SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

Martina Paradžik Šimunović, dr. med.

POVEZANOST SPECIFIČNIH KOMPONENATA MIKROBIOTE I GLJIVICE MALASSEZIA RESTRICTA S PTERIGIJEM

DOKTORSKA DISERTACIJA

SPLIT, 2026.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

Martina Paradžik Šimunović, dr. med.

POVEZANOST SPECIFIČNIH KOMPONENATA MIKROBIOTE I GLJIVICE MALASSEZIA RESTRICTA S PTERIGIJEM

DOKTORSKA DISERTACIJA

SPLIT, 2026.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za istraživanje raka, Zavoda za imunologiju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu te na Klinici za oftalmologiju, Klinički bolnički centar Split.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Janoš Terzić, dr. med.

Zahvala

Objavljeni članci iz disertacije:

1. Paradzik Simunovic M, Degoricija M, Korac-Prlic J, Lesin M, Stanic R, Puljak L, Olujic I, Marin Lovric J, Vucinovic A, Ljubic Z, Thissen J, Reen Kok C, Jaing C, Bucan K, Terzic J. Potential Role of *Malassezia restricta* in Pterygium Development. Int J Mol Sci. 2025 Mar 25;26(7):2976. doi: 10.3390/ijms26072976. PMID: 40243577; PMCID: PMC11989039.

2. Paradzik Simunovic M, Degoricija M, Korac-Prlic J, Simunovic M, Lesin M, Stanic R, Puljak L, Olujic I, Marin Lovric J, Vucinovic A, Ljubic Z, Bucan K, Terzić J. Gene Expression Signatures Associated with Pterygium Recurrence. J Clin Med. 2026 15, 7257. https://doi.org/10.3390/jcm15187257. PMID: 42796028. PMCID: PMC13607067.

SADRŽAJ

1. UVOD 10
1.1. Očna površina 11
1.2. Pterigij 14
1.2.1. Patofiziološki mehanizam nastanka pterigija 14
1.2.2. Klinička slika pterigija 15
1.2.3. Liječenje pterigija 17
1.3. Očna mikrobiota 21
1.3.1. Perspektiva istraživanja mikrobioma oka 26
1.4. Malassezia restricta 27
2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA 29
3. ISPITANICI I POSTUPCI 31
3.1. Kirurški zahvat i uzorkovanje tkiva 32
3.2. Histološka analiza 33
3.3. Imunohistokemija 33
3.4. FISH 33
3.5. Ekstrakcija DNA i RNA 33
3.6. Sekvenciranje RNA, RNA-Seq analiza 34
3.7. Metagenomska analiza 36
4. REZULTATI 38
4.1. Istraživanje: Uloga Malassezia restricta u razvoju pterigija 40
4.1.1. Metagoneskom analiza 42
4.1.2. Analiza transkriptoma 48
4.1.3. Fibroza u tkivima pterigija 56
4.2. Istraživanje: Genske ekspresije povezani s recidivom pterigija 61
4.2.1. Transkriptomska analiza 65
4.2.2. Down regulation 77
5. RASPRAVA 80
5.1. Uloga Malassezia restricta u razvoju pterigija 81
5.2. Genske ekspresije povezani s recidivom pterigija 83
5.3. Ograničenja i nedostaci studije 84
6. ZAKLJUČCI 86
7. SAŽETAK 88
8. LAIČKI SAŽETAK 91

9. LAY SUMMARY 93
10. SUMMARY 95
11. POPIS LITERATURE 98
12. ŽIVOTOPIS 110

POPIS OZNAKA I KRATICA

AS-OCT – optička koherentna tomografija prednjeg segmenta (eng. Anterior Segment Optical Cocherent Tomography)

CHIT1- eng. chitotriosidase-1

CF – cističnom fibrozom

COL10A1 - gen koji kodira alfa-1 lanac kolagena tipa X (eng. Collagen Type X Alpha 1 Chain)

DED – bolest suhoga oka (eng dry eye disease)

DEWS – radionica za suho oko (eng. Dry Eye Workshop)

DNA – deoksiribonukleinske kiseline (engl. deoxyribonucleic acid)

ECM – izvanstanični matriks

ECM1 – protein izvanstaničnog matriksa 1 (engl. extracellular matrix protein 1)

EMT – epititelno-mezenhimalna tranzicija (eng. Epithelial-Mesenchymal Transition)

HMP – Projekt ljudskog mirkobioma (engl. Human microbiome project)

HPV – humanim papiloma virusom

HSP – proteini toplinskog stresa (engl. heat shock protein)

IL-4 – inteleukin

IL-10 – interleukin 10

IL-13 – interleukin 13

IL-33 – interleukin 33

ILC2 – limfoidnih stanica 2 ILC2

MMC – mitomicin C (eng. mitomycin C)

MMP – enzim matričnih metaloproteinaza (eng. Matrix Metallopeptidase)

NIH – Nacionalni institut za zdravlje

OSD – bolesti ocne površine (eng. ocular surface disease)

OSSN – okularna skvamozna neoplazija površine oka (engl. ocular surface squamos neoplasia)

PDAC – duktalni adenokarcinom gušterače (engl. *pancreatic ductal adenocarcinoma*)

RNA – ribonukleinske kiseline (engl. ribonucleic acid)

TBUT – vrijeme pucanja suznog filma (eng Tear break up time test)

TGF-β1 – transformirajući faktor rasta beta 1 (engl. *transforming growth factor beta*)

TIMP1 - Tkivni inhibitor metaloproteinaza 1 (eng. Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1)

TFOS – međunarodno društvo za suzni film i očnu površinu (eng. Tear Film and Ocular Surface Society)

TH2 stanice – pomoćničke T stanice tipa 2

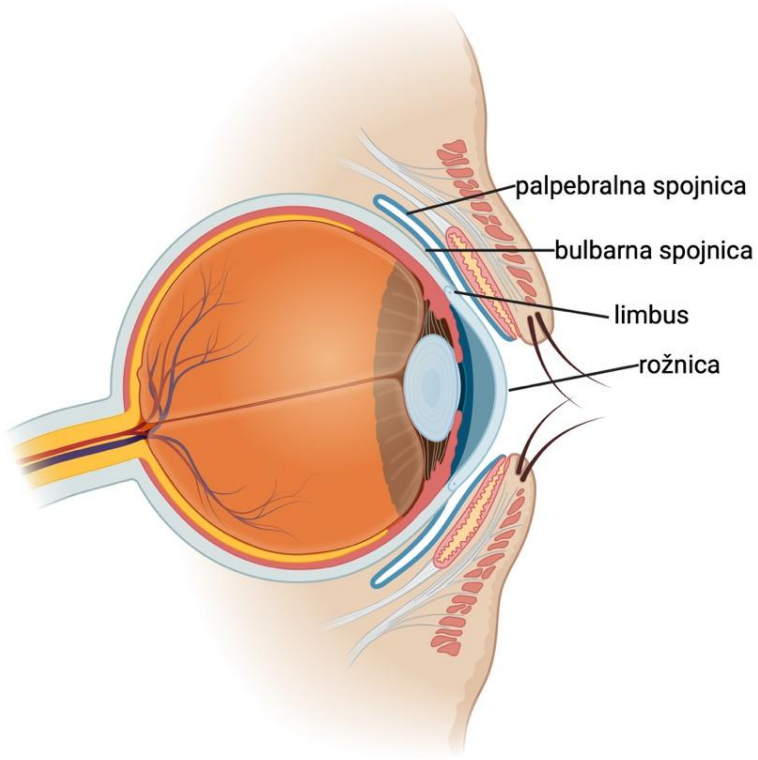
UV – ultraljubičasto zračenje (eng. ultra violet)

5FU – pet floro-uracil (eng 5 flourouracyl)

1. UVOD

1.1. Očna površina

Površina oka predstavlja granicu između vanjskog svijeta i unutrašnjeg sadržaja oka (1). Sastoji se od spojnice ili konjunktive, rožnice te prijelaza između spojnice i rožnice kojeg nazivamo limbus. Kod spojnice razlikujemo bulbarni i palpebrarni dio. U očnu površinu ubrajamo i suzni film, često zapostavljeni dio, koji svojim podmazivanjem čini očnu površinu glatkom i sjajnom (2). Suzni film također ima ulogu i u optičkoj prozirnosti oka, naime održavanjem vlažnosti epitela rožnice omogućava prvi kontakt i osigurava daljnji prolazak svjetlosne zrake kroz optički prozirne dijelove oka (3). Očna površina pruža ključnu anatomsku, fiziološku i imunološku zaštitu oka (4).



Slika 1. Očna površina. Kreirano koristeći *BioRender*. Paradzik Simunovic, M. (2026) https://BioRender.com/zw3rhtv

Kako bi se održala homeostaza, odnosno pravilna funkcija i zaštita očne površine potrebna je i uloga adneksalnih dijelova oka poput trepavica, Meibomovih žlijezda, suzne žlijezde, već spomenutog suznog filma ali i ekskretornog suznog sustava (5). Očna površina je prvi dodir oka s vanjskim svijetom, te ga štiti i od mehaničkih ozljeda, iritacijskih i toksičnih utjecaja te prodora mikroorganizama (6).

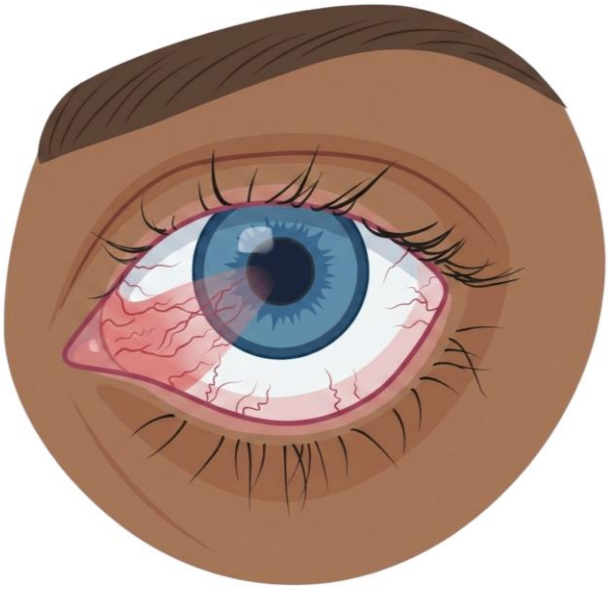
Svaki poremećaj homeostaze očne površine, bilo uslijed ozljeda ili očnih bolesti, ugrožava njezinu zaštitnu i funkcionalnu ulogu te dovodi do razvoja bolesti spojnice i rožnice (7). Poremećaji očne funkcije dolaze u širokom spektru, od blagih reverzibilnih stanja poput površinskih oštećenja rožnice – tzv. erozija, do teških ireverzibilnih stanja poput malacija rožnice koje nastaju uslijed oštećenja matičnih stanica koje se nalaze u važnom sloju očne površine – limbusu (8). Oštećenja očne površine mogu u uznapredovalim slučajevima dovesti do smanjenja vidne oštrine i sljepoće. Istraživanja koja se provode posljednjih tridesetak godina idu u prilog značajnom napretku proučavanju oporavka matičnih stanica epitela rožnice, a i u prilog razvoju medikamentozne terapije usmjerene na očuvanje i obnovu očne površine, kao i razvoju kirurških tehnika rekonstrukcije očne površine (9,10).

Bolesti očne površine, čak i blagog tipa, imaju snažan utjecaj na svakodnevno funkcioniranje oboljelih (11,12). U bolesti očne površine (engl. *ocular surface diseases*, OSD), kao zajednički pojam, ubrajamo više entiteta: bolest suhoga oka (engl. *dry eye disease,* DED), blefaritis, konjunktivitis, keratitits, ulceracije rožnice te razvoj pinguekule i pterigija (13,14). Temeljni mehanizam kojim nastaju bolesti očne površine uključuju nedovoljnu proizvodnju suza i/ili pojačano isparavanje suza koje dovodi do oštećenja očne površine i javljanja simptoma poput nelagode, suhoće, iritacije, suzenja ali i do smanjenja vidne oštrine i oštećenja kvalitete vidne oštrine (15).

Kako bi se bolje istražila uloga očne površine, međunarodno društvo za suzni film i očnu površinu (engl. *Tear Film and Ocular Surface Society*, TFOS) osnovalo je radnu grupu za suho oko prema čijem je radu objavljena smjernica za postupanje kod bolesti očne površine (16–18). Prije dijagnoze suhe bolesti oka potrebno je isključiti stanja kod kojih se javlja bolest suhog oka kao komorbiditet (1,19). Sama dijagnoza bolesti očne površine uključuje mjerenje ukupnog lučenja suza Schirmerovim testom, skraćeno vrijeme pucanja suznog filma (engl. *tear break up time test*, TBUT), pojačano bojanje defekata u epitelu rožnice i spojnice detektirano floresceinskom bojom (20–22). Ukupno, simptomi bolesti očne površine mogu nepovoljno utjecati na fizičko i psihičko stanje pacijenta te znatno narušiti kvalitetu života (23).

1.2. Pterigij

Pterigij je bolest koja zahvaća površinu oka, a karakterizirana je simptomima suhoće očiju, iritacije, estetskim problemima te, u uznapredovanoj fazi, oštećenjem vida (24). Naziv mu potječe od grčke riječi *pterygos*, što znači krilo, zbog tkiva koje se u obliku krila proteže od medijalne spojnice oka prema središtu rožnice (25).



Slika 2. Shematski prikaz ptergija. Kreirano koristeći *BioRender*.

1.2.1. Patofiziološki mehanizam nastanka pterigija

Točan patofiziološki mehanizam kojim nastaje pterigij još nije razjašnjen (26). Smatra se da važnu ulogu u nastanku pterigija ima kronična izloženost ultraljubičastom (UV) zračenju koje primarno narušava barijeru između avaskularne rožnice i vaskularizirane spojnice oka, nakon čega dolazi do sekundarnoga događaja poput infekcije ili dodatnog izlaganja UV zrakama (27). Taj sekundarni događaj pokreće molekularne mehanizme poput proliferacije, angiogeneze i upale koji zajedno dovode do stvaranja pterigija (26). Iako točan uzrok rasta

fibrovaskularnog pterigija ostaje nejasan, definirani su čimbenici koji doprinose njegovom razvoju poput izlaganja česticama prašine, kronične iritacije i upale (28,29).

1.2.1. Prevalencija pterigija

Prema rezultatima meta analize provedene u 2018. godine ukupna prevalencija pterigija iznosi 12% (30). Ukoliko uspoređujemo nalaze istraživanja populacijskih studija čini se da su stope prevalencija pojavnosti pterigija u europskim i azijskom populacijama niže nego kod afričke populacije (30). S obzirom da je poznato da je kronična izloženost izravnim sunčevim zrakama jedan od najvažnijih čimbenika za razvoj pterigija ne čudi da se rizik nastanka pterigija povećava u zemljama koje se nalaze bliže ekvatoru, gdje prevalencija doseže i do 22%, odnosno pterigij se javlja u svake pete osobe koja se nalazi u područjima više izloženima suncu (30,31).

Iako se povećava broj studija koje istražuju prevalenciju, čimbenike rizika za nastanka i recidiv pterigija, nedostaju studije koje bi bile od važnosti za utvrđivanje uzročnih čimbenika u razvoju pterigija.

1.2.2. Klinička slika pterigija

Kod pacijenata sa sumnjom na dijagnozu pterigija potrebno je izvršiti kompletan oftalmološki pregled. Bitno je utvrditi utječe li rast lezije na vidnu oštrinu, te je potrebno isključiti rjeđe diferencijalne dijagnoze (32). Puni pregled uključuje određivanje vidne oštrine uključujući postojeću korekciju te manifestnu refrakciju, ispitivanje pokretljivosti očnih jabučica, vanjski pregled vjeđa i suznog aparata u fokalnoj rasvjeti, pregled bulbarne i tarzalne spojnice na biomikroskopu s everzijom vjeđe, pregled prednjeg segmenta oka na biomikrskopu te eventualno određivanje topografije rožnice i keratometrije (33,34).

Dijagnozu pterigija postavlja se kliničkim pregledom na biomikroskopu s procjepnom svjetiljkom (tzv. *Špalt lampa*) kojim možemo utvrditi karakterističnu izraslinu medijalno u intrapalpebrarnoj fisuri koja se proteže od medijalne spojnice prema centru rožnice. Najčešće je za dijagnozu pterigija dovoljan klinički pregled, no kompletnim oftalmološkim pregledom možemo utvrditi postojanje dodatnih simptoma uzrokovanih pterigijom. Svaki očni pregled započinjemo uzimanjem vidne oštrine, koja kod pterigija može biti smanjena zbog astigmatizma (35). Novonastali astigmatizam uzrokovan je zatezanjem očne površine rastom fibrovasularne lezije. Kao jedan od uzroka smanjenja vidne oštrine može biti i rast lezije preko centra rožnice i zjeničnog otvora blokirajući centar vidne osovine. Pregled na biomikroskopu upotpunjujemo bojanjem floresceinskom bojom kako bi se utvrdilo oštećenje i prekid kontinuiteta epitela spojnice i rožnice odnosno postojanje tzv. *dellen* područja koje prilikom treptaja, a zbog tektonske neravnine očne površine, ostaje izloženo i nepokriveno suznim filmom (36). Ukoliko postoje takva područja, bojanje floresceinskom bojom, pod kobaltnim svjetlom na biomikroskopu s procjepnom svjetiljkom, je pozitivno. U klasični, klinički vidljiv, znak pterigija ubrajamo trokutasti izgled pri čemu je vrh trokuta usmjeren prema središtu rožnice. U ovisnosti o stupnju vaskularizacije, boja lezije varira od bjelkaste do ružičaste, a rast krvnih žila također je usmjeren prema vrhu pterigija (37) . Gradus pretigija možemo utvrditi stupnjevanjem prema sustavu koji su opisali Donald Tan i sur. (T1–T3), a koji se temelji na vidljivosti temeljnih episkleralnih krvnih žila. T1 (atrofični pterigij) definiran je kao tanak, proziran pterigij s jasno vidljivim episkleralnim krvnim žilama; T2 (intermedijarni pterigij) kao umjereno zadebljan pterigij s djelomično zaklonjenim episkleralnim krvnim žilama; te T3 (mesnati pterigij) kao debeo, neproziran pterigij koji u potpunosti zaklanja temeljne episkleralne krvne žile (38). Na kroničnu prirodu lezije ukazuje pigmentirana linija depozita željeza, tzv. *Stoker-ova linija*, uz vrh pterigija (39). Ako je prisutna linija depozita

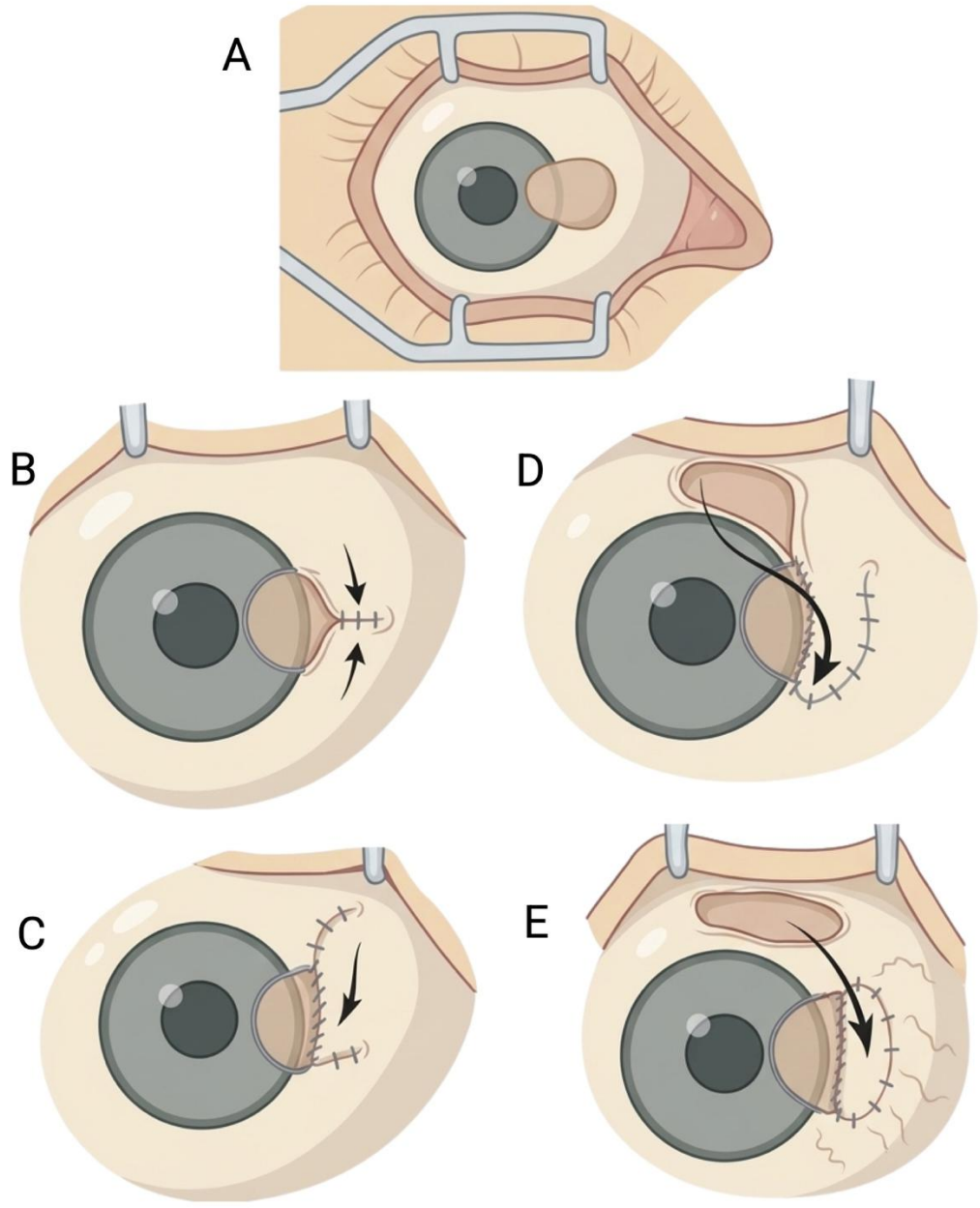
željeza radi se o dugotrajnoj leziji, koja je prisutna više godina. Također moguća je i prisutnost manje lezije spojnice na istom ili drugom oku u obliku pinguekule (40).

Najčešća pozicija rasta pterigija je nazalno odnosno medijalno, no može se pojavljivati i na vanjskoj odnosno temporalnom dijelu spojnice (41). Kod slučajeva kada klinička prezentacija ne ukazuje na tipičnu lokaciju ili ekstenziju lezije, i kako bi se isključilo postojanje pridružene epitelne displazije, uzorak ekscidiranog tkiva može se uputiti na histopatološku analizu (42). Kao diferencijalna dijagnoza u obzir dolazi okularna skvamozna neoplazija površine oka (engl. OSSN) (43). U takvim slučajevima od pomoći je optička koherentna tomografija prednjeg segmenta (AS-OCT) visoke rezolucije. AS-OCTA kod pacijenata s OSSN-om pokazuje vijugave krvne žila u obliku „cik-cak linija" i u površinskim i u dubokim slojevima. Nasuprot tome, pterigij u površinskom sloju pokazuje uzorke „ravnih krvnih žila", te avaskularnu zonu u dubokom sloju pterigija, što dodatno pomaže u postavljanju točne dijagnoze (44).

1.2.3. Liječenje pterigija

Kirurški pristup je jedina metoda liječenja pterigija. Primjenjuju se različite tehnike, a ono što je kod svih tehnika prisutno, iako u različitom udjelu, su recidivi. Kumulativna stopa recidiva iznosi 10,2%, dok se ista povećava u ovisnosti o geografskoj lokaciji i načinju liječenja (31). Najveća stopa recidiva javlja se kod najjednostavnije operacijske tehnike kod koje se tkivo izraslo preko rožnice i okolne spojnice ekscidira te se rana ostavlja bez šivanja. Ta tehnika, tzv. *bare sclera* ima neprihvatljivo visoke stope recidiva, za koje je zabilježeno da dosežu i 89 % (45,46). Slijedeća široko upotrebljavana operativna tehnika je tehnika režnja spojnice, bilo klizajućeg ili rotirajućeg režnja kod kojih dolazi do smanjivanja stope recidiva (47). Daljnjim unapređivanjem operacijske metodologije došlo se je do tehnike u kojoj je rotirajući režanj pretvoren u slobodni transplantat (48). Kod tehnika slobodnog transplantata,

stope recidiva svedene su na niže stope, te u ovisnosti o studiji kreću se od 6.8% pa čak do 69.2% (49). Ukoliko se koristi i limbalni dio, stope recidiva se smanjuju do 5,50% (50).



Slika 3. Kiruške tehnike u liječenju pterigija. A. Tzv. *bare sclere*-a. B. Jednostavno zatvaranje. C. Klizajući režanj. D. Rotiajući režanj. E. Tehnika slobodnog transplantata, može uključivati

i limbalni dio. Kreirano koristeći *BioRender*. Paradzik Simunovic, M. (2026) https://BioRender.com/a1pkwak

Kako bi se smanjila učestalost recidiva, razvijene su dvije glavne kirurške strategije: destruktivni i rekonstruktivni pristup, te se one danas najčešće kombiniraju. Destruktivni pristup kombinira eksciziju s adjuvantnim terapijama kako bi se inhibirala fibrovaskularna proliferacija (51). Te terapije uključuju primjenu antimetabolita poput mitomicina C (MMC) i 5-fluorouracila (5FU) (52). U literaturi pronalazimo i radove koji ispituju primjenu beta zračenja, ali taj pristup nije često korišten (53). Rekonstruktivni pristup uključuje nadomještanje spojnice i prekrivanje ogoljene bjeloočnice tkivnim transplantatima, tzv. autolognim transplantatima spojnice, bilo s istog ili drugog (zdravog) oka. U upotrebi su i transplantacija amnijske membrane, transplantati sluznice te transplantacija limbalnih stanica (54). Amnijska membrana, dobivena iz unutarnjeg sloja posteljice, se koristi u očnoj kirurgiji još od 40-tih godina prošlog stoljeća, dok je njena šira primjena zahvaljujući poboljšanoj pripremi te pohrani počela tek početkom ovog stoljeća (55). Brojne su prednosti primjene amnijske membrane. Elastična je, omogućava prekrivanje većih površinskih defekata, ali i sadrži faktore koji djeluju protuupalno te omogućavaju brže zacjeljivanje rane. Ipak, najčešće upotrebljavani transplantat je autologna, tj. vlastita spojnica. Kada se transplantacija autologonog tkiva kombinira sa antimetabolitom, u ovom slučaju jednokratne intaoperativne aplikacije MMC, stope recidiva se smanjuju za dodatnih 1,4 % bez dodatnih nuspojava (56) Međutim, primjena antimetabolita, posebno MMC, ponekad se povezuje s potencijalno ozbiljnim komplikacijama, poput infekcija, smanjenja tkiva spojnice i bjeloočnice te, u teškim slučajevima, perforacija očne jabučice (57–59).

Kirurška tehnika s najmanjom stopom recidiva je transplantacija autolognog tkiva spojnice (60). Kada govorimo o tehnikama kojima se samo autologno tkivo fiksira za

podležeću bjeloočnicu tu razlikujemo tehnike fiksacije pomoću šavova ili fibrinskog ljepila (61). Obe tehnike imaju različite prednosti, ali i nedostatke. Tehnika fiksacije autolognog tkiva spojnice šivanjem zahtijeva veću kiruršku vještinu, produžuje operativno vrijeme, ali nosi i moguće postoperativne nuspojave poput nelagoda i komplikacije povezane sa šavovima (61). Nasuprot tome, tehnika fiskacije autolognog tkiva spojnice fibrinskim ljepilom može smanjiti operativno vrijeme, smanjiti postoperativne nuspojave poput nelagode te ukloniti komplikacije povezane sa šavovima (61). Također, moguće je fiksirati transplantat na treći način, tada govorimo o metodi fiksacije transplantata spojnice kauterizacijom. Metoda kauterizacije, bez korištenja šavova i fibrinskog ljepila, pokazuje usporedive rezultate s ostalim tehnikama (62). Glavni razlog zbog kojega se izbjegava fibrinsko ljepilo je njegova dostupnost, cijena, ali i teorijski rizik prijenosa infekcije s obzirom da se radi o humanom preparatu dobivenim iz filtriranih uzoraka krvi (63). Međutim, dokazi koji postoje do sada, a uspoređuju učinkovitost različitih tehnika fiksacije transplantata u kirurškoj tehnici operacije pterigija, ostaju nedosljedni, te su potrebna veća istraživanja da bi potvrdila superiornost jedne od tehnika.

