



VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOSKLŲ CENTRAS
BIOMOKSLŲ INSTITUTAS
NEUROBIOLOGIJOS IR BIOFIZIKOS KATEDRA

Neurobiologijos magistro studijų programos II kurso studentė

Inesa Lelytė

Magistro baigiamasis darbas

Lazerio ir karbomero indukuotų aukšto akispūdžio modelių palyginimas
***Long Evans* žiurkėse**

Darbo vadovas:

In Vivo padalinio vadovas, UAB Experimentica, dr. Symantas Ragauskas

Darbo konsultantas:

Prof., Habil. dr. Osvaldas Rukšėnas

Vilnius, 2020

TURINYS

Santrumpos	4
ĮVADAS	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA	6
1.1. Vandeninio humoralinio skysčio dinamika	6
1.1.1. Vandeninis humoralinio skysčio formavimasis.....	7
1.1.2. Vandeninis humoralinio skysčio ištekėjimas	11
1.2. Aukšto akispūdžio etiologija ir patogenezė.....	19
1.2.1. Faktoriai lemiantys akispūdžio padidėjimą.....	19
1.2.2. Aukšto akispūdžio sąlygojamos patologijos.....	24
1.3. Eksperimentiniai aukšto akispūdžio gyvūnų modeliai	28
1.3.1. Episklerinių venų sutrikdymo modeliai.....	28
1.3.2. Trabekulinio tinklo užkimšimo modeliai	30
1.3.3. Aukšto akispūdžio modeliuose naudojami gyvūnai	33
4. METODIKA.....	34
2.1. Laboratoriniai gyvūnai, medžiagos, įranga	34
2.1.1. Laboratoriniai gyvūnai	34
2.1.2. Vaistiniai preparatai, reagentai ir kitos medžiagos.....	36
2.1.3. Įranga	38
2.2.1. Akispūdžio matavimas	41
2.2.2. Karbomero injekcija į priekinę kamerą	41
2.2.3. Episklerinių venų fotokoaguliacija lazeriu	42
2.2.4. Gydymas	43
2.2.5. Histologija	43
2.2.5.1. Audinių paruošimas.....	43
2.2.5.2. Visos tinklainės imunofluorescencinis žymėjimas.....	44
2.2.6. Statistinė rezultatų analizė	45
2.3. Tyrimų eiga	46
2.3.1. Pirmas eksperimentas: efektyvios karbomero koncentracijos nustatymas.....	46
2.3.2. Antras eksperimentas: efektyvaus lazerio šūvių skaičiaus nustatymas.....	46

2.3.3. Trečias eksperimentas: lazerio ir karbomero indukuotų aukšto akispūdžio modelių veiksmingumo nustatymas gydant timololiu.....	46
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	47
3.1. Efektyvios karbomero koncentracijos nustatymas	47
3.1.1. Akispūdžio kitimas	47
3.1.2. Tinklainės ganglinių ląstelių išgyvenamumas.....	49
3.2. Efektyvaus lazerio šūvių skaičiaus nustatymas	51
3.2.1. Akispūdžio kitimas	51
3.2.2. Tinklainės ganglinių ląstelių išgyvenamumas.....	53
3.3. Karbomero ir lazerio indukuotų aukšto akispūdžio modelių veiksmingumo nustatymas gydant timololiu.....	55
3.3.1. Akispūdžio kitimas	55
3.3.1.1. Akispūdžio kitimas karbomero indukuoto aukšto akispūdžio modelyje, gydant timololiu	55
3.3.1.2. Akispūdžio kitimas lazerio indukuoto aukšto akispūdžio modelyje, gydant timololiu	56
3.3.2. Tinklainės ganglinių ląstelių išgyvenamumas.....	58
3.3.2.1. Tinklainės ganglinių ląstelių išgyvenamumas, karbomero indukuoto aukšto akispūdžio modelyje, gydant timololiu	58
3.3.2.2. Tinklainės ganglinių ląstelių išgyvenamumas lazerio indukuoto aukšto akispūdžio modelyje, gydant timololiu	59
3.4. Lazerio ir karbomero indukuotų aukšto akispūdžio modelių palyginimas <i>Long Evans</i> žiurkėse.....	61
3.4.1 Akispūdžio kitimas	61
3.4.2. Tinklainės ganglinių ląstelių išgyvenamumas.....	64
3.5. Rezultatų aptarimas	66
IŠVADOS.....	69
SANTRAUKA	70
SUMMARY	71
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	72
1 priedas.....	87

Santrumpos

- AH** - vandeninis humoralinis skystis (angl. *aqueous humour*)
- ATP** - adenozino trifosfatas (angl. *adenosine triphosphate*)
- AVF** - arterioveninės fistulės (angl. *arteriovenous fistulas*)
- BDNF** – smegenų kilmės neurotrofinis faktorius (angl. *brain-derived neurotrophic factor*)
- bFGF** - fibroblastų augimo faktorius (angl. *fibroblast growth factor*)
- cAMP** - ciklinis adenozino monofosfatas (angl. *cyclic adenosine monophosphate*)
- CCT** - centrinės ragenos storis (angl. *central corneal thickness*)
- CDR** - įdubos ir disko santykis (angl. *cup-to-disk ratio*)
- Cx43** - koneksiną 43 koduojantis genas (angl. *gene connexin 43*)
- DIDS** - dizotiociano-stilbenedisulfoninė rūgštis (angl. *4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid*)
- ECM** - tarpląstelinė medžiaga (angl. *extracellular matrix*)
- EGF** - pagrindinis epidermio augimo faktorius (angl. *basic epidermal growth factor*)
- EVP** - episklerinių venų spaudimas (angl. *episcleral venous pressure*)
- GAGs** - glikozaminoglikanai (angl. *glycosaminoglycans*)
- ICAM-1** - tarpląstelinės adhezijos molekulė 1 (angl. *intercellular adhesion molecule – 1*)
- IEEVP** - idiopatinis padidėjusių episklerinių venų spaudimas (angl. *idiopathic elevated episcleral venous pressure*)
- IOP** - akispūdis (angl. *intraocular pressure*)
- JCT** - jukstakanalikuliarinis tinklas (angl. *juxtacanalicular meshwork*)
- MMPs** - matricos metaloproteinazės (angl. *matrix metalloproteinases*)
- NGF** - nervų augimo faktoriaus (angl. *nerve growth factor*)
- NOS-2** - azoto oksido sintazė-2 (angl. *nitric oxide synthase-2*)
- RGC** - tinklainės ganglinės ląstelės (angl. *retinal ganglion cell*)
- ROS** - aktyvios deguonies formos (angl. *reactive oxygen species*)
- SC** - Šlemo kanalas (angl. *Schlemm's canal*)
- SSN** - viršutinis seilinis branduolys (angl. *superior salivatory nucleus*)
- TGF** - transformuojantis augimo faktorius (angl. *transforming growth factor*)
- TM** - trabekulinis tinklas (angl. *trabecular meshwork*)
- TNF- α** - naviko nekrozės faktorius - alfa (angl. *tumor necrosis factor-alpha*)

IVADAS

Pasaulio Sveikatos Organizacijos duomenimis (angl. *World Health Organization*, 2002), glaukoma yra antra pagrindinė aklumo priežastis visame pasaulyje. Aukštas akispūdis, kuris paprastai yra nustatomas glaukominėse akyse, yra svarbiausias glaukomos neurodegeneracijos vystymosi ir progresavimo rizikos veiksnys. Aukštas akispūdis lemia regos nervo atrofiją, tinklainės ganglinių ląstelių mirtį ir galiausiai regos paradimą. Padidėjusio akispūdžio patofiziologija yra gana sudėtinga, o procesas vis dar nėra iki galo pilnai suprantamas. Be to, yra sunku tirti aukšto akispūdžio patofiziologiją žmonėse. Taip pat, pagal naujų vaistų registravimui nustatytus reikalavimus, kurių naujų vaistinių preparatų saugumas ir efektyvumas pirmiausia turi būti patikrintas iki klinikiniuose gyvūnų modeliuose. Todėl, yra kuriami įvairūs eksperimentiniai aukšto akispūdžio gyvūnų modeliai, siekiant suprasti patologinius ir farmakologinius mechanizmus susijusius su padidėjusiu akispūdžiu.

Vienas iš populiariausių aukšto akispūdžio gyvūnų modelių tai episklerinių venų fotokoaguliacija lazeriu. Tačiau, šis modelis turi keletą apribojimų, tokių kaip sudėtinga modelio indukcija, aukšta įrangos kaina, o pakilęs akispūdis išsilaiko tik kelias dienas. Todėl šiame darbe yra pristatomas kitas, mažai nagrinėtas, poliakrilinės rūgšties (karbomero) indukuotas aukšto akispūdžio modelis, kurio efektyvumas bus palyginamas su lazerio indukuotu aukšto akispūdžio modeliu.

Šio **tyrimo tikslas** yra palyginti lazerio ir karbomero indukuotus aukšto akispūdžio modelius *Long Evans* žiurkėse.

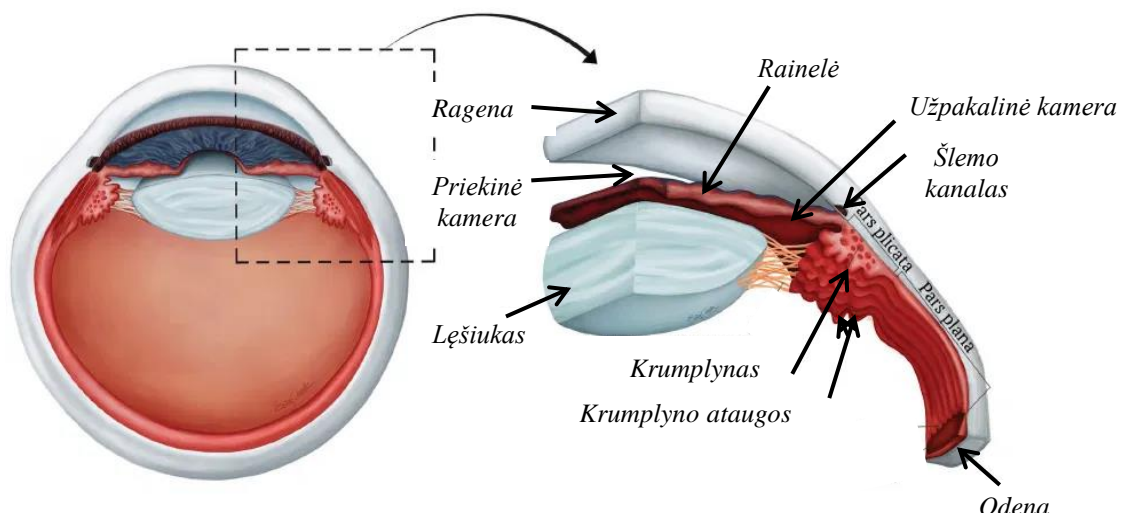
Tikslui pasiekti buvo išsikelti šie **uždaviniai**:

- Nustatyti efektyvią karbomero koncentraciją karbomero indukuoto aukšto akispūdžio modelyje;
- Nustatyti efektyvų lazerio šūvių skaičių lazerio indukuoto aukšto akispūdžio modelyje;
- Nustatyti karbomero ir lazerio indukuotų aukšto akispūdžio modelių veiksmingumą gydant timololiu;
- Palyginti lazerio ir karbomero indukuotus aukšto akispūdžio modelius *Long Evans* žiurkėse.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Vandeninio humoralinio skysčio dinamika

Vandeninis humoralinis skystis (angl. *aqueous humour, AH*) yra gaminamas žiedo formos krumplyne (angl. *ciliary body*), iš kurio išsišakoja lapelių formos projekcijos - krumplyno ataugos (angl. *ciliary processes*), esančios užpakalinėje kameroje (angl. *posterior chamber*) (žr. 1.1 paveikslą) (Gabelt ir kt., 2006). Mažas krumplyno dydis, sunkiai prieinama vieta bei sudėtinga kraujagyslių struktūra apsunkina vandeninio humoralinio skysčio formavimosi ir pasišalinimo tyrimus. Be to zondai, kurie padėtų nustatyti vandeninio humoralinio skysčio tekėjimo ląstelinius procesus – galimai sutrikdo normalią AH funkciją. Taip pat dirbant su anestezuotais gyvūnais, anestezijos agentai turi įtakos normaliems vandeninio humoralinio skysčio procesams, o tyrimai atliekami dirbant *In Vitro* su krumplyno epitelinėmis ląstelėmis yra riboti, nes yra prarandama normali krumplyno kraujotaka. Tad, duomenys sukaupti dirbant su eksperimentiniais gyvūnais ar ląstelių kultūromis dalinai remiasi mokslininkų prielaidomis, tačiau yra gerai žinoma, jog krumplyne gaminamas vandeninis humoralinis skystis išteka tradiciniu ir netradiciniu keliu ir atlieka svarbų vaidmenį akispūdžio palaikyme, visa tai išsamiau aptariama žemiau esančiuose skyriuose (Goel ir kt., 2010; Gabelt ir kt., 2006).



