

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО ОФТАЛМОЛОГИЯ

Д-Р ВАСИЛ МАРКОВИЧ ХАЙКИН

ИЗСЛЕДВАНЕ НА ПЪРВИЧНИ ЧОВЕШКИ КЛЕТЪЧНИ
КУЛТУРИ, ИЗОЛИРАНИ ОТ ПРЕДНИ ЛЕЩЕНИ КАПСУЛИ НА
ПАЦИЕНТИ С КАТАРАКТА

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И
НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР“

Област на висше образование: „Здравеопазване и спорт“, шифър 7.1

Научна специалност „Офталмология“, шифър 03.01.36

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ: ДОЦ. Д-Р АЛЕКСАНДЪР ХУГО
ОСКАР, ДМ

НАУЧЕН КОНСУЛТАНТ: ГЛ. АС. АНТОНИЯ РУМЕНОВА
ИСАЕВА, ДБ*

*КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ, МФ, МУ - СОФИЯ

СОФИЯ, 2021

Съдържание

СПИСЪК НА ТАБЛИЦИТЕ:	4
СПИСЪК НА ФИГУРИТЕ:	5
СПИСЪК НА СЪКРАЩЕНИЯТА:	6
ВЪВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА I	9
ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	9
1.1. <i>Ембриология на лещата</i>	9
1.2. <i>Анатомия на лещата</i>	11
1.3. <i>Физиология на лещата</i>	13
1.4. <i>Формиране на възрастово обусловена катаракта</i>	14
1.5. <i>Формиране на възрастово обусловената катаракта при пациенти със захарен диабет тип 2</i>	17
1.6. <i>Механизъм на образуване на вторична катаракта</i>	20
1.7. <i>Трупан blue</i>	22
1.8. <i>Култивиране на лещено епителни клетки</i>	24
ГЛАВА II	27
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	27
ГЛАВА III	29
МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	29
1. <i>Клиничен материал</i>	29
2. <i>Лабораторни консумативи, реактиви и материали</i>	30
3. <i>Методи на изследване</i>	32
3.1. <i>Получаване на експлант от човешка леща</i>	32
3.2. <i>Суправитално обогряне на експлантите</i>	33
3.3. <i>Получаване на първични ЛЕК от предна лещена капсула</i>	33
3.5. <i>Фазово-контрастно светлинно микроскопско наблюдение на ЛЕК</i>	34
3.6. <i>Цитохимично белязване на първични ЛЕК с Crystal violet</i>	34
3.7. <i>Белязване с 5-bromodeoxyuridine (BrdU) на първични ЛЕК</i>	35
3.8. <i>Имунофлуоресцентно маркиране на BrdU-белязаните първични ЛЕК</i>	35
3.9. <i>Имунофлуоресцентно белязване срещу Vimentin и N-cadherin</i>	36
3.10. <i>Стимулация с TGFβ2</i>	36
3.11. <i>siRNA-медирано заглушаване на ендегенната каталитична субединица (α) на протеин киназа CK2 в TGFβ2-стимулираните ЛЕК</i>	36
3.12. <i>Имунофлуоресцентно белязване срещу ERK1/2, CK2α, Vimentin и αSMA на TGFβ2-стимулирани, scrambled siRNA/CK2α siRNA-трансфектираните ЛЕК</i>	37
3.13. <i>Флуорисцентно оцветяване на живи първични ЛЕК</i>	37

3.14. Микроскопски анализи (Image-based high content screening) на цитохимична и мултифлуорисцентна микроскопия.....	38
3.15. Статистически анализ	38
ГЛАВА IV	40
РЕЗУЛТАТИ	40
1. Изследване на миграционната активност на ЛЕК.....	40
2. Изследване на пролиферативната и клоногенната активност на експоненциално растящи първични клетъчни култури.....	42
3. Фазово-контрастен и имунофлуоресцентен анализ на ЛЕК.....	46
4. Изследване на участието на протеин киназа CK2 в TGFβ2-индуцираният епително-мезенхимен преход на ЛЕК.....	49
5. Изследване на вътреклетъчния оксидативен стрес и калцификация на екстрацелуларния матрикс на първични клетъчни култури.....	50
ГЛАВА IV	55
ОБСЪЖДАНЕ	55
ГЛАВА V.....	61
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	61
ГЛАВА VI.....	62
ИЗВОДИ.....	62
ГЛАВА VII	64
ПРИНОСИ	64
БИБЛИОГРАФИЯ:	65

Списък на таблиците:

ТАБЛИЦА 1. РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ НА ПАЦИЕНТИ ПО ВИД КАТАРАКТА, ПОЛ И ВЪЗРАСТ.	30
ТАБЛИЦА 2. БРОЙ ЕКСПЛАНТИ И ВИД ОБАГРЯНЕ.	30
ТАБЛИЦА 3. КОЛОНИОФОРМИРАНЕ	44

Списък на фигурите:

ФИГУРА 1. ЕМБРИОНАЛНО РАЗВИТИЕ НА ЛЕЩАТА.....	10
ФИГУРА 2. IOL MASTER ОСТ ИЗОБРАЖЕНИЕ НА ПРЕДЕН ОЧЕН СЕГМЕНТ И ЛЕЩА.....	11
ФИГУРА 3. СХЕМАТИЧНА СТРУКТУРА НА ЛЕЩАТА.....	11
ФИГУРА 4. УВЕЛИЧАВАЩО СЕ ЖЪЛТО КЪМ КАФЯВО ОЦВЕТАВАНЕ НА ЛЕЩАТА С ВЪЗРАСТТА	15
ФИГУРА 5. ЗАХАРЕН ДИАБЕТ ТИП 2 ИНДУЦИРАНА КАТАРАКТА.....	17
ФИГУРА 6. ФОРМИРАНЕ НА ДИАБЕТНА КАТАРАКТА.....	19
ФИГУРА 7. ЛЕЩЕНО ЕПИТЕЛНИ КЛЕТКИ - СВЕТЛИННА МИКРОСКОПИЯ....	25
ФИГУРА 8. СТАТУЯТА НА КА-АРЕР.....	26
ФИГУРА 9. IN CELL ANALYZER 6000	34
ФИГУРА 10. ПЪРВИЧНИ ЛЕК КУЛТУРИ.....	41
ФИГУРА 11. КОЛОНИОФОРМИРАНЕ.	43
ФИГУРА 12. МУЛТИФЛУОРЕСЦЕНТНА МИКРОСКОПИЯ	45
ФИГУРА 13. ФАЗОВО – КОНТРАСТЕН И ИМУНОФЛУОРЕСЦЕНТЕН АНАЛИЗ НА ЛЕК	47
ФИГУРА 14. ОБОБЩЕН ФАЗОВО – КОНТРАСТЕН И ИМУНОФЛУОРЕСЦЕНТЕН АНАЛИЗ НА ЛЕК	48
ФИГУРА 15. АКТИВНОСТ НА ERK 1/2 (%) ПРИ 24-ЧАСОВОТО ТРЕТИРАНЕ НА ЛЕК С TGF- β 2	49
ФИГУРА 16. АКТИВНОСТ НА SK2 (%) ПРИ 12-ЧАСОВОТО siRNA-МЕДИИРАНО ЗАГЛУШАВАНЕ НА ЕНДОГЕННАТА КАТАЛИТИЧНА СУБЕДИНИЦА (A) НА ПРОТЕИН КИНАЗА SK2	50
ФИГУРА 17. ТРОЙНО ФЛУОРЕСЦЕНТНО МАРКИРАНЕ НА ЖИВИ ЛЕК	51
ФИГУРА 18. ОТНОСИТЕЛНИ НИВА НА ВЪТРЕКЛЕТЪЧНИЯ ОКСИДАТИВЕН СТРЕС (ROS) И НА КАЛЦИФИКАЦИЯТА НА ЕКСТРАЦЕЛУЛАРНИЯ МАТРИКС (Ca^{2+}) НА ЖИВИ ЛЕК	54

Списък на съкращенията:

АТФ - аденозин трифосфат

ВК - вторична катаракта

ВОЛ - Вътреочна леща

ДНК - дезоксирибонуклеинова киселина

ЗД2 - Захарен диабет тип 2

ЕМП – епително-мезенхимен преход

ЛЕК - лещени епителни клетки

ПЛК - предна лещена капсула

BrdU - Bromodeoxyuridine

DAPI – Diamidino phenylindole

DCFDA - Dichlorofluorescein diacetate

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid

EGF - epithelial growth factor

ERK 1/ 2 - Extracellular regulator kinases 1 and 2

FBS – fetal bovine serum

FGF - 2 - fibroblast growth factor 2

FOXM1- Forkhead box protein M1

IL-1 - interleukin 1

IL-6 - interleukin 6

PBS - Phosphate - buffered saline

ROS - reactive oxygen species

RNS - reactive nitrogen species

α -SMA - α -Smooth Muscle actin

TB - Trypan blue

TGF- β - transforming growth factor- β

XO – xylene orange

Въведение

Възрастово обусловената катаракта е едно от най-честите заболявания сред хората над 50 годишна възраст (1,2). Тя е водеща причина за обратима слепота в света с над 17 000 000 ослепели (3). Катаракталната екстракция с имплантация на вътреочна леща е най-успешната и най-често извършвана оперативна интервенция в медицината, като се очаква да достигне до 30 милиона годишно. Факоемулсификацията се характеризира с по-слабо изразено постоперативно възпаление и по-ниска вероятност за образуване на вторична катаракта, спрямо останалите оперативни техники (2,4–6).

Захарният диабет тип 2 е неинфекциозно епидемично (социално значимо) заболяване с постоянно нарастващ брой заболели, като се очаква диабетно болните до 2030 год. да достигнат 439 милиона. Катарактата е водеща причина за намалено зрение при пациентите с диабет, като нейната честота сред тях е по-висока в сравнение с недиабетно болните (7).

Уплътнението и помътняването на задната лещена капсула, известно като „вторична катаракта“ (ВК), е най-честото дългосрочно усложнение на катаракталната хирургия (8–11). Съвременните хирургични техники, материали и дизайн на вътреочните лещи (ВОЛ) водят до намаляване на честотата на ВК. Въпреки това, тя остава значим проблем при 20 до 40% от пациентите за периода от 2 до 5 години след катаракталната хирургия (8). Наблюдава се повишаване на честотата ѝ с намаляване на възрастта на пациентите, като в педиатричната група достига до 100% (12,13).

Единственият доказал се метод за лечение на ВК е Nd:YAG лазер капсулотомията, който от своя страна се свързва с усложнения, като отлепване на ретината, увреждане на ВОЛ, кистоиден макулен едем, повишено вътреочно налягане, ирисова хеморагия, оток на роговицата, сублуксация на ВОЛ и екзацербация на ендофталмит (8).

Задълбоченото изучаване на физиологията на лещено епителните клетки е от изключително значение за установяване на патогенетичните механизми, водещи до образуване на възрастово обусловените и на вторичните катаракти, както и за намаляване на тяхната честотата, и постигане на дългосрочен положителен ефект от хирургичното лечение.

Това е първото по рода си изследване в България, в което се култивират и изследват първични човешки лещено епителни клетки от недиабетно и диабетно болни пациенти с възрастово обусловена катаракта.

Глава I

Литературен обзор

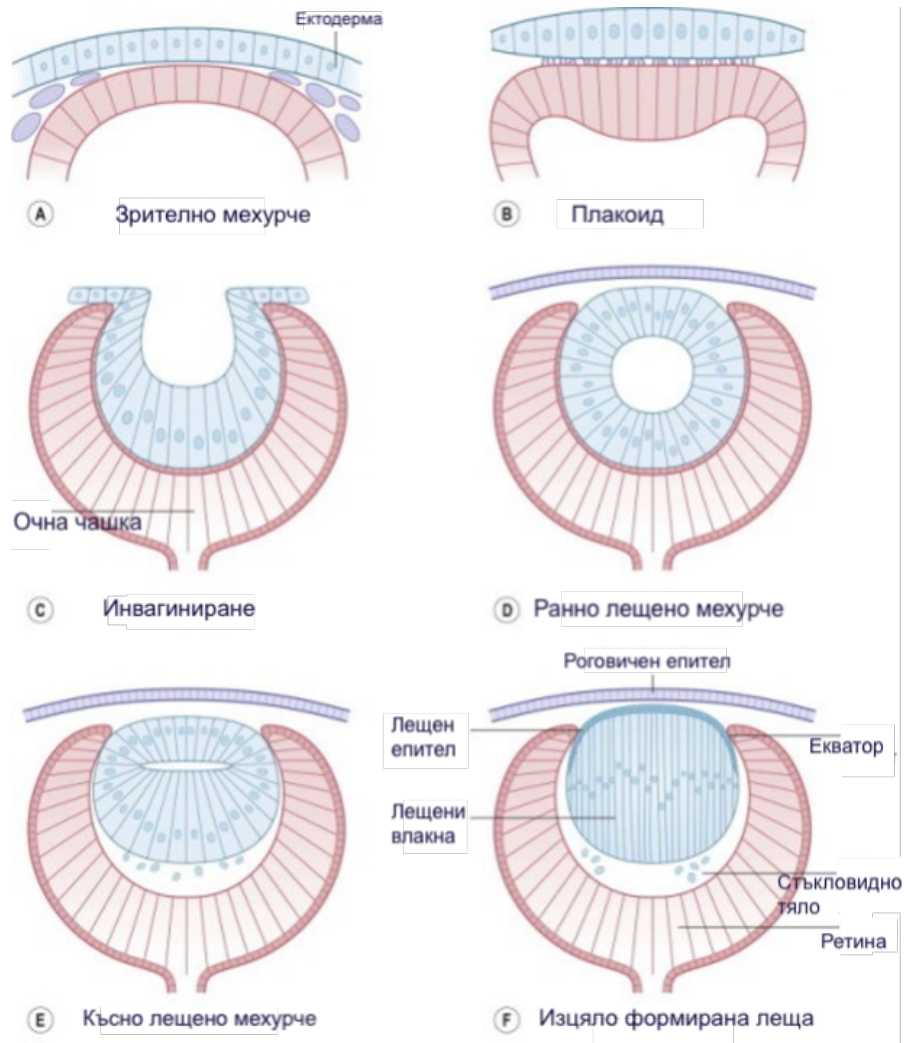
1.1. Ембриология на лещата

Лещата произхожда от кожната ектодерма. Около 27^{ми} гестационен ден в нея се образува задебеляване, лещен плакоид, което се прищъпва и формира лещено мехурче. То е покрито с единичен слой епителни клетки, лежащи върху базална мембрана. Клетките от задната повърхност на лещеното мехурче се удължават и образуват първичните лещени влакна. Напред те достигат до кубоидните епителни клетки, облитерирайки лумена на мехурчето. Първичните лещени влакна се формират до 3^{ти} гестационен месец и образуват ембрионалното ядро на лещата. Така задният полюс на лещата остава без епител. Вторичните лещени влакна водят своето начало от екваториалните клетки на предния епител. Отпред се разполагат под епитела, а отзад под лещената капсула. Така се образува феталното ядро. Върховете на растящите вторични лещени влакна се срещат и образуват Y-подобни шевове. След раждането влакната продължават да се удължават и делят, формирайки ювенилното ядро. При възрастните, влакната формират възрастното ядро. Растящите около него влакна образуват лещения кортекс (14–16) (Фигура 1).

По време на ембрионалното и фетално развитие, лещата е обвита и се изхранва от структура с мезенхимен произход - *tunica vasculosa lentis*, кръвоснабдявана от *arteria hyaloidea* (15).

Образуването на лещата се управлява от различни транскрипционни фактори и сигнални молекули. Основна роля играят SOX2 и PAX6. Те се експресират в очното мехурче, още преди формирането на очната чашка. Съществуват данни, че тези два транскрипционни фактора се експресират

в предната неврална плака и по цялото протежение на очното мехурче още преди формирането на очната чашка (17,18).

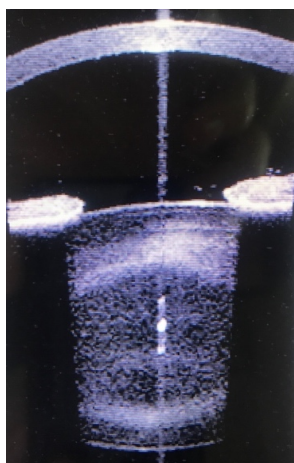


Фигура 1. Ембрионално развитие на лещата - (А) Лещеното мехурче контактува с повърхностната ектодерма. (В) Лещеното мехурче се прилепва към повърхностната ектодерма и бъдещите клетки на лещата се издължават, за да образуват лещения плакоид. (С) Плакоидът и външната повърхност на очното мехурче се инвагинират, за да образуват съответно ямаката на лещата и оптичната чашка. (D) Лещеното мехурче се отделя от повърхностната ектодерма. (E) Първичните влакна на лещата се удължават и започват да облитерират лумена на лещеното мехурче. (F) Конфигурацията на лещата, когато започва да расте. Клетките на вторичните влакна все още не са се развили и органелите все още присъстват във всички клетки. /Източник: Adler's Physiology of the Eye, Leonard Levin, 2011, Chapt. The Lens, p. 258-338, David C. Beebe, Elsevier./

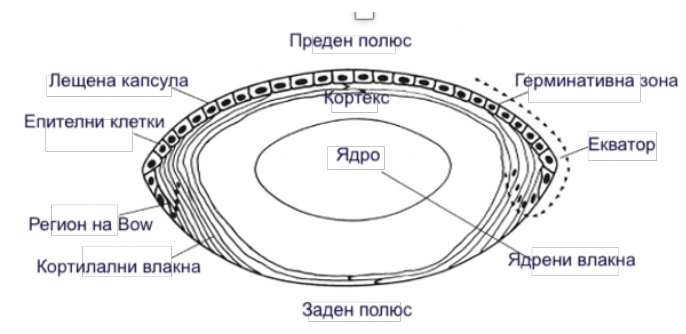
1.2. Анатомия на лещата

Човешката леща е прозрачна, биконвексна структура, която изпълнява 3 основни функции: да поддържа прозрачността си, да участва в оптичния апарат на окото и в процеса на акомодация. Тя няма кръвоносни съдове и нервни влакна, като разчита изцяло на вътреочната течност за задоволяване на метаболитните си нужди (16,19). Тази характеристика на лещата я прави идеален модел за изследване с теоретично и клинично значение на процеси като клетъчен растеж, пролиферация и диференциация, трансмембранен транспорт, и белтъчен синтез (20). Разположена е в задната камера и се поддържа се от т.нар. Цинови връзки, произлизащи от непигментирания епител на цилиарното тяло.

