



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Marija S. Trenkić Božinović

**KOMPARATIVNA ANALIZA GENSKE VARIJABILNOSTI
I NIVOVA CIRKULIŠUĆIH FAKTORA
NEKROZE TUMORA, HSP 70 I FAS/FASL
U PRIMARNOM GLAUKOMU OTVORENOG UGLA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2016.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE



Marija S. Trenkić Božinović

**COMPARATIVE ANALYSIS OF GENETIC VARIATION
AND LEVELS OF CIRCULATING TUMOR NECROSIS
FACTOR, HSP 70 AND FAS/FASL
IN PRIMARY OPEN-ANGLE GLAUCOMA**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2016.

Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor: Prof. dr Gordana Zlatanović
Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu

Naslov: Komparativna analiza genske varijabilnosti i nivoa cirkulišućih faktora nekroze tumora, HSP 70 i Fas/FasL u primarnom glaukomu otvorenog ugla

Genetska heterogenost primarnog glaukoma otvorenog ugla (POAG) i promena koncentracije različitih medijatora zapaljenja i imunog odgovora u krvi, očnoj vodici ili tkivima ukazuju da su različiti genetski mehanizmi, kao i aktivnosti imunog sistema uključeni u patogenezu POAG.

Cilj istraživanja bio je utvrđivanje međuzavisnog kliničkog, genskog i biohemijskog nalaza kod osoba obolelih od POAG sa povišenim intraokularnim pritiskom (POAG-HTG).

Na uzorku DNK ispitivana je distribucija genskih polimorfizama na genu za TNF- α -308 G/A i -863 C/A metodom PCR-RFLP, određivana je koncentracija cirkulišućeg TNF- α i HSP 70 u plazmi, koncentracija solubilnog Fas i FasL u očnoj vodici ispitanika komercijalnim ELISA testovima i ispitivana je njihova povezanost sa kvantitativnim kliničkim parametrima bolesti.

U ovo istraživanje uključeno je 357 ispitanika: 81 sa POAG-HTG, 35 sa pseudoeksfolijativnim glaukomom otvorenog ugla (PEXG), 77 sa staračkom kataraktom i 164 zdravih subjekata koji su po starosti i polu odgovarali pacijentima. Obrađeno je 35 uzoraka očne vodice pacijenata sa POAG-HTG, 24 sa PEXG i 29 sa staračkom kataraktom.

Rezultati istraživanja su pokazali da je koncentracija TNF- α u serumu znatno viša kod pacijenata obolelih od glaukoma. Zastupljenost genotipova GG TNF- α (-308) i CC TNF- α (-863) je značajno veća kod POAG-HTG. Nema značajne povezanosti između TNF- α (-308) G/A i TNF- α (-863) C/A polimorfizma i ispitivanih kliničkih parametara kod POAG-HTG. Koncentracija HSP 70 značajno utiče na MD, RNFL Avg, RNFL Sup i RNFL Inf pacijenata sa POAG-HTG. Kod POAG-HTG značajna je negativna korelacija koncentracije Fas i RNFL Inf, kao i negativna korelacija FasL sa MD i RNFL Avg.

Zaključak istraživanja je da je serumski TNF- α moćan citokin sa značajnom ulogom u patogenezi glaukoma i glaukomnoj neuropatiji. HSP 70, sFas i sFasL imaju ulogu u patogenezi POAG i mogu biti pokazatelji razvoja i progresije glaukomne neuropatije. Dokazano je da A alelni polimorfizam TNF- α (-863) ima zaštitnu ulogu u patogenezi POAG.

Naučna oblast: Medicina

Naučna disciplina: Oftalmologija

Ključne reči:

Glaukom otvorenog ugla, faktor nekroze tumora α , genski polimorfizam, TNF- α -308, TNF- α -863, HSP 70, Fas, FasL

UDK:

617.7-007.681(043.3)

CERIF
klasifikacija:

B 620 oftalmologija

Tip licence
Kreativne
zajednice:

CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	Gordana Zlatanović, MD, PhD Faculty of Medicine, University of Niš
Title:	Comparative analysis of genetic variation and levels of circulating tumor necrosis factor, HSP 70 and Fas/FasL in primary open-angle glaucoma
Abstract:	<p>Genetic heterogeneity of primary open-angle glaucoma, and concentration changes of various inflammation and immune response mediators in the blood, aqueous humor or tissues, indicate the involvement of different genetic mechanisms and immune system activity in the pathogenesis of POAG.</p> <p>The aim of study was to determine the interdependent clinical, genetic and biochemical findings in POAG-HTG patients.</p> <p>Distribution of genetic polymorphisms for TNF-α -308 G/A and -863 C/A in DNA samples was examined using PCR-RFLP, the concentrations of circulating TNF-α and HSP 70 in a plasma and concentration of sFas and sFasL in the aqueous humor were measured by commercial ELISA tests. Their association with quantitative clinical parameters was examined.</p> <p>This study included 357 subjects: 81 POAG-HTG, 35 PEXG, 77 with senile cataract and 164 healthy subjects age-sex matched. Furthermore, 35 samples of aqueous humor of POAG-HTG patients, 24 PEXG and 29 with senile cataract were treated.</p> <p>The results showed that serum concentration of TNF-α was significantly higher in patients with glaucoma. Genotypes GG TNF-α (-308) and CC TNF-α (-863) were significantly higher in POAG-HTG. No significant association between TNF-α (-308) G/A and TNF-α (-863) C/A polymorphism and investigated clinical parameters was found in POAG-HTG. HSP 70 concentration significantly affects MD, RNFL Avg, Sup and Inf in POAG-HTG patients. There is a significant negative correlation between Fas concentration and RNFL Inf, and negative correlation of FasL with MD and RNFL Avg in POAG-HTG.</p> <p>The study concluded that serum TNF-α is a powerful cytokine with potent significant role in the pathogenesis of glaucoma and glaucoma neuropathy. HSP 70, sFas and sFasL play a role in pathogenesis of POAG and may be indicators of the development and progression of glaucoma neuropathy. It has been shown that TNF-α (-863) A allelic polymorphism has a protective role in the pathogenesis of POAG.</p>
Scientific Field:	Medicine
Scientific Discipline:	Ophthalmology

Key Words:

Open-angle glaucoma, tumor necrosis factor α , genetic polymorphism, TNF- α -308, TNF- α -863, HSP 70, Fas, FasL

UDC:

617.7-007.681(043.3)

CERIF
Classification:

B 620 ophthalmology

Creative
Commons
License Type:

CC BY-NC-ND

Reči iskrene zahvalnosti upućujem

***Prof. dr Gordani Zlatanović**, mentoru ovog rada, na razumevanju, ukazanom poverenju i stručnoj podršci*

***Prof. dr Tatjani Jevtović Stoimenov**, za pažnju i vreme koje je posvetila ovom radu, za dragocene savete, osećaj stalne podrške uz koju sam ostvarila sve postavljene ciljeve, doslednost u naučnoj misli i istraživačku beskompromisnost*

***Prof. dr Predragu Jovanoviću, prof. dr Miroslavu Vukosavljeviću i doc. dr Jasmini Jocić Đorđević**, na pruženom znanju, iskustvu, nesebičnoj pomoći i podršci, dragocanim sugestijama i prijateljskim savetima*

Zahvaljujem se svim kolegama i saradnicima na podršci i pomoći.

Hvala mojim pacijentima na saradnji i ukazanom poverenju.

Neizmerno sam zahvalna mojim najmilijim

Nenadu, Petru i Jovanu

na ljubavi, strpljenju, veri i bodrenju

tati i Milanu

koji su uvek tu za mene

Marija

Sadržaj

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Glaukom otvorenog ugla.....	3
2.2. Primarni glaukom otvorenog ugla.....	4
2.2.1. Vrste primarnog glaukoma otvorenog ugla	4
2.2.2. Faktori rizika za nastanak POAG	5
2.2.3. Patogeneza glaukomnog oštećenja	6
2.2.4. Klinička slika	8
2.2.5. Lečenje i ciljevi lečenja.....	12
2.3. Neurodegeneracija i neuroprotekcija u glaukomu	13
2.4. Geni u patogenezi glaukoma.....	14
2.4.1. Glavni geni povezani sa POAG.....	14
2.4.2. Drugi geni povezani sa POAG	15
2.5. Autoimunost u glaukomu	15
2.6. Biomarkeri u glaukomu	16
2.6.1. Oksidativni stres i biomarkeri oksidativnog stresa u glaukomu.....	16
2.6.2. Biomarkeri imunog odgovora u glaukomu	17
2.6.3. Apoptoza i biomarkeri apoptoze u glaukomu	19
2.7. Faktor nekroze tumora	20
2.7.1. Signalna transdukcija TNF- α nakon vezivanja za receptore	21
2.7.1.1. Signalna transdukcija preko aktivacije receptora smrti	22
2.7.1.2. Uloga reaktivnih vrsta kiseonika u TNF- α indukovanoj apoptozi	22
2.7.2. Faktor nekroze tumora u patogenezi glaukoma	23
2.7.3. Polimorfizam na genu za TNF- α	25
2.7.4. Polimorfizam gena za TNF u patogenezi glaukoma.....	26
2.8. Protein toplotnog šoka 70	27
2.8.1. Biohemijske karakteristike HSP 70.....	28
2.8.2. Uloga HSP 70 u patogenezi glaukoma.....	29
2.9. Fas i Fas ligand	30

3. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	33
4. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA	35
4.1. Ispitanici.....	35
4.2. Metode kliničkog pregleda.....	36
4.3. Metode ispitivanja.....	38
4.3.1. Metode određivanja TNF- α , HSP 70, Fas i Fas liganda.....	38
4.3.2. Detekcija polimorfizama na genu za TNF- α	39
4.3.2.1. Lančana reakcija polimerizacije	39
4.3.2.2. Elektroforeza na agaroznom gelu	41
4.3.2.3. Određivanje dužine restrikcionih fragmenata	41
4.3.2.4. Poliakrilamidna gel elektroforeza (PAGE).....	41
4.3.2.5. Analiza fragmenata dobijenih PCR-RFLP metodom	42
4.4. Statistička obrada podataka.....	43
5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA	45
5.1. Klinička ispitivanja	45
5.1.1. Starosna struktura ispitanika.....	46
5.1.2. Polna struktura ispitanika.....	46
5.1.3. Vidna oštrina ispitanika	47
5.1.4. Intraokularni pritisak ispitanika.....	48
5.1.5. Indeks eskavacije vidnog živca ispitanika.....	49
5.1.6. Otvorenost komornog ugla pacijenata obolelih od POAG- HTG.....	50
5.1.7. Pigmentacija komornog ugla ispitanika obolelih od POAG- HTG	51
5.1.8. Funkcionalno ispitivanje i parametri vidnog polja: MD, PSD i CPSD kod ispitanika obolelih od glaukoma.....	51
5.1.9. Ispitivanje morfoloških parametara: istanjenja debljine peripapilarnih nervnih vlakana retine (RNFL Avg, RNFL Sup i RNFL Inf)	53
5.2. Biohemijska ispitivanja.....	57
5.2.1. Koncentracija TNF- α	57
5.2.2. Koncentracija HSP 70.....	58
5.2.3. Koncentracija Fas.....	60
5.2.4. Koncentracija Fas liganda.....	61
5.2.5. Korelacija koncentracije TNF- α , HSP 70, Fas i Fas liganda ispitanika.....	63

5.3. Genska ispitivanja	64
5.3.1. Polimorfizam na genu -308 za TNF- α	64
5.3.1.1. Polimorfizam na genu -308 za TNF- α i klinički parametri	66
5.3.1.2. Polimorfizam na genu -308 za TNF- α i biohemijski parametri.....	67
5.3.2. Polimorfizam na genu -863 za TNF- α	67
5.3.2.1. Polimorfizam na genu -863 za TNF- α i klinički parametri	70
5.3.2.2. Polimorfizam na genu -863 za TNF- α i biohemijski parametri.....	71
5.4. Procena uticaja TNF- α , HSP 70, Fas i FasL na vrednosti parametara IOP, C/D, MD, RNFL Avg, RNFL Sup i RNFL Inf kod pacijenata sa POAG- HTG.....	72
5.5. Procena uticaja polimorfizma gena -308 za TNF- α : GG, GA, AA na vrednosti parametara IOP, C/D, MD, RNFL Avg, RNFL Sup i RNFL Inf kod pacijenata sa POAG- HTG.....	75
5.6. Procena uticaja polimorfizma gena -863 za TNF- α : CC, CA, AA na vrednosti parametara IOP, C/D, MD, RNFL Avg, RNFL Sup i RNFL Inf kod pacijenata sa POAG- HTG	77
6. DISKUSIJA	79
6.1. Klinička ispitivanja	79
6.2. Koncentracija TNF- α	79
6.3. Polimorfizam gena za TNF- α	82
6.3.1. Polimorfizam gena za TNF- α -308.....	82
6.3.2. Polimorfizam gena za TNF- α -863.....	86
6.4. HSP 70	88
6.5. Fas i Fas ligand	92
7. ZAKLJUČAK.....	96
8. OPŠTI ZAKLJUČAK.....	99
9. LITERATURA	100
 BIOGRAFIJA AUTORA.....	 123

Lista skraćenica i simbola

A	adenin
C	citozin
CYP1B1	citohrom P450 familija 1 subfamilija B polipeptid 1
D	dioptrija
dB	decibel
DR	dijabetesna retinopatija
FasL	Fas ligand
G	guanin
HA	humor aqueus, očna vodica
HSP	heat shock protein, protein toplotnog šoka
HTG	high tension glaucoma, primarni glaukom otvorenog ugla sa povišenim intraokularnim pritiskom
IOP	intraokularni pritisak
JOAG	juvenilni glaukom otvorenog ugla
MD	mean deviation, srednje odstupanje
MYOC (MYOCIN)	miocilin gen
NTG	normal tension glaucoma, primarni glaukom otvorenog ugla sa normalnim intraokularnim pritiskom
OAG	open-angle glaucoma, glaukom otvorenog ugla
OCT	optička koherentna tomografija
OH	ocular hypertension, okularna hipertenzija
OPTN(OPTIN)	optineurin gen
PACG	primary angle closure glaucoma, primarni glaukom zatvorenog ugla
POAG	primary open-angle glaucoma, primarni glaukom otvorenog ugla
RGC	retinalne ganglijske ćelije
SNP	single nucleotide polymorphism, polimorfizam jednog nukleotida
T	tiamin
TNF	faktor nekroze tumora
RNFL	sloj retinalnih nervnih vlakana
RNFL Avg	prosečna debljina retinalnih nervnih vlakana, Avg RNFL
RNFL Sup	prosečna debljina retinalnih nervnih vlakana u gornjem kvadrantu, Savg RNFL
RNFL Inf	prosečna debljina retinalnih nervnih vlakana u donjem kvadrantu, Iavg RNFL
WDR36	WDRRepeat Domain 36 gen

1. UVOD

Glaukom je heterogena grupa progresivnih optičkih neuropatija sa kompleksnom genetskom osnovom, kompleksnim nizom faktora i mehanizama koji dovode do smrti retinalnih ganglijskih ćelija (RGC) (1). To je obično bilateralna i asimetrična bolest, koja se može razviti pri svakom intraokularnom pritisku (IOP). Primarni glaukom pogađa oko 60-70 miliona ljudi širom sveta, a za 10% njih se smatra da su bilateralno slepi (1-4). Glaukom je odgovoran za 14% slepila u svetu. On je drugi vodeći uzrok slepila u Evropi i svetu, posle katarakte i najčešći je uzrok ireverzibilnog slepila (5).

Sve vrste glaukoma imaju neke zajedničke kliničke karakteristike, koje uključuju specifično izmenjeni izgled glave vidnog živca, karakteristične promene i gubitke u vidnom polju i hroničnu progresiju. Pored toga, glaukom je često povezan sa povišenim intraokularnim pritiskom, koji nije ni potreban niti dovoljan za početak ili progresiju bolesti (6). Smatra se da problem počinje sa IOP koji je previsok za vidni živac pojedinca. Kod velikog broja ljudi obolelih od glaukoma (oko 40%) IOP je u okviru statistički definisanih referentnih vrednosti (7).

Glaukomi se mogu klasifikovati prema etiologiji na primarne i sekundarne, prema anatomiji komornog ugla i prednje očne komore na glaukome otvorenog i zatvorenog ugla i prema vremenu nastajanja na infantilne, kongenitalne ili juvenilne i adultne. Generalno, primarni glaukomi su podeljeni u tri velike grupe: primarni glaukom otvorenog ugla (POAG), primarni akutni glaukom zatvorenog ugla (PACG) i primarni kongenitalni glaukom. POAG je najčešći oblik glaukoma (8, 9).

Povišeni intraokularni pritisak je verovatno najvažniji faktor rizika za primarni glaukom otvorenog ugla, kao najčešćeg oblika glaukoma. Međutim, i drugi faktori kao što su ekscitotoksičnost, smanjena aktivnost antioksidativnog odbrambenog sistema i povećanje produkcije azot monoksida (NO) povećanjem aktivnosti azot-oksida sintaze (NOS) mogući su dodatni uzroci glaukomatoznih oštećenja (1).

Cilj terapije glaukoma je očuvanje vidne funkcije i kvaliteta života pacijenata. Uglavnom je terapija glaukoma usmerena na kontrolu intraokularnog pritiska. Međutim, terapija koja sprečava smrt RGC i sprečava gubitak vlakana glave vidnog živca treba da bude glavni cilj lečenja. Povišen očni pritisak je verovatno najvažniji faktor rizika za razvoj i napredovanje glaukoma, ali je i dalje faktor rizika, a ne bolest po sebi.

Konvencionalne metode za dijagnozu glaukoma zasnovane na analizi vidnog polja i morfološkim promenama glave vidnog živca i visina IOP kao “zlatni standard” imaju prilično nisku senzitivnost i specifičnost (10, 11). Rano otkrivanje glaukoma je još uvek važno pitanje, jer je moguće da postoji gubitak RGC čak i do 50% pre prvih patoloških promena u vidnom polju (8) i većina pacijenata može da boluje od glaukoma i više od 10 godina ne znajući za to. Postoji jasna potreba za boljim dijagnostičkim metodama visoke specifičnosti i senzitivnosti koje bi ukazale na veoma visok rizik za nastanak ili vrlo rano otkrivanje bolesti.

Promena koncentracije biomarkera u serumu obolelih od glaukoma ukazuje na ulogu autoimuniteta i njegovo uključivanje u patogenezu glaukoma kod nekih pacijenata. I dalje ostaje nejasno da li se autoantitela kod glaukoma razvijaju kao posledica bolesti ili su uzročnik. Možda se ona mogu efikasno koristiti kao visoko-specifični i precizni biomarkeri za dijagnozu različitih vrsta glaukoma (12). U budućnosti, specifični biomarkeri bi mogli da pomognu da se otkrije postojeći proces bolesti u vrlo ranoj fazi, možda čak i pre pojave kliničkih znakova bolesti i takođe mogu pomoći da se identifikuju pacijenti sa okularnom hipertenzijom (OH) koji imaju rizik za razvoj glaukoma. U mnogim drugim bolestima, poznato je da se povišeni titar antitela razvija mnogo godina pre kliničkog početka bolesti i može biti prisutan i do 10 godina pre pojave prvih simptoma (13, 14). Rana detekcija glaukoma bi rezultirala ranijim tretmanom, koji može da spreči slepilo ili uspori progresiju bolesti.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Glaukom otvorenog ugla

Ljudi svih uzrasta mogu da obole od glaukoma. Oko 2,65% svetskog stanovništva starijeg od 40 godina pati od glaukoma. Prevalenca raste sa godinama starosti, ona je u Evropi skoro 10% kod ljudi starijih od 75 godina (5). Prevalenca je veća kod osoba iz Afrike i Azije ili kod onih sa porodičnom istorijom glaukoma. Podaci iz populacionih studija ukazuju da danas 1 od 40 odraslih osoba starijih od 40 godina boluje od glaukoma sa značajnim oštećenjem vidne funkcije, što je jednako 60 miliona ljudi širom sveta, od kojih je 8,4 miliona bilateralno slepih (5, 8). Procenjuje se da je u 2013. godini u celom svetu broj ljudi (starosti od 40 do 80 godina) obolelih od glaukoma bio oko 64,3 miliona, a predviđa se rast na 76,0 miliona u 2020. godini i 111,8 miliona u 2040. godini (15).

Primarni glaukom se javlja u odsustvu drugih prepoznatljivih uzroka bolesti (npr. pseudoekfolijacije, pigmentna disperzija, hronični uveitis, itd.). Klasifikacija primarnog glaukoma otvorenog ugla uglavnom se zasniva na starosti pacijenta kada glaukom počinje i stoga je on klasifikovan kao primarni urođeni glaukom (početak do 3 godine života), juvenilni glaukom otvorenog ugla (JOAG, počinje u 10-35 godini života) i primarni glaukom otvorenog ugla odraslih (POAG, posle 35 godine) (16).

Najčešći oblik glaukoma na Zapadu je POAG. Različite studije procenjuju da je njegova prevalenca 1,1% do 2% u zavisnosti od ispitivane populacije (17-19). Dok je njegova prevalenca u crnačkim populacijama četiri do pet puta veća (20, 21). POAG se karakteriše otvorenim komornim uglom, povišenim intraokularnim pritiskom, a manifestuje se tipičnim promenama u vidnom polju u uznapredovalim fazama (22). Međutim, prema podacima "Baltimore Eye Survey", 33% svih glaukomatoznih očiju među belim i crnim Amerikancima je imalo IOP ispod 21 mm Hg (23). Ova podgrupa se naziva normo-tenzivni glaukom (NTG) i karakteriše se oštećenjem glave vidnog živca i defektima u vidnom polju tipičnim za glaukom (definicija Evropskog udruženja glaukomatologa, EGS) (24). Inače, postoje bolesnici sa povišenim IOP, tzv. okularna hipertenzija (OH), koji ne pate od glaukoma. OH je definisana kao povišenje IOP preko 21 mmHg mereno Goldmannovim aplanacionim tonometrom (24) uz odsustvo promena u vidnom polju (2, 24).

Glaukom otvorenog ugla (open-angle glaucoma, OAG) obuhvata: primarni glaukom otvorenog ugla, primarni juvenilni glaukom, okularnu hipertenziju i sekundarne glaukome otvorenog ugla, kao što su pseudoeksfolijativni glaukom i pigmentni glaukom.

2.2. Primarni glaukom otvorenog ugla

Primarni glaukom otvorenog ugla (primary open-angle glaucoma, POAG) je hronična, progresivna neuropatija vidnog živca, sa karakterističnim morfološkim promenama glave vidnog živca i peripapilarnih retinalnih nervnih vlakana u odsustvu drugih očnih oboljenja i urođenih anomalija. Ove promene su udružene sa progresivnim odumiranjem retinalnih ganglijskih ćelija i promenama u vidnom polju.

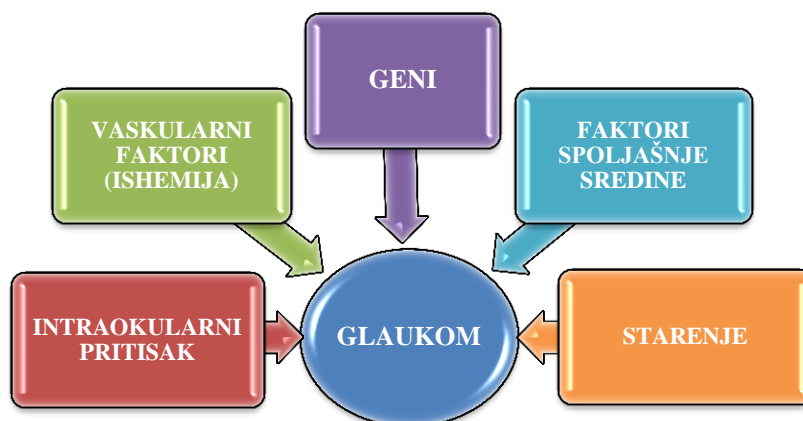
Glaukom je i dalje veliki problem javnog zdravlja širom sveta. Čak i u razvijenim zemljama, polovina slučajeva glaukoma je nedijagnostikovana do uznapredovalih promena u vidnom polju, zbog najčešće asimptomatske kliničke slike. Nakon što se dijagnostikuje glaukom, pacijenta treba pratiti doživotno kako bi se sprečilo napredovanje oštećenja u vidnom polju i da bi se održao kvalitet njegovog života.

Uznapredovali gubitak vidnog polja može se naći čak u oko 20 % osoba obolelih od primarnog glaukoma otvorenog ugla u trenutku dijagnoze i važan je prognostički faktor za dalji razvoj glaukoma i slepila. Kada se pojave rani defekti u vidnom polju, a IOP je veći od 30 mmHg, osobe obolele od glaukoma ukoliko su bez terapije mogu izgubiti ostatak vidnog polja za tri godine ili kraći vremenski period (25).

2.2.1. Vrste primarnog glaukoma otvorenog ugla

1. Primarni glaukom otvorenog ugla sa povišenim intraokularnim pritiskom (high pressure glaucoma, high-tension glaucoma, HTG)
2. Primarni glaukom otvorenog ugla sa normalnim intraokularnim pritiskom (normal-pressure glaucoma, normal tension glaucoma, NTG)
3. Primarni juvenilni glaukom
4. Okularna hipertenzija (ocular hypertension, OH)

Etiologija primarnog glaukoma otvorenog ugla je i dalje nepoznata i nije dovoljno razjašnjena. Smatra se da brojni genetski faktori i druge bolesti imaju određenu ulogu u nastanku glaukoma (shema 1) (24, 26, 27).



Shema 1. Faktori koji utiču na razvoj glaukoma.

Svetska zdravstvena organizacija (WHO) procenjuje da u svetu 105 miliona ljudi boluje od glaukoma. Glaukom je sve značajniji javni zdravstveni problem zbog starenja svetske populacije. Glaukom otvorenog ugla je najčešći oblik glaukoma kod pripadnika bele rase i Afrikanaca, dok je glaukom zatvorenog ugla češći kod Azijata. U Sjedinjenim Američkim Državama, POAG je četiri do pet puta češći među Afro-američkim stanovništvom u odnosu na stanovništvo evropskog porekla, a učestalost POAG kod meksičkih Amerikanaca je negde između. Prevalenca POAG u Kineskoj populaciji je slična kao u Evropi, dok je kod Indijaca veća. POAG se nasleđuje kao kompleks različitih karakteristika, mada i činioci životne sredine mogu da doprinesu ovoj bolesti.

Okularna hipertenzija ili visoki IOP, se smatra jednim od glavnih faktora rizika za razvoj glaukoma. Drugi faktori rizika za glaukom uključuju starenje, pozitivnu porodičnu istoriju glaukoma među pripadnicima prvog stepena srodstva, centralnu debljinu rožnjače manju od 555 mikrona, visoku kratkovidost i migrenu (5, 8, 24).

2.2.2. Faktori rizika za nastanak POAG

U faktore rizika za nastanak POAG spadaju:

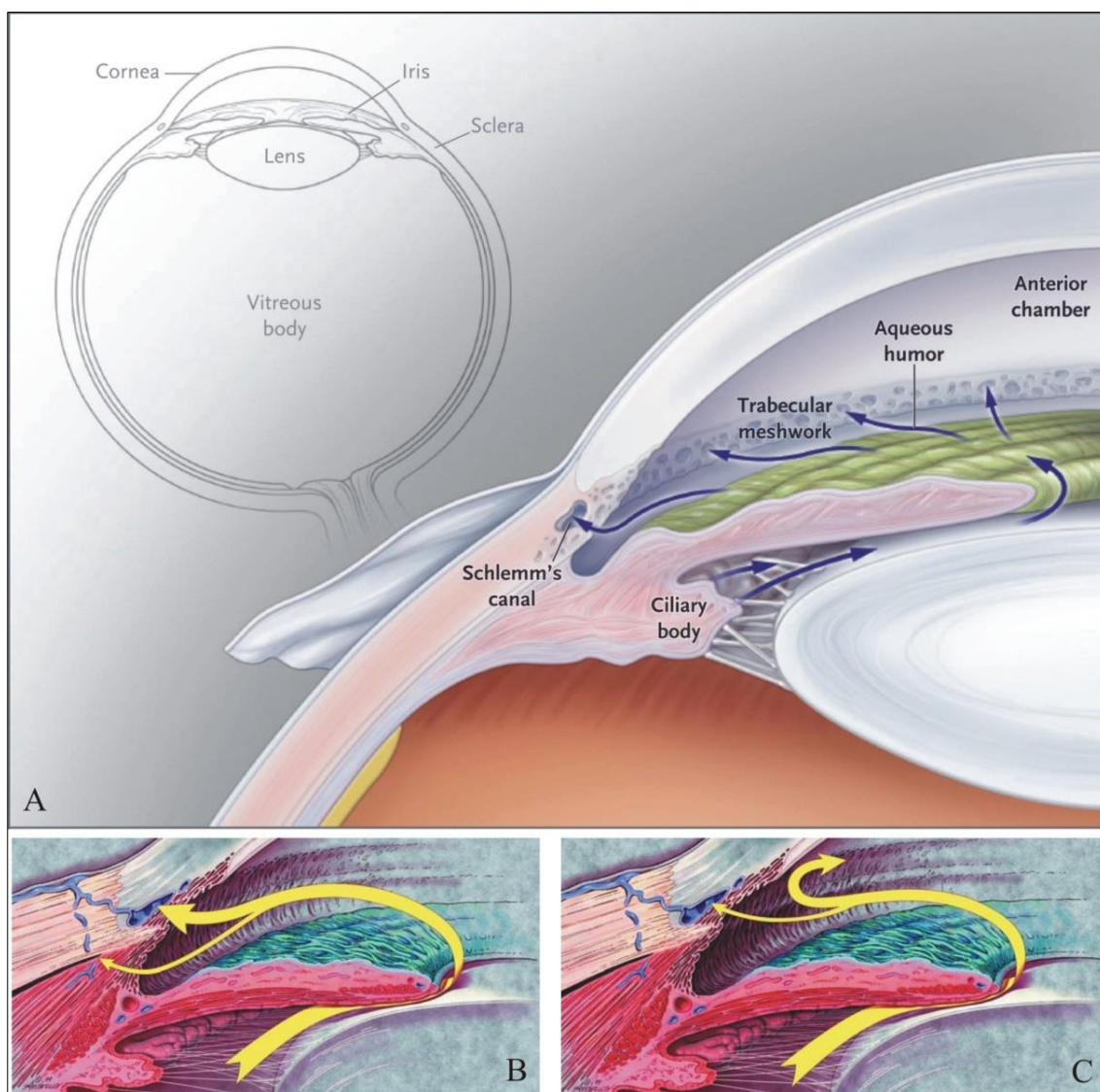
1. *Intraokularni pritisak.* POAG se može javiti sa ili bez povišenog očnog pritiska, ali je danas sniženje očnog pritiska glavni terapijski cilj i jedino se na IOP može delovati: lekovima, laserski ili hirurški. Povišeni IOP je u vezi sa prevalencom i incidencom OAG. Svako povećanje IOP od 1 mmHg povećava rizik za nastanak OAG za 1-12% među pripadnicima bele rase, za 10% kod Afrikanaca i 18% kod stanovnika latinske Amerike (28).

2. *Starost* je značajan faktor rizika za nastanak OAG. POAG je češći kod starijih osoba, a u većini slučajeva bolest se ispoljava posle 65 godine starosti. Oboljeva 1-2% belaca starijih od 40 godina, a taj procenat raste na 5% sa 70 godina starosti. Nije uobičajeno da se dijagnoza POAG postavi kod mlađih od 40 godina (29).
3. *Rasa*. POAG je znatno češći, razvija se ranije i u težem obliku kod pripadnika crne u odnosu na pripadnike bele rase (30).
4. *Porodična anamneza i nasleđivanje*. POAG je često nasledan, posebno na multifaktorni način. Geni koji su odgovorni za nasleđe (MYOCIN, OPTIN, WDR36), pokazuju inkompletnu penetraciju i varijabilnu ekspresiju. Intraokularni pritisak, lakoća oticanja očne vodice i dimenzije optičkog diska su takođe genetski predodređeni. Prvostepeni rođaci pacijenata su pod povećanim rizikom za razvoj POAG, međutim procene tačnog rizika nedostaju zato što se bolest razvija kod starijih osoba, a dugotrajno praćenje je neophodno za dobijanje preciznih rezultata. Saopšteno je da je približan rizik za braću i sestre 10%, a za potomstvo 4% (31).
5. *Centralna debljina rožnjače*. Tanja rožnjača, odnosno smanjenje centralne debljine rožnjače za 40 μm povećava rizik za nastanak glaukoma za 30% do 41% (3, 31).
6. *Miopija* veća od -3D (dioptrijska) je udružena sa povećanim rizikom za nastanak OAG. Rezultati istraživanja "Duch study" pokazuju da ljudi sa miopijom većom od -4D imaju 2,3 puta veći rizik za nastanak OAG, jer su miopne oči podložnije oštećenjima prouzrokovanim povišenim intraokularnim pritiskom (32).
7. *Okularni perfuzioni pritisak*. Smanjen okularni perfuzioni pritisak povećava rizik za nastanak OAG, u zavisnosti da li su pacijenti lečeni sistemskim antihipertenzivima ili ne (31).
8. *Drugi faktori rizika*: šećerna bolest, arterijalna hipertenzija, migrena, Raynaud sindrom, obstruktivna sleep apnea (33).

2.2.3. Patogeneza glaukomnog oštećenja

Povišenje IOP kod POAG je prouzrokovano povećanim otporom oticanju očne vodice u komornom uglu, tj. trabekulumu i Schlemm-ovom kanalu. Morfološke i biohemijske analize trabekuluma bolesnika sa POAG otkrile su gubitak ćelija, povećanu akumulaciju ekstracelularnih matriksnih proteina, promene u citoskeletu, ćelijsko starenje i procese subkliničkog zapaljenja (slika 1). Tkivo trabekuluma je glavna meta za ova dešavanja u prednjoj očnoj komori, a razvoj i napredovanje glaukoma moguće je pratiti akumulacijom oksidativnog ošte-

ćenja u ovom tkivu (34). Povećanje IOP, koje je različito za svako pojedinačno oko i koje to oko ne može da toleriše, dovodi do oštećenja *laminae cribrosae* i dalje vodi oštećenju aksona i apoptozi retinalnih ganglijskih ćelija. Preterminalni događaj je influks Ca^{++} u ćelijska tela i povećanje koncentracije intracelularnog azot-oksida. Dva mehanizma, vaskularni i mehanički, objašnjavaju ovu sporu programiranu smrt RGC. Nedavne studije sugerišu da dodatno autoimunost može doprineti patogenezi glaukoma (35–40).



Slika 1. (A) Normalan tok očne vodice u oku: iz ciliarnog tela i zadnje očne komore do prednje očne komore kroz zenicu i drenira se kroz trabekulum u komornom uglu, u Schlemm-ov kanal, odatle u episkleralne vene. Kod POAG povećan je otpor oticanju očne vodice.
 (B) Normalno oticanje očne vodice putem trabekuluma (velika strelica) i uveoskleralno oticanje (mala strelica). Veći deo očne vodice otiče kroz trabekulum.
 (C) Oticanje očne vodice u POAG; oticanje ovim putevima je smanjeno.

Preuzeto: Kwon YH i sar., *N Engl J Med* 2009.; Distelhorst JS i Hughes GM, *Am Fam Physician* 2003.

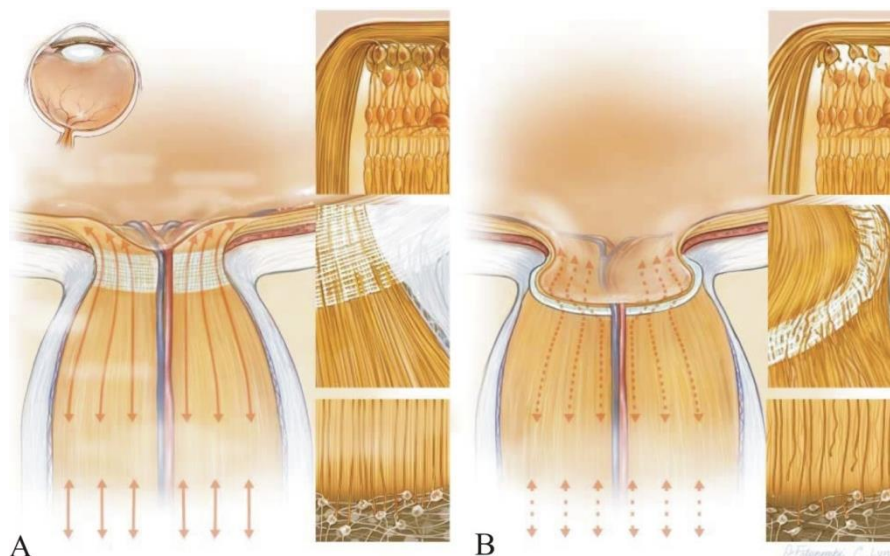
2.2.4. Klinička slika

Simptomi

POAG je obično asimptomatski dok se ne javi značajan gubitak vidnog polja, jer se oštećenje postepeno razvija, a područje fiksacije (centralni vid) je zahvaćeno kasno u toku bolesti. Obično je to bilateralna bolest, ali je napredovanje najčešće asimetrično.

Klinički znaci

- 1. Povišen IOP.** Bouwman je bio prvi koji je ukazao na značaj merenja IOP. Razvio je sistem digitalnog palpiranja i merenja IOP, čime nam je omogućio da dodelimo N (dig) za normalan očni pritisak, kao i N+1, N+2, N+3 za povišen očni pritisak (41). Približno 2% opšte populacije starosti preko 40 godina ima IOP veći od 24 mmHg, a 7% veći od 21 mmHg. Ipak, samo 1% njih ima glaukomatozna oštećenja u vidnom polju. Takođe, ima i onih sa normalnim IOP, manjim od 22 mmHg, kod kojih postoje eskavacija glave vidnog živca i promene u vidnom polju. Veliki značaj se pridaje fluktuaciji IOP. Potrebno je razlikovati dnevnu (diurnal) fluktuaciju, 24h fluktuaciju i dugoročnu. Dnevna fluktuacija je povećana u očima sa OH, ali ne kod NTG (41). Dugoročna fluktuacija je verovatno faktor rizika za progresiju glaukoma. Loša komplijansa će povećati ovu fluktuaciju, kao i rizik.
- 2. Dnevna kolebanja u nivou IOP** veća od 5 mmHg, kao i asimetrija visine IOP između dva oka.
- 3. Gonioskopski nalaz:** otvoren komorni ugao. Ovaj gonioskopski nalaz ne odstupa od nalaza zdravih ljudi istih godina starosti.
- 4. Promene glave vidnog živca:** eskavacija, asimetrija izgleda papile vidnog živca i asimetrija eskavacije ($> 0,2$ E/D ili C/D), bledilo i hemoragije na optičkom disku (slika 2).



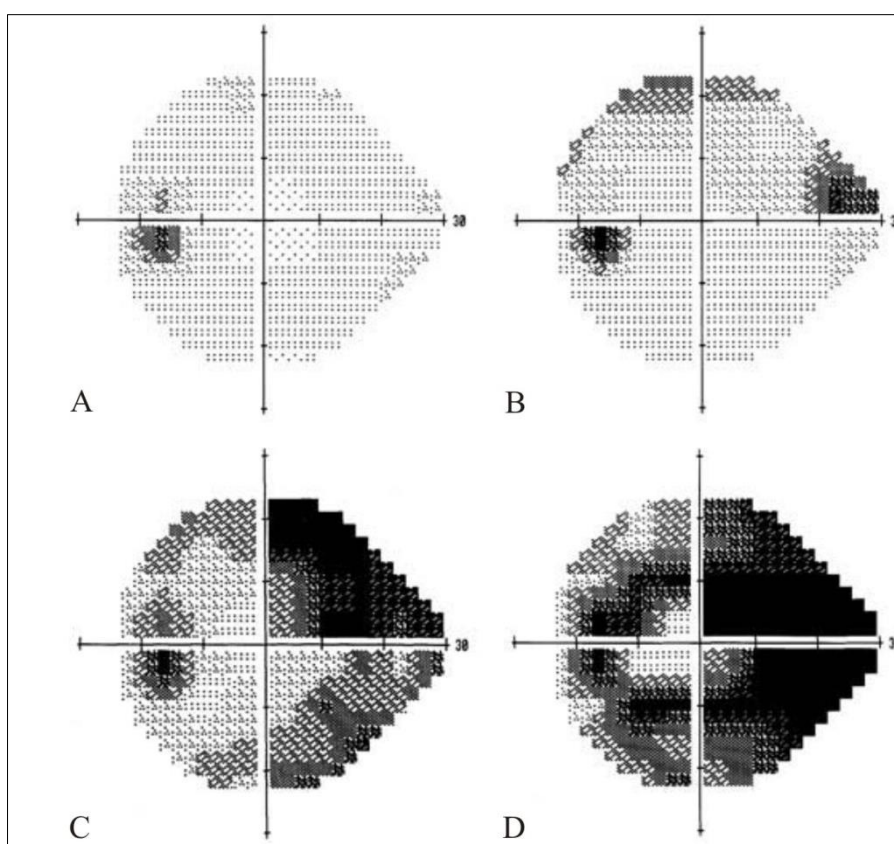
Slika 2. (A) Optički disk se sastoji od neuronskih vlakana, vaskularnog i vezivnog tkiva. Konvergencija aksona RGC u optički disk stvara neuroretinalni obod (rim). Neuroretinalni obod okružuje centralnu plitku depresiju (cup) u optičkom disku. Aksoni RGC nakon prolaska kroz laminu cribrosu (LC) formiraju vidni živac. (B) Glaukomatozna optička neuropatija predstavlja oštećenje i remodelovanje optičkog diska i LC, što dovodi do gubitka vida. Sa povišenjem IOP, dolazi do istanjenja i posteriornog pozicioniranja LC, što dovodi do produbljivanja eskavacije i sužavanja oboda. Poremećaji na nivou LC pokreću i doprinose blokadi aksonskog transporta, što je praćeno apoptozom RGC.