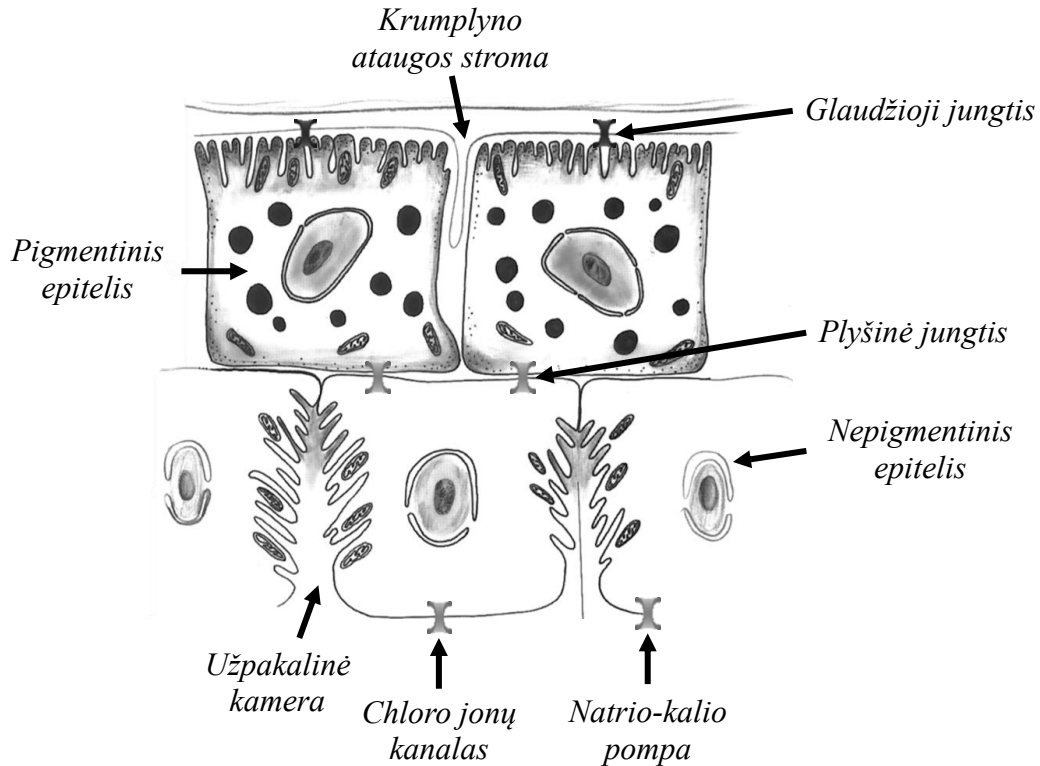
1.1 pav. Akies struktūra. Juodomis rodyklėmis pažymėtos priekinės ir užpakalinės kameros sudedamosios dalys (Stamper ir kt., 2009)

1.1.1. Vandėnėnis humoralinio skysėio formavimas

Vandėnėnis humoralinis skystis yra sudarytas iš jonų (pvz. Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^-), mažos molekulinės masės medžiagų (pvz. gliukozės, vitaminų, aminorūgšėių), didelės molekulinės masės medžiagų (pvz. baltymų) ir kitų medžiagų. Šis skystis yra gaminamas krumplyno ataugose, kurios yra sudarytos iš pigmentinio epitelio nukreipto į krumplyno stromą ir nepigmentinio epitelio nukreipto į užpakalinę kamerą (Civan ir Macknight, 2004) (žr. 1.2 paveikslą). Krumplyno ataugas, maitina ilgos užpakalinės ir trumpesnės priekinės krumplyno arterijos, kurios formuoja pagrindinį krumplyno arterinį ratą (angl. *major arterial circle*). Iš arterinio rato išsišakoja arteriolės į kiekvieną iš krumplyno ataugų ir atlieka svarbų vaidmenį kraujo tekėjimo reguliavime ir vandeniniame humoralinio skysėio formavimosi procese (Goel ir kt., 2010). Kraujui tekant krumplyno ataugų kapiliarais, apie 4% vandens ir jame tirpių medžiagų filtruojasi per kapiliarų sienelės į krumplyno stromą, šis skysėio pratekėjimas pro siau pralaidžią membraną yra vadinamas *ultrafiltracija* (angl. *ultrafiltration*) (Goel ir kt., 2010). Krumplyne AH skysėio judėjimas yra palengvinamas osmosiniu gradientu ir hidrostatiiniu slėgiu (Tamm, 2010). Nors ultrafiltracija padeda skysėiui iš kapiliarų patekti į krumplyno stromą, tačiau vien jos nepakanka vandeninio humoralinio skysėio tūrio formavimuisi. Tad, kitas svarbus AH formavimosi procesas yra *aktyvi transportacija* (angl. *active transportation*), kuri yra apie 80 - 90 % atsakinga už vandeninio humoralinio skysėio susiformavimą.

Aktyvi transportacija - tai nuo energijos priklausantis procesas, kurio metu medžiagos keliauja per membraną prieš savo elektrocheminį gradientą (Gabelt ir kt., 2006). Vienakryptę vandeninio humoralinio skysėio sekreciją iš stromos į užpakalinę kamerą sudaro trys nuoseklūs žingsniai (žr. 1.2 paveikslą):

- Jonų perėjimas iš krumplyno stromos į pigmentinio krumplyno epitelio ląsteles;
- Jonų perėjimas iš pigmentinių krumplyno epitelio ląstelių į nepigmentinį krumplyno epitelį;
- Jonų perėjimas iš nepigmentinio krumplyno epitelio į užpakalinę kamerą.



1.2 pav. Krumplyno ataugų struktūra. Juodomis rodyklėmis pažymėtos krumplyno ataugos sudedamos dalys (Stamper ir kt., 2009)

Pirmo žingsnio metu, jonų perėjimas iš krumplyno stromos į pigmentinio epitelio ląsteles vyksta per glaudžiasias jungtis (angl. *tight junctions*). Šis procesas vyksta elektroneutralių natrio – vandenilio (Na^+/H^+), chloro – bikarbonato (Cl^-/HCO_3^-) antiporterių bei natrio – kalio – chloro ($Na^+-K^+-2Cl^-$) simporterio pagalba, kurių metu yra aktyviai pernešamas natrius (Na^+), chloras (Cl^-) ir kiti jonai iš stromos į pigmentines krumplyno ląsteles (Civan ir Macknight, 2004). Izoliuoto krumplyno epitelio elektrofiziologiniai tyrimai rodo, jog šie antiporteriai ir simporteris yra ypatingai svarbūs vandeninio humoralinio skysčio formavimosi metu. Counillon ir kolegų, 2000 atliktas tyrimas su jaučio krumplyno pigmentinėmis epitelinėmis ląstelėmis parodė, jog natrio – vandenilio antiporterio (Na^+/H^+) inhibitoriai, tokie kaip kariporidas (angl. *cariporide*), etilo-izopropilio-amiloridas (angl. *ethyl-isopropyl amiloride*) ar amiloridas (angl. *amiloride*), ženkliai sumažina vandeninio humoralinio skysčio gamybą ir gali būti naudojami kaip farmakologiniai glaukomos gydymo variantai. Jau 1998 metais Mclaughlin ir jo kolegų atlikto tyrimo, su triušio krumplyno epitelium, rezultatai parodė, jog naudojant chloro – bikarbonato (Cl^-/HCO_3^-) antiporterio inhibitorių – acetazolamidą (angl. *acetazolamide*) yra užkertamas kelias chloro jonų padidėjimui pigmentinėse ir nepigmentinėse krumplyno ląstelėse, kas lemia sumažėjusią vandeninio humoralinio skysčio gamybą. Be to, tame pačiame tyrime buvo rasta, jog užblokavus natrio –

kalio – chloro ($Na^+ - K^+ - 2Cl^-$) simporterį su bumetanidu (angl. *bumetanide*) taip pat sumažėja chloro koncentracija abiejų tipų krumplyno epitelio ląstelėse.

Kitas svarbus žingsnis vandeninio humoralinio skysčio aktyvios transportacijos metu yra jonų perėjimas iš pigmentinio krumplyno epitelio į nepigmentinį krumplyno epitelį. Šis procesas įvyksta plyšinių jungčių (angl. *gap junctions*) dėka, kurios suteikia galimybę pereiti jonams ar kitoms molekulėms, mažesnėms, nei 1000 daltonų (Tamm, 2010). Jonų pernešimas per plyšines jungtis tarp pigmentinių ir nepigmentinių ląstelių yra svarbus vandeninio humoralinio skysčio gamyboje. Calera ir kiti mokslininkai, 2009 atliko tyrimą, kurio metu buvo inaktyvuotas koneksiną 43 koduojantis genas (angl. *connexin43, Cx43*), atsakingas už plyšinių jungčių susiformavimą, tarp krumplyno pigmentinių ir nepigmentinių ląstelių. Tyrimo rezultatai parodė, jog Cx43 geno inaktyvavimas lemia mažesnę AH gamybą bei sumažėjusį akispūdį (angl. *intraocular pressure, IOP*).

