POVEZANOST SERUMSKE KONCENTRACIJE VITAMINA D I GLAUKOMSKE OPTIČKE NEUROPATIJE KOD ŽENA

Vuković-Arar, Željka

Doctoral thesis / Disertacija

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:921571

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Željka Vuković Arar

POVEZANOST SERUMSKE KONCENTRACIJE VITAMINA D I GLAUKOMSKE OPTIČKE NEUROPATIJE KOD ŽENA

Doktorska disertacija

Osijek, 2017. godine

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Željka Vuković Arar

POVEZANOST SERUMSKE KONCENTRACIJE VITAMINA D I GLAUKOMSKE OPTIČKE NEUROPATIJE KOD ŽENA

Doktorska disertacija

Osijek, 2017. godine

Mentor rada: doc. dr. sc. Blaženka Miškić, dr. med.

Komentor rada: doc. dr. sc. Zoran Vatavuk, dr. med.

Rad ima 77 listova.

ZAHVALE

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Blaženki Miškić, dr. med. na stručnoj pomoći i savjetima, kolegijalnosti i ukazanom povjerenju pri izradi disertacije.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Zoranu Vatavuku, dr. med. na podršci pri izradi ovog rada. Hvala na stručnoj pomoći i savjetima koji su mi pomogli da lakše savladam prepreke i usvojim nova znanja.

Zahvaljujem gospođi Branki Maljković, dipl. ing. medicinske biokemije, koja mi je pomogla u biokemijskoj analizi.

Hvala mojoj sestri, prof. dr. sc. Jadranki Vuković Rodriguez, koja mi je također pomogla u biokemijskoj analizi i bila naveći kritičar.

Hvala dr. sc. Heleni Bakić, koja je svojim stručnim znanjem pomogla u statističkoj analizi ovog rada.

Hvala gospođi Jadranki Marić, dipl. ing. strojarstva, na informatičkoj i grafičkoj potpori prilikom izrade ovog rada. Zahvaljujem knjižničarki gospođi Snježani Prelević na pomoći pri pronalaženju i prikupljanju literature.

Hvala osoblju Odjela za oftalmologiju i optometriju Opće bolnice „Dr. Josip Benčević“ koje mi je pomoglo u obradi ispitanika.

Hvala roditeljima koji su mi omogućili ovaj put.

Hvala suprugu Krešimiru, na bezuvjetnoj potpori i razumijevanju pri izradi disertacije. Hvala mojoj djeci: Karli, Ivanu Franu i Petru na strpljivosti prilikom pisanja rada. Hvala našoj Ini.

Karli, Ivanu Franu i Petru posvećujem ovaj rad.

Njihova iskrena ljubav i dječja radoznalost
daju mi snagu, nadahnjuju me i vode me dalje.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Multifaktorijalna patogeneza glaukoma 1
1.1.1. Neuronalni gubitak u glaukoma uzrokovan apoptozom 2
1.1.2. Molekularni mehanizam apoptoze retinalnih ganglijskih stanica kao odgovor na povišenje intraokularnog tlaka 3
1.1.3. Vaskularna insuficijencija: drugi važan čimbenik 3
1.1.4. Uloga glutamata u smrti retinalnih ganglijskih stanica 4
1.1.5. Uloga dušikovog oksida u glaukomu 5
1.1.6. Oksidativni stres i glaukom 6
1.1.7. Važeći terapijski pristupi 7
1.2. Epidemiologija glaukoma 8
1.3. Klinički pregled kod glaukoma 9
1.4. Vitamin D 10
1.5. Dušikov oksid (NO) 15
2. HIPOTEZA 18
3. CILJ ISTRAŽIVANJA 19
4. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA 20
4.1. Ustroj studije 20
4.2. Ispitanici 21
4.3. Metode 23
4.3.1. Određivanje koncentracije vitamina D 24
4.3.2. Određivanje nitrata/nitrita (NO_3^-/NO_2^-) 24
4.3.3. Statističke metode 27
5. REZULTATI 29
5.1. Deskriptivni podaci 29
5.1.1. Dob 29
5.1.2. Spol 29
5.1.3. Ispitivane varijable 29

5.2. Usporedba oboljelih i kontrolnih ispitanica prema kliničkim parametrima 30
5.2.1. Vidna oštrina 30
5.2.2. Intraokularni tlak u obje ispitivane skupine 30
5.2.3. Pahimetrija 31
5.2.4. Promjene na glavi vidnog živca 31
5.2.5. Promjene u vidnom polju ispitanica s glaukomom i kontrolne skupine 32
5.2.6. Prosječna koncentracija kalcija i paratireoidnog hormona PTH u obje ispitivane skupine 33
5.3. Prosječna koncentracija vitamina D u obje ispitivane skupine 34
5.3.1. Ispitanici grupirani prema koncentraciji vitamina D (suficijencija, insuficijencija, deficit) 35
5.3.2. Koncentracija vitamina D ovisno o dobi ispitanica u obje skupine 36
5.4. Povezanost serumske koncentracije vitamina D s ostalim ispitivanim parametrima 38
5.5. Koncentracija NO_3/NO_2 (nitrita) u obje ispitivane skupine 39
5.5.1. Serumska koncentracija nitrita 39
5.5.2. Koncentracija nitrita ovisno o dobi ispitanica 40
5.5.3. Prikaz ispitivanih parametara, kliničkih i biokemijskih, vitamina D i nitrita 41
5.5.4. Povezanost serumske koncentracije vitamina D sa nitritima 42
5.6. Prikaz serumske koncentracije vitamina D ovisno o uznapredovalosti bolesti 43
5.6.1. Ovisnost koncentracije vitamina D o promjenama u vidnom polju 43
5.6.2. Određivanje nitrita u skupini I, II i III prema uznapredovalosti bolesti 44
5.6.3. Prikaz dobi u skupini I, II i III prema uznapredovalosti bolesti 44
5.6.4. Prikaz vrijednosti IOT u skupini I, II i III prema uznapredovalosti bolesti 45
6. RASPRAVA 46
7. ZAKLJUČCI 57
8. SAŽETAK 58
9. SUMMARY 60
10. LITERATURA 62

11. ŽIVOTOPIS 71
12. PRILOZI 77

POPIS KRATICA

PNO	papila nervi optici tj. glava vidnog živca
DNA	deoksiribonukleinska kiselina, m RNA – glasnička ribonukleinska kiselina
ECM	ekstracelularni matriks
MMP	matriks metaloproteinaza
TGF	transformirajući čimbenik rasta
TNF	čimbenik nekroze tumora
NMDA	n- metil-D-aspartat receptor
NO	dušikov oksid
NOS	sintetaza dušikovog oksida
PGOK	primarni glaukom otvorenog kuta
OHT	okularna hipertenzija
IOT	intraokularni tlak
PEX	pseudoeksfolijativni
NO_3^-/NO_2^-	nitrati/nitriti
HVP	Humphrey vidno polje
VDR	vitamin D receptor
$25(OH)D_3$	25-hidroksi vitamin D
$1,25(OH)_2D_3$	1,25 dihidroksi vitamin D
PTH	paratireoidni hormon
CAI	inhibitori karboanhidraze

POPIS TABLICA

Tablica 4.1. Različite koncentracije nitrata 26
Tablica 5.1. Prosječna koncentracija vitamina D u skupini ispitanica oboljelih od glaukoma i u kontrolnoj skupini 34
Tablica 5.2. Prikaz razlike u suficijenciji, insuficijenciji i deficitu vitamina D između skupina..... 35
Tablica 5.3. Prikaz koncentracije vitamina D ovisno o dobi ispitanica 37
Tablica 5.4. Povezanost koncentracije vitamina D s intraokularnim tlakom, promjenama na glavi vidnog živca i debljinom rožnice kod oboljelih i kontrolnih ispitanica 38
Tablica 5.5. Usporedba koncentracije nitrita ispitanica oboljelih od glaukoma i kontrolne skupine ispitanica..... 39
Tablica 5.6. Prikaz koncentracije nitrita ovisno o dobi ispitanica 40
Tablica 5.7. Prikaz kliničkih, biokemijskih parametara, te vrijednosti vitamina D i nitrita 41
Tablica 5.8. Prikaz serumske koncentracije vitamina D i nitria u tablci korelacija s drugim ispitivanim parametrima 42
Tablica 5.9. Koncentracija vitamina D uspoređena je između tri skupine ispitanica prema uznapredovalosti bolesti (MD indeks)..... 43
Tablica 5.10. Prikaz prosječne koncentracije nitrita u skupinama prema promjeni u vidnom polju 44
Tablica 5.11. Prosječna dob ispitanica u skupinama prema promjenama u vidnom polju..... 44
Tablica 5.12. Vrijednost IOT desnog oka u skupinama prema promjenama u vidnom polju 45
Tablica 5.13. Vrijednost IOT lijevog oka u skupinama prema promjenama u vidnom polju 45

POPIS SLIKA

Slika 1.1. Metabolizam vitamina D 12
Slika 4.1. Princip Griessove reakcije 27
Slika 5.1. Prosječna vrijednost intraokularnog tlaka u obje ispitivane skupine 30
Slika 5.2. Usporedba prosječne vrijednosti pahimetrije za desno i lijevo oko između skupina 31
Slika 5.3. Prikaz promjena na glavi vidnog živca (c/d omjer) između skupina 32
Slika 5.4. Prikaz promjena u vidnom polju oboljelih i kontrolnih ispitanica prema MD vrijednosti 32
Slika 5.5. Prosječna vrijednost kalcija u obje ispitivane skupine 33
Slika 5.6. Prosječna vrijednost PTH u obje ispitivane skupine 34
Slika 5.7. Prikaz prosječne koncentracije vitamina D u obje ispitivane skupine 35
Slika 5.8. Prikaz razlike koncentracija vitamina D između skupina 36
Slika 5.9. Koncentracija vitamina D u skupinama ovisno o dobi 37
Slika 5.10. Prikaz prosječne koncentracije nitrita u obje ispitivane skupine 40
Slika 5.11. Grafički prikaz koncentracije nitrita ovisno o dobi ispitanica 41

1. UVOD

Glaukom je multifaktorijalna optička neuropatija s karakterističnim stečenim gubitkom vlakana vidnog živca (1). To je skup simptoma koje karakterizira povišen očni tlak, promjene na vidnom živcu i promjene u vidnom polju. Povišen intraokularni tlak se smatra kao primarni rizik faktor odgovoran za glaukomsku optičku neuropatiju uključujući smrt ganglijskih stanica i njihovih aksona (2,3,4). Morfološke promjene optičkog diska su stanjivanje neuroretinalnog ruba, blijedoća i progresivno udubljenje («cupping») optičkog diska. Hemoragijama retinalnih živčanih vlakana prethode mjerljive promjene optičkog diska. Promjene u vidnom polju kod glaukoma otkriju se nakon što je izgubljeno 40% aksona vidnog živca. Patofiziologija glaukomske optičke neuropatije nije u potpunosti poznata. Od 1884. do 2006. godine prikazani su brojni radovi koji pokazuju važnu ulogu toksičnosti glutamata u glaukomskoj optičkoj neuropatiji (1). Do sada se zna za približno 60 tipova glaukoma. Postoji osjetljivost na povećani intraokularni tlak (veći od 21 mmHg) ili abnormalna osjetljivost na neku vrijednost intraokularnog tlaka (kao kod normotenzivnog glaukoma). Kod osoba osjetljivih na intraokularni tlak potrebno je smanjiti vrijednost tlaka zbog usporenja progresije bolesti. Ako je poremećaj glaukoma u autoregulaciji krvnih žila PNO, vazodilatacijske tvari kao što su blokatori kalcijskih kanala, djelovale bi pozitivno na otpornost glave vidnog živca na utjecaj povišenog intraokularnog tlaka. Neki oblici glaukoma su povezani s nasljeđem kao na primjer: juvenilni glaukom otvorenog kuta, kongenitalni glaukom, razvojni glaukomi i pigmentni glaukom. Identificirano je 12 lokusa za nasljedne glaukome i 7 prijemčljivih za primarni glaukom otvorenog kuta.

1.1. Multifaktorijalna patogeneza glaukoma

Glaukom je heterogena skupina bolesti i patogeneza glaukoma je multifaktorijalna. Faktori koji pridonose povišenju intraokularnog tlaka i vaskularnoj disregulaciji, primarno doprinose glaukomskoj atrofiji opstrukcijom aksoplazmatskog protoka unutar aksona retine na lamini kribrosi mijenjajući mikrocirkulaciju optičkog diska na lamini, mijenjajući laminarno glijalno i vezivno tkivo. Čimbenici koji dovode do sekundarnog oštećenja uključuju egzotoksično oštećenje uzrokovano glutamatom ili glicinom otpuštenim iz oštećenih neurona i oksidativno oštećenje uzrokovano hiperprodukcijom dušikovog oksida i drugih rektivnih metabolita kisika (5).

Suvremene hipoteze mogućih patogenih mehanizama nastanka glaukomske optičke neuropatije uključuju: egzotoksično oštećenje prekomjernim otpuštanjem retinalnog glutamata, smanjenje neuronalnog faktora rasta, peroksinitritnu toksičnost porastom aktivnosti sintetaze dušikovog oksida, imunološki posredovano oštećenje vidnog živca i oksidativni stres. Dušikov oksid uzrokuje porast oslobađanja glutamata i neuronalnu toksičnost kao reakciju sa superoksidnim anionom koji uzrokuje oksidativnim stresom inducirano oštećenje (6,7,8).

1.1.1. Neuronalni gubitak u glaukoma uzrokovan apoptozom

Karakteristična promjena glave vidnog živca u glaukoma je udubljenje („cupping“) optičkog diska gdje su izgubljene ganglijske stanice aksona. Smrt aksona je udružena s gubitkom ganglijskih stanica retine i ganglijskih stanica aksona terminalno u dorzalnom lateralnom genikulatnom tijelu. Smrt retinalnih ganglijskih stanica u glaukomskim ljudskim očima i eksperimentalnim životinjskim modelima uzrokovana je apoptozom. Apoptoza je proces programirane smrti stanice u odsutnosti upale karakterizirana DNA fragmentacijom, kromosomskim grudicama i staničnim nakupljanjem (9). Apoptoza je primarni i rani mehanizam smrti ganglijskih stanica u glaukomu. Nekroza pridonosi mehanizmu u kasnijoj fazi. Donedavno se smatralo da povišen intraokularni tlak igra veliku ulogu u smrti ganglijskih stanica uzrokovanoj apoptozom i stoga redukcija povišenog intraokularnog tlaka smanjuje napredovanje degenerativnih promjena u glaukomu. Jedna trećina do pola svih pacijenata u glaukomu imaju povišen intraokularni tlak u inicijalnoj fazi. Povišen intraokularni tlak često proizlazi iz promjena u trabekularnoj mreži, dovodeći do pogoršanja drenaže očne vodice. Trabekularna mreža je pokazala promjene citoskeleta stanica, izmijenjenu celularnost i promjene u ekstracelularnom matriksu. Nekoliko istraživača je istraživalo povezanost gubitka retinalnih ganglijskih stanica i povišenog intraokularnog tlaka. Značajna pozitivna korelacija je pokazana kod glaukomatoznih štakora (10,11,12,). Primarni mehanizam gubitka neurona je u početnoj fazi apoptoze, dok je u drugoj fazi gubitak neurona rezultat toksičnog učinka primarne degeneracije neurona uzrokovane izloženosti intraokularnom tlaku (12,13).

1.1.2. Molekularni mehanizam apoptoze retinalnih ganglijskih stanica kao odgovor na povišenje intraokularnog tlaka

Stanični odgovor na promjene intraokularnog tlaka, koji dovodi do apoptoze, nije u potpunosti poznat. Mogući mehanizam apoptoze retinalnih ganglijskih stanica je povezan s promjenama u ekstracelularnom matriksu (ECM) mrežnice glaukomskih očiju kao odgovor na povišenje intraokularnog tlaka. Opsežna pregradnja ekstracelularnog matriksa uključujući kolagen I i IV, transformirajući čimbenik rasta (TGF β-2) i matrix metaloproteinaze (MMP-1) može se zabilježiti u glaukomskim očima. Promjene u ECM komponentama mogu dovesti do interupcije stanica-stanica i do stanica-ECM interakcije, dovodeći do smrti stanica uzrokovane apoptozom (14,15,16). Rezultati navedenih studija upućuju da se nakon izlaganja povišenom intraokularnom tlaku povećava sekrecija MMP-9 od retinalnih ganglijskih stanica, što dovodi do povećane razgradnje lamine i apoptoze. Prema drugoj teoriji povišen intraokularni tlak uzrokuje mehanička oštećenja aksona ganglijskih stanica u području glave vidnog živca koji napreduje retrogradno oštećujući tijela retinalnih ganglijskih stanica. Oštećenja na tijelu retinalnih ganglijskih stanica dovode do povećane sekrecije MMP, što opet uzrokuje promjene u ECM i apoptozu. Druge alternativne teorije sugeriraju da porast MMP ekspresije kao rezultat izloženosti povišenom intraokularnom tlaku može biti posredovan neizravno podražajem neurotransmitera glutamata. Ekspresija receptora glutamata u retinalnim stanicama je udružena s porastom MMP-9 ekspresije (17). Faktori rasta i njihovi receptori reguliraju stanične funkcije, citoskeletnu organizaciju i komponente ECM u očnim tkivima. Trabekularna mreža, astrociti vidnog živca i lamine kribrose izražavaju široku lepezu čimbenika rasta kao što je neurotropni faktor i TGF β-2. Ti faktori rasta igraju važnu ulogu na normalan razvoj stanične funkcije trabekularne mreže i retine (18). TNF-A stimulacija čini se pridonosi neuronalnom oštećenju putem izravnog učinka na aksone retinalnih ganglijskih stanica i indukcijom sintetaze dušikovog oksida u astrocitima.

1.1.3. Vaskularna insuficijencija: drugi važan čimbenik

Povišen intraokularni tlak igra važnu ulogu u oštećenju retinalnih ganglijskih stanica u glaukomskim očima. Terapijska kontrola intraokularnog tlaka u mnogih pacijenata nije dovoljna za poboljšanje vidne funkcije i sprečavanja progresije bolesti. Brojni dokazi upućuju

na povezanost vaskularne insuficijencije i glaukoma. Postoji pozitivna veza glaukoma sa migrenom i perifernim vaskularnim abnormalnostima koje uključuju disregulaciju cerebralne i periferne vaskulature (19,20). Porast osjetljivosti na endotelin 1 posredovanom vazokonstrikcijom, upućuje na njegovu uključenost u vaskularne abnormalnosti. Moguća je uloga ovog vazokonstrikotora u patogenezi glaukoma, jer su otkrivene povećane razine endotelin-1 u očnoj vodici i plazmi kod glaukomskih bolesnika. Starenje se također smatra važnim čimbenikom, jer je porast rizika za glaukom uočen s povećanjem dobi, zbog progresivnog smanjenja moždane i očne perfuzije (21,22,23). Na temelju ovih opažanja može se zaključiti da neuronalne štete u glaukomu rezultiraju prednjom ishemijskom optičkom neuropatijom. U zdravom je oku konstantan protok krvi potreban za mrežnicu i glavu vidnog živca, posebice kod osoba sa niskim sistemskim krvnim tlakom koji dovodi do smanjenja očnog perfuzijskog tlaka. Smanjenje dijastoličkog perfuzijskog tlaka je prepoznato kao važan rizik faktor u nastanku glaukoma otvorenog kuta. Vaskularna insuficijencija može izravno oštetiti i uzrokovati apoptozu retinalnih ganglijskih stanica. Ekspresija MMP-9 u cirkulirajućim leukocitima uočena je kod bolesnika s normotenzivnim glaukomom. Ekspresija MMP može biti izravan odgovor na ishemijeske ozljede ili može biti sekundarni odgovor na povećanu razinu endotelina i TNF-A. Moguće je da je produkcija matrix metaloproteinaze u cirkulirajućim leukocitima u tih pacijenata uključena u djelomičnu barijeru sloma i oštećenja retinalnih ganglijskih stanica (24,25).

1.1.4. Uloga glutamata u smrti retinalnih ganglijskih stanica

Apoptotična smrt retinalnih ganglijskih stanica također se pripisuje glutamatom posredovanoj toksičnosti. Nakon izloženosti hipoksičnim uvjetima stanice mrežnice mogu otpustiti glutamat. Amino kiselina glutamat je esencijalni neurotransmiter u centralnom živčanom sustavu i retini. Koncentracija glutamata veća nego fiziološka je toksična za neurone ovisno o trajanju i opsegu povećanja koncentracije. Toksičnost glutamata su prvi put opisali Lucas i Newhouse 1957. godine kada je primjećeno uništenje retinalnih ganglijskih stanica nakon potkožne injekcije glutamata u mladih miševa. Glutamat inducira egzotoksičnost primarno posredovan ionotropskim NMDA subtip receptorima. Aktivacija NMDA receptora dovodi do otvaranja ionskih kanala i ulazak izvanstaničnog kalcija i natrija u neurone. Glutamatom posredovana NMDA toksičnost povezana je s influksom ekstracelularnog kalcija

koji je sekundarni glasnik za aktivaciju signalnog puta koji dovodi do smrti stanica (26). Aktivacija ionotropskih glutamat receptora može producirati neurotoksičnost. Neke studije sugeriraju korelaciju između povišene razine glutamata u vitreusu i apoptotične smrti retinalnih ganglijskih stanica. Egzcitotoksičnost glutamata igra važnu ulogu u neurodegenerativnim promjenama u glaukomu. Blokatori glutamata mogu umanjiti oštećenje neurona (1).

1.1.5. Uloga dušikovog oksida u glaukomu

Dušikov oksid (NO) igra važnu ulogu u tjelesnim funkcijama kad se secernira u fiziološkim koncentracijama. Prekomjerna produkcija NO je udružena sa različitim ne-neurološkim i neurološkim stanjima uključujući glaukom. Pod djelovanjem sintetaze dušikovog oksida (NOS) nastaje NO oksidacijom na L-argininu. Mogu se detektirati u 3 izoforme NOS (27). U normalnim ljudskim očima NOS-1 je pronađen u rasutim astrocitima glave vidnog živca, što ukazuje da je NOS-1 konstitutvni enzim sadržan u gliji. NO obavlja funkcije kao fiziološki medijator između astrocita i astrocita i aksona. U bolesnika s glaukomom velik broj stanica pokazuje e-NOS na vitrealnoj površini, u ostalim glijalnim stanicama i stanicama lamine kribrose u glaukomskim očima. Porast genske ekspresije mRNA i vjerojatno de novo sinteza NOS-1 izoforme uočena je na astrocitima na lamini kribrosi. NOS-3 je konstitutivni enzim prisutan u vaskularnom endotelu, stanicama prelaminarne regije glave vidnog živca u normalnim očima i funkcionira kao vazodilatator. U glaukomskim očima uzrokuje vazodilataciju i porast protoka. NOS-3 indukcija može pružiti neuroprotektivni efekt. Uloga NOS-3 prisutnih na astrocitima glave vidnog živca u glaukoma nije u potpunosti jasna (28).

NOS-2 je inducibilna forma enzima (iNOS) koja producira prekomjernu količinu NO pod različitim uvjetima kao što su izloženost citokinima i tlaku. Povišenje NO razine je pronađeno u očnoj vodici glaukomskih bolesnika i uočena je genetska povezanost između iNOS i NO razine sa smrću retinalnih ganglijskih stanica. Siu i suradnici su pokazali značajan porast IOT i značajnu redukciju broja retinalnih ganglijskih stanica kod štakora nakon laserskog tretmana (29). Uočena je veza između prekomjerne produkcije NO i smrti retinalnih ganglijskih stanica. Abnormalan sadržaj NO je pronađen u stanicama trabekularne mreže, Šlemovog kanala i cilijarnog tijela kod bolesnika s primarnim glaukomom otvorenog kuta.