Preuzeto: Weinreb RN i sar., JAMA 2014.

5. Vidno polje predstavlja projekciju funkcionalnog dela retine u prostoru, odnosno projekciju svih retinalnih tačaka na kojima mogu započeti vidne senzacije. Ispitivanje vidnog polja vrši se pomoću perimetrije. Pored standardne automatske perimetrije (standard automated perimetry, SAP), postoje i druge perimetrijske procedure (short-wavelength automated perimetry– SWAP, frequency-doubling technology perimetry– FDTP). Ne postoji patognomonično glaukomno vidno polje, već postoji tipičan glaukomni razvoj ispada vidnog polja: od početnih promena tipa isključivanja slepe mrlje i pojave paracentralnih skotoma tipa Bjeruma i Siedela, preko gubitka nazalnog dela vidnog polja sa očuvanim centralnim delom i nekoliko temporalnih ostrva, do krajnjeg stadijuma gde jedno ili više temporalnih ostrva vidnog polja prethode konačnom gubitku vida (slika 3). Ispitivanje vidnog polja na tri do šest meseci, a posebno pre i nakon promene terapije, pre i posle operativnog zahvata predstavlja osnovno merilo postojanja i brzine progresije glaukomne bolesti (42-45).

Gradiranje glaukomnog oštećenja (Hadopp klasifikacija)

- a) **Blago oštećenje** se karakteriše ranim defektima u vidnom polju (MD < -6 dB) i malim eskavacijama glave vidnog živca.
- b) **Umereno oštećenje** se karakteriše jasno definisanim arkuatnim skotomima (MD < -12 dB) i umerenim istanjenjem neuroretinalnog oboda.
- c) **Teško oštećenje** se manifestuje ekstenzivnim gubitkom vidnog polja (MD > -12 dB) i izraženom eskavacijom.
- d) **Završni stadijum bolesti** se karakteriše malim zaostatom vidnog polja i minimalnim zaostalim neuroretinalnim obodom.



Slika 3. Kompjuterizovano vidno polje pokazuje progresivan gubitak vidnog polja levog oka pacijenta sa nekontrolisanim glaukomom. (A) Prvo vidno polje je normalno i pokazuje lokaciju slepe mrlje. (B) Prva abnormalnost u vidnom polju ovog pacijenta je gubitak vidnog polja u superiornom i nazalnom delu vidnog polja. (C) Napredovanje oštećenja; gubitak vidnog polja obuhvata i superiorne i inferiorne delove vidnog polja. (D) Na kraju, u uznapredovaloj bolesti, prisutno je veliko oštećenje, celo vidno polje nestaje, ostaje samo centralni deo.

Preuzeto: Distelhorst JS i Hughes GM, Am Fam Physician 2003.

6. Debljina peripapilarnih nervnih vlakana retine

Trajni gubitak retinalnih ganglijskih ćelija karakterističan za glaukom manifestuje se kao eskavacija (cupping) glave vidnog živca i kao lokalizovani i/ili difuzni gubitak retinalnih nervnih vlakana (RNFL). Trenutni dokazi ukazuju da je u mnogim očima moguće postojanje značajnih oštećenja vidnog živca i da ona mogu da prethode promena i gubitku u vidnom polju, koji se registruju znatno kasnije. Tako je u studiji "Ocular Hypertension Treatment Study" (OHTS) prikazano da su promene na disku detektovane ranije nego abnormalnosti u vidnom polju u više od polovine bolesnika u vreme postavljanja početne dijagnoze glaukoma (42).

U novije vreme je razvijeno nekoliko laserskih i optičkih metoda koje pružaju objektivnije i kvantitativne informacije o količini izgubljenih aksona RGC i morfološkim parametrima glave vidnog živca. U ove tehnike spadaju: konfokalna skeniranje laser oftalmoskopija (confocal scanning laser ophthalmoscopy- CSLO (HRT)), skeniranje laser polarimetrija (scanning laser polarimetry- SLP (GDx, GDxVCC)) i optička koherentna tomografija (optical coherence tomography- OCT).

OCT koristi interferometriju niske koherentnosti za dobijanje snimaka poprečnog preseka tkiva, koji su visoke rezolucije, pružajući tzv. optičku biopsiju. Ovo je analogno ultrazvuku, osim što se koristi svetlo umesto zvuka. OCT omogućava direktnu, „real-time“ vizuelizaciju retine i njene patologije, a takođe obezbeđuje kvantitativna merenja retinalne arhitekture sa većom rezolucijom (~ 10 µm) od CSLO i SLP (42, 46-48).

Procena glaukomnog oštećenja prema prosečnoj debljini retinalnih nervnih vlakana (RNFL Avg)

- >80 µm: normalna debljina
- 70–79 µm: granična vrednost, suspektno glaukomno istanjenje
- 60–69 µm: početno istanjenje, rani stadijum glaukoma
- 50–59 µm: umereno istanjenje, umeren stadijum glaukomog oštećenja
- 40–49 µm: uznapredovalo istanjenje, uznapredovali stadijum glaukoma
- <40 µm: uznapredovalo istanjenje, retinalno neurodegenerativno oboljenje.

Glaukom pokazuje predilekciju za gornji i donji kvadrant glave vidnog živca i gubitak RNFL u ovim kvadrantima, pa je prosečna debljina vlakana u superiornom (RNFL Sup) i inferiornom kvadrantu (RNFL Inf) važna za procenu glaukomnog oštećenja. Normalna

vrednost za prosečnu debljinu nervnih vlakana u gornjem kvadrantu (Savg RNFL) je 142,7 μm , a rana glaukomna istanjenja se javljaju ako je debljina 104,8 μm . Takođe, normalna vrednost za prosečnu debljinu nervnih vlakana u donjem kvadrantu (Iavg RNFL) je 138,6 μm , a rana glaukomna istanjenja se javljaju ako je debljina 103,9 μm .

2.2.5. Lečenje i ciljevi lečenja

Visina IOP za koju se pretpostavlja da će sprečiti nastanak daljih glaukomnih oštećenja definiše se kao ciljni pritisak (24). Za pacijente sa početnim IOP iznad normalnog opsega, ciljni IOP je između 11-19 mmHg. Za pacijente sa početnim IOP u okviru normalnog opsega, ciljni IOP mora biti ispod 15 mmHg (41). Uz pomoć terapije IOP treba održati na, ili ispod ciljnog nivoa. Mada nema sigurnog nivoa, progresija je retka ako je IOP manji od 16 mmHg. Za pacijente sa odmaklom bolešću neophodno je da se odrede još niži ciljni pritisci, jer gubitak svake preostale ganglijske ćelije sve teže pogađa vidnu funkciju.

Terapijski algoritam preporučen od strane Evropskog udruženja glaukologa (EGS) je: farmakološko smanjenje očnog pritiska kao prvi korak, zatim laserske intervencije na trabekulumu i na kraju, hirurgija glaukoma (filtracione operacije). S druge strane, EGS preporučuje da terapijski ciljni IOP treba postaviti individualno, za svakog pacijenta posebno, i to kao funkciju stepena oštećenja vidnog živca, životnog veka pacijenta, brzine progresije i vrednosti intraokularnog pritiska pre tretmana (24).

Lečenje počinje upotrebom medikamentoznih preparata (95% bolesnika), bilo kao monoterapija ili kombinovana terapija, sem kod glaukoma otkrivenih u kasnim stadijumima bolesti i nekih vrsta sekundarnih glaukoma (49). Danas se koriste sledeći medikamenti:

- parasimpatikomimetici (holinergici i antiholinesterazni preparati),
- simpatikomimetici (α i β adrenergičke supstance koje smanjuju produkciju očne vodice i povećavaju lakoću oticanja),
- adrenergički blokatori,
- prostaglandini i njihovi analozi,
- lekovi koji smanjuju produkciju očne vodice (inhibitori karboanhidraze i kardijalni glikozidi),
- lekovi sa osmotskim dejstvom.

Dalji koraci u lečenju bolesnika obolelih od glaukoma su:

- laserska trabekuloplastika, koja može biti i primarni tretman ili dopuna medikamentoznom lečenju,
- filtracione operacije sa ili bez primene antimetabolita,
- dodatna medikamentozna terapija nakon hirurgije, ukoliko je potrebno,
- primena drenažnih implanata,
- ciklodestruktivne procedure (24, 50).

2.3. Neurodegeneracija i neuroprotekcija u glaukomu

Retinalne ganglijske ćelije ne umiru sve i istovremeno tokom glaukomne bolesti, tj. neke grupe RGC su osetljivije na stresorne agense, dok neke grupe RGC ostaju duže zdrave. Čak se i degeneracija samih RGC ne dešava odjednom, prvo stradaju aksoni, pa tek kasnije telo ćelije i dendriti. Sve ovo može promeniti strategiju neuroprotekcije, koja bi imala za cilj da stabilizuje i spase RGC koje su još funkcionalne. Istraživanje molekularnih aspekata u POAG je usmerilo neuroprotekciju ka blokadi neurotrofina, ekscitotoksičnosti glutamata protiv RGC preko N-metil-D-aspartat (NMDA) receptora i blokadi aktiviranja apoptotične kaskade u RGC i glijalnim ćelijama (51).

Postoji sve veće interesovanje za ispitivanje povezanosti oksidativnog stresa, zapaljenja, apoptoze i primarnog glaukoma otvorenog ugla, njegove pojave i progresije (52).

U današnje vreme postoji nekoliko teorija koje objašnjavaju gubitak RGC u POAG: 1) mehanička teorija, tj. mehanički stres zbog povećanog očnog pritiska (53), 2) ishemijska teorija, tj. smanjenje protoka krvi u retini (54), reperfuziona povreda, oksidativni stres (54), glutamatska ekscitotoksičnost (55, 56), i 3) autoimunost (57). Neki od ovih mehanizama, ili svi, mogu da izazovu glaukomni gubitak retinalnih ganglijskih ćelija (58).

Postoje brojni dokazi koji podržavaju hipotezu da imuni sistem ima određenu ulogu u patogenezi glaukomne optičke neurodegeneracije (59, 60). Malo je razlika između korisnog, zaštitnog efekta imuniteta i rizika od indukcije autoimune neurodegenerativne bolesti, tako da efekti ovakvih imunskih regulacija mogu biti ili neuroprotektivni ili neurodestruktivni (61). Imuni odgovor posredovan T-ćelijama može u početku biti koristan u ograničavanju neurodegeneracije. Međutim, neuspeh da se pravilno kontroliše, stresom indukovani imuni odgovor, verovatno pretvara zaštitni imunitet u autoimuni neurodegenerativni proces koji može olakšati progresiju neurodegeneracije u glaukomu (61, 62). Pronađen je povišen nivo autoantitela u

serumu bolesnika obolelih od glaukoma, i to auto-antitela na proteine toplotnog šoka kao što su proteini toplotnog šoka 60 (familija HSP 60) i HSP 27, alfa- kristalin i HSP 70 (39, 63). Faktor nekroze tumora- α (TNF- α) je doprinoseći faktor neurodegeneracije u glaukomu (64–67).

2.4. Geni u patogenezi glaukoma

2.4.1. Glavni geni povezani sa POAG

Genetska heterogenost POAG ukazuje da su različiti geni ili različiti genetski mehanizmi uključeni u njegovu patogenezu. Klinički, genetska heterogenost se odnosi na prisustvo različitih genetskih defekata koji izazivaju istu bolest (16).

Do 2006. godine pronađeno je 25 genskih lokusa povezanih sa POAG, ali samo tri osnovna gena su identifikovana, i to Myocilin gen (MYOC) (68), Optineurin gen (OPTN) (69) i WD Repeat Domain 36 gen (WDR36) (70). Iako je citohrom P450 familija 1 subfamilija B polipeptid 1 (CYP1B1) prvenstveno vezan za primarni glaukom zatvorenog ugla, dokazano je postojanje mutacije ovog gena u slučajevima POAG, kao i da mutacija na ovom genu može izazvati POAG po autozomno- recesivnom načinu nasleđivanja (71, 72).

Drugi gen povezan sa POAG je identifikovan 2002. godine i dobio je ime optineurin, OPTN (OPTN- optic neuropathy- inducin protein) (69). Prema shvatanju Rezaie i saradnika, divlji tip OPTN ima neuroprotektivnu ulogu protiv citolize indukovane TNF- α , tako da defektni protein može dovesti do optičke neuropatije i gubitka vida (16, 69).

Saopšteno je da se mutacija optineurin gena javlja u 16,7% porodica sa naslednim POAG, a većina od njih ima NTG. Mutacije gena citohrom P450 porodica 1 podfamilija B polipeptid 1 (CYP1B1) i latentni-transformišući faktor rasta beta- vezujući protein 2 (LTBP2) su češće u kongenitalnom i juvenilnom glaukomu. Drugi genetski faktori, npr. optička atrofija 1 (OPA1), apolipoprotein E, E- kadherin, neurotrofin- 4 (NTF- 4) i opticin (OPTC) povezani su sa rizikom za retinalnu degeneraciju, koja je karakteristika i glaukoma (73).

Podaci iz 2013. godine ukazuju da ima 33 genska lokusa i 5 identifikovanih glavnih gena koji su u vezi sa POAG. Pored već pomenutih, Myocilin (GLC1A), Optineurin (GLC1E), WD repeat domain 36 (GLC1G), pominju se i NTF4 (GLC1O) i ASB10 (GLC1F) (74).

2.4.2. Drugi geni povezani sa POAG

Pored glavnih gena postoje mnogi drugi geni povezani sa POAG: ANP, APOE, OPA1, P53, GST, interleukini i TNF- α . Mnoge studije pokazuju povezanost ovih gena i pojedinih populacionih grupa, ali u nekim slučajevima postoje konfliktni rezultati u okviru iste populacije. Nemoguće je zaključiti da li varijacije nastaju usled samih razlika u populaciji, veličini uzorka, modela studije ili različitosti u kliničkoj prezentaciji pacijenata (58, 75, 76).

2.5. Autoimunost u glaukomu

Osobe obolele od glaukoma imaju individualne profile autoantitela protiv specifičnih proteina i određenih neuronskih proteina u telesnim tečnostima, kao što su serum, očna vodica i suze, što snažno ukazuje na umešanost autoimune komponente u patogenezu glaukoma (77). Wax i saradnici su predložili da glaukom može biti neka vrsta organ-specifične autoimunske bolesti kod nekih pacijenata obolelih od NTG, i predložili da povećanje nivoa antitela na HSP može predstavljati uopšteni odgovor tkiva na stres ili oštećenje kod pacijenata sa NTG (37-39). Ova ushodna regulacija antitela se objašnjava kao iniciranje auto-agresivne sekvence, koja dovodi do patoloških stanja (78, 79). I zaista, prve studije na životinjama, tačnije Lewis pacovima, dokazale su neurodegenerativna svojstva indukovane autoimunosti prema RGC nakon systemske imunizacije poznatim antigenima kao što su HSP. Wax i saradnici su koristeći ovaj životinjski model eksperimentalnog autoimunog glaukoma (EAG) dokazali da injekcije HSP 60 ili HSP 27 u kombinaciji sa Freud-ovim adjuvansom i toksinom velikog kašlja izazivaju gubitak RGC (40). Štaviše, Joachim i saradnici (80, 81) su uspeali da pokažu kompleks promena u koncentraciji i pojavi autoantitela kod životinja sa provociranim glaukomom.

Kod pacijenata obolelih od glaukoma prvo je bio dokazan povišeni titar antitela protiv proteina toplotnog šoka 60 (heat shock protein 60, HSP 60). Zatim je opisano nekoliko serumskih autoantitela koji su bili povišeni u NTG: antitela protiv malih proteina toplotnog šoka (α -kristalin, β -kristalin, HSP 27). Takođe je potvrđena i pojava IgG autoantitela u serumu glaukomnih bolesnika u različitim populacionim grupama. Nekoliko autoantitela, kao što su antitela protiv HSP 70, anti-fosfatidilserina, γ -enolaze, glikozaminoglikana, neuron specifične enolaze, glutation-S-transferaze, α -fodrina, vimentina, mijelina osnovnog proteina (MBP), glijalnog fibrilarnog kiselog proteina (GFAP), retinaldehidnog gradivnog proteina ili retinalnog S-antigena je identifikovano i imaju ulogu u autoimunosti u glaukomu (77). Međutim, još uvek ostaje nejasno da li su autoantitela nađena u glaukomu posledica bolesti ili njen uzročnik.

Autoantitela su korisni biomarkeri za dijagnozu glaukoma. Biomarker, na osnovu svoje molekularne promene, prisustva ili odsustva, može koristiti kao parametar u vezi sa pojavom neke bolesti i njene kliničke težine. Čak i ako je prisustvo autoantitela posledica, ono može pomoći u ranom otkrivanju bolesti, pre pojave bilo kakve kliničke slike.

2.6. Biomarkeri u glaukomu

Ljudska krv, očna vodica, suze i druge telesne tečnosti i tkiva pacijenata obolelih od glaukoma su medijumi bogati različitim biomarkerima koji se mogu identifikovati i meriti.

2.6.1. Oksidativni stres i biomarkeri oksidativnog stresa u glaukomu

Oči su posebno osetljive na oksidativni stres (OS) koji može biti izazvan jakim svetlošću, ultraljubičastim zračenjem i raznim zagađivačima životne sredine. Smanjena antioksidantna odbrana zajedno sa povećanjem pro-oksidanata u očnoj vodici, drugim tkivima oka i krvi je povezana sa pojavom glaukoma (tabela 1). Progresija promena u POAG je povezana sa povećanjem markera OS. Neka istraživanja su dokazala značajnu korelaciju između nivoa malondialdehida (MDA) i težine glaukomne bolesti. U prisustvu reaktivnih vrsta kiseonika (RVK), NO proizvodi toksične metabolite (peroksinitrite) i izazvani oksidativno-nitratni stres prouzrokuje produženu upalu, ćelijsku proliferaciju i neurotoksičnost kod POAG pacijenata. Eritropoetin (EPO) ima protektivno dejstvo i pomaže u kontroli nastajanja peroksinitrita, na šta ukazuju povišeni nivoi EPO u očnoj vodici POAG pacijenata. RVK mogu oštetiti nukleinske kiseline što je bitan događaj za smrt ćelije. Značajno viši nivoi 8-hidroksi-20-deoksiguanozina (8-H-2-DG), dobijenog guanozin oksidacijom, u korelaciji su sa povišenim IOP i ispadima u vidnom polju POAG pacijenata. Mitohondrije su glavni izvori energije i RVK. Hronični OS dovodi do povećane proizvodnje RVK u mitohondrijama trabekuluma (52).

Tabela 1. Biomarkeri oksidativnog stresa i njihova disregulacija u POAG.

Biomarker	Uzorak	Disregulacija
SOD, superoksid dizmutaza	HA, serum	↑
GPx, glutatjon peroksidaza	HA	↑
AA, vit C, askorbinska kiselina	HA, plazma	↓
Vit D, α -tokoferol	krv	↓
Vit A, retinol	plazma	↓
NO, nitrit oksid	HA, serum	↑
EPO, eritropoetin	HA	↑
8-H-2-DG, 8-hidroksi-2-deoksiguanozin	TM, HA, serum	↑
MDA, malondialdehid	HA, LC, serum	↑

* HA- očna vodica, TM- trabekulum, LC- lamina cribrosa, ↑- povišen nivo, ↓- smanjen nivo

Preuzeto: Pinazo-Durán MD i sar., *Curr Opin Pharmacol*, 2013.

2.6.2. Biomarkeri imunog odgovora u glaukomu

Promena koncentracije različitih medijatora zapaljenja i imunog odgovora u krvi, očnoj vodici ili tkivima oka podržava teoriju o aktivnosti imunog sistema u patogenezi POAG (52). Međutim, sam mehanizam interakcije limfociti - antitela - citokini ostaje nejasan. Brojna antitela protiv neuron specifične enolaze i antigena vidnog živca i retine su dokazana (82-86) (tabela 2). Inflamatorni imunološki odgovor u POAG se odvija preko citokina. T-helper CD4 ćelije su glavni izvor citokina, čija se proizvodnja i disregulacija dešava u očnoj vodici, što sugerše da se u POAG dešava Th-1 tip imunskog odgovora (87-90). Takođe, faktor nekroze tumora alfa (TNF- α), transformišući faktor rasta beta (TGF- β), endotelijalni-leukocitni adhezioni molekul 1 (ELAM-1) i interleukini (IL), IL-1a i IL-8, su povišeni u očnoj vodici bolesnika sa glaukomom (91-94). Sistem komplementa (C1k, C4BP, C4B, C3, C5AR, C8, C9) ima ključnu ulogu u urođenim i u adaptivnim aktivnostima imunog sistema (95) (tabela 2).

Tabela 2. Biomarkeri imunog odgovora i njihova disregulacija u POAG.

Biomarker	Uzorak	Disregulacija
AT α enolaza	HA	↓
AT rodopsin	serum	↑
AT neurofilamentni protein	serum	↑
AT fosfatidilserin	serum	↑
AT glikozaminoglikan	serum	↑
AT glutation S transferaza	serum	↑
AT neuron specifična enolaza	serum	Detektabilan u 20% POAG
AT heat shock protein	HA, serum	↑
AT Helicobacter pylori	HA, serum	↑
AT Chlamydia pneumoniae	serum	↑
AT myelin basic protein	HA, serum	↑
AT α -1-antitripsin	HA, serum	↑
AT glial fibrilarni acid protein	HA, serum	↓
AT β -L-cristalin	HA, serum	↓
AT ubikvitin	HA, serum	↓
IL-2	TM	↑
IL-10	serum	↑
TNF- α	vidni živac, retina	↑
TNF- α	serum	↓
IL-4	serum	↑
IL-6	serum	↑
IL-12p40	serum	↑
IL-23	serum	↓
IL-12	HA	↑
CXCL9 (hemokin ligand 9)	HA	↑
Interferon γ	HA	↑
IL-8	HA	↑
Serum amiloid A	HA	↑
IL-6	HA	↓
TGF- β	HA	↑

* AT– antitela, HA– očna vodica, IL– interleukin, TM– trabekulum, TGF– transformišući faktor rasta, TNF– faktor nekroze tumora, ↑– povišen nivo, ↓– smanjen nivo
 Preuzeto: Pinazo-Durán MD i sar., *Curr Opin Pharmacol*, 2013.

2.6.3. Apoptoza i biomarkeri apoptoze u glaukomu

Apoptoza je zajednički kraj svih RGC u glaukomu. Brojna istraživanja pokazuju upletenost oksidativnog stresa, inflamacije, ishemije, ekscitotoksičnosti i autoimuniteta u proapoptotska dešavanja i smrt RGC. Ipak, mehanizam gubitka RGC i aksona glave vidnog živca u glaukomu je i dalje nerazjašnjen. Kao odgovor na glaukomatozni stimulus odigrava se transkripcija pro-apoptotskih signala (kaspaze- Cas aktivacija i mitohondrijalna- mt disfunkcija), kao i aktivacija promotera preživljavanja (neurotrofini), koji dalje određuju sudbinu RGC. Kaspaze- Cas (inicijatori i efektori) su proteaze koje promovišu dezorganizaciju i razaranje apoptotskih ćelija. Cas igraju centralnu ulogu u transdukciji apoptotskih signala. Povišen IOP indukuje ushodnu transkripciju i aktiviranje Cas (Cas-2, 8, 9, 10) koje pokreću kaskadu apoptoze, gde je kaspaza 3 (Cas-3) efektor i uključena je u specifičnu ćelijsku de-integraciju. Ovaj poslednji korak može biti verifikovan detekcijom poli-adenil-riboza-polimeraze (PARP) u očnoj vodici, trabekulumu i plazmi (tabela 3) (96-98).

Tabela 3. Biomarkeri apoptoze i njihova disregulacija u POAG.

Biomarker	Uzorak	Disregulacija
Cas-2,8,9,10 (kaspaza)	HA, plazma	↑
PARP-1 (poli adenil ribozil polimeraza)	HA, plazma	↑
Bax (regulator apoptoze)	krv	↑
Kalcijum	krv	↑
Homocistein	HA, plazma	↑
Ap(4)A (di-adenozin 4 fosfat)	HA	↑
PGDS (prostaglandin H2D sintetaza)	HA	↑
Cas-14 (kaspaza)	TM	↑
Transtiretin	HA	↑
BDNF (brain derived neurotrofični faktor)	HA, serum	↓
sFas (solubilni Fas receptor)	HA	↑
TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling)	TM	↑
sCD44	HA	↑
GRP78 (glukoza regulatorni protein 78)	TM	↑

*HA– očna vodica, TM– trabekulum

Preuzeto: Pinazo-Durán MD i sar., *Curr Opin Pharmacol*, 2013.

Transmembranski receptor Fas/APO-1 i njegov vezujući protein - partner Fas ligand (FasL) ključni su regulatori apoptoze, koja nastaje vezivanjem Fas za Fas ligand ili rastvorljivi Fas ligand (sFasL). Solubilni Fas blokira apoptozu sprečavajući vezivanje između Fas i Fas liganda ili sFasL. U literaturi postoje podaci da su detektovani niži nivoi sFas u trabekulumu pacijenata sa POAG (97-99).

Biomarkeri su pokazatelji biomedicinskog stanja, ali mogu pomoći i u lečenju neke bolesti. Dosta biomarkera je otkriveno u patogenezi glaukoma, međutim, nijedan se nije izdvojio kao ključan i siguran, niti kao molekul koji bi sprečio glaukomno slepilo. Stoga je važno nastaviti istraživanje različitih biomarkera u POAG kako bi se došlo do boljih saznanja vezano za rizik od glaukoma, tačnu dijagnozu, efikasnost antiglaukomatoznih lekova. Glaukom otvorenog ugla, kao neurodegenerativna bolest, nastaje tek posle pojave citotoksičnosti. Suštinska stvar je pronaći potencijalne biomarkere koji bi pomogli u ranom otkrivanju promena u trabekulumu i drugim putevima oticanja očne vodice pri povišenom IOP, kao i one koji bi zaštitili RGC i vidni živac i pomogli da se spreči dalja degeneracija.

2.7. Faktor nekroze tumora

Faktor nekroze tumora (tumor necrosis factor, TNF, kahektin ili TNF- α) pripada grupi proinflamatornih citokina. Prvi put ga je otkrio dr Lloyd Old 1975. godine kao supstancu koja dovodi do nekroze L-929 ćelija fibrosarkoma kod miša, po čemu je i dobio naziv (100). Nešto kasnije su Beutler i Cerami otkrili da je hormon koji izaziva kaheksiju, a nazvan kahektin, zapravo TNF (101).

Citokini (interleukini, interferoni, faktor stimulacije kolonija, hemokini, faktor nekroze tumora, faktor rasta) su proteini koji imaju centralnu ulogu u modulaciji imuniteta, ali mogu delovati i u angiogenezi i razvoju. Utvrđeno je da su serumske promene citokina povezane sa glaukomom, što ukazuje na mogućnost da imunitet ima ulogu u patogenezi POAG (84). Zato je moguće naći promenu u koncentraciji citokina u očnoj vodici pacijenata obolelih od glaukoma. Faktor nekroze tumora α (TNF- α), kao pluripotentan citokin, je povezan sa ishemijom tkiva, oštećenjem neurona i remodulacijom, a povišenje nivoa TNF- α ukazuje na oštećenje neurona nakon traume mozga.

Gen za TNF- α nalazi se na kratkom kraku hromozoma 6p21.3 dužine 3 kb i sadrži 4 egzona, od kojih poslednji kodira ekspresiju gena za sintezu 80% ovog molekula (102).

TNF- α proizvode mnoge ćelije: monociti, makrofagi, ćelije prirodne ubice (NK ćelije), mastociti, B limfociti, T limfociti, fibroblasti. Međutim, makrofag je glavni izvor

ovog citokina. Nakon stimulacije (lipopolisaharidi, brojni citokini od kojih su najznačajniji IL-1 i IFN- γ), signali se sa receptora na ćelijskoj membrani prenose u citoplazmu, pri čemu dolazi do aktivacije transkripcionih faktora, koji se zatim vezuju za promotorne regione target gena, sa sledstvenom transkripcijom odgovarajuće iRNK i sintezom TNF- α . Tako sintetisani TNF- α se transportuje i ugrađuje u ćelijsku membranu (103).

TNF- α se primarno sintetiše kao tip II transmembranskog proteina, sastavljen od tri identične subjedinice i 212 amino kiselina, sa intraćelijskim amino krajem i ekstraćelijskim karboksilnim krajem (104). U patološkim slučajevima, pod dejstvom serin-metaloproteinaze TNF- α konvertujućeg enzima (TACE), a u fiziološkim uslovima, pod dejstvom membranskog tipa matriks-metaloproteinaze (MT- MMP), nastaje zrela, solubilna forma TNF- α , od 17 kDa. Polimerizacijom tri polipeptidna lanca, nastaje cirkulišući homotrimer od 51 kDa, oblika trostrane piramide (103).

TNF- α ostvaruje svoje biološke efekte preko dva TNF receptora (TNF-RI i TNF-RII). TNF-RI (CD120a, p55) je konstitutivan u većini tkiva sa izuzetkom eritrocita i nestimulisanih limfocita i može ga aktivirati i membranski vezana i solubilna forma TNF- α . TNF-RII (CD120b, p75) poseduju samo ćelije imunskog sistema i aktivira ga samo membranski vezan TNF- α . Iako, TNF-RII ima pet puta veći afinitet za vezivanje TNF- α od TNF-RI, većina bioloških efekata se ostvaruje preko TNF-RI (105).

2.7.1. Signalna transdukcija TNF- α nakon vezivanja za receptore

Nakon vezivanja TNF- α za receptore, mala količina transmembranskog domena receptora se pod dejstvom proteaza (uključujući TACE) pretvara u svoje solubilne forme (sTNFR). Ovi solubilni receptori vezuju cirkulišući TNF- α i tako moduliraju efekte ovog citokina, pri čemu se mogu ponašati kao inhibitori njegove aktivnosti ako se nalazi u velikoj koncentraciji, ali mogu i povremenim oslobađanjem ovog citokina iz kompleksa sTNFR-TNF- α prolongirati njegove efekte u procesu inflamacije. Kada se TNF- α veže za ekstracelularni deo TNF-RI, receptor formira trimer, tj. dolazi do ligand indukovane trimerizacije, pri čemu je receptor spreman za prenos signala unutar ćelije (103).

Citoplazmatski rep TNF-RI učestvuje u signalnoj transdukciji interakcijom sa dve grupe intracelularnih proteina: TNF receptor vezanih faktora (TRAF) i adaptornih proteina koji sadrže domene smrti- DD (TNF-R pridruženi DD (TRADD), Fas pridruženi DD (FADD) i receptor inter-reagujući protein (RIP)), preko kojih se vezuju za DD TNF-RI. Adaptorni proteini takođe sadrže efektorni domen smrti (DED) koji može vezati DED u prokaspazi-8,

inicirajući kaskadu apoptotičnih signala. Postoji najmanje 6 TRAF molekula koji se preko TRAF- vezujućih mesta vezuju za citoplazmatski rep i iniciraju nekoliko signalnih puteva, uključujući: 1) NF- κ B signalni put, 2) signalni put kojim posreduju mitogenom aktivisane protein kinaze (MAPK) i 3) apoptozu.

2.7.1.1. Signalna transdukcija preko aktivacije receptora smrti

Apoptoza predstavlja oblik programirane ćelijske smrti, često opisana kao prirodni biohemijski proces ćelijske smrti i zauzima značajno mesto u regulaciji fizioloških i patoloških procesa i homeostazi organizma. Apoptozu može indukovati prisustvo signala smrti (FasL, TNF, TGF- β), odsustvo signala preživljavanja (faktori rasta), oštećenje ćelije (reaktivne vrste kiseonika (RVK), infekcija, oštećenje DNK), terapijski agensi (hemioterapeutici, UV i gama zračenje), toksini. Preko ovih signala aktiviraju se citoplazmatski proteolitički enzimi kaspaze, koji kaskadnim reakcijama aktivacije katalizuju hidrolizu peptidnih veza target proteina, sa sledstvenim gubitkom njihove funkcije. Apoptozu karakterišu promene na nivou plazma membrane, citoskeleta i DNK. Plazma membrana postaje propustljiva za intraćelijski sadržaj, endonukleaze se aktiviraju i vrše fragmentaciju hromozomalne DNK i tako fragmentirani delovi ćelije podležu fagocitozi. Apoptoza se odvija kroz tri faze: 1) faza indukcije (aktivacije), 2) efektorska faza (faza egzekucije) i 3) faza degradacije, a putevi aktivacije mogu biti spoljašnji i unutrašnji (106).

TNF- α može inicirati proces apoptoze spoljašnjim ili unutrašnjim putem aktivacije. U slučaju aktivacije ovog signalnog puta spoljašnjim putem, odnosno vezivanjem TNF- α za TNF-RI, koji sadrži DD, dolazi do vezivanja DD adaptornog proteina TRADD za ovaj receptor, TRADD vezuje FADD, koji sadrži efektni domen smrti (DED), preko koga se vezuje za DED prokaspaze-8. Oko ovog kompleksa, nazvanog kompleks koji indukuje signal smrti (DISC), grupišu se molekuli prokaspaze-8, pri čemu dolazi do njihove autokatalitičke aktivacije, dolazi do kaskadne aktivacije kaspaza (-3,-6,-7) koja konačno vodi ćeliju u smrt procesom apoptoze (106, 107).

2.7.1.2. Uloga reaktivnih vrsta kiseonika u TNF- α indukovanoj apoptozi

Osim što TNF- α može indukovati apoptozu aktivacijom kaspaze-8 (spoljašnji put), ovaj molekul indukcijom ekspresije gena za iNOS (inducibilna azot-monoksid sintaza) i NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat) oksidazu dovodi do generisanja reaktivnih

vrsta kiseonika i reaktivnih vrsta azota. Imajući u vidu efekte ovih metabolita na nivou plazma membrane, njihova povećana koncentracija može dovesti do poremećaja permeabilnosti unutrašnje mitohondrijalne membrane, sa gubitkom membranskog potencijala i oslobađanja citohroma-c u citoplazmu (unutrašnji put aktivacije apoptoze) (108). Osloboden citohrom-c u prisustvu ATP, formira kompleks sa Apaf1 (apoptotic protease activating factor 1) i prokaspazom-9. Ovaj kompleks naziva se apoptozom, pri čemu dolazi do katalitičke aktivacije prokaspaze-9 u kaspazu-9 i dalje kaskadne aktivacije kaspaza (-3,-6,-7), što ćeliju vodi u završnu fazu apoptoze (106, 108).

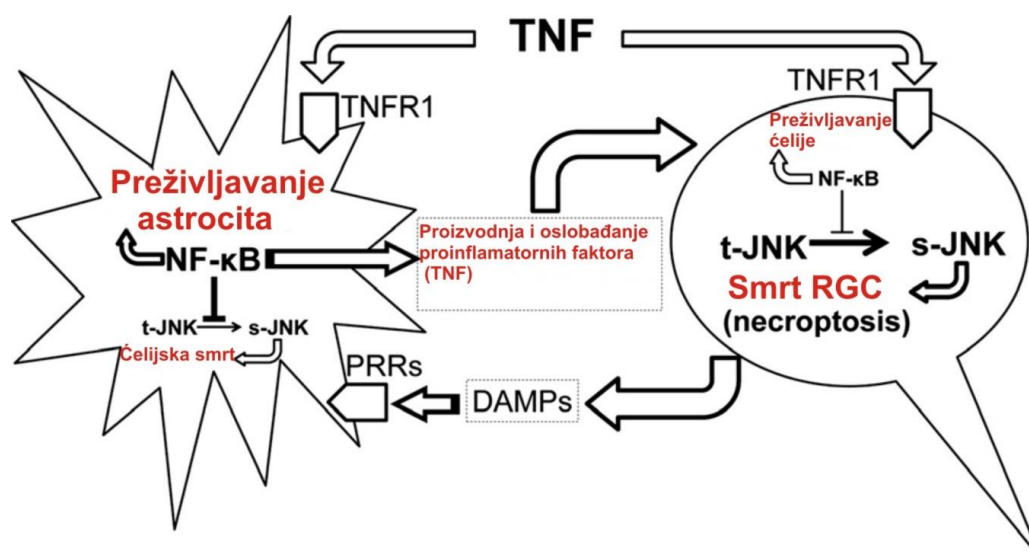
Unutrašnji put aktivacije apoptoze regulišu proteini smešteni na spoljašnjoj mitohondrijalnoj membrani i kontrolišu translokaciju određenih proteina iz intermembranskog prostora mitohondrija u citoplazmu. Oni mogu biti proapoptotski (Bak, Bax), proapoptotski fascilitator proteini (Bid, Bad, PUMA, Noxa) i antiapoptotski (Bcl-2, Bcl-X1). U slučaju aktivacije unutrašnjeg puta apoptoze, Bak i Bax proteini oligomerizuju, pri čemu se formiraju pore na mitohondrijalnoj membrani i omogućava izlazak citohroma-c. Antiapoptotski proteini se vezuju za Bax i Bak proteine i na taj način sprečavaju proces apoptoze. Da li će ćelija ući u apoptozu ovim mehanizmom ili će preživeti zavisi od koncentracije pro- i antiapoptotskih proteina (106).

2.7.2. Faktor nekroze tumora u patogenezi glaukoma

Faktor nekroze tumora- alfa (TNF- α) je uključen u brojna fiziološka i patološka stanja u centralnom nervnom sistemu (CNS) (109, 110). TNF može učestvovati u normalnom razvoju i održavanju nervnog tkiva, kao važan medijator urođenog imunog odgovora u CNS-u, uključujući i retinu (92, 109–112). Pokazano je da TNF ima uglavnom štetnu ulogu u širokom spektru neurodegenerativnih procesa u mrežnjači, kao što su glaukom i retinalna ishemija, koji su vodeći uzroci slepila odraslih u svetu (92, 112). Međutim, TNF ne mora samo da posreduje u ćelijskoj smrti i toksičnosti, on može da promoviše ćelijski opstanak (113).

Gubitak retinalnih ganglijskih ćelija je karakterističan za mnoga retinalna neurodegenerativna stanja, uključujući glaukom i retinalnu ishemiju (92, 112). U ovakvim neurodegenerativnim uslovima, astrociti mogu olakšati smrt RGC (114–117). Astrociti su važan tip glijalnih ćelija sa kojima su RGC u bliskom kontaktu. Astrociti u normalnom tkivu pružaju podršku neuronima i olakšavaju njihovu funkciju (118). Međutim, astrociti su usko povezani sa gubitkom neurona u patološkim stanjima u CNS (117, 119, 120). Već je pokazano da TNF koji proizvode i luče astrociti olakšava smrt RGC u kulturama RGC i astrocita (121).

Patološke efekte TNF u retini možemo objasniti aktivacijom signalnih kaskada u RGC, direktno i indirektno, zbog TNF-posredovane neurotoksične aktivnosti u astrocitima. Dokazano je da se TNF receptori nalaze i u RGC i u astrocitima (64, 92). Rečeno je, da vezivanje TNF za receptor može aktivirati oba faktora signalizacije za aktivaciju kaskade u ćeliji; i nuklearni faktor kapa B (NF- κ B) i c-Jun N-terminalnu kinazu (JNK) (122). Aktivacija NF- κ B i tranzitorno aktiviranje JNK su povezani sa ćelijskim opstankom, dok trajna aktivacija JNK doprinosi ćelijskoj smrti (123, 124). Pokazano je da nekvalitetna NF- κ B rezultira trajnim održavanjem JNK aktivacije i vodi ćeliju u smrt (123, 124). U međuvremenu, aktivacija NF- κ B u astrocitima promoviše proizvodnju neurotoksičnih proinflamatornih faktora, uključujući i TNF, što potpomaže smrt RGC (119, 120). Uzimajući u obzir sve ove informacije, predloženo je da se uz prisustvo TNF, NF- κ B i JNK signalne kaskade aktiviraju na dva potpuno suprotna načina u RGC i astrocitima, mada oba načina mogu da olakšaju smrt neurona (120). Stalna JNK aktivacija i nemogućnost RGC da aktiviraju NF- κ B olakšava nekroptozu RGC u prisustvu TNF (shema 2).



Shema 2. Predloženi mehanizam TNF-indukovane neurotoksičnosti u mrežnjači: TNF posreduje NF- κ B aktivaciju u astrocitima, što olakšava astroglialni opstanak ali inicira proizvodnju neurotoksičnih pro-inflamatornih faktora, kao što je TNF, u mrežnjači. Nedostatak NF- κ B aktivnosti u RGC, u prisustvu TNF, kao i stalna JNK aktivacija, doprinose smrti RGC, uglavnom nekrozom (necroptosis). U međuvremenu, endogeni faktori (damage-associated molecular patterns ili DAMPs) se oslobađaju iz nekrotične RGC i aktiviraju receptore (astrocyte pattern recognition receptors, PRRs) i posreduju u proizvodnji neurotoksičnih pro-inflamatornih faktora, kao što je TNF. Tako, TNF - posredovana nekroza RGC može povećati neurotoksični odgovor astrocita i indirektno dovesti do smrti RGC.

*t- JNK: prolazna JNK aktivacija; s- JNK: stalna JNK aktivacija

Preuzeto i modifikovano: Dvorianchikova G i Ivanov D, *Eur J Neurosci*, 2014.

2.7.3. Polimorfizam na genu za TNF- α

TNF- α se smatra citokinom sa dva lica, može stimulisati ćelijsku inflamaciju i proliferaciju, ali i indukovati proces apoptoze. Smatra se da su genske varijacije, koje za posledicu imaju povećanu produkciju ovog citokina, povezane sa potencijalnim razvojem hroničnih bolesti, povećanim rizikom za infekcije, a mogu uticati i na prognozu bolesti (125).

