasította a szürkehályog-műtétet (Kelman, 1967). Ezzel a technikával lehetőség nyílt egy ultrahangos frekvenciával rezgő kézifej segítségével a lencse mag szétdarabolására, majd aspirálására egy jelentősen kisebb (3-4 mm) corneális seben keresztül. Ez a megfigyelés nagy jelentőséggel bír, hiszen a kisebb seb esetén műtét alatt stabilabb lesz az elülső csarnok, továbbá felgyorsul a gyógyulási idő, és kisebb lesz a sebészileg indukált astigmia (SIA) is. A lehető legjobb visus rehabilitáció elérése érdekében az elülső tokot megnyitjuk, a lencse mag és kéreg eltávolítása és a hátsó tok meghagyása révén az így üressé vált tokzsákba IOL-t implantálunk. Idővel a sebképzés mérete tovább csökkent 2,2 mm-re, sőt esetenként 2,0 mm alá. Ezáltal a phacoemulsificatio az egyik legnépszerűbb, és legsikeresebb szürkehályog-műtétté vált. Ez az eljárás biztonságosnak és hatásosnak bizonyult.

Napjainkban a következőképpen zajlik egy phacoemulsificatio szürkehályog-műtét. Különböző, helyileg alkalmazott mydriaticum cseppekkel közvetlenül a műtét előtt pupillatágítás történik. Ezt követően a műtőben helyi érzéstelenítés, megfelelő fertőtlenítés, és a műtéti terület izolálása következik. A jó láthatóság érdekében szemhéj terpesz alkalmazása elterjedt. Egy 15 fokos kés segítségével a corneán a mellékseb kialakítása (paracentesis) történik, amin keresztül az elülső csarnok viszkoelasztikus anyaggal (OVD) feltölthető. Ez egyrészt védelmet biztosít a szem-szövetek számára, másrészt stabilitást nyújt a főseb elkészítéséhez. A legtöbb sebész az ún. „clear cornea” technikát (CCI) használja, mert a betegek jól tolerálják, illetve gyors felépüléssel jár, mindazok mellett, hogy műtét alatt is jó láthatóságot biztosít. A főseb mérete a sebkészítő kés függvényében változhat, de többnyire 1,8 mm és 2,75 mm között van. Ahhoz, hogy víztartó sebek legyenek, sebkészítés során többször sebkészítésére kell törekedni, így nem szükséges a műtét végén varrattal zárni a sebeket. Ezt követően egy rexis csipesz segítségével az elülső lencsetokon capsulotomiás nyílás kialakítása történik, törekedve arra, hogy ez folyamatos kör alakú capsulorhexis (CCC) legyen. Az így kialakított nyíláson keresztül elérhető a lencse mag, és a phacoemulsificatio által feldarabolható, majd aspirálható a lencse mag darabok, és a kéreg. Így tehát eltávolításra kerül az elülső lencsetok egy része, a kéreg és a lencse mag, és csupán a hátsó lencsetok marad vissza, ami ha intakt, akkor ideális a tokzsák az IOL implantálására. Utolsó lépésként az OVD alapos kimosása, majd intrakamerális antibiotikum beadása, és a víztartó sebek oedemasítása következik.

A szürkehályog-műtét fejlődésének, és a jó posztoperatív visus rehabilitáció igénynek köszönhetően a műtétnek hármas célja van: a látóélesség gyors és jelentős javítása, refraktív hibák (pl. rövid vagy távollátás, esetleg meglévő corneális astigmia) korrigálása, valamint

esetenként az akkomodációs képesség helyreállítása. Ennek érdekében több típusú IOL implantálása lehetséges. Az egyfókuszú műlencsék kiváló látóélességet biztosítanak távolra, ezzel szemben az un. prémium (multifokális, trifokális) műlencsék többnyire több távolságra próbálnak éles látást biztosítani. A trifokális műlencse közeli és távoli fókuszpontok mellett köztes távolságra (számítógép, telefon) is éles látást biztosít. Az un. alkalmazkodó műlencsék a szem természetes fókuszáló képességét igyekeznek utánozni a mindenkori éles kép létrehozására, azonban az eddigi típusok nem igazán váltak be, és így széles körben nem terjedtek el. Az un. tórikus műlencsék egyik tengelyükben más dioptriaértékűek, mint az arra merőleges tengelyben, így a műtét előtt fennálló (un. preoperatív) astigmatiát a szürkehályogműtét során, azzal együtt tudjuk korrigálni. Az un. prémium műlencsék implantálása előtt, kulcsfontosságú a „jó betegválasztás”, mert a betegeknek meg kell érteniük a prémium műlencsék esetenként jelentkező korlátait (pl. az éjszakai vezetés korlátozott lehet), reális elvárásokkal kell rendelkeznie, tudatában kell lennie az esetleges szövődeményekkel és motiválnak kell lennie a szemüvegtől való függetlenség elérése érdekében. Vannak a prémium műlencse-implantációját kizáró okok is (pl. bizonyos társuló szembetegségek), ilyenkor a szürkehályogműtét során csak egyfókuszú (un. monofokális) műlencse beültetése javasolt.

Femtosekundumos lézer használata a szemészetben

A femtosekundumos lézer 1053 nm hullámhosszon, az infravörös tartomány közelében, ultrarövid, 10^{-15} másodperc impulzus-tartományban működik. Mivel kisebb lökéshullámot generál, kisebb területen okoz járulékos károsodást. Az 1053 nm hullámhosszú lézernyaláb átmérője 0,001 mm, amely 5 μm -en belüli pontossággal 1,8 μm^2 -nél kisebb területre fókuszálható, így nem okoz traumát a felületes vagy környező szövetekben (Lubatschowski és mtsai., 2000). Rendkívüli áttörést hozott a szemészet világába, hiszen a készülék használatával háttérbe szorulhat a manuális sebkészítés, illetve egyes műtéti „szövet preparáló” lépések. Napjainkban többféle lézerkészülék található a kereskedelmi forgalomban, melyek legfontosabb paramétereit a 3. ábrán foglaltam össze.

Bár, a femtosekundumos lézerkészülékek fejlesztése már 1990-ben elkezdődött, a szövetségi élelmiszer- és gyógyszerengedélyezési hivatal (FDA), csak 2001-ben engedélyezte a femtosekundumos lézer használatát a refraktív hibák korrigálására (LASIK, laser in situ keratomileusis). Az első műtétet követően ez a technológia rendkívüli fejlődésen esett át, melynek fókuszában a szövetkárosodás csökkentése állt (Binder, 2010; Hjortdal és mtsai., 2012).

Paraméterek	Femto LDV	WaveLight FS 200	FemTec 20/10	IntraLase iFS 150	Zeiss VisuMax	Victus	Catalys	LensX
Hullámhossz	1,045	1,045	1,053	1,053	1,043	1,040±25	1,030	1,030±5
Centrálás	Mechanikai	Számítógép vezérelt	Mechanikai	Számítógép vezérelt	Mechanikai	Számítógép vezérelt	Számítógép vezérelt	Számítógép vezérelt
Műtéti megjelenítés	Virtuális	Vizuális és virtuális	Vizuális	Vizuális és virtuális	Vizuális	OCT	OCT	OCT
Mozgatható	Igen	Nem	Nem	Nem	Nem	Nem	Nem	Nem
Applanációs felszín	Síkbeli	Módosított síkbeli	Hajlított	Hajlított	Hajlított	Hajlított	Hajlított	Hajlított

3. ábra: Kereskedelmileg elérhető femtoszekundumos lézerkészülékek tulajdonságai (Callou és mtsai., 2016)

Femtoszekundumos lézerek használata a refraktív sebészetben

Femtoszekundumos lézer és a LASIK műtét

LASIK műtét alatt a sebész a szaruhártya felső rétegéből lebenyt képez, majd alatta egy excimer lézer segítségével elvégzi a lézerkezelést, végül visszahajtja a lebenyt. Ez egy széles körben elterjedt sebészi beavatkozás a refraktív hibák korrigálására (Sugar és mtsai., 2002). A műtét legfontosabb lépése a lebenyképzés, amit mechanikai, illetve femtoszekundumos lézeres mikrokeratóm segítségével lehet elvégezni (Ratkay-Traub és mtsai., 2001, Stulting és mtsai., 1999). Eddigi tapasztalatok, és irodalmi adatok alapján, ismert, hogy a femtoszekundumos lézer segítségével kialakított corneális lebeny esetén az operáló orvos könnyebben és pontosabban tudja meghatározni a lebeny vastagságát, átmérőjét és a vágási szöget. A fent leírt precizitásnak köszönhetően a lebenyhez kapcsolódó komplikációk, és a posztoperatív fertőzések száma jelentős mértékben csökkent (Talamo és mtsai., 2006, Slade, 2007; Rocha és mtsai., 2011; Sutton és Hodge, 2008; Stahl és mtsai., 2007).

Femtoszekundumos lézer és az intracorneális gyűrű (ICRS) implantáció

Azon keratoconusos esetekben, ahol a szaruhártya átültetéstől nem várható jó posztoperatív-refraktív eredmény, az intracorneális gyűrű implantációja indikált, amelyet a szaruhártya stromájába helyezünk el (Colin és mtsai., 2000; Alio és mtsai., 2006). Ellentétben a manuális ICRS implantációval, a femtoszekundumos lézerrel végzett műtéteknél kevesebb komplikáció kialakulása várható (epitheldefektus, perforáció, kilökődés), ugyanakkor a visus és refraktív eredmény várhatóan hasonló lesz (Kubaloglu és mtsai., 2010).

Femtoszekundumos lézer és a presbyopia kezelése

A femtoszekundumos lézer használata a presbyopia műtéti kezelését is átalakította, hiszen a lézer segítségével a szaruhártya alakját meg tudjuk változtatni, lebenyképzés nélkül.

Ezt a beavatkozást IntraCOR eljárásnak nevezik, és a szaruhártya stromájába fókuszálódó gyűrű alakú femtoszekundumos lézerimpulzusok segítségével változik meg a szaruhártya alakja (Ruiz és mtsai., 2009).

Femtoszekundumos lézer és az astigmia kezelése

Femtoszekundumos lézerasszisztált astigmias keratotomia alatt a szaruhártya stromájában kisebb átmérőjű, körkörös bevágásokat képzünk. A lézer használatával a corneális incízió sokkal precízebb, mindig a stromát érinti, biztonságosabb, gyorsabb a gyógyulási idő, és a Bowman membrán penetrálásának veszélye gyakorlatilag nem áll fenn (Bochmann és Schipper, 2006; Hoffart és mtsai., 2009; Yoo és mtsai., 2009).

Femtoszekundumos lézer és a SMILE (small incision lenticule extraction) műtét

Ezzel az eljárással a myopia és a kisebb fokú astigmia korrigálható. Műtét alatt a femtoszekundumos lézer segítségével, a szaruhártya felszínes rétegében lencsécskéket (lenticule) képeznek, majd a mélyebb rétegben, a cornea intakt részén kis bemetszéseket ejtenek, végül a bemetszéseken a lencsécskéket kihúzzák. A lézer használatának köszönhetően az idegkárosodás minimális, és száraz szem szindróma is kisebb arányban alakul ki (Li és mtsai., 2013).

Femtoszekundumos lézerek használata a szemészet egyéb területein

Femtoszekundumos lézer és a keratoplasztika

2005 óta a keratoplasztika területén is használhatóak a femtoszekundumos lézerek (Buratto és Böhm, 2007). Napjainkban, ez a lézer technológia egyaránt használható penetráló- (PKP), mély elülső lamelláris- (DALK), és endotheliális keratoplasztikában. Jelen ismeretek alapján a femtoszekundumos lézerasszisztált keratoplasztika előnye a jó sebkészítés, biomechanikailag stabil incízió képzése, minimális varrat feszülés, gyors sebgyógyulás és visus rehabilitáció. Ezáltal a keratoplasztika egy olyan refraktív sebészeti beavatkozás lehet, amely kevesebb invazivitással a legjobb refraktív eredményeket biztosíthatja (Alio és mtsai., 2013).

Femtoszekundumos lézer és a zöldhályog kezelése

A jövőben a zöldhályog sebészeti kezelését is megváltoztathatja a femtoszekundumos lézer, bár egyelőre csak kutatási szinten vannak biztató eredmények. Valószínűleg a precíz vágási képességének köszönhetően femtoszekundumos lézerrel jobb sclerotomiát lehet képezni

(Jin és mtsai., 2015), illetve csarnokvíz elvezető implantátum nyílásának kialakítására is alkalmasabb lehet, mint a manuális sebkészítés (Siewert és mtsai., 2012).

Femtosekundumos lézerasszisztált szürkehályog-műtét

Bár a capsulotomiás nyílás manuális módon történő képzése, és ezt követően a szemlencse phacoemulsificatio általi feldarabolása, majd a lencsedarabok eltávolítása, továbbra is biztonságos és sikeres műtétnek számít, a femtosekundumos lézerasszisztált szürkehályog-műtét nagyobb precizitást és stabilitást biztosít a műtét egyes lépéseiben. Magyarországi eredményeknek köszönhetően, 2009 óta a femtosekundumos lézerek FDA engedéllyel használhatóak a szürkehályog sebészetben (Nagy és mtsai., 2009). A lézer tulajdonságainak és biztonságosságának köszönhetően, ez a fajta műtéti technika napjainkban már széles körben elfogadott és alkalmazott (Nagy, 2014; He és mtsai., 2011), ugyanakkor a magas anyagköltsége miatt többnyire magánintézményekben alkalmazzák prémium IOL-ek implantálásával.

A műtét precizitásának és biztonságosságának érdekében, a szürkehályog-műtét esetén a femtosekundumos lézerek berendezése eltér attól, ami a refraktív műtéteknél megszokott. Az infravörös lézer képes penetrálni a kristálytiszta- vagy kissé homályos szaruhártyán, további intraocularis alkalmazását egy háromdimenziós képalkotó rendszer irányítja (többnyire optikai koherens tomográfia (OCT) vezérelt), az elülső szegmens anatómiájának ismerete alapján. A femtosekundumos lézerek négy típusú bemetszés képzésére alkalmasak: elülső capsulotomia, lencse fragmentáció (femtofragmentáció), limbális relaxáló incízió (astigmia kezelésére), és corneális sebkészítés (CCI és paracentézis).

Femtosekundumos lézerasszisztált CCI

A sebkészítés jelenti a szürkehályog-műtét első lépését. Ennek technikai kivitelezése nagy jelentőséggel bír, hiszen ezen keresztül kell majd a műtéti eszközöket használni, illetve a phacoemulsificatio szürkehályog-műtétnél a kialakított seb felépítése és mérete meghatározza a phacoemulsificatio alatti folyadékáramlást. Ezért minden sebész technikailag tökéletes sebkészítésre törekszik. CCI seb készítése négy szakaszra bontható: 30 °-os szögben mintegy 0,4 mm mélyen a szaruhártyába mélyesztjük a sebkészítő kést, majd ennek hegyét felfelé billentve az endothellel párhuzamosan haladunk 2,0-2,5 mm hosszan a szaruhártyában, ezt követően a kés nyelét megemelve, óvatosan perforáljuk a Descemet membránt, végül a szivárványhártya síkjával tesszük párhuzamosá a kés lapját. Így, a seb teljes terjedelmében párhuzamos marad a limbussal. Ismerve a sebkészítés elméleti hátterét láthatjuk, hogy a seb

megfelelő hossza, mélysége és szöge fontos a posztoperatív szivárgások megelőzésében, és így a fertőzések megakadályozásában.

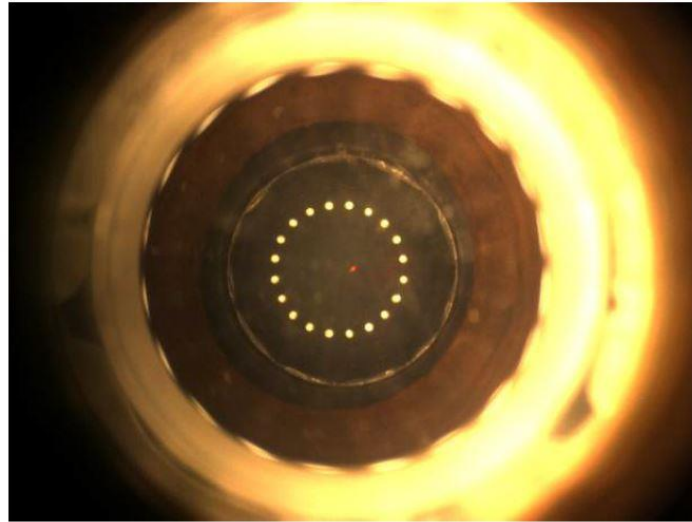
Tudva, hogy a femtoszekundumos lézerek kiváló vágó képességgel rendelkeznek, illetve a képkötő berendezés segítségével kontrollált sebkészítés lehetővé teszi, hogy a kívánt seb mindig a megfelelő szögben és a szaruhártya megfelelő mélységében helyezkedjen el, így a posztoperatív szivárgás kialakulásának veszélye jelentősen csökken (Masket és mtsai., 2010). Továbbá a femtoszekundumos lézerasszisztált CCI sokkal stabilabb a seb konfigurációjának köszönhetően, hiszen ez egy kétsíkú bemetszés, cikk-cakk formában, ami ellenállóbb a külső nyomásra, és nem igényel hidratálást (Palanker és mtsai, 2010b). Nem utolsó sorban, a lézer segítségével kialakított seb esetében gyorsabb a gyógyulás (Masket és mtsai., 2010; Stonecipher és mtsai, 2006).

Femtoszekundumos lézerasszisztált elülső capsulotomia (CCC)

A műtét ezen szakaszában az operáló orvos egy nyílást képez az elülső lencsetokon, hogy a későbbiekben hozzáférhető legyen a lencsemag. Fontos az ideális CCC kialakítása, hiszen ezen keresztül kell beültetni a műlencsét is. Jól sikerült CCC mellett az irrigálás/aspirálás is biztonságosabban elvégezhető, hiszen szabadon lebegő tokdarabkák nincsenek, és nem utolsó sorban, a hátsó tok sérülése esetén is a műlencse (a sulcus ciliarisban) biztosan stabilizálható (optic capture módszer) lesz. Minden szürkehályog-műtét esetén a posztoperatív visus rehabilitáció egyik meghatározó feltétele a műlencsepozíciója a tokzsákban (ELP), ami a prémium műlencsék implantálása, illetve a presbyopia kezelése céljából végzett szemlencse műtétek bevezetése óta különösen nagy hangsúlyt kapott a szemsebészek körében. Megfelelő műlencse pozicionálás tökéletes CCC mellett lehetséges, ami kerek, centrális és a műlencse optikájától legalább 1 mm-el kisebb (kb. 5,0 mm-es) (Biró, 1998). Phacoemulsificatio szürkehályog-műtét során, a manuálisan kialakított CCC-t, a lencsetok szakításával és nyíró erő kifejtésével alakítjuk ki. A capsulotomiát a lencsetok közepéről indítjuk és kívülről fejezzük be, ügyelve arra, hogy a tok ne szakadjon be. Ennek ellenére, az esetek körülbelül 1 %-ban a manuálisan kialakított capsulotomia, tok berepedésekhez és beszakadásokhoz vezet (Werner és mtsai., 2010).

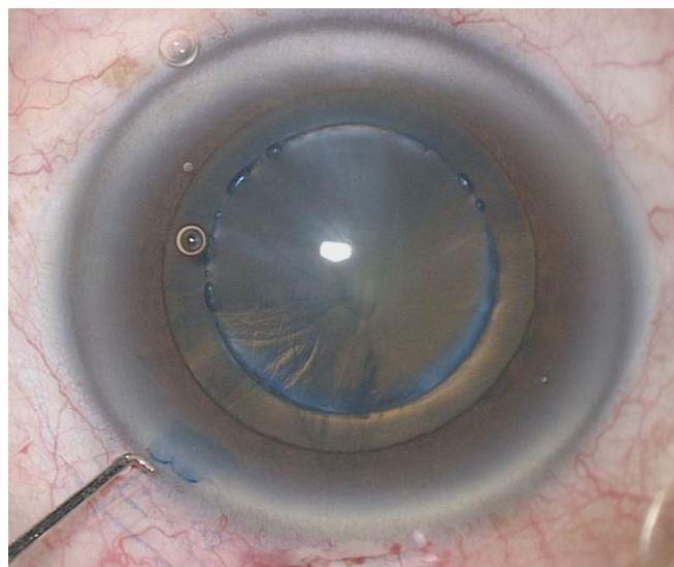
Mivel a femtoszekundumos lézerrel végzett beavatkozás számítógép által vezérelt, ezért precízebb (4. ábra), és várhatóan oldalberepedések nélküli sebészi bemetszést biztosít, ami különösen fontos lehet azokban az esetekben, amikor a CCC nehezebben elkészíthető (túlérett, fehér szürkehályog, congenitalis szürkehályog). Továbbá az operáló orvos könnyedén állíthat

be speciálisabb CCC átmérőket vagy formát, ami a prémium műlencsék implantálásánál nagy előnynek számít.



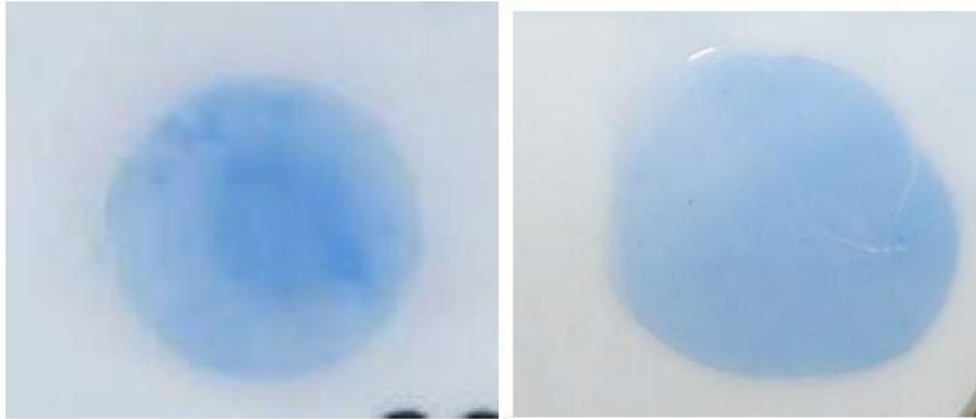
4. ábra: Operáló mikroszkóp látképe femtoszekundumos lézerasszisztált capsulotomia alatt
(Auffarth és Reddy, 2012)

A lézer fenti jellegzetességeinek köszönhetően a femtoszekundumos lézerasszisztált capsulotomia sokkal szabályosabb formájú, pontosabb (4. és 5. ábra), centrálisabb és jobban befedi a műlencse szélét, mint a manuálisan kialakított CCC (Nagy és mtsai., 2011; Auffarth és Reddy, 2012).



5. ábra: A femtoszekundumos lézerasszisztált capsulotomia centrális, szabályos formájú
(Auffarth és Reddy, 2012)

Femtosekundumos lézerrel sokkal pontosabb (6. ábra), erősebb és reprodukálható CCC-k kialakítása lehetséges, (Nagy és mtsai., 2009; Yeilding és mtsai., 2009; Friedman és mtsai., 2011; Szigeti és mtsai., 2012, Auffarth és Reddy, 2012).



6. ábra: A bal oldali képen szabályos formájú, femtosekundumos lézerasszisztált capsulotomia látható, ezzel szemben a jobb oldali képen szabálytalanabb formájú, manuálisan kialakított capsulotomia tekinthető meg (Auffarth és Reddy, 2012)

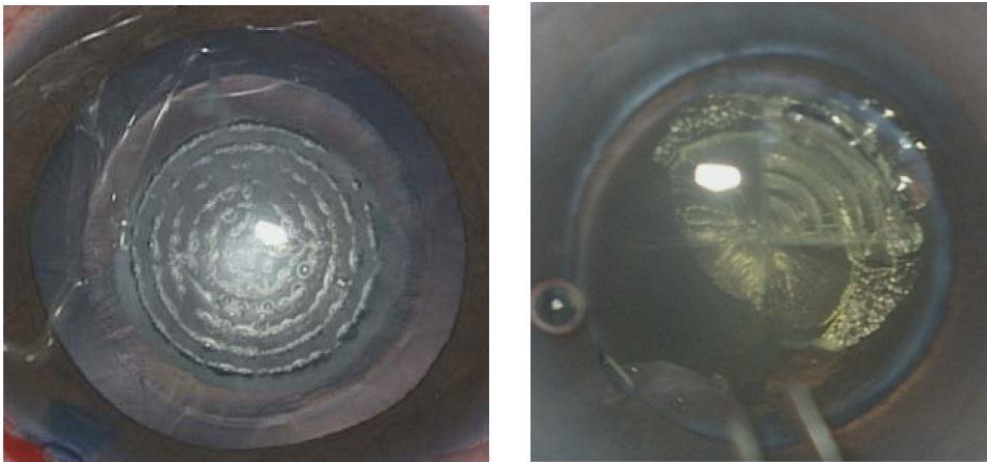
Jelen ismereteink alapján, a manuális capsulotomiás nyílás képzésével szemben, a femtosekundumos lézerasszisztált capsulotomiának egyetlen korlátozása van, a beszűkült pupilla, amin a lézeres kezelés előtt a pupilla mechanikus tágításával (iris hurok, Maljugin gyűrű) tudunk segíteni (Nagy, 2014).

Femtofragmentáció

A capsulotomia fejlődésének köszönhetően a lencse darabokat többé már nem az elülső csarnokban emulzifikáljuk, hanem a lencsemag apró részekre történő feldarabolását követően a lencsemag darabokat az eredeti helyén, azaz a lencsetokon belül távolítjuk el. A szürkehályogműtét fejlődése alatt a lencse fragmentációjára több technika is létezett, ezeket két csoportba sorolhatjuk: technikák, amelyek árokással indulnak a törés előtt, illetve azok, amelyek azonnal töréssel indulnak. Napjainkban a Phaco-Chop, Stop and Chop, illetve a Divide an Conquer technikák a legelterjedtebbek. A szemlencse feldarabolása közben figyelmet kell fordítani a hátsó tok védelmére is. Phacoemulsificatio alatt a szaruhártya endothelsejt károsodását a felhasznált phacoenergia határozza meg, ezért erősebb phacoenergia

használatakor, a posztoperatív első napokban súlyosabb szaruhártya vizenyő látható. Emellett fontos, hogy a phacoenergia a szemben hátrafele se terjedjen.

A phacoemulsificatioval szemben, a femtofragmentáció lényege, hogy a lézer segítségével, a sebész járatot tud képezni a magban (7. ábra), így a feldarabolás kisebb intraocularis erővel kivitelezhető (8. ábra). Ennek köszönhetően kevesebb ultrahang energiára van szükség. Így lecsökken a zonula rostokat, illetve a tokot érintő mechanikai stressz, és kevesebb intra- és posztoperatív komplikáció várható. Továbbá a szaruhártya átlátszó, kristálytisztá marad a posztoperatív időszakban is, hiszen nem nyeli el a lézersugarakat (Holzer és mtsai, 2006; Stein és Stein, 2013; Fishkind és mtsai., 2010; Auffarth és Reddy, 2012). Így nem meglepő, hogy femtoszekundumos lézert használt szürkehályog-műtéttel jobb visus rehabilitációt tudunk biztosítani (Edwards és mtsai., 2010).



7. ábra: Körkörös és kvadráns mintázatú femtofragmentáció (Auffarth és Reddy, 2012)



8. ábra: Femtofragmentáció után könnyen törhető a lencsemag (Auffarth és Reddy, 2012)

Femtosekundumos lézerrasztált szürkehályog-műtét leírása

A sikeres műtét feltétele a jó műtéti terv elkészítése, hiszen annak ellenére, hogy a lézerekészülékbe beépített OCT a szaruhártya-, elülső csarnok-, pupilla- és a szemlencse anatómiai paramétereit és sajátosságait tartalmazza, az operatőrnek minden egyes műtétnél külön be kell állítania a capsulotomia méretét, a femtofragmentáció mintázatát és a szaruhártyán kialakított sebek pontos helyét és mélységét (Nagy, 2012b). Ezt követően a szemet össze kell kapcsolnunk a lézerekészülékkel, ami a következőképpen történik: helyi érzéstelenítést követően a szemre helyezünk egy un. interfészt (törekedni kell a centrális illesztésre), amit a készülék szívással rögzít a szemfelszínen. A műtét ezen lépésénél számíthatunk arra, hogy a szemnyomás átmenetileg körülbelül 20 Hgmm-el megemelkedhet (Chaurasia és mtsai., 2010). Mindezek után négy OCT mérés történik. Az első mérést a szabályos és centrális capsulotomia kialakítása érdekében végezzük, hiszen itt mérjük meg az elülső csarnok mélységét, illetve az elülső lencsetok legalacsonyabb- és legmagasabb pontját. A második mérés alatt a szemlencsére összpontosítunk, és a femtofragmentáció biztonsági zónáját figyelembe véve, kiválasztjuk a szemlencse darabolásának mintázatát. A harmadik mérésnek köszönhetően, a sebészítés alatt a sebek geometriai szerkezete, helye, alakja szabadon választható az operatőr igényei szerint. Végül az utolsó méréssel a SIA mértékét tudjuk csökkenteni, az ívelt szaruhártyán végzendő bemetszéseket tervezhetjük meg (Nagy és mtsai., 2009; Konstantopoulos és mtsai., 2007; McAlinden és mtsai., 2011; Slade és mtsai., 2010). Továbbiakban a műtét steril izolálás alatt történik, megnyitjuk a szaruhártya sebeket, hogy egy csipesz segítségével a lézerrel körbe vágott elülső lencsetok darabot eltávolítsuk. A további lépések annyiban különböznek a klasszikus szürkehályog-műtéttől, hogy itt a phacoemulsificatiót a femtofragmentált magban végezzük (Palanker és mtsai., 2010b).

Előnyök és hátrányok

Napjainkban a szürkehályog-műtethez kötődő egyik leggyakoribb elvárás, a közel tökéletes látóélesség visszanyerése. Ennek olyan akadályai lehetnek, mint a műtét utáni szaruhártya ödéma, Irvin-Gass szindróma stb. Az Irvin-Gass szindrómaként ismert pseudophakiás cystoid maculaödéma az egyik leggyakoribb oka a szürkehályog-műtét utáni, nem megfelelő visus rehabilitációnak. Eddigi ismereteink alapján, femtosekundumos lézerrasztált szürkehályog-műtét után a cystoid maculaödéma kialakulása ritkább (Nagy és mtsai., 2012a). Hasonlóan a cystoid maculaödémánál tapasztaltakhoz, a szaruhártya ödéma mértéke is kevesebb femtosekundumos lézerrel végzett szürkehályog-műtétnél (Takács és

mtsai., 2012). Ugyancsak posztoperatív megfigyelések alapján várható a limbus körüli kötőhártya petechiák, illetve kis vazodilatációk megjelenése a femtoszekundumos lézer használata után. Valószínűleg, a műtét alatt használt interfész (kontaktlencse) mechanikai hatásának (vákumos rögzítés) köszönhetően alakulnak ki, akár csak az átmeneti szemnyomás-emelkedés (Hodge és mtsai., 2012). Mindezek mellett a magas anyagköltsége miatt a femtoszekundumos lézerasszisztált szürkehályog-műtét széles körben továbbra sem terjedt el.

Az elülső capsulotomiás nyílás képzésének módszerei

Manapság a klasszikus szürkehályog-műtét elengedhetetlen lépése az elülső lencsetok megnyitása. Történelmi hátterek ismeretében tudhatjuk, hogy az elülső lencsetokon a capsulotomiás nyílás kialakítása a durva megnyitástól a folyamatos kör alakú capsulorhexis kialakulásáig fejlődött. Ugyanakkor a különböző szem-sebészeti modernizációknak köszönhetően most már a capsulotomia kialakítása automatizált, fejlett technikai eszközök által vezérelt is lehet.

Módszerek az elülső capsulotomia kialakítására

Első próbálkozások

A capsulotomiás nyílás kialakításának első próbálkozásai a „lencse süllyesztő” műtéti technikával állnak összefüggésbe, ahol az operáló orvos a cystotom által egy bemetszést készített az elülső lencsetok alsó részén, majd a lencsemag eltávolítására a szemgolyóra gyakorolt nyomás által került sor. Később Vogt egy csipesszel darabokat próbált kitépni az elülső lencsetokból (Steinert és Fine, 1995).

Karácsonyfa capsulotomia

1968-ban Kelman bemutatta a karácsonyfa capsulotomiát, ahol ugyancsak egy cystotom segítségével háromszög alakú nyílást képezett az elülső lencsetokon (Kwitko és Simcoe, 1998).

Konzervnyitó capsulotomia

Az eddigi elképzeléseket továbbgondolva, Jacques Daviel kifejlesztette a konzervnyitó capsulotomiát (can opener capsulotomia), amelyben az elülső lencsetokon egy cystotom segítségével 5-6 mm átmérőjű kört próbált létrehozni, több kisebb beszakítás révén. Habár, ez egy technikailag könnyen elsajátítható módszer, elsősorban a komplikációként megjelenő radiális beszakadások (a lencsetokon) miatt nem használjuk (Sharma és mtsai., 2019).

Boríték capsulotomia

Annak ellenére, hogy 1979-ben Sourdille és Baikoff már javasolta a boríték capsulotomia elvét, állítva, hogy ez biztonságosabb, mint a konzervnyitó capsulotomia, végül mégis Albert Galand népszerűsítette. A boríték capsulotomia lényege, hogy az elülső lencsetok felső harmadában egy bemetszést képzett, ezen keresztül lehetett elvégezni a műtét további

lépéseit, és a capsulotomiát csak a műlencse implantálása után egészítette ki (Galand, 1983). Bár, érett szürkehályogban rendkívül hasznos eljárásnak bizonyult (Ndiaye és mtsai., 1999), a műlencse decentrációja (Akkin és mtsai., 1994) és a zonula rostok károsodása (Oner és mtsai., 2001; Budo és Montanus, 1991) miatt napjainkban már nem használatos.

Folyamatos kör alakú capsulorhexis (CCC):

Végül, amióta Neuhann és Gimbel egymással párhuzamosan kifejlesztette a folyamatos kör alakú capsulorhexist, a szürkehályog-műtétek alatt a radier irányú szakadásokkal szemben ellenállóbb tokmegnyitást tudunk létrehozni (Gimbel és Neuhann, 1990). Ebben az esetben a capsulotomiát a lencsetok közepéről indítjuk, és kívülről fejezzük be, ügyelve arra, hogy tok beszakadások ne alakuljanak ki. Ennek ellenére még így is létrejöhetnek beszakadások az elülső lencsetokon (Olali és mtsai., 2007), vagy ez sajnálatos módon hátra is terjedhet a hátsó tokra (Marques és mtsai., 2006).

Plasma Blade (PB) elülső capsulotomia

Úgynevezett „fugo blade” szálát helyezünk az elülső lencsetokra, amit 360°-ban körbe visszük a tokon. Mivel ez egy elektromos eszköz, úgy tudjuk körbe vágni az elülső lencsetokat, hogy a capsulotomia vonala nem fut ki oldalra. Ennek ellenére ez a módszer a klinikai gyakorlatban nem terjedt el, sokszor a vágás széle egyenetlen maradt (Izak és mtsai., 2004).

Háromszög elülső capsulotomia

Vannas ollóval is készíthető nyílás az elülső lencsetokon, hypermaturus szürkehályog esetén. Első lépésként a lencsetok alsó részén bemetszés történik, ezt követi a kéreg leszívása és a tokzsák feltöltése viszkoelasztikus anyaggal. Csak ezután komplettálják a capsulotomiát (Vajpayee és mtsai., 1995).

Lencse-csípő technika

Lágy szürkehályog, vagy zonula rost gyengeség esetén fontos műtéti eljárás, hiszen itt egy éles tűvel szurkálják az elülső lencsetokat, így védik a zonula rostokat, ugyanakkor kis zsebet képeznek a tokon. Végül a zsebet megfogva hagyományos CCC-vel folytatódik az eljárás (Snyder és Lindsell, 2010).

Pulse-electron avalanche knife (PEAK) elülső capsulotomia

A PEAK gyancsak elektromos eszköz, amely nagy frekvenciájú kisülésekkel plazmát képez és vágja a tokot. Nem túl elterjedt módszer (Palanker és mtsai., 2010a).

Fejlett technikai eszközök által vezérelt elülső capsulotomia kialakítás

Tekintettel arra, hogy egyre növekvő igényné vált a közel tökéletes látóélesség visszanyerése szürkehályog-műtét után, a CCC is minél tökéletesebb centrális helyzetű és körkörös kell legyen. Ebben jelent nagy áttörést a fejlett technikai eszközök által vezérelt capsulotomia kialakítás.

Femtosekundumos lézerasszisztált elülső capsulotomia (FLACS)

A femtosekundumos lézerasszisztált elülső capsulotomia jelentette az első igazán nagy előrelépést, amely által precízebb capsulotomia kialakítására lehetünk képesek (Friedman és mtsai., 2011). Mivel a szemlencse- és az elülső csarnok vastagsága egyénileg változó, szükség volt arra, hogy a pontos és precíz capsulotomia készítése érdekében a femtosekundumos lézerek egy OCT készülékkel legyenek ellátva, így a femtosekundumos lézerasszisztált capsulotomia számítógép vezérelt. Az OCT mérések alapján, és a szemre felhelyezett interfész segítségével, ultrarövid lézerimpulzusok által capsulotomiás nyílást képezünk az elülső lencsetokon. A megfelelő capsulotomia kialakításának érdekében nagyon fontos az interfész centrális illesztése.