Molekularni mehanizam NOS-2 indukcije i produkcije neurotoksične količine NO je proučen na kulturi astrocita ljudskog vidnog živca. Osim povišenja tlaka razni citokini igraju ključnu ulogu u NOS-2 indukciji. Izloženost vidnog živca interferonu gama i interleukinu 1β u kulturi, stimulira produkciju NOS-2 unutar 24 sata (30). TNF-A u kulturi čini se još značajnije od citokina uzrokuje indukciju NOS-2 (31). Taj citokin uz TNF-1 receptor otkriven je u glavi optičkog diska glaukomskih očiju. Ta izloženost citokina pretvara astrocite ljudskog vidnog živca u reaktivne astrocite koji sadrže NOS-2 i imaju sposobnost proizvesti neurotoksične količine NO. Osim važne uloge citokina, primjećeno je da astrociti vidnog živca koji su izloženi povišenim razinama hidrostatskog tlaka u kulturi izrazito povisuju NOS-2 razinu, što ukazuje na izravan utjecaj povišenog tlaka na indukciju NOS-2 u astrocitima (30). Direktne neurotoksične posljedice NO na retinalne ganglijske stanice u glavi vidnog živca dodatno svjedoče o neuroprotektivnim učincima aminoguanidina, specifičnog NOS-2 inhibitora u štakora s kronično povišenim intraokularnim tlakom (32). Velik broj dokaza sugerira da prekomjerne količine NO koje produciraju astrociti i mikroglija u glavi vidnog živca igraju ključnu ulogu u razvoju optičke neuropatije povezane s glaukomom. Višak NO tako proizveden ulazi slobodno u stanice nakon difuzije kroz lokalni mikrookoliš. To je slobodni radikal umjerene aktivnosti i nakon ulaska u stanicu dovodi do proizvodnje visokoreaktivnih slobodnih radikala kao što je peroksinitrit nakon kombinacije sa superoksidom (proizvod mitohondrijskog metabolizma).

1.1.6. Oksidativni stres i glaukom

Očno tkivo je opremljeno vrlo učinkovitim antioksidativnim obrambenim mehanizmom koji uključuje reducirani glutation (GHS) i superoksid dismutaza katalazni sustav. Askorbinska kiselina također ima važnu zaštitnu ulogu i njena visoka koncentracija je otkrivena u očnoj vodici, suznom filmu i središnjem rožničnom epitelu. Prekomjerno stvaranje slobodnih radikala i oksidativnog stresa je prepoznato kao etiopatogenetski faktor u mnogim očnim bolestima kao što su katarakta, senilna makularna degeneracija i glaukom.

Glaukomom zahvaćeni bolesnici su pokazali značajno potrošen antioksidativni potencijal u očnoj vodici (33), pad serumskih protutijela protiv glutation-S-transferaze (34), pad razine glutationa u plazmi (35) i povišenje proizvoda lipidne peroksidacije u plazmi (36). Vaskularna disregulacija uzrokuje ishemiju i reperfuziju pa može biti temeljni patogeni korak

u poticanju oksidativnog stresa. Pod utjecajem oksidativnog stresa, mijenjaju se endotelne funkcije, posebice proizvodnja endotelin-1 i NO. Endotelin-1 je identificiran kao mogući efektor u primarnom glaukomu otvorenog kuta koji dovodi do promjena u stanicama spužvaste trabekularne mreže uzrokujući vazokonstrikciju i time mijenja intraokularni tlak. Značajno povišena razina endotelina je otkrivena u očnoj vodici glaukomskih bolesnika u odnosu na normalne kontrole. NO, osim što uzrokuje povećano oslobađanje glutamata i neurotoksičnost, također reagira sa superoksid anionom u obliku peroksinitritnog radikala, koji dovodi do oksidativnim stresom induciranog oštećenja. Oksidativni stres kao rezultat akumulacije slobodnih radikala zajedno s aerobnim metabolizmom i vaskularnom disregulacijom oštećuje DNA stanice spužvaste trabekularne mreže (37). Kao rezultat toga izmijenjena adhezija stanica trabekularne mreže s proteinima ECM dovodi do preraspodjele staničnog citoskeleta i povećane otpornosti odtoku, te dovodi do povišenja intraokularnog tlaka (38). Opsežne promjene otkrivene u stanicama spužvastog trabekuluma bliže prednjoj sobici, pokazuju da izloženost slobodnim radikalima u prednjoj sobici igra ključnu ulogu kao patogenetski faktor. Rezultati pokusa na nekim životinjama su predložili korist od antioksidansa u glaukomske optičke neuropatije.

1.1.7. Važeći terapijski pristupi

Glaukomska optička neuropatija je kronični proces koji napreduje tijekom mnogo godina. Donedavno je modulacija povišenog intraokularnog tlaka bila jedini način terapijske intervencije. Kako glaukomske promjene napreduju unatoč dobro reguliranom intraokularnom tlaku, razvoj o tlaku nezavisnih i pretežno neuroprotektivnih strategija je izuzetno važan. Za razumijevanje patofizioloških mehanizama uključenih u glaukomsku optičku neuropatiju važno je poticati razvoj neuroprotektivnih strategija. Kao rezultat različitih terapijskih mogućnosti pokazana je učinkovitost neuroprotektivnih agenasa u eksperimentalnim studijama. Osim okularnih hipotenziva i pojačivača protoka krvi u oku, kao što su blokatori Ca kanala, pokazani su kao neuroprotektivi poboljšanjem protoka kroz glavu vidnog živca. No, problem je što ti agensi smanjuju sistemski krvni tlak i mogu pogoršati ishemiju glave vidnog živca sa smanjenjem protoka (1). Inhibitori karboanhidraze također poboljšavaju protok kroz glavu vidnog živca. Razni agensi sa antiapoptotičnom aktivnosti su procijenjeni kao neuroprotektivni učinci na pokusnim životinjama. Eritropoetin koji pomiče širenje i

diferencijaciju stanica koštane srži inhibira apoptozu kada se daje kao intravitrealna injekcija u štakora sa glaukomom i utvrđen je porast održivosti retinalnih ganglijskih stanica. Razni neurotropni čimbenici, antioksidansi (N-ace-tyl-L-cistein) i NOS inhibitori pokazali su obećavajući neuroprotektivni učinak moduliranjem procesa degeneracije retinalnih ganglijskih stanica na pokusnim životinjama (5).

1.2. Epidemiologija glaukoma

Glaukom je drugi uzrok sljepoće u svijetu. Od glaukoma danas u svijetu boluje 60,5 milijuna ljudi, a do 2020. godine se predviđa 79,6 milijuna oboljelih. Četiri i pol milijuna ljudi je slijepo od glaukoma, a do 2020. godine se predviđa 11,2 milijuna slijepih od glaukoma u svijetu. U razvijenim zemljama 50% zahvaćenih osoba ne zna da je bolesno, a u nerazvijenim i do 90%. Prevalencija glaukoma otvorenog kuta ovisna je o dobi. U dobi iznad 50 godina iznosi, po studiji Roscomona 1,9 %, a okularne hipertenzije 3,6 %. Podatak se odnosi i na našu populaciju. Godišnja incidencija glaukoma iznosi 0,025 do 0,048% i veća je u Afroamerikanaca (1). Rizični faktori za razvoj glaukoma su demografski: dob; glavni faktor koji pokazuje da je prevalencija 4-10 puta veća u dobi iznad 40 godina, spol; studije nisu pokazale da bi spol bio glavni faktor za razvoj glaukoma, rasa: pojavljuje se češće u crnaca i u ranijoj dobi.

Okularni faktori rizika su pokazali da je intraokularni tlak glavni riziko faktor. Baltimore Eye study (1) je pokazala da prevalencija raste s porastom intraokularnog tlaka, a da se vidno polje pogoršava ako je intraokularni tlak viši od 21 mmHg. Mehanička teorija pretpostavlja da intraokularni tlak direktno djeluje na laminu kribrozu. Lamina kribroza nije dovoljno otporna u gornjem i donjem polu pa se tu prvo vide karakteristični lučni defekti. Druga vaskularna teorija navodi da su promjene u mikocirkulaciji odgovorne za glaukomske promjene. Epidemiološke studije su pokazale da su varijacije diska rizični faktori za glaukom: vertikalni i horizontalni c/d koreliraju pozitivno s određenim gubitkom vidnog polja. Tako je i jedan od razloga zašto crnci imaju veću prevalenciju glaukoma otvorenog kuta činjenica da imaju veće PNO i veće c/d što je pogodnije za razvoj glaukoma (1). Visoki stupnjevi hiperopije su snažno povezani s glaukomom zatvorenog kuta, akutnim i kroničnm. Za dijabetes kao sistemski riziko faktor se smatra da su brojke pretjerane. Postoji snažna veza

između primarnog glaukoma otvorenog kuta i niskog dijastoličkog perfuzijskog tlaka. Bolesnici koji imaju noćni pad tlaka imaju povećni rizik za razvoj glaukoma otvorenog kuta. Baltimore eye studija je pokazala da prolongirana hipertenzija rezultira gubitkom autoregulacije krvnih žila što smanjuje sposobnost krvnih žila glave vidnog živca da odgovore na smanjenje dijastoličke perfuzije. Obiteljski rizik je 13-47%, a 5-20 puta raste prevalencija kod onih koji imaju pozitivnu obiteljsku anamnezu. Veća je prevalencija kod radnika koji rade na otvorenom. Roscomon studija je pokazala 7,3% prevalenciju sljepoće od glaukoma (1).

OHTS (ocular hypertnsion treatment study) govori o riziku razvoja početnog oštećenja vidnog polja i progresivnog oštećenja glave vidnog živca među onima koji nisu imali oštećenje vidnog polja, a imali su povišen intraokularni tlak. Rizik iznosi 9,5% u 5 godina.

EMGT (the early manifest glaucoma trial) je studija zlatnog standarda. Ukazuje na progresiju bolesti kod onih koji imaju gubitak vidnog polja i bez terapije su u usporedbi s onima koji su na medikamentoznoj terapiji. Velika je razlika u progresiji bolesti u onih koji nemaju gubitak vidnog polja, a imali su povišen intraokularni tlak (9,5%) i onih koji su imali blago oštećenje vidnog polja i povišen intraokularni tlak (6,2%), a bez terapije su (1,39). AGIT (Advanced Glaukoma Intervention Study) se bavila modalitetima liječenja glaukoma.

1.3. Klinički pregled kod glaukoma

Klinički pregled uključuje: tonometriju, tonografiju, gonioskopiju, analizu glave vidnog živca, analiza snopa živčanih vlakana retine, perimetriju i mjere protoka krvi kroz vidni živac (39,40). *Perimetrija:* Goldman je 1945. uveo svoj perimetar. Danas se koriste kompjuterizirani perimetri Octopus i Humphrey. Tipično za glaukom je gubitak snopa retinalnih živčanih vlakana koji imaju tendenciju poštivanja horizontalnog meridijana, posebice u nazalnoj polovini vidnog polja. Princip statičke perimetrije je da se sjaj stimulirajućeg svjetla povećava dok se ne uoči, dok se kod kinetičke perimetije stimulus kreće prema središtu vidnog polja dok se ne uoči. Kod svih SITA testova (Humphrey) koristi se bijeli podražaj veličine III (0,42 j), ako nije drugačije određeno. Stimulus varira intenzitetom od 0,8 -10000 apostilba u rangu od 5 log jedinica. Diferencijalni prag je obrnuto povezan sa intenzitetom podražaja, te se iskazuje u decibelima (dB). Svjetlina pozadine je 31,5 asb, a udaljenost na kojoj se testira je 33 cm (41,42).

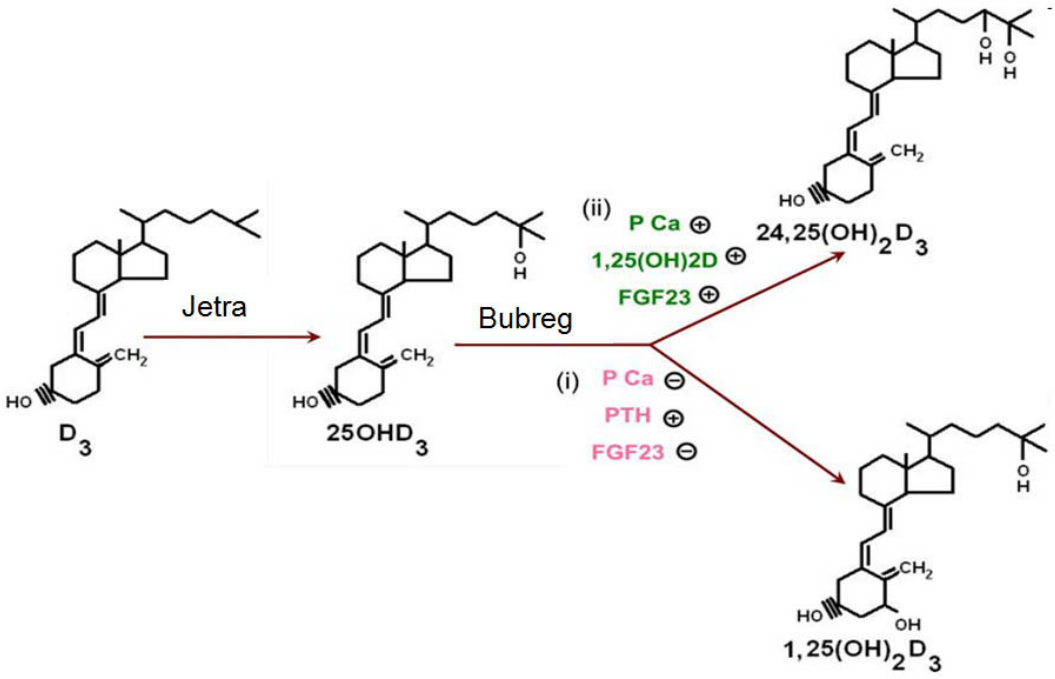
1.4. Vitamin D

Rastuća je spoznaja o brojnim važnim fiziološkim učincima vitamina D u proteklom desetljeću. Vitamin D kao steroidni hormon regulira direktno ili indirektno funkciju 3% ljudskog genoma (43). Dokazani su povoljni učinici vitamina D kod mnogih bolesti: u prevenciji srčanog i moždanog udara, šećerne bolesti tip I i II, infekcija i kroničnih bolesti dišnog sustava, autoimunih bolesti.

Windaus Adolf je identificirao i sintetizirao kemijski spoj koji predstavlja vitamin D za što je 1938. godine dobio Nobelovu nagradu (43). U 20. stoljeću je otkriveno dvostruko podrijetlo vitamina D: endogena sinteza u koži i egzogeni unos hranom. Daljnja važna otkrića u povijesti vitamina D su spoznaja o složenom metabolizmu vitamina D koji uključuje 41 metabolit, posebice otkriće 25-hidroksi vitamina D ($25(OH)D_3$) i 1,25 dihidroksi vitamina D ($1,25(OH)_2D_3$). Poznata i strogo regulirana produkcija $1,25(OH)_2D_3$ u bubregu dala mu je obilježja pravog steroidnog hormona, što je poslije potvrđeno otkrićem receptora vitamina D (VDR) u stanici koji je gotovo ubikvitarno prisutan u organizmu, a ne samo u tkivima direktno uključenim u metabolizam kalcija. Nedostatak vitamina D ovisno o težini, klasificira se kao insuficijencija ili deficijencija. Kod blažeg nedostatka vitamina D (insuficijencije) dolazi do porasta serumske koncentracije paratiroidnog hormona (PTH), što uzrokuje ubrzanu resorpciju kosti i osteoporozu. Teži nedostatak vitamina D (deficijencija) ovisno o dobi uzrokuje rahitis ili osteomalaciju. Dostatna koncentracija vitamina D se povezuje sa boljom tjelesnom sposobnosti preko utjecaja na mišićno tkivo. U epidemiološkim studijama se povezuje sa manjim morbiditetom i mortalitetom od malignih bolesti (debelo crijevo, prostata, pluća, dojka), manjim rizikom od autoimunih bolesti (šećerna bolest tipa I, multipla skleroza, Chronova bolest, upalne reumatske bolesti), manjim rizikom od kardiovaskularnih bolesti, te boljom obranom od infekcija (virusne i bakterijske respiratorne bolesti, tuberkuloza) (44,45).
Dva su osnovna oblika vitamina D: vitamin D_3 ili kolekalciferol i vitamin D_2 ili ergokalciferol. Dva su osnovna izvora vitamina D: egzogeno hranom (biljke izvor vitamina D_2, masne ribe izvor vitamina D_3) i endogeno sinteza u koži (80-90% potrebne količine vitamina D). Iz hrane se vitamin D apsorbira putem hilomikrona u limfu, potom ulazi u cirkulaciju gdje se veže na vezni protein (engl. DBP, vitamin D binding protein). U koži se pod utjecajem UV-B zraka valne duljine 290-315 nm fotokemijskom reakcijom iz prekursora

7-dehidrokolesterola (7DHC –provitamin D_3) nastaje prekolekalciferol (previtamin D_3). U koži termalnom izomerizacijom iz previtamina D_3 nastaje vitamin D_3 (kolekalciferol). Vitamin D_3 stvoren u koži ulazi u cirkulaciju gdje se vezan za DBP transportira do jetre. Dio se pohranjuje u masnom tkivu za kasniju upotrebu. Oba oblika vitamina D (egzogeni i endogeni) se metaboliziraju na isti način. Prva hidroksilacija se zbiva u jetri vezana uz citokrom P 450 na atomu C-25 pod djelovanjem mitohondrijskog enzima 25-hidroksilaze u $25(OH)D_3$, koji je glavni cirkulirajući oblik vitamina D. On održava status vitamina D u tijelu (suficijencija i insuficijencija). Njegova se koncentracija određuje kada želimo doznati status vitamina D u organizmu.

Druga hidroksilacija se zbiva u bubregu na atomu C-1 pod djelovanjem mitohondrijskog enzima 1α hidroksilaze u $1,25(OH)_2D_3$ (slika1.1). Koncentracija 1,25 $(OH)_2D_3$ je znatno niža od koncentracije $25(OH)D_3$ i iznosi 60-108 pmol/L za odrasle (43,44,45). No, njegova je aktivnost 500-1000 puta veća od aktivnosti $25(OH)D_3$, pa je on aktivni oblik vitamina D. Njegova je produkcija visoko kontrolirana preko stroge regulacije aktivnosti 1-alfa hidroksilaze. Produkciju $1,25(OH)_2D_3$ potiče PTH, a koče ioni kalcija i sam $1,25(OH)D_3$ preko kočenja sinteze PTH i aktivnosti 1-alfa hidroksilaze. $1,25(OH)_2D_3$ inaktivira se u bubregu gdje ga enzim 24-hidroksilaza pretvara u 24,25-dihidroksivitamin D i njegov metabolit topljiv u vodi izlučuje se urinom (slika 1.1.). Aktivnost 24-hidroksilaze potiče sam $1,25(OH)_2D_3$ dvojako djelujući negativnom povratnom spregom na svoju koncentraciju (koči 1-alfa hidroksilazu i potiče 24-hidroksilazu u bubregu). Osim renalne produkcije $1,25(OH)D_3$ koja je visoko regulirana s ciljem održanja normokalcemije, postoji i autonomna ekstrarenalna produkcija aktivnog oblika vitamina D u mnogim tkivima i stanicama.



Slika 1.1. Metabolizam vitamina D

(izvor: http://chemistry.gravitywaves.com/CHE452/20_Calcium%20Homeostasis16.htm)

Gotovo sva tkiva posjeduju vitamin D receptor (VDR). VDR je nuklearni transkripcijski faktor iz porodice receptora za steroidne hormone. Aktivnost vitamina D se ostvaruje putem genomskog i negenomskog učinka. Negenomski učinak nastaje vezanjem na membranski vitamin D receptor (VDR). Genomski učinak se očituje vezanjem na visokospecifičan VDR u jezgri stanice koji pokazuje značajan polimorfizam (46). Veliki doprinos razumijevanju globalne fiziološke funkcije vitamina D pridonio je miš kojemu nedostaje vitamin D receptor (engl. knockout mice for VDR) (43,46).

Brojna tkiva i stanice posjeduju i mitohondrijski enzim 1 alfa hidroksilazu: makrofagi, keratinociti, glatke mišićne stanice krvnih žila, beta stanice gušterače, stanice srca, debelog crijeva, oka, prostate, dojke i mozga, što omogućava ekstrarenalnu i autonomnu produkciju $1,25(OH)_2D_3$ (neovisno o PTH) koja je ograničena jedino bioraspoloživošću $25(OH)D_3$, tj.

statusom vitamina D u tijelu. Sve to daje mu obilježja pravog hormona, koji osim na klasične ciljne organe uključene u homeostazu kalcija (crijevo, bubreg, kost i paratiroidna žlijezda) djeluje i na druge ciljne organe i tkiva (npr. mišić, koža, gušterača, imunološki sustav). Iz toga proizlazi i otkriće novih bioloških učinaka vitamina D.

Stanice imunog sustava, osobito aktivirani makrofagi imaju sposobnost ekstrarenalne i neovisne produkcije $1,25(OH)_2D_3$. Aktivacija makrofaga preko TLR liganda kao što su lipopolisaharidi mikroorganizama ili interferon-gama (INF-γ) dovode do indukcije mitohondrijske 1-α hidroksilaze i produkcije $1,25(OH)_2D_3$ koja nije regulirana preko PTH, već ovisna samo o dostupnosti, tj. koncentraciji $25(OH)D_3$. Tako autokrino stvoreni $1,25(OH)_2D_3$ preko VDR se veže na osjetljivi element na odgovarajućem genu kao heterodimer s RXR (retinoidnim X receptorom) dovodeći do ekspresije ciljnog gena, transkripcije i de novo sinteze bjelančevina (44,45).

VDR je pronađen u nekim stanicama ganglijskog sloja, u vanjskom i unutarnjem nuklearnom sloju mrežnice i u retinalnom pigmentnom epitelu. Epitopi za VDR su pronađeni i u epitelu cilijarnog tijela. To sve govori o važnosti tog proteina u fiziologiji oka.Vitamin D preko VDR djeluje autokrino i parakrino.

Vitamin D receptor je uključen u transkripciju nekoliko ključnih proteina koji oblikuju strukture mrežnice. Prema istraživanju McGill Sveučilišta ti proteini uključuju nekoliko enzima: epidermalnu retinalnu dehidrogenazu, membranski protein vanjskog segmenta retine, retinalni pigmentni epitelni specifični protein, retinaldehid vežući protein 1 i druge (47).

Epitopi za kalcitriol, ATP ovisnu plazma membransku kalcijsku pumpu (PMCA) i 28-kD vitamin D ovisnu Ca vežući protein (kalbindin- D28k) su otkriveni u dijelu očiju albino štakora koristeći svjetlosni mikroskop i imunohistokemijski parafinom imbibirano tkivo. Kalcitriol receptor i kalbindin D 28k epitopi su detektirani u vanjskom i unutarnjem listu epitela cilijarnog tijela. Plazma membranska kalcijska pumpa (PMCA) je pronađena u oba lista epitela cilijarnog tijela, ali značajnije u unutarnjem (48). Epitopi za VDR i kalcijski vezajući protein su prisutni u unutarnjem i vanjskom segmentu fotoreceptora gdje se dešava vidni prijenos. Neka imunokemijska bojanja su pokazala prisutnost receptora za VDR, PMCA i kalbindin D28k u endotelu i bazalnom epitelu rožnice. Prisutnost tih proteina u nekim tkivima ljudskog oka sugerira da ti proteini igraju ulogu u celularnoj fiziologiji oka. Njihova točna funkcija u oku nije u potpunosti poznata (49). Rezultati nekih istraživanja sugeriraju da

$1,25(OH)_2D_3$ ima genomsku regulatornu akciju uključenu u staničnu proliferaciju, diferencijaciju i funkciju nekih stanica u oku i udruženim tkivima (50).

Određivanjem $25(OH)D_3$ u krvi smatra se dobrim pokazateljem statusa vitamina D u tijelu. Prema standardiziranim jedinicama koncentracija $25(OH)D_3$ u krvi izražava se nmol/L, tako 2,5 nmol/L približno odgovara 1ng/ml (1ng/ml=2,496nmol/L). Nema opće prihvaćenih smjernica o tome koja je koncentracija $25(OH)D_3$ dostatana koncentracija vitamina D. Tako prema većini studija i vodećih stručnjaka suficijentna koncentracija vitamina D iznosi oko 75nmol/L (30ng/ml) što je ujedno i najniža koncentracija vitamina D sposobna spriječiti porast PTH, te osigurati učinkovitu apsorpciju kalcija u cijevima kako bi se osiguralo zdravlje kostiju. Koncentracije između 50-75 nmol/L (20-30 ng/ml) smatraju se nedostatkom vitamina D i imaju negativan učinak na mineralnu gustoću kosti i moguć negativan učinak na mišić i tjelesnu sposobnost (51,52,53,54). Vrijednosti manje od 50 nmol/L smatraju se deficitom vitamina D, a manje od 30 nmol/L smatraju se teškim deficitom vitamina D, dok vrijednosti manje od 20 nmol/ uzrokuju ozbiljan poremećaj metabolizma kosti, odnosno, ovisno o dobi rahitis ili osteomalaciju, kao i miopatiju s nedvojenim negativnim učinkom na tjelesnu sposobnost (45,54). Preporuke američkog Instituta za medicinu, prehranu i nutricionizam za serumsku razinu vitamina D su: ≥50nmol / L (≥20 ng/ml) smatra se normalnom razinom, dok je razina u rasponu od 30-50nmol/L (12-20 ng/ml) (insuficijentna) nedovoljna, a deficijentna je razina vitamina D ≤30 nmol/L (≤12 ng/ml). Efekti vitamina D očituju se u oslobađanju proinflamatornih kemokina u ciljnim tkivima. Na makrofagima inhibiraju oslobađanje COX-a i iNOS-a (enzimi) i smanjuju produkciju dušikovog oksida i prostaglandina (55).