Polimorfizam jednog nukleotida (single nucleotide polymorphism, SNP) predstavlja zamenu jedne baze u bilo kom regionu DNK, što može dovesti do varijacije transkripcije ili sinteze proteina i na taj način direktno uticati na patogenezu bolesti i njen ishod.

SNP su najčešći tip genskih varijacija među ljudima i svaki predstavlja razliku u jednom nukleotidu. Prosečno se SNP dešava sa frekvencom od 1 DNK baze u svakih 1000 DNK baza kod jedne osobe. Kada se SNP pojavi u genu (ili sekvenci gena), ili u blizini regulatornog regiona gena, može imati direktnu ulogu u patogenezi bolesti preko funkcije gena. SNP može biti i biološki marker, koji pomaže naučnicima da pronađu gene koji su povezani sa određenom bolesti (16). Tako su neke hronične bolesti, Kronova bolest i karcinomi, povezane sa određenim genskim varijantama, dok je senilna degeneracija makule bila prva "kompleksna bolest" kod koje je genetska varijanta uspešno identifikovana određenim genomom – GWAS (genome-wide association studies) (16, 126).

Gen koji kodira sintezu TNF- α nalazi se na kratkom kraku hromozoma 6p21.3 u klasi III regiona glavnog histokompatibilnog kompleksa (MHC), zajedno sa genima za TNF- β (Limfotoksin- α , LT- α) i Limfotoksin- β (LT- β), između gena koji kodiraju klasu II humanog leukocitnog antigena (HLA molekula DP, DQ i DR) i klasu I (HLA-A, B, C). Preciznije, gen za TNF lociran je 250 kilobaza od HLA-B lokusa idući od centromere i 850 kilobaza od HLA-DR idući od telomere. Kontrola ekspresije gena za TNF- α vrši se na nivou transkripcije, translacije i posttranslacionom nivou. Sekvenca molekula DNK od 1100 baznih parova (bp) između 3' kraja gena za LT- α i 5' kraja gena za TNF- α smatra se da ima centralnu ulogu u kontroli transkripcije. Produkcija TNF- α zavisi i od stabilnosti iRNK, ali i od strukture i funkcije TNF-RI i TNF-RII i njihovih solubilnih formi (127).

Nekoliko SNP identifikovano je u 5' regionu gena za TNF- α , i to u pozicijama -1031 (supstitucija T u C, nazvan -1031 T/C), -863 (C u A, -863 C/A), -857 (C u T, -857 C/T), -308 (G u A, -308 G/A), -238 (G u A, -238 G/A). Nađeni su još i retki polimorfizmi u položaju -851, -575, -419, -376, -162, -49 (promotor gena), ali i u prvom intronu u položaju +488 (128).

Najčešće proučavan polimorfizam je u promotoru gena za TNF u poziciji -308, pri čemu dolazi do supstitucije guanina adeninom (G→A). Međutim, još uvek postoje kontra-

verzni podaci o njegovoj ulozi u ekspresiji gena za TNF- α . Dok je jedna grupa autora pokazala da ovaj polimorfizam ima direktan uticaj na transkripcionu aktivnost gena za TNF- α , sa sledstveno povećanom produkcijom ovog citokina, drugi autori ne nalaze povezanost ovog polimorfizma sa njegovim stepenom produkcije (128). S obzirom na ove kontradiktorne podatke o ulozi polimorfizma u različitim bolestima, njihovo izučavanje još uvek ima veliki značaj. Kod ljudi, zapaženo je povećanje nivoa TNF- α u vidnom živcu i mrežnjači u glaukomatoznim očima.

2.7.4. Polimorfizam gena za TNF u patogenezi glaukoma

Nekoliko funkcionalnih polimorfizama u promotornom regionu gena za TNF- α je identifikovano, i povezano sa rizikom za razvoj glaukoma. Intenzivno je proučavan polimorfizam koji karakteriše zamena G (guanin) sa A (adenin) na poziciji -308 (-308 G/A, rs1800629), što može povećati transkripciju TNF-a šest do sedam puta (129).

Ostali polimorfizmi, uključujući -238 G/A (rs361525), -863 C/A (rs645836), i -857 C/T (rs1799724), su takođe proučavani. Međutim, rezultati su bili dosta različiti. Neke studije pokazuju da je TNF- α -308 alel A značajno povezan sa povećanim rizikom od OAG (130-133), dok druge studije nisu pokazale značajnu povezanost (134-136), pa su čak prijavljeni i smanjeni rizici za OAG pri ovim mutacijama (137, 138).

Osim toga, istražujući ulogu TNF- α u glaukomu, nekoliko novijih studija bavilo se koncentracijom TNF- α u očnoj vodici (HA) pacijenata sa glaukomom i kontrolnih subjekata. Slično tome, neke studije su pokazale da su koncentracije TNF- α u HA više kod pacijenata sa OAG ili je broj pozitivnih uzoraka veći kod OAG pacijenata (89, 139), dok druge studije to opovrgavaju (140).

Polimorfizam C/A na položaju -863 u promotor regionu TNF- α je povezan sa Alchajmerovom bolesti (141, 142). Postoje dokazi da TNF- α može da promoviše razvoj depozita β -amiloida (143), kao i da se β -amiloid nagomilava u retinalnim ganglijskim ćelijama pacova sa eksperimentalnim glaukomom (144, 145). Tamura i saradnici (146) su pokazali visoku učestalost POAG kod pacijenata sa Alchajmerovom bolesti. U tom smislu, glaukom možemo posmatrati kao hroničnu neurodegenerativnu bolest sličnu Alchajmerovoj, kao što sporo nagomilavanje β -amiloida u ganglijskim ćelijama može eventualno aktivirati ćelijsku smrti i gubitak aksona vidnog živca.

Polimorfizam C/A u promotor regionu -863 za TNF- α se smatra značajnim za povećanu transkripciju i povećan nivo TNF- α . Neka istraživanja su pokazala da je učestalost TNF- α

(-863) A alela značajno manja u POAG pacijenata. Tako da nema povećane transkripcije, ni povišenog nivoa TNF- α , što pokazuje da je TNF- α (-863) A alelni polimorfizam protektivni faktor u razvoju POAG (73).

TNF- α ima zaštitnu ili štetnu ulogu u patogenezi POAG. TNF- α vrši svoje neuroprotektivno dejstvo aktiviranjem faktora transkripcije, nuklearni faktor kapa B (NF- κ B), preko vezivanja za receptore za TNF visokog afiniteta (TNF-RII). TNF- α može biti i neurodegenerativni faktor kada se vezuje za receptor smrti TNF-RI niskog afiniteta i indukuje mitohondrijalno-posredovani apoptozni put. Povećana ekspresija TNF- α može pomeriti balans ka TNF-RI signalizaciji, kao što se dešava u glaukomu, i na taj način promoviše smrt RGC. Povećani nivoi TNF- α su povezani sa lošom prognozom posle traume u mozgu, dok će smanjenje TNF- α smanjiti oštećenje neurona. U studijama koje su proučavale polimorfizam gena -863 za TNF- α učestalost A alela je povezana sa 31% nižom transkripcijom, zahvaljujući smanjenom afinitetu za vezivanje nuklearnog faktora transkripcije (NF- κ B), posebno oblika p50-p50. Opšti zaključak je da je alelni A polimorfizam za TNF- α (-863) povezan sa smanjenom koncentracijom cirkulišućeg TNF- α (73).

2.8. Protein toplotnog šoka 70

Poznato je da svi organizmi, od bakterija do ljudi, kao i skoro sve ćelije, odgovaraju na fiziološke stresore ili one iz okruženja povećanjem nivoa grupe proteina poznatih kao proteini toplotnog šoka (heat shock protein, HSP) ili stres proteini. Proteini toplotnog šoka indukovani u ćelijama bilo hipertermijom ili drugim vrstama metaboličkog stresa, štite ćeliju i povećavaju preživljavanje ćelije u uslovima daljeg teškog stresa. Odgovor na stres je visoko očuvan mehanizam regulacije gena. Sinteza HSP se rapidno povećava kao odgovor na različite vrste metaboličkog stresa. HSP funkcionišu kao molekuli “nadzornici” koji sprečavaju agregaciju i olakšavaju remodelovanje deaktivisanih proteina u ćeliji (147–154).

HSP deluju najrazličitijim mehanizmima: direktnom interakcijom sa komponentama ćelijskih signalnih puteva, nishodnom ili ushodnom regulacijom kaspaza-zavisne programirane ćelijske smrti ili na mitohondrijalnom nivou. HSP takođe mogu da utiču na kaspaza-nezavisnu apoptozu, interakcijom sa apoptogenim faktorima kao što su Apoptosis-inducing factor (AIF) ili deluju na nivou lizozoma. HSP 70 je čuvar integriteta membrane lizozoma. Ali usled oksidativnog stresa dolazi do karboksilacije HSP, što dalje izaziva rupturu lizozoma. Osim toga, disfunkcija HSP 70 aktivira nuklearni faktor- κ B (NF- κ B) signalizaciju koja takođe može da promoviše neurodegeneraciju (147–154).

U centralnom nervnom sistemu sisara, proizvodnja HSP povećava toleranciju neurona na ishemijske povrede i ima neuroprotektivni efekat (147–154).

Zaštitna uloga HSP demonstrirana je u retini pacova prilikom indukovanog hipertermalnog svetlosnog oštećenja retine (155, 156).

Različite porodice HSP se klasifikuju prema molekularnoj težini i uključuju: HSP 100, HSP 90, HSP 70, familija HSP 60, HSP 40 i HSP 27. Različite vrste HSP imaju različite uloge u procesu sklapanja, savijanja i translokacije proteina. HSP 70, familija HSP 60 i HSP 27 sprečavaju agregaciju proteina i pomažu u ponovnom savijanju proteina. HSP 100 otpuštaju proteine iz agregacija. HSP 90 ima važnu ulogu u sazrevanju i aktiviranju brojnih proteina. Stoga se očekuje da HSP imaju veliki potencijal kao terapijska sredstva za suzbijanje ili lečenje mnogih bolesti (156).

Porodica proteina toplotnog šoka 70 (HSP 70 porodica) obuhvata nekoliko članova: konstitutivni oblik, HSP 70; inducibilni HSP 72; mitohondrijalni GRP 75 i endoplazmatičnog retikuluma GRP 78. Oni imaju svoj prepoznatljivi neuroprotektivni efekat i funkcionišu u normalnim, razvojnim i stresnim uslovima. Iako konstitutivna forma postoji pod normalnim uslovima, ona je više izražena pod stresnim uslovima. Nasuprot tome, inducibilna forma je izražena samo u ćelijama koje su pod stresom. Štaviše, sinteza oba oblika se povećava hipertermijom (155, 157–169).

2.8.1. Biohemijske karakteristike HSP 70

HSP 70 je najviše strukturno i funkcionalno konzerviran proteini u HSP porodici. HSP 70 je sve prisutna klasa ATP zavisnih proteina “nadzornika”, koji ispoljava citoprotektivne efekte. Njegova centralna uloga je u ćelijskoj kontroli kvaliteta proteina. HSP 70 se vezuje za proteinski supstrat i pomaže njegovo rasklapanje, degradaciju, transport, regulaciju, a sprečava agregaciju (156).

HSP 70 sastoji se od dva visoko očuvana strukturna domena: 45 kDa N-terminalni nukleotid vezujući domen (NBD) i 25 kDa C-terminalni supstrat vezujući domen (SBD). NBD je strukturno sličan aktinu i heksokinazi, a sastoji se od dva reznja, svaki sadrži dva poddomena. Ovi reznjevi formiraju rascep koji vezuje ATP. SBD se sastoji od β - sendvič poddomena i α -helikoidnog poklopca. Oba domena, NBD i SBD, su ključni za funkciju nadzornika i povezani su kratkim fleksibilnim linkom (156).

HSP 70 ima brojne funkcije tokom procesa normalnog rasta. Pomaže u savijanju novot sintetizovanih proteina, subcelularnom prenosu proteina i vezikula, formiranju i disocijaciji

kompleksa i degradaciji neželjenih proteina. HSP 70 obavljajući svoju funkciju prolazi kroz tri konformacije: u odsustvu nukleotida, vezan za ADP i vezan za ATP. Mnoge od funkcija HSP 70 zavise od odnosa SBD i NBD i supstrata ATP-a. Hidroliza ATP u HSP 70 se smatra glavnom odlikom nadzorničke funkcije (156).

2.8.2. Uloga HSP 70 u patogenezi glaukoma

Mehanički stres izazvan povišenim IOP regrutuje HSP. Nekoliko studija je pokazalo da HSP ili antitela protiv njih imaju važnu ulogu u patogenezi glaukoma.

Ćelijski stres i smrt ćelije su međusobno povezani događaji, a HSP, indukovani kao odgovor na stres, imaju određenu ulogu u kontroli apoptoze. HSP uključuju anti- apoptotične i proapoptotične proteine koji interaguju sa različitim ćelijskim proteinima uključenim u apoptozu. Njihov nivo ekspresije može odrediti sudbinu ćelije kao odgovor na stimulus. Naravno, HSP 27 i HSP 70 mogu učestvovati u kancerogenezi (170).

Povećana imunohistohemijska bojenja HSP u glaukomatoznoj retini odražavaju funkciju ovih proteina u smislu ćelijske odbrane i odgovora na stres u glaukomu (171, 172).

Međutim, prekomerna ekspresija ovih proteina može dovesti do progresije bolesti aktiviranjem autostimulatornog odgovora koji rezultira optičkom neuropatijom (65). Što se objašnjava pojavom da je kod pacijenata obolelih od glaukoma titar anti-HSP antitela viši nego kod zdravih ispitanika, što smanjuje zaštitnu sposobnost nativnih HSP (172). Ovi podaci ukazuju da su HSP bitni za opstanak RGC kao molekularni “nadzornici” i imaju patogeni značaj kod pacijenata sa glaukomatoznom optičkom neuropatijom kroz stimulaciju imunog odgovora.

Pokazano je da neuroni transgenih miševa prekomerno ekspimiraju HSP 72, kao i da su pacovi kojima je injektiran virus herpesa koji sadrži gen za HSP 72 otporni na ishemiju (173, 174).

Demonstrirana je i neuroprotektivna uloga HSP 72 protiv ishemijske i ekscitotoksične smrti ćelije u kulturi retinalnih ganglijskih ćelija (RGC) (162). Iako su mnogi radovi o neuroprotektivnoj ulozi HSP 72 objavljeni, tačan mehanizam neuroprotekcije ovim proteinima ostaje nepoznat. HSP učestvuju u savijanju i sklapanju nesavijenih peptida bitnih za opstanak ćelije, čime olakšavaju transport proteina do specifičnih subcelularnih kompartmana i time odlažu degradaciju (175, 176).

HSP su takođe uključeni u više faza apoptoze i funkcija im je da inhibiraju apoptozu (177, 178). Prekomerna ekspresija HSP 70 štiti mitohondrije od štetnih efekata reaktivnih

vrsta kiseonika (179). HSP 70 inhibira apoptozu smanjujući oslobađanje citohroma-c i povećavajući aktivnost kaspaze-3 (180). Takođe je opisano da HSP 70 inhibira protein kinazu / c-Jun N- terminal kinazu (SAPK / JNK) (181).

Kim i saradnici (158) su dokazali da se HSP 70 prenosi od ćelije do ćelije, ali da RGC nisu jedina meta indukovane neuroprotekcije HSP 70, već i glijalne ćelije učestvuju u prenosu HSP 70 i doprinose neuroprotekciji.

2.9. Fas i Fas ligand

Fas, koji se još zove i APO-1 ili CD95, je 46 kDA transmembranski glikoprotein, i tip I membranskog proteina u TNF/ nervni faktor rasta (NGF) familiji, koji vezuje FasL za svoj receptor. Fas može da indukuje apoptozu, iako interakcija između Fas (+) ćelija i FasL (+) ćelija ne mora obavezno da podrazumeva pojavu apoptoze. Interakcija Fas i FasL smatra se da je važna u kontrolisanju T- ćelijskog imunog odgovora i utiče na smrt ćelija preko citotoksičnih T- limfocita (T-Ly). Fas je eksprimiran u raznim vrstama ćelija i tkiva, uključujući limfocite, timus, jetru i bubrege (182–195).

Fas ligand (FasL, CD 95L) je membranski protein tipa II koji pripada familiji faktora nekroze tumora (TNF). Njegov N-kraj je u citoplazmi a C-terminalni region se proteže u ekstracelularni prostor. Kao član TNF-citokin porodice FasL indukuje apoptozu kada je u interakciji sa receptorom Fas. FasL može da postoji bilo kao membranski vezan oblik (45 kD) ili rastvorljiv oblik (26 KD). Membranski vezan FasL može postati rastvorljiva, solubilna forma (sFasL), delovanjem matriks metaloproteinaze kao enzima. Rastvorljivi FasL (sFasL) je prisutan u serumima osoba koje pate od nekih vrsta leukemije i limfoma. Serumi zdravih pojedinaca ne sadrže detektabilne nivoe sFasL. Vezivanje FasL za Fas dovodi do oligomerizacije receptora i izaziva apoptotičku ćelijsku smrt kroz interakciju drugog proteina. FasL je pretežno eksprimiran u aktiviranim T-limfocitima i NK- ćelijama i u tkivima i organima sa izraženom imuno-privilegijom, kao što su testisi i oko. FasL ekspresija je potvrđena i u timusu, jetri, jajnicima, plućima, srcu i bubrezima (182–195).

Pored svojih uloga u indukciji apoptoze, Fas izaziva i pro-inflamatorni odgovor citokina. Pokazano je da Fas/FasL sistem igra ulogu u brojim ljudskim bolestima, na primer AIDS, hepatitis ili karcinomi. Pretpostavlja se da je indukcija apoptoze putem FasL pretežno zbog anti-virusnog imunog odgovora (182–195).

Fas-FasL interakcija ima ključnu ulogu u održavanju imune privilegije i imunološke tolerancije u organima kao što su oko, posteljica i testisi. Zapaljenska reakcija i imuni odgovori u imuno privilegovanim organima moraju odmah biti zaustavljeni jer čak i male epizode mogu ugroziti integritet organa i njihovu funkciju. Na primer, upala u oku može dovesti do trajnog oštećenog vida ili čak slepila. Ekspresija FasL u očima izaziva apoptozu Fas (+) limfocitnih ćelija, i vodi do inhibicije ćelijske infiltracije koja se javlja kao odgovor na virusnu infekciju. Dokazano je da apoptoza Fas (+) ćelija, indukovana FasL alograftom neophodna za uspeh keratoplastike. Dakle, interakcija Fas-FasL je važna i neophodna za regulaciju inflamacije i imunog odgovora u oku, mada njihov mehanizam nije u potpunosti razjašnjen (196, 197).

Velika količina FasL je pronađena u retini, uveji i rožnjači, kako miševa, tako i ljudi (197). U rožnjači, endotelijalne i epitelne ćelije proizvode FasL, koji ima sposobnost da izazove smrt Fas-limfocitnih ćelija (198).

U istraživanju sprovedenom na miševima, FasL⁺ ortograft kod keratoplastike bio je prihvaćen sa stopom od 45%, dok je Fas⁻ graft odbačen (198). Solubilni FasL se oslobađa aktivacijom limfocita (194, 197). Takođe, kornealni endotelijum je sposoban za oslobađanje sFasL (199). Rastvorljivi FasL nije u mogućnosti da indukuje apoptozu, štaviše on može da utiče na apoptozu indukovanu membranskim FasL (200).

Wax i Tezel su ukazali da se T- ćelijski -posredovana degeneracija RGC odvija preko signalnog puta Fas/FasL. Kao i da ćelijske kulture mikroglia oslobađaju FasL i mogu indukovati apoptotsku eliminaciju T- ćelija kod životinja imunizovanih HSP. Njihova dalja pretpostavka je da mali molekuli poput sFasL mogu da prođu kroz hemato-retinalnu barijeru u određenim patološkim stanjima, kao što su zapaljenja i dijabetes. Naravno, u patološkim stanjima, sFasL može biti oslobođen i iz ostalih ćelija. Povišen titar sFasL u serumu pacova imunizovanih HSP sugeriše da je, pored mnogih drugih faktora, i sFasL verovatno uključen u degeneraciju RGC. Međutim, iako sFasL proizveden od strane T-ćelija aktiviranih HSP 60 indukuje apoptozu RGC in vitro, indukcija apoptoze RGC preko T-ćelija aktiviranih HSP 27 nije povezana sa sFasL. Ovo sugeriše da dodatni faktori (kao što su membranozni FasL, drugi ligandi povezani sa TNF receptorima smrti ili drugi nepoznati molekuli) su uključeni u apoptozu RGC izazvanu HSP 27 aktiviranjem T- ćelija (201).

Pojedina istraživanja su pokazala da je kapacitet prirodno proizvedenog sFasL da izazove apoptozu smanjen u poređenju sa membranski vezanim FasL, što ukazuje na selektivnu sposobnost sFasL. Otkriveni sFasL u očnoj vodici može biti posledica visoke ekspresije FasL u intraokularnim ćelijama, međutim, postoji i mogućnost da sFasL ubija in

vivo aktivirane limfocite. Pored toga, još jedna uloga sFasL može biti postulat; endotelijalne ćelije rožnjače proizvode Fas, ukoliko je njegova proizvodnja smanjena to utiče na nizak nivo Fas/sFasL i nishodnu regulaciju Fas, što dalje rezultira nishodnom regulacijom apoptoze (202).

Glaukom, tj. POAG- HTG je usko povezan sa povišenim očnim pritiskom (IOP), koji može da bude posledica otežanog oticanja očne vodice kroz trabekulum (TM). Jedan od nalaza kod pacijenata sa POAG ukazuje na to da je broj ćelija u TM značajno smanjen u odnosu na zdravu populaciju iste starosti. Predloženi mehanizam gubitka ćelija TM je povećana stopa ćelijske smrti sa starenjem. Pri tome je apoptoza kontrolisani mehanizam za regulaciju ćelijske smrti u različitim tkivima. Povećana stopa apoptoze se može smatrati uzrokom za gubitak TM ćelija kod POAG. Agraval i saradnici (203) su pokazali da ćelije TM ekspri- miraju Fas receptor i prolaze kroz apoptozu posle aktiviranja receptora od strane monoklo- nalnog IgM. Fas, kao jedan od glavnih pokretača apoptoze, vezujući se sa svojim ligandom FasL, pokreće kaskadu kaspaza i izaziva apoptozu. Apoptoza posredovana Fas-om može biti blokirana vezivanjem solubilnog Fas za FasL što bi sprečilo interakciju membranoznog Fas sa FasL. Stoga se može pretpostaviti da povećanje stope ćelijske smrti TM nastaje kao posledica smanjenja nivoa sFas ili povećanja nivoa FasL u glaukomu (99, 203–208).

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Genetska heterogenost primarnog glaukoma otvorenog ugla (POAG) ukazuje da su različiti geni ili različiti genetski mehanizmi uključeni u njegovu prirodu. Promena koncentracije različitih medijatora zapaljenja i imunog odgovora u krvi, očnoj vodici ili tkivima oka podržava teoriju o aktivnosti imunog sistema u patogenezi POAG. Faktor nekroze tumora - alfa (TNF- α), važan proinflamatorni citokin, ispoljava razne fiziološke i patogene efekte koji dovode do razaranja tkiva. Nedavna istraživanja ukazuju da TNF- α ima ili zaštitnu ulogu, ili negativni efekat u patogenezi POAG.

Stoga smo postavili hipotezu da genski polimorfizam TNF- α (-308, -863) može biti jedan od genetskih faktora za razvoj primarnog glaukoma otvorenog ugla zbog dejstva na proteinsku ekspresiju TNF- α . Takođe, određivanje HSP 70 u serumu i solubilnih Fas i FasL u očnoj vodici bi definisalo njihovu ulogu u patogenezi POAG.

Ciljevi istraživanja bili su utvrđivanje međuzavisnog kliničkog i biohemijskog nalaza (sa osvrtom na genski polimorfizam i savremene biomarkere) kod osoba obolelih od primarnog glaukoma otvorenog ugla sa povišenim intraokularnim pritiskom (POAG- HTG):

1. Kliničko ispitivanje bolesnika obolelih od glaukoma otvorenog ugla standardnom i opšteprihvaćenom metodologijom (vidna oštrina, izgled komornog ugla, visina intraokularnog pritiska, morfometrija glave vidnog živca, nalaz vidnog polja, debljina peripapilarnih nervnih vlakana retine).
2. Ispitivanje distribucije genskih polimorfizama na genu za TNF- α -308 G/A i -863 C/A kod pacijenata obolelih od primarnog glaukoma otvorenog ugla sa povišenim intraokularnim pritiskom (POAG- HTG) u odnosu na zdrave ispitanike.
3. Ispitivanje učestalosti alela i polimorfnih genotipova na genu za TNF- α -308 i -863 kod pacijenata obolelih od primarnog glaukoma otvorenog ugla sa povišenim intraokularnim pritiskom (POAG- HTG) i utvrđivanje odnosa genskog polimorfizma i kvantitativnih kliničkih parametara bolesti.
4. Određivanje serumske koncentracije faktora nekroze tumora (TNF- α) i proteina toplotnog šoka 70 (HSP 70) kod pacijenata obolelih od primarnog glaukoma otvo-

renog ugla sa povišenim intraokularnim pritiskom (POAG- HTG) i ispitivanje veze ovih biomarkera i stepena kliničkog razvoja bolesti, kao i genskog polimorfizma.

5. Određivanje koncentracije Fas i Fas liganda (FasL) u očnoj vodici pacijenata oboljelih od primarnog glaukoma otvorenog ugla sa povišenim intraokularnim pritiskom (POAG- HTG) i uvrđivanje veze ovih markera apoptoze i stepena kliničkog razvoja bolesti.

4. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA

Istraživanje je organizovano po metodu prospektivne komparativne studije. Za ispitivanje je korišćen biološki materijal (eritrociti, plazma i DNK) pacijenata obolelih od glaukoma i osoba sa staračkom kataraktom i kontrolne grupe zdravih subjekata. Istraživanje je obavljeno na Klinici za očne bolesti, Kliničkog centra u Nišu, Katedri za biohemiju i Laboratoriji za funkcionalnu genomiku i proteomiku, Naučnoistraživačkog centra za biomedicinu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu. Svi ispitanici su pre uključivanja u istraživanje bili informisani o ciljevima istraživanja i potpisali informisani pristanak za učešće u istraživanju. Etički komitet Medicinskog fakulteta u Nišu (rešenje broj 01-2625-18) i Etički komitet Kliničkog centra u Nišu (rešenje broj 338/43) dali su saglasnost za sprovođenje ovog istraživanja.

4.1. Ispitanici

U ovo istraživanje uključeno je 357 ispitanika, podeljenih u četiri grupe:

- I 81 ispitanik oboleo od primarnog glaukoma otvorenog ugla sa povišenim intraokularnim pritiskom (POAG- HTG),
- II 35 ispitanika obolelih od pseudoeksfolijativnog glaukoma otvorenog ugla (PEXG),
- III 77 ispitanika sa staračkom kataraktom,
- IV 164 zdravih subjekata koji su po starosti i polu odgovarali pacijentima.

Obrađeno je 35 uzoraka očne vodice pacijenata obolelih od primarnog glaukoma otvorenog ugla sa povišenim očnim pritiskom (hipertenzivni glaukom, POAG- HTG), 24 uzoraka očne vodice pacijenata obolelih od pseudoeksfolijativnog glaukoma otvorenog ugla i 29 uzoraka očne vodice ispitanika sa staračkom kataraktom.

4.2. Metode kliničkog pregleda

Kompletno kliničko ispitivanje, standardnom i opšteprihvaćenom metodologijom, obavljeno je na Klinici za očne bolesti Kliničkog centra u Nišu.

Kliničko ispitivanje je obuhvatalo:

- demografske karakteristike ispitanika,
- detaljnu porodičnu, ličnu i oftalmološku anamnezu,
- određivanje oštine vida sa refrakcijom (Snellen-ovim tablicama),
- biomikroskopiju prednjeg segmenta oka,
- određivanje visine IOP-a aplanacionom tonometrijom po Goldmann-u,
- gonioskopiju (gonioskopom sa tri ogledala po Goldman-u): određivanje otvorenosti, širine i pigmentacije komornog ugla (klasifikacioni sistem po Scheie-u),
- indirektnu oftalmoskopiju i određivanje veličine eskavacije papile vidnog živca, tj. C/D odnos, pomoću lupe od 90D,
- standardnu automatsku perimetriju (Humphrey, USA, Threshold test) i određivanje promena u vidnom polju ispitanika,
- optičku koherentnu tomografiju (OCT, Stratus, Carl Zeiss Meditec, Inc., Dublin, CA) i određivanje debljine peripapilarnih nervnih vlakana retine (RNFL).

Dijagnostički kriterijumi za primarni glaukom otvorenog ugla sa povišenim intraokularnim pritiskom (POAG- HTG) bili su: povišen IOP, karakterističan lučni, Bjerumov skotom, i/ili paracentralni skotom, i/ili nazalni, Rönneov stepenik u Hamfrijevom kompjuterizovanom vidnom polju, i drugi odgovarajući ispadi u vidnom polju, i odgovarajuća eskavacija vidnog živca, i/ili istanjenje sloja nervnih vlakana na OCT-u, nalaz otvorenog komornog ugla prilikom gonioskopije, i odsustvo sekundarnog uzroka glaukomatozne optičke neuropatije, kao što su prethodna trauma, prethodna primena kortikosteroida, zapaljenje ili uveitis. Pacijenti sa POAG podvrgnuti antiglaukomatoznoj fistulizirajućoj operaciji su imali vrednosti intraokularnog pritiska veće od 21 mmHg sa antiglaukomatoznom terapijom pri dnevnom merenju. Pacijenti sa istorijom zapaljenskih bolesti oka, kongenitalnim glaukomom ili normotenzivnim glaukomom i sistemskim faktorima koji bi uticali na nivo ispitivanih markera bili su isključeni iz ispitivanja.

Grupu bolesnika obolelih od pseudoeksfolijativnog glaukoma (PEXG) činili su pacijenti sa već dijagnostikovanim PEXG po utvrđenim kriterijumima: povišen IOP, promene u

vidnom polju, istanjenje RNFL na OCT-u, kao za POAG, su prisustvo pseudoeksfolijacija na prednjoj kapsuli sočiva i/ili duž pupilarnog ruba.

Kontrolnu grupu ispitanika su činili oni koji su lečeni na Klinici za očne bolesti, Kliničkog centra u Nišu, iz nekih drugih razloga; senilna katarakta. Svi kontrolni ispitanici bili su bez sistemskih bolesti i bez porodične istorije za glaukom. Glaukom ovih pacijenata bio je isključen korišćenjem istih dijagnostičkih kriterijuma koji su korišćeni za postavljanje dijagnoze POAG- HTG, tj. nakon istih oftalmoloških pregleda i procedura. Ako je postojala bilo kakva sumnja na NTG ili HTG, pacijent je isključivan iz daljeg ispitivanja.

Očna vodica je uzorkovana od pacijenata podvrgnutih antiglaukomatoznoj fistulizirajućoj operaciji (35 pacijenata sa POAG- HTG i 24 pacijenta sa PEXG) i operaciji staračke katarakte (29 ispitanika u okviru kontrolne grupe).

Kontrolnu grupu ispitanika za genska istraživanja činili su zdravi dobrovoljci, bez sistemskih i očnih oboljenja, sparni po polu i starosti.

Statička automatska perimetrija (Humphrey Visual Field Analyzer, HFA, SAD; Carl Zeiss Meditec, Inc., Threshold Test 24-2) je korišćena za otkrivanje defekata u vidnom polju pacijenata. Prvo vidno polje nikada nije uzimano za analizu zbog krive učenja. Korišćene su vrednosti za srednje odstupanje (mean deviation, MD) u decibelima (dB), standardno odstupanje od obrasca (pattern standard deviation, PSD) u decibelima (dB) i korigovano standardno odstupanje od obrasca (corrected pattern standard deviation, CPSD) u decibelima (dB). Pacijenti sa nepouzdanim vidnim poljima (definisano kao lažno- negativne greške > 33 %, lažno-pozitivne greške > 33 % i gubitak fiksacije > 20 %) su isključivani iz ispitivanja.

OCT merenja su izvedena na Stratus OCT (Carl Zeiss Meditec, Inc.). Za testiranje su korišćeni „fast RNFL thickness” i „fast optic disc” OCT protokoli. „Fast RNFL thickness” protokol se sastoji od tri kružna skeniranja, svaki 3,46 mm u prečniku, centrirana na glavi vidnog živca. Pokazano je da je ovaj prečnik optimalan za analizu debljine RNFL i pruža bolju reproduktivnost od pojedinačnih skeniranja. Skeniranja su dalje analizirana korišćenjem „RNFL thickness average analysis protocol (OU)”. Protokol kvantifikuje prosečnu debljinu peripapilarnih nervnih vlakana (Avg RNFL), kao i prosečnu debljinu RNFL-a po kvadrantima (superior, inferior, nasal i temporal) i debljinu u sektorima („12 clock-hour sectoral measures” (30°)). Korišćene su vrednosti Avg RNFL, Savg RNFL (superior) i Iavg RNFL (inferior).

4.3. Metode ispitivanja

- Uzorkovanje pune krvi ispitanika, sa EDTA kao antikoagulansom, za biohemijske analize vršeno je na Klinici za očne bolesti KC Niš, prilikom kliničkog ispitivanja pacijenata i neposredno pre antiglaukomatozne fistulizirajuće operacije i operacije katarakte. Uzorci krvi za DNK analizu su odmah zamrzavani na -20°C . Drugi uzorci krvi su centrifugirani 10 minuta na 3500 obrtaja i temperaturi $+4^{\circ}\text{C}$, nakon čega je odvajana plazma i zamrzavana na temperaturi -80°C .
- Za ispitivanje je korišćena očna vodica ispitanika, čije uzorkovanje je vršeno neposredno pre antiglaukomatozne fistulizirajuće operacije i ultrazvučne operacije katarakte u sterilnim uslovima, paracentezom kroz limbus. Korišćen je sterilni insulinski špric 1 ml/cc sa iglom 29G X 1/2". Izbegavan je svaki kontakt sa endotelom rožnjače, dužicom i sočivom i vodilo se računa da dobijena očna vodica ne sadrži krv. Uzorci očne vodice (100-150 μL , $\sim 100 \mu\text{L}$) su odmah skladišteni i čuvani na temperaturi -80°C .
- Istraživanje je obavljeno na Katedri za biohemiju i Laboratoriji za funkcionalnu genomiku i proteomiku, Naučnoistraživačkog centra za biomedicinu Medicinskog fakulteta u Nišu.

4.3.1. Metode određivanja TNF- α , HSP 70, Fas i Fas liganda

- Koncentracija cirkulišućeg TNF- α merena je komercijalnim imunoabsorpcionim enzimskim testovima (sandwich enzyme linked immunosorbent assay- ELISA) u plazmi ispitanika, koji se zasniva na kompetitivnom vezivanju poliklonalnih antite- la specifičnih za TNF- α , prema uputstvu proizvođača (Quantikine ELISA, DTA00C, R&D Systems, Minneapolis, USA). Koncentracija je određivana pomoću stan- dardne krive i izražena u pg/ml. Minimalna detektabilna doza (MDD) je 1,6 pg/ml. Prema uputstvu proizvođača, ne postoji značajna ukrštena reaktivnost ili interfe- rencija sa drugim proteinima.
- Koncentracija cirkulišućeg HSP 70 merena je ELISA (sandwich enzyme linked immunosorbent assay) metodom u plazmi ispitanika, prema uputstvu proizvođača (Cusabio, CSB-E13463h, P.R. China). Koncentracija je određivana pomoću stan- dardne krive i izražena u ng/ml. Minimalna detektabilna doza (MDD) je 78 pg/ml.

Prema uputstvu proizvođača, ne postoji značajna ukrštena reaktivnost ili interferencija sa drugim proteinima.

- Koncentracija solubilnog Fas je određivana komercijalnim imunoadsorpcionim enzimskim testovima (sandwich enzyme linked immunosorbent assay- ELISA) u očnoj vodici ispitanika, prema uputstvu proizvođača (RayBiotech, ELH-Fas, USA). Koncentracija je određivana pomoću standardne krive i izražena u pg/ml. Minimalna detektabilna doza (MDD) je 5 pg/ml. Prema uputstvu proizvođača, ne postoji značajna ukrštena reaktivnost ili interferencija sa drugim proteinima.
- Koncentracija solubilnog Fas liganda merena je ELISA (sandwich enzyme linked immunosorbent assay) metodom u očnoj vodici ispitanika, prema uputstvu proizvođača (RayBiotech, ELH-FASL-1, USA). Koncentracija je određivana pomoću standardne krive i izražena u pg/ml. Minimalna detektabilna doza (MDD) je 2 pg/ml. Prema uputstvu proizvođača, ne postoji značajna ukrštena reaktivnost ili interferencija sa drugim proteinima.

4.3.2. Detekcija polimorfizama na genu za TNF- α

Uzorci pune krvi, sa EDTA kao antikoagulansom, korišćeni su za izolaciju DNK uz pomoć komercijalnog QIAamp DNA Blood Mini Kit-a (Quiagen GmbH, Hilden, Germany). Na uzorku DNK detekcija genskih polimorfizama za TNF- α -308 G/A i -863 C/A vršena je metodom lančane reakcije polimerizacije- analizom dužine restriktivnih fragmenata (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP).

4.3.2.1. Lančana reakcija polimerizacije

Lančanom reakcijom polimerizacije umnožavani su segmenti DNK u okviru kojih se nalazi SNP ispitivanog gena i to: -308 G/A (rs1800629) i -863 C/A (rs1800630).

Za PCR reakciju je korišćen KAPA2G Fast HotStart ReadyMix (Kapa Biosystems Inc., Wilmington, MA, SAD). Umnožavanje segmenta DNK, za svaki od ispitivanih gena ponaosob, izvršeno je u reakcionoj smeši zapremine 25 μ l kojoj je dodato 50 ng/ μ l DNK i po 10 μ M svakog prajmera iz odgovarajućeg seta prajmera (tabela 4). Korišćene su prethodno poznate sekvence prajmera (209, 210). Sastav reakcione smeše prikazan je u tabeli 4, a sekvence oligonukleotida koji su korišćeni kao prajmeri u PCR reakcijama date su u tabeli 5.

Tabela 4. Sastav reakcione smeše za lančanu reakciju polimerizacije.

Sastav reakcione smeše	Finalna koncentracija	Sastav smeše za ukupnu zapreminu od 25 μ l
Voda	/	varijabilno
KAPA2G Fast HotStart ReadyMix*	1X	12,5 μ l
F prajmer (10 μ M)	0,5 μ M	1,25 μ l
R prajmer (10 μ M)	0,5 μ M	1,25 μ l
DNK	50 ng	varijabilno

*KAPA2G Fast HotStart ReadyMix sadrži KAPA2G Fast HotStart DNK polimerazu, KAPA2G Fast HotStart PCR pufer, dNTP-ove (0.2 mM svakog 1XdNTP-a), 1X MgCl₂ (1.5 mM) i stabilizatore

Tabela 5. Sekvence prajmera korišćenih za određivanje genskih polimorfizama.

Polimorfizam	Sekvence prajmera
rs1800629	F 5'-AGG CAA TAG GTT TTGA GGG CCAT-3'
	R 5'-ACA CTC CCC ATC CTC CCT GCT-3'
rs1800630	F 5'-GGC TCT GAGGAATGG GTT AC-3'
	R 5'-CTA CAT GGC CCT GTC TTC GTT ACG-3'

Za izvođenje lančane reakcije polimerizacije korišćen je PCR aparat SureCycler 8800 Thermal Cycler (Agilent Technologies, Inc, SAD). Uslovi odvijanja PCR reakcije prikazani su u tabeli 6.

Tabela 6. Uslovi odvijanja lančane reakcije polimerizacije.

	Temperatura [°C]	Vreme [s]	
Inicijalna denaturacija	95	120	
Denaturacija	95	15	35 ciklusa
Hibridizacija	*	15	
Elongacija	72	15	
Finalna ekstenzija	72	30	

* temperature hibridizacije su se razlikovale u zavisnosti od analiziranog polimorfizma

4.3.2.2. Elektroforeza na agaroznom gelu

Uspešnost PCR amplifikacije proveravana je metodom elektroforeze na 2% agaroznom gelu. Za pripremanje 2% agaroznog gela korišćeni su 1,2 g agaroze (Serva, Nemačka) i 60 ml 1X TBE pufera sledećeg sastava: 0,89 M Tris-HCl, 0,89 M borna kiselina, 0,5 M EDTA pH 8,0. Elektroforeza se odvijala u istom puferu u trajanju od 30 minuta, pri struji jačine 100 mA i naponu 100 V. Nakon završene elektroforeze gel je bojen u rastvoru etidijum bromida u trajanju od 30 minuta, a zatim je izvršena vizuelizacija pod UV svetlošću transiluminatora (MacroVue UVis-20 Transilluminator, Hoefer Inc., Holliston, MA, SAD). Za određivanje veličine PCR produkata korišćen je marker GeneRuler 100bp DNA Ladder (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Nemačka).

4.3.2.3. Određivanje dužine restrikcionih fragmenata

Nakon verifikacije PCR produkata na agaroznom gelu izvršena je restrikciona digestija primenom odgovarajućih FastDigest (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Nemačka) restrikcionih endonukleaza, enzima koji prepoznaju specifičnu palindromsku sekvencu i hidrolizom fosfodiastarskih veza DNK daju fragmente odgovarajuće dužine (tabela 7). Reakcionu smešu za reakcije restrikcione digestije činili su: 2 µl 10X FastDigest pufera, 0,1 µl odgovarajućeg restrikcionog enzima, 5 µl PCR produkta i voda do ukupne zapremine od 10 µl. Reakcija se odvijala u vodenom kupatilu 5 minuta na temperaturi od 37 °C.

