

Uloga inflamatornih medijatora na površini oka u nastanku i progresiji keratokonusa i terapijskom odgovoru ovih pacijenata

UVOD

Keratokonius (KC) je progresivna, obično bilateralna ali asimetrična ektazija rožnjače koju karakterišu stanjivanje stromalnog tkiva, neregularni astigmatizam i progresivan gubitak vidne oštine, što često dovodi do značajnog narušavanja kvaliteta života, a u uznapredovalim slučajevima i do potrebe za keratoplastikom [1]. Iako se KC dugo smatrao „neinflamatornim“ degenerativnim poremećajem rožnjače, sve više podataka iz analiza suza, tkivnih studija i *in vivo* imidžinga ukazuje na to da KC predstavlja hronično, niskogradijentno inflamatorno ili para-inflamatorno stanje površine oka [2-5]. Tokom poslednje dve decenije brojna istraživanja su pokazala da je inflamatorni i proteolitički profil suznog filma pacijenata sa KC izmenjen u poređenju sa zdravim osobama [2-7]. Naknadne studije potvrdile su da suze pacijenata sa KC često pokazuju povišene koncentracije proinflamatornih citokina poput interleukina (IL)-1 β , IL-6, faktora nekroze tumora (TNF), interferona (IFN)- γ i IL-17, kao i povećane vrednosti matriksne metaloproteinaze (MMP)-9 i srodnih proteaza koje doprinose razgradnji stromalnog kolagena [4, 6, 7]. Istovremeno, uočena je disfunkcija regulatornih medijatora kao što su interleukin IL-10 i faktor transformacije rasta (TGF)- β 1, što podržava koncept da KC karakteriše disbalans između proinflamatornih i antiinflamatornih puteva, a ne homogeno povećanje svih citokina [2, 5, 7]. Proteomske i transkriptomске analize epitela i strome rožnjače, ukazuju na obogaćenje puteva ne samo vezanih za inflamaciju, već i oksidativni stres, remodelovanje ekstracelularnog matriksa i apoptozu [8].

Studije protočne citometrije i imunofenotipizacije takođe pokazuju povećanu gustinu antigen-prezentujućih ćelija i aktiviranih T-ćelija na površini oka kod pacijenata sa KC, ističući ulogu ćelijskog imuniteta [3]. Veće koncentracije citokina u suzama — posebno odnos IL-6, IL-8, TNF ili IL-17 prema regulatornim citokinima IL-10 i TGF- β 1 — koreliraju sa strmijom keratometrijom, smanjenom minimalnom debljinom rožnjače i uznapredovalim tomografskim stadijumima bolesti [2, 4, 6]. Klasični klinički faktori rizika za progresiju KC, kao što su atopija, alergija oka i trljanje očiju, takođe su povezani sa izraženijim inflamatornim profilima suza i većom proteaznom aktivnošću, ukazujući na sinergiju mehaničkog i imunološkog stresa kod genetski predisponirane rožnjače [4, 7]. Fotohemijsko umrežavanje kolagenih vlakana rožnjače primenom riboflavina i ultraljubičastog svetla (engl. *corneal cross-linking (CXL)*) predstavlja trenutno standardni terapijski pristup za zaustavljanje progresije ektazije povećanjem rigidnosti strome i njene otpornosti na enzimsku razgradnju [1, 8]. Pored biomehaničkog efekta, CXL izaziva apoptozu keratocita, generisanje reaktivnih oblika kiseonika (*reactive oxygen species, ROS*) i prolazno oštećenje epitela [7]. Zbog toga su brojne kliničke studije istraživale kako CXL menja citokine suznog filma i da li su te promene povezane sa dugoročnim strukturnim ishodima.