Topikalna aplikacija $1,25(OH)_2D_3$ i njegovog analoga 2-metilen-19-nor-(20S)-1α,25-dihidroksivitamina D (2MD) značajno reducira intraokularni tlak u nehumanih primata (56). Redukcija intraokularnog tlaka nije rezultat redukcije očne vodice. $1,25(OH)_2D_3$ modulira ekspresiju gena koji su uključeni u regulaciju intraokularnog tlaka u nehumanih primata. $1,25(OH)_2D_3$ suprimira ekspresiju angiotenzin konvertirajućeg enzima (ACE), inhibitora karboanhidraze (CAI) i značajno povećava ekspresiju kemokina, povisuje razinu matrix metaloproteinaze te može remodelirati exstracelularni matrix, rezultirajući porastom protoka tekućine sa smanjenjem rezistencije protoka kroz disrupciju celularnih adhezija i redukciju kontraktilnih molekula. Disrupcija aktina može dovesti do alteracije stanične morfologije i adhezija, koje ako su na prednjem segmentu oka mogu rezultirati relaksacijom trabekularne

mreže, što rezultira velikim protokom tekućine i značajno reducira intraokularni tlak. Pronađeno je da $1,25(OH)_2D_3$ regulira i ekspresiju gena kao što su kemokini koji neutraliziraju indukciju okularne hipertenzije. Mehanizam kojim vitamin D reducira intraokularni tlak nije jasno poznat (56). Vjerojatno je rezultat mnogih faktora (51). Okularna hipertenzija je primarni riziko faktor u nastanku glaukoma. Povišen intraokularni tlak je rezultat porasta rezistencije na protok u konvencionalnom putu. Ključna signalna molekula za lokalnu regulaciju vaskularnog tonusa je dušikov oksid (NO), slobodni radikal koji producira vaskularni endotel pod djelovanjem enzima endotelijalne sintetaze dušikovog oksida (eNOS), kroz konverziju L arginina u L citrulin. Na celularnoj razini NO dovodi do relaksacije trabekularne mreže i smanjenja stacionarnog volumena porastom protoka. Porast razine NO pod djelovanjem eNOS u endotelu prednjeg segmenta može povećati konvencionalni protok i smanjiti intraokularni tlak (6,55). Prethodne studije pokazuju da povećanje razine NO povećava protok. Nastaje regulatorni povratni mehanizam u trabekularnoj mreži koji pridonosi regulaciji IOT (7). U tom sistemu porast IOT nastaje produkcijom NO koji pokrene porast protoka. 1,25 $(OH)_2D_3$ ovisna doza inhibira iNOS mRNA ekspresiju na makrofagu sličnim RAW 264,7 stanicama i značajno reducira NO otpuštanje i peroksinitritnu (OONO(-)) produkciju. $1,25(OH)_2D_3$ inhibira iNOS ekspresiju i reducira NO produkciju u stimuliranim makrofagima u rasponu fiziološke doze. $1,25(OH)_2D_3$ produkcija u makrofagima djeluje protektivno samo po sebi na oksidativnu ozljedu uzrokovanu „eksplozijom“ NO (57).

1.5. Dušikov oksid (NO)

Dušikov oksid je široko poznat, važan intracelularni glasnik u kardiovaskularnom, živčanom sustavu i imunološkim reakcijama uključujući oko. On pridonosi fiziološkoj regulaciji okularne hemodinamike i stanica sposobnih za život. Štiti vaskularne endotelne stanice i živčane stanice od patogenih čimbenika povezanih s glaukomom, ishemijom i šećernom bolesti (58). Protok krvi u oku je reguliran otpuštanjem NO od endotela i eferentnih neurona. Endotelna disfunkcija oštećuje okularnu hemodinamiku smanjenjem bioraspoloživosti NO i povećanim stvaranjem reaktivnih vrsta kisika (ROS). S druge strane, NO nastao pod utjecajem inducibilne sintetaze (iNOS) pobuđuje neurodegeneraciju i staničnu apoptozu dovodeći do ozbiljnih očnih bolesti. Zbog dihotomnih uloga NO, koje su i pozitivne

i patogene, može se suočiti s poteškoćama u izgradnji terapijske strategije s NO suplementacjom ili NOS inhibicijom (58).

Dušikov oksid (NO) spada u skupinu slobodnih kisikovih radikala zajedno s vodikovim peroksidom (H_2O_2), superoksiodom (O_2) i perosinitritom ($ONOO^-$). NO se stvara pod utjecajem agonista i fizikalnih stimulusa u raznim tkivima iz L arginina katalitičkim djelovanjem konstitutivne i inducibilne sintetaze NO. NO nastaje od gvanidinske skupine L arginina u prisutnosti kisika, a kao nusproizvod nastaje L citrulin (59). Sintetaza dušikovog oksida je izuzetno složen enzim koji djeluje na molekularni kisik, arginin, NADPH i producira NO, citrulin i NADPH. Za taj proces treba 5 dodatnih kofaktora (FMN, FAD, hem, kalmodulin i tetrahidrobiopterin) i dva divalentna kationa (60). Sintetaze dušikovog oksida (NOS) dijelimo na kostitutivne i inducibilne sintetaze NO. Poznate su tri izoforme sintetaze NO. Izoenzim I, konstitutivni enzim ili cNOS (NOS-1) je prisutan u mozgu, perifernim živcima, te nekim epitelnim stanicama. Fiziološki je medijator između samih astrocita, te astrocita i aksona. Kod bolesnika s glaukomom velik broj stanica pokazuje cNOS pozitivan na vitrealnoj površini, ostatku glijalnih stanica i na stanicama lamine kribrose. Ovisan je o kalciju i kalmodulinu. Izoenzim II NO sintetaze je inducibilni enzim ili iNOS (NOS II). Nalazi se u makrofagima i induciran je citokinma i bakterijskim endotoksinom, odnosno lipopolisaharidima. Može se stimulirati u uvjetima stresa, upale i infekcije. Nije ovisan o kalciju. Izoenzim III NO sintetaze se nalazi u endotelnim stanicama (eNOS ili NOS III), a aktivnost mu je vezana uz kalcij i kalmodulin. Ubraja se u konstitutivne NO sintetaze. Prisutan je u vaskularnim endotelnim stanicama u prelaminarnoj regiji glave vidnog živca. Biološka aktivnost NO je prvo cijenjena kad je identificiran kao endotelno dobiveni relaksirajući faktor (EDRF) odgovoran za snažno vazodilatatorno svojstvo stimuliranog endotela. Od tada je NO prepoznat kao pleotropni biološki posrednik koji regulira različite aktivnosti u rasponu od živčanih funkcija do regulacije imunološkog sustava. To je plinoviti slobodni radikal s kratkim poluvremenom života in vivo od nekoliko sekundi i manje. Procjena NO u tkivima i biološkim tekućinama većinom je temeljena na mjerenju nitrita (NO_2^-) i nitrata (NO_3^-), krajnjeg produkta metabolizma NO (61,62). Serumska koncentracija nitrita i nitrata je različita u različitim dobnim skupinama u fiziološkim stanjima ovisno o metabolizmu sa dobi. Najbolji indeks totalne NO produkcije je suma ukupnih nitrata i nitrita prikazana kao nitriti (62). Farmakološki efekt NO može biti umanjen sa superoksidnim radikalima kao važnim faktorima na poluživot

NO. Iako je NO jedna od najmanjih i najjednostavnijih biološki aktivnih molekula u prirodi važna je molekula na području neuroznanosti, u fiziologiji i imunologiji, te je 1992. godine proglašena „molekulom godine“. Robert F. Furchgott, Luis J. Ignarro i Ferid Murad su 1998. godine dobili Nobelovu nagradu iz područja medicine zbog otkrića novog načela signalnog mehanizma u biološkim sustavima (63).

Ukoliko postoji dostatna koncentracija vitamina D moguće je njegovo imunomodulatorno djelovanje. Povezanost mogućih patogenih mehanizama nastanka glaukomske optičke neuropatije i imunomodulatornih svojstava vitamina D, nastojat ćemo prikazati kliničkim istraživanjem uspoređujući serumsku razinu vitamina D i glaukoma. Budući da je dokazana prisutnost vitamin D receptora (VDR) u mnogim strukturama ljudskog oka, ova vrsta istraživanja otvara mogućnost istraživanja na molekularnoj razini, novi dijagnostički i terapijaski pristup, kako u sistemskoj tako i u lokalnoj primjeni vitamina D (autokrino i parakrino djelovanje).

2. HIPOTEZA

Snižena serumska koncentracija vitamina D je povezana s glaukomskom optičkom neuropatijom uslijed povišene razine nitrata/nitrita.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

U okviru ovog rada istražit će se utjecaj vitamina D na glaukom kao bolest i to provedbom slijedećih ispitivanja:

a) utvrditi serumska koncentracija vitamina D u obje ispitivane skupine, te usporediti razlike u dobivenoj serumskoj koncentraciji vitamina D između spomenute dvije skupine ispitanica
b) odrediti serumska koncentracija nitrata/nitrita u krvi kao krajnjeg produkta metabolizma NO, te usporediti razlike u dobivenoj koncentraciji nitrata/nitrita između dvije navedene skupine ispitanica
c) utvrditi povezanost serumske koncentracije vitamina D s ostalim promatranim parametrima za nastanak glaukoma (visina intraokularnog tlaka, promjena na glavi vidnog živca, pahimetrija)
d) ispitati utjecaj nedostatka vitamina D kod bolesnika s glaukomom ovisno o uznapredovalosti bolesti (prema promjenama u vidnom polju).

4. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA

4.1. Ustroj studije

U opažajno presječno istraživanje je uključeno 90 ispitanica oboljelih od glaukoma i okularne hipertenzije u dobi od 45 do 55 godine starosti. Ispitanice su podijeljene u 3 skupine ovisno o izraženosti kliničke slike prema promjenama u vidnom polju. Ispitanice su žene oboljele od glaukoma i okularne hipertenzije iz Registra za glaukom Odjela za oftalmologiju i optometriju Opće bolnice „Dr. Josip Benčević“. U kontrolnu skupinu je uključeno 50 ispitanica iste dobne skupine. Kontrolna skupina je slijepo izabrana i bez oftalmološke patologije.

Kriterij za uključivanje ispitanica u istraživanje: u studiju su uključene ispitanice oboljele od primarnog glaukoma otvorenog kuta i okularne hipertenzije.

Isključni kriteriji za isključivanje ispitanica iz studije: u studiju nisu uključene ispitanice koje imaju bilo koju bolest koštanog metaboličkog sustava, ispitanice sa primarnim hiperparatiroidizmom, ispitanice koje boluju od pseudoeksfolijativnog oblika glaukoma otvorenog kuta, te ispitanice sa drugom intraokularnom patologijom uključujući retinalnu. Iz istraživanja su isključene i ispitanice koje su na nadomjesnoj terapiji vitaminom D kao i one koje iz bilo kojeg razloga mogu imati promijenjenu serumsku koncentraciju vitamina D (solarij, rad na otvorenom, prehrana). Uzorak krvi za određivanje vitamina D i nitrata/nitrita uziman je u rano proljeće (2-4 mjesec).

Dijagnostički postupci i metode: Nakon uzete anamneze ispitanicama je izvršen oftalmološki pregled koji uključuje: određivanje vidne oštrine, pregled očne pozadine, mjerenje očnog tlaka, biomikroskopski pregled, te gonioskopija, pahimetrija i vidno polje po Humphreyu.

Istraživanje je provedeno u ambulanti za glaukom Odjela za oftalmologiju i optometriju Opće bolnice „Dr. Josip Benčevć“ u Slavonskom Brodu, biokemijskom laboratoriju iste bolnice, te na Katedri za analitiku i kontrolu lijekova Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta u Zagrebu.

4.2. Ispitanici

Tijekom rada ambulante za glaukom na Odjelu za oftalmologiju i optometriju Opće bolnice „Dr. Josip Benčević“ prikupljani su podatci o ispitanicama oboljelim od glaukoma i okularne hipertenzije. Dijagnostički kriteriji za primarni glaukom otvorenog kuta su: vrijednost intraokularnog tlaka iznad 21 mmHg, otvoren kut prednje sobice, promjene na vidnom živcu i u vidnom polju, bez znakova sekundarnog glaukoma. Kontrolna skupina su naslijepo izabrane ispitanice bez oftalmološke patologije. Svim ispitanicama su uzeti anamnestički podaci, kompletan oftalmološki pregled i učinjeno vidno polje. Ispitanicama je uzet uzorak venske krvi (5 ml) za određivanje koncentracije vitamina D i nitrata/nitrita u serumu. Uzorci pune krvi za određivanje serumske koncentracije vitamina D i nitrata/nitrita su čuvani u standardnim epruvetama za biokemijsku analizu smrznuti na odgovarajućoj temperaturi do vršene analize. Sve ispitanice su upoznate o metodi i svrsi istraživanja, te su potpisale informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju. Za ispitanice neće biti dodatnih rizika, ali ni neposredne koristi ni štete ako budu podvrgnute istraživanju. Ispitanice su podrvrgnute samo rutinskim dijagnostičkim metodama koje se koriste u uzimanju oftalmološkog statusa. Uzorci krvi potrebni za određivanje vitamina D i nitrata/nitrita nisu korišteni u druge svrhe. Svi podaci prikupljeni za vrijeme istraživanja korišteni su samo izradu doktorske disertacije i planiranih publikacija u vezi s njom.

U našoj ustanovi (Odjel za oftalmologiju i optometriju Opće bolnice „Dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu), 2012. godine osnovali smo Registar glaukomskih bolesnika. Budući da se terapijski dobro regulirani glaukomski bolesnici kontroliraju dva puta godišnje, nakon godinu dana praćenja dobili smo rezultate koji su zadovoljavajući za interpretaciju. Registrirano je 620 bolesnika. Ako se taj broj uzme na broj stanovnika onda je prevalencija 0,8% (po Baltimor studiji prevalencija je 1,3%, po Beaver Dam studiji 0,9% kod bijelaca u dobi od 43 do 54 godine). Od toga je 427 žena i 193 muškarca, tj. 69% žena i 31% muškaraca. Ispod 40 godina je 7 bolesnika što iznosi 1,1%. Budući da se glaukom pojavljuje češće u dobi iznad 40 godine života, uzeli smo skupinu žena u dobi iznad 40 (45-55 godina) kod kojih bolest nije dugog trajanja. Kod skupine bolesnica u dobi između 45 i 55 godine starosti razina vitamina D nije snižena kao kod žena iznad 60 godine starosti.

Na području zemljopisnih širina udaljenih od ekvatora, tj. iznad 35 stupnjeva sjeverno i južno vrlo se malo proizvodi vitamina D u koži od 10. do 3. mjeseca bez obzira na izlaganje

kože suncu. U ostatku godine dovoljno je izložiti kožu lica i ruku suncu 10 do 15 minuta na dan da bi se stvorila dovoljna količina vitamina D u koži pod uvjetom da se suncu izlaže rano ujutro ili kasno popodne. Koncentracija vitamina D pokazuje sezonske varijacije. Najniža je u kasnu zimu i rano proljeće, a najviša ljeti i u ranu jesen. Hrvatska se nalazi između 42 i 46 stupnja sjeverne zemljopisne širine i stoga se očekuju sezonske varijacije u koncentraciji vitamina D (64).

4.3. Metode

Ispitanicama su uzeti anamnestički podaci te kompletan oftalmološki pregled.

Oftalmološki pregled ispitanica uključenih u studiju uključuje:

- ispitivanje vidne oštrine subjektivnom metodom standardnim optotipima po SI tablicama,
- biomikroskopski pregled prednjeg očnog segmenta na biomikroskopu (Haag-Streit, Bern, Swiss made),
- mjerenje intraokularnog tlaka aplanacionim tonometrom po Goldmanu (izraženo u mmHg),
- pregled očne pozadine direktnom ili indirektnom oftalmoskopijom,
- pahimetrija (mjerenje debjine rožnice izraženo u μm),
- gonioskopija (pregled komornog kuta, indirektno Goldmanovom lećom)
- analiza vidnog polja vršena je kompjuteriziranom statičkom perimetrijom po

Humphreyu u programu SITA fast (Thereshold 24-2 (Carl Zeiss Meditec, Dublin, CA) izraženo prema vrijednosti indeksa MD (mean deviation).

Korištenje 24-2 programa skraćuje vrijeme ispitivanja i poboljšava suradljivost bolesnika. Indeks MD je vrijednost prosječnog gubitka vidnog polja i predstavlja razliku između utvrđene prosječne senzitivnosti i srednje vrijednosti normalne senzitivnosti za dato godište. To je mjera prosječne razlike između vrijednosti praga svake test lokacije i normalnih vrijednosti ovisnih o dobi. MD je uglavnom indeks veličine defekta vidnog polja, nije indikator generalizirane depresije vidnog polja, ali je vrlo osjetljiv na generalizirani gubitak osjetljivosti. Veliki lokalizirani defekti također utječu na vrijednost MD. Mora se dati jači svjetlosni podražaj kako bi pacijent primjetio test značku. Vrijednost indeksa MD kod 95% normalne populacije kreću se u rasponu od -2,4dB do +2,4 dB ±SD i rezultat su normalnih varijacija senzitivnosti retine (65). Pozitivni brojevi ukazuju na „povišeno“ polje, a negativni brojevi ukazuju na „depresiju“ polja.

Ukupni kalcij (Ca) je određivan na automatskom analizatoru Au 680 (Beckman Coutler, Fullerton, SAD) s pripadajućim originalnim reagensima istog proizvođača.

PTH i vitamin D u plazmi su određivani elektrokemiluminiscentnom metodom na Elecys 2010 cobas e 411 (Roche Diagnostics, Manheim, Njemačka) s pripadajućim reagensima.Nitrati (NO_3^-) /Nitriti (NO_2^-) su određivani metodom po Griessu.

4.3.1. Određivanje koncentracije vitamina D

Mjerenje serumske koncentracije vitamina D u serumu je određivano elektrokemiluminescentnom imunometodom na komercijalnom testu Elecsys 2010 vitamin D, koji je namijenjen za kvantitativno određivanje ukupnog 25-hidroksi vitamin D u ljudskom serumu i plazmi. On reflektira ukupni vitamin D uključujući D_3 nastao u koži, te D_2 i D_3 nastao iz uzete hrane i dodataka prehrani. Elecsys 2010 je elektrokemiluminescentna imunometoda namijenjena za uporabu u Elecsys i Cobas 411 imuno analizatorima. Princip testa je kompetitivan. Ukupno trajanje testa je 27 minuta. Čine ga tri inkubacije. U prvoj inkubaciji uzorak se pretretira s 2 reagesa nakon čega dolazi do oslobađanja vitamina D od vitamin D vežućeg proteina. Nastao uzorak se inkubira s rutenijem obilježen vitamin D vežućeg proteina, i tako nastaje kompleks vitamin D-rutenijem obilježen vitamin D vežući protein. U trećoj inkubaciji nakon dodavanja vitamin D obilježenog s biotinom i streptavidinom obilježeni mikropartikli, dolazi do vezanja slobodnog rutenijm obilježenog vitamin D vežućeg proteina i vitamina D obilježenog biotinom. Nastao kompleks se formira i postaje vezan za čvrste faze putem interakcije biotina i streptavidina. Reakcijska smjesa se aspirira u mjerne stanice u kojim su mikročestice zarobljene na površini elektrode. Slobodne supstance se presele u ProCell/ProCell M. Primjena napona na elektrodi inducira kemiluminiscentnu emisiju koja se mjeri fotomultiplikatorom nakon čega se radi kalibracija rezultata (Roche,Ggermany).

4.3.2. Određivanje nitrata/nitrita (NO_3^-/NO_2^-)

NO se sintetizira u biološkim sustavima pod djelovanjem enzima sintetaze dušikovog oksida (NOS). NOS je izuzetno složen enzim koji djeluje na molekularni kisik, arginin, NADPH i producira NO, citrulin i $NADP^+$. Za taj proces treba pet dodatnih kofaktora (FMN; FAD, hem, kalmodulin i tetrahidrobiopterin) i dva divalentna kationa (62).

NO prolazi niz reakcija s nekoliko molekula prisutnih u biološkim tekućinama.One uključuju:

$NO + O_2^-$ ---------- $ONO_2^- + H^+$ ---------- $NO_3^- + H^+$

$2NO + O_2$ ---------- $N_2O_4 + H_2O$ ---------- $NO_2^- + NO_3^-$

$NO + NO_2$ ---------- $N_2O_3 + H_2O$ ---------- $2NO_2^-$

Konačni produkt NO *in vivo* su nitriti (NO_2^-) i nitrati (NO_3^-). Odnos nitrita i nitrata je relativan i ne može se sa sigurnošću predvidjeti. Stoga je najbolji indeks ukupne produkcije NO zbroj nitrita i nitrata.

Princip Griessove reakcije:

U kiselim uvjetima nitriti reagiraju sa sulfanilamidom (Griess I) i nastaje diazonium ion koji se poveže s N-(1-naftil-etilendiaminom)-NED-(Griess II) i nastane ljubičasti azo proizvod koji apsorbira na 540 nm (slika 4.1). Da bi se dobio kiseli pH potrebno je za tu reakciju upotrijebiti različite kiseline (klorovodična, octena, fosforna) u različitim koncentracijama i posljedično se dobiju različite vrijednosti pH.

Reagensi

Za određivanje NO_3^-/NO_2^- (nitrati/nitriti) korištene su sljedeće otopine: standardna otopina natrijeva nitrata (200 μM, Kemika, Hrvatska), 1% sulfonamid (Sigma Aldrich, SAD) otopljen u 5% fosfatnoj kiselini (Lachron, Češka Republika), 0,1% N-(1-naftil)etilendiamin dihidroklorid (NED) (Sigma Aldrich, SAD), 20 mM Tris pufer (pH 7,6) (Sigma Aldrich) otopina NADPH (0,625 mg/mL) (Sigma Aldrich), nitrat reduktaza iz Aspergilus vrsta (250 mU/mL) (Sigma Aldrich). Sve otopine pripremljene su korištenjem ultračiste vode, ukoliko nije drugačije navedeno. Otopine nitrat reduktaze i NADPH čuvaju se na 0-5°C, zaštićene od svjetla, te se trebaju upotrijebiti unutar 2 tjedna.

Postupak određivanja sadržaja NO_3^-/NO_2^- u serumu

Deproteinizacija seruma provedena je centrifugiranjem kroz 10kDa filtre (Pall Corporation, SAD). Filtri su prethodno isprani s puferskom otopinom. Standardna otopina nitrata (200 μM) je korištena za pripremu kalibracijskog pravca. Pravac je dobiven

korištenjem šest različitih koncentracija nitrata (5, 10, 20, 30, 40 i 50 µM) dobivenih razrjeđivanjem standardne otopine prema navedenoj shemi (tablica br.3.1).

