

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Prim. mr. sc. Robert Stanić, dr. med.

**POVEZANOST TERAPIJE ANALOZIMA
PROSTANGLANDINA F2 I FIBROZNIH PROMJENA U
PACIJENATA NAKON OPERACIJE GLAUKOMA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

SPLIT, 2025.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Prim. mr. sc. Robert Stanić, dr. med.

**POVEZANOST TERAPIJE ANALOZIMA
PROSTANGLANDINA F2 I FIBROZNIH PROMJENA U
PACIJENATA NAKON OPERACIJE GLAUKOMA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

SPLIT, 2025.

Ovaj rad izrađen je na Odjelu za oftalmologiju i optometriju Opće bolnice Zadar, Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju Kliničkog bolničkog centra Split i Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

Voditelj rada: doc. dr. sc. Samir Čanović, dr. med.

Zahvala

.

SADRŽAJ

1. UVOD	8
1.1. Glaukom	9
1.1.1. Patofiziološki mehanizam nastanka glaukoma	10
1.1.2. Klinička slika glaukoma	13
1.1.3. Dijagnostičke metode u glaukomu	14
1.2. Liječenje glaukoma	19
1.2.1. Konzervativno liječenje glaukoma	19
1.2.2. Lasersko liječenje glaukoma	21
1.2.3. Kirurško liječenje glaukoma	22
1.3. Očna fibroza	27
1.3.1. Čimbenik rasta vezivnog tkiva	29
1.3.2. Transkripcijski čimbenik c-myb	29
1.3.3. Protein cinkovog prsta SNAI1	30
1.3.4. Alfa glatkomišićni aktin	30
1.3.5. Protein toplinskog šoka 70	30
1.3.6. Čimbenik induciran hipoksijom alfa	31
2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA.....	32
3. ISPITANICI I POSTUPCI	34
3.1. Ispitanici i kirurški zahvat	35
3.2. Klinički pregled	35
3.3. Prikupljanje tkiva i osnovni postupci bojenja.....	36
3.4. Dvostruka imunofluorescencija	36
3.5. Statistički postupci	38
4. REZULTATI.....	40
4.1. Usporedba intraokularnog tlaka i vidne oštine prije i nakon glaukomskog zahvata	42

4.2.	Analiza uzoraka konjunktive, episklere i duboke bjeloočnice na preparatima bojenim hemalaun eozinom	43
4.3.	Analiza uzoraka konjunktive, episklere i duboke bjeloočnice na preparatima bojenim Masson trikromom	44
4.4.	Izražaj HSP70 i HIFa u konjunktivi, episkleri i skleri ispitanika s glaukomom 45	
4.5.	Izražaj SNAIL i aSMA u konjunktivi, episkleri i skleri ispitanika s glaukomom.....	47
4.6.	Izražaj CTGF i cMYB u konjunktivi, episkleri i skleri ispitanika s glaukomom.....	49
5.	RASPRAVA	51
6.	ZAKLJUČCI.....	56
7.	SAŽETAK	58
8.	SUMMARY	61
9.	POPIS LITERATURE.....	64
10.	ŽIVOTOPIS	76

POPIS OZNAKA I KRATICA

AAO – Američka akademija za oftalmologiju (engl. *American Academy of Ophthalmology*)

ACG – glaukom zatvorenog kuta (engl. *angle closure glaucoma*)

ALT – trabeculoplastika argonskim laserom (engl. *argon laser trabeculoplasty*)

cMYB – transkripcijski čimbenik cMYB

CTGF - čimbenik rasta vezivnog tkiva (engl. *connective tissue growth factor*)

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindolom

EGS – Europsko društvo za glaukom (engl. *European Glaucoma Society*)

EMT – epitelna mezenhimalna tranzicija

GWAS – cjelogenomska asocijacijska istraživanja (engl. *genome-wide association studies*)

HIFa – čimbenika induciranog hipoksijom alfa

HSP70 – protein toplinskog šoka 70 (engl. *heat shock protein 70*)

IOT – intraokularni tlak

ISM – izvanstanični matriks

MMP – matriksna metaloproteinaza

OAG – glaukom otvorenog kuta (engl. *open angle glaucoma*)

OCT – optička koherencijska tomografija

PGF2 – prostanglandin F2

SAP – standardna automatska perimetrija

SLT – selektivna laserska trabekuloplastika

SNAIL – Protein cinkovog prsta SNAIL

SŽS – središnji živčani sustav

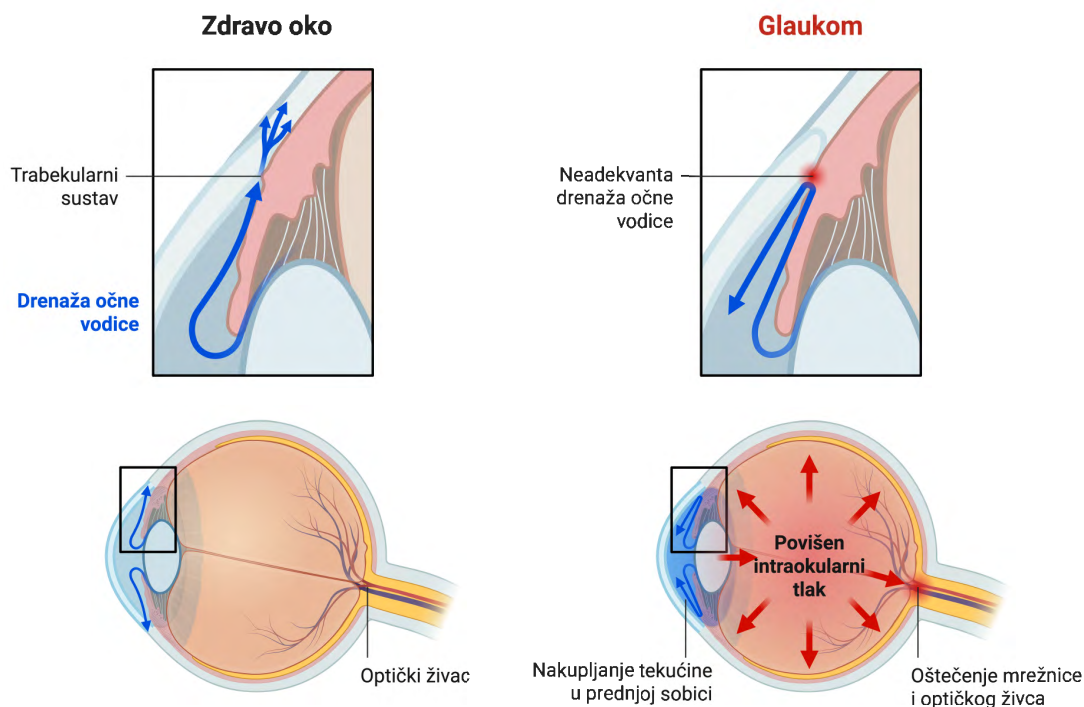
SWAP – automatizirana perimetrija kratke valne doljine (engl. *short-wavelength automated perimetry*)

UBM – ultrazvučna biomikroskopija

1. UVOD

1.1. Glaukom

Glaukom je kronična bolest oka koja za posljedicu ima optičku neuropatiju, karakteriziranu progresivnom degeneracijom ganglijskih stanica mrežnice (1). Naziv potječe od grčke riječi γλαυκός (glaukós), što znači sivo ili mutno, a ukazuje na posljedice povišenog intraokularnog tlaka (2) (Slika 1).



Slika 1. Osnovni patofiziološki mehanizam glaukoma.

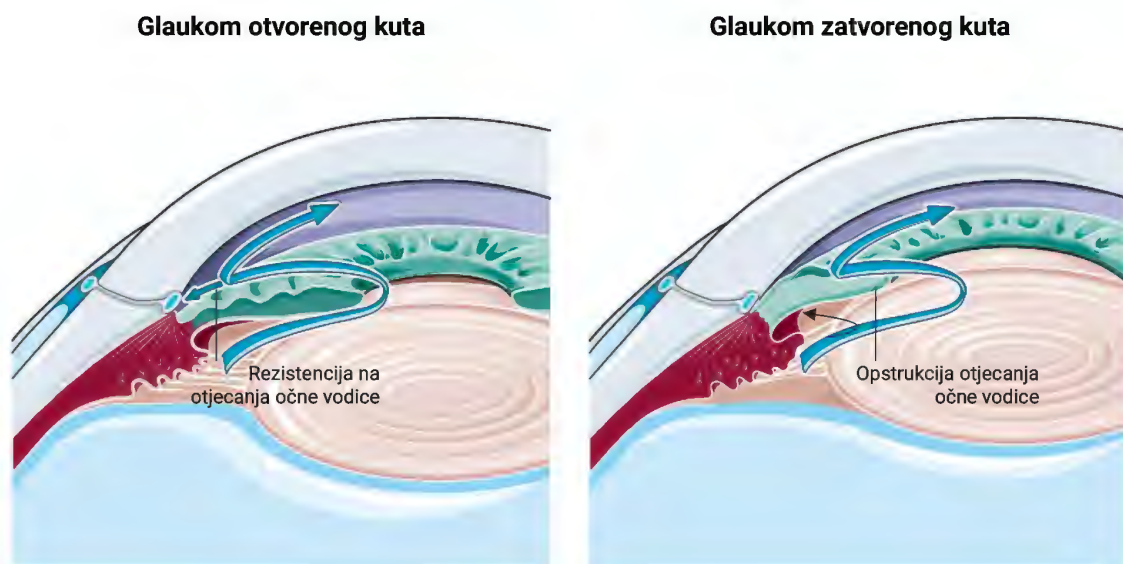
Licenca: <https://BioRender.com/csfudkt>.

Glaukom je vodeći uzrok nepovratne sljepoće u svijetu (3,4). Procjenjuje se da danas 76 milijuna ljudi boluje od glaukoma (3). Prema predviđanjima, globalna prevalencija i dalje je porastu te će 2040. godine doseći 111,8 milijuna oboljelih (3). Prevalencija glaukoma se povećava sa životnom dobi, što ukazuje da će porast incidencije biti najveći u Africi i Aziji gdje dolazi do postupnog starenja populacije (3). Demografske trendovi u Europi također su negativni te je prema recentnoj studiji Stuart i suradnika prevalencija glaukoma 12,3

milijuna, uključujući 6,9 milijuna osoba s nedijagnosticiranom bolešću. Također se predviđa porast prevalencije za više od milijun ljudi do 2050. godine (5).

1.1.1. Patofiziološki mehanizam nastanka glaukoma

Etiopatogeneza nastanka glaukoma i čimbenici koji doprinose progresiji bolesti nisu u potpunosti razjašnjeni (1). Glaukom se dijeli na glaukom otvorenog kuta (engl. *open angle glaucoma* (OAG)) i glaukom zatvorenog kuta (engl. *angle closure glaucoma* (ACG)) (Slika 2).



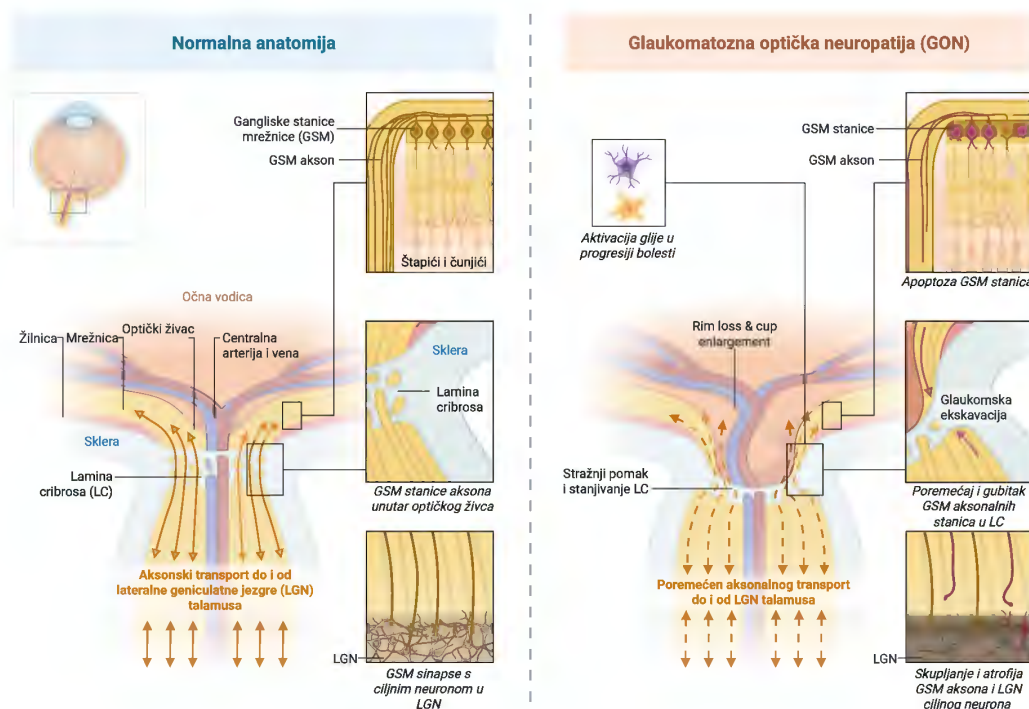
Slika 2. Podjela glaukoma.

Preuzeto iz: Sarkis S, Chamard C, Johansen B, Daien V, Michon F. Challenging glaucoma with emerging therapies: an overview of advancements against the silent thief of sight. *Front Med.* 2025;12:1527319.

Licenca: <https://BioRender.com/ay5iyjo>.

1.1.1.1. *Primarni glaukom otvorenog kuta*

Osnovni patofiziološki mehanizam glaukoma je povišen intraokularni tlak (IOT) koji za posljedicu ima postupno oštećenje ganglijskih stanica mrežnice. Ključnu ulogu u regulaciji očnog tlaka ima adekvatna sekrecija očne vodice iz cilijarnog tijela i njena resorpcija. Drenaža očne vodice odvija se preko dva odvojena puta - trabekularne mreže i uveoskleralnog izlaznog puta (1). U osoba s OAG primarno dolazi do povišenja rezistencije otjecanja očne vodice u trabekularnoj mreži (1). Povišeni IOP postupno utječe na stražnji segment oka, posebno kribroznu laminu (lat. *lamina cribrosa*) gdje optički živac ulazi u oko (1,6). To je područje najosjetljivije na povišeni IOT koji izaziva kompresiju, deformaciju i preoblikovanje kribrozne lamine, mehaničko oštećenje aksona i poremećaj aksonalnog transporta (1,7,8). Poremećaj aksonalnog transporta se smatra inicijalnim degenerativnim korakom koji postupno uzrokuje smrt ganglijskih stanica mrežnice (9). Do sad su objavljene brojne studije koje demonstriraju utjecaj aksonalnog transporta u neurodegenerativnim bolestima poput Parkinsonove, Alzheimerove i Huntingtonove bolesti (10). Na animalnim modelima i humanim tkivima dokazano je da poremećaj u aksonalnom transportu utječe na neadekvatni unutarstanični transport organela, sinaptičkih komponenti, vezikula i neurotrofičkih čimbenika, što za posljedicu ima nastanak kroničnog oštećenja vidnog živca (10) (Slika 3).



Slika 3. Prikaz normalne anatomije i neurodegenerativnih promjena povezanih s optičkom neuropatijom kod glaukoma

Preuzeto iz: Weinreb R, Aung T, Medeiros F. The pathophysiology and treatment of glaucoma: A review. JAMA. 2014; 311(18): 1901–11.

Licenca: <https://BioRender.com/a9bh8w7>.

Posebnu skupinu OAG glaukoma čine pacijenti s normotenzivnim glaukomom, prvi put opisanim 1857. godine, koji oblik do danas stvara poteškoće u adekvatnoj dijagnostici i liječenju glaukoma (11). Prema podacima iz različitih studija, udio normotenzivnog glaukoma u OAG u Japanu je 92,3%, a u većini europskih zemalja 30% do 40% (11,12). Sve više studija ukazuje na važnost drugih čimbenika u nastanku glaukomatozne optičke neuropatije, uključujući kardiovaskularne i neurovaskularne bolesti, protok i spazam krvnih žila, oksidativni stres i endotelnu disfunkciju (11). Kod bolesnika koji imaju niži tlak cerebrospinalne tekućine u subarahnoidalnom prostoru oko vidnog živca, to može negativno utjecati na gradijent IOP-a i rezultirati nastankom optičke neuropatije (11,13).

Glavni rizični čimbenici za razvoj glaukoma su životna dob, etnička pripadnost i spol, a više istraživanja ukazuju i na genetske čimbenike (14). U eri cjelogenomskih asocijacijskih istraživanja (GWAS od engl. *genome-wide association studies*) nađeni su genski lokusi povezani s OAG (15). Za sad nije u potpunosti jasno kako navedeni geni utječu na nastanak i razvoj OAG te su potrebna daljnja istraživanja kakobi se eventualno pronašla genotip-fenotip korelacija (1).

1.1.1.2. Primarni glaukom zatvorenog kuta

Temeljna razlika između OAG i ACG je u očnom kutu - mjestu gdje se očna vodica drenira iz oka, jer je u ACG-u došlo do anatomske opstrukcije šarenicom i zatvaranja kuta, najmanje od 270° (1). Najčešći uzrok opstrukcije oćnog kuta su poremećaji šarenice, leće i retrolentikularnih struktura (1). Pupilarni blok posljedićno dovodi do zatvaranje oćnoga kuta i otećanog prolaska oćne vodice iz straćnje u prednju oćnu sobicu (1). U rjećim slućajevima ACG moće biti uzrokovan anatomskim varijacijama šarenice te dinamićnim procesima, kao što su povećani volumen šarenice uz dilataciju zjenice i korioidni izljev (1).

Rizićni ćimbenici su slićni kao kod OAG-a i ukljućuju životnu dob, etnićku pripadnost i spol, uz dodatan rizik kod bolesnika s uskim prednjim segmentom, primjerice osoba s manjim oćima, plićom prednjom oćnom sobicom, debljom i sprijeda pozicioniranom lećom te kraćom aksilarnom duljinom oka (1). U jednoj epidemioloćkoj studiji pokazana je povećana incidencija OAG-a kod osoba u srodstvu koja je bila gotovo 60%, a relativni rizik kod braće i sestara 7,6 puta veći nego u općoj populaciji (16). Liang Y i sur. u recentnoj meta analizi navode više od 30 gena ili lokusa koji su povezani s primarnim ACG (14). Naćalost, joć nisu poznati genetski prediktori koji bi bili korisni u svakodnevnoj klinićkoj praksi jer su istraćivanja uglavnom bila na raznim populacijama i tipovima glaukoma, a ACG je genetski sloćen i potrebna su dalja istraćivanja (14,17).