Paskutinis, bet ne mažiau svarbus, žingsnis vandeninio humoralinio skysčio formavimosi aktyvios transportacijos metu, yra jonų perėjimas iš nepigmentinių krumplyno epitelio ląstelių į užpakalinę kamerą. Natris pasiekia užpakalinę kamerą per natrio-kalio pompą, o chloras per chloro jonų kanalus esančius nepigmentuoto krumplyno epitelio bazolateralinėje membranoje. Siekiant patikrinti natrio – kalio pompos reikšmingumą vandeninio humoralinio skysčio formavimosi procese, buvo panaudotas anijonų inhibitorius (dizotiocianostilbenedisulfoninė rūgštis, DIDS), kuris sąlygojo AH įtekėjimo į užpakalinę kamerą sumažėjimą (Shahidullah ir Delamere, 2012). DIDS blokuoja natrio – bikarbonato ($Na^+ / nHCO_3^-$) transportą, taip sumažindamas natrio – vandenilio (Na^+ / H^+) antiporterio aktyvumą, todėl sumažėja nepigmentinių ląstelių viduląstelinis pH. Sumažėjęs pH lygis aktyvuoja Src šeimos kinazes, kurios atlieka natrio-kalio pompų fosforilizaciją ir inhibiciją. Fosforilizuotos natrio-kalio pompos nepraleidžia natrio ir tai sąlygoja sumažėjusią vandeninio humoralinio skysčio gamybą (Civan, 2013). *In Vitro* tyrimai su krumplyno nepigmentinių ląstelių chloro kanalais (Mitchell ir kt., 1999; Carré ir kt., 2000) atskleidė, jog adenosinas (angl. *adenosine*), prisijungdamas prie A3 adenosino receptorių, reguliuoja chloro kanalų aktyvumą ir taip atlieka svarbų vaidmenį vandeninio humoralinio skysčio susidarymo procese. Nepigmentinių ląstelių išskirtas adenosino trifosfatas (angl. *adenosine triphosphate, ATP*) yra metabolizuojamas į adoziną, kuris prisijungia prie G baltymą prisijungiančio adenosino receptoriaus (Yang ir kt., 2005). Aktyvūs adenosino receptoriai, aktyvuoja chloro kanalus, tad didėja vandeninio humoralinio skysčio gamyba. Avila ir kitų mokslininkų, 2001 atlikto tyrimo su pelėmis rezultatai parodė, jog A3 receptoriaus antagonistas (MRS 1191) sumažina vandeninio humoralinio skysčio tekėjimą ir akispūdį. To paties tyrimo metu buvo pastebėta, jog A2_A adenosino receptoriai, taip pat atlieka svarbų vaidmenį AH gamybos procese: A2

receptoriaus agonistas (CGS 21680) padidino, o antagonistas (ZM 241385) sumažino AH gamybą ir pelių akispūdį. Taip pat vėlesniuose šių mokslininkų tyrimuose (Avila ir kt, 2002) buvo rasta, jog genetiškai modifikuotos pelės su inaktyvuotais A3 adenzino receptoriais pasižymėjo sumažėjusiu IOP lyginant su kontrolinėmis pelėmis. Išskirtas iš krumplyno epitelio į užpakalinę kamerą, vandeninis humoralinis skystis teka tarp rainelės, lęšiuko ir pro akies vyzdį patenka į priekinę kamerą (angl. *anterior chamber*).

1.1.2. Vandeningis humoralinio skysčio ištekėjimas

Patekęs į priekinę kamerą AH yra surenkamas ir pašalinamas iš akies trabekulinio tinklo, Šlemo kanalo ir episklerinių venų dėka, o šis skysčio ištekėjimas yra vadinamas *tradiciniu ištekėjimo keliu* (angl. *conventional outflow pathway*) (žr. 1.3 paveikslą).

Trabekulinis tinklas (angl. *trabecular meshwork, TM*) yra porėta struktūra, kurios pagrindinė funkcija yra praleisti vandeninį humoralinį skystį bei sukurti pasipriešinimą šio skysčio nutekėjimui, kad akyje būtų palaikomas akispūdis (Keller ir Acott, 2013). Trabekulinis tinklas yra sudarytas iš trijų regionų, kurie skiriasi savo funkcija ir struktūra. Vienas iš jų yra *uvealinis tinklas* (angl. *uveal meshwork*), esantis arčiausiai priekinės kameros ir besitęsiantis nuo rainelės iki Švalbe linijos (angl. *Schwalbe line*) (Abu-Hassan ir kt., 2014). Uvealinis tinklas yra sudarytas iš trijų jungiamojo audinio pluoštų (angl. *beams*) padengtų endotelinėmis ląstelėmis ir atskirtų dideliais (nuo 25 iki 75 μm) tarpais. Dėl didelių porų esančių tarp pluoštų, uvealinis tinklas nesukelia didelio pasipriešinimo vandeninio humoralinio skysčio ištekėjimui (Llobet ir kt., 2003). Šalia uvealinio tinklo jungiasi *korneosklerinis tinklas* (angl. *corneoscleral meshwork*) sudarytas iš 8-15 pluoštų, taip pat padengtų endotelinėmis ląstelėmis, o tarpai tarp jų yra ženkliai mažesni (2–15 μm) nei uvealiniame tinkle (Tamm, 2015). Kuo gilesnė korneosklerinio trabekulinio tinklo dalis, tuo mažesni tarpai tarp pluoštų, tad korneosklerinis tinklas sukuria didesnę pasipriešinimą vandeninio humoralinio skysčio ištekėjimui, tačiau ne tokį didelį kaip trečiasis trabekulinio tinklo sluoksnis - *jukstakanalikuliarinis tinklas* (angl. *juxtacanalicular meshwork, JCT*) (Llobet ir kt., 2003). JCT yra laisvas jungiamasis audinys tiesiogiai susijungiantis su vidinėje Šlemo kanalo dalyje esančiomis endotelinėmis ląstelėmis (Ahmad ir kt. 2014). JCT yra sudarytas iš laisvai išsidėsčiusios tarpląstelinės medžiagos (angl. *extracellular matrix, ECM*), į kurią yra įsiterpusios JCT ląstelės. Šios ląstelės jungiasi tarpusavyje, sudaro jungtis su ECM elementais integrinų dėka bei jungiasi su korneosklerinio pluoštų ir Šlemo kanalo endotelio ląstelėmis (Ahmad ir kt. 2014). Tyrimai rodo, jog JCT sluoksnio ląstelės ir tarpląstelinė medžiaga, sudaryta iš proteoglikanų, hialurono rūgšties (HA), IV tipo kolageno, laminino bei fibronektino, atlieka pagrindinį vaidmenį vandeninio humoralinio skysčio nutekėjimo pasipriešinimo procese. JCT ląstelės pajutusios vandeninio humoralinio skysčio srauto padidėjimą, aktyvuoja matricos metaloproteinazes (angl. *matrix metalloproteinases, MMPs*), ir taip lokaliai sumažina ECM elementų skaičių, tad yra užtikrinamas didesnis vandeninio humoralinio skysčio kiekio nutekėjimas (Keller ir Acott, 2013). Jau 1998 metais Bradley ir jo kolegų atliktame tyrime, buvo pastebėta, jog padidėjus AH skysčio srautui padidėjo ir MMP2 bei MMP14 lygiai. O metaloproteinazės aktyvumo slopinimas naudojant TIMP – sumažino vandeninio humoralinio skysčio nutekėjimą. Šių

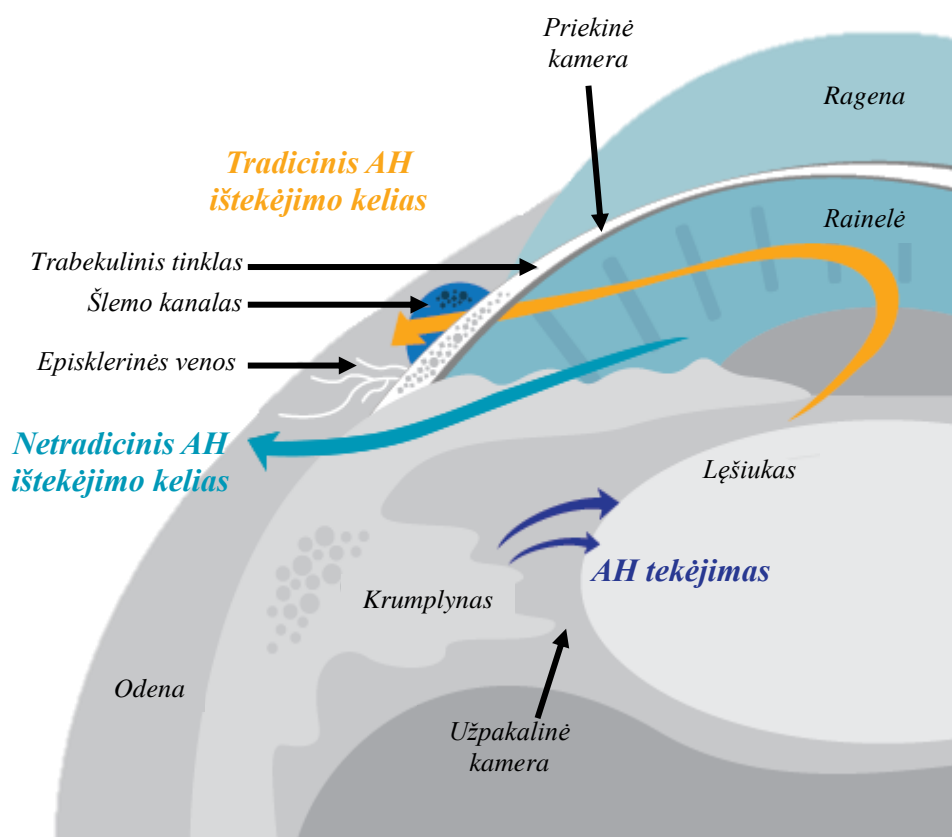
fermentų aktyvinimas yra nukreiptas į struktūrinius ECM baltymus, pavyzdžiui MMP2 ir MMP14 skaido kolageną, o ADAMTS4 baltymas skaido versikaną (angl. *versican*), tad JCT sluoksnyje atsiranda didesni tarpai vandeniniam humoraliniam skysčiui pratekėti (Keller ir Acott, 2013). Taip pat, buvo rasta, jog glikozaminoglikanai (angl. *glycosaminoglycans*, GAGs), proteoglikanų šoninės grandinės, modifikuoja vandeninio humoralinio skysčio ištekėjimą. Siekiant nustatyti GAGs funkciją vandeninio humoralinio skysčio nutekėjimo procese, buvo panaudoti cheminiai agentai (beta-ksilozidas, chloratas, sulfato inhibitorius) slopinantys GAGs grandinės biosintezę (Keller ir kt., 2008). Tyrimo rezultatai parodė, jog GAGs biosintezės slopinimas padidina skysčio nutekėjimą perfuzuotuose kiaulių ir žmonių trebakulinio tinklo ląstelių kultūrose. Vis dėl to yra autorių prieštaraujančių šiai teorijai (Gao ir kt., 2014), tad GAGs poveikis AH ištekėjimui išlieka diskutuotinas. Kitos mokslininkų grupės matavo akispūdį genetiškai modifikuotose pelėse, neturinčiose specifinių ECM elementų JCT sluoksnyje. Šių tyrimų metu (Haddadin ir kt., 2009; Haddadin ir kt., 2012) buvo rasta, jog pelės neturinčios JCT tarpląstelinės medžiagos baltymų (pvz. SPARC, TSP1 ir TSP2), pasižymėjo mažesniu akispūdžiu, nei kontralateralinės grupės pelės.