Tablica 4.1. Različite koncentracije nitrata

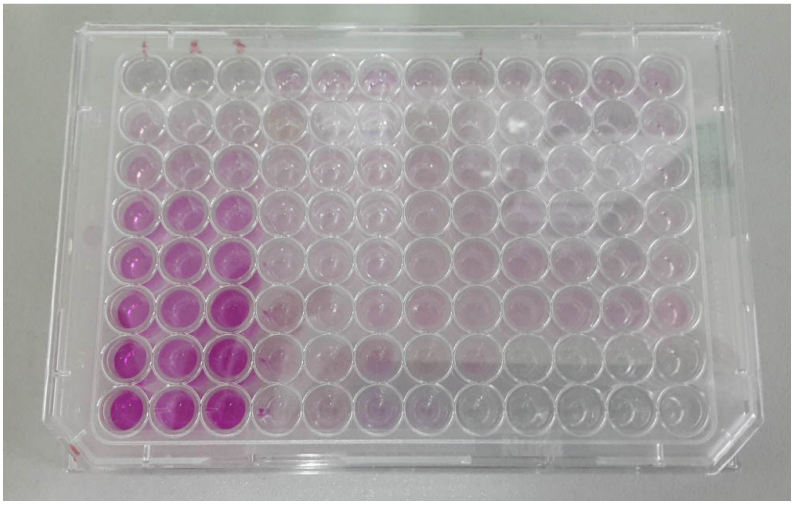
koncentracija (µM)	$NaNO_3$ (µL)	TRIS pufer (µL)
0	0	80
5	5	75
10	10	70
20	20	60
30	30	50
40	40	40
50	50	30

Dobivanje kalibracijskog pravca kao i određivanje sadržaja NO_3^-/NO_2^- provedeno je u mikrotitarskim pločicama, ravnog dna s 96 jažica (Nunc-Nundon, Danska). Mjerenje je provedeno na čitaču mikrotitarskih pločica (The Wallac Victor, Perkin Elmer, SAD).

Određivanje NO_3^-/NO_2^- provedeno je s 50 µL profiltriranog uzorka seruma. Konačni volumen uzorka od 80 µL je podešen dodatkom Tris pufera. U tako pripremljene uzorke u mikrotitarskoj ploči doda se 10 µL NADPH i 10 µL nitrat reduktaze. Ploča se prekrije i inkubira 2h na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije u svaku reakcijsku smjesu se doda 50 µL 1% sulfanilamida i 50 µL 0,1% NED, promiješa, te ostavi stajati 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon stajanja mjeri se apsorbancija na 540 nm pomoću čitača mikropločica.

Dobivena apsorbancija svakog uzorka korigira se s vrijednostima dobivenim za slijepi uzorak. Sadržaj NO_3^-/NO_2^- se dobije iz kalibracijskog pravca nitrata dobivenog iz odnosa apsorbancije i koncentracije standardne otopine nitrata. Izračunavanje sadržaja NO_3^-/NO_2^- dobije se korištenjem sljedeće jednadžbe

$$[NO_3^-/NO_2^-]\ (\mu M) = \left(\frac{A_{540} - odsječak\ na\ osi}{nagib\ pravca}\right)\left(\frac{200\,\mu L}{volumen\ uzorka}\right) \times razrjeđenje$$



Slika 4.1. Princip Griessove reakcije

4.3.3. Statističke metode

Za svakog ispitanika su određivane osobine: dob, spol, intraokularni tlak, pahimetrija, promjene na vidnom živcu, vidno polje, serumska koncentracija vitamina D, paratiroidni hormon, kalcij, te serumska koncentrcija nitrita/nitrata. Svako numeričko obilježje ima svoje specifičnosti.

Dob je izražena u godinama starosti, vidna oštrina brojčano u rasponu od 0,1 do 1,0, intraokularni tlak u milimetrima žive, promjene na vidnom živcu brojčano u smislu promjena na glavi vidnog živca od 0,1 do 1,0, debljina rožnice (pahimetrija) u μm, gonioskopija određuje otvorenost komornog kuta, koncentracija vitamina D u serumu u nmol/L, te PTH u pg/ml, kalcij pg/L, nitriti/nitrati u μM/L.

Ispitivane su razlike u serumskoj koncentraciji vitamina D između promatranih ispitanika i kontrolne skupine. Ispitivane su razlike nitrita/nitrata između obje ispitivane skupine. Metode prikupljanja podataka su: oftalmološki pregled, mjerenje, brojanje, ocjenjivanje, evidentiranje, anketiranje.

Numerički rezultati su prikazani aritmetičkom sredinom, kao mjerom prosjeka i standardnom devijacijom, kao mjerom variranja rezultata oko prosjeka.

T-test korišten je kod usporedbe IOT između skupina, promjena na glavi vidnog živca i u vidnom polju, usporedbe koncentracije Ca i PTH između skupina, usporedbe koncentracije vitamina D i nitrita između bolesnih i kontrolnih ispitanica, razlike u koncentraciji vitamina D ovisno o dobi ispitanica, te koncentracije nitrita između skupina.

Kako bi se utvrdila povezanost serumske koncentracije vitamina D sa visinom intraokularnog tlaka, promjenama na glavi vidnog živca i debljinom rožnice, promjenana na očnoj pozadini i u vidnom polju provedena je korelacijska analiza na poduzorcima oboljelih i kontrolnih ispitanica. Korelacijska analiza je korištena i u prikazu koncentracije vitamina D i nitrita sa drugim promatranim parametrima. Hi kvadrat test je korišten u prikazu razlike u suficijenciji, insuficijenciji i deficitu vitamina D između skupina.

Analize varijance korištena je kod analize nedostatka vitamina D prema uznapredovalosti bolesti, prikaz koncentracije nitrita ovisno o promjenama u vidnom polju, te prosječne dobi i IOT kod ispitanica u skupinama prema promjenama u vidnom polju. Razlike su se smatrale značajne uz vjerojatnost pogreške od 5% ($p<0,05$). U tekstu su navođene točne vrijednosti vjerojatnosti pogreške na 3 decimale. U istraživanje su uključene sve ispitanice iz Registra glaukomskih bolesnika koje su udovoljavale prethodno navedene kriterije. Ukupno je uključeno 90 ispitanica iz registra te 50 kontrolnih ispitanica. Ova veličina uzroka trebala bi biti dovoljna da se u 80% slučajeva može proglasiti značajnom i mala razlika između aritmetičkih sredina na razini značajnosti od 0,05 (izračunato pomoću G*Power softvera). Za sve statističke testove korišten je softverski paket IBM SPSS Statistic verzija 20.

5. REZULTATI

5.1. Deskriptivni podaci

5.1.1. Dob

Prosječna dob u skupini ispitanica (aritmetička sredina) s glaukomom je 51,9 (sd= 4,1, raspon od 42 do 58), a u kontrolnoj skupini je 49.5 (sd= 3,688, raspon od 43 do 57 godina) godina

5.1.2. Spol

Sve ispitanice u obje ispitivane skupine su žene.

5.1.3. Ispitivane varijable

U skupini s glaukomom je 90 ispitanica (64,3%), a u kontrolnoj skupini 50 ispitanica (35,7%).

Svim ispitanicama je pregledan prednji segment oka na biomikroskopu. Svi su nalazi u granici normalnih vrijednosti za dob ispitanica.
Svim oboljelim ispitanicama i kontrolama učinjen je gonioskopski pregled prednjeg komornog kuta. Sve ispitanice u obje skupine imaju otvoren komorni kut (prema Shafferu).

Za ocjenu povezanost glaukoma sa sniženom serumskom koncentracijom vitamina D prethodi značajno mjerenje i povezivanje koncentracije vitamina D kao neovisne varijable s drugim ovisnim varijablama bitnim za glaukom kao bolest kao što su vidna oštrina, visina intraokularnog tlaka (IOT), pahimetrija, promjene na glavi vidnog živca izražene kao c/d omjer, stupanj oštećenja vidnog polja prema MD vrijednosti, te određivanje serumske koncentracije kalcija i paratireoidnog hormona. Serumska koncentracijea nitrita uspoređivana je sa vitaminom D i ostalim promatranim parametrima.

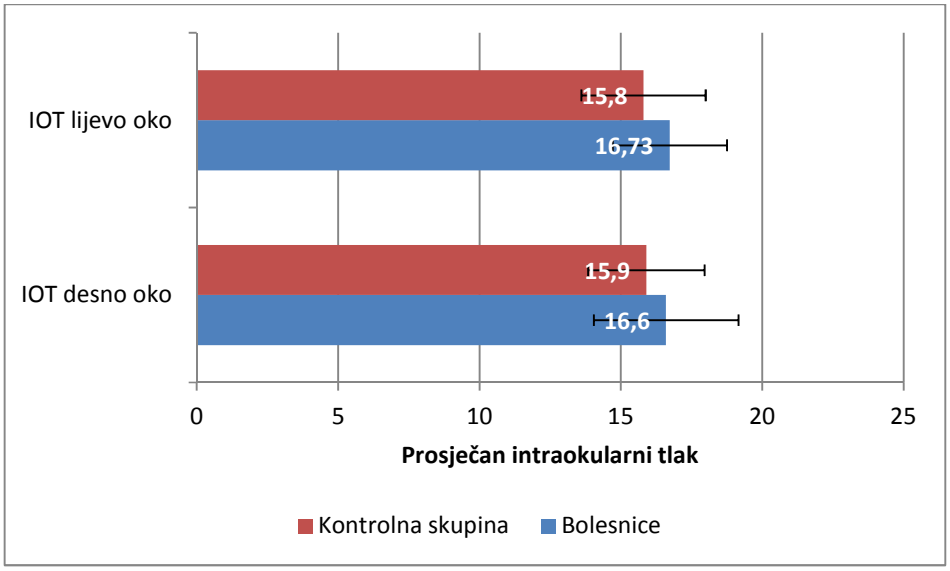
5.2. Usporedba oboljelih i kontrolnih ispitanica prema kliničkim parametrima

5.2.1. Vidna oštrina

Vidna oštrina u skupini ispitanica s glaukomom je 1,0 po međunarodnim optotipima (prosječna vrijednost za desno oko je 0,98 i za lijevo također 0,98). U kontrolnoj skupini je prosječna vidna oštrina također 1,0 za oba oka (0,99 za desno i 0,998 za lijevo oko).
Kod 86 ispitanica s glaukomom je vidna oštrina 1,0 sa ili bez korekcije po međunarodnim optotipima (SI), a četiri ispitanice imale su vidnu oštrinu nešto manju od 1,0 zbog diskretne slabovidnosti. U kontrolnoj skupini jedna ispitanica ima manju vidnu oštrinu od 1,0 zbog visoke miopije.

5.2.2. Intraokularni tlak u obje ispitivane skupine

Prosječna vrijednost intraokularnog tlaka u oboljelih ispitanica je iznosila 16,6 mmHg za desno oko i 16,73 mmHg za lijevo oko. Kontrolne ispitanice su imale prosječnu vrijednost intraokularnog tlaka desnog oka 15,9 mmHg, a lijevog 15,8 mmHg.

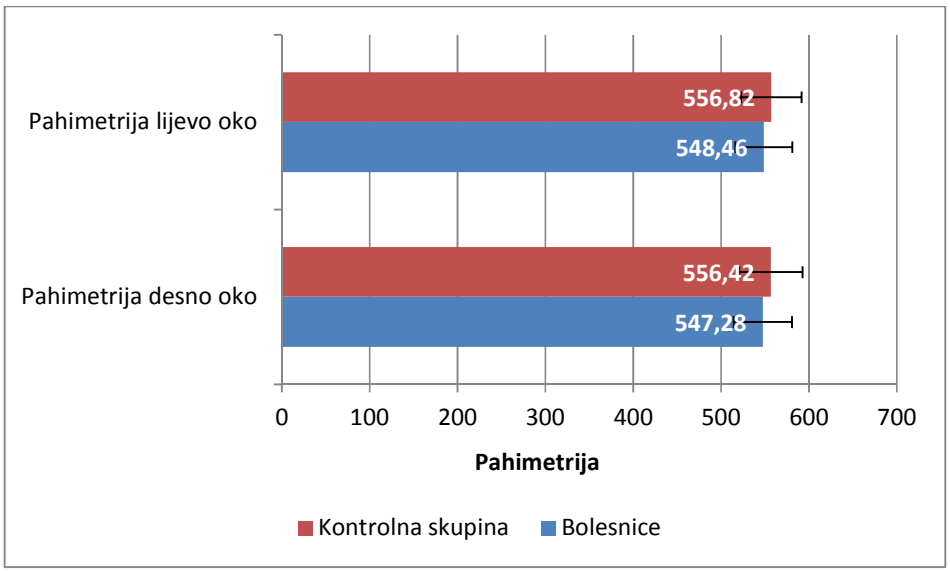


Slika 5.1. Prosječna vrijednost intraokularnog tlaka u obje ispitivane skupine

Intraokularni tlak statistički se značajno razlikovao između dvije skupine ispitanica samo kod lijevog oka. Bolesnice su u prosjeku imale IOT lijevog oka u iznosu od 16,73, a kontrolne ispitanice u iznosu od 15,8 (*t*-test= -2,617, p=0,01). Ovo znači da su oboljele imale statistički značajno viši IOT lijevog oka od kontrolnih ispitanica.

5.2.3. Pahimetrija

Slijedi prikaz vrijednosti pahimetrije desnog i lijevog oka za obje skupine ispitanica (µm).

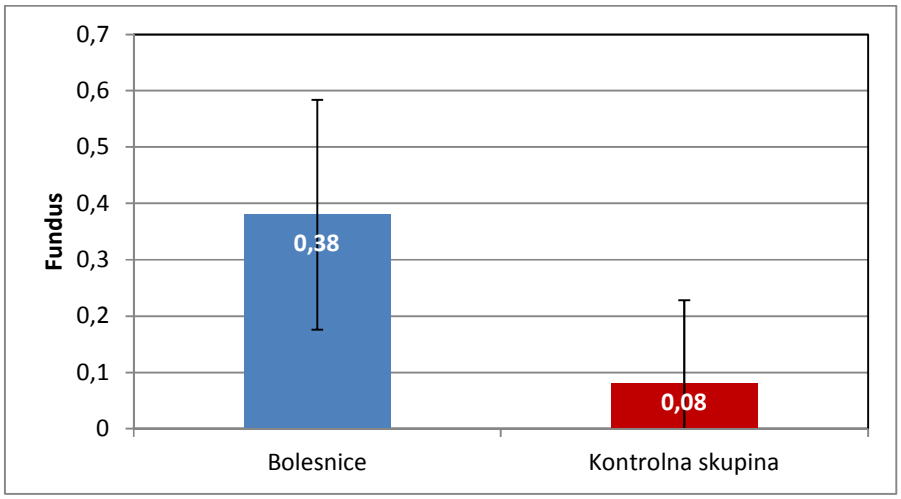


Slika 5.2. Usporedba prosječne vrijednosti pahimetrije za desno i lijevo oko između skupina

Prosječna vrijednost pahimetrije za skupinu bolesnih je 547,28 µm za desno oko i 548,46 µm za lijevo oko. Kontrolne ispitanice su imale vrijednost pahimetrije 556,42 µm za desno oko i 556,82 µm za lijevo oko. Nije bilo statistički značajnih razlika u pahimetriji između bolesnih i kontrolnih ispitanica.

5.2.4. Promjene na glavi vidnog živca

Sljedeća slika prikazuje promjene na glavi vidnog živca izražene kao c/d omjer. Prosječan c/d omjer kod bolesnih je iznosio 0,38, a u kontrolnoj skupini 0,08.

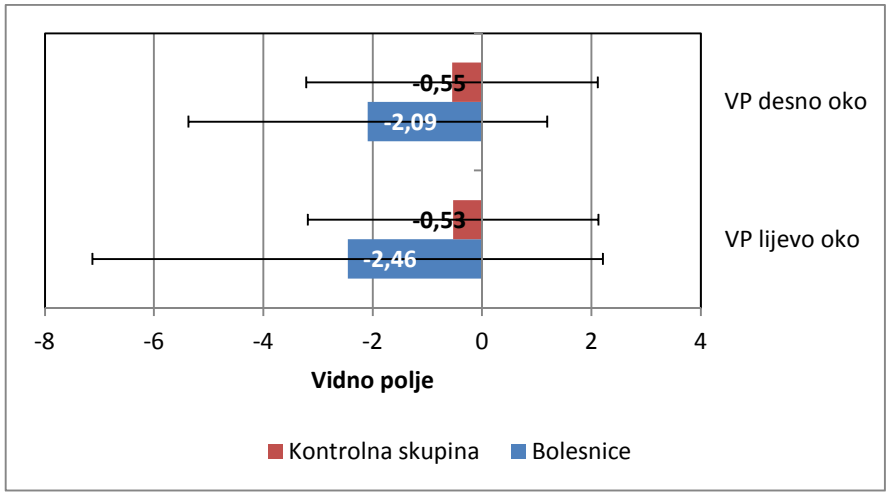


Slika 5.3. Prikaz promjena na glavi vidnog živca (c/d omjer) između skupina

Postojala je statistički značajna razlika u c/d omjeru između ispitanica oboljelih od glaukoma i kontrolnih ispitanica (*t*-test=-9,257; p<0,001). Ispitanice oboljele od glaukoma u prosjeku su imale c/d 0,38, a kontrolne ispitanice 0,08.

5.2.5. Promjene u vidnom polju ispitanica s glaukomom i kontrolne skupine

Sljedeća slika prikazuje promjene u vidnom polju između obje skupine ispitanica izražene kao MD vrijednost (dB).



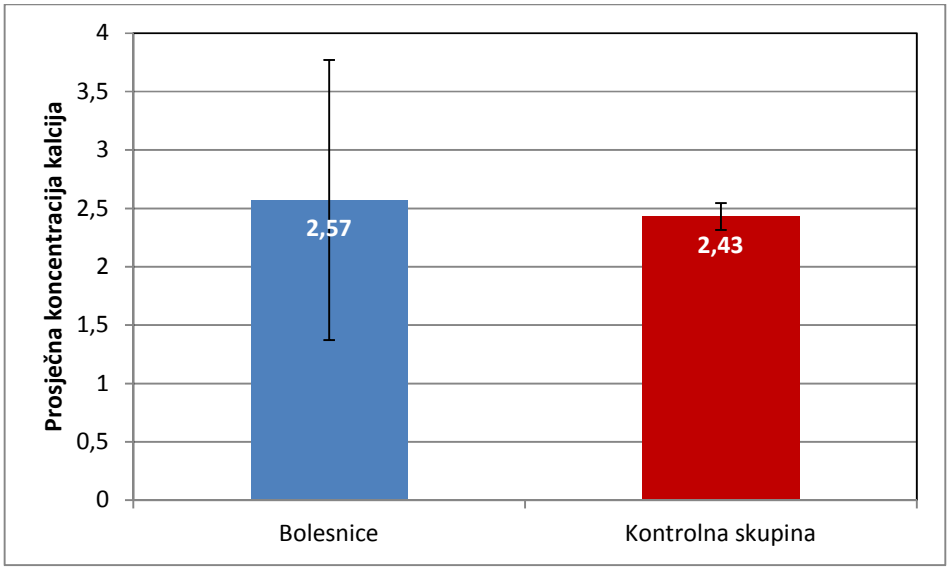
Slika 5.4. Prikaz promjena u vidnom polju oboljelih i kontrolnih ispitanica prema MD vrijednosti (dB).

Ispitanice oboljele od glaukoma su u prosjeku imale vrijednost MD indeksa lijevoga oka -2,46 dB, a kontrolne ispitanice -0,53 dB, dok je vrijednost MD indeksa desnoga oka kod oboljelih ispitanica bila -2,09 dB, a kod kontrolnih ispitanica -0,55 dB.

Postojala je statistički značajna razlika između ispitanica oboljelih od glaukoma i kontrolnih ispitanica u MD vrijednosti lijevoga (*t*-test=2,693, p=0,008) i desnoga oka (*t*-test=3,006; p=0,003).

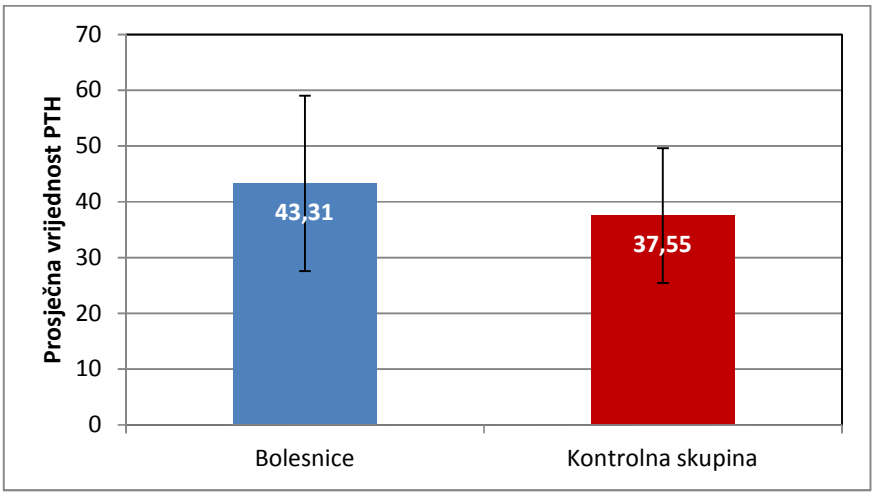
5.2.6. Prosječna koncentracija kalcija i paratireoidnog hormona PTH u obje ispitivane skupine

Slijedi prikaz prosječne koncentracije kalcija u obje ispitivane skupine:



Slika 5.5. Prosječna vrijednost kalcija u obje ispitivane skupine (mmol/L)

Prosječna koncentracija kalcija kod ispitanica s glaukomom je iznosila 2,57 mmol/L, a u kontrolnoj skupini 2,43 mmol/L. Nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji kalcija između oboljelih i kontrolne skupine.



Slika 5.6. Posječna vrijednost PTH u obje ispitivane skupine (pg/ml)

Usporedba ispitanica prema vrijednosti PTH pokazala je kako ispitanice oboljele od glaukoma imaju prosječnu vrijednost 43,31 pg/ml, a kontrolne ispitanice 37,75 pg/ ml. Ova razlika bila je statistički značajna (*t*-test: -2,249; p= 0,026). Tijekom prikupljanja podataka za istraživanje kod jedne je ispitanice kontrolne skupine pronađena povišena vrijednost PTH 105,9 pg/ml, vrijednost vitamina D 14,7 nmol/L, a kalcija 2,31mmol/L. Ta je ispitanica isključena iz istraživanja i upućena na daljnju kliničku obradu. Umjesto nje u istraživanje je uvrštena nova ispitanica koja je zadovoljila sve kriterije istraživanja.

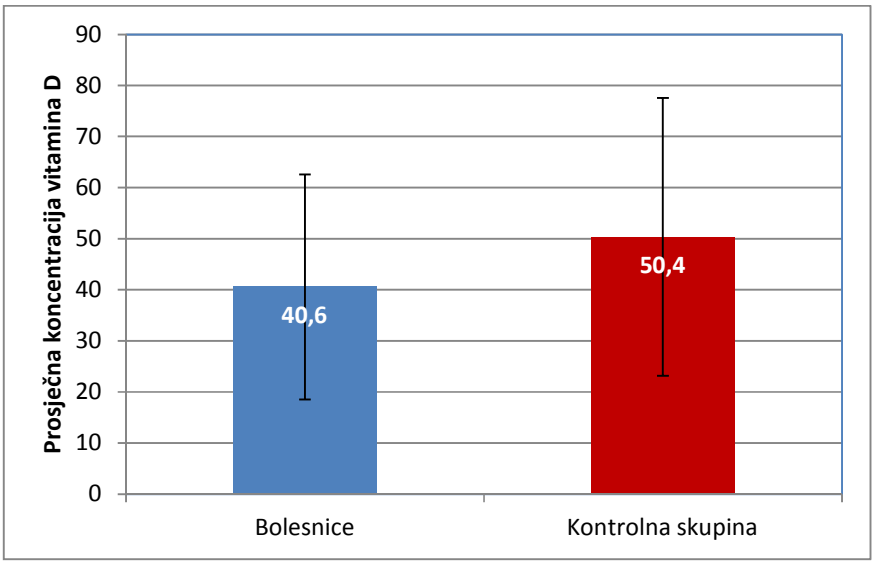
5.3. Prosječna koncentracija vitamina D u obje ispitivane skupine

Tablica 5.1. Prosječna koncentracija vitamina D (nmol/L) u skupini ispitanica oboljelih od glaukoma i u kontrolnoj skupini

Oboljeli od glaukoma	Broj ispitanica	koncentracija vitamina D (nmol/L)	Standardna devijacija	*t*-test, p
ne	50	50,43	27,194	2,188; 0,031
da	90	40,60	22,042	

U prosjeku, ispitanice koje nisu oboljele od glaukoma imale su prosječnu koncentraciju vitamina D od 50,43 nmol/L, a ispitanice koje su oboljele od glaukoma 40,6 nmol/L. Ova

razlika bila je statistički značajna (*t*-test= 2,188; p= 0,031), odnosno ispitanice koje nisu imale glaukom su imale u prosjeku višu razinu vitamina D.