1.1.2. Klinićka slika glaukoma

Klinićka prezentacija glaukoma razvija se postupno pa je većina pacijenata bez simptoma, a pojava gubitka vida znak već uznapredovale bolesti. Tradicionalno, glaukom se

definira kao vrijednost IOT-a iznad 21 mmHg; s obzirom da je prosječni IOT u odraslih 15-16 mmHg, ta je vrijednost za dvije standardne devijacije veća od prosječne (18). Međutim, proizvoljne granične vrijednosti IOT-a prema vodećim smjernicama europskih i američkih društava nisu posve adekvatne za razlikovanje zdravlja i bolesti (18–20). Povišeni IOT jest rizični čimbenik za razvoj glaukoma, ali ima pacijenata s povišenim IOT-om koji tijekom dugog praćenja nikad nisu razvili glaukom (1,18,21).

Akutni glaukom zatvorenog kuta je urgentno stanje u oftalmologiji koje zahtjeva hitno liječenje kako bi se izbjegla sljepoća. Manifestira se naglom boli u oku, vaskularnom kongestijom manifestiranom kao konjuktivitis i episkleritis, edemom rožnice, umjereno dilatiranom zjenicom, zamućenjem leće, glavoboljom, mučninom i povraćanjem (20).

1.1.3. Dijagnostičke metode u glaukomu

S obzirom na kasnu pojavu simptoma i teške posljedice za vid, razmišlja se o uvođenju sustavnih probira kojima bi se glaukom dijagnosticirao pravovremeno. Američka akademija za oftalmologiju (AAO prema engl. *American Academy of Ophthalmology*) savjetuje opći probir populacije starije od 40 godina, posebno rizičnih skupina s kroničnim bolestima (šećerna bolest i kardiovaskularni bolesti) i pozitivnom obiteljskom anamnezom (22). Druga društva, uključujući Europsko društvo za glaukom (EGS od engl. *European Glaucoma Society*) za sad ne savjetuju opći probir s obzirom na nema jasnih smjernica koji bi se testovi koristili i nedostaju studije s dugoročnim praćenjem rezultata probira (22).

S obzirom da ne postoji jedinstveni test i standardi za postavljanje dijagnoze glaukoma, rana dijagnoza može biti izazov (1). Postoje brojne mogućnosti za dijagnostiku glaukoma koje uključuju klinički pregled oka, perimetriju, tonometriju, gonioskopiju i druge metode (18).

1.1.3.1. Tonometrija

Povišeni IOT je vrijednost očnog tlaka iznad 21 mmHg, što je za dvije standardne devijacije veće od prosječnog očnog tlaka u odrasloj populaciji. Postoje različite tehnike i metode tonometrije, a zasnivaju se na odnosu IOT-a i sile koja je potrebna za deformaciju

prirodnog oblika rožnice (18). Tonometrija se dijeli na kontaktnu i nekontaktnu. Danas dostupne metode mjerenja tonometrije prikazane su u Tablici 1 (23).

Tablica 1. Metode mjerenja tonometrije

Metode	Prednosti ili nedostaci
Goldmannova aplanacijska tonometrija	Zlatni standard u mjerejnu IOT.
Perkinsova aplanacijska tonometrija	Prijenosna aplanacija. Slična metoda kao i Goldmannova aplanacija.
Tono-Pen apalancijski tomometar	Koristi manju površinu rožnice za mjerenje.
Pneumotonometar	Često pokazuje veće vrijednosti od aplanacije.
Povratna tonometrija (Icare)	Kratkotrajni dodir s rožnicom. Nije potrebna topikalna anestezija.
Schiøtzova tonometrija	Mjeri udubljenje rožnice uzrokovano poznatom težinom. Glavna prednost cijena.
Tonometri s mlazom zraka	Radi se ne kontaktnoj mjerenju IOT. Značajan broj lažno pozitivnih i lažno negativnih očitavanja.
Palpacija	Točnost ovisi o iskustvu ispitivača.

Preuzeto iz: Fayed MA, Teresa C Chen TC. Pediatric intraocular pressure measurements: Tonometers, central corneal thickness, and anesthesia. *Surv Ophthalmol.* 2019;64(6):810-825.

1.1.3.2. Gonioskopija

Gonioskopija ima ključnu ulogu u dijagnostici glaukoma jer omogućuje uvid u prednji očni kut. Ako postoji sumnja na ACG, gonioksopiju treba učiniti na oba oka (20). Dvije su tehnike gonioskopije: direktna, uz pomoć Koepperove ili Barkanove leće i indirektna, uz pomoć Goldmannove ili druge leće sa zrcalima, a obje metode izvode se u zamračenoj prostoriji uporabom uskog svijetla (18). Prema smjernicama EGS-a, adekvatna gonioskopija treba procijeniti sljedeće:

- razinu insercije šarenice
- oblik perifernog profila šarenice: ravan, konveksan ili konkavan

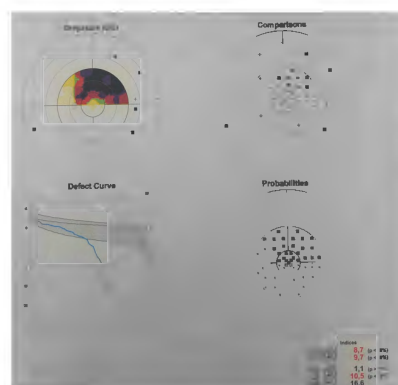
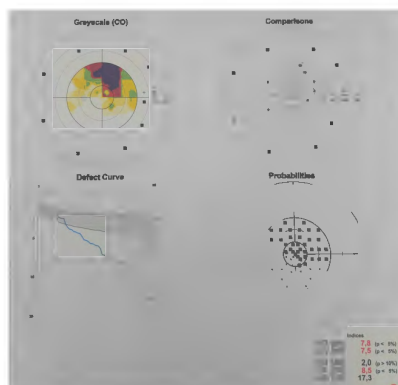
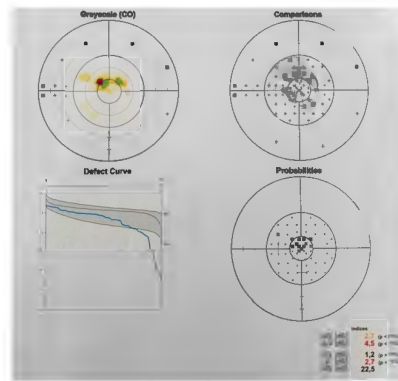
- širinu iridokornealnog kuta
- stupanj, vrstu i raspodjelu pigmentacije trabekularne mreže
- područja iridotrabekularne apozicije ili sinehije (18).

1.1.3.3. *Klinički pregled*

Klinički pregled očne pozadine i vidnog živca direktnom oftalmoskopijom ili na biomikroskopu ima važnu ulogu u dijagnostici i praćenju pacijenata s glaukomom. Međutim, klinički pregled je donekle subjektivan i ovisi o iskustvu oftalmologa te može biti značajnih varijacija u interpretaciji nalaza, čak i među specijalistima za glaukom (1). Jampel HD i sur. su u svojoj studiji prikazali neslaganje specijalista za glaukom u 43% slučajeva povezanih s promjenama optičkog živca kod pacijenata s OAG-om (24).

1.1.3.4. *Perimetrija*

Vidno polje ima centralnu ulogu u dijagnostici, a još više u praćenju i liječenju glaukoma. Na Slici 5 prikazani su različiti stupnjevi promjena vidnog polja kod pacijenata s glaukomom (18). Prema smjernicama, savjetuje se korištenje standardne automatske perimetrije (SAP od engl. *standard automated perimetry*) s tzv. bijelo na bijelo podražajima (25). Testiranje se može prilagoditi pacijentu i stupnju gubitka vidnog polja uporabom stupnjevanja praga osjetljivosti (24°, 30 ° i 10 °) i promjenom veličine podražaja (19). Druge tehnike perimetrije uključuju automatiziranu perimetriju kratke valne duljine (SWAP od engl. *short-wavelength automated perimetry*), tehnologiju udvostručenja frekvencije i perimetriju treperenja, a koje prema objavljenim studijama nisu pokazale značajno poboljšanje u detekciji ranog glaukoma (18).



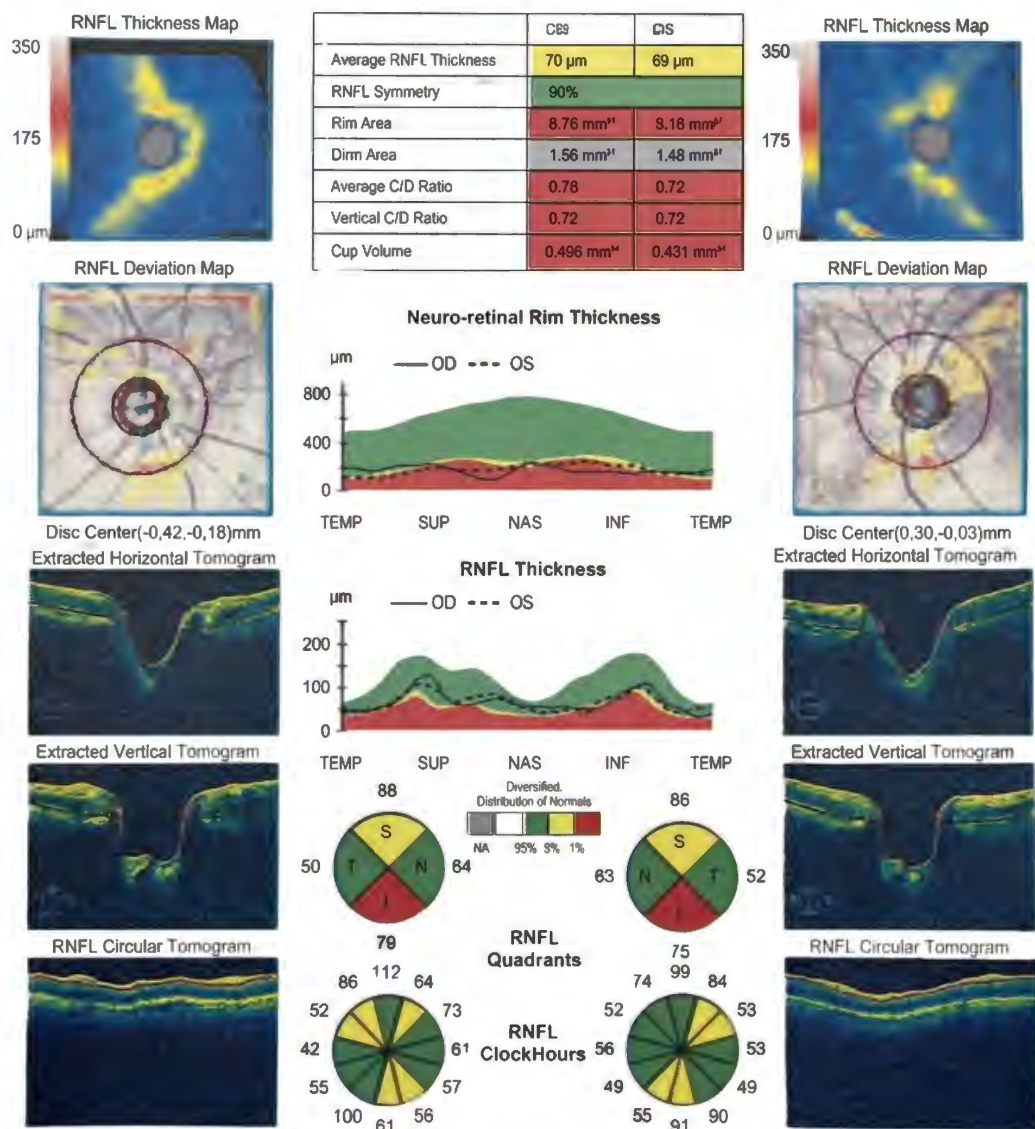
Slika 5. Prikaza progresije propadanja vidnog polja.

Slika je djelo autora.

1.1.3.5. *Optička koherencijska tomografija*

Optička koherencijska tomografija (OCT od engl. *optical coherence tomography*) je jedna od najčešće korištenih slikovnih metoda koja pomažu u otkrivanju i praćenju strukturnih glaukomaških oštećenja (26) (Slika 6). Uloga OCT-a je važna u procjeni ključnih

dijelova neuronskih struktura mrežnice - glave vidnog živca, sloja živčanih vlakana mrežnice i makule (26). Nalaz OCT-a, a pogotovo progresije bolesti treba interpretirati s oprezom zbog moguće varijabilnosti mjerenja i drugih promjena koji nisu povezane s glaukomom (18).



Slika 6. Prikaz optičke koherencijska tomografija kod glaukoma.

Slika je djelo autora.

1.2. Liječenje glaukoma

Liječenja glaukoma je jako zahtjevno i pri tom ključan odabir adekvatnog terapijskog pristupa za smanjenje kroničnih komplikacija glaukoma (27). Primarni terapijski pristup je redukcija IOT-a, jer ostali mogući čimbenici koji djeluju na vidni živac nemaju adekvatnu terapiju (27). U više kliničkih istraživanja pokazano je da redukcija IOT-a statistički značajno smanjuje progresiju oštećenja vidnog polja (28–30). S obzirom na navedeno, postavlja se pitanje ciljeva - postizanje niže razine očnog tlaka ili postotak smanjenja IOT-a (18). EGS smjernice zasad ne navode jasne terapijske ciljeve pa klinička odluka ovisi o stupnju glaukoma i oštećenju vidnog polja, a ponekad je potrebna redukcija IOT-a za više od 30% (18).

Danas su široke mogućnosti liječenja glaukoma, a uključuju medikamentozno, lasersko i kirurško liječenje.

1.2.1. Konzervativno liječenje glaukoma

Era liječenja glaukoma započeta je otkrićem lijeka pilokarpina 1875. godine (18). Savjetuje se prvo započeti s monoterapijom i postupno, ako je potrebno, uvoditi dodatne lijekove kako bi mogućnost nuspojava bila što manja. Odgovarajući terapijski učinak je smanjenje IOT-a prema prosječnim vrijednostima za određenu skupinu lijekova. Prema AAO i EGS smjernicama najčešće se u prvoj liniji liječenja koriste prostagladinski analozi i beta-adrenergički antagonisti (18–20). U Tablici 2. prikazane su medikamentozne opcije u liječenju glaukoma; najčešće se koriste u obliku topičkih pripravaka, a rjeđe kao sistemski lijekovi (18–20).

Tablica 2. Glaukomski lijekovi

Skupina lijekova	Vrsta	Smanjenje IOT	Metoda djelovanja
Prostagladinski analozi	Latanoprost, Tafluprost, Travoprost	25-35%	Povećava uveoskleralni i/ili trabekularni otjecanje.
Prostamidi	Bimatoprost	25-35%	Povećava uveoskleralni i/ili trabekularni odjecanje.

Beta-adrenergički antagonisti	Neselektivni: Carteolol, Levobunolol, Metipranolol, Timolol Selektivni: Betaksolol	20-25%	Smanjuje produkciju očne vodice.
Alfa-adrenergički agonisti	Apraklonidin, Brimonidin	18-35%	Neselektivni: poboljšavaju otjecanje očne vodice. Selektivni: smanjuju produkciju očne vodice; smanjuju venski tlak ili povećaju uveoskleralni odjecanje.
Parasimpatomimetici	Kolinergički agonist: Pilocarpin Antikolinesterazni: Ehotiofat	15-25%	Povećanje trabekularnog otjecanje.
Inhibitori Rho kinaze	Netarsudil, Ripasudil	20-25%	Povećava trabekularni otjecanje. Smanjuje venski tlak.
Inhibitori karboanhidraze	Topikalni: Brinzolamid, Dorzolamid Oralni: Acetazolamid, Metazolamid	15-20% 20-40%	Smanjuje produkciju očne vodice.
Osmotski	Oralni: Glicerol, Isosorbid Intravenski: Manitol	15-20% 15-30%	Dehidracija staklovine i smanjenje volumena.

Preuzeto iz: smjernica Američke akademije za oftalmologiju i Europskog društva za glaukom (18–20).

1.2.1.1. Prostaglandinski analozi

Prostaglandini nastaju iz arahidonske kiseline posredstvom enzima ciklooksigenaze 1 (COX-1) i ciklooksigenaze 2 (COX-2). Skupina prostaglandinskih lijekova koristi se u kardiologiji, ginekologiji, kardiologiji, urologiji i oftalmologiji (31). Prema EGS smjernicama, terapija prostaglandinskim kapima dovodi do najvećeg smanjenja oćnog tlaka i zato je terapija prve linije (18). Primarno prostaglandini djeluju na povećano otjecanje oćne vodice uveoskleralnim i trabekularnim putem (18,32). Eksperimentalna studija pokazala je da je razina prostaglandina veća u roćnici/skleri nego u oćnoj vodici, što sugerira da je topićka primjena prostaglandina F2 analoga putem konjunktivalne/skleralne apsorpcije adekvatana za brzu regulaciju IOT-a (33). Prostaglandini imaju proinflamatorni ućinak jer prostaglandin F2 (PGF2) utjeće na povećanje koncentracije matriksnih metaloproteinaza (MMP) (31). Navedeni podaci ukazuju na ulogu PGF2 analoga u remodeliranja tkiva u oku, posebno u uveoskleralnom putu (31). Mehanizam djelovanja je proširenje uveoskleralnog puta, što dugotrajno pozitivno utjeće na sniženje IOT-a (31,34). Naćalost, remodeliranje tkiva u oku i proinflamatorni ućinak PGF2 analoga tijekom dugotrajne glaukomske terapije mogu negativno utjecati na uspjeh kirurćskog lijećenja (35). Ćak i kad se glaukomski operacijski zahvat izvede bez dodatnih komplikacija, povećan je rizik od neuspjeha operacije zbog oćiljkavanja konjunktive, fibroze i okluzije novog izlaznog puta (35).

1.2.2. Lasersko lijećenje glaukoma

Laserska kirurgija je prvi put upotrijebljena 1973. godine za lijećenje glaukoma (36). Radilo se o laserskoj trabekuloplastici, neinvazivnoj metodi koja se i danas koristi kao terapija prvoga izbora, ili kao dodatna terapija kad se ćeli izbjeći/odgoditi kirurćski zahvat (37). U poćetku se uglavnom koristila trabekuloplastika argonskim laserom (ALT od engl. *argon laser trabeculoplasty*) u kojem se laserom tretira trabekularna mreća i tako povećava filtracija oćne vodice (37). Prema recentnoj meta-analizi, ALT ima prednost u kontroli IOT-a u usporedbi s konzervativim lijećenjem (37). Treba naglasiti da je u pacijenata lijećenih ALT-om povećana incidencija perifernih prednjih sinehija (38). 1995. godine je izvedena selektivna laserska trabekuloplastika (SLT od engl. *selective laser trabeculoplasty*) kojim se

tretirao pigmentirani dio trabekularne mreže s Nd:YAG laserom (37). U randomiziranom pokusu s petogodišnjim praćenjem, nakon primjene SLT-a bila je dobra kontrola IOT-a i manja potreba za medikamentoznim liječenjem (39). Prema dostupnim spoznajama, nema značajne razlike u kontroli IOT-a liječenjem ALT i SLT metodom (18,37).