Човешката леща е изградена от лещена капсула, лещен епител (лещено епителни клетки, ЛЕК), лещени влакна и зонуларен апарат (Фигура 2, Фигура 3).



Фигура 2. IOL Master OCT изображение на преден очен сегмент и леща на пациент с възрастово обусловена катаракта /Клиника по очни болести, УМБАЛ Александровска/



Фигура 3. Схематична структура на лещата; /Източник: ААО, Lens and Cataract, 2019-2020;/

Лещената капсула е еластична, прозрачна базална мембрана, съставена основно от ламеларно подреден колаген тип IV (21). Наблюдават се три зони: най-дебела предна около 16 μm , екваториална и най-тънка задна около 2-4 μm . В екваториалната зона се сливат зонулите (22). Под предната лещена капсула е разположен един слой кубоидни епителни клетки, които поддържат предната лещена капсула и участват в метаболитния транспорт. Преекваториално в герминативната зона са разположени ЛЕК, които са митотично активни и дават началото на вторични лещени влакна. Те се образуват в резултат на миграция и диференциация на епителните клетки, при което се удължават и губят органели, включително клетъчното ядро, митохондрии, рибозоми. Този процес на терминална диференциация протича през целия живот на човека и най-младите (т.е. най-късно образуваните лещени влакна) са разположени най-повърхностно и са по-дълги от предходните (22,23). Хексагоналното сечение и диаметър на лещените влакна са оптимални за рефракцията на светлина. Цитоплазмата е богата на протеини, наречени кристалини. Кристалините са преобладаващите структурни протеини в лещата, съставляващи около 90% от водоразтворимите протеини на лещата. Трите основни типа кристалини са α , β и γ кристалини (24). Те са склонни да образуват разтворими агрегати с високо молекулно тегло, които плътно се пакетират в лещените влакна, като по този начин увеличават индекса на пречупване на лещата и същевременно поддържат нейната прозрачност. Основните кристалини са α кристалините, състоящи се от 2 субединици - αA и αB . Те изпълняват ролята на шаперони, които предпазват протеините от агрегация и преципитация (22,24–26). Също така участват в състава на междуклетъчните каналчета (gap junction), водните канали, адхезиите тип „клетка-клетка“, участват в ремоделирането и защитата на цитоскелета, осигуряват прозрачността на лещата, инхибират апоптозата и имат антиоксидативна функция (22,27).

1.3. Физиология на лещата

Физиологичната функция на лещата, заедно с роговицата, е да фокусира образи върху ретината. За тази цел е необходимо тя да бъде прозрачна, да има относително висок рефракционен индекс и да е способна да акомодира. Прозрачността изисква минимално наличие на разсейващи светлината елементи, еднотипна подредба на фибрилите и минимално разстояние между тях (28,29). Високият рефракционен индекс - изобилие от водноразтворими цитоплазмени протеини, кристалини, а акомодацията изисква флуидност на цитоплазмата и клетъчните мембрани (29).

Лещата е подложена на оксидативен стрес, причинен от кислородни и азотни свободни радикали (ROS/RNS) (19). Високата митотична активност в преекваториалната зона на предния епител и светлинната експозиция, в частност УВ-радиацията са предпоставки за образуването на свободни радикали (28). Лещата притежава уникална антиоксидантна система, състояща се от редица ензими и молекули, сред тях каталаза и глутатион пероксидаза. Каталазата превръща водородния прекис във вода, а глутатион пероксидазата, осъществява окисление до глутатион. Глутатионът има клетъчно протективна функция и предпазва от образуване на катаракта (19,28).

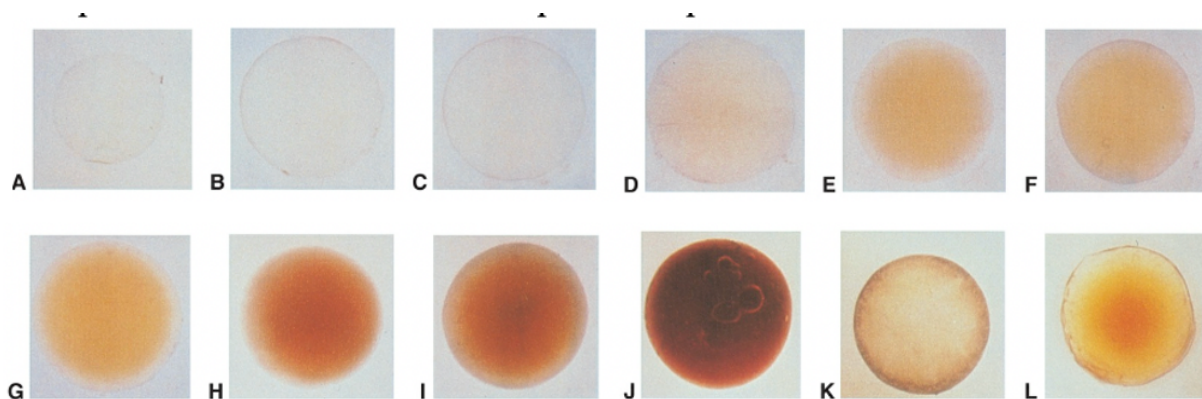
Поради своята аваскуларна структура, метаболитите се доставят основно от вътреочната течност и в по-малка степен от стъкловидното тяло (16,19). Обмяната на веществата се извършва чрез транспортни механизми в полупропускливата лещена капсула, напр. $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATP}$ -азни помпи (16,28). Мембранното равновесие и хомеостаза се поддържат от активнотранспортни $\text{Na}^+\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ и $\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ канали (28,30). Движението на вода се осъществява посредством двупосочни аквапорини (28). Лещата поддържа сравнително дехидратирано състояние, като съдържанието на

вода варира от 60-75%. С напредване на възрастта общото количество вода намалява (31). Na^+/K^+ /АТФазни помпи поддържат натриево-калиевия градиент, чрез активен транспорт на калиеви йони и аминокиселини към лещата, и на натриеви и хлорни йони извън нея. По този начин се поддържа ниска водна концентрация, която допринася за прозрачността на лещата. Парциалното налягане на кислорода около лещата е ниско и енергията за метаболитните ѝ нужди се набавя чрез анаеробна гликолиза. Анаеробната гликолиза е основен енергиен източник за активния транспорт през епитела (32).

1.4. Формиране на възрастово обусловена катаракта

Катаракта се нарича всяко помътняване на човешката леща. За клинично значима се приема катаракта, която оказва негативно влияние върху зрението (33). Тя е мултифакторно заболяване, свързано с редица рискови фактори: генетични фактори, възрастови дегенеративни промени, травматични, възпалителни и дегенеративни заболявания на очите, метаболитни (диабет, галактоземия и др.), употреба на токсични субстанции, излагане на ултравиолетова радиация и електромагнитни вълни и др. (34).

Възрастово обусловената катаракта е заболяване, което се наблюдава при пациенти над 50 години (Фигура 4) и не е свързано с предходна механична, химична или радиационна травма (34).



Фигура 4. Увеличаващо се жълто към кафяво оцветяване на лещата с възрастта A-6м. B- 8г. C-12г. D-25г. E-47г. F-60г. G-70г. H-82г. I-91г. J- Брунесцентна катаракта (70г.) K-кортикална катаракта(68г) L- нуклео-кортикална катаракта (74г.); Източник: AAO, *Lens and Cataract*, 2019-2020;

Основните видове възрастово обусловена катаракта, спрямо локализацията в лещата са нуклеарна, кортикална и задна субкапсуларна (19). Формирането на катарактата е свързано със загуба на равновесието между оксидативния и антиоксидативния статус, с мембранна липидна пероксидация, с дефектна клетъчна комуникация, с нарушено йонно равновесие, с модификация, агрегация и натрупване на протеини, с клетъчна смърт, с възпаление и др. (19,35–41).

Промени в лещените протеини - дисбаланс между оксиданти и антиоксиданти

Хипероксидативните свободни радикали имат съществена роля в индуцирането на апоптоза в норма и патология. Митохондриите са едновременно източника и таргетната структура на ROS (42). Оксидативният стрес чрез ROS и индуцираната апоптоза, заедно с намалената антиоксидантна активност, се предполагат като отговорни за развитието на различни видове катаракта (43–46). Лещата разполага с редица ензимни антиоксиданти: супероксид дисмутаза, каталаза,

глутатион пероксидаза, глутатион редуктаза, глутатион-S-трансфераза, тиоредоксинова система и др., а също и с неензимни антиоксиданти: редуциран глутатион, аскорбинова киселина, витамин А, Е и др., които я предпазват от увреждане (19,47–51). Спад в активността на антиоксидантните ензими и молекули от една страна, и високи нива на силно реактивни и нестабилни съединения от друга, водят до формиране на катаракта (19,45,46,52). Освен това с напредване на възрастта, антиоксидантите проникват по-трудно в ядрото на лещата, което го излага на висок оксидативен стрес (34).

Правилното подреждане и структуриране на протеините в лещата е от първостепенно значение за прозрачността ѝ. Оксидативният стрес, заедно с протеолиза, трансамидация, карбамилиране, фосфорилиране и липидна пероксидация водят до увреждане на структурни и функционални протеини в лещата, и нарушена физиологична функция на клетъчните мембрани (19,53). Убиквитин-протеазомната система е отговорна за отстраняването на засегнатите лещени протеини. Нейната активност намалява с възрастта и с увеличаване на свободните радикали. Компрометираната функция на тази система води до помътняване на лещата (19).

С възрастта, също така, се наблюдават промени в α -кристалините и намаляване на антиоксидантната им активност. Те намаляват и след 40 годишна възраст изчезват от ядрото на лещата (54,55). Това води до покачване нивата на β и γ кристалините, съответно до повишена агрегация, cross-linking и повишено разсейване на светлината (54,56,57).

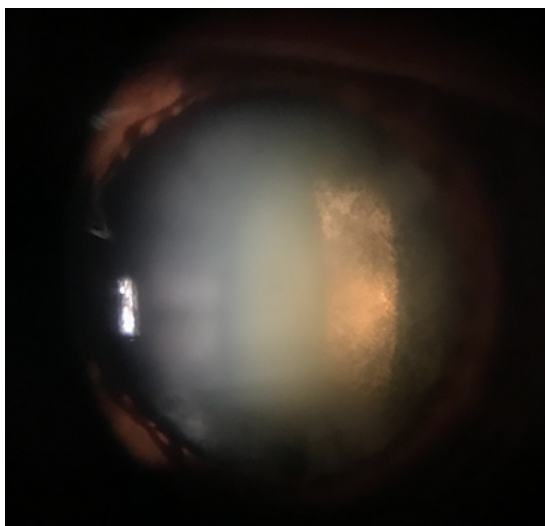
Промени в лещено епителните клетки

Още през 1952 г. von Sallmann изказва мнение за ролята на ЛЕК в катарактогенезата (20,58). Vermbach открива морфологични промени в стареещите ЛЕК - от малки епителни клетки с ясно различими ядра при

младите ЛЕК, през вакуолизация [израз на загуба на цитоплазмени органели и асоциирана с предстояща клетъчна смърт (59)] на застаряващите клетки до изчезване на клетъчните ядра и поява на вътреклетъчни филаменти (20). Докладвани са различия в апоптотичните лещено епителни клетки при пациенти със захарен диабет тип 2 (ЗД2), в сравнение с пациенти с възрастово обусловена катаракта. Апоптозата на лещено епителните клетки може да бъде индуцирана също така и от хипергликемия (43,44).

1.5. Формиране на възрастово обусловената катаракта при пациенти със захарен диабет тип 2

Класическата диабетна катаракта тип „снежинки“ е рядко срещана при ЗД2. Типична находка при диабетната катаракта е кортикално и задно субкапсуларно помътняване (43,60,61) (Фигура 5). В болшинството от случаи диабетно болните пациенти развиват възрастово обусловена катаракта, структурно неразличима от тази при недиабетно болните.



Фигура 5. Захарен диабет тип 2 индуцирана катаракта: спицовидни мътнини и уплътнена задна лещена капсула /Клиника по очни болести, УМБАЛ Александровска/

Появата на катаракта при пациентите със ЗД2 настъпва в по-ранна възраст, в сравнение с недиабетно болните (7,61,62). Основните предполагаеми механизми за развитието на катаракта при пациенти със ЗД2 са три (43)(Фигура 6):

➤ **Полиолов път**

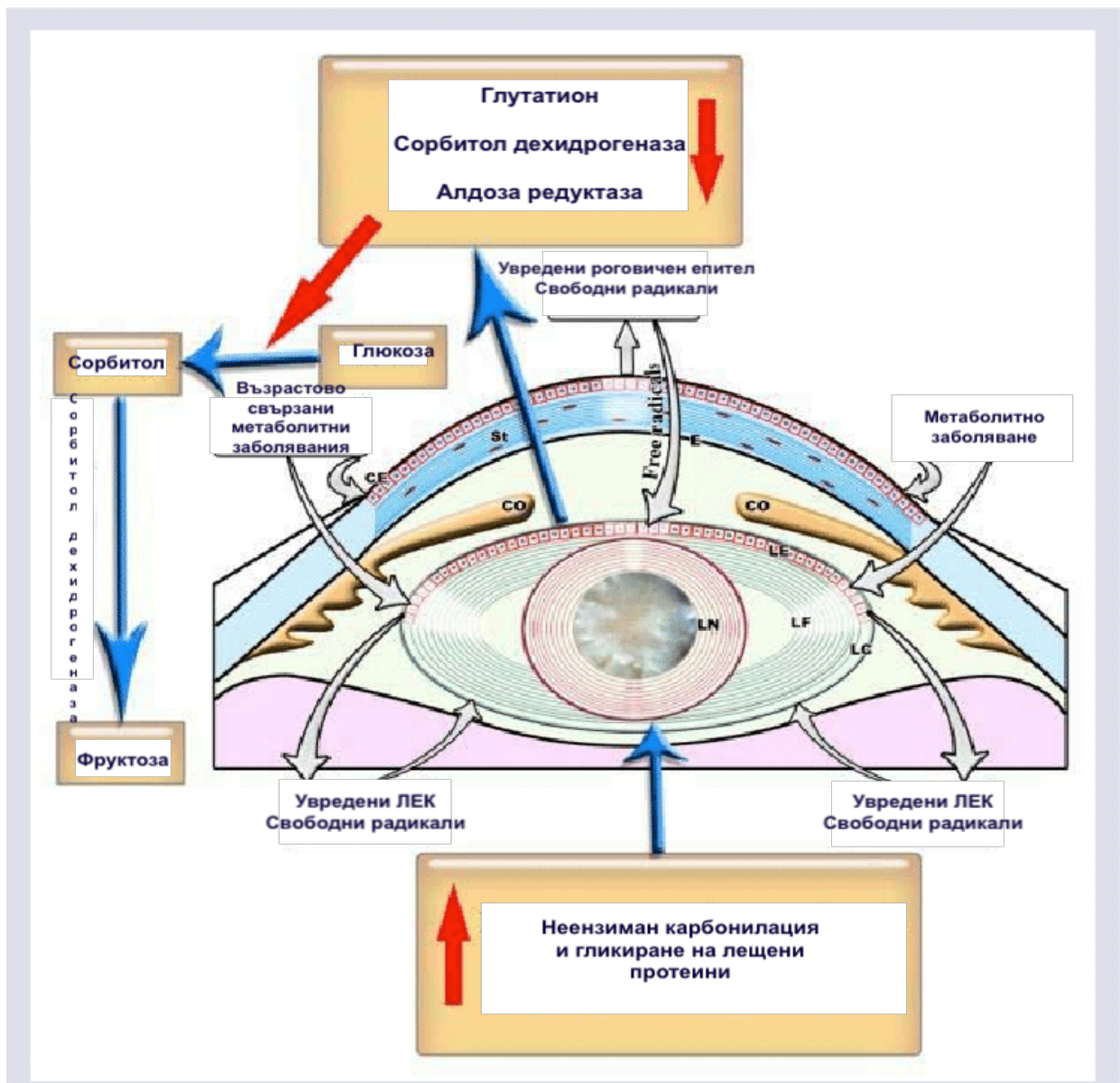
Свързва се с продължителна хипергликемия, вариации в нивата на глюкоза в кръвта и натрупване на сорбитол в лещата. Сорбитолът се произвежда през полиоловия път, след като глюкозата се редуцира в реакция, катализирана от ензима алдоза редуктаза. По-високи концентрации на ензима се откриват в лещено епителни клетки, подложени на осмотичен и оксидативен стрес (57,63). Повишените нива на сорбитол в лещата и хипергликемията водят до хиперосмотична промяна, приток на течности в клетките, образуването на супероксидни радикали и на водороден пероксид, дегенерация на лещените влакна и помътняване на лещата (7,64,65).

➤ **Гликиране (неензимно гликозилиране) на лещени протеини**

Натрупват се крайни продукти на напредналата гликация в лещата, произхождащи от ЛЕК и лещените влакна. Акумулират се гликирани β - и γ - кристалини, настъпват протеолиза и агрегация. Крайни продукти на напредналата гликация водят по повишени нива на оксидативен стрес (3,60,66).

➤ **Повишен оксидативен стрес**

Оксидативният стрес в лещата настъпва в ранните етапи на диабета. Той е свързан с повишена активност на алдоза редуктаза, неензимно гликиране, активиране на протеин киназа С, повишени нива на вътреклетъчен Ca^{2+} , активиране на МАРК и др. (60). Сред лещено епителните клетки, изложени на оксидативен и осмотичен стрес се наблюдава апоптоза (62,63).



Фигура 6. Формиране на диабетна катаракта (3)

При пациентите със ЗД2 се наблюдават редица трудности, свързани с оперативното лечение на катаракта - повишено увреждане на ендотела и на пигментния епител на ириса, повишена съдова пропускливост, високи нива на проинфламаторни фактори, отлагане на фибрин и др. Почесто срещани са и постоперативните усложнения - повишен риск от образуване на синехии, настъпване на зеничен блок, бърза прогресия на вторична катаракта (67). При придружаваща диабетна ретинопатия (ДР) - постоперативно влошаване на тежестта на ретинопатията, поява на

диабетен макулен едем, хемофтальм, рубеоза на ириса и неоваскуларна глаукома (7). С оглед на повишения риск от настъпване на усложнения, възпрепятстващи визуализацията на очното дъно, е редно активната ДР да бъде лекувана предоперативно (7,67). Въпреки това, когато помътнената леща не позволява адекватно диагностициране и лечение на ДР, оперативното лечение на катаракта е от първостепенно значение (7).