Slika 5.7. Prikaz prosječne koncentracije vitamina D u obje ispitivane skupine (nmol/L)

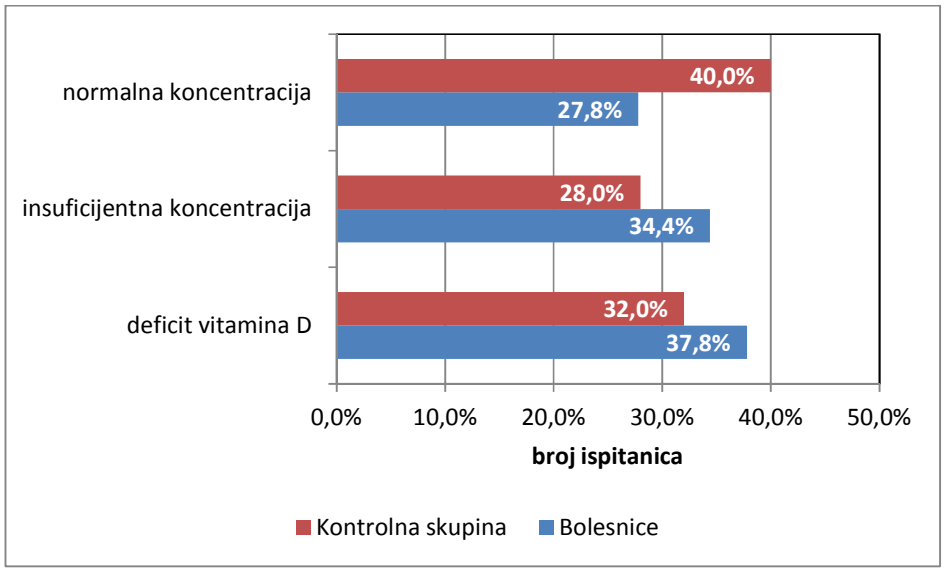
5.3.1. Ispitanici grupirani prema koncentraciji vitamina D (suficijencija, insuficijencija, deficit)

Prema preporukama Američkog Instituta za medicinu normalna koncentracija vitamina D je ≥50 nmol/L, insuficijentna koncentracija iznosi od 30-50 nmol/L, a deficit vitamina D je ≤ 30 nmol/L.

Tablica 5.2. Prikaz razlike u suficijenciji, insuficijenciji i deficitu vitamina D između skupina

	Oboljele		Kontrolna skupina	
	n	%	n	%
deficit vitamina D	34	37,8	16	32,0
insuficijentna koncentracija	31	34,4	14	28,0
normalna koncentracija	25	27,8	20	40,0

Deficit vitamina D je podjednako izražen u obje ispitivane skupine (37,8% u oboljelih nasuprot 32% u kontrolnoj skupini), dok je normalna koncentracija vitamina D prisutna u 40% kontrolnih ispitanika nasuprot 27,8% oboljelih ispitanica.



Slika 5.8. Prikaz razlike koncentracija vitamina D između skupina

Raspodjela ispitanica po skupinama koncentracije vitamina D nije se statistički značajno razlikovala kod oboljelih i kontrolne skupine (Hi-kvadrat test= 2,210, p=0,331).

5.3.2. Koncentracija vitamina D ovisno o dobi ispitanica u obje skupine

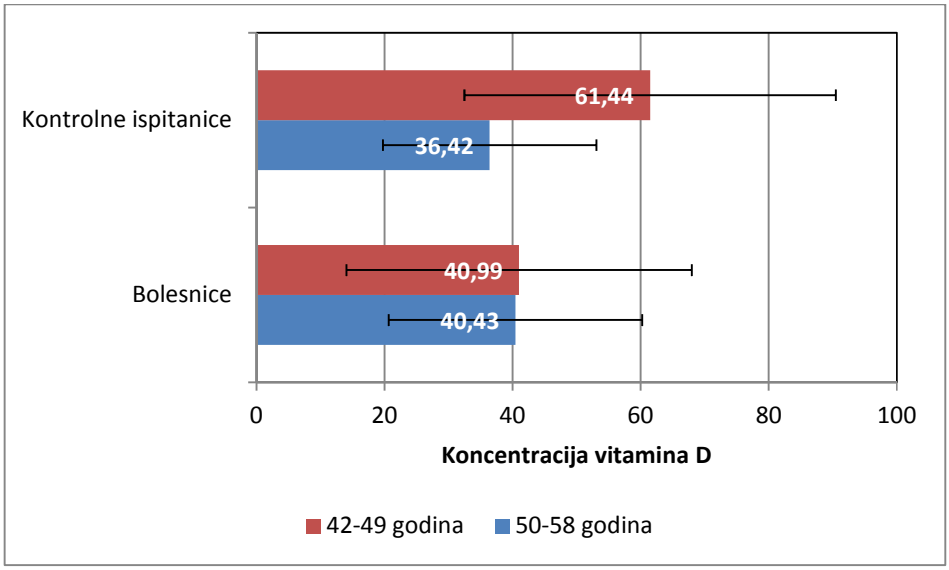
U skupini oboljelih ispitanica jedna ispitanica je imala 42 godine, a jedna 58 godina, dok su u kontrolnoj skupini 2 ispitanice imale 43 godine i jedna 57 godina. To ne utječe na prosjek zadane dobne skupine (od 45 do 55 godina), ali smo zato tablično prikazali taj raspon godina.

Tablica 5.3. Prikaz koncentracije vitamina D (nmol/L) ovisno o dobi ispitanica

	Skupina						*t*-test, p
	42-49 godina			50-58 godina			
	c	±sd	N	c	±sd	N	
Oboljele	40,99	26,975	27	40,43	19,804	63	0,109; 0,913
Kontrolne ispitanice	61,44	28,987	28	36,42	16,668	22	3,832; <0,001

Legenda: c=koncentracija (nmol/L), N=broj ispitanica, sd=standardna devijacija

U skupini oboljelih ispitanica nije bilo statistički značajne razlike u prosječnoj koncentraciji vitamina D između dobnih skupina. U skupini kontrolnih ispitanica postojala je statistički značajna razlika u koncentraciji vitamina D između dobnih skupina (*t*-test=3,832, p<0,001). Ispitanice u dobi od 42 do 49 godina imale su prosječnu koncentraciju vitamina D od 61,44, a one u dobi između 50 i 58 godina 36,42.



Slika 5.9. Koncentracija vitamina D u skupinama ovisno o dobi (nmol/L)

5.4. Povezanost serumske koncentracije vitamina D s ostalim ispitivanim parametrima

Tablica 5.4. Povezanost koncentracije vitamina D s intraokularnim tlakom, promjenama na glavi vidnog živca i debljinom rožnice kod oboljelih i kontrolnih ispitanica

	Oboljele ispitanice (N=90)	p	Oboljele ispitanice (glaukom) (N=70)	p	Oboljele ispitanice (OHT) (N=20)	p	Kontrolne ispitanice (N=50)	p
pahimetrija desno oko	0,132	0,215	0,091	0,454	0,334	0,15	0,508**	<0,001
pahimetrija lijevo oko	0,092	0,393	0,063	0,603	0,241	0,32	0,563**	<0,001
IOT desno oko	0,126	0,236	0,145	0,232	-0,008	0,974	0,287*	0,044
IOT lijevo oko	0,047	0,663	0,031	0,8	0,158	0,52	0,166	0,25
fundus desno i lijevo oko	0,185	0,081	0,145	0,231	0,378	0,1	-0,181	0,213
VP lijevo oko	-0,229*	0,031	-0,248*	0,038	0,439	0,06	0,016	0,912
VP desno oko	-0,117	0,273	-0,114	0,348	0,192	0,417	-0,022	0,877

Kod svih oboljelih ispitanica, neovisno o dijagnozi, kao i kod ispitanica oboljelih od glaukoma, koncentracija vitamina D bila je statistički značajno povezana samo s vidnim poljem lijevog oka. Što je koncentracija vitamina D bila viša, to je MD vrijednost vidnog polja lijevog oka je bila manja (koeficijent korelacije r kod svih oboljelih ispitanica= -0,229, p=0,031; koeficijent korelacije r kod ispitanica oboljelih od glaukoma = -0,248, p=0,038). Ova povezanost je bila mala po iznosu.

Kod ispitanica oboljelih od okularne hipertenzije, koncentracija vitamina D nije bila statistički značajno povezana niti sa jednim parametrom. Korelacije s raznim parametrima zapravo su više nego kod ispitanica s glaukomom: npr. za pahimetriju i promjene na glavi vidnog živca u rangu malih do umjerenih po iznosu, te za vidno polje lijevo u rangu umjerenih. To su sve pozitivne povezanosti što znači da što je viša koncentracija vitamina D, to je veći rezultat na tim parametrima. Rezultat za vidno polje je suprotan nego kod ispitanica s glaukomom. Ove korelacije nisu značajne zbog malog broja ispitanica s OHT. Hoće li razlika biti „proglašena" značajnom uvelike ovisi o veličini uzorka.

Kod kontrolnih ispitanica koncentracija vitamina D bila je statistički značajno povezana s pahimetrijom lijevog i desnog oka te intraokularnim tlakom desnog oka. Što je koncentracija vitamina D bila viša, to je rezultat na pahimetriji bio viši te je to bio viši intraokularni tlak desnog oka. Ove povezanosti su bile umjerene do velike za pahimetriju, te male za IOT.

5.5. Koncentracija NO_3/NO_2 (nitrita) u obje ispitivane skupine

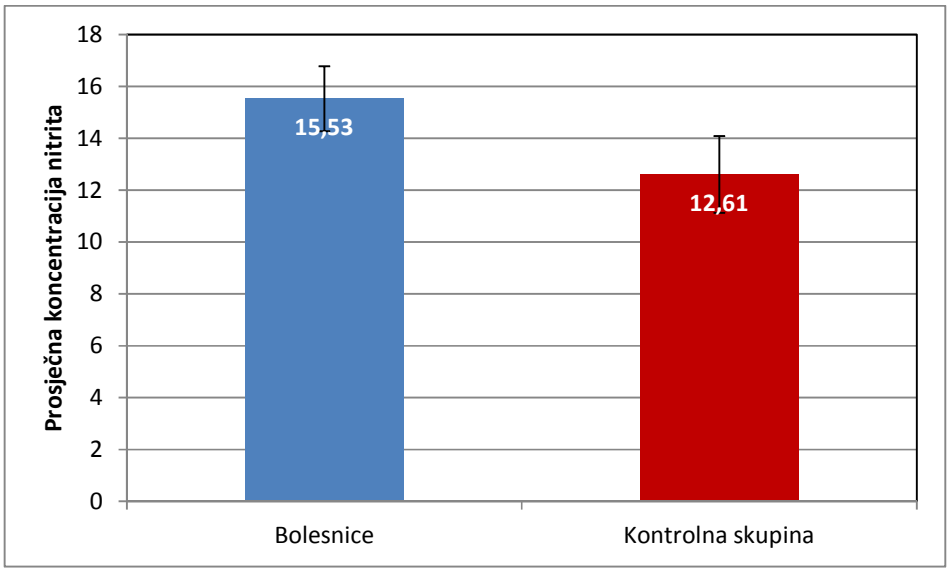
5.5.1. Serumska koncentracija nitrita

Tablica 5.5. Usporedba koncentracije nitrita (c/µmol/L) ispitanica oboljelih od glaukoma i kontrolne skupine ispitanica.

Oboljeli od glaukoma	Broj ispitanica	Prosječna koncentracija nitrita (c)	Standardna devijacija
ne	50	12,61	1,480
da	90	15,53	1,252

U prosjeku, ispitanice koje nisu oboljele od glaukoma imale su prosječnu koncentraciju nitrita od 12,61 µmol/L, a ispitanice koje su oboljele od glaukoma 15,53 µmol/L. Premda su ispitanice oboljele od glaukoma imale nešto višu prosječnu koncentraciju nitrita, ova razlika nije bila statistički značajna (*t*-test= -1,451; p= 0,149). Provedeno vlastito istraživanje je pokazalo razmjerno rasap vrijednosti ukupne koncentracije metabolita NO (NO_3/NO_2)

izraženo kao nitriti u rasponu od 0,96 do 64,51 µmol/L za oboljele ispitanice i od 0,64 do 45,16 µmol/L za kontrole.



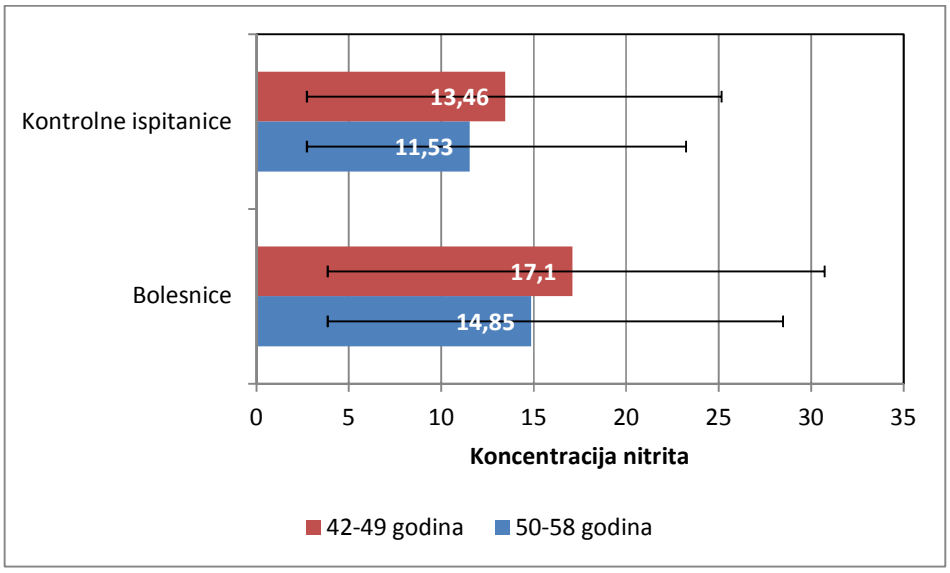
Slika 5.10. Prikaz prosječne koncentracije nitrita u obje ispitivane skupine (µmol/L)

5.5.2. Koncentracija nitrita ovisno o dobi ispitanica

Tablica 5.6. Prikaz koncentracije nitrita (c) ovisno o dobi ispitanica

	Skupina						*t*-test, p
	42-49 godina			50-58 godina			
	c	±sd	N	c	±sd	N	
Oboljele	17,10	13,624	27	14,85	11,10	63	0,823; 0,413
Kontrolne ispitanice	13,46	11,696	28	11,53	8,806	22	0,644; 0,523

U oboljelih u mlađoj dobnoj skupini prosječna vrijednost nitrita je iznosila 17,10 µmol/L, a u starijoj 14,85 µmol/L. U kontrolnih ispitanica mlađe dobi nitriti su iznosili 13,46, a u starijoj dobi 11,53 µmol/L. Nije bilo statistički značajnih razlika u koncentraciji nitrita između oboljelih i kontrolnih ispitanica u ovisno o dobi.



Slika 5.11. Grafički prikaz koncentracije nitrita ovisno o dobi ispitanica

5.5.3. Prikaz ispitivanih parametara, kliničkih i biokemijskih, vitamina D i nitrita

Tablica 5.7. Prikaz kliničkih, biokemijskih parametara, te vrijednosti vitamina D i nitrita

	Skupina				t-test, p
	Bolesnice (N=90)		Kontrolna skupina (N=50)		
	M	±sd	M	±sd	
Vitamin D	40,6	22,042	50,4	27,194	2,188; 0,031
Nitriti	15,53	1,252	12,61	1,480	1,451; 0,149
PTH	43,31	15,704	37,55	12,071	-2,249; 0,026
Ca	2,57	1,200	2,43	0,115	-0,831; 0,407
IOT desno oko	16,6	2,560	15,9	2,062	-1,656; 0,100
IOT lijevo oko	16,73	2,021	15,8	2,200	-2,617; 0,010
Pahimetrija desno oko	547,28	33,175	556,42	36,191	1,512; 0,133
Pahimetrija lijevo oko	548,46	32,511	556,82	34,442	1,424; 0,157
Fundus	0,381	0,204	0,075	0,148	-9,257; <0,001
VP lijevo oko	-2,46	4,669	-0,53	2,657	2,693; 0,008
VP desno oko	-2,092	3,281	-0,55	2,668	3,006; 0,003

Usporedbom ispitanica oboljelih od glaukoma s kontrolnim ispitanicama, pokazalo se kako statistički značajne razlike postoje u koncentraciji vitamina D, PTH, IOT lijevog oka, fundusu, i vidnom polju lijevog i desnog oka. Nije bilo statistički značajnih razlika u ostalim analiziranim pokazateljima.

5.5.4. Povezanost serumske koncentracije vitamina D sa nitritima

Tablica 5.8. Prikaz serumske koncentracije vitamina D i nitrita u tablci korelacija s drugim ispitivanim parametrima

	Oboljele ispitanice (N=90)	p	Oboljele ispitanice (glaukom) (N=70)	p	Oboljele ispitanice (OHT) (N=20)	p	Kontrolne ispitanice (N=50)	p
nitriti	0,006	0,954	0,044	0,716	-0,159	0,503	0,228	0,111
pahimetrija desno oko	0,132	0,215	0,091	0,454	0,334	0,15	0,508**	<0,001
pahimetrija lijevo oko	0,092	0,393	0,063	0,603	0,241	0,32	0,563**	<0,001
IOT desno oko	0,126	0,236	0,145	0,232	-0,008	0,974	0,287*	0,044
IOT lijevo oko	0,047	0,663	0,031	0,8	0,158	0,52	0,166	0,25
fundus desno i lijevo oko	0,185	0,081	0,145	0,231	0,378	0,1	-0,181	0,213
VP lijevo oko	-0,229*	0,031	-0,248*	0,038	0,439	0,06	0,016	0,912
VP desno oko	-0,117	0,273	-0,114	0,348	0,192	0,417	-0,022	0,877

Nitriti nisu bili statistički značajno povezani s vitaminom D niti kod jedne skupine ispitanica.

5.6. Prikaz serumske koncentracije vitamina D ovisno o uznapredovalosti bolesti

5.6.1. Ovisnost koncentracije vitamina D o promjenama u vidnom polju

Sve ispitanice oboljele od glaukoma podijeljene su u 3 skupine prema promjenama u vidnom polju (po Humphreyu) izraženo prema MD vrijednosti:

I skupina: do -6 dB,

II skupina: od -6 do -12 dB

III skupina: više od -12 dB.

Tablica 5.9. Koncentracija vitamina D uspoređena je između tri skupine ispitanica prema uznapredovalosti bolesti (MD indeks)

Oštećenje vidnog polja	Broj ispitanica	Prosječna koncentracija vitamina D (c)	Standardna devijacija
I skupina	77	39,40	21,51
II skupina	9	46,88	26,92
III skupina	4	49,63	22,30

Legenda: c= koncentracija nmol/L

U prosjeku, bolesnice s manje uznapredovalom bolesti (I skupina) imale su manju prosječnu koncentraciju vitamina D od bolesnica u skupinama s većim oštećenjima vidnog polja. Bolesnice u II i III skupini prema uznapredovalosti bolesti imale su sličnu prosječnu koncentraciju vitamina D. No, ove razlike nisu bile statistički značajne (Analiza varijance, F=0,811, p=0,448).

5.6.2. Određivanje nitrita u skupini I, II i III prema uznapredovalosti bolesti

Tablica 5.10. Prikaz prosječne koncentracije nitrita u skupinama prema promjeni u vidnom polju

Oštećenje vidnog polja	Broj ispitanica	Prosječna koncentracija nitrita (c)	Standardna devijacija
I skupina	77	15,51	12,007
II skupina	9	14,11	12,265
III skupina	4	19,03	10,519

Razlika u koncentraciji nitrita prema oštećenju vidnog polja nije bila statistički značajna (Analiza varijance, F=0,234; p=0,792).

5.6.3. Prikaz dobi u skupini I, II i III prema uznapredovalosti bolesti

Tablica 5.11. Prosječna dob ispitanica u skupinama prema promjenama u vidnom polju

Oštećenje vidnog polja	Broj ispitanica	Prosječna dob	Standardna devijacija
I skupina	77	52,14	4,071
II skupina	9	49,00	4,301
III skupina	4	53,25	2,986

Razlika u dobi prema oštećenju vidnog polja nije bila statistički značajna (Analiza varijance, F=2,653; p=0,076).

5.6.4. Prikaz vrijednosti IOT u skupini I, II i III prema uznapredovalosti bolesti

Tablica 5.12. Vrijednost IOT desnog oka u skupinama prema promjenama u vidnom polju

Oštećenje vidnog polja	Broj ispitanica	Prosječna vrijednost IOT za desno oko	Standardna devijacija
I skupina	77	16,34	2,548
II skupina	9	17,89	1,900
III skupina	4	18,75	2,754

Postojala je statistički značajna razlika u prosječnoj vrijednosti IOT za desno oko (Analiza varijance, F=3,093; p=0,05).

Tablica 5.13. Vrijednost IOT lijevog oka u skupinama prema promjenama u vidnom polju

Oštećenje vidnog polja	Broj ispitanica	Prosječna vrijednost IOT za lijevo oko	Standardna devijacija
I skupina	77	16,67	1,995
II skupina	9	16,89	2,205
III skupina	4	17,50	2,517

Nije postojala statistički značajna razlika u prosječnoj vrijednosti IOT za lijevo oko (Analiza varijance, F=0,349; p=0,706).

6. RASPRAVA

Budući da je glaukom multifaktorijalna neurodegenerativna bolest važno je usporiti njegovu progresiju. Povezanost patogenih mehanizama nastanka glaukomske optičke neuropatije i imunomodulatornih svojstava vitamina D nastojali smo prikazati uspoređujući serumsku koncentraciju vitamina D, nitrita i glaukoma. Hipovitaminoza D dovodi do smanjenje inhibicije sintetaze NO, a time i do porasta NO, peroksinitritne toksičnosti i apoptoze.

Glavno obilježje ovog istraživanja je snižena serumska koncentracija vitamina D u skupini ispitanica sa glaukomom u odnosu na kontrolnu skupinu (40,60: 50,43 nmol/L) što je prikazano u tablici 5.1. (str.34). U ovom istraživanju, koje je po dostupnim podacima prvi puta provedeno na području Republike Hrvatske, izmjerena je serumska koncentracija vitamina D kod ispitanica oboljelih od glaukoma i u kontrolnoj skupini.

Kao što smo naveli sve ispitanice u obje skupine su žene u dobi od 45 do 55 godina starosti. Izabrali smo tu skupinu žena kako bismo isključili dobno ovisnu insuficijenciju vitamina D (43). Učestalost glaukoma raste s dobi: 2-5% u dobi od 40-49 godine života i 10-30% u dobi iznad 65 godine života. Incidencija glaukoma raste s dobi. Rezultati statističke studije za bijelce rastu od 0,08/1000 osoba na godinu u ranim 40. do 1.46/1000 osoba u 80 (1). Ispitanice oboljele od glaukoma su iz Registra za glaukom Odjela za oftalmologiju i optometriju Opće bolnice „Dr. Josip Benčević“. U Registru je zastupljenost žena u odnosu na muškarce 69% nasuprot 31%. Na osnovu toga smo u studiju izabrali žene. Kontrolna skupina su slučajno izabrane ispitanice iste dobi bez oftalmološke patologije.

Izviješća po spolu često se razlikuju. Iako su neke po dobi kontrolirane studije pronašle značajno višu srednju vrijednost intraokularnog tlaka kod žena nego kod muškaraca, drugi nisu uspjeli naći takvu razliku, a neki su pokazali veću učestalost kod muškaraca (66).
Studija De Moraes i Latina je pronašla da su riziko faktori za progresiju gubitka vidnog polja u tretiranih glaukoma otvorenog kuta: ženski spol, Afrikanci, Južnoamerikanci, eksfolijativni sindrom, debljina rožnice, pik intraokularnog tlaka od 1,13 mmHg i više, hemoragije diska i ß zone peripapilarne atrofije.