Habár klasszikus szürkehályog-műtét esetén a manuális CCC-t, illetve egyes magánintézményekben a femtosekundumos lézerasszisztált capsulotomiát használjuk, egyre több új technika jelenik meg a capsulotomia kialakítására.

Precíziós elülső capsulotomia (PPC, Zepto és Aperture Rx)

A PPC olyan non-lézer technológia, amellyel automatizált, precíz CCC-t lehet kialakítani. Egy egyszer használatos, összehajtható, flexibilis nikkeltitánium ötvözet (Nitinol) segítségével, 5,2 mm átmérőjű capsulotomiás nyílást tudunk létrehozni az elülső lencsetokon. A műtét során a szaruhártya sebekén keresztül az elülső csarnokba vezetjük, majd a centrális pozícióban történő elhelyezése után, egy szívással rögzítjük az elülső lencsetokon az ötvözetet (közben a flexibilis ötvözet felveszi az eredeti alakját). Végül az elektromos impulzusok vágásával, négy milliszekundum alatt, és a zonula rostok minimális károsodásával kialakítjuk az elülső capsulotomiás nyílást (Chang és mtsai., 2016). Tekintettel arra, hogy ezzel az

eljárással a zonula rostok épsége jobban megőrzött, precíziós elülső capsulotomia zonulopátia esetén különösen hasznos lehet (Chang, 2017).

Szelektív lézerasztált elülső capsulotomia (SLC, CapsuLaser)

Hasonlóan a femtoszekundumos lézerhez, ez a lézer is folyamatos vágást biztosít. Ahhoz, hogy a CapsuLaser az elülső szegmens anatómiai tulajdonságait felismerje, szükséges az elülső lencsetok tripánkéssel történő megfestése. Körülbelül egy másodperc alatt körkörös és precíz capsulotomiát alakít ki, folyamatos hőenergia által. A capsulotomia átmérője 4,5 és 7 mm között változhat, amit az operatőr szabadon választhat meg (Brennan, 2017).

Continuous thermal elülső capsulotomia (CTC, ApertureCTC)

Ugyancsak precíz és körkörös elülső capsulotomia kialakítására alkalmas egy eldobható acél gyűrű által. A gyűrűt egy phaco-fejhez hasonló eszközre rácsatlakoztatjuk, majd a szaruhártya sebekén keresztül az elülső csarnokba vezetjük. Amikor a gyűrű ráilleszkedik az elülső lencsetokra, akkor folyamatos felmelegítéssel hat a lencsetok kollagén rostjaira, így alakítja ki a capsulotomiás nyílást (Brennan, 2017).

Erbium:Yttrium-Aluminum-Garnet (Er:YAG) lézer elülső capsulotomia

Az elülső tok megnyitása Er:YAG lézerrel történik. A klinikai gyakorlatban nem népszerű, és elterjedése nem is várható, mert erősebb szövet károsodást és több lencsetok beszakadást okoz, mint a CCC (Radner és mtsai., 2004)

Segédeszközök az elülső capsulotomiás nyílás képzésénél

Festék asszisztált elülső capsulotomia

Habár az operáló mikroszkóp fénye alatt legtöbbször jól látható az elülső lencsetok, bizonyos esetekben, mint pl. a csökkent vörös visszfénynek köszönhetően, a manuális CCC nehezen kivitelezhető az elülső lencsetok rossz láthatósága miatt. Ezekben az esetekben indokolt az elülső lencsetok festése. Leggyakoribb indikációi a festék asszisztált elülső capsulotomiának: a kifejlett (matur), fehér szürkehályog (Pandey és mtsai., 2000), tömött (barnálló) szürkehályog (Pandey és mtsai., 2000), jelentős szaruhártya homály (Bhartiya és mtsai., 2002), illetve a phacoemulsificatio mütéti technika tanulási folyamata (Dada és mtsai., 2002).

Tripánkék (Vision Blue):

Jelen ismeretek alapján, a tripánkék rendelkezik a legnagyobb biztonsági profillal. Toxicitása nem ismert, az elülső lencsetok bazális membránjához kötődik, a kollagénhálózathoz kötődve keresztkötevényeket alakít ki (Navanaty és mtsai., 2006; Mencucci és mtsai., 2007). Ugyanakkor leírták azt is, hogy megváltoztatja az epithelsejtek denzitását, életképességét. Apoptotikus jeleket, mitokondrium szakadásokat, endoplazmatikus retikulumok felpuffadását mutatták ki, a lencsetok epithelsejtjeiben tripánkék festés után (Portes és mtsai., 2010). Társbetegségek jelenlétében sokkal erőteljesebben festődik (pseudoexfoliatív szindróma, diabetes), illetve merevebbé válik az elülső lencsetok tripánkék hatására (Jardeleza és mtsai., 2009; Singh és mtsai., 2003; Chung és mtsai., 2005; Sharma és mtsai., 2002; Pandey és mtsai., 2002; Rossiter és Morris, 2005; Portes és mtsai., 2010; Navanaty és mtsai., 2006). A tripánkék molekula viszonylag nagyméretű, ezért normális körülmények között nem tud átjutni a lencse zonuláin. Gyakorlati tapasztalatok szerint megváltoztatja az elülső lencsetok biomechanikai tulajdonságait, ezáltal sokkal merevebbé, és könnyebben téphetővé teszi az elülső lencsetokot. Manuális elülső capsulotomia esetén ezzel lehet csökkenteni az oldalbepedések kialakulását, hiszen a megváltozott szakítószilárdság miatt a sebésznek kisebb energia kifejtésre van szüksége, ugyanakkor a tok nyújthatósága is csökken (Dick és mtsai., 2008; Wollensak és mtsai., 2004; Jardeleza és mtsai., 2009). A 0,06%-os tripánkék a lencsetok kollagén (IV-es típusú) hálózatára hat, ahol keresztkötevényeket alakít ki. Festést követően, egy percen belül a viszkozitási modulus növekszik, és a biomechanikai elváltozások megjelennek (Wollensak és mtsai., 2004).

Habár, a tripánkék festék használata egy, a CCC kialakítása előtt elterjedt technika, ennek rutinszerű használatát elsősorban mégis az operáló orvos igényei határozzák meg, mert a festék használatának javaslatai ellentmondásosak a szakirodalomban (Veckeneer és mtsai., 2001; Gaur és Kayarkar, 2005; Chowdhury és mtsai., 2004; Yamamoto és mtsai., 2005; Haritoglou és mtsai., 2004; Roos és Muir, 2005; Bhartiya és mtsai., 2002; Yetik és mtsai., 2002; Satofuka és mtsai., 2004; Chang és mtsai., 2005; Fritz, 1998; Fritz, 2002; Mencucci és mtsai., 2007; Jacobs és mtsai., 2006). Jelen ismeretek alapján, a tripánkék festék használatának egyetlen kontraindikációja a hydrophil acryl műlencse-implantáció, mert a műlencse elszíneződését okozhatja (Jacobs és mtsai., 2006).

Meg kell azonban jegyezni, hogy a szemészeti alkalmazáson kívül a tripánkék festést elterjedten alkalmazzák a sejtbiológiai és klinikai kutatásokban, ugyanis egy egyszerű és gyors módszer az élő és halott sejtek közötti különbségtétel során (Pegg, 1964; Tennant, 1964; Schroeter és Rieck, 2009; Paik és mtsai., 2008; Stoddart, 2011; Adan és mtsai., 2016). Ugyanis

a tripánkéket csak a már károsodott membránnal rendelkező sejtek (azaz a sejthalál állapotában lévő sejtek) veszik fel. Ép sejtmembránnal rendelkező sejtek esetén a membrán kizárja a festéket, azaz az ép sejtek nem festődnek.

Indocianinzöld (ICG)

0,125%-os vagy 0,5%-os ICG-t lehet használni az elülső lencsetok festésére. Toxicitása miatt, klinikai gyakorlatban már nem használjuk (Gou és mtsai., 2003).

Autológ vér

A betegtől származó 2 ml vért centrifugálják 200 rpm-en 2 percig, majd a felülúszót használják az elülső lencsetok festésére (Dada és mtsai., 2004). Klinikai gyakorlatban nem túl elterjedt.

Fluoreszcein

2%-os fluoreszceint használtak az elülső lencsetok festésére (Nahra és Castilla, 1998), klinikai gyakorlatban már nem használjuk.

Gentianaibolya

A gentianaibolya szintén használható az elülső lencsetok festésére. Nem túl népszerű, mert szaruhártya oedemát okoz (Unlü és mtsai, 2000).

Egyéb segédeszközök

Wallace capsulorhexis jelző

Az eszköz segítségével 6 mm alatti capsulotomiás nyílást lehet kialakítani az elülső lencsetokon. A Wallace capsulorhexis jelző egy olyan kör alakú eszköz, amelyet a szaruhártyára kell illeszteni a capsulotomiás nyílás kialakítása előtt (Wallace, 2003).

Félkör alakú capsulorhexis jelző

A félkör alakú capsulorhexis jelzőt az elülső lencsetokra helyezik a capsulotomiás nyílás kialakítása előtt. Nem túl népszerű, mert műtét alatt nehéz irányítani (Suzuki és mtsai., 2017).

Kör alakú capsulorhexis jelző

Kör alakú capsulorhexis jelző, kialakítása Tassignon nevéhez fűződik, a szaruhártya

seben keresztül vezetik az elülső csarnokba, majd ezt követően ráhelyezik az elülső lencsetokra. Hátránya, hogy 3,0 mm alatti szaruhártya seben nagyon nehéz bevinni az elülső csarnokba (Tassignon és mtsai., 2006).

VERUS capsulorhexis jelző

Kör alakú, szilikon jelző, előnye, hogy használat közben laterális stabilitást biztosít (Kahook és mtsai., 2016).

Nyitott polymethyl methacrylat (PMMA) gyűrű

5,3 mm átmérőjű, nem összehajtható PMMA, félkör alakú gyűrű, amelyet a szaruhártya seben keresztül vezetnek az elülső csarnokba, majd az elülső lencsetokra helyezik, ezt követően a capsulotomiás nyílás kialakítását megkezdik. Segítségével nem mindig tökéletesen centrális elhelyezésű az elülső capsulotomia (Lee és mtsai., 2018).

Összetett irányítási rendszerek a szürkehályog-műtétben

A rendszer által (VERION, Callisto), az operáló mikroszkóp képére mintát vetítenek, ez segít a precíz CCC kialakításában. Gyakorlott operatőrök esetén is javítja a CCC minőségét (Haeussler-Sinangin és mtsai., 2017).

Az elülső capsulotomiás nyílás minőségének jelentősége

A prémium műlencsék implantálásának köszönhetően a műlencse pozicionálása miatt, fontossá vált a kialakított capsulotomiás nyílás minősége. Ugyanakkor nemcsak a posztoperatív visus rehabilitációt befolyásolja a capsulotomia jellege, hanem a műtét további menetét is meghatározza. A lencsetok beszakadása révén intraoperatív nehézségek (pl. hátsó lencsetok beszakadása, üvegtest vesztés, „dropped nucleus”, stb.), és posztoperatív szövődmények (pl. műlencse decentrációja) alakulhatnak ki.

Intraoperatív nehézségek a lencsetok beszakadása miatt

Abban az esetben, ha az elülső capsulotomia kialakításakor, ez egy vagy több ponton kifut oldalra, akkor a phacoemulsificatio szürkehályog-műtétet legtöbb esetben nem szabad a klasszikus módon tovább folytatni. A műtéti terv újragondolása szükséges, és a helyzetnek megfelelően esetleg nyitott tokos hályogkivonásra, vagy kis metszésből végzett műtetre (small

incision cataract surgery) kell áttérni. Ez kemény mag esetén különösen fontos. Ugyanakkor a további műtéti lépésekben a capsulotomia oldalra kifutásának helye meghatározó. Ha ez a szaruhártya sebtől a disztális 180°-ban történik, akkor célszerű elkerülni a további phacoemulsificatiót. Ha a szaruhártya sebtől a proximális 180° érintett, akkor módosított (igen óvatos) phacoemulsificatio technikával tovább lehet folytatni a műtétet (Toshniwal, 2013).

Körkörös, de kisméretű elülső capsulotomiás nyílás kialakításakor a műtét további lépéseiben nehéz a lencsemaggal történő manipuláció, és elsősorban a szaruhártya seb alatti területen a kéregrészek eltávolítása nehézkessé válik.

A lencsetok beszakadásának posztoperatív következményei

Az elülső lencsetok beszakadása több problémát is maga után vonhat. Ha ez a szakadás a hátsó tokra is ráterjed, akkor az üvegtesti térbe lencse, vagy lencse darabkák süllyedhetnek („dropped nucleus”), ami posztoperatív gyulladást (uveitis), cystoid maculaödémát, szemnyomás-emelkedést vagy szekunder retinaleválást okozhat. Ezért a visszamaradt lencse darabkák műtéti eltávolítása minden esetben szükséges.

Az elülső capsulotomiás nyílás és a műlencse helyzete

A nem tökéletes elülső capsulotomiás nyílás (CCC) négy következményt vonhat maga után:

- a tokzsákba implantált műlencse stabilitása és centrális pozíciója megváltozik
- ezért az effektív lencsepozíció (ELP) nem megfelelő
- a capsulotomiás nyílás széle nem fedi be teljesen a műlencse szélét
- ez hozzájárul a posztoperatív hátsó tok fibrosis kialakulásához

Az elülső capsulotomiás nyílás mérete, konstrukciója közvetlenül befolyásolja az ELP-t (Hodge és mtsai., 2012). Az effektív lencsepozíció akkor számít jónak, ha a tokzsákba implantált műlencse haptikái mindenhol jól támaszkodnak a tokzsákban, illetve a műlencse optikája centrális pozíciójú. Szabályos, folytonos, de túl nagyméretű elülső capsulotomiás nyílás esetén a tokzsákba implantált műlencse előre csúszhat, aminek refraktív következményei lesznek (myopiás shift). Viszont, ha a szabályos és folytonos elülső capsulotomiás nyílás túlságosan kis méretű, akkor a tokzsákba implantált műlencse a tokzsák zsugorodása miatt hátrafelé mozdulhat, aminek szintén refraktív következményei lesznek (hypermetropiás shift). A műlencse jó pozíciója a tokzsákban nagyon fontos, mert a műlencsének a tokzsákban előre vagy

hátrafelé történő minimális elmozdulása jelentős refrakció változással jár (Matsuura és mtsai., 1989; Reddy és mtsai., 2013; Nagy és McAlinden, 2015).

Az elülső capsulotomiás nyílás és a posztoperatív hátsó tok fibrosis kialakulása

Az intraocularis műlencse-implantáció bevezetése óta ismert késői posztoperatív szövődmény a hátsó tok fibrosis megjelenése a szürkehályog-műtéten átesett betegek körében (Apple és mtsai., 1999). Napjainkban is a posztoperatív hátsó tok fibrosis az egyik leggyakoribb szövődménye a komplikációmentes szürkehályog-műtétnek (Dholakia és Vasavada, 2004). Jelen ismeretek szerint a posztoperatív hátsó tok fibrosis kialakulása csökkenthető, ha:

- éles hátsó szélű (szögletes) műlencsét implantálunk a tokzsákba (Nishi és mtsai., 2000; Peng és mtsai., 2000b)
- az elülső capsulotomiás nyílás legalább 0.5-1.0 mm-el körkörösén befedi a műlencse optikáját (Ravalico és mtsai., 1996)
- alapos kéreg eltávolítást végzünk (Apple és mtsai., 2000)
- műtét alatt az elülső lencsetok epithelsejtjei nem sérülnek (Jay, 2004)
- a műtét végén a hátsó tokon minimális redőződés látható (Jay, 2004)

Az elülső lencsetok epithelsejtek migrációja és az equatoriális sejtek proliferációja kulcs szerepet játszik a posztoperatív hátsó tok fibrosis kialakulásában (Apple és mtsai., 1992). Habár manapság minden szürkehályog-műtét esetén szövetbarát műlencse implantálása történik (Ursell és mtsai., 1998), a posztoperatív hátsó tok fibrosis megjelenésének csökkentése érdekében, kerek, centrális, kb. 5.0 mm-es CCC kialakítása szükséges (Birinci és mtsai., 1999). Megfelelő elülső capsulotomiás nyílás esetén, a műlencse és a CCC pereme egy zárt rendszert képez. Azon molekuláris biológiai folyamatok, amelyek a hátsó tok fibrosis kialakulásában játszanak szerepet, az elülső lencsetok reziduális epithelsejtjei, a beültetett műlencse széle és a hátsó tok között zajlanak le (Marcantonio és Vrensen, 1999). Szabályos, folytonos, de túl nagyméretű elülső capsulotomiás nyílás esetén, nem jön létre a zárt rendszer a műlencse és a CCC pereme között, így az epithelsejtek és germinatív sejtek proliferációja és migrációja akadálytalan lehet. Ugyanakkor szabályos, folytonos, de túlságosan kisméretű elülső capsulotomiás nyílás esetén több lencsetok-epithelsejt kerül közvetlen kontaktusba az implantált műlencse felszínével ez is fibrosus metaplasziát idézhet elő. Így már kontraktilis tulajdonsággal rendelkező sejtek válnak a lencsetok reziduális epithelsejtekből, és az aszimmetrikus tokzsák zsugorodásnak (phimosis) köszönhetően végül az implantált

intraocularis műlencse elmozdulhat a kívánt posztoperatív pozícióból (Marcantonio és Vrensen, 1999).

A szürkehályog-műtét jó posztoperatív visus rehabilitációval járó sebészeti beavatkozás, ezért érzékeny terület a posztoperatív látóélesség és kontrasztérzékenység eredményessége (prémium műlencsék esetén különösen fontos). Ehhez hasonlóan, a gyerekkorban történő szürkehályog-eltávolítás után is fontos a posztoperatív látóélesség, illetve mindazon tényezők kiiktatása, amelyek ezt negatívan befolyásolhatják.

Bizonyos esetekben tehát jelentős posztoperatív szövődmény a hátsó tok fibrosis, ami a visust és a kontrasztérzékenységet is nagymértékben rontja (Buehl és mtsai., 2005; Jose és mtsai., 2005).

Ismeretek a programozott sejthalál és a szemlencse kapcsolatáról

Programozott sejthalál és a szemlencse fejlődése

1972-ben vált ismertté az apoptózis folyamata, amely alatt jellegzetes morfológiai és biokémiai elváltozásokkal járó programozott sejthalált értünk. Fiziológias körülmények között az apoptózis megjelenik a fejlődés és az öregedés folyamán, valamint a homeosztatis mechanizmus egyik koordinátora, amely fenntartja az egészséges sejtpopulációt (Stellar, 1995). A szemlencse fejlődése, ezen belül a lencsehólyag formálódása során is megjelennek az apoptózisra jellemző morfológiai elváltozások, amelyek apoptotikus jellegzetességeket hordoznak magukban (Garcia-Porrero és mtsai., 1984). Feltehetően az epithelsejtek számát szintén az apoptózis szabályozza (Morgenbesser és mtsai., 1994).

Programozott sejthalál és a p53 molekula

Az apoptózis mechanizmusa rendkívül komplex és kifinomult, energiafüggő folyamat, amelynek során több molekula hat egymásra (Elmore, 2007). Egyik kulcsfontosságú molekula a p53 fehérje. A p53 egy transzkripciós faktor, amely többféle funkcióval rendelkezik, hiszen fontos a sejtproliferáció szabályozásában, illetve a DNS károsodás esetén megfigyelhető repair és apoptotikus folyamatokban is. A p53 szerepét elsősorban a szövet eredete és a sejt típusa határozza meg, illetve a sejtet érintő stressz mértéke. Ugyanakkor a p53 fehérje életideje nagyon rövid azon sejtekben, amelyeket stressz nem ért (Bai és mtsai., 2003).

Apoptotikus folyamat két fontosabb útvonal által valósul meg:

- extrinszik útvonal
- intrinszik útvonal

Az extrinszik útvonal a felszíni receptorok stimulálása révén indul el, ezzel szemben az intrinszik útvonal a mitokondrium működés változásával jár (Fridman és Lowe, 2003; Elmore, 2007). Az intrinszik útvonal mitokondriális folyamatok egyik szabályzó molekulái, a Bcl-2 család fehérjéin keresztül valósul meg, (Cory és Adams, 2002), melyek működését a p53 molekula szabályozza (Schuler és Green, 2001). A Bcl-2 fehérjecsaládba proapoptotikus és anti-apoptotikus fehérjék tartoznak. Az apoptotikus folyamatok elősegítése érdekében a p53 molekula oxigén szabadgyököt (ROS) is felszabadít (Polyak és mtsai., 1997), valamint a mitokondrium működését szabályozza, ezáltal is elősegítve az apoptózis kialakulását (Fridman és Lowe, 2003).

Fiziológiás körülmények között, a p53 molekula a magas turnovervel rendelkező szem szövetekben mutatható ki. Így nem meglepő, hogy a lencse epitheliumában a praeaequatoriális területen, az epithelsejtek sejtmagja magas p53 pozitivitással rendelkezik. Ezzel szemben a szemlencse germinatív területén alacsonyabb a p53 fehérje expressziója, a lencserostok pedig egyáltalán nem tartalmaznak p53 molekulát (Pokroy és mtsai., 2002).

Programozott sejthalál és a szürkehályog:

Nemcsak fiziológiás, hanem kóros impulzusok is beindíthatják az apoptotikus folyamatokat (Elmore, 2007). A szürkehályog kialakulásának molekuláris biológiai háttere még napjainkban is rendkívül vitatott. Ismert, hogy a szemlencse epitheliuma egyfajta barrierként működik a lencserostok és a csarnokvíz között. Így nem meglepő, hogy a szürkehályog kialakulása során a lencse epitheliuma strukturális változásokat szenved (Andjelic és mtsai., 2016). Szürkehályog-műtét során eltávolított elülső lencsetokok transzmissziós elektronmikroszkópos felvételein az epithelsejtek zsugorodása látható, melyet a szerzők apoptózis folyamatával magyaráztak (Sorkou és mtsai., 2019). Mások elképzelései szerint is a lencse elhomályosodása apoptotikus folyamatokkal hozhatók összefüggésbe (Li és mtsai., 1995; Lee és mtsai., 2002). Ez az elképzelés nem terjedt el szélesebb körben. Abban az esetben, ha a kezdeti celluláris folyamat (apoptózis) kulcsfontosságú lenne a szürkehályog kialakulásában, akkor a sejtsűrűségnek is csökkennie kellene (Harocopos és mtsai., 1998).

Programozott sejthalál és az elülső lencsetok hámsejtek:

Külső körülmények a sejtek életképességét veszélyeztetik, ez szürkehályog-műtét alatt nagymértékben kihathat az elülső lencsetok epithelsejtjeire. Az elülső lencsetokból származó tenyésztett epithelsejtek esetén megfigyelhető jelenségek arra engednek következtetni, hogy a

lencsetokhámsejtek életben tartják egymást, túlélést elősegítő faktorok szekrécijával (Ishizaki és mtsai.,1993). Ezt az egyensúlyt a mechanikai stressz fel tudja borítani, ami akár egy műtéti beavatkozás is lehet. Az apoptózis hisztopathológiai jellemzői fénymikroszkópos felvételeken: sejtsugorodás, citoplazma zsugorodás és kompaktálódás, kromatin kondenzáció, sejtmagban sötét kromatin részecskék jelenléte. Transzmissziós elektronmikroszkópos felvételeken apoptotikus folyamatokban szubcelluláris változásokat láthatunk: kromatin kondenzáció, elektronrendez sejtmag, apoptotikus testek kialakulása (Reichel és mtsai., 1998; Elmore, 2007). Ugyanakkor, a szürkehályog-műtét során, a biztonságos elülső capsulotomiás nyílás kialakítása érdekében használt tripánkék festék sejtek általi felvétele a sejtek sérülésére és membránszerkezetének megváltozására utal (Rossiter és Morris, 2005). Emellett apoptotikus jeleket is leírtak a lencsetok epithelsejtjeiben tripánkék festés után (Portes és mtsai., 2010). Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy a tripánkéket csak károsodott membránnak rendelkező sejtek veszik fel, ami ellentmond Portes eredményeinek, hiszen klasszikus apoptózis esetén általános jelenség, hogy a sejtmembrán ép marad.

Társbetegségek, például diabetes mellitus esetén a lencsetok epithelsejtjeiben nagyobb mértékű apoptotikus elváltozás detektálható szürkehályog-műtéten átesett személyeknél (Okamura és mtsai., 2002; Takamura és mtsai., 2001).

A femtoszekundumos lézerasszisztált szürkehályog-műtét bevezetése óta több tanulmány vizsgálta a szem szöveteiben megjelenő, lézer okozta károsodást. Annak ellenére, hogy az elérhető femtoszekundumos lézerkészülékek kissé eltérőek, működésüket tekintve hasonlóak. A szem szöveteiben megjelenő károsodások mértéke ennek ellenére eltérő a különböző lézerkészülékek használatakor (Sun és mtsai., 2018; Tognetto és mtsai., 2018). Például, a LensAR lézer készülék sokkal erőteljesebb károsodást okoz az epithelsejtben, mint a LenSx (Sun és mtsai., 2018). Ilyen tekintetben fontos a lézerkészülék beállításakor az ideális paraméterek ismerete. Tudomásunk szerint egyetlen lézerkészülékről készült ilyen ajánlás, miszerint a Catalys femtoszekundumos lézer használatakor, capsulotomiás nyílás képzésénél, 3 μm góc átmérő és sűrű góc távolság, illetve alacsony lézer energia (kisebb, mint 10 uJ) használata javasolt a sejt károsodás mértékének a csökkentése érdekében (Kang és mtsai., 2018). Kifejezett apoptotikus elváltozások a femtoszekundumos-asszisztált corneális seb-, illetve az elülső capsulotomiás nyílás képzésekor voltak kimutathatóak. Manuálisan kialakított sebképzés kisebb mértékű apoptotikus elváltozást mutatott, mint a femtoszekundumos lézerasszisztált CCI az eltávolított lencsetok széli részén (Mayer és mtsai., 2014a). További fénymikroszkópos vizsgálatok alátámasztották, hogy elülső capsulotomiás nyílás kialakításakor magasabb lézer energia használatával a vágási felszín mentén a sejtek

elmozdulása figyelhető meg, és demarkációs vonal alakul ki (Ostovic és mtsai., 2013; Sun és mtsai., 2018). Ugyanakkor, a lencsetok széli részén az epithelsejtek károsodott sejtmaggal rendelkeztek (Kohnen és mtsai., 2014). Ezen eredmények alapján feltételezhető, hogy az elülső capsulotomiás nyílás kialakításakor a lencsetok sérül, és az epithelsejtekben apoptotikus folyamatok indulnak meg. Eddigi vizsgálatok a manuálisan kialakított elülső capsulotomiás minták epithelsejtjeiben kevesebb apoptotikus elváltozást találtak, mint a femtoszekundumos lézerrel végzett mintákban. Femtoszekundumos lézerasszisztált elülső capsulotomiás nyílás kialakításakor, az epithelsejtekben a vágási felszín mentén nagyobb mértékű sejtkárosodás látszik, melynek mértékét a lézer behatási ideje határozta meg (Sun és mtsai., 2018). Mindezek mellett, egyéb vizsgálat eredményei szerint a manuális CCC epithelsejtjei a lencsetok periferiáján, a vágási felszín mentén mutattak sejtpusztulást. Ezzel szemben, a femtoszekundumos lézerasszisztált CCC epithelsejtjeinek apoptotikus jelei a lencsetokon a demarkációs vonalnál és a lézer góccok mentén voltak láthatóak. A korábbi megfigyelés szerint, az apoptotikus morfológiai jelek kialakulását a használt pulzusenergia határozta meg (Mayer és mtsai., 2014b).

Programozott sejthalál és a posztoperatív hátsó tok fibrosis:

Sejtkárosodás esetén anti-apoptotikus folyamatok, védekezési mechanizmusok zajlanak a sejtekben (Elmore, 2007), melyeknek a posztoperatív hátsó tok fibrosis kialakulásában is fontos szerepe lehet (Martinez és Iongh, 2010). A műtét alatti molekuláris elváltozások a lencse eltávolítása utáni re-epithelizációt is befolyásolják (Takamura és mtsai., 2003). Az elülső lencsetok epithelsejtek migrációja és proliferációja kulcs szerepet játszik a posztoperatív hátsó tok fibrosis kialakulásában (Apple és mtsai., 1992). Kato és mtsai. (1997) a posztoperatív hátsó tok fibrosis patomechanizmusát tanulmányozva műtét után három területet vizsgáltak: az elülső lencsetok capsulotomia után visszamaradt része és a hátsó lencsetok találkozási pontját (adhezív régió), az elülső lencsetok capsulotomia után visszamaradt részét (intracapsuláris régió) és a hátsó lencsetok centrális részét. Eredményeik szerint az apoptózist csak az adhezív régióban tudták kimutatni, viszont a posztoperatív harmadik naptól az intracapsuláris régióban a sejtek megnyúlt rostokká alakultak át, az ötödik naptól kezdve pedig lapos sejtek kezdtek átkúszni a hátsó lencsetok centruma felé. A megfigyelt elváltozások értelmében az apoptózist a sebgyógyulási mechanizmus részeként értelmezték, amely a posztoperatív hátsó tok fibrosis kialakulását segíthetik elő (Kato és mtsai., 1997).

Ezen ismeretek birtokában szürkehályog-műtét alatt mechanikai úton (a lencsetok polírozása) a lencsetok reziduális epithelsejtek minél tökéletesebb eltávolítására törekszik az

operáló orvos. Ugyanakkor, a posztoperatív hátsó tok fibrosis kialakulásának esélyét tovább lehet csökkenteni a választott és beültetésre kerülő intraocularis műlencse típusával (műlencse anyaga és formája – minél élesebb hátsó széllel rendelkezik, annál kevesebb epithelsejt tud vándorolni a hátsó tok irányába). Tekintettel arra, hogy a posztoperatív hátsó tok fibrosis prevenciója a prémium műlencsék implantálása óta még inkább előtérbe került, új kutatási területként az apoptotikus folyamatokat is vizsgálják az esetleges farmakológiai terápia kialakítása érdekében. Ezen tanulmányok szerint potenciális prevenciós kezelési lehetőség lehet az apoptózist elősegítő, direkt citotoxikus anyag használata. Jordan és mtsai. (2001) a Mitomycin C intraoperatív használatával (irigáló folyadék tartalmazta a Mitomycin C-t) fokozott apoptózist figyeltek meg az eltávolított elülső lencsetok epithelsejteken (Jordan és mtsai., 2001). Awasthi és Wagner a reziduális epithelsejtek proliferációjának a csökkentésében látnak preventív terápiás lehetőséget. Kísérletükben MG 132-t használtak, amely reverzibilisen gátolja a proteoszómális fehérje degradációt és ezáltal antiproliferatív szerként működik az epithelsejtek számára (Awasthi és Wagner, 2006). Ezek a farmakológiai terápiás lehetőségek ígéretesnek tűntek, jelenleg kísérleti fázisban vannak, a klinikai gyakorlatban nem terjedtek el.

Fentiek alapján egyértelmű összefüggés létezik a szürkehályog-eltávolítást követően a lencsetok gyógyulása, regenerálódása, apoptotikus elváltozása és a posztoperatív hátsó tok fibrosis megjelenése között (Frezzotti és mtsai., 1990).

CÉLKITÚZÉS

Munkánk során manuális, illetve femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomia módszerével eltávolított elülső lencsetokszöveteket 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 paramétereit vizsgáltuk.
3. a manuális, illetve femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomia módszerével eltávolított elülső lencsetok sejtek citoskeletális rendszerében megfigyelhető változásokat.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Betegek

Etikai engedély

Vizsgálataink során felhasznált manuális és femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomiával eltávolított lencsetokszöveteket a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar és Klinikai Központ (ÁOK-KK), Szemészeti Klinikájáról és a Budapesti Optimum Látásjavító Lézerközpontból kaptuk. A mintákat az egyetemi Etikai Bizottság jóváhagyásával gyűjtöttük (Pécsi Tudományegyetem, 5426). A lencsetokszövetek a betegek írásos beleegyezését követően, anonim mintaként kerültek szövettani és laboratóriumi feldolgozásra.

Minták

Pécsi Tudományegyetem ÁOK-KK Szemészeti Klinikájának és a Budapesti Optimum Látásjavító Lézerközpont 2014 és 2019. között operált beteg-anyagából nyert mintákat használtuk. Manuális és femtoszekundumos lézerrel (VICTUS® Femtosecond Laser, Bausch + Lomb, USA) eltávolított elülső lencsetokszövet epithelsejtjeit tanulmányoztuk (n=110). 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 impulzushossz. A manuálisan eltávolított elülső lencsetokokat az egyes csoportba (n=63), míg a femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomiákat a kettes csoportba (n=47) soroltuk. Szövettani vizsgálatra (fénymikroszkópia és transzmissziós elektronmikroszkópia) 45 mintát használtunk, molekuláris biológiai vizsgálatot (PCR) 20 minta esetén végeztünk. Továbbá immunfluoreszcens vizsgálat 25 mintán történt, az aktin citoskeleton vizsgálatra 10 mintát használtunk, és 10 minta esetén végeztünk sejtenyésztést (1. táblázat).

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
Sejtenyésztés	n=5	n=5

Szövetteni vizsgálat

Fénymikroszkópia és transzmissziós elektronmikroszkópia

Szürkehályog-műtét során frissen kivett lencsetokokat 2%-os formaldehid és 2,5 %-os glutáraldehid fixálóban tároltuk (foszfátpuffer 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. Az ozmium-tetroxiddal történt fixálást követően az elülső lencsetokokat emelkedő koncentrációjú alkoholsorban víztelenítettük. Víztelenítést követően rövid mosás (2x2 perc), és propilén-oxid kezelés következett, majd a mintákat Durkupán ACM gyantába ágyasztuk be (Sigma Aldrich, Budapest, Magyarország). A beágyasztott mintákból Leica Ultracut R ultramikrotómmal 700 nm vastag félvékony metszeteket metszettük, melyeket tárgylemezre helyeztünk és toluidinkékkel festettük (Sigma Aldrich, Budapest, Magyarország), majd fénymikroszkóp segítségével vizsgáltuk (Olympus BX 50 mikroszkóp). Ezek mellett ultravékony, 50 nm vastag metszeteket készítettünk, melyeket rácsos gridekre 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 pontos kvantifikálását a 700 nm vastag félvékony metszeteken végeztük, Olympus BX 50 mikroszkóp (40x-es nagyítás) segítségével. Mindegyik minta minimum 10 mérési blokkot tartalmaz, az így kapott 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 $p \leq 0,05$. A kapott 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 StepOnePlus[™] and Real Time PCR System (Life Technologies) segítségével vizsgáltuk a PCR termékeket ciklusonként egyszer. A fent leírt reakciónál a végső térfogat 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 (2. táblázat). Minden relatív termék mennyiséget a StepOne Software és a Livak analitikai metódus segítségével határoztuk meg. A β -aktint használtuk belső kontrollnak.

A géneexpresszió változásokat a $2(-ddCT)$ módszerrel kvantifikáltuk. A kapott PCR görbe kiértékelése és kvantifikálása StepOnePlus[™] and Real Time PCR quantification software 4.1-el történt. Az egyes csoportok összehasonlítása során Student-t próbát használtunk, és a szignifikancia szintet $p \leq 0,05$ -nél határoztuk meg.

Géneexpresszió 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, amely ebben az esetben a β -aktin génje volt. A Ct értéket automatikusan meghatározta a StepOne Software.

Sejtenyészet

Az eltávolított elülső lencsetokokat 14 napig tenyésztettük SAGM tenyésztő médiumban (SAGM basal médium és SAGM[™]Single Quots Supplement, Lonza, Basel, Svájc). Ehhez Small Airway Cell Basal Medium-ot (Lonza SABM Clonetics) és SAGM[™]Single Quots Supplement-et (Lonza) használtunk. Az epithelsejteket kisméretű Petri csészében standard sejtenyésztési körülmények között (37°C, 5% CO₂) tenyésztettük.