U svakodnevnoj praksi u liječenju ACG-a koriste se i tehnike periferne laserske iridotomije i periferne iridoplastike uporabom termalnog lasera (18).

1.2.3. Kirurško liječenje glaukoma

Postoje različite kirurške tehnike u liječenju glaukoma, a mogu se podjeliti na tehnike koje povećavaju subkonjunktivalnu, trabekularnu ili suprahoroidalnu filtraciju i tehnike koje smanjuju produkciju očne vodice (40). Glaukomski zahvati mogu biti drenažni i filtracijski (40).

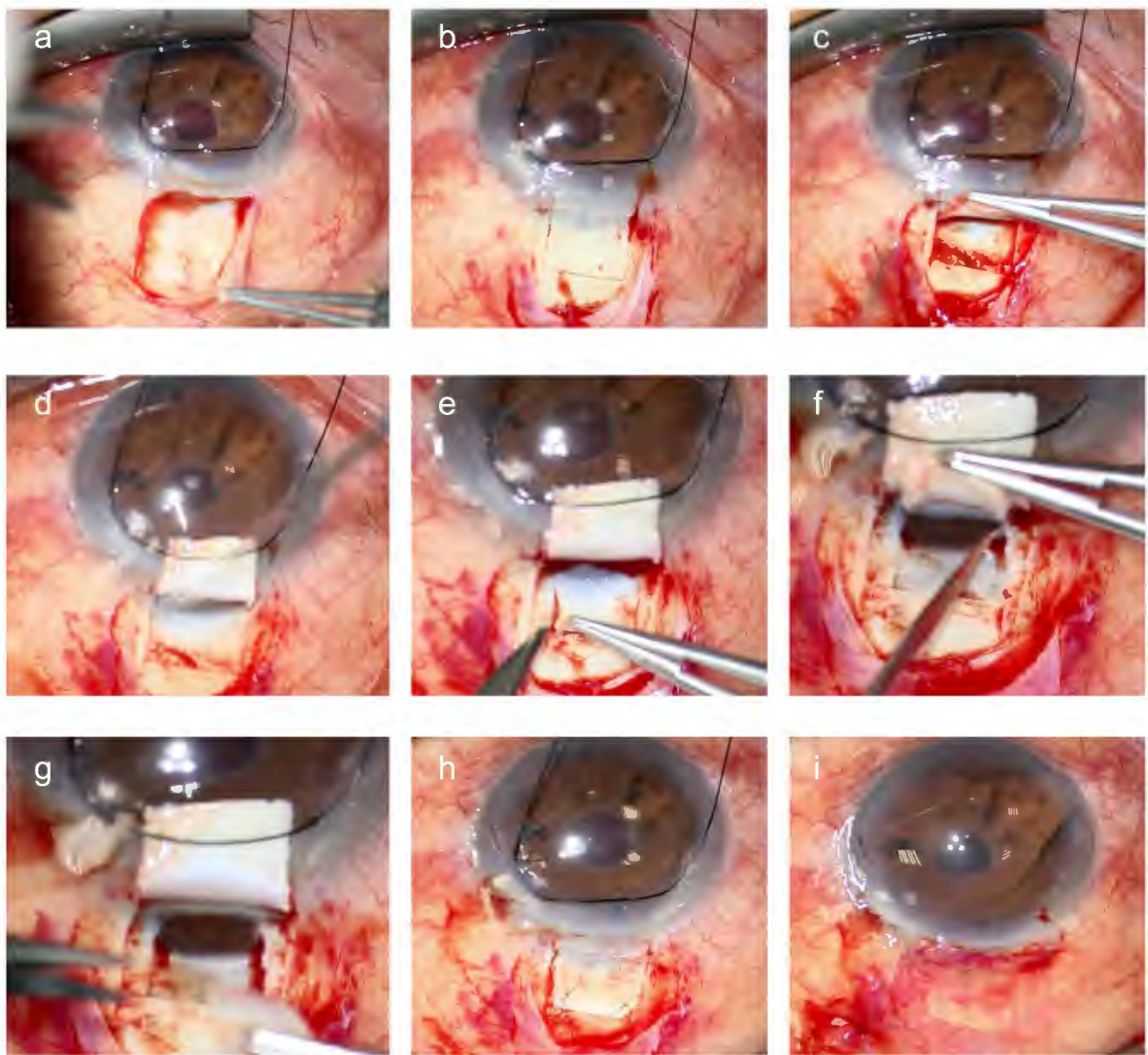
1.2.3.1. Trabekulektomija

Danas je trabekulektomija zlatni standard u kirurškom liječenju glaukoma. Metodu su opisali Sugar i suradnici 1961. godine, a prvu uspješnu trabekulektomiju izveo Cairns 1968. godine (40–42). Naziv operacijskog zahvata nije precizan jer trabekularna mreža ne mora biti izrezana da bi operacija uspjela pa je točniji naziv sklerokratektomija (40). Zahvat uključuje uklanjanje dijela Schlemmovog kanala, priležeće trabekularne mreže, vrha skleralnog grebena i dubokih slojeva rožnice, nakon čega slijedi iridektomija i čvrsto šivanje skleralnog režnja. Za regulaciju OIT-a su odgovorni drenaža očne vodice kroz sklerostomiju i formiranje subkonjunktivalnog jastučića te rezistencija skleralnog režnja i episkleranog tkiva (40). S obzirom na veliki udio komplikacija i pojavu fibroze, intraoperativno se primjenjuju antifibrozni lijekovi mitomicin C i 5-fluorouracil te u novije vrijeme steroidni antireumatici (40,43,44). U jednoj studiji na više od 400 izvršenih trabekulektomija i s praćenjem pacijenata dvije godine nakon operacije, uspjeh operacije bio potvrđen u 87% slučajeva, s prosječnim IOT-om 12.4 ± 4 mm Hg (44).

1.2.3.2. *Nepenetrirajući glaukomi zahvati*

Nepenetrirajuća operacija tzv. duboka sklerektomija je prvi put opisana 1963. godine, ali u usporedbi s trabekulektomijom nije stekla široku primjenu, primarno zbog vrlo zahtjevne kirurške tehnike i lošijih ishoda (45). Godine 1962. Kraznov je izveo prvu sinusotomiju, zahvat koji je uključivao uklanjanje sklere i otvaranje Schlemmovog kanala preko 120°. Kazanov je unutarnju stijenu Schlemmovog kanala ostavio netaknutu, smatrajući da je glavni otpor otjecanju očne vodice u većini slučajeva primarnog glaukoma otvorenog kuta na razini skleralnih vena, a ne u trabekulumu (46). Sinusotomija nije bila široko prihvaćena jer je kirurški zahtjevnija i potreban je kirurški mikroskop za precizan pronalazak Schlemmova kanala. Sljedećih 30 godina je trabekulektomija bila najčešća izdvojena glaukomska operacija. Ipak, ideja razvoja nepenetrirajućih operacija nije napuštena i sinusotomija je poslužila kao osnova za razvoj novih tehnika. *Ab externo* trabekulektomija, koju je predložio Zimmerman 1984. godine, temelji se na daljem uklanjanju jukstakanalikularnog trabekuluma i unutarnje stijenke Schlemmovog kanala. Fyodorov i Kozlov su 1989. godine uradili duboku sklerektomiju koja uključuje uklanjanje strome rožnice iza prednjeg trabekuluma i Descemetove membrane (47). Kod duboke sklerektomije, otjecanje vodice se događa na razini prednjeg trabekuluma i Descemetove membrane (48).

Sam kirurški zahvat započinje otvaranjem konjunktive na limbusu ili u području forniksa (Slika 6a). Zatim se otvara površinski skleralni režanj veličine 5x5 mm koji zahvaća jednu trećinu debljine sklere, debljine oko 300 µm (Slika 6b). Kako bi se kasnije u disekciji mogla dosegnuti Descemetova membrana, površinski skleralni režanj seže 1–1,5 mm anteriorno u rožnicu (Slika 6c i Slika 6d). Sljedeći korak je ekscizija drugog, dubljeg skleralnog reznja veličine 4x4 mm, pri čemu se ostavlja približno 10% sklere iznad korioideje i cilijarnog tijela (Slika 6e). Horizontalna disekcija provodi se polumjesečastim nožem, kretnjom od stražnjeg dijela prema naprijed (Slika 6f). U blizini limbusa Schlemmov kanal se automatski otvara (Slika 6g). Disekcija se nastavlja prema naprijed kako bi se našao prirodni put između Descemetove membrane i strome rožnice. Kad je Descemetova membrana izložena 1 mm, drugi skleralni režanj se uklanja (Slika 6g). U toj fazi postaje vidljivo kako očna vodica filtrira (tzv. perkolacija) kroz prednji trabekulum i Descemetovu membranu (Slika 6h i Slika 6i) (49).

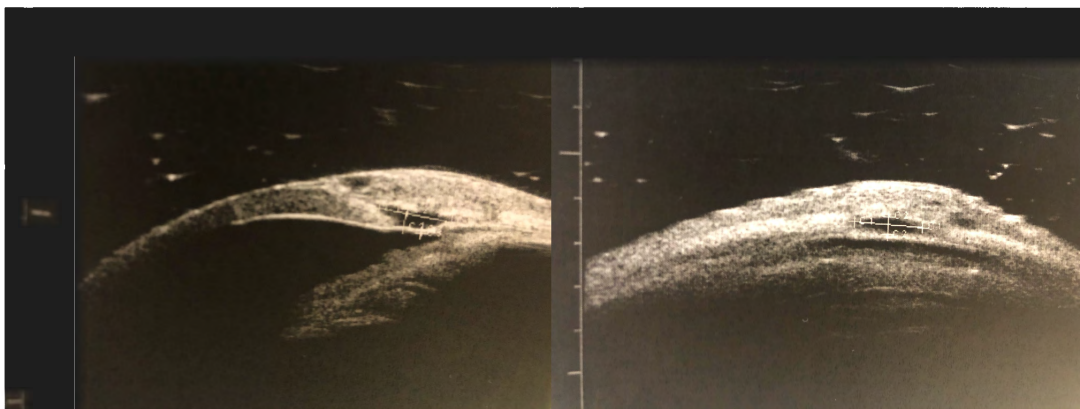


Slika 6. Operacijski zahvat duboke sklerektomije.

Slika je djelo autora.

Kako bi se održala prohodnost stvorenog intraskleralnog prostora može se koristiti implantat i to kolageni implantat koji se resorbira za 6–9 mjeseci, jako viskozna

hijaluronska kiselina, retikulirana hijaluronska kiselina) (Slika 7) (50, 51).



Slika 7. Prikaz ultrazvučne biomikroskopije (UBM).

Održana je prohodnost stvorenog intraskleralnog prostora bez korištenja implantata.

Slika je djelo autora.

1.2.3.3. Penetrirajuća duboka sklerektomija

Za poboljšanje filtracije u trenutku izlaska na trabekulo-Descemetovu membranu može se izvesti *ab externo* trabekulektomija uklanjanjem jukstakanalikularnog trabekuluma i unutarnje stijenke Schlemmovog kanala i penetracija u prednju očnu sobicu. Potom je potrebno učiniti iridektomiju.

1.2.3.4. Implantibilni uređaji za glaukom

Uređaji za drenažu glaukoma odводе očnu vodicu iz prednje očne sobice prema vanjskom rezervoaru oko kojeg se za 4–6 tjedana nakon zahvata stvara fibrozna kapsula koja regulira protok očne vodice (52). Ovi implantati su dokazano učinkoviti u snižavanju intraokularnog tlaka kod pacijenata koji su prethodno imali neuspjelu trabekulektomiju i u pacijenata u kojih je zbog prethodnih operacija ili trauma prisutno oživljavanje konjunktive (53). Drenažni uređaji pokazuju dobre rezultate i kod kompleksnih oblika glaukoma, uključujući uveitični i neovaskularni glaukom te kod dječjih i razvojnih glaukoma (54). Razlikuju se uređaji s valvulom i bez valvule. U skupinu uređaja bez valvule ubrajaju se

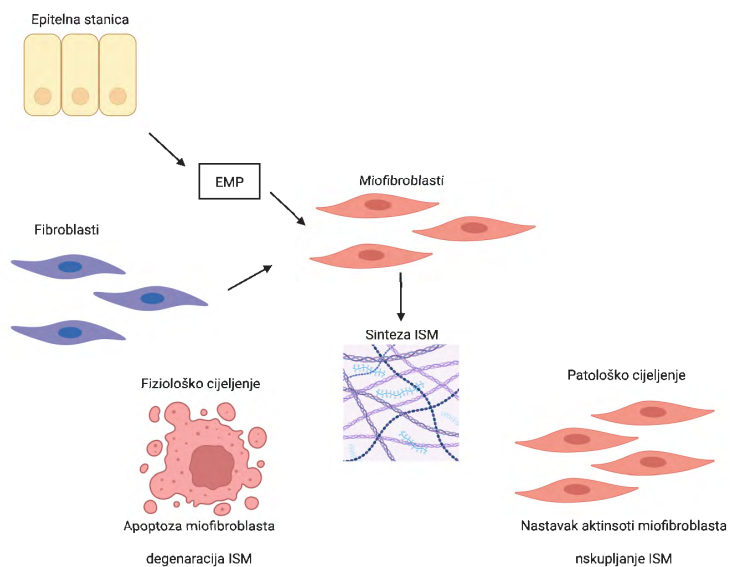
Molteno (IOP, Inc., Costa Mesa, Kalifornija, SAD; Molteno Ophthalmic Limited, Dunedin, Novi Zeland), Baerveldt (Advanced Medical Optics, Inc., Santa Ana, Kalifornija, SAD) i Paul glaukomijski implant (PGI, Advanced Ophthalmic Innovations, Singapur) (55). Nasuprot tome, valvularni uređaji ili uređaji s ugrađenim mehanizmom za ograničavanje protoka omogućuju jednosmjerni protok očne vodice iz prednje očne sobice u subkonjunktivalni prostor, a potreban je minimalni tlak za otvaranje valvule. Najrašireniji implantat s valvulom je Ahmedov glaukomijska valvula (New World Medical iz Rancho Cucamonge, Kalifornija, SAD). Uređaji za drenažu glaukoma pokazali su se djelotvornima u regulaciji očnog tlaka kod pacijenata u kojih prethodni kirurški zahvati nisu bili uspješni, ili kod kojih se očekuje slab uspjeh standardne filtracijske kirurgije (56). Rezultati ugradnje drenažnog uređaja ovise o tipu glaukoma i vrsti primijenjenog implantata.

1.2.3.5. Zahvati smanjenja proizvodnje očne vodice

U pacijenata s refraktornim glaukomom kod kojih nije postignuto zadovoljavajuće snižavanje intraokularnog tlaka unatoč filtracijskim operacijama i maksimalnoj medikamentoznoj terapiji, često se primjenjuju ciklodestruktivni postupci. Kod ciklodestruktivnih zahvata oštećuje se ekskrecijski epitel cilijarnog tijela, što rezultira smanjenim stvaranjem očne vodice i sniženjem intraokularnog tlaka (57). Kako bi učinak na normalizaciju očnog tlaka bio stabilan i dugotrajan, treba zahvat koji put ponavljati jer se cilijarni epitel s vremenom obnovi. Različite metode za postizanje ciklodestrukcije uključuju dijatermiju, krioterapiju, ultrazvuk i lasersko svjetlo. Ciklofotokoagulacija je standardni postupak za ciklodestrukciju. Može se izvoditi transskleralno i endoskopski uz uporabu laserskog svjetla različitih valnih duljina (58). Najčešće nuspojave navedenih zahvata su hipotonija i ftiza bulbusa (57).

1.3. Očna fibroza

Očna fibroza je složeno biološko zbivanje uzrokovano patofiziološkim mehanizmima, ali i primjenom terapije u brojnim očnim bolestima (59,60). Pojava fibroze opisana je u dijabetičkoj retinopatiji, senilnoj makularnoj degeneraciji, operacijama katarakte, retine i strabizma te kod glaukoma (59–61). Fibroza je fiziološki proces kojem je primarni cilj odgovor tkiva na oštećenje uzrokovano vanjskim čimbenicima, metaboličkim procesima, upalom, ishemijom i degenerativnim bolestima (60). Nažalost, pojava fibroze u prednjem i stražnjem segmentu oka može drastično utjecati na vidnu osovinu, staničnu aktivnost i remodelaciju tkiva, s funkcionalnim posljedicama (60). Odgovor lokalnog tkiva na ozljedu sastoji se od aktivacije upalnih stanica, neovaskularizacije, pojačane vaskularne propustnosti, proliferacije fibroblasta, remodeliranja izvanstaničnog matriksa i posljedičnog razlaganje oštećenog tkiva (59,60). S obzirom da je mrežnica dio središnjeg živčanog sustava (SŽS), proces cijeljenja naziva se gliozna, dok prednji segment oka cijeli procesom fibroze kao većina drugih tkiva izvan SŽS (60). Centralnu ulogu u cijeljenju ima izvanstanični matriks koji nastaje ili aktiviranjem fibroblasta u miofibroblaste ili iz epitelnih stanica koji prolaze epitelnu-mezenhimalnu pretvorbu (59,62) (Slika 7).



Slika 8. Prikaz fiziološkog i patološkog staničnog mehanizma nastanka fibroze

EMT – epitelno mezenhimalna pretvorba (EMT od engl. *epithelial mesenchymal transition*),
ISM – izvanstanični matriks.

Preuzeto iz: Mallone F, Costi R, Marengo M, Plateroti R, Minni A, Attanasio G i sur. Understanding Drivers of Ocular Fibrosis: Current and Future Therapeutic Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2021;22:11748.

Licenca: <https://BioRender.com/uhwnuhc>.

U fiziološkom načinu cijeljenja miofibroblasti umiru apoptozom, a kod patološkog načina cijeljenja budu dalje aktivirani, što dovodi do nakupljanja i kontrakcije izvanstaničnog matriksa i fibroze (59).