Većina studija nije pronašla predominaciju po spolu (Baltimor, Beaver Dam, Roscommon). Barbados očna studija je uspjela pronaći da muškarci imaju veći dobno

prilagođen rizik za razvoj glaukoma nasuprot ženama. Rotterdam studija je pokazala tri puta veći rizik kod muškaraca. Dalby studija je pokazala veći rizik za žene (67,68,69,70,71). Žene imaju povišen rizik za glaukom zatvorenog kuta, ali ne postoji jasna spolna predispozicija za glaukom otvorenog kuta. Postoji hipoteza da je smanjena estrogenska izloženost povezana sa povećanim rizikom za glaukom otvorenog kuta, ali populacija na temelju studije predstavlja nedosljedne rezultate. Osim toga čini se da žene nose veći teret glaukoma zbog dugovječnosti (72).

Vidna oštrina u obje ispitivane skupine je gotovo 1,0 po međunarodnim optotipima. Učinak vidne oštrine na promjene u vidnom polju je isključen. Vitamin D receptor je uključen u transkripciju nekoliko ključnih proteina koji oblikuju strukture mrežnice i tako može pridonijeti gubitku vida u nekoliko puteva. Međutim, kao mikrobiološka supstanca vitamin D se može vezati i smanjiti aktivnost VDR receptora. Povišena razina vitamina D može ometati pravilan rad receptora (47).

Vrijednosti intraokularnog tlaka u obje ispitivane skupine su u granici normalnih vrijednosti, što znači da su oboljele ispitanice terapijski dobro regulirane. Ispitanice su se razlikovale po vrijednosti intraokularnog tlaka lijevog oka. Intraokularni tlak lijevog oka je statistički značajno viši u oboljelih u odnosu na kontrolne ispitanice (*t*-test= -2,617, p=0,01), (slika 5.1, str 30).

Nije bilo statistički značajne razlike u pahimetriji između oboljelih i kontrolne skupine. Prosječna vrijednost pahimetrije u obje skupine odgovarala je prosječnoj debljini rožnice (oko 550 µm), (slika 5.2, str.31). EMGT (the early manifest glaucoma trial) studija sa jedanaest godišnjim praćenjem, pokazala je da je debljina rožnice značajan čimbenik za glaukomsku progresiju kod bolesnika sa visokim osnovnim vrijednostima IOT, ali ne sa niskim vrijednostima IOT (39).

Prosječan c/d omjer kod glaukomskih ispitanica ukazuje na tek početne promjene na glavi vidnog živca. Izražene vrijednosti su rezultat procjene ispitivača, a nisu izražene mjerenjem. Prosječan c/d omjer kod oboljelih ispitanica je bio statistički značajan u odnosu na kontrolnu skupinu (*t*-test=-9,257; p<0,001) kao što je prikazano na slici 5.3. (str 32). Deficit vitamina D je povezan sa smanjenim volumenom optičke hijazme u starijih odraslih osoba i ukazuje na mogućnost gubitka vidnih aksona i njihovih stanica. Vitamin D deficijencija je

udružena sa reduciranom debljinom retinalnih ganglijskih stanica i retinalnih nervnih vlakana (73).

Postojala je statistički značajna razlika između oboljelih i kontrolnih ispitanica u MD vrijednosti lijevog (*t*-test=2,693, p=0,008) i desnog oka (*t*-test=3,006; p=0,003). Prosječno oboljele ispitanice imale su prosječnu MD vrijednost nižu od -6,00 dB, što ukazuje na minimalne promjene u vidnom polju i bolest koja nije uznapredovala (slika 5.4, str 32).

U obje ispitivane skupine kalcij je bio u rasponu normalnih vrijednosti (od 2,14-2,33 mmol/L) (slika 5.5., str.33). Prosječna vrijednost PTH je također bila u granici normalnih vrijednosti (od 10-60 pg/ml) u obje ispitivane skupine, kao što je prikazano na slici 5.6.(str.34). Postoji statistički značajna razlika u razini PTH između oboljelih i kontrolne skupine (*t*-test:-2,249; p=0,026). Na tijek istraživanja i same rezultate ova činjenica nije imala utjecaja. Određivanje razine kalcija i PTH bilo je bitno da bismo isključiti sniženu razinu vitamina D uslijed povišene razine PTH. Upravo, kako je u rezultatima navedeno, pronađena je povišena razina PTH kod jedne ispitanice koja je isključena iz istraživanja.

Pronađena je razlika u koncentraciji vitamina D u skupini ispitanica s glaukomom u odnosu na kontrolnu skupinu (40,6:50,43 nmol/L) na statistički značajnoj razini (t-test=2,188; p=0,031) prikazana u tablici 5.1. (str.34). Kod ispitanica oboljelih od glaukoma pronađena je insuficijentna koncentracija vitamina D (40,6 nmol/L), a u kontrolnoj suficijentna koncentracija vitamina D (50.43 nmol/L) prema smjernicama američkog Instituta za prehranu.

Pronašli smo mali broj kliničkih studija koje su istraživale povezanost između vitamina D i glaukoma. Još davne 1953. godine je skupina njemačkih autora zabilježila brzo opadanje IOT nakon intramuskularne aplikacije velikih doza vitamina D (Guist i Steffen 1953.). Međutim, ispitanici koji su bili uključeni u studiju su heterogeni i vitamin D je primjenjivan zajedno sa lijekovima za intraokularni tlak. U zečeva intramuskularna injekcija ulja jetre bakalara reducira IOT za 3-7 mmHg ovisno o dozi (Mancino 1992) (74).

Kutuzova i suradnici su 2012. objavili rad o učinku vitamina D na redukciju intraokularnog tlaka u nehumanih primata. Oni su otkrili da 1,α25 dihidroksivitamin D (1,α25 $(OH)_2D_3$) modulira ekspresiju gena za koji su uključeni u regulaciju intraokularnog tlaka. Topikalna aplikacija 1,α25 dihidroksivitamin D (1,α25$(OH)_2D_3$) i njegovog analoga 2-metilen-19-nor-(20S)- 1,α25 dihidroksivitamina D (2MD) značajno reducira intraokularni tlak za 20% u nehumanih primata, osobito povećanjem drenaže očne vodice. Nakon tretmana sa

1,α25$(OH)_2D_3$ može se remodelirati ECM rezultirajući porastom protoka tekućine, sa smanjenjem rezistencije kroz disrupciju staničnih adhezija i redukciju kontraktilnih molekula (56). Nasuprot tome Krefting i suradnici u randomiziranoj kontroliranoj studiji u ljudi nisu pronašli redukciju intraokularnog tlaka nakon aplikacije visoke doze vitamina D (20 000 IU dva puta tjedno) kroz 6 mjeseci. Nema povezanosti između serumske razine 25(OH)D i intraokularnog tlaka. Aplikacija vitamina D kod ispitanika sa niskom razinom vitamina D nema utjecaja na intraokularni tlak. Njihovi rezultati ne podupiru ulogu vitamina D u regulaciji IOT (74).

Prvu studiju o povezanosti vitamina D i primarnog glaukoma otvorenog kuta objavila je skupina autora Yoo i suradnici 2014. godine. Njihova hipoteza je glasila da je snižen vitamin D status povezan sa većom prevalencijom primarnog glaukoma otvorenog kuta. Oni su pronašli da intraokularni tlak, vertikalni i horizontalni c/d omjer imaju značajnu povezanost sa serumskom razinom 25$(OH)D_3$. Vitamin D može biti razmatran kao potencijalni rizik faktor za razvoj primanog glaukoma otvorenog kuta (75).

Goncalves i autori su u kolovozu 2015. objavili rad o povezanosti vitamina D sa prisutnošću ali ne i težinom primarnog glaukoma otvorenog kuta. Ispitanici sa primarnim glaukomom otvorenog kuta imaju nižu serumsku koncentraciju 25$(OH)D_3$ nego kontrole i veću prevalenciju vitamin D insuficijencije. No, nije bilo razlike u koncentraciji vitamina D prema težini glaukoma koja je definirana također prema promjenama MD indeksa u vidnom polju. Iznenađujuće je sa su oboljeli od glaukoma imali značajno tanju debljinu retinalnih živčanih vlakana i veći c/d omjer, ali manji intraokularni tlak nego kontrole (76). Hipoteza ovog rada je veoma slična našoj, samo je postavljena kasnije i na drugim patofiziološkim mehanizmima.

Podjela ispitanika prema koncentraciji vitamina D u tri skupine izražena kao suficijencija, insuficijencija i deficit, pokazuje da je deficit vitamina D u približnom postotku izražen u obje ispitivane skupine (tablica 5.2, str.35). Nasuprot tome normalna koncentracija vitamina D prisutna je u 40% kontrolnih ispitanika nasuprot 27,8% oboljelih ispitanica (slika 5.8., str.36). Raspodjela ispitanica u skupinama prema koncentraciji vitamina D nije se statistički značajno razlikovala kod oboljelih i kontrolne skupine (Hi-kvadrat test=2,210, p=0,331). Hipovitaminoza D je udružena sa porastom rizika od multiplih maligniteta, metaboličkih i kardiovaskularnih bolesti, imunih i autoimunih bolesti, te visokom postotku infekcija (53).

Insuficijencija vitamin D povezana je s općom neurodegeneracijom uključujući i primarni glaukom otvorenog kuta (76). Deficit vitamina D uzrokuje rahitis kod djece, a kasnije predisponira i pogoršava osteopeniju, osteoporozu i frakture u odraslih. Udružen je sa povećanih rizikom raka, autoimunih bolesti, hipertenzije i infektivnih bolesti (77).

Zapažamo da u skupini oboljelih ispitanica serumska koncentracija vitamina D nije ovisna o dobi, nego je praktički podjednaka u obje dobne skupine (40,99:40,43 nmol/L) što je vidljivo iz tablice 5.3. (str.37). Kod oboljelih u mlađoj dobnoj skupini je bilo 30% ispitanica, a u starijoj 70% ispitanica. U skupini kontrolnih ispitanica zastupljenost je bila 56% u mlađoj dobnoj skupini, nasuprot 44% u starijoj dobnoj skupini. U mlađoj dobnoj skupini kontrolnih ispitanica prosječna koncentracija vitamina D bila 61.44 nmol/L što je bilo statistički značajno (*t*-test=3,832, p<0,001). Uočava se da je prosječna vrijednost vitamina D te dobne skupine viša od prosječne vrijednosti za cijelu skupinu (50,43 nmol/L) što može biti uvjetovano s dobi ispitanica.

Istraživanje Laktašić-Žerjavić i suradnika upućuje na ovisnost vitamina D o dobi, spolu, boji kože i godišnjem dobu. Tako su starija životna dob, ženski spol, tamnija koža, manje izlaganje kože suncu i loše prehrambene navike uz odsutnost hrane obogaćene vitaminom D povezani s nedostatkom vitamina D (64,77,78,79,80). Koncentracija $25(OH)D_3$ ovisi o stvaranju u koži jer je vitamin D slabo zastupljen u hrani, a starije osobe imaju oslabljenu sposobnost stvaranja vitamina D zbog stanjene kože. Kritična dob u kojoj dolazi do najznačajnijeg pada koncentracije $25(OH)D_3$ je 59 godina, a prevalencija svih stupnjeva nedostatka vitamina D značajno raste s dobi. Utvrđena je vrlo visoka prevalencija teškog deficita vitamina D ($25(OH)D_3$ <30 nmol/l) u ispitanica u dobi iznad 65 godina od 23,8% (64).

Koncentracija vitamina D pokazuje sezonske varijacije. Najniža je u kasnu zimu i rano proljeće, a najviša ljeti i u ranu jesen. Hrvatska se nalazi između 42 i 46 stupnja sjeverne zemljopisne širine i stoga se očekuju sezonske varijacije u koncentraciji vitamina D (64). Slavonski Brod se nalazi na 45. stupnju sjeverne zemljopisne širine što onemogućava stvaranje vitamina D u koži pri izlaganju suncu od listopada do ožujka. Stoga je naše istraživanje provedeno u tom periodu kako bi se izbjegle i sezonske varijacije vitamina D. U našem podneblju hrana se uobičajeno ne obogaćuje vitaminom D i prosječna konzumacija ribe, poglavito masne ribe, je insuficijentna. Vitamin D se uobičajeno propisuje samo ženama s dijagnosticiranom osteoporozom, a suradljivost bolesnica pri uzimanju je loša.

Što je koncentracija vitamina D bila viša MD indeks je bio manji. Koncentracija vitamina D bila je statistički značajno povezana samo s promjenama u vidnom polju lijevog oka (tablica 5.4., str.38). Taj se rezultat podudara s našom hipotezom. Znači kod ispitanica s višom koncentracijom vitamina D promjene u vidnom polju su manje, tj. vidno polje je bolje. Može se pretpostaviti da povišena koncentracija vitamina D djeluje zaštitnički na vidni živac i time su promjene u vidnom polju manje izražene. To se odnosi na ukupan broj oboljelih i na oboljele od glaukoma. Kod ispitanice s OHT koncentracija vitamina D nije bila statistički povezana niti s jednim parametrom. Kod ispitanica s OHT, iako neznačajne, sve su korelacije bile pozitivne. Kod kontrolnih ispitanica nije bilo statistički značajne povezanosti sa promjenema u vidnom polju. Ovakav rezultat je očekivan, jer kod tih ispitanica ne očekujemo promjene u vidnom polju.

Oboljele ispitanice imale su višu razinu nitrita (15,53 µmol/L) u odnosu na kontrolnu skupinu (12,61 µmol/L) što je prikazano u tablici 5.5. (str.39). Iako razlika nije statistički značajna ovakav rezultat opravdava postavljenu hipotezu. Određivali smo krajnji produkt metabolizma NO izražen kao ukupna razina nitrata i nitrita (NO_3/NO_2). Znači ukupna razina NO_3/NO_2 je korištena kao zamjenski marker za određivanje razine NO. Relativna proporcija NO_3 i NO_2 je varijabilna i ne može se sa sigurnošću predvidjeti (62).

Studija Gasemija i autora pokazuje prve referentne vrijednosti nitrata i nitrita (NO_x) koje iznose 11,5-76,4 µmol/L za muškarce i od 10,1-65,6 µmol/L za žene (81). U našoj studiji vrijednosti se kreću u rasponu od 0,96 do 64,51 µmol/L za oboljele ispitanice i od 0,64 do 45,16 µmol/L za kontrole. Dušikov oksid (NO) je organski plin ubikvitaran, sintetiziran u tkivu sisavaca pomoću sintetaze NO. Producira se kao krajnji produkt u specifičnim fazama života stanice i funkcionira kao atipični neuronalni glasnik. NO je važan regulator homeostatskih promjena u oku i promjene u njegovoj sintezi mogu dovesti do različitih očnih bolesti (82). Skupina autora Chang i suradnici su pronašli da $1,25(OH)_2D_3$ ovisna doza inhibira iNOS m RNA na LPS stimuliranim RAW 264,7 stanicama i značajno reducira plinovito NO otpuštanje i OONO(-) produkciju. $1,25(OH)_2D_3$ inhibira iNOS ekspresiju i reducira NO produkciju u stimuliranim makrofagima u rasponu fiziološke doze (83). Brojni autori su pronašli povišenu razinu NO u stanicama trabekularne mreže, Šlemovog kanala i cilijarnog tijela kod bolesnika s PGOK (30). Uočena je i povezanost između povišenja razine NO u očnoj vodici glaukomskih bolesnika i smrti retinalnih ganglijskoh stanica (28).

Interesantno je uočiti da je prosječna koncentracija nitrita ovisna o dobi viša u mlađim dobnim skupinama u odnosu na prosjek skupine. Kod oboljelih u mlađoj dobnoj skupini koncentracija nitrita je 17,10 µmol/L, a 14,85 µmol/L u starijoj dobnoj skupini. U kontrolnoj skupini koncentracija nitrita je podjednaka u obje dobne skupine (tablica 5.6., str.40). Nitriti pokazuju negativnu korelaciju s dobi ali samo u fiziološkim stanjima, a ne u patološkim. Serumska koncentracija nitrata i nitrita je različita u različitim dobnim skupinama ovisno o metabolizmu s dobi (61). Rezultati ove studije pokazuju smanjenje produkcije NO s dobi, ne u patološkim stanjima nego u fiziološkim. Nirtiti su u serumu određivani metodom po Griessu, bilo direktno ili prethodno redukcija nitrata u nitrite, pa potom određivanje nitrita metodom po Griessu kao što nalažu standardi (84,85,86,87,88). Budući da smo prvi puta određivali serumsku koncentraciju NO_3/NO_2 kod ispitanica oboljelih od glaukoma nameće se zaključak da mjerenje serumske koncentracije možda nije dovoljno osjetljiva metoda u odnosu na mjerenje NO na lokalnoj razini u oku. Možda bi došli do boljeg zaključka usporedbom koncentracije nitrita mjerenih u serumu i pojedinim strukturama oka.

Nije pronađena statistički značajna razlika u koncentraciji vitamina D i nitrita među ispitivanim skupinama (tablica 5.7, str.41). Davno je pisano o ulozi NO kao potentnog modulatora vaskularnog tonusa (89). Brojni su radovi pokazali o učinku vitamina D na smanjenje koncentracije NO, aktivnost i ekspersiju iNOS. $1,25(OH)_2D_3$ inhibira produkciju čimbenika nekroze tumora α, interleukina 6 i NO u stimuliranoj mikrogliji (89,90,91,92,93). Neki, pak, autori opisuju da NO inducira inhibiciju mitohondrijske $1,25(OH)_2D_3$ sinteze (94). NO je uključen u regulaciju intraokularnog tlaka, modulaciju okularnog protoka i apoptozu. Budući da porast NO nastaje kao posljedica oštećenja induciranog oksidativnim stresom, a vitamin D djeluje zaštitno, moguće da je razina vitamin D kod oboljelih ispitanica dovoljna da bi imala zaštitnu ulogu u prekomjernoj produkciji NO. Moguće da zbog toga nitriti kao krajnji produkt nisu povišeni. Postavlja se pitanje koja je serumska razina vitamina D potrebna da spriječi prekomjernu produkciju NO?

Usporedbom ispitanica oboljelih od glaukoma s kontrolnim ispitanicama, pokazalo se kako statistički značajne razlike postoje u koncentraciji vitamina D, PTH, IOT lijevog oka, fundusu, i vidnom polju lijevog i desnog oka (tablica 5.8., str. 42). Smanjenje vaskularne autoregulacije na glavi vidnog živca osjetljivoj na smanjenje okularnog perfuzijskog tlaka nastaje porastom intraokularnog tlaka i /ili lokalnih metaboličkih zahtijeva. Ishemična

oštećenja koja vjerojatno doprinose kasnijem smanjenju autoregulacije rezultiraju promjenama na glavi vidnog živca (95). Nameće se zaključak da je veći c/d omjer povezan sa smanjenom razinom vitamina D i povišenom razinom NO (NO_3/NO_2). Goncalves i suradnici nisu pronašli povezanost serumske koncentracije $25(OH)D_3$ ni sa vertikalnim c/d omjerom niti sa intraokularnim tlakom. Pronašli su da je smanjena koncentracija 25(OH) D povezana sa primarnim glaukomom otvorenog kuta (PGOK), ali nisu pronašli razlike u koncentraciji 25(OH)D između umjerenog i teškog PGOK. Nije jasno je li povezanost između snižene koncentracije vitamin D i PGOK uzročna. Snižena koncentracija vitamin D je mogući povećani rizik za PGOK (76).

Iako razlika u koncentraciji vitamina D prema uznapredovalosti bolesti nije statistički značajna, može se zaključiti da je većina ispitanica u I skupini po MD indeksu (tablica 5.9., str.43)- To je dobro terapijski gledano, jer znači da promjene u vidnom polju nisu uznapredovale kod većine ispitanica (85%). Koncentracija vitamina D u I skupini po MD indeksu spada u insuficijenciju vitamina D (prema smjernicama Američkog Instituta za prehranu). U II skupini prema MD indeksu je 10% ispitanica, a u III skupini 4% ispitanica (tablica 5.9., str 43). Ranije spomenut rad Goncalvesa i suradnika stupnjevao je težinu primarnog glaukoma otvoreng kuta prema vrijednosti MD indeksa. Teški oblik je definiran kao vrijednost MD indeksa viša od -12 dB. (76). Oboljele ispitanice u prosjeku imaju manju razinu vitamina D od kontrolnih ispitanica, no kad se gledaju oboljele ispitanice zasebno one kod kojih je veći MD indeks imaju višu razinu vitamina D. Moguće tumačenje ovog rezultata je da je mali broj ispitanica sa uznapredovalim oštećenjem vidnog polja (III skupina) ili su po nečemu specifične.

Koncentracija nitrita je najviša u skupini ispitanica s većim promjenama u vidnom polju, no ne i statistički značajna. Ispitanice I skupine imaju prosječnu koncentraciju nitrita 15,51 µmol/L što je jednako prosjeku cijele skupine (15,53 µmol/L). Zapažamo da je u skupini ispitanica s najvećim MD indeksom (III skupina) najviša prosječna koncentracija nitrita (19,03 µmol/L) što je prikazano u tablici 5.10.(str 44).

Iako su u prikazu dobi po skupinama (MD indeks) ispitanice u skupini III bile dobno nešto starije razlika nije bila statistički značajna (Analiza varijance, F=2,653; p=0,076).

Prosječna vrijednost IOT u III skupini ispitanica bila je statistički značajno viša u odnosu na ostale dvije skupine i to za desno oko. Ispitanice III skupine su imale lošije vidno polje (MD

veći od -12 dB). Koncentracija vitamina D u toj skupini bila je 49,63 nmol/L tj. viša od prosjeka za oboljele ispitanice, a nitrita 19,03 μmol/L također viša od prosjeka za grupu. Da bi došli do zaključka zašto ispitanice u skupini III imaju višu serumsku razinu vitamina D svrstali smo ih u 3 skupine i prema koncentraciji nitrita i dobi. Zapažamo da je u skupini III najviša koncentracija nitrita (tablica 5.10, str.44) i da su ispitanice u toj skupini najstarije (tablica 5.11, str. 44). Tumačenje ovog rezultata je otežano zbog malog broja ispitanica u grupi.

Samo su se neke kliničke studije bavile istraživanjem povezanosti između vitamina D i glaukoma (Yoo i suradnici, Goncalves i suradnici) (75,76). Slično kao u te dvije studije i mi smo pronašli da statistički značajne razlike postoje u koncentraciji vitamina D, PTH, IOT lijevog oka, fundusu, i vidnom polju lijevog i desnog oka.

Naši rezultati sugeriraju da serumska razina vitamina D može biti biljeg udružen sa prisutnošću glaukoma, ali ne i sa težinom bolesti. Međutim još nije jasno je li povezanost između snižene koncentracije vitamina D i glaukoma uzročna ili ne. Može se pretpostaviti da je smanjena serumska koncentracija vitamina D mogući povećan rizik za razvoj glaukoma. Starije žene sa glaukomom i vidnom disfunkcijom, uz dobno i spolno uvjetovanu smanjenu serumsku razinu vitamina D mogu imati veću progresiju bolesti.

Neklasični učinci vitamina D na ciljna tkiva su: regulacija hormonske sekrecije, regulacija imune funkcije, regulacija stanične proliferacije i diferencijacije (96). Vitamin D regulira inflamatorne biljege u oku, angiogenezu inibirajući migraciju Langerhansovih stanica i kornealnu novaskularizaciju u miša (97,98). Ima zaštitnu ulogu u ranom stadiju dijabetičke retinopatije. VDR je prisutan u ljudskoj mrežnici, a polimorfizam VDR se odnosi na rizik od retinopatije tipa I (99). Mnoge in vitro i in vivo studije podupiru imunomodulatorni efekt vitamina D na tretman optičkog neuritisa. Neke od velikih funkcija vitamina D su: imunoregulacija, indukcija VDR transkripcije, indukcija nervnog faktora rasta (NGF), te inhibitorni i stimulatorni efekt na drugim citokinima (53,99). Protuupalna svojstva vitamina D mogu biti uključena u glavnu ulogu vitamina D u imunološkom sustavu i modulirajući učinak na stanice koje proizvode vitamin D i izražavaju VDR (100,101,102,104). Studija Yingjuana i suradnika proučavala je polimorfizam gena za VDR kod ispitanika sa PGOK i je li deficit vitamin D važan čimbenik udružen sa razvojem glaukoma. Prisutnost VDR genskog polimorfizma je zabilježen kao kritični rizik faktor za razvoj očnih bolesti. U ljudi je VDR uključen u retinoidnu funkciju oka kao što je akomodacija, zjenična reakcija i produkcija očne

vodice. Međutim, učestalost $1,25(OH)_2D_3$ deficita, promjene u strukturi i funkciji VDR i učestalost alela nositelja polimorfizma VDR zahtijevaju daljnja istraživanja (105). Različitost ove studije u odnosu na ranije je što su određivali serumsku razinu $1,25(OH)_2D_3$, a ne $25(OH)D_3$, iako je $25(OH)D_3$ glavni cirkulirajući oblik vitamin D i njegova se koncentracija određuje kada želimo doznati status vitamin D u organizmu. Uloga vitamina D u smanjenju oksidativnog stresa udruženog sa optičkim neuritisom i multiplom sklerozom treba dodatna objašnjenja (99,106). Kalcitriol može prepraviti ekstracelularni matriks (ECM), uzrokovati gubitak stanične adhezije i rupturu filamenata aktina, te relaksaciju trabekularne mreže i smanjenje intraokularnog tlaka.