Ipak, glavni cilj kirurškog liječenja su potpuna ekscizija pterigija, sprječavanje recidiva te rekonstrukcija cjelovitosti očne površine (64). Operativni zahvat se obično izvodi u topikalnoj i/ili peribulbarnoj anesteziji. Nakon standardne kirurške pripreme oka i postavljanja sterilnih prekrivki, postavlja se očni spekulum. Uklanjanje pterigija započinje pažljivom disekcijom glave pterigija s površine centralne rožnice, čime se omogućuje pristup ostalom,fibrovaskularnom tkivu. U slučaju tipičnog pterigija čija je pozicija u medijalnom interpalpebrarnom području, tkivo se odvaja i ekscidira u najvećoj mogućoj mjeri u posterioronom smjeru prema hvatištu medijalnog ravnog mišića. Kod ovog koraka bitno je sačuvati što više zdravog okolnog tkiva spojnice kako bismo spriječili stvaranje ožiljka, simblefaron ili restrikciju bulbomotorike (65). Svo preostalo ožiljno tkivo s površine rožnice i bjeloočnice uklanja se, te se ostavlja cjelovita, zaglađena očna površina.

Potom se pristupa rekonstrukciji nastalog defekta na bjeloočnici. Prvo se uzimaju mjere nastalog defekta te se veličina izmjerenog defekta, u slučaju autolognog transplantata, prenosi na gornji i temporalni dio spojnice (63). Nastoji se sačuvati gornji dio spojnice kako bi se, u slučaju buduće operacije glaukoma, omogućila nesmetana filtracija očne vodice kroz filtracijski jastučić spojnice (66). Kada se uzima transplantat, nastoji se da bude što tanji, odnosno da se peribulbarnom injekcijom anestetika napravi lagana hidrodisekcija i pažljiva kirurška disekcija od podležeće Tenonove kapsule, što može smanjiti postoperativni edem i kontrakciju transplantata. Prilikom prijenosa transplantata pazi se na njegovu pravilnu epitelnu i limbalnu orijentaciju (63). Ukoliko se radi o fiksaciji za bjeloočnicu pojedinačnim šavovima najčešće se upotrebljava resorptivni materijal *Vicryl* (debljine 7-0 ili 8-0) ilineresorptivni najlon (debljine 10-0) (67). Alternativno, transplantat se može pričvrstiti na episkleru pomoću dvokomponentnog fibrinskog ljepila, koja se kod očne kirurgije primjenjuje susljedno, komponentu po komponentu; za razliku od primjene u abdominalnim i drugim kirurgijama gdje se fibrinsko ljepilo nanosi istovremeno pomoću dvokomorne štrcaljke (67). Transplantat se može fiksirati i kauterizacijom, tehnikom koja izbjegava i šavove i fibrinsko ljepilo (63). Kod te tehnike, uz pomoć pincete, tkivo doniranog transplantata i primateljeve spojnice se približi te uz pomoć katuera združi. U odnosu na fiksaciju fibrinskim ljepilom, tu nedostaje prilijeganje za samu bjeloočnicu, no smatra se da faktori prilikom prirodne koagulacije pomažu u djelomičnoj fiksaciji za podležeću bjeloočnicu. Trenutno su u upotrebi različite tehnike za fiksaciju autolognog transplantata te je potrebno te rezultate objediniti i postaviti smjernice kod operacije pterigija.

1.3. Očna mikrobiota

Površina oka kontinuirano je izložena vanjskom okolišu, a time i širokom spektru mikroorganizama. Ta izloženost započinje prilikom rođenja i traje tijekom cijelog života. Kada

govorimo o mikrobioti, važno je jasno razlikovati pojam mikrobiote od pojma mikrobioma. Naime, mikrobiota označava populaciju mikroorganizama koji koloniziraju različita anatomska mjesta na ljudskom tijelu, dok mikrobiom je širi pojam, obuhvaća i sav genetski materijal te ekosustav mikrobiote. Brojna su istraživanja proučavala mikroorganizme koji se rutinski mogu izolirati s različitih dijelova površine oka.

Istraživanja mikrobioma su privlačna znanstvenicima zbog moguće povezanosti s raznim bolestima (68). Zainteresiranost za istraživanje mikrobioma započelo je 2008. godine kada je američki Nacionalni institut za zdravlje (NIH), pokrenuo Projekt ljudskog mirkobioma (*engl. Human Microbiome Project,* HMP) u želji da se bolje istraže mikroorganizmi koje naseljavaju pet glavnih ljudskih anatomskih područja (69). Opsežnost mikrobioma usne šupljine, dišnog sustava, kože, gastrointestinalnog trakta te rodnice je pokazana kada je utvrđeno da ukupni ljudski mikrobiom sadrži približno 8 milijuna gena bakterija, virusa i eukariotskih mikroorganizama. Svako od tih pet područja je pokazalo značajnu razliku prisutnih mikroorganizama. Pokazalo se da je bitna rezidencijalna uloga tih mikrobiomskih zajednica, a ukoliko je njihova homestaza narušena, dolazi do pojave i razvoja bolesti. Taj poremećaj homeostaze nazivamo disbiozom (70).

Iako su mikrobiota kože i crijeva dobro okarakterizirani, studije o mikrobioti očne površine su rijetke , iako je epitel oka izravno izložen okolišu i posljedično sklon mikrobnoj kolonizaciji i infekcijama, posebno kada je imunološka barijera narušena (68,71). U primarnim istraživanjima Projekta ljudskog mirkobioma očna površina nije bila uključena. No u 2023. godini je pokrenuta inicijativa iz NIH za osnivanjem Projekta očnog mikrobioma *(engl. Ocular Microbiome Project)* koji je okupio konzorcij pet laboratorija kako bi istražili i definirali ključne mikrobne sastojke očne mikrobiote (72). Radi se o multicentričnom istraživanju koje uključuje rad više laboratorija kako bi razjasnili odgovore na pitanja da li na očnoj površini postoje stalne, rezidentne zajednice mikroorganizama. Sami projekt je podijeljen u pet

različitih manjih projekata, pa tako različiti laboratoriji istražuju karakterizaciju očnog mikrobioma, determinante periokularnog mikrobioma, molekularnu karakterizaciju okularnog mikrobioma u odraslih, standardizirane resurse kojima je moguće karakterizirati rezidentnu očnu površinu te definiranje članova porodice bakterija očne površine i procjenu stabilnosti te mikrobiote tijekom vremena. Posebno se zahtjevno pokazala sama karakterizacija mikrobioma s obzirom da se radi o mirkobno siromašnom okruženju, te postoje tehničke poteškoće u analizi detektiranih mikroba radi razlikovanja stalnih mikroba očne površine od prolaznihkontaminacija iz okolnih struktura poput površine kože (73–75).

Tradicionalno se je očna površina smatrala sterilnom. Razlozi za takve zaključke su zapravo bili tehničke prirode. S obzirom da su mikrobiološka istraživanja, provedena prije više desetaka godina, bila utemeljena na tradicionalnim tehnikama uzimanja mikrobioloških uzoraka sterilnim štapićem i prijenosom tih mikroba sa sterilnih štapića na podloge, nije bilo moguće utvrditi postojanje mikroba pa se je površina oka proglašavala sterilnom, odnosno bez kolonizacije mikrobima (76). Međutim, osjetljivije tehnike temeljene na sekvenciranju mikrobne deoksiribonukleinske kiseline (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA) identificirale su prisutnost mikroorganizama na površini oka (77). Sam postupak uzimanja mikrobiološkog preparata tradicionalnim načinom započinje vlaženjem sterilnog pamučnog štapića s fiziološkom otopinom. Zatim, nakon povlačenja donje vjeđe prikazuje se donji dio konjunktivalne vrećice (franc. *cul-de-sac*) i forniksa, s čije se površine nježno uzme bris. Potom se uzorci inokuliraju na različite hranjive podloge u ovisnosti o mikroorganizama čiji porast očekujemo. Najčešće korištene podloge su krvni agar s 5 % konjske ili ovčje krvi za detekciju Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija, zatim, čokoladni agar za detekciju *Haemophilus influenzae* i *Neisseirie Gonorrhoeae* te *Sabouraudov* agar za izolaciju gljiva. Za rutinsku procjenu prisutnosti mikroorganizama na očnoj površini koriste se krvni i čokoladni agar. Nakon inokulacije, slijedi inkubacija kultura pri posebnim atmosferskim uvjetima, uključujući

aerobne, anaerobne uvjete te atmosferu s 5 % ugljikova dioksida (CO_2). Inkubacija traje oko 24 sata ali može potrajati i do 14 dana. Produljena inkubacija je izrazito bitna za detekciju anaerobnih bakterija i gljivica. Različita istraživanja bilježe znatne razlike u izolacijama mikrobiote čemu pridonose razlike kod tehnika uzorkovanja, zatim razlike u podlogama za kultivaciju kao i u atmosferskim uvjetima, a i urazličitom trajanju inkubacije. Sve je to doprinijelo tradicionalnom stavu da je zdrava očna površina sterilna.

Razvoj novih metoda koje se temelje na molekularnim detekcijama, neovisno o uzgojima kultura postali su zlatni standard i omogućili su daljnja istraživanja očnog mikrobioma. Primjenom tih metoda moguće je detektiranje bakterija, virusa ili gljivica,odnosno analiza metagenoma, tj. cijelokupnog genetskog materijala u određenom okolišu. Analiza temeljena na razlikama u slijedu gena za 16S ribonukleinske kiseline (engl. *ribonucleic acid*, RNA) omogućila je prepoznavanje bakterijskih mikrobiomskih zajednica te njihovu klasifikaciju. Nadalje, metodom sekvenciranja cijelog metagenoma, tzv. „*shotgun" sequencing* metodom omogućena je detekcija svih mikroba uključujući viruse, gljivice i arheje s visokom osjetljivošću. Ta visoka osjetljivost metoda djelomično je ograničavajuća, jer omogućava detekciju kontaminata, tj. mikkroba koji prethodnim metodama ne bi bili detektirani (74,78).

Analizom metagenoma dobivamo punu sliku mikrobiote, njene zastupljenosti i raznolikosti u određenoj zajednici ili okolišu.

Među prvim studijama koje su se bavile istraživanjima mikrobioma očne površine, Ozkan i suradnici su identificirali Pseudomonas kao predominantni bakterijski rod na zdravoj konjunktivi, bez razlike između limbalne i forniksne regije (79). U daljim istraživanjima, Dong i suradnici otkrili su više od tri puta veću raznolikost u odnosu na dotadašnje studije utemeljene na kulturama mikroorganizama. Identificirali su 12 glavnih bakterijskih rodova na zdravoj površini oka koje su predstavili u sklopu koncepta osnovnog mikrobioma, i to: *Pseudomonas,*

Propionibacterium, Bradyrhizobium, Corynebacterium, Acinetobacter, Brevundimonas, Staphylo- cocci, Aquabacterium, Sphingomonas, Streptococcus, Streptophyta i Methylobacterium. Također su istaknuli važnost dodatnog proučavanja mikrobiote. Slijedeći tu strategiju uzorci su uzeti "nježnim obriskom očne površine" te su pronašli prolazne, potencijalno oportunističke patogene poput roda *Rothia* i *Herbaspirillum*, kao i okolišni mikroorganizmi *Leptothrichia* and *Rhizobium.* Naprotiv, druge varijacije vrsta su identificirane u nalazima uzetim čvrstim obriskom očne površine poput *Staphylococci* i *Corynebacteriae* (77).

Korištenjem molekularnih tehnologija, utvrđeno je da je mikrobiom konjunktive sastavljen od bakterija, virusa i eukariota. Dok su bakterije otkrivene u većini analiziranih uzoraka (77,5%), i druge sastavnice mirkobiote su bile prisutne i to virusi u 3% uzoraka te gljive u 19.5% uzoraka (80).

Lee i suradnici su 2012 opisali promjene kod pacijenata s blefaritisom u vidu veće bakterijske raznolikosti u usporedbi s ispitanicima bez blefaritisa. Također su identificirane rijetke bakterijske vrste poput *Streptophyta*, *Corynebacterium,* and *Enhydrobacter* i to na rubovima vjeđa i uz rub trepavica(81).

Više studija pokušava utvrditi postojanje tzv. osovine koje povezuje crijeva i oči (engl. *gut-eye axix*) (82). Za sada su utvrđene povezanosti poremećaja crijevne mirkobiote s nekoliko očnih stanja kao što su uveitis, suhoća oka, makularni edem povezan sa starenjem i glaukom (83–86). Skrzypecki i suradnici su predstavili dokaze i moguću povezanost metabolita crijevnog mikrobioma, butirata i trimetilamina, koji uzrokuju oštećenja u pacijenata s glaukomom (87,88). Točan način na koji mikrobiom crijeva djeluje na oko još nije razjašnjen, ali se pretpostavlja da crijevni mikrobi potiču aktivaciju CD4+ limfocita. Oni potom napuštaju crijevo i kroz oštećenu krvno-retinalnu barijeru ulaze u oko te putem križne reakcije s

retinalnim ganglijskim stanicama uzrokuju neurodegeneraciju tih stanica (89). Ipak, kako bi se utvrdila točna patogeneza glaukom potrebna su daljnja istraživanja.

Studije su također istražile potencijalnu vezu pterigija s humanim papiloma virusom (HPV), ali nalazi iz različitih studija variraju (90). Unatoč bogatom sastavu mikrobiote, koji obuhvaća vrste u različitim carstvima, većina istraživanja očne površine usredotočila se na bakterijske vrste, s ograničenim istraživanjem virusa i minimalnim izvještajima o drugim komponentama mikrobiote, poput gljivica (91)..Problemi koji se javljaju kod definiranja mikrobiote su razlikovanje stalno naseljenih od prolzano prisutnih mikroba na određenoj anatomskoj lokaciji. Naime, kako bi se utvrdila mikrobiota određenog područja, potrebno je u više navrata detektirati iste ili vrlo slične mikroorganizme. Kod detekcije mikroba na očnoj površini utvrđen je puno manji broj detektiranih mikroorganizama, a što oko čini posebnim mikrobnim staništem. Iako istraživanja okularanog mikrobioma zaostaju za istraživanjima mirkobioma drugih dijelova tijela, sve je više dokaza da očna površina ima bogatu i raznoliku zajednicu mikrobiote.

1.3.1. Perspektiva istraživanja mikrobioma oka

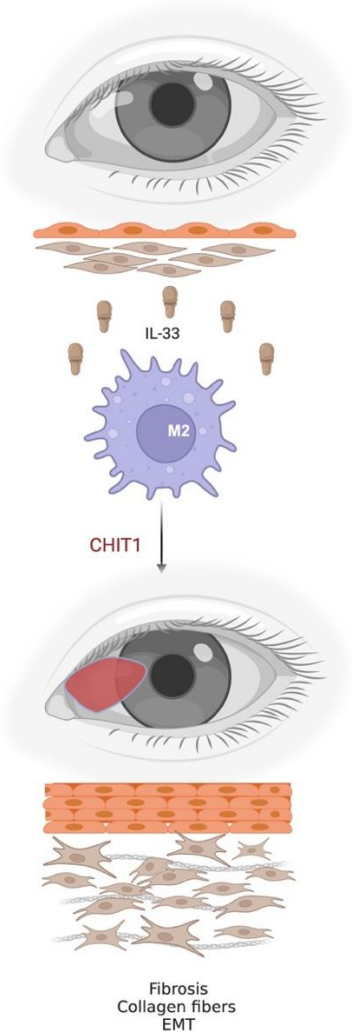
Istraživanjima se nastoji utvrditi jesu li očne bolesti izravna posljedica infekcija ili su povezane s upalom izazvanom mikrobima te koji su molekularni signali koji povezuju mikroorganizme oka s bolestima koje utječu na vid. Istraživanja mikrobioma mogu biti korisna za dijagnosticiranje, liječenje i sprječavanje očnih bolesti. Jedna od ideja je, primjena probiotika u svrhu liječenja očnih bolesti. Jedna je studija pokazala da primjena oralnih probiotika uz standardni tretman ječmenca u djece dovodi do bržeg oporavka u usporedbi s grupom bez dodatne terapije pobioticima (92). Nadalje, istraživače je zanimalo hoće li lokalna primjena probitika imati povoljan učinak na zdravlje. Tako je studija na pacijentima s vernalnim keratokonjunktivitisom pokazala korist od dodatne primjene probiotika s

Lactbacillus acidophilus u kapima za oči, a što je dovelo dosmanjenja suzenja, crvenila spojnice (93). Također, upotreba kontaktnih leća obloženih prebiotikom imala je povoljniji učinak na pojavu bakterijskih keratitisa kod pacijenata koji su nosioci kontaktnih leća (94). Ostaje ispitati pravo značenje okularnog mikrobioma u bolestima oka ali i punog potencijala primjene tih znanja u preventivne i terapijske svrhe .

1.4. Malassezia restricta

Gljivice vrste *Malassezia spp.* fiziološki su ovisne o lipidima te su sastavni dio flore ljudske kože. U posljednje vrijeme, *Malasezzia spp.* su okarakterizirane kao uzročnik određenih kožnih bolesti, što ih čini potencijalnim kandidatima za sudjelovanje u patofiziološkom razvoju pterigija (95). Također, nedavne studije povezale su *Malasseziu* s drugim patologijama poput adenocarcinoma duktalnog kanala gušterače, Crohnove bolesti i pogoršanja plućnih stanja kod pacijenata s cističnom fibrozom (96,97). Navedena istraživanja sugeriraju da *Malassezia* može djelovati kao patogen u različitim tkivima u povoljnim lokalnim uvjetima (97). S druge strane, enzim chitotriozidaza 1, CHIT1, razgrađuje hitin gljivica te je dio prirođene imunološke obrane od *Malassezije*. Detaljan mehanizam kojim *Malassezia* uzrokuje poremećaje, opisan je kod adenokarcinoma duktalnog kanala gušterače, gdje je pokazano da tumorske stanice oslobađaju interleukin 33 (IL-33) nakon stimulacije *Malasseziom*. IL-33 zatim potiče lokalni imunološki odgovor tipa 2 karakteriziran prisutnošću pomogačkih T-stanic tip 2 (Th2 stanice) i urođenih limfoidnih stanica 2 (ILC2). Opisani imunološki i mikrobni okoliš podržavaju rast stanica adenokarcinoma (98). IL-33 također potiče Th2 i ILC2 na oslobađanje inteleukina 4 (IL-4) i interleukina 13 (IL-13), koji potom potiču diferencijaciju alternativno-aktiviranih makrofaga, koji zaustavljaju upalu, potiču cijeljenje i induciraju fibrozu (99–101). Alternativno aktivirani, M2 makrofagi, koji luče transformirajući faktor rasta beta 1 (engl. *transforming growth factor beta* TGF-β1), smatraju

se glavnim pokretačem fibroze, procesa tipičnog za pterigij (102). Slika 4. prikazujeMogući mehanizam povezanosti kolonizacije spojnica *Malassesia restricta-om* i pterigija.



Slika 4. Moguća povezanost *Malassesie restricte* i pterigija.
Površina spojnice oka bude kolonizirana gljivicom *Malassesia restricta*. koja potiče oslobađanje IL-33 i drugih citokina, koji omogućuju alternativnu aktivaciju makrofaga (M2). Citokini koje stvaraju M2 makrofagi potiču nekontroliranu priliferaciju stanica spojnice te nastanak pterigija. Povećani izražaj enzima CHIT1 dio je prirođenog imunološkog odgovora na prisutnost *Malassesie restricte*. Kreirano koristeći *BioRender*. IL-33, inteleukin 33; EMT- epitelno mezenhimalna tranzicija, CHIT1- chitin 1. Kreirano koristeći *BioRender*. Paradzik Simunovic, M. (2026) https:// BioRender.com/u55h887

2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

U skladu s problematikom istraživanja **glavni ciljevi istraživanja** su:

1. Identificirati i okarakterizirati sastojke mikrobiote potencijalno povezane s razvojem pterigija.
2. Utvrdi postoji li povećana pojavnost *Malassezia restricta* u tkivu pterigija.

tkivom.

3. Utvrditi razinu ekspresije gena *CHIT1* u tkivu pterigija.
4. Ispitati značajnost aktivacije M2 makrofaga u tkivu pterigija.

Sporedni ciljevi istraživanja su:

1. Utvrditi obrazac ekspresije gena u pterigiju koji recidivira.
2. Utvrditi prevalenciju recidiva pterigija nakon kirurškog liječenja.

HIPOTEZE

1. *Malassezia restricta* ima veću pojavnost u tkivu pterigija.
2. Ekspresija gena *CHIT1* biti će povećana u tkivu pterigija.
3. Ekspresije gena karaterističnih za M2 makrofage, poput CD163 i TGF-β1, biti će povećana u tkivu pterigija. Vrijednosti za tkiva pterigija, u točkama 1. do 3., određivati će se usporedbom s kontrolnim tkivom.
4. Obrazac ekspresija gena u tkivu pterigija koji će recidivirti biti će različit od obrazca u pterigiju koji neće recidivirati.
5. Prevalencija recidiva pterigija nakon kirurškog liječenja biti će unutar svjetskih standarda.

3. ISPITANICI I POSTUPCI

U prvom dijelu prospektivnog presječnog istraživanja uključena su 46 pacijenata koji su podvrgnuti primarnoj operaciji pterigija, na Klinici za očne bolesti, Kliničkog Bolničkog Centra Split od rujna 2017. do siječnja 2019. Prema protokolu studije, kriteriji uključivanja bili su postojanje pterigija većeg od 4 mm na rožnici sa simptomima povezanim s poremećajem vida, kroničnom upalom i estetskim razlozima. Kriteriji isključivanja bili su bilo koja druga očna bolest (npr. glaukomom) ili prethodne operacije oka. Kontrolni uzorci (n = 22) uzorkovani su od pacijenata koji su podvrgnuti operaciji katarakte od rujna 2021. do siječnja 2022. Informirani pristanak potpisan je od svih pacijenata i kontrolnih ispitanika, a prije uzimanja uzorka i daljnje analize.

U drugom dijelu istraživanja prospektivno su uključena 85 bolesnika podvrgnuta primarnoj operaciji pterigija na Klinici za očne bolesti Kliničkog bolničkog centra Split u razdoblju od rujna 2017. do siječnja 2019. godine. Kriteriji za uključivanje bili su proširenost pterigija više od 4 mm na rožnicu te prisutnost pridruženih simptoma, uključujući smanjenje vidne oštrine, kroničnu upalu ili estetske razloge (103). Iz istraživanja su isključeni bolesnici s drugim očnim bolestima (npr. glaukomom), neovisno o primjeni lokalnih oftalmoloških lijekova, kao i oni s poviješću prethodnih operacija na oku.

3.1. Kirurški zahvat i uzorkovanje tkiva

Kirurško prekrivanje u oba istraživanja napravljeno je na standardni način. Uzorci izrezanog tkiva pterigija koji prekriva rožnicu i kontrolni uzorci zdravog tkiva konjuktive u blizini spoja rožnice i bjeloočnice uzeti su na samom početku operacije kako bi se izbjegla kontaminacija i prekomjerna manipulacija tkivom (103). Prikupljeni uzorci stavljeni su u sterilne Eppendorf epruvete, brzo zamrznuti u tekućem dušiku i pohranjeni na -80 ˚C do daljnje obrade.

U drugom dijelu istraživanja, kako bi se identificirali pacijenti koji su podvrgnuti primarnom kirurškom zahvatu, a kod kojih je naknadno došlo do recidiva pterigija, retrospektivno su pregledani i analizirani elektronički medicinski zapisi.

U drugom dijelu istraživanja, od pet pacijenata koji su razvili recidiv pterigija, troje je podvrgnuto konjunktivalnom autotransplantatu s fiksacijom grafta kauterizacijom, dok su dva podvrgnuta fiksaciji fibrinskim ljepilom. Isključeni je jedan uzorak iz skupine s kauterizacijom jer nije sadržavao dovljnu količinu biološkog materijala (tj. mRNA) za analizu; pa je konačna analiza aktivnosti gena uključivala četiri recidivna uzorka, po dva iz svake tehnike fiksacije.

Svi uzorci tkiva prikupljeni su na početku operacije, prije uzimanja i fiksacije konjunktivalnog autotransplantata. Stoga tehnika fiksacije grafta nije mogla utjecati na transkriptomske profile analiziranih uzoraka. Ipak, relativno mala veličina uzorka u drugom dijelu istraživanja ograničava statističku snaguanalize.

3.2. Histološka analiza

Uzorci tkiva fiksirani su u 10% puferiranom formalinu i rutinski ugrađeni u parafinske blokove. Rezovi debljine 4 mm izrezani su mikrotomom (RM2125 RTS, Leica, Buffalo Grove, IL, SAD), potom su podvrgnuti bojenju hematoksilinom i eozinom (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka i Merck, Darmstadt, Njemačka) ili Massonovom trikromnom bojenju (BioGnost Ltd., Zagreb, Hrvatska).

3.3. Imunohistokemija

Imunohistokemijska analiza provedena je na uobičajen način. Ukratko, presjeci debljine 4 mm su rehidrirani , potom su kuhani u 1 mM pH 8 EDTA puferu tijekom 30 minuta, da bi se otkrili antigeni u tkivu, a zatim su blokirani u 1% BSA/TBS-T. Za detekciju CD163+ M2 makrofaga korišteno je anti-CD163 antitijelo (Abcam, ab182422, 1:500, Cambridge, UK), a slike su napravljene mikroskopom Olympus BX43 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan)

3.4. FISH

Kako bi se vizualizirala *Malassezia* u prikupljenim uzorcima, provedena je fluorescentna *in situ* hibridizacija korištenjem fluorescentno obilježene specifične oligonukleotidne probe [Cy3] CCG ATA TTT AGC TTT AGA TGG AGT CTA, kako je prethodno opisano (navesti referencu). Mikroskopska analiza uzoraka provedena je korištenjem Olympus BX43 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan).

3.5. Ekstrakcija DNA i RNA

Uzorci tkiva pterigija prikupljeni su tijekom kirurške ekscizije i odmah naglo zamrznuti u tekućem dušiku, u kojem su čuvani do daljnje obrade. Homogenizacija tkiva provedena je pomoću sustava Minilys (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Francuska) uz uporabu keramičkih kuglica od cirkonijeva oksida promjera 1,4 mm (Precellys, Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Francuska).

Ukupne RNA i DNA izolirana je primjenom reagensa TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD) prema uputama proizvođača. Ukratko, svaki homogenizirani uzorak liziran je u 0,25 mL reagensa TRIzol, nakon čega je uslijedilo odvajanje faza pomoću kloroforma. Nakon centrifugiranja pri 12.000 × g tijekom 15 minuta na 4 °C, vodena faza pažljivo je prenesena u čistu epruvetu bez DNaza i RNaza. DNA i RNA su istaložena izopropanolom, isprana 75-postotnim etanolom, osušena na zraku te naposljetku resuspendirana u vodi bez nukleaza (AccuGENE, Lonza, Basel, Švicarska). Koncentracije DNA i RNA mjerena su pomoću spektrofotometra NanoDrop (ND-1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Koncentracija DNA i RNA određene su na temelju apsorbancije pri 260 nm, dok je čistoća uzoraka procijenjena pomoću omjera apsorbancije A260/A280 i A260/A230. Od uzoraka recidivirajućeg pterigija, samo su četiri dala dovoljnu količinu RNA za pripremu knjižnice i naknadnu sekvencijsku analizu.

3.6. Sekvenciranje RNA, tzv. RNA-Seq analiza

Kako bismo istražili cijeli spektar promjena genskih aktivnosti prisutnih u pterigiju, koristili smo sekvenciranje mRNA. Za analizu transkriptoma, ukupna RNA iz pet reprezentativnih tkiva pterigija i pet kontrolnih tkiva obogaćena je s mRNA korištenjem oligo-d-T magnetskih kuglica te su randomizirani heksamerni primeri korišteni su za sintezu prvog lanca cDNA. Konstruirana je neusmjerena biblioteka i uzorci su sekvencirani s 40 milijuna očitavanja po uzorku na Illumina Novaseq PE150 (Illumina, Inc., San Diego, CA 92122, SAD). Sekvenciranje je napravljeno u firmi Novogene Co., Ltd. (Cambridge, UK). Deseq2 je korišten za diferencijalnu analizu gena, a log2FC≥ od ±1 korišten je kao prag za diferencijalnu ekspresiju. Za analizu obogaćivanja skupa gena korišten je modul GenePattern GSEA (verzija 20.4.0), s tisuću permutacija po genskom setu na kolekcijama iz baze podataka genskih setova Molecular Signatures. Algoritam dekonvolucije CIBERSORTx korišten je za predviđanje relativnih udjela imunoloških stanica u tkivu.

U drugom dijelu istraživanja provedeno je sekvenciranje RNA (RNA-seq) kako bi se karakterizirale razlike u ekspresiji gena na razini cijelog transkriptoma povezane s naknadnim ponovnim pojavljivanjem pterigija. Ukupna RNA izolirana iz uzoraka pterigija prikupljenih tijekom početnog kirurškog zahvata korištena je za transkriptomsko profiliranje. Konačni skup podataka sastojao se od osam bioloških uzoraka: četiri od uzoraka pterigija koji su naknadno ponovno razvili pterigij i četiri od pacijenata koji su ostali bez ponovnih pojava tijekom razdoblja praćenja. Četiri nerecidivna uzorka odabrana su od pacijenata bez recidiva i usklađeni su prema Tan stupnju i tehnici fiksacije grafta. Svaki uzorak predstavljao je neovisni biološki replikat.