1.6. Механизъм на образуване на вторична катаракта

Уплътняването и помътняване на задната лещена капсула е резултат от пролиферация, миграция и трансформация на остатъчни ЛЕК от предната лещена капсула, след екстракапсулна екстракция на катаракта (8,68). Оперативната интервенция уврежда кръвно-водната бариера, повишавайки експресията на растежни фактори и цитокини, в резултат на която остатъчните ЛЕК пролиферират и мигрират към задната лещена капсула, претърпяват епително-мезенхимна трансформация/преход (ЕМП), отлага се колаген и се синтезират лещени влакна (8,9). Клинично се различават 2 морфологични типа ВК: фиброзен и перлен. Фиброзният се причинява от пролиферация и миграция на ЛЕК, които претърпяват ЕМП и фиброзна метаплазия. Перленият тип се причинява от абнормен опит на ЛЕК, намиращи се в екватора на лещата, да се диференцират в кристалин експресиращи лещени влакна, формиращи перли на Elschnig и пръстен на Soemmering (8,69).

Редица регулаторни фактори играят основна роля при образуването на ВК. Wormstone и колеги доказват, че за своя растеж остатъчните ЛЕК не се нуждаят от чужди растежни фактори, а синтезират автокринни такива (70,71). Сред тях са трансформиращ растежен фактор β (transforming growth factor - β , TGF- β), фибробластен растежен фактор 2 (fibroblast growth factor 2, FGF-2), хепатоцит растежен фактор (hepatocyte growth

factor), интерлевкин (interleukin, IL) 1 и 6, епителен растежен фактор (epithelial growth factor).

TGF- β е сред основните индуктори на ЕМП. Той представлява мултифункционален цитокин, участващ в ембриогенезата и тъканната хомеостаза (72). В лещата се експресират три изоформи, като TGF- β 2 е с най-висока концентрация и се активира в следствие на травма (68). Представители на FGF семейството са от значение за формиране и поддържане на нормалната лещена структура и функция. *In vitro* се доказва ролята им за пролиферацията, миграцията и диференциацията на ЛЕК. FGF-2 способства образуването на ВК чрез стимулиране пролиферацията на ЛЕК. Хепатоцит растежният фактор също индуцира пролиферация на ЛЕК, а епителният растежен фактор тяхната миграция. IL-1 стимулира митозата и колагеновата синтеза от ЛЕК. Под влияние на IL-1 ЛЕК синтезират простагландин-Е₂, който води до възпалителна реакция след катаракталната хирургия. Предполага се, че IL-6 оказва медиращо действие върху IL-1. През последните години се установява и основната роля на съединително тъканния растежен фактор (connective tissue growth factor) (9,72). Той е тясно свързан с TGF- β , участва в митозата, във фибробластната пролиферация, в синтеза на колаген и на екстрацелуларен матрикс, в клетъчната адхезия, в миграцията, и фиброзирането (8,9). Основният патологичен фактор, свързан с формирането на ВК е ЕМП (9,11). Характеризира се с настъпващи клетъчни морфологични промени, загуба на епителния характер, реорганизиране на актина и на интерстициалния клетъчен фенотип. ЛЕК се трансформират в миофибробласти (11). TGF- β индуцира експресията на α -Smooth Muscle actin (α -SMA) - ключов фактор на клетъчната фиброза и специфичен маркер на миофибробластите и ЕМП. Промяната в структурата на актиновия цитоскелет и индукцията на α -SMA са в основата на контрактилитета на трансдиференциралите се клетки, тяхната миграция и инвазия. Колаген тип 1 и фибронектин, а също така

лумикан и хиалуронова киселина се разпределят по повърхността на клетките и пространствата между тях, формирайки екстрацелуларен матрикс, мрежовидна структура, способстваща клетъчната миграция (9).

Митоген-активируемият протеинкиназен път (МАРК) представлява верига от протеини в клетката, която предава сигнали от рецептори на повърхността ѝ до ДНК в ядрото. МАРК включва множество протеини, сред тях извънклетъчните сигнално-регулирани кинази 1 и 2 (ERK 1/2), които имат важна роля в основни клетъчни процеси като диференциация, пролиферация, клетъчен цикъл и апоптоза. Те фосфолирират съседни протеини, като по този начин ги активират или дезактивират. Протеин киназа СК2 фосфорилира ERK и регулира ядрената ѝ активност (73). СК2 е активен ензим, фосфорилиращ голямо разнообразие от протеини, поддържайки клетъчната морфология и клетъчна полярност (74,75). Представлява серин / треонин киназа, която най-често се открива като тетрамер, състоящ се от две каталитични субединици (α и / или α') и две регулаторни субединици (β). Нейното широкоспектърно действие включва СК2 в почти всички аспекти на клетъчната физиология и нейната ключова роля в регулирането на генната експресия и сигналната трансдукцията е безспорна (76). Известно е, че протеин киназа СК2 е необходима за осъществяването на TGF- β индуцирана ЕМП (75), но участието на СК2 в ЕМП на ЛЕК не е изследвано до момента.

1.7. Trypan blue

Багрилата са химични съединения, които се свързват с определени вещества, индуцирайки промяна в цвета им. Багрилата, които оцветяват живи тъкани или клетки се наричат витални. Виталното оцветяване, извършвано в жив организъм се назовава интравитално, а когато се извършва върху живи клетки, непосредствено след отстраняването им от организма - суправитално (77).

Trypan blue (ТВ) е анионно, хидрофилно багрило със следната химична формула $C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$ и молекулна маса от 960.79 далтона, принадлежащо към групата на азо-багрилата. Те се образуват, когато diaзониев йон се свърже с фенол, или с амин. Азо-връзката позволява абсорбция на видимата светлина от багрилата, което води до брилянтно оцветяване с висок интензитет. Виталните клетки с интактна клетъчна мембрана обикновено не се багрят, поради селективния си мембранен транспорт, който не позволява свързване с ТВ (78).

Виталното багрило *trypan blue* е синтезирано през 1904 год. от Paul Ehrlich. Използвано е в Африка като химиотерапевтичен агент срещу трипанозомни инфекции, причиняващи сънна болест (79,80).

За първи път ТВ се използва в офталмологията през 70^{те} години на XX^{ти} век за обагряне на роговичния ендотел. Багрилото оцветява ядрата на увредените и мъртви ендотелни клетки (77). През 1999 год. Melles и съавтори съобщават за първи път за използването на ТВ по време на катарактална хирургия за визуализиране на ПЛК и улесняване на капсулорексиса при матурна катаракта (81,82).

Факоемулсификацията изисква извършването на непрекъснат кръгов капсулорексис и багрилото ТВ е станало важно средство за подобряване визуализацията на предната лещена капсула, особено при по-неопитни хирурзи и при случаи с матурна катаракта (81,83–85). ТВ е сред най-често използваните агенти в катаракталната хирургия (77). ТВ 0,1% има предимство пред останалите химични съединения, тъй като оцветява селективно предната лещена капсула, отмива се лесно от предната очна камера и не причинява трайно оцветяване на очните структури (86). За разлика от други багрила, ТВ оцветява селективно базалната мембрана в близост до епителния слой на ПЛК и минимално оцветява повърхностния й слой (77). Използваната концентрация за обагряне на ПЛК варира в различните проучвания от 0.6 до 0.0125%. Най-често използваната концентрация е 0.06%. Препоръчителната времева

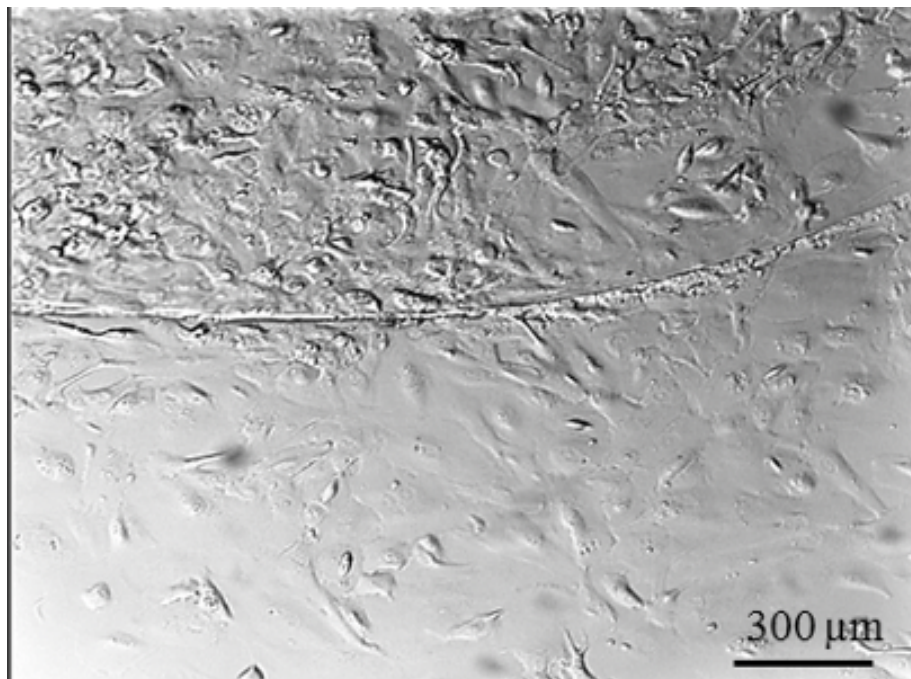
експозиция на ПЛК при *in vitro* изследвания е 60 секунди, като в клиничната практика експозицията е едва няколко секунди (78,82).

Rangaraj проучва ефекта на ТВ върху повърхностния интегритет на предната лещена капсула. Той установява електронномикроскопски идентични промени в капсулите, получени чрез рутинен капсулорексис от третирани и нетретирани с 0,1 % ТВ очи (87).

Въпреки че *in vitro* проучвания са показали, че при концентрация от 0,025 до 5,0 mg/ml ТВ няма ефект върху виталността на ЛЕК, Nanavaty и съавтори съобщават за значително намаляване плътността на ЛЕК по предната лещена капсула след използване на 0,0125% ТВ за 30 сек. в сравнение с нетретирани очи (88,89). Portes и съавтори установяват смърт на ЛЕК при използване на 0,1% ТВ. В пробите от очите, третирани с ТВ се установяват промени в ЛЕК, като руптури в ендоплазмения ретикулум и митохондриите, увеличаване на клетъчното ядро, за разлика от пробите, получени от нетретирани очи, където клетъчните ядра са по-малки и еухроматични (10). Имунохистохимичният тест за експресия на *bcclin-1* показва клетъчна смърт чрез автофагия само в групата на третирани с ТВ очи. Sharma и съавтори. установяват значително намаляване на честотата на вторичната катаракта при очи, в които ТВ е инжектиран в капсулния сак след хидродисекцията (90). Тези изследвания изказват хипотеза, че оцветяването с ТВ може да помогне за понижаване виталността на лещените епителни клетки и намаляване честотата на помътняване на задната лещена капсула.

1.8. Култивиране на лещено епителни клетки

ЛЕК (Фигура 7) поддържат нормалната физиология и хомеостаза на лещата, затова първичните човешки клетъчни култури са източник на важна информация за ролята на епителните клетки в норма и в патология (19,91).



Фигура 7. Лещено епителни клетки - светлинна микроскопия / Катедра по медицинска химия и биохимия/

Клетъчното култивиране на ЛЕК е описано за първи път от Mayer, който успява да култивира говежди ЛЕК през 1969 г. Ringens изследва човешки ЛЕК през 1982, като се позовава на три опита на Tassin, Malaise и Courtois, Eguchi и Kodama, Perry, Tassin и Courtois от 1979 г. През същата година свои изследвания върху ЛЕК провеждат Francois и Victoria-Troncoso. В литературата се откриват трудовете на Reddan, който изследва и съпоставя човешки със заешки ЛЕК и открива, че човешките ЛЕК са изключително чувствителни и взискателни към състава на хранителната среда, и трудни за *in vitro* култивиране (20,92). Vermbach, за разлика от своите предшественици, които използват криоекстракция, използва щадяща микрохирургична техника за отстраняване на ПЛК с прилежащите ЛЕК (20).

Ограничените източници на първичните човешки клетъчни култури от предни лещени капсули, ниският им виталитет и високата им

чувствителност към механични травми, контаминация, токсичност на реагенти и замразяване ги правят изключително трудни за изследване (91).

Повече от четири хилядолетия след първата документирана катаракта (93) (Фигура 8), механизмите на помътняване на човешката леща не са напълно изяснени. В настоящия труд е представено изследване върху човешки лещено епителни клетки, проведено в страната за първи път, целящо да обогати познанието ни за първичната и вторична катарактогенеза.



(A)

(B)

Фигура 8. А. Статуята на Ка-апер - 5-та династия (около 2457-2467 г. пр. Н. Е.) (Египетски музей, Кайро, Египет); В. Бял зеничен рефлекс в ляво око, съответстващ на матурна катаракта (J Cataract Refract Surg 2001;27(11):1714-5)

Глава II

Цел и задачи

Цел:

Изолиране и поддържане на първични човешки лещено епителни клетки от експланти от предна лещена капсула при стандартна факоемулсификация, със или без интраоперативно използване на *trypan blue*, при пациенти с възрастово обусловена катаракта и при пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта и изследване и сравнение на основните им клетъчно-физиологични характеристики: миграционна, пролиферативна и диференциационна активности, нивата на вътреклетъчния оксидативен стрес и калцификация на екстрацелуларния им матрикс.

Задачи:

1. Получаване на експлант от предна лещена капсула чрез капсулорексис, със или без интраоперативно използване на *trypan blue*, на пациенти с възрастово обусловена катаракта и на пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта. (1)
2. Получаване на първични ЛЕК от предна лещена капсула. (2)
3. Изследване на миграционната активност на ЛЕК при получаване на първични клетъчни култури от *trypan blue* обагрени и необагрени преднолещени експланти от пациенти с възрастово обусловена катаракта и от пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта. (2)
4. Изследване на клоногенната активност на ЛЕК при получаване на първични клетъчни култури от *trypan blue* обагрени и необагрени преднолещени експланти от пациенти с възрастово обусловена катаракта и от пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта. (2)

5. Изследване на пролиферативната активност на експоненциално растящи първични клетъчни култури от *trypan blue* обагрени и необагрени преднолещени експланти от пациенти с възрастово обусловена катаракта и от пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта. (2)
6. Изследване на участието на протеин киназа СК2 в TGFβ2-индуцираният епително-мезенхимен преход на ЛЕК. (2)
7. Изследване на вътреклетъчния оксидативен стрес и калцификация на екстрацелуларния матрикс на първични клетъчни култури от *trypan blue* обагрени и необагрени преднолещени експланти от пациенти с възрастово обусловена катаракта и от пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта. (2)

1. Клиника по очни болести, УМБАЛ „Александровска“

2. Катедра по медицинска химия и биохимия, МФ, МУ - София

Глава III

Материал и методи

1. Клиничен материал

1.1. Брой и разпределение на пациентите по групи:

Събирането на пациентски експланти бе проведено след получаване на одобрение от Комисията по етика на научните изследвания при Медицински университет - София.

Обагрени с *trypan blue* 0,06% и необагрени кръгови експланти (с диаметър около 5 мм) от предна лещена капсула с прилежащите ѝ лещно епителни клетки (ЛЕК) бяха получени при преден курвилинеарен капсулорексис на 176 пациенти (възраст 50 - 93 години) - 148 пациента с възрастово обусловена катаракта и 28 пациента с катаракта вследствие на захарен диабет тип 2 (ЗД2), дали информирано съгласие и подложени на оперативно лечение на катаракта в Клиниката по очни болести при УМБАЛ „Александровска” ЕАД (

Таблица 1). Един от пациентите бе с поставена диагноза карцином на дебелото черво.

Вид катаракта	Жени	Мъже	Общо	Средна възраст	Медиана	Обхват	Процент (%)
Възрастово обусловена	87	61	148	71,74	73,00	50 - 93	84,09
Диабет тип 2 - индуцирана	9	19	28	65,89	66,00	50 - 83	15,91
Общо	96	80	176	70,81	73,00	50 - 93	100,00
Средна възраст	71,74	72,00	70,81				
Медиана	72,00	69,00	73,00				
Обхват	50 - 88	50 - 93	50 - 93				
Процент (%)	54,55	45,45	100,00				

Таблица 1. Разпределение на пациенти по вид катаракта, пол и възраст.

Бе избрана репрезентативна извадка от 17 експланти от пациенти с възрастово обусловена катаракта (възраст 55 - 75 год.) и 16 пациенти със ЗД2. Интравитално обагряне с *trypan blue 0,06%* бе направено при 19 пациенти. Суправитално (*iv vitro* от двете страни) бяха обагрени 10 експланта и 8 експланта не бяха обагрени (Таблица 2).

Пациенти	<i>Trypan blue 0.06%</i> обагрени експланти		Необагрени експланти
	Едностранно	Двустранно	
Недиабетици	10	3	4
Диабетици	9	3	4

Таблица 2. Брой експланти и вид обагряне.