Tabela 7. Restrikcioni enzimi korišćeni za određivanje ispitivanih polimorfizama.

Polimorfizam	Restrikcioni enzim	Palindromske sekvence
rs1800629	NcoI	5'...C↓C A T G G...3' 3'...G G T A C↑C...5'
rs1800630	TaiI	5'...A C G T ↓...3' 3'...↑ T G C A...5'

4.3.2.4. Poliakrilamidna gel elektroforeza (PAGE)

Identifikacija dobijenih restrikcionih fragmenata izvršena je na 8% poliakrilamidnom gelu. Poliakrilamidni gel se dobija polimerizacijom akrilamida i bisakrilamida uz primenu odgovarajućih katalizatora. Proces polimerizacije u reakcionoj smeši odvija se istovremenim

dodavanjem 10% amonijumpersulfata (APS) i N,N,N',N'-tetrametilenetilendiamin (TEMED) u 30% rastvor akrilamida (29:1 akrilamid: N'N'-metilenbisakrilamid u vodi).

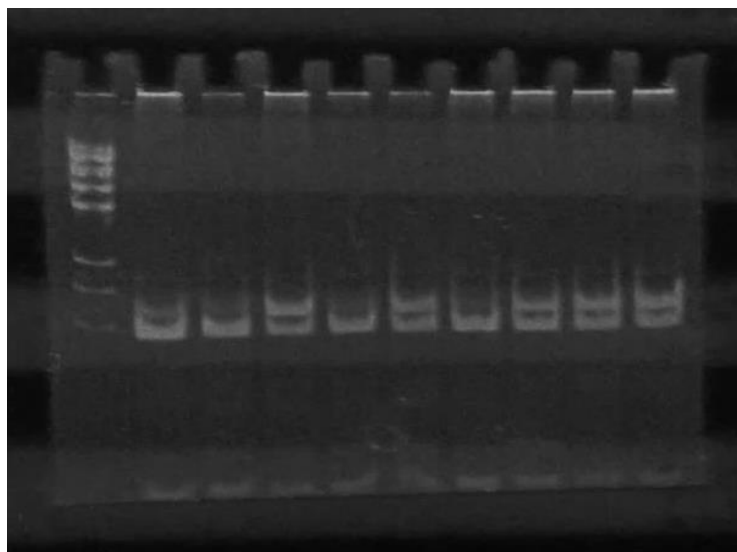
Elektroforeza se odvijala u 1X TBE puferu u trajanju od 80 min pri struji jačine 20 mA i naponu 120 V. Nakon završene elektroforeze gel je bojen u rastvoru etidijum bromida u trajanju od 30 min, a zatim je izvršena vizuelizacija pod UV svetlošću transiluminatora (MacroVue UVis-20 Transilluminator, Hoefer Inc., Holliston, MA, SAD). Za određivanje dužine restrikcionih fragmenata korišćen je marker GeneRuler 100bp DNA Ladder (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Nemačka). Veličine restrikcionih fragmenata za ispitivane polimorfizme prikazane su u tabeli 8.

Tabela 8. Aleli i veličina odgovarajućih restrikcionih fragmenata za ispitivane polimorfizme.

Polimorfizam	Alel	Veličina restrikcionih fragmenata
rs1800629	G	97bp i 20bp
	A	117bp
rs1800630	C	125 bp
	A	104 bp+ 21bp

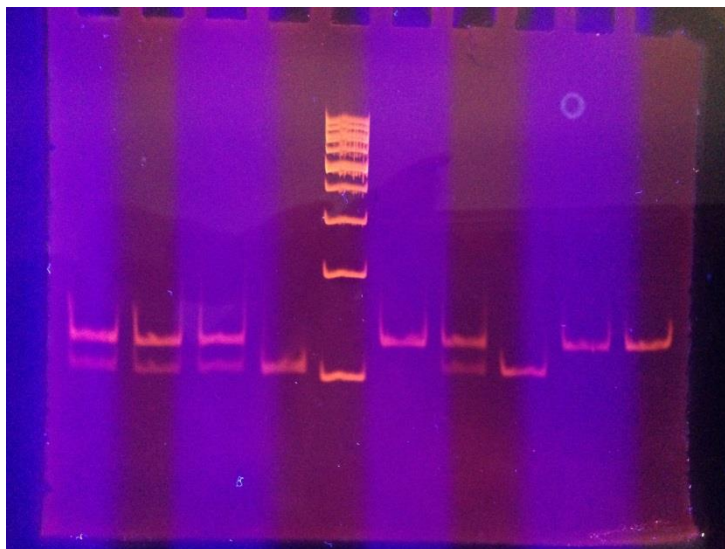
4.3.2.5. Analiza fragmenata dobijenih PCR-RFLP metodom

Analizom dužine restrikcionih fragmenata utvrđen je genotip za svaki od ispitivanih polimorfizama.



Slika 4. Poliakrilamidna gel elektroforeza za TNF- α G-308A polimorfizam.

rs1800629. Homozigotni, normalni (divlji, engl. *wild type*) genotip GG predstavljen je prisustvom dva fragmenta veličine 97bp i 20bp, dok u prisustvu dva polimorfna alela nastaje AA genotip koji se na agaroznom gelu vidi kao jedinstveni fragment veličine 117bp. Prisustvo sva tri fragmenta (117bp, 97bp i 20bp) odgovara heterozigotnom GA genotipu (slika 4).



Slika 5. Poliakrilamidna gel elektroforeza za TNF- α C-863A polimorfizam.

rs1800630. Homozigotni, normalni (wild type) bb (CC) genotip karakteriše se prisustvom fragmenta veličine 125bp, a homozigotni, mutirani (AA) genotip prisustvom fragmenta veličine 104bp i 21bp. Heterozigotni bB (CA) genotip registrovan je u prisustvu tri fragmenta veličine 125bp, 104bp i 21bp (slika 5).

4.4. Statistička obrada podataka

Rezultati kliničkih ispitivanja i biohemijskih analiza su sistematizovani, prikazani grafički i tabelarno.

U obradi podataka dobijenih istraživanjem korišćene su metode deskriptivne i analitičke statistike. Izbor metodoloških postupaka bio je prilagođen ciljevima studije i postavljenim naučnim hipotezama.

Statistička obrada rezultata rađena je programskim paketom SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Dati su osnovni deskriptivni statistički parametri za kvalitativnu i kvantitativnu procenu dobijenih rezultata: apsolutni brojevi, relativni brojevi, aritmetička sredina, standardna devijacija, medijana, interval varijacije (minimalne i maksimalne vrednosti).

Normalnost distribucije kontinualnih varijabli ispitivana je Kolmogorov-Smirnov testom ili Shapiro-Wilk-ovim testom u zavisnosti od veličine uzorka.

Za ocenu značajnosti razlike (p) između ispitivanih vrednosti između dve grupe ispitanika korišćen je Man-Vitnijev (Mann-Whitney) U test ili Studentov t-test nezavisnih uzoraka, a Kruskal-Wallis test i ANOVA korišćeni su za testiranje značajnosti razlike između više grupa pri čemu su Studentov t-test i ANOVA korišćeni u slučaju kada su kontinualne varijable imale normalnu raspodelu.

Za testiranje statističke značajnosti razlika apsolutnih frekvencija među uzorcima korišćen je χ^2 test ili Fisher-ov test egzaktno verovatnoće, ukoliko je apsolutna frekvencija bila manja od 5.

Za ispitivanje jačine povezanosti između dve kontinualne promenljive korišćena je korelaciona analiza, tj. Pearsonov koeficijent proste linearne korelacije za normalnu distribuciju kontinualnih varijabli ili Spirmanov koeficijent rang korelacije za distribuciju, koja odstupa od normalne.

Za testiranje uticaja nezavisnih, prediktorskih promenljivih na vrednost kontinualne zavisne varijable primenjena je univarijantna linearna regresiona analiza.

Kao prag statističke značajnosti korišćena je vrednost $p < 0,05$.

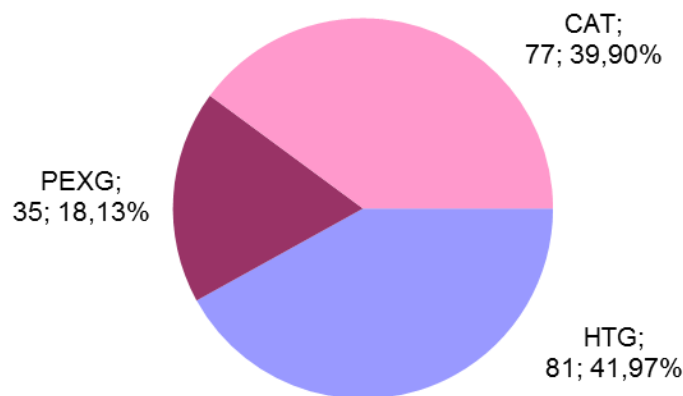
5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

5.1. Klinička ispitivanja

U ovo istraživanje uključeno je 357 ispitanika, podeljenih u četiri grupe:

- I 81 ispitanik oboleo od primarnog glaukoma otvorenog ugla sa povišenim intraokularnim pritiskom (hipertenzivni glaukom, POAG- HTG),
- II 35 ispitanika obolelih od pseudoeksfolijativnog glaukoma otvorenog ugla (PEXG),
- III 77 ispitanika sa staračkom kataraktom (CAT),
- IV 164 zdravih subjekata koji su po starosti i polu odgovarali pacijentima.

U prve tri ispitivane grupe (POAG- HTG, PEXG, CAT) bilo je 193 pacijenta. Grupa ispitanika je bila nehomogena u odnosu na raspodelu tipova glaukoma i kataraktu (χ^2 test: $p < 0,001$). Zastupljenost pacijenata obolelih od POAG- HTG (81, tj. 41,97%) i pacijenata sa kataraktom (77, tj. 39,90%) bila je značajno veća u odnosu na zastupljenost pacijenata obolelih od PEXG koji je dijagnostikovao kod 35 (18,13%) ispitanika (grafikon 1).



Grafikon 1. Struktura ispitanika po tipovima glaukoma i katarakte.

5.1.1. Starosna struktura ispitanika

Prosečna starost svih ispitanika bila je $71,13 \pm 9,35$ godina, sa medijanom, kao merom centralne tendencije od 73 godine. Najmlađi ispitanik imao je 44 godine, a najstariji 88 godina (tabela 9).

Tabela 9. Starost ispitanika u odnosu na tip oboljenja.

	X±SD (Me) Min–Max		
	HTG (n=81)	PEXG (n=35)	CAT (n=77)
Starost ^{***} (god)	68,30±9,17 (68,00) 44–85	76,54±6,28^{a***c**} (79,00) 63–87	71,66±9,61^{a*} (74,00) 47–88

a – vs HTG, c – vs CAT
* – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001 (Kruskal-Wallis i Mann-Whitney test)
n – broj ispitanika

Kruskal-Wallis testom je utvrđeno da postoji statistički značajna razlika u starosti između ispitivanih grupa (p<0,001). Najstariji su bili ispitanici oboleli od PEXG, statistički stariji u odnosu na ispitanike sa kataraktom (p<0,01) i pacijente sa POAG- HTG (p<0,001). Pacijenti oboleli od POAG- HTG bili su ujedno i najmlađi, statistički mlađi i u odnosu na ispitanike sa kataraktom (p<0,05).

5.1.2. Polna struktura ispitanika

U ispitivanom uzorku bilo je 101 (52,33%) ispitanika muškog pola i 92 (47,67%) ispitanika ženskog pola. Polna struktura ispitanika po grupama data je u tabeli 10.

Tabela 10. Polna struktura ispitanika u odnosu na tip glaukoma i kataraktu.

Pol	HTG (n=81)	PEXG (n=35)	CAT (n=77)
Muški	44 (54,32%)	20 (57,14%)	37 (48,05%)
Ženski	37 (45,68%)	15 (42,86%)	40 (51,95%)

n – broj ispitanika
 χ^2 test

Utvrđeno je da je POAG- HTG i PEXG bio nešto zastupljeniji kod muškaraca (54,32%, tj. 57,14%), a katarakta zastupljenija kod žena (51,95%), no između grupa nije bilo statistički značajne razlike, kao ni statistički značajne dominacije nekog od polova u okviru navedenih ispitivanih grupa.

5.1.3. Vidna oštrina ispitanika

Iz didaktičkih razloga formirane su sledeće kategorije vidnih oštrina (V): L-; L+P+; <0,1 (1/60,2/60,3/60,4/60,5/60); 0,1–0,2; 0,3–0,4; 0,5–0,6; 0,7–0,8; 0,9–1,0.

U celom uzorku dominiraju ispitanici čija je vidna oštrina jednog oka bila 0,9–1,0 i njih je 97 (25,13%), a potom ispitanici sa V jednog oka < 0,1, kojih je bilo 75 (19,43%) (tabela 11). Najmanje je bilo ispitanika sa L – vidnom oštrinom (bez osećaja svetlosti, apsolutni glaukom), 8 očiju (2,07%). Procenat ispitanika sa navedenim ostalim vrednostima vidnih oštrina, uključujući i L+P+ (osećaj svetlosti sa tačnom projekcijom) se kretao u opsegu od 9,33% (V= 0,1–0,2) do 11,92% (V= L+P+).

Tabela 11. Vidna oštrina (V) ispitanika u odnosu na tip glaukoma i kataraktu.

V	HTG (n=162)		PEXG (n=70)		CAT (n=154)		Ukupno (n=386)	
L-	4	2,47%	2	2,86%	2	1,30%	8	2,07%
L+P+	8	4,94%	9	12,86%	29	18,83%	46	11,92%
<0,1	20	12,35%	14	20,00%	41	a**26,62%	75	19,43%
0,1–0,2	11	6,79%	11	15,71%	14	9,09%	36	9,33%
0,3–0,4	13	8,02%	6	8,57%	18	11,69%	37	9,59%
0,5–0,6	18	11,11%	9	12,86%	15	9,74%	42	10,88%
0,7–0,8	19	11,73%	12	17,14%	14	9,09%	45	11,66%
0,9–1,0	69	***bc42,59%	7	10,00%	21	13,64%	97	25,13%
Ukupno	162	100,00%	70	100,00%	154	100,00%	386	100,00%

a – vs HTG, b – vs PEXG, c – vs CAT

** – p<0,01, *** – p<0,001 (χ^2 test)

n – broj očiju ispitanika

Kod pacijenata obolelih od POAG- HTG dominirala je vidna oštrina 0,9–1,0 i nju je imalo 69 (42,59%) očiju ove grupe, što je statistički značajno viša zastupljenost u odnosu na sve ostale vidne oštrine definisane u tabeli za ovu grupu (p<0,001). U poređenju sa ostale dve grupe zastupljenost ispitanika sa ovom vidnom oštrinom statistički je takođe značajno veća (p<0,001).

Kod pacijenata obolelih od PEXG najviše očiju, 14 (20,00%), je bilo vidne oštrine <0,1, što je statistički u okviru ove grupe više samo u odnosu na broj očiju sa vidnom oštrinom L- (p<0,001).

U grupi ispitanika sa kataraktom, takođe je bilo najviše očiju sa vidnom oštrinom <0,1, što je statistički u okviru ove grupe više u odnosu na zastupljenost očiju sa vidnom oštrinom 0,9–1,0 (p<0,01) kao i u odnosu na broj očiju kod ostalih vidnih oštrina manje zastupljenosti (p<0,001). Broj očiju sa vidnom širinom <0,1 u grupi ispitanika sa kataraktom je statistički značajno veći no u POAG- HTG grupi (p<0,01).

5.1.4. Intraokularni pritisak ispitanika

Iz didaktičkih razloga smo formirali nekoliko kategorija prema visini intraokularnog pritiska (IOP): ≤ 21 mmHg; 22–24 mmHg; 25–29 mmHg; 30–34 mmHg; 35–39 mmHg; 40–44 mmHg; 45–49 mmHg; >50 mmHg.

Prosečna vrednost i standardna devijacija za IOP svih očiju ispitanika bila je $19,26 \pm 7,97$ mmHg, sa medijanom 18 mmHg, u intervalu od 8 do 76 mmHg, a vrednosti ovog parametra po grupama date su u tabeli 12.

Tabela 12. Vrednosti IOP ispitanika u odnosu na tip glaukoma i kataraktu.

	X \pm SD (Me) Min–Max		
	HTG (n=162)	PEXG (n=70)	CAT (n=154)
IOP ^{***} (mmHg)	21,86\pm7,37^{c***} (20,00) 10–48	23,11\pm11,78^{c***} (20,50) 10–76	14,76 \pm 2,39 (14,00) 8–20

c – vs CAT

*** – p<0,001 (Kruskal- Wallis i Mann-Whitney test)

n – broj očiju ispitanika

Kruskal-Wallis testom utvrđeno je postojanje statistički značajne razlike IOP između ispitivanih grupa (p<0,001). Najveća vrednost IOP bila je kod očiju ispitanika obolelih od PEXG, IOP pacijenata obolelih od POAG- HTG bio je niži. Vrednosti IOP u obe ove grupe ispitanika statistički su značajno veće u odnosu na ispitanike sa staračkom kataraktom, kod kojih je ujedno i najniža vrednost IOP (p<0,001).

Tabela 13. Distribucija IOP po kategorijama u odnosu na tip glaukoma i kataraktu.

IOP (mm Hg)	HTG (n=162)		PEXG (n=70)		CAT (n=154)		Ukupno (n=386)	
≤ 21	92	56,79%	40	57,14%	154	ab*** 100,00%	286	74,09%
22–24	33	20,37%	13	18,57%	0	0,00%	46	11,92%
25–29	14	8,64%	6	8,57%	0	0,00%	20	5,18%
30–34	11	6,79%	2	2,86%	0	0,00%	13	3,37%
35–39	4	2,47%	2	2,86%	0	0,00%	6	1,55%
40–44	4	2,47%	3	4,29%	0	0,00%	7	1,81%
45–49	4	2,47%	1	1,43%	0	0,00%	5	1,30%
>50	0	0,00%	3	4,29%	0	0,00%	3	0,78%
Ukupno	162	100,00%	70	100,00%	154	100,00%	386	100,00%

a – vs HTG, b – vs PEXG

*** – p<0,001 (χ^2 test)

n – broj očiju ispitanika

U celom ispitivanom uzorku, kao i u sve tri grupe ispitanika, statistički značajno najveći broj ispitanika imao je $IOP \leq 21\text{mmHg}$ ($p < 0,001$) (tabela 13). Broj očiju opada sa porastom vrednosti IOP, izuzev kod PEXG gde postoje minimalna odstupanja od ovog trenda, što može biti posledica i najmanjeg broja očiju sa ovim tipom glaukoma. Valja zapaziti da u grupi ispitanika sa senilnom kataraktom sve oči imaju $IOP \leq 21\text{mmHg}$, te je zastupljenost očiju sa ovakvim vrednostima IOP statistički značajno veća u grupi sa kataraktom u odnosu na POAG- HTG i PEXG ponaosob ($p < 0,001$).

5.1.5. Indeks eskavacije vidnog živca ispitanika

Svi ispitanici sa već dijagnostikovanom glaukomom imali su eskavaciju vidnog živca (C/D) $> 0,3$.

Prosečna vrednost indeksa eskavacije vidnog živca (C/D) svih očiju ispitanika sa POAG- HTG i PEXG bila je $0,64 \pm 0,20$, sa medijanom od 0,6, a u opsegu od 0,4 do 1,0. Vrednosti C/D u odnosu na tip glaukoma date su u tabeli 14.

Tabela 14. Indeks eskavacije vidnog živca (C/D) ispitanika u odnosu na tip glaukoma.

	X \pm SD (Me) Min–Max	
	HTG (n=149)	PEXG (n=30)
C/D	0,64 \pm 0,20 (0,60)	0,62 \pm 0,19 (0,55)
	0,4–1,0	0,4–1,0

n – broj očiju ispitanika
Mann-Whitney test

Vrednosti indeksa eskavacije vidnog živca su gotovo identične kod POAG- HTG i PEXG, pa nema statistički značajne razlike ovog parametra između POAG- HTG i PEXG. U 13 očiju ispitanika obolelih od POAG- HTG i 40 očiju ispitanika obolelih od PEXG nije bilo moguće odrediti indeks eskavacije vidnog živca zbog замуćenja u sočivu i promena na prednjem segmentu oka.

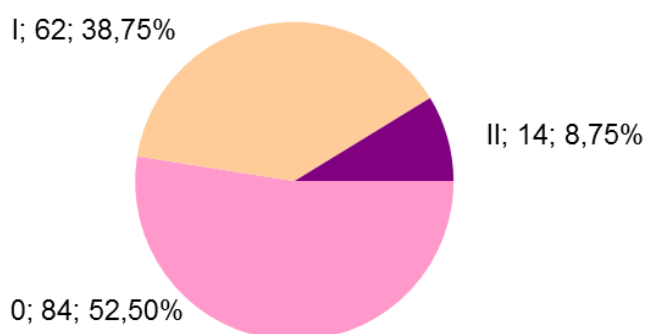
Tabela 15. Distribucija vrednosti C/D u odnosu na tip glaukoma ispitanika.

C/D	HTG (n=149)		PEXG (n=30)		Ukupno (n=170)	
0,4	33	22,15%	5	16,67%	38	21,23%
0,5	33	22,15%	10	33,33%	43	24,02%
0,6	19	12,75%	4	13,33%	23	12,85%
0,7	15	10,07%	3	10,00%	18	10,06%
0,8	16	10,74%	2	6,67%	18	10,06%
0,9	24	16,11%	5	16,67%	29	16,20%
1,0	9	6,04%	1	3,33%	10	5,59%
Ukupno	149	100,00%	30	100,00%	179	100,00%

n – broj očiju ispitanika
 χ^2 test

U obe ispitivane grupe, POAG- HTG i PEXG, najviše očiju je bilo sa C/D= 0,5; s tim da je u POAG- HTG grupi isti broj očiju i sa C/D= 0,4. Između ispitivanih grupa nema statistički značajnih razlika raspodele očiju po vrednostima indeksa eskavacije C/D (tabela 15).

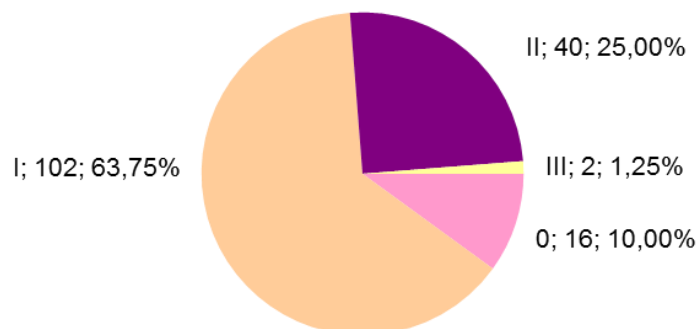
5.1.6. Otvorenost komornog ugla pacijenata obolelih od POAG- HTG



Grafikon 2. Stepen otvorenosti komornog ugla (po Scheie-u) ispitanika obolelih od POAG sa povišenim IOP (HTG).

Prisutna je bila izrazita nehomogenost ispitanika obolelih od POAG- HTG u odnosu na otvorenost komornog ugla (χ^2 test: $p < 0,001$). Najviše je očiju sa otvorenošću komornog ugla 0 stepena po Scheie-u, više od polovine ispitanih očiju, 84 (52,50%). Broj očiju sa I stepenom otvorenosti komornog ugla po Scheie-u bio je 62 (38,75%), a samo 14 (8,75%) očiju imalo je otvorenost komornog ugla II stepena po Scheie-u (grafikon 2).

5.1.7. Pigmentacija komornog ugla ispitanika obolelih od POAG- HTG



Grafikon 3. Pigmentacija komornog ugla (po Scheie-u) ispitanika obolelih od POAG- HTG.

Izrazita nehomogenost ispitanika obolelih od POAG- HTG bila je prisutna u odnosu na stepen pigmentacije komornog ugla (χ^2 test: $p < 0,001$). Najviše je očiju sa pigmentacijom komornog ugla I stepena po Scheie-u. Pigmentaciju komornog ugla nije bilo moguće odrediti u dva oka zbog promena na prednjem segmentu (grafikon 3).

5.1.8. Funkcionalno ispitivanje i parametri vidnog polja:

MD, PSD i CPSD kod ispitanika obolelih od glaukoma

Prosečna vrednost za srednje odstupanje (mean deviation, MD, u dB) u kompjuterizovanom vidnom polju svih ispitanika sa POAG- HTG i PEXG bila je $-11,88 \pm 9,28$ dB, sa medijanom od $-8,46$ dB, u opsegu od $-0,07$ dB do $-31,27$ dB, a vrednosti ovog parametra u odnosu na tip glaukoma prikazane su u tabeli 16.

Tabela 16. Srednje odstupanje (MD) ispitanika u odnosu na tip glaukoma.

	X \pm SD (Me) Min–Max	
	HTG (n=128)	PEXG (n=18)
MD	$-11,73 \pm 9,05$ ($-8,46$)	$-12,95 \pm 10,98$ ($-8,62$)
(dB)	$-0,38 - -31,27$	$-0,07 - -29,69$

n – broj očiju ispitanika
Mann-Whitney test

Iako je apsolutna vrednost MD veća kod očiju sa PEXG, nema statistički značajne razlike u odnosu na vrednost ovog parametra kod očiju sa POAG- HTG. Kod određenog broja ispitanika nije bilo moguće uraditi funkcionalno ispitivanje zbog izuzetno male vidne oštine.

Na osnovu opšteprihvaćenog gradiranja glaukomnog oštećenja (*Hadopp klasifikacija*) izvršena je klasifikacija bolesnika obolelih od POAG- HTG u tri grupe:

- a) blago oštećenje (MD < -6 dB),
- b) umereno oštećenje (MD < -12 dB),
- c) teško oštećenje (MD > -12 dB).

Tabela 17. Distribucija ispitanika obolelih od POAG- HTG prema stepenu glaukomnog oštećenja u vidnom polju.

MD	HTG (n=128)		PEXG (n=18)		Ukupno (n=146)	
< 6 dB	41	32,03%	8	44,44%	49	33,56%
6–12 dB	45	35,16%	3	16,67%	48	32,88%
>12 dB	42	32,81%	7	38,89%	49	33,56%
Ukupno	128	100,00%	18	100,00%	146	100,00%

n – broj očiju ispitanika

χ^2 test

Nema statistički značajnih razlika u distribuciji očiju po Hadopp klasifikaciji između ispitanika sa POAG- HTG i PEXG (tabela 17).

Prosečna vrednost PSD (pattern standard deviation, u dB) svih očiju ispitanika bila je $5,37 \pm 3,05$ dB, sa medijanom od 4,58 dB, u opsegu od 1,42 dB do 14,75 dB, a vrednosti u odnosu na tip glaukoma date su u tabeli 18.

Tabela 18. Distribucija PSD ispitanika u odnosu na tip glaukoma.

	X \pm SD (Me), Min–Max	
	HTG (n=126)	PEXG (n=18)
PSD	5,58\pm3,10* (4,92)	3,88 \pm 2,22(2,86)
(dB)	1,42–14,75	1,63–7,92

* – p<0,05 (Mann-Whitney test)

n – broj očiju ispitanika

Vrednost PSD (dB) statistički je značajno veća kod ispitanika obolelih od POAG- HTG no ispitanika obolelih od PEXG (p<0,05) (tabela 18).

Prosečna vrednost CPSD (corrected pattern standard deviation, u dB) svih ispitanika bila je $4,38 \pm 3,25$ dB, uz medijanu od 3,56 dB, u opsegu od 0 dB do 14,67 dB.

Vrednost CPSD veća je kod obolelih od POAG- HTG, blizu granice statističke značajnosti u odnosu na obolele od PEXG ($p=0,0504$) (tabela 19).

Tabela 19. Distribucija CPSD ispitanika u odnosu na tip glaukoma.

	X±SD (Me) Min–Max	
	HTG (n=124)	PEXG (n=18)
CPSD	4,58±3,30(3,80)	3,00±2,52(2,40)
(dB)	0–14,67	0–7,77

n – broj očiju ispitanika
Mann-Whitney test

5.1.9. Ispitivanje morfoloških parametara: istanjenja debljine peripapilarnih nervnih vlakana retine (RNFL Avg, RNFL Sup i RNFL Inf)

Poređenjem deskriptivnih parametara nisu utvrđene statistički značajne razlike u vrednostima RNFL Avg (prosečna debljina sloja retinalnih nervnih vlakana), RNFL Sup (prosečna debljina sloja retinalnih nervnih vlakana u gornjem kvadrantu) i RNFL Inf (prosečna debljina sloja retinalnih nervnih vlakana u donjem kvadrantu) između POAG- HTG i PEXG.

Prosečna vrednost RNFL Avg svih očiju ispitanika bila je $78,19 \pm 23,97$ μm , uz medijanu od 80,97 μm , a kretala se u opsegu od 24,46 μm do 143,71 μm . Vrednosti RNFL Avg u odnosu na tip glaukoma prikazane su u tabeli 20.

Tabela 20. Distribucija RNFL Avg ispitanika u odnosu na tip glaukoma.

	X±SD (Me) Min–Max	
	HTG (n=110)	PEXG (n=14)
RNFL Avg	78,09±24,39 (80,98)	78,95±21,21 (81,63)
(μm)	24,46–143,71	45,77–103,69

n – broj očiju ispitanika
Mann-Whitney test

Vrednost RNFL Avg veća je kod bolesnika obolelih od PEXG, ali ne i statistički značajno u odnosu na grupu bolesnika obolelih od POAG- HTG.

Procenu glaukomnog oštećenja moguće je izvršiti prema debljini peripapilarnih retinalnih nervnih vlakana. Na osnovu debljine RNFL Avg postoji sledeća podela po grupama:

- 0 – Normalno (normal) > 80 μm
- 1 – Suspektan glaukom (borderline glaucoma suspect) 70–79 μm
- 2 – Rani glaukom (early glaucoma) 60–69 μm
- 3 – Umereni glaukom (moderate glaucoma) 50–59 μm
- 4 – Uznapredovali glaukom (advanced glaucoma) 40–49 μm
- 5 – Uznapredovala retinalna bolest (advanced retinal disease) < 40 μm .

Tabela 21. Distribucija ispitanika po vrednostima RNFL Avg u odnosu na tip glaukoma.

RNFL Avg (μm)	HTG (n=110)		PEXG (n=14)		Ukupno (n=124)	
Normalno > 80 μm	57	51,82%	7	50,00%	64	51,61%
Suspektan glaukom 70–79 μm	9	8,18%	3	21,43%	12	9,68%
Rani glaukom 60–69 μm	9	8,18%	0	0,00%	9	7,26%
Umereni glaukom 50–59 μm	19	17,27%	1	7,14%	20	16,13%
Uznapredovali glaukom 40–49 μm	11	10,00%	3	21,43%	14	11,29%
Uznapredovala retinalna bolest <40 μm	5	4,55%	0	0,00%	5	4,03%
Ukupno	110	100,00%	14	100,00%	124	100,00%

n – broj očiju ispitanika

χ^2 test

U celom ispitivanom uzorku, kao i u obe grupe glaukoma, POAG- HTG i PEXG, skoro polovina očiju ima normalnu vrednost parametra RNFL Avg. Broj očiju sa normalni vrednostima RNFL Avg u celom uzorku i POAG- HTG je dominantno veći u odnosu na broj očiju sa drugim navedenim vrednostima ovog parametra ($p < 0,001$). Nema statistički značajnih razlika između POAG- HTG i PEXG u raspodeli očiju u odnosu na vrednosti RNFL Avg (tabela 21).

Prosečna vrednost RNFL Sup svih ispitanika bila je $93,44 \pm 34,85 \mu\text{m}$, uz medijanu od $96,00 \mu\text{m}$, u opsegu od $26 \mu\text{m}$ do $180 \mu\text{m}$, a vrednosti u odnosu na tip glaukoma date su u tabeli 22.

Tabela 22. Distribucija RNFL Sup ispitanika u odnosu na tip glaukoma.

X \pm SD (Me) Min–Max

	HTG (n=97)	PEXG (n=14)
RNFL Sup	92,38 \pm 34,50 (96,00)	100,97 \pm 37,33 (104,00)
(μm)	26–180	44–161

n – broj očiju ispitanika

Mann-Whitney test

Vrednost RNFL Sup bila je veća kod pacijenata sa PEXG, ali ne i statistički značajno u odnosu na grupu pacijenata obolelih od POAG- HTG.

Glaukomatozna oštećenja moguće je pratiti i na osnovu parametra RNFL Sup i RNFL Inf.

Izvršili smo podelu po grupama u odnosu na RNFL Sup (tabela 23):

0 – normalno (normal) 104,80 – 142,70 μm

1 – glaukom (glaucoma) < 104,80 μm .

Tabela 23. Distribucija ispitanika po vrednostima RNFL Sup u odnosu na tip glaukoma.

RNFL Sup (μm)	HTG (n=97)		PEXG (n=14)		Ukupno (n=111)	
Normalno 104,80–142,70 μm	39	40,21%	6	42,86%	45	40,54%
Glaukom < 104,80 μm	58	59,79%	8	57,14%	66	59,46%
Ukupno	97	100,00%	14	100,00%	111	100,00%

n – broj očiju ispitanika
 χ^2 test

U celom ispitivanom uzorku, i u obe grupe glaukoma ponaosob, veći je broj očiju čiji je parametar RNFL Sup vrednosti koje su karakteristika glaukoma, a ne normalnog nalaza. Nema statistički značajnih razlika između POAG- HTG i PEXG u raspodeli očiju u odnosu na vrednosti RNFL Sup.

Prosečna vrednost RNFL Inf svih ispitanika bila je $94,67 \pm 36,65 \mu\text{m}$, medijana je $101,00 \mu\text{m}$, a opseg od $29 \mu\text{m}$ do $157 \mu\text{m}$, a vrednosti u odnosu na tip glaukoma date su u tabeli 24.

Tabela 24. RNFL Inf ispitanika u odnosu na tip glaukoma.

	X \pm SD (Me) Min–Max	
	HTG (n=97)	PEXG (n=14)
RNFL Inf (μm)	94,41 \pm 37,55 (101,00) 29–157	96,43 \pm 30,78 (91,00) 57–144

n – broj očiju ispitanika
Mann-Whitney test

Vrednost RNFL Inf bila je minimalno veća kod pacijenata sa PEXG, ali bez statistički značajne razlike u odnosu na grupu sa POAG- HTG.

Izvršena je podela po grupama u odnosu na RNFL Inf (tabela 25):

0 – normalno (normal) 103,90-138,60 μm

1 – glaukom (glaucoma) <103,90 μm .

Tabela 25. Distribucija ispitanika po vrednostima RNFL Inf u odnosu na tip glaukoma.

RNFL Inf (μm)	HTG (n=97)		PEXG (n=14)		Ukupno (n=111)	
Normalno 103,90–138,60 μm	47	48,45%	6	42,86%	53	47,75%
Glaukom < 103,90 μm	50	51,55%	8	57,14%	58	52,25%
Ukupno	97	100,00%	14	100,00%	111	100,00%

n – broj očiju ispitanika
 χ^2 test

I u ovom slučaju, u celom uzorku, i u obe grupe glaukoma ponaosob, bio je veći broj očiju čiji je parametar RNFL Inf vrednosti koje su karakteristika glaukoma, a ne normalnog nalaza. Nešto je veći broj očiju sa nalazom RNFL Inf < 103.90 μm među pacijentima obolelim od PEXG, ali bez statistički značajne razlike u odnosu na grupu POAG- HTG (tabela 25).

Ako u odnosu na vrednost RNFL Avg (μm) smatramo da su glukomi samo oni sa RNFL Avg < 80 μm , onda nema statistički značajne razlike između broja očiju koje pripadaju glaukomu na osnovu korišćenih parametara (tabela 26).

Tabela 26. Pripadost kategoriji glaukoma u grupi POAG- HTG

na osnovu vrednosti parametara RNFL Avg, RNFL Sup i RNFL Inf.

RNFL Avg (μm)	RNFL Sup (μm)	RNFL Inf (μm)
53 (vs 57), ako se uzima samo normalno > 80 μm ili	58 (vs 39)	50 (vs 47)
44 (vs 66), ako se uzima i suspektan glaukom 70–79 μm		

χ^2 test

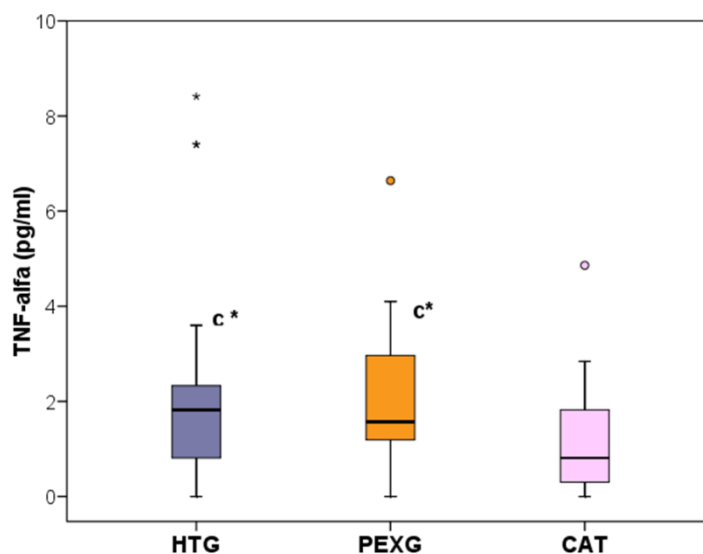
Najviše glaukoma u POAG- HTG grupi je na osnovu kategorizacije po RNFL Sup (58 ispitanika; 59,79%), a najmanje po RNFL Avg (47 ispitanika; 48,18%).

Ako pod glaukomom posmatramo RNFL Avg \leq 69 μm , onda je broj glaukoma po RNFL Avg 44 (47,00%), pa je u odnosu na to statistički značajno veća zastupljenost kategorizacije glaukoma u POAG- HTG grupi po RNFL Sup ($p < 0,01$).

5.2. Biohemijska ispitivanja

5.2.1. Koncentracija TNF- α

Prosečna vrednost TNF- α u serumu svih ispitanika bila je $1,84 \pm 1,88$ pg/ml, sa medijanom 1,32 pg/ml, a kretala se u opsegu od 0 do 10,19 pg/ml. Vrednosti statističkih parametara TNF- α u ispitivanim grupama prikazane su na grafikonu 4 i u tabeli 27.



Grafikon 4. Vrednosti medijane, minimalnih, maksimalnih vrednosti i 25. i 75. percentila za TNF- α u serumu ispitanika u odnosu na tip glaukoma i kataraktu.

c – vs CAT, * – $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis i Mann-Whitney test)

Tabela 27. Koncentracija TNF- α u serumu ispitanika u odnosu na tip glaukoma i kataraktu.

	X \pm SD (Me) Min–Max		
	HTG (n=35)	PEXG (n=23)	CAT (n=29)
TNF- α *	2,04\pm1,98^{c*} (1,82)	2,05\pm1,48^{c*} (1,57)	1,43 \pm 2,00(0,81)
(pg/ml)	0,00–8,41	0,00–6,64	0,00–10,19

c – vs CAT

* – $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis i Mann-Whitney test)

n – broj ispitanika

Kruskal-Wallis testom je utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u serumskoj koncentraciji TNF- α između ispitivanih grupa ($p < 0,05$). Vrednost serumskog TNF- α najmanja je u grupi pacijenata sa senilnom kataraktom, statistički značajno manja u odnosu na pacijente sa POAG- HTG i PEXG ($p < 0,05$).

Spearmanovim koeficijentom linearne korelacije ispitivana je povezanost serumske koncentracije TNF- α i vidne oštine, intraokularnog pritiska, MD, PSD, CPSD, RNFL Avg, RNFL Sup i RNFL Inf istog pacijenta (tabela 28).

Tabela 28. Spearmanovi koeficijenti korelacije TNF- α i ispitivanih kliničkih parametara u odnosu na tip glaukoma i kataraktu.

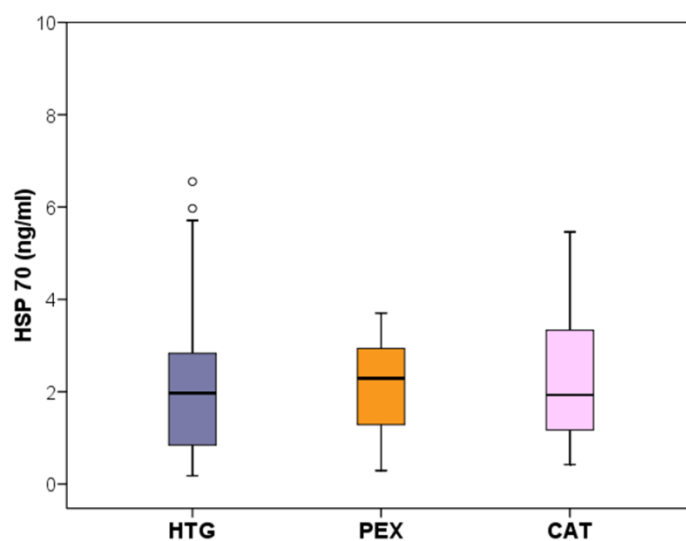
ρ TNF- α (pg/ml) i	V	IOP	C/D	MD	PSD	CPSD	RNFL Avg	RNFL Sup	RNFL Inf
HTG	0,00	-0,03	0,02	-0,02	0,03	0,07	0,02	-0,03	-0,05
PEXG	-0,15	-0,08	-0,12	0,31	-0,28	-0,16	0,29	0,13	0,44
CAT	-0,01	0,19							
ceo uzorak	-0,01	0,13	-0,03	0,06	-0,07	-0,01	0,06	0,02	0,06

ρ – Spirmanov koeficijent rang korelacije

Ni u celom ispitivanom uzorku, ni u grupama ispitanika obolelih od glaukoma i ispitanika sa staračkom kataraktom nije bilo statistički značajnih korelacija koncentracije TNF- α u serumu ni sa jednim od navedenih parametara.