Pripremu i sekvenciranje biblioteke izvršila je tvrtka Novogene Europe (Novogene Co., Ltd., Cambridge, UK). Prije pripreme biblioteke, integritet RNA procijenjen je pomoću Agilent 2100 Bioanalyzera (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka). Uzorci koji zadovoljavaju unaprijed definirane kriterije kvalitete i količine RNA korišteni su za konstrukciju biblioteke. Poliadenilirana RNA obogaćena je iz ukupne RNA pomoću oligo(dT)-konjugiranih magnetskih kuglica i potom fragmentirana kako bi se generirali fragmenti RNA odgovarajuće veličine. Prvi lanac cDNA sintetiziran je iz fragmentirane RNK korištenjem slučajnih heksamernih primera i reverzne transkriptaze, nakon čega je slijedila sinteza drugog lanca cDNA za generiranje dvolančane cDNA. RNA-seq biblioteke koje nisu specifične za lanac konstruirane su korištenjem standardnih postupaka, uključujući popravak krajeva, A-repovanje, ligaciju adaptera, odabir veličine i PCR amplifikaciju. Rezultirajuće biblioteke pročišćene su i procijenjene na koncentraciju, raspodjelu veličine fragmenata i ukupnu kvalitetu korištenjem Qubit fluorometrije, Agilent Bioanalyzera i kvantitativne PCR (qPCR).

Kvalificirane biblioteke su združene i sekvencirane na Illumina NovaSeq platformi (Illumina, Inc., San Diego, CA, SAD) korištenjem sekvenciranja parnih krajeva od 150 bp (PE150), s ciljanom dubinom sekvenciranja od približno 40 milijuna očitanja parnih krajeva po uzorku. Sirovi podaci sekvenciranja generirani su u FASTQ formatu i podvrgnuti kontroli kvalitete prije daljnje analize. Uklonjena su očitanja koja su sadržavala kontaminaciju adaptera, i imala više od 10% dvosmislenih nukleotida (N) ili više od 50% baza s ocjenom kvalitete ispod 5. Kvaliteta sekvenciranja procijenjena je na temelju udjela baza s Phred vrijednostima kvalitete ≥20 i ≥30 (Q20 i Q30), udjela GC parova te broja zadržanih „čistih" očitanja (engl. "*clean reads"*).

Svih osam uzoraka zadovoljilo je kriterije kvalitete i uključeno je u transkriptomsku analizu, čime je dobiveno ukupno 121,3 Gb „pročišćenih" podataka sekvenciranja. Svaki je uzorak dao više od 12,17 Gb „čistih" podataka, pri čemu su udjeli Q20 i Q30 vrijednosti premašivali 99,24 %, odnosno 96,71 %. Očitanja koja su prošla kontrolu kvalitete poravnata su s referentnim genomom čovjeka (GRCh38/hg38) pomoću alata HISAT2 (verzija 2.2.1). Referentni genom preuzet je iz baze Ensembl. Stope poravnanja kretale su se u rasponu od 97,35 % do 98,04 % među uzorcima. Broj očitanja na razini gena određen je pomoću alata featureCounts (verzija 2.0.6) unutar Novogene-ovog analitičkog procesa, na temelju odgovarajuće anotacije genoma.

Analiza diferencijalne ekspresije gena koji kodiraju proteine provedena je pomoću alata DESeq2 (R paket, verzija 1.42.0). DESeq2 modelira podatke o broju očitanja (engl. "*counts"*) iz RNA-seq analize primjenom negativne binomne distribucije i veličine specifične za uzorak kako bi se uzele u obzir razlike u dubini sekvenciranja. Kao ulazni podatak korištena je matrica sirovih vrijednosti broja očitanja gena, a uzorci su klasificirani prema kliničkom ishodu, tj. na one s recidivom (n = 4) i one bez recidiva (n = 4). Za svaki gen, DESeq2 je procijenio log2-promjenu omjera (log2FC) izražaja gena između skupina s recidivom i onih bez njega te izračunao odgovarajuću statističku značajnost. P-vrijednosti korigirane su za višestruko testiranje primjenom postupka Benjamini-Hochberg radi kontrole stope lažnih otkrića (FDR). Geni su smatrani diferencijalno eksprimiranima ako su zadovoljavali oba unaprijed definirana kriterija: apsolutnu vrijednost $\log2FC \geq 1$ i korigiranu P-vrijednost (FDR ili q-vrijednost) < 0,1. Geni s vrijednošću $\log2FC \geq 1$ klasificirani su kao geni povećanog izražaja (engl. *upregulated*), dok su oni s vrijednošću $\log2FC \leq -1$ klasificirani kao geni smanjenog izražaja (engl. *downregulated*) u uzorcima s recidivom u odnosu na uzorke bez recidiva. Gen se smatrao aktivnim (eksprimiranim) ako je zbroj njegovih FPKM vrijednosti u svim uzorcima premašivao 1.

Analize funkcionalnog obogaćivanja provedene su pomoću platforme NovoMagic, Novogeneove bioinformatičke platforme, koja omogućuje radne procese za analizu ekspresije (RNA-seq), diferencijalne ekspresije i funkcionalne anotacije. Analize obogaćivanja prema klasifikaciji Gene Ontology (GO) i bazi Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) provedene su pomoću alata clusterProfiler (verzija 4.8.1). Skupovi gena s vrijednošću FDR < 0,1 smatrani su značajno obogaćenima.

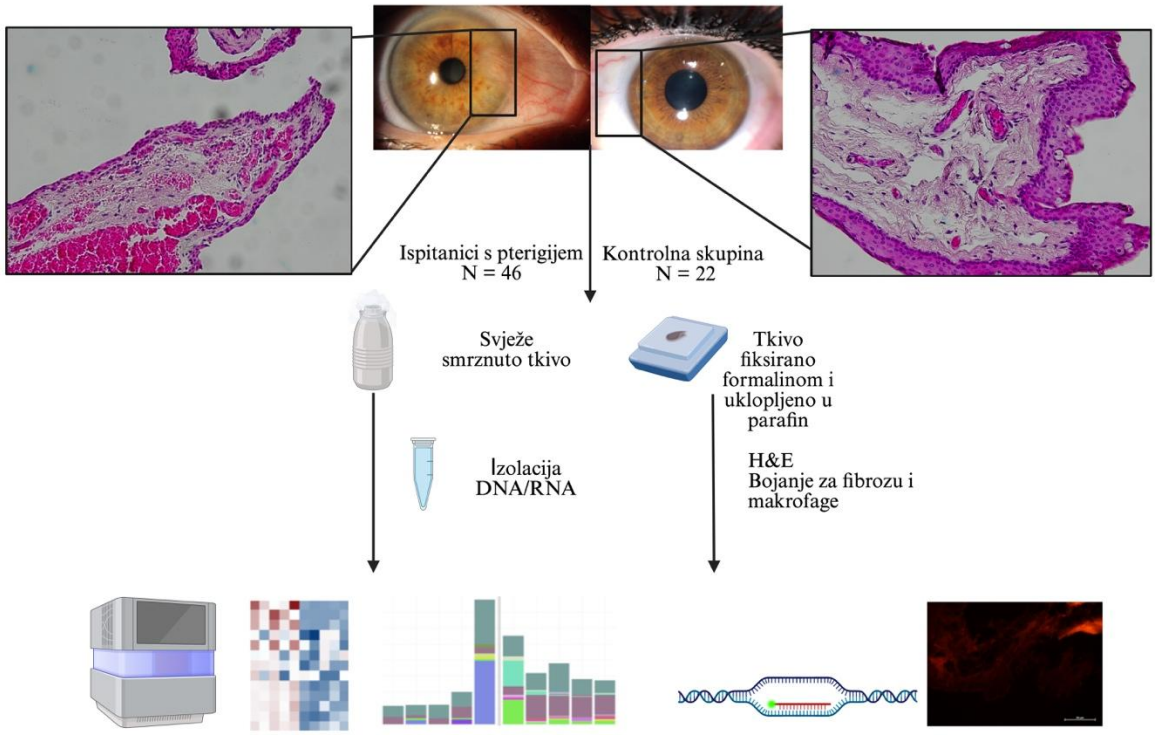
3.7. Metagenomska analiza

U prvom dijelu istraživanja provedeno je i sekvenciranje cijelog genoma mikrobioma. Uzorci genomske DNA kvantificirani su pomoću Qubit fluorimetra (Thermo Fisher, Waltham, MA, SAD), a 150 nanograma genomske DNA svakog uzorka uneseno je u komplet za pripremu knjižnica Illumina DNA Prep (Illumina, #20060059, San Diego, CA, SAD) prema standardnim protokolima proizvođača. Dovršene knjižnice procijenjene su i kvantificirane pomoću instrumenta Tapestation 4200 (Agilent, Santa Clara, CA, SAD). Biblioteke su normalizirane i sekvencirane na Illumina NextSeq 2000 sekvenceru korištenjem P2 300 cycle sekvencing kita (Illumina, Inc., San Diego, CA 92122, SAD). Nakon sekvenciranja, generirane su fastq datoteke i filtrirane po kvaliteti pomoću fastp korištenjem sljedećih parametara koji nisu zadani: -g -- poly_g_min_len = 5 -x --poly_x_min_len = 5 -y. Filtrirane fastq datoteke korištene su kao ulaz za program Centrifuge, bioinformatički alat za taksonomsku klasifikaciju metagenomskih sekvenci, korištenjem prilagođene baze podataka koja je izgrađena na sadržaju NCBI nt od 4. siječnja 2023. Rezultat Centrifuge analize generiran je korištenjem minimalne duljine (MHL) 15 te je unesen u Recentrifuge.

4. REZULTATI

4.1. Istraživanje: Uloga *Malassezia restricta* u razvoju pterigija

U prvi dio istraživanja je uključeno 46 ispitanika s primarnim pterigijem i 22 ispitanika koji su činili kontrolnu skupinu. Dijagram tijeka prvog dijela istraživanja prikazan je na Slici 5.



Slika 5. Dijagram tijeka prvog dijela istraživanja. Kreirano koristeći *BioRender*. Paradzik Simunovic, M. (2026) https:// BioRender.com/pniopqj

Bojenje pterigija hematoksilinom i eozinom pokazalo je i epitelne i stromalne promjene, skvamoznu metaplaziju s gubitkom vrčastih stanica u epitelnom sloju i stromu ispunjenu fibrovaskularnim vezivnim tkivom koje se sastoji od kolagena pomiješanog s fibrilarnim strukturama i krvnim žilama s akutnim i kroničnim upalnim infiltratom, za razliku od kontrolnih uzoraka konjuktive, gdje je bio prisutan ne-keratinizirajući pločasti epitel, s raspršenim vrčastim stanicama koje prekrivaju vezivno tkivo lamine proprije.

Demografski podaci osoba s pterigijem i kontrolne skupine ispitanika prikazani su u Tablici 1. U skupini pacijenata i kontrolnoj skupini bila je podjednaka raspodjela prema spolu. Kontrolna skupina bila je nešto starija, što odražava dob u kojoj se katarakta u potpunosti razvija i zahtijeva operaciju.

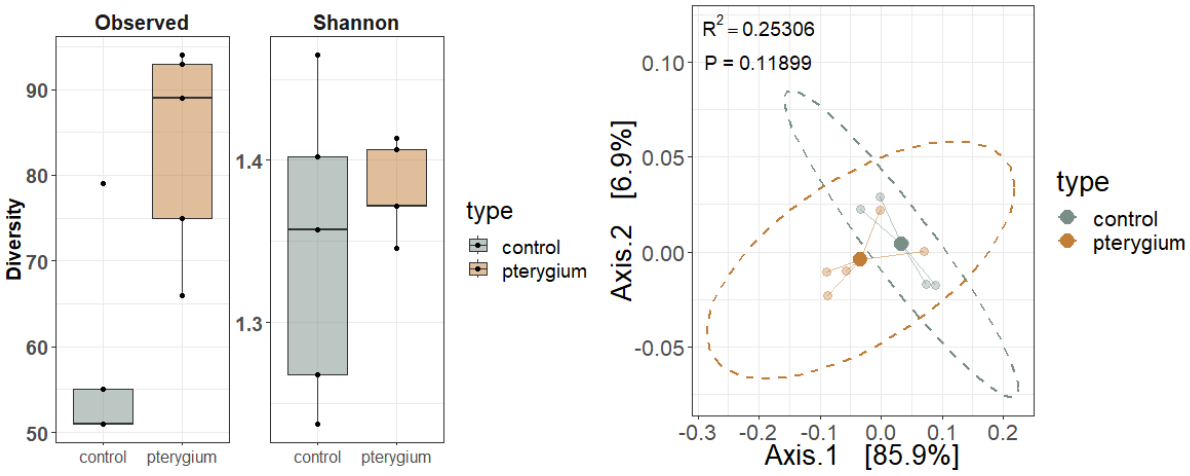
Tablica 1. Demografske karakteristike ispitanika i kontrolne skupine uključene u istraživanje

Varijable	**Ispitanici s pterigijem (N=46)**	**Kontrolna skupina (N=22)**	**P**
Spol – N (%)			
Muško	23 (50 %)	9 (41 %)	0,482
Žensko	23 (50 %)	13 (59 %)	
Dob (godine)	64,3 (36,48-87,69)	71,64 (56,05-83,31)	0,015

Usporedba između grupa po dobi provedena je s t-testom. Usporedba između grupa po spolu provedena je hi-kvadrat testom.

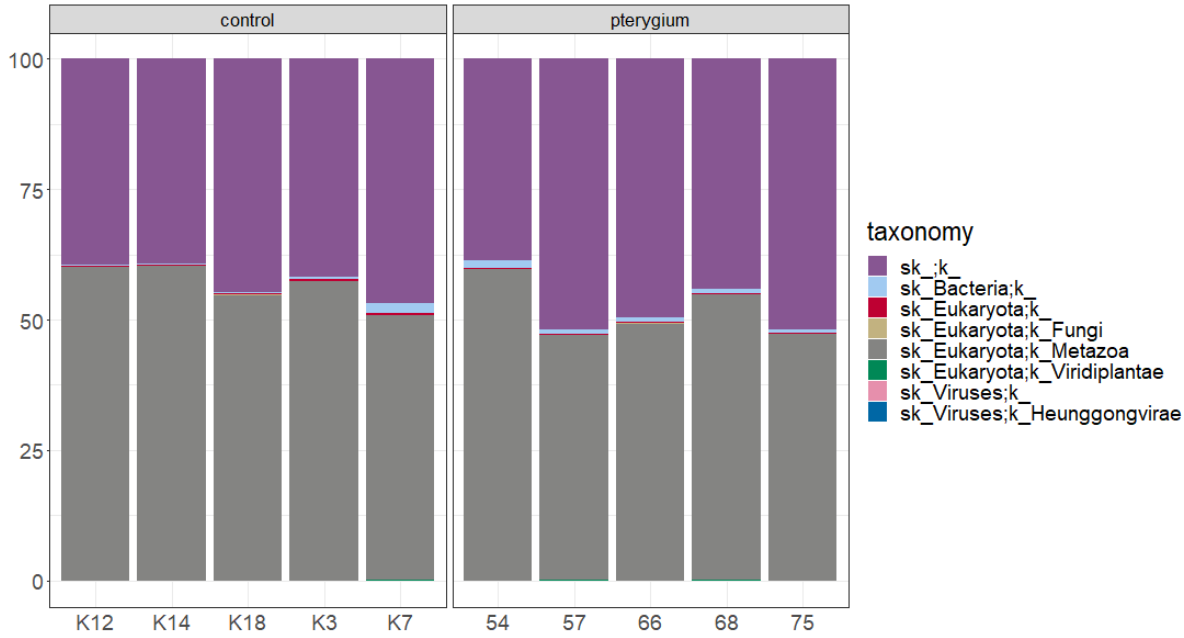
4.1.1. Metagoneskom analiza

Metagenomska analiza provedena je na pet uzoraka tkiva pterigija i pet kontrolnih uzoraka. Taksonomska analiza cijelog metagenomskog sekvenciranja "*shotgun*" nije pokazala značajne razlike u alfa i beta raznolikosti, vjerojatno zbog ograničene veličine uzorka (Slika 6).



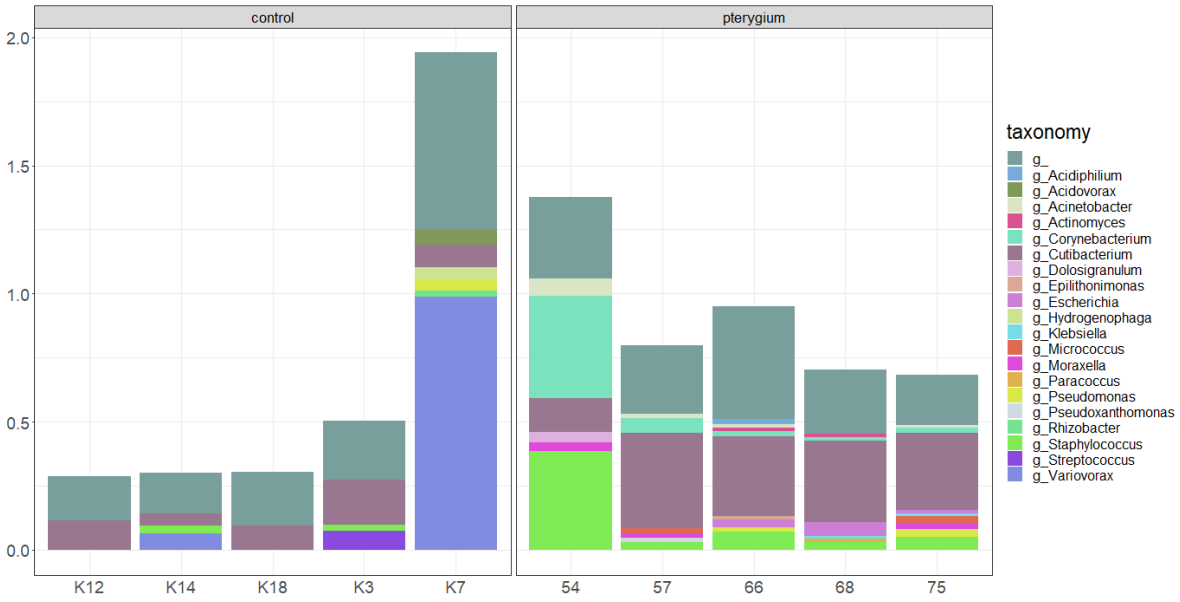
Slika 6. Raznolikost i sastav mikrobioma u uzorcima pterigija i kontrolnog tkiva. A. Alfa-raznolikost mikrobioma izražena kao broj opaženih taksona (*Observed*, lijevo) i Shannonov indeks (*Shannon*, desno) u kontrolnim uzorcima (sivo) i uzorcima pterigija (smeđe). Box-plotovi prikazuju medijan, interkvartilni raspon i raspon vrijednosti, a točke predstavljaju pojedinačne uzorke (n = 5 po skupini). Razlike među skupinama nisu statistički značajne (padj < 0.05). **B.** Analiza glavnih koordinata (PCoA) beta-raznolikosti mikrobioma, temeljena na [Bray-Curtisovoj] mjeri udaljenosti. Svaka točka predstavlja jedan uzorak, veliki simboli označuju centroide skupina, a isprekidane elipse prikazuju [95 %] interval pouzdanosti za svaku skupinu. Prve dvije osi objašnjavaju 85,9 % (Os 1) odnosno 6,9 % (Os 2) ukupne varijance. Razlika u sastavu mikrobioma među skupinama nije statistički značajna (PERMANOVA, $R^2 = 0{,}253$; $p = 0{,}119$).

Iako nije značajno, uzorci pterigija imali su, u prosjeku, veći broj uočenih mikrobnih vrsta i veći Shannon indeks raznolikosti. Na razini carstva, uzorcima su uglavnom dominirale Metazoe, bez uočljivih razlika između skupine pacijenata i kontrolne skupine (Slika 7).

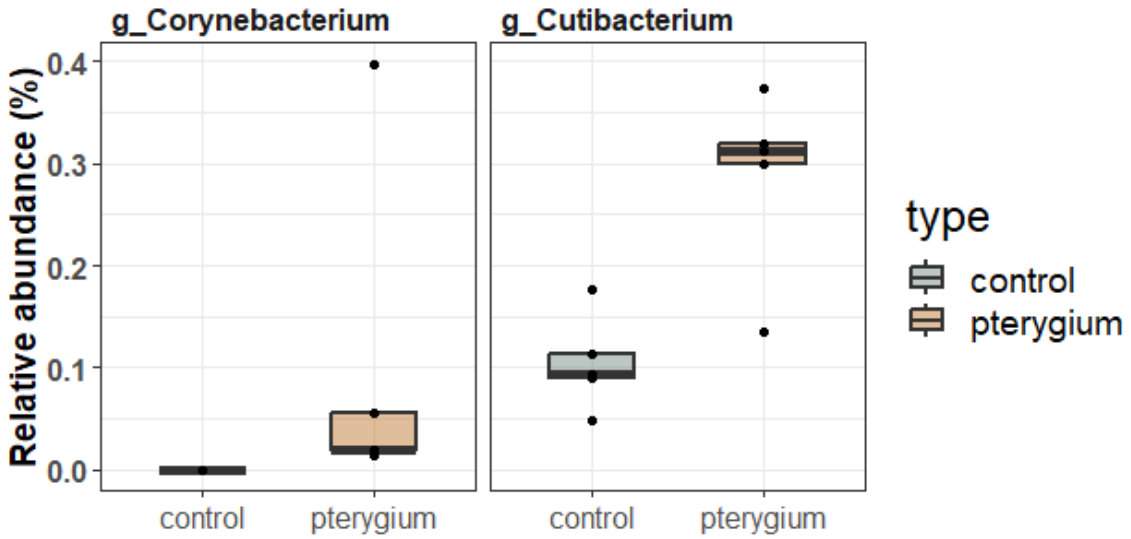


Slika 7. Taksonomski sastav uzoraka kontrolnog tkiva i pterigija na razini kraljevstva (carstva). Stupčasti prikaz relativne zastupljenosti (%) taksonomskih skupina na razini carstva (*kingdom*) u pojedinačnim uzorcima kontrolnog tkiva (lijevo) i pterigija (desno). Svaki stupac predstavlja jedan uzorak, a boje označuju taksonomske skupine prema legendi: neklasificirane sekvence (ljubičasto), bakterije (svijetloplavo), neraspoređeni eukarioti (crveno), gljive (bež), Metazoa (sivo), Viridiplantae (zeleno), neraspoređeni virusi (ružičasto) i Heunggongvirae (tamnoplavo). U svim je uzorcima dominantan udio Metazoa (otprilike 47 – 60 %) i neklasificiranih sekvenci (otprilike 40 – 53 %), dok su bakterije, gljive, biljke i virusi zastupljeni u vrlo malom udjelu.

Međutim, diferencijalna analiza brojnosti na razini roda otkrila je povišenu brojnost *Corynebacterium* i *Cutibacterium* u uzorcima pterigija, oba mikroba su kožni komenzali koji se smatraju oportunističkim patogenima (Slike 8 i 9).

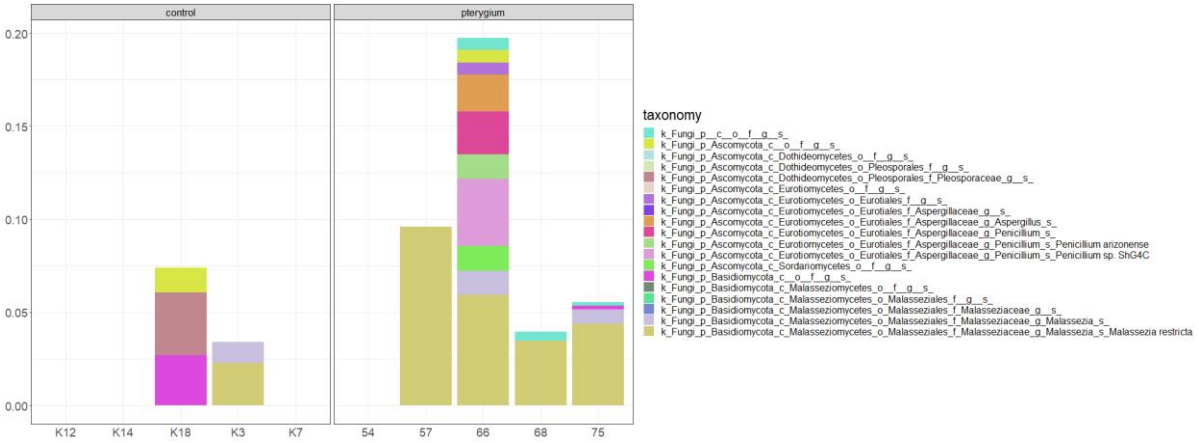


Slika 8. Taksonomski sastav bakterijskih zajednica u uzorcima kontrolnog tkiva i pterigija na razini roda. Naslagani stupčasti prikaz relativne zastupljenosti (%) bakterijskih rodova u pojedinačnim uzorcima kontrolnog tkiva (lijevo) i pterigija (desno). Svaki stupac predstavlja jedan uzorak, a boje označuju rodove prema legendi. U većini uzoraka prisutni su rodovi *Cutibacterium*, *Staphylococcus* i *Corynebacterium*, uz znatan udio sekvenci neklasificiranih na razini roda (g_). U kontrolnom uzorku K7 dominira rod *Variovorax*, dok se u uzorku pterigija 54 ističu *Staphylococcus* i *Corynebacterium*. Ostali rodovi (npr. *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Escherichia*) zastupljeni su u manjim udjelima.



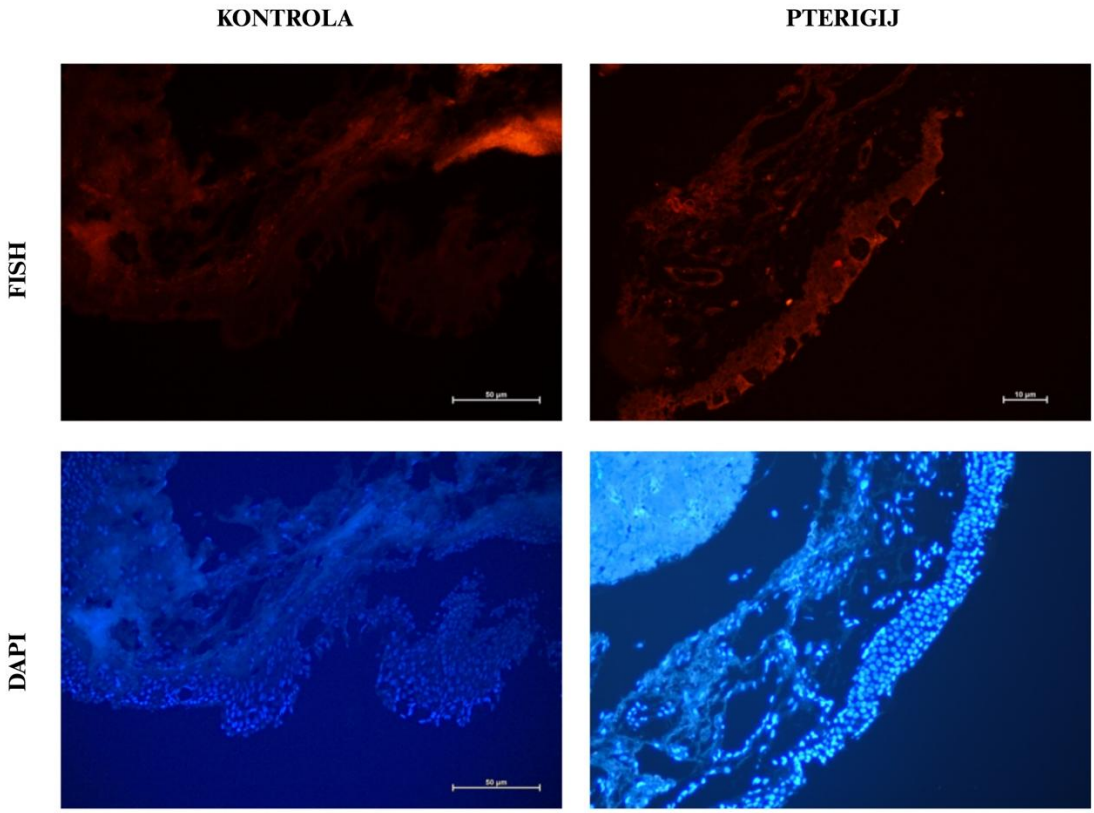
Slika 9. Relativna zastupljenost rodova *Corynebacterium* i *Cutibacterium* u kontrolnom tkivu i pterigiju. Box-plotovi prikazuju relativnu zastupljenost (%) rodova *Corynebacterium* (lijevo) i *Cutibacterium* (desno) u kontrolnim uzorcima (sivo) i uzorcima pterigija (smeđe). Točke predstavljaju pojedinačne uzorke (n = 5 po skupini). Razlike među skupinama [nisu statistički značajne / padj < 0.05.