Uprkos rastućem broju publikacija koje se tiču (imuno)patogeneze KC, ostaju značajne praznine. Mnoge studije su zasnovane na malom uzorku pacijenata, kratkom praćenju i fokusiraju se isključivo na apsolutne koncentracije citokina, a ne na odnose proinflamatornih i antiinflamatornih medijatora [4-7]. Postoji malo dokaza koji identifikuju pouzdane biomarkere iz suznog filma koji mogu predvideti uspeh ili neuspeh CXL-a [2]. Nepoznato je da li preoperativni ili rani postoperativni citokinski odnosi — poput IL-6/IL-10, IL-17/TGF- β 1 ili

kombinovanih Th1/Th2/Th17 indeksa — mogu predvideti dugoročnu (>5 godina) tomografsku stabilnost, progresiju ili potrebu za ponovnim tretmanom [4–7]. Hemokini kao što su IL-8, monocitni hemoatraktantni protein (MCP)-1 i protein indukovani interferonom gama (IP)-10 takođe učestvuju u patofiziologiji KC. Povišeni IL-8 i MCP-1 pospešuju regrutaciju leukocita i epitelni stres, dok su fluktuacije IP-10 dokumentovane tokom remodelovanja rožnjače [7]. Pozitivne korelacije između IL-17A, IL-13 i TNF i keratometrijskog ustrmljavanja dodatno potvrđuju ulogu inflamatornog disbalansa u težini bolesti [9]. Citokini u suzama služe i kao dinamički markeri terapijskog odgovora: sadržaj IL-6, IL-8, IL-13, IL-17A i više MMP tipično poraste neposredno nakon CXL, a zatim se normalizuje paralelno sa stabilizacijom rožnjače [9, 10]. Niži preoperativni nivoi IL-6 i MCP-1 povezani su sa povoljnijim dugoročnim ishodima, sugerišući da „mirnija“ inflamatorna pozadina može doprineti snažnijem remodelovanju strome [9, 10].

RADNA HIPOTEZA

Inflamacija na površini oka utiče na patogenezu, kliničku sliku keratokonusa (težinu bolesti) i dugoročni ishod terapijskog fotohemijaskog umrežavanja kolagenih vlakana rožnjače.

CILJEVI

- 1 Ispitati povezanost koncentracije medijatora inflamacije u suzama sa težinom bolesti pacijenata sa keratokonusom.
- 2 Ispitati povezanost medijatora inflamacije u suzama pacijenata sa keratokonusom sa ishodom (sprečavanjem ustrmljavanja rožnjače) fotohemijaskog umrežavanja kolagenih vlakana rožnjače.
- 3 Ispitati dugoročno uspešnost metode fotohemijaskog umrežavanja kolagenih vlakana rožnjače u vidu sprečavanja ustrmljavanja rožnjače.

METODOLOGIJA

Studija je dizajnirana kao opservaciona, studija preseka, sprovedena u potpunoj saglasnosti sa institucionalnim smernicama i Deklaracijom iz Helsinkija, i odobrena je od strane Etičkog komiteta Kliničkog centra Srbije (1600/25). Studija je rađena u periodu od septembra 2025. sa planiranim završetkom do početka 2027. godine. U nju će biti uključeni svi pacijenti koji su prošli proceduru fotohemijaskog umrežavanja kolagenih vlakana rožnjače, istog hirurga, od 2014. do 2026. što se procenjuje na broj od oko 140. Pisani informisani pristanak će biti pribavljen od svih učesnika pre uključivanja u istraživanje. Dijagnoza keratokonusa (KC) se zasniva se na kornealnoj tomografiji (Orbican) na početnoj poseti i tokom svake kontrolne posete. Stepene težine bolesti se klasifikuje prema modifikovanoj Amsler–Krumeich klasifikaciji, koja integriše nalaze sa biomikroskopije na biomikroskopu, srednje centralne keratometrijske

vrednosti, promene u sfernoj i cilindričnoj refrakciji i debljini rožnjače. Strukturisana anamneza obuhvatiće podatke o trljanju očiju, kao i o postojanju očnih i sistemskih alergija.

Jedinica posmatranja će biti oko, na kome će se pratiti keratometrijski parametri, debljina rožnjače i preoperativna vidna oštrina u periodu do 10 godina nakon operacije. Iz suza tog oka će se izolovati medijatori zapaljenja.

