

A humán szemlencse korfüggő UV abszorpciója és molekuláris háttere

PhD tézis

Pajer Viktor



Szeged Tudományegyetem
Általános Orvostudományi kar
Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet

2020

Szeged

**A humán szemlencse korfüggő UV abszorpciója
és molekuláris háttere**

PhD tézis

Pajer Viktor

Szeged Tudományegyetem
Általános Orvostudományi kar
Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet

2020

Szeged

Bevezetés

Az emberi szem legkülső rétege, a szaruhártya hatékonyan nyeli el az ultraibolya (UV) sugárzást, azonban még így is jelentős mértékű sugárzás éri el a szemlencsét. A szemlencse betegségei, mint például a katarakta különböző típusainak kialakulása összefüggésbe hozható a szemet ért napsugárzás mennyiségével.

Mivel a szemlencse effektíven nyeli el mind az UV-A (330-400 nm) mind az UV-B (280-330 nm) sugárzást, fontos, hogy meghatározzuk, hogy a lencsetokok és a lencse különböző rétegei milyen mértékben járulnak hozzá a teljes lencse abszorbanáciájához. Csupán néhány kutatás foglalkozik a lencse elülső 1-2 mm-es szegmensének abszorpciós tulajdonságaival. Ezekből kiderül, hogy az optikai tengely mentén haladva az abszorpció előlről hátrafelé nő, azonban nem áll rendelkezésre adat a hátulsó kéregre vonatkozóan. A tokokat illetve a 280 nm-nél rövidebb hullámhossz-tartományt tekintve szintén elenyésző számú eredmény érhető el.

Régóta ismert tény, hogy a lencse abszorbanáciája nő a korrallal, melyet a teljes lencsére vonatkozó transzmissziós mérések is alátámasztanak. Ehhez mind a megnövekedett vastagság mind a lencsében, az idő előrehaladtával felhalmozódó pigment hozzájárulhat. A lencse különböző rétegeinek korfüggő abszorbanáciájáról minimális mérési eredmény áll rendelkezésre: mindössze annyi ismert, hogy a 360 nm-nél lévő abszorpciós csúcs a kor előrehaladtával a rövidebb hullámhosszak felé tolódik.

A legnagyobb koncentrációban az emberi szemlencsében találhatóak fehérjék. A fő fehérjék a krisztallinok, melyek feltehetően szerepet

játszanak az UV sugárzás elnyelésében, mivel abszorpciós spektrumuk 280 nm-nél mutat maximumot, csakúgy, mint a triptofán. A lencsében jelenlévő triptofán származékok vagy más néven UV-szűrő hatású molekulák, mint például a kinurenin abszorpciós spektruma nagyban hasonlít a lencsééhez. Mivel szignifikánsan kisebb mértékben nyelik az UV sugárzást, mint a krisztallinok, ezért feltehetően az UV-A tartományban járulnak hozzá az abszorpcióhoz. Ezen molekulák koncentrációja jelentősen eltér a mag és a kéreg között. A fehérjékhez kötődő molekulák szintje szignifikáns változást mutat a korrallal.

Célkitűzés

Jelen munka során meg kívántuk vizsgálni

1. a lencsetokok és a lencse különböző rétegeinek UV elnyelő képességét,
2. a kor hatását a tokok és a lencse különböző részeinek abszorbanciájára és
3. az elülső és hátulsó rétegek UV abszorpciójának molekuláris hátterét.

Anyagok és módszerek

Kriosztát metszés

A tanulmányban összesen 44 darab humán lencsét használtunk fel, kizárólag olyanokat, melyek nem mutattak kóros elváltozást. A lencsén belüli különböző rétegek abszorbanciájának meghatározásához -18°C -on, kriosztátban $60\ \mu\text{m}$ vastag szeleteket készítettünk (összesen 38 lencséből), a lencse elülső részeitől a hátulsó részek felé haladva. A metszés előtt eltávolítottuk az elülső és hátulsó lencsetokot és fiziológiás sóoldatban tároltuk. Összesen kilenc metszet állt rendelkezésre lencsénként, kettő az elülső kéregből (1, 2 rétegek), öt a magból (3-7 rétegek) és kettő a hátulsó kéregből (8, 9 rétegek). A spektroszkópiai vizsgálatokhoz, a metszeteket és a tokokat külön-külön egy csepp fiziológiás sóoldatban két kvarclemezzel közé helyeztük.