Nadalje, uzorci pterigija imali su veću prevalenciju gljivica u usporedbi sa zdravim kontrolnim skupinama (Slika 10). *Malassezia restricta*pronađena je u četiri od pet uzoraka pterigija, dok je samo jedan od kontrolnih uzoraka bio pozitivan na tu gljivicu (Slika 10).



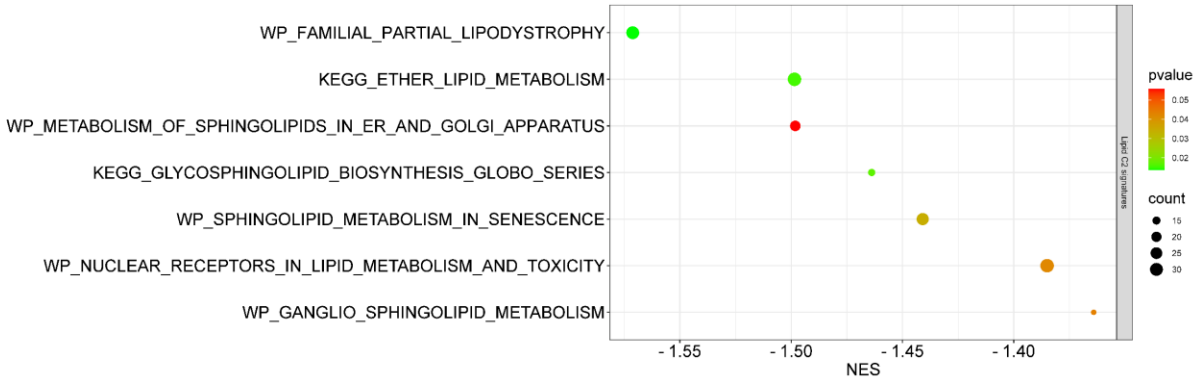
Slika 10. Taksonomski sastav gljivične zajednice u kontrolnom tkivu i pterigiju na razini vrste. Stupčasti prikaz relativne zastupljenosti (%) gljivičnih taksona u pojedinačnim uzorcima kontrolnog tkiva (lijevo) i pterigija (desno). Svaki stupac predstavlja jedan uzorak, a boje označavaju taksone prema legendi. U pterigiju dominira *Malassezia restricta*.

Također, kako bi se dodatno potvrdila prisutnost *Malassezije* u tkivu pterigija, korištena je fluorescentna in situ hibridizacija (Slika 11).



Slika 11. Prikaz gljivice *Malassezia restricta* u pterigiju. Fluorescentna *in situ* hibridizacija u uzorcima pterigija u usporedbi s kontrolnom skupinom. Gornji panel slika prikazuje specifičnu hibridizaciju za *Malassezia restricta*, a donji red prikazuje obojenje jezgara bojom DAPI.

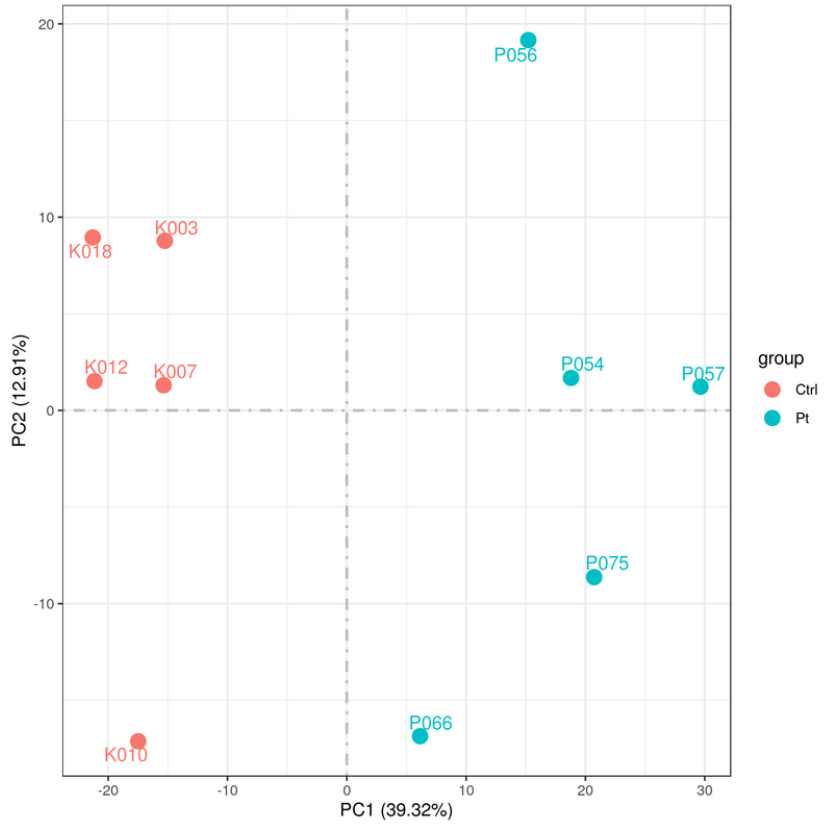
Budući da su vrste *Malassezia* ovisne o lipidima, genski potpisi povezani s metabolizmom lipida analizirani su i utvrđeno je da su promijenjeni u uzorcima pterigija (Slika 12).



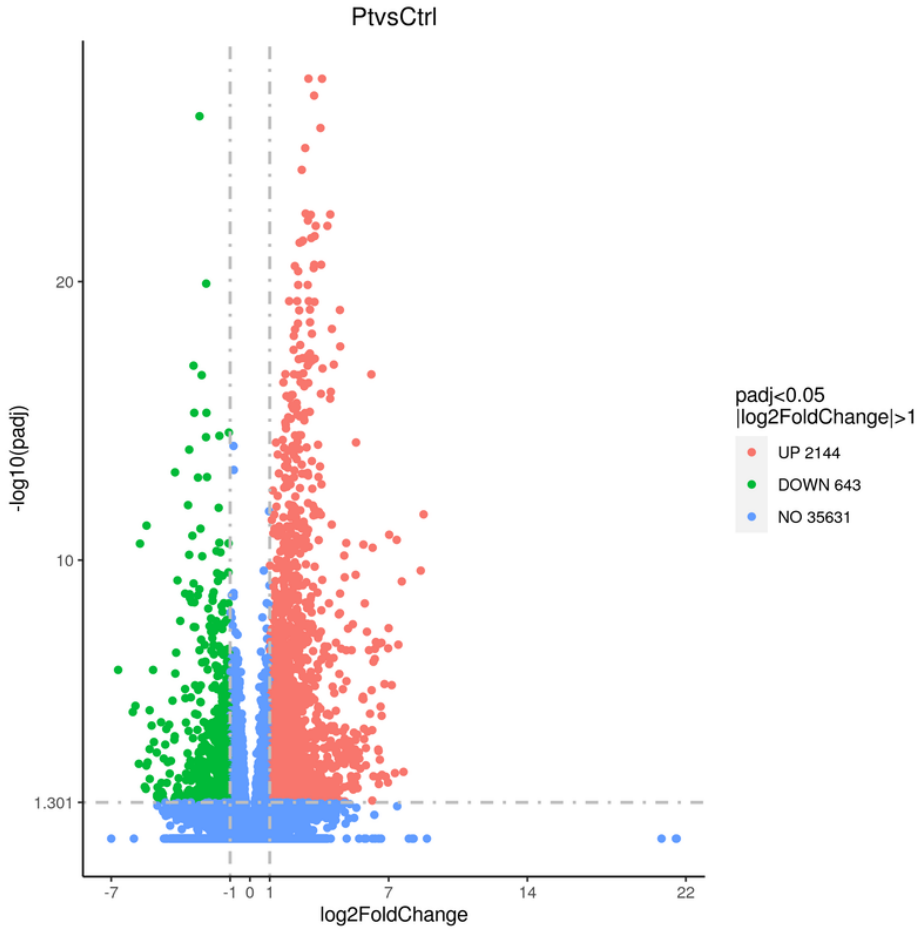
Slika 12. **Obogaćenje lipidnih genskih skupova (GSEA) u pterigiju u odnosu na kontrolno tkivo.** Dot-plot prikazuje lipidne genske skupove s negativnim normaliziranim indeksom obogaćenja (NES). Veličina točke odgovara broju gena u skupu, a boja nominalnoj *p*-vrijednosti (< 0,05).

4.1.2. Analiza transkriptoma

U transkriptomskoj analizi demonstrirano je značajne razlike u ekspresiji gena između pterigija i kontrolnih uzoraka. Analiza glavnih komponenti i vulkanski dijagram, provedene kako bi se razlikovala većina varijacija u ekspresiji gena, pokazale su značajne korelacije i dobru kvalitetu dobivenih transkriptomskih podataka (Slike 13 i 14).

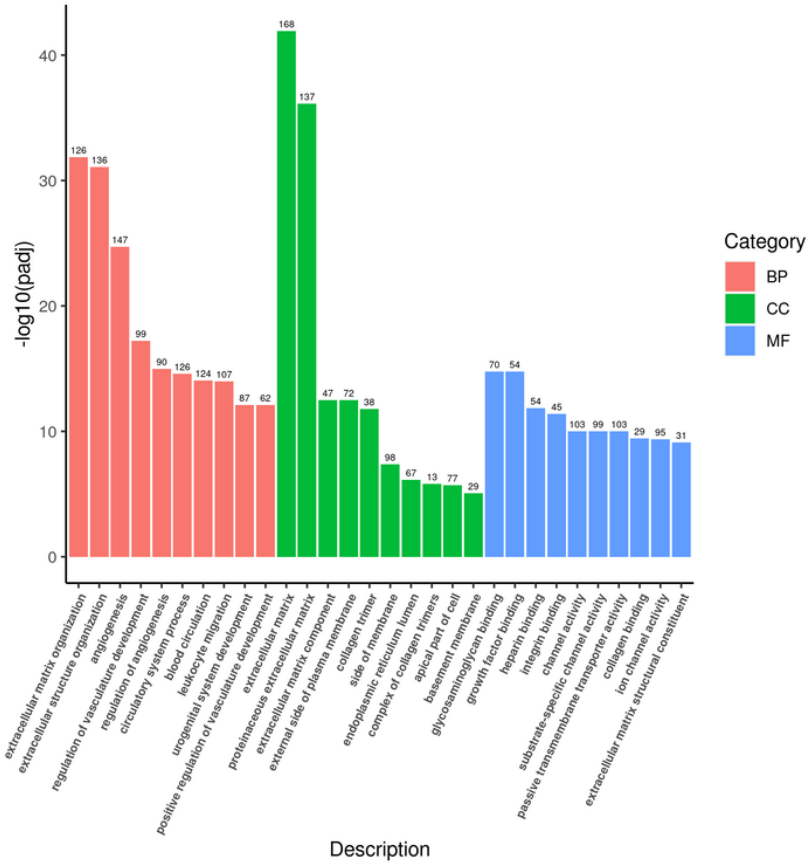


Slika 13. Analiza glavnih komponenti (PCA) transkriptoma uzoraka kontrolnog tkiva i pterigija. Svaka točka predstavlja jedan uzorak: kontrole (Ctrl, crveno) i pterigij (Pt, plavo). Prve dvije glavne komponente objašnjavaju 39,32 % (PC1) odnosno 12,91 % (PC2) ukupne varijabilnosti.



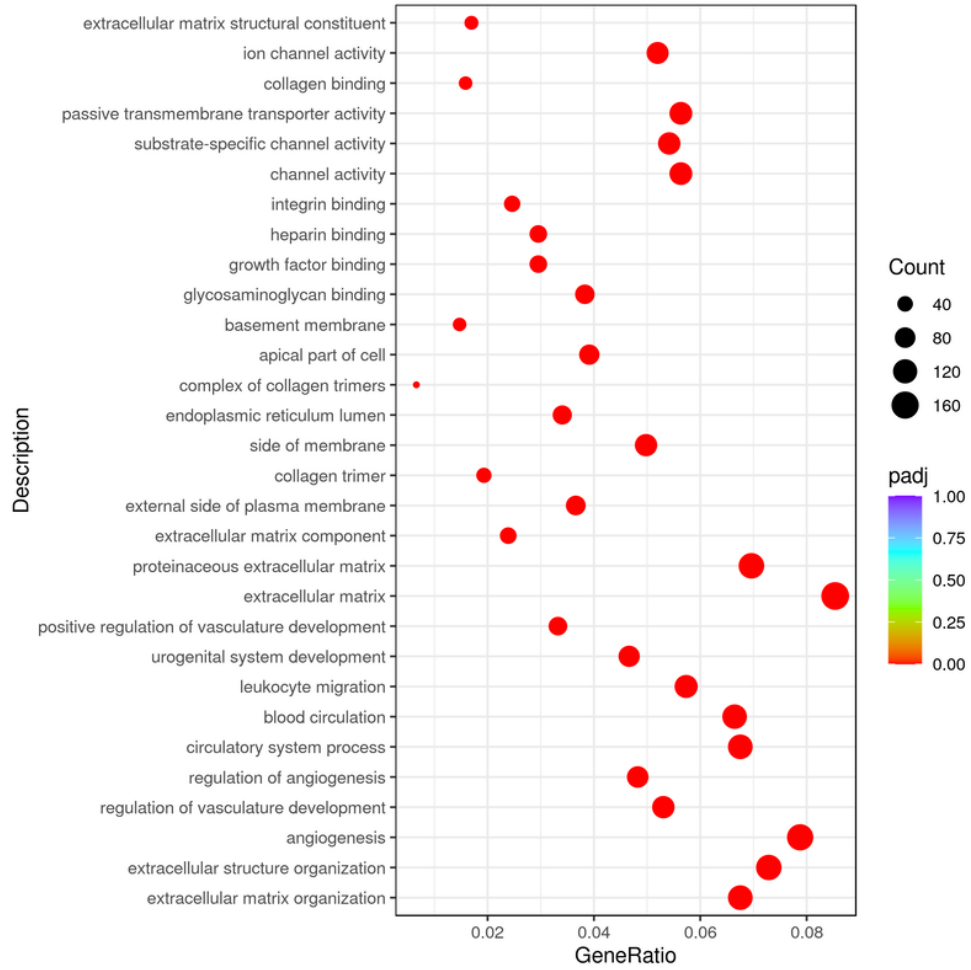
Slika 14. Diferencijalna ekspresija gena u pterigiju u odnosu na kontrolno tkivo. Volcano plot prikazuje rezultate diferencijalne ekspresije gena (pterigij vs. kontrola). Os x prikazuje log2 promjenu ekspresije (log2FoldChange), a os y negativni logaritam prilagođene *p*-vrijednosti (-log10 padj). Isprekidane linije označuju pragove značajnosti (padj < 0,05; |log2FoldChange| > 1). Crvenom bojom označeni su geni s povećanom ekspresijom u pterigiju (n = 2144), zelenom geni sa smanjenom ekspresijom (n = 643), a plavom geni koji ne zadovoljavaju zadane kriterije (n = 35 631).

U analizi genske ontologije prepoznali smo nekoliko bioloških procesa koji su bili značajno obogaćeni u pterigiju (Slika 15).



Slika 15. ***Gene Ontology* (GO) među diferencijalno eksprimiranim genima u pterigiju u odnosu na kontrolno tkivo.** Stupčasti prikaz deset najznačajnije obogaćenih GO pojmova po kategoriji: biološki procesi (BP, crveno), stanične komponente (CC, zeleno) i molekularne funkcije (MF, plavo). Os x prikazuje opis GO pojma, a os y negativni logaritam prilagođene *p*-vrijednosti (-log10 padj). Brojevi iznad stupaca označuju broj diferencijalno eksprimiranih gena pridruženih pojedinom pojmu. Najznačajnije obogaćenje uočeno je za pojmove povezane s izvanstaničnim matriksom (npr. organizacija izvanstaničnog matriksa, izvanstanični matriks, vezanje glikozaminoglikana), angiogenezom i razvojem krvožilnog sustava, te za pojmove vezane uz kolagen i bazalnu membranu.

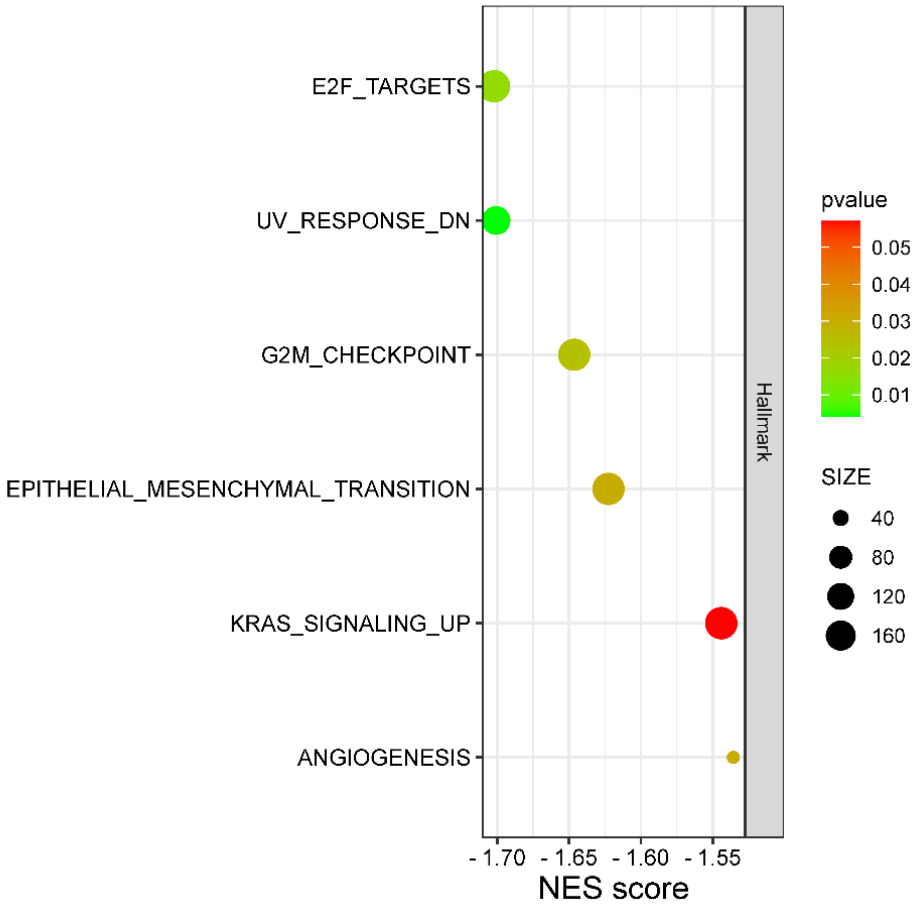
Među pojačano reguliranim, diferencijalno eksprimiranim genima, najveće povećanje ekspresije pronađeno je za gen CHIT1, koji je uključen u razgradnju hitina, komponente stanične stijenke Malassezia. Nakon pojačane regulacije ovog gena slijedili su geni uključeni u izvanstaničnu strukturu matrice, COL10A1, i remodeliranje, MMP9, što odražava intenzivnu fibrozu, glavni patološki nalaz pterigija. Angiogeneza, dobro poznata karakteristika pterigija, i regulacija vaskularne komponente također su biološki procesi pojačano regulirani u pterigiju. Klasifikacija Genske ontologije ukazuje na pojačanu regulaciju molekularnih procesa povezanih s aktivnošću kanala u pterigiju (Slika 16).



Slika 16. **Gene Ontology (GO) analiza među diferencijalno izraženim (eksprimiranim) genima u pterigiju u odnosu na kontrolno tkivo.** Dot-plot prikazuje GO pojmove (biološki procesi, stanične komponente i molekularne funkcije) značajno obogaćene među diferencijalno eksprimiranim genima. Os x prikazuje omjer gena (*GeneRatio*), odnosno udio diferencijalno eksprimiranih gena pridruženih pojedinom pojmu u odnosu na ukupan broj analiziranih gena. Veličina točke odgovara broju diferencijalno eksprimiranih gena u pojmu (*Count*), a boja prilagođenoj *p*-vrijednosti (padj). Svi prikazani pojmovi imaju vrlo nisku padj (crveno).

Najveći omjer gena i najviše gena imaju pojmovi izvanstanični matriks, angiogeneza, organizacija izvanstanične strukture i organizacija izvanstaničnog matriksa. Obogaćeni su i pojmovi vezani uz kolagen, bazalnu membranu, vezanje integrina, heparina i glikozaminoglikana, razvoj krvožilnog sustava, migraciju leukocita te aktivnost ionskih kanala.

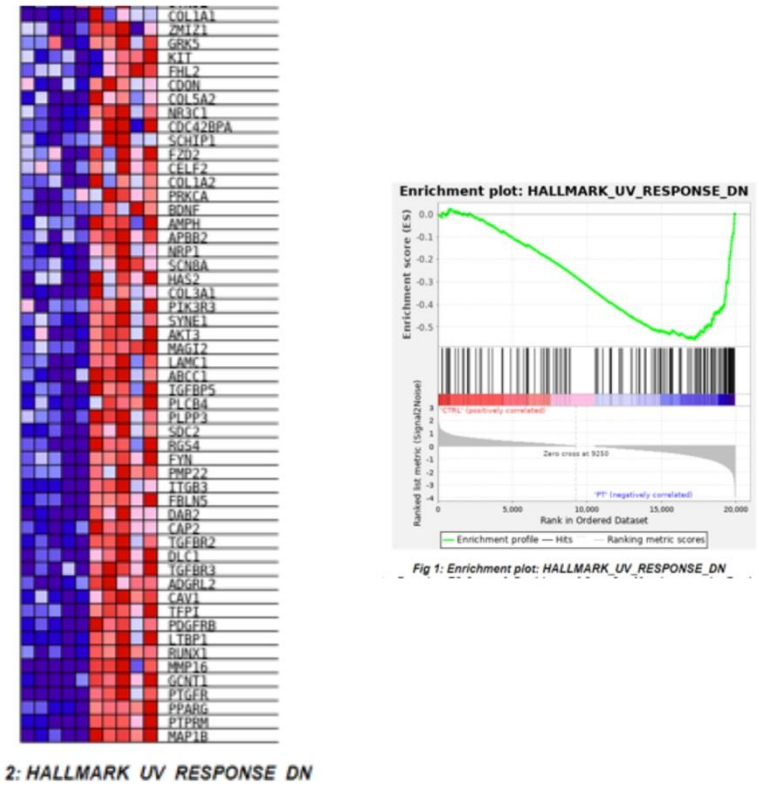
Kako bismo dalje istražili razlike u njihovim biološkim funkcijama, napravili smo analizu obogaćivanja skupa gena HALLMARK (engl. *gene set enrichment analysis*, GSEA), gdje smo pronašli sljedeće pojačano regulirane puteve: transkripcijski faktor E2F, UV odgovor, EMT, K RAS signalnom putu i angiogeneza (Slika 17).



Slika 17. Obogaćenje Hallmark genskih skupova (GSEA) u pterigiju u odnosu na kontrolno tkivo. Dot-plot prikazuje Hallmark genske skupove (MSigDB) s negativnim normaliziranim indeksom obogaćenja (NES). Veličina točke odgovara broju gena u skupu (*SIZE*), a boja nominalnoj *p*-vrijednosti.

Osim toga, geni u UV odgovoru i epitelno-mezenhimalnim putevima prikazani su na odgovarajućim heatmapama, što potvrđuje snažnu aktivaciju odgovarajućih procesa (Slike 18 i 19).

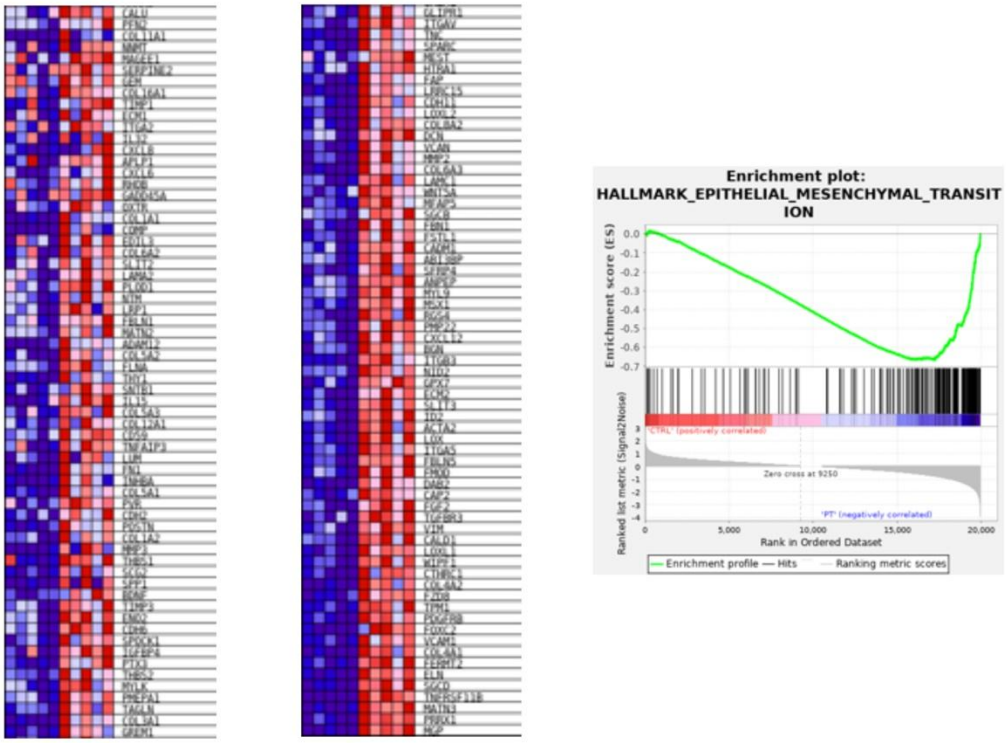
A. **B.**



Slika 18. Obogaćenje genskog skupa HALLMARK_UV_RESPONSE_DN u pterigiju u odnosu na kontrolno tkivo (GSEA). (A) Toplinska karta (*heatmap*) ekspresije vodećih gena (*leading edge*) skupa HALLMARK_UV_RESPONSE_DN u pojedinačnim uzorcima; crvena boja označuje višu, a plava nižu relativnu ekspresiju. **(B)** GSEA enrichment plot s krivuljom obogaćenja (*enrichment score*), položajem gena iz skupa na rangiranoj listi gena i metrikom rangiranja (Signal2Noise). Negativan ES pokazuje obogaćenje skupa u pterigiju (PT) u odnosu na kontrole (CTRL).

.

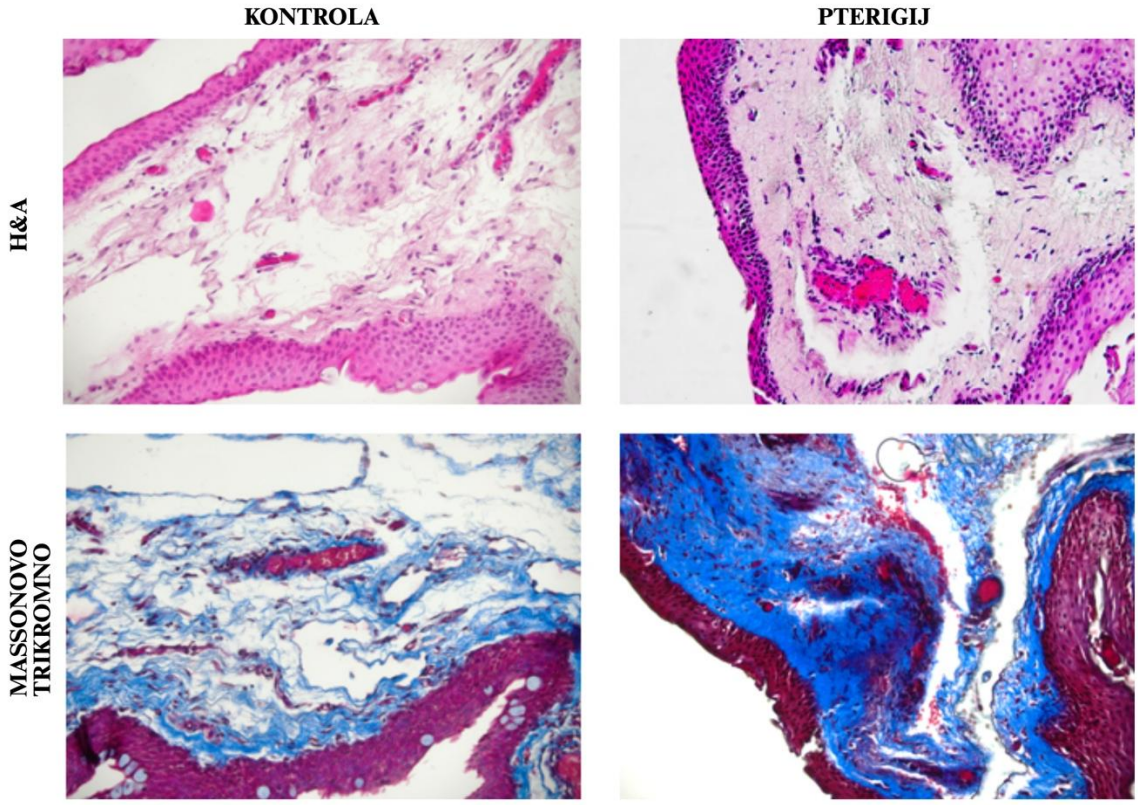
A. **B.** **C.**



Slika 19.. Obogaćenje genskog skupa za epitelno-mezemhimsku tranziciju u pterigiju u odnosu na kontrolno tkivo (GSEA). (A, B) Toplinske karte (*heatmap*) ekspresije vodećih gena (*leading edge*) skupa u pojedinačnim uzorcima; crvena boja označava višu, a plava nižu relativnu ekspresiju. **(C)** GSEA enrichment plot s krivuljom obogaćenja (*enrichment score*), položajem gena iz skupa na listi. Negativan ES pokazuje obogaćenje skupa u pterigiju (PT) u odnosu na kontrole (CTRL).