Pratekėjęs pro trabekulinį tinklą, vandeninis humoralinis skystis pasiekia ovalios formos Šlemo kanalą (angl. *Schlemm's canal*, SC), kurio pagrindinė funkcija yra surinkti AH iš trabekulinio tinklo ir išleisti jį į episklerines venas bei sukurti pasipriešinimą vandeninio humoralinio skysčio nutekėjimui, kad būtų palaikomas akispūdis. Šlemo kanalo vidinė dalis yra sudaryta iš endotelinių ląstelių, kurios reaguodamos į slėgio gradientą formuoja neįprastas struktūras, žinomas kaip milžiniškos vakuolės (angl. *giant vacuoles*) (Abu-Hassan ir kt., 2014). Milžiniškos vakuolės lokalizuojasi išorinėje endotelio dalyje, o jų dydis ir tankumas priklauso nuo vandeninio humoralinio skysčio srauto stiprumo. Pagrindinė milžiniškų vakuolių funkcija yra reaguoti į AH srauto pokyčius ir „išsipučiant“ prisidėti prie porų susidarymo SC vidiniame endotelyje. Taip pat, buvo rasta, kad apie 20 - 30 % milžiniškų vakuolių turi laidžias poras, ir gali veikti kaip kanalai AH ištekėjimo procese (Johnson, 2006). Didžioji dalis vandeninio humoralinio skysčio į SC patenka pro vidiniame endotelyje susiformavusias tarpląstelines (I-poras) ir kraštines poras (B-poras). Porų dydis vyrauja nuo 0,1 iki 2 mikrometrų, o pralaidumas nuo 200 iki 500 nanometrų dalelėms (Dautriche ir kt., 2015). Poros atsiranda tose vietose, kur SC endotelio citoplazma yra pakankamai suplonėjusi ir susilieja viršutinė ir apatinė plazminės membranos (Stamer ir kt., 2015). Braakman ir jo kolegų, 2014 atlikto *In Vitro* tyrimo rezultatai parodė, kad SC vidinio endotelio ląstelės reaguodamos į ištempimą dėl tam tikro skysčio srauto, sudaro tiek tarpląstelines, tiek kraštines poras. Porų formavimasis yra mechanškai jautrus procesas, kurį sukelia vandeninio humoralinio skysčio srauto padidėjimas, tad SC endotelio ląstelės turi savybę moduluoti porų tankį ir charakteristikas (Braakman ir kt., 2014). Be to,

tyrimai rodo, jog sumažėjęs SC vidinio endotelio poringumas mažina vandeninio humoralinio skysčio nutekėjimą ir didina akispūdį (Overby ir kt., 2014), tad daugelis aukšto akispūdžio terapijos būdų yra nukreipti būtent į šių porų tankio didinimą. Billas ir Svedbergas, 1972 apskaičiavo SC vidinio endotelio sukuriama hidraulinį laidumą bei srauto pasipriešinimą ir padarė išvadą, jog vidinis SC endotelis gali sudaryti apie 10% viso AH nutekėjimo pasipriešinimo.

Vandeninis humoralinis skystis praėjęs pro Šlemo kanalą pasiekia piltuvėlio formos, endotelio išklotus, *kolektorinius kanalus* (angl. *collector channels*). Kolektoriniai kanalai susidaro iš išorinio Šlemo kanalo endotelio, o jų pagrindinė funkcija yra pernešti vandeninį humoralinį skystį į episklerines venas. Kolektorių kanalų skaičius vyrauja, tačiau paprastai jis siekia apie 24-35 kanalus vienoje akyje (Bentley ir kt., 2016). Patekęs į kolektorinius kanalus vandeninis humoralinis skystis yra surenkamas trijų veninių rezginių esančių skirtinguose odenos sluoksniuose, o vėliau pasiekia episklerines venas. Veniniai rezginiai yra skirstomi į gilųjį odenos venų rezginį (angl. *deep scleral venous plexus*), vidurinį odenos venų rezginį (angl. *mid scleral venous plexus*) bei episklerinį venų rezginį (angl. *episcleral venous plexus*) (Samples ir Ahmed, 2014).

Episklerinės venos (angl. *episcleral veins*) yra tolimiausias cirkuliacijos taškas tradiciniame vandeninio humoralinio skysčio ištekėjimo procese. AH susimaišęs su krauju episklerinėse venose toliau patenka į bendrą kraujotaką. Susiformavęs episklerinių venų spaudimas (angl. *episcleral venous pressure, EVP*) yra svarbus kriterijus lemiantis vandeninio humoralinio skysčio ištekėjimą ir yra vienas iš svarbiausių veiksnių akispūdžio reguliavime. Įprastai episklerinių venų spaudimas vyrauja tarp 8 mmHg –10 mmHg, tačiau gali kisti dėl skirtingų matavimo technikų bei asmens fiziologinės būsenos. Episklerinės venos yra intensyviai įnervuojamos parasimpatinių, simpatinių ir trišakio nervo skaidulų, kurių aktyvumas atlieka reikšmingą vaidmenį akispūdžio reguliavime. Strohmaier ir jo kolegų, 2013 atliktame tyrime, buvo stimuliuojamas žiurkių smegenų kamiene esantis viršutinis seilinis branduolys (angl. *superior salivatory nucleus, SSN*), įnervuojantis akis. Tyrimo rezultatai parodė, jog SSN stimuliacija padidino žiurkių episklerinių venų spaudimą bei akispūdį. Be to vandeninio humoralinio skysčio ištekėjimui ir akispūdžio palaikymui yra svarbus episklerinių venų plotis. Funk su kolegomis, 1996 iškėlė hipotezę, jog kraujospūdį didinantis nitroprusidas turėtų padidinti episklerinių venų plotį, episklerinių venų spaudimą bei akispūdį - tyrimo rezultatai buvo teigiami.



1.3 pav. Vandeninio humoralinio skysčio tekėjimas. Tamsiai mėlyna rodykle pažymėtas AH tekėjimas iš krumplyno į priekinę kamerą; geltona rodykle pažymėtas tradicinis AH ištekėjimo kelias; šviesiai mėlyna rodykle pažymėtas netradicinis AH ištekėjimo kelias; AH – vandeninis humoralinis skystis.

Išsamiau tyrinėjant vandeninio humoralinio skysčio ištekėjimą mokslininkai suprato, jog vandeninis humoralinis skystis gali būti surenkamas ir pašalinamas ne tik tradiciniu būdu, bet ir *netradiciniu ištekėjimo keliu* (angl. *unconventional outflow pathway*) - per krumplyno raumenį į supragyslaininę ertmę (angl. *suprachoroidal space*) (žr. 1.3 paveikslą). Bill ir jo kolegų, 1965 atlikti tyrimai su beždžionėmis patvirtino šią hipotezę. Tyrėjai pro priekinę kamerą praleisdavo įvairaus dydžio radioaktyviai paženklintas molekules ir tyrė skirtingus kelius, kuriais medžiagos palikdavo akį. Atliktų eksperimentų (Bill, 1965; Bill ir Hellsing, 1965) rezultatai parodė, jog apie 80% molekulių pašalinano per tradicinį vandeninio humoralinio skysčio ištekėjimo kelią, tačiau likusioji dalis buvo rasta krumplyno raumenyje. Be to, Crawford ir Kaufman, 1987 atliktame tyrime naudotas pilokarpinas (angl. *pilocarpine*), skatinantis krumplyno raumens susitraukimą, sumažino tarpus tarp krumplyno raumenų pluoštų, ir buvo nustatytas mažesnis vandeninio humoralinio skysčio ištekėjimas netradiciniu keliu. O atropinas (angl. *atropin*) - muskarininis antagonistas, atpalaiduojantis krumplyno raumenį, padidino netradicinį AH ištekėjimą (Bill ir Walinder, 1966). Pateikti tyrimai rodo, jog krumplyno raumens tonusas modifikuoja netradicinį vandeninio humoralinio skysčio srautą.

Taip pat, eksperimentai atlikti leidžiant į priekinę kamerą torotrasto daleles (angl. *thorotrast*) (Inomata ir kt., 1972) ar fluorescencinį dekstraną (angl. *dextran*) (Lindsey ir Weinreb, 2002), parodė, jog vandeninis humoralinis skystis teka per išilgus krumplyno raumenų pluoštus į supragyslaininę ertmę.

Nors yra žinoma, jog vandeninis humoralinis skystis teka per krumplyno raumenį į supragyslaininę ertmę, vis dėl to, kur AH teka toliau ir kaip jis yra pašalinamas iš akies, vis dar išlieka diskutuotinas klausimas. Dalis tyrėjų (Bill, 1965; Kaufman, 1989) teigia, jog vandeninis humoralinis skystis prasiskverbia pro odeną ir pereina į akiduobę, kur yra surenkamas akiduobės kraujagyslių – *uveasklerinis kelias* (angl. *uveoscleral pathway*). Jau anksčiau minėtame tyrime (Bill, 1965) nustatė uveasklerinį kelią sekdamas radioaktyviai pažymėtų didelių molekulių judėjimą. Pažymėtos molekulės buvo rastos susikaupusios krumplyno raumenyje, supragyslaininėje ertmėje, odenoje bei akiduobėje. Vis dėl to, panaudojus mažesnius molekulių žymeklius buvo rastas kitas vandeninio humoralinio skysčio nutekėjimo kelias. Suleidus kontrastuojančias daleles į priekinę beždžionės akies kamerą buvo pastebėta, jog nemaža dalis žymeklio susikaupia vortekso venose (angl. *vortex veins*) (Pederson ir kt., 1977), tad buvo iškelta teorija, jog netradiciniu būdu keliaujantis humoralinis skystis yra absorbuojamas gyslainėje ir pašalinamas iš akies per vortekso venas, o šį skysčio ištekėjimo būdą pavadino *uveovorteksiniu keliu* (angl. *uveovortex pathway*). Trečią *uveolimfinį kelią* (angl. *uveolymphatic pathway*) vandeninio humoralinio skysčio netradicinį ištekėjimo kelią neseniai pasiūlė Yücel su kolegomis, 2009. Tyrėjų nuomone AH pasišalina per limfines kraujagysles esančias krumplyne. Autoriams suleidus radioaktyviai pažymėtą albuminą į avių akies priekinę kamerą, 1–2% žymeklio buvo rasta susikaupę limfmazgiuose ir limfinėse kraujagyslėse (Pederson ir kt., 1977).

1.1.3. Vandeninio humoralinio skysčio funkcija

Vandeninis humoralinis skystis tiekia deguonį, vitaminus bei maisto medžiagas, tokias kaip gliukozė ir aminorūgštys, į nevaskuliarizuotas lęšiuko, rainelės, ragenos bei trabekulinio tinklo dalis (Welge-Lüssen ir kt., 2001). Tirdant vandeninio humoralinio skysčio funkciją, buvo pastebėta, jog AH yra atsakingas už askorbato rūgšties (vitamino C) transportą. Vitaminas C akyje veikia kaip antioksidantas, apsaugantis akį nuo žalingų laisvųjų radikalų ir toksinų poveikio. Vandeniniame humoraliniame skystyje askorbato rūgšties koncentracija yra maždaug 15 kartų didesnė nei plazmoje, o tai rodo, jog vitaminas C galimai apsaugo nuo žalingų veiksnių atsirandančių akyje (Hah ir kt., 2017). Be to, buvo rasta mažesnė vitamino C koncentracija glaukominių (Leite, 2009) bei kataraktinių (Wei ir kt., 2016) akių, vandeniniame humoraliniame skystyje.

Taip pat yra žinoma, jog AH yra gausu augimo faktorių, tokių kaip transformuojantis augimo faktorius (angl. *transforming growth factor, TGF*), fibroblastų augimo faktorius (angl. *fibroblast growth factor, bFGF*) bei pagrindinis epidermio augimo faktorius (angl. *basic epidermal growth factor, EGF*), skatinančių ląstelių augimą, dauginimąsi, gijimą bei diferenciaciją. Jau 1998 metais atlikto Wallentin ir kitų mokslininkų, tyrimo metu buvo pastebėta, jog triušių akys su katarakta turėjo padidėjusį augimo faktoriaus - TGF-β2 kiekį lyginant su sveikomis akimis, o tyrėjų atlikta eksperimentinė kataraktos chirurginė operacija sumažino TGF-β2 koncentraciją triušių akių vandeniniame humoraliniame skystyje. Be to, buvo rasta, jog augimo faktoriaus - TGF-α lygis padidėjo katės AH po ragenos endotelio sužalojimo, tad autoriai teigia, jog TGF-α yra galimai atsakingas už autokrininių žaizdų gijimą akyje (Rotatori ir kt., 1994). Majima, 1995 atlikto *In Vitro* eksperimento rezultatai parodė, jog AH esantis epidermio augimo faktorius stimuliuoja lęšiuko endotelinių ląstelių dauginimąsi. O Inoue ir kitų, 2012 atliktame tyrime šalia kitų augimo faktorių buvo rastas EGF padidėjimas kataraktinėse žmogaus akyse. Be to, neseniai atlikto tyrimo metu (Cheng ir kt., 2019) buvo rasti padidėję bFGF bei EGF lygiai akyse su uvealine melnoma (angl. *uveal melanoma*).