2. Táblázat: A kísérletben detektált gének leírása

	Célgén	Primer neve	Szekvencia	Termék hossza
Reverz transzkriptáz- polimeráz láncreakció	humán beta aktin (ACTB)	b-Actin2-F	GCGCGGCTACAGCTTCA	56
		b-Actin2-R	CTTAATGTCACGCACGATTTCC	56
	humán Cyclin D1 (CCND1)	CyclinD1-F	AACTACCTGGACCGCTTCCT	204
		CyclinD1-R	CCACTTGAGCTTGTTACCA	204
	humán interleukin 8 (IL8)	IL8-F	CAGTTTTGCCAAGGAGTGCTA	208
		IL8-R	AACTTCTCCACAACCCTCTGC	208
	humán interleukin 6 (IL6)	IL6-F	AGGGCTCTTCGGCAAATGTA	62
		IL6-R	GAAGGAATGCCCATTAACAACAA	62
	humán BCL-2	BCL-2-F	CATCTCATGCCAAGGGGGAA	72
		BCL-2-R	ATTCTTGACGAGGGGGTGT	72
	humán p53	p53-F	CGCTTCGAGATGTTCCGAGA	102
		p53-R	CTTCAGGTGGCTGGAGTGAG	102

Immunfluoreszcens vizsgálat

A minták fixálása és előkezelése

Az elülső lencsetokokat két órán át, szobahőmérsékleten 4%-os paraformaldehidben (PFA; Sigma, Budapest, Magyarország) fixáltuk, foszfátpufferben (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 a mintákat szobahőmérsékleten inkubáltuk, illetve az elsődleges antitestnek megfelelő fluorophorral konjugált szekunder antitestekkel is inkubáltuk. Ezután került sor a magfestésre 4', 6-diamidino-2-phenylindollal (DAPI, Sigma, Budapest, Magyarország). Végül Fluoromount-G-vel (Southern Biotech, USA) lefedtük a festett mintákat. Kontroll mintánkban az elsődleges antitestet kihagytuk, ami az eredmények helyes értelmezését segítette elő.

p53 jelölése

Az immunfestés protokollja szerint, az immunfluoreszcens vizsgálatnál elsődleges antitestként p53 ellen nyúlban termelt poliklonális antitestet használtunk (Santa Cruz Biotechnology, USA), melyet PBS-ben hígítottunk (1:50), majd a mintákat szobahőmérsékleten egy éjszakán át inkubáltuk. Ezután mintáinkat 2 órán át inkubáltuk a szekunder antitesttel (Alexa Fluor® 488 anti-nyúl, 1:100, Lifetechnology, Budapest, Magyarország). Magfestésnél a DAPI-t 1:1000-es hígításban használtuk. 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) és Glutamin-szintáz (GS) jelölése

Korábban ismertetett fixálás és előkészítés után, szobahőmérsékleten, egy órát inkubáltuk a mintákat 10%-os normál kecske szérumban (NGS; Vector Laboratories, Burlingame, CA). A GFAP ellen nyúlban termelt poliklonális és a GS ellen termelt monoklonális antitesteket PBS-ben hígítottuk (GFAP; 1:1000, Sigma, Budapest, Magyarország, GS; 1:1000, Transduction Laboratories, USA), majd 4 °C-on 72 órán át inkubáltuk a mintákat. Ezután a mintáinkat 24 órán át inkubáltuk a szekunder antitestekkel (Alexa Fluor® 568, anti-nyúl és 488 anti-egér, 1:1000, Lifetechnology, Budapest, Magyarország). Magfestésnél a DAPI-t 1:10000-es hígításban használtuk. A mintákat

konfokális lézerpásztázó mikroszkóp segítségével (Fluoview FV-1000 Laser Confocal Scanning Microscope) vizsgáltuk.

Mindezek mellett 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. Ezt követően került sor az antigén-antitest reakció megjelenítésére, amihez kromogén 3-3'-diamino-benzidint (DAB, Sigma, Budapest, Magyarország) használtunk. Végül, a mintákat tárgylemezre helyeztük, víztelenítettük, és DePeX-el (Sigma, Budapest, Magyarország) fedtük. Az így kapott teljes vastagságú szöveti mintákat fénymikroszkóp (Olympus BX 50) segítségével vizsgáltuk.

Eredmények kvantifikálása

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

Aktinhálózat vizsgálata

A vizsgált elülső lencsetokokat foszfátpufferben (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 percig 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 aktinhálózat tanulmányozásánál mindkét csoportban 5 mintát vizsgáltunk, mintánként 10 felvételt készítettünk (Zeiss LSM 710, 63x-os nagyítás), majd a felvételeken a sejtek számát meghatároztuk. A sejszámok átlagát \pm SEM (Student-t teszt, $p \leq 0,05$) értékét mutattuk eredményként. A statisztikai adatokat GraphPad Prism 5,03-as program segítségével elemeztük. Az ábrákat a mikroszkópos felvételekből Adobe Photoshop CS6 programmal készítettük.

Az idegen szavak írásánál a Süveges Szemészet Tankönyv (Süveges, 2010) írásmódját követtük.

EREDMÉNYEK

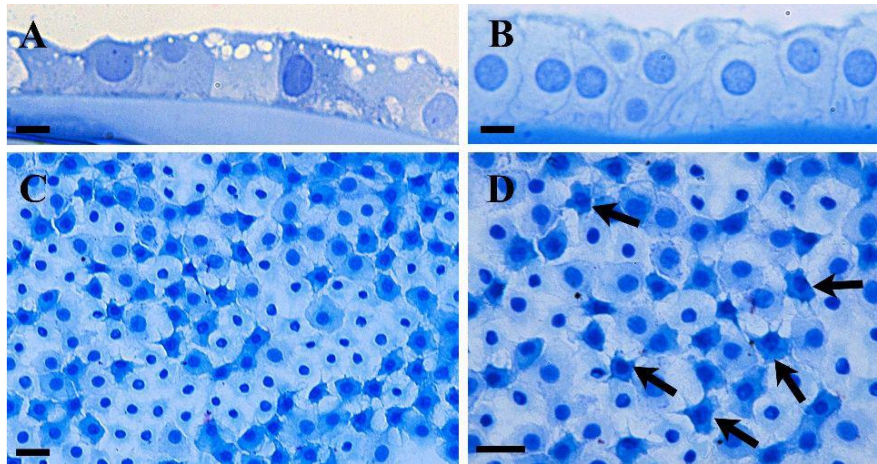
Szövetteni vizsgálatok eredményei

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

Az egyik típusú sejt normál köbhámsejtnek tekinthető, mert világos festődésű sejtmagot és citoplazmát tartalmazott. Továbbá kerek sejtmaggal, és láthatólag jól megőrzött 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 eltűnését és a citoplazma zsugorodását láttuk volt látható. Mindezek mellett az epithelsejtek bazális membránról történő leválása szintén látható volt. A zsugorodott, sötét sejtek gyakran tartalmaztak vakuólumokat a citoplazmájukban, felpuffadt intracelluláris sejtorganellumok jelenlétét jelezve.

A kontrollszerű, ép köbhámsejtekre jellemző morfológiával rendelkező sejtekhez képest figyelemre méltó morfológiai eltérések többnyire a manuális capsulotomiával eltávolított elülső lencsetokszövetekben jelentek meg. Ezzel szemben a femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomiával eltávolított lencsetokok epithelsejtjei többnyire a normál sejtekre jellemző képet mutattak (9 és 10. ábra).

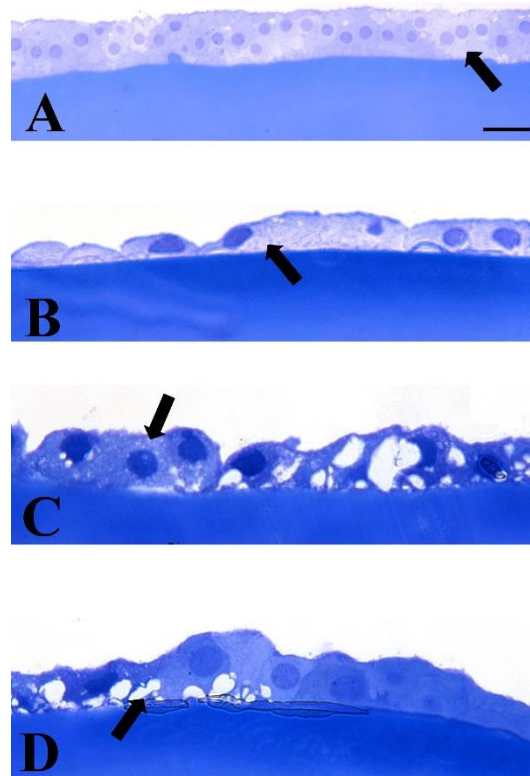
Az általunk megfigyelt morfológiai jellegzetességek súlyos sejtkárosodásra utalnak. Mindkét módszerrel eltávolított capsulotomia után az elülső lencsetokok epithelsejtjei egyaránt tartalmaztak normális morfológiájú és sötét citoplazmával és sejtmaggal rendelkező sejteket jelezve, hogy mindkét típusú beavatkozás sejtkárosodást okoz. Összességében azt láthattuk, hogy több károsodott sejt volt az elülső lencsetok epithelsejtjeiben manuális eltávolítás esetén, mint femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomia után. A degeneratív sejtek arányának pontosabb meghatározásához a félvékony metszeteken látottakat kvantifikáltuk (11. ábra).



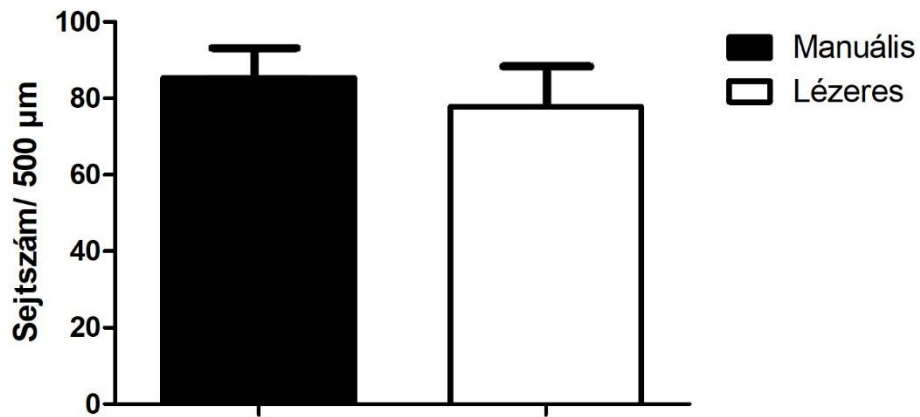
9. ábra: Fénymikroszkópos felvételek toluidin-kékkel festett félvékony metszetekből (A és B) és teljes vastagságú whole mount preparátumon (C és D) manuális (A, C, D) és femtoszekundumos lézerrel (B) végzett capsulotomia után. Manuális capsulotomia után úgy a félvékony metszeteken, mint a teljes vastagságú szöveti mintán egyaránt erőteljes morfológiai változás látható az epithelsejteken (nyilak a D képen). Lépték: 10 μm az A és B képen, 20 μm a C és D képen

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 (12. ábra). A leginkább a lézerrel végzett capsulotomia után látható kontrollszerű, kerek sejtmagot tartalmazó epithelsejtkekkel ellentétben a manuális csoportban található sejtek sejtmagja szabálytalan volt, amely feltételezhetően a sejt 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 tartalmazott, míg a manuális csoportban sok sejtben elektrondenz citoplazma és zsugorodott organelumok voltak láthatók (12. ábra). A sejtsugorodásnak köszönhetően, ami gyakran megfigyelhető a manuális csoportban, a sejt-sejt közötti kapcsolatok, illetve a sejt és extracelluláris mátrix közötti kapcsolatok is károsodtak. A lézerrel végzett műtét után jól megtartott epithelsejtkek között látható sejtkecskékkel ellentétben a manuális módon eltávolított lencsetok epithelsejtjeit széles rések választották szét. Több sejt közötti kapcsolatnál megfigyelhető volt, hogy sötét citoplazmájú sejthez kapcsolódott az ép,

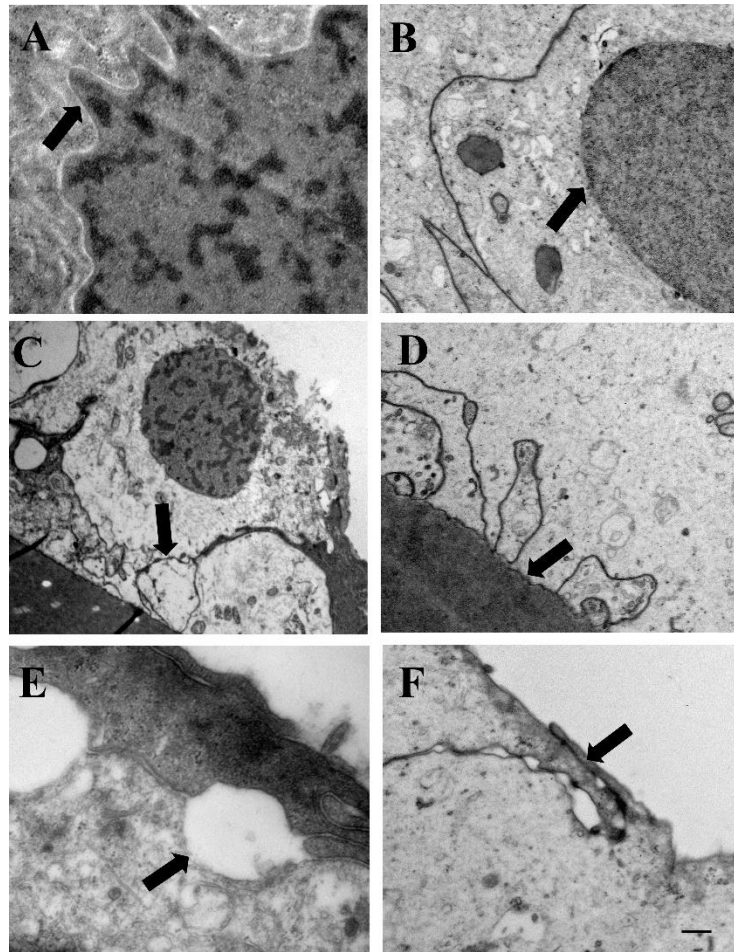
világos festődésű sejt, arra utalva, hogy legalább az egyik, esetleg mindkét sejthez tartozó komponense sérült a sejtek közötti kapcsolatnak. A lézerrel végzett és manuális capsulotomia után vizsgált minták közötti különbség nagyobb volt akkor, amikor a sejt és extracelluláris mátrix kapcsolatát vizsgáltuk. Míg a lézerrel végzett műtét után a sejtek többségében megfelelően kapcsolódtak a tokhoz, a manuális módon eltávolított mintákban láthatóan nagy rések választották el a sejt bazális felszínét a toktól (10. ábra).



10. ábra: Fénymikroszkópos felvételek toluidin-kékkel festett félvékony metszetekből manuális (B, C, D) és femtoszekundumos lézerrel (A) végzett capsulotomia után. Ellentétben a jól megőrzött köbhámsejtekre jellemző kerek sejtmaggal és világosan festődött citoplazmával rendelkező epithelsejtekkel, amelyek nagyobb számban a femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomiával eltávolított elülső lencsetokokban (A) láthatóak, a manuálisan eltávolított lencsetokokban a sejtek többsége degeneratív jeleket mutatott (B, C, D). B. Az epithelsejtek (nyíl) zsugorodtak, és sötétebbek. A sejtek zsugorodásának köszönhetően széles üres terek (nyíl, D) jelentek meg a sejtek között, ami károsodott sejt-sejt kapcsolatra utalhat. A nyíl a sejtmag körüli citoplazmatikus vakuolumokra mutat (C). Lépték: 15 μm az A, illetve 10 μm a B, C, D képen.



11. ábra: Félvékony metszeteken megfigyelt degeneratív jeleket mutató sejtek száma. Az elülső lencsetok manuális eltávolítása után a sejtek 85,39%-a tartalmazott degeneratív jeleket, míg a femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomia esetén a sejtek 77,82%-a mutatott degeneratív elváltozást, azonban a két csoport közötti különbség statisztikailag nem volt szignifikáns ($p = 0,35$).

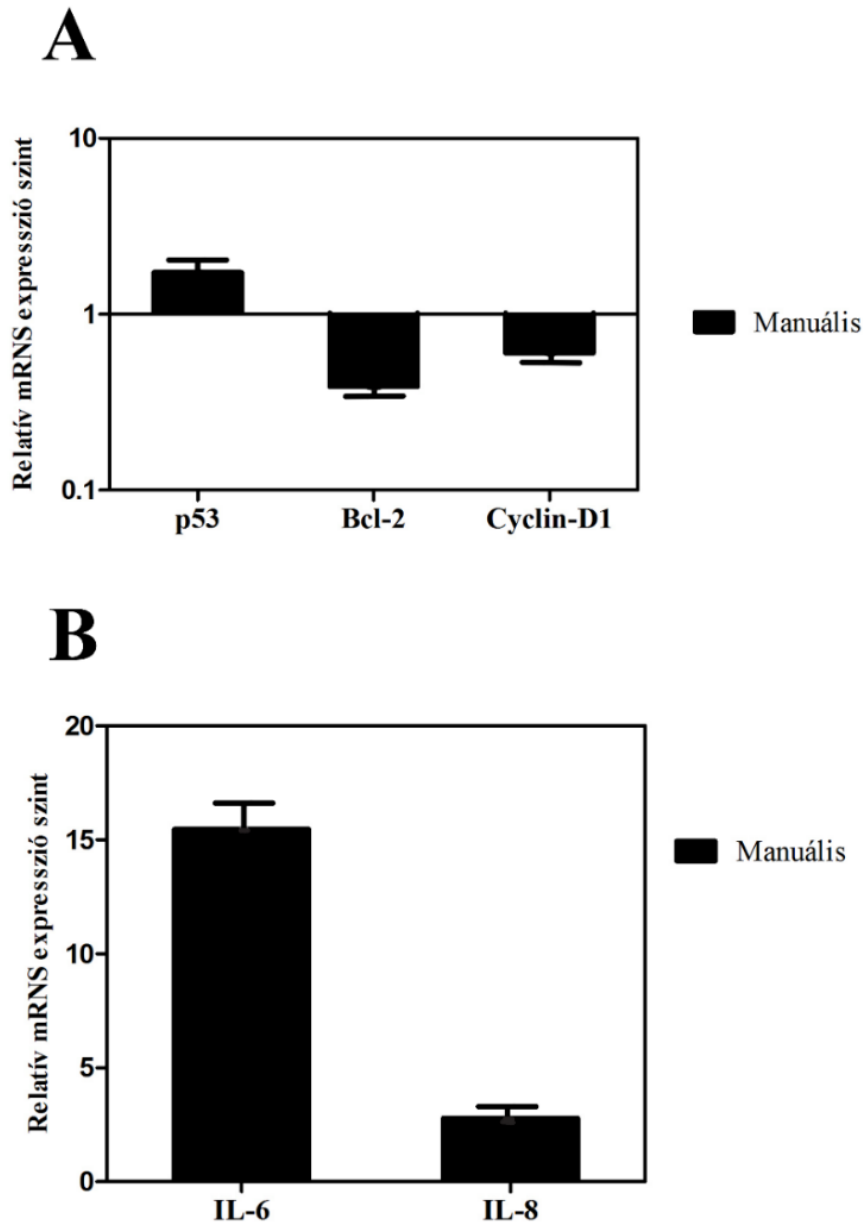


12. ábra: *Transzmissziós elektronmikroszkópos felvételek az elülső lencsetok epithelsejtjeiről manuális (A, C, E) és femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomia (B, D, F) után. A. Zsugorodott sejtmag (nyíl) szabálytalan, de láthatóan folytonos a membránnal, körülötte sötét citoplazma. B. Az A képen láthatókkal ellentétben, az epithelsejtek citoplazmája világos maradt, és a sejtmag (nyíl) kerek a femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomia után. C. Citoplazmatikus vakuolák (nyíl) manuális CCC után. D és F. Az epithelsejtek bazális felszíne kapcsolódik a bazális membránhoz (nyíl, D) femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomia után, a sejtek apikális felszínén megőrződtek tűnő sejt-sejt kapcsolatok láthatók (nyíl, F). E. Sejtkapcsolat két epithelsejt között. Az egyik sejt citoplazmája világos, míg a másik citoplazma sötét a sejt zsugorodása miatt. A nyíl a két sejt között kialakult résre mutat, amely a sejt zsugorodásának következtében jelenik meg manuális capsulotomia után. Lépték: 10 nm az E, 30 nm az A, B, D, F és 50 nm a C képen.*

Molekuláris biológiai vizsgálatok eredményei

Génexpresszió vizsgálata reverz transzkriptáz-polimeráz láncreakció segítségével

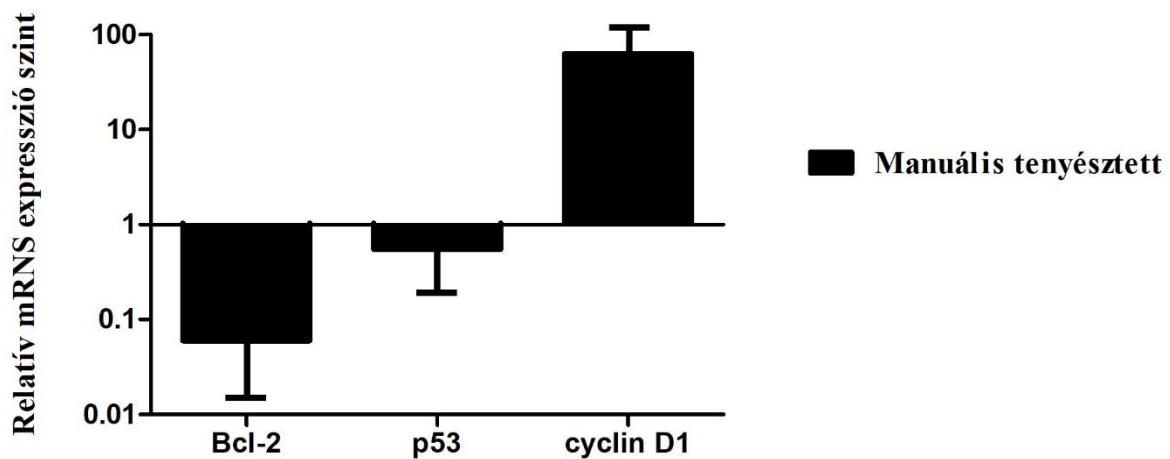
A morfológiai elváltozások alapján valószínűsíthető, hogy az epithelsejtekben látott sejtd degeneráció háttérében apoptózis áll. Ennek igazolása érdekében RT-PCR módszerrel olyan gének expresszióját vizsgáltuk, amelyek szerepet játszanak az apoptotikus sejthalálban, illetve a sejttúlélésben és sejtproliferációban. Eredményeink szerint a manuális capsulotomia után enyhén alacsonyabb Bcl-2 mRNS szint mérhető, mint femtoszekundumos lézerrel végzett elülső lencsetok eltávolítás esetén (13. ábra). 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. Sejtciklust szabályzó cyclin-D1 génexpresszió vizsgálata során nem találtunk jelentősebb különbséget a két csoport között. Stressz-indukálta mechanikai károsodás következtében gyulladáshoz vezető 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 (13. ábra).



13. ábra: Apoptózishoz, sejtüléléshez és stressz jelátviteli utakhoz kapcsolódó különböző gének expressziójának mRNS szint mérése qRT-PCR módszerrel manuális capsulotomia után összehasonlítva a femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomia utáni expresszióval. A. p53 és Bcl-2 gének mRNS szintje, apoptózishoz kapcsolódóan az elülső lencsetok epithelsejtjeiben manuális eltávolítás után, összehasonlítva a femtoszekundumos lézerrel eltávolított mintákban mért mRNS szinttel. A horizontális vonal jelöli a p53, Bcl-2 és cyclin-D1 gének expresszióját femtoszekundumos lézerrel végzett lencsetok eltávolítás után. B. Relatív IL-6 és IL-8 mRNS szint az elülső lencsetok epithelsejtjeiben manuális capsulotomia után, összehasonlítva a femtoszekundumos lézerrel végzett eltávolítás után mért gyulladáscitokinek mRNS expressziójával, amelyet a grafikonon a 0-nál húzott tengely jelez.

A génexpresszióra vonatkozó eredmények tenyésztett sejtek esetében

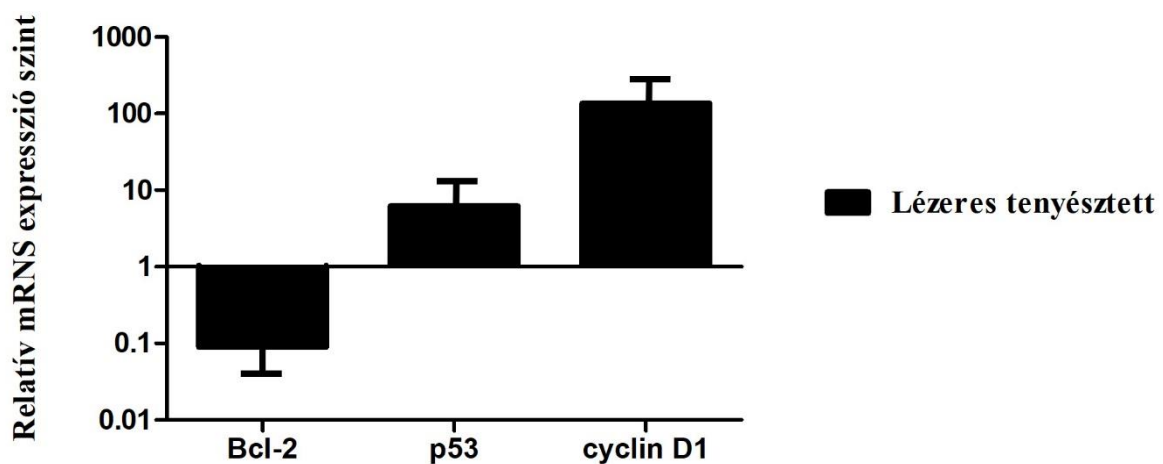
RT-PCR módszerrel, az előző szakaszban részletezett, a sejtproliferációban és apoptózisban expresszálandó gének kifejeződését a lencsetok epithelsejtek 14 napig tartó tenyésztése után is tanulmányoztuk.



14. ábra: *Sejttúlélést, apoptózist (Bcl-2 és p53) és proliferációt meghatározó (cyclin-D1) gének mRNS szintjének RT-PCR módszerével meghatározott szintje manuális capsulotomiás minták tenyésztett epithelsejtjeiben. A p53, Bcl-2 és cyclin-D1 gének expressziója az elülső lencsetok epithelsejtjeiben 14 napig tartó sejtenyésztés után, a manuális capsulotomia után közvetlenül vizsgált minták génexpressziós szintjével összehasonlítva. A horizontális vonal jelzi a manuális capsulotomia után közvetlenül vizsgált minták génexpresszióját. Szignifikáns eltérést találtunk a Bcl-2 ($p = 0,033$) és cyclin-D1 ($p = 0,002$) gének mRNS szint esetében a tenyésztett minták és capsulotomia után közvetlenül vizsgált minták összehasonlításakor.*

Közvetlenül a capsulotomia után vizsgált elülső lencsetok epithelsejtjekben mért génexpresszióhoz viszonyítva, mindkét csoportban a tenyésztett epithelsejtjekben szignifikánsan csökkent az anti-apoptotikus Bcl-2 expresszió (14 és 15. ábra). 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 ($p = 0,397$).

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 ($p = 0,0004$). Ugyanakkor nem találtunk jelentős különbséget a cyclin-D1 expressziót tekintve a manuális és a femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomiával nyert minták tenyésztett epithelsejtjei között (14 és 15. ábra).

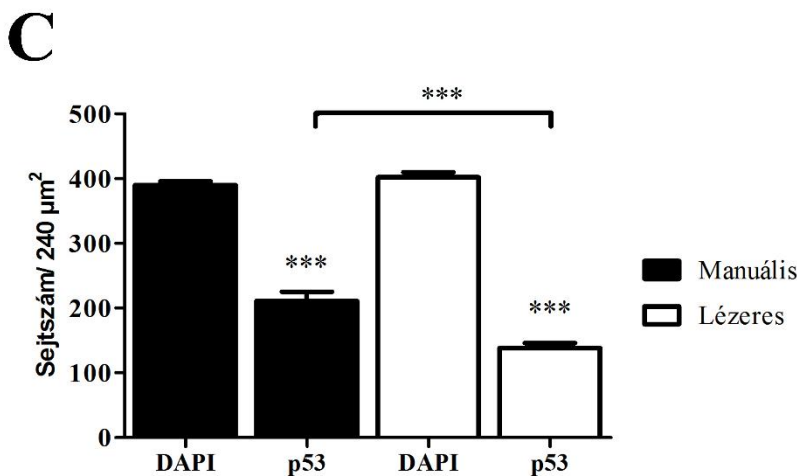
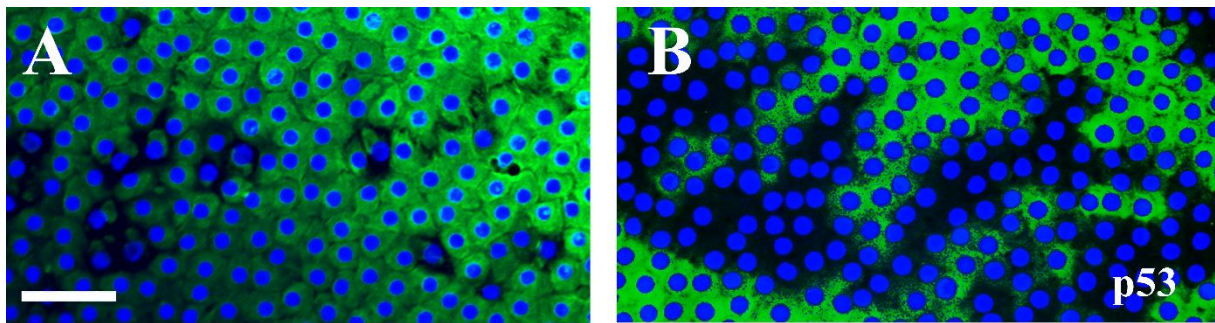


15. ábra: Sejttúlélést, apoptózist (Bcl-2 és p53) és proliferációt (cyclin-D1) meghatározó gének mRNS szintjének meghatározása RT-PCR módszerével femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomiás minták tenyésztett epithelsejtjeiben. Az ábra a gének expresszióját az elülső lencsetok epithelsejtjeiben 14 napig tartó sejtenyésztés után mutatja. A horizontális vonal jelzi a femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomia után közvetlenül vizsgált minták génexpresszióját. Szignifikáns eltérést találtunk a Bcl-2 ($p = 0,023$) mRNS szint esetében a tenyésztett minták és capsulotomia után közvetlenül vizsgált minták összehasonlításakor.

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

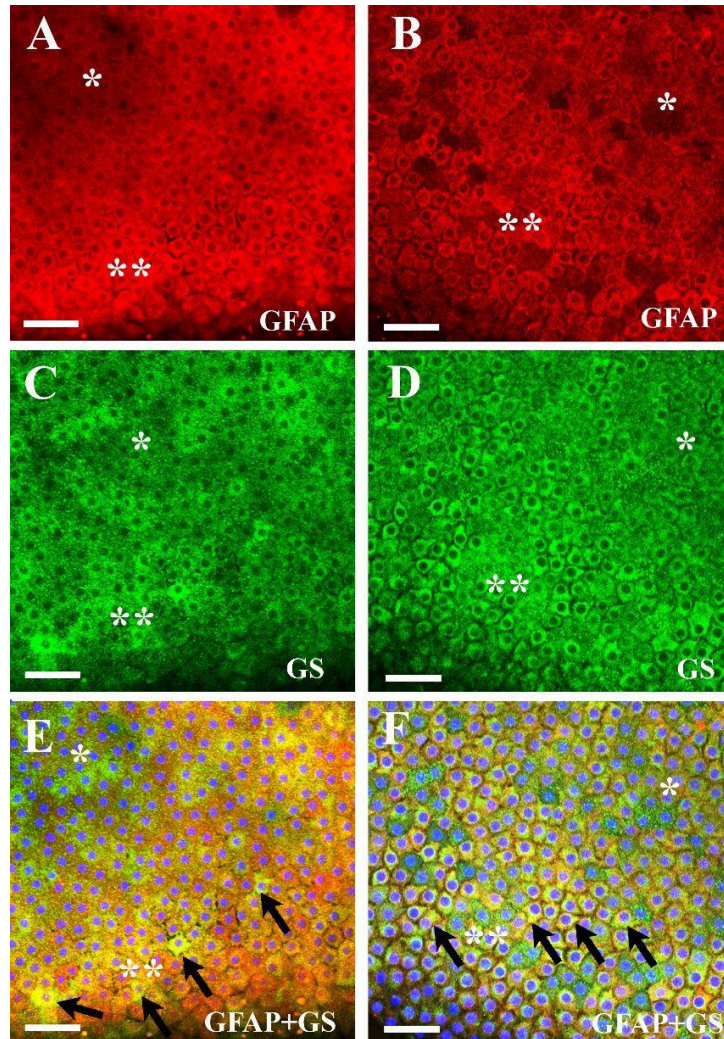
capsulotomia után a sejtek 48,5%-a volt p53 immunreaktív. Ugyanakkor az elülső lencsetok femtoszekundumos lézerrel végzett eltávolítása után az immunreaktív epithelsejtek aránya 31,42% volt, és a két csoport közötti különbség statisztikailag szignifikánsnak bizonyult ($p = 0,019$, 16. ábra).



16. ábra: p53 immunreakció az elülső lencsetok epithelsejtjeiben immunhisztokémiai jelölést követően manuális (A) és femtoszekundumos lézerrel végzett (B) capsulotomiák esetén. A teljes szöveti mintán végzett immunhisztokémiai vizsgálat eredményeinek kvantifikálása szerint a p53 pozitív sejtek száma magasabb volt manuális, mint femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomia után (C). Lépték: 50 μm

Szöveti 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 immunhisztokémiát. A citoszkeleton elemei közül először az intermedier filamentum GFAP-t vizsgáltuk, melyről ismert, hogy míg embrionális korban

jelen van a lencsetok epithelsejtjeiben, addig érett lencsetoksejtjeiben nem expresszálódik. Tekintettel viszont arra, hogy érett sejtekben sérülés hatására több, az embrionális korra jellemző fehérje expressziója ismét detektálható, megvizsgáltuk, hogy jelen van-e a GFAP a lencsetok hámsejtjeiben a capsulotomia után.



17. ábra: Konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal készült felvételek az egész elülső lencsetok epithelsejtjeiben a GFAP és a GS immunfestés eredményét mutatják. GFAP és GS detektálása az elülső lencsetok epithelsejtjeiben immunfestést követően manuális (A, C, E) és femtoszekundumos lézerrel végzett (B, D, F) capsulotomiák esetén. A felvételek az elülső lencsetok perifériás területén (**), illetve a centrumában (*) a GFAP és GS immunreaktivitásában megfigyelhető különbségét mutatják. A, B: GFAP pozitívitas az epithelsejtjeiben. C, D. GS immunpozitivitas az epithelsejtjeiben. GFAP és GS együttes expressziója (nyíl) az epithelsejtjeiben (E, F). Lépték: 50 μ m.

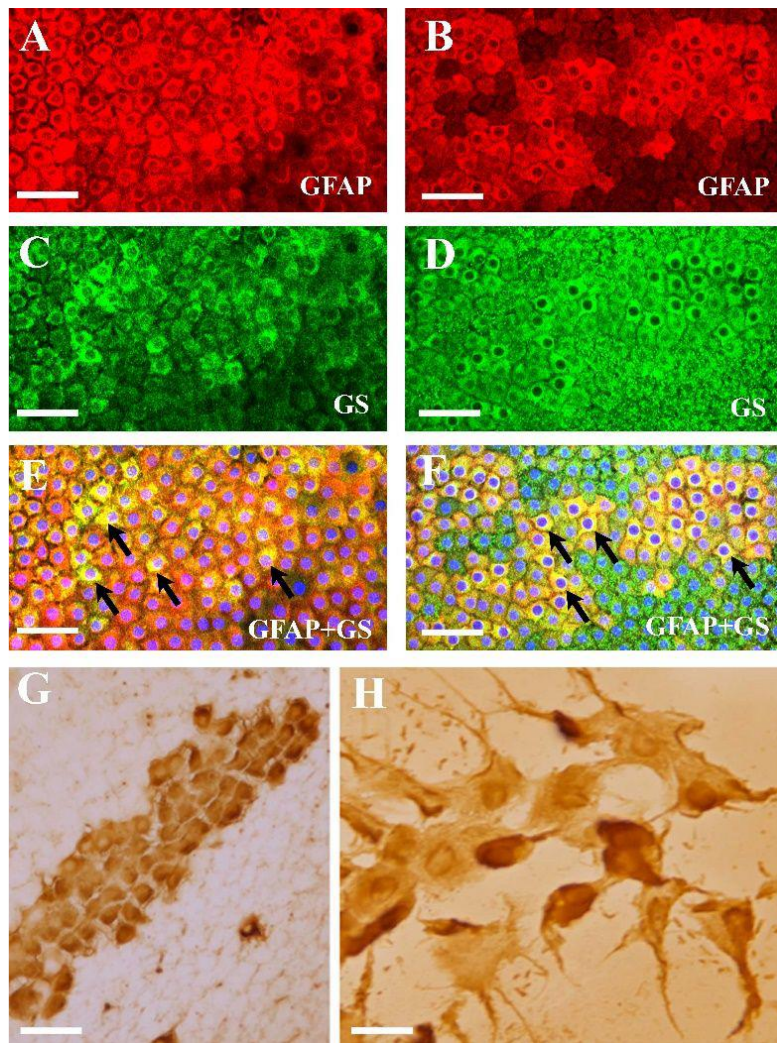
Astrocytákban és a retina Müller sejtjeiben GFAP kolokalizál a glutamin szintázzal (GS). A lencsetok epithelsejtek egy GS-szerű proteint, lengsin is expresszálnak, amely GS elleni antitesttel detektálható, annak ellenére, hogy a lengsin nem rendelkezik GS-szerű enzimikus aktivitással (Grassi és mtsai., 2006; Wistow és mtsai., 2002). A lengsin expresszió normál lencsetok epithelsejtekben magas, azonban időskori szürkehályog esetén expressziója jelentősen csökken (Grassi és mtsai., 2006; Hawse és mtsai., 2003). Annak az érdekében, hogy a lengsin expresszióról információt szerezzünk, GS antitestet használtunk.