Vitamin D može igrati ulogu u regulaciji IOT. Vitamin D kapi u neljudskim primatima su rezultirale 20% smanjenjem IOT (56). Studije na ljudima su pronašle oprečne rezultate. Neke su pronašle sniženje intraokularnog tlaka nakon aplikacije vitamina D (74), a druge su pronašle povezanost niske serumske koncentracije vitamina D i glaukoma (75,76). Trenutno prihvaćen mehanizam kojim vitamin D izvršava svoje funkcije je preko VDR koji je prisutan u mnogim stanicama i tkivima (105).

Vitamin D insuficijencija je povezana sa općom neurodegeneracijom uključujući i glaukomsku optičku neuropatiju. Uske veze između mozga i mrežnice potaknule su više autora razmotriti oko kao prozor u mozak, omogućujući rano otkrivanje i praćenje neurodegenerativnih bolesti.

Ovo opažajno istraživanje ukazuje na deficijenciju vitamina D kod ispitanica oboljelih od glaukoma na statistički značajnoj razini (*t* –test=2,188; p=0,031) (tablica 5.1, str.34, slika 5.7,str.35). U našem istraživanju je opis karakteristika sudionika i ovisnih varijabli detaljan. Određivanje koncentracije vitamina D je rađeno u jednom laboratoriju, kao i određivanje koncentracije nitrita, te je na taj način izbjegnuta međulaboratorijska varijabilnost. Uzorak ispitanika je bio dovoljno velik da se razlika među skupinama proglasi statistički značajnom, jer je razlika među skupinama bitno veća.

Vitamin D deficit ima oblik pandemije. Naši rezultati daju opravdanje za racionalno mjerenje razine vitamine D kod bolesnika oboljelih od glaukoma. Na ovom području do sada je proveden relativno mali broj istraživanja. Neka su pokazala povezanost hipovitaminoze D i glaukoma (75,76). Budući da u našem istraživanju nismo potvrdili postavljenu hipotezu, ono je otvorilo brojne nedoumice i mogućnost daljnih istraživanja kako na kliničkoj tako i na

molekularnoj razini. Do sada nismo pronašli ovako postavljenu hipotezu na tom patofiziološkom mehanizmu. Potiče nas na razmišljanje koja je razina NO, odnosno nitrita u serumu patološka za razvoj i progresiju glaukoma. Ukazali smo na složenost problematike vitamina D i njegovu moguću ulogu u razvoju glaukomske optičke neuropatije. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem upućuju da se mjerenje koncentracije vitamina D i nitrita može koristiti u budućim istraživanjima uz ispitivanje većeg broja ovisnih varijabli.

7. ZAKLJUČCI

1. Serumska koncentracija vitamina D je snižena kod ispitanica oboljelih od glaukoma u odnosu na kontrolnu skupinu.
2. Vitamin D može imati zaštitnu funkciju na promjene u vidnom polju kod ispitanica s glaukomom.
3. Kod ispitanica oboljelih od glaukoma veće su promjene na glavi vidnog živca što može upućivati na neuroprotektivni učinak vitamina D na glaukomsku optičku neuropatiju.
4. Nitriti nisu povišeni kod oboljelih ispitanica na statistički značajnoj razini, što ukazuje da NO nije uključen u zaštitni učinak vitamina D na glaukom.
5. Možemo zaključiti da serumska razina vitamina D može biti biljeg udružen s prisutnošću glaukoma kao neurodegenerativne bolesti, ali ne i s težinom bolesti.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Ovim istraživanjem smo ispitivali je li kod ispitanica oboljelih od glaukoma i okularne hipertenzije snižena serumska koncentracija vitamina D uslijed povišene koncentracije nitrita. Uspoređivali smo povezanost kliničkih parametara sa serumskom razinom vitamina D, kako bismo zaključili o povezanosti vitamina D i glaukomske optičke neuropatije. Hipovitaminoza D dovodi do manje inibicije NOS-a, tj. povećane aktivnosti sintetaze dušikovog oksida (NOS), veće produkcije NO i veće peroksinitritne toksičnosti. Dušikov oksid uzrokuje porast oslobađanja glutamata i neuronalnu toksičnost, što je jedan od uzroka nastanka glaukomske optičke neuropatije. Na ovoj patofiziološkoj povezanosti temelji se i naša hipoteza. Prisutnost vitamin D receptora je dokazana u mnogim strukturama ljudskog oka. Ukoliko postoji suficijentna koncentracija vitamina D, moguće je njegovo imunomodulatorno djelovanje.

Nacrt studije: Opažajno presječno istraživanje s kontrolnom skupinom.

Ispitanici i metode: U istraživanje je uključeno 90 ispitanica oboljelih od glaukoma u dobi od 45 do 55 godine starosti. U kontrolnu skupinu je uključeno 50 ispitanica iste dobne skupine. Ispitanicama smo uzeli oftalmološki status, izmjerili serumsku koncentraciju vitamina D i nitrita.

Rezultati: Intraokularni tlak lijevoga oka je statistički značajno viši u oboljelih u odnosu na kontrolne ispitanice (*t*-test= -2,617, p=0,01). Prosječan c/d omjer kod oboljelih ispitanica je bio statistički značajan u odnosu na kontrolnu skupinu (*t*-test=-9,257; p<0,001). Postojala je statistički značajna razlika između oboljelih i kontrolnih ispitanica u vrijednosti MD indeksa lijevoga (*t*-test=2,693, p=0,008) i desnoga oka (*t*-test=3,006; p=0,003).

Ispitanice oboljele od glaukoma imale su prosječnu koncentraciju vitamina D 40,6 nmol/L, a ispitanice u kontrolnoj skupini 50,43 nmol/L. Ova razlika bila je statistički značajna (*t*-test= 2,188; p= 0,031), odnosno ispitanice koje nisu imale glaukom su imale u prosjeku višu razinu vitamina D. Deficit vitamina D približno je izražen u obje ispitivane skupine. Normalna koncentracija vitamina D prisutna u 40% kontrolnih nasuprot 27,8% oboljelih ispitanica. Raspodjela ispitanica u skupinama prema koncentraciji vitamina D nije se statistički značajno razlikovala kod oboljelih i kontrolne skupine (Hi-kvadrat test= 2,210, p=0,331). U skupini oboljelih ispitanica serumska koncentracija vitamina D nije ovisna o dobi, nego je podjednaka

u obje dobne skupine (40,99:40,43 nmol/L). U mlađoj dobnoj skupini kontrolnih ispitanica prosječna koncentracija vitamina D bila 61.44 nmol/L što je bilo statistički značajno (*t*-test=3,832, p<0,001). Uočava se da je prosječna vrijednost vitamina D te dobne skupine viša od prosječne vrijednosti za cijelu skupinu (50,43nmol/L).

Izmjerena vrijednost nitrata/nitrita ((NO_3^-/NO_2^-) je 15,48 µmol/L u skupini oboljelih i 12,93 µmol/L u kontrolnoj skupini. Nismo dobili statistički značajnu razliku između skupina, ali ovaj rezultat opravdava postavljenu hipotezu. Nitriti nisu bili statistički značajno povezani s vitaminom D niti kod jedne skupine ispitanica. Nismo našli povezanost serumske koncentracije vitamina D prema uznapredovalosti bolesti (MD indeks).

Zaključak: Naši rezultati sugeriraju da serumska razina vitamina D može biti biljeg udružen s prisutnošću glaukoma, ali ne i sa težinom bolesti. Međutim još nije jasno je li povezanost između snižene serumske koncentracije vitamina D i glaukoma uzročna ili ne. Budući da nitriti nisu povišeni kod ispitanica sa glaukomom, možemo zaključiti da NO nije uključen u zaštitni učinak vitamin D na glaukom. Vitamin D insuficijencija je povezana s neurodegenerativnim bolestima uključujući glaukomsku optičku neuropatiju.

Klučne riječi: vitamin D, glaukom, nitriti

9. SUMMARY

ASSOCIATION OF SERUM VITAMIN D CONCENTRATION AND GLAUCOMATOUS OPTIC NEUROPATHY IN WOMEN

Aim of the study: The aim was to investigate whether serum vitamin D concentration is decreased due to the increased nitrite concentration in female patients suffering from glaucoma and ocular hypertension. Correlation of clinical parameters with serum vitamin D level was compared to determine vitamin D association with glaucomatous optic neuropathy. Vitamin D hypovitaminosis leads to lower nitric oxide synthase (NOS) inhibition, i.e. to increased NOS, greater nitric oxide production and higher peroxynitrite toxicity. Nitric oxide induces release of glutamate and neuronal toxicity, which is one of the causes of glaucomatous optic neuropathy development. Our hypothesis was based on this pathophysiological association. The presence of vitamin D receptors has been demonstrated in many structures of the human eye. Thus, vitamin D immunomodulatory action may be postulated in the presence of a sufficient vitamin D concentration.

Study design: Observational cross-sectional study with control group.

Subjects and methods: The study included 90 women aged 45-55 suffering from glaucoma (patient group) and 50 age-matched women free from glaucoma (control group). All study subjects underwent ophthalmologic examination and determination of vitamin D and nitrite serum concentrations.

Results: The left eye intraocular pressure was significantly higher in glaucoma patients as compared with control subjects (*t*-test=-2.617; p=0.01). The mean c/d ratio showed a statistically significant between-group difference (*t*-test=9.257; p<0.001). There was a statistically significant between-group difference in MD index on both left and right eyes (*t*-test=2.693; p=0.008 and *t*-test=3.006; p=0.003, respectively).

The mean serum vitamin D concentration was 40.6 nmol/L in patient group and 50.43 nmol/L in control group, yielding a statistically significant difference (*t*-test=2.188; p=0.031). Accordingly, the mean serum vitamin D concentration was higher in the control group of women free from glaucoma. Vitamin D deficiency was recorded in a comparable proportion of subjects from both groups. Normal serum vitamin D concentration was found in 40% of

control subjects *versus* 27.8% of glaucoma patients. Distribution of subjects according to vitamin D concentration did no differ significantly between the patient group and control group (χ^2-test=2.210; p=0.331). In the group of glaucoma patients, serum vitamin D concentration was not age dependent but was comparable in both age groups (40,99 *vs*. 40,43 nmol/L). In younger age group, the mean serum vitamin D concentration was 61.44 nmol/L, yielding a statistically significant difference (*t*-test=3.832; p<0.001). It should be noted that the mean serum vitamin D concentration measured in this age group exceeded the mean vitamin D concentration recorded in this group as a whole (50.43 nmol/L).

The mean serum nitrate/nitrite (NO_3^-/NO_2^-) concentration was 15.48 μmol/L and 12.93 μmol/L in the patient group and control group, respectively, yielding no statistically significant between-group difference but justifying the study hypothesis. Nitrites were not statistically significantly associated with vitamin D in either group of subjects. There was no association of serum vitamin D concentration with the disease severity (MD index) either.

Conclusion: Our results suggest that serum level of vitamin D could serve as a marker associated with the presence of glaucoma but not with the disease severity. However, it remains obscure whether the association of lower serum vitamin D concentration and glaucoma is causal or not. Since, in female patients with glaucoma the increased amount of nitrites is not found, it can be concluded that NO is not involved in the protective effect of vitamin D on glaucoma. Vitamin D insufficiency is associated with neurodegenerative disorders including glaucomatous optic neuropathy.

Key words: vitamin D, glaucoma, nitrite

10. LITERATURA

1. Yanoff M, Duker YS. Ophthalmology. 2nd Ed. St. Luis: Mosby, 2004.
2. Gupta N, Weinreb RN. New definitions of glaucoma. Curr Opin Ophthalmol 1997;8:38-41.
3. Quigley HA. Neuronal death in glaucoma. Prog Retin Eye Res 1999;18:39-57.
4. Agarwal R, Gupta SK, Agarwal P, Saxena R, Agrawal SS. Current concepts in the pathophysiology of glaucoma. Indian J Ophthalmol 2009;57:257-66.
5. Kaushik S, Pandav SS, Ram J. Neuroprotection in glaucoma. J Postgrad Med 2003;49:90–5.
6. Agarwal R, Gupta SK, Agarwal P, Saxena R, Agrawal SS. Current concepts in the pathophysiology of glaucoma. Indian J Ophthalmol 2009;57(4):257-66.
7. Stamer WD, Lei Y, Boussommier-Calleja A, Overby DR, Ethier CR. eNOS, a pressure-dependent regulator of intraocular pressure. Invest Ophthalmol Vis Sci 2011;52:9438-44.
8. Schneemann A, Leusink-Muis A, van den Berg T, Hoyng PF, Kamphuis W. Elevation of nitric oxide production in human trabecular meshwork by increased pressure. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2003;241:321-6.
9. Farkas RH, Grosskreutz CL. Apoptosis, neuroprotection and retinal ganglion cell death: An overview. Int Ophthalmol Clin 2001;41:111-30.
10. Morrison JC, Moore CG, Deppmeier LM, Gold BG, Meshul CK, Johnson EC. A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. Exp Eye Res 1997;64:85-96.
11. Chauhan BC, Pan J, Archibald ML, LeVatte TL, Kelly ME, Tremblay F. Effect of intraocular pressure on optic disc topography, electroretinography, and axonal loss in a chronic pressure-induced rat model of optic nerve damage. Invest Ophthalmol Vis Sci 2002;43:2969-76.
12. Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Martin KR, Valenta D, Baumrind LA, Pease ME. Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats. Invest Ophthalmol Vis Sci 2002;43:402-10.
13. Agar A, Yip SS, Hill MA, Coroneo MT. Pressure related apoptosis in neuronal cell lines. J Neurosci Res 2000;60:495-503.

14. Johnson EC, Morrison JC, Farrell S, Deppmeier L, Moore CG, McGinty MR. The effect of chronically elevated intraocular pressure on the rat optic nerve head extracellular matrix. Exp Eye Res 1996;62:663-74.
15. Pena JD, Taylor AW, Ricard CS, Vidal I, Hernandez MR. Transforming growth factor beta isoforms in human optic nerve heads. Br J Ophthalmol 1999;83:209-18.
16. Cordeiro MF. Beyond mitomycin: TGF-beta and wound healing. Prog Retin Eye Res 2002;21:75-89.
17. Zhang X, Cheng M, Chintala SK.Kainic acid-mediated upregulation of matrix metalloproteinase-9 promotes retinal degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci 2004;2374-83.
18. Nickells W. Retinal ganglion cell death in glaucoma: the how, the witty and the maybe. J Glaucoma 1996;5:345-56.
19. Wang JJ, Mitchell P, Smith W. Is there an association between migraine headache and open-angle glaucoma? Findings of the Blue Mountains Study. Ophthalmology 1997;104:1714-9.
20. Cursiefen C, Wisse M, Cursiefen S, Jünemann A, Martus P, Korth M. Migraine and tension headache in high-pressure and normal-pressure glaucoma. Am J Ophthalmol 2000;129:102-4.
21. Cellini M, Possati GL, Profazio V, Sbrocca M, Caramazza N, Caramazza R. Color Doppler imaging and plasma levels of endothelin-1 in low-tension glaucoma. Acta Ophthalmol Scand 1997;224:11-3.
22. Noske W, Hensen J, Wiederholt M. Endothelin-like immunoreactivity in aqueous humor of patients with primary open-angle glaucoma and cataract. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 1997;235:551-2.
23. Tezel G, Kass MA, Kolker AE, Becker B, Wax MB. Plasma and aqueous humor endothelin levels in primary open-angle glaucoma. J Glaucoma 1997;6:83-9.
24. Golubnitschaja-Labudova O, Liu R, Decker C, Zhu P, Haeflinger IO, Flammer J. Altered gene expression in lymphocytes of patients with normal-tension glaucoma. Curr Eye Res 2000;21:867-76.
25. Golubnitschaja O, Yeghiazaryan K, Liu R, Mönkemann H, Leppert D, Schild H, Haefliger IO, Flammer J. Increased expression of matrix metalloproteinases in

mononuclear blood cells of normal-tension glaucoma patients. J Glaucoma 2004;13:66-72.

26. Sucher NJ, Lipton SA, Dreyer EB. Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells. Vis Res 1997;27:3483-93.
27. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. N Engl J Med 1993;329:2002-12.
28. Neufeld AH. Nitric oxide a potential mediator of retinal ganglion cell damage in glaucoma. Surv Ophthalmol 1999;43:S129-35.
29. Siu AW, Leung MC, To CH, Siu FK, Ji JZ, So KF. Total retinal nitric oxide production is increased in intraocular pressure-elevated rats. Exp Eye Res 2002;75:401-6.
30. Liu B, Neufeld AH. Expression of nitric oxide synthase-2 (NOS-2) in reactive astrocytes of the human glaucomatous optic nerve head. Glia 2000;30:178-86.
31. 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.
32. Neufeld AH. Pharmacologic neuroprotection with an inhibitor of nitric oxide synthase for the treatment of glaucoma. Brain Res Bull 2004;62:455-9.
33. Ferreira SM, Lerner SF, Brunzini R, Evelson PA, Llesuy SF. Oxidative stress markers in aqueous humor of glaucoma patients. Am J Ophthalmol 2004;137:62-9.
34. Yang J, Tezel G, Patil RV, Romano C, Wax MB. Serum autoantibody against glutathione S-transferase in patients with glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci 2001;42:1273-6.
35. Gherghel D, Griffiths HR, Hilton EJ, Cunliffe IA, Hosking SL. Systemic reduction in glutathione levels occurs in patients with primary open-angle glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci 2005;46:877-83.
36. Yildirim O, Ates NA, Ercan B, Muslu N, Unlu A, Tamer L, Atik U, Kanik A. Role of oxidative stress enzymes in open angle glaucoma. Eye (Lond) 2005;19:580-3.
37. Saccà SC, Pascotto A, Camicione P, Capris P, Izzotti A. Oxidative DNA damage in human trabecular meshwork and its correlation with intraocular pressure and visual field in primary open angle glaucoma. Arch Ophthalmol 2005;123:458-63.

38. Zhou L, Li Y, Yue BY. Oxidative stress affects cytoskeletal structure and cell-matrix interactions in cells from an ocular tissue: The trabecular meshwork. J Cell Physiol 1999;180:182-9.
39. European glaucoma society. Terminology and guidelines for glaucoma. 3rd Ed. Savona: PubliComm, 2008.
40. Kanski JJ. Clinical Ophthalmology. A Systematic Approach. 4th Ed. Oxford: Butterworth Heinemann, 1999.
41. Wani JS, Sajid Mir M, Nasti AR. Automated perimetry- interpreting the data. JK Pract 2005;12:219-23.
42. Flammer J. Glaucoma: A Guide for Patients, An Introduction for Care Providers, A Quick Reference. Boston: Hogrefe & Huber Pub, 2006.
43. Laktašić-Zerjavić N, Korsić M, Crncević-Orlić Z, Anić B. Vitamin D: vitamin from the past and hormone of the future. Lijec Vjesn 2011;133:194-204.
44. Bartley J. Vitamin D: emerging roles in infection and immunity. Expert Rev Anti Infect Ther 2010;8:1359-69.
45. Holick MF. The vitamin D deficiency pandemic and consequences for nonskeletal health: mechanisms of action. Mol Aspects Med 2008;29:361-8.
46. Willems HM, van den Heuvel EG, Carmeliet G, Schaafsma A, Klein-Nulend J, Bakker AD. VDR dependent and independent effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on nitric oxide production by osteoblasts. Steroids 2012;77:126-31.
47. The Marshall Protocol Knowledge Base. Eye diseases. Available at: http://mpkb.org/home/diseases/eyes [15.07.2014]
48. Johnson JA, Grande JP, Roche PC, Campbell RJ, Kumar R. Immunolocalization of calcitriol receptor, plasma membrane calcium pump and calbindin-D28 k in the cornea and ciliary body of the rat eye. Ophthalmic Res 1995;27:42-7.
49. Johnson JA, Grande JP, Roche PC, Campbell RJ, Kumar R. Immuno-localization of the calcitriol receptor, calbindin-D28k and the plasma membrane calcium pump in the human eye. Curr Eye Res 1995;14:101-8.
50. Bidmon HJ, Stumpf WE. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 binding sites in the eye and associated tissues of the green lizard Anolis carolinensis. Histochem J 1995;27:516-23.

51. Girgis CM, Clifton-Bligh RJ, Hamrick MW, Holick MF, Gunton JE. The Roles of vitamin D in Skeletal Muscle: form, function, and metabolism. Endocr Rev 2013;34:33-83.
52. Zittermann A, Gummert JF. Nonclassical vitamin D action. Nutrients 2010;2:408-25.
53. Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D: modulator of the immune system. Curr Opin Pharmacol 2010;10:482-96.
54. Holick MF. Vitamin D: extraskeletal health. Rheum Dis Clin North Am 2012;38:141-60.
55. Molinari C, Uberti F, Grossini E, Vacca G, Carda S, Invernizzi M, Cisari C. 1α,25-dihydroxycholecalciferol induces nitric oxide production in cultured endothelial cells. Cell Physiol Biochem 2011;27:661-8.
56. Kutuzova GD, Gabelt BT, Kiland JA, Hennes-Beann EA, Kaufman PL, DeLuca HF. 1α,25-Dihydroxyvitamin D(3) and its analog, 2-methylene-19-nor-(20S)-1α, 25-dihydroxyvitamin D(3) (2MD), suppress intraocular pressure in non-human primates. Arch Biochem Biophys 2012;518:53-60.
57. Chang JM, Kuo MC, Kuo HT, Hwang SJ, Tsai JC, Chen HC, Lai YH. 1-alpha, 25-Dihydroxyvitamin D3 regulates inducible nitric oxide synthase messenger RNA experssion and nitric oxide release in macrophage-like RAW 264,7 cells. J Lab Clin Med 2004;143:14-22.
58. Toda N, Nakanishi-Toda M. Nitric oxide:ocular blod flow, glaucoma, and diabetic retinopathy. Prog Retin Eye Res 2007;26:205-38.
59. Štraus B. Dušikov oksid i njegove funkcije. Biochem Med 1996;6:13-21.
60. Tsikas D. Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids. Free Radic Res 2005;39:797-815.
61. Toprakçi M, Ozmen D, Mutaf I, Turgan N, Parildar Z, Habif S, Güner I, Bayindir O. Age-associated changes in nitric oxide metabolites nitrite and nitrate. Int J Clin Lab Res 2000;30:83-5.
62. Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit (LDH Method). Available at: https://www.funakoshi.co.jp/data/datasheet/CAY/760871.pdf [23.10.2014.]
63. Culotta E, Koshland DE Jr. NO news is good news. Science 1992;258:1862-5.

64. Laktasic-Zerjavic N, Korsic M, Crncevic Orlic Z, Kovac Z, Polasek O, Soldo-Juresa D. Vitamin D status, dependence on age, and seasonal variations in the concentration of vitamin D in Croatian postmenopausal women initially screened for osteoporosis. Clin Rheumatol 2010;29:861-7.
65. Srećković S, Petrović M, Petrović N, Vukosavljević M. Comparison of primary medicament therapy effects and primary argon laser trabeculoplasty on regulation of intraocular pressure and stability of perimetry findings in open angle glaucoma. Vojnosanit Pregl 2011;68:225-30.
66. Bell JA. Primary Open-Angle Glaucoma. Available at: http://emedicine.medscape.com/article/1206147-overview [27.10.2014.]
67. 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.
68. Klein BE, Klein R, Sponsel WE, Franke T, Cantor LB, Martone J, Menage MJ. Prevalence of glaucoma. Ophthalmology 1992;99:1499-504.
69. Coffey M,Reidy A,Wormald R, Xian WX, Wright L, Courtney P. Prevalence of glaucoma in the west of Ireland. Br J Ophthalmol 1993;77:17-21.
70. Leske MC, Connell AMS, Schachat AP, Hyman L. The Barbados Eye Study. Prevalence of open angle glaucoma. Arch Ophthalmol 1994;112:821-9.
71. 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;101:1851-5.
72. Vajaranant TS, Nayak S, Wilensky JT, Joslin CE. Gender and glaucoma: what we know and what we need to know. Curr Opin Ophthalmol 2010;21:91-9.
73. Uro M, Beauchet O, Cherif M, Graffe A, Milea D, Annweiler C. Age-Related Vitamin D Deficiency Is Associated with Reduced Macular Ganglion Cell Complex: A Cross-Sectional High-Definition Optical Coherence Tomography Study. PLoS One 2015;10:e0130879.
74. Krefting EA, Jorde R, Christoffersen T, Grimnes G. Vitamin D and intraocular pressure--results from a case-control and an intervention study. Acta Ophthalmol 2014;92:345-9.