Šalia to, vandeninis humoralinis skystis pašalina medžiagų apykaitos produktus ir toksines medžiagas, tokias kaip pieno rūgštis ir anglies dioksidas bei dalyvauja imuniniame atsake. Jau anksčiau minėtame tyrime (Cheng ir kt., 2019) buvo rasta padidėjusi citokinų (IL-6; IL-8) koncentracija vandeniniame humoraliniame skystyje, akyse su uvealine melnoma. O tarpląstelinės adhezijos molekulės 1 (angl. *intercellular adhesion molecule – 1, ICAM-1*) padidėjimas yra randamas diabetinės makulos edemos metu ir ICAM-1 gali būti traktuojama kaip šios ligos biomarkeris (Hillier ir kt., 2017). Be to, padidėjusi citokino - interleukino 8 (angl.

interleukin 8) koncentracija yra siejama su aukšto akispūdžio lemiamu uždegimu glaukominėse akyse (Huang ir kt., 2014).

Galiausiai viena iš svarbiausių vandeninio humoralinio skysčio funkcijų yra *akispūdžio palaikymas*, kuris yra svarbus akies struktūriniam ir optiniam vientisumui (Ahmad ir kt. 2014). Būtent vandeninio humoralinio skysčio dėka sukurtas akispūdis palaiko akies obuolio rutulio formą bei įtempia akies obuolio sienes. Pagrindiniai akispūdį lemiantys veiksniai yra vandeninio humoralinio skysčio formavimasis, ištekėjimas ir episklerinių venų spaudimas (Ahmad ir kt. 2014). Šie veiksniai yra tarpusavyje susiję pagal Goldmano lygtį: $P_o = F/C + P_v$, kur P_o yra akispūdis, matuojamas gyvsidabrio stulpelio milimetrais (mmHg), F – vandeninio humoralinio skysčio susiformavimo greitis, matuojamas mikrolitrais per minutę ($\mu\text{l}/\text{min}$), C – vandeninis humoralinio skysčio ištekėjimas, matuojamas mikrolitrais per minutę gyvsidabrio stulpelio milimetre ($\mu\text{l}/\text{min}/\text{mmHg}$), o P_v – episklerinių venų spaudimas, matuojamas gyvsidabrio stulpelio milimetrais (mmHg). Iš pateiktos Goldmano lygties akivaizdu, jog akispūdis didės, kai padidės vandeninio humoralinio skysčio formavimasis, padidės episklerinių venų spaudimas, arba sumažės AH ištekėjimo apimtys. Akispūdis yra matuojamas tonometru (angl. *tonometer*), o prietaise esantis zondas neinvaziškai prisiliedamas prie akies ragenos išmatuoja IOP gyvsidabrio stulpelio milimetrais (mmHg). Akispūdis sveikuose žmonėse varijuoja tarp 10 mmHg ir 20 mmHg, o vidutinė akispūdžio vertė siekia 15,5 mmHg su 2,75 mmHg svyravimais (Tai ir kt., 2005). Laboratoriniuose gyvūnuose šie skaičiai šiek tiek kinta, pavyzdžiui *Lewis* žiurkėse vidutinė IOP vertė yra 17.30 mmHg \pm 5.25 mmHg (Mermoud ir kt., 1994), *Wistar* žiurkėse 11.4 mmHg \pm 0.8 mmHg (Smedowski ir kt., 2014), *Long Evans* žiurkėse 10.5 mmHg \pm 0.9 mmHg (Gurdita ir kt., 2017). *C57BL/6* pelėse IOP vidurkis siekia 9.8 mmHg \pm 3.9 mmHg (Danias ir kt., 2003), o *Naujosios Zelandijos* ir *Dutch Belted* triušiuose akispūdis vyrauja tarp 15 mmHg ir 23 mmHg (Vareilles ir kt., 1977).

Atliekant vis daugiau eksperimentų, buvo nustatyti įvairūs faktoriai darantys įtaką akispūdžio svyravimui, vienas iš jų centrinės ragenos storio variacija (angl. *central corneal thickness, CCT*). Bendroje populiacijoje, yra randami CCT skirtumai tarp skirtingų rasių bei amžiaus grupių. Fern ir jo kolegų, 2012 atliktame tyrime buvo rasta, jog suaugusiųjų afro-amerikiečių centrinės ragenos storis buvo plonesnis, o IOP mažesnis, lyginant su kitomis etninėmis grupėmis. Esporcatte ir kitų, 2015 atliktame tyrime buvo rasta teigiama koreliacija tarp sveikų tiriamųjų CCT ir IOP: storesnė centrinė ragena tiesiogiai koreliavo su aukštesniu akispūdžiu. Be to, yra žinoma, jog ragena su amžiumi storėja dėl ragenos kolageno pokyčių, ir dėl to didėja akispūdis. Tonnu ir jo kolegų, 2005 atliktame tyrime buvo nustatyta, jog sveikiems asmenims akispūdis padidėja apie 0,5 mmHg per dešimtmetį, tad nuo 20-ties iki 90-ties akispūdis padidėja maždaug 3,2 mmHg. Atlikti eksperimentai su gyvūnais taip pat rodo, jog

akispūdis gali kisti priklausomai nuo amžiaus. Cone ir kitų, 2012 atliktame tyrime jaunų (2 mėnesių) C57BL/6 pelių vidutinis IOP buvo ženkliai mažesnis (10.4 ± 2.9) mmHg, nei senų (8 mėnesių) pelių akispūdis (12.4 ± 4.2) mmHg.

Kitas svarbus veiksnys darantis įtaką akispūdžio svyravimui, tai lytis. Ejimadu ir jo kolegos, 2018 ištyrė 100 sveikų tiriamųjų ir gauti rezultatai parodė, jog vyrai turėjo didesnę akispūdį (17.45 mmHg), nei tyrime dalyvavusios moterys (15.26 mmHg). Tiriant glaukomą turinčių pacientų akispūdį, buvo pastebėta, jog vyrų akispūdis buvo reikšmingai didesnis ($23,7 \pm 0,99$) mmHg nei moterų ($18,8 \pm 0,61$) mmHg (Osaiywu ir kt., 2018). Mokslininkų nuomone, su lytimi susijęs akispūdžio skirtumai gali kilti dėl moteryse esančio lytinio hormono - estrogeno, kuris mažina simpatinį aktyvumą ir todėl mažėja akispūdis (Dane ir kt. 2003).

Vienas didžiausių veiksnių darančių įtaką akispūdžio svyravimui yra paros laikas. Per 24 valandas sveikiems žmonėms IOP paprastai pakinta nuo 2 mmHg iki 6 mmHg dėl netobulos vandeninio humoralinio skysčio formavimosi ir ištekėjimo sinchronizacijos (Giaconi ir kt., 2016). Didžiausias IOP pastebimas dienos eigoje, dažniausiai sveiki žmonės pasiekia IOP piką vidurdienį (18.3 ± 2.7) mmHg, o mažiausias akispūdis pastebimas naktį ir anksti ryte (15.9 ± 2.4) mmHg (Caiado ir kt., 2014). Toks IOP svyravimas yra dėl sumažėjusio vandeninio humoralinio skysčio formavimosi naktį ir padidėjusio dienos metu (Goel ir kt., 2010). Autorių nuomone, AH susiformavimo kiekis miego metu yra dvigubai mažesnis, nei pirmojo prabudimo metu, tikėtina dėl sumažėjusios krumplyno epitelio stimuliacijos naktį. Nors nedidelis IOP svyravimas yra normalus fiziologinis reiškinys, vis dėl to didesnė kaip 10 mmHg IOP variacija dienos eigoje yra siejama su ankstyvąja glaukoma (Leidl ir kt. 2014).

1.2. Aukšto akispūdžio etiologija ir patogenezė

Kaip ir minėta ankstesniame skyriuje, pagrindiniai faktoriai lemiantys akispūdžio padidėjimą, tai sutrikęs vandeninio humoralinio skysčio ištekėjimas, padidėjęs episklerinių venų spaudimas ir padidėjęs AH formavimosi greitis. Aukštas akispūdis sąlygoja akyje atsirandančias patologijas, tokias kaip regos nervo atrofija, tinklainės ganglinių ląstelių (angl. *retinal ganglion cell*, *RGC*) mirtį bei galiausiai regos praradimą.

1.2.1. Faktoriai lemiantys akispūdžio padidėjimą

Vienas iš pagrindinių faktorių lemiančių padidėjusį akispūdį, tai *sutrikęs vandeninio humoralinio skysčio ištekėjimas*, galimai atsirandantis dėl: sumažėjusio trabekulinio tinklo ląstelių skaičiaus; trabekulinio tinklo tarpląstelinės medžiagos pokyčių; Šlemo kanalo pokyčių. Stebėdami molekulinis pokyčius atsirandančius trabekuliniame tinkle, mokslininkai nustatė, jog *ląstelių skaičius trabekuliniame tinkle* su amžiumi bei sergant glaukoma, mažėja. Jau 1987 metais Grierson ir Howes apskaičiavo, jog visame trabekuliniame tinkle 20-ties metų asmenims buvo apie 763 000 ląstelių ir šis skaičius sumažėjo iki 403 000 ląstelių sulaukus 80 metų amžiaus, autoriai nustatė, jog per metus prarandama 6000 ląstelių. Kadangi ląstelės trabekulinio tinklo JTC regione yra atsakingos už padidėjusio AH srauto aptikimą, tai sumažėjęs ląstelių skaičius apriboja audinio galimybes aptikti ir reaguoti į aukštą akispūdį (Keller ir Acott, 2013). Trabekulinio tinklo ląstelių sumažėjimo priežastis vis dar nėra iki galo žinoma, tačiau buvo pasiūlyti keli mechanizmai, tokie kaip: ląstelių migracija, aktyvi fagocitozė bei oksidacinis stresas. Pasak Hogg ir kitų, 2000, trabekulinio tinklo ląstelės, išprovokuotos tam tikrų stimulų (pvz. uždegimo), tampa aktyvios, atsiskiria nuo kaimyninių ląstelių, pakeičia formą ir migruoja į Šlemo kanalą. Be to, Hogg ir kolegų, 1995 atliktame *In Vitro* tyrime, buvo pirmą kartą parodyta, jog vandeninis humoralinis skystis veikia kaip trabekulinio tinklo ląstelių migracijos stimulatorius. Autorių nuomone, AH pasižymi motogeniniais (angl. *motogenic*) veiksniais ir stimuliuoja trabekulinio tinklo ląstelių migraciją. Kitas svarbus veiksnys galimai sąlygojantis ląstelių mažėjimą trabekuliniame tinkle, tai ląstelių vykdoma aktyvi fagocitozė. Pasak, Grierson, ir Hogg, 1995 trabekulinio tinklo ląstelių aktyvi fagocitozė užima daugiau nei 50% ląstelės paviršiaus membranos. Autorių nuomone, kai didelis energijos kiekis yra skiriamas fagocitozei, ląstelių pasidalijimo tikimybė yra slopinama, tad mažėja ląstelių skaičius trabekuliniame tinkle. Tų pačių mokslininkų atliktas tyrimas su trabekulinio tinklo ląstelių kultūra, parodė, jog veikiant ląsteles su vis didesne mikrosferų koncentracija, TM ląstelių replikacijos laipsnis vis mažėjo, nes jos vis labiau įsitraukė į fagocitozės procesą. Galiausiai,

vienas svarbiausių faktorių sąlygojančių trabekulinio tinklo ląstelių mažėjimą – tai oksidacinis stresas. Dėl kai kurių išorinių faktorių yra pažeidžiama oksidacinė kūno pusiausvyra, tad atsiranda tam tikri patologiniai pokyčiai (Zhao ir kt., 2016). Kadangi trabekulinis tinklas yra labiausiai oksidaciniam stresui jautrus audinys priekinėje kameroje, tai aktyvios deguonies formos (angl. *reactive oxygen species, ROS*) gali padaryti daug žalos: pažeisti TM ląstelių ir mitochondrijų DNR, paveikti ląstelių ciklo progresą, skatinti ląstelių senėjimą ir lėtinį uždegimą bei sukelti ląstelių apoptozę (Zhao ir kt., 2016). Pasak Saccà, 2015 oksidacinis stresas sukelia mitochondrijų DNR pažeidimą, kas sąlygoja ląstelių apoptozę ir ląstelių sumažėjimą trabekuliniame tinkle.