5.2.2. Koncentracija HSP 70

Prosečna vrednost serumskog HSP 70 svih ispitanika bila je $2,21 \pm 1,41$ ng/ml, sa medijanom 2,04 ng/ml, a opseg vrednosti ovog parametra je od 0,18 do 6,55 ng/ml. Na grafikonu 5 i u tabeli 29 date su vrednosti statističkih parametara HSP 70 u ispitivanim grupama.



Grafikon 5. Vrednosti medijane, minimalnih, maksimalnih vrednosti i 25. i 75. percentila za HSP 70 u odnosu na tip glaukoma i kataraktu.

Tabela 29. Serumske vrednosti HSP 70 ispitanika u odnosu na tip glaukoma i kataraktu.

	X±SD (Me) Min–Max		
	HTG (n=37)	PEXG (n=24)	CAT (n=29)
HSP 70	2,27±1,70 (1,97)	2,14±0,96 (2,29)	2,20±1,32 (1,93)
(ng/ml)	0,18–6,55	0,29–3,70	0,42–5,46

n – broj ispitanika

Kruskal-Wallis, Mann-Whitney test, Studentov t-test nezavisnih uzoraka

Serumske vrednosti HSP 70 su veoma slične u sve tri grupe ispitanika, pa ni Kruskal-Wallis, ni Mann-Whitney, odnosno Studentovim t-testom nezavisnih uzoraka, nisu utvrđene statistički značajne razlike između ispitivanih pacijenata.

Spearmanovim koeficijentom rang korelacije i Pirsonovim koeficijentom linearne korelacije ispitivana je povezanost serumske koncentracije HSP 70 i vidne oštine, intraokularnog pritiska, MD, PSD, CPSD, RNFL Avg, RNFL Sup i RNFL Inf istog pacijenta (tabela 30).

Kod pacijenata obolelih od POAG- HTG statistički je značajna negativna korelacija serumske koncentracije HSP 70 i RNFL Sup ($p < 0,05$), a veoma blizu statističke značajnosti su negativne korelacije HSP 70 sa MD ($p = 0,0538$) i sa RNFL Inf ($p = 0,0584$).

U celom uzorku statistički su značajne negativne korelacije serumske koncentracije HSP 70 sa MD, RNFL Avg, RNFL Sup i RNFL Inf ($p < 0,05$).

Tabela 30. Spearmanovi i Pirsonovi koeficijenti korelacije HSP 70 i ispitivanih kliničkih parametara u odnosu na tip glaukoma i kataraktu.

ρ (<i>r</i>) HSP70 (ng/ml) i	V	IOP	C/D	MD	PSD	CPSD	RNFL Avg	RNFL Sup	RNFL Inf
HTG	0,01	0,12	-0,12	-0,27	-0,07	-0,10	-0,26	*-0,33	-0,30
PEXG	0,12	0,07	0,12	-0,46	-0,03	-0,05	0,14	-0,05	-0,171
CAT	0,08	0,05							
ceo uzorak	0,06	0,08	-0,05	*-0,25	-0,05	-0,09	*-0,29	*-0,32	*-0,31

* – $p < 0,05$, ρ – Spearmanov koeficijent rang korelacije,*r* – Pirsonov koeficijent linearne korelacije (italik vrednosti)

5.2.3. Koncentracija Fas

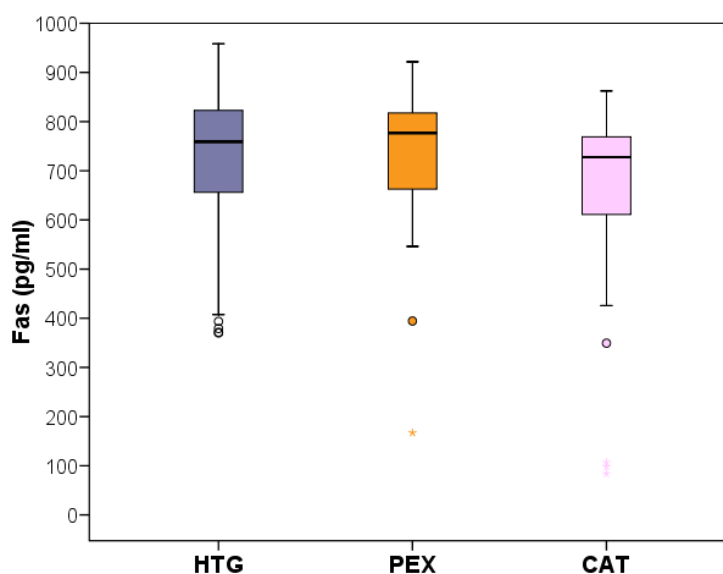
Prosečna vrednost koncentracija solubilnog Fas u očnoj vodici svih ispitanika bila je $688,57 \pm 186,76$ pg/ml, uz medijanu od 756,49 pg/ml, a vrednosti su bile u opsegu od 83,83 do 958,22 pg/ml, a statistički parametri u ispitivanim grupama dati su na grafikonu 6 i u tabeli 31.

Tabela 31. Koncentracija Fas u očnoj vodici ispitanika u odnosu na tip glaukoma i kataraktu.

X \pm SD (Me) Min–Max

	HTG (n=35)	PEXG (n=24)	CAT (n=29)
Fas	713,43 \pm 162,69 (759,80)	720,14 \pm 167,39 (776,63)	632,46 \pm 217,11 (727,79)
(pg/ml)	369,95–958,22	166,99–921,60	83,83–862,33

n – broj ispitivanih uzoraka očne vodice
Kruskal-Wallis i Mann-Whitney test



Grafikon 6. Vrednosti medijane, minimalnih, maksimalnih vrednosti i 25. i 75. percentila za koncentraciju Fas u očnoj vodici u odnosu na tip glaukoma i kataraktu.

Ni Kruskal-Wallis, ni Mann-Whitney testom nisu utvrđene statistički značajne razlike koncentracije Fas u očnoj vodici između ispitivanih grupa.

Vrednost Fas u očnoj vodici najveća je kod očiju bolesnika obolelih od PEXG, a malo niža kod pacijenata obolelih od POAG- HTG. Ipak treba naglasiti da je statistička razlika između POAG- HTG i CAT na granici statističke značajnosti ($p=0,0505$), a između PEXG i CAT takođe bliska statistički značajnoj razlici ($p=0,0657$).

Spearmanovim koeficijentom linearne korelacije ispitivana je povezanost koncentracije Fas u očnoj vodici ispitanika i vidne oštine, intraokularnog pritiska, MD, PSD, CPSD, RNFL Avg, RNFL Sup i RNFL Inf istog pacijenta (tabela 32).

Tabela 32. Spearmanovi koeficijenti korelacije Fas i ispitivanih kliničkih parametara u odnosu na tip glaukoma i kataraktu.

ρ FAS (pg/ml) i	V	IOP	C/D	MD	PSD	CPSD	RNFL Avg	RNFL Sup	RNFL Inf
HTG	-0,12	0,06	0,06	0,07	0,02	0,07	-0,29	-0,20	* -0,33
PEXG	0,06	-0,22	-0,17	-0,38	0,26	0,14	-0,35	-0,43	-0,28
CAT	0,08	0,11							
ceo uzorak	0,01	0,14	0,03	-0,01	0,07	0,09	* -0,31	-0,27	* -0,35

* - $p < 0,05$, ρ – Spearmanov koeficijent rang korelacije

Kod pacijenata obolelih od POAG- HTG statistički je značajna negativna korelacija koncentracije Fas u očnoj vodici i RNFL Inf ($p < 0,05$).

U celom uzorku statistički su značajne negativne korelacije koncentracije Fas iz očne vodice ispitanika sa morfološkim parametrima dobijenim OCT-om: RNFL Avg i RNFL Inf ($p < 0,05$).

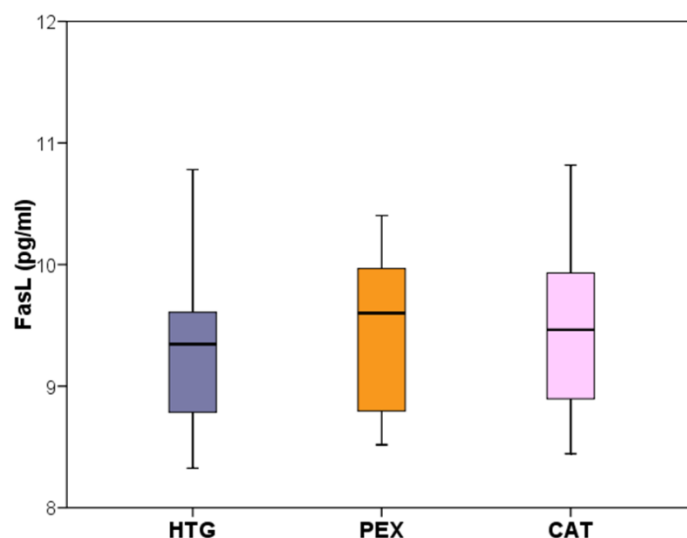
5.2.4. Koncentracija Fas liganda

Prosečna vrednost koncentracija solubilnog FasL u očnoj vodici svih ispitanika bila je $9,39 \pm 0,663$ pg/ml, uz medijanu od 9,43 pg/ml, a vrednosti su bile u opsegu od 8,33 do 10,82 pg/ml. Statistički parametri FasL u ispitivanim grupama dati su u tabeli 33 i na grafikonu 7.

Tabela 33. Koncentracija FasL u očnoj vodici ispitanika u odnosu na tip glaukoma i kataraktu.

	X \pm SD (Me) Min–Max		
	HTG (n=35)	PEXG (n=24)	CAT (n=29)
FasL (pg/ml)	9,28 \pm 0,551 (9,35) 8,33–10,78	9,45 \pm 0,61 (9,60) 8,52–10,40	9,48 \pm 0,73 (9,46) 8,44–10,82

n- broj ispitivanih uzoraka očne vodice
Kruskal-Wallis i Mann-Whitney test, Studentov t-test nezavisnih uzoraka



Grafikon 7. Vrednosti medijane, minimalnih, maksimalnih vrednosti i 25. i 75. percentila za koncentraciju FasL u očnoj vodici u odnosu na tip glaukoma i kataraktu.

Ni Kruskal-Wallis, ni Mann-Whitney, odnosno Studentovim t-testom nezavisnih uzoraka nisu utvrđene statistički značajne razlike u koncentraciji FasL iz očne vodice pacijenata obolelih od POAG- HTG i PEXG i ispitanika sa staračkom kataraktom.

Koncentracija solubilnog FasL u očnoj vodici bila je najniža kod pacijenata obolelih od POAG- HTG, gotovo statistički značajno manja u odnosu na koncentraciju FasL kod pacijenata obolelih od PEXG ($p=0,0566$).

Spearmanovim koeficijentom linearne korelacije ispitivana je povezanost koncentracije FasL u očnoj vodici ispitanika i vidne oštine, intraokularnog pritiska, MD, PSD, CPSD, RNFL Avg, RNFL Sup i RNFL Inf istog pacijenta (tabela 34).

Tabela 34. Spearmanovi koeficijenti korelacije FasL i ispitivanih kliničkih parametara u odnosu na tip glaukoma i kataraktu.

ρ FasL (pg/ml) i	V	IOP	C/D	MD	PSD	CPSD	RNFL Avg	RNFL Sup	RNFL Inf
HTG	-0,11	0,18	0,17	* -0,32	0,13	0,00	-0,31	-0,27	-0,30
PEXG	-0,11	-0,11	-0,12	-0,29	0,30	0,22	-0,43	* -0,62	-0,07
CAT	0,01	-0,04							
ceo uzorak	-0,11	-0,08	0,10	* -0,31	0,16	0,04	* -0,32	* -0,35	* -0,31

* - $p < 0,05$

U grupi pacijenata obolelih od POAG- HTG statistički značajna je negativna korelacija FasL sa MD ($p < 0,05$), a blizu statistički značajne je negativna korelacija sa RNFL Avg ($p = 0,0594$). U grupi pacijenata obolelih od PEXG statistički je veoma značajna negativna korelacija sa RNFL Sup ($p < 0,05$).

U celom uzorku ispitanika statistički značajne su negativne korelacije FasL sa funkcionalnim parametrom vidnog polja MD i morfološkim OCT parametrima: RNFL Avg, RNFL Sup i RNFL Inf ($p < 0,05$).

5.2.5. Korelacija koncentracije TNF- α , HSP 70, Fas i Fas liganda ispitanika

Spearmanovim koeficijentom linearne korelacije ispitivana je povezanost serumske koncentracije TNF- α i HSP 70, koncentracije Fas i FasL u očnoj vodici ispitanika (tabela 35).

Tabela 35. Spearmanovi i Pirsonovi koeficijenti korelacije parametara TNF- α , HSP 70, Fas i FasL po grupama u odnosu na tip glaukoma i kataraktu.

ρ (r) (pg/ml)	TNF- α i HSP 70	TNF- α i Fas	TNF- α i FasL	HSP 70 i Fas	HSP 70 i FasL	Fas i FasL
HTG	-0,20	-0,09	-0,11	-0,11	0,21	-0,15
PEXG	-0,18	0,11	-0,36	-0,11	-0,03	-0,12
CAT	** -0,53	0,04	<i>0,10</i>	-0,23	-0,20	-0,03

** – $p < 0,01$, ρ – Spearmanov koeficijent rang korelacije,
 r – Pirsonov koeficijent linearne korelacije (italik vrednosti)

Statistički značajna je negativna korelacija serumske koncentracije TNF- α sa serumskom koncentracijom HSP 70 kod ispitanika sa senilnom kataraktom ($p < 0,01$).

5.3. Genska ispitivanja

5.3.1. Polimorfizam na genu -308 za TNF- α

Ispitivanje genskog polimorfizma TNF- α -308 vršeno je ukupno na 328 ispitanika, i to kod 164 ispitanika iz studijske grupe (71 pacijenta obolelog od POAG- HTG, 28 pacijenata obolela od PEXG i 65 ispitanika sa staračkom kataraktom) i 164 ispitanika iz zdrave populacije (kontrolna grupa). Određivana je učestalost genotipova GG, GA, AA po grupama ispitanika (tabela 35 i 36) i G i A alela (tabela 37).

Tabela 35. Zastupljenost genotipova na genu -308 za TNF- α u studijskoj i kontrolnoj grupi.

Genotip	Studijska grupa (n=164)		Kontrolna grupa (n=164)		Ukupno (n=328)	
GG	129	*78,66%	113	68,90%	242	73,78%
GA	30	18,29%	50	30,49%	80	24,39%
AA	5	3,05%	1	0,61%	6	1,83%
Ukupno	164	100,00%	164	100,00%	328	100,00%

* - p<0,05
 χ^2 test

Zastupljenost genotipa GG na genu -308 za TNF- α statistički je značajno veća u studijskoj u odnosu na kontrolnu grupu (p<0,05).

Tabela 36. Zastupljenost genotipova u odnosu na prisustvo A alela na genu -308 za TNF- α u studijskoj i kontrolnoj grupi.

Genotip	Studijska grupa (n=164)		Kontrolna grupa (n=164)		Ukupno (n=328)	
GG	129	78,66%	113	68,90%	242	73,78%
GA+AA	35	21,34%	51	*31,10%	86	26,22%

* - p<0,05
 χ^2 test

Zastupljenost genotipova koji imaju A alel statistički je značajno veća u kontrolnoj u odnosu na studijsku grupu (p<0,05).

Tabela 37. Zastupljenost alela G i A na genu -308 za TNF- α u ukupnom broju alela u studijskoj i kontrolnoj grupi.

Alel	Studijska grupa (n=328)		Kontrolna grupa (n=328)		Ukupno (n=656)	
G	288	87,80%	276	84,15%	564	85,98%
A	40	12,20%	52	15,85%	92	14,02%

Nema statistički značajne razlike u zastupljenosti alela između studijske i kontrolne grupe, a A alel je zastupljeniji u kontrolnoj grupi.

Tabela 38. Zastupljenost genotipova na genu -308 za TNF- α

kod ispitanika sa POAG- HTG, PEXG, senilnom kataraktom i u kontrolnoj grupi.

Genotip	HTG (n=71)		PEXG (n=28)		CAT (n=65)		Kontrola (n=164)	
GG	58	^{k*} 81,69%	21	75,00%	50	76,92%	113	68,90%
GA	13	18,31%	7	25,00%	10	15,38%	50	30,49%
AA	0	0,00%	0	0,00%	5	7,69%	1	0,61%
Ukupno	71	100,00%	28	100,00%	65	100,00%	164	100,00%

* – p<0,05, k –vs kontrola
 χ^2 test

Zastupljenost genotipa GG na genu -308 za TNF- α statistički je značajno veća kod POAG- HTG ispitanika u odnosu na kontrolnu grupu (p<0,05) (tabela 38).

Tabela 39. Zastupljenost genotipova u odnosu na prisustvo A alela na genu -308 za TNF- α

kod ispitanika sa POAG- HTG, PEXG, senilnom kataraktom i u kontrolnoj grupi.

Genotip	HTG (n=71)		PEXG (n=28)		CAT (n=65)		Kontrola (n=164)	
GG	58	81,69%	21	75,00%	50	76,92%	113	68,90%
GA+AA	13	18,31%	7	25,00%	15	23,08%	51	^{h*} 31,10%

* – p<0,05, h –vs HTG
 χ^2 test

Zastupljenost genotipova koji imaju A alele statistički je veća u kontrolnoj grupi u odnosu na grupu POAG- HTG (p<0,05) (tabela 39).

Tabela 40. Zastupljenost alela G i A alela u ukupnom broju alela na genu -308 za TNF- α kod

ispitanika sa POAG- HTG, PEXG, senilnom kataraktom i u kontrolnoj grupi.

Alel	HTG (n=142)		PEXG (n=56)		CAT (n=130)		Kontrola (n=328)	
G	129	90,85%	49	87,50%	110	84,62%	276	84,15%
A	13	9,15%	7	12,50%	20	15,38%	52	15,85%

χ^2 test

Nema statistički značajne razlike u zastupljenosti alela G i A između studijske i kontrolne grupe, mada je A alel u kontrolnoj grupi gotovo statistički zastupljeniji u odnosu na POAG- HTG grupu (p=0,0536) (tabela 40).

5.3.1.1. Polimorfizam na genu -308 za TNF- α i klinički parametri

Vidna oštrina pacijenata je kod oba tipa glaukoma veća u slučaju GG genotipa u odnosu na GA genotip, ali je Mann-Whitney testom utvrđeno da je statistički značajno veća samo kod PEXG ($p < 0,05$) (tabela 41).

Tabela 41. Vidna oštrina (V) ispitanika u odnosu na genotip na genu TNF- α (-308).

X \pm SD (Me) Min–Max			
HTG	GG (n=116)	GA (n=26)	AA (n=0)
V	0,64 \pm 0,39 (0,80) 0,00–1,00	0,51 \pm 0,42 (0,45) 0,00–1,00	/
PEXG	GG (n=42)	GA (n=14)	AA (n=0)
V	0,38\pm0,33* (0,30) 0,00–1,00	0,12 \pm 0,23 (0,02) 0,00–0,70	/
CAT	GG (n=100)	GA (n=20)	AA (n=10)
V	0,34 \pm 0,36 (0,20) 0,00–1,00	0,25 \pm 0,36 (0,07) 0,00–1,00	0,35 \pm 0,36 (0,28) 0,00–0,80

* – $p < 0,05$
Mann-Whitney test

Mann-Whitney testom nisu utvrđene statistički značajne razlike vidne oštrine između ispitivanih genotipova kod ispitanika sa senilnom kataraktom.

Tabela 42. Intraokularni pritisak (IOP) ispitanika u odnosu na genotip na genu TNF- α (-308).

X \pm SD (Me) Min–Max			
HTG	GG (n=116)	GA (n=26)	AA (n=0)
IOP (mmHg)	22,72 \pm 7,79 (21,00) 12,00–48,00	20,04 \pm 6,94 (19,00) 10,00–46,00	/
PEXG	GG (n=42)	GA (n=14)	AA (n=0)
IOP (mmHg)	24,71 \pm 13,10 (21,00) 10,00–76,00	22,50 \pm 12,23 (20,50) 12,0–58,00	/
CAT	GG (n=100)	GA (n=20)	AA (n=10)
IOP (mmHg)	14,80 \pm 2,31 (14,00) 10,00–20,00	14,15 \pm 2,43 (14,00) 10,00–18,00	14,50 \pm 2,95 (14,50) 8,00–18,00

Mann-Whitney test

IOP je takođe kod oba tipa glaukoma veći u slučaju GG genotipa, ali Mann-Whitney testom nisu utvrđene statistički značajne razlike (tabela 42).

Mann-Whitney testom nisu utvrđene statistički značajne razlike IOP između ispitivanih genotipova kod senilne katarakte.

5.3.1.2. Polimorfizam na genu -308 za TNF- α i biohemijski parametri

Kod ispitanika obolelih od glaukoma Mann-Whitney testom nisu utvrđene statistički značajne razlike u serumskoj koncentraciji TNF- α između genotipova u okviru POAG- HTG i PEXG. Kod PEXG je evidentno veća vrednost koncentracije TNF- α , kod GA u odnosu na GG genotip, ali zbog relativno malog uzorka i visokih vrednosti standardnih devijacija nema statistički značajne razlike (tabela 43).

Tabela 43. Koncentracija TNF- α u ispitivanim grupama u odnosu na genotip na genu TNF- α (-308).

	X \pm SD (Me) Min–Max		
HTG	GG (n=24)	GA (n=7)	AA (n=0)
TNF- α (pg/ml)	2,20 \pm 1,86 (1,95) 0,00–7,40	2,25 \pm 2,81 (1,57) 0,00–8,41	/
PEXG	GG (n=16)	GA (n=6)	AA (n=0)
TNF- α (pg/ml)	1,63 \pm 1,08 (1,32) 0,00–3,09	3,26 \pm 1,99 (2,97) 0,81–6,64	/
CAT	GG (n=17)	GA (n=4)	AA (n=2)
TNF- α (pg/ml)	1,78 \pm 2,35 (1,06) 0,00–10,19	0,67 \pm 0,85 (0,43) 0,00–1,82	0,00

Mann-Whitney test

Mann-Whitney testom nisu utvrđene statistički značajne razlike TNF- α između genotipova kod ispitanika sa senilnom kataraktom, iako je evidentno veća vrednost kod GG genotipa.

5.3.2. Polimorfizam na genu -863 za TNF- α

Ispitivanje genskog polimorfizma na genu -863 za TNF- α vršeno je ukupno na 272 ispitanika, i to kod 164 ispitanika iz studijske grupe (71 pacijenta obolelog od POAG- HTG, 28 pacijenata obolela od PEXG i 65 ispitanika sa staračkom kataraktom) i 108 ispitanika iz zdrave populacije (kontrolna grupa). Učestalosti genotipova CC, CA, AA (tabela 44 i 45) i alela C i A po grupama ispitanika (tabela 46) prikazane su u narednim tabelama.

Tabela 44. Zastupljenost genotipova na genu -863 za TNF- α u studijskoj i kontrolnoj grupi.

Genotip	Studijska grupa (n=164)		Kontrolna grupa (n=108)		Ukupno (n=272)	
CC	105	64,02%	59	54,63%	164	60,29%
CA	51	31,10%	43	39,81%	94	34,56%
AA	8	4,88%	6	5,56%	14	5,15%
Ukupno	164	100,00%	108	100,00%	272	100,00%

 χ^2 test

Nema statistički značajne razlike u zastupljenosti genotipova između kontrolne i studijske grupe (tabela 44).

Tabela 45. Zastupljenost genotipova u odnosu na prisustvo A alela na genu -863 za TNF- α u studijskoj i kontrolnoj grupi.

Genotip	Studijska grupa (n=164)		Kontrolna grupa (n=108)		Ukupno (n=272)	
CC	105	64,02%	59	54,63%	164	60,29%
CA+AA	59	35,98%	49	45,37%	108	39,71%

 χ^2 test

Nema statistički značajne razlike u zastupljenosti genotipova u odnosu na prisustvo A alela u njima, a genotipovi sa A alelom prisutniji su u kontrolnoj grupi (tabela 45).

Tabela 46. Zastupljenost alela C i A na genu -863 za TNF- α u ukupnom broju alela u studijskoj i kontrolnoj grupi.

Alel	Studijska grupa (n=328)		Kontrolna grupa (n=216)		Ukupno (n=544)	
C	261	79,57%	161	74,54%	422	77,57%
A	67	20,43%	55	25,46%	122	22,43%

 χ^2 test

Nema statistički značajne razlike u zastupljenosti alela između studijske i kontrolne grupe, a A alel je zastupljeniji u kontrolnoj grupi (tabela 46).

Tabela 47. Zastupljenost genotipova na genu -863 za TNF- α

kod ispitanika sa POAG- HTG, PEXG, senilnom kataraktom i u kontrolnoj grupi.

Genotip	HTG (n=71)		PEXG (n=28)		CAT (n=65)		Kontrola (n=108)	
CC	50	^{*k} 70,42%	14	50,00%	41	63,08%	59	54,63%
CA	17	23,94%	13	^{*h} 46,43%	21	32,31%	^{*h} 43	39,81%
AA	4	5,63%	1	3,57%	3	4,62%	6	5,56%
Ukupno	71	100,00%	28	100,00%	65	100,00%	108	100,00%

h – vs HTG, k – vs kontrola, * – p<0,05

 χ^2 test

CC genotip bio je zastupljeniji kod pacijenata obolelih od POAG- HTG, statistički je zastupljeniji u odnosu na kontrolnu grupu (p<0,05), a u odnosu na PEXG bio je veoma blizu granice statističke značajnosti (p=0,0556). Zastupljenost genotipa CA statistički je značajno veća kod PEXG, kao i u kontrolnoj grupi u odnosu na POAG- HTG grupu (p<0,05) (tabela 47).

Tabela 48. Zastupljenost genotipova u odnosu na prisustvo A alela na genu -863 za TNF- α

kod ispitanika sa POAG- HTG, PEXG, senilnom kataraktom i u kontrolnoj grupi.

Genotip	HTG (n=71)		PEXG (n=28)		CAT (n=65)		Kontrola (n=108)	
CC	50	70,42%	14	50,00%	41	63,08%	59	54,63%
CA+AA	21	29,58%	14	50,00%	24	36,92%	49	^{*h} 45,37%

* – p<0,05, h –vs HTG

 χ^2 test

Zastupljenost genotipova koji sadrže alel A u kontrolnoj grupi bila je statistički značajno veća no u POAG- HTG grupi, dok je zastupljenost A alela u PEXG bila veća u odnosu na zastupljenost u POAG- HTG grupi, ali samo blizu nivou statističke značajnosti (p=0,0568) (tabela 48).

Tabela 49. Zastupljenost alela C i A u ukupnom broju alela na genu -863 za TNF- α kod

ispitanika sa POAG- HTG, PEXG, senilnom kataraktom i u kontrolnoj grupi.

Alel	HTG (n=142)		PEXG (n=56)		CAT (n=130)		Kontrola (n=216)	
C	117	82,39%	41	73,21%	103	79,23%	161	74,54%
A	25	17,61%	15	26,79%	27	20,77%	55	25,46%

 χ^2 test

Nema statistički značajne razlike u zastupljenosti alela između ispitivanih grupa iako je procentualno gledano najveća zastupljenost A alela bila u PEXG, a vrlo slična u kontrolnoj grupi, dok je A alel bio najmanje zastupljen kod POAG- HTG (tabela 49).

5.3.2.1. Polimorfizam na genu -863 za TNF- α i klinički parametri

Vidna oštrina ispitanika obolelih od POAG- HTG i ispitanika sa staračkom kataraktom veća je u CC i CA genotipovima, ali ne i statistički značajno u odnosu na AA genotip. Generalno, ni kod POAG- HTG, ni kod PEXG, ni senilne katarakte nema statistički značajnih razlika vrednosti V između različitih genotipova na genu TNF- α (-863) (tabela 50).

Tabela 50. Vidna oštrina (V) ispitanika u odnosu na genotip na genu za TNF- α (-863).

X \pm SD (Me) Min–Max			
HTG	CC (n=100)	CA (n=34)	AA (n=8)
V	0,62 \pm 0,40 (0,75) 0,00–1,00	0,62 \pm 0,38 (0,70) 0,00–1,00	0,51 \pm 0,46 (0,50) 0,02–1,00
PEXG	CC (n=28)	CA (n=26)	AA (n=2)
V	0,31 \pm 0,32 (0,20) 0,00–1,00	0,32 \pm 0,34 (0,20) 0,00–1,00	0,35 \pm 0,49 (0,35) 0,00–0,70
CAT	CC (n=82)	CA (n=42)	AA (n=6)
V	0,33 \pm 0,36 (0,15) 0,00–1,00	0,35 \pm 0,38 (0,20) 0,00–1,00	0,16 \pm 0,28 (0,02) 0,00–0,70

Kruskal-Wallis i Mann-Whitney test

Kruskal-Wallis testom je utvrđena statistički značajna zavisnost vrednosti IOP od genotipa na genu -863 za TNF- α ($p < 0,05$). Poređenjem vrednosti ovog parametra između grupa ponaosob, Mann-Whitney testom, kod ispitanika sa POAG- HTG utvrđeno je da je vrednost IOP ispitanika sa CA genotipom statistički značajno manja u odnosu na vrednost kod ostala dva genotipa ponaosob ($p < 0,05$) (tabela 51).

Tabela 51. Intraokularni pritisak (IOP) ispitanika u odnosu na genotip na genu za TNF- α (-863).

X \pm SD (Me) Min–Max			
HTG	CC (n=100)	CA (n=34)	AA (n=8)
IOP (mmHg)	22,44\pm 7,45^{b*} (21,00) 12,00–48,00	20,53 \pm 8,13 (18,00) 10,00–46,00	26,75\pm 7,46^{b*} (24,50) 18,00–38,00
PEXG	CC (n=28)	CA (n=26)	AA (n=2)
IOP (mmHg)	23,54 \pm 10,96 (21,00) 10,00–58,00	23,85 \pm 14,69 (20,00) 10,00–76,00	37,00 \pm 7,07 (37,00) 32,00–42,00
CAT	CC (n=82)	CA (n=42)	AA (n=6)
IOP (mmHg)	14,56 \pm 2,33 (14,00) 10,00–20,00	15,02 \pm 2,30 (16,00) 10,00–18,00	13,83 \pm 3,37 (14,00) 8,00–17,00

b – vs CA, * – $p < 0,05$

Kruskal-Wallis i Mann-Whitney test

5.3.2.2. Polimorfizam na genu -863 za TNF- α i biohemijski parametri

Mann-Whitney testom nisu utvrđene statistički značajne razlike u serumskoj koncentraciji TNF- α između genotipova u okviru POAG- HTG i PEXG, kao i senilne katarakte. Utvrđeno je da su vrednosti serumske koncentracije TNF- α bile najmanje kod CC genotipa u grupi POAG- HTG, a najveće kod AA genotipa, dok je u grupi PEXG i kod senilne katarakte situacija suprotna (tabela 52).

Tabela 52. Koncentracija TNF- α u ispitivanim grupama
u odnosu na genotip na genu -863 za TNF- α .

X \pm SD (Me) Min–Max					
HTG	CC (n=21)		CA (n=7)		AA (n=3)
TNF- α (pg/ml)	1,95 \pm 1,56	(1,82)	2,43 \pm 2,38	(1,82)	3,51 \pm 4,31 (1,82)
	0,00–7,40		0,00–7,40		0,30–8,41
PEXG	CC (n=11)		CA (n=10)		AA(n=1)
TNF- α (pg/ml)	2,30 \pm 1,95	(2,59)	2,03 \pm 0,83	(1,83)	/
	0,00–6,64		1,06–3,09		
CAT	CC (n=14)		CA (n=7)		AA(n=2)
TNF- α (pg/ml)	1,80 \pm 2,58	(1,19)	1,02 \pm 1,06	(0,56)	0,28 \pm 0,40 (0,28)
	0,00–10,19		0,00–2,83		0,00–0,56

Kruskal-Wallis i Mann-Whitney test

5.4. Procena uticaja TNF- α , HSP 70, Fas i FasL na vrednosti parametara IOP, C/D, MD, RNFL Avg, RNFL Sup i RNFL Inf kod pacijenata sa POAG- HTG

Univarijantna linearna regresiona analiza nije utvrdila nijedan faktor koji statistički značajno utiče na vrednost IOP ni kod ispitanika obolelih od POAG- HTG, ni od PEXG (tabela 53).

Tabela 53. Procena uticaja faktora od interesa na vrednost IOP (mmHg), rezultati univarijantne linearne regresione analize za pacijente sa POAG- HTG i PEXG.

Faktor	HTG					PEXG				
	t	p	B	95% IP za B		t	p	B	95% IP za B	
TNF- α (pg/ml)	1,05	0,2971	0,52	-0,47	1,50	0,15	0,8846	0,17	-2,15	2,49
HSP 70 (ng/ml)	0,50	0,6161	0,30	-0,87	1,47	0,07	0,9446	0,12	-3,28	3,52
Fas (pg/ml)	-0,03	0,9752	0,00	-0,01	0,01	-0,58	0,5654	-0,01	-0,03	0,01
FasL (pg/ml)	0,98	0,3291	1,86	-1,92	5,65	-0,93	0,3572	-2,47	-7,81	2,87

Univarijantna linearna regresiona analiza nije utvrdila nijedan faktor koji statistički značajno utiče na vrednost C/D ni kod ispitanika obolelih od POAG- HTG, ni od PEXG (tabela 54).

Tabela 54. Procena uticaja faktora od interesa na vrednost C/D, rezultati univarijantne linearne regresione analize za pacijente sa POAG- HTG i PEXG.

Faktor	HTG					PEXG				
	t	p	B	95% IP za B		t	p	B	95% IP za B	
TNF- α (pg/ml)	0,19	0,8538	0,00	-0,02	0,03	-0,71	0,4895	-0,03	-0,11	0,06
HSP 70 (ng/ml)	-0,99	0,3255	-0,01	-0,04	0,01	0,51	0,6166	0,03	-0,10	0,16
Fas (pg/ml)	0,69	0,4936	0,00	0,00	0,00	-0,74	0,4712	0,00	0,00	0,00
FasL (pg/ml)	0,97	0,3381	0,04	-0,04	0,13	-0,23	0,8186	-0,02	-0,16	0,13

Univarijantna linearna regresiona analiza je, kao jedini faktor koji statistički značajno utiče na MD kod pacijenata obolelih od POAG- HTG, potvrdila HSP 70 (tabela 55).

Povećanje HSP 70 za jednu mernu jedinicu uzrokuje kod pacijenata obolelih od POAG- HTG značajan pad vrednosti MD za 1,37 uz interval poverenja 0,01 – 2,73 (tabela 55).

Tabela 55. Procena uticaja faktora od interesa na vrednost MD (dB), rezultati univarijantne linearne regresione analize za pacijente sa POAG- HTG i PEXG.

Faktor	HTG					PEXG				
	t	p	B	95% IP za B		t	p	B	95% IP za B	
TNF- α (pg/ml)	0,26	0,7973	0,32	-2,20	2,85	1,06	0,3132	2,30	-2,49	7,09
HSP 70 (ng/ml)	-2,02	0,0490	* -1,37	-2,73	-0,01	-1,17	0,2678	-5,29	-15,27	4,69
Fas (pg/ml)	1,36	0,1807	0,01	0,00	0,03	-1,38	0,1946	-0,05	-0,13	0,03
FasL (pg/ml)	-1,38	0,1730	-3,14	-7,71	1,43	-0,89	0,3923	-4,48	-15,55	6,59

* – $p < 0,05$

Univarijantna linearna regresiona analiza je, kao jedini faktor koji statistički značajno utiče na RNFL Avg kod pacijenata obolelih od POAG- HTG, potvrdila HSP 70.

Povećanje HSP 70 za jednu mernu jedinicu kod pacijenata obolelih od POAG- HTG uzrokuje značajan pad vrednosti RNFL Avg za 4,78 uz interval poverenja 0,11 – 9,45 (tabela 56).

Tabela 56. Procena uticaja faktora od interesa na vrednost RNFL Avg (μm), rezultati univarijantne linearne regresione analize za pacijente sa POAG- HTG i PEXG.

Faktor	HTG					PEXG				
	t	p	B	95% IP za B		t	p	B	95% IP za B	
TNF- α (pg/ml)	-1,16	0,2535	-3,51	-9,64	2,63	-1,16	0,2535	-3,51	-9,64	2,63
HSP 70 (ng/ml)	-2,07	0,0450	* -4,78	-9,45	-0,11	-2,07	0,0450	-4,78	-9,45	-0,11
Fas (pg/ml)	-1,24	0,2249	-0,03	-0,07	0,02	-1,24	0,2249	-0,03	-0,07	0,02
FasL (pg/ml)	-0,73	0,4697	-5,23	-19,77	9,30	-0,73	0,4697	-5,23	-19,77	9,30

* – $p < 0,05$

Univarijantna linearna regresiona analiza je, kao jedini faktor koji statistički značajno utiče na RNFL Sup kod pacijenata obolelih od POAG- HTG, potvrdila HSP 70, a kod pacijenata obolelih od PEXG potvrdila je FasL (tabela 57).

Tabela 57. Procena uticaja faktora od interesa na vrednost RNFL Sup (μm), rezultati univarijantne linearne regresione analize za pacijente sa POAG- HTG i PEXG.

Faktor	HTG					PEXG				
	t	p	B	95% IP za B		t	p	B	95% IP za B	
TNF- α (pg/ml)	-0,91	0,3672	-3,26	-10,50	3,98	0,57	0,5801	5,84	-17,19	28,88
HSP 70 (ng/ml)	-2,13	0,0396	*-5,74	-11,20	-0,29	-0,14	0,8932	-2,90	-50,36	44,56
Fas (pg/ml)	-0,65	0,5209	-0,02	-0,07	0,04	-1,11	0,2967	-0,20	-0,62	0,21
FasL (pg/ml)	-0,67	0,5100	-5,86	-23,74	12,02	-2,29	0,0479	*-48,47	-96,39	-0,55

* – $p < 0,05$

Povećanje HSP 70 za jednu mernu jedinicu uzrokuje kod pacijenata obolelih od POAG- HTG značajan pad vrednosti RNFL Sup od 5,74 uz interval poverenja 0,29 – 11,20.

Porast FasL u grupi pacijenata obolelih od PEXG za mernu jedinicu dovodi do pada RNFL Sup za 48,47 uz interval poverenja 0,55 – 96,39.

Univarijantna linearne regresione analiza je, kao jedini faktor koji statistički značajno utiče na RNFL Inf kod pacijenata obolelih od POAG- HTG, potvrdila HSP 70. Porast HSP 70 za jednu mernu jedinicu kod pacijenata obolelih od POAG- HTG uzrokuje značajan pad vrednosti RNFL Inf od 7,62 uz interval poverenja 0,89 – 14,36 (tabela 58).

Tabela 58. Procena uticaja faktora od interesa na vrednost RNFL Inf (μm), rezultati univarijantne linearne regresione analize za pacijente sa POAG- HTG i PEXG.

Faktor	HTG					PEXG				
	t	p	B	95% IP za B		t	p	B	95% IP za B	
TNF- α (pg/ml)	-1,42	0,1661	-6,13	-14,94	2,67	1,95	0,0834	13,31	-2,16	28,78
HSP 70 (ng/ml)	-2,29	0,0276	*-7,62	-14,36	-0,89	-0,52	0,6174	-8,42	-45,23	28,39
Fas (pg/ml)	-1,55	0,1297	-0,05	-0,12	0,02	-2,03	0,0732	-0,26	-0,55	0,03
FasL (pg/ml)	-0,70	0,4885	-7,70	-30,04	14,63	-0,75	0,4719	-15,26	-61,23	30,71

* – $p < 0,05$

Generalno se može reći da u grupi pacijenata sa POAG- HTG jedini faktor od interesa je HSP 70, koji svojim porastom utiče na pad vrednosti parametara MD, RNFL Avg, RNFL Sup i RNFL Inf.

5.5. Procena uticaja polimorfizma gena -308 za TNF- α : GG, GA, AA na vrednosti parametara IOP, C/D, MD, RNFL Avg, RNFL Sup i RNFL Inf kod pacijenata sa POAG- HTG

Univarijantna linearna regresiona analiza nije utvrdila nijedan genotip za polimorfizam gena TNF- α (-308) koji statistički značajno utiče na vrednosti ispitivanih parametara kod ispitanika obolelih od POAG-HTG (tabela 59- 64).

Tabela 59. Procena uticaja polimorfizma gena -308 za TNF- α na vrednost IOP (mmHg), rezultati univarijantne linearne regresione analize za pacijente sa POAG- HTG .

Faktor	HTG				
	t	p	B	95% IP za B	
GG	1,61	0,1087	2,68	-0,60	5,96
GA	-1,61	0,1087	-2,68	-5,96	0,60
AA					

Tabela 60. Procena uticaja polimorfizma gena -308 za TNF- α na vrednost C/D, rezultati univarijantne linearne regresione analize za pacijente sa POAG- HTG.

Faktor	HTG				
	t	p	B	95% IP za B	
GG	1,59	0,1132	0,08	-0,02	0,18
GA	-1,59	0,1132	-0,08	-0,18	0,02
AA					

Tabela 61. Procena uticaja polimorfizma gena -308 za TNF- α na vrednost MD (dB), rezultati univarijantne linearne regresione analize za pacijente sa POAG- HTG.