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 (17. ábra).

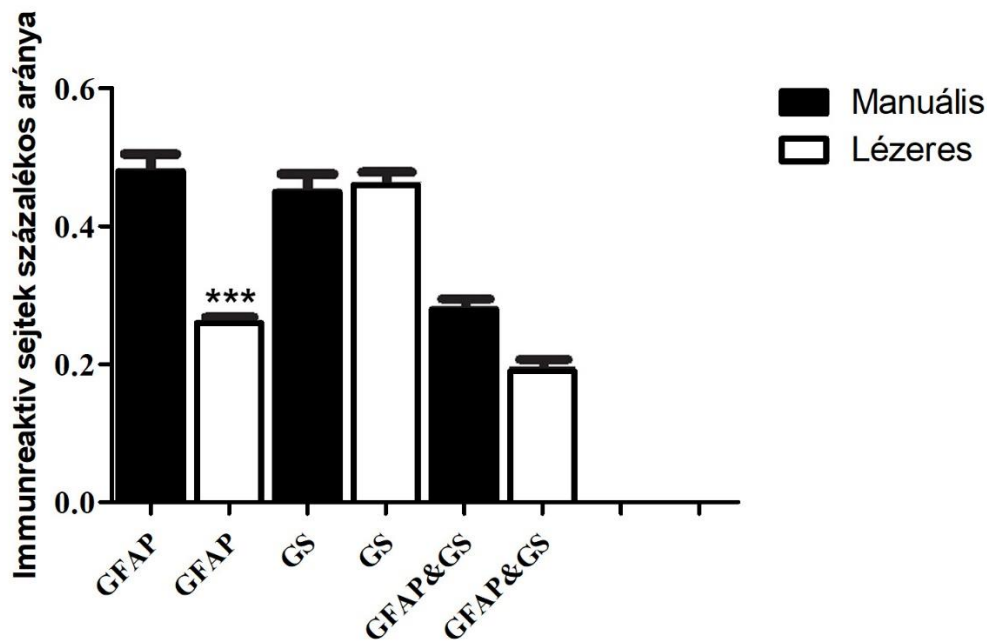
Mindezek mellett a manuális capsulotomia után, az elülső lencsetok GFAP immunreaktivitást mutató epithelsejtek morfológiáját, egy másik, anti-humán GFAP antitest segítségével is vizsgáltuk, ehhez kromogénként DAB-ot használtunk. Az elülső lencsetok epithelsejtjei közt két típusú sejtet különíthettünk el. Egyes GFAP immunpozitív sejtek normális morfológiai megjelenéssel rendelkeztek (18. ábra G), ugyanakkor más sejtek formája megváltozott, hosszú vékony nyúlványok voltak megfigyelhetőek (18. ábra H).

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 kvantifikálással kapott eredményeket összehasonlítva szignifikáns különbséget találtunk a két csoport között a GFAP ($p = 2,24 \times 10^{-6}$) pozitivitást mutató epithelsejtek, és a GFAP és GS együttes expresszióját ($p = 0,003$) mutató epithelsejtek esetében. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a GFAP expresszió mechanikai károsodást jelezhet mind a manuális, mind a lézerrel végzett capsulotomiás mintákban (19. ábra).



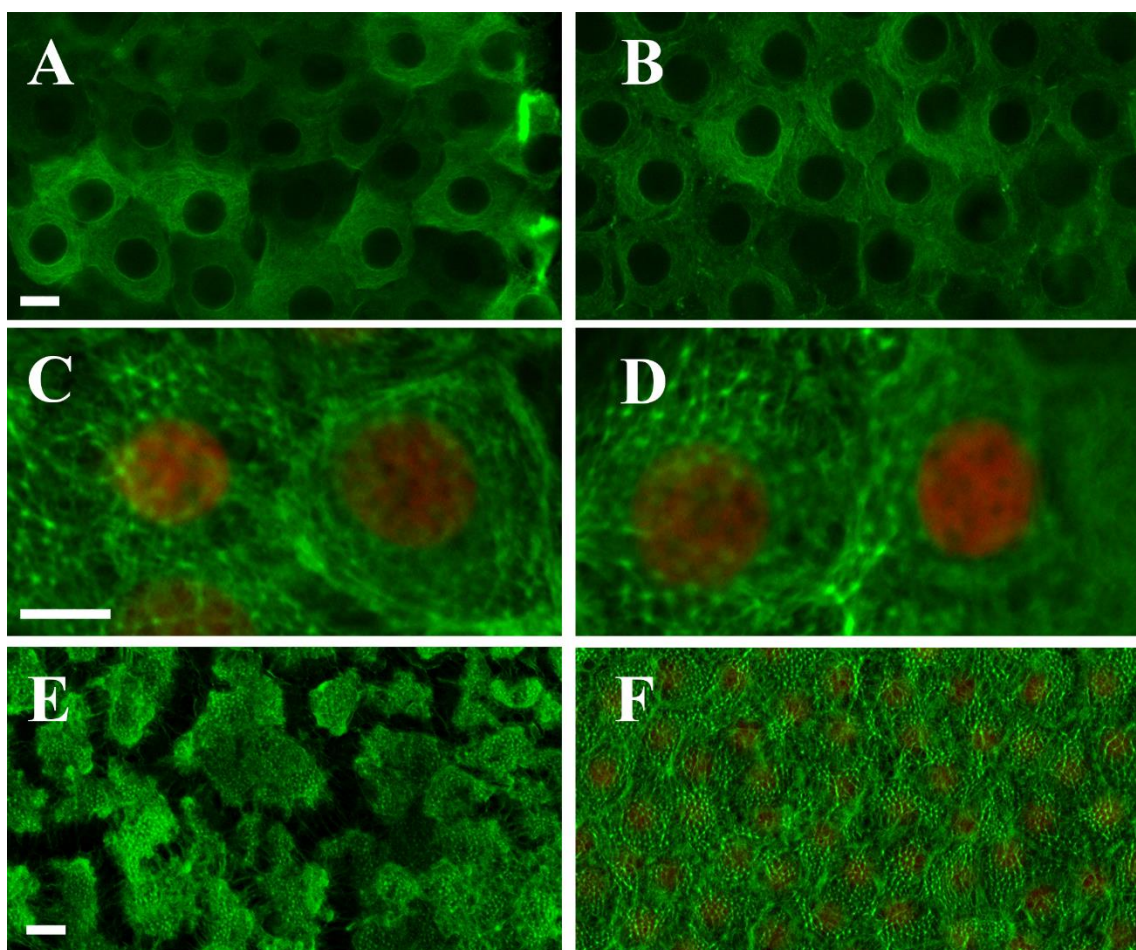
18. ábra: GFAP és a GS immunfestés eredményét bemutató reprezentatív felvételek az egész elülső lencsetok szövetéből. GFAP és GS detektálása az elülső lencsetok epithelsejtjeiben immunfestést követően manuális (A, C, E) és femtoszekundumos lézerrel végzett (B, D, F) capsulotomiák esetén. A, B: GFAP pozitivitás az epithelsejtekben. C, D. GS pozitivitás az epithelsejtekben. GFAP és GS együttes expressziója (nyíl) az epithelsejtekben (E, F). Manuális capsulotomia után, a GFAP immunreaktív epithelsejtek morfológiája (G, H). Lépték: 50 μm az A-F, 40 μm a G képen és 15 μm a H képen.



19. ábra: GFAP és GS immunreaktív sejtek száma manuális és femtoszekundumos lézeraszisztált capsulotomia esetén. A teljes szöveti mintán végzett immunhisztokémiai vizsgálat során jelölt sejtek kvantifikálása szerint a GFAP pozitív sejtek százalékos aránya magasabb volt manuális, mint femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomia után.

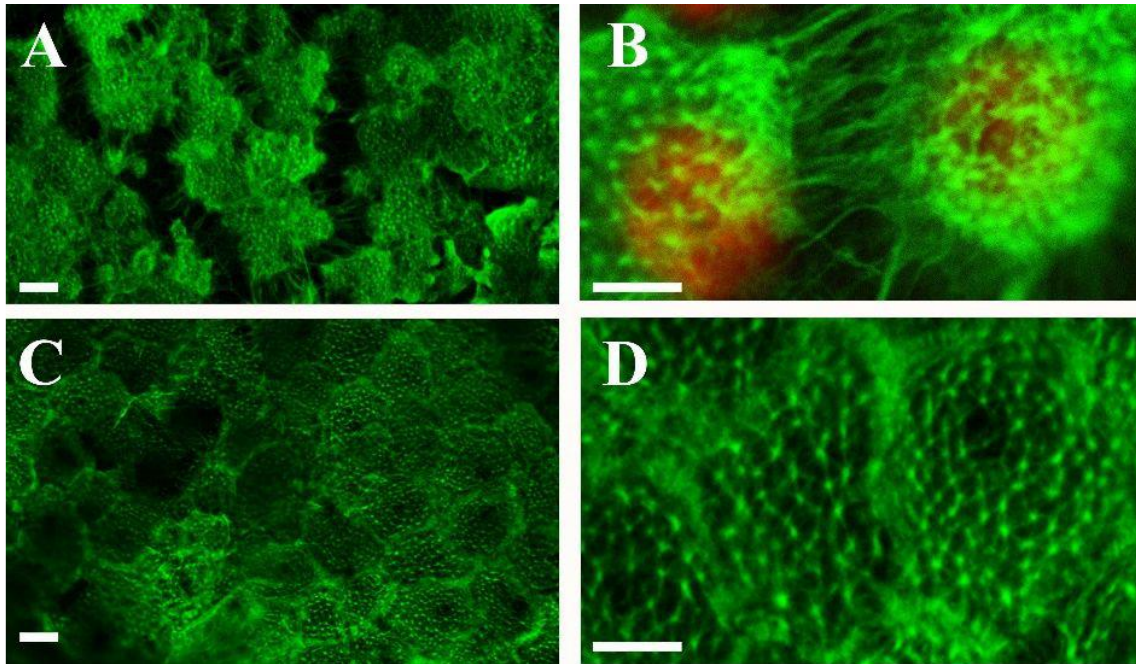
A GFAP és GS jelölés során kapott eredményeink párhuzamba vonhatók a toluidin-kékkel festett félvékony metszeteken látott eredményeinknek, ami arra enged következtetni, hogy a manuálisan eltávolított mintákban a sejtek károsodása nagyobb és a GFAP immunhisztokémiával megfigyelt morfológiai jellegzetességek 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 hámszövetekben fluoreszcensen jelölt phalloidin segítségével az aktin citoskeletonális hálózatot tettük láthatóvá. Az aktinhálózat vizsgálata során mindkét csoportban az aktinhálózat szabályos mintázata mellett erős kortikális aktingyűrűt figyeltünk meg (20. ábra). A két csoport között, egyedül az aktin-hálózat denzitásában találtunk jelentős különbséget. A femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomiás mintákban az aktinfilamentumok denzitása a normál sejtekben jelen lévő aktinfilamentumok denzitásával összehasonlítva nem mutatott eltérést. Ezzel szemben a manuálisan végzett capsulotomia után a minták citoszkeletonjában szembetűnő volt az aktinhálózat átrendeződése. A manuális mintákban a tömött aktinfilamentumok helyett aktin szigetek jelentek meg (20. ábra).



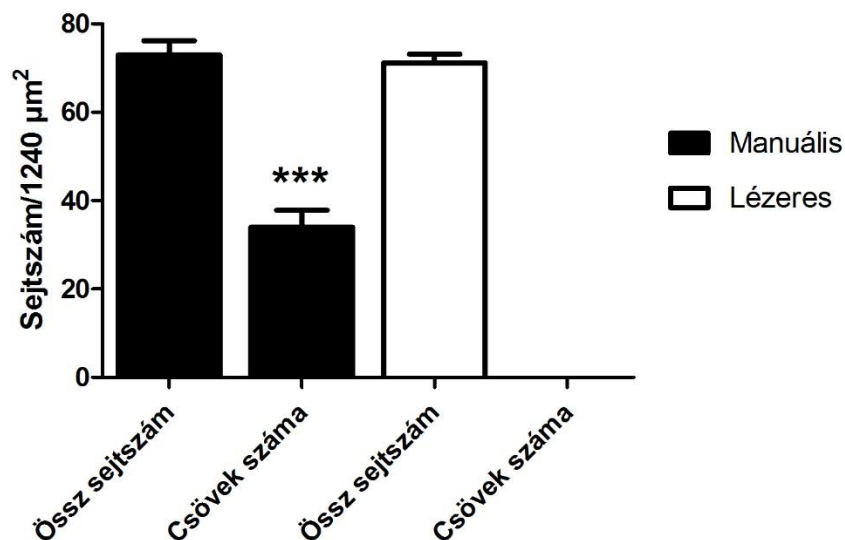
20. ábra: Aktinfilamentumok konformációja manuálisan (A, C) és femtoszekundumos lézer segítségével végzett (B, D) capsulotomia esetén. Reprezentatív fluoreszcens felvételek az egész elülső lencsetok sejtjeiről, melyeken aktinjelölést végeztünk. Erős kortikális aktinhálózat és szabályos intracelluláris aktin elrendeződés figyelhető meg úgy a manuálisan (A), mint femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomia (B) esetén. Jelentős eltérés mutatkozik az aktin kötegek denzitásában. Az elülső lencsetok manuális eltávolítása után sejtek szigetszerű megjelenése és a sejtek közötti résképződés (C) figyelhető meg, míg femtoszekundumos lézer segítségével végzett beavatkozás után az aktinhálózat tömött marad (D). Lépték: 10 μ m.

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 (21. ábra).



21. ábra: Résképződés és csőszerű elemek megjelenése manuális (A, B) capsulotomia esetén, illetve ezek hiánya femtoszekundumos lézerrel végzett (C, D) capsulotomia esetén. Reprezentatív fluoreszcens felvételek az egész elülső lencsetok szövetéből, amelyen aktin jelölést végeztünk. A manuálisan eltávolított elülső lencsetokban résképződés (A) látható. Nagyobb nagyítással vizsgálva az epithelsejteket összekötő csőszerű elemeket láthatunk (B), melyek kitöltik a képződött rést. Lépték: 10 μm .

A manuális módon, illetve lézerrel eltávolított mintákon elvégzett kvantifikáció eredménye szerint, 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 aktinfilamentumok szerveződésében (22. ábra).



22. ábra: Az aktin jelöléssel láthatóvá tett sejtek és a csőszerű elemek száma manuális és femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomiák esetén. A teljes szöveti mintán végzett aktin festést követően, az epithelsejtek között megjelenő csőszerű elemek száma szignifikánsan magasabb volt manuális capsulotomia esetén, mint a femtoszekundumos lézerrel végzett elülső lencsetok eltávolítása után, ($p < 0,0001$).

MEGBESZÉLÉS

A szürkehályog kezelése érdekében végzett műtét posztoperatív sikerességét nagymértékben meghatározza a műtét egyik kulcslépése, az elülső lencsetokon kialakított capsulotomiás nyílás minősége. A lézer segítségével végzett capsulotomiás technika fejlődésének köszönhetően kerek, jól centrált, tökéletes méretű capsulotomiás nyílás hozható létre. Emellett a műtét további lépései is jobban kontrollálhatóak (pl. a főseb és segédnyílások képzése, femtofragmentáció, illetve a phacoemulsificatio során használt energia is csökkenthető). Napjainkban, úgy a manuális, mint a femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomia tanulmányozásának középpontjában többnyire a posztoperatív fénytörési következmények, illetve a makroszkópos elváltozások állnak (Kohnen és mtsai., 2014; Ostovic és mtsai, 2013).

Sejtpusztulás és a sejtek túlélése manuális és fetoszekundum lézerrel végzett capsulotomia után

Eredményeink szerint mind morfológiai, mind molekuláris biológiai módszerekkel változások mutathatóak ki az elülső lencsetok epithelsejtjeiben capsulotomia után, aminek magyarázata az, hogy a műtéti beavatkozás az érintett sejtek számára stresszt jelent. Az általunk végzett vizsgálatok során a manuális és femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomia után az elülső lencsetok epithelsejtjeiben megfigyelhető morfológiai és génexpressziós elváltozásokat tanulmányoztuk. A változások minden bizonnyal érintik a lencsetok azon részét is, ami a műtét során a szemben marad, ami hatással lehetnek a posztoperatív hátsó tok fibrosis kialakulására.

Fény- és elektronmikroszkópos felvételeinken egyértelműen több olyan sejt látható manuális capsulotomia után, amely a degeneráció morfológiai jeleit mutatja, mint femtoszekundumos lézer segítségével végzett elülső lencsetok eltávolítás esetén. Ugyanezt erősíti meg a félvékony metszeteken végzett kvantifikáció is, noha a különbség a két csoport között nem volt szignifikáns. Az epithelsejtben megfigyelt degeneratív jelek, mint pl. a sejtmag megváltozott alakja, a sejtek zsugorodása és a sötétben festődő citoplazma alapján arra következtethetünk, hogy az elváltozások hátterében apoptotikus folyamatok állnak. Morfológiai vizsgálataink eredményeivel összhangban, a p53 proapoptotikus fehérje immunhisztokémiai detektálásával, valamint a sejtpusztulás és a sejtek túlélésre jellemző gének expressziójának vizsgálatával további eltérést láttunk a két csoport epithelsejtjei között. Megfigyeléseink szerint a proapoptotikus p53 mRNS erőteljesebb expressziót mutatott

manuális capsulotomia után, mint lézerasszisztált eltávolításkor, bár eredményeink a két csoport között nem mutattak szignifikáns különbséget. A génexpresszió vizsgálata során látottakat támasztotta alá immunhisztokémiai megfigyelésünk is. Az epithelsejtek nagyobb hányadában láttunk p53 immunreakciót manuális eltávolítás után, mint a lézerrel történt capsulotomia esetén. A p53 immunreaktivitás a sejtek citoplazmájában volt jelentős. A p53 mRNS magas szintje és a citoplazmában megfigyelhető p53 immunreaktivitás a fehérje képződésére utal, és a sejtmagban emiatt csak kis mennyiségben jelenik meg, mint transzkripciós faktor. Ezek alapján valószínűsíthetjük, hogy a p53 immunreaktivitás a transzkripciós faktor szintézisére utal, és nem annak a genom őreként betöltött funkciójára.

Korábbi tanulmányok szerint a szürkehályog kezelése során végzett műtét az elülső lencsetok epithelsejtjeiben apoptózist vált ki, hiszen a capsulotomia után a sejtek TUNEL pozitívítása volt megfigyelhető (Mayer és mtsai., 2014b; Saika és mtsai., 2002; Harocopos és mtsai., 1998; Toto és mtsai., 2015). A műtét során használt femtoszekundumos lézer energiája és a sejtkárosodás közötti összefüggést vizsgálva a TUNEL reakcióval kevesebb apoptotikus sejtet mutattak ki manuális capsulotomia után, mint a lézer segítségével elvégzett műtét esetében (Mayer és mtsai., 2014b; Toto és mtsai., 2015). A fenti eredmények és saját eredményeink közötti ellentmondás hátterében az állhat, hogy a p53 fehérje transzkripciós faktorként több folyamatot is indukálhat. Ezek a folyamatok az apoptotikus sejthalál kiváltása mellett a sejtciklus leállítása, valamint a DNS repair folyamatok indukálása is lehetnek, a sejtet ért károsodás mértéktől függően. Eredményeink szerint a manuális módon eltávolított capsulotomiás minták és a femtoszekundumos lézer segítségével műtött minták epithelsejtjei hasonló mértékben váltak érintetté. Ebből arra következtethetünk, hogy a károsodás a sejteket a sejtciklus G1 fázisában tarthatta, vagy DNS repair történhetett, de nem indukálta azonnal apoptózis kialakulását. Eredményeink alapján az elülső lencsetok hámsajtjeiben a p53 pontos szerepe nem egyértelmű, mi ugyanis a p53 mRNS-t, illetve a p53 fehérje citoplazmatikus megjelenését mutattuk ki, ami sokkal inkább a p53 fehérje képződésére utal, mint a sejtmagban transzkripciós faktorként való működésére. Ennek egyik oka lehet, hogy a minták a kivételt követően azonnal fixálószerbe kerültek, és a fixálás miatt a műtéti beavatkozás által kiváltott sejtkárosodás által indukált apoptotikus folyamat annak elindulását követően hamarosan leállt. Ennek megfelelően mintáinkban a p53 mRNS képződése és a fehérje citoplazmatikus szintézise figyelhető csak meg.

Annak ellenére az epithelsejtekben a Bcl-2 anti-apoptotikus gén expressziója a femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomia után enyhén magasabb volt, mint manuális mintákban, a két tanulmányozott csoport között szignifikáns különbséget nem tudtunk

kimutatni. Ismert, hogy a Bcl-2 anti-apoptotikus fehérje éppen a p53 fehérje által elindított, intrinsic apoptotikus folyamat egyik fontos regulátora, és gátolja a p53 által kiváltott, proapoptotikus fehérjék által, a Bcl-2 hiányában megvalósuló apoptotikus sejthalált (Szeberényi, 2011). A lézerrel végzett műtét után a Bcl-2 protein emelkedése alapján feltételezzük, hogy az elülső lencsetok epithelsejteiben a p53 nem apoptózist indukál, hanem a sejtciklust állítja meg. Ugyancsak ezt a feltételezést támasztja alá az a megfigyelésünk, miszerint a manuális capsulotomia után sejt proliferációért felelős cyclin-D1 génexpressziója alacsonyabb szintű, mint femtoszekundumos lézerrel végzett műtét esetén. Meg kell jegyeznünk, hogy a szürkehályog-műtét során a capsulotomiás nyílás képzése és a mRNS izolálása közt eltelt idő valószínűleg nem elégséges ahhoz, hogy az apoptózis teljes folyamata komplett módon megtörténjen, beleértve azokat a DNS változásokat, melyek kimutatása TUNEL módszerrel lehetséges. Ezzel szemben a capsulotomiás nyílás képzése és a mRNS izolálása közt eltelt idő elegendő ahhoz, hogy a p53 mRNS expresszálódjon, és a fehérje szintézise elkezdődjön. Patkány lencsén végzett kísérletek adatai szerint tudjuk, hogy harminc perccel a lencsét ért sérülés után sem proliferáció, sem degeneratív elváltozások nem mutathatóak ki az epithelsejtekben, de bizonyos korai válasz gének közé tartozó transzkripciós faktor mRNS-e és fehérje terméke expresszálódik (Shirai és mtsai., 2001).

Ellentétben azokkal a tanulmányokkal, melyekben az eltávolított elülső lencsetok vágási felszínén mutattak ki több apoptotikus sejtet lézerrel végzett capsulotomia után (Ostovic és mtsai., 2013; Mayer és mtsai., 2014b; Reyes és mtsai., 2016), mi a teljes eltávolított elülső lencsetokot "whole mount" preparatumként használtuk, ami lehetővé teszi azt, hogy ne csak a vágási szél mentén lévő sejteket, hanem attól néhány milliméterrel távolabb lévő sejteket is vizsgáljunk. Fény- és elektronmikroszkóppal, valamint p53 immunhisztokémiával végzett vizsgálataink során az eltávolított elülső lencsetok epithelsejteiben a morfológiai elváltozások, illetve a fehérje expresszió a teljes vastagságú szöveti minta széli és centrális területeit is érintette. A teljes eltávolított mintán végzett vizsgálatok eredménye szerint súlyosabb károsodást láttunk az elülső lencsetok epithelsejtjeiben manuális capsulotomia után, mint lézerrel végzett capsulotomiát követően. Mindez valószínűleg a manuális capsulotomiás nyílás készítése során a tokon okozott mechanikai behatásnak, feszítésnek, és nyújtásának volt köszönhető. A mechanikai sérülés következtében olyan jelátviteli útvonalak serkentése történhet, amelyek szerepet játszhatnak a posztoperatív hátsó tok fibrosis kialakulásában (Mamuya és mtsai., 2014; Kovács és mtsai., 2014).

Az elülső lencsetok eltávolítását követően, a vágás szomszédságában és a lencsetok bennmaradó részén található reziduális epithelsejtekben a mechanikai behatás miatt

feltételezhetően hasonló elváltozások jelennek meg a műtét alatt és után, mint az eltávolított lencsetok epithelsejtekben. A capsulotomiás nyílás képzésekor keletkező károsodás azokat az útvonalakat stimulálja, amelyek serkenthetik az epithelialis-mesenchymális transzformációt (EMT) az elülső lencsetok reziduális epithelsejtjeiben. Ezzel a folyamattal kezdetét veheti a posztoperatív hátsó tok fibrosis kialakulása (Marcantonio és Vrensen, 1999). Irodalmi adatok szerint az elülső lencsetok epithelsejtjeiben az epithelialis-mesenchymális transzformáció egyik központi eleme a TGF- β növekedési faktor, amely hozzájárulhat a posztoperatív hátsó tok fibrosis kialakulásához (Wormstone és mtsai., 2002; Suzuki és mtsai., 2011; Yao és mtsai., 2012; Wertheimer és mtsai., 2014; Ma és mtsai., 2014). Továbbá, a TGF- β mechanikai hatásra a bőr az epithelsejtjeiben adaptív változásokat indukál (Huang és mtsai., 2012). Ehhez hasonlóan, az a mechanikai hatás, amit a manuális vagy a femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomia okoz, aktiválhatja a TGF- β növekedési faktort. Ez olyan sejten belüli pathológias reakciókat indukálhat, mint például az epithelialis-mesenchymális transzformáció.

Az elülső lencsetokon végzett megfigyeléseink jelentőségét az adja, hogy szürkehályog-műtét során emberi mintákban a hátsó tok morfológiai és molekuláris változásainak vizsgálata nem kivitelezhető. Ugyanakkor az elülső lencsetok epithelsejtjeiben látott változások alapján részben következtetni tudunk a hátsó tokban megjelenő folyamatokra is. Ezt a lehetőséget kihasználva mindkét csoportban az epithelsejteket *in vitro* körülmények között tenyésztettük, és a sejt proliferációt, túlélést és apoptózist vizsgáltuk. Eredményeink hasonlóak Mayer és mtsai. (2014) megfigyeléseéhez, amely szerint a tenyésztett epithelsejtek nagyobb hányada pusztult el apoptózissal femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomia után, mint manuálisan végzett műtét után. Az általunk, a tenyésztett sejtekben kimutatott, mindkét csoportban megfigyelt Bcl-2 génexpresszió csökkenés, illetve femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomiás mintákban talált p53 génexpresszió emelkedés arra enged következtetni, hogy a capsulotomiás nyílás képzésekor kiváltott trauma az epithelsejteket érzékenyebbé tette az apoptózis iránt. Feltételezzük, hogy manuális és femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomia esetén a reziduális epithelsejtek sejtproliferációja az eltávolított sejtek tenyésztése során találtakhoz hasonlóan változik. Vizsgálatainkkor ugyanis nem találtunk különbséget a manuálisan és femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomia után a tenyésztett elülső lencsetok epithelsejtjek cyclin-D1 génexpressziójában. Mindezek mellett figyelembe kell vennünk, hogy a posztoperatív hátsó tok fibrosis kialakulásának patomechanizmusa összetett folyamat (El-Osta és mtsai., 2003; McLean és mtsai., 2005; Oharazawa és mtsai., 2005; Peng és mtsai., 2000a; Ram és mtsai., 1999; Vargas és mtsai., 2002; Vargas és mtsai., 2003; Peng és mtsai., 2000b).

A citoskeleton változásai manuális és lézerasszisztált capsulotomia során

A manuális módon és a lézerrel végzett capsulotomia után, az eltávolított lencsetok epithelsejtjeiben megfigyelt morfológiai jellegzetességek arra utalnak, hogy az epithelsejtek citoskeletonja jelentősen megváltozik szürkehályog-műtét során. Feltételeztük, hogy mint minden műtéti eljárás, a szürkehályog-műtét során végzett capsulotomia is befolyásolja a műtétben érintett sejteket, és olyan stressz által indukált jelátviteli utakat indít be, melyek eredménye a citoskeleton változása. Feltételezésünk igazolása végett a citoskeleton két komponensét vizsgáltuk, az intermedier filamentumokat, valamint az aktinfilamentumokat.

A gliális fibrilláris savanyú protein (GFAP) olyan intermedier filamentum, amely megtalálható a központi idegrendszerben, az astrocytákban. Ismert, hogy különböző sérülések hatására, például stressz jelenlétében a GFAP expresszió megemelkedik (Oblinger és Singh 1993; Brenner 1994). Ugyanakkor normál körülmények között a GFAP-t az astrocyták mellett több, nem-glia típusú sejtben is kimutatták, mint a vesetokban, a gégefedő porc chondrocytaiban, valamint több különböző típusú tumorban (Budka, 1986; Alliot és Pessac 1988; Gard és mtsai., 1985). Továbbá, a GFAP megjelenik a szemlencsében a szemlencse fejlődése során, de a differenciálódást követően az epithelsejtekben többé már nem mutatható ki (Boyer és mtsai., 1990; Boyer és mtsai., 1991; Hatfield és mtsai., 1984; Lipner, 2015). A GFAP helyett az epithelsejtekre jellemző cytokeratin jelenik meg. Mindezek mellett ismert, hogy a sejteket ért sérülés vagy stressz hatására a fejlődés során átmenetileg megjelenő fehérjék emelkedett expressziót mutatnak a felnőtt szervezetben, amely tény a szemre is jellemző (Gallina és mtsai., 2016; Mader és Cameron, 2004). Eredményeink alapján, az eltávolított elülső lencsetok epithelsejtjeiben GFAP expresszálódott. Vizsgálataink során két különböző antitestet használtunk annak érdekében, hogy eredményünk megbízható legyen. Mindkét antitesttel a GFAP jelenlétét mutattuk ki. Boyer és mtsai. (1990) a GFAP immunreaktív nyúlványok jelenlétét a fejlődő lencsetok epithelsejtekben mutatták ki. Tudomásunk szerint a felnőttek szemlencséjének epithelsejtjeiben megjelenő GFAP-ról nincs irodalmi adat, ezért feltételezéseink szerint a kimutatott GFAP re-expresszió az epithelsejteket ért mechanikai stressz miatt jelenhetett meg.

Immunhisztokémiai és fénymikroszkópos kvalitatív és kvantitatív GFAP immunreaktivitás kimutatására irányuló vizsgálataink eredményei szerint, az elülső lencsetok epithelsejtjeinek szignifikánsan nagyobb aránya volt GFAP immunreaktív manuális capsulotomia után, mint femtoszekundumos lézerasszisztált capsulotomia esetén. Különböző szervezetben, többek között a szemben is, a sejteket ért károsító hatások következtében elinduló regenerációt elősegítő mechanizmusok során megfigyelhetőek az embrionális és magzati

fejlődési folyamatokra jellemző gének ismételt emelkedett expressziója (Gallina és mtsai., 2016; Mader és Cameron, 2004). Ennek során olyan fehérjék képződése figyelhető meg, mint például a növekedési faktorok és receptoraik megjelenése, melyek pozitívan befolyásolják és előmozdítják a regenerálódási folyamatokat (Fischer és mtsai., 2009; Fischer és mtsai., 2010). Más fehérjék, mint pl. a citoskeleton fehérjéinek jelenléte GFAP, vimentin, nestin sejt károsodásra utal (Xue és mtsai., 2010; Noristani és mtsai., 2016).

Eredményeink alapján a GFAP immunreaktív sejtek egy része glutamin-szintáz (GS) immunreaktivitást is mutatott. Mivel ismert, hogy a lencsetok hámsejtekben GS-szerű fehérje, a lengsin expresszálódik, ezek a sejtek valószínűleg lengsin-t is tartalmaztak (Grassi és mtsai., 2006; Wistow és mtsai., 2002; Hawse és mtsai., 2003). Vizsgálatainkban azt láthattuk, hogy jelentős különbség nincs a manuális és lézerasszisztált elülső lencsetok eltávolítás esetén az epithelsejteken belül a GS immunreaktivitást mutató sejtek arányában. Ismert, hogy az időskori cataractában a lengsin expresszió csökken (Hawse és mtsai., 2003). Tekintve, hogy a vizsgált esetekben a szürkehályog stádiuma közel megegyező volt, a lengsin expresszió is hasonló lehetett a manuális módon és a lézerasszisztált műtéten átesett betegek elülső lencsetok epithelsejtjeiben. Mivel a GS expresszió a lengsin expressziójára utal, fontos eredmény, hogy mindkét csoportban hasonló mértékű volt a GS expresszió. Ez azt jelenti, hogy az időskori caratacta „érettségének” és a szemlencse műtét előtti transzparenciájának tekintetében a két betegcsoport között nem volt szignifikáns különbség. A két betegcsoport homogén volta ellenére a capsulotomiás nyílás képzésének két eltérő műtéti módszerével magyarázható a GFAP immunreaktivitásban látott különbség. A GFAP immunreaktív sejtek száma ugyanis szignifikáns különbséget mutatott a két csoport között. Ezzel összhangban a GFAP és GS együttes immunreaktivitása is jelentős különbséget mutatott a két csoport között, ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy a GFAP immunreaktív sejtek csak egy része tartalmazott GS-t. Feltehetően az elülső lencsetok eltávolítása manuális capsulotomia által nagyobb mechanikai stresszt jelenthet az epithelsejtek számára, hiszen a GFAP pozitív sejtek aránya nagyobb volt a manuális capsulotomiás mintáinkban.

A fentiek jelentősége sebgyógyulás szempontjából lehet érdekes, mivel az elülső capsulotomiás nyílás képzésekor az elülső lencsetok perifériás része nem kerül eltávolításra, és a sebgyógyulás a reziduális epithelsejteknél kezdődik. Feltételezéseink szerint a reziduális epithelsejtekben olyan változások jelennek meg, amelyeket az eltávolított elülső lencsetok epithelsejtjeiben láttunk. Emiatt a műtéti beavatkozás által okozott károsodás olyan útvonalak stimulálását válthatja ki, amely a reziduális epithelsejtek epithelialis-mesenchymális transzformációját indukálhatja, így a posztoperatív hátsó tok fibrosis és a hátsó tok

elhomályosodásának megjelenését segíti elő (Marcantonio és Vrensen, 1999). A műtét okozta trauma miatt, szürkehályog-eltávolítás esetén a reziduális epithelsejtek migrációja és proliferációja által posztoperatív hátsó tok fibrosis jelenik meg (Marcantonio és és Vrensen, 1999).

A capsulorrhexis körül az epithelsejtek citoszkeletonjában látott változások nem csupán morfológiai jellegűek. Különösen az aktin mikrofilamentum hálózatban megfigyelt változások alapján arra következtethetünk, hogy a sejtek kontraktilitása és migrációs képessége is változott.

Meg kell jegyeznünk, hogy a mechanikai stressz a direkt sejt-sejt közötti kommunikációt is megváltoztathatja. Napjainkig úgy gondolták, hogy a direkt sejt-sejt kommunikáció réskapcsolatok, vagy parakrin mechanizmusok révén valósul meg. Viszont, 2004-ben Rustom és mtsai. egy új, aktin tartalmú, csőszerű elem kialakulását írták le, amely alkalmas arra, hogy intercelluláris kommunikáció jöjjön létre egymástól távolabb elhelyezkedő sejtek között (Rustom és mtsai., 2004). Azóta ismert, hogy több sejtípus képes arra, hogy hasonló csőszerű képződményeket képezzen, mint például az astrocyták, daganat sejtek, az immunrendszer egyes sejtjei (Önfelt és Davis, 2004; Rostami és mtsai., 2017).

A két eltérő capsulotomiás nyílás képzése során nyert elülső lencsetokok epithelsejtjeit összehasonlítva, eredményeink a citoszkeleton vizsgálata eltérő mértékű mechanikai stressz jelenlétére utalnak, ezért a továbbiakban az aktinhálózat morfológiai jellegzetességeinek vizsgálatára összpontosítottunk.

Ismert, hogy stressz hatására az aktin mikrofilamentumok átalakulása történik, melynek során ún. stressz rostok jelennek meg (Pavalko és mtsai., 1998; Liou és Rafferty, 1988). Weber és Menko munkája által tudhatjuk, hogy epithelsejtek tenyésztése során a stressz rostok normál aktinhálózattá alakulnak át. A citoszkeleton aktin mikrofilamentumában bekövetkező változást olyan fehérjék expressziója követi, amelyek az epithelsejtek túlélését és a károsító hatásra adott biológiai válaszát határozzák meg (Weber és Menko, 2006). Az aktinhálózat vizsgálata során a kortikális hálózat esetében hasonló mintázatot láttunk a manuális és a femtoszekundumos lézerasszisztált elülső capsulotomiás nyílás képzésekor az eltávolított elülső lencsetok epithelsejtjeiben. Ez azért bír jelentőséggel, mert a kortikális aktinhálózat mintázatának változása különböző molekuláris biológiai jelátviteli utak működésére lehet hatással (Weber és Menko, 2006).