U prednjem segmentu oka su zamućenje rožnice i glaukom najčešće bolesti povezane s fibrozom (60). Rožnica je vrlo složeno avaskularno tkivo prekriveno nekeratinizirajućim višeslojnim pločastim epitelom (60). Kod različitih bolesti rožnice postupno nastaje kronična upala povezana s neovaskularizacijom, edemom i konačno fibrozom, što dovodi do zamućenja i pada vidne oštine (60,63). Brojne studije *in vivo* i *in vitro* pokušavaju razjasniti patofiziološki mehanizam i pronaći nove terapijske mogućnosti (59). Recentne studije opisuju učinak losartana koji se primarno koristi kao antihipertenziv (64). Losartan je blokator receptora za angiotenzin II (ARB) koji inhibira signalizaciju transformirajućeg faktora rasta beta (TGF β) i ima negativnu ulogu u nastanku fibroze preko regulacije čimbenika rasta i miofibroblasta (64). Brojne eksperimentalne studije demonstrirale su pozitivan učinak topičkog losartana na prevenciju i liječenje fibroze rožnice uzrokovane traumom, infekcijom, drugim bolestima i kirurškim komplikacijama (65). U objavljenom prikazu slučaja pokazan je povoljan učinak losartana na suzbijanje fibroze u *off label* primjeni kod ljudi nakon komplikacije laserskog skidanja dioptrije (66). Navedeni rezultati su ohrabrujući, no potrebna su randomizirani kontrolirani pokusi za analizu učinka losartana na različite očne bolesti.

Povišeni IOT je jedan od najvažnijih čimbenika koji utječu na kronične posljedice glaukoma, ali treba ukazati i na ulogu progresivne fibroze koja mijenja trabekularnu mrežu (60). Temelj današnjeg liječenja glaukoma je regulacija IOT-a, a zasad nema registriranih lijekova kojih bi utjecali na druge čimbenike koji sudjeluju u nastanku glaukoma, uključujući fibrozu. Lim i suradnici su u retrospektivnoj studiji na 150,000 pacijenata sa šećernom bolesti tipa 2 starijih od 40 godina dokazali da pacijenti na terapiji metforminom imaju 25%

manju incidenciju glaukoma OAG, iz čega autori zaključuju da je jedan od učinaka metformina protuupalno djelovanje (67). Studije su pokazale da metformin utječe na izvanstanični matriks i TGF β te pozitivno djeluje na epitelno-mezenhimalnu pretvorbu i apoptozu miofibroblasta (68–74). Na mišjem modelu nakon glaukomskog filtracijskog zahvata primijenjen je topički metformin, što je rezultiralo protufibrotičkim učinkom (75). Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se u potpunosti razjasnila uloga metformina i drugih lijekova na razvoj fibroze u pacijenata s glaukomom.

1.3.1. Čimbenik rasta vezivnog tkiva

Čimbenik rasta vezivnog tkiva (CTGF od engl. *connective tissue growth factor*) je jedan od ključnih čimbenika u regulaciji izvanstaničnog matriksa, angiogenezi i posljedičnoj fibrozi (62). Osim toga, CTGF je povezan s procesom cijeljenja rane i upalnim odgovorom (76). U homeostazi je imunoekspresija CTGF-a u području očne vodice negativna ili vrlo niska (77). Smanjena regulacija CTGF-a utječe na smanjenje proliferacije i povećanu apoptozu fibroblasta pa je zanimljiva za buduća istraživanja i nove terapijske mogućnosti u liječenju glaukoma (77). U recentnoj studiji analizirana je u Gravesovoj orbitopatiji fibroza nakon primjene TGF β na masnom/vezivnom tkivu orbite i nađena značajna transkripcijska aktivacija CTGF, što pruža nove spoznaje patofiziološkog mehanizma orbitopatije (78).

1.3.2. Transkripcijski čimbenik c-myb

Transkripcijski čimbenik c-myb je važan za kontrolu diferencijacije hematopoetskih stanica i tu je njegova uloga najbolje razjašnjena (79). Nadalje, cMYB kao nuklearni transkripcijski čimbenik ima ulogu u fibrozi putem regulacije fibroblasta (80). Ma i sur. su pokazali da cMYB sudjeluje u regulaciji sinteze kolagena i izražaja TGF β , što sugerira da bi inhibitor cMYB mogao biti regulator jetrene fibroze (81). Do sad uloga cMYB u očnoj fibrozi nije razjašnjena, ali je opisana ekspresija u razvoju oka i retini odraslih, što ukazuje na ulogu cMYB u fiziologiji stanica mrežnice (79).

1.3.3. Protein cinkovog prsta SNAI1

Protein cinkovog prsta SNAI1 (SNAIL) ima važnu ulogu u fibrozi i epitelno-mezenhimalnoj pretvorbi (82). SNAIL je jedan glavnih čimbenika u preživljavanju stanice i imunološkoj regulaciji (82). Imunoekspresija SNAIL u tumoru povezana je s proliferacijom i recidiviranjem tumora (82). Na animalnom staničnom modelu Schlemmovog kanala pokazan je koristan učinak inhibitora Rho kinaze jer smanjuje TGF β koji regulira SNAIL i alfa glatkomišićni aktin. To ukazuje na moguću korist liječenja glaukoma inhibitorima Rho kinaze zbog njihove uloge u regulaciji fibroze (83).

1.3.4. Alfa glatkomišićni aktin

Alfa glatkomišićni (aSMA) je izražen u miofibroblastima čija proliferacija vodi u fibrozu (84). U eksperimentalnoj studiji ciljana inhibicija aSMA smanjila je proliferaciju fibroblasta, što ukazuje da bi aSMA mogao biti terapijska meta kod liječenja glaukoma (85). Chow i suradnici su u staničnoj kulturi peripapilarnih skleralnih fibroblasta primjenili inhibitor tiroksin kinaze dasatinib koji je značajno smanjio TGF β – inducirani izražaj aSMA (86). Potrebna su daljnja istraživanja glaukopskih terapijskih modula koji bi mogli djelovati na izražaj aSMA.

1.3.5. Protein toplinskog šoka 70

Protein toplinskog šoka 70 (HSP70 od engl. *heat shock protein 70*) je član obitelji ubikvitarno prisutnih proteina toplinskog šoka važnih u induciranju apoptoze (87). Na eksperimentalnom mišjem modelu ozljede rožnice pokazano je da je HSP70 negativno povezan s fibroznim odgovorom, što ukazuje na ulogu cijeljenju rožnice (88). U prethodnim studijama dokazana je prisutnost HSP 70 u pacijenata s glaukomom, što upućuje na preoblikovanje tkiva u razvoju bolesti (87).

1.3.6. Čimbenik induciran hipoksijom alfa

Čimbenik induciran hipoksijom alfa (HIFa od engl. *hypoxia inducible factor alpha*) je biljeg staničnog odgovora na hipoksiju i inducira prepisivanje gena uključenih u proliferaciju stanica (89). U eksperimentalnom štakorskom modelu očne hipertenzije, razina imunoekspresije HIFa je korelirala s visinom IOT-a, što ukazuje na adaptivnu reakciju tkiva oka na hipoksiju kod glaukoma (89).

2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

U skladu s problematikom istraživanja, ciljevi istraživanja su:

1. Analizirati imunoekspresiju HSP70, HIFa, SNAIL, aSMA, CTGF i c-myb u konjunktivi, episkleri i dubokoj bjeloočnici ispitanika s operiranim glaukomom i ispitati ima li razlike u imunoekspresiji pojedinog biljega obzirom na lokalizaciju
2. Ispitati je li predoperativno liječenje analogima PGF2 u obliku kapi povezano s razlikom u imunoekspresiji analiziranih čimbenika u uzorcima iz površnih i dubljih lokacija oka
3. Utvrditi ima li razlike u imunoekspresiji ispitivanih biljega između skupine ispitanika s operiranim glaukomom koja je primala PGF2 i skupine koja nije primala tu terapiju.

HIPOTEZE

1. Imunoekspresija čimbenika povezanih s fibrozom HSP70, HIF, SNAIL, aSMA, CTGF i c-myb je veća u epitelu konjunktive ispitanika liječenih s PGF2 nego u ispitanika koji nisu bili liječeni s PGF2.
2. Imunoekspresija tih biljega je veća u konjunktivi i episkleri, a manja u duboka skleri.
3. Vidna funkcija, analizirana oftalmološkim pregledom vidne oštine i mjerenja intraokularnog tlaka prije i poslije operacije, bit će značajno bolja poslije operacijskog zahvata.

3. ISPITANICI I POSTUPCI

Dizajn studije odobren je od strane Etičkog povjerenstva Opće bolnice Zadar (broj protokola 02-1 29831 1 9-41 1, u Zadru, 31. 12. 2019.). Istraživanje je prosječno i eksperimentalno, prema načinu dobivanja podataka opservacijsko, a u odnosu na vremensku orijentaciju prospektivno i nerandomizirano. Istraživanje je provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom i kasnijim revizijama iste. Svi ispitanici su potpisali informirani pristanak prije početka ispitivanja.

3.1. Ispitanici i kirurški zahvat

Kriteriji za uključivanje bili su: životna dob ≥ 18 godina, dijagnosticiran primarni ili pseudoeksfolijacijski glaukom, kod ispitanika koji su liječeni s PGF2, minimalno 2 godine primjene lokalnog prostaglandinskog lijeka protiv glaukoma. Kriteriji isključenja bili su: sve prethodne očne operacije. U studiju su uključena 23 ispitanika koji su liječeni s PGF2 i 8 ispitanika koji nisu liječeni s PGF2.

Kirurški zahvat započeo je otvaranjem konjunktive i Tenonove čahure na limbusu u gornjem kvadrantu. Izložena površina bjeloočnice je abradirana hokej nožem (Alcon Ophthalmic Kit, Fort Worth, TX, SAD) i kauterizirane episkleralne vene koje su krvarile. Površinski skleralni režanj veličine 5×5 mm stvoren je s 11 kirurškim oštricama (tipa AILEE), nakon dubokog skleralnog režnja veličine 4×4 mm koji je prepariran kirurškim nožem br.15 (Oftalmološki komplet, Fort Worth, TX, SAD). Oba režnja su završena nožem s polumjesečastom oštricom (Oftalmološki komplet, Fort Worth, TX, SAD). Nakon izlaganja trabekulodescementne membrane i ljuštenja unutarnje stjenke Schlemmovog kanala, izrezan je duboki skleralni režanj i djelić naknadno analiziran kao „uzorak duboke sklere“. Superficialni režanj zatvoren je s dva šava 10-0 (Ethylon, Ethicon, Johnson & Johnson, NJ, SAD), a tkivo preostalo između dva šava veličine 1×3 mm izrezano i kasnije analizirano kao „uzorak episklere“. Konjunktiva je zatvorena produžnim šavovima 8-0 (Vicryl, Ethicon, Johnson & Johnson, NJ, SAD) i uklonjen „uzorak konjunktive“ koja je prelazila preko limbusa. Na kraju postupka je u subkonjuktivalno tkivo injektiran antifibrozni lijek 5-florouracil.

3.2. Klinički pregled

Svi ispitanici prije kirurškog zahvata pregledani su od strane specijalista oftalmologije te je učinjen standardni oftalmološki pregled, ispitivanje vidne oštine i

mjerenje IOT-a na Goldmannovom aplanacijskom tonometru (Carl Zeiss Meditech, AG, Jena, Germany). Identični oftalmološki pregled je ponavljen mjesec dana nakon kirurškog zahvata radi evaluacije terapijskog ishoda.

3.3. Prikupljanje tkiva i osnovni postupci bojenja

Uzorci tkiva prikupljani su od 2011. do 2012. godine, a uzorkovani s tri lokacije - konjunktive, episklere i duboke sklere. Uzorci su stavljeni u 4%-tni puferirani formalin i poslani su na Zavod za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, Kliničkog bolničkog centra Split, gdje su u histološkom laboratoriju strojno dehidrirana u gradjentu alkohola, izbistreni u ksilolu, parafinirani i uklopljeni u parafinske blokove. Sva histološka bojenja urađena su na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Splitu. Na mikrotomu su iz parafinskih blokova serijski izrezani preparati debljine 5 μ m, a svaki deseti obojen hemalaun-eozinom (H&E) za provjeru kvalitete tkiva za imunofluorescenciju.

3.4. Dvostruka imunofluorescencija

Preparati su na standardni način deparafinirani u ksilolu i gradijentu alkohola do vode (90–92). Potom su kuhani u citratnom puferu (pH 6,0) u mikrovalnoj pećnici 10 minuta radi otvaranja antigena i ohlađeni na sobnu temperaturu u fosfatnom puferu. Apliciran je proteinski blok serum 30 minuta i ocijeđen bez ispiranja. Nakon toga apliciran je koktel od dva primarna protutijela te preparati inkubirani preko noći na vlažnom i tamnom mjestu. Sutradan su preparati isprani fosfatnim puferom i na njih aplicirana sekundarna protutijela u odgovarajućoj kombinaciji (Tablica 3).

Tablica 3. Primarna i sekundarna protutijela korištena u istraživanju

Protutijela	Kataloški broj	Domaćin	Razrijeđenje	Proizvođač
Anti-HSP70	ab31010	Zec	1:100	Abcam (Cambridge, UK)
HIF1a	sc-13515	Miš	1:200	Santa Cruz Bt. (Dallas, TX, USA)
Anti-SNAIL	Ab52519	Koza	1:500	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-Smooth Muscle Actin	M0851	Miš	1:300	Dako, Glostrup, Denmark
CTGF	sc-14939	Koza	1:200	Santa Cruz Bt. (Dallas, TX, USA)
c-Myb	sc-7874	Zec	1:200	Santa Cruz Bt. (Dallas, TX, USA)
Alexa Fluor®488 AffiniPure Anti-Goat IgG (H+L)	705-545-003	Magarac	1:400	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. I (Baltimore, PA, USA)
Anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor® 488	711-295-152	Magarac	1:400	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. I (Baltimore, PA, USA)
Rhodamine Red™-X (RRX) AffiniPure Anti-Mouse IgG (H+L)	711-295-151	Magarac	1:400	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. I (Baltimore, PA, USA)
Anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor® 488	711-295-152	Magarac	1:400	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. I (Baltimore, PA, USA)
Rhodamine Red™-X (RRX) AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	711-295-152	Magarac	1:400	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. I (Baltimore, PA, USA)

Anti-HSP70 – protutijela na protein toplinskog šoka 70, HIF1a – čimbenik induciran hipoksijom alfa, anti-SNAIL – protein cinkovog prsta SNAI1, CTGF – čimbenik rasta vezivnog tkiva, c-MYB – transkripcijski čimbenik cMYB, IgG – imunoglobulin G

Nakon ispiranja, jezgre su obojene 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI) te je apliciran pokrovni medij (Immu-Mount, Shandon, Pittsburgh, PA, SAD) i stavljena pokrovnica. Histološki preparati analizirani su na fluorescencijskom mikroskopu Olympus (Tokio, Japan) BX51 i slikani fotoaparatom Nikon DS-Ri1 (Nikon Corporation, Tokio, Japan). Mikrofotografije su sastavljene pomoću programa Adobe Photoshop (Adobe Systems, MI, SAD). Slikano je pet nepreklapajućih polja iz tri uzorka svakog ispitanika na vidnom polju povećanja objektiva 40x.

U konjunktivi, episkleri i dubokoj skleri analizirana je dvostruka imunofluorescencija u sljedećim kombinacijama: CTGF i cMyb; SNAIL i aSMA; HSP70 i HIF1a (Tablica 1).

Razina pozadinskog signala za reprezentativne slike prikazane u rezultatima uklonjena je pomoću Adobe Photoshopa (v21.0.2, Adobe, San Jose, CA, SAD). Obrada slika za analizu i kvantifikaciju izvedena je pomoću softvera ImageJ (v1.530, Nacionalni institut za zdravlje, Bethesda, MD, SAD). Zeleni signal je izoliran uklanjanjem kanala crvene boje. Nakon dupliciranja slika, na jednoj je primijenjen srednji filter i oduzet od nefiltrirane slike kako bi se identificirao pozitivan signal. Korištenjem opcije "*triangl*", konačne fotografije su ograničene, pretvorene u 8-bitne slike i spojene s DAPI-jem. Brojanje stanica provedeno je pomoću softvera ImageJ (v1.530, Nacionalni institut za zdravlje, Bethesda, MD, SAD). Ukupan broj pozitivnih stanica izračunat je kao broj stanica po mm² u konjunktivi, episkleri i dubokoj skleri. Konačni ukupni broj pozitivnih stanica po ispitaniku bio je srednja vrijednost 10 odjeljaka koji su izračunati i uspoređeni između skupina.

3.5. Statistički postupci

Izračun potrebne veličine uzorka proveden je korištenjem programa koji se nalazi na mrežnoj stranici <https://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/n2>. Za izračun smo koristili podatke dobivene iz pilot pokusa na našim uzorcima koje uključuje imunohistokemijsko bojenje i analizu postotka stanica pozitivnih na SNAIL u sklerama ispitanika, sa sljedećim parametrima: $\mu_1 = 1.14$, $\mu_2 = 0.28$, $\sigma = 0.6$, $\text{power} = 0.8$, $p = 0.05$, za što je dobivena najmanja potrebna veličina uzorka po skupini $n = 8$. S obzirom da naša najmanja skupina sadrži osam uzoraka, veličina uzorka je primjerena za izradi disertacije.

Statistička analiza biti će provedena korištenjem statističkog programa Prism 10 (verzija 10.6.1, GraphPad, La Jolla, CA, SAD). Za procjenu normalne distribucije podataka koristiti će se Kolmogorov-Smirnov test. Za analizu kontinuiranih podataka koristi će se t-test (2 skupine). Nadalje, za korelaciju između tkiva pacijenata sa i bez liječenja analogom PGF2 koristi će se Welch's koeficijent korelacije. Statistička značajnost definirana je kao $P < 0,05$.

4. REZULTATI

U istraživanje je uključen 31 ispitanik s glaukomom koji je bio podvrgnut glaukomskom zahvatu. Osnovni demografski podaci svih ispitanika uključenih u studiju prikazani su u Tablici 4.