Abszorbancia mérése spektrofotométerrel

A metszetek illetve a tokok abszorbanciáját egy kétutas spektrofotométerrel mértük meg. Az egyik karban a mintát helyeztük el,

míg referenciaként két kvarclemezt közé cseppentett fiziológiás sóoldatot szolgált. A két jel arányából meghatározható volt a minta abszorpciós együtthatója. A mért értékekből kiszámítottuk az abszorpciós együtthatókat a minta vastagságának ismeretében.

Proteomika

További hat lencsénél az elülső és hátulsó kéregből vett metszeteket két dimenziós gélelektroforézishez használtuk. Az eredményeket ProteomweaverTM szoftver segítségével értékeltük ki. Összehasonlítva az elülső és hátulsó kéregben lévő molekulák koncentrációját, összesen 14 fehérjét találtunk, melyek szignifikánsan eltérő értékeket mutattak. Mind MASCOT, mind Modiro TM kereséseket is lefuttatunk a molekulák pontos azonosításához.

Statisztika

Pearson korrelációt és leíró statisztika alkalmazásával határoztuk meg, hogy a kor és a lencséből vett minták illetve a tokok abszorpciós együtthatói között kimutatható-e szignifikáns korreláció. További számításokhoz kovariancia analízist (ANCOVA) használtunk.

A fehérjekoncentráció csoportok közötti eltéréseinek meghatározásához kétmintás t-próbát valamint Bonferroni és LSD korrekciókat használtunk.

Eredmények

A lencse abszorpciós karakterisztikája

Az átlagos abszorpciós együtthatót, hét különböző korcsoportban határoztuk meg: 7-19, 20-29, 30-39 ... 70-81 év között. Az UV-A tartományban az egyes rétegek átlagos abszorpciós együtthatói közel állandók és egyenlők. Átlépvé az UV-B tartományba ez a tendencia körülbelül 310 nm-ig folytatódik, majd egy meredek emelkedés figyelhető meg, ami az UV-B és UV-C határáig tart. A 280 nm-nél látható maximum után az abszorpciós együttható ugyanilyen mértékű csökkenést mutat 250 nm-ig, de még itt is jelentős az elnyelés. Tovább haladva a rövidebb hullámhosszak felé, az abszorpciós együttható ismét növekszik. A különböző mélységből vett metszetek ugyanolyan karakterisztikát mutatnak, és megfigyelhető, hogy a hátulsó rétegek felé az abszorpciós együttható nő. Kivételt képez a legfiatalabb korcsoport, amely esetében a magból vett minták azonos UV-elnyelő képességgel rendelkeznek. Az idősebb korcsoportokban már az UV-A tartományban is enyhe növekedés figyelhető meg, azonban a hátulsó rétegek nem minden esetben rendelkeznek nagyobb UV-elnyelő képességgel.

A tokok UV-elnyelő képessége

A lencsetokok abszorpciós spektrumában ugyanolyan karakterisztika figyelhető meg, mint a lencse különböző rétegeinél. Az UV-A tartományban enyhe növekedés látható, majd 280 nm-nél egy abszorpciós maximum látható. 250 nm alatt az abszorpciós koefficiens ismét emelkedik. A hátulsó lencsetokok nagyobb abszorpciós

együtthatóval rendelkeznek, mint az elülső lencsetokok, függetlenül a kortól. Az epitéliális réteg abszorpciós együtthatója az UV-C tartományban közel azonos az elülső tok értékeivel, azonban feltehető, hogy a teljes abszorbanciához nem járul hozzá szignifikánsan az elhanyagolható vastagsága miatt.

Korfüggő változások

A abszorpciós koeficiensek 280 nm-nél vett értékeiből egy adatbázist állítottunk össze. Az ANCOVA modell eredménye alapján elmondható, hogy a kor és a rétegek közötti korreláció mérsékelten szignifikáns ($p = 0,057$). Megvizsgáltuk minden egyes réteg abszorpciós koeficiensének változását a kor függvényében. Szignifikáns korrelációt találtunk a 6-os ($R = 0,371$, $p = 0,022$), 7-es ($R = 0,49$, $p = 0,002$) és 9-es ($R = 0,363$, $p = 0,041$) rétegek esetében. Ugyanezen számításokat elvégeztük a 360 nm-nél vett értékeknél is. Az ANCOVA modell szignifikáns korrelációt mutatott a kor és a réteg között ($p < 0,01$). Az abszorpciós koeficiensek változása szignifikáns volt az 5-ös ($R = 0,379$, $p = 0,047$), 6-os ($R = 0,614$, $p = 0,000$), és a 7-es ($R = 0,676$, $p = 0,000$) rétegek esetében.