Išsamiau nagrinėjant vandeninio humoralinio skysčio ištekėjimo pokyčius, sąlygojančius aukštą akispūdį, pastebima, jog svarbų vaidmenį atlieka *trabekulinio tinklo tarpląstelinės medžiagos elementai*. Pasak, Abu-Hassan ir jo kolegų, 2014 tarpusavyje sąveikaujantys trabekulinio tinklo ECM komponentai sudaro nuosėdas, blokuojančias vandeninio humoralinio skysčio ištekėjimo kelią pro trabekulinį tinklą. ECM baltymas – kokchlinas (angl. *cochlin*) glaukominėse pelėse dėl mechaninio streso multimerizavosi ir suformavo nuosėdas, kurios sąlygojo AH kaupimąsi, padidėjusį akispūdį ir regos nervo atrofiją (Bhattacharya ir kt., 2005). Taip pat, su amžiumi ar susirgus glaukoma trabekulinio tinklo JCT regione pradeda kauptis iš tarpląstelinės medžiagos susiformavę fibriliniai elementai, vadinami – *apnašų medžiagomis* (angl. *plaque material*) (Abu-Hassan ir kt., 2014). Nors tikslus šių apnašų medžiagų mechanizmas vis dar nėra aiškus, tyrimai rodo, jog apnašų medžiagų kiekis yra ženkliai didesnis glaukominėse, nei sveikose akyse (Gottanka ir kt., 1997). Be to, ECM pokyčiai, atsirandantys dėl kalogenų disfunkcijos ir struktūrinio pakitimo, turi įtakos TM funkcijai ir vandeninio humoralinio skysčio ištekėjimui (Huang ir kt., 2013). Padidėjęs VI tipo kolageno kiekis apgaubia jungiamuosius pluoštus ir blokuoja AH pratekėjimą trabekuliniame tinkle (Hann ir kt., 2001). Aihara ir kiti, 2003 siekė įvertinti akispūdį transgeninėse pelėse, turinčiose I tipo kolageno koduojančio geno mutaciją. Tyrimo rezultatai parodė, jog transgeninės pelės turėjo statistiškai reikšmingai aukštesnį akispūdį, lyginant su sveikomis pelėmis. Be to, pastaruoju metu, buvo rastas stiprus ryšys tarp ECM standumo (angl. *stiffness*) ir aukšto akispūdžio (Wang ir kt., 2017). Trabekulinio tinklo ląstelių susitraukimas skatina ECM reorganizaciją, tad buvo iškelta hipotezė, jog padidėjusi TM ląstelių susitraukimo būseną yra galimai susijusi su ECM standumu (Wang ir kt., 2017).

Taip pat, moksliniai tyrimai rodo, jog *Šlemo kanalo* pokyčiai galimai lemia padidėjusį akispūdį, pavyzdžiui Šlemo kanale esančių, milžiniškų vakuolių bei tarpląstelinųjų ir kraštinių porų kiekis koreliuoja su padidėjusiu akispūdžiu. Andrés-Guerrero ir kiti, 2017 lygino tarpląstelinųjų ir kraštinių porų kiekį glaukominėse ir sveikose akyse. Tyrimo rezultatai parodė,

jog glaukominės akys pasižymėjo 80% mažesniu porų tankiu (160 poros/mm²) lyginant su sveikomis akimis (835 poros/mm²). Be to, yra pastebimas milžiniškų vakuolių praradimas glaukominėse akyse (Abu-Hassan ir kt., 2014). Tiksliai milžiniškų vakuolių bei porų kiekio sumažėjimo priežastis vis dar nėra aiški, bet manoma, kad tai susiję su padidėjusiu SC standumu. Kadangi poros susiformuoja susiliejus viršutinei ir apatinei SC endotelio plazminėms membranoms, tai padidėjęs Šlemo kanalo standumas slopina SC deformaciją ir porų susiformavimą (Stamer ir kt., 2015). Šią hipotezę patvirtino Overby ir jo kolegų, 2014 atliktas tyrimas, kuriame buvo rasta stipri koreliacija tarp padidėjusio SC standumo ir sumažėjusio porų susiformavimo kiekio. Be to, sumažėjusį milžiniškų vakuolių bei porų kiekį galimai lemia sutrikęs SC ląstelių prisitvirtinimas prie tarpląstelinės medžiagos ir kaimyninių ląstelių (Stamer ir kt., 2015). Dėl sutrikusio ląstelių prisitvirtinimo pastebima SC endotelio ląstelių migracija, taip pat galimai prisideda prie padidėjusio akispūdžio. Be to mokslininkai analizuojantys anatomines Šlemo kanalo charakteristikas, pastebėjo su amžiumi ir su glaukoma susijusius Šlemo kanalo morfologinius pokyčius. Asmenys turintys aukštą akispūdį pasižymi sumažėjusiu Šlemo kanalo skersmeniu bei ilgiu, o tokie pokyčiai sąlygoja padidėjusį pasipriešinimą AH ištekėjimui ir aukštą akispūdį. Hamanaka ir jo kolegų, 2016 atlikto tyrimo rezultatai parodė reikšmingai trumpesnę Šlemo kanalą glaukominėse akyse ($198.70 \mu\text{m} \pm 81.65 \mu\text{m}$), nei sveikose akyse ($277.7 \mu\text{m} \pm 65.52 \mu\text{m}$) (Hamanaka ir kt., 2016). Kagemann ir kitų, 2014 atliktame tyrime buvo rasta, jog ūmus akispūdžio padidėjimas sumažino sveikų akių Šlemo kanalo skerspjūvio plotą. Tyrėjų nuomone su amžiumi ar su glaukoma susijęs SC kanalo ilgio ar skersmens sumažėjimas glaudžiai koreliuoja su sumažėjusiu SC vidiniame endotelyje esančių porų skaičiumi: kuo trumpesnis ir plonesnis SC kanalas, tuo mažesnis SC vidinio endotelio porų skaičius, tad vandeninis humoralinis skystis sunkiai prateka ir didėja akispūdis (Allingham ir kt., 1996).

Kitas svarbus faktorius, skatinantis aukštą akispūdį, tai *padidėjęs episklerinių venų spaudimas*. Dėl padidėjusio EVP atsiranda struktūriniai pažeidimai tiek Šlemo kanale, tiek trabekuliniame tinkle, o tai lemia chroniškai padidėjusį akispūdį. Pagrindines padidėjusio episklerinių venų spaudimo priežastis galima suskirstyti į dvi kategorijas: venų obstrukcija (angl. *venous obstruction*) bei arterioveninės fistulės (angl. *arteriovenous fistulas, AVF*). Venų obstrukcija gali pasireikšti įvairiomis formomis, viena iš jų skleritas (angl. *scleritis*). Skleritas - tai uždegimas episkleriniuose bei odenos audiniuose, pažeidžiantis episklerines venas. Heinz ir kiti, 2013 siekė nustatyti aukšto akispūdžio paplitimą bei rizikos veiksnius, susijusius su sklerito forma. Tyrimo rezultatai parodė, jog IOP padidėjimas atsiranda maždaug penktadaliui pacientų, turinčių skleritą. Kita galima venų obstrukcijos forma, tai kaverninė sinusų trombozė (angl. *cavernous sinus thrombosis*), pasireiškianti kraujo krešulio susidarymu kaverniniame

sinuse ir lemianti sutrikusį venų nutekėjimą iš orbitos (Otulana ir kt., 2008). Kaverninė sinusų trombozė yra susijusi su padidėjusiu episklerinių venų spaudimu sąlygojančiu aukštą akispūdį (Shaarawy ir kt., 2009). Arterioveninės fistulės – tai susiformavęs nenormalus ryšys tarp arterijos ir venos. AVF dažniausiai sukelia tam tikra trauma ar operacija, o dėl susiformavusių AVF intensyvėja kraujotaka ir didėja episklerinių venų spaudimas, kuris sąlygoja aukštą IOP (Cagatay ir kt., 2014). Mokslinėje literatūroje randama daug klinikinių atvejų išsamiai aprašančių pacientų padidėjusį akispūdį, galimai dėl susiformavusių arterioveninių fistulių (Fourman, 1989; Heichel ir kt., 2015; Calafiore ir kt., 2016).

Padidėjęs vandeninio humoralinio skysčio formavimosi greitis, sąlygoja didesnę AH susikaupimą priekinėje kameroje ir aukštą akispūdį. Nors padidėjęs AH formavimosi mechanizmas vis dar išlieka neaiškus, pastebėta, jog farmakologiniai aukšto akispūdžio gydymo būdai yra nukreipti būtent į AH gamybos sumažinimą krumplyne. Pavyzdžiui, beta-adrenerginių receptorių antagonistas *timololis*, daugelį metų buvo pagrindinė padidėjusio akispūdžio gydymo priemonė. Timololis slopina beta – adrenerginius receptorių lokalizuotus krumplyno epitelyje, ir tokiu būdu riboja AH aktyvią transportaciją (Negri ir kt. 2019) bei sumažina AH susiformavimą ir mažina akispūdį (Kiland ir kt., 2004). Yra tyrimų rodančių, jog timololis slopina plazmos srautą į krumplyno ataugas (Van Buskirk ir kt., 1990); slopina natrio – kalio – chloro ($Na^+ - K^+ - 2Cl^-$) simporterį (Crook ir Riese, 1996); bei slopina natrio – kalio pompą krumplyno epitelyje (Becker, 1980). Sihota ir kiti, 2004 siekė patikrinti timololio poveikį asmenims sergantiems glaukoma. Tyrimo rezultatai parodė, jog 0,5% timololio gydymas du kartus per parą, pradinį pacientų akispūdį (20.2 ± 2.1) mmHg sumažino 26 % iki (14.4 ± 2.9) mmHg. O Seki su kolegomis, 2005 atliko aukšto akispūdžio modelio indukciją *Wistar* žiurkėms ir stebėjo timololio veikimą tris savaites. Tyrimo rezultatai parodė statistiškai reikšmingai mažesnę IOP bei didesnę ganglinių ląstelių skaičių žiurkėse, kurios gavo 0,5% timololio gydymą (10 μ l, tris kartus paroje), nei žiurkėse, kurios gavo tirpiklio (angl. *vehicle*) gydymą. Kitas populiarus vandeninio humoralinio skysčio formavimosi slopintojas – *dorzolamidas* (angl. *dorzolamide*). Dorzolamidas yra anglies anhidrazės inhibitorius. Anglies anhidrazė katalizuoja H_2CO_3 virsmą į bikarbonato (HCO_3^-) ir vandenilio (H^+) jonus. Slopinant anglies anhidrazę sumažėja vandenilio jonų koncentracija ląstelėje ir mažėja (Na^+/H^+) simporterio efektyvumas. Na^+ jonai nebepatenka iš stromos į pigmentines ląsteles, todėl silpnėja ir AH gamyba (Kobayashi ir Naito, 2000). Orzalesi ir kitų, 2000 atliktame tyrime pacientai, sergantys glaukoma, pasižymėjo ženkliai mažesniu IOP (19.3 ± 1.7) mmHg po 2% dorzolamido gydymo tris kartus paroje, lyginant su pradine IOP verte prieš gydymą (22.7 ± 1.8) mmHg. Be to, anksčiau minėto Seki ir kitų, 2005 tyrimo metu buvo patikrintas ir dorzolamido poveikis *Wistar* žiurkėms su indukuotu aukšto akispūdžio modeliu. Tyrimo

rezultatai parodė statistiškai reikšmingai mažesnę IOP bei didesnę ganglinių ląstelių skaičių žiurkėse, kurios gavo 1% dorzolamido gydymą (10 µl, tris kartus paroje), nei žiurkėse, kurios gavo tirpiklio gydymą. Be timolilio ir dorzolamido, taip pat yra populiarūs *latanoprostas* (angl. *latanoprost*) bei *travoprostas* (angl. *travoprost*) siekiant sumažinti vandeninio humoralinio skysčio gamybą (Orzalesi ir kt.,2000; Lim ir kt., 2008).