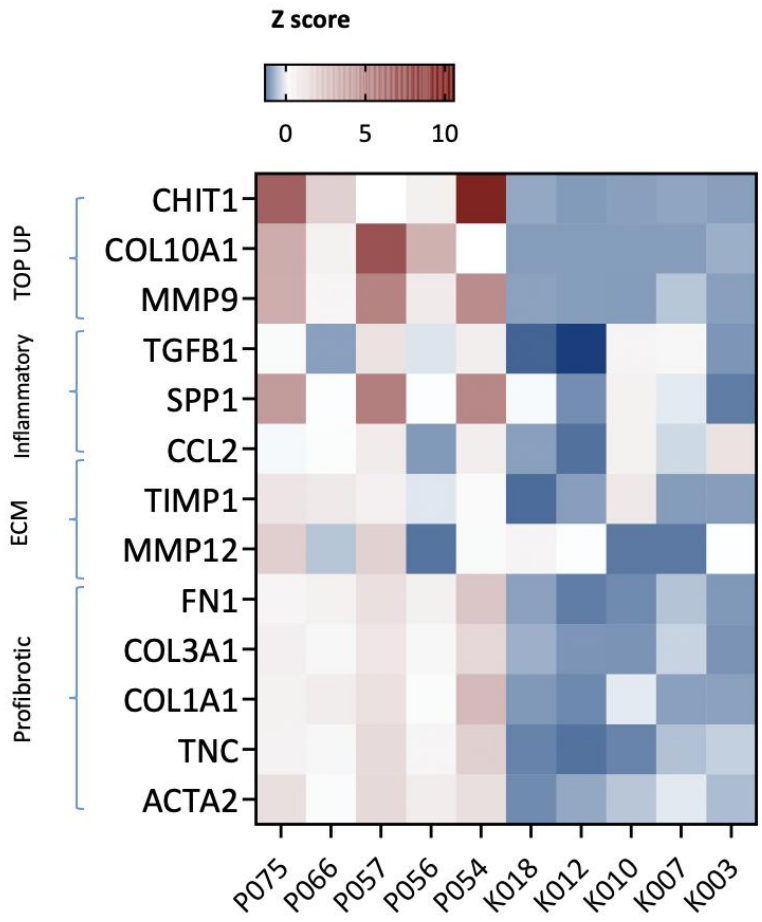
4.1.3. Fibroza u tkivima pterigija

Opsežan fibrotični proces u tkivima pterigija uočen je nakon Massonovog trikromnog bojenja (Slika 20).



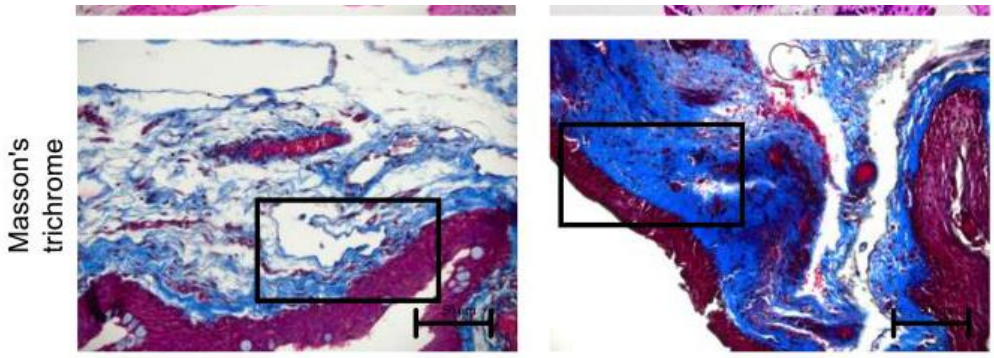
Slika 20. Obogaćenje tkiva pterigija vezivnim tkivom. Tkivo pterigija bojano je s hematoksilinom i eozinom i Massonovim trikrom bojanjem. Na slici je vidljivo povećanje količine vezivnog tkiva.

Na Slici 21. demonstrirana je povišena ekspresija gena uključenih u promet izvanstanične mtriksa. Najveći porast ekspresije gena u pterigiju uočen je za hitotriozidazu (CHIT1), nakon čega slijede dva proteina povezana s izvanstaničnim matriksom - kolagen tipa X alfa jedan lanac (COL10A1) i MMP9. Ostali enzimi za preoblikovanje izvanstanične matriksa bili su pojačano regulirani, uključujući TIMP1 i MMP12, kao i profibrotični geni poput gena za kolagen, fibronektin i aktin.



Slika 21. Ekspresija odabranih gena povezanih s upalom, izvanstaničnim matriksom i fibrozom u pterigiju i kontrolnom tkivu. Toplinska karta (*heatmap*) prikazuje relativnu ekspresiju odabranih gena (Z-vrijednost) u pojedinačnim uzorcima pterigija (lijevo) i kontrolnog tkiva (desno). Crvena boja označava višu, a plava nižu ekspresiju u odnosu na prosjek. Geni su grupirani prema funkciji: najviše pojačano eksprimirani (*TOP UP*: *CHIT1*, *COL10A1*, *MMP9*), upalni (*TGFB1*, *SPP1*, *CCL2*), geni izvanstaničnog matriksa (ECM: *TIMP1*, *MMP12*) i profibrotični geni (*FN1*, *COL3A1*, *COL1A1*, *TNC*, *ACTA2*).

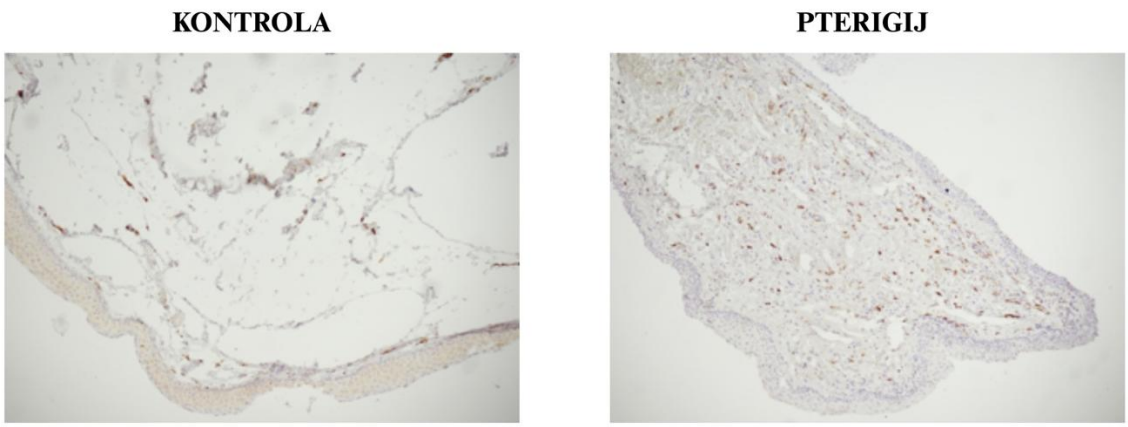
Fibroza je proces koji olakšavaju M2 makrofazi. Stoga smo testirali prisutnost M2 makrofaga u uzorcima pterigija. Utvrđeno je da je potpis ekspresije M2 gena prevladavajući među uzorcima pterigija (Slika 22).



Slika 22. Procijenjeni udio imunosnih stanica u uzorcima kontrolnog tkiva i pterigija. Stupčasti prikaz relativnog udjela (%) 22 tipa imunoloških stanica u pojedinačnim uzorcima kontrolnog tkiva (lijevo) i pterigija (desno), procijenjen dekonvolucijom transkriptomskih podataka [CIBERSORT / CIBERSORTx, LM22 signaturna matrica]. Svaki stupac predstavlja jedan uzorak, a boje označuju tipove stanica prema legendi. Posljednji stupac (*Key*) prikazuje legendu boja. U uzorcima pterigija uočava se veći udio makrofaga (osobito M2) i plazma stanica nego u većini kontrola.

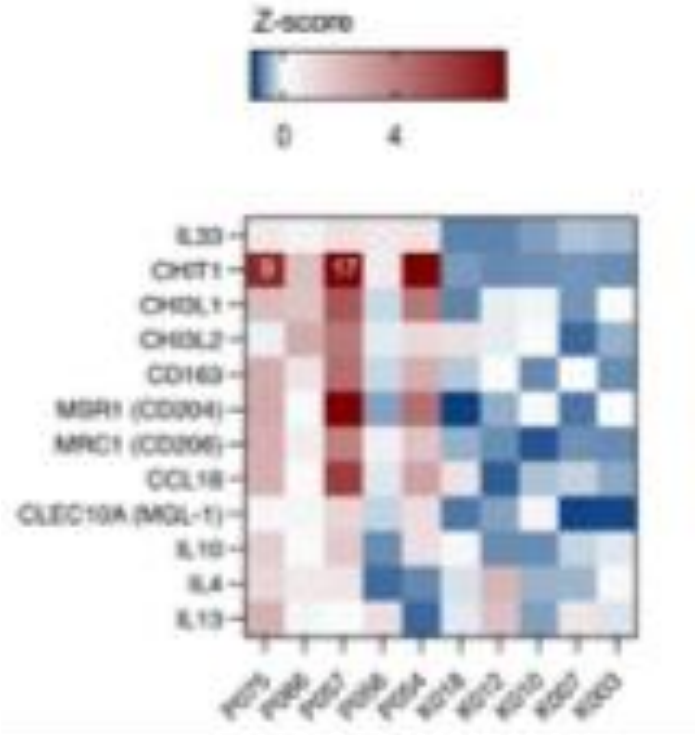
.

Kako bi se dodatno potvrdila uključenost alternativno aktiviranih makrofaga u pterigij, provedeno je imunohistokemijsko bojenje za CD163, marker M2 makrofaga. Brojni aktivirani M2 makrofagi bili su prisutni u uzorcima pterigija, dok su gotovo bili odsutni u kontrolnim tkivima (Slika 23).



Slika 23. Povećana zastupljenost M2 makrofaga u pterigiju. Imunohistokemijsko bojenje koristeći primarno protutijelo za CD163, marker makrofaga M2. U tkivu pterigija uočen je povećan broj makrofaga M2.

Nadalje, značajno pojačanegenske potpise makrofaga, kao i istaknuta ekspresija IL-33 i specifičnih markera kao što su CHIT1, MRC1, CCL18, interleukin 10 (IL-10) i drugi, ukazuju na alternativnu aktivaciju M2 makrofaga (Slika 24).



Slika 24. **Ekspresija gena povezanih s M2 polarizacijom makrofaga i tip 2 upalom u pterigiju i kontrolnom tkivu.** Toplinska karta (*heatmap*) prikazuje relativnu ekspresiju odabranih gena (Z-vrijednost) u pojedinačnim uzorcima pterigija (lijevo) i kontrolnog tkiva (desno). Crvena boja označuje višu, a plava nižu ekspresiju u odnosu na prosjek. Prikazani su citokini tip 2 upale (*IL33*, *IL4*, *IL13*, *IL10*), hitinaze i hitinazi slični proteini (*CHIT1*, *CHI3L1*, *CHI3L2*), markeri M2 makrofaga (*CD163*, *MSR1*/CD204, *MRC1*/CD206, *CLEC10A*/MGL-1) te kemokin *CCL18*. Brojevi unutar polja (9 i 17) označuju vrijednosti Z-score koje prelaze raspon prikazane skale.

4.2. Istraživanje: Genske ekspresije povezani s recidivom pterigija

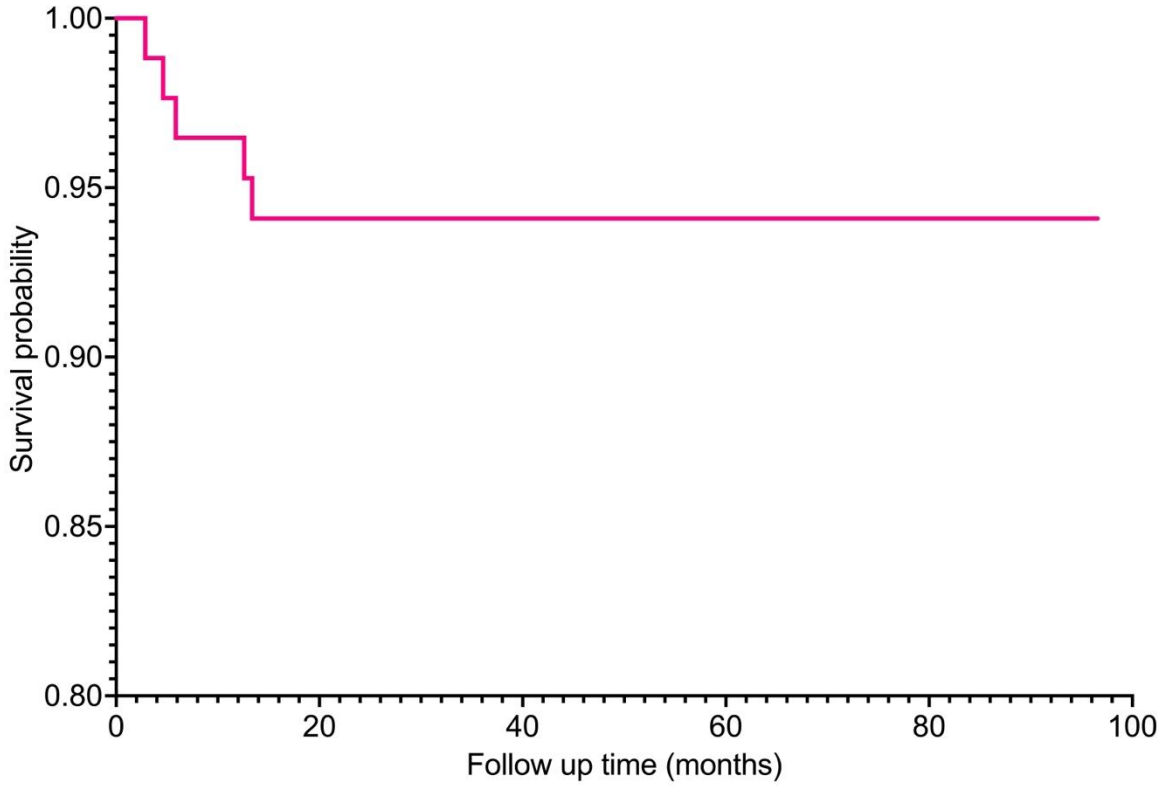
U ovaj dio istraživanja uključeno je 87 ispitanik. Nakon primjene kriterija uključivanja i isključivanja, dva ispitanika su isključena zbog gubitka praćenja. Stoga je u konačnu analizu na kraju uključeno 85 ispitanika.

Osnovne demografske i kliničke karakteristike 85 ispitanika s pterigijom prikazana su u Tablici 2. Dob ispitanika bila je od 24 do 83 godine, a prosječnom dobi iznosila je 63,25 ± 12,71 godina. Žene su činile 47,1% kohorte (N=40). Prema kliničkoj procjeni težine bolesti 21,2% ispitanika bilo je stupnja 1, stupanj 2 predstavljao je najveći udio s 50,6%, a stupanj 3, koji označava najteži oblik, činio je 28,2% ispitanika.

Tablica 2. Demografske i kliničke karakteristike ispitanika uključenih u istaživanje

Varijabla	Svi ispitanici (N=85)	Recidivi (N=5)
Dob (godine)	63,25 ± 12,71	
Spol – N (%)		
Muško	45 (52,9 %)	
Žensko	40 (47,1 %)	
Tan skala N (%)		
I	18 (21,2 %)	0
II	43 (50,6 %)	4 (80 %)
III	24 (28,2 %)	1 (20 %)
Vrijeme praćenja (godine)	7,23 ± 1,84	
Vrijeme do recidiva (godine)		0,66 ± 0,4

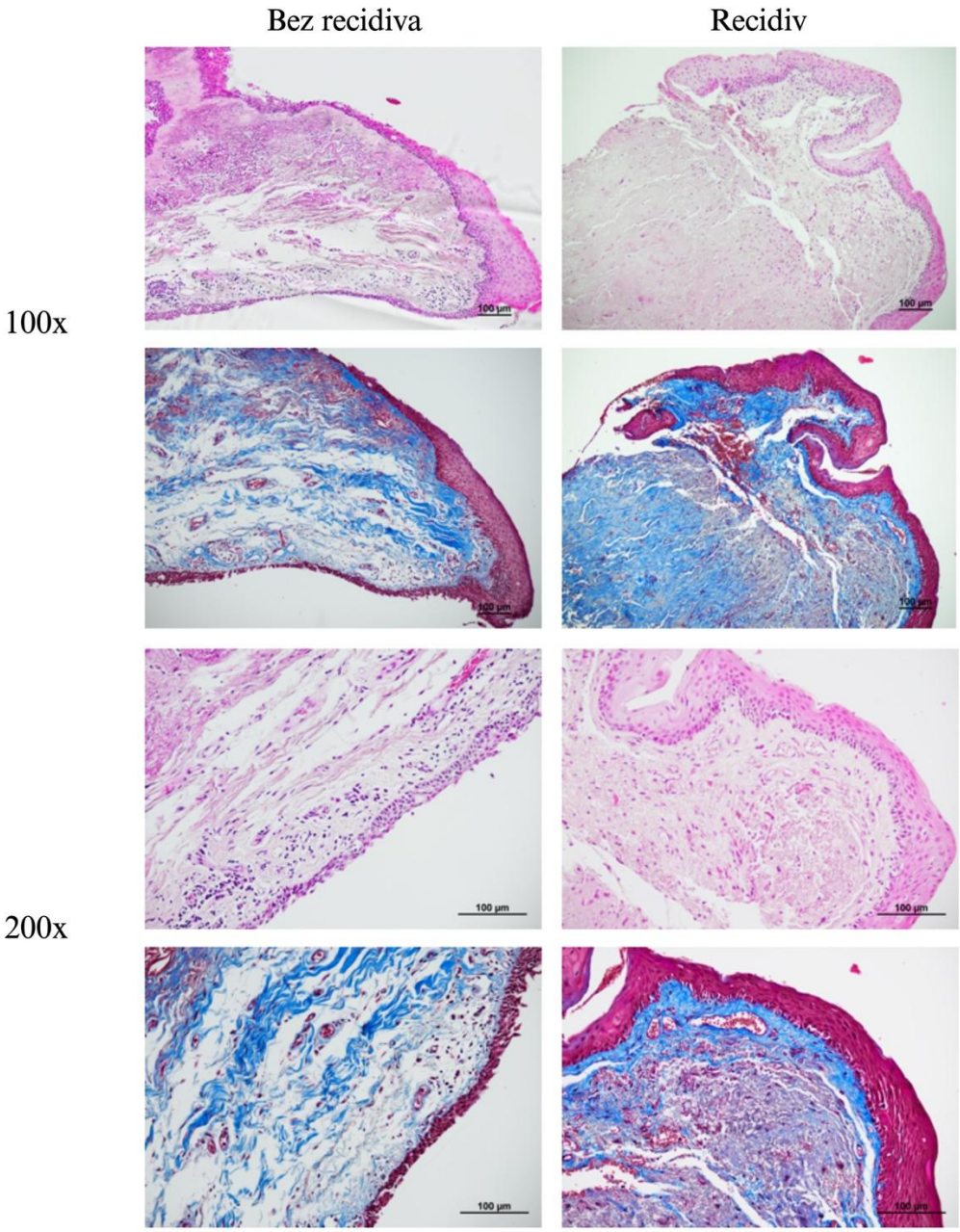
Svi ispitanici imali su primarni pterigij; međutim, recidiv se pojavio u 5,8 % ispitanika (N=5) tijekom prosječnog razdoblja praćenja od 7,32 ± 1,69 godina. Prosječno vrijeme pojave recidiva bilo je 8,87 ± 5,15 mjeseci (0,74 ± 0,43 godine), što ukazuje na to da se većina recidiva razvila unutar prve postoperativno. Navedeno je prikazano uz pomoć Kaplan-Meierove krivulje pojavnosti recidiva pterigija (Slika 25).



Slika 25. Kaplan-Meierove krivulje pojavnosti recidiva pterigija.

Također, pokazali smo da su uzorci pterigija kod kojih je kasnije došlo do recidiva pripadali stupnju 2 (tj. T2; četiri slučaja) i stupnju 3 (tj. T3; jedan slučaj); niti jedan uzorak s najblažom kliničkom slikom – stupnjem 1 (tj. T1) ili tankim pterigijem – nije pokazao znakove recidiva.

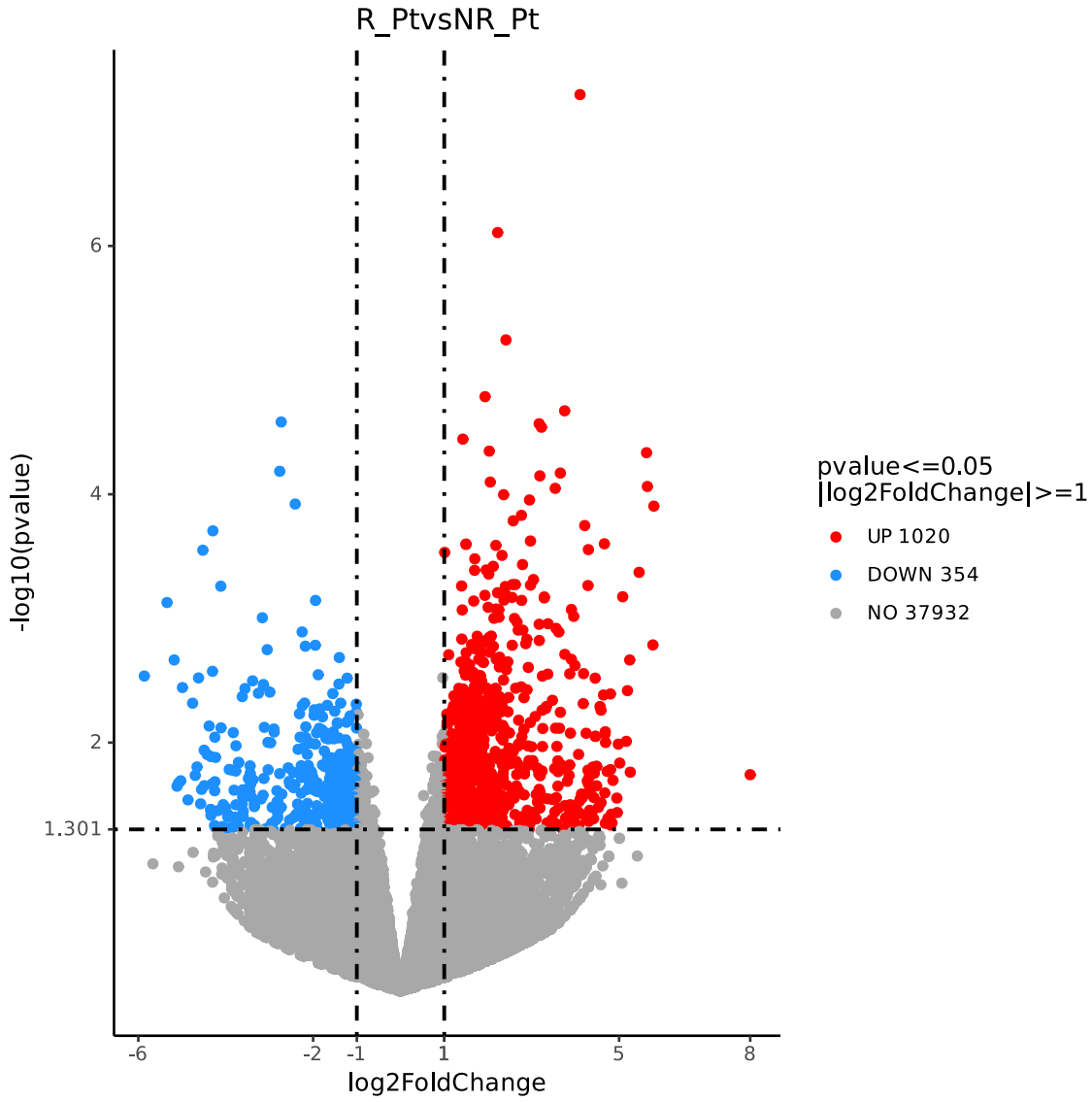
Nakon bojanja hematoksilin-eozinom tkiva pterigija pokazane su promjene i u epitelu i u stromi, uključujući skvamoznu metaplaziju uz gubitak vrčastih stanica u epitelnom sloju te fibrovaskularno vezivno tkivo unutar strome, sastavljeno od kolagena, fibrilarnih struktura i krvnih žila, uz prisutnost upalnih infiltrata. Uzorci pterigija kod kojih je došlo do recidiva pokazivali su povećanu celularnost pri bojanju H&E metodom te opsežniji proces fibroze pri bojanju Massonovim trikromom. Reprezentativne slike prikazane su na Slici 26.



Slika 26. Povećana celularnost i fibroza pterigija koji su recidivirali. Bojanje tkiva pterigija i kontrolne skupine ematoksilinom i eozinom te s Masson trikromom pokazuje veću gustoću stanica i više veziva u tkivu pterigija koji su recidivirali

4.2.1. Transkriptomska analiza

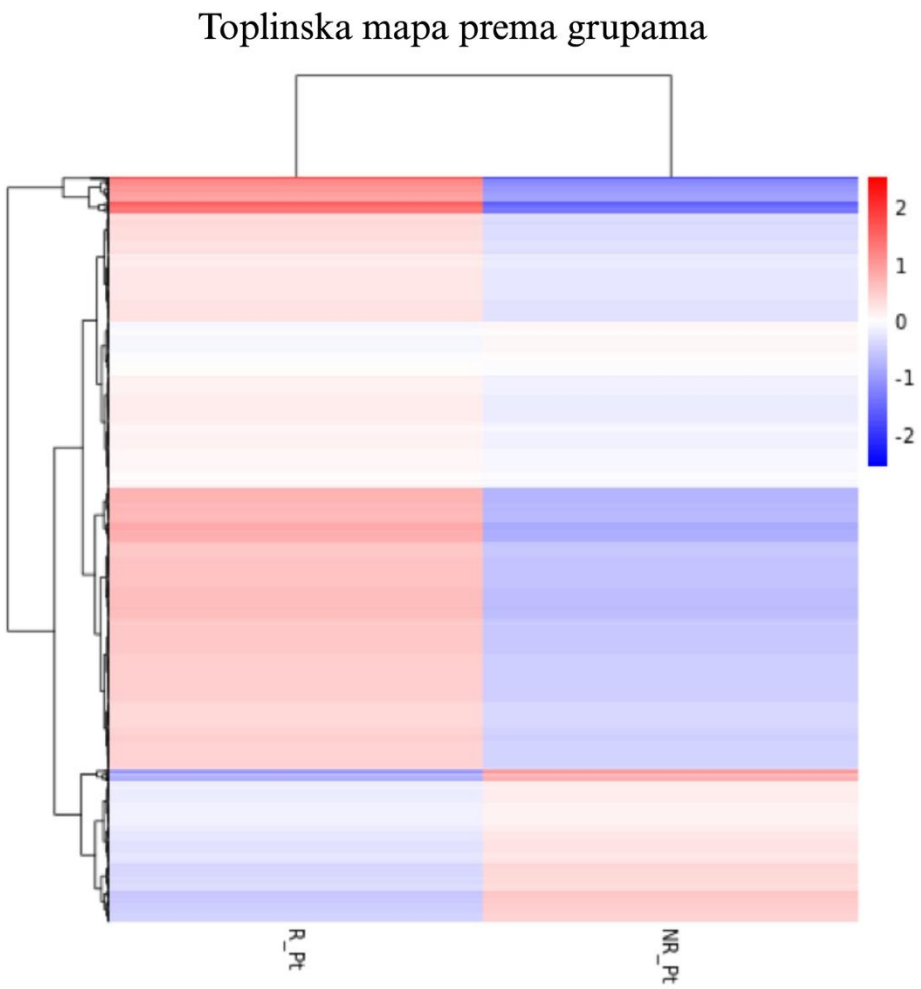
Transkriptomska analiza pokazala je značajne razlike u profilima ekspresije gena između uzoraka pterigija kod kojih je kasnije došlo do recidiva i onih kod kojih do njega nije došlo. Primjenom granične vrijednosti za log2 promjenu omjera (log2 fold change) > 1 i p vrijednosti < 0,05, identificirano je ukupno 1374 gena s diferencijalnom ekspresijom (Slika xx). Među njima, 1020 gena pokazalo je povećanu (uzlaznu) ekspresiju, dok je 354 gena pokazalo smanjenu (silaznu) ekspresiju u usporedbi s genima iz uzoraka pterigija bez recidiva. Dijagram tipa „vulkan" (volcano plot) prikazuje znatne molekularne razlike između dviju skupina (Slika 27).