2. Лабораторни консумативи, реактиви и материали

- Багрило за преден очен сегмент Tekno Capsule Blue 0,06% *Trypan blue*, стерилен разтвор (Teknomek, Turkey)

- 75 cm² културални матраци, мулти ямкови (12 и 96) културални плаки (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany)
- Пълноценна хранителна среда Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany)
- fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich, USA)
- trypsin/EDTA (Gibco, Germany)
- Phosphate - buffered saline (PBS) (Lonza, Verviers, Belgium)
- 1 vol acetic acid/ 7 vol methanol (Sigma-Aldrich, USA)
- Crystal violet solution (crystal violet powder/H₂O/ methanol, Sigma-Aldrich, USA)
- Bromodeoxyuridine (5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU, Santa Cruz Biotechnology, USA)
- блокиращ буфер (PBS, 3% BSA, 0,02% Tween20)
- TrytonX-100 (Sigma-Aldrich, USA)
- Paraformaldehyde
- Hoechst 3342 (Santa Cruz Biotech, USA)
- 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Termo Fisher Scientific, USA)
- Човешки, рекомбинантен растежен фактор TGFβ₂
- Scrambled siRNA, CK2α siRNA (Santa Cruz Biotechnology, USA)
- Si RNA Reagent System (Santa Cruz Biotechnology, USA)
- комплексен трансфекционен кит (siRNA Reagent System, Santa Cruz Biotechnology, USA)
- Xylenol Orange (XO, Sigma-Aldrich, USA)
- 2',7'- Dichlorofluorescein diacetate (DCFDA, Sigma-Aldrich, USA)
- Първични антитела
 - Anti-human BrdU antibody (sc-51514) (Santa Cruz Biotechnology, USA)
 - Anti-human FOXM1 antibody (sc-271746) (Santa Cruz Biotechnology, USA)

- Anti-N-cadherin antibody (sc-59987) (Santa Cruz Biotechnology, USA)
- Anti-Vimentin antibody (sc-373717) (Santa Cruz Biotechnology, USA)
- Phospho-ERK1/2 (Thr202, Tyr204), rabbit antibody (Sigma-Aldrich, USA)
- Anti-human CK2 α antibody (Sigma-Aldrich, USA)
- Anti-human α SMA antibody (Sigma-Aldrich, USA)
- Вторични имунофлуоресцентно белязани антители
 - chicken anti-rabbit IgG-FITC antibody (sc-2990) (Santa Cruz Biotechnology, USA)
 - goat anti-mouse IgG-CFL 555 antibody (sc-362267) (Santa Cruz Biotechnology, USA)
 - goat anti-mouse IgG-CFL 488 antibody (sc-362257) (Santa Cruz Biotechnology, USA)
 - donkey anti-goat IgG-CFL 647 antibody (sc-362285) (Santa Cruz Biotechnology, USA)

3. Методи на изследване

3.1. Получаване на експлант от човешка леща в хода на стандартна факоемулсификация, с или без интраоперативно използване на *trypan blue* за визуализация на предната лещена капсула, от пациенти с възрастово обусловена катаракта и пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта. Използвана е техниката на оцветяване на предна лещена капсула с *trypan blue* 0,06% под въздушен мехур:

- Роговичен тунелен разрез 2,75 мм.
- Изпълване на предната камера с въздух

- Изпълване на предна камера с багрилото *trypan blue* под въздушния мехур чрез 2 ml спринцовка и 27G канюла /само за групата на обагрените експланти/
- Перфузия на багрилото с иригационна течност чрез спринцовка и канюла /само за групата на обагрените експланти/
- Изпълване на предната камера с вискоеластична субстанция
- Извършване на преден кривилинеарен капсулорексис с форцепс

3.2. Суправитално обагряне на експлантите – допълнителна експозиция на ПЛК с *trypan blue 0,06%* за 1 мин. с последващо промиване с физиологичен разтвор.

3.3. Получаване на първични ЛЕК от предна лещена капсула:

Експлантите бяха поставени с епителните клетки към дъното на 12-ямкови плаки в пълноцена хранителна среда - DMEM, съдържаща 20% FBS и 2 mmol/L glutamine, и инкубирани на 37⁰ C и 5% CO₂. Пълноценната хранителна среда беше сменяна на всеки трети ден от *in vitro* култивирането на anteriорните експланти. При достигане на около 60% клетъчна конfluентност (експоненциална фаза на растеж на *in vitro* култивирани клетки) на първичните ЛЕК култури, клетките бяха подготвени за последващи изследвания на колониообразуването и протичането на клетъчния цикъл.

3.4. Пасажиране на ЛЕК култури:

Получените първични култури бяха пасажирани чрез 0,05% trypsin/EDTA, клетъчният брой беше хемоцитометрично установен, 5 x 10³ клетки/ямка бяха засети в 96-ямкови плаки и култивирани в пълноценна хранителна среда, съдържаща 10% FBS, на 37⁰ C и 5%

CO₂. При получаване на 50% клетъчна конfluентност, пълноценната хранителна среда беше заменена с такава, съдържаща 0,5% FBS за създаване на автокринни културални условия и 24 часа по-късно клетките бяха подложени на последващи експерименти.

3.5. Фазово-контрастно светлинно микроскопско наблюдение на ЛЕК:

Капсуларните експланти бяха наблюдавани на всеки 24 ч. с 10X обектив, Brightfield illumination от Acquisition Mode на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000, 5% CO₂ (GE Healthcare Life Sciences) (Фигура 9). Капсуларните експланти и мигрирали от тях първични ЛЕК бяха заснети през различни интервали от време.



Фигура 9. IN Cell Analyzer 6000

3.6. Цитохимично белязане на първични ЛЕК с Crystal violet:

Експоненциално растящите ЛЕК бяха промити с PBS, фиксирани за 10 мин. на стайна температура с 1 vol acetic acid/ 7 vol methanol и инкубирани с 0,5% Crystal violet solution за 1 часа на стайна температура, интензивно промити с H₂O и оставени да изсъхнат на въздух за 2 дни. Цитохимично белязаните с Crystal violet първични ЛЕК бяха анализирани на Automated cellular and

subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000 - 10X обектив и/или 20X обектив, Brightfield illumination от Acquisition Mode.

3.7. Белязане с 5-bromodeoxyuridine (BrdU) на първични ЛЕК:

Експоненциално растящите ЛЕК бяха инкубирани с пълноценна хранителна среда, съдържаща 10 μ M BrdU за 2 часа на 37⁰ C и 5% CO₂.

3.8. Имунофлуоресцентно маркиране на BrdU-белязаните първични ЛЕК:

След изтичане на 2-часовата инкубация с BrdU, клетките бяха трикратно промити с PBS, фиксирани за 30 мин. на стайна температура с 2% paraformaldehyde, пермебиализирани за 10 мин. на стайна температура с 0,5% TrytonX-100, трикратно промити с PBS, инкубирани с 2N HCl за 10 мин. на стайна температура (изсолване на ДНК), и инкубирани с блокиращ буфер за 1 часа на стайна температура. След трикратно промиване с PBS, клетките бяха инкубирани за 2 часа на стайна температура с anti-human BrdU ab, трикратно промити с PBS и инкубирани за 1 часа на стайна T⁰, на тъмно, с IgG-FITC ab. След трикратно промиване с PBS, клетките бяха инкубирани за 2 часа на стайна температура с anti-human FOXM1 ab, трикратно промити с PBS и инкубирани за 1 часа на стайна температура, на тъмно, с IgG-CFL 555 ab. След трикратно промиване с PBS, клетъчните ядра бяха белязани с DAPI за 15 мин. на стайна температура, на тъмно. Имунофлуоресцентно белязаните клетки бяха анализирани на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000.

3.9. Имунофлуоресцентно белязване срещу Vimentin и N-cadherin:

След трикратно промиване с PBS, клетките бяха инкубирани за 2 часа на стайна температура с anti-human Vimentin ab, трикратно промити с PBS и инкубирани за 1 часа на стайна T^0 , на тъмно, с IgG-CFL 555 ab. След трикратно промиване с PBS, клетките бяха инкубирани за 2 часа на стайна температура с anti-human N-cadherin ab, трикратно промити с PBS и инкубирани за 1 часа на стайна температура, на тъмно, с IgG-CFL FITC ab. След трикратно промиване с PBS, клетъчните ядра бяха белязани с DAPI за 15 мин. на стайна температура, на тъмно. Имунофлуоресцентно белязаните клетки бяха анализирани на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000.

3.10. Стимулация с TGF β 2:

Експоненциално растящите ЛЕК (при достигане на около 65% клетъчна конfluентност) бяха подложени на 24-часова инкубация с човешки рекомбинантен TGF β 2 растежен фактор добавен към хранителна среда, на 37 $^{\circ}$ C и 5% CO $_2$. След изтичането на първите 12 часа от инкубационния период, клетките бяха трансфектирани с scrambled siRNA или с CK2 α siRNA за последващите 12 часа от стимулирането с TGF β 2. След изтичане на 24-часовото стимулиране, клетките бяха индиректно мултифлуоресцентно маркирани и анализирани.

3.11. siRNA-медирано заглушаване на ендогенната каталитична субединица (α) на протеин киназа CK2 в TGF β 2-стимулираните ЛЕК:

При изтичане на 12 часа от началото на стимулирането с TGF β 2, клетките бяха подложени на 12-часова трансфекция с 20 pmol scrambled siRNA (контролни клетки) или CK2 α siRNA и комплексен

трансфекционен кит по протокол, предоставен от производителя. След изтичането на 12-часовата трансфекция, в присъствието на TGF β 2, клетките бяха индиректно мултифлуоресцентно маркирани и анализирани. Всяко от експерименталните условия беше проведено триплетно.

3.12. Имунофлуоресцентно белязване срещу ERK1/2, CK2 α , Vimentin и α SMA на TGF β 2-стимулирани, scrambled siRNA/CK2 α siRNA-трансфектираните ЛЕК:

Клетките бяха трикратно промити с PBS, фиксирани за 30 мин. на стайна температура с 2% paraformaldehyde, пермебиализирани за 10 мин. на стайна температура с 0,5% TrytonX-100, трикратно промити с PBS и инкубирани с блокиращ буфер за 1 часа на стайна температура. След трикратно промиване с PBS, клетките бяха инкубирани за 2 часа на стайна температура с anti-human phospho-ERK1/2 ab или с anti-human CK2 α ab, трикратно промити с PBS и инкубирани за 1 часа на стайна температура, на тъмно, с IgG-CFL 555 ab. След трикратно промиване с PBS, клетките бяха инкубирани за 2 часа на стайна температура с anti-human vimentin ab или с anti-human α SMA ab, трикратно промити с PBS и инкубирани за 1 часа на стайна температура, на тъмно, с IgG-FITC ab. След трикратно промиване с PBS, клетъчните ядра бяха белязани с DAPI за 15 мин. на стайна температура, на тъмно. Имунофлуоресцентно белязаните клетки бяха анализирани на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000.

3.13. Флуоресцентно оцветяване на живи първични ЛЕК с xyleneol orange, визуализиращ калциев депозит в екстрацелуларния матрикс и флуоресцентно оцветяване на живи първични ЛЕК с

2',7'-Dichlorofluorescein diacetate, визуализиращ
вътреклетъчния оксидативен стрес (ROS):

Живите първични ЛЕК бяха инкубирани през нощта при 37.0 °C в DMEM културална среда, съдържаща 20 µmol / L XO. Инкубацията се извърши в продължение на 45 минути при 37.0 °C в DMEM културална среда, съдържаща 2 µg / ml DCFDA (2',7'-дихлорофлуоресцеин диацетат). Пробите бяха подложени на фиксиране за 20 минути при стайна температура с 2% параформалдехид на тъмно и бяха оцветени с Hoechst за 10 минути при стайна температура на тъмно. ЛЕК бяха промити три пъти за 10 минути с PBS. Оцветените ЛЕК бяха анализирани на Automated cellular and subcellular imaging system IN Cell Analyzer 6000 (GE Healthcare Life Sciences).

3.14. Микроскопски анализи (Image-based high content screening) на цитохимична и мултифлуорисцентна микроскопия:

Микроскопските образи бяха получени чрез 20X обектив и 405-nm, 561-nm, 488-nm лазери, възбуждащи DAPI и Hoechst-белязаните ядра, IgG-CFL 555-белязаните белтъци и съответно - IgG-FITC- белязаните белтъци.

Площта на цялата ямка, за всяко от експерименталните условия, беше микроскопски анализирана чрез Image-based high content screening - беше приложен алгоритъм за изчисляване на 555-, 488- и 405-флуоресцентното излъчване на клетките, заемащи площта.

3.15. Статистически анализ:

Получените данни от Image-Based High Content Screening анализите бяха анализирани чрез Student's test и One-way ANOVA, проведени на SigmaPlot Version 12.0 (Systat Software, San Jose, CA,

USA). $P < 0.05$ (*) беше прието за статистически значима достоверност, а $P < 0.01$ (**) за високо значима достоверност.

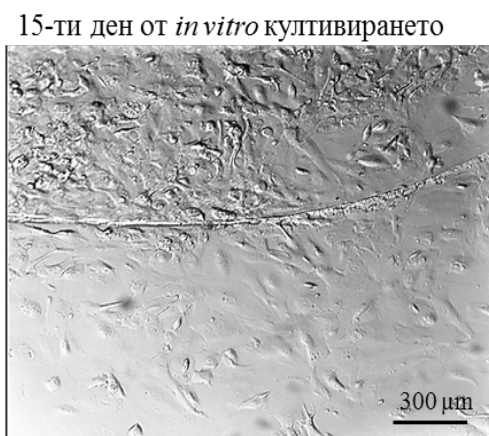
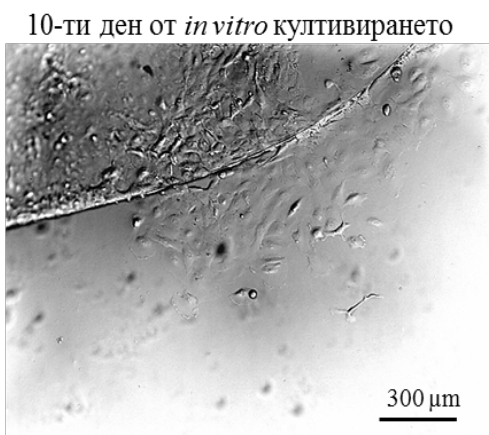
Глава IV

Резултати

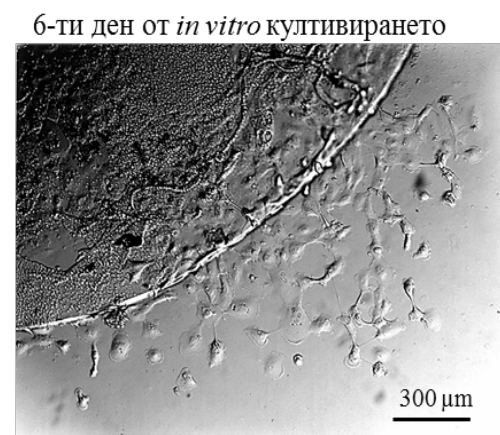
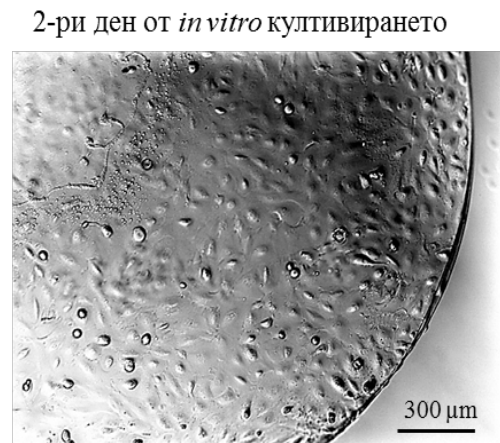
1. **Изследване на миграционната активност на ЛЕК** при получаване на първични клетъчни култури от *trypan blue* обагрени и необагрени преднолещени експланти от пациенти с възрастово обусловена катаракта и от пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта.

Мигриране на първични ЛЕК бе наблюдавано от всички експланти. Латентния период (lag фаза), след който започва миграцията, беше различен при ЛЕК, изолирани от пациенти с възрастово обусловена катаракта със ЗД2 и ЛЕК, изолирани от пациенти с възрастово обусловена катаракта без диабет (Фигура 10). При експлантите от пациенти с възрастово обусловена катаракта миграция на първите клетки (т. нар. *leader cells*) бе установена на 5-7 ден (mean=5,875, n=8) от *in vitro* култивирането. При експлантите от пациенти със ЗД2 индуцирана катаракта миграция започва на 8-10 ден (mean=8,875, n=8) от *in vitro* култивирането. Не бяха установени разлики в латентния период на *in vivo trypan blue* обагрени и необагрените експланти от двете пациентски групи.

LECs култура, изолирани от антериорна лещна капсула от пациенти с диабет тип 2-индуцирана катаракта



LECs култура, изолирани от антериорна лещна капсула от пациенти с възрастообусловена катаракта

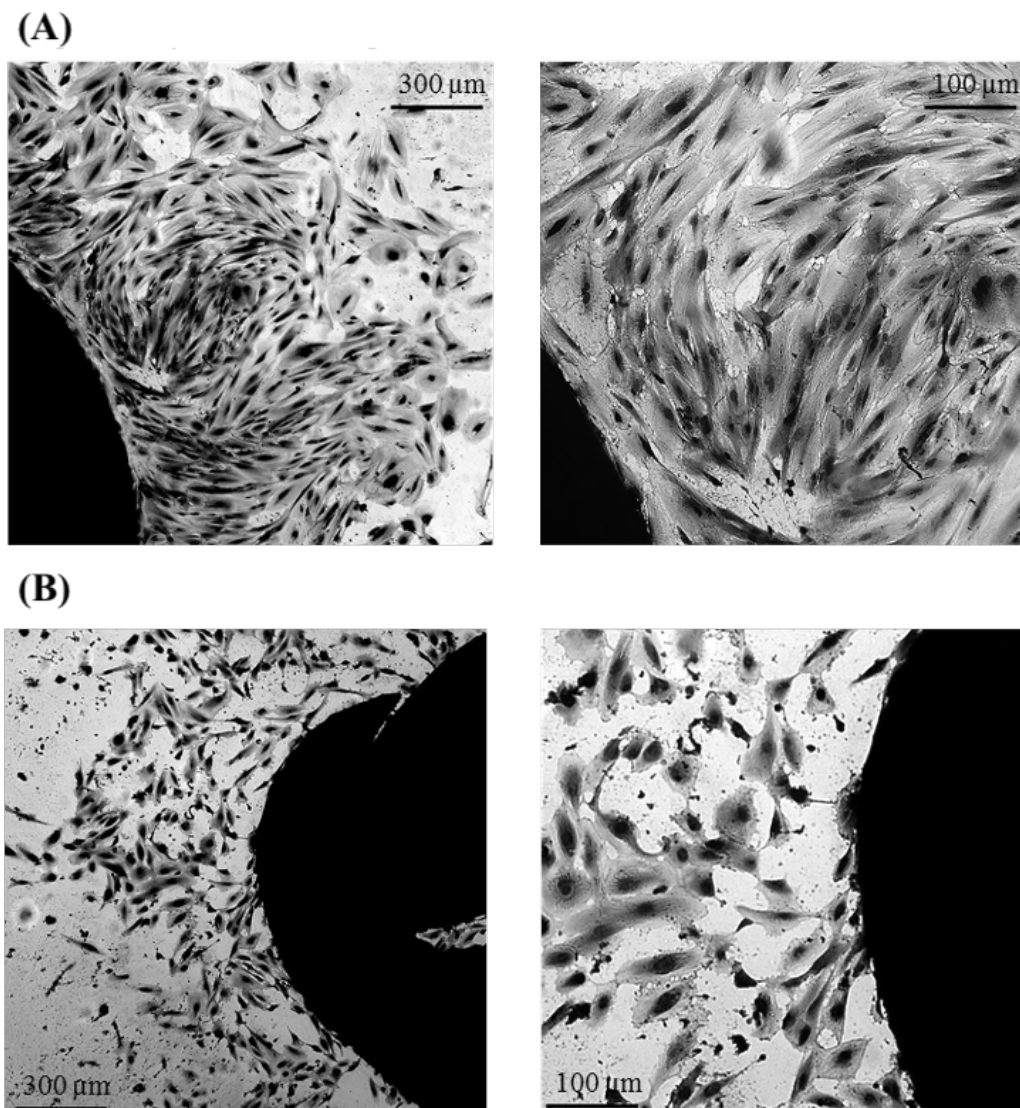


Фигура 10. Първични ЛЕК култури: при експлантите от пациенти с възрастово обусловена катаракта миграция на първите клетки бе установена на около 6 ден от *in vitro* култивирането. При експлантите от пациенти със ЗД2 индуцирана катаракта миграцията започва на около 9 ден от *in vitro* култивирането.