A kortikális hálózatban megfigyeltekkel ellentétben, a két műtéti csoport között az aktinhálózat kompaktsága jelentős különbséget mutatott. Manuális capsulotomiás mintáknál az epithelsejtek citoszkeletonjában az aktinhálózat esetében változást láttunk. A kompakt

aktinhálózat helyett aktin „sziget” képződést figyeltünk meg. Ugyanakkor az aktin „szigetek” között résképződés volt látható. Az epithelsejtek közötti résképződés a femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomia után nem volt látható. A főleg manuális mintákban megfigyelt résképződés azzal magyarázható, hogy a manuális capsulotomiás nyílás kialakítása alatt nagyobb mechanikai stressz éri az elülső lencsetok epithelsejtjeit. Mindez összhangban áll a dolgozatban korábban bemutatott fény- és elektronmikroszkópos vizsgálataink eredményeivel, valamint a magas GFAP expresszióval.

Az aktin „szigetek” között szintén aktin tartalmú tubuláris képződmények jelentek meg. Ezeket az aktinhálózatot érintő változásokat kifejezetten a manuális capsulotomia után láttuk az elülső lencsetok epithelsejtjeiben.

Eredményeink alapján valószínűnek tartjuk, hogy a femtoszekundumos-asszisztált elülső capsulotomiás nyílás képzése enyhébb mechanikai stresszt okoz az elülső lencsetok epithelsejtjeiben, mint a manuális elülső lencsetok eltávolítás. A manuális capsulotomia után látott erőteljes citoskeletális elváltozások megváltozott sejt-sejt kommunikációra és a sejtek megnövekedett migrációs hajlamára utalnak. Mindez az epithelialis-mesenchymális transzformációt, és ennek következtében a posztoperatív hátsó tok fibrosis és másodlagos caratacta kialakulását segítheti elő. Ezzel ellentétben femtoszekundumos lézerrel végzett elülső capsulotomiás nyílás képzésekor az elülső lencsetok epithelsejtjeiben enyhébb citoskeletális változást láttunk, így valószínűsítjük, hogy a lézerasszisztált capsulotomia esetén kevesebb reziduális epithelsejten történik epithelialis-mesenchymális transzformáció, ami, harmóniában mások eredményeivel (Kovács és mtsai., 2014; Verdina és mtsai., 2020), csökkentheti a posztoperatív hátsó tok fibrosis kialakulásának rizikóját.

A szemészeti beavatkozásoknál használt lézerek sejtkárosító hatása

A szemészeti lézersebészetben eltérő típusú és működési elvű lézerkészülékeket használnak. A terápiás alkalmazást az egyes lézer típusok szöveti hatása határozza meg. Így, egyes lézereket koagulációra (pl. a diabeteses retinopathia kezelésében használt argon lézer), másokat pedig ionizációra (pl. a posztoperatív hátsó tok fibrosis kezelésében használt Nd:YAG lézer), illetve automatizációra (lézerek a refraktív sebészetben, például a femtoszekundumos lézer) használnak. Nagyon sok szemsebészeti beavatkozásnál használják a lézerek metsző vagy vágó hatását. A szemészeti műtétek során a femtoszekundumos lézerkészülékek akkor használhatóak biztonsággal, ha a posztoperatív időszakban a betegek klinikai állapotában megfelelő és gyors javulást láthatunk, illetve, ha a lézer használata által létrejött szövetkárosodás mértéke nem túl nagy. Ennek a szövetkárosodásnak egyik jele lehet a sejtek

apoptózisa. Femtoszekundumos lézerasszisztált szürkehályog-műtét során, elülső capsulotomiás nyílás képzésekor, az elülső lencsetok szélén nagyobb számban jelentek meg olyan epithelsejtek, amelyek apoptotikus jeleket mutattak, mint ahogyan az látható volt a manuális elülső capsulotomia által eltávolított elülső lencsetokok epithelsejtjeiben (Mayer és mtsai., 2014b; Sun és mtsai., 2018; Pisciotta és mtsai., 2018). Az epithelsejtek károsodásának mértéke a felhasznált lézer energiától is függ (Mayer és mtsai., 2014b; Williams és mtsai., 2017; Toto és mtsai., 2015). Meg kell azonban jegyezni, hogy a fenti közleményekben nagyobb lézer energiát használtak, mint amekkora energiát mi használtunk, ami részben magyarázatot adhat saját és a fenti közleményekben leírtak közötti különbségre. Emellett ki kell emelnünk, hogy Toto és mtsai. (2015), akik tanulmányukban az általunk használt lézerhez hasonló energiájú lézerrel dolgoztak, közleményükben az epithelsejtek hasonló morfológiai elváltozását írták le, mint amelyet mi is találtunk (Toto és mtsai., 2015 1. ábra). A manuális mintákban zsugorodott, lapos, míg a lézerasszisztált capsulotomiával eltávolított mintákban szabályos kontrollszerű köbhámsejtek láthatók az ábrán (Toto és mtsai., 2015 1. ábra), annak ellenére, hogy a szerzők ennek nem tulajdonítottak jelentőséget. Fontos azonban megjegyezni, hogy apoptózis során jellemző az érintett sejtek zsugorodása. Toto és mtsai. (2015) munkája kapcsán ki kell azt is emelnünk, hogy csak nagy lézer energia használata mellett találtak szignifikánsan nagyobb TUNEL pozitívítást a lézerrel eltávolított mintákban a manuális módszerrel kivett mintákhoz képest. Ugyanakkor 7 μJ energia használata mellett hasonló, 10 μJ -nál enyhén kisebb mértékű TUNEL pozitívítást figyeltek meg a lézer asszisztált műtét után, mint manuális capsulotomia után (Toto és mtsai., 2015, 2. ábra), amely eredmények összhangban vannak az általunk megfigyeltekkkel.

Annak ellenére, hogy a lézer okozta károsodás energiafüggő, még az alacsony lézer energia használata során is megjelenik bizonyos szintű apoptózis (Pisciotta és mtsai., 2018). Ugyanakkor, figyelembe kell vennünk, hogy Pisciotta és mtsai. (2018) Ziemer LDV Z8 femtoszekundumos lézer platformot használtak, amely magas frekvencián, és alacsony energia mellett biztosít lehetőséget a műtéti lépések elvégzéséhez. Más femtoszekundumos lézerkészülékekkel ellentétben, ez a platform kis lézergócokat képez, kevés gáz buborék megjelenése mellett (Pajic és mtsai., 2017).

Femtoszekundumos lézerasszisztált szaruhártya műtéteknél is kimutatható a sejtek károsodása (Liu és mtsai., 2014; Heinzelmann és mtsai., 2013). A sejthalál kialakulásának gyakorisága itt is a femtoszekundumos lézer energiájával állt arányban (Medeiros és mtsai., 2009). Ez azzal magyarázható, hogy a femtoszekundumos lézerasszisztált vágás fotodiszrupció által valósul meg, így a vágási felszín környezetében elhelyezkedő sejtek károsodása

elkerülhetetlen. Ezzel összhangban, Riau és mtsai., a femtoszekundumos lézerasszisztált szaruhártya lebeny képzésénél, a szaruhártya vágási szélén és a kialakított lebeny szélén találtak apoptotikus sejteket (Riau és mtsai., 2011). Hasonlóan, penetráló keratoplasztika esetén, femtoszekundumos lézerasszisztált trepanálás vágási felszíne mentén jelentek meg az apoptotikus sejtek, míg a manuálisan kialakított trepanálás esetén apoptotikus jelek nemcsak a vágási felszín mentén, hanem a távolabbi területeken is láthatóak voltak (Angunawela és mtsai., 2012). Az elülső lecsatok manuális és femtoszekundumos lézer segítségével végzett eltávolítása után mi is Angunawela és mtsai. (2012) megfigyeléséhez hasonló jelenséget észleltünk. Nevezetesen, nagyobb arányban találtunk apoptotikus, illetve a károsodás miatt citoskeletális elváltozás jeleit mutató sejteket a manuális módon kimetszett minták vágási felszínétől távolabbi területeken, mint femtoszekundumos lézerasszisztált capsulotomia esetén.

A femtoszekundumos lézer használata, és az apoptotikus folyamatok megjelenésének értelmezésében, nemcsak a femtoszekundumos lézer típusa, a felhasznált lézer energiája számít, hanem a műtéti beavatkozás után eltelt időt is szem előtt kell tartanunk. Kísérleti állatokon végzett különböző típusú femtoszekundumos lézerasszisztált szaruhártya műtétek esetén a korai posztoperatív időszakban (4 és 24 óra) nagyobb mértékű sejthalál detektálható, mint később (Dong és mtsai., 2014; Angunawela és mtsai., 2012; Netto és mtsai., 2007). Más szerzők szerint, még a posztoperatív első két napban is nagyobb mértékben figyelhető meg az apoptózis, mint a későbbi időszakban (Santhiago és mtsai., 2012). Ugyanakkor, a későbbi posztoperatív időszakban a femtoszekundumos lézerasszisztált és a manuálisan elvégzett műtétek után nincs jelentős különbség az apoptotikus sejtek mennyisége között (Santhiago és mtsai., 2012; Riau és mtsai., 2013; Angunawela és mtsai., 2012).

Az apoptotikus folyamatok kialakulásával kapcsolatban Liu és mtsai. (2018) rámutattak arra, hogy az idegentest reakció is fontos tényező. Munkájuk során összehasonlították a szintetikus anyagból előállított- és a biológiai szaruhártya betét (inlay) femtoszekundumos lézerasszisztált beültetését. Eredményeik szerint több TUNEL pozitív sejt volt detektálható a szintetikus anyagból előállított szaruhártya betét beültetésekor. Azaz nem egyedül a femtoszekundumos lézer használatával magyarázható az apoptotikus sejtek megjelenése, hanem a szintetikus anyag által kiváltott szöveti reakció kialakulásával is (Liu és mtsai., 2018).

Ismert, hogy a posztoperatív hátsó tok fibrosis kialakulása rutin szürkehályog-műtét után egyrészt az idegentest reakcióval is magyarázható (Raj és mtsai., 2007). A femtoszekundumos asszisztált szürkehályog-műtét a femtofragmentáció után megegyezik a rutin, manuális beavatkozással. Emiatt, a manuális műtétnél megfigyelhető idegentest reakcióhoz hasonló megjelenhet a femtoszekundumos lézerasszisztált szürkehályog-műtét

során is a beültetett műlencse, a hátsó lencsetok, és az elülső lencsetok reziduális epithelsejtjei között. Verdina és mtsai. (2020) 18 hónapos utánkövetés alapján úgy találták, hogy a femtoszekundumos lézerasszisztált elülső capsulotomiás nyílás, alacsonyabb lézer energia használatával szabályosabb lesz, ez által jobban körbeveszi a műlencsét, és kisebb mértékű posztoperatív hátsó tok fibrosis kialakulását eredményezi. Tanulmányukban mind a manuális, mind a femtoszekundumos lézerasszisztált capsulotomia kialakítás után ugyanazt az intraocularis műlencsét implantálták. Ennek eredményeként statisztikailag szignifikánsan nagyobb arányban jelent meg a posztoperatív hátsó tok fibrosis manuális capsulotomia képzés után, mint femtoszekundumos lézerasszisztált capsulotomia esetén (Verdina és mtsai., 2020).

Összegezve, a femtoszekundumos lézerasszisztált szemészeti műtétek területén megjelenő kutatások eddigi eredményei alapján az apoptotikus folyamatok megjelenését a femtoszekundumos lézer típusa, a műtét során használt lézer energia, a műtéti beavatkozás után eltelt idő, és ahol az releváns, az idegentest reakció befolyásolta. Emellett nem hanyagolhatók el, különösen szürkehályog-műtét esetén a betegek eltérő anamnesztikus adatai, járulakos betegségei, rendszeresen szedett gyógyszerei, melyek sok esetben befolyásolhatják a műtétek kimenetelét, és a műtét során létrejött sejtkárosodás mértékét. Vizsgálataink eredményei, miszerint bár nem szignifikánsan, de nagyobb mértékű apoptózist, és a citoskeletális rendszer szintjén megfigyelhető epithelsejt sérülést okoz a manuális capsulotomia mint a lézer asszisztált bemetszés, arra utalnak, hogy manuális eltávolítás esetén a műtét jellegéből és technikai megvalósíthatóságából fakadóan a sejtek nagyobb mértékű, a szövet húzásából, vongálásából eredő mechanikai stressznek vannak kitéve, mint lézerasszisztált capsulotomia esetén. Ugyanakkor a betegcsoportok heterogenitása, a manuálisan végrehajtott műtéteket végző orvosok gyakorlatának, és gyakorlottságának heterogenitása olyan faktorok, melyek jelentősen befolyásolhatják az eltávolított elülső lencsetokban az epithelsejtek károsodását. Ezek a faktorok nemcsak saját munkánk, hanem más szerzők munkája esetén is relevánsak, és az eltérő lézerenergia alkalmazása mellett ezek a faktorok is megnehezítik jelen témakörben leírtak teljeskörűösszehasonlíthatóságát. Mindezek arra utalnak, hogy további vizsgálatokra van szükség annak érdekében, hogy standardizált körülmények között végzett műtéti beavatkozásokat követően minden kétséget kizáróan megállapítható legyen a manuális és lézerasszisztált capsulotomia okozta szöveti sérülés mértéke.

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 lézerasszisztált capsulotomia után, annak ellenére, hogy a különbség nem volt szignifikáns. A manuális capsulotomia során az epithelsejtek nagyobb arányában detektáltunk apoptotikus folyamatokra jellemző sejt morfológiát és proapoptotikus 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 mindezek 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.

IRODALOMJEGYZÉK

- Adan A, Kiraz Y, Baran Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Curr Pharm Biotechnol* (2016) **17**(14):1213-1221.
- Akkin C, Ozler SA, Menten J. Tilt and decentration of bag-fixated intraocular lenses: A comparative study between capsulorhexis and envelope techniques. *Doc Ophthalmol* (1994) **87**:199-209.
- Alió JL, Anania A and Sagnelli P. Age-Related Changes of Human Eye. Carol A.P. Cavalotti, Luciano Cerulli, editors Humana Press, a part of Springer Science + Business Media LLC (2008) Chap **5**:61-73.
- Alio JL, Shabayek MH, Artola A. Intracorneal ring segments for keratoconus correction: long-term follow-up. *J Cataract Refract Surg* (2006) **32**(6):978–985.
- Alio JL, Vega A, Soria F, editors Femtosecond Laser Assisted Keratoplasty. 1st ed. New Delhi, India: Jaypee Brothers (2013) 75-76.
- Alliot F, Pessac B. Macrophages express glial markers. *Biol Cell* (1988) **63**(1):109-111.
- Amaya L, Taylor D, Russell-Eggitt I, Nischal KK, Lengyel D. The morphology and natural history of childhood cataracts. *Surv Ophthalmol* (2003) **48**:125-144.
- Andjelic S, Draslar K, Hvala A, Hawlina M. Anterior lens epithelium in intumescent white cataracts-scanning and transmission electron microscopy study. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* (2016) **254**:269–276.
- Angunawela RI, Riau A, Chaurasia SS, Tan DT, Mehta JS. Manual suction versus femtosecond laser trephination for penetrating keratoplasty: intraocular pressure, endothelial cell damage, incision geometry, and wound healing responses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2012) **53**(6):2571-2579.
- Apple DJ, Peng Q, Ram J. The 50th anniversary of the intraocular lens and a quiet revolution [editorial]. *Ophthalmology* (1999) **106**:1861–1862.
- Apple DJ, Peng Q, Visessook N, Werner L, Pandey SK, Gomez ME, Ram J, Whiteside SB, Schoderbeck R, Ready LE, Guindi A. Surgical prevention of posterior capsule opacification. Part 1: Progress in eliminating this complication of cataract surgery. *J Cataract Refract Surg* (2000) **26**(2):180–187.
- Apple DJ, Solomon KD, Tetz MR, Assia EI, Holland EY, Legler UF, Tsai JC, Castaneda VE, Hoggatt JP, Kostick AM. Posterior capsule opacification. *Surv Ophthalmol* (1992) **37**(2):73-116.

- Auffarth GU, Reddy KP. Preliminary Clinical Results of the Femto-Cataract Procedure Using the VICTUS® Femtosecond Laser Platform (2012). Corpus ID: 53498444
- Awasthi N and Wagner BJ. Suppression of Human Lens Epithelial Cell Proliferation by Proteasome Inhibition, a Potential Defense against Posterior Capsular Opacification. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2006) **47**(10):4482-4489.
- Bai F, Xi JH, Wawrousek EF, Fleming TP, Andley UP. Hyperproliferation and p53 Status of Lens Epithelial Cells Derived from alphaB-crystallin Knockout Mice. *J Biol Chem* (2003) **278**(38):36876–36886.
- Barraquer J. Drugs and instruments used in cataract surgery. *Am J Ophthalmol* (1966) **61**(1):184-185.
- Bhartiya P, Sharma N, Ray M, Sinha R, Vajpayee RB. Trypan blue assisted phacoemulsification in corneal opacities. *Br J Ophthalmol* (2002) **86**:857-859.
- Binder PS. Femtosecond applications for anterior segment surgery. *Eye Contact Lens* (2010) **36**(5):282–285.
- Birinci H, Kuruoglu S, Oge I, Oge F, Acar E. Effect of intraocular lens and anterior capsule opening type on posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* (1999) **25**(8):1140–1146.
- Biró Z. Phacoemulsificatio: Capsulorhexis. *Szemészet Supplementum* (1998) **135**: 11-15.
- Bochmann F, Schipper I. Correction of post-keratoplasty astigmatism with keratotomies in the host cornea. *J Cataract Refract Surg* (2006) **32**(6):923–928.
- Boyer S, Maunoury R, Gomès D, de Néchaud B, Hill AM, Dupouey P. Expression of glial fibrillary acidic protein and vimentin in mouse lens epithelial cells during development *in vivo* and during proliferation and differentiation *in vitro*: comparison with the developmental appearance of GFAP in the mouse central nervous system. *J Neurosci Res* (1990) **27**(1):55-64.
- Boyer S, Montagutelli X, Gomès D, Simon-Chazottes D, Guénet JL, Dupouey P. Recent evolutionary origin of the expression of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lens epithelial cells. A molecular and genetic analysis of various mouse species. *Brain Res Mol Brain Res* (1991) **10**(2):159-166.
- Brennan K. Making the cut: Capsulotomy Devices. *Review of Ophthalmol* (2017)
- Brenner M. Structure and transcriptional regulation of the GFAP gene. *Brain Pathol* (1994) **4**(3):245-257.

- Budka H. Non-glial specificities of immunocytochemistry for the glial fibrillary acidic protein (GFAP). Triple expression of GFAP, vimentin and cytokeratins in papillary meningioma and metastasizing renal carcinoma. *Acta Neuropathol* (1986) **72**(1):43-54.
- Budo C, Montanus F. Small capsulotomy and great implant lens. *Bull Soc Belge Ophthalmol* (1991) **242**:41-46.
- Buehl W, Sacu S, Findl O. Association between intensity of posterior capsule opacification and contrast sensitivity. *Am J Ophthalmol* (2005) **140**:927–930.
- Buratto L, Böhm E. The use of the femtosecond laser in penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol* (2007) **143**(5):737-742.
- Callou TP, Garcia R, Mukai A, Giacomini NT, de Souza RG, Bechara SJ. Advances in femtosecond laser technology. *Clin Ophthalmol* (2016) **10**:697-703.
- Chang DF, Mamalis N, Werner L. Precision pulse capsulotomy: preclinical safety and performance of a new capsulotomy device. *Ophthalmology* (2016) **123**:255-264.
- Chang DF. Zepto precision pulse capsulotomy: A new automated and disposable capsulotomy technology. *Indian J Ophthalmol* (2017) **65**:1411-1414.
- Chang YS, Tseng SY, Tseng SH. Comparison of dyes for cataract surgery Part 2: efficacy of capsule staining in a rabbit model. *J Cataract Refract Surg* (2005) **31**(14):799-804.
- Chaurasia SS, Luengo Gimeno F, Tan K, Yu S, Tan DT, Beuerman RW, Mehta JS. In vivo real-time intraocular pressure variations during LASIK flap creation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2010) **51**:4641–4645.
- Chowdhury PK, Raj SM, Vasavada AR. Inadvertent staining of the vitreous with trypan blue. *J Cataract Refract Surg* (2004) **30**(1):274-276.
- Chung CF, Liang CC, Lai JS, Lo ES, Lam DS. Safety of trypan blue 1% and indocyanine green 0.5% in assisting visualization of anterior capsule during phacoemulsification in mature cataract. *J Cataract Refract Surg* (2005) **31**:938–942.
- Colin J, Cochener B, Savary G, Malet F. Correcting keratoconus with intracorneal rings. *J Cataract Refract Surg* (2000) **26**(8):1117–1122.
- Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* (2002) **2**:647–656.
- Dada T, Ray M, Bhartiya P, Vajpayee RB. Trypan-blue-assisted capsulorhexis for trainee phacoemulsification surgeons. *J Cataract Refract Surg* (2002) **28**:575-576.
- Dada VK, Sharma N, Sudan R, Sethi H, Dada T, Pangtey MS. Anterior capsule staining for capsulorhexis in cases of white cataract: Comparative clinical study. *J Cataract Refract Surg* (2004) **30**(2):326-233.

- Daviel J. A new method of curing cataract by extraction of the lens. [Sur une nouvelle méthode de guérir la cataracte par l'extraction du cristallin.]. *Memoires de L'Academie Royale de Chirurgie Paris* (1753) **2**:337–354.
- Davis G. The evolution of cataract surgery. *Mo Med* (2016) **113**(1):58-62.
- de Medeiros FW, Kaur H, Agrawal V, Hammel J, Wilson SE, Chaurasia S, Dupps WJ. Effect of femtosecond laser energy level on corneal stromal cell death and inflammation. *J Refract Surg* (2009) **25**(10):869-874.
- Dholakia SA, Vasavada AR. Intraoperative performance and longterm outcome of phacoemulsification in age-related cataract. *Indian J Ophthalmol* (2004) **52**(4):311-317.
- Dick HB, Aliyeva SE, Hengerer F. Effect of trypan blue on the elasticity of the human anterior lens capsule. *J Cataract Refract Surg* (2008) **34**(8):1367–1373.
- Dong Z, Zhou X, Wu J, Zhang Z, Li T, Zhou Z, Zhang S, Li G. Small incision lenticule extraction (SMILE) and femtosecond laser LASIK: comparison of corneal wound healing and inflammation. *Br J Ophthalmol* (2014) **98**(2):263-269.
- Edwards KH, Frey RW, Naranjo-Tackman R. Clinical outcomes following laser cataract surgery. (2010) **51**:E-Abstract.
- Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* (2007) **35**(4):495-516.
- El-Osta AA, Spalton DJ, Marshall J. In vitro model for the study of human posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* (2003) **29**:1593-600.
- Fischer AJ, Scott MA, Ritchey ER, Sherwood P. Mitogen-activated protein kinase-signaling regulates the ability of Müller glia to proliferate and protect retinal neurons against excitotoxicity. *Glia* (2009) **57**(14):1538-1552.
- Fischer AJ, Scott MA, Zelinka C, Sherwood P. A novel type of glial cell in the retina is stimulated by insulin-like growth factor 1 and may exacerbate damage to neurons and Müller glia. *Glia* (2010) **58**(6):633-649.
- Fishkind W, Uy H, Tackman RN, Kuri JV. Alternative fragmentation patterns in femtosecond laser cataract surgery [abstract]. In: Program and Abstracts of American Society of Cataract and Refractive Surgeons Symposium on Cataract, IOL and Refractive Surgery; 9-14 April (2010) Boston, Massachusetts.
- Frezzotti R, Caporossi A, Mastrangelo D, Hadjistilianou T, Tosi P, Cintorino M, Minacci C. Pathogenesis of posterior capsular opacification Part II: Histopathological and in vitro culture findings. *J Cataract Refract Surg* (1990) **16**(3):353–360.

- Fridman JS and Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* (2003) **22**:9030–9040.
- Friedman NJ, Palanker DV, Schuele G, Andersen D, Marcellino G, Seibel BS, Batlle J, Feliz R, Talamo JH, Blumenkranz MS, Culbertson WW. Femtosecond laser capsulotomy. *J Cataract Refract Surg* (2011) **37**(7):1189-1198.
- Fritz WL. Digital image analysis of trypan blue and fluorescein staining of anterior lens capsules and intraocular lenses. *J Cataract Refract Surg* (2002) **28**(6):1034-1038.
- Fritz WL. Fluorescein blue, light-assisted capsulorhexis for mature or hypermature cataract. *J Cataract Refract Surg* (1998) **24**(1):19–20.
- Galand A. A simple method of implantation within the capsular bag. *J Am Intraocul Implant Soc* (1983) **9**:330-332.
- Gallina D, Palazzo I, Steffenson L, Todd L, Fischer AJ. Wnt/ β -catenin-signaling and the formation of Müller glia-derived progenitors in the chick retina. *Dev Neurobiol* (2016) **76**(9):983-1002.
- Garcia-Porrero JA, Colvee E, and Ojeda JL. The mechanism of cell death and phagocytosis in the early chick lens morphogenesis: a scanning electron microscopy and cytochemical approach. *Anat Rec* (1984) **208**:123-136.
- Gard AL, White FP, Dutton GR. Extra-neural glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity in perisinusoidal stellate cells of rat liver. *J Neuroimmunol* (1985) **8**(4-6):359-375.
- Gaur A, Kayarkar VV. Inadvertent vitreous staining. *J Cataract Refract Surg* (2005) **31**(4):649.
- Gimbel HV, Neuhann T. Development, advantages, and methods of the continuous circular capsulorhexis technique. *J Cataract Refract Surg* (1990) **16**:31-37.
- Grassi F, Moretto N, Rivetti C, Cellai S, Betti M, Márquez AJ, Maraini G, Ottonello S. Structural and functional properties of lensin, a pseudo-glutamine synthetase in the transparent human lens. *Biochem Biophys Res Commun* (2006) **350**(2):424-429.
- Grom E. An inquiry into the history of the crystalline lens. In: Bellows, J. G, editors *Cataract and abnormalities of the lens*. Grune & Stratton Inc., New York, NY 1975 (1985):6–28.
- Grósz E, Hoor K. Handbook of ophthalmology III. [A szemészet kézikönyve III.], Magyar Orvosi Könyvkiadó Társulat, Franklin Társulat, Budapest (1910):701–804.
- Guo S, Caputo A, Wagner R, DeRespinis P. Enhanced visualization of capsulorhexis with indocyanine green staining in pediatric white cataracts. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* (2003) **40**:268-271.

- Haeussler-Sinangin Y, Dahlhoff D, Schultz T, Dick HB. Clinical performance in continuous curvilinear capsulorhexis creation supported by a digital image guidance system. *J Cataract Refract Surg* (2017) **43**(3):348-352.
- Haritoglou C, Gandorfer A, Schaumberger M, Priglinger SG, Mueller AJ, Gass CA, Kampik A. Trypan blue in macular pucker surgery: an evaluation of histology and functional outcome. *Retina* (2004) **24**(4):582-590.
- Harocopos GJ, Alvares KM, Kolker AE, Beebe DC. Human Age-Related Cataract and Lens Epithelial Cell Death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (1998) **39**(13):2696-2706.
- Hatfield JS, Skoff RP, Maisel H, Eng L, Bigner DD. The lens epithelium contains glial fibrillary acidic protein (GFAP). *J Neuroimmunol* (1985) **8**(4-6):347-357.
- Hatfield JS, Skoff RP, Maisel H, Eng L. Glial fibrillary acidic protein is localized in the lens epithelium. *J Cell Biol* (1984) **98**(5):1895-1898.
- Hawse JR, Hejtmancik JF, Huang Q, Sheets NL, Hosack DA, Lempicki RA, Horwitz J, Kantorow M. Identification and functional clustering of global gene expression differences between human age-related cataract and clear lenses. *Mol Vis* (2003) **9**:515-537.
- He L, Sheehy K, Culbertson W. Femtosecond laser-assisted cataract surgery. *Curr Opin Ophthalmol* (2011) **22**(1):43–52.
- Heinzelmann S, Maier P, Böhringer D, Auw-Hädrich C, Reinhard T. Visual outcome and histological findings following femtosecond laser-assisted versus microkeratome-assisted DSAEK. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* (2013) **8**; 251(8):1979-1985.
- Hjortdal J, Nielsen E, Vestergaard A, Søndergaard A. Inverse cutting of posterior lamellar corneal grafts by a femtosecond laser. *Open Ophthalmol J* (2012) **6**:19–22.
- Hodge C, Bali SJ, Lawless M, Chan CC, Roberts T, David Ng, Chen S, Hughes P, Sutton G. Femtosecond cataract surgery: A review of current literature and the experience from an initial installation. *Saudi J Ophthalmol* (2012) **26**(1):73–78.
- Hoffart L, Proust H, Matonti F, Conrath J, Ridings B. Correction of postkeratoplasty astigmatism by femtosecond laser compared with mechanized astigmatic keratotomy. *Am J Ophthalmol* (2009) **147**(5):779–787.
- Hogan MJ, AlvaradoJA, Weddell JE. Lens. In: *Histology of the Human Eye*. editor WB Saunders, Toronto, (1971) 638-677.
- Holzer MP, Rabsilber TM and Auffarth GU. Femtosecond Laser-Assisted Corneal Flap Cuts: Morphology, Accuracy, and Histopathology. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2006) **47**:2828-2831.

- Huang C, Akaishi S, Ogawa R. Mechanosignaling pathways in cutaneous scarring. *Arch Dermatol Res* (2012) **304**(8):589-597.
- Hubbell AA. Samuel Sharp, the first surgeon to make the corneal incision in cataract extraction with a single knife: A biographical and historical sketch. *Med Library Hist J* (1904) **2**(4):242, 1-268.
- Ishizaki Y, Voyvodic JT, Burne JF, Raff MC. Control of lens epithelial cell survival. *J Cell Biol* (1993) **121**(4):899-908.
- Izak AM, Werner L, Pandey SK, Apple DJ, Izak GJ. Analysis of the capsule edge after Fugo plasma blade capsulotomy, continuous curvilinear capsulorhexis, and can-opener capsulotomy. *J Cataract Refract Surg* (2004) **30**:2606-2611.
- Jacobs DS, Cox TA, Wagoner MD, Ariyasu RG, Karp CL. Capsule Staining as an Adjunct to Cataract Surgery: A Report from the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology* (2006) **113**(4):707–713.
- Jardeleza MS, Daly MK, Kaufman JD, Klapperich C, Legutko PA. Effect of trypan blue staining on the elastic modulus of anterior lens capsules of diabetic and nondiabetic patients. *J Cataract Refract Surg* (2009) **35**(2):318–323.
- Jay Bhopi. Evidence-based Approach in Cataract Surgery. Taylor & Francis Ltd. Chapter **8**: 68-75.
- Jin L, Jiang F, Dai N, Peng J, Hu M, He S, Fang K, Yang X. Sclerectomy with nanojoule energy level per pulse by femtosecond fiber laser in vitro. *Opt Express* (2015) **23**(17):22012–22023.
- Jordan JF, Kociok N, Grisanti S, Jacobi PC, Esser JM, Luther TT, Krieglstein GK, Esser P. Specific features of apoptosis in human lens epithelial cells induced by mitomycin C in vitro. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* (2001) **239**(8): 613-618.
- Jose RM, Bender LE, Boyce JF, Heatley C. Correlation between the measurement of posterior capsule opacification severity and visual function testing. *J Cataract Refract Surg* (2005) **31**(3):534–542.
- Kahook MY, Cionni RJ, Taravella MJ, Ang RE, Waite AN, Solomon JD, Uy HS. Continuous curvilinear capsulorhexis performed with the VERUS ophthalmic caliper. *J Refractive Surg* (2016) **32**(10):654–658.
- Kang MJ, Lee YE, Choi JS, Joo CK. Ideal parameters for femto-second laser-assisted anterior capsulotomy: Animal studies. *PLoS ONE* (2018) **13**(1):e0190858.
- Kato K, Kurosaka D, Nagamoto T. Apoptotic Cell Death in Rabbit Lens After Lens Extraction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (1997) **38**(11):2322-2330.

- Kaufman MH. The Atlas of Mouse Development. Academic Press, London (1992).
- Kelman CD. Phaco-emulsification and aspiration: a new technique of cataract removal: a preliminary report. *Am J Ophthalmol* (1967) **64**(1):23-35.
- Kohnen T, Klaproth OK, Ostovic M, Hengerer FH, Mayer WJ. Morphological changes in the edge structures following femtosecond laser capsulotomy with varied patient interfaces and different energy settings. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* (2014) **252**:293–298.
- Konstantopoulos A, Hossain PN, Anderson DF. Recent advances in ophthalmic anterior segment imaging: a new era for ophthalmic diagnosis? *Br J Ophthalmol* (2007) **91**:551–557.
- Kovács I, Kránitz K, Sándor GL, Knorz MC, Donnenfeld ED, Nuijts RM, Nagy ZZ. The effect of femtosecond laser capsulotomy on the development of posterior capsule opacification. *J Refract Surg* (2014) **30**(3):154-158.
- Krag S, Andreassen TT. Mechanical properties of the human lens capsule. *Progress in Retinal and Eye Research* (2003) **22**:749-767.
- Kubaloglu A, Sari ES, Cinar Y, Cingu K, Koytak A, Coskun E, Ozertürk Y. Comparison of mechanical and femtosecond laser tunnel creation for intrastromal corneal ring segment implant in keratoconus: prospective randomized clinical trial. *J Cataract Refract Surg* (2010) **36**(9):1556–1561.
- Kwitko M, Simcoe W. Manual extracapsular surgery. In: Marvin L Kwitko, Charles D Kelman, editor, The history of modern cataract surgery. The Netherlands: Hague; Kugler publishers; (1998) 91-106.
- Lance O. Anatomy and embryology of the lens. In: Duane TD, Jaeger EA, editors Duane's Clinical Ophthalmology, Vol.1. Philadelphia: JB Lippincott, (1988) Chap **71**:1-8.
- Lee JH, Lee YE and Joo CK. Clinical results of the open ring PMMA guider assisted capsulorrhexis in cataract surgery. *BMC Ophthalmology* (2018) **18**(1):116
- Li M, Zhao J, Shen Y, Li T, He L, Xu H, Yu Y and Zhou X. Comparison of dry eye and corneal sensitivity between small incision lenticule extraction and femtosecond LASIK for myopia. *PLoS One* (2013) **8**(10):e77797.
- Li WC, Kuszak JR, Dunn K, Wang RR, Ma W, Wang GM, Spector A, Leib M, Cotliar AM, Weiss M. Lens Epithelial Cell Apoptosis Appears to be a Common Cellular Basis for Non-Congenital Cataract Development in Humans and Animals. *J Cell Biol* (1995) **130**(1):169-181.
- Liou W, Rafferty NS. Actin filament patterns in mouse lens epithelium: a study of the effects of aging, injury, and genetics. *Cell Motil Cytoskeleton* (1988) **9**(1):17-29.

- Lipner M. Forgoing the femtosecond laser. *Eye World* (2015) 50-51.
- Liu T, Zhang J, Sun D, Sui W, Zhang Y, Li D, Chen Z, Gao H. Comparative Study of Corneal Endothelial Cell Damage after Femtosecond Laser Assisted Deep Stromal Dissection. *Biomed Res Int* (2014) **7**: 2014:731565.
- Liu Y, Teo EPW, Ang HP, Seah XY, Lwin NC, Yam GHFY, Mehta JS. Biological corneal inlay for presbyopia derived from small incision lenticule extraction (SMILE). *Sci Rep* (2018) **8**:1831.
- Lubatschowski H, Maatz G, Heisterkamp A, Hetzel U, Drommer W, Welling H, Ertmer W. Application of ultrashort laser pulses for intrastromal refractive surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* (2000) **238**(1):33-39.
- Ma B, Kang Q, Qin L, Cui L, Pei C. TGF- β 2 induces transdifferentiation and fibrosis in human lens epithelial cells via regulating gremlin and CTGF. *Biochem Biophys Res Commun* (2014) **447**(4):689-695.
- Mader MM, Cameron DA. Photoreceptor differentiation during retinal development, growth, and regeneration in a metamorphic vertebrate. *J Neurosci* (2004) **24**(50):11463-11472.
- Mamuya FA, Wang Y, Roop VH, Scheiblin DA, Zajac JC, Duncan MK. The roles of α V integrins in lens EMT and posterior capsular opacification. *J Cell Mol Med* (2014) **18**(4):656-670.
- Marcantonio JM, Rakic JM, Vrensen GFJM and Duncan G. Lens cell populations studied in human donor capsular bags with implanted intraocular lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2000) **41**:1130-1141.
- Marcantonio JM, Syam PP, Liu CS, Duncan G. Epithelial transdifferentiation and cataract in the human lens. *Exp Eye Res* (2003) **77**(3):339-46.
- Marcantonio JM, Vrensen GF. Cell biology of posterior capsular opacification. *Eye* (1999) **13**(pt 3b):484-488.
- Marques FF, Marques DMV, Osher RH, Osher JM. Fate of anterior capsule tears during cataract surgery. *J Cataract Refract Surg* (2006) **32**:1638-1642.
- Marsovszky L. *A hályogoperálás története Magyarországon | History of cataract operations in Hungary. Orvosi Hetilap* (2013) **154**(45):1802-1805.
- Martinez G, Iongh RU. The lens epithelium in ocular health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* (2010) **42**(12):1945-1963.
- Masket S, Sarayba M, Ignacio T, Fram N. Femtosecond laser-assisted cataract incisions: architectural stability and reproducibility. *J cataract Refract Surg* (2010) **36**(6):1048-1049.