Slika 27. Diferencijalna ekspresija gena u uzorcima pterigija s recidivom u odnosu na pterigij bez recidiva. Volcano plot prikazuje rezultate diferencijalne ekspresije gena (R_Pt vs. NR_Pt, odnosno pterigij s recidivom vs. pterigij bez recidiva). Os x prikazuje log2 promjenu ekspresije (log2FoldChange), a os y negativni logaritam *p*-vrijednosti (-log10 *p*). Isprekidane linije označuju pragove značajnosti ($p \leq 0,05$; $|\text{log2FoldChange}| \geq 1$). Crvenom bojom označeni su geni s povećanom ekspresijom u pterigiju s recidivom (n = 1020), plavom geni sa smanjenom ekspresijom (n = 354), a sivom geni koji ne zadovoljavaju zadane kriterije (n = 37 932).

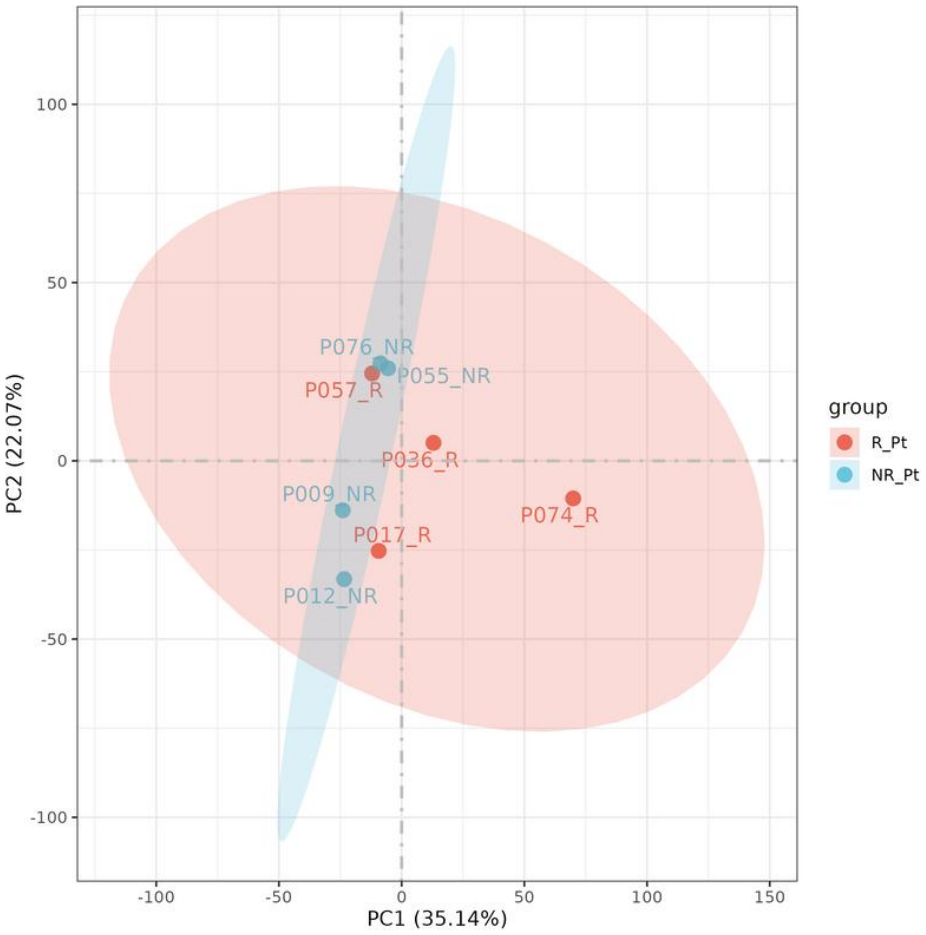
.

Toplinska mapa koja sažima profile ekspresije pokazala je jasnu razdvojenost između uzoraka pterigija koji su kasnije recidivirali i onih koji nisu (Slika 29).



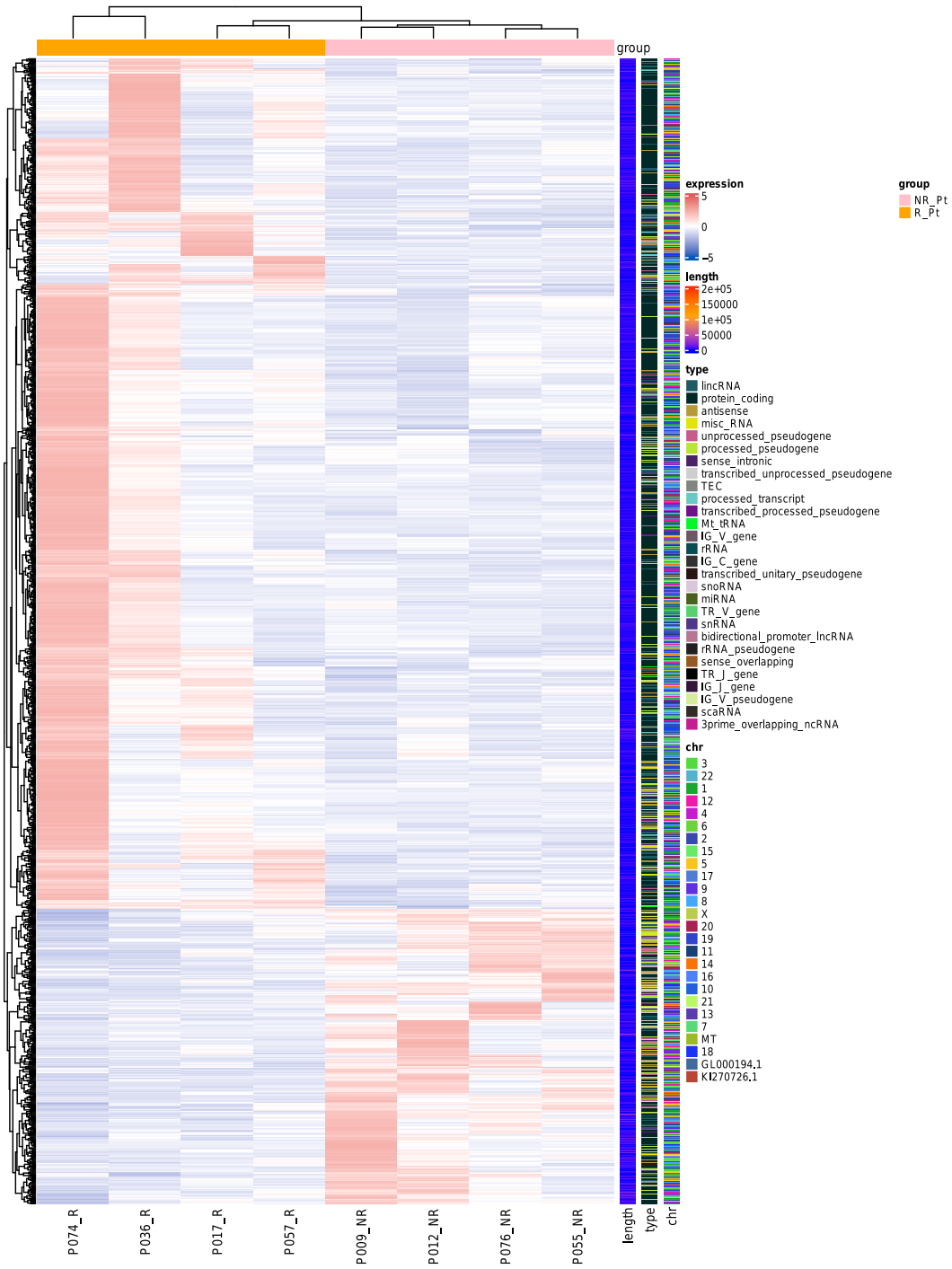
Slika 29. Toplinska karta diferencijalno eksprimiranih gena u pterigiju s recidivom i pterigiju bez recidiva. Toplinska karta (*heatmap*) prikazuje relativnu ekspresiju (Z-vrijednost) diferencijalno eksprimiranih gena u skupinama pterigija s recidivom (R_Pt) i bez recidiva (NR_Pt). Crvena boja označuje višu, a plava nižu ekspresiju u odnosu na prosjek. Geni (redovi) i skupine (stupci) hijerarhijski su grupirani, a dendrogrami prikazuju sličnost među njima.

Kako bi se dodatno procijenila ukupna transkriptomska varijacija, provedena je analiza glavnih komponenata (PCA). Prve dvije glavne komponente (PC1 i PC2) objasnile su 35,14 %, odnosno 22,07 % ukupne varijabilnosti među uzorcima (Slika 30).



Slika 30. Analiza glavnih komponenti (PCA) transkriptoma uzoraka pterigija s recidivom i bez recidiva. Svaka točka predstavlja jedan uzorak pterigija s recidivom (R_Pt, crveno) ili bez recidiva (NR_Pt, plavo). Elipse označuju područje pojedine skupine. Prve dvije glavne komponente objašnjavaju 35,14 % (PC1) odnosno 22,07 % (PC2) ukupne varijabilnosti.

Iako su skupine bile uglavnom razdvojene, uočeno je određeno preklapanje, što ukazuje na to da su skupine dijelile neke transkriptomske sličnosti. Hijerarhijsko grupiranje profila ekspresije gena ukazuje na razlike u ukupnoj ekspresiji gena među pojedinačnim uzorcima pterigija (Slika 31).



Slika 31. Toplinska karta diferencijalno eksprimiranih gena u pterigiju s recidivom i pterigiju bez recidiva. Toplinska karta (*heatmap*) prikazuje relativnu ekspresiju diferencijalno

eksprimiranih gena (Z-vrijednost) u pojedinačnim uzorcima pterigija s recidivom (R_Pt: narančasto) i bez recidiva (NR_Pt: ružičasto). Crvena boja označuje višu, a plava nižu ekspresiju. Geni (redovi) i uzorci (stupci) hijerarhijski su grupirani. Dodatne trake desno prikazuju duljinu gena (*length*), tip transkripta (*type*; npr. protein-kodirajući geni, lncRNA, pseudogeni) i kromosom na kojem se gen nalazi (*chr*).

Također, treba istaknuti da je uzorak pacijenta s najranijim recidivom (P074_R), koji se pojavio 3 mjeseca nakon operacije, pokazao najizraženije transkriptomske promjene u odnosu na uzorke bez recidiva. Nasuprot tome, uzorak (P057_R, kod kojeg je do recidiva došlo nakon 13 mjeseci, pokazao je znatno manji broj gena s diferencijalnom ekspresijom. S obzirom na vrlo mali broj uzoraka, ovo je zapažanje istraživačkog karaktera te se ne može zaključiti o postojanju veze između opsega transkriptomske promjene i vremena do pojave recidiva.

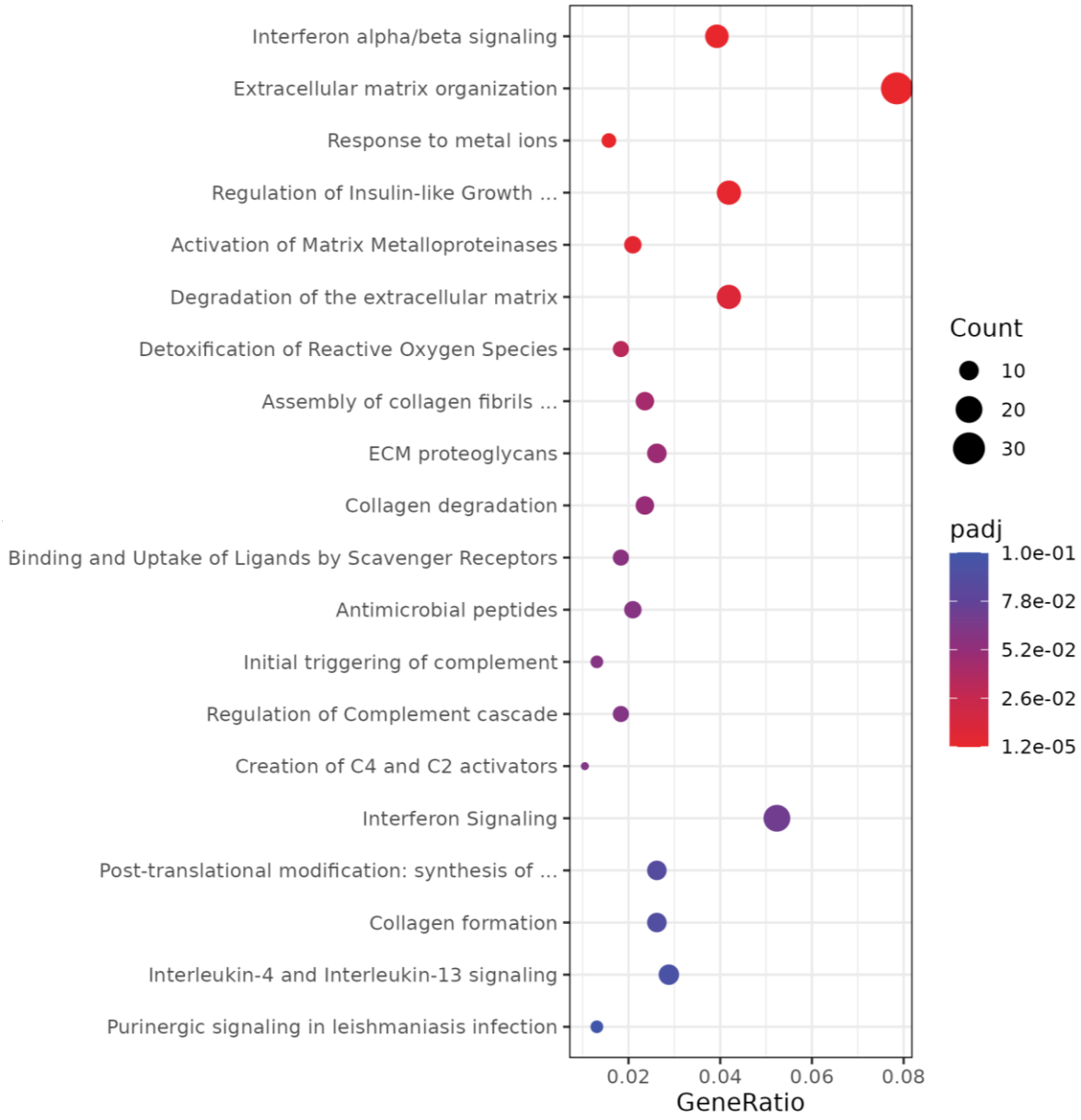
4.22. Geni čiji porast karakterizira pterigije koji će recidivirati

Među uzorcima pterigija koji su se naknadno ponovno pojavili, identificiran je zaseban skup pojačano aktivnih gena. Najviše su pojačano regulirani geni:ECM1, HOXB5, SHISAL1, CWH43, MARCO i PSORS1C1.

Tablica 3. Geni s najizraženijom povećanom ekspresijom u pterigiju s recidivom u odnosu na pterigij bez recidiva.

Ime gena	P	P pril	Log promjena
SHISAL1	<0,001	0,009	2,222
ECM1	<0,001	0,044	2,412
CWH43	<0,001	0,083	3,754
MARCO	<0,001	0,083	3,171
FST	<0,001	0,092	1,426
PSORS1C1	<0,001	0,097	2,029
HOXB5	<0,001	0,097	5,628

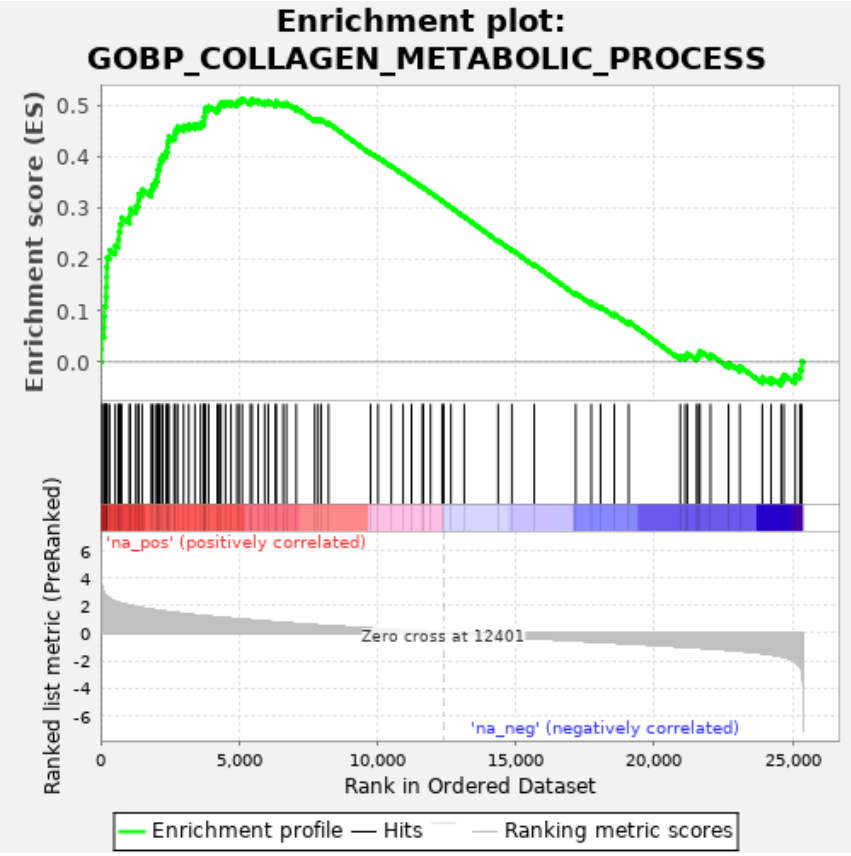
Analiza obogaćivanja reaktomskih puteva pokazala je da su pojačano regulirani geni pretežno povezani s preoblikovanjem izvanstaničnog matriksa i urođenim imunološkim odgovorima (Slika 32). Putovi povezani s izvanstaničnim matriksom bili su najizraženije obogaćeni, sa sedam od dvadeset najboljih reaktomskih puteva.



Slika 32. Obogaćenje Reactome signalnih puteva među diferencijalno eksprimiranim genima u pterigiju s recidivom u odnosu na pterigij bez recidiva. Dot-plot prikazuje 20 najviše obogaćenih Reactome puteva. Os x prikazuje omjer gena (*GeneRatio*), veličina točke odgovara broju diferencijalno eksprimiranih gena u putu (*Count*), a boja prilagođenoj *p*-vrijednosti (padj; od crvene, najniža vrijednost, do plave, najviša). Najveći omjer gena i broj gena ima organizacija izvanstaničnog matriksa. Najznačajnije su obogaćeni putevi vezani uz izvanstanični matriks (organizacija i razgradnja izvanstaničnog matriksa, aktivacija matriks metaloproteinaza), signalizaciju interferona alfa/beta, odgovor na metalne ione i regulaciju

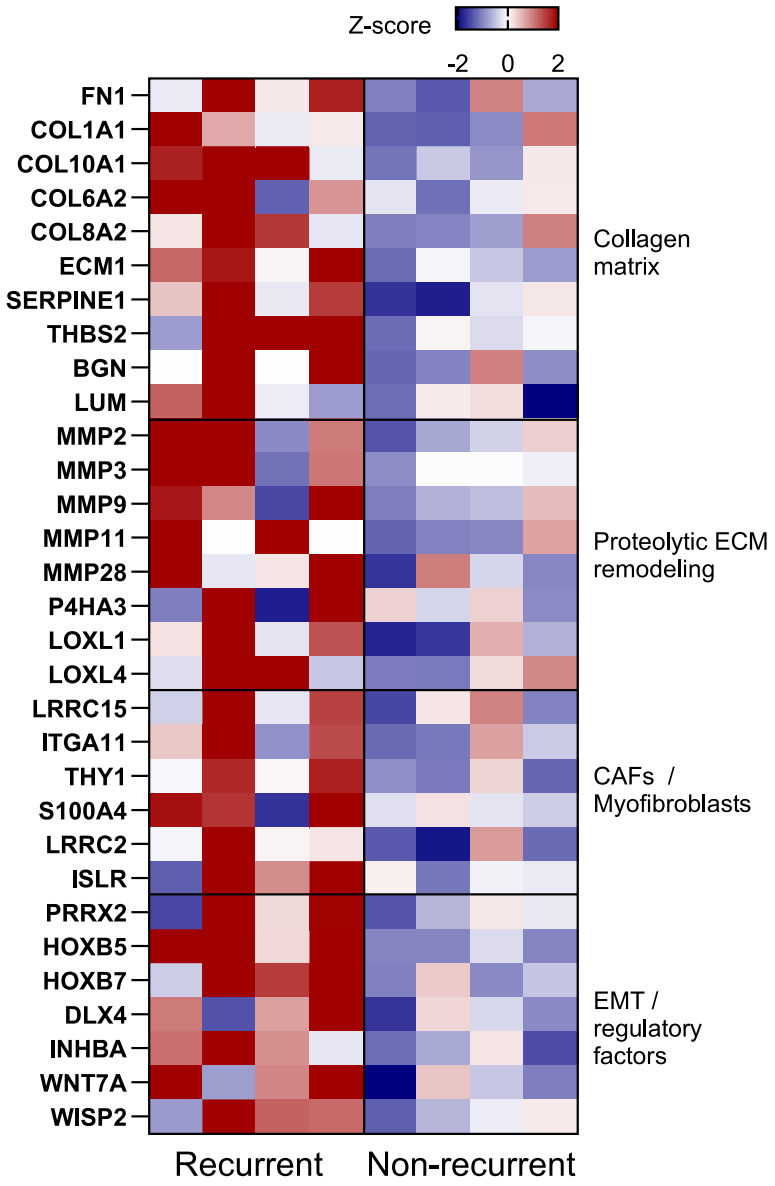
čimbenika rasta sličnih inzulinu. Uz njih su prikazani i putevi razgradnje kolagena, sastavljanja kolagenskih fibrila, proteoglikana ECM-a, komplementa, antimikrobnih peptida te signalizacije IL-4 i IL-13.

U skladu s tim nalazima, analiza obogaćivanja genskog skupa pokazala je značajno obogaćivanje metaboličkih procesa kolagena, što ukazuje na pozitivnu povezanost između pojačanog metabolizma kolagena i naknadne ponovne pojave pterigija (Slika 33).



Slika 33. Obogaćenje genskog skupa collagena i metaboličkih procesa (GSEA, *PreRanked*). GSEA enrichment plot prikazuje krivulju obogaćenja (*enrichment score*, ES), položaj gena iz skupa (crne crte) na rangiranoj listi gena te vrijednosti metrike rangiranja (*ranked list metric*). Geni su rangirani od pozitivno korelirane skupine (lijevo, crveno) do negativno korelirane skupine (desno, plavo). Maksimalni ES iznosi približno 0,5, a većina gena iz skupa nalazi se na početku liste, što upućuje na obogaćenje u skupini s pozitivnom korelacijom, odnosno na pojačanu ekspresiju gena povezanih s metabolizmom kolagena u toj skupini.

Također, usporedba gena kolagenske matriksa i gena uključenih u preoblikovanje ECM-a pokazala je jasnu razliku između uzoraka pterigija koji su se naknadno ponovili i onih koji se nisu (Slika 34). Nadalje, geni uključeni u aktivaciju fibroblasta i epitelno-mezenhimalnu tranziciju također su pojačano regulirani u uzorcima pterigija koji su se naknadno ponovili (Slika 34).



Slika 34. Ekspresija odabranih gena povezanih s izvanstaničnim matriksom, proteolitičkim remodeliranjem, fibroblastima povezanima s tumorom/miofibroblastima i EMT-om u pterigiju s recidivom i bez recidiva. Toplinska karta (*heatmap*) prikazuje relativnu ekspresiju (Z-vrijednost) odabranih gena u pojedinačnim uzorcima pterigija s recidivom (*Recurrent*, n = 4) i bez recidiva (*Non-recurrent*, n = 4). Crvena boja označuje višu, a plava nižu ekspresiju u odnosu na prosjek. Geni su grupirani prema funkciji: kolagenski

matriks (*FN1*, *COL1A1*, *COL10A1*, *COL6A2*, *COL8A2*, *ECM1*, *SERPINE1*, *THBS2*, *BGN*, *LUM*), proteolitičko remodeliranje ECM-a (*MMP2*, *MMP3*, *MMP9*, *MMP11*, *MMP28*, *P4HA3*, *LOXL1*, *LOXL4*), fibroblasti povezani s tumorom (CAF) i miofibroblasti (*LRRC15*, *ITGA11*, *THY1*, *S100A4*, *LRRC2*, *ISLR*) te EMT i regulatorni čimbenici (*PRRX2*, *HOXB5*, *HOXB7*, *DLX4*, *INHBA*, *WNT7A*, *WISP2*). Većina gena pokazuje višu ekspresiju u pterigiju s recidivom.

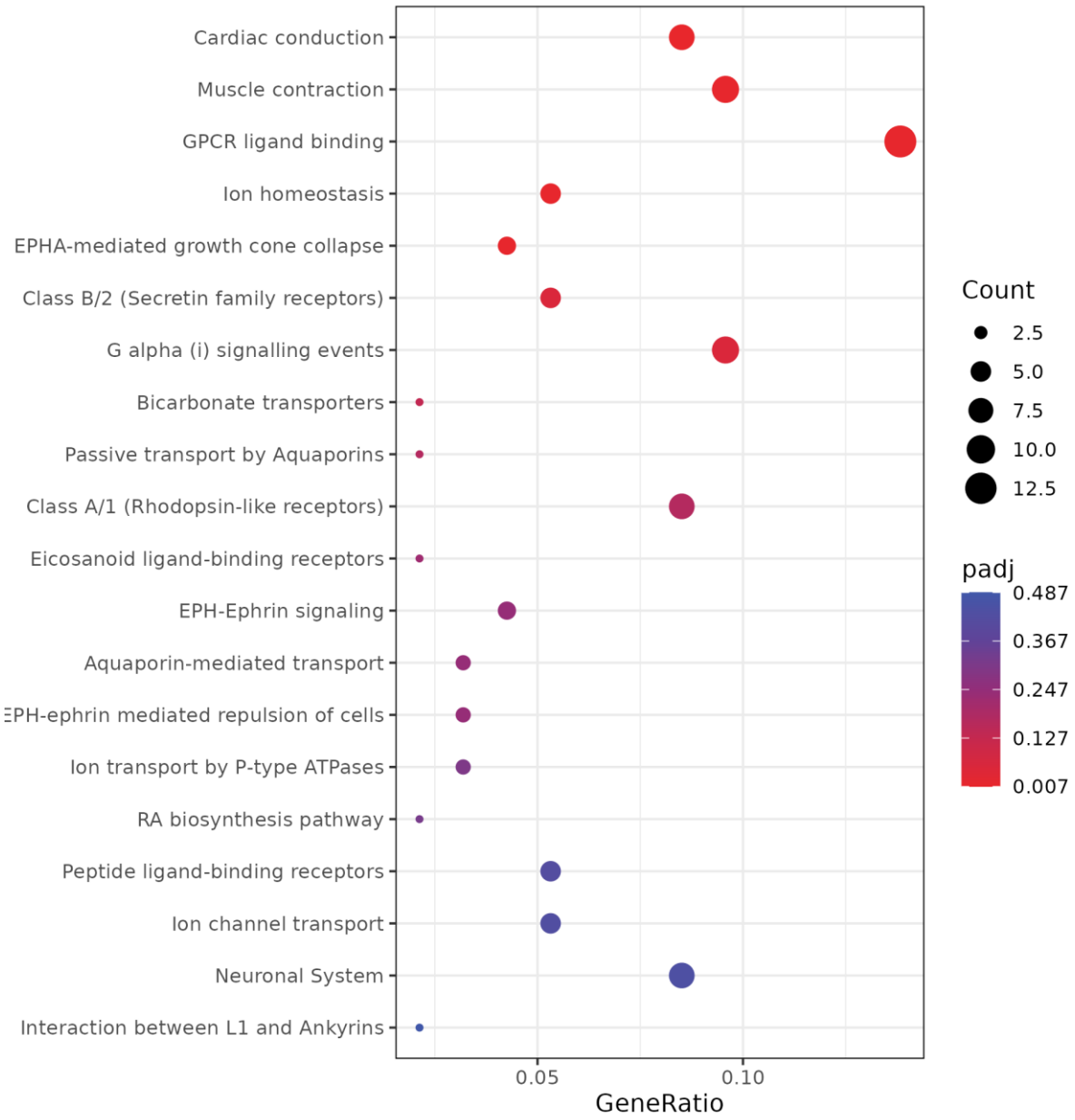
4.2.2. Down regulation

Među uzorcima pterigija kod kojih je kasnije došlo do recidiva, geni s najizraženijim smanjenjem ekspresije bili su LCN10 (lipokalin 10), ZBTB16 (transkripcijski čimbenik) i GPR101 (GPCR receptor). Ti geni predstavljaju biološke funkcije povezane s aktivnošću proteina nosača, regulacijom transkripcije, odnosno signalizacijom posredovanom siročićima receptorima (Tablica 4).