2. Изследване на пролиферативната и клоногенната активност на експоненциално растящи първични клетъчни култури от *trypan blue* обагрени и необагрени преднолещени експланти от пациенти с възрастово обусловена катаракта и от пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта.

Времето на удвояване на ЛЕК клетъчните популации от двете пациентски групи бе различно. Необходимото време за достигане на около 70% клетъчна конфлуентност на първичните ЛЕК от пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта бе една седмица по-дълго спрямо времето за култивиране до 70% конфлуентност на първичните ЛЕК, изолирани от пациенти с възрастово обусловена катаракта (Фигура 10). ЛЕК, изолирани от пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта се характеризират със значително по-слаби миграционна и пролиферативна активности *in vitro*.

Последващата колективна миграционна (т. нар. *collective movement*) и колоногенна активност бяха наблюдавани на всеки 24 часа и беше определяно културалното време (времето на удвояване на клетъчната популация) необходимо за достигане на 60% клетъчна конфлуентност на първичните ЛЕК. На 22-рия ден от *in vitro* култивирането на пациентските експланти чрез *Crystal violet* микроскопия се установява категорична разлика в клоногенността на ЛЕК от недиабетно и диабетно болни пациенти. Ясно личат формираните се големи плътно пакетирани ЛЕК колонии, без празни пространства между отделните многобройни клетки от възрастово обусловена катаракта. Контрастно на тях, ЛЕК колонии от диабет тип 2 индуцирана катаракта са малки, рехави, със значително по-малък брой клетки, с променена морфология, изразяваща се в променено съотношение цитоплазма/ядро (Фигура 11).



Фигура 11. Колониоформиране: *Crystal violet* микроскопски изображения - белязани колонии от 22^{-рия} ден от *in vitro* култивирането на ЛЕК, изолирани от предна лещена капсула от пациенти с възрастово обусловена катаракта - големи плътно пакетирани ЛЕК колонии (А) и изолирани от предна лещена капсула от пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта - малки рехави ЛЕК колонии (В).

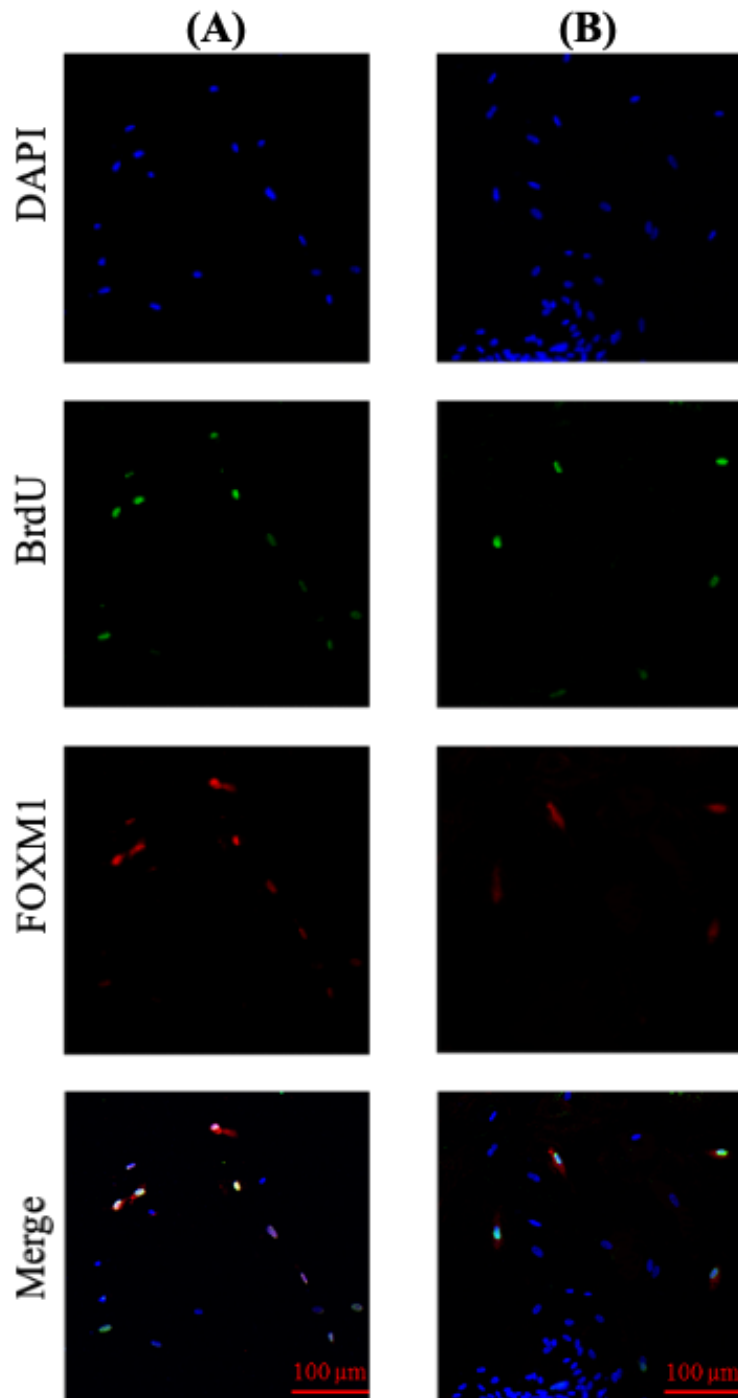
Въз основа на проведените Image-based high content screening анализи на *Crystal violet* микроскопските изображения се установява, че формиралите се колонии от ЛЕК от диабет тип 2 индуцирана катаракта са трикратно по-малко в сравнение с колониите, формирани се от ЛЕК при възрастово обусловена катаракта (**Таблица 3**).

Тип катаракта	Възрастово обусловена	Диабет тип 2 - индуцирана
Колониоформиране	3.05X (1064 кл.)	X (349 кл.)

Таблица 3. Колониоформиране – трикратно по-голям брой клетки (1064) при ЛЕК колониите от възрастово обусловена катаракта в сравнение с клетките (349) при колониите от диабет тип 2 индуцирана катаракта.

С цел анализиране на пролиферативната активност на 22^{-рия} ден от *in vitro* култивирането на пациентските експлантати се проведе пролиферативен анализ на имунофлуоресцентно маркираните BrdU и FOXM1-белязани първични ЛЕК.

Чрез ДНК-свързващото багрило DAPI се идентифицираха клетъчните ядра. BrdU, инкорпориращ се в новосинтезирана ДНК, се визуализира в по-голям брой ядра при ЛЕК от възрастово обусловена катаракта в сравнение с ЛЕК от диабетно болни пациенти. Сред ЛЕК от възрастово обусловена катаракта се визуализира и по-висока експресия на транскрипционния фактор FOXM1, регулиращ генната експресия на белтъците от делителното вретено (Фигура 12).



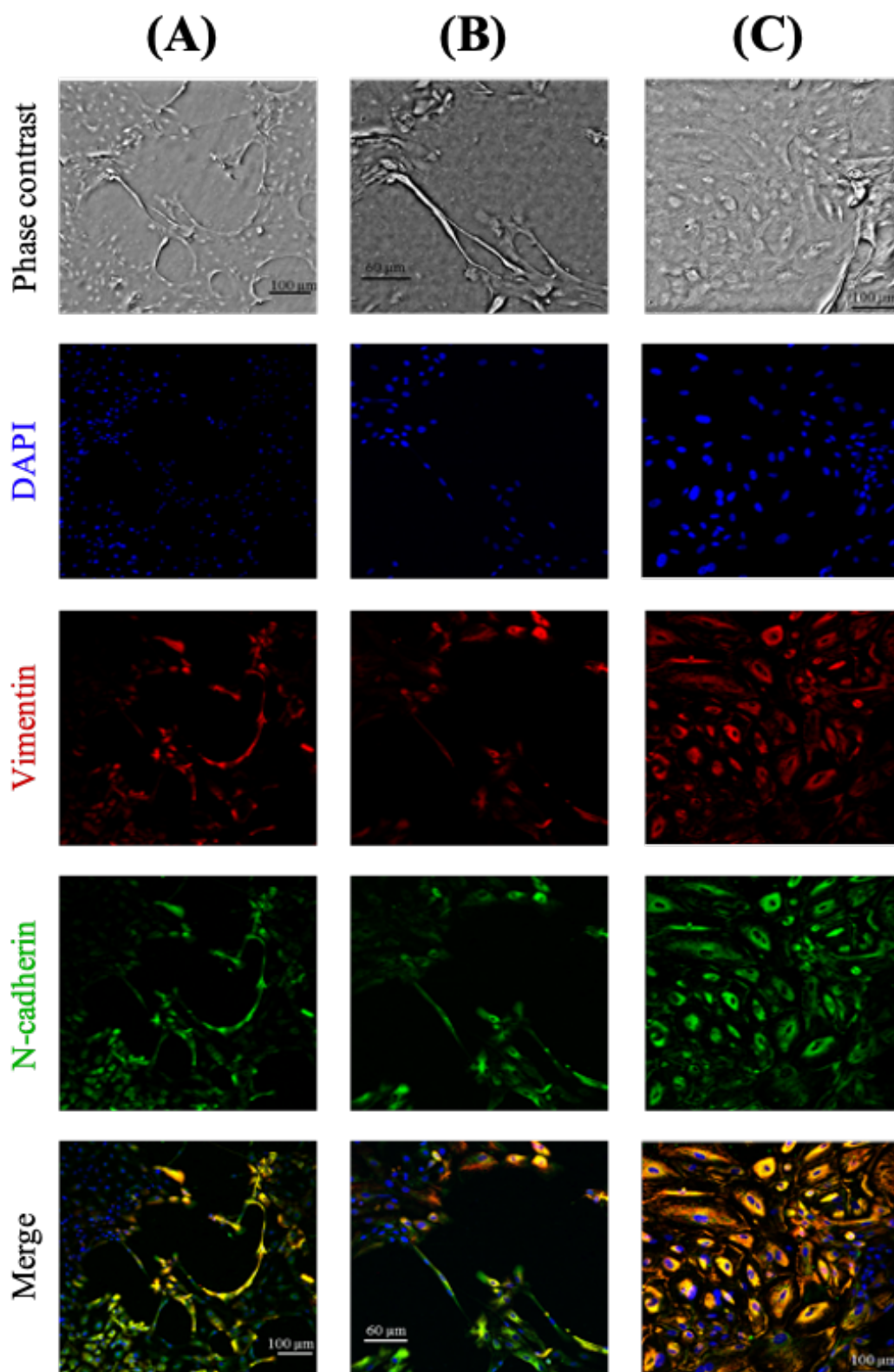
Фигура 12. Мултифлуоресцентна микроскопия на имунофлуоресцентно маркирани BrdU и FOXM1-белязани първични ЛЕК, изолирани от предна лещена капсула от пациенти с възрастово обусловена катаракта (А) и изолирани от предна лещена капсула от пациенти с диабет тип 2-индуцирана катаракта (В). Визуализира се новосинтезирана ДНК в по-голям брой ядра и по-висока експресия на транскрипционния фактор FOXM1 в група (А) в сравнение с група (В).

Проведените Image-based high content screening анализи показаха, че mean=55,76%, n=4, P<0.05 от ЛЕК от възрастово обусловена катаракта съдържат новосинтезирана ДНК и експресиран FOXM1, докато само mean=33,45%, n=4, P<0.05 от ЛЕК от диабет тип 2 индуцирана катаракта са пролиферативно активни. Установената по-слаба клоногенна активност сред ЛЕК от пациенти със ЗД2 е резултат от намалената пролиферативна активност.

3. Фазово-контрастен и имунофлуоресцентен анализ на ЛЕК.

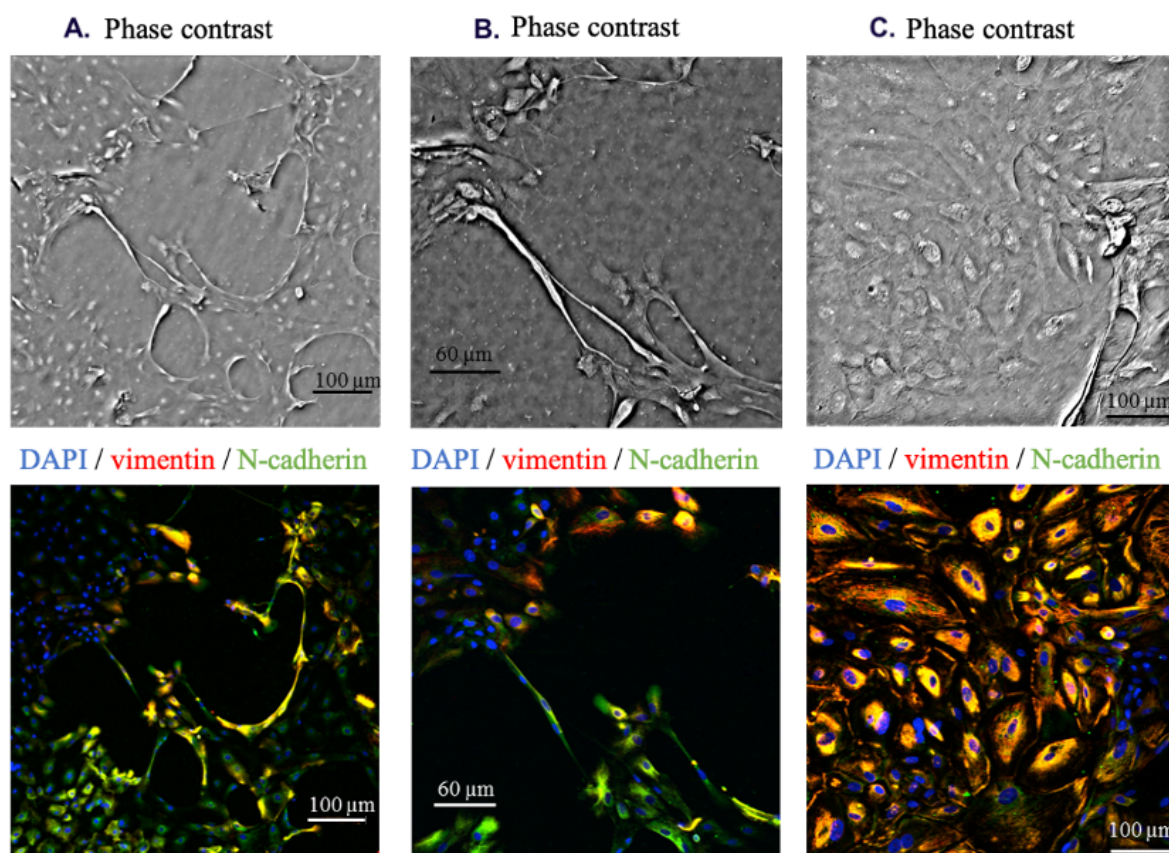
Морфологията на ЛЕК бе изследвана чрез фазово-контрастна микроскопия. При ЛЕК, изолирани от пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта, бе наблюдавана *in vitro* начална промяна на епителния фенотип във фибробластоподобен. При 60% от първичните ЛЕК култури от пациенти със ЗД2 бе отчетена промяна в морфологията от кубична към фибробластоподобна. Такава промяна не бе наблюдавана сред ЛЕК от недиабетно болни пациенти. Морфологичните промени започваха около 14 дни след култивирането на пациентските експланти, а продължителността на процеса бе 7 до 8 дни. В края на периода фибробластоподобните клетки представляваха 20% от клетъчния състав на първичните култури. Тези клетки бяха пролиферативно неактивни, като между тях и пролиферативно активните ЛЕК се формираха празни пространства (Фигура 13).

Хетерогенните (съставени от ЛЕК и фибробластоподобни клетки) първични култури не бяха използвани в последващи експерименти, а бяха имунофлуоресцентно анализирани. Клетъчните ядра бяха идентифицирани на база DAPI. Анализира се наличието на Vimentin и на N-cadherin (Фигура 13).



Фигура 13. Фазово – контрастен и имунофлуоресцентен анализ на ЛЕК, изолирани от предна лещена капсула от пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта (A) и (B), и изолирани от предна лещена капсула от пациенти с възрастово обусловена катаракта (C).

Установява се по-висока експресия на Vimentin и N-cadherin при ЛЕК от възрастово обусловена катаракта спрямо експресията им при ЛЕК от пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта (Фигура 13). При ЛЕК от пациенти със ЗД2 се идентифицират по-голям брой клетъчни ядра, разположени периферно, без наличие на Vimentin и N-cadherin около тях (в клетките), съпоставени с ЛЕК от недиабетно болни пациенти (Фигура 14).