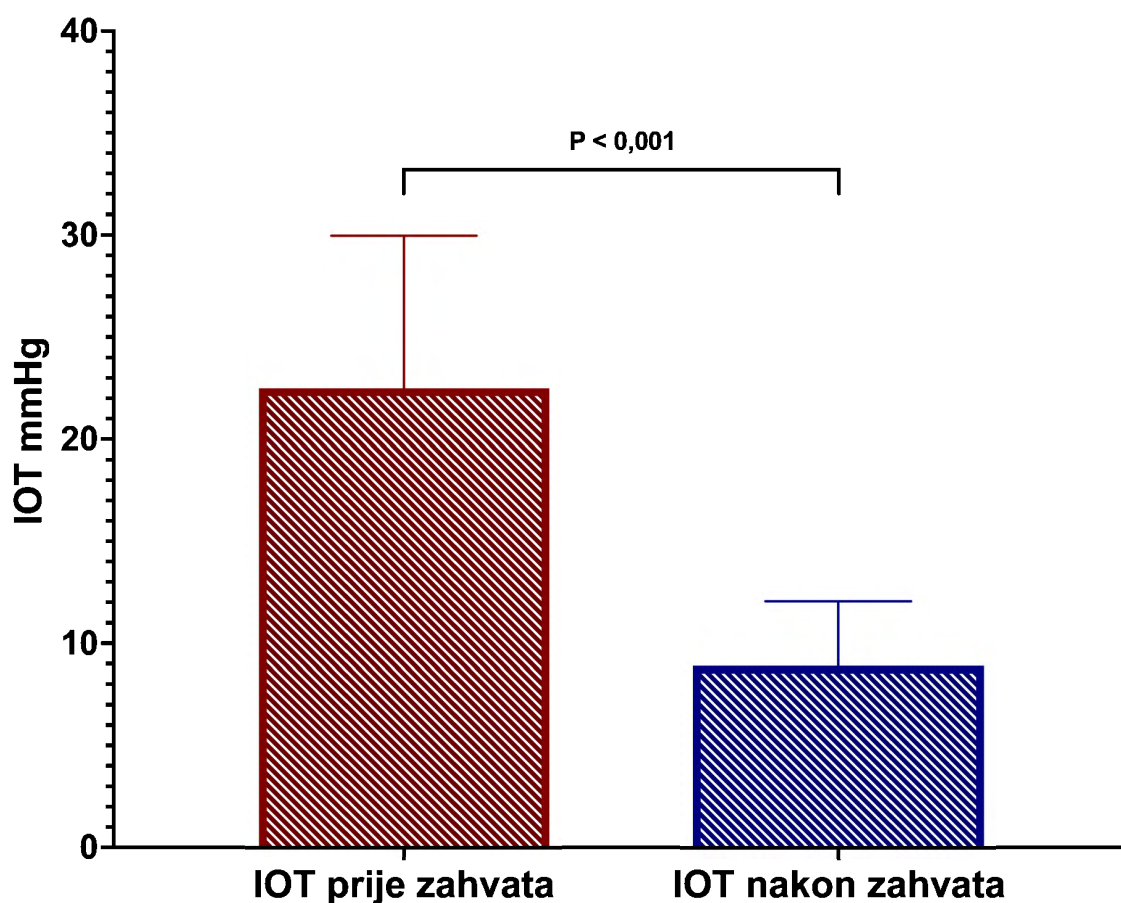
Tablica 4. Demografske i kliničke karakteristike ispitanika uključenih u istraživanje

Varijabla	Ispitanici (N=31)
Spol – N (%)	
Muško	19 (61,3)
Žensko	12 (38,7)
Dob (godine)	70,45 ± 15,23
Broj glaukomskih lijekova – N (%)	
Jedan lijek	1 (3,2)
Dva lijeka	7 (22,6)
Tri lijeka	23 (74,2)

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SD (standardna devijacija) ako nije drugačije navedeno.

4.1. Usporedba intraokularnog tlaka i vidne oštine prije i nakon glaukenskog zahvata

Utvrđena je statistički značajna razlika u razini intraokularnog tak prije i nakon glaukenskog zahvata ($22,48 \pm 7,48$ vs. $8,9 \pm 3,45$ mm Hg, $P < 0,001$) (Slika 9). Nije utvrđena razlika u vidnoj oštini prije i nakon glaukenskog zahvata ($0,3 \pm 0,28$ vs. $0,33 \pm 0,25$, $P = 0,528$).



Slika 9. Razine intraokularnog tlaka prije i nakon glaukenskog zahvata.

IOT – intraokularnog tlak

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD (standardna devijacija).

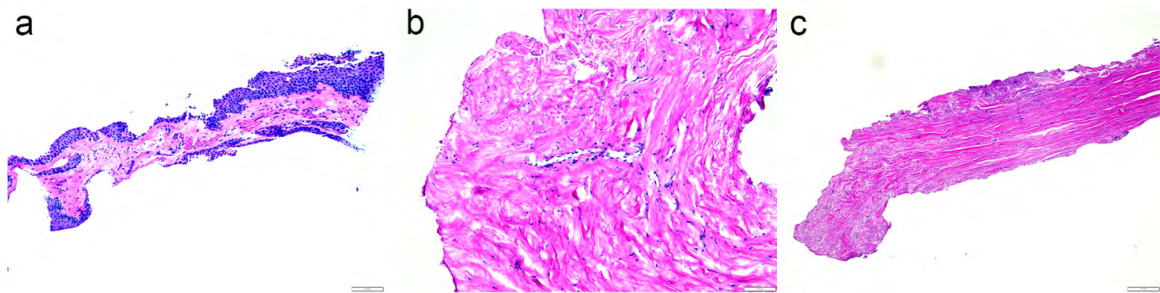
Usporedba između skupina provedena je s t-testom.

4.2. Analiza uzoraka konjunktive, episklere i duboke bjeloočnice na preparatima bojenim hemalaun eozinom

Konjuktiva je obložena višeslojnim cilindričnim epitelom koji u nekim područjima prelazi u višeslojni pločasti epitel. Bazalne stanice su cilindrične, a u površnim slojevima ima pojedinačnih okruglih do ovalnih mukoznih stanica. Subepitelna stroma konjunktive građena je od rahlog veziva u kojem ima krvnih žila i raspršenih fibroblasta (Slika 10a). Među ispitanicima nije uočena varijabilnost u organizaciji navedenih tkiva.

Episklera je sloj građen od gustog vezivnog tkiva koji se nalazi između konjunktive i sklere. Sadržava manje stanica nego stroma konjunktive i ima organiziraniji izvanstanični matriks koji je bogat kolagenom. Fibroblasti su rjeđi, s jezgrama vretenastog oblika, a krvne žile istaknutije i često okružene upalnim stanicama (Slika 10b).

Skleru karakterizira gusta vlaknasta organizacija tkiva, većinom paralelnih snopova kolagenih vlakana. Među njima su razbacani fibroblasti s izduženim vretenastim jezgrama. Sklera je znatno slabije vaskularna nego druga analizirana tkiva oka, ali sadrži krvne žile. Površinski sloj sklere ima organiziraniji raspored kolagenih vlakana, koja se u dubljem sloju isprepliću (Slika 10c).

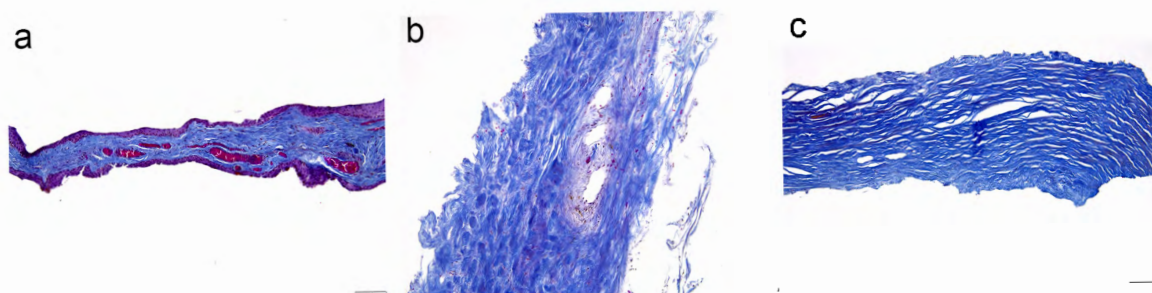


Slika 10. Bojenje analiziranih tkiva hematoksilinom i eozinom.

Na slici su reprezentativni prikazi konjunktive (a), episklere (b) i sklere (c) ispitanika s glaukomom. Mjerilo u donjem desnom kutu slika je 100 μ m. Slika je djelo autora.

4.3. Analiza uzoraka konjunktive, episklere i duboke bjeloočnice na preparatima bojenim Masson trikromom

Bojenje Masson trikromom bolje od HE bojenja ističe vezivne strukture, stanične detalje i vaskularne elemente. Citoplazma epitela konjunktive je u različitim nijansama ljubičaste boje, a jezgre tamnocrvene. Subepitelna stroma konjunktive je jarko plava zbog prisutnosti kolagenih vlakana. Jezgre fibroblasta u stromi su tamnocrvene i ističu se na svjetlijoj pozadini vezivnog tkiva. Krvne žile u stromi sadrže crveno obojene eritrocite (Slika 11a). Episklerno vezivo je jarko plavo zbog većeg sadržaja kolagena i vlaknastije prirode episklere u usporedbi s rahlom stromom konjunktive. Krvne žile su istaknute, a endotel i eritrociti crveno obojeni (Slika 11b). Tkivo sklere se obojilo tamnoplavo jer se sastoji od obilnih, gusto poredanih kolagenih vlakana. U matriksu su raspršeni fibroblasti s jezgrama obojenim tamnocrveno. Rijetke su krvne žile, a endotel i eritrociti u lumenu obojeni crvenkasto (Slika 11c). Među ispitanicima nije uočena varijabilnost navedenih tkiva obojenih ovom metodom.

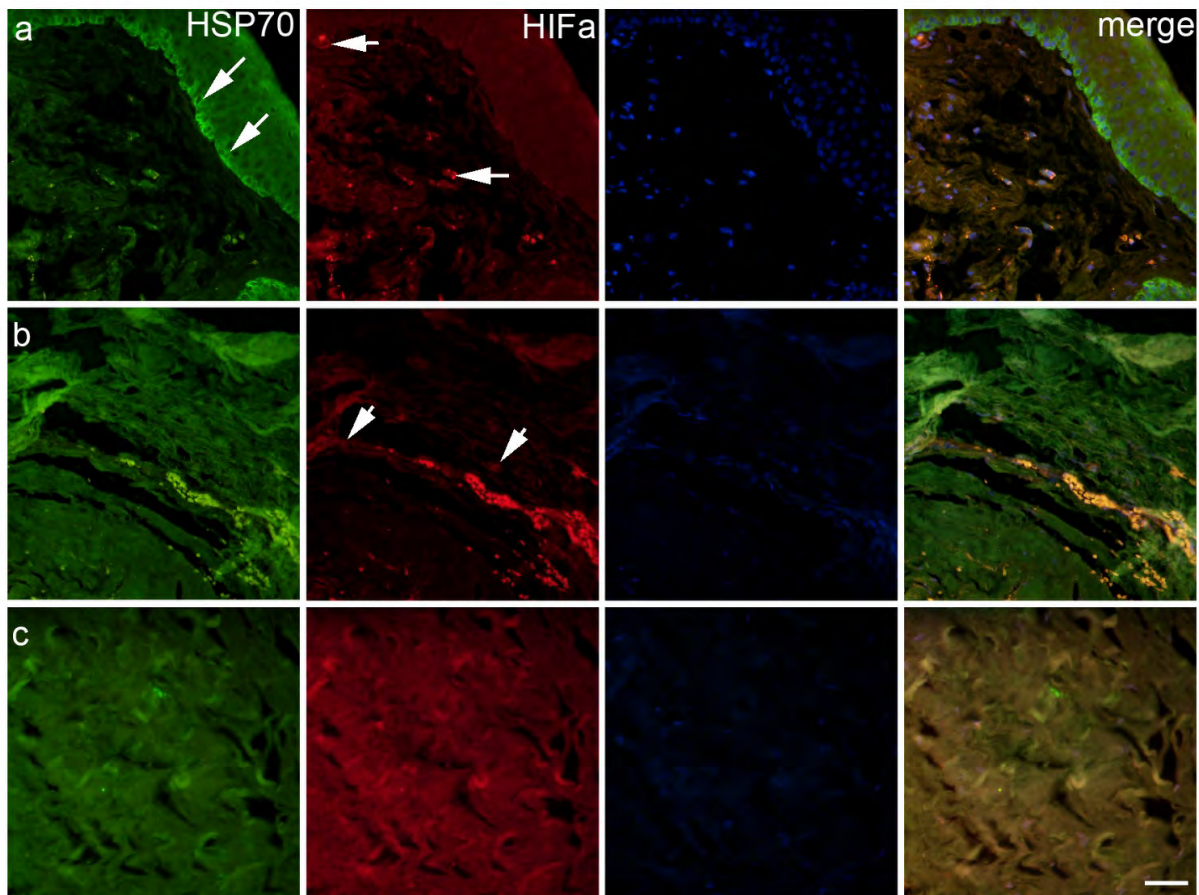


Slika 11. Bojenje analiziranih tkiva Masson trikromom.

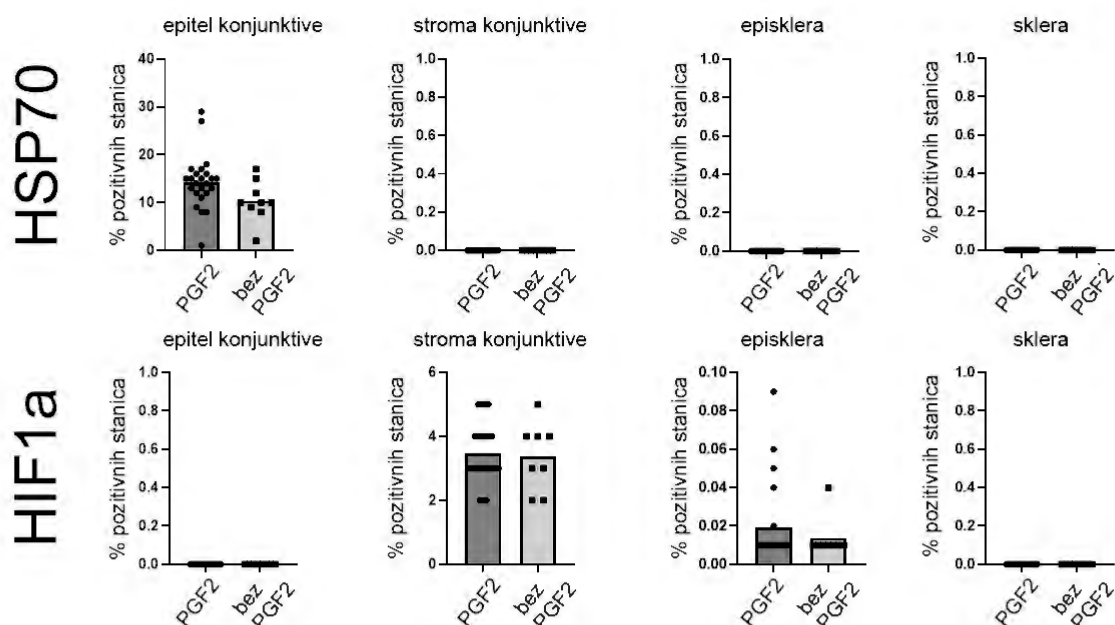
Na slici su reprezentativni prikazi konjunktive (a), episklere (b) i sklere (c) ispitanika s glaukomom. Mjerilo u donjem desnom kutu slika je 100 μm . Slika je djelo autora.

4.4. Izražaj HSP70 i HIFa u konjunktivi, episkleri i skleri ispitanika s glaukomom

Imunoekspresija HSP70 je bila pozitivna u epitelu konjunktive, dok su subepitelna stroma konjunktive, episklera i dublji dijelovi sklere negativni (Slika 12). U ispitanika koji su liječeni analogima prostaglandina F2 alfa (PGF2), udio HSP70- pozitivnih epitelnih stanica u konjunktivi bio je značajno veći nego u ispitanika koji nisu bili liječeni PGF2-om ($P=0,043$) (Slika 13). Imunoizražaj HIFa je pozitivan u stromi konjunktive i u episkleri, a negativan u epitelu konjunktive i dubokoj skleri (Slika 12). Nije bilo statistički značajne razlike u udjelu HIFa-pozitivnih stanica između ispitanika liječenih PGF2-ima i ispitanika koji nisu bili liječeni PFG-om (Slika 13).



Slika 12. Izražaj proteina toplinskog šoka 70 (HSP70) i čimbenika induciranog hipoksijom alfa (HIFa) u epitelu i subepitelnoj stromi konjunktive (a), episkleri (b) i skleri (c) ispitanika s glaukomom (HSP70 zeleno, HIFa crveno, 400x). Slika je djelo autora.

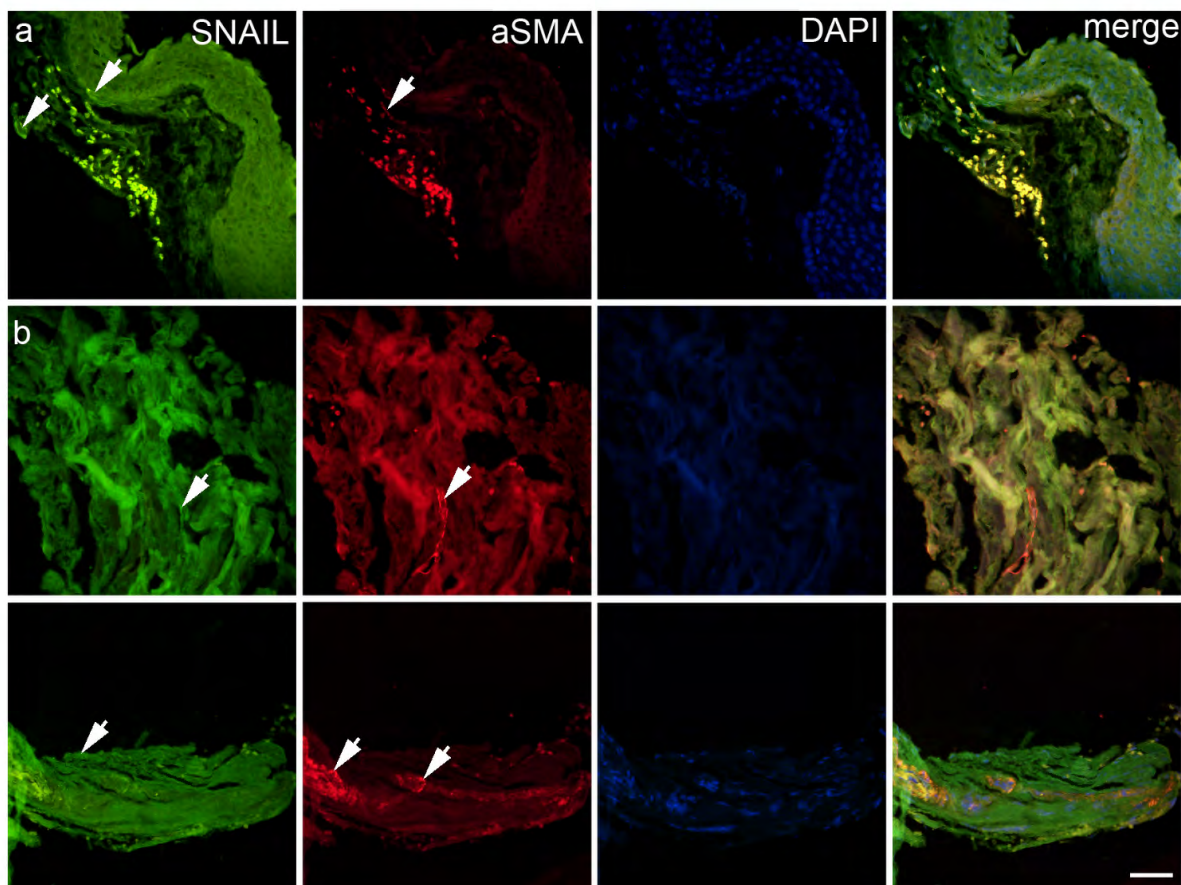


Slika 13. Grafički prikaz udjela imunoekspresije proteina toplinskog šoka 70 (HSP70) i čimbenika induciranog hipoksijom alfa (HIFa) u epitelu konjunktive, subepitelnoj stromi konjunktive, episkleri i dubokoj skleri.