Tablica 4. Geni sa smanjenom ekspresijom u pterigiju s recidivom u odnosu na pterigij bez recidiva.

Ime gena	P	P pril	Log promjena
LCN10	<0,001	0,117	-2.765
ZBTB16	<0,001	0,143	-2.41
GPR101	<0,001	0,189	-4.294

Analiza obogaćenja putova (prema bazi Reactome) za gene s smanjenom ekspresijom otkrila je značajno obogaćenje putova uključenih u signalizaciju posredovanu receptorima spregnutim s G-proteinima (GPCR), prijenos iona, neuronsku komunikaciju i funkciju mišića (Slika xx). Istaknuti putovi uključivali su vezanje liganda za GPCR, signalne događaje povezane s G-alfa (i) podjedinicom, prijenos putem ionskih kanala, živčani sustav te signalizaciju putem EPH-efrin sustava (Slika 35).



Slika 35. Obogaćenje Reactome signalnih puteva među genima sa smanjenom ekspresijom u pterigiju s recidivom u odnosu na pterigij bez recidiva. Dot-plot prikazuje 19 najviše obogaćenih Reactome puteva. Os x prikazuje omjer gena (*GeneRatio*), veličina

točke odgovara broju diferencijalno eksprimiranih gena u putu (*Count*), a boja prilagođenoj *p*-vrijednosti (padj; od crvene, najniža vrijednost, do plave, najviša). Najveći omjer gena i broj gena ima put vezanja liganada na GPCR receptore. Najniže padj vrijednosti imaju putevi srčane provodljivosti, mišićne kontrakcije, vezanja GPCR liganada, homeostaze iona, kolapsa stožca rasta posredovanog EPHA, receptora klase B/2 (obitelj sekretina) i signalnih događaja G alfa (i). Uz njih su prikazani putevi transporta bikarbonata i akvaporina, receptora klase A/1 (slični rodopsinu), signalizacije EPH-efrina, transporta iona P-tipa ATPaza i neuronskog sustava.

5. RASPRAVA

5.1. Uloga Malassezia restricta u razvoju pterigija

U našem istraživanju analizirali smo mikrobiotu uzorka pterigija i usporedili ga s mikrobiotom zdravog tkiva spojnice. Utvrdili smo značajnu prisutnost gljiva u većini uzoraka pterigija, pri čemu je prevladavala vrsta *Malassezia restricta*. Na temelju naših rezultata pretpostavljamo da postoji mogući patofiziološki mehanizam u kojem *Malassezia restricta* ima ulogu nastanku i razvoju pterigija.

Poznato je da različiti dijelovi ljudskog tijela su nastanjeni različitom mikrobiotom, a promjene u sastavu mikrobiote - disbiozom, a koja je povezana s nastankom i progresijom brojnih bolesti (99,104). Brojna su istraživanja proučavali gastrointestinalni sustav koji predstavlja jedan najvećih miokribioma u našem organizmu te je demonstrirana uloga u mikrobiote u brojnim procesima uključujući: imunološki sustav, proliferaciju stanica, regulaciju endokrine funkcije crijeva, neurološke signalizacijem regulaciju probave i reasorpcije hranjivih tvari (105).

Površina oka povijesno se smatrala okruženjem bez mikroorganizama. Međutim, recentna istraživanja pokazala su da je riječ o području sa značajnom mikrobnom raznolikošću (74). U prethodnom istraživanju u koje je analizirana mikrobiota zdrave površine oka, a koja se temeljila na analizi DNA iz brisa spojnice pokazano je 12 temeljnih bakterijskih rodova, uključujući; *Acinetobacter, Aquabacterium, Bradyrhizobium, Brevundimonas, Corynebacterium, Methylobacterium, Propionibacterium, Pseudomonas, Staphylococcus, Sphingomonas, Streptococcus* i *Streptophyta* (77).

Međutim, nebakterijske komponente mikrobiote spojnice, poput virusa, gljiva, arheja i protista, ostale su uglavnom neistražene. S obzirom na navedeno u našem istraživanju proveli smo metagenomsku analizu uzoraka zdrave spojnice i uzoraka pterigija kako bih stekli uvid u sastav i potencijalne razlike njihovih mikrobiota. Iznenađujuće, utvrdili smo prisutnost vrste *Malassezia restricta* u četiri od pet analiziranih uzoraka pterigija. Navedeno neočekivano otkriće potaknulo nas je da dodatno analiziramo i razjasnimo moguću poveznicu između *Malassezia restricta* i nastanka ptergiija. Vrste roda *Malassezia* prepoznate su kao uzročnici određenih kožnih bolesti, što ih čini mogućim čimbenikom u razvoju pterigija (95). Također, recentne studije pokazali su poveznicu između *Malassezia* i drugih patoloških stanja, kao što su duktalni adenokarcinom gušterače (engl. *pancreatic ductal adenocarcinoma* (PDAC)), Crohnove bolesti i pogoršanja plućne funkcije u bolesnika s cističnom fibrozom (CF) (96,97,106,107). Navedeni rezultati upućuju na to da *Malassezia* može negativno utjecati kao patogen u različitim tkivima ako za to postoje povoljni lokalni uvjeti(96). Nadalje, uloga

Malassezia najdetaljnije je razjašnjena u razvoj PDAC. Stanice PDAC-a nakon stimulacije s *Malassezia* otpuštaju IL-33. IL-33 zatim potiče lokalni imunološki odgovor tipa 2, koji je karakterizira prisutnošću Th2 stanice i ILC2. Navedeno imunološko okruženje pogoduje rastu PDAC-a (98). IL-33 također potiče Th2-stanice i ILC2 na otpuštanje IL-4 i IL-13, citokina koji usmjeravaju diferencijaciju makrofaga u alternativni fenotip sličan M2 fenotipu (108). Ti tipovi makrofaga dovode do redukcije upale, potiču cijeljenje rana i uzrokuju nastanak fibroze (100,101). U nastavku našeg istraživanja imunohistokemijskom analizom i profiliranjem ekspresije gena demonstrirali smo veliku zastupljenost makrofaga polariziranih u M2 fenotip u tkivu pterigija. Alternativno aktivirani M2 makrofagi smatraju se glavnim pokretačima fibroze, a koji je jedan od najtipičnijih procesa u nastanku i progresiji pterigij te je također utvrđeno da prevladava u histološkim nalazima i nalazima ekspresije gena u našem istraživanju. Glavni molekularni pokretač fibroze jest TGF-β1, koji proizvode makrofagi (102). U našem je istraživanju utvrđena povišena razina TGF-β1 u tkivu pterigija, što ukazuje na moguću ulogu gljive *Malassezia* u razvoju pterigija putem međudjelovanja imunološkog okruženja potaknutog tom gljivom, imunološkog odgovora, aktivacije makrofaga i, naposljetku, fibroze. Dokaz koji podupire moguću ulogu gljive *Malassezia* u nastanku pterigija jest zapažanje da se najznačajnija promjena u ekspresiji gena dogodila kod gena CHIT1, koji kodira hitinazu 1. Hitinaza 1 je enzim koji izlučuju aktivirani ljudski makrofagi i koji ima zaštitnu ulogu razgradnjom hitina, a koja je ključna komponenta stanične stjenke gljive *Malassezia* (109,110). Povećana ekspresija gena CHIT1 ukazuje na reakciju urođenog imunosnog sustava usmjerenu protiv vrste *Malassezia restricta*. Štoviše, *Malassezia* je kvasac ovisan o lipidima, a u uzorcima pterigija otkrili smo promijenjenu ekspresiju gena uključenih u metabolizam lipida. Taj nalaz sugerira da *Malassezia* nije tek slučajno prisutna u tkivu pterigija te vjerojatno igra jednu od ključnih uloga u razvoju i progresiji pterigija (111,112). Također, zanimljivo je da smo demonstrirali obrasce ekspresije gena koji ukazuju na izloženost UV zračenju, angiogenezu, epitelno-mezenhimsku tranziciju i proliferaciju, a koji su dobro poznata obilježja patofiziološkom kaskadi nastanka i progresije pterigija (113). Finalno, pokazali smo metagenomsko metodom „sačmarica" prisutnost roda *Cutibacterium,* skupine rezidentnih komenzalnih bakterija kože, u našim uzorcima pterigija. Međutim, taj se bakterijski rod obično povezuje s proupalnim odgovorom, karakteristikom koja je uglavnom izostala u našim uzorcima pterigija (114).

5.2. Genske ekspresije povezani s recidivom pterigija

U drugog dijelu našeg istraživanja pokazali smo da su primarna tkiva pterigija koja su kasnije razvila recidiv pokazala izrazit transkriptomski profil koji je već bio prisutan u vrijeme inicijalne operacije. Najistaknutije bile su molekularne promjene koje su uključivale preoblikovanje izvanstaničnog matriksa i urođenih imunoloških puteva, a što sugerira da je pojava recidiva povezana s intrinzičnim biološkim karakteristikama primarne lezije, a ne samo s postoperativnim cijeljenjem kirurške rane.

Klinički, ukupna stopa recidiva u našoj kohorti iznosila je 5,8%, što je u skladu s objavljenim stopama recidiva nakon autotransplantacije konjunktive (50). Nadalje, svi slučajevi recidiva bolesti dogodili su se kod klinički uznapredovalog pterigije (Tan stupnjevi 2 i 3), što ukazuje na prethodna zapažanja da je težina lezije povezana s povećanim rizikom od recidiva (115). Iako je histološkom analizom pokazana samo pozitivan trend prema povećanoj celularnosti kod uzoraka koji su naknadno razvili recidiv bolesti, molekularnom analizom demonstrirana je značajna razlike. Također, izrazito je važno naglasiti da se recidiv bolesti pojavio unutar prve postoperativne godine, a uzorak s najranijim recidivom pokazao je najizraženije transkriptomske promjene. Međutim, budući pojava recidiva pokazala isključivo kod klinički uznapredovale pterigije (Tan stupnjevi 2 i 3), možemo zaključiti da kirurška ekscizija kod Tan stupnja 1 mogla značajno smanjiti rizik od pojave recidiva pterigija. Potrebna su dodatna prospektivna istraživanja koja bih dodatno razjasnila ulogu rane kirurške intervencije s obzirom na činjenicu da su lezije Tan stupnja 1 većinom asimptomatske prije nego što se preporuči bilo kakva promjena u vremenu operacije.

Pojačani profil ekspresije gena sugerira pojačano remodeliranje izvanstanične matriksa (ECM) i aktivaciju imunološki povezanih putova, što je u skladu s patogenezom pterigija (31). Većina pojačano reguliranih gena povezana je s organizacijom ECM-a i remodeliranjem tkiva, što demonstrirano i u drugim istraživanjima. Posebno, protein izvanstaničnog matriksa 1 (engl. extracellular matrix protein 1, ECM1) reguliran glikoprotein koji doprinosi organizaciji matrice, angiogenezi i homeostazi tkiva, dijelom inhibicijom MMP9 (116). Također, CWH43 gen kodira protein povezan s staničnom membranom, a koji je uključen u biosintezu glikozil-fosfatidil-inozitolnog sidra i stanične obrade membranskih proteina, važnih procesa koji podupiru remodeliranje izvanstaničnog matriksa (117). Nadalje, folistatin ima ključnu ulogu u vezanju i neutralizacija proteina iz skupine TGF-βecm, a koja uključuje aktivine, miostatin, koštane morfogenetske proteine, reguliranje rasta tkiva, razvoj mišića i staničnu diferencijaciji (118). Iako je prvenstveno prepoznat kao razvojni transkripcijski faktor, HOXB5 također može

doprinijeti remodeliranju ECM-a putem svojih uloga u embrionalnom oblikovanju, organogenezi i morfogenezi kostiju (119).

Uz gene povezane s ECM-om, nekoliko gena s pojačanom ekspresijom sudjeluje u regulaciji imunosnog odgovora, a što je još jedan od obilježja patogeneze pterigija. Gen MARCO kodira receptor za čišćenje (engl. *scavenger receptor*) koji eksprimiraju makrofagi i koji posreduje u prepoznavanju i uklanjanju patogena, dok gen PSORS1C1 kodira nuklearni protein genetski povezan s psorijazom (120,121). Međutim, gen SHISAL do sada je slabo okarakteriziran, nepoznate je funkcije te mu se za sada nije mogla pripisati uloga u pojavi recidiva bolesti. Nalazi iz prethodnih istraživanja podudaraju se s našim rezultati, a koji potvrđuju ulogu u patofiziološkom mehanizmu aberantnog remodeliranja ECM-a i aktivacije imunosnog sustava u molekularne mehanizme razvoja i recidiva pterigija.

Transkriptomski nalazi nadalje upućuju na koordinirano smanjenje ekspresije nekoliko gena, uključujući LCN10, ZBTB16 i GPR101. LCN10 sudjeluje u aktivaciji makrofaga, odgovoru na lipopolisaharid, odgovoru na stres i odgovoru na interferon tipa II, što dodatno pospješuje nastanak upalnih promjena koje pridonose razvoju recidiva bolesti (122). Dva dodatna gena sa smanjenom ekspresijom, ZBTB16 i GPR101, do sada su slabije istražena u literaturi, ali radi se o transkripcijskom represoru i signalnom receptoru (engl. *orphan receptor*) bez očite povezanosti s recidivom pterigija (123,124).

5.3. Ograničenja i nedostaci studije

Glavni nedostaci našeg istraživanja bila je manji uzorak u metagenomskoj analizi, a koji je mogao utjecati na mogućnost generalizacije naših rezultata. Također, na rezultate mogao utjecati i presječni dizajn studije te činjenica da je provedena u jednom centru. Nadalje, transkriptomske analize temeljile su se na razmjerno malom broju uzoraka i samo jednoj vrsti analize, što može umanjiti statističku snagu i sposobnost otkrivanja suptilnih, ali biološki značajnih promjena. Iako su transkriptomske analize provedene na ograničenom broju uzoraka recidiva, a primarno zbog toga što je je sama pojava recidiva bila rijetka dosljednost takvih rezultata dobivenih analizom glavnih komponenti, hijerarhijskim grupiranjem, analizom obogaćenja putova (Reactome) i analizom obogaćenja skupova gena potvrđuje da uočeni transkriptomski potpis odražava temeljne biološke razlike, a ne nasumične varijacije. Unatoč tome, potrebna su dodatna multicentrična istraživanja na većem uzorku i s dugotrajnim

praćenjem kako bih se u potpunosti razjasnila uloga navedenih mehanizama u nastanku i razvoju pterigija i pojavi recidiva.

6. ZAKLJUČCI

1. *Malassezia restricta* ima veću pojavnost u tkivu pterigija u usporedbi s kontrolnim tkivom.
2. Ekspresija gena *CHIT1* povećana je u tkivu pterigija u usporedbi s kontrolnim tkivom.
3. Ekspresije gena karateristčnih za M2 makrofage, poput CD163 i TGFβ1, povećana je u tkivu pterigija.
4. Obrazac izražaja gena u tkivu pterigija koji će recidivirati razlikuje se od izražaja gena u pterigiju koji neće recidivirati. .
5. Prevalencija recidiva pterigija nakon kirurškog zahvata nalazi se unutar svjetskih standarda.

7. SAŽETAK

Uvod: Pterigij je fibrovaskularna lezija koja invadira očnu površinu i uzrokuje simptome žuljanja, crvenila, upale, estetske smetnje, ali i smanjenje vidne oštrine. Usprkos brojnim istraživanjima točan mehanizam nastanka pterigija još uvijek nije otkriven. Jedini način uklanjanja pterigija je kirurški zahvat, no recidivi su česti, te uzrokuju teže kliničke slike.

Ciljevi: Našim istraživanjima usporedili smo mikrobiotu pterigija i zdrave spojnice oka. Također smo analizirali inicijalne molekularne promjene u pterigiju u osoba koje su razvili recidiv te ih usporedili s promjenama u pacijenata koji u praćenju od 7.32 godine nisu razvili recidiv pterigija.

Materijali i metode: Istraživanja obuhvaćaju metagenomsku analizu, te analizu transkriptoma u pet uzoraka pterigija, kaoi usporedbu s pet tkiva zdravih spojnica. Također, na uzorku od 85 pacijenta izvršeno je praćenje radi pojave recidiva bolesti te je uspoređen transkriptom na pet inicijalnih uzoraka pterigija kod pacijenata koji su razvili recidiv s pterigijom pacijenata koji nisu razvili recidiv bolesti.

Rezultati: Metagenomska analiza pokazala je povišenu prisutnost gljivice *Malassezia restricta* u pet uzoraka ptergija u usporedbi s uzorcima zdrave konjunktive. Prisutnost gljivice *Malassezia restricta* dodatno je potvrđena florescein *in situ* hibridizacijom. Najizraženiji gen u tkivima pterigija je *CHIT1*, gen koji ima značajnu ulogu u obrani od gljivica. U uzorcima pterigija povišen je izražaj biljega fibroze, te M2 makrofaga. Također, pozitivno je i imunohistokemijsko bojanje na CD162, marker aktiviranih M2 makrofaga. Navedeno upućuje na aktivnu ulogu gljivice *Malassezia restricta* u razvoju pterigija. Nadalje, na uzorku od osamdeset i pet pacijenta praćenih postoperativno, 5.8% pacijenata gradusa TAN 2 i 3 razvilo je recidic, u prosjeku 8.87 mjeseci nakon operacije pterigija. Analizom transkriptoma utvrdili smo 1374 različito ekspirimirana gena, od kojih je 1020 bilo pojačano izraženo, a 354 je imalo smanjeni izražaj. Pojačano izraženi geni su *ECM1, HOXB5, MARCO, SHISAL1, CWH43* i *PSORS1C1, a oni* su pretežito uključeni u procese ekstracelularnog remodeliranja i prirođene imunosti. Smanjeni izražaj gena *LCN10, ZBTB16, GPR101* upućuje na povezanost s GPCR signaliziranjem i neuronalnom komunikacijom.

Zaključak: Metagenomskim istraživanjem mikrobiote pterigija, pronašli smo povezanost prisutnosti gljivice *Malassezia restricta* i pterigija. Također, utvrdili smo obrazac genske aktivnosti koji postoji u vrijeme inicijalne operacije, a koji pretkazuje pojavu recidiva

pterigija.. Molekularne promjeneizvanstaničnog remodeliranja i prirođene imunosti u budućnosti bi mogle biti kandidati za biomarkere za recidiv bolesti.

8. LAIČKI SAŽETAK

Pterigij, bolest koja zahvaća površinu rožnice ima značajan utjecaj na svakodnevni život pacijenata zbog žuljanja, crvenila i smanjenog vida. Jedino rješenje uklanjanja tegoba je operacija, koja je uspješna ali se bolest često ponovno vrati. Način na koji bolest nastaje i razlozi zbog kojih se vraća još nisu poznati.

U ovom istraživanju analizirani su uzorci tkiva pterigij i uspoređeni su s normalnim tkivom. Nadalje, analizirana su tkiva pterigija u pacijenta kod kojih se bolest kasnije vratila i uspoređena su s tkivima osoba u kojih se bolest nije vratila. Analiza je provedena na razini gena te su identificirani geni koji su uključeni u procese karakteristične za razvoj pterigija.

Istraživanje je otkrilo moguću povezanost gljivice *Malassezia restricta* i nastanka pterigija. Nadalje, pacijenti kojima se pterigij vraća imaju izraženu akrivnost određenih gena prije nego što su razvili ponovnu bolest, što bi se potencijalno moglo koristiti kao biljeg kojim bi mogli predvidjeti kojima će se pacijentima bolest vratiti.

9. LAY SUMMARY

Pterygium, a condition affecting the surface of the cornea, significantly impacts patients' daily lives by causing irritation, redness, and reduced vision. The only way to alleviate these symptoms is through surgery; while the procedure is successful, the condition frequently recurs. The mechanisms underlying the development of the disease and the reasons for its recurrence are not yet fully understood.

In this study, tissue samples from patients who developed pterygium were analyzed and compared with tissue from individuals without the condition. Furthermore, tissue samples from patients who experienced a recurrence were compared with those from patients who did not. The analysis was conducted at the genetic level, identifying genes involved in processes characteristic of pterygium development.

The research revealed a potential link between the fungus *Malassezia restricta* and the development of pterygium. Additionally, it was found that patients who experienced a recurrence exhibited heightened activity of specific genes prior to the return of the condition—a finding that could potentially serve as a biological marker to predict which patients are at risk of recurrence.

10. SUMMARY

ASSOCIATION OF SPECIFIC MICROBIOTA COMPONENTS AND THE FUNGUS *MALASSEZIA RESTRICTA* WITH PTERYGIUM

Introduction: Pterygium is a fibrovascular lesion that invades the ocular surface, causing symptoms such as irritation, redness, and inflammation, as well as aesthetic concerns and a reduction in visual acuity. Despite extensive research, the exact mechanism of its development remains not fully understood. The only way to remove this growth is through surgery; however, recurrences frequently occur, often leading to more severe clinical presentations.

Objectives: In our study, we compared the microbiota of pterygium tissue with that of healthy conjunctiva. We also analysed initial molecular changes in pterygium tissue from individuals who subsequently experienced a recurrence, comparing these to changes observed in patients who did not develop a recurrence over a follow-up period of 7.32 years.

Materials and Methods: The study involved metagenomic and transcriptomic analysis of five pterygium samples, compared against five samples of healthy conjunctival tissue. Additionally, a cohort of 85 patients was monitored for disease recurrence. The transcriptomic profiles of initial pterygium samples from patients who experienced a recurrence were compared with those from patients who did not.

Results: Metagenomic analysis revealed an increased prevalence of the fungus *Malassezia restricta* in the five pterygium samples compared to the healthy conjunctival samples. The presence of *Malassezia restricta* was further confirmed using fluorescence *in situ* hybridization. The most prominent gene expression in pterygium tissues is *CHIT1*, a gene that plays a significant role in defence against fungi. Pterygium samples show elevated expression of fibrosis markers, the *IL33* gene, and M2 macrophages. Furthermore, immunohistochemical staining for CD162—a marker of activated M2 macrophages—is positive; these findings collectively suggest an active role for the fungus *Malassezia restricta* in the development of pterygium. Additionally, in a cohort of 85 patients monitored postoperatively, 5.8% of those with a TAN grade of 2 or 3 experienced a recurrence of the condition, with a mean time to recurrence of 8.87 months following pterygium surgery. Transcriptome analysis identified 1,374 expressed genes: 1,020 were upregulated, while 354 were downregulated. The upregulated genes—*ECM1*, *HOXB5*, *MARCO*, *SHISAL1*, *CWH43*, and *PSORS1C1*—are primarily involved in extracellular remodelling processes and innate

immune pathways. The downregulated genes—*LCN10*, *ZBTB16*, and *GPR101*—are associated with GPCR signalling and neuronal communication.

Conclusion: Through a metagenomic investigation of the microbiota in pterygium, we identified an association between the presence of the fungus *Malassezia restricta* and the condition. Furthermore, we established a gene activity pattern—present at the time of the initial surgery—that predicts the recurrence of pterygium. Transcriptomic changes present during initial pterygium surgery are associated with disease recurrence. Changes most pronounced in extracellular remodelling and innate immunity could be candidates for molecular biomarkers for disease recurrence in the future.

11. POPIS LITERATURE

1. Betz J, Galor A. Navigating the Dry Eye Therapeutic Puzzle: A Mechanism-Based Overview of Current Treatments. Bd. 18, Pharmaceuticals. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2025.
2. Pflugfelder SC, Stern ME. Biological functions of tear film. Bd. 197, Experimental Eye Research. Academic Press; 2020.
3. Kumar NR, Praveen M, Narasimhan R, Khamar P, D'Souza S, Sinha-Roy A, et al. Tear biomarkers in dry eye disease: Progress in the last decade. Indian J Ophthalmol. 2023;71(4):1190–202.
4. Ozkan O, Utine CA. Clinical anatomy: cornea and ocular surface. Bd. 14, Medical Hypothesis, Discovery, and Innovation in Ophthalmology. International Virtual Ophthalmic Research Center; 2025. S. 60–72.
5. Takahashi Y, Watanabe A, Matsuda H, Nakamura Y, Nakano T, Asamoto K, et al. Anatomy of secretory glands in the eyelid and conjunctiva: A photographic review. Bd. 29, Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery. 2013. S. 215–9.
6. Chen Y, Wang S, Alemi H, Dohlman T, Dana R. Immune regulation of the ocular surface. Exp Eye Res. 2022;218.
7. Yoo D, Horacek M, Chae MK, Kim JY, Bu P, Yoon JS. The Effect of Rho Kinase Inhibitors on In Vitro Human Orbital Preadipocytes. Ophthalmic Plast Reconstr Surg. 2024;40(2):181–6.
8. Cid-Bertomeu P, Vilaltella M, Martínez M, Mir M, Huerva V. Topical Insulin for Ocular Surface Disease. Bd. 40, Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics. Mary Ann Liebert Inc.; 2024. S. 204–14.
9. Soleimani M, Masoumi A, Momenaei B, Cheraqpour K, Koganti R, Chang AY, et al. Applications of mesenchymal stem cells in ocular surface diseases: sources and routes of delivery. Bd. 23, Expert Opinion on Biological Therapy. Taylor and Francis Ltd.; 2023. S. 509–25.
10. Genna VG, Maurizi E, Rama P, Pellegrini G. Biology and medicine on ocular surface restoration: Advancements and limits of limbal stem cell deficiency treatments. Bd. 35, Ocular Surface. Elsevier Inc.; 2025. S. 57–67.
11. Bu Y, Shih KC, Tong L. The ocular surface and diabetes, the other 21st Century epidemic. Exp Eye Res. 2022;220.
12. Wang X, Jacobs DS. Contact Lenses for Ocular Surface Disease. Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice. 2022;48(3):115–8.

13. Huang R, Su C, Fang L, Lu J, Chen J, Ding Y. Dry eye syndrome: comprehensive etiologies and recent clinical trials. Bd. 42, International Ophthalmology. Springer Science and Business Media B.V.; 2022. S. 3253–72.
14. Zemanova M. DRY EYES DISEASE. A REVIEW. Cesk Slov Oftalmol. 2021;3(77):107–19.
15. Fatima A, Attem J, Esam S, Vemuganti GK. Extracellular Vesicles of Tears and Ocular Surface: An Enigma. Curr Eye Res. 2025;50(12):1225–39.
16. Sullivan DA, da Costa AX, Del Duca E, Doll T, Grupcheva CN, Lazreg S, I sur. TFOS Lifestyle: Impact of cosmetics on the ocular surface. Ocular Surface. 2023;29:77–130.
17. Craig JP, Alves M, Wolffsohn JS, Downie LE, Efron N, Galor A, et al. TFOS Lifestyle Report Executive Summary: A Lifestyle Epidemic - Ocular Surface Disease. Bd. 30, Ocular Surface. Elsevier Inc.; 2023. S. 240–53.
18. Downie LE, Britten-Jones AC, Hogg RE, Jalbert I, Li T, Lingham G, et al. TFOS Lifestyle - Evidence quality report: Advancing the evaluation and synthesis of research evidence. Ocular Surface. 2023;28:200–12.
19. Sheppard J, Shen Lee B, Periman LM. Dry eye disease: identification and therapeutic strategies for primary care clinicians and clinical specialists. Bd. 55, Annals of Medicine. Taylor and Francis Ltd.; 2023. S. 241–52.
20. Srinivas SP, Rao SK. Ocular surface staining: Current concepts and techniques. Bd. 71, Indian Journal of Ophthalmology. Wolters Kluwer Medknow Publications; 2023. S. 1080–9.
21. Doughty MJ. Rose bengal staining as an assessment of ocular surface damage and recovery in dry eye disease-A review. Bd. 36, Contact Lens and Anterior Eye. 2013. S. 272–80.
22. Bron AJ, Evans VE, Smith JA. Grading Of Corneal and Conjunctival Staining in the Context of Other Dry Eye Tests. 2003.
23. Baral P, Kumaran S, Stapleton F, Pesudovs K. A systematic review assessing the quality of patient reported outcome measures in ocular surface disease. Bd. 35, Ocular Surface. Elsevier Inc.; 2025. S. 31–56.
24. Hirst LW. The role of cosmesis in pterygium surgery. Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery. 2022;75(10):3877–903.
25. Solomon A. Pterygium. British Journal of Ophthalmology. 2006;90(6):665–6.