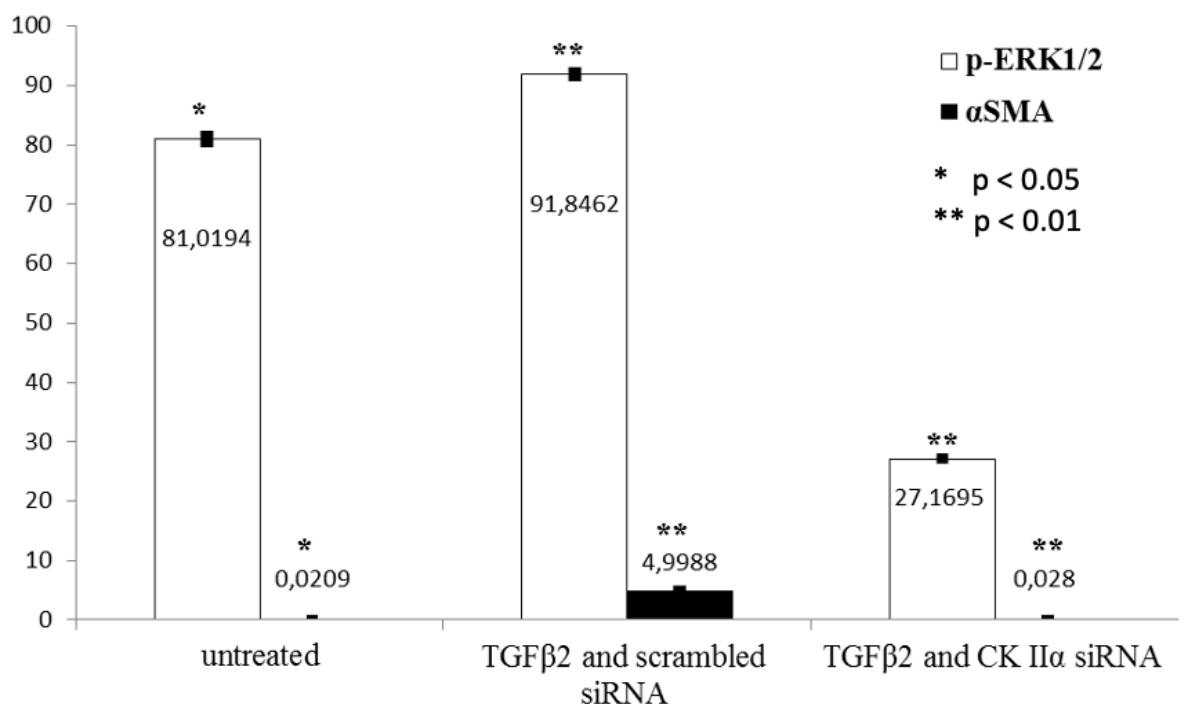


Фигура 14. Обобщен фазово – контрастен и имунофлуоресцентен анализ на ЛЕК, изолирани от предна лещена капсула от пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта (А) и (В), и изолирани от предна лещена капсула от пациенти с възрастово обусловена катаракта (С). По-висока експресия на Vimentin и N-cadherin в група (С), спрямо група (А,В). По-голям брой периферно разположени клетъчни ядра, без наличие на Vimentin и N-cadherin около тях (вътреклетъчно) в група (А,В), в сравнение с група (С).

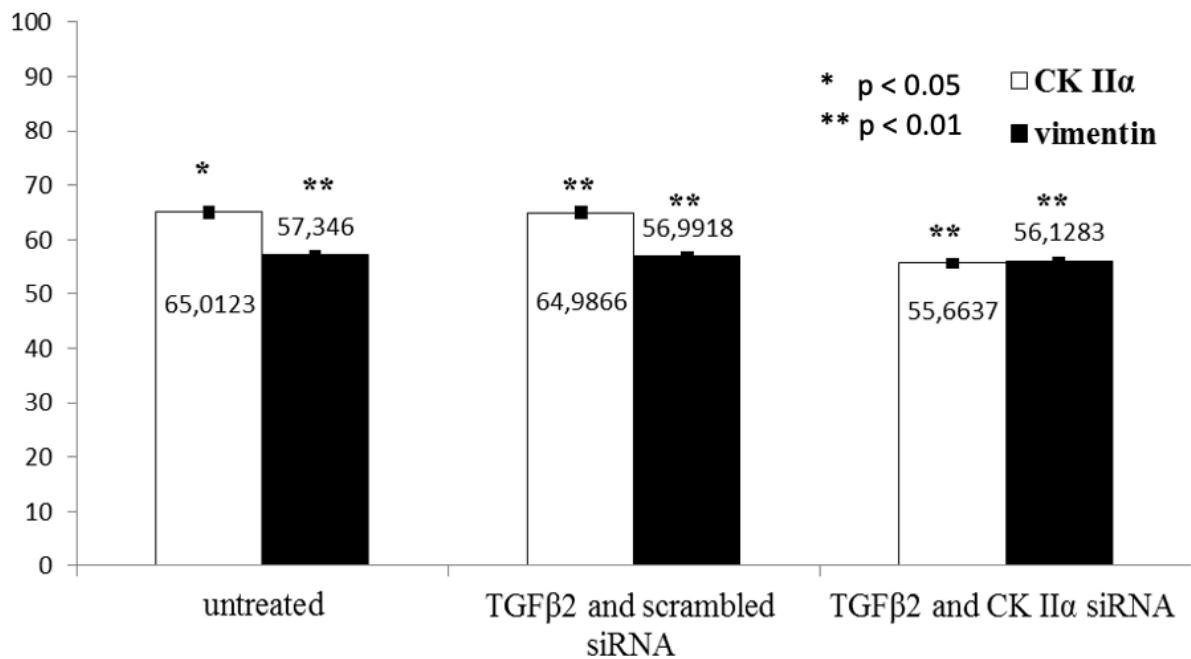
4. Изследване на участието на протеин киназа СК2 в TGFβ2-индуцираният епително-мезенхимен преход на ЛЕК.

След проведено 24-часово третиране на ЛЕК с TGF-β2 се установява, че TGF-β2 статистически достоверно стимулира активността на ERK1/2. TGF-β2 индуцираното повишено фосфорилиране на ERK1/2 корелира с появата на експресиран αSMA (Фигура 15), но не корелира с експресията на цитоскелетния белтък vimentin (Фигура 16).

12-часовото siRNA-медирано заглушаване на ендогенната каталитична субединица (α) на протеин киназа СК2 статистически достоверно потиска TGFβ2-индуцираната повишена активност на ERK1/2 и понижава TGFβ2-индуцираната експресия на αSMA (Фигура 15).

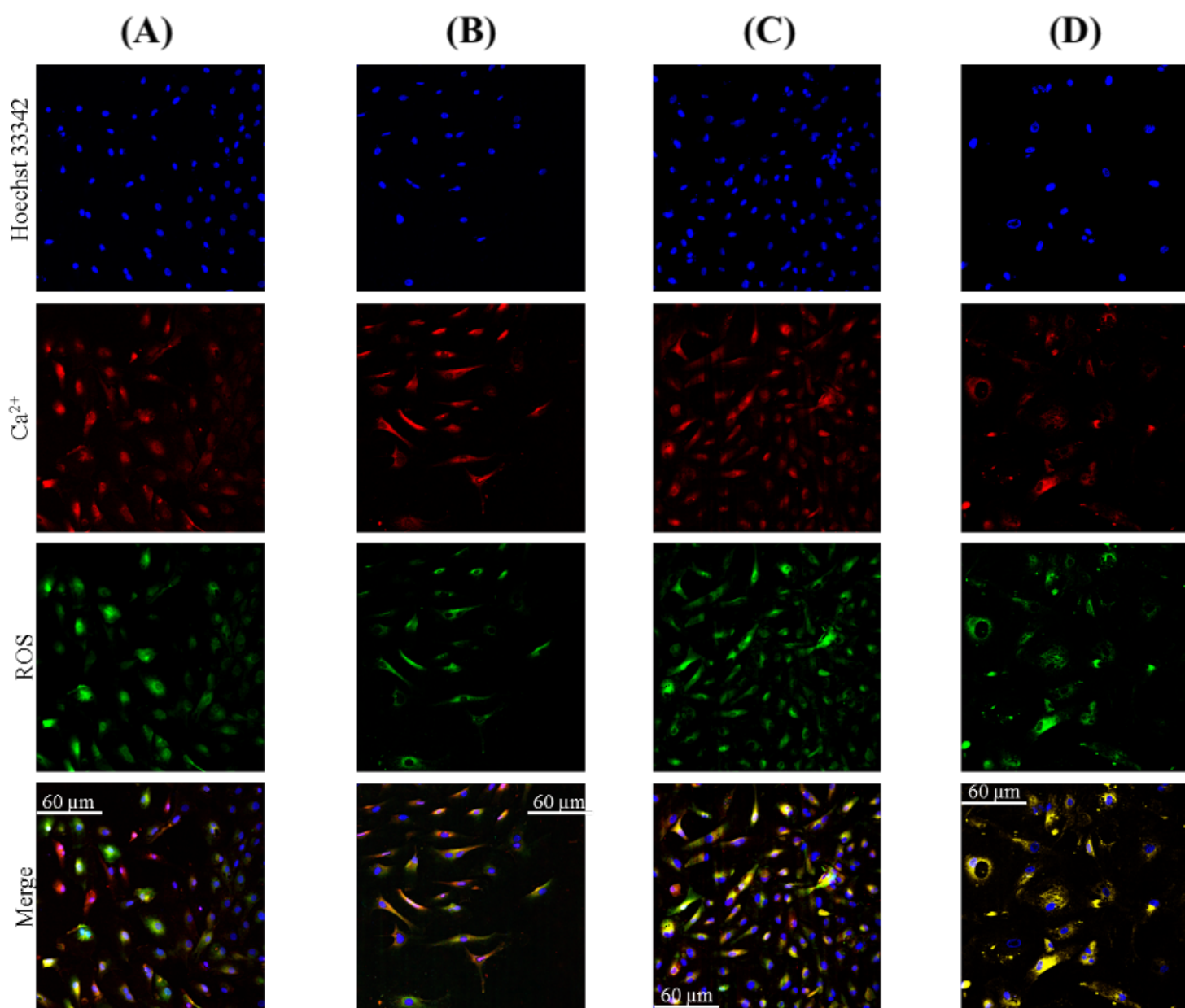


Фигура 15. Активност на ERK 1/2 (%) при 24-часовото третиране на ЛЕК с TGF-β2. TGF-β2 индуцираното повишено фосфорилиране на ERK1/2 корелира с появата на експресиран αSMA.



Фигура 16. Активност на CK2 (%) при 12-часовото siRNA-медирано заглушаване на ендогенната каталитична субединица (α) на протеин киназа CK2. TGF- β 2 индуцираното повишено фосфорилиране на ERK1/2 не корелира с експресията на цитоскелетния белтък vimentin.

5. **Изследване на вътреклетъчния оксидативен стрес и калцификация на екстрацелуларният матрикс на първични клетъчни култури** от *trypan blue* обагрени и необагрени преднолещени експлантати от пациенти с възрастово обусловена катаракта и от пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта (Фигура 17).



Фигура 17. Тройно флуоресцентно маркиране на живи ЛЕК, изолирани от двустранно обагрена с *trypan blue* предна лещена капсула на пациент с възрастово обусловена катаракта (А), изолирани от двустранно обагрена с *trypan blue* предна лещена капсула на пациент с диабет тип 2-индуцирана катаракта (В), изолирани от едностранно обагрена с *trypan blue* предна лещена капсула на пациент с възрастово обусловена катаракта (С), изолирани от едностранно обагрени с *trypan blue* предна лещена капсула на пациент с диабет тип 2-индуцирана катаракта (D).

Въз основа на проведеното тройно флуоресцентно изследване се направи количествен анализ за изчисляване на средно статистическия екстрацелуларен калциев депозит и вътреклетъчния оксидативен стрес, отнесен към единична клетка.

Най-високо ниво на ROS (с изключение на пациента с карцином на дебелото черво) се установи при ЛЕК от *trypan blue* - двустранно оцветена предна лещена капсула от пациентите с диабет тип 2 индуцирана катаракта - 0,299. По-ниско ниво на ROS - 0,182 се установява при ЛЕК от *trypan blue* - едностранно оцветена предна лещена капсула от пациентите с диабет тип 2- индуцирана катаракта. ROS при ЛЕК от *trypan blue* - едностранно оцветена предна лещена капсула от пациентите с възрастово обусловена катаракта - 0,238, а при ЛЕК от *trypan blue* - двустранно оцветена предна лещена капсула от пациентите с възрастово обусловена катаракта - 0,208 (Фигура 18).

При ЛЕК от пациенти с възрастово обусловена катаракта се установяват по-високи нива на оксидативен стрес при едностранно обагрениите (0,238) в сравнение с двустранно обагрениите ЛЕК (0,208).

При ЛЕК от пациенти със ЗД2 се установяват по-високи нива на оксидативен стрес при двустранно обагрениите (0,299) в сравнение с едностранно оцветените ЛЕК (0,182).

Сред едностранно експозираниите на *trypan blue* ЛЕК по-високи нива на ROS се откриват при ЛЕК от пациенти без диабет (0,238).

Сред двустранно обагрениите с *trypan blue* ЛЕК по-високи нива на ROS се откриват при ЛЕК от пациенти със ЗД2 (0,299).

Най-високо ниво на калцификация на екстракапсуларния матрикс (Ca^{2+}) (с изключение на пациента с карцином на дебелото черво) се установи при ЛЕК от *trypan blue* двустранно оцветена ПЛК от пациентите с диабет тип 2 индуцирана катаракта - 5,214. Най-ниско ниво на калцификация на екстракапсуларния матрикс - 3,420 се установява при ЛЕК от *trypan blue* едностранно оцветена ПЛК от пациентите с

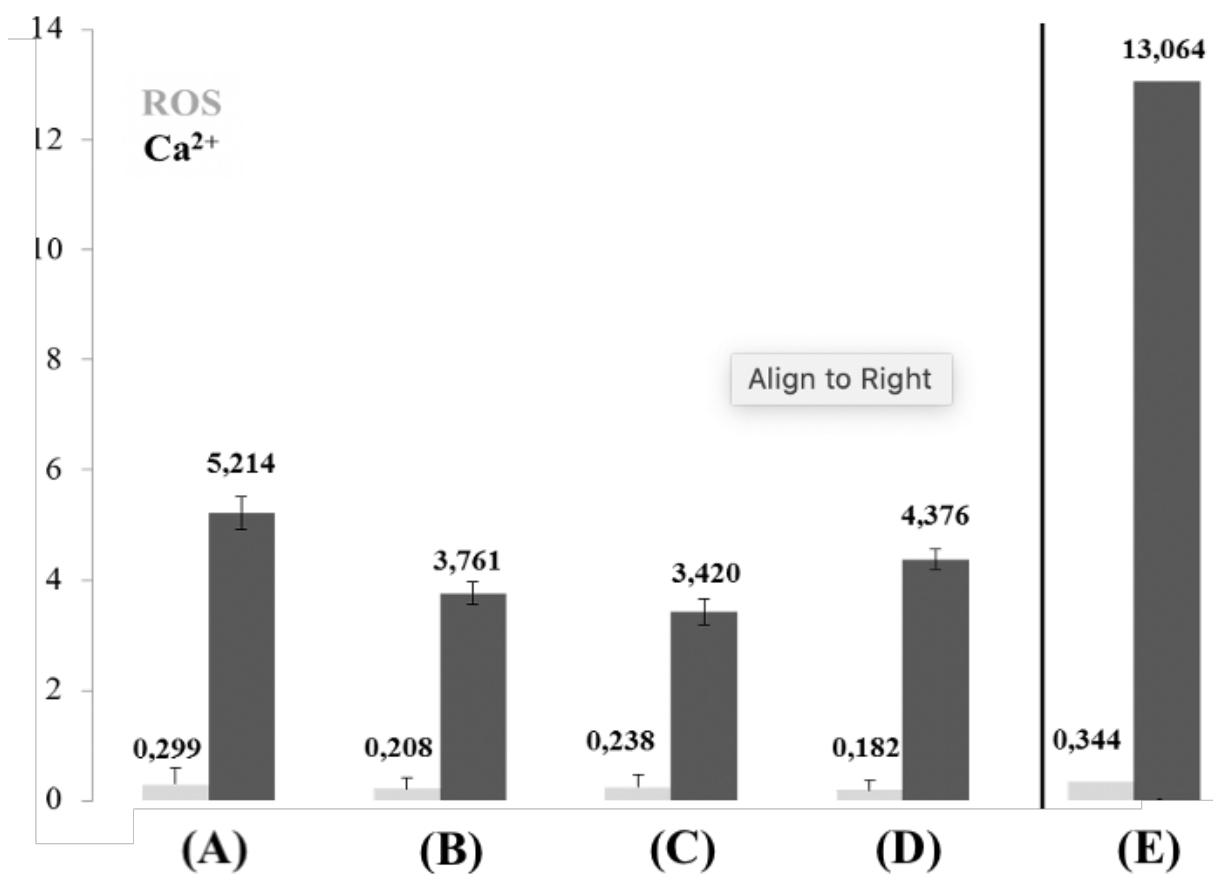
възрастово обусловена катаракта. Ca^{2+} при ЛЕК от *trypan blue* едностранно оцветена предна лещена капсула от пациентите с диабет тип 2 индуцирана катаракта - 4,376, а при ЛЕК от *trypan blue* - двустранно оцветена предна лещена капсула от пациентите с възрастово обусловена катаракта - 3,761 (Фигура 18).

При ЛЕК от пациенти с възрастово обусловена катаракта се установяват по-ниски нива на калцификация при едностранно обагрените (3,420) в сравнение с двустранно обагрените ЛЕК (3,761).

При ЛЕК от пациенти със ЗД2 се установяват по-високи нива на калцификация при двустранно обагрените (5,214) в сравнение с едностранно оцветените ЛЕК (4,376).

Сред едностранно експозирани на *trypan blue* ЛЕК по-високи нива на калцификация се откриват при ЛЕК от пациенти със ЗД2 (4,376).

Сред двустранно обагрените с *trypan blue* ЛЕК по-високи нива на ROS се откриват при ЛЕК от пациенти със ЗД2 (5,214).



Фигура 18. Относителни нива на вътреклетъчния оксидативен стрес (ROS) и на калцификацията на екстрацелуларния матрикс (Ca²⁺) на живи ЛЕК, изолирани от двустранно обогрени с *trypan blue* предни лещени капсули на пациенти с диабет тип 2- индуцирана катаракта (A), изолирани от двустранно обогрени с *trypan blue* предни лещени капсули на пациенти с възрастово обусловена катаракта (B), изолирани от едностранно обогрени с *trypan blue* предни лещени капсули на пациенти с възрастово обусловена катаракта (C), изолирани от едностранно обогрени с *trypan blue*- предни лещени капсули на пациенти с диабет тип 2- индуцирана катаракта (D), изолирани от едностранно обогрени с *trypan blue* предна лещена капсула на пациент с карцином на дебелото черво (E).