Stupići predstavljaju aritmetičku srednju vrijednost, kružići pojedinačne vrijednosti u ispitanika liječenih analogima prostaglandina F2 alfa (PGF2, a kvadratići u ispitanika neličenih s PGF2. Korišten je t-test uz Welchovu korekciju. Slika je djelo autora.

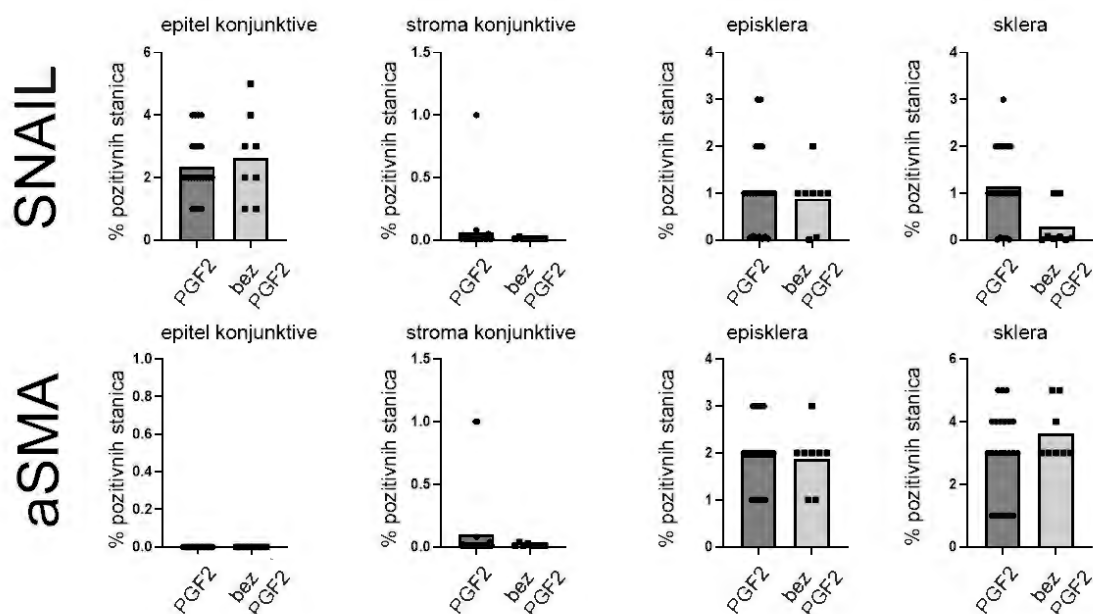
4.5. Izražaj SNAIL i aSMA u konjunktivi, episkleri i skleri ispitanika s glaukomom

Imunoekspresija SNAIL je bila jako pozitivna u epitelu konjunktive, slaba u subepitelnoj stromi konjunktive i umjereno pozitivna u episkleri i dubokoj skleri (Slika 14). U ispitanika koji su liječeni analogima prostaglandina F2 alfa (PGF2) je udio SNAIL-pozitivnih stanica u dubokoj skleri bio značajno veći nego u ispitanika koji nisu liječeni s PGF-2 ($P=0,001$). U ostalim lokalizacijama nije bilo statistički značajne razlike između tih dviju skupina ispitanika (Slika 15). Imunoekspresija aSMA bila je negativna u epitelu konjunktive, slabo pozitivna u subepitelnoj stromi konjunktive i jako pozitivna u episkleri i dubokoj skleri (Slika 14). Ispitanici koji nisu liječeni s PGF2 imali su granično veći udio aSMA-pozitivnih stanica u dubokoj skleri nego ispitanici koji su liječeni s PGF2 ($P=0,050$) (Slika 15).



Slika 14. Izražaj proteina cinkovog prsta (SNAIL) i alfa glatkomišićnog aktina (aSMA) u u epitelu i subepitelnoj stromi konjunktive (a), episkleri (b) i skleri (c) ispitanika s glaukomom

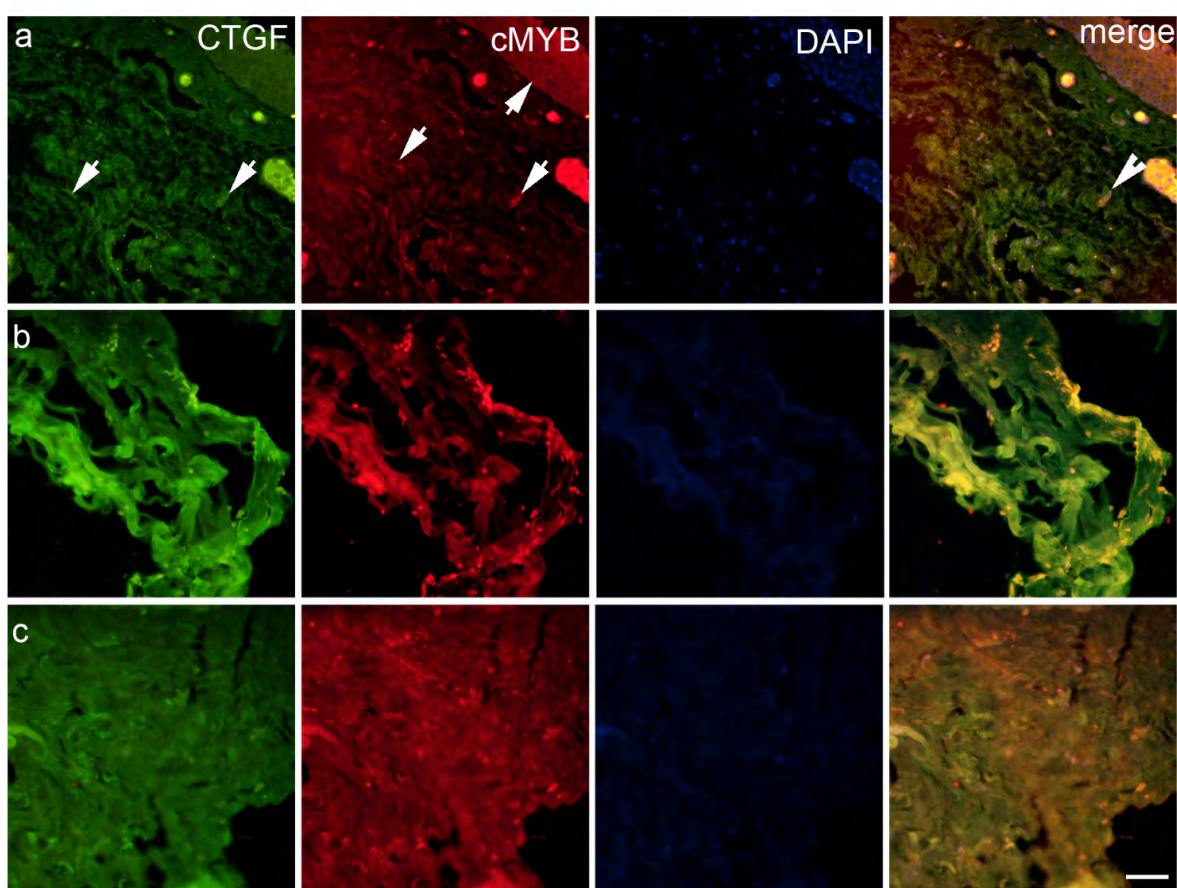
(SNAIL zeleno, aSMA crveno, 400x, mjerilo 50 μ m te se odnosi na sve slike.). Slika je djelo autora.



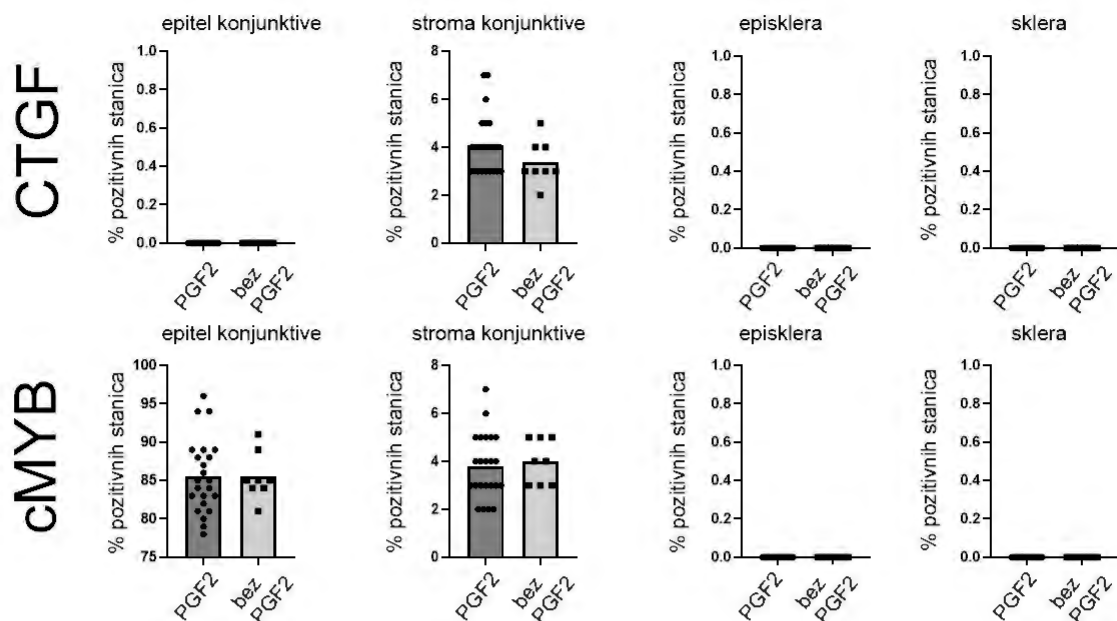
Slika 15. Grafički prikaz udjela imunoekspresije SNAIL i sSMA u epitelu konjunktive, subepitelnoj stromi konjunktive, episkleri i dubokoj skleri. Stupići predstavljaju aritmetičku srednju vrijednost, kružići pojedinačne vrijednosti u ispitanika liječenih analogizima PGF2, a kvadratići u ispitanika neličenih s PGF2. Korišten je t-test uz Welchovu korekciju. Slika je djelo autora.

4.6. Izražaj CTGF i cMYB u konjunktivi, episkleri i skleri ispitanika s glaukomom

Imunoekspresija CTGF je bila pozitivna u stromi konjunktive, dok su epitel konjunktive, episklera i dublji dijelovi sklere bili negativni (Slika 16). Imunoekspresija cMYB je bila pozitivna u epitelu i stromi konjunktive, a negativna u episkleri i dubokoj skleri (Slika 16). Nije bilo statistički značajne razlike u udjelu CTGF-pozitivnih odnosno cMYB-pozitivnih stanica između ispitanika liječenih PGF2-ima i ispitanika koji nisu bili liječeni PFG-om (Slika 17).



Slika 16. Izražaj čimbenika rasta vezivnog tkiva (CTGF) i transkripcijskog čimbenika cMYB u epitelu i subepitelnoj stromi konjunktive (a), episkleri (b) i skleri (c) ispitanika s glaukomom (CTGF zeleno, c-myb crveno, 400x, mjerilo 50 μ m te se odnosi na sve slike.). Slika je djelo autora.



Slika 17. Grafički prikaz udjela imunoekspresije čimbenika rasta vezivnog tkiva (CTGF) i cMYB u epitelu konjunktive, subepitelnoj stromi konjunktive, episkleri i dubokoj skleri. Stupići predstavljaju aritmetičku srednju vrijednost, kružići pojedinačne vrijednosti u ispitanika liječenih analozima PGF2, a kvadratići u ispitanika neliječenih s PGF2. Korišten je t-test uz Welchovu korekciju. Slika je djelo autora.

5. RASPRAVA

Na histološkim preparatima bojenim H&E analizirali smo morfologiju konjunktive, episklere i duboke sklere koja se u bitnom nije razlikovala od opisa u literaturi, niti se moglo pretpostaviti kojoj skupini ispitanika s obzirom na liječenje s PGF-2 pripadaju promatrani uzorci (93–95). Histokemijskim bojenjem po Mallory trikromu dobro se diferenciraju poznati obrasci gustoće kolagena između analiziranih tkiva, ali opet bez mogućnosti da se svjetlosnim mikroskopom uoče razlike između dviju skupina naših ispitanika (95).

U ovom je radu dvostruko imunofluorescentno bojenje pružilo uvid u imunoekspresiju nekoliko biljega vezanih uz fibrozu kod ispitanika s glaukomom i usporedbu njihova izražaja ne samo po tipu uzorka od istog ispitanika, nego i među skupinama ispitanika s obzirom na liječenje s PGF2. Imunoekspresija HSP70 bila je pozitivna u epitelu konjunktive, a negativna u drugim analiziranim djelovima. Epitel konjunktive kod ispitanika liječenih PGF2 imao je značajno veći udio HSP70-pozitivnih stanica nego kod ispitanika koji nisu liječeni s PGF2 ($p=0,043$). Konjunktivalni epitel predstavlja barijeru protiv vanjskih oštećenja i patogena i osjetljiv je na različite stresore (96,97). Pojačana regulacija HSP70 u epitelu konjunktive ukazuje na adaptivni zaštitni odgovor u svrhu očuvanja funkcije (98). Moguće je PGF2 inducirao stresni odgovor epitela posredovan s HSP70, a ovaj doprinosi upali i fibrozi. Razumijevanje uloge HSP70 u očnim tkivima ispitanika s glaukomom, posebno kao odgovor na liječenje PGF2, ima implikaciju za optimiziranje terapijske strategije. Ciljno liječenje preko HSP70 puteva moglo bi poboljšati zaštitne mehanizme konjunktivalnog epitela, što bi poboljšalo zdravlje očne površine i ukupni ishod liječenja pacijenata s glaukomom.

Rezultati naše studije pokazali su pozitivan obrazac imunoekspresije HIFa u stromi konjunktive i episkleri, a negativan u epitelu konjunktive i dubokoj skleri. Prisutnost HIFa u stromi konjunktive i episkleri implicira ulogu tog transkripcijskog čimbenika u regulaciji staničnog odgovora na hipoksiju (99). U očnom tkivu, posebno u hipoksičnim uvjetima izazvanim upalom ili dugotrajnom upotrebom lijekova, HIFa može utjecati na pogoršanje fibrotičnih promjena, što ga čini relevantnim biljekom za istraživanja povezana s učinkom PGF2. Stroma konjunktive i episklera su vaskularizirana tkiva pa imunoekspresija HIFa može ukazivati na adaptivni odgovor održavanja stanične funkcije i poticanje angiogeneze u hipoksičnim uvjetima (100,101). Iako se PGF2 često koristi u liječenju glaukoma za

smanjenje intraokularnog tlaka, čini se da ne utječe izravno na imunoekspresiju HIFa u tim očnim tkivima.

U našem istraživanju pokazali smo različite obrazce imunoekspresije SNAIL proteina, ključnog regulatora epitelno-mezenhimalne pretvorbe (EMT), u analiziranim očnim tkivima ispitanika s glaukomom. Imunoekspresija SNAIL je bila jako pozitivna u konjunktivalnom epitelu, slaba u stromi konjunktive i umjereno pozitivna u episkleri i dubokoj skleri. Udio SNAIL- pozitivnih stanica je statistički značajno veći u dubokoj skleri ispitanika liječenih s PGF2 nego u ispitanika koji nisu liječeni s PGF2 ($p=0,001$). Različita imunoekspresija SNAIL-a u očnim tkivima sugerira regulaciju procesa EMT u tim regijama (82). Ekspresija SNAIL može biti odgovor na liječenje analogom prostaglandina F2 i pogoršati fibrotični odgovor u očnim tkivima. Imunoekspresija SNAIL-a u konjunktivalnom epitelu ukazuje na mogućnost EMT u ovoj regiji važnu za održavanje integriteta epitela i reagiranje na različite podražaje (102,103). Slaba imunoekspresija u stromi konjunktive sugerira nižu sklonost EMT-u u ovom tkivu, a umjerena imunoekspresija u episkleri i dubokoj skleri dinamičniju regulaciju EMT u tim regijama. Značajno veća imunoekspresija SNAIL-a u dubokoj skleri ispitanika liječenih PGF2 nego u ispitanika koji nisu liječeni s PGF2 ukazuje na mogućnost da taj lijek utječe na EMT posebno u skleri. Sklera, sloj vezivnog tkiva, preoblikuje se i fibrozira u raznim očnim bolestima uključujući glaukom (95). Ekspresija SNAIL-a u dubokoj skleri ispitanika liječenih PGF2 ukazuje na moguće preoblikovanje tkiva kao odgovor na liječenje. Stoga razumijevanje uloge SNAIL-a i EMT-a u očnim tkivima ispitanika s glaukomom, posebno kao odgovor na liječenje PGF2, ima implikacije za optimizaciju terapijskih strategija i upravljanje potencijalnim nuspojavama. Treba istražiti mogućnosti intervencije u modulaciju EMT procesa u skleri i eventualno razviti novi terapijski pristup za sprječavanje/ublažavanje preoblikovanja sklere i fibrozu kod pacijenata s glaukomom.

U različitim očnim tkivima bolesnika s glaukomom nalazi se pozitivna imunoekspresija aSMA u miofibroblastima (104). U našem istraživanju izražaj aSMA bio je negativan u epitelu konjunktive, slabo pozitivan u subepitelnoj stromi konjunktive, a pozitivan u episkleri i dubokoj skleri. Različita ekspresija aSMA u očnim tkivima odražava raspodjelu aktivnosti miofibroblasta u ispitanika s glaukomom. Na mišjem modelu već je prije dokazano da je glaukom povezan s povećanom proliferacijom fibroblasta sklere i i njihovom

diferencijacijom u miofibroblaste (84). U našoj studiji bio je granično veći ($p=0,05$) udio aSMA-pozitivnih stanica u dubokoj skleri kod ispitanika koji nisu liječeni s PGF2 u usporedbi s ispitaicima liječenima PGF2. Prema literaturi, PGF2 potiče fibrozu pluća i miokarda stimulacijom proliferacije fibroblasta (105). Slijeom toga, povećana ekspresija aSMA ukazuje na prisutnost aktivnih miofibroblasta i sugerira da bi liječenje analogom prostaglandina F2 moglo poticati fibrozu poticanjem aktivacije miofibroblasta u tkivima oka. Kalouche i suradnici su utvrdili da liječenje latanoprostom, analogom PGF2, potiče ekspresiju aSMA i tranziciju fibroblasta u miofibroblaste u humanoj trabekularnoj mreži (106). Moguće da je granična značajnost razlike koju smo dobili uvjetovana malim uzorkom, ali mogućnost da PGF2 u skleri ublažava fibrotički proces posredovan miofibroblastima treba dalje istražiti na većoj i randomiziranoj skupini ispitanika.