- Matsuura T, Niki J, Kadono Y, Hirai H, Uozato H, Saishin M. Change in anterior chamber depth after posterior chamber iol implantation. *Fol Ophthalmol Jpn* (1989) **40**:2007–2010.
- Mayer WJ, Klaproth OK, Hengerer FH, Kook D, Dirisamer M, Priglinger S, Kohnen T. In vitro immunohistochemical and morphological observations of penetrating corneal incisions created by a femtosecond laser used for assisted intraocular lens surgery. *J Cataract Refract Surg* (2014a) **40**:632-638.
- Mayer WJ, Klaproth OK, Ostovic M, Terfort A, Vavaleskou T, Hengerer FH, Kohnen T. Cell death and ultrastructural morphology of femtosecond laser-assisted anterior capsulotomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2014b) **55**(2):893-898.
- McAlinden C, Khadka J, Pesudovs K. A comprehensive evaluation of the precision (repeatability and reproducibility) of the Oculus Pentacam HR. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2011) **52**(10):7731–7737.
- McLean SM, Mathew MR, Kelly JB, Murray SB, Benett HGB, Webb LA, Esakowitz L, McLean JS. Detection of integrins in human cataract lens epithelial cells and two mammalian lens epithelial cell lines. *Br J Ophthalmol* (2005) **89**:1506-1509.
- Mencucci R, Mazzotta C, Rossi F, Ponchiotti C, Pini R, Baiocchi S, Caprossi A, Menchini U. Riboflavin and ultraviolet A collagen crosslinking: In vivo thermographic analysis of the corneal surface. *J Cataract Refract Surg* (2007) **33**(6):1005–1008.
- Moore DB, Harris A, Siesky B. The world through a lens: the vision of Sir Harold Ridley. *The British journal of ophthalmology* (2010) **94**(10):1277-1280.
- Morgenbesser SD, Williams BO, Jacks T and dePinho RA. p53-dependent apoptosis produced by Rb-deficiency in the developing mouse lens. *Nature* (1994) **317**:72-74.
- Nagy Z, Kranitz K, Takacs AI, Mihaltz K, Kovacs I, Knorz MC. Comparison of intraocular lens decentration parameters after femtosecond and manual capsulotomies. *J Refract Surg* (2011) **27**(8):564–569.
- Nagy Z, Takacs A, Filkorn T, Sarayba M. Initial clinical evaluation of an intraocular femtosecond laser in cataract surgery. *J Refract Surg* (2009) **25**(12):1053-1060.
- Nagy ZZ, Ecsedy M, Kovács I, Takács Á, Tátrai E, Somfai GM, Cabrera DeBuc D. Macular morphology assessed by optical coherence tomography image segmentation after femtosecond laser-assisted and standard cataract surgery. *J Cataract Refract Surg* (2012a) **38**(6):941-946.
- Nagy ZZ, McAlinden C. Femtosecond laser assisted cataract surgery. *Eye Vis (London)* (2015) **30**(2):11.

- Nagy ZZ. Advanced technology IOLs in cataract surgery: pearls for successful femtosecond cataract surgery. *Int Ophthalmol Clin* (2012b) **52**(2):103–114.
- Nagy ZZ. New technology update: femtosecond laser in cataract surgery. *Clin Ophthalmol* (2014) **18**(8):1157–1167.
- Nahra D, Castilla M. Fluorescein-stained capsulorrhexis. *J Cataract Refract Surg* (1998) **24**(9):1169-1170.
- Nanavaty MA, Johar K, Sivasankaran MA, Vasavada AR, Praveen MR, Zetterström C. Effect of trypan blue staining on the density and viability of lens epithelial cells in white cataract. *J Cataract Refract Surg* (2006) **32**(9):1483–1488.
- Navneet Toshniwal. Simplified Phacoemulsification. Japee Brothers Medical Publishers (P) Ltd. Chapter 7:72.
- Ndiaye PA, Eboulabeka E, Tchabi S, Ndiaye CS, Wane A, Ndiaye MR. Analysis of implant position after envelope technique in “white” cataract surgery. *Dakar Med* (1999) **44**:16-19.
- Netto MV, Mohan RR, Medeiros FW, Dupps WJ, Sinha S, Krueger RR, Stapleton WM, Rayborn M, Suto C, Wilson SE. Femtosecond laser and microkeratome corneal flaps: comparison of stromal wound healing and inflammation. *J Refract Surg* (2007) **23**(7):667-676.
- Nishi O, Nishi K, Wickström K. Preventing lens epithelial cell migration using intraocular lenses with sharp rectangular edges. *J Cataract Refract Surg* (2000) **26**(10):1543-1549.
- Noristani R, Kuehn S, Stute G, Reinehr S, Stellbogen M, Dick HB, Joachim SC. Retinal and optic nerve damage is associated with early glial responses in an experimental autoimmune glaucoma model. *J Mol Neurosci* (2016) **58**(4):470-482.
- Oblinger MM, Singh LD. Reactive astrocytes in neonate brain upregulate intermediate filament gene expression in response to axonal injury. *Int J Dev Neurosci* (1993) **11**(2):149-156.
- Oharazawa H, Ibaraki N, Ohara K, Reddy VN. Inhibitory effects of Arg-Gly-Asp (RGD) peptide on cell attachment and migration in a human lens epithelial cell line. *Ophthalmic Res* (2005) **37**:191-196.
- Okamura N, Ito Y, Shibata MA, Ikeda T, Otsuki Y. Fas-mediated apoptosis in human lens epithelial cells of cataracts associated with diabetic retinopathy. *Med Electron Microsc* (2002) **35**(4):234-241.
- Olali CA, Ahmed S, Gupta M. Surgical outcome following breach rhexis. *Eur J Ophthalmol* (2007) **17**:565-570.

- Oner FH, Durak I, Soylev M, Ergin M. Long-term results of various anterior capsulotomies and radial tears on intraocular lens centration. *Ophthalmic Surg Lasers* (2001) **32**:118-123.
- Ostovic M, Klaproth OK, Hengerer FH, Mayer WJ and Kohnen T. Light microscopy and scanning electron microscopy analysis of rigid curved interface femtosecond laser–assisted and manual anterior capsulotomy. *J Cataract Refract Surg* (2013) **39**:1587–1592.
- Önfelt B and Davis DM. Can membrane nanotubes facilitate communication between immune cells? *Biochemical Society Transactions* (2004) **32**:676-678.
- Paik DC, Wen Q, Braunstein RE, Trokel SL. Short chain aliphatic beta-nitro alcohols for corneoscleral cross-linking: corneal endothelial toxicity studies. *J Refract Surg* (2008) **24**:741-747.
- Pajic B, Cvejic Z, and Pajic-Eggspuehler B. Cataract surgery performed by high frequency LDV Z8 femtosecond laser: safety, efficacy, and its physical properties. *Sensors*, (2017) **18**(6):17.
- Palanker D, Nomoto H, Huie P, Vankov A, Chang D. Anterior capsulotomy with a pulsed electron avalanche knife. *J Cataract Refract Surg* (2010a) **36**:127-132.
- Palanker DV, Blumenkranz MS, Andersen D, Wiltberger M, Mercellino G, Gooding P, Angeley D, Schuele G, Woodley B, Simoneau M, Friedman NJ, Siebel B, Battle J, Feliz R, Talamo J, Culbertson W. Femtosecond Laser–Assisted Cataract Surgery with Integrated Optical Coherence Tomography. *Sci Transl Med* (2010b) **2**: 58ra85.
- Pandey SK, Werner L, Escobar-Gomez M, Roig-Melo EA, Apple DJ. Dye enhanced cataract surgery. Anterior capsule staining for capsulorhexis in advanced/white cataract. *J Cataract Refract Surg* (2000) **26**:1052-1059.
- Pandey SK, Werner L, Wilson ME, Izak AM, Apple DJ. Anterior capsule staining. Techniques, recommendations and guidelines for surgeons. *Indian J Ophthalmol* (2002) **50**(2):157-159.
- Pavalko FM, Chen NX, Turner CH, Burr DB, Atkinson S, Hsieh YF, Qiu J, Duncan RL. Fluid shear-induced mechanical signaling in MC3T3-E1 osteoblasts requires cytoskeleton-integrin interactions. *Am J Physiol* (1998) **275**(6 Pt 1):C1591-C1601.
- Pegg DE. In vitro assessment of cell viability in human bone marrow preserved at -79 C. *J Appl Physiol* (1964) **19**(1):123-126.
- Peng Q, Apple DJ, Visessook N, Werner L, Pandey SK, Escobar-Gomez M, Schoderbek R, Guindi A. Surgical prevention of posterior capsule opacification. Part II. Enhancement

- of cortical clean up by focusing on hydrodissection. *J Cataract Refract Surg* (2000a) **26**:188-197.
- Peng Q, Visessook N, Apple DJ, Pandey SK, Werner L, Escobar-Gomez M, Schoderbek R, Solomon KD, Guindi A. Surgical prevention of posterior capsule opacification. Part III. Intraocular lens optic barrier effect as a second line of defense. *J Cataract Refract Surg* (2000b) **26**:198-213.
- Perry MM, Tassin J, Courtois YA. A comparison of human lens epithelial cells in situ and in vitro in relation to aging: an ultrastructural study. *Exp Eye Res* (1979) **28**:327-341.
- Pisciotta A, De Maria M, Verdina T, Fornasari E, de Pol A, Cavallini GM. Anterior Capsule of the Lens: Comparison of Morphological Properties and Apoptosis Induction following FLACS and Standard Phacoemulsification Surgery. *Biomed Res Int* (2018) 1:11; 2018:7242837.
- Pokroy R, Tendler Y, Pollack A, Zinder O, Weisinger G. p53 Expression in the Normal Murine Eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2002) **43**(6):1736-1741.
- Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* (1997) **389**(6648):300-305.
- Portes AL, Almeida AC, Allodi S, Monteiro ML, Miguel NC. Trypan blue staining for capsulorhexis: Ultrastructural effect on lens epithelial cells and capsules. *J Cataract Refract Surg* (2010) **36**(4):582–587.
- Radner G, Amon M, Stifter E, Nepp J, Diendorfer G, Mallinger R, Radner W. Tissue Damage at Anterior Capsule Edges After Continuous Curvilinear Capsulorhexis, High-Frequency Capsulotomy, and erbium:YAG Laser Capsulotomy. *J Cataract Refract Surg* (2004) **30**(1):67-73.
- Rafferty NS, Goossens W. Growth and aging of the lens capsule. *Growth* (1978) **42**:375-389.
- Rafferty NS. Lens morphology. In: Maisel H. editors *The Ocular Lens: Structure, Function, and Pathology*. Marcel Dekker Inc, New York (1985): 1-53.
- Raj SM, Vasavada AR, Johar SR, Vasavada VA, Vasavada VA. Post-operative capsular opacification: a review. *Int J Biomed Sci* (2007) **3**(4):237-250.
- Ram J, Apple DJ, Peng Q, Visessook N, Auffarth GU, Schoderbek RJ Jr, Ready L. Update on fixation of rigid and foldable posterior chamber intraocular lenses. Part II. Choosing the correct haptic fixation and intraocular lens design to help eradicate posterior capsule opacification. *Ophthalmology* (1999) 106:891-900.

- Ratkay-Traub I, Juhasz T, Horvath C, Suarez C, Kiss K, Ferincz I, Kurtz R. Ultra-short pulse (femtosecond) laser surgery: initial use in LASIK flap creation. *Ophthalmol Clin North Am* (2001) **14**(2):347-355.
- Ravalico G, Tognetto D, Palomba M, Busatto P, Baccara F. Capsulorhexis size and posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* (1996) **22**(1):98–103.
- Reddy KP, Kandulla J, Auffarth GU. Effectiveness and safety of femtosecond laser – assisted lens fragmentation and anterior capsulotomy versus the manual technique in cataract surgery. *J Cataract Refract Surg* (2013) **39**(9):1297–1306.
- Reichel MB, Ali RR, D'Esposito F, Clarke AR, Luther PJ, Bhattacharya SS, Hunt MD. High frequency of persistent hyperplastic primary vitreous and cataracts in p53-deficient mice. *Cell Death Differ* (1998) **5**(2):156-162.
- Reyes Lua M, Oertle P, Camenzind L, Goz A, Meyer CH, Konieczka K, Loparic M, Halfter W, Henrich PB. Superior rim stability of the lens capsule following manual over femtosecond laser capsulotomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2016) **57**(6):2839-2849.
- Riau AK, Angunawela RI, Chaurasia SS, Lee WS, Tan DT, Mehta JS. Early Corneal Wound Healing and Inflammatory Responses after Refractive Lenticule Extraction (ReLEx). *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2011) **52**(9):6213-6221.
- Riau AK, Angunawela RI, Chaurasia SS, Lee WS, Tan DT, Mehta JS. Reversible femtosecond laser-assisted myopia correction: a non-human primate study of lenticule re-implantation after refractive lenticule extraction. *PLoS One*. (2013) **8**(6):e67058.
- Rocha KM, Randleman JB, Stulting RD. Analysis of microkeratome thin flap architecture using Fourier-domain optical coherence tomography. *J Refract Surg* (2011) **27**(10):759–763.
- Roos JC, Muir MG. Use of trypan blue for penetrating keratoplasty. *J Cataract Refract Surg* (2005) **31**(10):1867-1869.
- Rossiter J, Morris A. Trypan blue vital staining of the anterior lens capsule in the management of cataract in true exfoliation of the lens capsule. *Eye* (2005) **19**:809-810.
- Rostami J, Holmqvist S, Lindström V, Sigvardson J, Westermark GT, Ingelsson M, Bergström J, Roybon L, Erlandsson A. Human astrocytes transfer aggregated alpha-synuclein via tunneling nanotubes. *J Neurosci* (2017) **37**(49):11835-11853.
- Ruiz LA, Cepeda LM, Fuentes VC. Intrastromal correction of presbyopia using a femtosecond laser system. *J Refract Surg* (2009) **25**(10):847–854.
- Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes HH. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* (2004) **303**(5660):1007-1010.

- Saika S, Miyamoto T, Ishida I, Ohnishi Y, Ooshima A. Lens epithelial cell death after cataract surgery. *J Cataract Refract Surg* (2002) **28**:1452-1456.
- Santhiago MR, Barbosa FL, Agrawal V, Binder PS, Christie B, Wilson SE. Short-term cell death and inflammation after intracorneal inlay implantation in rabbits. *J Refract Surg* (2012) **2**; 28(2):144-149.
- Satofuka S, Nakamura K, Negishi K, Kato K, Kurosaka D, Yoshino M. Time course of lens capsule staining using trypan blue and indocyanine green: in vitro study in porcine eyes. *J Cataract Refract Surg* (2004) **30**(8):1751-154.
- Schroeter J, Rieck P. Endothelial evaluation in the cornea bank. *Dev Ophthalmol* (2009) **43**:47-62.
- Schuler M, Green DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans* (2001) **29**:684–688.
- Seland JH. Ultrastructural changes in the normal human lens capsule from birth to old age. *Acta Ophthalmol* (1974) **52**:688-706.
- Sharma B, Abell RG, Arora T, Antony T, Vajpayee RB. Techniques of anterior capsulotomy in cataract surgery. *Indian J Ophthalmol* (2019) **67**(4):450-460.
- Sharma N, Bhartiya P, Sinha R, Vajpayee RB. Trypan blue assisted phacoemulsification by residents in training. *Clin Exp Ophthalmol* (2002) **30**(5):386-387.
- Shen Y, Sun A, Wang Y, Cha D, Wang H, Wang F, Feng L, Fang S, Shen Y. Upregulation of mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor in glial cells is associated with ischemia-induced glial activation. *J Neuroinflammation* (2012) **23**(9):254.
- Shirai K, Okada Y, Saika S, Senba E, Ohnishi Y. Expression of transcription factor AP-1 in rat lens epithelial cells during wound repair. *Exp Eye Res* (2001) **73**:461-468.
- Siewert S, Schultze C, Schmidt W, Hinze U, Chichkov B, Wree A, Sternberg K, Allemann R, Guthoff R, Schmitz KP. Development of a micro mechanical valve in a novel glaucoma implant. *Biomed Microdevices* (2012) **14**(5):907–920.
- Singh AJ, Sarodia UA, Brown L, Jagjivan R and Sampath R. A histological analysis of lens capsules stained with trypan blue for capsulorrhexis in phacoemulsification cataract surgery. *Eye* (2003) **17**:567–570.
- Slade SG, Culbertson WW, Krueger RR. Femtosecond lasers for refractive cataract surgery. *Cataract Refract Surg Today* (2010) 67–73.
- Slade SG. The use of the femtosecond laser in the customization of corneal flaps in laser in situ keratomileusis. *Curr Opin Ophthalmol* (2007) **18**(4):314–317.
- Snyder C. Aurelius Cornelius Celsus on cataracts. *Arch Ophthalmol* (1964) **71**:144–146.

- Snyder ME, Lindsell LB. Crossed-swords, capsule-pinch technique for capsulotomy in pediatric and/or loose lens cataract extraction. *J Cat Refract Surg* (2010) **36**:197-199.
- Sorkou NK, Manthou ME, Meditskou S, Ziakas N, Tsaousis K, Tsinopoulos I. Severe Abnormalities of Lens Epithelial Cells in Exfoliation Syndrome: A Transmission Electron Microscopy Study of Patients With Age-Related Catarac. *Medicina (Kaunas)* (2019) **55**(6):235.
- Spemann H. Über Organisatoren in der tierischen Entwicklung. *Naturwissenschaften* (1924) **48**:1092-1094.
- Stahl JE, Durrie DS, Schwendeman FJ, Boghossian AJ. Anterior segment OCT analysis of thin IntraLase femtosecond flaps. *J Refract Surg* (2007) **23**(6):555–558.
- Stein R and Stein R. Femtosecond Laser Cataract Surgery: Improving Precision, Improving Results. *Ophthalmology Rounds* (2013) **10**(1):1-8.
- Steinert RF, Fine IH. Cataract Surgery: Technique, Complications and Management. 1st ed. Philadelphia: Saunders; 1995.
- Stellar H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* (1995) **267**:1445-1449.
- Stoddart MJ. Cell viability assays: introduction. *Methods Mol Biol* (2011) **740**:1-6.
- Stonecipher K, Ignacio TS, Stonecipher M. Advances in refractive surgery: microkeratome and femtosecond laser flap creation in relation to safety, efficacy, predictability, and biomechanical stability. *Curr Opin Ophthalmol* (2006) **17**(4):368-372.
- Stulting RD, Carr JD, Thompson KP, Waring GO 3rd, Wiley WM, Walker JG. Complications of laser in situ keratomileusis for the correction of myopia. *Ophthalmology* (1999) **106**(1):13–20.
- Sugar A, Rapuano CJ, Culbertson WW, Huang D, Varley GA, Agapitos PJ, de Luise VP, Koch DD. Laser in situ keratomileusis for myopia and astigmatism: safety and efficacy: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology* (2002) **109**(1):175–187.
- Sun W, Liu J, Li J, Wu D, Wang J, Wang MW, Zhang JS, Zhao JY. Human lens epithelial cell apoptosis and epithelial to mesenchymal transition in femtosecond laser-assisted cataract surgery. *Int J Ophthalmol* (2018) **11**(3):401-407.
- Sutton G, Hodge C. Accuracy and precision of LASIK flap thickness using the IntraLase femtosecond laser in 1000 consecutive cases. *J Refract Surg* (2008) **24**(8):802–806.
- Suzuki H, Shiwa T, Oharazawa H, Takahashi H. Usefulness of a semicircular capsulotomy marker. *J Nippon Med Sch* (2012) **79**(3):195–197.

- Suzuki S, Sagara H, Senoo T. Developmental factors of fibrous opacification in the atopic cataract lens capsule. *Ophthalmic Res* (2011) **45**(4):216-220.
- Süveges Ildikó. Szemészet (2010). Medicina Könyvkiadó Zrt.
- Szeberényi József. Molekuláris sejtbológia (2011). Dialóg Campus Kiadó.
- Szigeti A, Kránitz K, Takacs AI, Miháltz K, Knorz MC, Nagy ZZ. Comparison of long-term visual outcome and IOL position with a single-optic accommodating IOL After 5.5- or 6.0-mm Femtosecond laser capsulotomy. *J Refract Surg* (2012) **28**(9):609-613.
- Takács AI, Kovács I, Miháltz K, Filkorn T, Knorz MC, Nagy ZZ. Central corneal volume and endothelial cell count following femtosecond Laser-assisted refractive cataract surgery compared to conventional phacoemulsification. *J Refract Surg* (2012) **28**(6):387-392.
- Takamura Y, Kubo E, Tsuzuki S, Akagi Y. Apoptotic cell death in the lens epithelium of rat sugar cataract. *Exp Eye Res* (2003) **77**(1):51–57.
- Takamura Y, Sugimoto Y, Kubo E, Takahashi Y, Akagi Y. Immunohistochemical Study of Apoptosis of Lens Epithelial Cells in Human and Diabetic Rat Cataracts. *Jpn J Ophthalmol* (2001) **45**(6):559–563.
- Talamo JH, Meltzer J, Gardner J. Reproducibility of flap thickness with IntraLase FS and Moria LSK-1 and M2 microkeratomes. *J Refract Surg* (2006) **22**(6):556–561.
- Tassignon MJ, Rozema JJ, Gobin L. Ring-shaped caliper for better anterior capsulorrhexis sizing and centration. *J Cataract Refract Surg* (2006) **32**(8):1253–1255.
- Taylor VL, Al-Ghoul KJ, Lane CW, Davis VA, Kuszak JR, and Costello MJ. Morphology of the Normal Human Lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (1996) **37**:1396-1410.
- Tennant JR. Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. *Transplantation* (1964) **2**(11):685-694.
- Tognetto D, Giacinto CD, Perrotta AA, Candian T, Bova A, Rinaldi S and Turco G. Scanning electron microscopy analysis of the anterior capsulotomy edge: a comparative study between femtosecond laser-assisted capsulotomy and manual cupsulorhexis. *J Ophthalmol* (2018) 8620150.
- Toto L, Calienno R, Curcio C, Mattei PA, Mastropasqua A, Lanzini M, Mastropasqua L. Induced inflammation and apoptosis in femtosecond laser-assisted capsulotomies and manual capsulorhexes: an immunohistochemical study. *J Refract Surg* (2015) **31**(5):290-294.
- Unlü K, Askünger A, Söker S, Kiliñç N, Karaca C, Erdinc M. Gentian violet solution for staining the anterior capsule. *J Cataract Refract Surg* (2000) **26**(8):1228-1232.

- Ursell PG, Spalton DJ, Pande MV, Hollick EJ, Barman S, Boyce J, Tilling K. Relationship between intraocular lens biomaterials and posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* (1998) **24**(3):352–360.
- Vajpayee RB, Angra SK, Honavar SG, Katoch S, Prasad N, Bansal A, Anand J. Capsulotomy for phacoemulsification in hypermature cataracts. *J Cataract Refract Surg* (1995) **21**:612-615.
- Vargas LG, Izak AM, Apple DJ, Werner L, Pandey SK, Trivedi RH. Single Piece AcrySof Implantation of a single-piece, hydrophilic, acrylic, minus-power foldable posterior chamber intraocular lens in a rabbit model: clinicopathologic study of posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg* (2003) **29**:1613-1620.
- Vargas LG, Peng Q, Apple DJ, Escobar-Gomez M, Pandey SK, Arthur SN, Hoddinott DS, Schmidbauer JM. Evaluation of 3 modern single-piece foldable intraocular lenses: clinicopathological study of posterior capsule opacification in a rabbit model. *J Cataract Refract Surg* (2002) **28**:1241-1250.
- Veckeneer M, Overdam K, Monzer J, Kobuch K, Marle W, Spekreijse H, Meurs J. Ocular toxicity study of trypan blue injected into the vitreous cavity of rabbit eyes. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* (2001) **239**(9):698-704.
- Verdina T, Peppoloni C, Barbieri L, Carbotti MR, Battaglia B, Mastropasqua R, Cavallini GM. Long-Term Evaluation of Capsulotomy Shape and Posterior Capsule Opacification after Low-Energy Bimanual Femtosecond Laser-Assisted Cataract Surgery. *J Ophthalmol* (2020) **9**:23; 2020:6431314.
- Von Sallmann L, Grimes PA, Albert DM. Histogenesis of the lens capsule in tissue culture. *Am J Ophthalmol* (1969) **68**:435-438.
- Wallace RB 3rd. Capsulotomy diameter mark. *J Cataract Refract Surg* (2003) **29**(10):1866–1868.
- Watts LT, Rathinam ML, Sshenker S and Henderson GI. Astrocytes protect neurons from ethanol-induced oxidative stress and apoptotic death. *J of Neurosc Res* (2005) **80**:655-666.
- Weber GF, Menko AS. Actin filament organization regulates the induction of lens cell differentiation and survival. *Dev Biol* (2006) **295**(2):714-729.
- Werner L, Jia G, Sussman G, Maddula S, Ness P, Davis D, Burrow M, Mamalis N. Mechanized model to assess capsulorhexis resistance to tearing. *J Cat Refract Surg* (2010) **36**: 1954–1959.

- Wertheimer C, Liegl R, Kernt M, Docheva D, Kampik A, Eibl-Lindner KH. EGFR-blockade with erlotinib reduces EGF and TGF- β 2 expression and the actin-cytoskeleton which influences different aspects of cellular migration in lens epithelial cells. *Curr Eye Res* (2014) **39**(10):1000-1012.
- Williams GP, George BL, Wong YR, Yam GHF, Ang M, Tay SC, Mehta JS. Performing reliable lens capsulotomy in the presence of corneal edema with a femtosecond laser. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2017) **58**(11):4490–4498.
- Wistow G, Bernstein SL, Wyatt MK, Behal A, Touchman JW, Bouffard G, Smith D, Peterson K. Expressed sequence tag analysis of adult human lens for the NEIBank Project: over 2000 non-redundant transcripts, novel genes and splice variants. *Mol Vis* (2002) **8**:171-184.
- Wollensak G, Spörl E, Pham DT. Biomechanical changes in the anterior lens capsule after trypan blue staining. *J Cataract Refract Surg* (2004) **30**(7):1526–1530.
- Wormstone IM, Tamiya S, Anderson I, Duncan G. TGF- β 2-induced matrix modification and cell transdifferentiation in the human lens capsular bag. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2002) **43**(7):2301-2308.
- Xue LP, Ding P, Xiao LB, Hu M, Hu ZL. Nestin, a new marker, expressed in Müller cells following retinal injury. *Can J Neurol Sci* (2010) **37**(5):643-649.
- Yamamoto N, Ozaki N, Murakami K. Trypan-blue- and endoillumination-assisted phacoemulsification in eyes with vitreous hemorrhage during combined cataract and vitreous surgery. *Ophthalmologica* (2005) **219**(6):338-344.
- Yao J, Yang W, Liu Y, Sun YX, Jiang Q. Dexamethasone inhibits TGF- β 2-induced migration of human lens epithelial cells: implications for posterior capsule opacification prevention. *Mol Med Rep* (2012) **5**(6):1509-1513.
- Yeilding RH, Villar-Kuri J, Naranjo-Tackman R. Evaluation of size and shape of anterior lens capsules after photodisruption laser capsulotomy and continuous curvilinear capsulorrhexis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2009) **50**: E-Abstract1145.
- Yetik H, Devranoglu K, Ozkan S. Determining the lowest trypan blue concentration that satisfactorily stains the anterior capsule. *J Cataract Refract Surg* (2002) **28**(6):988-991.
- Yoo SH, Kymionis GD, Ide T, Diakonis VF. Overcorrection after femtosecond assisted astigmatic keratotomy in a post-Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty patient. *J Cataract Refractive Surg* (2009) **35**(10):1833–1834.
- Young RW, Ocumpaugh DE. Autoradiographic studies on the growth and development of the lens capsule in the rat. *Invest Ophthalmol* (1966) **5**:583-593.

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

KONFERENCIA MEGJELENÉSEK JEGYZÉKE

1. Sükösd Andrea Krisztina, Rapp Judit, Feller Diána, Pongrácz Judit, Kerek Andrea, Gáspár Beáta, Biró Zsolt - Eltérő génexpresszió vizsgálata humán elülső lencsetok reziduális epithel sejtjeiben manuális és femtosecond lézeres capsulorhexis után – FEPS (Federation of European Physiological Societies), 2014, Augusztus 27-30, Budapest, Magyarország
2. Sükösd Andrea Krisztina, Biró Zsolt - A lencsetok elülső falának ultrastruktúrája veleszületett és idős kori szürkehályog esetén – MSZT (Magyar Szemorvos Társaság), 2014, Június 26-28, Pécs, Magyarország
3. Szabadfi Krisztina, Sükösd Andrea, Pintér Erika, Biró Zsolt, Gábel Róbert - Patológiás human retina minták kísérletes feldolgozása: struktúrális analízis - MSZT (Magyar Szemorvos Társaság), 2014, Június 26-28, Pécs, Magyarország
4. Lantos Krisztina, Sükösd Andrea, Pusztai Ágota, Gaál Valéria - Retinoblastoma - szemléletváltás határán - MSZT (Magyar Szemorvos Társaság), 2014, Június 26-28, Pécs, Magyarország
5. Sükösd Andrea Krisztina, Rapp Judit, Feller Diána, Pongrácz Judit, Kerek Andrea, Gáspár Beáta, Biró Zsolt - Eltérő génexpresszió vizsgálata humán elülső lencsetok reziduális epithel sejtjeiben manuális és femtosecond lézeres capsulorhexis után – HMAA (Hungarian Medical Association), 2014, Augusztus 22-23, Balatonfüred, Magyarország
6. Sükösd Andrea Krisztina, Szabadfi Krisztina, Szabó-Meleg Edina, Kerek Andrea, Gáspár Beáta, Palotás Csilla, Kovács Orsolya, Nyitrai Miklós, Gábel Róbert, Ábrahám Hajnalka, Biró Zsolt - Elülső lencsetok epithel-sejtjeiben lezajló citoskeletális változások vizsgálata manuális és femtoszekundum lézeres capsulorhexis után – IDK (IV. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia), 2015, Május 14-15, Pécs, Magyarország
7. Sükösd Andrea Krisztina, Szabadfi Krisztina, Szabó-Meleg Edina, Kerek Andrea, Gáspár Beáta, Palotás Csilla, Kovács Orsolya, Nyitrai Miklós, Gábel Róbert, Ábrahám Hajnalka, Biró Zsolt. Elülső lencsetok epithel-sejtjeiben lezajló citoskeletális változások vizsgálata manuális és femtoszekundum lézeres capsulorhexis után – IDK Conference Book (2015): 235-244

8. Sükösd Andrea Krisztina, Szabadfi Krisztina, Szabó-Meleg Edina, Kerek Andrea, Gáspár Beáta, Palotás Csilla, Kovács Orsolya, Ábrahám Hajnalka, Nyitrai Miklós, Gábrriel Róbert, Biró Zsolt - Műtéti stressz és citoskeletális változások vizsgálata elülső lencsetok epitelsejtjeiben manuális és femtoszekundum lézeres capsulorhexis után - MSZT (Magyar Szemorvos Társaság), 2015, Június 18-20, Pécs, Magyarország
9. Sükösd Andrea Krisztina, Rapp Judit, Feller Diána, Kerek Andrea, Gáspár Beáta, Palotás Csilla, Kovács Orsolya, Ábrahám Hajnalka, Pongrácz E. Judit, Biró Zsolt - Lencsetok epitél - sejtpusztulás vizsgálata manuális és femtoszekundum lézeres capsulorhexis után– SHIOL (Societas Hungarica ad Amplantandam Oculi Lenticulam), 2015, Március 19-21, Balatonalmádi, Magyarország
10. Sükösd Andrea Krisztina, Rapp Judit, Feller Diána, Kerek Andrea, Gáspár Beáta, Palotás Csilla, Kovács Orsolya, Ábrahám Hajnalka, Pongrácz E. Judit, Biró Zsolt - Elülső szemlencsetok epitél sejtpusztulás vizsgálata – TSZK (Tavaszi Szél Konferencia), 2015, Április 10-12, Eger, Magyarország
11. Zsolt Biró, Andrea Krisztina Sükösd, Krisztina Szabadfi, Edina Szabó-Meleg, Andrea Kerek, Beáta Gáspár, Csilla Palotás, Orsolya Kovács, Hajnalka Ábrahám, Miklós Nyitrai, Róbert Gábrriel - Examination of surgical stress and cytoskeletal changes in anterior lens capsule epithelial cells following manual and femtosecond laser-assisted capsulorhexis – WOC (World Ophthalmology Congress of the International Council of Ophthalmology), 2016, Február 5-9, Guadalajara, Mexikó
12. Sükösd Andrea Krisztina, Feller Diána, Rapp Judit, Kerek Andrea, Gáspár Beáta, Palotás Csilla, Kovács Orsolya, Pongrácz E. Judit, Ábrahám Hajnalka, Biró Zsolt - Eltérő génexpresszió vizsgálata manuális és femtoszekundum lézeres capsulorhexis után az elülső lencsetok epithelsejtjein - DKK17 (Doktoranduszok a Klinikai Kutatásban), 2017, október 28, Pécs, Magyarország
13. Sükösd Andrea Krisztina, Bálint András, Szabó Ilona, Biró Zsolt - Vasoproliferatív tumorok differenciál diagnosztikai nehézségei - MSZT (Magyar Szemorvos Társaság), 2018, május 31-június 2, Szeged, Magyarország

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), az EFOP-3.6.1-16-2016-00004 projekt, az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009, 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, és a GINOP-2.3.2-15-2016-00036 támogatta.

Doktori értekezés benyújtása és nyilatkozat a dolgozat eredetiségéről

Alulírott

név: Lombosné Dr. Sükösd Andrea Krisztina

születési név: Sükösd Andrea Krisztina

anyja neve: Bálint Eszter

születési hely, idő: Székelyudvarhely, 1987.07.07

Manuális és femtoszekundumos lézerrel végzett capsulotomiával eltávolított lencsetok szövet vizsgálata

című doktori értekezésemet a mai napon benyújtom a(z)

Klinikai Idegtudományi (D221) Doktori Iskola

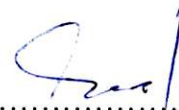
Klinikai neuro-immunológiai és stroke (B-1/2005) Programjához.

Témavezető neve: **Prof. Dr. Biró Zsolt, Dr. Ábrahám Hajnalka**

Egyúttal nyilatkozom, hogy jelen eljárás során benyújtott doktori értekezésemet

- korábban más doktori iskolába (sem hazai, sem külföldi egyetemen) nem nyújtottam be,
- fokozatszerzési eljárásra jelentkezésemet két éven belül nem utasították el,
- az elmúlt két esztendőben nem volt sikertelen doktori eljárásom,
- öt éven belül doktori fokozatom visszavonására nem került sor,
- értekezésem önálló munka, más szellemi alkotását sajátomként nem mutattam be, az irodalmi hivatkozások egyértelműek és teljeseek, az értekezés elkészítésénél hamis vagy hamisított adatokat nem használtam.

Dátum: 2021.07.23



.....
doktorjelölt aláírása

Cell death and survival following manual and femtosecond laser-assisted capsulotomy in age-related cataract

Andrea Krisztina Sükösd¹, Judit Rapp^{2,3}, Diána Feller^{2,3}, György Sétáló Jr^{3,4}, Beáta Gáspár⁵, Judit E. Pongrácz^{2,3}, Hajnalka Ábrahám⁴, Zsolt Biró^{1,5}

¹Department of Ophthalmology, the University of Pécs Medical School and Clinical Centre, Pécs 7623, Hungary

²Department of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, the University of Pécs, Pécs 7624, Hungary

³János Szentágothai Research Centre of the University of Pécs, Pécs 7624, Hungary

⁴Department of Medical Biology and Central Electron Microscopic Laboratory, the University of Pécs Medical School, Pécs 7624, Hungary

⁵Optimum Laser Centre, Budapest 1124, Hungary

Correspondence to: Zsolt Biró. Departments of Ophthalmology, Clinical Centre, University of Pécs Medical School, Rákóczi út 2, Pécs 7623, Hungary. biro.zsolt@pte.hu

Received: 2018-01-31 Accepted: 2018-07-12

Abstract

• **AIM:** To study molecular and morphological changes in lens epithelial cells following femtosecond laser-assisted and manually performed continuous curvilinear capsulotomy (CCC) in order to get information about these methods regarding their potential role in the induction of development of secondary cataract.