Глава IV

Обсъждане

Миграция на първите клетки от експлантите на недиабетно болните пациенти с възрастово обусловена катаракта започва около 6^{ти} ден на *in vitro* култивирането. Това е потвърждение на публикуваните до момента литературните данни (20,94). Не се откриха изследвания, анализиращи първоначалната *in vitro* миграционна активност на *leader cells* от предна лещена капсула на пациенти със ЗД2. Резултатите представят изцяло нова информация, съществено обогатяваща познанието за клетъчно-физиологично обосноващите механизми на капсуларната опацификация.

Липсата на разлики в миграционните активности на *leader cells*, мигрирали от *in vivo trypan blue* обагрени и необагрени експлантите доказва, че интраоперативното визуализиране с *trypan blue* на предната лещена капсула не афектира епитализационния капацитет на ЛЕК.

Интегритета на екстрацелуларния матрикс е от изключително значение за нормалното функциониране на клетките. Клетъчната и груповата миграция, адхезия, диференциация, както и тъканната организация и структура са пряко зависими от неговото състояние (95–97). ЗД2 оказва негативно влияние върху неговата структура и нарушава междуклетъчната комуникация (96,98). Наблюдава се намаляваща клетъчна плътност при възрастово обусловената катаракта с възрастта, а също така и по-ниска клетъчна плътност на ЛЕК при диабетно болни пациенти с катаракта в сравнение с недиабетно болни (99). Диабетната катаракта е сред най-ранните прояви на вторични усложнения, свързани със ЗД и асоциираните високи кръвни нива на глюкоза (62,100). Освен трите добре известни катарактогенни механизми (полиолов път, неензимно гликозилиране и повишен оксидативен стрес), актуални изследвания установяват допълнителен патогенетичен механизъм на диабетната катарактогенеза - ЕМП на ЛЕК, индуцирана от хипергликемия

(100). ЕМП, отговорна също така и за вторичната катарактогенеза, се характеризира с фибробластоподобна клетъчна морфология, с редуциране на междуклетъчните връзки и епителните маркери, със същевременно увеличаване на маркерите за ЕМП (като α -SMA, N-cadherin) и експресията на транскрипционни фактори (101). TGF- β е най-добре изученият инициатор на ЕМП, който регулира генната експресия чрез посредничеството на Smad транскрипционни фактори. TGF- β може също така да активира и не-Smad сигнални пътища (напр. ERK1/2), които водят до нарушаване на междуклетъчните връзки, до промяна на цитоскелета и клетъчния мотилитет (101,102). TGF- β 2 е основният фактор, водещ до диференциация и фиброзиране на ЛЕК (101). В групата на диабетно болните бе наблюдавана спонтанната промяна в морфологията и епително-клетъчния фенотип на ЛЕК от кубоидна към фибробластоподобна. Vimentin и N-cadherin са белтъци, експресирани в епителния клетъчен фенотип (103–105). Въпреки, че Vimentin е смятан за биомаркер за ЕМП, поради експресията си като интермедиерен филаментозен протеин и основен цитоскелетен компонент на мезенхимните клетки, той участва и в миграцията на епителните клетки (106,106). Тъй като е неразделна част от структурната цялост на клетката, образуването на ламелиподии и адхезионната сигнализация, понижаването на експресията на Vimentin е достатъчно, за да промени клетъчната морфология *in vitro*, както и да инхибира клетъчната подвижност (106). N-cadherin е гликопротеин, отговорен за междуклетъчната адхезия, участващ в структурата, както на влакнестите клетки на лещата (107), така и в структурата на ЛЕК (108). Неговата експресия води до усилен клетъчен мотилитет (104). Смятан е за маркер на ЕМП (109). N-cadherin също така стимулира клетъчния растеж, чрез блокиране на апоптотични сигнали (104). Намаленият синтез на N-cadherin води до нарушена междуклетъчна адхезия и до инициация на ЕМП (110). Въз основа на гореизложеното, установената по-ниска

експресия на Vimentin и N-cadherin при ЛЕК от пациенти със ЗД2 води до промяна в клетъчната им морфология, намален мотилитет и съответно до намалена миграционна активност. Наблюдаваната *in vitro* начална промяна на епителния фенотип на ЛЕК във фибробластоподобен в групата на ЛЕК от диабетно болни пациенти може да се приеме за начален етап на епително-мезенхимен преход.

Установената разлика в колониообразуването на ЛЕК, изолирани от диабетно и недиабетно болните пациенти (Фигура 11) се дължи на различна пролиферативна активност при двете групи. Това бе доказано чрез имунофлуоресцентното изследване на инкорпурирането на BrdU в новосинтезираната ДНК и експресията на транскрипционния фактор FOXM1 (Фигура 12), регулиращ генната експресия в митотичното вретено. Въз основа на по-малкото съдържание на новосинтезирана ДНК и по-ниска експресия на FOXM1, който е сигурен маркер за клетъчна пролиферация, обуславяйки прехода от G1/S към G2/M (111), можем да обобщим, че пролиферативната активност на ЛЕК от пациенти със ЗД2 е по-ниска от тази на ЛЕК от недиабетно болни пациенти. Негативната връзка между диабета и пролиферацията на ЛЕК се потвърждава от Sundelin и сътрудници (94). По-слабата клоногенна активност на ЛЕК от диабет тип 2 индуцирана катаракта корелира с тяхната намалена пролиферативна активност. Формирането на по-малки и по-рехави колонии от диабетните ЛЕК се свързва също така с понижен клетъчен мотилитет и миграция, и нарушена междуклетъчна адхезия в резултат на по-слабата експресия на Vimentin и N-cadherin.

Повечето офталмолози имат клиничното впечатление, че диабетно болните пациенти развиват по-бързо и по-изразена ВК, спрямо недиабетно болните. Редица проучвания откриват формиране на по-екстензивно уплътняване на задната лещена капсула при диабетно в сравнение с недиабетно болните (112,113). Установената намалена пролиферативна активност на ЛЕК от пациенти със ЗД2 тласка клетките

към спонтанна начална промяна на епителния фенотип във фибробластоподобен (Фигура 13), инициация на ЕМП и вероятно по-ранна проява на фиброзиране на задната лещена капсула при диабетно болните.

Противоположно на тези изследвания, други проучвания показват сходна или дори по-ниска честота на образуване на ВК сред пациентите със ЗД (114–116). Теоретично погледнато, доказаните в настоящия труд по-ниски миграционна, пролиферативна и клоногенна активности на диабетни ЛЕК предоставят възможно обяснение за описаната по-ниска честота на ВК при диабетно болните.

Растежния фактор $TGF\beta_2$, който се счита за основния сигнал, индуциращ епително-мезенхимният преход в патогенезата на ВК (117,118), се трансдуцира по ERK1/2-зависима сигнализация, която води до генна експресия на неепителния цитоскелетен белтък α SMA в *in vitro* култивирани ЛЕК, изолирани от пациентски експланти. И тъй като до настоящия момент няма литературни данни за изследване на участието на протеин киназа СК2 в сигнализацията, поддържаща клетъчната физиология на ЛЕК, за първи път се разкрива, че функционирането на ERK1/2 е регулирано от конститутивно активната хетеротетрамерна (2 каталитични α и 2 некаталитични β субединици, продукти на различни гени) протеин киназа СК2 в този клетъчен фенотип.

ROS участват активно в процеса на индуциране на апоптоза в норма и патология. Едновременно източник и таргетна структура на ROS са митохондриите (119). Образуването на различни видове катаракти се свързва с оксидативния стрес, причинен от ROS, индуциранта апоптоза, заедно с намалена антиоксидантна активност и нарушена калциева хомеостаза. Повишеният оксидативен стрес и намалената антиоксидативна активност нарушават функцията на Ca^{2+} АТФ-ази и Na^+/Ca^{2+} обменници, водейки до покачване на вътреклетъчната калциева концентрация и калциеви отлагания. Повишените нива на калций

причиняват апоптоза на ЛЕК, агрегация на лещени протеини, активиране на протеази, разграждащи основни структурни протеини и формиране на лещени мътнини (19). Физиологично извънклетъчно отлагане на калциев депозит се наблюдава само в костно-скелетната система (120), следователно калцификацията на екстрацелуларния матрикс на лещено епителните култури е патологична изява. При диабетно болните пациенти с възрастово обусловена катаракта се открива по-ниска антиоксидантна активност в сравнение с недиабетно болните пациенти с възрастово обусловена катаракта (121,122). В настоящия труд най-високите нива на калциев депозит се откриват именно сред пациентите със ЗД2. Оксидативният стрес и повишената калциева концентрация активират протеин киназа С (19). Тъй като доказахме, че СК2 регулира ERK1/2 и съответно ЕМП, която води до диференциация на ЛЕК, можем да предположим, че установените по-високи нива на ROS и Ca²⁺ в групата на ЛЕК от диабетно болни пациенти са активирали СК2. Процес, който е дал началото на ЕМП и е довел до начална фенотипна промяна на диабетните ЛЕК. Редица други фактори (като оперативна техника, дизайн и материал на ВОЛ, диабетен статус, постоперативно възпаление и др. (123,124), които не са предмет на настоящето изследване могат да оказват влияние върху формирането на ВК.

Въпреки че не се открива разлика в миграционната активност на необагренени и интраоперативно (едностранно) обагренени ЛЕК с *trypan blue*, при двустранно обагрените с *trypan blue 0.06%* експлантите от пациенти със ЗД2 се установяват по-високи нива на калциев депозит и оксидативен стрес. Вероятно, увреда на плазматичните мембрани на ЛЕК в резултат на липидна пероксидация при диабетно болните пациенти ги прави частично пропускливи за багрилото. Въз основа на тези и наскоро публикувани данни, директна експозиция на ЛЕК с *trypan blue* при пациенти със ЗД2 би могла да оказва негативен ефект върху физиологичната им цялост (125).

Освен помътняването на задната лещена капсула, което води до намаляване на зрителната острота, пролиферацията на остатъчните ЛЕК води до вторични усложнения в резултат на създадените механични сили. Те са причина за стрии, гънки на задната лещена капсула и потенциално тракционнно-индуцирано децентриране на изкуствената вътреочна леща (123). Офталмоскопията и лазерната фотокоагулация се извършват трудно или дори не могат да бъдат осъществени при наличие на тежка ВК. Прозрачността на лещената капсула е от изключително значение, особено при диабетно болни пациенти, при които често се наблюдава формиране на силно проявена ВК (113).

Глава V

Заклучение

Една от основните причини за развитието на възрастово обусловената катаракта при недиабетно болни пациенти и пациенти със ЗД2 е увреждането на лещата, поради освобождаването на свободни радикали и свързаните с това повишени нива на калций.

ЛЕК на диабетно болните пациенти се характеризират със значително по-ниска *in vitro* миграционна и пролиферативна активности, в сравнение с *in vitro* активностите на ЛЕК от недиабетно болни пациенти.

Миграционните характеристики на ЛЕК не се повлияват от оцветяване *in vivo* на външната повърхност на предната лещена капсула с *trypan blue* 0,06%. Въпреки това, по-високите нива на ROS при пряка експозиция на ЛЕК с *trypan blue* 0,06%, особено при пациенти с диабет, вероятно могат да ги увредят.

Лещено епителните клетки са съществен фактор в катарактогенезата. Отчетените патофизиологични характеристики и наблюдения могат да допринесат за изясняване на механизмите на първичната и вторичната катарактна патогенеза при диабетно и недиабетно болни пациенти.

Глава VI

Изводи

1. ЛЕК от диабет тип 2 индуцирана катаракта се характеризират със значително по-слаба миграционна, пролиферативна и клоногенна активности *in vitro* спрямо активностите *in vitro* на ЛЕК от възрастово обусловена катаракта.
2. Липсата на разлики в миграционните активности на *leader cells*, мигрирали от *in vivo trypan blue* обагрени и необагрени експланти доказва, че интраоперативното визуализиране с *trypan blue* на предната лещена капсула не афектира епитализационния капацитет на ЛЕК при пациенти с възрастово обусловена катаракта и при пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта.
3. Компрометираният от диабет тип 2 фенотип се характеризира с намален синтез на ДНК, което тласка клетките към инициация на епително-мезенхимен преход. Нарушени молекулярни механизми повлияват миграционната, пролиферативната и спонтанната диференциационна активност на лещено епителните клетки при пациенти с възрастово обусловена катаракта и при пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта.
4. Протеин киназа CK2 регулира ERK1/2, независимо от растежният фактор TGF β 2, считан за основния сигнал, индуциращ епително-мезенхимния преход в патогенезата на капсулната опацификация. ERK1/2-зависима сигнализация води до генна експресия на неепителния цитоскелетен белтък α SMA в *in vitro* култивирани ЛЕК, изолирани от пациентски експланти.
5. Основна причина за формиране на възрастово обусловената и диабет тип 2 индуцираната катаракти е увреждането на лещата в следствие на образувалите се свободни радикали (ROS) и

асоциираните с тях повишени нива на екстрацелуларен калциев депозит.

Глава VII

Приноси

1. За първи път у нас бяха получени първични ЛЕК култури, изолирани от пациенти с възрастово обусловена катаракта и от пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта.
2. За първи път се изследва първоначалната *in vitro* миграционна активност на *leader cells* от експланти от предна лещена капсула на пациенти с диабет тип 2 индуцирана катаракта. Резултатите представят изцяло нова информация, съществено обогатяваща познанието за клетъчно-физиологично обосноваваните механизми на капсулната опацификация. Установената, на около 6-тия ден от *in vitro* култивирането, миграция на първите клетки от експлантите от предни лещени капсули на пациенти с възрастово обусловена катаракта е потвърждение на литературните данните.
3. За първи път се установява участието на протеин киназа СК2 в сигнализацията, поддържаща клетъчната физиология на ЛЕК. За първи път се разкрива, че функционирането на ERK1/2 е регулирано от конститутивно активната протеин киназа СК2 в този клетъчен фенотип.
4. Доказа се, че основните характеристики на *in vitro* култивираните ЛЕК комплексно отразяват фенотипната изява на типа катаракта, от която са изолирани. Това е солидна основа за използването на ЛЕК първични култури, изолирани от български пациенти в разнопосочни изследвания с практическа и научно-изследователска насоченост.
5. Настоящото изследване е първото по рода си у нас, което допринася за изясняването на механизмите на катарактогенезата и молекулните механизми, обуславящи последващата поява на вторичната катаракта при пациенти с диабет тип 2.

Библиография:

1. Kwon, C., Y. Kim, H Jeon. Collective Migration of Lens Epithelial Cell Induced by Differential Microscale Groove Patterns. *Journal of Functional Biomaterials*. 2017;8(4):34.
2. Здравков, Я., Е. Янкова, Г. Цветкова и др. Предиктивни фактори за развитие на постоперативна фибринова ексудация. *Български офталмологичен преглед*. 2018;62(1):33–42.
3. El-Sayyad, H., E. Bakr, H. El-Ghawet, et al. Overview of Congenital, Senile and Metabolic Cataract. *J Ocular Biol*. 2015;3(2):12.
4. Wormstone, IM, L. Wang, CSC Liu. Posterior capsule opacification. *Exp Eye Res*. 2009;88(2):257–69.
5. Wormstone, IM, JA. Eldred. Experimental models for posterior capsule opacification research. *Exp Eye Res*. 2016;142:2–12.
6. Andjelic S. The role of lens epithelial cells in the development of the posterior capsule opacification and in the lens regeneration after congenital cataract surgery. *Zdrav Vestn*. 2017;86:8.
7. Георгиева, А., И. Петкова. Диабет и очни усложнения. *Диабет и метаболизъм*. 2014;(4):3–7.
8. Awasthi, N., S. Guo, BJ. Wagner. Posterior capsular opacification: A problem reduced but not yet eradicated. *Arch Ophthalmol*. 2009;127(4):555-62.
9. Ma, B., R. Jing, J. Liu, et al. CTGF Contributes to the Development of Posterior Capsule Opacification: an *in vitro* and *in vivo* study. *International Journal of Biological Sciences*. 2018;14(4):437–48.
10. Portes, ALF., AC Almeida, S. Allodi, et al. Trypan blue staining for capsulorhexis: Ultrastructural effect on lens epithelial cells and capsules. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*. 2010;36(4):582–7.
11. Meng, F., JUN. Li, X. Yang, et al. Role of Smad3 signaling in the epithelial - mesenchymal transition of the lens epithelium following injury. *Int J Mol Med*. 2018; 42:851-860.
12. Pandey, SK., DJ. Apple, L. Werner. Posterior Capsule Opacification : A Review of the Aetiopathogenesis. *Indian journal of Ophthalmology*. 2004;52:99–112.

13. Pandey, SK., ME. Wilson, RH. Trivedi, et al. Pediatric Cataract Surgery and Intraocular Lens Implantation: Current Techniques, Complications, and Management. *International Ophthalmology Clinics*. 2001;41:175-196.
14. Smelser, GK. Embryology and Morphology of the Lens. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1965;4(4):398–410.
15. Танев, И. Ембриология на лещата. *От лещата до катарактата*. Еко РИНГ. 2019;13–4.
16. Beebe D. The Lens. *Adler's Physiology of the Eye*. Elsevier Health Sciences. 2011;258-264.
17. Kondoh, H., M. Uchikawa, Y. Kamachi. Interplay of Pax6 and SOX2 in lens development as a paradigm of genetic switch mechanisms for cell differentiation. *The International journal of developmental biology*. 2004;48(8–9):819–27.
18. Smith, AN., L-A. Miller, G. Radice, et al. Stage-dependent modes of Pax6-Sox2 epistasis regulate lens development and eye morphogenesis. *Development*. 2009 Sep;136(17):2977–85.
19. Sreelakshmi, V., A. Abraham. Age Related or Senile Cataract: Pathology, Mechanism and Management. *Austin J Clin Ophthalmol*. 2016;3(2):1067.
20. Bermbach, G., U. Mayer, GOH. Naumann. Human lens epithelial cells in tissue culture. *Exp Eye Res*. 1991;52(2):113–9.
21. Daszynski, DM., P. Santhoshkumar, AS. Phadte, et al. Failure of Oxysterols Such as Lanosterol to Restore Lens Clarity from Cataracts. *Sci Rep*. 2019;9(1):8459.
22. Танев, И. Анатомия на лещата. *От лещата до катарактата*. Еко РИНГ. 2019;15–23.
23. Gregory, L., M. Skuta, B. Louis, et al. Lens and Cataract. *American Academy of Ophthalmology*. 2011;11:1–275.
24. Horwitz J. Alpha-crystallin. *Exp Eye Res*. 2003;76(2):145–53.
25. Sun, Y., TH. MacRae. Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62(21):2460–76.
26. Петкова, К., К. Тодорова-Ананиева, М. Стаменова. Нискомолекулни протеини на топлинния шок и ролята им при някои заболявания. *Медицински преглед*. 2008;32–42.