Rezultati naše studije pružaju uvid u obrasce imunoizražaja CTGF-a i cMYB-a u različitim očnim tkivima ispitanika s glaukomom. Tako je izražaj CTGF-a ograničen na stromu konjunktive, a cMYB izražen u epitelu i stromi konjunktive i negativan u episkleri i dubokoj skleri. Nije nađena statistički značajna razlika u obrascima imunoizražaja oba biljega s obzirom na to jesu li ispitanici liječeni s PGF2. Razlika u ekspresiji CTGF-a i cMYB-a u očnim tkivima ukazuje na različitu ulogu tih čimbenika u održavanju homeostaze tkiva i reakciji na podražaj. CTGF, ključni regulator fibroze i preoblikovanja tkiva, eksprimiran je samo u stromi konjunktive, što implicira njegovu ulogu u modulaciji stromalnog mikrookoliša (107). Kod ispitanika s glaukomom koji su primali analoge prostaglandina F2, CTGF može posredovati fibrozu u konjunktivi i utjecati na kirurški ishod duboke sklerotomije jer potiče prekomjerno stvaranje ožiljka. cMYB, transkripcijski faktor uključen u proliferaciju i diferencijaciju stanica, eksprimiran je u epitelu i stromi konjunktive, što sugerira širu ulogu u regulaciji staničnih procesa u tim tkivima (108). Visoke razine c-MYB mogle bi ukazivati na pojačanu proliferaciju stanica u konjunktivi i skleri, što rezultira zadebljanjem i krutošću tkiva nakon operacijskog zahvata. Odsutnost značajnih razlika u ekspresiji CTGF i cMYB između ispitanika s obzirom na liječenje s PGF2 ukazuje da liječenej agonistima prostaglandina ne mijenja značajno ekspresiju ovih čimbenika u konjunktivalnom i skleralnom tkivu.

U naših ispitanika s glaukomom došlo je nakan operacije sklerekotomijom do značajnog smanjenja IOT-a, što je u skladu s literaturom. Slage i suradnici su u

petogodišnjem praćenju rezultata 106 urađenih sklerekтомija utvrdili značajno niži IOT poslije duboko sklerekтомije (109). Time se potvrđuje da manje invazivni zahvat kao što je duboka sklerekтомija, u slučaju adekvatne operaciji i urednog poslijeoperacijskog tijeka, može održati kontrolu IOT tijekom dugog vremenskog razdoblja.

U zaključku, klinički pokazatelji i imunofluorescentna analiza biljega vezanih uz fibrozu pružaju uvid u strukturne i funkcionalne varijacije u analiziranim očnim tkivima. Značajna razlika u imunoekspresiji HSP70 i SNAIL-a, moguće kao odgovor na liječenje PGF2, naglašava složenu interakciju između mehanizama odgovora na stres, EMT-a, diferencijacije miofibroblasta i terapijskih intervencija u očnim bolestima. Konjunktiva je osjetljiva na upalu nakon terapije antiglaukomske lijekovima. Dublji put drenaže koji pruža duboka sklerotomija može pomoći u smanjenju postoperativnih komplikacija jer stvaranjem intraskleralnog puta drenaže minimizira ovisnost o konjunktivi koja je ranjivija nakon dulje medicinske terapije. Uvid postignut ovim istraživanjem je značajan za glaukomske kirurge jer predlaže strateški pomak prema postupcima koji snižavaju intraokularni tlak s manje postoperativnih komplikacija. Preferencija za drenažne operacije, posebno kod pacijenata s opsežnom anamnezom lokalne terapije, je korisna jer pacijenti često imaju konjunktivalnu upalu koja može ugroziti kirurške ishode ako se izvedu postupci poput trabekulotomije. Naša studija svojim rezultatima podupire napore za kontinuiranim poboljšanjem kirurških intervencija u liječenju glaukoma. Potrebna su daljnja istraživanja specifičnih mehanizama koji leže u osnovi regulacije analiziranih čimbenika povezanih s fibrozom i njihovog utjecaja na zdravlje oka, a sve u svrhu boljeg liječenja glaukoma.

6. ZAKLJUČCI

1. Imunoekspresija biljega povezanih s fibrozom u uzorcima ispitanika s operiranim glaukomom je različita. Izražaj HSP70 je pozitivan u epitelu konjunktive, a negativan u drugim analiziranim djelovima. Izražaj HIFa je pozitivan u stromi konjunktive i episkleri, a negativan u epitelu konjunktive i dubokoj skleri. Izražaj CTGF-a ograničen na stromu konjunktive, a c-myb na epitel i stromu konjunktive. Izražaj SNAIL prisutan je u epitelu konjunktive i dubokoj skleri, a aSMA u dubokoj skleri.

2. U ispitanika koji su liječeni analogima prostaglandina F2 alfa, udio HSP70- pozitivnih epitelnih stanica u konjuktivi bio je značajno veći nego u ispitanika koji nisu bili liječeni tim lijekom ($P=0,043$). U ispitanika koji su liječeni analogima prostaglandina F2 alfa je udio SNAIL-pozitivnih stanica u dubokoj skleri bio značajno veći nego u ispitanika koji nisu liječeni tim lijekom ($P=0,001$).

3. Sklerektomija je kod naših ispitanika bila je uspješna. Utvrđena je statistički značajna razlika u razini intraokularnog tiska prije i nakon glaukenskog zahvata ($22,48 \pm 7,48$ prema $8,9 \pm 3,45$ mm Hg, $P < 0,001$). Nije utvrđena razlika u vidnoj oštini prije i nakon glaukenskog zahvata ($0,3 \pm 0,28$ prema $0,33 \pm 0,25$, $P=0,528$).

7. SAŽETAK

Uvod: Glaukom je danas vodeći uzrok nepovratne sljepoće. Liječenja je zahtjevno i odabir adekvatnog terapijskog pristupa ključan u smanjenju kroničnih komplikacija glaukoma. Primarni terapijski pristup je redukcija intraokularnog tlaka (IOT). U medikamentoznom liječenju glaukoma, dugotrajna primjena lokalnih prostaglandina F2 (PGF2) može dovesti do kroničnog konjunktivitisa i posljedično loših ishoda operacije glaukoma. Cilj studije je analizirati obrazac imunoekspresije proteina vezanih uz fibrozu u konjunktivi, episkleri i dubokoj skleri pacijenata s glaukomom koji su operirani metodom sklerektomije i usporediti izražaj analiziranih biljega s obzirom je pacijent prethodno bio liječen ili ne s PGF2.

Ispitanici i postupci: U studiju je uključen 41 ispitanik s operiranim glaukomom, od kojih su 23 liječena s PGF2, a osam nisu. Tijekom operacije uzeti su uzorci za analizu. Svim ispitanicima je prije i poslije zahvata učinjen standardni oftalmološki pregled i mjerenje IOT-a. Protutijela na protein toplinskog šoka 70 (HSP70), čimbenik rasta vezivnog tkiva (CTGF), protein cinkovog prsta SNAI1 (SNAIL), alfa glatkomišićni aktin (αSMA), transkripcijski čimbenik cMYB (cMYB) i čimbenik induciran hipoksijom alfa (HIFα) aplicirana su u različitim kombinacijama na histološkim preparatima konjunktive, sklere i episklere dvostrukom imunofluorescencijskom metodom.

Rezultati: Prosječna dob ispitanika je $70,45 \pm 15,23$ godina, a njih 74,3 % primala su tri različita antiglaukomska lijeka. Razina IOT-a je smanjena nakon glaukenskog zahvata, $22,48 \pm 7,48$ prema $8,9 \pm 3,45$ ($P < 0,001$). U ispitanika liječenih PGF2 analogima je imunoekspresija HSP70 u konjunktivalnom epitelu i SNAIL u dubokoj skleri bila značajno veća nego u ispitanika koji nisu primali PGD2 ($p=0,043$ odnosno $P=0,001$); u ekspresiji ostalih biljega nije bilo statistički značajne razlike između dvije skupine.

Zaključak: U ispitanika koji su primali PGF2 jače su izraženi biljeg oštećenja HSP70 i biljeg epitelno-mezenhimalne pretvorbe SNAIL, čime smo dokazali veći fibrozni potencijal u analiziranim segmentima oka tih pacijenata. Rezultati našeg istraživanja mogli bi potaknuti preferenciju za drenažne operacije, posebno kod pacijenata s opsežnom anamnezom lokalne terapije, budući da ti pacijenti često imaju konjunktivalnu upalu koja može ugroziti kirurške ishode ako se izvedu postupci poput trabekulotomije. Daljnja istraživanja regulacije ovih

čimbenika u očnim tkivima mogla bi dovesti do razvoja potencijalnih novih terapijskih pristupa u liječenju glaukoma.

8. SUMMARY

Introduction: Glaucoma is today the leading cause of irreversible blindness. Treatment is demanding and the selection of an adequate therapeutic approach is crucial in reducing chronic complications of glaucoma. The primary therapeutic approach is the reduction of intraocular pressure (IOP). In the medical treatment of glaucoma, long-term use of local prostaglandin F₂ (PGF₂) can lead to chronic conjunctivitis and consequently poor outcomes of glaucoma surgery. The aim of the study is to analyze the immunoexpression pattern of fibrosis-related proteins in the conjunctiva, episclera and deep sclera of glaucoma patients who underwent sclerectomy and to compare the expression of the analyzed markers with regard to whether the patient had previously been treated with PGF₂ or not.

Patients and methods: The study included 41 patients with glaucoma surgery, of whom 23 were treated with PGF₂ and eight were not. Samples were taken for analysis during surgery. All patients underwent a standard ophthalmological examination and IOP measurement before and after the procedure. Antibodies to heat shock protein 70 (HSP70), connective tissue growth factor (CTGF), zinc finger protein SNAIL (SNAIL), alpha smooth muscle actin (αSMA), transcription factor cMYB and hypoxia-inducible factor alpha (HIFα) were applied in different combinations to histological preparations of conjunctiva, sclera and episclera by double immunofluorescence method.

Results: The mean age of the patients was 70.45 ± 15.23 years, and 74.3% of them were receiving three different antiglaucoma drugs. IOP levels were reduced after glaucoma surgery, 22.48 ± 7.48 vs. 8.9 ± 3.45 ($P < 0.001$). In patients treated with PGF₂ analogues, the immunoexpression of HSP70 in the conjunctival epithelium and SNAIL in the deep sclera was significantly higher than in patients not receiving PGD₂ ($p=0.043$ and $P=0.001$, respectively); there was no statistically significant difference in the expression of other markers between the two groups.

Conclusion: In patients receiving PGF₂, the damage marker HSP70 and the epithelial-mesenchymal transition marker SNAIL were more strongly expressed, thus demonstrating a greater fibrotic potential in the analyzed eye segments of these patients. The results of our study could encourage a preference for drainage surgeries, especially in patients with an extensive history of topical therapy, since these patients often have conjunctival inflammation that can compromise surgical outcomes if procedures such as trabeculotomy are performed. Further research into the regulation of these factors in ocular tissues could

lead to the development of potential new therapeutic approaches in the treatment of glaucoma.

9. POPIS LITERATURE

1. Weinreb RN, Aung T, Medeiros FA. The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review. *JAMA*. 2014;311:1901–11.
2. Joshi P, Dangwal A, Guleria I, Kothari S, Singh P, Kalra JM i sur. Glaucoma in adults- diagnosis, management, and prediagnosis to end-stage, categorizing glaucoma's stages: A review. *J Curr Glaucoma Pract*. 2022;16:170–8.
3. Tham YC, Li X, Wong TY, Quigley HA, Aung T, Cheng CY. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: A systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology*. 2014;121:2081–90.
4. Quigley H, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J of Ophthalmol*. 2006;90:262–7.
5. Stuart KV, de Vries VA, Schuster AK, Yu Y, van der Heide FCT, Delcourt C i sur. Prevalence of glaucoma in europe and projections to 2050: findings from the European eye epidemiology consortium. *Ophthalmology*. 2025;132:1114–24.
6. Quigley HA, Addicks M, Green WR, Maumenee AE. Optic nerve damage in human glaucoma. II. The site of injury and susceptibility to damage. *archives of ophthalmology*. *Arch Ophthalmol*. 1981;4:635–49.
7. Burgoyne CF, Crawford Downs J, Bellezza AJ, Francis Suh JK, Hart RT. The optic nerve head as a biomechanical structure: A new paradigm for understanding the role of IOP-related stress and strain in the pathophysiology of glaucomatous optic nerve head damage. *Prog in Retin Eye Res*. 2005;24:39–73.
8. Fechtner RD, Weinreb RN. Mechanisms of optic nerve damage in primary open angle glaucoma. *Surv Ophthalmol*. 1994;39:23–42.
9. Fahy ET, Chrysostomou V, Crowston JG. Mini-Review: Impaired axonal transport and glaucoma. *Curr Eye Res*. 2016;41:273–83.
10. Dias MS, Luo X, Ribas VT, Petrs-Silva H, Koch JC. The role of axonal transport in glaucom. *Int J Mol Sci*. 2022;23:3935.
11. Leung DY, Tham CC. Normal-tension glaucoma: Current concepts and approaches- A review. *Clin Exp Ophthalmol*. 2022;50:247-259.

12. Iwase A, Suzuki Y, Araie M, Yamamoto T, Abe H, Shirato S i sur. The prevalence of primary open-angle glaucoma in Japanese. *Ophthalmology*. 2004;111(9):1641–8.
13. Wang N, Xie X, Yang D, Xian J, Li Y, Ren R i sur. Orbital cerebrospinal fluid space in glaucoma: The Beijing intracranial and intraocular pressure (iCOP) study. *Ophthalmology*. 2012;119:2065-73.
14. Liang YJ, Wang YY, Rong SS, Chen ZJ, Chen SY, Tham JA i sur. Genetic Associations of Primary Angle-Closure Disease. *JAMA Ophthalmol*. 2024;142:437-44.
15. Shiga Y, Akiyama M, Nishiguchi KM, Sato K, Shimozawa N, Takahashi A i sur. Genome-wide association study identifies seven novel susceptibility loci for primary open-angle glaucoma. *Hum Mol Genet*. 2018;27:1486–96.
16. Amerasinghe N, Zhang J, Thalamuthu A, He M, Vithana EN, Viswanathan A i sur. The heritability and sibling risk of angle closure in Asians. *Ophthalmology*. 2011;118:480–5.
17. Vithana EN, Khor CC, Qiao C, Nongpiur ME, George R, Chen LJ i sur. Genome-wide association analyses identify three new susceptibility loci for primary angle closure glaucoma. *Nat Genet*. 2012;44:1142–6.
18. European glaucoma society terminology and guidelines for glaucoma, 5th edition. *Br J Ophthalmol*. 2021;105:1-169.
19. Gedde SJ, Lind JT, Wright MM, Chen PP, Muir KW, Vinod K i sur. Primary open-angle glaucoma suspect preferred practice pattern®. *Ophthalmology*. 2021;128:151–92.
20. Gedde SJ, Chen PP, Muir KW, Vinod K, Lind JT, Wright MM i sur. Primary angle-closure disease preferred practice pattern®. *Ophthalmology*. 2021;128:30–70.
21. Weinreb RN, Khaw PT. Primary open-angle glaucoma. *Lancet*. 2004;363:1711–20.
22. Gunzenhauser R, Coleman AL. Glaucoma screening guidelines worldwide. *J Glaucoma*. 2024;33:9–12.

23. Fayed MA, Chen TC. Pediatric intraocular pressure measurements: Tonometers, central corneal thickness, and anesthesia. *Surv Ophthalmol.* 2019; 64:810–25.
24. Jampel HD, Friedman D, Quigley H, Vitale S, Miller R, Knezevich F i sur. Agreement among glaucoma specialists in assessing progressive disc changes from photographs in open-angle glaucoma patients. *Am J Ophthalmol.* 2009;147:39-44.e1.
25. Delgado MF, Nguyen NTA, Cox TA, Singh K, Lee DA, Dueker DK i sur. Automated perimetry: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology.* 2002;109:2362-74.
26. Geevarghese A, Wollstein G, Ishikawa H, Schuman JS. Optical coherence tomography and glaucoma. *Annu Rev Vis Sci.* 2021;7:693-726.
27. Burr J, Azuara-Blanco A, Avenell A, Tuulonen A. Medical versus surgical interventions for open angle glaucoma. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012; 12;2012(9):CD004399.
28. Heijl A, Cristina Leske M, Bengtsson B, Hyman L, Bengtsson B, Hussein M. Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression results from the early manifest glaucoma trial. *Arch Ophthalmol.* 2002;120:1268-79.
29. Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study Group. Comparison of glaucomatous progression between untreated patients with normal-tension glaucoma and patients with therapeutically reduced intraocular pressures. *Am J Ophthalmol.* 1998;126:487-97.
30. The AGIS investigators. The advanced glaucoma intervention study (AGIS): 7. the relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. *Am J Ophthalmol.* 2000;130(4):429–40.
31. Doucette LP, Walter MA. Prostaglandins in the eye: Function, expression, and roles in glaucoma. *Ophthalmic Genet.* 2017;38:108–16.
32. Razeghinejad MR. The Effect of latanaprost on intraocular inflammation and macular edema. *Ocul Immunol Inflamm.* 2019; 27:181–8.