• **METHODS:** Anterior lens capsules (ALC) were removed from 40 patients with age-related cataract by manual CCC and by femtosecond laser-assisted capsulotomy (FLAC). Samples removed by manual CCC were assorted in group 1, FLAC samples were classified in group 2. Morphology of lens epithelial cells was examined with light and electron microscopes. Following capsulotomy, expressions of p53, Bcl-2 and cyclin D1 genes were analyzed with reverse transcriptase polymerase chain reaction. Immunohistochemistry was used to detect the pro-apoptotic p53 in the epithelial cells.

• **RESULTS:** Light and electron microscopic examination showed that ALC of group 1 contained more degenerating cells following manual CCC than after FLAC. The expression level of p53 was higher after manual than laser-assisted surgery. Immunocytochemistry indicated significantly higher number of cells containing p53 protein in the manual CCC group than following FLAC. Bcl-2 and cyclin D1 gene expression levels were slightly lower following manual CCC than after FLAC, but the difference was not significant.

• **CONCLUSION:** Manually removed ALC shows slightly, but not significantly larger damage due to the mechanical stretching and pulling of the capsule than those removed using FLAC.

• **KEYWORDS:** capsulotomy; capsulorhexis; femtosecond laser; immunohistology; ultrastructure; gene expression

DOI:10.18240/ijo.2018.09.02

Citation: Sükösd AK, Rapp J, Feller D, Sétáló Gy Jr, Gáspár B, Pongrácz JE, Ábrahám H, Biró Zs. Cell death and survival following manual and femtosecond laser-assisted capsulotomy in age-related cataract. *Int J Ophthalmol* 2018;11(9):1440-1446

INTRODUCTION

Cataract is a common, multifactorial, age-related pathology with a high incidence among elderly people. Since the development of phacoemulsification, cataract surgery has undergone major improvements. From 2009, laser-assisted anterior capsulotomy with femtosecond laser system is also used. Initially from 2001, this technology dramatically changed the refractive surgery and it was widely used in the laser *in situ* keratomileusis^[1-2]. Today, the goal of cataract surgery is to achieve near emmetropia. Femtosecond laser technology can deliver remarkable gains in reproducibility, centration, and safety in cataract surgery^[3-6]. Regarding the incidence of posterior capsule opacification which is the most common postoperative complication following capsulotomy, results of different studies are contradictory. Investigations showed that laser-assisted surgery is not significantly better than manual capsulotomy, while others warn that femtosecond laser could increase the risk of this novel postoperative complication^[7-11]. Secondary cataract develops by the migration and proliferation of residual lens epithelial cells after extracapsular cataract extraction. These residual lens epithelial cells become immature cells, and in addition to their proliferating ability, they undergo a large increase in cell volume. In the absence of normal lens architecture, these enlarged cells can take on a globular shape. The presence of crystallin-rich Elschnig pearls at the rear of the lens capsule interferes with vision due to light scattering^[12].

A number of clinical studies focus on the cut surface, on the intraocular lens decentration parameters, or on the continuous

Table 1 Summary of the numbers of anterior lens capsule and the methods used in this study

Methods	No. of laser assisted samples	No. of manual performed samples
Immunohisto-chemistry (whole mount)	n=6	n=4
RT-PCR	n=5	n=5
Light microscopy	n=7	n=8
Electron microscopy	n=1	n=4

RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction.

curvilinear capsulorhexis (CCC) parameters that effect intraocular lens centration when manual or laser assisted methods are compared^[13-15]. Little is known about the changes of the lens epithelial cells following capsulotomy using the two different methods. According to Mayer *et al*^[16], epithelial cells on the cutting surface of the removed anterior lens capsule (ALC) are affected differently when femtosecond laser-assisted capsulotomy (FLAC) and manual capsulotomy (manual CCC) were performed. Detection of apoptotic epithelial cells at the cut surface of the capsule with the TUNEL method indicated that more cells have undergone apoptosis using FLAC when compared to manual CCC^[16].

In addition to the cells on the cut edge of the removed ALC, cells locating medially of the cutting may also be affected by the surgery. The deleterious effect of the mechanical damage on epithelial cells due to surgery, and its consequence on the increased cell proliferation rate was also observed in other organs^[17].

It is plausible that the mechanical damage caused by the removal of the ALC may induce the formation of secondary cataract through the dedifferentiation and increased proliferation rate of the residual epithelial cells. We hypothesize that the damage caused by FLAC and manual CCC can be different. However, the effect of these surgical methods on residual epithelial cells cannot be directly examined in human. Alternatively, study of the epithelial cells of the removed ALC is a useful method to get information about the changes that occur in the residual epithelial cells. Therefore, in this work light microscopic and ultrastructural morphological alterations were detected in the epithelial cells of the removed ALC. In addition, expression of genes coding proteins related to cell proliferation (cyclin D1) and apoptosis, such as pro-apoptotic p53 and anti-apoptotic Bcl-2 were studied.

SUBJECTS AND METHODS

Patients Samples of ALC (n=40) were taken during routine manual CCC and FLAC (VICTUS[®] Femtosecond Laser, Bausch+Lomb's, USA) with the following parameters: energy, 7.2 μJ; spot spacing, 6 μm; path spacing, 4 μm; time, 400-550 femtoseconds. In all cases we obtained written consent of the patients for further examination of the lens capsule. Investigations were carried out according to procedures approved by the Institutional Ethics Committee (University of Pécs 5426, Hungary). Manually removed ALC were assorted

in group 1 (n=21), while FLAC samples were classified in group 2 (n=19). Our inclusion criteria were the following: all patients with cataract, independent of gender and age. Table 1 summarizes the number of ALC and the methods used in this study.

Examination of Morphology

Immunohistochemistry After removal, ALC were immersed in fixative containing 4% paraformaldehyde. Expression of p53 was detected on whole mount preparation with immunohistochemistry using primary antibody against p53 protein (rabbit polyclonal antibody, 1:50, Santa Cruz Biotechnology, USA), while the secondary antibody was fluorophore-conjugated (Alexa Fluor[®] 488, 1:100, Life Technologies, Budapest, Hungary). Nuclear staining was performed with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 1:1000, Sigma, Budapest, Hungary), and tissues were coverslipped with Fluoromount-G (Southern Biotech, USA). For control experiments, primary antibody was omitted, and cross-reactivity of the non-corresponding secondary antibody with the primary was also checked. Photographs were taken digitally with a Fluoview FV-1000 Laser Confocal Scanning Microscope (Olympus, Japan).

Transmission electron microscopy The lens capsules were fixed in a buffered solution (phosphate buffer 0.1 mol/L, pH=7.4) of 2% formaldehyde and 2.5% glutaraldehyde for 24h at 4°C. Specimens were post-fixed with 1% osmium tetroxide diluted in phosphate buffer for 30min at room temperature. Following dehydration with ethyl-alcohol, samples were washed and placed in propylene oxide and then embedded in Durcupan resin (Sigma, Budapest, Hungary). Semithin sections were stained with toluidine-blue and examined with light microscope. Ultrathin sections were placed on mesh grids, and contrasted using solutions of lead-citrate and uranyl-acetate and examined in a JEOL JEM 1200EX transmission electron microscope (TEM). Photographs were taken digitally with the iTEM software (Olympus, Japan).

Gene Expression Analyses Using Real-time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction After removal, ALC were immersed into SAGM[™] cell culture medium (Lonza, Basel, Switzerland) that contains all the ingredients that are necessary for the survival of human epithelial cells. From ALC total mRNA was isolated using NucleoSpin RNA Kit (Macherey-Nagel) within 24h following removal.

Table 2 The primers used in reverse transcription polymerase chain reaction

Target gene	Primer name	Sequence	Product length
ACTB	β -actin2-F	GCGCGGCTACAGCTTCA	56
	β -actin2-R	CTTAATGTCACGCACGATTTCC	56
CCND1	CyclinD1-F	AACTACCTGGACCGCTTCTCT	204
	CyclinD1-R	CCACTTGAGCTTGTTACCA	204
Human IL8	IL8-F	CAGTTTGGCCAAGGAGTGCTA	208
	IL8-R	AACTTCTCCACAACCCTCTGC	208
Human IL6	IL6-F	AGGGCTCTTCGGCAAATGTA	62
	IL6-R	GAAGGAATGCCCATTAACAACAA	62
Human Bcl-2	Bcl-2-F	CATCTCATGCCAAGGGGGAA	72
	Bcl-2-R	ATTCTTGACGAGGGGGTGT	72
Human p53	p53-F	CGCTTCGAGATGTTCCGAGA	102
	p53-R	CTTCAGGTGGCTGGAGTGAG	102

p53: p53 tumor suppressor protein; ACTB: Human beta-actin protein coding gene; CCND1: Human cyclin D1 protein coding gene; IL: Interleukin; Bcl-2: Human Bcl-2 apoptosis regulator protein.

cDNA was synthesized using High Capacity cDNA Kit (Life Technologies, Budapest, Hungary). Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed using a StepOnePlus™ and Real Time PCR System (Life Technologies, Budapest, Hungary) to quantify the PCR product once per cycle. Reaction consisted of 1 μ L of each primer (in a final concentration of 500-500 nmol/L), 10 μ L 2 \times SensiFAST SYBR Hi-ROX master mix (Bioline Reagents Ltd., USA) in a 20 μ L final volume. The following pairs of primers were used: p53, Bcl-2, cyclin D1 (Table 2). Relative product quantities were determined using StepOne Software and the Livak analysis method. β -actin was used as endogenous control.

Quantification of Data and Statistical Analysis Expression of the genes were measured using RT-PCR analysis in both group and relative expression were compared to β -actin. Quantification and melting curve analysis were performed using StepOnePlus™ and Real Time PCR quantification software 4.1.

Degenerating cell number was determined on toluidine-blue-stained semithin sections in both groups, using light microscope (40 \times magnification). All the cells and those with degenerating morphology along the removed ALC were counted and the percentage of cells with degenerating morphology was determined.

DAPI stained and the p53-immunoreactive cells were counted separately on the entire thickness of the whole mount preparation in both groups (ten pictures were taken from every sample). The percentage of anterior lens epithelial cells expressing p53 protein was determined. Data were presented as mean \pm standard error of measurement (SEM), and statistical significance was set using Student *t*-test analysis.

RESULTS

Examination of toluidine blue-stained sections of the ALC

using light microscopy clearly showed two types of cells in both groups. One of these was a cell with normal, light staining of the nucleus and cytoplasm (Figure 1A, 1C). These cells were normal appearing cuboidal epithelial cells with round nuclei, and we could see apparently well-preserved junctions between the neighboring cells and between the cells and the capsule (Figure 1C). The other cell type was characterized by a darker staining in both the nucleus and the cytoplasm (Figure 1D, 1E). In many cases, loss of the cuboidal shape of lens epithelial cells and the shrinkage of the cytoplasm were seen (Figure 1B). In addition, detachment of the lens epithelial cells from the capsule was observed (arrow on Figure 1E). Shrunken dark cells frequently contained vacuoles in their cytoplasm (Figure 1D), indicating the presence of swollen intracellular organelles. These morphological characteristics indicate severe cell damage. ALC removed by manual CCC and with FLAC contained epithelial cells with both normal and damaged morphology indicating that both methods induce certain level of cell damage. Apparently, more damaged (darker, shrunken) cells were seen in the ALC removed by manual CCC than after FLAC.

In order to get more accurate information about the morphological differences caused by manual CCC and FLAC, we performed TEM. In the manually removed ALC, severe morphological alterations of the nuclei were observed. In contrast to the round nuclei of the control ALC that mostly could be observed in group 2 (Figure 2A), the shape of the nuclei in group 1 were irregular due to shrinkage, while the nuclear membrane remained intact (Figure 2B). Regarding the cytoplasm, difference could be seen between the cells of groups 1 and 2. In group 2, most of the cells contained well-preserved organelles in the relatively light cytoplasm (Figure 2A, 2C, 2E), while in group 1, electron dense cytoplasm contained shrunken organelles (Figure 2B, 2D). Due to the shrinkage of the cells,

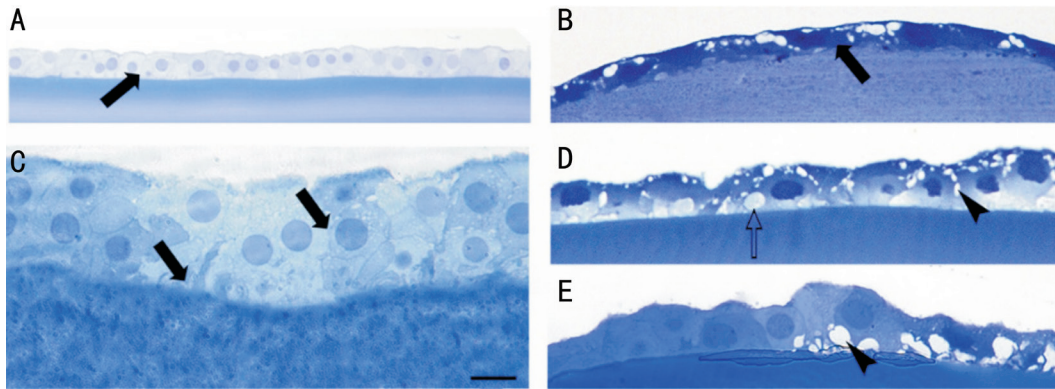


Figure 1 Light microscopic photos (toluidine blue staining) showing morphological alterations on semithin sections due to manual CCC (B, D, E) and FLAC (A, C). Cuboidal epithelial cells with round nuclei and light cytoplasm (arrows in A and C) were present in large numbers after FLAC; Following manual CCC, many cells showed degenerative signs (B-E), they became flat and darker (arrow in B) with empty spaces (arrowhead) and cytoplasmic vacuoles (open arrows) could be seen. Scale bar: 30 μ m (A), 10 μ m (C) and 15 μ m (B, D, E).

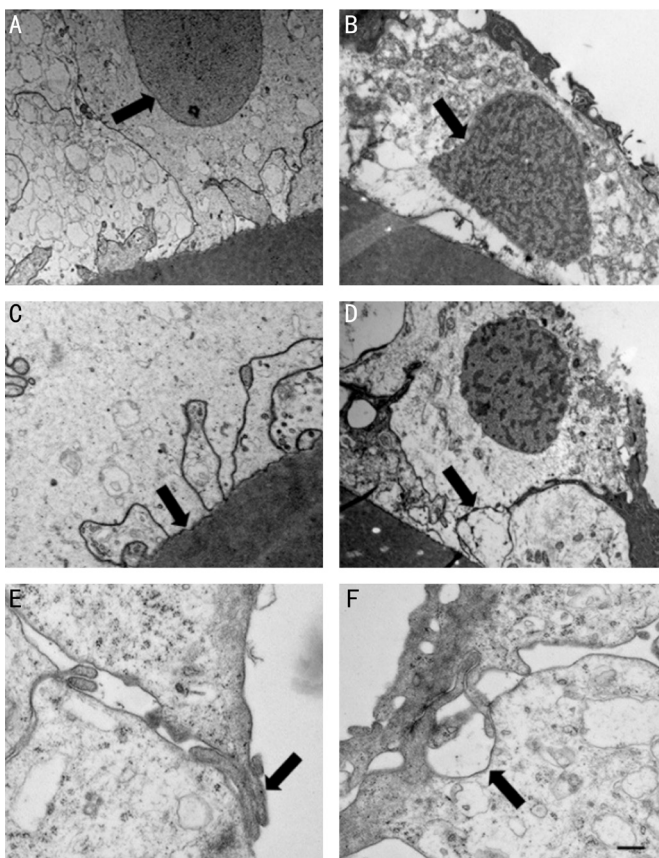


Figure 2 Electron micrographs of epithelial cells after FLAC (A, C, E) and manual CCC (B, D, F). A: Light cytoplasm of a cell with a round nucleus (arrow); B: Shrunken nucleus (arrow) with an irregular but apparently intact nuclear envelop; C, D: Basal surface of the epithelial cells are attached to the capsule (arrow); E, F: Overlapping cytoplasmic processes of the apical surfaces of the cells form junctions (arrow in E). Arrow (D) points to a gap between the two cells formed after manual CCC. Scale bar: 1000 nm (A, B, D) and 250 nm (C, E, F).

that is frequently observed in group 1, disruption of cell-cell and cell-extracellular matrix junctions was observed. In contrast to the well-preserved, control-like junctions between epithelial cells of group 2 (Figure 2E), separation of cells by

large gaps between them could be seen in group 1 (Figure 2F). Even the apparently preserved junctions on the apical part of the cells by overlapping processes revealed abnormality. Many junctions were formed by processes of cells with dark cytoplasm, indicating that the junction is formed by damaged cells.

Quantification of the rate of cells with degenerative profiles was performed on the whole ALC on semithin sections. We have found that in the manual CCC specimens 85.39% of the cells presented degenerative signs, in the FLAC only 77.82%, however, the difference between the two groups was not statistically significant. Based on the detected morphological changes, we assumed that apoptosis is responsible for observed cell degeneration of ALC. Therefore, we performed the RT-PCR to determine the level of expression of genes playing a role in apoptotic cell death, cell proliferation and survival. Slightly lower expression of cyclin D1 was detected following manual CCC compared to FLAC but the difference was not significant. Anti-apoptotic Bcl-2 expression levels were reduced in the manual CCC group compared to FLAC. In harmony with this, we have found an increased level of pro-apoptotic p53 mRNA in the manual CCC specimens compared to those removed using FLAC (Figure 3), although the difference was not statistically significant.

Therefore, we performed immunohistochemistry on whole mount preparation to detect p53 protein. In both groups we detected intense staining of the epithelial cells in the peripheral area of the ALC (Figure 4A, 4B), which gradually became weaker towards the central area. Following manual CCC, 48.5% of the cells showed immunoreactivity to p53. In contrast, in case of FLAC, p53 reactivity was present only in 31.42% of the cells, and the difference between the two groups was significant ($P=0.019$).

DISCUSSION

The goal of our study is to compare morphological and molecular changes induced during manual CCC and FLAC in

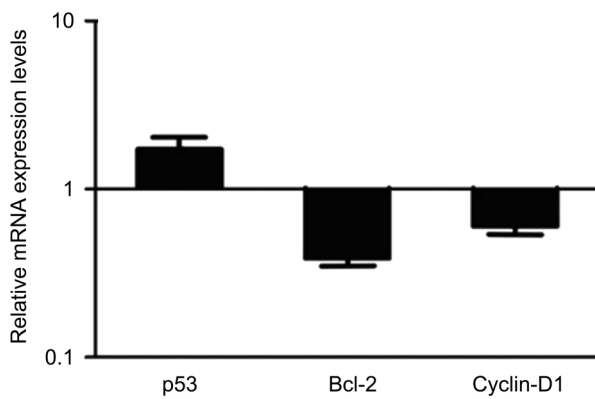


Figure 3 mRNA expression levels of various genes related to apoptosis and cell survival detected with qRT-PCR mRNA of p53, Bcl-2 and cyclin D1 genes in epithelial cells of ALC in manual CCC compared to that of cells after FLAC. The horizontal lines indicate the expression levels of genes following FLAC.

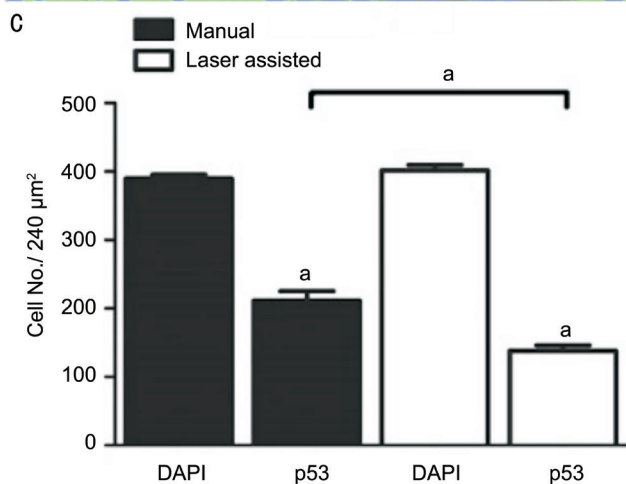
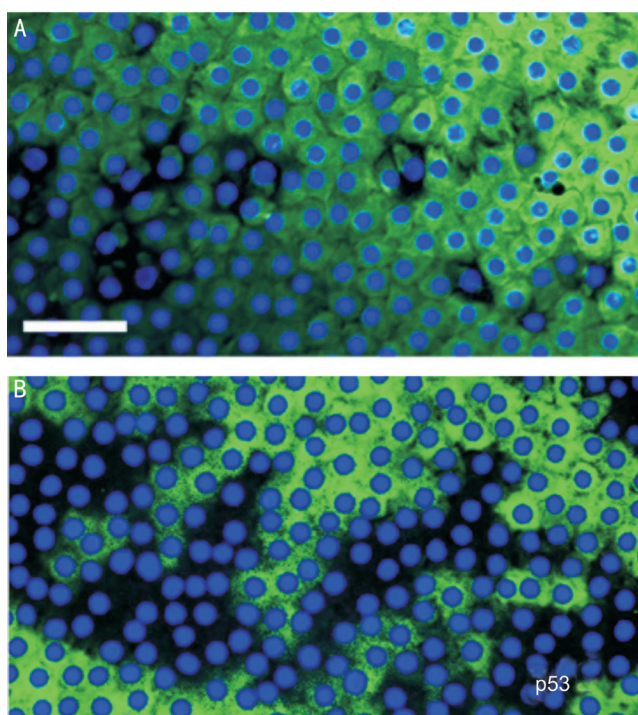


Figure 4 Photomicrographs showing p53 detected in epithelial cells using immunohistochemistry following manual CCC (A) and FLAC (B). Quantification of data on preparations shows that p53 positive cell number was higher following manual CCC than after FLAC (C) Scale bar: 50 μm; ^aStatistically significant.

order to obtain information about the potential effect of these methods in the formation of posterior capsule opacification. In addition to the light and electron microscopic signs of ALC cells' damage, we measured the expression level of the several genes playing a role in cell death and survival.

Morphological examination and quantification of cells with degenerating morphology revealed that manual CCC induces stronger cell damage than FLAC. The majority of cells with the signs of degeneration clearly showed the morphological features of apoptosis, such as the shrinkage and darker staining of the cytoplasm and the nucleus. These light and electron microscopic notions were in harmony with our molecular biological results and the p53 immunohistochemistry.

Although the results' differences were not significant, the expression of the pro-apoptotic p53 gene expression was higher in manual CCC samples than in FLAC. The higher expression of p53 gene was accompanied by a higher level of p53 protein in the ALC epithelial cells after manual CCC than compared to that after FLAC. The p53 expression was detected in the cytoplasm and not in the nuclei of the epithelial cells, which indicates the synthesis (translation) of the p53 transcription factor and not yet it's binding to the DNA. However, we cannot exclude that a low amount of p53 protein was already present in the nucleus bound to the relevant enhancers. Previous studies have shown that epithelial cells became TUNEL positive after cataract surgery, indicating apoptosis^[16,18-20]. Two of these studies have shown lower number of apoptotic cells after manual CCC than after FLAC, and their goal was to present that cell damage depends on the energy used for the FLAC^[16,20]. Their results are apparently in contradiction with to our present observations. The explanation for this can be that being a transcription factor, p53 can induce several processes, not only apoptosis. Depending on the damage, it can stop the cell cycle or can stimulate DNA repair, and, finally, when it is not avoidable, it induces apoptosis. We can suppose that the epithelial cells of our samples were mildly affected in both groups, and this mild damage does not induce immediate apoptosis, only arrest of the cells in G1 phase of the cell cycle, or DNA repair. Since we could observe only the elevated p53 mRNA and the presence of p53 protein product in the cytoplasm most probably during its synthesis, the exact role of p53 in our samples, *e.g.* whether it induces apoptosis or repair, is not clear. Expression of another apoptosis-related gene, the anti-apoptotic Bcl-2 did not differ significantly between the two groups, although it was slightly higher following FLAC than after the manual method. Since Bcl-2 protein is downstream to p53 in the apoptotic pathway, it is plausible that the major function of p53 in ALC is not the induction of apoptosis but the arrest of the cell-cycle. In harmony with this, the cell proliferation marker cyclin D1 expression was slightly lower in manual CCC than in FLAC.

In addition, the time-window needed for the removal of the ALC plus the time that lasts until mRNA is isolated from the cells may be too short for the whole apoptotic process. However, the transcription and translation of p53 can occur. According to a study performed in rat lenses, thirty minutes after the injury the mRNAs and proteins of another transcription factor-prototypical early response gene products were already expressed^[21]. In harmony with our results, it indicates a very fast and robust change in the gene expression of ALC following capsulotomy.

In this study we detected morphological and gene expression profile changes of epithelial cells of the removed anterior capsule using two different methods for the removal, manual CCC and FLAC. We propose that similar alterations may occur during and after the surgery in the residual lens epithelial cells and the damage caused by capsule removal may induce those pathways that can trigger the epithelial-mesenchymal transformation (EMT) of residual capsular epithelial cells that eventually results in fibrosis and posterior capsule opacification^[22]. Several studies indicated the central role of transforming growth factor-beta (TGF- β) signaling in EMT of lens epithelial cells and in the formation of posterior capsular opacification^[23-27]. In addition, TGF- β is a key molecule in mechanotransduction, by which mechanical effects induce adaptive internal cellular changes in epithelial cells^[28]. This means that mechanical effects that was induced either by manual CCC or FLAC activate TGF- β , and thereby induce intracellular transduction pathways that participate in pathological reactions such as EMT. We have to emphasize that morphological and molecular changes of the posterior capsule cannot be examined in human following cataract surgery. However, it is possible to examine the changes of the anterior capsule epithelial cells following the removal of the capsule, and information of the possible changes in the posterior capsule can be deduced from the changes that were found in the removed anterior capsular cells. While previous studies examined only the cutting rim of the removed anterior capsule^[15-16,29], we used whole mount preparation that allowed us to examine, in addition to the cutting rim, the changes of those cells that are several millimeters far from the cut. With both light and electron microscope, as well as with p53 immunocytochemistry, we could detect morphological changes and alteration of protein expression in the epithelial cells that locate overall including the central area of the removed anterior capsule. We can propose that if we can see changes in cells that locate several millimeters far from the cutting rim in the removed capsule, similar remote changes can be found in those cells that remain in the lens close to its equator. We observed stronger changes in the anterior lens epithelial cells following manual CCC, most probably because of the pulling and stretching of the anterior capsule. Among these changes

disruption of cell-extracellular matrix (e.g. cell-capsule) junctions was frequently seen following manual CCC that can trigger TGF- β signaling and result in EMT of the residual epithelial cells^[30]. This indicates that the stronger deleterious effect of manual CCC may result in a slightly higher level of posterior capsule opacification in harmony with results of clinical observations^[10].

Since we detected the immediate effect of FLAC or manual CCC, the exact role and the extent of contribution of the detected molecular and morphological changes in acquiring the proliferative capacity of residual epithelial cells and the formation of posterior capsular opacification need further studies. We have to emphasize that the difference in the expression of genes related to apoptosis, cell survival and proliferation were for the most part insignificant following manual CCC and FLAC, therefore both methods appear to be fully suitable for the removal of the ALC in age-related cataract.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors appreciate the assist of surgeons and theatre nurses in sample collections, and the support of volunteers, and EFOP-3.6.1-16-2016-00004 project.

Foundation: Supported by grant EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 to University of Pécs Medical School.

Conflicts of Interest: Sükösd AK, None; Rapp J, None; Feller D, None; Sétáló GyJr, None; Gáspár B, None; Pongrácz JE, None; Ábrahám H, None; Biró Zs, None.

REFERENCES

- 1 Nagy ZZ. Intraocular femtosecond laser applications in cataract surgery. *Cataract Refract Surg Today* 2009;79-82.
- 2 Schaumberg DA, Dana MR, Christen WG, Glynn RJ. A systematic overview of the incidence of posterior capsule opacification. *Ophthalmology* 1998;105(7):1213-1221.
- 3 Kohnen T, Klapproth OK, Ostovic M, Hengerer FH, Mayer WJ. Morphological changes in the edge structures following femtosecond laser capsulotomy with varied patient interfaces and different energy settings. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2014;252(2):293-298.
- 4 Reddy KP, Kandulla J, Auffarth GU. Effectiveness and safety of femtosecond laser-assisted lens fragmentation and anterior capsulotomy versus the manual technique in cataract surgery. *J Cataract Refract Surg* 2013;39(9):1297-1306.
- 5 Abell RG, Darian-Smith E, Kan JB, Allen PL, Ewe SY, Vote BJ. Femtosecond laser-assisted cataract surgery versus standard phacoemulsification cataract surgery: outcomes and safety in more than 4000 cases at a single center. *J Cataract Refract Surg* 2015;41(1):47-52.
- 6 Grewal DS, Schultz T, Basti S, Dick HB. Femtosecond laser-assisted cataract surgery-current status and future directions. *Surv Ophthalmol* 2016;61(2):103-131.
- 7 Rostami B, Tian J, Jackson N, Karanjia R, Lu K. High rate of early posterior capsule opacification following femtosecond laser-assisted cataract surgery. *Case Rep Ophthalmol* 2016;7(3):213-217.

- 8 Ewe SY, Abell RG, Oakley CL, Lim CH, Allen PL, McPherson ZE, Rao A, Davies PE, Vote BJ. A comparative cohort study of visual outcomes in femtosecond laser-assisted versus phacoemulsification cataract surgery. *Ophthalmology* 2016;123(1):178-182.
- 9 Day AC, Gore DM, Bunce C, Evans JR. Laser-assisted cataract surgery versus standard ultrasound phacoemulsification cataract surgery. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2016;7:CD010735.
- 10 Kovács I, Kránitz K, Sándor GL, Knorz MC, Donnenfeld ED, Nuijts RM, Nagy ZZ. The effect of femtosecond laser capsulotomy on the development of posterior capsule opacification. *J Refract Surg* 2014;30(3):154-158.
- 11 Yu Y, Chen X, Hua H, Wu M, Lai K, Yao K. Comparative outcomes of femtosecond laser-assisted cataract surgery and manual phacoemulsification: a six-month follow-up. *Clin Exp Ophthalmol* 2016;44(6):472-480.
- 12 Boswell BA, Korol A, West-Mays JA, Musil LS. Dual function of TGF β in lens epithelial cell fate: implications for secondary cataract. *Mol Biol Cell* 2017;28(7):907-921.
- 13 Nagy ZZ, Kránitz K, Takacs AI, Miháltz K, Kovács I, Knorz MC. Comparison of intraocular lens decentration parameters after femtosecond and manual capsulotomies. *J Refract Surg* 2011;27(8):564-569.
- 14 Kránitz K, Takacs A, Miháltz K, Kovács I, Knorz MC, Nagy ZZ. Femtosecond laser capsulotomy and manual continuous curvilinear capsulorrhexis parameters and their effects on intraocular lens centration. *J Refract Surg* 2011;27(8):558-563.
- 15 Ostovic M, Klapproth OK, Hengerer FH, Mayer WJ, Kohnen T. Light microscopy and scanning electron microscopy analysis of rigid curved interface femtosecond laser-assisted and manual anterior capsulotomy. *J Cataract Refract Surg* 2013;39(10):1587-1592.
- 16 Mayer WJ, Klapproth OK, Ostovic M, Terfort A, Vavaleskou T, Hengerer FH, Kohnen T. Cell death and ultrastructural morphology of femtosecond laser-assisted anterior capsulotomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(2):893-898.
- 17 Simmy T, Anup R, Prabhu R, Balasubramanian KA. Effect of surgical manipulation of the rat intestine on enterocyte populations. *Surgery* 2001;130(3):479-488.
- 18 Saika S, Miyamoto T, Ishida I, Ohnishi Y, Ooshima A. Lens epithelial cell death after cataract surgery. *J Cataract Refract Surg* 2002;28(8):1452-1456.
- 19 Harocopos GJ, Alvares KM, Kolker AE, Beebe DC. Human age-related cataract and lens epithelial cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(13):2696-2706.
- 20 Toto L, Calienno R, Curcio C, Mattei PA, Mastropasqua A, Lanzini M, Mastropasqua L. Induced inflammation and apoptosis in femtosecond laser-assisted capsulotomies and manual capsulorhexes: an immunohistochemical study. *J Refract Surg* 2015;31(5):290-294.
- 21 Shirai K, Okada Y, Saika S, Senba E, Ohnishi Y. Expression of transcription factor AP-1 in rat lens epithelial cells during wound repair. *Exp Eye Res* 2001;73(4):461-468.
- 22 Marcantonio JM, Vrensen GF. Cell biology of posterior capsular opacification. *Eye (Lond)* 1999;13 (Pt 3b):484-488.
- 23 Wormstone IM, Tamiya S, Anderson I, Duncan G. TGF- β 2-induced matrix modification and cell transdifferentiation in the human lens capsular bag. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(7):2301-2308.
- 24 Suzuki S, Sagara H, Senoo T. Developmental factors of fibrous opacification in the atopic cataract lens capsule. *Ophthalmic Res* 2011;45(4):216-220.
- 25 Yao J, Yang W, Liu Y, Sun YX, Jiang Q. Dexamethasone inhibits TGF- β 2-induced migration of human lens epithelial cells: implications for posterior capsule opacification prevention. *Mol Med Rep* 2012;5(6):1509-1513.
- 26 Wertheimer C, Liegl R, Kernt M, Docheva D, Kampik A, Eibl-Lindner KH. EGFR-blockade with erlotinib reduces EGF and TGF- β 2 expression and the actin-cytoskeleton which influences different aspects of cellular migration in lens epithelial cells. *Curr Eye Res* 2014;39(10):1000-1012.
- 27 Ma B, Kang Q, Qin L, Cui L, Pei C. TGF- β 2 induces transdifferentiation and fibrosis in human lens epithelial cells via regulating gremlin and CTGF. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;447(4):689-695.
- 28 Huang C, Akaishi S, Ogawa R. Mechanosignaling pathways in cutaneous scarring. *Arch Dermatol Res* 2012;304(8):589-597.
- 29 Reyes Lua M, Oertle P, Camenzind L, Goz A, Meyer CH, Konieczka K, Loparic M, Halfter W, Henrich PB. Superior rim stability of the lens capsule following manual over femtosecond laser capsulotomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016;57(6):2839-2849.
- 30 Mamuya FA, Wang Y, Roop VH, Scheiblin DA, Zajac JC, Duncan MK. The roles of α V integrins in lens EMT and posterior capsular opacification. *J Cell Mol Med* 2014;18(4):656-670.

Surgical stress and cytoskeletal changes in lens epithelial cells following manual and femtosecond laser-assisted capsulotomy

Andrea Krisztina Sükösd¹, Krisztina Szabadfi², Edina Szabó–Meleg^{3,4}, Beáta Gáspár⁵, Pavel Stodulka⁶, György Sétáló Jr^{4,7}, Róbert Gábrriel², Miklós Nyitrai^{3,4}, Zsolt Biró^{1,5}, Hajnalka Ábrahám⁷

¹Department of Ophthalmology, University of Pécs Medical School and Clinical Centre, Pécs 7623, Hungary

²Department of Experimental Zoology and Neurobiology, University of Pécs, Pécs 7624, Hungary

³Department of Biophysics, University of Pécs Medical School and Clinical Centre, Pécs 7624, Hungary

⁴János Szentágothai Research Centre, University of Pécs, Pécs 7624, Hungary

⁵Optimum Laser Centre, Budapest 1124, Hungary

⁶Gemini Eye Clinics, Zlín 76001, Czech Republic

⁷Department of Medical Biology and Central Electron Microscopic Laboratory, University of Pécs Medical School, Pécs 7624, Hungary

Correspondence to: Hajnalka Ábrahám. Department of Medical Biology and Central Electron Microscopic Laboratory, University of Pécs Medical School, Pécs 7624, Szigeti út 12, Hungary. hajnalka.abraham@aok.pte.hu

Received: 2019-06-26 Accepted: 2020-03-16

Abstract

• **AIM:** To study the effect of mechanical stress on the cytoskeleton in lens epithelial cells following conventional phacoemulsification surgery (CPS) and femtosecond laser-assisted cataract surgery (FLACS).

• **METHODS:** The cytoskeleton of the epithelial cells of the anterior lens capsules (ALC) removed by CPS and FLACS was examined by immunohistochemistry. Expression of the intermediate filament, glial fibrillary acidic protein (GFAP), and glutamine synthetase (GS) immunoreactivity were detected. In order to map the actin network of cells, fluorescently labeled phalloidin was used. The samples were examined using confocal laser scanning microscopy.

• **RESULTS:** GFAP expression was visible in a larger number of the epithelial cells after CPS compared to FLACS. In CPS sample's epithelial cells, GFAP immunoreactivity indicated robust morphological change. Regarding the actin filaments, the presence of tubular elements connecting

epithelial cells, regular actin pattern and marked cortical network after CPS were found. Following FLACS, the actin cytoskeleton of the epithelial cells remained densely structured, and the tubular elements were undetectable, however, the above-mentioned regular actin pattern and the marked cortical network were visible.

• **CONCLUSION:** The conventional removal of the ALC induces more robust changes of the cytoskeleton of the lens epithelial cells.