A hátsó tokok nagyobb abszorpciós koeficienssel rendelkeznek, mint az elülsők, azonban az ANCOVA modell eredményei alapján ez a különbség nem szignifikáns ($p = 0,198$). A 280 nm-nél vett értékek esetében nem volt kimutatható szignifikáns korreláció a kor és a tokok abszorpciós koeficiense között.

Fehérjék az elülső és hátulsó kéregben

Összesen öt fehérjét azonosítottunk, melyek szignifikánsan különböző koncentrációban voltak jelen a két csoportban. Magas szekvencia lefedettséget (max. 90,83 %) sikerült elérni ezen fehérjék esetében. A peptideket tripszinnel és kimotripszinnel való bontással határoztuk meg. A két-dimenziós gélek esetében minden fehérje mennyiségi meghatározására ninhidrin próbát alkalmaztunk.

A Humán glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz, a Béta-krisztallin B2 lánc és a Béta-krisztallin A3 lánc magasabb koncentrációban voltak jelen az elülső kéregben. A Humán Alfa-krisztallin A lánc és a Béta-krisztallin B1 lánc a hátulsó kéregben mutatott emelkedett értékeket az elülsőhöz képest.

Diszkusszió

Meghatároztuk a lencsetokok és a szemlencse különböző rétegeinek abszorbanciáját, 7 és 81 éves kor között. Az átlagos abszorpciós spektrumokból látható, hogy a lencse lényegesen nagyobb elnyelőképeséggel rendelkezik az UV-B és -C tartományban, mint a hosszabb hullámhosszakon. Az UV-A tartományt vizsgálva, csak a fiatal lencsék mutattak szemmel látható változásokat.

Eredményeinkből látható, hogy az abszorpció növekszik előlről hátra felé haladva az optikai tengely mentén, kortól függetlenül. Az átlagos abszorpciós koefficiensek 280 nm-nél vett értékei egyértelműen mutatják, hogy a hátulsó kéreg abszorpciója változik legnagyobb mértékben a korról, míg az elülső kéreg esetében elhanyagolható a

korfüggés. A statisztikai analízis is azt bizonyította, hogy csak a lencse hátulsó részeiből vett minták esetében van szignifikáns korreláció. Az UV-A tartományban a mag középső és hátulsó részeiből vett minták esetében volt kimutatható összefüggés. A hátulsó tokok nagyobb abszorpciós koefficienssel rendelkeznek, mint az elülsők, kortól függetlenül, azonban szignifikáns korfüggő változást nem találtunk.

Kimutattuk, hogy a Humán glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz, a Béta-krisztallin B2 lánc és a Béta-krisztallin A3 lánc nagyobb koncentrációban voltak jelen az elülső kéregben. A Humán Alfa-krisztallin A lánc és a Béta-krisztallin B1 lánc viszont a lencse hátulsó részében volt magasabb. Egyértelmű, hogy az UV abszorpció lencsén belüli változásait a különböző fehérjék koncentrációbeli eltérései kísérik és a lencse hátulsó szegmenseinek korfüggő abszorbanciája összefüggésben lehet a fehérjék korfüggő változásaival.

A tézis alapjául szolgáló közlemények

I. Pajer V, Tiboldi Á, Bae N, Li K, Kang SU, Hopp B, Kolozsvári L, Lubec G and Nógrádi A, The molecular background of the differential UV absorbance of the human lens in the 240-400 nm range. 2013, *Photochem Photobiol*, 89: 856-863. Impakt Faktor: 2,684

II. Pajer V, Rárosi F, Kolozsvári L, Hopp B and Nógrádi A, Age-related absorption of the human lens in the near-ultraviolet range. 2019, *Photochem Photobiol*, php.13199. Impakt Faktor: 2,338 (2018)