Faktor	HTG				
	t	p	B	95% IP za B	
GG	-1,30	0,1957	-3,86	-9,74	2,02
GA	1,30	0,1957	3,86	-2,02	9,74
AA					

Tabela 62. Procena uticaja polimorfizma gena -308 za TNF- α na vrednost RNFL Avg (μ m), rezultati univarijantne linearne regresione analize za pacijente sa POAG- HTG.

Faktor	HTG				
	t	p	B	95% IP za B	
GG	-0,37	0,7106	-3,25	-20,58	14,08
GA	0,37	0,7106	3,25	-14,08	20,58
AA					

Tabela 63. Procena uticaja polimorfizma gena -308 za TNF- α na vrednost RNFL Sup (μm), rezultati univarijantne linearne regresione analize za pacijente sa POAG- HTG.

Faktor	HTG				
	t	p	B	95% IP za B	
GG	0,38	0,7065	5,30	-22,59	33,19
GA	-0,38	0,7065	-5,30	-33,19	22,59
AA					

Tabela 64. Procena uticaja polimorfizma gena -308 za TNF- α na vrednost RNFL Inf (μm), rezultati univarijantne linearne regresione analize za pacijente sa POAG- HTG.

Faktor	HTG				
	t	p	B	95% IP za B	
GG	-0,28	0,7784	-4,30	-34,62	26,01
GA	0,28	0,7784	4,30	-26,01	34,62
AA					

5.6. Procena uticaja polimorfizma gena -863 za TNF- α : CC, CA, AA na vrednosti parametara IOP, C/D, MD, RNFL Avg, RNFL Sup i RNFL Inf kod pacijenata sa POAG- HTG

Univarijantna linearna regresiona analiza nije utvrdila nijedan genotip za polimorfizam gena za TNF- α (-863) koji statistički značajno utiče na vrednosti ispitivanih parametara kod ispitanika obolelih od POAG- HTG. Blizu granice statističke značajnosti je uticaj AA genotipa koji smanjuje vrednosti MD za 7,22; odnosno vrednosti C/D za 0,14 (tabela 65- 70).

Tabela 65. Procena uticaja polimorfizma gena -863 za TNF- α na vrednost IOP (mmHg), rezultati univarijantne linearne regresione analize za pacijente sa POAG- HTG.

Faktor	HTG				
	t	p	B	95% IP za B	
CC	0,51	0,6093	0,73	-2,08	3,53
CA	-1,48	0,1407	-2,23	-5,21	0,75
AA	1,73	0,0865	4,79	-0,70	10,29

Tabela 66. Procena uticaja polimorfizma gena -863 za TNF- α na vrednost C/D, rezultati univarijantne linearne regresione analize za pacijente sa POAG- HTG.

Faktor	HTG				
	t	p	B	95% IP za B	
CC	1,01	0,3133	0,04	-0,04	0,12
CA	-0,02	0,9814	0,00	-0,09	0,09
AA	-1,85	0,0669	-0,14	-0,28	0,01

Tabela 67. Procena uticaja polimorfizma gena -863 za TNF- α na vrednost MD (dB), rezultati univarijantne linearne regresione analize za pacijente sa POAG- HTG.

Faktor	HTG				
	t	p	B	95% IP za B	
CC	-0,02	0,9867	-0,03	-4,07	4,00
CA	1,05	0,2983	2,29	-2,06	6,64
AA	-1,86	0,0658	-7,22	-14,93	0,48

Tabela 68. Procena uticaja polimorfizma gena -863 za TNF- α na vrednost RNFL Avg (μm), rezultati univarijantne linearne regresione analize za pacijente sa POAG- HTG.

Faktor	HTG				
	t	p	B	95% IP za B	
CC	-1,01	0,3152	-6,07	-18,01	5,87
CA	1,61	0,1105	10,59	-2,46	23,64
AA	-0,83	0,4067	-9,52	-32,20	13,16

Tabela 69. Procena uticaja polimorfizma gena -863 za TNF- α na vrednost RNFL Sup (μm), rezultati univarijantne linearne regresione analize za pacijente sa POAG- HTG.

Faktor	HTG				
	t	p	B	95% IP za B	
CC	-0,33	0,7390	-3,04	-21,12	15,04
CA	1,03	0,3083	10,31	-9,69	30,31
AA	-1,06	0,2944	-17,19	-49,58	15,21

Tabela 70. Procena uticaja polimorfizma gena -863 za TNF- α na vrednost RNFL Inf (μm), rezultati univarijantne linearne regresione analize za pacijente sa POAG- HTG.

Faktor	HTG				
	t	p	B	95% IP za B	
CC	-0,67	0,5024	-6,64	-26,24	12,96
CA	1,48	0,1422	16,08	-5,51	37,67
AA	-1,17	0,2462	-20,64	-55,78	14,51

6. DISKUSIJA

6.1. Klinička ispitivanja

Rezultati našeg istraživanja ukazali su da nisu utvrđene statistički značajne razlike između grupe pacijenata obolelih od primarnog glaukoma otvorenog ugla sa povišenim očnim pritiskom (POAG- HTG) i pseudoeksfolijativnog glaukoma (PEXG) poređenjem vrednosti RNFL Avg, RNFL Sup i RNFL Inf.

U celom ispitivanom uzorku, i u obe grupe glaukoma, POAG- HTG i PEXG, skoro polovina od ukupnog broja očiju imala je normalnu vrednost parametra RNFL Avg. Broj očiju sa normalnim vrednostima RNFL Avg u celom uzorku i POAG- HTG je dominantno veći u odnosu na broj očiju sa drugim navedenim vrednostima ovog parametra ($p < 0,001$). Nema statistički značajnih razlika između POAG- HTG i PEXG u raspodeli očiju u odnosu na vrednosti RNFL Avg.

Suprotno tome, u celom ispitivanom uzorku, kao i u grupi POAG- HTG i PEXG, veći je broj očiju čiji je parametar RNFL Sup vrednosti koje su karakteristika glaukoma, a ne normalnog nalaza. Nema statistički značajnih razlika između POAG- HTG i PEXG u raspodeli očiju u odnosu na vrednosti RNFL Sup. To nam ukazuje da je parametar RNFL Sup specifičniji za određivanje glaukomnih oštećenja (46, 47).

Takođe, u celom ispitivanom uzorku, i u obe grupe glaukoma ponaosob, bio je veći broj očiju čiji je parametar RNFL Inf vrednosti koje su karakteristika glaukoma, a ne normalnog nalaza. Nešto je veći broj očiju sa nalazom RNFL Inf $< 103.90 \mu\text{m}$ kod pacijenata obolelih od PEXG, ali bez statistički značajne razlike u odnosu na grupu POAG- HTG. Parametar RNFL Inf je specifičniji za određivanje glaukomnih oštećenja (42, 46–48).

6.2. Koncentracija TNF- α

Citokini su polipeptidi niske molekularne težine uključeni u komunikaciju između ćelija (211). Abnormalna proizvodnja nekih citokina, kao što su faktor nekroze tumora- α (TNF- α), interleukin- 1β (IL- 1β), rastvorljivi IL- 2 receptor (sIL-2R), IL- 6 i hemokin IL- 8 je ključna za patogenezu različitih zapaljenskih i autoimunih bolesti (211, 212). Mnoge “in vivo” studije su pokazale da su TNF- α , IL-1, IL-6 i IL-8 važne komponente u pro- za-

paljenskom odgovoru i intraokularnoj inflamaciji (212). Oksidativni stres je povezan sa mnogim sistemskim inflamatornim oboljenjima, proizvodnjom slobodnih radikala i lipidnom peroksidacijom (213).

TNF- α je proinflamatorni citokin. Novija naučna istraživanja pokazala su da ishemija ili povišen pritisak na glijalne ćelije stimuliše produkciju TNF- α . To izaziva smrt oligodendrocita i naknadnu apoptozu ganglijskih ćelija retine (121, 214). Pored azot oksida i ekscitotoksičnosti, TNF- α ima neurotoksični efekat i funkcioniše kao aktivator. Povećan nivo TNF- α je povezan sa lošom prognozom posle trauma u mozgu (215–217), dok smanjenje TNF- α može da smanji oštećenje nerava (218).

Koncentracije TNF- α u plazmi, cerebrospinalnoj tečnosti i moždanom tkivu su povišene kod nekih poremećaja CNS-a, uključujući Alzheimer-ovu bolest, multiplu sklerozu, Parkinsonovu bolest i ishemijske poremećaje u mozgu (219). Prethodne studije su pokazale povezanost nekih okularnih oboljenja i povećanog nivoa TNF- α . Pacijenti sa dijabetičnom retinopatijom imaju povišene serumske nivoe TNF- α , što može imati prediktivnu vrednost za razvoj retinopatije kod bolesnika sa šećernom bolesti (220, 221).

Doganay i saradnici (221) su detektovali serumski TNF- α u 46 od 53 pacijenta sa diabetes mellitus-om, u rasponu od 4,0 do 26,4 pg/ml, a najviše vrednosti su nađene kod pacijenata sa proliferativnom diabetesnom retinopatijom (DR). Pacijenti sa proliferativnom diabetesnom retinopatijom su imali znatno viši nivo serumskog TNF- α ($15,0 \pm 0,8$ pg/ml) u odnosu na pacijente sa neproliferativnom DR, bez DR i kontrole ($7,3 \pm 0,5$ pg/ml).

Sugita i saradnici (199, 222) su detektovali znatno povišene nivoe TNF- α i TNF- α receptora u očnoj vodici i staklastom telu pacijenata sa aktivnim uveitom ($19,6 \pm 8,5$ pg/mL u očnoj vodici; $29,8 \pm 9,9$ pg/mL u staklastom telu) u poređenju sa pacijentima sa senilnom kataraktom ($6,8 \pm 6,7$ pg/mL u očnoj vodici; $9,7 \pm 6,7$ pg/mL u staklastom telu).

Mnoge studije su detaljno proučavale odnos između glaukomatozne optičke neuropatije i TNF- α . Na životinjskim modelima sa visokim intraokularnim pritiskom, povećanje koncentracije TNF- α dovelo je do gubitka RGC i oligodendrocita. Pored toga, ovi gubici ćelija su se dešavali i ukoliko je davan TNF- α , bez povišenog intraokularnog pritiska (223). TNF- α ima negativan uticaj na oligodendrocite, što povećava osetljivost aksona na ekscitotoksičnost u glavi vidnog živca i dovodi do smrti RGC (224, 225).

Kada su glijalne ćelije izložene takvim stresorima, kao što su visok pritisak ili ishemija, povećava se izlučivanje TNF- α , što rezultira apoptozom. Ova apoptoza može da se spreči davanjem neutrališućih anti-TNF- α antitela (121). Ovi eksperimenti su potkrepljeni re-

zultatima imunohistohemijskih ispitivanja na humanim uzorcima koja su sproveli Yan i saradnici (226), kao i Tezel sa saradnicima (64), a odnose se na povećan nivo ekspresije TNF- α i njegovog receptora TNF-RI u unutrašnjem sloju retine glaukomatoznih očiju u odnosu na kontrole. Slične podatke objavili su Juan i Neufeld (227).

Povećana ekspresija TNF- α u glaukomatoznim očima sugerise da je ovaj citokin usko povezan sa procesom neurodegeneracije. Razumevanje ovog procesa može doprineti razvoju novih terapijskih strategija.

Chen i saradnici koristili su ELISA test za određivanje koncentracije IL-6, IL-2 i TNF- α u očnoj vodici i serumu pacijenata sa sekundarnim, neovaskularnim glaukomom nakon okluzije centralne retinalne vene u odnosu na zdrave kontrole sa senilnom kataraktom i došli su do saznanja da se nivoi IL-6, IL-2 i TNF- α u serumu ne razlikuju među grupama (228).

Evereklioglu i saradnici su pokazali da su najveće TNF- α koncentracije u bolesnika sa aktivnom formom Behcetovog sindroma, srednje vrednosti $7,9 \pm 0,5$ pg/ml, što je znatno više nego u bolesnika sa neaktivnom formom ($5,1 \pm 0,2$ pg/ml, $p < 0,001$) ili zdravih ispitanika ($4,7 \pm 0,1$ pg/ml, $p < 0,001$) (229).

Takođe je Gustavsson sa saradnicima proučavao profil citokina kod pacijenata sa dijabetičnom retinopatijom. TNF- α je otkriven u svim uzorcima staklastog tela i serumu pacijenata, i sa proliferativnom i sa neproliferativnom dijabetičnom retinopatijom, kao i u 24 kontrole (88,8%). Pri tome, koncentracije TNF- α u staklastom telu su bile niže u dijabetičara nego kod onih bez šećerne bolesti (srednja vrednost: 18,0 pg/ml (8,0–46,0); 22 pg/ml (13–47), $p=0,034$). U serumu je bilo obrnuto, vrednosti TNF- α su bile veće u serumu dijabetičara, a manje kod onih koji nisu dijabetičari (9,0 pg/ml (5,0–53,0); 6,7 pg/ml (3,0–11,0), $p<0,001$), što je u skladu sa podacima iz studije Doganaya i saradnika (221). Nivo TNF- α u vitreusu nije zavisio od sistemskog stanja i lekova, dok je postojala pozitivna veza između nivoa serumskog TNF- α i BMI (body mass index). Što se tiče nivoa TNF- α u očnoj vodici, nije postojala razlika među grupama (230).

Gustavsson i saradnici su proučavajući serumski nivo TNF- α kod 128 pacijenata sa diabetes mellitus-om tip I, pronašli znatno viši nivo ovog citokina kod pacijenata sa proliferativnom DR (n=62; 7,0 pg/ml (4–7 pg/ml)) nego kod pacijenata sa neproliferativnom DR (n=66; 6,0 pg/ml (4–25 pg/ml); $p=0,009$) (230).

Do danas, povezanost sistemskog TNF- α i glaukoma je malo proučavana. Rezultati Kanga i saradnika (231) su u skladu sa onima iz studije preseka Huanga i saradnika (88), koji

su proučavali 32 pacijenta sa POAG. Uočene su značajno više koncentracije TNF- α kod pacijenata sa uznapredovalom neuropatijom (MD > 12 dB) u poređenju sa kontrolama (p=0,0464) i pacijentima sa umerenom neuropatijom (MD \leq 12 dB) (p=0,0328) (88).

Druga studija preseka nije pokazala nikakve razlike u koncentraciji TNF- α u plazmi pacijenata sa glaukomom i kataraktom, mada su nivoi TNF- α u očnoj vodici veći kod pacijenata sa glaukomom (232). Ovo nam sugeriše da efekti sistemskog nivoa TNF- α mogu biti drugačiji od efekta lokalnog nivoa TNF- α u očnoj vodici (139, 214).

Naše istraživanje je pokazalo da je koncentracija TNF- α u serumu znatno viša kod pacijenata obolelih od glaukoma u odnosu na ispitanike sa staračkom kataraktom u kontrolnoj grupi. Najviša serumska koncentracija TNF- α bila je kod pacijenata obolelih od pseudoeksfolijativnog glaukoma (2,05 \pm 1,48 pg/ml), niža kod obolelih od primarnog glaukoma otvorenog ugla sa povišenim IOP, tačnije 2,04 \pm 1,98 pg/ml, a najniža kod ispitanika sa senilnom kataraktom (1,43 \pm 2,0 pg/ml).

Istraživanje koje smo sprovedeli pokazalo je postojanje statistički značajne razlike u serumskoj koncentraciji TNF- α između grupe POAG- HTG i PEXG u odnosu na grupu ispitanika sa senilnom kataraktom (p<0,05). Istraživanje je rađeno na većem broju ispitanika u sve tri grupe nego ostala objavljena ispitivanja (88, 221, 230, 231). Naši rezultati su u skladu sa rezultatima Kanga i saradnika (231); kao i rezultatima Huanga i saradnika (88). Ovo nas navodi na zaključak da je serumski TNF- α moćan citokin sa značajnom ulogom u patogenezi glaukoma i glaukomnoj neuropatiji.

Našim istraživanjem nije utvrđena statistički značajna korelacija koncentracije TNF- α u serumu ni sa jednim ispitivanim kliničkim parametrom koji bi odredio stepen razvoja i oštećenja u glaukomu, kao što su vidna oština, visina IOP, MD, PSD, CPSD, RNFL Avg, RNFL Sup, RNFL Inf. To je delimično u suprotnosti sa rezultatima Huanga i saradnika. (88).

Kang i saradnici su pokazali da je koncentracija serumskog TNF- α viša kod žena u odnosu na muškarce (231), što mi nismo dokazali.

6.3. Polimorfizam gena za TNF- α

6.3.1. Polimorfizam gena za TNF- α -308

Smatra se da je genetika POAG jako složena. Do sada je identifikovano najmanje 33 genskih lokusa povezanih sa patogenezi POAG; 14 lokusa je označeno sa GLC1A do GLC1N, a samo tri glavna gena je identifikovano na ovim lokusima: miocilin (MIOC),

optineurin (OPTN) i WD repite domen 36 (WDR36). Mutacije u ovim genima se javljaju samo kod 10% pacijenata sa POAG. Više od 20 drugih gena je povezano sa POAG, ali je većina proučavana samo u pojedinačnim studijama, a samo nekoliko njih u više različitih studija. Smatra se i da je gen za TNF povezan sa apoptozom. Rezultati ovakvih istraživanja su dosta konfliktni, verovatno zbog malog proučavanog uzorka ili etničke različitosti. Tako je dalje ispitivanje ovih gena poželjno i potrebno na većem broju ispitanika i u različitim populacijama (68–70, 233–239).

Dokazano je da u krvnim sudovima glave vidnog živca, kao i u njemu samom, postoji ushodna regulacija TNF i TNF-RI. Naučnici veruju da TNF doprinosi progresiji degeneracije vidnog živca u glaukomu direktnim efektom na aksone RGC i indukcijom NOS-2 (nitric oxide synthase 2) u astrocitima (240).

Pored toga, dokazano je da glijalne ćelije proizvode TNF- α ukoliko se izlože stresu. Kao i da je moguće zaustaviti apoptozu uz pomoć antitela protiv TNF- α (121).

Ekspresija ovih proteina može imati ulogu u progresiji glaukomatozne optičke neuropatije (226).

Veza između TNF- α i POAG je prvi put otkrivena među kineskim stanovništvom. Učestalost alela A promotora SNP rs1800629 (-308 G→A) bila je veća kod pacijenata sa POAG nego u kontrolnoj grupi (42,5% nasuprot 21,4%, OR= 2,72; 95% CI; 1,66–4,45). Takođe je učestalost homozigota AA bila znatno veća kod POAG (133).

Alel A -308 u promotoru TNF utiče na vezivanje faktora transkripcije i time raste transkripcija, što može dodatno da izmeni proizvodnju TNF, imuni odgovor i podložnost određenim autoimunim, infektivnim i malignim bolestima. Osim toga, -308 alel A može da spreči represore transkripcije. Polimorfizam u promotoru gena za TNF može biti i tih i ispoljiti efekat samo kada postoji veza sa HLA alelima. Prisustvo polimorfizma G u A na poziciji -308 TNF promotor gena može povećati transkripciju šest do sedam puta (129, 241, 242).

Veza polimorfizma -308 TNF i POAG je potvrđena i među iranskim stanovništvom, ali sa većom frekvencijom alela A na rs1800629 kod pacijenata sa POAG nego u kontrolnih subjekata (9,3% vs 2,5%; OR= 3,99; 95% CI; 1,71–9,33). Međutim, frekvencija alela A u zdravoj i bolesnoj iranskoj populaciji bila je mnogo niža od one među Kinezima. Ispitivanje među japanskim stanovništvom otkriva da ne postoji značajna povezanost između tri promotorna SNP (-308 G/A, -857 C/T i -863 C/A) TNF i POAG, iako postoji pozitivna interakcija između TNF i OPTN (131, 136).

Studija u populaciji belaca iz južne Austrije nije pokazala značajnu povezanost između dva promotora SNP (-308 G/A i -238 G/A) TNF i POAG(135).

Fan i saradnici su pokazali da je frekvencija alela A u kontrolnoj grupi (9,7%) slična onoj u podacima iz studije HapMap Chinese (3,3%), ali je bila mnogo niža od prve prijavljene u kineskoj studiji (21,4%). Učestalost alela G na rs1800629 je bila veća kod pacijenata sa HTG nego u kontrolnoj grupi (94,6% vs. 90,3%; OR= 1,89; 95% CI; 1,14–3,13). Ovim ispitivanjem, Fan i saradnici su potvrdili da alel A na rs1800629 ima zaštitnu ulogu u patogenezi POAG, dok je alel G faktor rizika (137).

Slične zaštitne efekte alela A srećemo i u drugim bolestima, i u specifičnim etničkim grupama, kao što su PEX glaukom u Turaka i ishemijski moždani udar kod Azijata. Ipak, ostaje nerazjašnjeno kako to G alel može da bude faktor rizika i kako on to utiče na razvoj POAG, kad je u studiji lipopolisaharidne stimulacije ćelija krvne kulture pokazano da je alel A na rs1800629 povezan sa povećanom proizvodnjom TNF. Međutim, istraživači u drugoj studiji nisu mogli da ponove ove efekte alela A na produkciju TNF (243, 244).

Rezultati studije koju je sproveo Razeghinejad i saradnici su pokazali da nasleđena povećana produkcija TNF- α (-308) A alela je možda faktor rizika za razvoj glaukoma otvorenog ugla (131).

Najnovija istraživanja koja su sproveli Chakraborty i saradnici u 2013. godini (74), proučavajući SNP za dva promotora TNF- α (-308 G/A i -238 G/A) i određujući genotip za 570 POAG pacijenata i kontrola, nisu pokazala povezanost TNF polimorfizma i POAG među istočno indijskim stanovništvom (74). Dokazali su da ne postoji statistički značajna povezanost niti alela, niti genotipova sa POAG ($p > 0,05$). Nije pronađena značajna povezanost čak i nakon podele pacijenata u grupe prema visini intraokularnog pritiska ($IOP \geq 21$ mmHg ili < 21 mmHg) sa tri različita haplotipa.

Nedavna meta-analiza od 7 različitih izveštaja iz različitih populacija nije identifikovala nikakvu asocijaciju SNP -308 G/A sa POAG (245).

Zanimljivo je da pacijenti sa POAG imaju viši nivo TNF- α u očnoj vodici, ali ostaje pitanje da li je to uzrok ili epifenomen (139).

Xin i saradnici (246) su uradili meta analizu u 2013. godini svih objavljenih studija koje su proučavale povezanost polimorfizma TNF- α i POAG. Došli su do saznanja da ne postoji značajna povezanost između TNF- α (-308) G/A polimorfizma i rizika za OAG (A naspram G: OR= 1,379, 95% CI= 0,877–2,170; AA/AG vs. GG: OR= 1,421, 95% CI =0,907–2,226). Međutim, kada je urađena analiza po vrstama OAG uočena je značajna povezanost iz-

među TNF- α (-308) G/A polimorfizma i rizika za HTG (A vs. G: OR= 1,660, 95% CI= 1,033–2,667; AA/AG vs. GG: OR= 1,713, 95% CI= 1,10–2,651), ali ta povezanost nije nađena kod NTG (A vs. G: OR= 1,005, 95% CI= 0,321–3,140; AA/AG vs. GG: OR= 1,005, 95% CI= 0,319–3,165) ili PEXG (A vs. G: OR= 1,181, 95% CI= 0,373–3,732; AA/AG vs. GG: OR= 1,130, 95% CI= 0,346–3,689). Osim toga, analiza pojedinačnih etničkih grupa pokazala je da značajna povezanost postoji kod Azijata (A vs. G: OR= 1,947, 95% CI= 1,097–3,456; AA/AG protiv GG: OR= 1,949, 95% CI= 1,140–3,332).

Sakupljeni rezultati o udruženosti polimorfizma TNF- α (-238 G/A, -863 C/A, i -857 C/T) i rizika za OAG su pokazali da nijedan od ovih genskih polimorfizama nije značajno povezan sa rizicima za OAG (za -857 C/T, T vs. C, OR= 1,055, 95% CI= 0,931–1,216; TT/CT vs. CC, OR= 0,984, 95% CI= 0,794–1,219, za -863 C/A, A vs. C, OR= 0,928, 95% CI= 0,636–1,353; AA/AC vs. CC, OR= 0,871, 95% CI= 0,618–1,227, za -238 G/A, OR= 1,088, 95% CI= 0,691–1,941; AA/AG vs. GG, OR= 1,076, 95% CI= 0,681–1,701). Takođe je naglašeno da nije sprovedena analiza po grupama u zavisnosti od tipa OAG ili etničke pripadnosti zbog ograničenosti raspoloživih studija (132, 137, 246).

Naše istraživanje je pokazalo da je zastupljenost genotipa GG na genu -308 za TNF- α statistički značajno veća kod POAG- HTG ispitanika (81,69%) u odnosu na kontrolnu grupu potpuno zdravih subjekata (68,90%) ($p < 0,05$). Odnosno da je zastupljenost genotipova koji imaju A alele (GA i AA) statistički veća u kontrolnoj grupi (31,10%) u odnosu na grupu POAG- HTG (18,31%) ($p < 0,05$). Moramo naglasiti da je ovo prvo ovakvo ispitivanje među srpskim stanovništvom, jer mnoga genska ispitivanja pokazuju etničke različitosti. Ovi rezultati su u suprotnosti sa rezultatima istraživanja sprovedenim među kineskim (133) i iranskim stanovništvom (131). Ali su potpuno u skladu sa istraživanjima sprovedenim u Japanu (136) i u južnoj Austriji (135), kao i među indijskim stanovništvom (74) i rezultatima meta-analize sedam različitih istraživanja (245) gde nije utvrđena nikakva povezanost između SNP -308 G/A za TNF- α i POAG.

Ovim istraživanjem smo pokazali da nema statistički značajne razlike u zastupljenosti alela G i A između studijske i kontrolne grupe, mada je A alel u kontrolnoj grupi (15,85%) gotovo statistički zastupljeniji u odnosu na POAG- HTG grupu (9,15%) ($p = 0,0536$). Naši rezultati se slažu sa rezultatima meta-analize iz 2013. godine, gde su Xin i saradnici (246) utvrdili da ne postoji značajna povezanost između TNF- α (-308) G/A polimorfizma i rizika za OAG, ali su suprotni od njihovog zaključka da postoji značajna povezanost između TNF- α (-308) G/A polimorfizma i rizika za HTG. Možda je to zato što je analiza pojedinačnih etničkih

grupa pokazala da značajna povezanost postoji kod Azijata, a veći broj ovih studija je rađen među japanskim, kineskim i azijskim stanovništvom. Koliko je nama poznato, ovakvo istraživanje je sprovedeno samo u južnom delu Austrije, tj. među pripadnicima bele rase.

Istraživanje koje smo sprovedeli pokazalo je da je vidna oštrina pacijenata kod oba tipa glaukoma, i POAG- HTG i PEXG, veća u slučaju GG genotipa u odnosu na GA genotip, ali je Mann-Whitney testom utvrđeno da je statistički značajno veća samo kod PEXG ($p < 0,05$). IOP je takođe kod oba tipa glaukoma veći u slučaju GG genotipa, ali Mann-Whitney testom nisu utvrđene statistički značajne razlike.

Kod ispitanika obolelih od glaukoma Mann-Whitney testom nisu utvrđene statistički značajne razlike u serumskoj koncentraciji TNF- α između genotipova u okviru POAG- HTG i PEXG. Kod PEXG je evidentno veća vrednost koncentracije TNF- α , kod GA u odnosu na GG genotip, ali nema statistički značajne razlike.

Univarijantna linearna regresiona analiza podataka dobijenih našim istraživanjem nije utvrdila nijedan genotip (GG, GA, AA) za polimorfizam gena TNF- α (-308) koji statistički značajno utiče na vrednosti ispitivanih parametara (vidna oštrina, IOP, C/D, MD, RNFL Avg, RNFL Sup, RNFL Inf) kod ispitanika obolelih od POAG- HTG.

6.3.2. Polimorfizam gena za TNF- α -863

Wang i saradnici (73) su objavili da je genotip -863 TNF- α AA ređi kod pacijenata sa POAG nego u kontroli (7% u odnosu na 11%; $p = 0,037$). Frekvencija TNF- α (-863) A alela bila je značajno smanjena u POAG grupi (22% vs. 30%, $p = 0,007$), tako da je bilo znatno manje nosilaca A alela (AA ili CA) na TNF- α (-863) kod pacijenata sa POAG nego među kontrolama (37% vs. 48%, $p = 0,017$). Nihovi rezultati ukazuju da TNF- α (-863) A alelni polimorfizam može biti zaštitni faktor u razvoju POAG. Nasleđe TNF- α (-863) C alela je povezano sa povišenim rizikom za razvoj Alchajmerove bolesti. Postoje dokazi da citokin TNF- α može pozitivno delovati na razvoj β -amiloidnih depozita u Alchajmerovoj bolesti. McKinnon i saradnici su dokazali da postoje naslage β -amiloida u retinalnim ganglijskim ćelijama pacova sa indukovanim glaukomom. Smrt RGC kod glaukoma uz pojavu nagomilavanja β -amiloida može da ukaže na sličan molekularni mehanizam kao kod Alchajmerove bolesti i mogućnost poklapanja degenerativnih dešavanja kod glaukoma i Alchajmerove bolesti (73, 141-144).

Wang i saradnici (73) su pokazali da je TNF- α (-863) A alel povezan sa zaštitnom ulogom kod POAG u kineskoj populaciji. Genotip i frekvenciji A alela u kontrolnoj kineskoj populaciji se razlikuje od one posmatrane u japanskim populacijama (73, 136). Frekvencija

TNF- α (-863) A alela bila je niža u japanskoj populaciji u poređenju sa onom u kineskoj (13 % vs. 29%, $p < 0,05$). U japanskoj studiji frekvencija AA genotipa bila je mala, oko 0,5%. Nasuprot tome, frekvencija AA genotipa u kineskoj populaciji bila je jako visoka, čak viša od 10%. Ovi nalazi ukazuju da kineski i japanski narod imaju drugačiju genetsku osnovu i da ovaj fenomen kontraverznih rezultata može biti posledica etničkih razlika.

Funayama i saradnici (136) su takođe primetili interakciju između TNF- α (-863) A/C polimorfizma i polimorfizma OPTN (603) A/T (Met98Lis) (136). Na kraju, utvrđeno je da TNF- α indukuje ekspresiju OPTN kroz NF κ -B (247).

Neke studije su pokazale da je polimorfizam u promotor regionu gena za TNF- α u položaju -863 odgovoran za transkripcionu regulaciju proizvodnje proteina TNF- α (248).

Takođe je saopšteno da je TNF- α (-863) A alel povezan sa 31 % nižom transkripcionom aktivnosti gena i sa smanjenim koncentracijama cirkulišućeg proteina TNF- α (249, 250).

U studiji koju su sproveli Wang i saradnici nije pronađena veza između frekvence TNF- α (-863) alela i visine IOP, kao i stepena oštećenja u POAG (73).

Naše istraživanje je pokazalo da je CC genotip bio zastupljeniji kod pacijenata obolelih od POAG- HTG (70,42%), statistički zastupljeniji u odnosu na kontrolnu grupu zdravih subjekata (54,63%) ($p < 0,05$), a u odnosu na PEXG (50,00%) bio je veoma blizu granice statističke značajnosti ($p = 0,0556$). Zastupljenost genotipa CA statistički je značajno veća kod PEXG (46,43%), kao i u kontrolnoj grupi (39,81%) u odnosu na POAG- HTG (23,94%) ($p < 0,05$). Zastupljenost genotipova koji sadrže alel A u kontrolnoj grupi (45,37%) bila je statistički značajno veća no u POAG- HTG grupi (29,58%), dok je zastupljenost A alela u PEXG (50,00%) bila veća u odnosu na zastupljenost u POAG- HTG grupi, ali samo blizu nivou statističke značajnosti ($p = 0,0568$). Ovi rezultati su u potpunosti u skladu sa rezultatima istraživanja koje su sproveli Wang i saradnici (73) među kineskim stanovništvom, i ukazuju da A alelni polimorfizam može imati zaštitnu ulogu u patogenezi primarnog glaukoma otvorenog ugla.

Sprovedeno istraživanje nam je otkrilo da nema statistički značajne razlike u zastupljenosti alela između ispitivanih grupa, iako je procentualno gledano najveća zastupljenost A alela bila u PEXG (26,79%), a vrlo slična u kontrolnoj grupi (25,46), dok je A alel bio najmanje zastupljen kod ispitanika obolelih od POAG- HTG (17,61%). Ista distribucija frekvencije A alela prijavljena je među stanovnicima Kine i Japana (73,136), s tim što je naša kontrolna grupa imala nižu frekvencu alela A nego kineska, a u japanskoj populaciji je prijavljena još niža frekvencija nego u našoj studiji.

Vidna oštrina pacijenata obolelih od POAG- HTG i ispitanika sa staračkom kataraktom bila je veća u CC i CA genotipovima, ali ne i statistički značajno u odnosu na AA genotip. Generalno, ni kod POAG- HTG, ni kod PEXG, ni senilne katarakte nema statistički značajnih razlika vrednosti vidne oštine između različitih genotipova na genu -863 za TNF- α .

Kruskal-Wallis testom je utvrđena statistički značajna zavisnost vrednosti IOP od genotipa na genu -863 za TNF- α ($p < 0,05$). Poređenjem vrednosti ovog parametra između grupa ponaosob, Mann-Whitney testom, kod ispitanika sa POAG- HTG utvrđeno je da je vrednost IOP ispitanika sa CA genotipom statistički značajno manja u odnosu na vrednost kod ostala dva genotipa ponaosob ($p < 0,05$). Dok Wang i saradnici nisu pronašli vezu između frekvence TNF- α (-863) alela i visine IOP, kao i stepena oštećenja u POAG (73).

Mann-Whitney testom nisu utvrđene statistički značajne razlike u serumskoj koncentraciji TNF- α između genotipova u okviru POAG- HTG i PEXG, kao i senilne katarakte, iako je evidentno da su vrednosti serumske koncentracije TNF- α bile najmanje kod CC genotipa, a najveće kod AA genotipa, dok je kod senilne katarakte situacija suprotna. Tako da opet možemo zaključiti da A alelni polimorfizam ima zaštitnu ulogu u patogenezi POAG.

Univarijantna linearna regresiona analiza rezultata našeg istraživanja nije utvrdila nijedan genotip (CC, CA, AA) za polimorfizam -863 gena za TNF- α koji statistički značajno utiče na vrednosti ispitivanih parametara (vidna oštrina, IOP, C/D, MD, RNFL Avg, RNFL Sup, RNFL Inf) kod ispitanika obolelih od POAG- HTG. Blizu granice statističke značajnosti je uticaj AA genotipa koji smanjuje vrednosti MD za 7,22, odnosno vrednosti C/D za 0,14.

6.4. HSP 70

Proteini toplotnog šoka (HSP) su sve prisutni i evolutivno konzervirani molekuli, što ukazuje na njihov funkcionalni značaj. Oni se obično smatraju intracelularnim proteinima, sa ulogom "nadzornika" i citoprotektivnom funkcijom (251).

HSP 70 ima bitnu ulogu u metabolizmu proteina, kako u stresnim, tako i u normalnim uslovima, pomaže u sklapanju novostvorenih proteina, translokaciji i degradaciji oštećenih proteina, učestvuje u regulatornim procesima. Smatra se neuroprotektorom zbog svoje ekspresije koja je indukovana u neuronima izloženim raznovrsnim štetnim stresnim uslovima, uključujući ishemiju i ekscitotoksičnosti. Osim toga, HSP su veoma antigenski, i posledica imunog odgovora na ove proteine može imati zaštitni ili patogeni efekat. Nedavne studije su dokaze da HSP ili anti-HSP antitela mogu biti patogenetski značajna u glaukomatoznoj ne-

urodegeneraciji. Produkcija HSP je ushodno regulisana u RGC glaukomnih pacijenata. Količina HSP, kao i HSP 70, je povećana u majmuna sa eksperimentalnim glaukom, a HSP 72 je povećan u RGC u glaukomnom modelu pacova. Indukovana ekspresija HSP 72 poboljšava opstanak RGC pri štetnim uslovima i smanjuje glaukomna oštećenja u modelu pacova, što sugerise da HSP 72 ima zaštitni efekat na RGC. Međutim, povišene serumske vrednosti antitela na HSP, detektovane kod glaukomnih pacijenata, mogu aktivirati smrt nervnih ćelija preko apoptoze. U početku, povećana ekspresija HSP u glaukomnom oku može biti neuroprotektivna, da štiti od dalje degeneracije, olakšava popravke i inhibira apoptozu. Nakon toga, HSP mogu delovati kao imunostimulacioni signal, što dovodi do sloma imunske tolerancije i smanjenja zaštitne sposobnosti samih HSP. Na kraju, HSP mogu doprineti kasnoj progresiji bolesti umanjujući antiapoptotske mehanizme i aktivno olakšavajući apoptozu. Tako, glaukomatozna optička neuropatija može biti posledica aberantne autoimunosti (252).

Ekspresija HSP određuje sudbinu ćelije, smanjena ekspresivnost vodi neefikasnom odgovoru na stres, a povećana ekspresija aktivira imunodestrukciju, u oba slučaja ishod je isti – smrt ćelije, ali preko dva mehanizma: prvi je preko oksidativnih slobodnih radikala, a drugi preko citokina. To su pokazali Tezel i saradnici (172); HSP mogu biti značajni pojačivači i citoprotektivne i neurodegenerativne funkcije imunog sistema u RGC i glialnim ćelijama (172).

Proteini toplotnog šoka 70 (HSP 70) su prisutni u perifernoj cirkulaciji zdravih osoba (Pocklei i sar. 1998.). Nivo cirkulišućih HSP 70 je povišen u vaskularnim oboljenjima bubrega i periferije (Vright i sar. 2000.), za vreme i posle vežbanja (Volš i sar. 2001.; Fehrenbach i sar. 2005.), u bolesti srpastih ćelija, naročito tokom vazo-okluzivne krize (Adevoie i sar. 2005.), u pacijenata sa akutnim infekcijama (Njemini i sar. 2003.), u bolesnika sa rakom prostate (Abe i sar. 2004.) ili hroničnom srčanom insuficijencijom (Genth-Zotz i sar. 2004), kod dece sa septičnim šokom (Vheeler i sar. 2005.), nakon hirurških procedura (Kimura i sar. 2004.), kao i nakon infarkta miokarda (Dibdahl i sar. 2005.) i aortokoronarnog bajpasa (Dibdahl i sar. 2002.) (253). Objavljeno je da je serumski nivo HSP 70 znatno niži u zdravih trudnih žena nego kod onih koje nisu trudne (254). Porast koncentracije HSP 70 u cirkulaciji se javlja u preeklampsiji (254). Molvarec i sar. (254) su našli da su serumske vrednosti HSP 70 bile 0,2 ng/ml (0,03–0,59) kod trudnica i 0,58 ng/ml (0,15–3,14) kod trudnica sa pre-eklampsijom.

Sahebari i saradnici (255) su odredili da su serumske koncentracije HSP 70 u pacijenata sa Behcet-ovim uveitisom ($3,52 \pm 3,52$ ng/ml) bile znatno više nego kod pacijenata sa idiopatskim uveitisom ($2,37 \pm 3,30$ ng/ml; $P= 0.028$, $t= 2.31$). Dok nije postojala statistički signifikantna razlika u koncentraciji anti- HSP antitela (255).

Prethodno prijavljenih podaci ukazuju da su HSP uključeni u patogenezu neuropatije, izazvane povećanim IOP kod glaukoma. Učešće HSP u razvoju glaukoma može biti povezano sa njihovom neuroprotektivnom funkcijom ili sa napredovanjem bolesti zbog aktiviranja autoimunog odgovora (65, 172, 201).

Anti- HSP antitela su identifikovana u serumu pacijenata sa glaukomom u nekoliko studija, a imunizacija HSP 60 dovodi do smrti RGC u životinjskom modelu eksperimentalnog autoimunog glaukoma (256).

Tezel i saradnici su, uz pomoć elisa testa, odredili da su titri antitela, uključujući HSP 27, alpha B-kristalin, humanu familiju HSP 60 i bakterijsku familiju HSP 60, bili viši kod pacijenata sa glaukomom u poređenju sa kontrolnim subjektima, u obe grupe pacijenata: japanskoj i američkoj. Međutim, nije bilo veze između serumskog titra antitela i strukturnih promena glave vidnog živca ni u jednoj grupi. Ovi rezultati ukazuju da se povećanje anti-HSP antitela ne javlja kao epifenomen glaukomatozne neurodegeneracije jer ne postoji zavisnost titra i kliničkog stadijuma bolesti (257).

Nedavno je otkriveno da se HSP 72 može naći u ekstracelularnim kompartmentima i da se ovaj vanćelijski HSP 72 ponaša kao citokin koji indukuje inflamaciju i moduliše urođeni imuni odgovor. Dvostruka uloga HSP 72 kao molekularnog nadzornika i citokina, ukazuju na to da fino podešavanje njegove ekspresije može biti potencijalni put za novi terapijski pristup za glaukom i druge neurodegenerativne bolesti (258).

Proučavajući G/C polimorfizam u položaju 190, koji se nalazi u 5'UTR regionu HSP 70-1 gena, koji je odgovoran region za efikasnost transkripcije, regulacije i stabilnost mRNK, He i saradnici (259) su pokazali da varijante C alela, u 190 G/C HSP 70-1 polimorfizmu, uzrokuju smanjenu aktivnost promotora i niži nivo HSP 70 proteina, u poređenju sa G alelom. Ova studija podržava hipotezu koja glaukomatoznu neuropatiju povezuje sa smanjenom neuroprotektivnom funkcijom HSP.