26. Chui J, Coroneo MT, Tat LT, Crouch R, Wakefield D, Di Girolamo N. Ophthalmic pterygium: A stem cell disorder with premalignant features. American Journal of Pathology. 2011;178(2):817–27.
27. Chui J, di Girolamo N, Wakefield D, Coroneo MT. The pathogenesis of pterygium: Current concepts and their therapeutic implications. Ocular Surface. 2008;6(1):24–43.
28. Wanzeler ACV, Barbosa IAF, Duarte B, Borges D, Barbosa EB, Kamiji D, et al. Mechanisms and biomarker candidates in pterygium development. Bd. 82, Arquivos Brasileiros de Oftalmologia. Conselho Brasileiro De Oftalmologia; 2019. S. 528–36.
29. Suarez MF, Echenique J, López JM, Medina E, Irós M, Serra HM, et al. Transcriptome analysis of pterygium and pinguecula reveals evidence of genomic instability associated with chronic inflammation. Int J Mol Sci. 2021;22(21).
30. Rezvan F, Khabazkhoob M, Hooshmand E, Yekta A, Saatchi M, Hashemi H. Prevalence and risk factors of pterygium: a systematic review and meta-analysis. Surv Ophthalmol. 2018;63(5):719–35.
31. Liu L, Wu J, Geng J, Yuan Z, Huang D. Geographical prevalence and risk factors for pterygium: a systematic review and meta-analysis. BMJ Open [Online]. 2013;3:3787. Verfügbar unter: http://tuftscaes.org/meta_analyst/.
32. Yoon CH, Seol BR, Choi HJ. Effect of pterygium on corneal astigmatism, irregularity and higher-order aberrations: a comparative study with normal fellow eyes. Sci Rep. 2023;13(1).
33. Beheshtnejad AH, Ghassemi H, Abdolkhalegh H, Atighehchian M. Clinical and Autofluorescence Findings in Eyes with Pinguecula and Pterygium. J Ophthalmic Vis Res. 2023;18(3):260–6.
34. Aguilar-González M, España-Gregori E, Pascual-Camps I, Pinazo-Durán MD, Peris-Martínez C. Association between Tomographic Characteristics of Pterygium and Preoperative Anterior and Posterior Topography Measured by Anterior Segment Optical Coherence Tomography. 2024;14(10).
35. Rad NR. Treatment of Pterygium on the Refractive Errors: A Systematic Review. Bd. 39, Korean Journal of Ophthalmology. Korean Ophthalmological Society (KOS); 2025. S. 269–87.
36. Rodriguez JA, Ferrari C, Hernández GA. Intraoperative application of topical mitomycin C 0.05% for pterygium surgery. Bol Asoc Med P R. 2004;96(2):100–2.

37. Han J, Gong Q, Zhu X, Ji R, Li M, Wang H, et al. Vascular characteristics and haemodynamics of severe and mild pterygium: a quantitative analysis. Ann Med. 2025;57(1).
38. Tan DTH, Chee SP, Dear KBG, Arthur ;, Lim SM. Effect of Pterygium Morphology on Pterygium Recurrence in a Controlled Trial Comparing Conjunctival Autografting With Bare Sclera Excision.
39. Arai Y, Makino S, Obata H. Stocker's line in pterygium. Bd. 18, Journal of General and Family Medicine. Wiley-Blackwell; 2017. S. 92–3.
40. Viso E, Gude F, Rodríguez-Ares MT. Prevalence of pinguecula and pterygium in a general population in Spain. Eye (Basingstoke). 2011;25(3):350–7.
41. Journal O, Kurtul BE, Kakac A, Karaaslan A. Medical Hypothesis, Discovery &Innovation Bilateral Double-headed Recurrent Pterygium: A Case Presentation and Literature Review. 2020.
42. Ramasamy B, Quah S, Wishart M, Hiscott P. Temporal pterygium: benign or not? Bd. 89, British Journal of Ophthalmology. 2005. S. 1533–4.
43. Dandala PP, Malladi P, Kavitha. Ocular surface squamous neoplasia (OSSN): A retrospective study. Journal of Clinical and Diagnostic Research. 2015;9(11):NC10–3.
44. Nampei K, Oie Y, Kiritoshi S, Morota M, Satoh S, Kawasaki S, et al. Comparison of ocular surface squamous neoplasia and pterygium using anterior segment optical coherence tomography angiography. Am J Ophthalmol Case Rep. 2020;20.
45. Chen PP, Ariyasu RG, Kaza V, LaBree LD, McDonnell PJ. Randomized trial comparing mitomycin C and conjunctival autograft after excision of primary pterygium. Am J Ophthalmol. 1995;120(2):151–60.
46. Youngson RM, Ophthalmic SJ. Recurrence of pterygium after excision. Bd. 56, Brit. J. Ophthal.
47. Kim DJ, Lee JK, Chuck RS, Park CY. Low recurrence rate of anchored conjunctival rotation flap technique in pterygium surgery. BMC Ophthalmol. 2017;17(1).
48. Akhter W, Tayyab A, Kausar A, Masrur A. Reducing postoperative pterygium recurrence: comparison of free conjunctival auto-graft and conjunctival rotation flap techniques. J Coll Physicians Surg Pak. 2014;24(10):740–4.
49. Thompson JP, Harbin Z, Das H, Deschner LA, Seale SA, Kheirkhah A. Comparison of Pterygium Recurrence Rates Between Attending Physicians and Supervised Trainee Residents. Cornea. 2022;41(1):12–5.

50. Paganelli B, Sahyoun M, Gabison E. Conjunctival and Limbal Conjunctival Autograft vs. Amniotic Membrane Graft in Primary Pterygium Surgery: A 30-Year Comprehensive Review. Bd. 12, Ophthalmology and Therapy. Adis; 2023. S. 1501–17.
51. Kaufman SC, Jacobs DS, Lee WB, Deng SX, Rosenblatt MI, Shtein RM. Options and adjuvants in surgery for pterygium: A report by the American academy of ophthalmology. Ophthalmology. 2013;120(1):201–8.
52. Bekibele CO, Ashaye A, Olusanya B, Baiyeroju A, Fasina O, Ibrahim AO, et al. 5-Fluorouracil versus mitomycin C as adjuncts to conjunctival autograft in preventing pterygium recurrence. Int Ophthalmol. 2012;32(1):3–8.
53. Jürgenliemk-Schulz IM, Hartman LJC, Roesink JM, Tersteeg RJHA, Van Der Tweel I, Kal HB, et al. Prevention of pterygium recurrence by postoperative single-dose β-irradiation: A prospective randomized clinical double-blind trial. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2004;59(4):1138–47.
54. Trinh T, Mimouni M, Mednick Z, Einan-Lifshitz A, Cohen E, Santaella G, et al. Outcomes of Ipsilateral Simple Limbal Epithelial Transplantation, Tenonectomy, Mitomycin and Amniotic Membrane Transplantation for Treatment of Recurrent Pterygium. Cornea. 2021;40(1):43–7.
55. Ashraf M, Elhusseiny AM, Bouchard CS, Chodosh J, Djalilian AR, Saeed HN. Amniotic membrane in ophthalmology: Historical perspectives, biological properties, and clinical applications. Prog Retin Eye Res. 2026;113.
56. Taher NO, Alnabihi AN, Hersi RM, Alrajhi RK, Alzahrani RA, Batais WT, et al. Amniotic membrane transplantation and conjunctival autograft combined with mitomycin C for the management of primary pterygium: A systematic review and meta-analysis. Bd. 9, Frontiers in Medicine. Frontiers Media S.A.; 2022.
57. Tsai YY, Lin JM, Shy JD. Acute scleral thinning after pterygium excision with intraoperative mitomycin C: a case report of scleral dellen after bare sclera technique and review of the literature. Cornea. 2002;21(2):227–9.
58. Chaidaroon W, Ausayakhun S, Tananuvat N, Upaphong P, Thabsuwan K. Pseudomonas aeruginosa Scleritis following Pterygium Surgery with Mitomycin C or Beta Irradiation: Three-Case Report. Case Rep Ophthalmol Med. 2022;2022:1–5.
59. Dadeya S, Fatima S. Comeoscleral perforation after pterygium excision and intraoperative mitomycin C. Ophthalmic Surg Lasers Imaging. 2003;34(2):146–8.
60. Clearfield E, Muthappan V, Wang X, Kuo IC. Conjunctival autograft for pterygium. Bd. 2016, Cochrane Database of Systematic Reviews. John Wiley and Sons Ltd; 2016.

61. Romano V, Cruciani M, Conti L, Fontana L. Fibrin glue versus sutures for conjunctival autografting in primary pterygium surgery. Bd. 2016, Cochrane Database of Systematic Reviews. John Wiley and Sons Ltd; 2016.
62. Costa FQ, Costa RQ, Barbosa JB, Gomes JÁP. Pterygium Surgery with Conjunctival Autograft Fixation Using Bipolar Electrocauterization. Eur J Ophthalmol. 2021;31(3):1458–62.
63. Lešin M, Paradaik M, Marin Lovria J, Olujia I, Ljubia A, Vuainovia A, et al. Cauterisation versus fibrin glue for conjunctival autografting in primary pterygium surgery (CAGE CUP): Study protocol of a randomised controlled trial. BMJ Open. 2018;8(6).
64. Chang J, Cao Q, Yong J, Ling X, Zhang X, Kang Z, et al. The effect of different pterygium surgery techniques on the ocular surface parameters in different durations: a systematic review and meta-analysis. Bd. 262, Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2024. S. 1383–96.
65. Monden Y, Nagashima C, Yokote N, Hotokezaka F, Maeda S, Sasaki K, et al. Management of recurrent pterygium with severe symblepharon using mitomycin C, double amniotic membrane transplantation, cryopreserved limbal allograft, and a conjunctival flap. Int Med Case Rep J. 2020;13:201–9.
66. Yu DY, Morgan WH, Sun X, Su EN, Cringle SJ, Yu PK, et al. The critical role of the conjunctiva in glaucoma filtration surgery. Bd. 28, Progress in Retinal and Eye Research. 2009. S. 303–28.
67. Tsai JHJ, Tan EJ, Au Eong JTW, George SM, Au Eong KG. Fibrin Glue Versus Sutures for Securing Conjunctival Autograft in Primary Pterygium Surgery: A Systematic Review and Meta-Analysis. Am J Ophthalmol. 2026;283:313–23.
68. Aragona P, Baudouin C, Benitez del Castillo JM, Messmer E, Barabino S, Merayo-Lloves J, et al. The ocular microbiome and microbiota and their effects on ocular surface pathophysiology and disorders. Bd. 66, Survey of Ophthalmology. Elsevier Inc.; 2021. S. 907–25.
69. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The Human Microbiome Project. Bd. 449, Nature. Nature Publishing Group; 2007. S. 804–10.
70. Iebba V, Totino V, Gagliardi A, Santangelo F, Cacciotti F, Trancassini M, et al. Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota. New Microbiologica. 2016;39:1–12.

71. Leong YY, Tong L. Barrier function in the ocular surface: From conventional paradigms to new opportunities. Bd. 13, Ocular Surface. Elsevier Inc.; 2015. S. 103–9.
72. https://www.ocular-microbiome.org/en/latest/index.html.
73. Ozkan J, Willcox MD. The Ocular Microbiome: Molecular Characterisation of a Unique and Low Microbial Environment. Bd. 44, Current Eye Research. Taylor and Francis Ltd; 2019. S. 685–94.
74. Gomes JÁP, Frizon L, Demeda VF. Ocular surface microbiome in health and disease. Bd. 9, Asia-Pacific Journal of Ophthalmology. Lippincott Williams and Wilkins; 2020. S. 505–11.
75. Herzog EL, Kreuzer M, Zinkernagel MS, Zysset-Burri DC. Challenges and insights in the exploration of the low abundance human ocular surface microbiome. Front Cell Infect Microbiol. 2023;13.
76. Nolan J. Evaluation of conjunctival and nasal bacterial cultures before intra-ocular operations. Brit J Ophthal. 1967;51(1):483–5.
77. Dong Q, Brulc JM, Iovieno A, Bates B, Garoutte A, Miller D, et al. Diversity of bacteria at healthy human conjunctiva. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011;52(8):5408–13.
78. Zilliox MJ, Bouchard CS. The Microbiome, Ocular Surface, and Corneal Disorders. Bd. 193, American Journal of Pathology. Elsevier Inc.; 2023. S. 1648–61.
79. Ozkan J, Coroneo M, Willcox M, Wemheuer B, Thomas T. Identification and visualization of a distinct microbiome in ocular surface conjunctival tissue. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2018;59(10):4268–76.
80. Deng Y, Wen X, Hu X, Zou Y, Zhao C, Chen X, et al. Geographic difference shaped human ocular surface metagenome of young Han Chinese from Beijing, Wenzhou, and Guangzhou cities. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2020;61(2).
81. Lee SH, Oh DH, Jung JY, Kim JC, Jeon CO. Comparative ocular microbial communities in humans with and without blepharitis. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012;53(9):5585–93.
82. Labetoulle M, Baudouin C, Benitez del Castillo JM, Rolando M, Rescigno M, Messmer EM, et al. How gut microbiota may impact ocular surface homeostasis and related disorders. Bd. 100, Progress in Retinal and Eye Research. Elsevier Ltd; 2024.
83. Di Zazzo A, Coassin M, Surico PL, Bonini S. Age-related ocular surface failure: A narrative review. Exp Eye Res. 2022;219:109035.
84. Li G, Akpek EK, Ahmad S. Glaucoma and Ocular Surface Disease: More than Meets the Eye. Bd. 16, Clinical Ophthalmology. Dove Medical Press Ltd; 2022. S. 3641–9.

85. Napolitano P, Filippelli M, Davinelli S, Bartollino S, dell'Omo R, Costagliola C. Influence of gut microbiota on eye diseases: an overview. Bd. 53, Annals of Medicine. Taylor and Francis Ltd.; 2021. S. 750–61.
86. Campagnoli LIM, Varesi A, Barbieri A, Marchesi N, Pascale A. Targeting the Gut–Eye Axis: An Emerging Strategy to Face Ocular Diseases. Bd. 24, International Journal of Molecular Sciences. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
87. Skrzypecki J, Zera T, Ufnal M. Butyrate, a gut bacterial metabolite, lowers intraocular pressure in normotensive but not in hypertensive rats. J Glaucoma. 2018;27(9):823–7.
88. Skrzypecki J, Izdebska J, Kamińska A, Badowska J, Przybek-Skrzypecka J, Bombuy J, et al. Glaucoma patients have an increased level of trimethylamine, a toxic product of gut bacteria, in the aqueous humor: a pilot study. Int Ophthalmol. 2021;41(1):341–7.
89. Chen H, Cho KS, Vu THK, Shen CH, Kaur M, Chen G, et al. Commensal microflora-induced T cell responses mediate progressive neurodegeneration in glaucoma. Nat Commun. 2018;9(1).
90. Chalkia AK, Spandidos DA, Detorakis ET. Viral involvement in the pathogenesis and clinical features of ophthalmic pterygium (Review). Int J Mol Med. 2013;32(3):539–43.
91. Di Girolamo N. Association of human papilloma virus with pterygia and ocular-surface squamous neoplasia. In: Eye. Nature Publishing Group; 2012. S. 202–11.
92. Filippelli M, dell'Omo R, Amoruso A, Paiano I, Pane M, Napolitano P, et al. Intestinal microbiome: a new target for chalaziosis treatment in children? Eur J Pediatr. 2021;180(4):1293–8.
93. Iovieno A, Lambiase A, Sacchetti M, Stampachiacchiere B, Micera A, Bonini S. Preliminary evidence of the efficacy of probiotic eye-drop treatment in patients with vernal keratoconjunctivitis. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology. 2008;246(3):435–41.
94. Vivero-Lopez M, Pereira-Da-Mota AF, Carracedo G, Huete-Toral F, Parga A, Otero A, et al. Phosphorylcholine-Based Contact Lenses for Sustained Release of Resveratrol: Design, Antioxidant and Antimicrobial Performances, and in Vivo Behavior. ACS Appl Mater Interfaces. 2022;14(50):55431–46.
95. Park M, Park S, Jung WH. Skin commensal fungus malassezia and its lipases. J Microbiol Biotechnol. 2021;31(5):637–44.
96. Aykut B, Pushalkar S, Chen R, Li Q, Abengozar R, Kim JI, et al. The fungal mycobiome promotes pancreatic oncogenesis via activation of MBL. Nature. 2019;574(7777):264–7.

97. Abdillah A, Ranque S. Chronic diseases associated with malassezia yeast. Bd. 7, Journal of Fungi. MDPI; 2021.
98. Alam A, Levanduski E, Denz P, Villavicencio HS, Bhatta M, Alhorebi L, et al. Fungal mycobiome drives IL-33 secretion and type 2 immunity in pancreatic cancer. Cancer Cell. 2022;40(2):153-167.e11.
99. Zhu Y, Yu X, Cheng G. Human skin bacterial microbiota homeostasis: A delicate balance between health and disease. Bd. 2, mLife. John Wiley & Sons Inc; 2023. S. 107–20.
100. Hassanshahi A, Moradzad M, Ghalamkari S, Fadaei M, Cowin AJ, Hassanshahi M. Macrophage-Mediated Inflammation in Skin Wound Healing. Bd. 11, Cells. MDPI; 2022.
101. Faas M, Ipseiz N, Ackermann J, Culemann S, Grüneboom A, Schröder F, et al. IL-33-induced metabolic reprogramming controls the differentiation of alternatively activated macrophages and the resolution of inflammation. Immunity. 2021;54(11):2531-2546.e5.
102. Jiang Y, Cai R, Huang Y, Zhu L, Xiao L, Wang C, et al. Macrophages in organ fibrosis: from pathogenesis to therapeutic targets. Bd. 10, Cell Death Discovery. Springer Nature; 2024.
103. De Vos WM, Tilg H, Van Hul M, Cani PD. Gut microbiome and health: mechanistic insights. Gut. 2022;71(5):1020–32.
104. Lynch S V., Pedersen O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. New England Journal of Medicine. 2016;375(24):2369–79.
105. Soret P, Vandenborght LE, Francis F, Coron N, Enaud R, Avalos M, et al. Respiratory mycobiome and suggestion of inter-kingdom network during acute pulmonary exacerbation in cystic fibrosis. Sci Rep. 2020;10(1).
106. Limon JJ, Tang J, Li D, Wolf AJ, Michelsen KS, Funari V, et al. Malassezia Is Associated with Crohn's Disease and Exacerbates Colitis in Mouse Models. Cell Host Microbe. 2019;25(3):377-388.e6.
107. Zhu Y, Herndon JM, Sojka DK, Kim KW, Knolhoff BL, Zuo C, et al. Tissue-Resident Macrophages in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Originate from Embryonic Hematopoiesis and Promote Tumor Progression. Immunity. 2017;47(2):323-338.e6.
108. Anwar W, Amin H, Khan HAA, Akhter A, Bashir U, Anjum T, et al. Chitinase of Trichoderma longibrachiatum for control of Aphis gossypii in cotton plants. Sci Rep. 2023;13(1).

109. Vannella KM, Ramalingam TR, Hart KM, De Queiroz Prado R, Sciurba J, Barron L, et al. Acidic chitinase primes the protective immune response to gastrointestinal nematodes. Nat Immunol. 2016;17(5):538–44.
110. Choudhary V, Choudhary M, Bollag WB. Exploring Skin Wound Healing Models and the Impact of Natural Lipids on the Healing Process. Bd. 25, International Journal of Molecular Sciences. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.
111. Summer R, Mora AL. Lipid metabolism: A new player in the conundrum of lung fibrosis. Bd. 61, American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. American Thoracic Society; 2019. S. 669–70.
112. Zhang X, Han P, Qiu J, Huang F, Luo Q, Cheng J, et al. Single-cell RNA sequencing reveals the complex cellular niche of pterygium. Ocul Surf. 2024;32:91–103.
113. Mayslich C, Grange PA, Dupin N, Brüggemann H. Cutibacterium acnes as an Opportunistic Pathogen: An Update of Its Virulence-Associated Factors. 2021; Verfügbar unter: https://doi.org/10.3390/microorganisms9020303.
114. Chen S, Zhang M, Lin Y, Shi Y, Lin Q, Xie T, et al. Risk factors for pterygium recurrence based on a retrospective study of 196 patients. Sci Rep. 2025;15(1).
115. Oyama N, Chan I, Neill SM, Hamada T, South AP, Wessagowit V, et al. Autoantibodies to extracellular matrix protein 1 in lichen sclerosus. The Lancet [Online]. 2023;362(9378):118–23. Verfügbar unter: www.thelancet.com.
116. Umemura M, Fujita M, Yoko-O T, Fukamizu A, Jigami Y. Saccharomyces cerevisiae CWH43 is involved in the remodeling of the lipid moiety of GPI anchors to ceramides. Mol Biol Cell. 2007;18(11):4304–16.
117. Parfenova OK, Kukes VG, Grishin D V. Follistatin-like proteins: Structure, functions and biomedical importance. Bd. 9, Biomedicines. MDPI AG; 2021.
118. Kam MKM, Lui VCH. Roles of Hoxb5 in the development of vagal and trunk neural crest cells. Bd. 57, Development Growth and Differentiation. 2015. S. 158–68.
119. Tawfik NZ, Abdallah HY, Hassan R, Hosny A, Ghanem DE, Adel A, et al. PSORS1 Locus Genotyping Profile in Psoriasis: A Pilot Case-Control Study. Diagnostics. 2022;12(5).
120. Dorrington MG, Roche AM, Chauvin SE, Tu Z, Mossman KL, Weiser JN, et al. MARCO Is Required for TLR2- and Nod2-Mediated Responses to Streptococcus pneumoniae and Clearance of Pneumococcal Colonization in the Murine Nasopharynx . The Journal of Immunology. 2013;190(1):250–8.

121. Wang L, Xie W, Li G, Hu B, Wu W, Zhan L, et al. Lipocalin 10 as a New Prognostic Biomarker in Sepsis-Induced Myocardial Dysfunction and Mortality: A Pilot Study. Mediators Inflamm. 2021;2021.
122. Furukawa M, He YJ, Borchers C, Xiong Y. Targeting of protein ubiquitination by BTB-Cullin 3-Roc1 ubiquitin ligases. Nat Cell Biol. 2003;5(11):1001–7.
123. Trivellin G, Bjelobaba I, Daly AF, Larco DO, Palmeira L, Faucz FR, et al. Characterization of GPR101 transcript structure and expression patterns. J Mol Endocrinol. 2016;57(2):97–111.

12. ŽIVOTOPIS

CURRICULUM VITAE

OSOBNI PODATCI

Martina Paradžik Šimunović, dr.med. – spec. oftalmologije i optometrije, subspec. kirurgije vjeđe i orbite

Adresa: Split, Croatia

email: martina.paradzik@gmail.com

Udana, majka dvoje djece.

IZOBRAZBA

- 2008. – 2014. – Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu, Split
- 2017. – 2018. – Specijalistički studiji iz oftalmologije, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

-2024. – 2025. – poslijediplomski studij cjeloživotnog obrazovanja „Nekirurška estetska medicina – Esthetic Academy“, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci, Rijeka

ZAPOSLENJA I AKTIVNOSTI:

2015. – 2020. – specijalizant oftalmologije i optometrije, Klinika za očne bolesti, KBC Split, Split

2021. – 2024. – subspecijalizant kirurgije vjeđe i orbite, Klinika za očne bolesti, KBC Split, Split

2024. – subspecijalist kirurgije vjeđe i orbite, Klinika za očne bolesti, KBC Split, Split

TEČAJEVI I EDUKACIJE

2018. ESCRS Annual Meeting, Vienna, Austrija

2018. EMYO, Krakov, Poljska

2019, 2020. Open Medical Institute Weill Cornell Seminar "Ophthalmology", Salzburg, Austrija

2019. Ophthalmic Winteracademy, Mayrhoffen, Austrija

2019. Balkan Ophthalmic Wetlab, Sofija, Bugarska

2021. SOE grant, Klinika za očne bolesti, UKC Ljubljana, Slovenija

2024. ESCRS Annual Meeting, Barcelona, Španjolska

2024. ESOPRS Annual Meeting, Rotterdam, Nizozemska

2025. Ophthalmic Winteracademy, Schruns, Austrija

2025. ESOPRS Annual Meeting, Prague, Češka

2025. ESCRS Annual Meeting, Copenhaegen, Dansa

2026. ESOPRS Annual Meeting, Lisboa, Portugal

2026. ESCRS Annual Meeting, London, Ujedinjeno Kraljevstvo

POPIS KONGRESNIH PRIOPĆENJA

1. Paradzik Simunovic M, Stanic R, Lesin M. Acute ocular complication of Steven-Johnson syndrome. Abstract ID: 24-507, ESOPRS Meeting 2024, Rotterdam, Netherlands.
2. Paradzik Simunovic M, Lesin M. Painful lesion on the anterior orbital rim - case report. Number 25-555. ESOPRS Meeting 2025, Prague, Cezch Republic.
3. Bolna promjena na prednjem rubu orbite - prikaz slučaja i pregled literature. Sekcija za orbitu, plastičnu i rekonstruktivnu kirurgiju oka hrvatskog društva za oftalmologiju i optometriju, Zagreb, veljača 2025.
4. Paradžik Šimunović M., Lešin M., Olujić I., Puljak L., Marin Lovrić J., Ljubić Ž., Vučinović A., Ljubičić T., Bućan K. Usporedba kauterizacije i fibrinskog ljepila za fiksaciju spojničkog presatka kod operacije primarnog pterigija – randomizirana studija. Cauterization versus fibrin glue for conjunctival autografting in primary pterygium surgery. Prva nagrada Hrvatskog oftalmoloskog drustva u kategoriji Mladi u oftalmologiji, HOOD Vodice 2018.

POPIS RADOVA

1. **Paradžik M**, Bučević-Popović V, Šitum M, Jaing CJ, Degoricija M, McLoughlin KS, i sur. Association of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) with bladder cancer in Croatian patients. Tumour Biol. 2014;35:567-72.
2. Degoricija M, Situm M, Korać J, Miljković A, Matić K, **Paradžik M**, i sur. High NF-κB and STAT3 activity in human urothelial carcinoma: a pilot study. World J Uro. 201;32(6):1469-75.
3. Simunović M, **Paradžik M**, Skrabić R, Unić I, Bućan K, Skrabić V. Cataract as early ocular complication in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. Int J Endocrinol 2018;2018.
4. Bucan K, Plestina Borjan I, Bucan I, **Paradzik Simunovic M**, Borjan I. Genetic Background of a Recurrent Unusual Combined Form of Retinal Vein Occlusion: A Case Report. Case Rep Ophthalmol. 2018 Apr 12;9(1):248-253.
5. Lešin M, **Paradžik M**, Marin Lovrić J, Olujić I, Ljubić Ž, Ana Vučinović A, i sur. Cauterisation versus fibrin glue for conjunctival autografting in primary pterygium

surgery (CAGE CUP): study protocol of a randomised controlled trial. BMJ Open. 2018;8(6):e020714.

6. Simunovic M, Supe-Domic D, Karin Z, Degoricija M, **Paradzik M**, Bozic J, i sur. Serum catestatin concentrations are decreased in obese children and adolescents. Pediatr Diabetes 2019;20:549–55.
7. Simunovic M, Supe-Domic D, Karin Z, Degoricija M, **Paradzik M**, Skrabic R, i sur. The Relationship of Vitamin D Status, Adherence to the Mediterranean Diet, and Physical Activity in Obese Children and Adolescents. J Med Food 00 (0) 2020, 1–9.
8. Simunovic M, Jukic A, **Paradzik M**, Supe-Domic D, Stanisic L, Degoricija M i sur. The Role of Urotensin-II in Obesity and Metabolic Syndrome in Pediatric Population. Children 2022, 9, 204.
9. Simunovic M, Kumric M, Rusic D, **Paradzik Simunovic M**, Bozic, J. Continuous GlucoseMonitoring—New Diagnostic Tool in Complex Pathophysiological Disorder of Glucose Metabolism in Children and Adolescents with Obesity. Diagnostics 2024, 14, 2801.
10. Stanić R, Katarina Vukojević K, Filipović N, Benzon B, Ogorevc M, Kunac N, Čanović S, Kovačević P, **Paradžik Šimunović M**, 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 Nov 24;25(23):12618.
11. **Paradzik Simunovic M**, Degoricija M, Jelena Korac-Prlic J, Lesin M, Stanic R, Puljak L, i sur. Potential Role of Malassezia restricta in Pterygium Development. Int J Mol Sci. 2025;26(7):2976.
12. **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. J Clin Med. 2025;14:3640.
13. **Paradzik Simunovic M**, Degoricija M, Korac-Prlic J, Simunovic M, Lesin M, Stanic R, Puljak L, Olujic I, Marin Lovric J, Vucinovic A, Ljubic Z, Bucan K, Terzić J. Gene Expression Signatures Associated with Pterygium Recurrence. J Clin Med. 2026:
14. **Paradzik Simunovic M,** Stanic R, Bozic J, Simunovic M. Ophthalmic Findings in Pediatric Patients with Graves' disease – single center study. Clinics and Practice. 2026.

ČLAN:

Hrvatski liječnički zbor HLZ

Hrvatsko oftalmološkog i optometrijsko društvo HOOD

Europsko društvo za okuloplastiku ESOPRS, Full member.

Europsko drustvo za kirurgiju katarakte ESCRS