• **KEYWORDS:** lens epithelial cell; cytoskeleton; capsulotomy; glial fibrillary acidic protein; actin

DOI:10.18240/ijo.2020.06.11

Citation: Sükösd AK, Szabadfi K, Szabó-Meleg E, Gáspár B, Stodulka P, Sétáló G Jr, Gábrriel R, Nyitrai M, Biró Z, Ábrahám H. Surgical stress and cytoskeletal changes in lens epithelial cells following manual and femtosecond laser-assisted capsulotomy. *Int J Ophthalmol* 2020;13(6):927-934

INTRODUCTION

Cataract surgery underwent rapid and significant development in the past decades^[1]. In addition to the conventional phacoemulsification surgery (CPS), the use of femtosecond laser-assisted cataract surgery (FLACS) gained acceptance and has become widespread. Based on previous studies, FLACS has several advantages over conventional surgical techniques, including the more accurate capsulorhexis, the reduced phacoemulsification time and the rapid visual recovery of the patients^[2-3]. Moreover, FLACS may reduce the corneal endothelial cell damage and the postoperative thickening of the cornea^[4-6]. However in contrast to the above-mentioned advantages, a constant debate exists on the benefit of FLACS^[7-8].

It is well known that every surgical intervention induces certain changes at cellular level. Following mechanical stress, various molecular pathways are activated, and consequently, changes are induced in the cells including alteration of structure of the

cytoskeleton. According to the study of Mayer *et al*^[9], apoptotic cell death is induced in both CPS and FLACS. According to our previous results, the rate of anterior lens capsules (ALC) epithelial cells' degeneration is higher following CPS than after FLACS^[10]. Compared to CPS, FLACS induced lower rate of cell death, and lower expression of the pro-apoptotic p53 gene. In contrast, anti-apoptotic bcl-2 gene expression level is increased after the FLACS. Studies indicate correlation between the expression of proteins important in the epithelial cell death and survival, and the changes of actin pattern^[11-12]. According to Weber and Menko^[11], the changes of cortical actin network results in decreased anti-apoptotic Bcl-2 protein level. These results are in harmony with that of Zhang^[12], who has shown that alterations of actin cytoskeleton are associated with pro-apoptotic transcription factor p53 protein level. Thus, we can hypothesize that CPS and FLACS induce different cytoskeletal changes. In this study, we compared the effect of the two surgical methods used for the removal of ALC (CPS and FLACS) on the epithelial cells. Our main focus was to reveal cytoskeletal changes due to mechanical stress induced by capsulotomy. In the epithelial cells of the removed ALC, we examined the actin pattern and the intermediate filament glial fibrillary acidic protein (GFAP), which is characteristically expressed in the immature epithelial cells^[13]. It is well known, that due to deleterious effects (mechanical damage, injury, *etc.*), proteins which characteristically appear in the cells throughout embryonic development show an increased expression level in various organs including the eye^[14-15]. In astrocytes as well as in retinal Müller glia, GFAP is colocalized with glutamine synthetase (GS). In the epithelial cells of the lens, a GS-like protein, lengsin is present that can be detected with antibodies against GS, although, lengsin has no enzymatic activity characteristic to GS^[16-17]. While lengsin is highly expressed in normal lens epithelial cells, expression is decreased in age-related cataract^[16,18]. In order to get information about lengsin expression, antibodies against GS were used. We show that the different surgical techniques affect lens epithelial cells differently. The goal of this study is to examine the cytoskeletal changes in the epithelial cells of the ALC due to capsulotomy.

SUBJECTS AND METHODS

Ethical Approval Investigations were carried out according to procedures approved by the Institutional Ethics Committee (University of Pécs 7624, Hungary). In all cases, we obtained written consent of the patients for further examination of the lens capsule.

Subjects Samples of ALC were taken during CPS ($n=32$) and FLACS ($n=18$; VICTUS[®] Femtosecond Laser, Bausch+Lomb's, USA) with the following parameters: energy, 7.2 μ J; spot spacing, 6 μ m; path spacing, 4 μ m; time, 400-550fs. CPS removed ALC were assorted in group 1, while FLACS

samples were classified in group 2. Our inclusion criteria were the following: all patients with cataract, independent of gender and age.

Light Microscopy and Immunohistochemistry For routine light microscopy, ALC ($n=8$ with laser-assisted, $n=17$ with manual removal) were fixed in a buffered solution (phosphate buffer 0.1 mol/L, pH=7.4) of 2% formaldehyde and 2.5% glutaraldehyde for 24h at 4°C. Specimens were post-fixed with 1% osmium tetroxide diluted in phosphate buffer for 30 min at room temperature. Following dehydration with ethyl-alcohol, samples were washed and placed in propylene oxide and then embedded in Durcupan resin (Sigma, Budapest, Hungary). Semithin sections or whole mount preparations were stained with toluidine-blue and studied with Olympus BX50 light microscopy.

Extracted tissue samples ($n=5$ ALC in each group) were immediately fixed in 4% paraformaldehyde (PFA; Sigma, Budapest, Hungary) diluted in phosphate buffered saline (PBS, 0.1 mol/L, pH 7.4) for two hours at room temperature. The fixed samples were washed in PBS and Triton-X (1:1000, Sigma, Budapest, Hungary), and incubated in 10% normal goat serum (NGS; Vector Laboratories, Burlingame, CA) for one hour at room temperature. Anti-GFAP (rabbit polyclonal antibody, 1:1000, Sigma, Budapest, Hungary) and anti-GS antibodies (GS; mouse monoclonal antibody, 1:1000, Transduction Laboratories, USA) diluted in PBS were applied to the samples and incubated for 72h at 4°C. The bound antibodies were visualized following incubation with Alexa Fluor[®] 568-conjugated anti-rabbit and Alexa Fluor[®] 488-conjugated anti-mouse (1:1000, Life Technologies, Budapest, Hungary) fluorescent secondary antibodies, respectively, for 24h. Finally, nuclear labeling was performed using 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI, 1:10 000, Sigma, Budapest, Hungary) and preparations were coverslipped using fluoromount-G (Southern Biotech, USA).

In addition, GFAP immunoreaction was also examined with another, anti-human GFAP antibody (mouse monoclonal antibody, 1:750, DAKO, Glostrup, Denmark) on whole-mount preparations of ALC ($n=5$). Following binding of the primary antibody overnight at room temperature, anti-mouse biotinylated secondary antibody (1:100), then the avidin-biotin peroxidase detection system (Vector, Burlingame, CA) were used for 2h each. Binding sites were visualized with the chromogene 3-3'-diamino-benzidine (DAB, Sigma, Budapest, Hungary). Following mounting on glass slides and dehydration, preparations were coverslipped with DePeX (Sigma, Budapest, Hungary) and examined under light microscope.

Examination of the Actin Pattern Samples ($n=5$ ALC in each group) were washed in PBS (0.1 mol/L, pH 7.4),

followed by fixation in 4% PFA (Sigma, Budapest, Hungary) for 10min at room temperature. Fixed tissues were incubated in permeabilization solution (diluted in PBS containing 0.1% Triton X-100, 0.1% Na-azide, 5% BSA) for 20min at room temperature. Then capsules were stained with Alexa Fluor® 488-conjugated fluorescent phalloidin (Life Technologies, Budapest, Hungary) for 45min, light protected at room temperature. Samples were washed in PBS and nuclear labeling was performed by propidium iodide (1:1000, Life Technologies, Budapest, Hungary), followed by coverslipping using VectaShield medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

Statistical Analysis To determine the percentage of immunoreactive cells, anti-GFAP and anti-GS immunopositive cells as well the immunonegative cells were counted on the full thickness of the whole-mount preparations ($n=5$ ALC in each group, 10 images were taken from each sample) using a Fluoview FV-1000 Laser Confocal Scanning Microscope (40× magnification). Examination of the actin pattern was performed by analyzing 5 ALC samples from each group, taking 10 images from every sample in a Zeiss LSM 710 Microscope (63× magnification) and the number of cells was determined. Data were presented as mean±SEM and statistical significance ($P<0.05$) was set with Student's *t*-test analysis, using GraphPad Prism 5.03 program. Images were processed with Adobe Photoshop CS6.

RESULTS

Routine light microscopy revealed remarkable morphological changes in toluidine blue-stained ALC epithelial cells following CPS capsulotomy (Figure 1A), while morphology of epithelial cells remained relatively normal following laser-assisted removal (Figure 1B). The alteration of cells' shape indicated robust cytoskeletal changes especially following CPS capsulotomy (Figure 1C and 1D), therefore, we further examined components of the cytoskeleton.

Immunohistochemical examinations performed in tissue samples obtained by different capsulotomy methods showed intense GFAP and GS immunopositivity of the epithelial cells. Immunoreactivity, especially following CPS capsulotomy, was stronger in the peripheral area of the ALC, and the immunoreactivity became patchy and gradually weaker towards the central area (Figure 2). The nuclei of the epithelial cells remained unstained, but the cytoplasm showed GFAP and GS immunoreactivity (Figure 2 and Figure 3A-3D). Many GFAP immunoreactive cells contained also GS (Figure 2 and Figure 3E, 3F). Following CPS of the ALC, 48.07% of the epithelial cells were positive to GFAP immunostaining, 45.18% of them showed immunoreactivity to GS and 28.85% of the cells displayed colocalization of GFAP and GS.

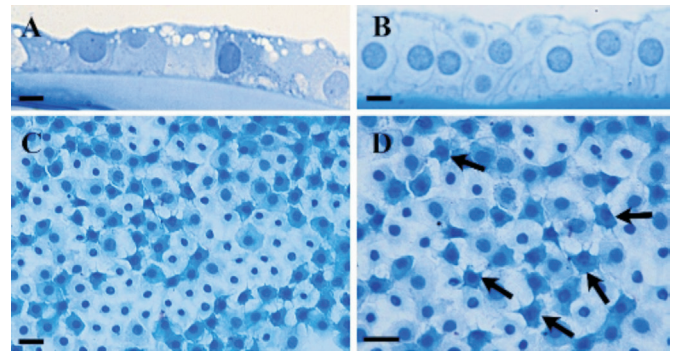


Figure 1 Toluidine blue-stained epithelial cells in semithin sections (A and B) and in whole mount preparations (C and D) of ALC following CPS (A, C, D) and FLACS capsulotomy (B) Semithin sections as well as whole mount preparations revealed alterations in cellular morphology (arrows in D) following manual CPS that indicate cytoskeletal changes. Scale bar: 10 μm for A and B, 20 μm for C and D.

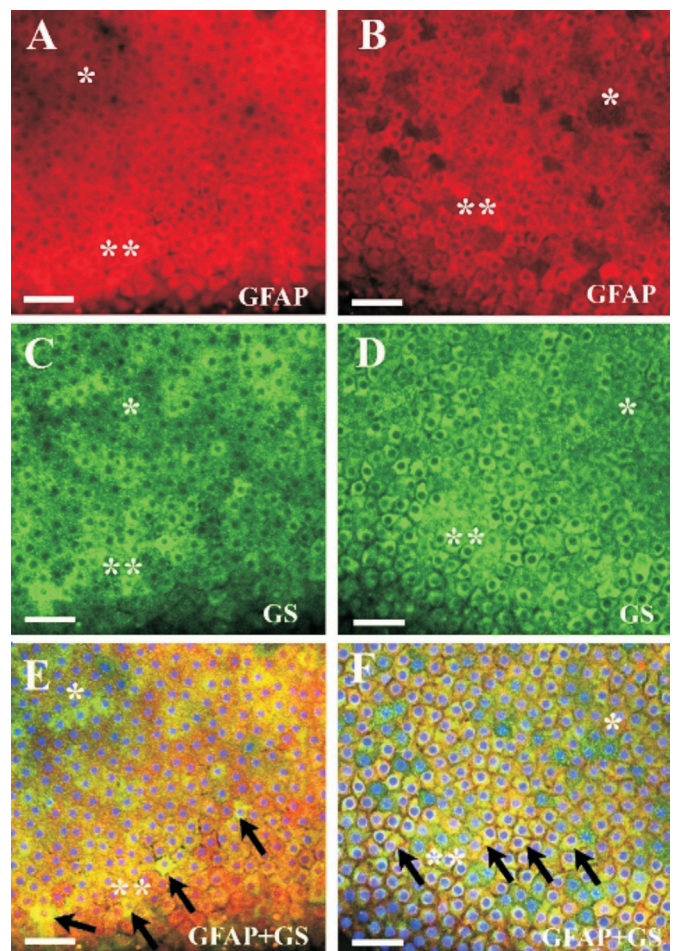


Figure 2 Difference in GFAP and GS immunoreaction detected in the peripheral (**) and more central (*) parts of ALC following CPS (A, C, E) and FLACS capsulotomy (B, D, F) A, B: GFAP positivity in the epithelial cells; C, D: Positive staining of epithelial cells for GS immunohistochemistry; E, F: Colocalization of GFAP and GS (arrows) in the epithelial cells. Scale bar: 50 μm.

In contrast, samples obtained from FLACS showed only 26.38% immunoreactivity to GFAP, while the GS immunoreactivity

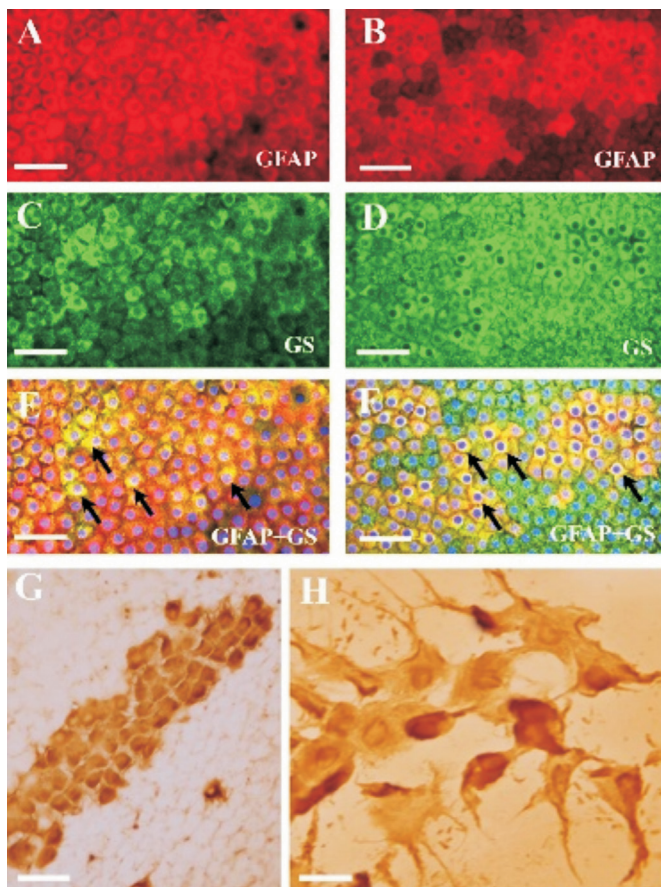


Figure 3 GFAP and GS detected in lens epithelial cells using immunohistochemistry, following CPS (A, C, E) and FLACS capsulotomy (B, D, F) Representative fluorescence microphotographs taken from whole ALC, processed for GFAP, GS immunohistochemistry. A, B: GFAP positivity in the epithelial cells; C, D: Positive staining of epithelial cells for GS immunohistochemistry; E, F: Colocalization of GFAP and GS (arrows) in the epithelial cells. G, H: The morphology of GFAP-immunoreactive cells following CPS. Scale bar: 50 μm for A-F, 40 μm in G and 15 μm in H.

was observed in 46.78% of the cells. Colocalization of GFAP and GS was found in 19.07% of epithelial cells. Apparently, no meaningful difference could be detected in the GS-immunoreactive cell density between FLACS and CPS capsulotomy.

Comparing the results of the quantification, significant differences were found between the two groups (CPS and FLACS) in the expression of GFAP ($P=2.24 \times 10^{-6}$), as well as GFAP and GS coreactivity ($P=0.003$). In conclusion, GFAP expression can be an indicator of mechanical damage in case of CPS and FLACS (Figure 4).

The morphology of GFAP immunoreactive cells following CPS was examined with anti-human GFAP antibody, using DAB as chromogene (Figure 3G, 3H). In addition to the normal morphology of GFAP-positive ALC epithelial cells, cells with altered shape and long thin processes were observed

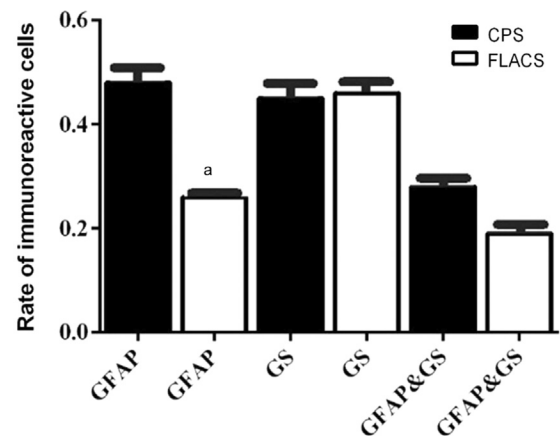


Figure 4 Quantification of immunohistochemical data In CPS removed ALC on the whole mount preparations, GFAP positive cell density was significantly higher than in FLACS capsulotomy specimens ($^aP=2.24 \times 10^{-6}$).

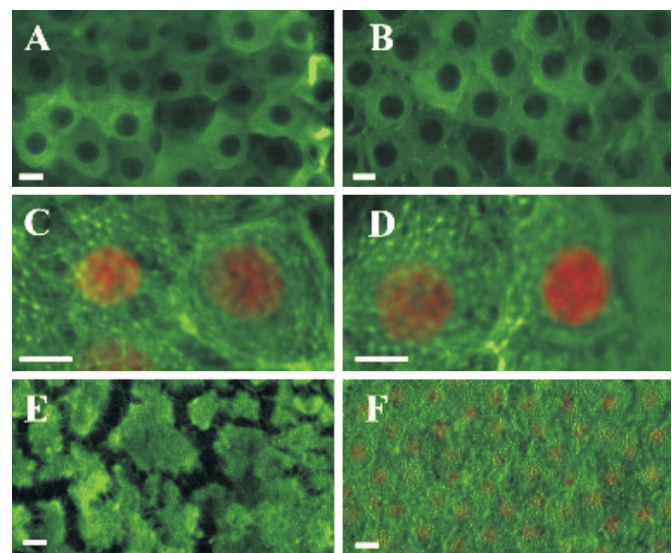


Figure 5 The organization of actin filaments visualized by phalloidin labeling following CPS (A, C, E) and FLACS capsulotomy (B, D, F) Representative fluorescence microphotographs taken from ALC. Marked cortical network (A) and regular actin pattern (C) could be observed after CPS removal, like in case of FLACS capsulotomy (B, D). Remarkable difference was visible regarding the compactness of the actin pattern after CPS removal of ALC (E). In contrast, the actin pattern remained compact after FLACS capsulotomy (F). Scale bar: 10 μm .

that supported robust change of their cytoskeleton proposed on the base of toluidine blue staining. Therefore, another, a more dynamic component of the cytoskeleton, microfilaments were also studied.

Examination of the actin pattern revealed a marked cortical network (Figure 5A, 5B) as well as regular actin filaments (Figure 5C, 5D) both in CPS and FLACS capsulotomy samples. However, a difference was found between the two groups when the compactness of the actin pattern was studied (Figure 5E, 5F). In case of FLACS capsulotomy,

the compactness of the actin pattern was similar that seen in control epithelial cells. In contrast, the epithelial cells after CPS capsulotomy showed a reorganization of the actin pattern. Instead of compact actin filaments, actin islands appeared and gap formation was observed between them (Figure 6A). In these gaps, tubular elements connecting epithelial cells were visible (Figure 6B). The tubular elements appeared only after CPS of the ALC.

Quantitative measurements using analysis of variance from whole ALC resulted in a significant difference ($P < 0.0001$) between the two capsulotomy methods when the presence of tubular elements was examined (Figure 7).

DISCUSSION

Due to the introduction of femtosecond laser technology, the critical points of cataract surgery have become automated. Macroscopic changes, and postoperative refractive consequences are in the center of interest of the studies on femtosecond laser-assisted and manually performed capsulotomy^[19-20]. The goal of our study was to compare cytoskeletal changes associated with CPS and FLACS capsulotomy.

Several mild injuries including mechanical damage cause stress to the cells. We suppose that all surgical interventions have an influence on the affected cells, and induce stress signaling pathways which results in the change of cytoskeleton.

GFAP is one component of intermediate filaments that is found in astrocytes of the central nervous system. Due to various damages including stress, GFAP expression is increased^[21-22]. In addition to astrocytes, GFAP can also be detected in many non-glial cells under normal conditions such as renal capsule, chondrocytes of epiglottic cartilage as well as in various types of tumors^[23-25]. Moreover, GFAP can be observed during the embryonic development of the lens. Following differentiation it cannot be detected in lens epithelial cells anymore^[13,26-28], and cytokeratin characteristic for epithelial cells is present instead. It is known, that due to damage or stress on the cells, proteins being characteristically present during embryonic development show an increased expression in adults in many organs including the eye^[14-15]. Our results revealed that after ALC removal, the intermediate filament GFAP can be detected in epithelial cells. We used two different antibodies to verify the presence of GFAP and both indicated the expression of it. Boyer *et al*^[13] described the presence of GFAP-immunoreactive fibers only during development. Based on our knowledge, there is no data in the literature about GFAP expression in the adult's ALC epithelial cells, and we suggest that re-expression of GFAP occurred in our samples may be due to the stress caused by mechanical damage.

Our immunohistochemical and light microscopic qualitative and quantitative examinations of GFAP-immunoreactivity revealed that the rate of GFAP-immunoreactive epithelial

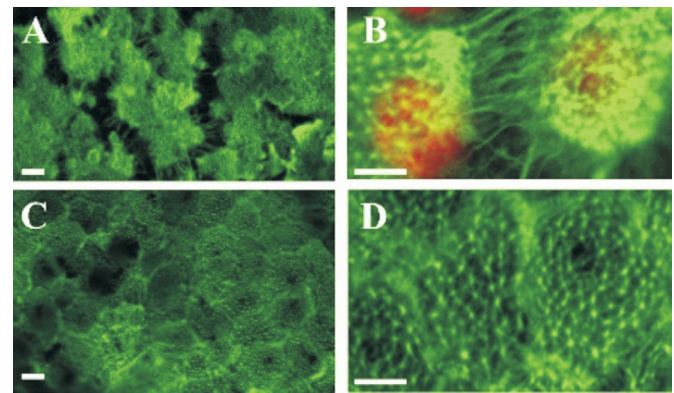


Figure 6 Gap formation and tubular elements connecting epithelial cells following CPS capsulotomy (A, B) and the lack of tubular elements following FLACS (C, D) Representative fluorescence photomicrographs taken from whole ALC, processed for actin labelling with phalloidin. In CPS capsulotomy, gap formation was observed (A). Image B shows a magnified image of gap with connecting tubular elements. Scale bar: 10 μm .

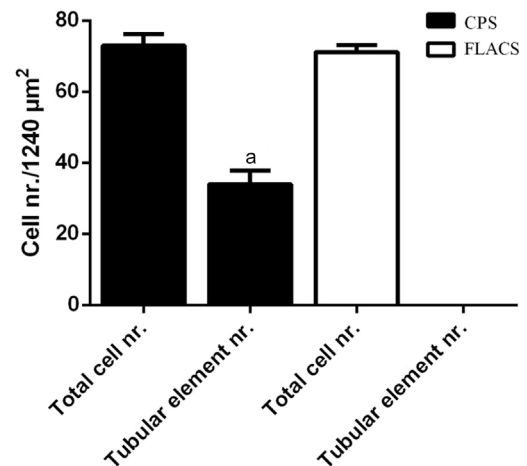


Figure 7 Quantification of data obtained from studying phalloidin-labeled actin-cytoskeleton Total epithelial cell number (nr.), and number (nr.) of cells connected by tubular elements were expressed in an area of 1240 μm^2 . ^aSignificant difference between the density of tubular element connecting epithelial cells following CPS and FLACS.

cells were significantly higher after CPS removal of the ALC compared to FLACS capsulotomy. Repair mechanism following cellular damage involve recapitulation of developmental processes in various organs including the eye and induce elevated expression of those gene that are expressed during embryonic development^[14-15]. Some of these proteins such as growth factors and their receptors can promote recovery processes^[29-30]. Others, like cytoskeletal proteins (such as GFAP, vimentin or nestin) indicate the presence of cell damage^[31-32]. Part of the GFAP-positive cells revealed GS-immunoreactivity indicating the presence of lensin in those cells^[16-18]. Apparently, no meaningful difference could be detected in the GS-immunoreactive cell density between FLACS and

CPS capsulotomy. Since expression of lensin decreases in age-related cataract, the similarity in the rate of GS-immunoreactivity of lens epithelial cells indicates similar lensin expression, and consequently, similar severity of cataract. Thus, it signifies the homogeneity of our cataract patients' groups treated by the two different surgical methods and even highlights the difference found in GFAP expression.

In harmony with the strongly significant difference in GFAP-immunoreactive cell density, the GFAP and GS double-labelled cell density revealed significant differences between the groups, although only part of GS-immunoreactive cells co-expressed GFAP. The higher density of GFAP positive cells observed after CPS capsulotomy than following FLACS ALC removal may suggest that CPS capsulotomy exerts stronger mechanical stress on the epithelial cells than the laser-assisted method.

This is important because during capsulotomy a part of the anterior capsule is not removed, and wound healing process will begin on the residual epithelial cells. We suggest that similar alterations can occur in the residual lens epithelial cells following the surgical removal of ALC and the damage caused by surgery may induce those pathways that can trigger the epithelial-mesenchymal transformation of residual capsular epithelial cells that eventually results in fibrosis and posterior capsule opacification^[33]. By the migration and proliferation of residual lens epithelial cells after extracapsular cataract extraction, secondary cataract can appear due to surgical trauma^[34]. The alteration of the cytoskeleton of epithelial cells around capsulorhexis showed not only changed morphology, but the alteration observed, especially in actin pattern may indicate a change in contractility and in ability to migrate.

In addition, due to stress, direct cell-cell communication can also be changed. Until recently, direct cell-cell communication was supposed to happen *via* gap junctions and different paracrine mechanisms. In 2004 Rustom and co-worker's^[35] described a new-actin containing-tubular structure of intercellular communication that provides continuity between distantly positioned cells. Since then similar tubular structures have been reported in many cell types (astrocytes, various tumour cells, immune cells, *etc.*)^[36-37]. By comparing the two types of capsulotomy, we have identified cytoskeletal changes that may indicate different rates of mechanical stress on ALC epithelial cells, therefore we focused onto the examination of the actin pattern in our investigations.

It is known that stress leads to the reorganization of the actin pattern with the appearance of stress fibers^[38-39]. According to Weber and Menko^[11], stress fibers convert to normal actin pattern in epithelial cell culture. The change in actin cytoskeleton can trigger the expression of different signaling

proteins playing a role in the epithelial cells' response and survival^[11]. Examination of the actin pattern revealed similar cortical networks in cell after CPS and FLACS as well. This is important, because changes in the cortical actin network can influence different molecular biological signaling pathways. By contrast we have found a marked difference in the compactness of the actin pattern.

In CPS capsulotomy, remodeling of the actin cytoskeleton of epithelial cells was observed. Instead of compact actin filaments, actin "islands" appeared. Between these actin "islands" gap formation was found. These gaps were not visible after FLACS capsulotomy. Gap formation can presumably be explained with the higher mechanical effect of CPS capsulotomy, which is supported with our previous light and electron microscopic results and the increased GFAP expression found in this study^[10]. Between the gaps, actin-containing tubular elements could be seen. These structures were only observed after CPS removal of the ALC. Both after CPS and FLACS capsulotomy, regular actin filaments were visible.

Our results suggest that FLACS capsulotomy causes milder mechanical stress on epithelial cells, than CPS. The robust cytoskeletal changes detected following CPS indicate the possibility of altered cell-cell communication and increased ability to migration that may result in epithelial-mesenchymal transformation and consequently, development of secondary cataract. The milder cytoskeletal changes following FLACS allows us to suggest that following laser-assisted method fewer residual epithelial cells undergo epithelial-mesenchymal transformation, which may decrease the risk for the formation of posterior capsule opacification.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors appreciate the assistance of surgeons and theatre nurses in sample collections, and the support of volunteers.

The work was presented in WOC (World Ophthalmology Congress of the International Council of Ophthalmology), 2016. February 5-9, Guadalajara, Mexico.

Foundations: Supported by EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 and GINOP-2.3.2-15-2016-00036 to University of Pécs Medical School; EFOP-3.6.1-16-2016-00004 project; The Higher Education Institutional Excellence Programme of the Ministry for Innovation and Technology in Hungary, within the framework of the 5. thematic programme of the University of Pécs.

Conflicts of Interest: Sükösd AK, None; Szabadi K, None; Szabó-Meleg E, None; Gáspár B, None; Stodulka P, None; Sétáló G Jr, None; Gábor R, None; Nyitrai M, None; Biró Z, None; Ábrahám H, None.

REFERENCES

1 Davis G. The evolution of cataract surgery. *Mo Med* 2016;113(1):58-62.

- 2 Sharma B, Abell RG, Arora T, Antony T, Vajpayee RB. Techniques of anterior capsulotomy in cataract surgery. *Indian J Ophthalmol* 2019;67(4):450-460.
- 3 Qian DW, Guo HK, Jin SL, Zhang HY, Li YC. Femtosecond laser capsulotomy versus manual capsulotomy: a Meta-analysis. *Int J Ophthalmol* 2016;9(3):453-458.
- 4 Chen H, Lin HT, Chen W, Zhang B, Xiang W, Li J, Chen WR, Liu YZ. Femtosecond laser combined with non-chopping rotation phacoemulsification technique for soft-nucleus cataract surgery: a prospective study. *Sci Rep* 2016;6:18684.
- 5 Ang RET, Quinto MMS, Cruz EM, Rivera MCR, Martinez GHA. Comparison of clinical outcomes between femtosecond laser-assisted versus conventional phacoemulsification. *Eye Vis (Lond)* 2018;5:8.
- 6 Chen XY, Chen KL, He JL, Yao K. Comparing the curative effects between femtosecond laser-assisted cataract surgery and conventional phacoemulsification surgery: a meta-analysis. *PLoS One* 2016;11(3):e0152088.
- 7 Ranka M, Donnenfeld ED. Femtosecond laser will be the standard method for cataract extraction ten years from now. *Surv Ophthalmol* 2015;60(4):356-360.
- 8 Lipner M. Forgoing the femtosecond laser. *Eye World* 2015;50-51.
- 9 Mayer WJ, Klaproth OK, Ostovic M, Terfort A, Vavaleskou T, Hengerer FH, Kohnen T. Cell death and ultrastructural morphology of femtosecond laser-assisted anterior capsulotomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(2):893-898.
- 10 Sükösd AK, Rapp J, Feller D, Sétáló G Jr, Gáspár B, Pongrácz JE, Ábrahám H, Biró Z. Cell death and survival following manual and femtosecond laser-assisted capsulotomy in age-related cataract. *Int J Ophthalmol* 2018;11(9):1440-1446.
- 11 Weber GF, Menko AS. Actin filament organization regulates the induction of lens cell differentiation and survival. *Dev Biol* 2006;295(2):714-729.
- 12 Zhang Y. Tunneling-nanotube. *Commun Integr Biol* 2011;4(3):324-325.
- 13 Boyer S, Maunoury R, Gomès D, de Néchaud B, Hill AM, Dupouey P. Expression of glial fibrillary acidic protein and vimentin in mouse lens epithelial cells during development *in vivo* and during proliferation and differentiation *in vitro*: comparison with the developmental appearance of GFAP in the mouse central nervous system. *J Neurosci Res* 1990;27(1):55-64.
- 14 Gallina D, Palazzo I, Steffenson L, Todd L, Fischer AJ. Wnt/ β -catenin-signaling and the formation of Müller glia-derived progenitors in the chick retina. *Dev Neurobiol* 2016;76(9):983-1002.
- 15 Mader MM, Cameron DA. Photoreceptor differentiation during retinal development, growth, and regeneration in a metamorphic vertebrate. *J Neurosci* 2004;24(50):11463-11472.
- 16 Grassi F, Moretto N, Rivetti C, Cellai S, Betti M, Márquez AJ, Maraini G, Ottonello S. Structural and functional properties of lensin, a pseudo-glutamine synthetase in the transparent human lens. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;350(2):424-429.
- 17 Wistow G, Bernstein SL, Wyatt MK, Behal A, Touchman JW, Bouffard G, Smith D, Peterson K. Expressed sequence tag analysis of adult human lens for the NEIBank Project: over 2000 non-redundant transcripts, novel genes and splice variants. *Mol Vis* 2002;8:171-184.
- 18 Hawse JR, Hejtmancik JF, Huang Q, Sheets NL, Hosack DA, Lempicki RA, Horwitz J, Kantorow M. Identification and functional clustering of global gene expression differences between human age-related cataract and clear lenses. *Mol Vis* 2003;9:515-537.
- 19 Kohnen T, Klaproth OK, Ostovic M, Hengerer FH, Mayer WJ. Morphological changes in the edge structures following femtosecond laser capsulotomy with varied patient interfaces and different energy settings. *Graefes Arch Exp Ophthalmol* 2014;252(2):293-298.
- 20 Ostovic M, Klaproth OK, Hengerer FH, Mayer WJ, Kohnen T. Light microscopy and scanning electron microscopy analysis of rigid curved interface femtosecond laser-assisted and manual anterior capsulotomy. *J Cataract Refract Surg* 2013;39(10):1587-1592.
- 21 Oblinger MM, Singh LD. Reactive astrocytes in neonate brain upregulate intermediate filament gene expression in response to axonal injury. *Int J Dev Neurosci* 1993;11(2):149-156.
- 22 Brenner M. Structure and transcriptional regulation of the GFAP gene. *Brain Pathol* 1994;4(3):245-257.
- 23 Budka H. Non-glia specificities of immunocytochemistry for the glial fibrillary acidic protein (GFAP). Triple expression of GFAP, vimentin and cytokeratins in papillary meningioma and metastasizing renal carcinoma. *Acta Neuropathol* 1986;72(1):43-54.
- 24 Alliot F, Pessac B. Macrophages express glial markers. *Biol Cell* 1988;63(1):109-111.
- 25 Gard AL, White FP, Dutton GR. Extra-neural glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity in perisinusoidal stellate cells of rat liver. *J Neuroimmunol* 1985;8(4-6):359-375.
- 26 Boyer S, Montagutelli X, Gomès D, Simon-Chazottes D, Guénet JL, Dupouey P. Recent evolutionary origin of the expression of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lens epithelial cells. A molecular and genetic analysis of various mouse species. *Brain Res Mol Brain Res* 1991;10(2):159-166.
- 27 Hatfield JS, Skoff RP, Maisel H, Eng L. Glial fibrillary acidic protein is localized in the lens epithelium. *J Cell Biol* 1984;98(5):1895-1898.
- 28 Hatfield JS, Skoff RP, Maisel H, Eng L, Bigner DD. The lens epithelium contains glial fibrillary acidic protein (GFAP). *J Neuroimmunol* 1985;8(4-6):347-357.
- 29 Fischer AJ, Scott MA, Ritchey ER, Sherwood P. Mitogen-activated protein kinase-signaling regulates the ability of Müller glia to proliferate and protect retinal neurons against excitotoxicity. *Glia* 2009;57(14):1538-1552.
- 30 Fischer AJ, Scott MA, Zelinka C, Sherwood P. A novel type of glial cell in the retina is stimulated by insulin-like growth factor 1 and may exacerbate damage to neurons and Müller glia. *Glia* 2010;58(6):633-649.
- 31 Xue LP, Ding P, Xiao LB, Hu M, Hu ZL. Nestin, a new marker, expressed in Müller cells following retinal injury. *Can J Neurol Sci* 2010;37(5):643-649.
- 32 Noristani R, Kuehn S, Stute G, Reinehr S, Stellbogen M, Dick HB, Joachim SC. Retinal and optic nerve damage is associated with early

- glial responses in an experimental autoimmune glaucoma model. *J Mol Neurosci* 2016;58(4):470-482.
- 33 Marcantonio JM, Vrensen GF. Cell biology of posterior capsular opacification. *Eye (Lond)* 1999;13(Pt 3b):484-488.
- 34 Marcantonio JM, Rakic JM, Vrensen GF, Duncan G. Lens cell populations studied in human donor capsular bags with implanted intraocular lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(5):1130-1141.
- 35 Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes HH. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* 2004;303(5660):1007-1010.
- 36 Onfelt B, Davis DM. Can membrane nanotubes facilitate communication between immune cells? *Biochem Soc Trans* 2004;32(Pt 5):676-678.
- 37 Rostami J, Holmqvist S, Lindström V, Sigvardson J, Westermark GT, Ingelsson M, Bergström J, Roybon L, Erlandsson A. Human astrocytes transfer aggregated alpha-synuclein via tunneling nanotubes. *J Neurosci* 2017;37(49):11835-11853.
- 38 Pavalko FM, Chen NX, Turner CH, Burr DB, Atkinson S, Hsieh YF, Qiu J, Duncan RL. Fluid shear-induced mechanical signaling in MC3T3-E1 osteoblasts requires cytoskeleton-integrin interactions. *Am J Physiol* 1998;275(6 Pt 1):C1591-C1601.
- 39 Liou W, Rafferty NS. Actin filament patterns in mouse lens epithelium: a study of the effects of aging, injury, and genetics. *Cell Motil Cytoskeleton* 1988;9(1):17-29.