Jedno istraživanje u Pakistanu je pokazalo značajnu populacionu povezanost 190 G/C polimorfizma na genu za HSP 70-1 i primarnog glaukoma zatvorenog ugla, ali ne povezanost sa POAG (260). Shi i saradnici (261) su takođe zaključili da 190 G/C polimorfizam u HSP 70-1 genu utiče na razvoj glaukoma. Međutim, Tosaka i saradnici (252) nisu našli nikakvu asocijaciju između glaukoma i 190 G/C polimorfizma među japanskim stanovništvom, kao što i studija Nowak i saradnika u Poljskoj nije otkrila vezu između ovog polimorfizma i POAG (171).

Međutim, druga polimorfna varijanta, -110 A/C na HSP 70-1 genu je povezana sa rizikom za pojavu OAG, naročito POAG (AA nasuprot AC+CC, $p=0,007$), što je potvrđeno

u Japanu. Ovaj genski polimorfizam utiče na povećanu ekspresiju HSP 70, što ide u prilog hipotezi da je neuropatija povezana sa autoimunitetom (252, 262). Štaviše, -110 A alel može biti povezan sa višom transkripcionom aktivnošću nego -110 C alel, što ukazuje na povezanost neuropatije i autoimunosti (260, 263).

U istraživanju koje su sproveli Lichtenaur i saradnici navodi se da je serumska koncentracija HSP 70 u zdravih ispitanika bila 49 ± 22 pg/mL (264). Drugo istraživanje je pokazalo da je HSP 70 bio detektabilan samo u 77% analiziranih uzoraka i da se serumska koncentracija ovog proteina smanjuje sa godinama (400 ng/ml < 40 godina; 20 ng/ml > ili = 90 godina), dok koncentracije anti-HSP 70 antitela imaju tendenciju rasta sa godinama starosti, ali bez međusobne zavisnosti. Ovi nalazi ukazuju da se sa starošću smanjuje potencijal odgovora na stres (265).

Naše istraživanje je pokazalo da su serumske vrednosti HSP 70 bile veoma slične u sve tri grupe ispitanika (POAG- HTG $2,27 \pm 1,70$ ng/ml, PEXG $2,14 \pm 0,96$ ng/ml, katarakta $2,20 \pm 1,32$ ng/ml), pa ni Kruskal-Wallis, ni Mann-Whitney testom, nisu utvrđene statistički značajne razlike između ispitivanih pacijenata. Tako možemo zaključiti da kod POAG- HTG ne dolazi do serumskog povećanja koncentracije HSP 70, što ne isključuje povećanje ovog proteina u očnoj vodici.

Kod pacijenata obolelih od POAG- HTG statistički je značajna negativna korelacija serumske koncentracije HSP 70 i RNFL Sup ($p < 0,05$), a veoma blizu statističke značajnosti su negativne korelacije HSP 70 sa MD ($p = 0,0538$) i sa RNFL Inf ($p = 0,0584$).

U našem daljem radu smo Spearmanovim koeficijentom linearne korelacije ispitivali povezanost serumske koncentracije TNF- α i HSP 70, koncentracije Fas i FasL u očnoj vodici ispitanika i utvrdili da postoji statistički značajna negativna korelacija serumske koncentracije TNF- α sa serumskom koncentracijom HSP 70 kod ispitanika sa senilnom kataraktom ($p < 0,01$).

Univarijantna linearna regresiona analiza je kao jedini faktor koji statistički značajno utiče na MD vidnog polja pacijenata sa POAG- HTG potvrdila HSP 70. Povećanje HSP 70 za jednu mernu jedinicu uzrokuje kod pacijenata sa POAG- HTG značajan pad vrednosti MD za 1,37 uz interval poverenja 0,01–2,73.

Takođe, univarijantna linearna regresiona analiza je kao jedini faktor koji statistički značajno utiče na RNFL Avg, RNFL Sup i RNFL Inf kod pacijenata sa POAG- HTG potvrdila HSP 70. Povećanje HSP 70 za jednu mernu jedinicu kod pacijenata sa POAG- HTG uzrokuje značajan pad vrednosti RNFL Avg za 4,78 uz interval poverenja 0,11–9,45. Povećanje HSP 70 za jednu mernu jedinicu uzrokuje kod pacijenata sa POAG- HTG značajan pad

vrednosti RNFL Sup od 5,74 uz interval poverenja 0,29–11,20. Porast nivoa serumskog HSP 70 za jednu mernu jedinicu kod pacijenata sa POAG- HTG uzrokuje značajan pad vrednosti RNFL Inf od 7,62 uz interval poverenja 0,89–14,36.

Naše istraživanje je tako pokazalo da serumska koncentracija HSP 70 može biti mera razvoja i progresije glaukomne neuropatije u POAG- HTG. Takođe, HSP 70 može biti značajan biomarker glaukomne bolesti.

6.5. Fas i Fas ligand

Razni pro-apoptični stimulansi dovode do pokretanja biohemijskih procesa i aktiviraju veliku familiju proteaza, tzv. kaspaze, koje su glavni egzekutori apoptoze. Aktivacija kaspaza se uglavnom dešava putem dva mehanizma: spoljašnji put je iniciran vezivanjem određenih proteina (faktor nekroze tumora, TNF- α , Fas ligand, FasL) za njihove specifične receptore, dok se unutrašnji put inicira oslobađanje citohroma-c iz intermembranskog prostora mitohondrija. Spoljašnji i unutrašnji put aktivacije kaspaza su podjednako umešani u glaukomatозno oštećenje i apoptozu RGC, uključivanjem TNF- α , FasL, interleukina-1 α (IL-1 α), interleukina-1 β (IL-1 β), interleukina-6 (IL-6), kao i u smanjenje celularnosti trabekuluma u glaukomatозnom oku (266).

Razeghinejad i saradnici (99) su proučavali koncentraciju Fas i FasL u očnoj vodici pacijenata sa POAG i objavili sledeće rezultate: srednja vrednost sFas u očnoj vodici POAG bolesnika ($5,17 \pm 25,6$ pg / ml) bila je znatno niža nego kod pacijenata sa PEXG ($30 \pm 49,78$ pg / ml) i kataraktom ($28,7 \pm 48,93$ pg / ml) ($p = 0,002$; odnosno $p = 0,004$). Nije bilo značajne razlike u koncentraciji sFas iz očne vodice PEXG i grupe sa kataraktom ($p = 0,72$). Srednja koncentracija sFasL u očnoj vodici POAG grupe ($9,02 \pm 32,54$ pg / ml) nije pokazala značajniju razliku sa PEXG ($0,99 \pm 1,9$ pg / ml) i kataraktom ($2,9 \pm 12,54$ pg / ml) ($p = 0,44$, odnosno $p = 0,6$). Takođe, nisu pronašli korelaciju između nivoa sFas i vertikalnog C/D odnosa kod POAG i PEXG ($p = 0,52$ i $p = 0,65$), kao i između koncentracije sFasL i vertikalne eskavacije u POAG i PEXG ($p = 0,58$ i $p = 0,64$). Međutim, ova studija nije pružila nikakve dokaze o ulozi sFasL u patogenezi POAG, jer su rezultati pokazali da ne postoji statistički značajna razlika u nivoima sFasL u očnoj vodici pacijenata sa POAG, PEXG i grupe sa kataraktom. Nivo sFas u POAG koji je bio znatno niži od onog u kontrolnoj grupi tumačili su vezivanjem FasL za Fas i višom stopom apoptoze ćelija trabekuluma, što konačno vodi povećanju otpora oticanja očne vodice (99).

Suprotno ovim rezultatima, Borkenstein i saradnici (266) objavljuju da su nivoi citokina (TNF- α , IL-1 α i FasL) bili ispod granice detekcije, u istraživanju sprovedenom “multiplex bead” analizom uzoraka očne vodice 25 pacijenata sa POAG i 29 pacijenata sa kataraktom, što tumače izborom različitih metoda (266).

Sotozono i saradnici (202) su proučavali koncentraciju sFasL u očnoj vodici i staklastom telu pacijenata sa uveitisom (n=17) i pacijenata bez uveitisa (n=12, senilna katarakta). Nijedan uzorak očne vodice pacijenata bez uveitisa nije sadržao detektabilne nivoe sFasL. Koncentracija sFasL u HA pacijenata sa uveitisom bila je $367,0 \pm 154,7$ pg/ml. Kod nijednog od ispitivanih pacijenata nije pronađen merljivi nivo sFasL u serumu. Slično tome, nijedan uzorak staklastog tela pacijenata bez uveitisa nije sadržao detektabilne nivoe sFasL, dok je koncentracija sFasL u staklastom telu pacijenata sa uveitisom bila $1132,2 \pm 281,7$ pg/ml. S obzirom da sFas nije detektovan u serumu, a bio je signifikantno povišen samo kod pacijenata sa uveitisom, kako u očnoj vodici, tako i u staklastom telu, zaključili su da se sFasL lokalno proizvodi u očima tokom uveitisa, a mogući ćelijski izvori su endotel rožnjače, dužica, cilijarno telo, retina (202).

S. Mitrović i saradnici (267) su proučavali nivo sFasL u očnoj vodici 61 pacijenta sa kataraktom, i to 32 sa senilnom kataraktom i 29 sa kataraktom i diabetes mellitus-om. Došli su do rezultata da je nivo sFasL niži kod pacijenata sa DM u odnosu na kontrole (p= 0,48). Iako se smatra da je razvoj katarakte povezan sa apoptozom epitelijalnih ćelija sočiva i da pacijenti sa dijabetesnom kataraktom i proliferativnom DR imaju više apoptotskih ćelija i veći nivo Fas mRNA u epitelijumu sočiva nego kontrole bez dijabetesa, i da je nedavno pokazano da ekspresija Bak, drugog proapoptičnog molekula, u epitelijalnim ćelijama sočiva raste sa dužinom trajanja dijabetesa, oni su pronašli niže nivoe rastvorljivog FasL u HA pacijenata sa dijabetesom, što ukazuje u ovom slučaju na smanjen nivo apoptoze (267–269).

U studiji koju su sprovedeli Reinhard i saradnici pokazano je da je koncentracija sFasL bila nedetektabilna u HA kontrolne grupe sa senilnom kataraktom (n=3 pacijenata), dok je maksimalna koncentracija od 95 pg/ml pronađena kod pacijenata sa endotelijalnom reakcijom nakon penetrantne keratoplastike (270).

Sugita i saradnici (199) su prikupljali uzorke HA (100–200 μ L) pacijenata sa senilnom kataraktom (n= 20) i pacijenata sa različitim tipovima uveitisa (n=17). Među pacijentima u kontrolnoj grupi, od njih 20 sa senilnom kataraktom bez okularnog zapaljenja, 11 pacijenata je imalo detektabilne nivoe sFasL u uzorku HA (223 – 1343 pg/ml). Srednja koncentracija sFasL u očnoj vodici pacijenata sa kataraktom bila je 273 pg/ml (SD 341). Kod šest od 17 pacijenata sa uveitisom detektovan je sFasL, njegova srednja vrednost u očnoj vodici

bila je 132 pg/ml (SD 202). Nije bilo statistički značajne razlike u nivoima sFasL u HA između dve grupe. Solubilni Fas u očnoj vodici većine ne-uveitičnih pacijenata bio je ispod nivoa detekcije, dok su svi pacijenti sa uveitisom imali visoke koncentracije sFas u HA. Srednja vrednost sFas za ne-uveitične pacijente bila je 67 pg/ml (SD 129), a za uveitične 1132 pg/ml (SD 881). Između grupa postojala je statistički značajna razlika ($p < 0,0005$). Serumski nivo sFasL kod zdravih pacijenata bio je nemerljiv, ili jako nizak. Nasuprot tome, sFas je bio znatno viši u obe grupe. Ova studija je pokazala značajne nivoe sFasL u HA pacijenata sa senilnom katarakte i bez okularnog zapaljenja. Ovo ukazuje da HA u normalnom stanju sadrži značajne količine sFasL (199).

Ova diskrepanca među studijama može biti uzrokovana različitim uslovima punkcije i uzorkovanja očne vodice iz prednje očne komore, kao i upotrebom različitih eliza testova. Na količinu sFasL koji se detektuje u HA može uticati kontakt šprica sa okularnim strukturama, kontaminacija krvlju iz limbalnih krvnih sudova, suzni film sa sopstvenom koncentracijom sFasL. U našem istraživanju, sve oči su pre početka hirurške intervencije isprane rastvorom povidon jodida, tako da nije bilo mogućnosti za kontaminaciju ili prisustva suza. U ovoj studiji, strogo se vodilo računa da se izbegne kontakt igle i dužice. Uzorci kontaminirani krvlju nisu obrađivani. Izvlačeno je samo 100-150 μ l očne vodice, a određena količina je uvek ostavljena u prednju očnu komoru, dok su Sugita i saradnici izvlačili kritičnu količinu HA od 0,2 ml.

Istraživanje koje smo sproveli pokazalo je da je vrednost Fas u očnoj vodici bila najveća kod očiju sa PEXG (720,14 \pm 167,39 pg/ml), niža kod pacijenata obolelih od POAG- HTG (713,43 \pm 162,69 pg/ml). Ipak, treba naglasiti da je statistička razlika između POAG- HTG i pacijenata sa senilnom kataraktom (632,46 \pm 217,11 pg/ml) na granici statističke značajnosti ($p=0,0505$), a između PEXG i grupe ispitanika sa kataraktom takođe bliska statistički značajnoj razlici ($p=0,0657$), što nije potpuno u skladu sa rezultatima koje su dobili Razeghinejad i saradnici (99), kao ni sa rezultatima Sugita i saradnika (199). Mi nismo utvrdili statistički značajne razlike koncentracije Fas u očnoj vodici između ispitivanih grupa, ni Kruskal-Wallis, ni Mann-Whitney testom.

Spearmanovim koeficijentom linearne korelacije ispitivana je povezanost koncentracije Fas u očnoj vodici ispitanika i vidne oštine, intraokularnog pritiska, MD, PSD, CPSD, RNFL Avg, RNFL Sup i RNFL Inf istog pacijenta i došli smo do rezultata da je kod pacijenata obolelih od POAG- HTG statistički značajna negativna korelacija koncentracije Fas u očnoj vodici i RNFL Inf ($p < 0,05$).

Sprovedeno istraživanje je pokazalo da solubilni Fas u očnoj vodici glaukomnih pacijenata ima ulogu u patogenezi primarnog glaukoma otvorenog ugla i u vezi je sa progresijom glaukomnog oštećenja, tj. istanjenjem RNFL u inferiornom kvadrantu.

Naše istraživanje je pokazalo da je koncentracija solubilnog FasL u očnoj vodici bila najniža kod pacijenata obolelih od POAG- HTG ($9,28 \pm 0,551$ pg/ml), gotovo statistički značajno manja u odnosu na koncentraciju FasL kod pacijenata obolelih od PEXG ($9,45 \pm 0,61$ pg/ml) ($p=0,0566$). Ni Kruskal-Wallis, ni Mann-Whitney testom nisu utvrđene statistički značajne razlike u koncentraciji FasL iz očne vodice očiju obolelih od različitih tipova glaukoma i očiju sa starijom kataraktom ($9,48 \pm 9,46$ pg/mL).

Spearmanovim koeficijentom linearne korelacije ispitivana je povezanost koncentracije FasL u očnoj vodici ispitanika i vidne oštine, IOP, MD, PSD, CPSD, RNFL Avg, RNFL Sup i RNFL Inf istog pacijenta. Istraživanjem smo potvrdili da u grupi pacijenata obolelih od POAG- HTG statistički značajna je negativna korelacija FasL sa MD ($p < 0,05$), a blizu statistički značajne je negativna korelacija sa RNFL Avg ($p=0,0594$). U grupi pacijenata obolelih od PEXG statistički je veoma značajna negativna korelacija sa RNFL Sup ($p < 0,05$).

Naše istraživanje je definisalo solubilni FasL kao značajan biomarker u patogenezi glaukomnog oštećenja, ali smo došli i do rezultata koji definišu sFasL kao pomoćnu mernu jedinicu za funkcionalna (MD) i strukturalna (RNFL Avg) glaukomatozna oštećenja.

Univarijantna linearna regresiona analiza je kao jedini faktor koji statistički značajno utiče na RNFL Sup kod pacijenata sa PEXG potvrdila FasL. Porast FasL u grupi pacijenata sa PEXG za mernu jedinicu dovodi do pada RNFL Sup za 48,47 uz interval poverenja 0,55–96,39.

7. ZAKLJUČAK

1. Koncentracija TNF- α u serumu statistički je znatno viša kod pacijenata obolelih od glaukoma u odnosu na ispitanike sa staračkom kataraktom.

Najviša serumska koncentracija TNF- α bila je kod pacijenata obolelih od PEXG, niža kod obolelih od POAG- HTG, a najniža kod ispitanika sa senilnom kataraktom.

Nije utvrđena statistički značajna korelacija koncentracije TNF- α u serumu ni sa jednim ispitivanim kliničkim parametrom koji određuje stepen razvoja i oštećenja u glaukomu.

2. Zastupljenost genotipa GG na genu -308 za TNF- α statistički je značajno veća kod ispitanika obolelih od POAG- HTG u odnosu na grupu zdravih subjekata.

Ne postoji značajna povezanost TNF- α (-308) G/A polimorfizma sa rizikom za nastanak POAG- HTG, kao i kliničkih parametara za dijagnozu POAG- HTG.

Nijedan genotip (GG, GA, AA) gena -308 TNF- α ne utiče statistički značajno na vrednosti ispitivanih kliničkih parametara kod pacijenata obolelih od POAG- HTG.

Vidna oštrina i IOP pacijenata obolelih od glaukoma veći su u slučaju GG genotipa u odnosu na GA genotip.

Nije utvrđena statistički značajna razlika u serumskoj koncentraciji TNF- α između genotipova u okviru POAG- HTG i PEXG.

Koncentracije TNF- α je veća kod GA u odnosu na GG genotip kod PEXG.

3. Genotip CC za TNF- α (-863) je zastupljeniji kod pacijenata obolelih od POAG- HTG, statistički zastupljeniji u odnosu na grupu zdravih subjekata, a u odnosu na PEXG je blizu granice statističke značajnosti.

Zastupljenost genotipa CA statistički je značajno veća kod PEXG, kao i u grupi zdravih subjekata u odnosu na POAG- HTG.

Zastupljenost genotipova koji sadrže alel A u grupi zdravih subjekata bila je statistički značajno veća no u POAG- HTG grupi, dok je zastupljenost A alela u PEXG bila veća u odnosu na zastupljenost u POAG- HTG grupi, ali samo blizu nivou statističke značajnosti.

Vidna oštrina pacijenata obolelih od POAG- HTG i ispitanika sa staračkom kataraktom bila je veća u CC i CA genotipovima, ali ne i statistički značajno u odnosu na AA genotip.

Utvrđena je statistički značajna zavisnost vrednosti IOP od genotipa na genu -863 za TNF- α , kod ispitanika sa POAG- HTG, vrednost IOP ispitanika sa CA genotipom je statistički značajno manja u odnosu na vrednost kod ostala dva genotipa ponaosob.

Nisu utvrđene statistički značajne razlike u serumskoj koncentraciji TNF- α između genotipova ispitivanih grupa, iako je evidentno da su vrednosti serumske koncentracije TNF- α bile najmanje kod CC genotipa u glaukomu, a najveće kod AA genotipa, dok je kod senilne katarakte situacija suprotna.

Nema značajne povezanosti između genotipova (CC, CA, AA) -863 gena za TNF- α i ispitivanih kliničkih parametara kod pacijenata obolelih od POAG- HTG. Blizu granice statističke značajnosti je uticaj AA genotipa na vrednost MD.

4. Serumske vrednosti HSP 70 bile su veoma slične u sve tri grupe ispitanika, te nisu utvrđene statistički značajne razlike između ispitivanih pacijenata.

Kod POAG- HTG ne dolazi do serumskog povećanja koncentracije HSP 70, što ne isključuje povećanje ovog proteina u očnoj vodici.

Postoji međuzavisnost između serumskog nivoa HSP 70 i ispitivanih kliničkih parametara za dijagnozu POAG- HTG. Statistički je značajna negativna korelacija serumske koncentracije HSP 70 i RNFL Sup, na granici statističke značajnosti su negativne korelacije HSP 70 sa MD i RNFL Inf.

Koncentracija HSP 70 u serumu je jedini faktor koji statistički značajno utiče na MD vidnog polja, RNFL Avg, RNFL Sup i RNFL Inf pacijenata sa POAG- HTG. Povećanje HSP 70 za jednu mernu jedinicu uzrokuje kod pacijenata sa POAG- HTG značajan pad vrednosti MD, RNFL Avg, RNFL Sup i RNFL Inf.

Postoji statistički značajna negativna korelacija serumske koncentracije TNF- α sa serumskom koncentracijom HSP 70 kod ispitanika sa senilnom kataraktom.

5. Koncentracija solubilnog Fas u očnoj vodici bila je najveća kod pacijenata obolelih od PEXG, niža kod pacijenata obolelih od POAG- HTG. Razlika u koncentraciji Fas kod pacijenata sa POAG- HTG i ispitanika sa senilnom kataraktom je na granici statističke značajnosti, a između PEXG i grupe ispitanika sa kataraktom takođe bliska statistički značajnoj razlici.

Kod pacijenata obolelih od POAG- HTG statistički je značajna negativna korelacija koncentracije Fas u očnoj vodici i RNFL Inf.

Koncentracija solubilnog FasL u očnoj vodici bila je najniža kod pacijenata obolelih od POAG- HTG, gotovo statistički značajno manja u odnosu na koncentraciju FasL kod pacijenata obolelih od PEXG. Nisu utvrđene statistički značajne razlike u koncentraciji FasL iz očne vodice obolelih od glaukoma i sa staračkom kataraktom.

U grupi pacijenata obolelih od POAG- HTG statistički značajna je negativna korelacija FasL sa MD, a blizu statistički značajne je negativna korelacija sa RNFL Avg. U grupi pacijenata obolelih od PEXG statistički je veoma značajna negativna korelacija sa RNFL Sup.

FasL je faktor koji statistički značajno utiče na RNFL Sup kod pacijenata sa PEXG. Porast koncentracije FasL u grupi pacijenata sa PEXG za mernu jedinicu dovodi do značajnog istanjenja RNFL u superiornom kvadrantu.

8. OPŠTI ZAKLJUČAK

Serumski TNF- α je moćan citokin sa značajnom ulogom u patogenezi glaukoma i glaukomnoj neuropatiji. TNF- α ima ulogu medijatora neurodegeneracije u POAG.

A alelni polimorfizam -863 za TNF- α ima zaštitnu ulogu u patogenezi primarnog glaukoma otvorenog ugla.

HSP 70 ima ulogu u patogenezi POAG- HTG. Serumaska koncentracija HSP 70 može biti mera razvoja i progresije glaukomne neuropatije u POAG- HTG. Takođe, HSP 70 može biti značajan biomarker glaukomne bolesti, jer promena koncentracije HSP 70 izaziva promenu vrednosti MD, RNFL Avg, RNFL Sup i RNFL Inf.

Solubilni Fas u očnoj vodici glaukomnih pacijenata ima ulogu u patogenezi primarnog glaukoma otvorenog ugla i u vezi je sa progresijom glaukomnog oštećenja, tj. istanjenjem RNFL u inferiornom kvadrantu.

Solubilni FasL je značajan biomarker u patogenezi glaukomnog oštećenja, i pomoćna merna jedinica za funkcionalna (MD) i strukturalna (RNFL Avg) glaukomna oštećenja.

Glaukom je kompleksna bolest do koje dovode razni genetski faktori i faktori životne sredine. U različitim populacijama prijavljeno je da razni genski polimorfizmi dovode do pojave glaukoma. Naša studija predstavlja korak napred u smislu pojašnjenja uloge genskog polimorfizma i medijatora imunog odgovora u patogenezi glaukoma, naročito u pogledu pacijenata sa teritorije jugoistočne Srbije. Potrebno je nadalje sprovesti slične studije u različitim populacijama širom sveta kako bi se u potpunosti razotkrile genetske osnove glaukoma, što će na kraju dovesti do boljeg razumevanja mehanizma nastajanja bolesti. Ovi rezultati podržavaju mehanizam koji uključuje imuni odgovor u glaukomnom oštećenju, a to može pružiti novi terapijski pristup u neuroprotekciji glaukomne optičke neuropatije. Razumevanje genetike i imunosti u patogenezi POAG je važan način za dizajniranje novih tretmana za glaukom.

9. LITERATURA

1. Fei ZG, Zeng S. Glaucoma: etiology, pathogenesis and treatments. Hauppauge, N.Y.: Nova Science Publishers; 2012.
2. Kass MA, Heuer DK, Higginbotham EJ, Johnson CA, Keltner JL, Miller JP, Parrish RK 2nd, Wilson MR, Gordon MO. The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open- angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 2002; 120: 701-13.
3. Gordon MO, Beiser JA, Brandt JD, Heuer DK, Higginbotham EJ, Johnson CA, Keltner JL, Miller JP, Parrish RK 2nd, Wilson MR, Kass MA. The Ocular Hypertension Treatment Study: baseline factors that predict the onset of primary open- angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 2002; 120: 714-20.
4. Lichter PR, Musch DC, Gillespie BW, Guire KE, Janz NK, Wren PA, Mills RP; CIGTS Study Group. Interim clinical outcomes in the Collaborative Initial Treatment Study comparing initial treatment randomized to medications or surgery. *Ophthalmology* 2001; 108 (11): 1943-53.
5. Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol* 2006; 90: 262-67.
6. Ray K, Mukhopadhyay A, Acharya M. Recent advances in molecular genetics of glaucoma. *Mol Cell Biochem* 2003; 253: 223-31.
7. Shah R, Wormald RP. Glaucoma. *BMJ Clin Evid* 2011; 0703.
8. Quigley HA. Open-angle glaucoma. *N Engl J Med* 1993; 328: 1097-106.
9. Shields M, Ritch R, Krupin T. Classification of the glaucomas. Mosby, St Louis, USA; 1996.
10. Mowatt G, Burr JM, Cook JA, Siddiqui MA, Ramsay C, Fraser C, Azuara- Blanco A, Deeks JJ. Screening tests for detecting open-angle glaucoma: systematic review and meta-analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49: 5373-85.
11. Troost A, Grunz C, Troost R, Grus FH, Pfeiffer N, Schwenn O. Agreement between clinical evaluation, Heidelberg-Retina-Tomograph (HRT) and Nerve Fiber Analyzer (GDx) in glaucoma diagnosis. *Klin Monbl Augenheilkd* 2004; 221: 757-61.

12. Bell K, Gramlich OW, Von Thun Und Hohenstein-Blaul N, Beck S, Funke S, Wilding C, Pfeiffer N, Grus FH. Does autoimmunity play a part in the pathogenesis of glaucoma? *Prog Retin Eye Res* 2013; 36: 199-216.
13. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, Harley JB. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2003; 349(16): 1526-33.
14. Shmerling RH. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus-there before you know it. *N Engl J Med* 2003; 349(16): 1499-500.
15. Tham YC, Li X, Wong TY, Quigley HA, Aung T, Cheng CY. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology* 2014; 121 (11): 2081-90.
16. Gemenetzi M, Yang Y, Lotery AJ. Current concepts on primary open-angle glaucoma genetics: a contribution to disease pathophysiology and future treatment. *Eye (Lond)* 2012; 26(3): 355-69.
17. Dielemans I, Vingerling JR, Wolfs RC, Hofman A, Grobbee DE, de Jong PT. The prevalence of primary open-angle glaucoma in a population-based study in the Netherlands. The Rotterdam Study. *Ophthalmology* 1994; 101: 1851-55.
18. Klein BE, Klein R, Sponsel WE, Franke T, Cantor LB, Martone J, Menage MJ. Prevalence of glaucoma. The Beaver Dam eye study. *Ophthalmology* 1992; 99: 1499-504.
19. Rudnicka AR, Mt-Isa S, Owen CG, Cook DG, Ashby D. Variations in primary open-angle glaucoma prevalence by age, gender, and race: a Bayesian meta-analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 4254-61.
20. Leske MC, Connell AM, Schachat AP, Hyman L. The Barbados eye study. Prevalence of open angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 1994; 112: 821-29.
21. Tielsch JM, Sommer A, Katz J, Royall RM, Quigley HA, Javitt J. Racial variations in the prevalence of primary open-angle glaucoma. The Baltimore Eye Survey. *Jama* 1991; 266: 369-74.
22. Duane's O. Duane's Ophthalmology on DVD-ROM edition 2010. *Clin Exp Optom* 2010; 94: 506-7.
23. Sommer A, Tielsch JM, Katz J, Quigley HA, Gottsch JD, Javitt J, Singh K. Relationship between intraocular pressure and primary open angle glaucoma among white and black Americans. *Arch Ophthalmol* 1991; 109: 1090-95

24. European glaucoma society. Primary open-angle glaucoma. In: Terminology and guidelines for glaucoma (4th edition). Savona: PubliComm; 2014. p. 79-89.
25. Fraser S, Bunce C, Wormald R, Brunner E. Deprivation and late presentation of glaucoma: case-control study. *BMJ* 2001; 322(7287): 639-43.
26. Kanski JJ. *Clinical ophthalmology* 5e. Elsevier; 2003.
27. Coleman AL, Miglior S. Risk factors for glaucoma onset and progression. *Surv Ophthalmol* 2008; 53 (1): 3-10.
28. Czudowska MA, Ramdas WD, Wolfs RC, Hofman A, De Jong PT, Vingerling JR, Jansonius NM. Incidence of glaucomatous visual field loss: a ten-year follow-up from the Rotterdam Study. *Ophthalmology* 2010; 117 (9): 1705-12.
29. Topouzis F, Wilson MR, Harris A, Anastasopoulos E, Yu F, Mavroudis L, Pappas T, Koskosas A, Coleman AL. Prevalence of open angle glaucoma in Greece: the Thessaloniki Eye Study. *Am J Ophthalmol* 2007; 144 (4): 511-9.
30. Varma R, Wang D, Wu C, Francis BA, Nguyen BB, Chopra V, Memarzadeh F, Torres M, Azen SP; Los Angeles Latino Eye Study Group. Four-year incidence of open-angle glaucoma and ocular hypertension: the Los Angeles Latino Eye Study. *Am J Ophthalmol* 2012; 154 (2): 315-25.
31. Leske MC, Wu SY, Hennis A, Honkanen R, Nemesure B; BESs Study Group. Risk factors for incident open-angle glaucoma: the Barbados Eye Studies. *Ophthalmology* 2008; 115 (1): 85-93.
32. Wong TY, Klein BE, Klein R, Knudtson M, Lee KE. Refractive errors, intraocular pressure, and glaucoma in a white population. *Ophthalmology* 2003; 110 (1): 211-7.
33. Topouzis F, Wilson MR, Harris A, Founti P, Yu F, Anastasopoulos E, Pappas T, Koskosas A, Salonikiou A, Coleman AL. Risk factors for primary open-angle glaucoma and pseudoexfoliative glaucoma in the Thessaloniki eye study. *Am J Ophthalmol* 2011; 152 (2): 219-28.
34. Munemasa Y, Kitaoka Y. Molecular mechanisms of retinal ganglion cell degeneration in glaucoma and future prospects for cell body and axonal protection. *Front Cell Neurosci* 2013; 6 (60): 1-13.
35. Wax MB. Is there a role for the immune system in glaucomatous optic neuropathy? *Curr Opin Ophthalmol* 2000; 11: 145-50.
36. Wax MB. The case for autoimmunity in glaucoma. *Exp Eye Res* 2000; 93: 187-90.

37. Wax MB, Barrett DA, Pestronk A. Increased incidence of paraproteinemia and autoantibodies in patients with normal-pressure glaucoma. *Am J Ophthalmol* 1994; 117: 561-68.
38. Wax MB, Tezel G, Edward PD. Clinical and ocular histopathological findings in a patient with normal-pressure glaucoma. *Arch Ophthalmol* 1998; 116: 993-1001.
39. Wax MB, Tezel G, Saito I, Gupta RS, Harley JB, Li Z, Romano C. Anti- Ro/SS-A positivity and heat shock protein antibodies in patients with normal pressure glaucoma. *Am J Ophthalmol* 1998; 125: 145-57.
40. Wax MB, Tezel G, Yang J, Patil R, Sappington R, Calkins D. Induced autoimmunity to heat shock proteins elicits glaucomatous loss of retinal ganglion cells via a FAS/FAS-ligand pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 1828.
41. Hitchings R. Glaucoma: an area of darkness. *Eye* 2009; 23: 1764-74.
42. Sharma P, Sample PA, Zangwill LM, Schuman JS. Diagnostic tools for glaucoma detection and management. *Surv Ophthalmol* 2008; 53(11): 17-32.
43. Jovanović P. Uloga antioksidanasa u patogenezi primarnih glaukoma otvorenog ugla. Doktorska disertacija, Medicinski fakultet, Niš, 2003.
44. Cvetković D, Kontić Đ, Hentova Sećanić P. Glaukom, dijagnoza i lečenje. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva; 1996.
45. Advanced Glaucoma Intervention Study Investigators. The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS). The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. *Am J Ophthalmol* 2000; 130: 429-40.
46. Bussell II, Wollstein G, Schuman JS. OCT for glaucoma diagnosis, screening and detection of glaucoma progression. *Br J Ophthalmol* 2014; 98(2): 15-9.
47. Hood DC, Raza AS. Onimproving the use of OCT imaging for detecting glaucomatous damage. *Br J Ophthalmol* 2014; 98(2): 1-9.
48. Sung KR, Kim JS, Wollstein G, Folio L, Kook MS, Schuman JS. Imaging of the retinal nerve fibre layer with spectral domain optical coherence tomography for glaucoma diagnosis. *Br J Ophthalmol* 2011; 95(7): 909-14.
49. Migdal C. Glaucoma medical treatment: philosophy, principles and practice. *Eye* 2000; 14. 2315-23.
50. Heijl A, Leske MC, Hyman L, Yang Z, Bengtsson B; EMGT Group. Intraocular pressure reduction with a fixed treatment protocol in the Early Manifest Glaucoma Trial. *Acta Ophthalmol* 2011; 89 (8): 749- 4.

51. Chen N, Huang TL, Tsai Rk. Neuroprotection in Glaucoma: the Odyssey against Degeneration. *Neuro-ophthalmol Jpn* 2014; 31 (3): 377-81.
52. Pinazo-Durán MD, Zanón-Moreno V, García-Medina JJ, Gallego-Pinazo R. Evaluation of presumptive biomarkers of oxidative stress, immune response and apoptosis in primary open-angle glaucoma. *Curr Opin Pharmacol* 2013; 13 (1): 98-107.
53. Whitmore AV, Libby RT, John SW. Glaucoma: thinking in new ways-a role for autonomous axonal self-destruction and other compartmentalised processes? *Prog Retin Eye Res* 2005; 24: 639-62.
54. Mozaffarieh M, Grieshaber MC, Flammer J. Oxygen and blood flow: players in the pathogenesis of glaucoma. *Mol Vis* 2008; 14: 224-33.
55. Dreyer EB. A proposed role for excitotoxicity in glaucoma. *J Glaucoma* 1998; 7: 62-7.
56. Dreyer EB, Grosskreutz CL. Excitatory mechanisms in retinal ganglion cell death in primary open angle glaucoma (POAG). *Clin Neurosci* 1997; 4: 270-73.
57. Wax MB, Tezel G. Immunoregulation of retinal ganglion cell fate in glaucoma. *Exp Eye Res* 2009; 88: 825-30.
58. Ray K, Mookherjee S. Molecular complexity of primary open angle glaucoma: current concepts. *J Genet* 2009; 88: 451-67.
59. Wax MB, Yang J, Tezel G. Serum autoantibodies in patients with glaucoma. *J Glaucoma* 2001; 10: 22-4.
60. Wax M, Yang J, Tezel G. Autoantibodies in glaucoma. *Curr Eye Res* 2002; 25: 113-6.
61. Tezel G, Wax MB. The immune system and glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol* 2004; 15: 80-4.
62. Mookherjee S, Banerjee D, Chakraborty S, Banerjee A, Mukhopadhyay I, Sen A, Ray K. Association of IL-1A and IL-1B loci with primary angle glaucoma. *BMC Med Genet* 2010; 11:99.
63. Tezel G, Seigel GM, Wax MB. Autoantibodies to small heat shock proteins in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 2277-87.
64. Tezel G, Li LY, Patil RV, Wax MB. TNF-alpha and TNF-alpha receptor-1 in the retina of normal and glaucomatous eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 1787-94.
65. Tezel G, Yang J, Wax MB. Heat shock proteins, immunity and glaucoma. *Brain Res Bull* 2004; 62: 473-80.
66. Zhou X, Li F, Kong L, Tomita H, Li C, Kao W. Involvement of inflammation, degradation and apoptosis in a mouse model of glaucoma. *J Biol Chem* 2005; 280: 31240-8.

67. Yano T, Yamada K, Kimura A, Takeshita T, Minohara M, Kira JI, Senju S, Nishimura Y, Tanihara H. Autoimmunity against neurofilament protein and its possible association with HLADRB1* 1502 allele in glaucoma. *Immunol Lett* 2005; 100: 164-9.
68. Stone EM, Fingert JH, Alward WL, Nguyen TD, Polansky JR, Sunden SL, Nishimura D, Clark AF, Nystuen A, Nichols BE, Mackey DA, Ritch R, Kalenak JW, Craven ER, Sheffield VC. Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science* 1997; 275: 668-70.
69. Rezaie T, Child A, Hitchings R, Brice G, Miller L, Coca-Prados M, Héon E, Krupin T, Ritch R, Kreutzer D, Crick RP, Sarfarazi M. Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *Science* 2002; 295: 1077-79.
70. Monemi S, Spaeth G, DaSilva A, Popinchalk S, Ilitchev E, Liebmann J, Ritch R, Héon E, Crick RP, Child A, Sarfarazi M. Identification of a novel adult-onset primary open-angle glaucoma (POAG) gene on 5q22.1. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 725-33.
71. Acharya M, Mookherjee S, Bhattacharjee A, Bandyopadhyay AK, Daulat Thakur SK, Bhaduri G, Sen A, Ray K. Primary role of CYP1B1 in Indian juvenile-onset POAG patients. *Mol Vis* 2006; 12: 399-404.
72. Bayat B, Yazdani S, Alavi A, Chiani M, Chitsazian F, Tusi BK, Suri F, Narooie-Nejhad M, Sanati MH, Elahi E. Contributions of MYOC and CYP1B1 mutations to JOAG. *Mol Vis* 2008; 14: 508-17.
73. Wang CY, Shen YC, Wei LC, Lin KH, Feng SC, Yang YY, Chiu CH, Tsai HY. Polymorphism in the TNF- α (-863) locus associated with reduced risk of primary open angle glaucoma. *Mol Vis* 2012; 18: 779-85.
74. Chakraborty S, Mookherjee S, Sen A, Ray K. Analysis of COCH and TNFA variants in East Indian primary open-angle glaucoma patients. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 937870.
75. Rao KN, Nagireddy S, Chakrabarti S. Complex genetic mechanisms in glaucoma. An overview. *Indian J Ophthalmol* 2011; 59: 31-42.
76. Coffey M, Reidy A, Wormald R, Xian WX, Wright L, Courtney P. Prevalence of glaucoma in the west of Ireland. *Br J Ophthalmol* 1993; 77: 17-1.
77. Gramlich OW, Bell K, von Thun Und Hohenstein-Blaul N, Wilding C, Beck S, Pfeiffer N, Grus FH. Autoimmune biomarkers in glaucoma patients. *Curr Opin Pharmacol* 2013; 13: 90-7.

78. Zimmermann CW, Eblen F. Repertoires of autoantibodies against homologous eye muscle in ocular and generalized myasthenia gravis differ. *Clin Investig* 1993; 71: 445-51.
79. Zimmermann CW, Weiss G. Antibodies not directed against the acetylcholine receptor in myasthenia gravis. An immunoblot study. *J Neuroimmunol* 1987; 16: 225-36.
80. Joachim SC, Gramlich OW, Laspas P, Schmid H, Beck S, von Pein HD, Dick HB, Pfeiffer N, Grus FH. Retinal ganglion cell loss is accompanied by antibody depositions and increased levels of microglia after immunization with retinal antigens. *PLoS One* 2012; 7: 40616.
81. Joachim SC, Grus FH, Kraft D, White-Farrar K, Barnes G, Barbeck M, Ghanaati S, Cao S, Li B, Wax MB. Complex antibody profile changes in an experimental autoimmune glaucoma animal model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50: 4734-42.
82. Grus FH, Joachim SC, Hoffmann EM, Pfeiffer N. Complex autoantibody repertoires in patients with glaucoma. *Mol Vis* 2004; 10: 132-37.
83. Reichelt J, Joachim SC, Pfeiffer N, Grus FH. Autoantibodies against human retinal antigens in sera of patients with glaucoma and ocular hypertension. *Curr Eye Res* 2008; 33: 253-61.
84. Kokotas H, Kroupis C, Chiras D, Grigoriadou M, Lamnissou K, Petersen MB, Kitsos G. Biomarkers in primary open angle glaucoma. *Clin Chem Lab Med* 2012; 50(12): 2107-19.
85. Ikeda Y, Maruyama I, Nakazawa M, Ohguro H. Clinical significance of serum antibody against neuron-specific enolase in glaucoma patients. *Jpn J Ophthalmol* 2002; 46: 13-17.
86. Joachim SC, Pfeiffer N, Grus FH. Autoantibodies in patients with glaucoma: a comparison of IgG serum antibodies against retinal, optic nerve, and optic nerve head antigens. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005; 243: 817-23.
87. Huang P, Zhang SS, Zhang C. The two sides of cytokine signaling and glaucomatous optic neuropathy. *J Ocul Biol Dis Infor* 2009; 2: 78-83.
88. Huang P, Qi Y, Xu YS, Liu J, Liao D, Zhang SS, Zhang C. Serum cytokine alteration is associated with optic neuropathy in human primary open angle glaucoma. *J Glaucoma* 2010; 19: 324-30.
89. Chua J, Vania M, Cheung CM, Ang M, Chee SP, Yang H, Li J, Wong TT. Expression profile of inflammatory cytokines in aqueous from glaucomatous eyes. *Mol Vis* 2012; 18: 431-38.