27. Andley, UP. Crystallins in the eye: Function and pathology. *Prog Retin Eye Res.* 2007;26(1):78–98.
28. Танев, И. Физиология на лещата. *От лещата до катарактата.* Еко РИНГ. 2019;24–9.
29. Mathias, RT., JL. Rae, GJ. Baldo. Physiological properties of the normal lens. *Physiological Reviews.* 1997;77(1):21–50.
30. Donaldson, PJ., K-SN. Chee, JC. Lim, et al. Regulation of lens volume: implications for lens transparency. *Exp Eye Res.* 2009;88(2):144–50.
31. Fisher, RF., BE. Pettet. Presbyopia and the water content of the human crystalline lens. *The Journal of Physiology.* 1973;234(2):443–7.
32. Kinoshita, JH. Pathways of Glucose Metabolism in the Lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1965;4(4):619–28.
33. Sanders, DR., Vukich JA. Incidence of Lens Opacities and Clinically Significant Cataracts With the Implantable Contact Lens: Comparison of Two Lens Designs. *J Refract Surg.* 2002 Nov 1;18(6):673–82.
34. Gupta, VB., M. Rajagopala, B. Ravishankar. Etiopathogenesis of cataract: An appraisal. *Indian J Ophthalmol.* 2014;62(2):103–10.
35. Kisić, B., D. Mirić, L. Zorić, et al. Role of lipid peroxidation in pathogenesis of senile cataract. *Vojnosanit Pregl.* 2009;66(5):371–5.
36. Gao, J., X. Sun, FJ. Martinez-Wittinghan, et al. Connections between connexins, calcium, and cataracts in the lens. *J Gen Physiol.* 2004;124(4):289–300.
37. Duncan, G., AR. Bushell. Ion analyses of human cataractous lenses. *Exp Eye Res.* 1975;20(3):223–30.
38. Takemoto, LJ. Oxidation of cysteine residues from alpha-A crystallin during cataractogenesis of the human lens. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;223(2):216–20.
39. Harocopos, GJ., KM. Alvares, AE. Kolker, et al. Human age-related cataract and lens epithelial cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39(13):2696–706.
40. Li, Wc., Jr. Kuszak, K. Dunn, et al. Lens epithelial cell apoptosis appears to be a common cellular basis for non congenital cataract development in humans and animals. *Journal of Cell Biology.* 1995;130(1):169–81.

41. Klein, BEK., R. Klein, KE. Lee, et al. Markers of inflammation, vascular endothelial dysfunction, and age-related cataract. *Am J Ophthalmol.* 2006;141(1):116–22.
42. Lanju, X., X. Jing, L. Shichang, et al. Induction of apoptosis by antimycin A in differentiated PC12 cell line. *Journal of Applied Toxicology.* 2014;34(6):651–7.
43. Jung, Y., MS. Kim, C-K. Joo, et al. Role of the intrinsic apoptotic pathway in cataractogenesis in type 2 diabetic patients. *Journal of Cataract & Refractive Surgery.* 2013;39(10):1470–6.
44. Osnes-Ringen, Ø., KH. Berg, MC. Moe, et al. Cell death pattern in lens epithelium of cataract patients. *Acta Ophthalmologica.* 2016;94(5):514–20.
45. Kisic, B., D. Miric, L. Zoric, et al. Antioxidant capacity of lenses with age-related cataract. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;467130.
46. Stamenkovic, M., T. Radic, I. Stefanovic, et al. Glutathione S-transferase omega-2 polymorphism Asn142Asp modifies the risk of age-related cataract in smokers and subjects exposed to ultraviolet irradiation. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2014;42(3):277–83.
47. Bhuyan, KC., DK. Bhuyan. Catalase in ocular tissue and its intracellular distribution in corneal epithelium. *Am J Ophthalmol.* 1970;69(1):147–53.
48. Pirie, A. Glutathione Peroxidase In Lens And A Source Of Hydrogen Peroxide In Aqueous Humour. *Biochem J.* 1965;96:244–53.
49. Rao, GN., B. Sadasivudu, E. Cotlier. Studies on glutathione S-transferase, glutathione peroxidase and glutathione reductase in human normal and cataractous lenses. *Ophthalmic Res.* 1983;15(4):173-9.
50. Yegorova, S., O. Yegorov, MF. Lou. Thioredoxin induced antioxidant gene expressions in human lens epithelial cells. *Exp Eye Res.* 2006;83(4):783-92.
51. Giblin, FJ. Glutathione: a vital lens antioxidant. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2000;16(2):121-35.
52. Механджиев, Д. Ролята на свободните радикали при катарактогенезата и стареенето на лещата. *Български офталмологичен преглед.* 1997;(пилотен):22–6.
53. Sharma, KK., P. Santhoshkumar. Lens aging: effects of crystallins. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1790(10):1095–108.

54. Танев, И. Катаракта. *От лещата до катарактата*. Еко Ринг. 2019;35–51.
55. Sweeney, MH., RJ. Truscott. An impediment to glutathione diffusion in older normal human lenses: a possible precondition for nuclear cataract. *Exp Eye Res*. 1998;67(5):587–95.
56. Lampi, KJ., Z. Ma, SR. Hanson, et al. Age-related changes in human lens crystallins identified by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Exp Eye Res*. 1998;67(1):31–43.
57. Srivastava, OP., K. Srivastava, V. Harrington. Age-related degradation of betaA3/A1-crystallin in human lenses. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;258(3):632–8.
58. Von Sallmann, L. Experimental studies on early lens changes after roentgen irradiation. III. Effect of x-radiation on mitotic activity and nuclear fragmentation of lens epithelium in normal and cysteine-treated rabbits. *AMA Arch Ophthalmol*. 1952 Mar;47(3):305–20.
59. Shubin, AV., IV. Demidyuk, AA. Komissarov et al. Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival. *Oncotarget*. 2016;7(34):55863–89.
60. Obrosova, IG., SSM. Chung, PF. Kador. Diabetic cataracts: mechanisms and management. *Diabetes Metab Res Rev*. 2010;26(3):172–80.
61. Li, J., W. Ye, W. Xu, et al. Activation of autophagy inhibits epithelial to mesenchymal transition process of human lens epithelial cells induced by high glucose conditions. *Cellular Signalling*. 2020;75:109768.
62. Pollreisz, A., U. Schmidt-Erfurth. Diabetic Cataract—Pathogenesis, Epidemiology and Treatment. *Journal of Ophthalmology*. 2010;1–8.
63. Kumamoto, Y., Y. Takamura, E. Kubo, et al. Epithelial cell density in cataractous lenses of patients with diabetes: Association with erythrocyte aldose reductase. *Exp Eye Res*. 2007;85(3):393–9.
64. Leske, MC., S-Y. Wu, A. Hennis, et al. Diabetes, hypertension, and central obesity as cataract risk factors in a black population. *Ophthalmology*. 1999;106(1):35–41.
65. Pessoa, R., C. Lira, MA. Nascimento, et al. Incidence of preoperative high blood pressure in cataract surgery among hypertensive and normotensive patients. *Indian J Ophthalmol*. 2010;58(6):493–5.

66. Аргирова, М. Гликирането на лещените протеини и развитието на старческа и диабетна катаракта. *Български офталмологичен преглед*. 2001;(2):62–5.
67. Minckler, D. Cataract surgery in patients with diabetes. *Ophthalmology*. 1998;105(6):949–50.
68. Nibourg, LM., E. Gelens, R. Kuijer, et al. Chapter 2 Prevention of posterior capsular. *Exp Eye Res*. 2015;(136):110–5.
69. Saxby, L., E. Rosen, M. Boulton. Lens epithelial cell proliferation, migration, and metaplasia following capsulorhexis. *British Journal of Ophthalmology*. 1998;82(8):945–52.
70. Wormstone, I., C. Liu, J. Rakic, et al. Human lens epithelial cell proliferation in a protein-free medium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38(2):396–404.
71. Duncan, G. Lens cell growth and posterior capsule opacification: in vivo and in vitro observations. *British Journal of Ophthalmology*. 1998;82(10):1102–3.
72. Zhang, R., Y. Wei, C. Zhao, et al. EDIL3 depletion suppress epithelial-mesenchymal transition of lens epithelial cells via transforming growth factor β pathway. *International Journal of Ophthalmology*. 2018;1:1–7.
73. Whitmarsh, AJ. Casein Kinase 2 Sends Extracellular Signal-Regulated Kinase Nuclear. *Molecular and Cellular Biology*. 2011;31(17):3512–4.
74. Filhol, O., C. Cochet. Protein Kinase CK2 in Health and Disease: Cellular functions of Protein kinase CK2: a dynamic affair. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(11–12):1830–9.
75. Kim, S., S. Ham, K. Yang, et al. Protein kinase CK2 activation is required for transforming growth factor β -induced epithelial-mesenchymal transition. *Mol Oncol*. 2018;12(10):1811–26.
76. Son, E., H. Do, H-M. Joo, et al. Induction of alkaline phosphatase activity by l-ascorbic acid in human osteoblastic cells: a potential role for CK2 and Ikaros. *Nutrition*. 2007;23(10):745–53.
77. Rodrigues, EB., EF. Costa, FM. Penha, et al. The Use of Vital Dyes in Ocular Surgery. *Survey of Ophthalmology*. 2009;54(5):576–617.
78. Badaro, E., EA. Novais, FM. Penha, et al. Vital Dyes in Ophthalmology: a Chemical Perspective. *Current Eye Research*. 2014;39(7):649–58.

79. Cooksey, CJ. Quirks of dye nomenclature. 3. Trypan blue. *Biotechnic & Histochemistry*. 2014;89(8):564–7.
80. Brockmann, T., V. Blanchard, P. Heretsch, et al. Photochemical degradation of trypan blue. *PLoS ONE*. 2018;13(4):1–15.
81. Melles, GRJ., PWT. de Waard, JH. Pameyer, W. Houdijn Beekhuis. Trypan blue capsule staining to visualize the capsulorhexis in cataract surgery. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 1999;25(1):7–9.
82. Jhanji, V., E. Chan, S. Das, et al. Trypan blue dye for anterior segment surgeries. *Eye*. 2011;25(9):1113–20.
83. Yetik, H., K. Devranoglu, S. Ozkan. Determining the lowest trypan blue concentration that satisfactorily stains the anterior capsule. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 2002;28(6):988–91.
84. Bhartiya, P., N. Sharma, M. Ray, et al. Trypan blue assisted phacoemulsification in corneal opacities. *The British Journal of Ophthalmology*. 2002;86(8):857–9.
85. Dada, T., M. Ray, P. Bhartiya, et al. Trypan-blue-assisted capsulorhexis for trainee phacoemulsification surgeons. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 2002;28(4):575–6.
86. Chang, Y-S., S-Y. Tseng, S-H. Tseng. Comparison of dyes for cataract surgery. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 2005;31(4):799–804.
87. Rangaraj, NR., M. Ariga, J. Thomas. Comparison of anterior capsule electron microscopy findings with and without trypan blue stain. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 2004;30(10):2241–2.
88. Melendez, RF., N. Kumar, SM. Maswadi, et al. Photodynamic Actions of Indocyanine Green and Trypan Blue on Human Lens Epithelial Cells In Vitro. *American Journal of Ophthalmology*. 2005;140(1):132–4.
89. Nanavaty, MA., K. Johar, MA. Sivasankaran, et al. Effect of trypan blue staining on the density and viability of lens epithelial cells in white cataract. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 2006;32(9):1483–8.
90. Sharma, P., M. Panwar. Trypan blue injection into the capsular bag during phacoemulsification: Initial postoperative posterior capsule opacification results. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 2013;39(5):699–704.
91. Ibaraki, N. Human lens epithelial cell culture. *Methods Mol Biol*. 2002;188:1-6.

92. Reddan, JR., SJ. McGee, EM. Goldenberg, et al. Both human and newborn rabbit lens epithelial cells exhibit similar limited growth properties in tissue culture. *Current Eye Research*. 1982;2(6):399–405.
93. Ascaso, FJ., V. Huerv. The History of Cataract Surgery. *InTech*; 2013
94. Sundelin, K., A. Petersen, Y. Soltanpour, et al. In vitro growth of lens epithelial cells from cataract patients - association with possible risk factors for posterior capsule opacification. *The open ophthalmology journal*. 2014;8:19–23.
95. Islam, MdS. Calcium Signaling. Cham: Springer International Publishing; *Advances in Experimental Medicine and Biology*; 2020;1131.
96. Law, B., V. Fowlkes, JG. Goldsmith, et al. Diabetes-Induced Alterations in the Extracellular Matrix and Their Impact on Myocardial Function. *Microsc Microanal*. 2012;18(1):22–34.
97. Trepap, X., Z. Chen, K. Jacobson. Cell Migration. Terjung R, editor. *Comprehensive Physiology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2012;c110012.
98. Huang, Y., TR. Kyriakides. The role of extracellular matrix in the pathophysiology of diabetic wounds. *Matrix Biology Plus*. 2020;7:100037.
99. Nishi, O., J. Saitoh, H. Hitani. Morphometry of lens epithelial cells of human cataracts. *European Journal of Implant and Refractive Surgery*. 1991;3(4):245–8.
100. Du, L., M. Hao, C. Li, et al. Quercetin inhibited epithelial mesenchymal transition in diabetic rats, high-glucose-cultured lens, and SRA01/04 cells through transforming growth factor- β 2/phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2017;452:44–56.
101. Liu, H., Y. Mao, B. Xia, et al. Curcumin Inhibits Proliferation and Epithelial-Mesenchymal Transition in Lens Epithelial Cells through Multiple Pathways. *BioMed Research International*. 2020;2020:1–11.
102. Shu, DY., FJ. Lovicu. Myofibroblast transdifferentiation: The dark force in ocular wound healing and fibrosis. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2017;60:44–65.
103. Velez-delValle, C., M. Marsch-Moreno, F. Castro-Muñozledo, et al. Epithelial cell migration requires the interaction between the vimentin and keratin intermediate filaments. *Sci Rep*. 2016;6(1):24389.
104. Wheelock, MJ., Y. Shintani, M. Maeda, et al. Cadherin switching. *Journal of Cell Science*. 2008;121(6):727–35.

105. Logan, CM., S. Rajakaruna, C. Bowen, et al. N-cadherin regulates signaling mechanisms required for lens fiber cell elongation and lens morphogenesis. *Developmental Biology*. 2017;428(1):118–34.
106. Richardson, AM., LS. Havel, AE. Koyen, et al. Vimentin Is Required for Lung Adenocarcinoma Metastasis via Heterotypic Tumor Cell–Cancer-Associated Fibroblast Interactions during Collective Invasion. *Clin Cancer Res*. 2018;24(2):420.
107. Maisel, H., P. Atreya. N-cadherin detected in the membrane fraction of lens fiber cells. *Experientia*. 1990;46(2):222–3.
108. Leong, L., A. Menko, G. Grunwald. Differential expression of N- and B-cadherin during lens development. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2000;41(11):3503—3510.
109. Wang, M., D. Ren, W. Guo, et al. N-cadherin promotes epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell-like traits via ErbB signaling in prostate cancer cells. *Int J Oncol*. 2016;48(2):595–606.
110. Saénz-de-Santa-María, I., L. Celada, M-D. Chiara. The Leader Position of Mesenchymal Cells Expressing N-Cadherin in the Collective Migration of Epithelial Cancer. *Cells*. 2020;9(3):731.
111. Wierstra, I., J. Alves. FOXM1, a typical proliferation-associated transcription factor, 2007;388(12):1257-1274.
112. Bron, AJ., J. Sparrow, NAP. Brown, et al. The lens in diabetes. *Eye*. 1993;7(2):260–75.
113. Ebihara, Y., S. Kato, T. Oshika, et al. Posterior capsule opacification after cataract surgery in patients with diabetes mellitus: *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 2006;32(7):1184–7.
114. Elgohary, MA., JG. Dowler. Incidence and risk factors of Nd:YAG capsulotomy after phacoemulsification in non-diabetic and diabetic patients. *Clin Exp Ophthalmol*. 2006;34(6):526-34.
115. Praveen, MR., AR. Vasavada, GD. Shah, et al. A prospective evaluation of posterior capsule opacification in eyes with diabetes mellitus: a case–control study. *Eye*. 2014;28(6):720–7.
116. Zaczek, A., C. Zetterström. Posterior capsule opacification after phacoemulsification in patients with diabetes mellitus: *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 1999;25(2):233–7.

117. Li, J., X. Tang, X. Chen. Comparative effects of TGF- β 2/Smad2 and TGF- β 2/Smad3 signaling pathways on proliferation, migration, and extracellular matrix production in a human lens cell line. *Exp Eye Res.* 2011;92(3):173–9.
118. de Iongh, RU., E. Wederell, FJ. Lovicu, et al. Transforming Growth Factor- β -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in the Lens: A Model for Cataract Formation. *Cells Tissues Organs.* 2005;179(1–2):43–55.
119. Simon, HU., A. Haj-Yehia, F. Levi-Schaffer. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis : an International Journal on Programmed Cell Death.* 2000;5(5):415-418.
120. Schinke, T., MD. McKee, G. Karsenty. Extracellular matrix calcification: where is the action? *Nat Genet.* 1999;21(2):150–1.
121. Deepa, K., BM. Goud, M. Suma, et al. Antioxidant and calcium levels in mature and immature diabetic cataract lens. *Int J Life Sci.* 2012;6(1):56–60.
122. Görlach, A., K. Bertram, S. Hudecova, et al. Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biology.* 2015;6:260–71.
123. Apple, DJ., KD. Solomon, MR. Tetz, et al. Posterior capsule opacification. *Survey of Ophthalmology.* 1992;37(2):73–116.
124. Pandey, SK., DJ. Apple, L. Werner. Posterior Capsule Opacification : A Review of the Aetiopathogenesis. *Indian journal of Ophthalmology.* 2004;52:99–112.
125. Sinumol, S, PS. Jayalakshmy, T. Sreedharan, et al. Effect of intraoperative trypan blue on lens epithelial cells – Histomorphological analysis. *Saudi Journal of Ophthalmology.* 2019;33(1):18–23.