33. Ichhpujani P, Katz LJ, Hollo G, Shields CL, Shields JA, Marr B i sur. Comparison of human ocular distribution of bimatoprost and latanoprost. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2012;28:134-45.
34. Gatton DD, Sagara T, Lindsey JD, True Gabelt A, Kaufman PL, Weinreb RN. Increased matrix metalloproteinases 1, 2, and 3 in the monkey uveoscleral outflow pathway after topical prostaglandin f 2-isopropyl ester treatment. *Arch Ophthalmol.* 2001;119:1165-70.
35. Helin M, Rönkkö S, Puustjärvi T, Teräsvirta M, Ollikainen M, Uusitalo H. Conjunctival inflammatory cells and their predictive role for deep sclerectomy in primary open-angle glaucoma and exfoliation glaucoma. *J Glaucoma.* 2011;20:172–8.
36. Krasnov MM. Laseropuncture of anterior chamber angle in glaucoma. *Am J Ophthalmol.* 1973;75:674–8.
37. Rolim-de-Moura CR, Paranhos A, Loutfi M, Burton D, Wormald R, Evans JR. Laser trabeculoplasty for open-angle glaucoma and ocular hypertension. *Cochrane Database Syst Rev.* 2022;8:CD003919.
38. GLT Research Group. The glaucoma laser trial: 4. contralateral effects of timolol on the intraocular pressure of eyes treated with ALT. *Ophthalmic Surg.* 1991;22:324-9.
39. Sm J, Frcophth L, Kh J, Frcs C, Cy C, Frcs T i sur. Five-year follow up of selective laser trabeculoplasty in Chinese eyes. *Clin Exp Ophthalmol.* 2004;32:368-72.
40. Lim R. The surgical management of glaucoma: A review. *Clin Exp Ophthalmol.* 2022;50:213-31.
41. Sugar HS. Some recent advances in the surgery of glaucoma. *Bull N Y Acad Med.* 1963;39:3–20.
42. Cairns JE. Trabeculectomy. Preliminary report of a new method. *Am J Ophthalmol.* 1968;4:673–9.
43. Fuller JR, Bevin TH, B Molteno AC, T Vote BJ, Herbison Br PJ. Anti-inflammatory fibrosis suppression in threatened trabeculectomy bleb failure produces good long

- term control of intraocular pressure without risk of sight threatening complications. *Br J Ophthalmol*. 2002;86:1352-4.
44. Kirwan JF, Lockwood AJ, Shah P, Macleod A, Broadway DC, King AJ i sur. Trabeculectomy in the 21st century: A multicenter analysis. *Ophthalmology*. 2013;120:2532–9.
 45. Mermoud A. Sinusotomy and deep sclerectomy. *Eye*. 2000;14:531–5.
 46. Krasnov MM. Symposium: microsurgery of the outflow channels. Sinusotomy. Foundations, results, prospects. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*. 1972;76:368–74.
 47. Demailly P, Jeanteur-Lunel MN, Berkani M, Ecoffet M, Kopel J, Kretz G i sur. Non-penetrating deep sclerectomy combined with a collagen implant in primary open-angle glaucoma. Medium-term retrospective results. *J Fr Ophtalmol*. 1996;19:659–66.
 48. Vaudaux J, Mermoud A. Aqueous humor dynamics in non-penetrating filtering surgery. *Ophthalmol Practice*. 1988;38:S1064.
 49. Mermoud A, Shaarawy T. *Non-Penetrating Glaucoma Surgery*. 1 izdanje. CRC Press; 2001.
 50. Stegmann R, Pienaar A, Miller D. Visco canalostomy for open-angle glaucoma in black African patients. *J Cataract Refract Surg*. 1999;25:316–22.
 51. Chiou AG, Mermoud A, Underdahl JP, Schnyder CC. An ultrasound biomicroscopic study of eyes after deep sclerectomy with collagen implant. *Ophthalmology*. 1998;105:746–50.
 52. Brown RD, Cairns JE. Experience with the Molteno long tube implant. *Trans Ophthalmol Soc U K*. 1983;103:297–312.
 53. Luo N, Liu M, Hao M, Xu R, Wang F, Zhang W. Comparison of tube shunt implantation and trabeculectomy for glaucoma: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*. 2023;13:e065921.

54. Mermoud A, Salmon JF, Alexander P, Straker C, Murray AD. Molteno tube implantation for neovascular glaucoma. Long-term results and factors influencing the outcome. *Ophthalmology*. 1993;100:897–902.
55. Koh V, Chew P, Triolo G, Lim KS, Barton K, PAUL Glaucoma Implant Study Group. Treatment Outcomes Using the PAUL Glaucoma Implant to Control Intraocular Pressure in Eyes with Refractory Glaucoma. *Ophthalmol Glaucoma*. 2020;3:350–9.
56. Gedde SJ, Schiffman JC, Feuer WJ, Herndon LW, Brandt JD, Budenz DL, et al. Treatment outcomes in the Tube Versus Trabeculectomy (TVT) study after five years of follow-up. *Am J Ophthalmol*. 2012;153:789-803.e2.
57. Chen MF, Kim CH, Coleman AL. Cyclodestructive procedures for refractory glaucoma. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019;3:CD012223.
58. Koronis S, Matsou A, Tzamalīs A, Dermenoudi M, Ziakas N, Anastasopoulos E. Comparison of two protocols of diode laser transscleral cyclophotocoagulation in refractory glaucoma. *Eur J Ophthalmol*. 2023;33:976–83.
59. Mallone F, Costi R, Marengo M, Plateroti R, Minni A, Attanasio G i sur. Understanding drivers of ocular fibrosis: Current and future therapeutic perspectives. *Int J Mol Sci*. 2021;22:11748.
60. Friedlander M. Fibrosis and diseases of the eye. *J Clin Invest*. 2007;117:576-86.
61. Saika S, Yamanaka O, Sumioka T, Miyamoto T, Miyazaki K ichi, Okada Y i sur. Fibrotic disorders in the eye: Targets of gene therapy. *Prog Retin Eye Res*. 2008;27:177-96.
62. Mizdrak M, Filipović N, Vukojević K, Čapkun V, Mizdrak I, Durdov MG. Prognostic value of connective tissue growth factor and c-Myb expression in IgA nephropathy and Henoch-Schönlein purpura—A pilot immunohistochemical study. *Acta Histochem*. 2020;122:151479.
63. Fini M. Keratocyte and fibroblast phenotypes in the repairing cornea. *Prog Retin Eye Res*. 1999;18:529–51.

64. Wilson SE. Topical losartan: practical guidance for clinical trials in the prevention and treatment of corneal scarring fibrosis and other eye diseases and disorders. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2023;39:191-206.
65. Sampaio LP, Hilgert GSL, Shiju TM, Murillo SE, Santhiago MR, Wilson SE. Topical losartan inhibits corneal scarring fibrosis and collagen type IV deposition after Descemet's membrane-endothelial excision in rabbits. *Exp Eye Res.* 2022;216:108940.
66. Pereira-Souza AL, Ambrósio R, Bandeira F, Salomão MQ, Souza Lima A, Wilson SE. Topical losartan for treating corneal fibrosis (haze): first clinical experience. *J Refract Surg.* 2022;38:741-746.
67. Lin HC, Stein JD, Nan B, Childers D, Newman-Casey PA, Thompson DA i sur. Association of geroprotective effects of metformin and risk of open-angle glaucoma in persons with diabetes mellitus. *JAMA Ophthalmol.* 2015;133:915–23.
68. Thakur S, Viswanadhapalli S, Kopp JB, Shi Q, Barnes JL, Block K i sur. Activation of AMP-activated protein kinase prevents TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition and myofibroblast activation. *american journal of pathology. A m J Pathol.* 2015;185:2168-80.
69. Kheirollahi V, Wasnick RM, Biasin V, Vazquez-Armendariz AI, Chu X, Moiseenko A i sur. Metformin induces lipogenic differentiation in myofibroblasts to reverse lung fibrosis. *Nat Commun.* 2019;10:2987.
70. Li L, Huang W, Li K, Zhang K, Lin C, Han R, et al. Metformin attenuates gefitinib-induced exacerbation of pulmonary fibrosis by inhibition of TGF- β signaling pathway. *Oncotarget.* 2015;6:43605-19.
71. Cufí S, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Martin-Castillo B, Joven J, Menendez JA. Metformin against TGF β -induced epithelial-to-mesenchymal transition (EMT): From cancer stem cells to aging-associated fibrosis. *Cell Cycle.* 2010;9:4461-8.

72. Lin H, Li N, He H, Ying Y, Sunkara S, Luo L i sur. AMPK inhibits the stimulatory effects of TGF- β on Smad2/3 activity, cell migration, and epithelial-to-mesenchymal transition. *Mol Pharmacol*. 2015;88:1062–71.
73. Lu J, Shi J, Li M, Gui B, Fu R, Yao G i sur. Activation of AMPK by metformin inhibits TGF- β -induced collagen production in mouse renal fibroblasts. *Life Sci*. 2015;127:59–65.
74. Hurley DJ, Irnaten M, O'Brien C. Metformin and glaucoma—review of anti-fibrotic processes and bioenergetics. *Cells*. 2021;10:2131.
75. Li X, Leng Y, Jiang Q, Wang Z, Luo P, Zhang C i sur. Eye drops of metformin prevents fibrosis after glaucoma filtration surgery in rats via activating AMPK/Nrf2 signaling pathway. *Front Pharmacol*. 2020;11:1038.
76. Wang WH, Deng AJ, He SG. A key role of microRNA-26a in the scar formation after glaucoma filtration surgery. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2018;46:831–7.
77. Bao H, Jiang K, Meng K, Liu W, Liu P, Du Y i sur. TGF- β 2 induces proliferation and inhibits apoptosis of human Tenon capsule fibroblast by miR-26 and its targeting of CTGF. *Biomed Pharmacother*. 2018;104:558–65.
78. Wang X, Lu J, He Y, Shu Q, Lin Y, Su W i sur. MMP14 as a central mediator of TGF- β 1-induced extracellular matrix remodeling in graves orbitopathy. *Front Endocrinol*. 2025;16:1623842.
79. Lee E, Chung YH, Park JY, Mun GH, Oh CS, Oh SH i sur. The distribution of c-myb immunoreactivities in the adult mouse retina. *Neurosci Lett*. 2004;366:297–301.
80. Zhang L, Zhang S, Wang C, Bing Q, Zhao Z, Wang J i sur. Role and mechanism of microRNA-548c-3p/c-Myb in myocardial infarction fibrosis in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019;23:908–16.
81. Ma HH, Yao JL, Yao CL, Chen XJ, Yang SJ. Effects of c-myb antisense RNA on TGF- β 1 and α 1-I collagen expression in cultured hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol*. 2004;10:3662–5.

82. Wang Y, Shi J, Chai K, Ying X, Zhou B. The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets*. 2013;13:963–72.
83. Fujimoto T, Inoue-Mochita M, Inoue T. A ROCK inhibitor suppresses the transforming growth factor-beta-2-induced endothelial–mesenchymal transition in Schlemm’s canal endothelial cells. *Sci Rep*. 2023;13:9655.
84. Oglesby E, Tezel G, Cone-Kimball E, Steinhart M, Jefferys J, Pease M i sur. Scleral fibroblast response to experimental glaucoma in mice. *Mol Vis*. 2016;22:82–99.
85. Pitha I, Oglesby E, Chow A, Kimball E, Pease ME, Schaub J i sur. Rho-kinase inhibition reduces myofibroblast differentiation and proliferation of scleral fibroblasts induced by transforming growth factor β and experimental glaucoma. *Transl Vis Sci Technol*. 2018;7:6.
86. Chow A, McCrea L, Kimball E, Schaub J, Quigley H, Pitha I. Dasatinib inhibits peripapillary scleral myofibroblast differentiation. *Exp Eye Res*. 2020; 194:107999.
87. Shi H, Zhu R, Hu N, Shi J, Zhang J, Jiang L i sur. Association of frizzled-related protein (MFRP) and heat shock protein 70 (HSP70) single nucleotide polymorphisms with primary angle closure in a Han Chinese population: Jiangsu Eye Study. *Mol Vis*. 2013;19:128–34.
88. Jing Y, Li J, Hao P, Xing S, Li X. Silencing METTL3 Increases HSP70 Expression and Alleviates Fibrosis in Keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2024;65:9.
89. Gui D, Li Y, Chen X, Gao D, Yang Y, Li X. HIF1 signaling pathway involving iNOS, COX2 and caspase9 mediates the neuroprotection provided by erythropoietin in the retina of chronic ocular hypertension rats. *Mol Med Rep*. 2015;11:1490–6.
90. Racetin A, Raguž F, Durdov MG, Kunac N, Saraga M, Sanna-Cherchi S i sur. Immunohistochemical expression pattern of RIP5, FGFR1, FGFR2 and HIP2 in the normal human kidney development. *Acta Histochem*. 2019;121:531–8.
91. Vukojevic K, Skobic H, Saraga-Babic M. Proliferation and differentiation of glial and neuronal progenitors in the development of human spinal ganglia. *Differentiation*. 2009;78:91–8.

92. Racetin A, Jurić M, Filipović N, Šolić I, Kosović I, Durdov MG i sur. Expression and localization of DAB1 and Reelin during normal human kidney development. *Croat Med J.* 2019;60:521–31.
93. Diebold Y, García-Posadas L. Is the conjunctiva a potential target for advanced therapy medicinal products? *Pharmaceutics.* 2021;13:1140.
94. Vannas S, Teir H. Histologic observations of the structure of the sclera in glaucomatous human eyes. *Am J Ophthalmol.* 1960;49:411–6.
95. Belmares R, Raychaudhuri U, Maansson S, Clark AF. Histological investigation of human glaucomatous eyes: Extracellular fibrotic changes and galectin 3 expression in the trabecular meshwork and optic nerve head. *Clinical Anatomy.* 2018;31:1031–49.
96. Zhan H, Towler HMAT, Calder VL. The immunomodulatory role of human conjunctival epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:3906–10.
97. Dartt DA. Regulation of mucin and fluid secretion by conjunctival epithelial cells. *Prog Retin Eye Res.* 2002;21:555-76.
98. Ambrose AJ, Chapman E. Function, therapeutic potential, and inhibition of Hsp70 chaperones. Vol. 64, *J Med Chem.* 2021;64:7060–82.
99. Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell.* 2010;40:294-309.
100. Zimna A, Kurpisz M. Hypoxia-Inducible factor-1 in physiological and pathophysiological angiogenesis: Applications and therapies. *Biomed Res Int.* 2015;2015:549412.
101. Hirota K, Semenza GL. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2006;59:15–26.
102. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15:178–96.

103. Cook DP, Vanderhyden BC. Context specificity of the EMT transcriptional response. *Nat Commun.* 2020;11:2142.
104. Chadli L, Sotthwes B, Li K, Andersen SN, Cahir-McFarland E, Cheung M i sur. Identification of regulators of the myofibroblast phenotype of primary dermal fibroblasts from early diffuse systemic sclerosis patients. *Sci Rep.* 2019;9:4521.
105. Li K, Zhao J, Wang M, Niu L, Wang Y, Li Y i sur. The roles of various prostaglandins in fibrosis: A review. *Biomolecules.* 2021;11:789.
106. Kalouche G, Beguier F, Bakria M, Melik-Parsadaniantz S, Leriche C, Debeir T i sur. Activation of prostaglandin FP and EP2 receptors differently modulates myofibroblast transition in a model of adult primary human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016;57:1816–25.
107. Lipson KE, Wong C, Teng Y, Spong S. CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2012;5:S24.
108. George OL, Ness SA. Situational awareness: Regulation of the myb transcription factor in differentiation, The cell cycle and oncogenesis. *Cancers.* 2014;6:2049–71.
109. Slagle G, Groth SL, Montelongo M, Sponsel WE. Nonpenetrating deep sclerectomy for progressive glaucoma: Long-term (5-year) follow-up of intraocular pressure control and visual field survival. *J Curr Glaucoma Pract.* 2020;14:3–9.

10. ŽIVOTOPIS

OPĆI PODACI:

Ime i prezime: Robert Stanić

Datum rođenja: 24. srpnja 1962., Zagreb

Adresa stanovanja: Starčevićeva 24d ,21000 Split

Telefona: 021/556-402

Email: robertstanic@hotmail.com

OBRAZOVANJE:

1980.-1987.: Medicinski fakultet Sveučilište u Zagrebu, srednja ocjena 4,4

Od 1987.: Poslijediplomski studij iz medicinskih znanosti, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagreb, Studij alergologije i kliničke imunologije

Od 1987.-1988.: Liječnički staž u KBC – Split

1988.: položen državni ispit

1988.-1991.: radio u Domu zdravlja Omiš

1991.-1994.: Specijalizacija iz oftalmologije na Klinici za očne bolesti KBC-Split

1993.: obranio magistarski rad pod naslovom: “Epidemiologija atopijskih uveitisa i njihova povezanost s antigenim sustavom HLA“

AKADEMSKI NASLOVI:

1987.: doktor medicine

1993.: magistar znanosti

2013: primarijus

2013: subspecijalist prednjeg segmenta oka

ČLANSTVO U ORGANIZACIJAMA:

Hrvatski liječnički zbor

Hrvatska liječnička komora

Hrvatsko oftalmološko društvo

Hrvatsko društvo za kataraktu i refraktivnu kirurgiju (CSCRS)

Europsko društvo za kataraktu i refraktivnu kirurgiju(ESCRS)

STRUČNA USAVRŠAVANJA

1995.: Klinika za očne bolesti Ljubljana

2000.: Fyodorov institut Moskva

2001.: Očni odjel bolnice „Sestara milosrdnica“ Zagreb

2003.: 10th Ophthalmic Winteracademy Schruns

2010 Centre du Glaucome de Montchoisi a Laussane, Suisse

Od 1991.: zaposlen na Klinici za očne bolesti KBC – Split

Uže područje rada u oftalmologiji: kirurgija prednjeg očnog segmenta

POPIS PUBLIKACIJA:

1. Stanic R, Stanic R. Traumatic glaucoma. Coll Antropol. 2001; 25:101-4.
2. Kovacic Z, Stanic R, Rogosic V, Bojic L, Ivanisevic M, Capkun V. The effect of travoprost 0.004% as an adjuvant to timolol 0.5% therapy. Acta Clin Croat. 2009; 48(1):31-3.

3. Skrabac V, Ivanisevic M, Stanic R, Unic I, Bucan K, Galetovic D. Acute bilateral cataract with phacomorphic glaucoma in a girl with newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 2010; 47:e1-3.
4. Ivanisevic M, Stanic R, Ivanisevic P, Vukovic A. Albrecht von Graefe (1828-1870) and his contributions to the development of ophthalmology. *Int Ophthalmol*. 2020; 40(4):1029-1033.
5. Stanic R, Vukojevic K, Filipovic N, Benzon B, Ogorevc M, Kunac N i sur. The Effect of Prostaglandin F2 Analog Treatment on the Immunoexpression of Fibrosis-Associated Factors in Patients with Glaucoma Undergoing Deep Sclerotomy. *Int. J. Mol. Sci*. 2024; 25:12618.
6. Paradzik Simunovic M, Degoricija M, Korac-Prlic J, Lesin M, Stanic R, Puljak L i sur. Potential Role of *Malassezia restricta* in Pterygium Development. *International Journal of Molecular Sciences*. 2025; 26(7):2976.
7. Paradzik Simunovic M, Degoricija M, Stanic R, Terzic J, Simunovic M. The Potential Role of Vitamin D in the Pterygium Pathophysiology—A Possible New Therapeutic Perspective and Narrative Review. *Journal of Clinical Medicine*. 2025; 14(11):3640.