75. Yoo TK,Oh E, Hong S. Is vitamin D associated with open-angle glaucoma? A cross-sectional study from South Korea. Public Health Nutr 2014;17:833-43.
76. Goncalves A, Milea D, Gohier P, Jallet G, Leruez S, Baskaran M, Aung T, Annweiler C. Serum vitamin D status is associated with the presence but not the severity of primary open angle glaucoma. Maturitas 2015;81:470-4.
77. Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. Am J Clin Nutr 2008;87:1080S-6S.
78. Holick MF. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. Ann Epidemiol 2009;19:73-8.
79. Mithal A, Wahl DA, Bonjour JP, Burckhardt P, Dawson-Hughes B, Eisman JA, El-Hajj Fuleihan G, Josse RG, Lips P, Morales-Torres J; IOF Committee of Scientific Advisors (CSA) Nutrition Working Group. Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. Osteoporos Int 2009;20:1807-20.
80. Lips P. Vitamin D status and nutrition in Europe and Asia. J Steroid Biochem Mol Biol 2007;103:620-5.
81. Ghasemi A, Zahediasl S, Azizi F. Reference values for serum nitric oxide metabolites in an adult population. Clin Biochem 2010;43:89-94.
82. Drago F, Bucolo C. Therapeutic potential of nitric oxide modulation in ocular diseases. Drug News Perspect 2010;23:430-7.
83. Chang JM, Kuo MC, Kuo HT, Hwang SJ, Tsai JC, Chen HC, Lai YH. 1-alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates inducible nitric oxide synthase messenger RNA expression and nitric oxide release in macrophage-like RAW 264.7 cells. J Lab Clin Med 2004;143:14-22.
84. Guevara I, Iwanejko J, Dembińska-Kieć A, Pankiewicz J, Wanat A, Anna P, Gołabek I, Bartuś S, Malczewska-Malec M, Szczudlik A. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. Clin Chim Acta 1998;274:177-88.
85. Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. Clin Chem 1995;41:892-6.

86. Giovannoni G, Land JM, Keir G, Thompson EJ, Heales SJ. Adaptation of the nitrate reductase and Griess reaction methods for the measurement of serum nitrate plus nitrite levels. Ann Clin Biochem 1997;34:193-8.
87. Guevara I, Iwanejko J, Dembińska-Kieć A, Pankiewicz J, Wanat A, Anna P, Gołabek I, Bartuś S, Malczewska-Malec M, Szczudlik A. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. Clin Chim Acta 1998;274:177-88.
88. Catalog Number KGE001 For the quantitative determination of Nitric Oxide concentrations in cell culture supernates, serum, plasma, and urine. Available at: https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/kge001.pdf [27.10.2014.]
89. Haefliger IO, Flammer J, Lüscher TF. Nitric oxide and endothelin-1 are importantregulators of human ophthalmic artery. Invest Ophthalmol Vis Sci 1992;33:2340-3.
90. Adams JS, Ren SY, Arbelle JE, Shany S, Gacad MA. Coordinate regulation of nitric oxide and 1,25-dihydroxyvitamin D production in the avian myelomonocytic cell line HD-11. Endocrinology 1995;136:2262-9.
91. Gupta R, Dixon KM, Deo SS, Holliday CJ, Slater M, Halliday GM, Reeve VE, Mason RS. Photoprotection by 1,25 dihydroxyvitamin D3 is associated with an increase in p53 and a decrease in nitric oxide products. J Invest Dermatol 2007;127:707-15.
92. Lefebvre d'Hellencourt C, Montero-Menei CN, Bernard R, Couez D. Vitamin D3 inhibits proinflammatory cytokines and nitric oxide production by the EOC13 microglial cell line. J Neurosci Res 2003;71:575-82.
93. Blom J, Giove T, Deshpande M, Eldred WD. Characterization of nitric oxide signaling pathways in the mouse retina. J Comp Neurol 2012;520:4204-17.
94. Adams JS, Ren SY. Autoregulation of 1,25-dihydroxyvitamin D synthesis in macrophage mitochondria by nitric oxide. Endocrinology. 1996;137:4514-7.
95. Moore D, Harris A, Wudunn D, Kheradiya N, Siesky B. Dysfunctional regulation of ocular blood flow: A risk factor for glaucoma? Clin Ophthalmol 2008;2:849-61.
96. Bikle D. Nonclassic actions of vitamin D. J Clin Endocrinol Metab 2009;94:26-34.

97. Lin Y, Ubels JL, Schotanus MP, Yin Z, Pintea V, Hammock BD, Watsky MA. Enhancement of vitamin D metabolites in the eye following vitamin D3 supplementation and UV-B irradiation. Curr Eye Res 2012;37:871-8.
98. Yin Z, Pintea V, Lin Y, Hammock BD, Watsky MA. Vitamin D enhances corneal epithelial barrier function. Invest Ophthalmol Vis Sci 2011;52:7359-64.
99. Nebbioso M, Buomprisco G, Pascarella A, Pescosolido N. Modulatory Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on Eye Disorders: A Critical Review. Crit Rev Food Sci Nutr 2015 Jun 9, [Epub ahead of print]
100. Bikle DD. Vitamin D and immune function: understanding common pathways. Curr Osteoporos Rep 2009;7:58-63.
101. Adorini L, Penna G. Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. Nat Clin Pract Rheumatol 2008;4:404-12.
102. Mathieu C, Van Etten E, Gysemans C, Decallonne B, Kato S, Laureys J, Depovere J, Valckx D, Verstuyf A, Bouillon R. In vitro and in vivo analysis of the immune system of vitamin D receptor knockout mice. J Bone Miner Res 2001;16:2057-65.
103. Cantorna MT, Zhu Y, Froicu M, Wittke A.Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D3, and the immune system. Am J Clin Nutr 2004;80:1717S-20S.
104. Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D: modulator of the immune system. Curr Opin Pharmacol 2010;10:482-96.
105. Yingjuan LV, Quingbin Y, Wenjiang M, Hua L, Jian J, Xiaoromg L.Asociations of vitamin D deficiency and vitamin D receptor (Cdx-2, Fok I, Bsm I and Taq I) polymorphisms with the risk of primary open-angle glaucoma. BMC Ophthalmol 2016;16:116.
106. Adams JS, Hewison M. Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. Nat Clin Pract Endocrinol Metab 2008;4:80-90.

11. ŽIVOTOPIS

Ja, Željka Vuković Arar, rođena sam 29. svibnja 1971. godine u Slavonskom Brodu, Hrvatica, udana, majka troje djece, u trajnom radnom odnosu u Općoj bolnici „Dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu na Odjelu za oftalmologiju i optometriju.

Obrazovanje

2015. godine postala sam subspecijalist iz područja glaukomatologije.

2014. stekla sam naziv primarijus.

2014. obranila sam temu doktorske disertacije pod naslovom „Povezanost serumske koncentracije vitamina D i glaukomske optičke neuropatije kod žena“.

2007. godine upisala sam poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta »Josip Juraj Strossmayer» u Osijeku.

2006. godine obranila sam magistarsku radnju pod naslovom „Usporedba medikamentoznog i kirurškog liječenja intrabulbarnog stranog tijela“ pod vodstvom mentora prof. dr. sc. Damira Katušića.

2001. godine položila sam specijalistički ispit iz oftalmologije na Klinici za očne bolesti KBC Rebro

1997. započela specijalizaciju iz oftalmologije. Kao liječnik „sekundarac“ radim na očnom odjelu od 1996. godine.

1995. sam se zaposlila u Općoj bolnici „Dr. Josip Benčević“ nakon položenog državnog ispita

1995. godine diplomirala sam na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

1989. godine završila sam CUO „Zlatko Šnajder“ U Slavonskom Brodu.

1985. godine završila sam Osnovnu školu u Podvinju pokraj Slavonskog Broda.

Članstvo u stručnim i znanstvenim društvima:

Član sam Hrvatskog liječničkog zbora (HLZ) i Hrvatske liječničke komore (HLK).

Član sam Hrvatskog oftalmološkog društva (HOD).

Član sam ECLSO (Europskog udruženja oftalmologa-kontaktologa).

Član sam Hrvatskog katoličkog liječničkog društva (HKLD).

Zaposlenje

Zaposlena sam na Odjelu za Očne bolesti Opće bolnice „Dr. Josip Benčević“, kao specijalist oftalmolog, subspecijalist glaukomatolog.

Sudjelovala sam na mnogim stručnim i znanstvenim skupovima u zemlji i inozemstvu kao aktivni i pasivni sudionik. Završila sam poslijediplomski tečaj iz ultrazvuka u oftalmologiji.

Objavila sam brojne stručne i znanstvene radove.

Radovi u CC časopisima

1. Šapina, Lidija; Lojen, Gordana; Janjetović, Željka; Vuković-Arar, Željka.Giant aneurysm of basilar artery. Coll Antropol 2011;35(2):607-9.
2. Pajić-Penavić I,Danic D, Mrzljak-Vučinić N,Matic I, Vuković Arar Z, Dikanović M. Postoperative quality of life after two different methods of tonsillectomy. Wien Klin Wochenschr. 2013;125(17-18): 524-8.
3. Vukovic Arar Z,Vatavuk Z, Miskic B, Janjetovic Z, Sekelj S, Knezevic Pravecek M.Optic nerve sheath meningeoma: a case report with 15-year follow –up.Semin Ophthalmol 2014;29(1):52-5.
4. Sandra S, Zeljka J, Zeljka VA, Kristian S, Ivana A. The influence of pterygium morphology on fibrin glue conjunctival autografting pterygium surgery. Int Ophthalmol. 2014 Feb;34(1):75-9.
5. Coha B, Vucinic I, Mahovne I,Vukovic-Arar Z. Extranodal lymphomas of head and neck with emphasis on NK/T-cell lymphoma, nasal type.J Craniomaxillofac. Surg. 2014;42(2): 149-52.
6. Sekelj S, Dekaris I, Balog T, Mahovne I, Krstonijevic EK, Janjetovic Z, Arar ZV, Aric I. Vascular Endothelial Growth Factor in a Recipient Cornea Acts as a Prognostic Factor for Corneal Graft Reaction Development. Curr Eye Res. 2014 Jun 9:1-8.

Ostali radovi u drugim časopisima

1. Janjetović Ž, Vuković-Arar Ž, Paradžik-Tomić M, Šapina L, Bitunjac M, Lojen G, Marinculić A. Ocular dirofilariasis: a case report. Acta Med Croat 2010;64(1):41-5

2. Vuković-Arar Ž, Janjetović Ž, Marinić M, Sekelj S, Ležaić Ž, Dikanović M. Bolna oftalmoplegija - Tolosa-Huntov sindrom. Acta Med Croat 2007;61:395-8.
3. Janjetović Ž, Vuković-Arar Ž, Marinić M, Pandak N. Uveitis uzrokovan parazitom Toxocara canis. Acta Med Croat 2006;60(1):63-6.
4. Vuković Arar Ž, Janjetović Ž, Sekelj S, Šapina L, Pajić Penavić I. Neuroretinitis caused by bartonella quintana. Med Glas (Zenica) 2012;9(1):112-114
5. Šapina L, Vuletić V, Lojen G, Janjetović Z, Vuković-Arar Z.Head trauma and posttraumatic epilepsy in Slavonski Brod, East Croatia, 1988-2008. Coll Antropol. 2014 Sep;38(3):1077-9.

Kao predavač sam sudjelovala na sljedećim skupovima:

1. 8. Godišnji sastanak Hrvatskog oftalmološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem, 27. Međunarodni simpozij oftalmologa Hrvatske i Slovenije, Zadar, 16-17. Svibnja 2002., Meningeom orbite, predavač.
2. Hrvatski liječnički zbor-podružnica Slav. Brod,07.05.2002: Dijabetes i oko, predavač
3. 7. Hrvatski oftalmološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem, Split 2007, 30th International Congeress of Alpe Adria Ophtahlmological Society.; Frequency diabetic retinopathy in patients on insulin therapy or on oral antidiabetic drugs. predavač
4. Kongres oftalmologa BiH, Tuzla,11.-14.11.2009.: Neuroretinitis caused by Bartonella quintna-a case report. predavač
5. Suvremeni pristup glaukomskoj bolesti, Plitvice, 26.-28.02.2010. predavač
6. Diferencijalna dijagnostika crvenog oka-bolesti i liječenje prednjeg segmenta oka, KBC Osijek, Očni odjel, 27.04.2010. predavač
7. Oftalmološki forum, stručni skup, Sarajevo, 2012: Učinak razine vitamina D na razvoj glaukoma, predavač.
8. Prvi simpozij o palijativnoj skrbi s međunarodnim sudjelovanjem, Slavonski Brod, 17.-18. travanj 2015: Palijativna skrb oftalmološkog bolesnika, predavač.

Sudjelovala sam na brojnim kongresima, simpozijima, te završila poslijediplomske tečajeve kako slijedi:

1. Tečaj iz KPR, Slavonski Brod, 7. i 8. studeni 1997.

2. Glaukomski simpozij s međunarodnim sudjelovanjem. Dijagnosticiranje i liječenje glaukoma, Zagreb, 13.11.1999.
3. Poslijediplomski tečaj 1. Kategorije: Rekonstruktivna i plastična kirurgija periokularnog područja, Zagreb, 24. i 25. veljače 2000. god.
4. Poslijediplomski tečaj 1. Kategorije: Okuloorbitalna ozljeda i neurooftalmološke manifestacije kraniocervikalne ozljede, Zagreb, 12.03.2004.
5. Poslijediplomski tečaj I kategorije. Ultrazvučna oftalmološka dijagnostika, Zagreb, 3-6.11.2004.
6. WET LAB Tuzla, 03-07.10.2005. polaznik tečaja fakoemulzifikacije, tečaj 1. kategorije
7. Peti Hrvatski oftalmološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem, Hvar 2005., Bolna oftalmoplegija-Tolosa-Hunt syndrome. poster
8. Simpozij Korak dalje od glaukoma, Opatija 3-5. ožujka 2006.
9. Analozi prostaglandina kao lijek prvog izbora u suvremenom liječenju glaukoma, stručni skup, Slavonski Brod, 28. 03. 2006.
10. Suvremeni pristup glaukomskoj bolesti, Sv. Martin na Muri, 25-27.09.2009
11. Kongres oftalmologa BiH, Tuzla,11-14.11.2009. Ocular dirofilariasis-a case report, poster/koautor.
12. Simpozij o novostih v oftalmologiji, Ljubljana, 3.02.2010.
13. Novosti o glaukomu i drugim bolestima oka, stručni skup, Kunjevci, 2.10.2010.
14. 8. simpozij Suvremeno u oftalmologiji, Osijek, 12.11.2011.
15. Sastanak Hrvatskog i Slovenskog oftalmološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem-Dijagnostika glaukoma i nove mogućnosti u liječenju, Maribor, 17. ožujka 2012.
16. International symposium on glaucoma, Belgrad, 21. april 2012.
17. Poslijediplomski tečaj stalnog medicinskog usavršavanja 1. kategorije: Retinalne vaskularne bolesti, Zagreb, 25.10.2013.
18. Prvi simpozij: Lasersko liječenje glaukoma, Osijek, 8.03.2014.
19. Međunarodni kurs prve kategorije: Aktuelno u oftalmologiji, Beograd, 22.03.2014.
20. 5th Allergan international forum, Beograd, 22.03.2014.
21. Glaukomski dan u glaukomskom tjednu-glaukomski simpozij, Zagreb, 14.ožujak 2015.
22. Međunarodni poslijedioplomski tečaj 1. kategorije: Nove tehnologije u oftalmologiji, Zagreb, 17. Travnja 2015.

23. Prvi simpozij o palijativnoj skrbi s međunarodnim sudjelovanjem, Slavonski Brod, 17.-18. travanj 2015:Respiratorna insuficijencija kod palijativnog bolesnika, koautor usmeno prezentiranog rada
24. Prvi simpozij o palijativnoj skrbi s međunarodnim sudjelovanjem, Slavonski Brod, 17.-18. travanj 2015: Liječenje boli kod palijativnog bolesnika, koautor usmeno prezentiranog rada
25. Prvi simpozij o palijativnoj skrbi s međunarodnim sudjelovanjem, Slavonski Brod, 17.-18. travanj 2015: Nutricija i hidracija palijativnog bolesnika, koautor usmeno prezentiranog rada

Sažeci u zbornicima skupova

1. Vuković Arar Ž, Janjetović Ž, Marinić M, Miličić D. Exophthalmos caused by frontal sinus mucocoela. Book of abstracts, 5th Slovenian Congres of ophthalmology, 28th Symposium of Ophthalmology of Slovenia and Croatia, 2004.
2. Janjetović Ž, Vuković Arar Ž, Cerovski B, Marinić M. Toxic optic neuropathy caused by narcotics. 5th Slovenian Congres of ophthalmology, 28th Symposium of Ophthalmology of Slovenia and Croatia, 2004.
3. Vuković Arar Ž, Janjetović Ž, Marinić M, Mitrović S, Sekelj S. Painful ophthalmoplegia-Tolosa-Hunt syndrome. Abstract of the 5th Congress of the Croatian Ophtalmological Society with International Participation Ophthalmol Croat 2005;14(Suppl 1) pp 1-154
4. Vuković Arar Ž, Janjetović Ž. Frequency diabetic retinopathy in patients on insulin therapy or on oral antidiabetic drugs. Abstarcts of the 30th International Congeress of Alpe Adria Ophtahlmological Society. Ophthalmol Croat 2007;16(Suppl.1) pp 1-158
5. Šapina L, Lojen G, Ratković-Lozert M, Vuković Arar Ž, Janjetović Ž. Hornerov sindrom i transpozicija velikih krvnih žila-prikaz bolesnika. Neurol Croat 2009;58(suppl. 3)
6. Vuković Arar Ž. Neuroretinitis caused by Bartonella quintana. Acta Medica Saliniana 2009;38(suppl. 1)
7. Janjetović Ž, Vuković Arar Ž,Tomić Paradžik M, Šapina L, Bitnjac M, Lojen G, Marinculić A. Ocular dirofilariasis: a case report. Acta Medica Saliniana 2009;38(suppl. 1)

Sudjelovanja na kongesima

1998. Htvatski oftalmološki kongres, Šibenik, usmena prezentacija: Uveitis uzrokovan toxocarom canis

2001. Hrvatski oftalmološki kongres, Dubrovnik, koautor na usmeno prezentiranom radu: Toksična optikoneuropatija uzrokovana tuberkulostaticima

2002. Hrvatski oftalmološki kongres , Zadar, usmena prezentacija: Meningeom orbite

2003. Hrvatski oftalomološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem, Rovinj, poster Dijabetes i suho oko, rad proglašen među tri najbolja na kongresu

2004. Slovenski oftalmološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem, Ljubljana, poster – usmena prezentacija: Exophthalmos caused by frontal sinus mucocoela.

2004. Slovenski oftalmološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem, Ljubljana, poster, koautor: Toxic Optic Neuropathy caused by narcotics.

2005. Hrvatski oftalmološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem, Hvar: Painful ophthalmoplegia-Tolosa-Hunt syndrome, poster.

2007. 7. Kongres hrvatskog oftalmološkog društva, Split: Učestalost dijabetičke retinopatije kod bolesnika na inzulinu i peroralnim antidijabeticima. usmena prezentacija

2009. Kongres oftalmologa BIH s međunarodnim sudjelovanjem, Tuzla, usmeno izlaganje/prvi autor: Neuroretinitis caused by Bartonella quintana-a case report.

2009. Kongres oftalmologa BIH s međunarodnim sudjelovanjem, Tuzla, poster/koautor: Ocular dirofilariasis-a case report.

2009. Hrvatski neurološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem,Vukovar, poster/koautor : Transpozicija velikih krvnih žila i Hornerov sindrom, prikaz slučaja

2010. X Kongres hrvatskog oftalmološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem, usmena prezentacija/koautor: Effect of travoprost 0,004% on diurnal curve IOP: peak and through analysis

2013. SOE, Copenhagen, Denmark; I Aric, S. Sekelj, Z Janjetovic, Z. Vukovic Arar, I. Mahovne, B. Coha, K. Samardzic, A.Prkacin Opacak: Eyelid lymphomatoid papulosis: a case report

12. PRILOZI

12.1. Dokument obaviještenosti namijenjen potencijalnim ispitanicima u istraživanju

12.2. Pristanak/suglasnost obaviještene osobe/ ispitanika

12.1. Dokument obaviještenosti namijenjen potencijalnim ispitanicima u istraživanju

«Povezanost serumske koncentracije vitamina D i glaukomske optičke neuropatije kod žena»

U ambulanti za glaukom Odjela za očne bolesti „Dr. Josip Benčević“ Slavonski Brod, provodi se prospektivna studija, kojom će s pokušati dobiti odgovor da li je kod bolesnica oboljelih od glaukoma (bolest koja nastaje zbog djelovanja povišenog očnog tlaka na vidni živac) niža serumska razina vitamina D u odnosu na kontrolnu skupinu.

Želim Vam pojasniti svrhu i cilj ovog istraživanja, te osigurati Vaš dragovoljni pristanak za sudjelovanje u njemu.

Cilj istraživanja

Cilj istraživanja je odrediti serumsku razinu vitamina D kod bolesnica oboljelih od galukoma, te pokazati da li postoji povezanost s razvojem glaukoma.

Neželjeni učinci

Budući da se istraživanje provodi u redovitim uvjetima rada liječničke službe, ne predviđaju se dodatni neželjeni učinci.

Opis pretraga

Ako se odlučite za istraživanje, obaviti će kompletan oftalmološki pregled. Iz vene ćemo Vam izvaditi krv kako bismo izmjerili razinu vitamina D u Vašoj krvi. Ukoliko već uzimate vitamin D zbog neke druge bolesti nećete moći sudjelovati u istraživanju.

Nova otkrića

Bit ćete obaviješteni o svim važnim novim informacijama dobivenim za vrijeme istraživanja, a koje mogu utjecati na Vašu spermnost za nastavkom sudjelovanja u ovoj studiji.

Koristi

Možda nećete imati koristi od sudjelovanja u ovom istraživanju, ali znanje koje će se u okviru njega steći možda će pomoći drugima ili imati utjecaja i smjernice za neka nova istraživanja.

Povjerljivost

Imate pravo na privatnost. Svi podaci vezani uz ovo istraživanje bit će povjerljivi, te će uvid u medicinsku dokumentaciju imati smo Vaš liječnik i Vi. Vaše se ime neće objaviti niti u jednom izvješću ni publikaciji proizašloj iz ovog istraživanja.

Dobrovoljno sudjelovanje

Vaša odluka o sudjelovanju u ovom istraživanju je dobrovoljna i odbijanje sudjelovanja neće za sobom povlačiti nikakve neugodnosti.Sudjelovanje možete prekinuti u bilo koje vrijeme bez ikakvih obveza s Vaše strane.

Vaša pitanja

Ako imate bilo kakva pitanja u vezi istraživanja za vrijeme i nakon završetka studije možete kontaktirati Željku Vuković Arar, dr. med. na broj telefona 0915271885 u bilo koje vrijeme.

12.2. Pristanak/suglasnost obaviještene osobe/ ispitanika

Pismenim i usmenim putem sam obaviješten u vezi sudjelovanja u predloženim istraživanju.

Upoznat sam da u svakom trenutku mogu odustati od sudjelovanja u istraživanju bez posljedica. Dobrovoljno pristajem na sudjelovanje u istraživanju.

Svojim potpisom jamčim suglasnost u predviđenom istraživanju.

Ime i prezime ispitanika:_____

potpis ispitanika, datum:_____

Ime i prezime voditelja istraživanja:_____

potpis i datum:_____