1.2.2. Aukšto akispūdžio sąlygojamos patologijos

Didelis vandeninio humoralinio skysčio susikaupimas priekinėje kameroje lemia tinklainės ganglinių ląstelių mirtį, regos nervo atrofiją bei galiausiai regos praradimą. Mokslininkai tiriantys akispūdžio ir tinklainės ganglinių ląstelių ryšį, randa teigiamą koreliaciją tarp IOP padidėjimo ir RGC praradimo. Mukai ir kiti, 2019 atliko glaukomos modelio indukciją pelėse, o atlikto trimo rezultatai parodė IOP padidėjimą glaukominėse akyse (34.91 ± 5.21) mmHg, lyginant su pradiniu akispūdžiui (11.08 ± 2.26) mmHg bei 64.1% RGC sumažėjimą periferinėje tinklainės dalyje. Taip pat, Huang su kolegomis, 2018 atliko glaukomos modelio indukciją *Wistar* žiurkėse ir rado, IOP padidėjimą (20.91 ± 1.97) mmHg lyginant su kontralateraline akimi (10.28 ± 0.39) mmHg bei 50.2% RGC sumažėjimą. Medeiros ir kiti mokslininkai, 2012 siekė įvertinti su amžiumi susijusį tinklainės ganglinių ląstelių praradimą pacientuose sergančiuose glaukoma. Vidutinis RGC praradimo procentas buvo 4,4% per metus, RGC sumažėjimas kiekvienam pacientui svyravo nuo 1,4% iki 8,9% per metus.

Įvairūs moksliniai tyrimai vis dar siekia paaiškinti aukšto akispūdžio sąlygotus, tinklainės ganglinių ląstelių praradimo molekulinis mechanizmus. Nors RGC ląstelių apoptozės mechanizmai vis dar nėra gerai suprantami, mokslininkų nuomone svarbų vaidmenį atlieka augimo faktorių sumažėjimas ir citokinų padidėjimas tinklainėje bei glutamato toksiškas poveikis, atsirandantys dėl padidėjusio IOP. Vienas iš sumažėjusio augimo faktorių yra smegenų kilmės neurotrofinis faktorius (angl. *brain-derived neurotrophic factor*, *BDNF*), kuris yra svarbus ląstelių metabolizmui ir išgyvenimui reguliuoti. Padidėjęs IOP sumažina BDNF kiekį tinklainėje, o BDNF trūkumas paskatina tinklainės ganglinių ląstelių apoptozę. Ghaffariyeh ir jo kolegų, 2011 atliktame tyrime buvo pastebėtas ženkliai mažesnis BDNF lygis glaukominėse pacientų akyse (18.42 ± 4.05) ng/mL lyginant su sveikomis akimis (27.16 ± 5.53) ng/mL. Taip pat, pastebimas nervų augimo faktoriaus (angl. *nerve growth factor*, *NGF*) sumažėjimas, dėl padidėjusio akispūdžio. NGF yra svarbus tinklainės ganglinių ląstelių augimo, dauginimosi ir išgyvenimo reguliavime bei slopina RGC degeneraciją (Wang ir kt., 2014). Aukštas IOP lemia nenormalų NGF arba jo receptorių veikimą bei NGF sumažėjimą, kas skatina RGC apoptozę (Colafrancesco ir kt., 2011). Be to, NGF gali būti naudojamas kaip potencialus glaukomos gydymo būdas. Lambiase ir kitų, 2009 atlikto tyrimo histologinė analizė parodė, jog NGF (200 $\mu\text{g} / \text{ml}$) akių lašai 4 kartus per dieną 7 savaites iš eilės apsaugojo glaukominių žiurkių, tinklainės ganglines ląsteles. Autorių nuomone NGF, slopindamas RGC apoptozę, pasižymi apsauginiu poveikiu. Taip pat, siekiant nustatyti kitus veiksnius sąlygojančius tinklainės ganglinių ląstelių apoptozę, dėl padidėjusio IOP, buvo atkreiptas dėmesys į naviko nekrozės faktorių - alfa (angl. *tumor necrosis factor-alpha*, *TNF- α*).

yra citokinas ir priklausomai nuo fiziologinių sąlygų gali užtikrinti ląstelių apsaugą arba skatinti jų degeneraciją (R. Agarwal ir P. Agarwal, 2012). Aukšto akispūdžio fiziologinėmis sąlygomis yra randamas TNF- α lygio padidėjimas, kuris skatina tinklainės ganglinių ląstelių apoptozę. Nakazawa ir kiti, 2006 atliko glaukomos indukciją pelėse ir rado, jog jau po trijų dienų ženkliai padidėjo TNF- α lygis, kuris išliko aukštas apie 2 savaites. TNF- α lygio padidėjimas pelėse paskatino mikroglijų aktyvaciją bei oligodendrocitų praradimą, o tai sąlygojo tinklainės ganglinių ląstelių mirtį. Be to, panašus poveikis buvo rastas ir atlikus intravitrealines (angl. *intravitreal*) TNF- α injekcijas sveikoms pelėms. Naudojant anti-TNF-alfa-neutralizuojantį antikūną arba užblokavus pelės genus, koduojančius TNF- α , buvo išvengta šio patofiziologinio efekto. Taip pat TNF- α veikia RGC ląsteles ir netiesioginiu keliu: TNF- α aktyvuoja azoto oksido sintazę-2 (angl. *nitric oxide synthase-2*, *NOS-2*) astrocituose (Yuan ir Neufeld, 2000). Padidėjusi NOS-2 ekspresija astrocituose sukelia azoto oksido (NO) perteklių, kuris skatina RGC mirtį (R. Agarwal ir P. Agarwal, 2012). Aminoguanidinas (angl. *aminoguanidine*), specifinis NOS-2 slopintojas, apsaugo RGC nuo apoptozės (Toda ir Nakanishi-Toda, 2007).

Taip pat, tinklainės ganglinių ląstelių apoptozė yra siejama su *glutamato sukeliama toksišku poveikiu*. Hipoksinėms sąlygoms, tinklainės ląstelės išskiria didelį glutamato kiekį, kuris sąlygoja RGC apoptozę. Glutamas yra pagrindinis neurotransmiteris centrinėje nervų sistemoje ir tinklainėje, tačiau didesnės glutamato koncentracijos yra toksiškos RGC ląstelėms (Agarwal ir kt., 2009). Glutamato neurotransmisija vyksta per jonotropinius (NMDA, AMPA) ir metabotropinius (mGluR) glutamato receptorius, o aukštas IOP sukelia padidėjusią šių receptorių stimuliaciją RGC kūnuose. Pavyzdžiui, yra žinoma, jog per didelį NMDA receptorių lygį sukelia tinklainės ganglinių ląstelių mirtį ir regos nervo atrofiją (Munemasa ir Kitaoka, 2013). Vis dar nėra aišku, kodėl didelis NMDA receptorių aktyvumas skatina RGC apoptozę, tačiau yra žinoma, kad NMDA receptorių antagonistai (pvz. staurosporinas) stabdo tinklainės ganglinių ląstelių mirtį (Guo ir kiti, 2006). Kitas svarbus faktorius, sąlygojantis glutamato padidėjimą aukšto akispūdžio metu, tai glutamato pašalinimo iš tarpląstelinės erdvės sutrikdymas. Glutamato transporteriai padeda pašalinti glutamatą iš tarpląstelinės erdvės ir gabena į glijos ląsteles, kur glutamino sintetazė jį verčia į glutaminą (Munemasa ir Kitaoka, 2013). Tačiau, eksperimentiniuose glaukomos modeliuose buvo pastebėtas nukrypimas nuo šio įprasto tinklainėje vykstančio glutamato / glutamino ciklo. Moreno ir jo kolegos, 2005 sukėlė glaukomą žiurkėse ir pastebėjo reikšmingai sumažėjusį glutamato pašalinimą iš tarpląstelinės erdvės bei sumažėjusį glutamino sintetazės aktyvumą. Taip pat, Naskar ir kitų, 2000 tyrimo metu buvo rastas sumažėjusi glutamato transporterio (EAAT-1) raiška glaukominėse akyse, lyginant su sveikomis akimis. Genetinėtiškai modifikuotos pelės, turinčios sumažėjusį

glutamato / aspartato transporterio (GLAST) lygį, pasižymėjo spontaniška tinklainės ganglinių ląstelių mirtimi ir regos nervo atrofija (Sarthy ir kt., 2005).

Tinklainės ganglinių ląstelių aksonai sudaro regos nervą, todėl RGC sumažėjimas tinklainėje lemia *regos nervo atrofiją*. Aukšto akispūdžio metu pastebimi morfologiniai pokyčiai regos diske (tai tinklainės ganglinių ląstelių aksonų, išeinančių iš akies, išeities taškas). Tinklainės ganglinių ląstelių aksonų konvergencija regos diske sudaro neuroretininį lanką (angl. *neuroretinal rim*), kuris apsupa įdubą (angl. *cup*) esančią regos disko centre, o RGC aksonai iš akies išeina pro akytą plokštelę (angl. *lamina cribrosa*) ir sudaro regos nervą, kuris keliauja toliau į smegenis (Weinreb ir kt., 2014). Dėl padidėjusio IOP ir sumažėjusio tinklainės ganglinių ląstelių skaičiaus, akytoji plokštelė deformuojasi, neuroretininis lankas progresuojančiai plonėja, o centrinė regos disko įduba gilėja (Weinreb ir kt., 2014).