Za procenu povezanosti vrednosti medijatora zapaljenja i stepena terapijskog odgovora sa očekivanim koeficijentom korelacije 0,5 (osrednja povezanost), dovoljan broj jedinica posmatranja za procenu povezanosti pomenutih varijabli od interesa za statističku snagu od 80% i nivo statističke značajnosti od 0,05 iznosi 29.

Po stepenu KC, pacijenti su raspoređeni kao: stepen 1, stepen 2, stepen 3 i stepen 4. Napredovanje stepena je praćeno povećanjem keratometrijskih parametara (K1, K2, Kmean, Kmax) i smanjenjem pahimetrijskih vrednosti (centralna debljina rožnjače — CDR; najmanja debljina rožnjače — MDR), uz karakteristične kliničke znakove, posebno Fleischerov prsten i Vogtove strije. Praćenje nakon CXL je na 1, 6, godinu dana, 3, 5 i do 10 godina. Kornealna tomografija je rađena na svakom od ovih vremenskih intervala. Promena na tangencijalnoj osi je korišćena za klasifikaciju ishoda u tri kategorije: minimalno-stabilni parametri ili < 1 D zaravnjenja rožnjače; umereno ili 1–3 D zaravnjenja; maksimalno ili > 3 D zaravnjenja.

Određivanje pokazatelja inflamacije

Istraživanje će biti rađeno na institutu za mikrobiologiju i imunologiju. Za uzorkovanje suza biće korišćene sterilne Schirmerove tračice koje će se odmah nakon uzimanja stavljati u sterilne perforirane mikrocentrifugalne epruvete unutar većih kolekcionih epruveta, nakon čega će slediti centrifugiranje pri 13. 000 obrtaja u minuti tokom 15 minuta na 4 °C. Dobijeni eluat suza (30 µL) biće prenet u nove sterilne mikro epruvete i korišćen za dalju analizu. Uzorkovanje suza biće obavljeno pre CXL tretmana.

Kvantifikacija rastvorljivih faktora u suzama obuhvatiće citokine (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, TNF, IFN- γ), hemokine (MCP-1, IL-8, IP-10) i faktor rasta TGF- β 1, merenih pomoću LEGENDplex™ kompleta (BioLegend Inc., SAD) prema uputstvu proizvođača. Akvizicija mikročestica i registracija signala za Cytometric Bead Array i LEGENDplex™ testove biće obavljene na BD FACS ARIA™ III protočnom citometru uz BD FACSDiva softver (BD Biosciences, SAD). Apsolutne koncentracije analita biće dobijene korišćenjem LEGENDplex™ Data Analysis Software Suite-a (BioLegend Inc., SAD) na osnovu standardnih krivih specifičnih za svaki analit.

Statistička analiza

Zavisno od tipa varijabli i normalnosti raspodele, deskripcija podataka je prikazana kao n (%), aritmetička sredina $\pm$ standardna devijacija ili medijana (min-max).

Poređenje grupa pacijenata sa keratokonusom i zdravih kontrola kojima su uzorkovane suze biće vršeno Mann–Whitney U testom. Kako bi se procenile razlike u koncentracijama citokina između tri grupe stepena odgovora na zaravnjenje rožnjače (minimalno, umereno, maksimalno), biće korišćen Kruskal–Wallis H test kao omnibus test, nakon čega će biti rađeni post-hoc Mann–Whitney U testovi za parna poređenja. Standardizacija Z-score [(vrednost –

sredina)/standardna devijacija] biće dodatno primenjena radi poređenja citokina merenih u različitim jedinicama. Povezanost koncentracije citokina i ordinalnih terapijskih ishoda biće procenjivana *Spearman*-ovim koeficijentom korelacije ranga. Uspešnost procedure fotohemijskog umrežavanja kolagenih vlakana rožnjače biće ispitivana *Wilcoxon* testom rangova ili *T* testom u zavisnosti od normalnosti raspodele sa primenom *Benjamini-Hochberg* korekcije.