90. Takai Y, Tanito M, Ohira A. Multiplex cytokine analysis of aqueous humor in eyes with primary open-angle glaucoma, exfoliation glaucoma, and cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53: 241-47.
91. Fuchshofer R, Tamm ER: The role of TGF- β in the pathogenesis of primary open-angle glaucoma. *Cell Tissue Res* 2012; 347: 279-90.
92. Tezel G. TNF- α signaling in glaucomatous neurodegeneration. *Prog Brain Res* 2008;173: 409-21.
93. Sacca SC, Centofanti M, Izzotti A. New proteins as vascular biomarkers in primary open angle glaucomatous aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53: 4242-53.
94. Liton PB, Luna C, Bodman M, Hong A, Epstein DL, Gonzalez P. Induction of IL-6 by mechanical stress in the trabecular meshwork. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 337: 1229-36.
95. Tezel G, Yang X, Luo C, Kain AD, Powell DW, Kuehn MH, Kaplan HJ. Oxidative stress and the regulation of complement activation in human glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51: 5071-82.
96. Osborne NN, Wood JPM, Chidlow G, Bae JH, Melena J, Nash MS. Ganglion cell death in glaucoma: what do we really know? *Br J Ophthalmol* 1999; 83: 980-86.
97. Huang W, Dobberfuhr A, Filippopoulos T, Ingelsson M, Fileta JB, Poulin NR, Grosskreutz CL: Transcriptional up-regulation and activation of initiating caspases in experimental glaucoma. *Am J Pathol* 2005; 167: 673-81.
98. Pinazo-Durán MD, Gallego-Pinazo R, Zanón-Moreno V, Serrano M: Glaucoma genetics. Regulation of cell surviving and death in the retina. In *Glaucoma. Basic and Clinical Concepts*. Edited by Shimon Rumelkt; 2011; 207-24.
99. Razeghinejad MR, Kamali-Sarvestani E. Aqueous humor levels of soluble Fas and Fas-ligand in patients with primary open angle and pseudoexfoliation glaucoma. *Iran J Immunol* 2007; 4(4): 215-19.
100. Carswell E, Old L, Kassel R, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72 (9): 3666-70.
101. Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD, Chang M, Pan YC, Mathison J, Ulevitch R, Cerami A. Identity of tumor necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* 1985; 316 (6028): 552-4.

102. Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Jarrett-Nedwin J, Pennica D, Goeddel DV, Gray PW. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res* 1985; 13 (17): 6361-73.
103. Takeuchi T, Amano K, Kameda H, Abe T. Anti-TNF biological agents in rheumatoid arthritis and other inflammatory diseases. *Allergol Int* 2005; 54: 191-202.
104. Tang P, Hung M, Klostergaard J. Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry (Mosc)* 1996; 35 (25): 8216-25.
105. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 2003; 10 (1): 45-65.
106. Schultz R. Cell cycle, programmed cell death, and cancer. In: Devlin T, editor. *Textbook of biochemistry*. Hoboken, USA: Willey-Liss; 2006. p. 1020-4.
107. Jevtović-Stoimenov T. Genska ekspresija parametara apoptoze i metabolizam nukleinskih kiselina u limfoproliferativnim oboljenjima. Doktorska disertacija, Medicinski fakultet, Niš, 2007.
108. Li S, Tao L, Jiao X, Liu H, Cao Y, Lopez B, Luan RH, Christopher T, Ma XL. TNF- α initiated oxidative/nitrative stress mediates cardiomyocyte apoptosis in traumatic animals. *Apoptosis* 2007; 12 (10): 1795-802.
109. Perry SW, Dewhurst S, Bellizzi MJ, Gelbard HA. Tumor necrosis factor-alpha in normal and diseased brain: conflicting effects via intraneuronal receptor crosstalk? *J Neurovirol* 2002; 8: 611-24.
110. McCoy MK, Tansey MG. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J Neuroinflamm* 2008; 5: 45-60.
111. De Simoni MG, Imeri L. Cytokine-neurotransmitter interactions in the brain. *Biol Signal Recept* 1998; 7: 33-44.
112. Berger S, Savitz SI, Nijhawan S, Singh M, David J, Rosenbaum PS, Rosenbaum DM. Deleterious role of TNF-alpha in retinal ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49: 3605-10.
113. Marques-Fernandez F, Planells-Ferrer L, Gozzelino R, Galenkamp KM, Reix S, Llecha-Cano N, Lopez-Soriano J, Yuste VJ, Moubarak RS, Comella JX. TNFalpha induces survival through the FLIP-L-dependent activation of the MAPK/ERK pathway. *Cell Death Dis* 2013; 4: 493-500.
114. Varela HJ, Hernandez MR. Astrocyte responses in human optic nerve head with primary open-angle glaucoma. *J Glaucoma* 1997; 6: 303-13.

115. Dvorianchikova G, Santos AR, Saeed AM, Dvorianchikova X, Ivanov D. Putative role of protein kinase C in neurotoxic inflammation mediated by extracellular heat shock protein 70 after ischemia reperfusion. *J Neuroinflamm* 2014; 11: 81-100.
116. Son JL, Soto I, Oglesby E, Lopez-Roca T, Pease ME, Quigley HA, Marsh-Armstrong N. Glaucomatous optic nerve injury involves early astrocyte reactivity and late oligodendrocyte loss. *Glia* 2009; 58: 780-9.
117. Barakat DJ, Dvorianchikova G, Ivanov D, Shestopalov VI. Astroglial NF-kappaB mediates oxidative stress by regulation of NADPH oxidase in a model of retinal ischemia reperfusion injury. *J Neurochem* 2012; 120: 586-97.
118. Fields RD, Stevens-Graham B. New insights into neuron-glia communication. *Science* 2002; 298: 556-62.
119. Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 2005; 50: 427-34.
120. Dvorianchikova G, Ivanov D. Tumor necrosis factor-alpha mediates activation of NF-kappaB and JNK signaling cascades in retinal ganglion cells and astrocytes in opposite ways. *Eur J Neurosci* 2014; 40: 3171-78.
121. Tezel G, Wax MB. Increased production of tumor necrosis factor-alpha by glial cells exposed to simulated ischemia or elevated hydrostatic pressure induces apoptosis in cocultured retinal ganglion cells. *J Neurosci* 2000; 20(23): 8693-700.
122. Mak TW, Yeh WC. Signaling for survival and apoptosis in the immune system. *Arthritis Res* 2002; 4(3): 243-52.
123. Kamata H, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M. Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* 2005, 120: 649-61.
124. Papa S, Bubici C, Zazzeroni F, Pham CG, Kuntzen C, Knabb JR, Dean K, Franzoso G. The NF-kappaB-mediated control of the JNK cascade in the antagonism of programmed cell death in health and disease. *Cell Death Differ* 2006; 13: 712-29.
125. Haukim N, Bidwell JL, Smith AJ, Keen LJ, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, McDermott MF, Oksenberg J, McNicholl J, Pociot F, Hardt C, D'Alfonso S. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 2. *Genes Immun* 2002; 3 (6): 313-30.
126. Janssen SF, Gorgels TG, Ramdas WD, Klaver CC, van Duijn CM, Jansonius NM, Bergen AA. The vast complexity of primary open angle glaucoma: disease genes, risks, molecular mechanisms and pathobiology. *Prog Retin Eye Res* 2013; 37: 31-67.

127. Bašić J. Oksidativni stres, matriks metaloproteinaza-9 i polimerizam gena za faktor nekroze tumora i njegov receptor u juvenilnom idiopatskom artritisu. Doktorska disertacija, Medicinski fakultet, Niš, 2010.
128. Hajeer A, Hutchinson I. TNF- α polymorphism: clinical and biological implications. *Microsc Res Tech* 2000; 50: 216-28.
129. Agarwal P, Oldenburg MC, Czarneski JE, Morse RM, Hameed MR, Cohen S, Fernandes H. Comparison study for identifying promoter allelic polymorphism in interleukin 10 and tumor necrosis factor alpha genes. *Diagn Mol Pathol* 2000; 9: 158-64.
130. Al-Dabbagh NM, Al-Dohayan N, Al-Asmari A, Arfin M, Tariq M. Association of TNF- α and TNF- β Gene Polymorphisms with Primary Open Angle and Primary Angle Closure Glaucoma. In: Tomas Kubena, editor. *The Mystery of Glaucoma*. InTech; 2011; 229-56.
131. Razeghinejad MR, Rahat F, Kamali-Sarvestani E. Association of TNFA -308 G/A and TNFRI +36 A/G gene polymorphisms with glaucoma. *Ophthalmic Res* 2009; 42(3): 118-24.
132. Khan MI, Micheal S, Rana N, Akhtar F, den Hollander AI, Ahmed A, Qamar R. Association of tumor necrosis factor alpha gene polymorphism G-308A with pseudoexfoliative glaucoma in the Pakistani population. *Mol Vis* 2009; 15: 2861-7.
133. Lin HJ, Tsai FJ, Chen WC, Shi YR, Hsu Y, Tsai SW. Association of tumour necrosis factor alpha -308 gene polymorphism with primary open-angle glaucoma in Chinese. *Eye (Lond)* 2003; 17: 31-4.
134. Mossböck G, Renner W, El-Shabrawi Y, Faschinger C, Schmut O, Wedrich A, Zimmermann C, Weger M. TNF-alpha -308 G>A and -238 G>A polymorphisms are not major risk factors in Caucasian patients with exfoliation glaucoma. *Mol Vis* 2009; 15: 518-22.
135. Mossböck G, Weger M, Moray M, Renner W, Haller-Schober EM, Mattes D, Schmut O, Wegscheider B, El-Shabrawi Y. TNF-alpha promoter polymorphisms and primary open-angle glaucoma. *Eye (Lond)* 2006; 20: 1040-3.
136. Funayama T, Ishikawa K, Ohtake Y, Tanino T, Kurosaka D, Kimura I, Suzuki K, Ideta H, Nakamoto K, Yasuda N, Fujimaki T, Murakami A, Asaoka R, Hotta Y, Tanihara H, Kanamoto T, Mishima H, Fukuchi T, Abe H, Iwata T, Shimada N, Kudoh J, Shimizu N, Mashima Y. Variants in optineurin gene and their association with tumor necrosis factor-

- alpha polymorphisms in Japanese patients with glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 4359-67.
137. Fan BJ, Liu K, Wang DY, Tham CC, Tam PO, Lam DS, Pang CP. Association of polymorphisms of tumor necrosis factor and tumor protein p53 with primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51: 4110-6.
 138. Tekeli O, Turacli ME, Egin Y, Akar N, Elhan AH. Tumor necrosis factor alpha-308 gene polymorphism and pseudoexfoliation glaucoma. *Mol Vis* 2008; 14: 1815-8.
 139. Balaiya S, Edwards J, Tillis T, Khetpal V, Chalam KV. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) levels in aqueous humor of primary open angle glaucoma. *Clin Ophthalmol* 2011; 5(1): 553-6.
 140. Takai Y, Tanito M, Ohira A. Multiplex cytokine analysis of aqueous humor in eyes with primary open-angle glaucoma, exfoliation glaucoma, and cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53: 241-7.
 141. Ramos EM, Lin MT, Larson EB, Maezawa I, Tseng LH, Edwards KL, Schellenberg GD, Hansen JA, Kukull WA, Jin LW. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 10 promoter region polymorphisms and risk of late-onset Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2006; 63: 1165-9.
 142. Ma SL, Tang NLS. Association between tumor necrosis factor- α promoter polymorphism and Alzheimer's disease. *Neurology* 2004; 62: 307-9.
 143. McGeer EG, McGeer PL. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a field in its infancy. *J Alzheimers Dis* 2010; 19: 355-61.
 144. McKinnon SJ, Lehman DM, Kerrigan-Baumrind LA, Merges CA, Pease ME, Kerrigan DF, Ransom NL, Tahzib NG, Reitsamer HA, Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Zack DJ. Caspase activation and amyloid precursor protein cleavage in rat ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 1077-87.
 145. McKinnon SJ. Glaucoma: ocular Alzheimer's disease? *Front Biosci* 2003; 8: 1140-56.
 146. Tamura H, Kawakami H, Kanamoto T, Kato T, Yokoyama T, Sasaki K, Izumi Y, Matsumoto M, Mishima HK. High frequency of open-angle glaucoma in Japanese patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 2006; 246: 79-83.
 147. Chidlow G, Wood JP, Casson RJ. Expression of inducible heat shock proteins Hsp27 and Hsp70 in the visual pathway of rats subjected to various models of retinal ganglion cell injury. *PLoS One* 2014; 9(12): 114838.

148. Franklin TB, Krueger-Naug AM, Clarke DB, Arrigo AP, Currie RW. The role of heat shock proteins Hsp70 and Hsp 27 in cellular protection of the central nervous system. *Int J Hyperthermia* 2005; 21(5): 379-92.
149. Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, Garrido C. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J Cell Mol Med* 2008; 12(3): 743-61.
150. Yamashima T. Hsp70.1 and related lysosomal factors for necrotic neuronal death. *J Neurochem* 2012; 120(4): 477-94.
151. Park KH, Cozier F, Ong OC, Caprioli J. Induction of heat shock protein 72 protects retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 1522-30.
152. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Meriin AB, Sherman MY, Morimoto RI, Massie B. The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 2000; 20(19): 7146-59.
153. Chopp M. Transient hyperthermia protects against subsequent forebrain ischemic cell damage in the rat. *Neurology* 1989; 39: 1396-98.
154. Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Kuwabara K, Hata R, Handa N, Fukunaga R, Kimura K, Kamada T. Hyperthermia-induced neuronal protection against ischemic injury in gerbils. *J Cereb Blood Flow Metab* 1991; 11: 449-52.
155. Barbe MF, Tytell M, Gower DJ, Welch WJ. Hyperthermia protects against light damage in the rat retina. *Science* 1988; 241: 1817-20.
156. Lu RC, Tan MS, Wang H, Xie AM, Yu JT, Tan L. Heat shock protein 70 in Alzheimer's disease. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 435203.
157. Caprioli J, Ishii Y, Kwong JM. Retinal ganglion cell protection with geranylgeranylacetone, a heat shock protein inducer, in a rat glaucoma model. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2003; 101: 39-50; discussion 50-1.
158. Kim JM, Park KH, Kim YJ, Park HJ, Kim DM. Thermal injury induces heat shock protein in the optic nerve head in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47(11): 4888-94.
159. Tanaka Y, Kobayashi K, Kita M, Hiroco M. Expression of 47kDa heat shock protein (HSP47) during development of mouse cornea. *Exp Eye Res* 1996; 63: 383-93.
160. Laios E, Rebeyka IM, Prody CA. Characterization of cold-induced heat shock protein expression in neonatal rat cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem* 1997; 173: 153-59.

161. Tamm ER, Russell P, Johnson DH, Piatigorsky J. Human and monkey trabecular meshwork accumulate β -crystallin in response to heat shock and oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 2402-13.
162. Caprioli J, Kitano S, Morgan JE. Hyperthermia and hypoxia increase tolerance of retinal ganglion cells to anoxia and excitotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 2376-81.
163. Kim YM, Vera ME, Watkins SC, Billar TR. Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. *J Biol Chem* 1997; 272: 1402-11.
164. Chopp M, Tidwell CD, Lee YJ, Knight R, Helpert JA, Welch KM. Reduction of hyperthermic ischemic acidosis by a conditioning event in cats. *Stroke* 1989; 20: 1357-60.
165. Kitagawa K, Matsumoto M, Kuwabara K, Tagaya M, Ohtsuki T, Hata R, Ueda H, Handa N, Kimura K, Kamada T. "Ischemic tolerance" phenomenon detected in various brain regions. *Brain Res* 1991; 561: 203-11.
166. Amin V, Cumming DVE, Latchman DS. Over-expression of heat shock protein 70 protects neuronal cells against both thermal and ischaemic stress but with different efficiencies. *Neurosci Lett* 1996; 206: 45-48.
167. Sato K, Saito H, Matsuki N. HSP 70 is essential to the neuroprotective effect of heat-shock. *Brain Res* 1996; 740: 117-23.
168. Mizzen LA, Welch WJ. Characterization of the thermotolerant cell. I: effects on protein synthesis activity and the regulation of heat shock protein 70 expression. *J Cell Biol* 1988; 106: 1105-116.
169. Welch WJ, Mizzen LA. Characterization of the thermotolerant cell. II: effects of the intracellular distribution of heat-shock protein 70, intermediate filaments, and small nuclear ribonucleoprotein complexes. *J Cell Biol* 1988; 106: 1117-130.
170. Didelot C, Schmitt E, Brunet M, Maingret L, Parcellier A, Garrido C. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Handb Exp Pharmacol* 2006; 172: 171-98.
171. Nowak A, Szaflik JP, Gacek M, Przybyłowska-Sygut K, Kamińska A, Szaflik J, Majsterek I. BDNF and HSP gene polymorphisms and their influence on the progression of primary open-angle glaucoma in a Polish population. *Arch Med Sci* 2014; 10(6): 1206-13.

172. Tezel G, Hernandez R, Wax MB. Immunostaining of heat shock proteins in the retina and optic nerve head of normal and glaucomatous eyes. *Arch Ophthalmol* 2000; 118: 511-8.
173. Plumier JC, Krueger AM, Currie RW, Kontoyiannis D, Kollias G, Pagoulatos GN. Transgenic mice expressing the human inducible Hsp70 have hippocampal neurons resistant to ischemic injury. *Cell Stress Chaperones* 1997; 2: 162-67.
174. Yenari MA, Fink SL, Sun GH, Chang LK, Patel MK, Kunis DM, Onley D, Ho DY, Sapolsky RM, Steinberg GK. Gene therapy with HSP72 is neuroprotective in rat models of stroke and epilepsy. *Ann Neurol* 1998; 44: 584-91.
175. Hartle FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 1996; 381: 571-79.
176. Rokutan K, Hirakawa T, Teshima S, Nakano Y, Miyoshi M, Kawai T, Konda E, Morinaga H, Nikawa T, Kishi K. Implications of heat shock/stress proteins for medicine and disease. *J Med Invest* 1998; 44: 137-47.
177. Mailhos C, Howard MK, Latchman DS. Heat shock protects neuronal cells from programmed cell death by apoptosis. *Neuroscience* 1993; 55: 621-627.
178. Vayssier M, Polla BS. Heat shock proteins chaperoning life and death. *Cell Stress Chaperones* 1998; 3: 221-27.
179. Polla BS, Kantengwa S, François D, Salvioli S, Franceschi C, Marsac C, Cossarizza A. Mitochondria are selective target for the protective effects of heat shock against oxidative injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 6458-63.
180. Li CY, Lee JS, Ko YG, Kim JI, Seo JS. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem* 2000; 275: 25665-71.
181. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C, Massie B. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 5317-27.
182. Gregory MS, Hackett CG, Abernathy EF, Lee KS, Saff RR, Hohlbaum AM, Moody KS, Hobson MW, Jones A, Kolovou P, Karray S, Giani A, John SW, Chen DF, Marshak-Rothstein A, Ksander BR. Opposing roles for membrane bound and soluble Fas ligand in glaucoma-associated retinal ganglion cell death. *PLoS One* 2011; 6(3): e17659.
183. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995; 267: 1449-56.
184. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993; 75: 1169-78.

185. Gruss HJ, Dower SK. Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood* 1995; 85: 3378-404.
186. Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 1994; 76: 959-62.
187. Nagata S, Suda T. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol Today* 1995; 16: 39-43.
188. Rouvier E, Luciani MF, Golstein P. Fas involvement in Ca(2+)-independent T cell-mediated cytotoxicity. *J Exp Med* 1993; 177: 195-200.
189. Suda T, Okazaki T, Naito Y, Yokota T, Arai N, Ozaki S, Nakao K, Nagata S. Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. *J Immunol* 1995; 154: 3806-13.
190. Vignaux F, Vivier E, Malissen B, Depraetere V, Nagata S, Golstein P. TCR/CD3 coupling to Fas-based cytotoxicity. *J Exp Med* 1995; 181: 781-86.
191. Watanabe FR, Brannan CI, Itoh N, Yonehara S, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J Immunol* 1992; 148: 1274-79.
192. Mohler KM, Sleath PR, Fitzner JN, Cerretti DP, Alderson M, Kerwar SS, Torrance DS, Otten EC, Greenstreet T, Weerawarna K, Kronheim SR, Petersen M, Gerhart M, Kozlosky CJ, March CJ, and Black RA. Protection against a lethal dose of endotoxin by an inhibitor of tumour necrosis factor processing. *Nature* 1994; 370: 218-20.
193. McGeehan GM, Becherer JD, Bast RJ, Boyer CM, Champion B, Connolly KM, Conway JG, Furdon P, Karp S, Kidao S et al. Regulation of tumour necrosis factor- α processing by a metalloproteinase inhibitor. *Nature* 1994; 370: 558-61.
194. Tanaka M, Suda T, Takahashi T, and Nagata S. Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *Embo J* 1995; 14: 1129-35.
195. Tanaka M, Suda T, Haze K, Nakamura N, Sato K, Kimura F, Motoyoshi K, Mizuki M, Tagawa S, Ohga S, Hatake K, Drummond AH, Nagata S. Fas ligand in human serum. *Nat Med* 1996; 2: 317-22.
196. Griffith TS, Yu X, Herndon JM, Green DR, Ferguson TA. CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance. *Immunity* 1996; 5: 7-16.
197. Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 1995; 270: 1189-92.

198. Yamagami S, Kawashima H, Tsuru T, Yamagami H, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K, Gregerson DS. Role of Fas-Fas ligand interactions in the immunorejection of allogeneic mouse corneal transplants. *Transplantation* 1997; 64(8): 1107-11.
199. Sugita S, Taguchi C, Takase H, Sagawa K, Sueda J, Fukushi K, Hikita N, Watanabe T, Itoh K, Mochizuki M. Soluble Fas ligand and soluble Fas in ocular fluid of patients with uveitis. *Br J Ophthalmol* 2000; 84(10): 1130-4.
200. Hohlbaum AM, Moe S, Marshak-Rothstein A. Opposing effects of transmembrane and soluble Fas ligand expression on inflammation and tumor cell survival. *J Exp Med* 2000; 191(7): 1209-20.
201. Wax MB, Tezel G, Yang J, Peng G, Patil RV, Agarwal N, Sappington RM, Calkins DJ. Induced autoimmunity to heat shock proteins elicits glaucomatous loss of retinal ganglion cell neurons via activated T-cell-derived fas-ligand. *J Neurosci* 2008; 28(46): 12085-96.
202. Sotozono C, Sano Y, Suzuki T, Tada R, Ikeda T, Nagata S, Kinoshita S. Soluble Fas ligand expression in the ocular fluids of uveitis patients. *Curr Eye Res* 2000; 20(1): 54-7.
203. Agarwal R, Talati M, Lambert W, Clark AF, Wilson SE, Agarwal N, Wordinger RJ. Fas-activated apoptosis and apoptosis mediators in human trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res* 1999; 68: 583-90.
204. McKinnon SJ. Glaucoma: ocular Alzheimer's disease? *Front Biosci* 2003; 1: 1140-56.
205. Alvarado J, Murphy C, Juster R. Trabecular meshwork cellularity in primary open-angle glaucoma and nonglaucomatous normals. *Ophthalmology* 1984; 91: 564-79.
206. Grierson I, Howes RC. Age-related depletion of the cell population in the human trabecular meshwork. *Eye* 1987; 1: 204-10.
207. Timmer T, de Vries EG, de Jong S. Fas receptor-mediated apoptosis: a clinical application? *J Pathol* 2002; 196: 125-34.
208. Houston A, O'Connell J. The Fas signaling pathway and its role in the pathogenesis of cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4: 321-6.
209. Jevtovic-Stoimenov T, Kocic G, Pavlovic D, Macukanovic-Golubovic L, Marjanovic G, Djordjevic V, Tosić N, Pavlović S. Polymorphisms of tumor-necrosis factor-alpha - 308 and lymphotoxin-alpha + 250: possible modulation of susceptibility to apoptosis in chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphoma mononuclear cells. *Leuk Lymphoma* 2008; 49(11): 2163-9.

210. Asifa GZ, Liaquat A, Murtaza I, Kazmi SA, Javed Q. Tumor necrosis factor-alpha gene promoter region polymorphism and the risk of coronary heart disease. *Scientific World Journal* 2013; 2013: 203492.
211. Balkwill FR, Burke F. The cytokine network. *Immunol Today* 1989; 10: 299–304.
212. Hoekzema R, Murray PI, Kijlstra A. Cytokines and intraocular inflammation. *Curr Eye Res* 1990; 9: 207–11.
213. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 1991; 91: 14–22.
214. Sawada H, Fukuchi T, Tanaka T, Abe H. Tumor Necrosis Factor- α Concentrations in the Aqueous Humor of Patients with Glaucoma. *IOVS* 2010; 51 (2): 903- 6.
215. Barone FC, Arvin B, White RF, Miller A, Webb CL, Willette RN, Lysko PG, Feuerstein GZ. Tumor necrosis factor- α : a mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke* 1997; 28: 1233– 44.
216. Muñoz-Fernández MA, Fresno M. The role of tumor necrosis factor, interleukin 6, interferon- γ , and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. *Prog Neurobiol* 1998; 56: 307– 40.
217. Ertel W, Keel M, Bonaccio M, Steckholzer U, Gallati H, Kenney JS, Trentz O. Release of anti-inflammatory mediators after mechanical trauma correlates with severity of injury and clinical outcome. *J Trauma* 1995; 39: 879– 87.
218. Shohami E, Bass R, Wallach D, Yamin A, Gallily R. Inhibition of tumor necrosis factor alpha (tnf- α) activity in rat brain is associated with cerebroprotection after closed head injury. *J Cerebr Blood Flow Metab* 1996; 16: 378– 84.
219. Liu T, Clark RK, McDonnell PC, Young PR, White RF, Barone FC, Feuerstein GZ. Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. *Stroke* 1994; 25 (7): 1481–88.
220. Zorena K, Myśliwska J, Myśliwiec M, Balcerska A, Hak Ł, Lipowski P, Raczyńska K. Serum TNF-alpha level predicts nonproliferative diabetic retinopathy in children. *Mediators of Inflammation* 2007; 92196: 1–5.
221. Doganay S, Evreklioglu C, Er H, Türköz Y, Sevinç A, Mehmet N, Savli H. Comparison of serum NO, TNF- α , IL-1 β , sIL-2R, IL-6 and IL-8 levels with grades of retinopathy in patients with diabetes mellitus. *Eye* 2002; 16: 163–70.
222. Sugita S, Takase H, Taguchi C, Mochizuki M. The role of soluble TNF receptors for TNF-alpha in uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 3246–52.

223. Nakazawa T, Nakazawa C, Matsubara A, Noda K, Hisatomi T, She H, Michaud N, Hafezi-Moghadam A, Miller JW, Benowitz LI. Tumor necrosis factor- α mediates oligodendrocyte death and delayed retinal ganglion cell loss in a mouse model of glaucoma. *J Neurosci* 2006; 26: 12633–41.
224. Butt AM, Jenkins HG. Morphological changes in oligodendrocytes in the intact mouse optic nerve following intravitreal injection of tumor necrosis factor. *J Neuroimmunol* 1994; 51: 27–33.
225. Coleman M. Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 889–98.
226. Yan X, Tezel G, Wax B, Edward P. Matrix metalloproteinases and tumor necrosis factor alpha in glaucomatous optic nerve head. *Arch Ophthalmology* 2000; 118: 666–73.
227. Yuan L, Neufeld AH. Activated microglia in the human glaucomatous optic nerve head. *J Neuroscience Res* 2001; 64 (5): 523–32.
228. Chen KH, Wu CC, Roy S, Lee Sm, Liu JH. Increased interleukin-6 in aqueous humor of neovascular glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 2627–32.
229. Evereklioglu C, Er H, Türköz Y, Cekmen M. Serum levels of TNF-alpha, sIL-2R, IL-6, and IL-8 are increased and associated with elevated lipid peroxidation in patients with Behçet's disease. *Mediators Inflamm* 2002; 11(2): 87-93.
230. Gustavsson C, Agardh CD, Agardh E. Profile of intraocular tumour necrosis factor- α and interleukin-6 in diabetic subjects with different degrees of diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol* 2013; 91 (5): 445-52.
231. Kang JH, Wiggs JL, Pasquale LR. A nested case control study of plasma ICAM-1, E-selectin and TNF receptor 2 levels, and incident primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54(3): 1797-804.
232. Ghanem AA, Arafa LF, Elewa AM. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 levels in patients with primary open-angle glaucoma. *Clin Exp Ophthalmol* 2011; 2:118.
233. Fan BJ, Wang DY, Lam DS, Pang CP. Gene mapping for primary open angle glaucoma. *Clin Biochem* 2006; 39: 249-58.
234. Wang DY, Fan BJ, Chua JK, Tam PO, Leung CK, Lam DS, Pang CP. A genome-wide scan maps a novel juvenile-onset primary open-angle glaucoma locus to 15q. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 5315-21.

235. Fan BJ, Wang DY, Fan DS, Tam PO, Lam DS, Tham CC, Lam CY, Lau TC, Pang CP. SNPs and interaction analyses of myocilin, optineurin, and apolipoprotein E in primary open angle glaucoma patients. *Mol Vis* 2005; 11: 625-31.
236. Fan BJ, Wang DY, Cheng CY, Ko WC, Lam SC, Pang CP. Different WDR36 mutation pattern in Chinese patients with primary open angle glaucoma. *Mol Vis* 2009; 15: 646-53.
237. Allingham RR, Liu Y, Rhee DJ. The genetics of primary open-angle glaucoma: a review. *Exp Eye Res* 2009; 88: 837-44.
238. Aung T, Ockada L, Ebenezer ND, Morris AG, Krawczak M, Thiselton DL, Alexander C, Votruba M, Brice G, Child AH, Francis PJ, Hitchings RA, Lehmann OJ, Bhattacharya SS. A major marker for normal tension glaucoma: association with polymorphisms in the OPA1 gene. *Hum Genet* 2002; 110: 52-56.
239. Liu Y, Schmidt S, Qin X, Gibson J, Munro D, Wiggs JL, Hauser MA, Allingham RR. No association between OPA1 polymorphisms and primary open-angle glaucoma in three different populations. *Mol Vis* 2007; 13: 2137-41.
240. Yuan L, Neufeld AH. Tumor necrosis factor-alpha: a potentially neurodestructive cytokine produced by glia in the human glaucomatous optic nerve head. *Glia* 2000; 32: 42-50.
241. Wilson AG, Symons JA, McDowell YL, Giovane FS, di Duff GW. Effects of a tumor necrosis factor (TNF α) promoter base transition on transcriptional activity. *Br J Rheumatol* 1994; 33: 89.
242. Allen RD. Polymorphism of the human TNF-alpha promoter-random variation or functional diversity? *Mol Immunol* 1999; 36(15-16): 1017-27.
243. Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaf-Lafontaine N, Roland S, Mahieu P, Malaise M, De Groote D, Louis R, Belaiche J. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol* 1998; 113: 401-6.
244. Huizinga TW, Westendorp RG, Bollen EL, Keijsers V, Brinkman BM, Langermans JA, Breedveld FC, Verweij CL, van de Gaer L, Dams L, Crusius JB, García-Gonzalez A, van Oosten BW, Polman CH, Peña AS. TNF-alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. *J Neuroimmunol* 1997; 72: 149-53.

245. Yu QQ, Yao Y. A detailed meta-analysis shows no association between TNF- α -308G/A polymorphism and different forms of glaucoma. *Ophthalmic Research* 2011; 47(1): 47-51.
246. Xin X, Gao L, Wu T, Sun F. Roles of tumor necrosis factor alpha gene polymorphisms, tumor necrosis factor alpha level in aqueous humor, and the risks of open angle glaucoma: a meta-analysis. *Mol Vis* 2013; 19: 526-35.
247. Sudhakar C, Nagabhushana A, Jain N, Swarup G. NF-kappaB mediates tumor necrosis factor alpha-induced expression of optineurin, a negative regulator of NF-kappaB. *PLoS One* 2009; 4(4): e5114
248. Uglialoro AM, Turbay D, Pesavento PA, Delgado JC, McKenzie FE, Gribben JG, Hartl D, Yunis EJ, Goldfeld AE. Identification of three new single nucleotide polymorphisms in the human tumor necrosis factor- α gene promoter. *Tissue Antigens* 1998; 52: 359-67.
249. Hajeer AH, Hutchinson IV. Influence of TNF gene polymorphisms on TNF production and disease. *Hum Immunol* 2001; 62: 1191-9.
250. Skoog T, van't Hooft FM, Kallin B, Jovinge S, Boquist S, Nilsson J, Eriksson P, Hamsten A. A common functional polymorphism (CA substitution at position -863) in the promoter region of the tumour necrosis factor- α (TNF- α) gene associated with reduced circulating levels of TNF- α . *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1443-9.
251. Hightower LE. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell* 1991; 66(2): 191-7.
252. Tosaka K, Mashima Y, Funayama T, Ohtake Y, Kimura I; Glaucoma Gene Research Group. Association between open-angle glaucoma and gene polymorphism for heat-shock protein 70-1. *Jpn J Ophthalmol* 2007; 51: 417-23.
253. Meng X, Harken AH. The interaction between Hsp70 and TNF-alpha expression: a novel mechanism for protection of the myocardium against post-injury depression. *Shock* 2002; 17(5): 345-53.
254. Molvarec A, Rigó J Jr, Lázár L, Balogh K, Makó V, Cervenak L, Mézes M, Prohászka Z. Increased serum heat-shock protein 70 levels reflect systemic inflammation, oxidative stress and hepatocellular injury in preeclampsia. *Cell Stress Chaperones* 2009; 14 (2): 151-9.
255. Sahebari M, Hashemzadeh K, Mahmoudi M, Saremi Z, Mirfeizi Z. Diagnostic yield of heat shock protein 70 (HSP-70) and anti-HSP-70 in Behcet-induced uveitis. *Scand J Immunol* 2013; 77(6): 476-81.

256. Joachim SC, Wax MB, Seidel P, Pfeiffer N, Grus FH. Enhanced characterization of serum autoantibody reactivity following HSP 60 immunization in a rat model of experimental autoimmune glaucoma. *Curr Eye Res* 2010; 35(10): 900-8.
257. Wax MB, Tezel G, Kawase K, Kitazawa Y. Serum autoantibodies to heat shock proteins in glaucoma patients from Japan and the United States. *Ophthalmology* 2001; 108(2): 296-302.
258. Sohn S, Im JE, Kim TE, Kee C. Effect of heat shock protein 72 expression on etoposide-induced cell death of rat retinal ganglion cells. *Korean J Ophthalmol* 2013; 27(1): 48-51.
259. He M, Guo H, Yang X, Zhang X, Zhou L, Cheng L, Zeng H, Hu FB, Tanguay RM, Wu T. Functional SNPs in HSPA1A gene predict risk of coronary heart disease. *PLoS One* 2009; 4: 4851.
260. Ayub H, Khan MI, Micheal S, Akhtar F, Ajmal M, Shafique S, Ali SH, den Hollander AI, Ahmed A, Qamar R. Association of eNOS and HSP70 gene polymorphisms with glaucoma in Pakistani cohorts. *Mol Vis* 2010; 16: 18-25.
261. Shi H, Zhu R, Hu N, Shi J, Zhang J, Jiang L, Jiang H, Guan H. Association of frizzled-related protein (MFRP) and heat shock protein 70 (HSP70) single nucleotide polymorphisms with primary angle closure in a Han Chinese population: Jiangsu Eye Study. *Mol Vis* 2013; 19: 128-34.
262. Bayer AU, Ferrari F, Erb C. High occurrence rate of glaucoma among patients with Alzheimer's disease. *Eur Neurol* 2002; 47: 165-8.
263. Wu YR, Wang CK, Chen CM, Hsu Y, Lin SJ, Lin YY, Fung HC, Chang KH, Lee-Chen GJ. Analysis of heat-shock protein 70 gene polymorphisms and the risk of Parkinson's disease. *Hum Genet* 2004; 114: 236-41.
264. Lichtenauer M, Zimmermann M, Nickl S, Lauten A, Goebel B, Pistulli R, Yilmaz A, Figulla HR, Ankersmit HJ, Jung C. Transient hypoxia leads to increased serum levels of heat shock protein-27, -70 and caspase-cleaved cytokeratin 18. *Clin Lab* 2014; 60(2): 323-8.
265. Rea IM, McNerlan S, Pockley AG. Serum heat shock protein and anti-heat shock protein antibody levels in aging. *Exp Gerontol* 2001; 36(2): 341-52.
266. Borkenstein A, Faschinger C, Maier R, Weger M, Theisl A, Demel U, Graninger W, Irene H, Mossböck G. Measurement of tumor necrosis factor- α , interleukin-6, Fas ligand, interleukin-1 α , and interleukin-1 β in the aqueous humor of patients with open angle glaucoma using multiplex bead analysis. *Mol Vis* 2013; 19: 2306-11.

267. Mitrović S, Kelava T, Sućur A, Grčević D. Levels of Selected Aqueous Humor Mediators (IL-10, IL-17, CCL2, VEGF, FasL) in Diabetic Cataract. *Ocul Immunol Inflamm* 2016; 24(2): 159-66.
268. Okamura N, Ito Y, Shibata MA, Ikeda T, Otsuki Y. Fas-mediated apoptosis in human lens epithelial cells of cataracts associated with diabetic retinopathy. *Med Electron Microsc* 2002; 35: 234-41.
269. Kim B, Kim SY, Chung SK. Changes in apoptosis factors in lens epithelial cells of cataract patients with diabetes mellitus. *J Cataract Refract Surg* 2012; 38: 1376-81.
270. Reinhard T, Bönig H, Mayweg S, Böhringer D, Göbel U, Sundmacher R. Soluble Fas ligand and transforming growth factor beta2 in the aqueous humor of patients with endothelial immune reactions after penetrating keratoplasty. *Arch Ophthalmol* 2002; 120(12): 1630-5.

BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Marija Trenkić Božinović rođena je 28.06.1976. godine u Prokuplju, sa stalnim je mestom boravka u Nišu.

Osnovnu školu i gimnaziju prirodno-matematičkog smera završila je u Nišu. Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu upisala je 1995/96. godine, završila 2002. godine, sa prosečnom ocenom 9,78 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. U toku studija radila je dve godine kao student- demonstrator na Katedri za Patološku anatomiju, Instituta za patologiju Medicinskog fakulteta u Nišu. Bila je stipendista Fonda za talente grada Niša i Ministarstva za nauku, tehnologiju i razvoj 2002/03. godine. Dobitnik je stipendije Vlade Kraljevine Norveške za 2001. godinu.

Novembra 2003. godine zasniva stalni radni odnos na Klinici za očne bolesti Kliničnog centra u Nišu. Specijalističke studije iz Oftalmologije upisala je 20.04.2005. godine, a završila odličnom ocenom 17.12.2009. godine. Doktorske Akademske Studije- Klinička medicina, oftalmologija upisala je 2007/08. godine.

Aprila 2016. godine izabrana je u zvanje asistenta za UNO Oftalmologija na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu.

Autor je i koautor većeg broja naučnih radova.

U okviru stručnog usavršavanja boravila je na Institutu za očne bolesti Kliničkog centra Srbije u Beogradu (2009.), na Klinici za očne bolesti, Vojnomedicinske akademije u Beogradu (2013.), u Univerzitetskom medicinskom centru "Johannes Gutenberg" u Mainz-u, u Nemačkoj (stipendija Evropskog udruženja oftalmologa- SOE, 2014.) i na Klinici za očne bolesti, Univerzitetskog medicinskog centra u Maastricht-u, u Holandiji (stipendija Evropskog udruženja hirurga za kataraktu i refraktivnu hirurgiju- ESCRS, 2016.). Učestvovala je u internacionalnom projektu VISON 2020- LECOP Glaucoma Course (WHO, 2007.). Bila je stipendista ESCRS za 2009. u Barseloni. Učesnik je inostranih praktičnih kurseva “ Non-penetrating Glaucoma Surgery” i “Endophthalmitis Following Cataract Surgery” i “Weill Cornell Medical College Seminar in Ophthalmology 2015.”, u Salzburg-u, u Austriji. Dobitnik je stipendije Evropskog udruženja glaukomatologa- EGS za 2016. godinu.

Član je Srpskog lekarskog društva, Udruženja oftalmologa Srbije, Evropskog udruženja hirurga za kataraktu i refraktivnu hirurgiju (ESCRS), Udruženja glaukomatologa Srbije (UGLAS), Evropskog udruženja glaukomatologa (EGS).

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

Компаративна анализа генске варијабилности и нивоа циркулишућих фактора некрозе тумора, HSP 70 и Fas/FasL у примарном глаукому отвореног угла

која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, јун 2016. године.

Потпис аутора дисертације:


Др Марија С. Тренкић Божиновић

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

**Компаративна анализа генске варијабилности и нивоа циркулишућих фактора
некрозе тумора, HSP 70 и Fas/FasL у примарном глаукому отвореног угла**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном облику.

У Нишу, јун 2016. године.

Потпис аутора дисертације:


Др Марија С. Тренкић Божиновић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

Компаративна анализа генске варијабилности и нивоа циркулишућих фактора некрозе тумора, HSP 70 и Fas/FasL у примарном глаукому отвореног угла

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, јун 2016. године.

Потпис аутора дисертације:


Др Марија С. Тренкић Божиновић