Sve statističke analize biće sprovedene u *Python*-u (*Python Software Foundation, SAD*), uz nivo statističke značajnosti $p < 0.05$.

NAUČNI ZNAČAJ

Podaci iz literature govore o značaju medijatora inflamacije na površini oka u patogenezi keratokonusa. Utvrđivanje konkretnih medijatora inflamacije bi moglo poslužiti u formiranju inflamatornih panela, koji bi se koristili prvenstveno u prevenciji i predikciji nastanka bolesti, kao i razumevanju težine kliničke slike i njene patogeneze. Takođe, od izrazitog značaja bi bila mogućnost predikcije ishoda fotohemijskog umrežavanja kolagenih vlakana rožnjače kao terapijske metode, na osnovu prethodno identifikovanih povišenih medijatora inflamacije na površini oka. To bi omogućilo individualizaciju pristupa pacijentu, sa prethodno utvrđenim faktorima rizika, kao i potencijalnog preoperativnog uvođenja antiinflamatorne terapije. Iako su u svetskoj literaturi ishodi fotohemijskog umrežavanja mnogo puta ispitivani, slične veće studije nisu rađene na teritoriji republike Srbije. Pored efikasnosti same metode u sprečavanju ustrmljavanja rožnjače, dobio bi se uvid i o momentu stabilizacije parametara tomografije i na taj način bi se lakše utvrdile potrebe učestalosti praćenja pacijenata.

LITERATURA:

1. Santodomingo-Rubido J, Carracedo G, Suzaki A, Villa-Collar C, Vincent SJ, Wolffsohn JS. Keratoconus: An updated review. *Cont Lens Anterior Eye*. 2022;45:101559.
2. Balasubramanian SA, Pye DC, Willcox MDP. Proteases, proteolysis and inflammatory molecules in the tears of people with keratoconus. *Acta Ophthalmol*. 2012;90:e303–e309.
3. D'Souza S, Nair AP, Sahu GR, Vaidya T, Shetty R, Khamar P, et al. Keratoconus patients exhibit a distinct ocular surface immune cell and inflammatory profile. *Sci Rep*. 2021;11:20891.
4. Huang RS, Akpek EK, Chatzis N, Yoo SH, Amescua G. Evaluating changes in pro- and anti-inflammatory mediators in keratoconus following corneal collagen cross-linking: A systematic review. *AJO Int*. 2025;2(4):100185.
5. Acar Eser N, Dikmetas O, Kocabeyoglu S, Tan C, Irkec M. Evaluation of keratoconus disease with tear cytokine and chemokine levels before and after corneal cross-linking treatment. *Ocul Immunol Inflamm*. 2024;32:269–275.

6. Shetty R, Sethu S, Chevour P, Pahuja N, Nagaraja H, Nuijts RMMA, et al. Tear inflammatory cytokines and matrix metalloproteinases in keratoconus: Relation to disease severity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56:738–750.
7. Krok M, Wróblewska-Czajka E, Łach-Wojnarowicz O, Bronikowska J, Czuba ZP, Wylęgała E, et al. Analysis of cytokine and chemokine level in tear film in keratoconus patients before and after corneal cross-linking (CXL) treatment. *Int J Mol Sci*. 2024;25:1052.
8. Natarajan R, Rao S, Shetty R, Ghosh A, Subramani M, Pahuja N, et al. Ocular surface inflammation in keratoconus: Pathogenesis and biomarkers. *J Ophthalmol*. 2021;2021:1-12.
9. McKay TB, Hjortdal J, Sejersen H, Asara JM, Karamichos D. Tear film metabolomics in keratoconus: A pilot study. *Ocul Surf*. 2020;18(2):289-297
10. Zhang H, Chen L, Hou W, Yan W. Tear levels of inflammatory cytokines in keratoconus: A meta-analysis. *Biomed Res Int*. 2021;2021:6628923.

Mentor: Vladimir Perović

Mentor: Svetlana Stanojlović Kuljić

Kandidat: Tiana Petrović