Padidėjęs IOP spaudžia ir deformuoja *akytąją plokštelę* (Weinreb ir kt., 2014). Tokie morfologiniai akytosios plokštelės pokyčiai sukelia mechaninį regos nervo aksonų pažeidimą bei sutrikdo aksonų veiklą. Quigley ir kolegų, 2000 atliktame tyrime buvo rasta, jog padidėjęs akispūdis sutrikdo augimo faktoriaus (BDNF) retrogradinį (angl. *retrograde*) transportą aksonu, akytoje plokštelėje. Fortune su kolegomis, 2016 tyrė *neuroretinino lanko* morfologinius pokyčius glaukomos vystymosi eigoje. Tyrimo rezultatai parodė, jog neuroretininis lankas suplonėjo 40%, pradinė neuroretinino lanko pločio vertė buvo 330 μm , o glaukominėse akyse lanko plotis siekė 200 μm . Esant aukštam IOP, neuroretininis lankas, sudarytas iš susiliejusių tinklainės ganglinių ląstelių aksonų, plonėja ir skatina regos nervo atrofiją. Tyrimai atlikti su *regos disko įduba*, rodo, jog aukšto akispūdžio metu, įduba vis gilėja. Regos disko įduba dažniausiai yra matuojama pasitelkus įdubos ir disko santykio matavimo būdą (angl. *cup-to-disk ratio, CDR*). Padidėjęs įdubos ir disko santykis (didesnis nei 0.5) informuoja apie tinklainės ganglinių ląstelių aksonų sumažėjimą ir regos nervo atrofiją (Weinreb ir kt., 2014). Tatham ir kiti, 2013 atlikto tyrimą su glaukoma sergančiais pacientais. Tyrimo rezultatai parodė, jog sveikų akių vidutinė CDR vertė buvo $0,45 \pm 0,15$, o glaukominių akių apie $0,80 \pm 0,16$. Be to, tyrimo metu autoriai nustatė, jog CDR vertė buvo didesnė tose akyse, kurios pasižymėjo aukštu IOP bei sumažėjusiu RGC kiekiu.

IOP pokyčiai lemia molekulinis ir funkcinis pasikeitimus regos nerve esančiose *glijos ląstelėse* (pvz. astrocituose, oligodendrocituose, mikroglijoje) (Weinreb ir kt., 2014). Aukšto akispūdžio metu astrocitų ir mikroglijų aktyvacija didėja, o oligodendrocitų kiekis ir aktyvacija mažėja. *Astrocitai* atlieka svarbų vaidmenį regos nerve: pašalina neurotransmitterius iš tarpląstelinės medžiagos (pvz. pašalina glutamato perteklių); palaiko jonų homeostazę (pvz. pristato kalcį ir natrijį į neuronų citoplazmą); yra atsakingi už tam tikrą tarpląstelinės medžiagos komponentų (pvz. laminino) ir augimo faktorių (pvz. BDNF) produkciją (Hernandez ir kt.,

2008). Esant pažeidimui, ramybės būsenoje buvę astrocitai tampa „reaktyvūs“ ir keičia savo morfologiją bei funkciją, o šie pokyčiai gali turėti tiek teigiamą, tiek neigiamą poveikį regos nervui (Sofroniew ir Vinters, 2010). Viena iš naudingų reaktyvių astrocitų funkcijų regos nerve, tai neurotrofinių signalų (pvz. TGF- β , bFGF) ekspresija, kurie padeda RGC ir aksonams išvengti degeneracijos (Hernandez ir kt., 2008). Be to, astrocitų kiekis ženkliai padidėja pakilus IOP, ir astrocitai suteikia mechaninį palaikymą ir užpildo spragas, atsirandančias dėl aksonų ar kitų mirusių ląstelių degeneracijos (Mabuchi ir kt., 2003; Tamm ir Dowling, 2017). Astrocitų suaktyvėjimas gali turėti ir neigiamos įtakos aksonams. Per didelis reaktyvių astrocitų kiekis gali užspausti regos nervo aksonus ir sumažinti aksonu vykstančią medžiagų transportaciją (Tamm ir Dowling, 2017). Taip pat, regos nervo astrocituose yra didelis kiekis azoto oksido sintazės (NOS) fermento, atsakingo už azoto oksido (NO) gamybą. Esant aukštam IOP, padidėja NOS aktyvumas astrocituose, todėl susidaro azoto oksido (NO) perteklius, kuris skatina tinklainės ganglinių ląstelių ir jų aksonų mirtį (Hernandez ir kt., 2008). Be to, astrocitų gebėjimas pašalinti neurotransmitterius pakinta astroцитams tapus reaktyviems, pavyzdžiui, reaktyvieji astrocitai turi mažesnę glutamato receptorių (GLT1) kiekį, tad sumažėja glutamato pašalinimas iš tarpstelinės medžiagos (Pardo ir kt., 2006).

Taip pat, tiriant regos nervo pokyčius esant aukštam IOP, pastebimas padidėjęs *mikroglijos* aktyvumas. Glaukomos gyvūnų modeliuose yra randamas ženkliai didesnis susikaupęs mikroglijos kiekis glaukominėse akyse, lyginant su sveikomis akimis (Bosco ir kt., 2011). Atliekant fagocitozę, šalinant kenksmingas medžiagas bei siunčiant tarpstelinius signalus, mikroglija yra svarbus imuninio atsako tarpininkas (Zeng ir Shi, 2018). Vis dėl to, per didelis mikroglijos kiekis skatina regos nervo degeneraciją. Bosco ir kitų, 2008 atliktame tyrime buvo rasta, jog minociklinas (angl. *minocycline*) mažinantis mikroglijos aktyvaciją, slopino RGC degeneraciją.

Oligodendrocitų kiekis, esant aukštam IOP mažėja, todėl intensyvėja regos nervo aksonų degeneracija. Oligodendrocitai yra vienos dažniausiai sutinkamos ląstelės regos nerve, nes jos apsupa (angl. *ensheath*) ir apsaugo nemielinizuotus aksonus. Nakazawa ir jo kolegų, 2006 atlikto tyrimo metu su pelėmis, buvo rasta, jog oligodendrocitų kiekis sumažėja net 80% jau pirmąją savaitę po glaukomos modelio indukcijos. Tyrėjų nuomone, toks didelis oligodendrocitų praradimas yra dėl TNF- α suaktyvėjimo. Naudojant anti-TNF-alfa antikūną arba užblokavus pėlės genus, koduojančius TNF- α arba jo receptorių, buvo išvengta oligodendrocitų sumažėjimo. Taip pat tyrimai rodo, jog BDNF sumažėjimas aukšto akispūdžio metu, gali tiesiogiai paveikti oligodendrocitų populiaciją. Cellerino ir kitų, 1997 tyrime buvo parodyta, jog regos nerve sumažėjo aksonų skersmuo ir mielinizuota aksonų dalis, pelėse neturinčiose BDNF.

1.3. Eksperimentiniai aukšto akispūdžio gyvūnų modeliai

Padidėjusio akispūdžio patofiziologija yra gana sudėtinga, o procesas vis dar nėra iki galo pilnai suprantamas. Taikydami iki klinikinius aukšto akispūdžio gyvūnų modelius mokslininkai geriau suvokia kaip padidėjęs vandeninio humoralinio skysčio formavimasis, padidėjęs episklerinių venų spaudimas ar AH ištekėjimo sutrikdymas, lemia aukštą akispūdį. Be to, eksperimentiniai aukšto akispūdžio gyvūnų modeliai leidžia ne tik suvokti padidėjusio akispūdžio sukeltus patologinius mechanizmus, bet ir sukurti bei išbandyti naujus gydymo būdus, skirtus sumažinti akispūdį. Kuriant eksperimentinius aukšto akispūdžio modelius, vieni iš svarbiausių siekiamų tikslų yra padidėjęs IOP bei sumažėjęs tinklainės ganglinių ląstelių skaičius. Dažnai literatūroje yra randami dviejų tipų modeliai: modeliai nukreipti į episklerinių venų sutrikdymą ir modeliai, nukreipti į trabekulinio tinklo užkimšimą.

1.3.1. Episklerinių venų sutrikdymo modeliai

Vienas iš episklerinių venų sutrikdymo būdų yra *hipertoninio druskos tirpalo suleidimas į episklerines venas*. Šio metodo metu aplink akies pusiaują yra uždedamas polipropileno (C formos) žiedas ir sukuriamas laikinas slėgis. Naudojant stiklinę mikroadatą hipertonicinis druskos tirpalas yra injekuojamas į episklerinę veną. Po procedūros polipropileno žiedas yra pašalinamas. Patekęs į trabekulinį tinklą NaCl sukelia trabekulinio tinklo destruktiją. Vienas pirmųjų, pristatęs šį modelį buvo Morrison su kolegomis, 1997. Tyrimo metu, buvo atliktos natrio chlorido injekcijos į *Brown Norway* žiurkių episklerines venas. Tyrimo rezultatai parodė, jog po natrio chlorido injekcijų į episklerines venas IOP padidėjo 50 % žiurkių. Taip pat, buvo reikalingos kelios injekcijos siekiant padidinti žiurkių akispūdį. Be to, atlikus histologinius tyrimus, buvo rasta, jog padidėjęs IOP sąlygojo trabekulinio tinklo destruktiją. Autoriai nepatikrino, ar sumažėjo ganglinių ląstelių skaičius, o tai yra svarbu kuriant eksperimentinį aukšto akispūdžio gyvūnų modelį. Tad, Hänninen ir kiti, 2002 atliko hipertonicinio druskos tirpalo injekcijas *Brown Norway* žiurkėms ir stebėjo IOP pokyčius bei tyrimo pabaigoje suskaičiavo RGC ląsteles. Tyrimo rezultatai parodė, jog IOP padidėjimas pasireiškė maždaug 60% žiurkių. RGC sumažėjimas svyravo tarp žiurkių, nuo 39% iki 93%. Šio eksperimentinio aukšto akispūdžio privalumai yra tokie, jog lengva išryškinti episklerines venas, metodas yra greitas ir pigus. Tačiau, hipertonicinio druskos tirpalo suleidimas į episklerines venas neužtikrina 100% akispūdžio padidėjimo ir tinklainės ganglinių ląstelių sumažėjimo, o tai gali trukdyti įvertinti tam tikrų vaistinių preparatų efektyvumą. Taip pat, dažnai yra būtina pakartotinė injekcija siekiant padidinti IOP. Be to, autorių nuomone, šios

procedūros atlikimas yra gana sudėtingas, reikalaujantis specialių įgūdžių ir atitinkamos įrangos (polipropileno žiedo, stiklinės mikrodatos ir kt.).

Kitas episklerinių venų sutrikdymo modelis yra *episklerinių venų fotokoaguliacija lazeriu*. Fotokoagulatoriumi yra sutrikdoma kraujotaka episklerinėse venose ir vandeningas humoralinis skystis nebegali efektyviai pašalinti, todėl kyla akispūdis. Procedūra dažniausiai yra atliekama du kartus, norint gauti ženklų ganglinių ląstelių pokytį. WoldeMussie su kolegomis, 2001 atliko šio modelio indukciją žiurkėse. Po dviejų procedūrų padidėjo žiurkių IOP iki 33.1 ± 0.4 mmHg, tačiau šis padidėjimas išsilaikė tik kelias dienas. Tyrimo pabaigoje vidutinis žiurkių RGC praradimo kiekis siekė 44%. Taip pat, autoriai patikrino modelio veiksmingumą naudojant brimonidiną (angl. *brimonidine*). Gydytas brimonidinu sumažino laipsnišką ganglinių ląstelių praradimą bei užkirto kelią IOP padidėjimui. Šie rezultatai, duoda pagrindo teigti, jog episklerinių venų fotokoaguliacija lazeriu yra efektyvus aukšto akispūdžio modelis, siekiant padidinti IOP ir sumažinti RGC kiekį. Be to, brimonidino sąlygota tinklainės ganglinių ląstelių apsauga, rodo, jog šis modelis yra veiksmingas ir tinkamas patikrinti naujus farmakologinius gydymo būdus, skirtus sumažinti akispūdį. Vis dėl, to modelis turi ir keletą apribojimų: aukšta įrangos kaina, būtina pakartotinė fotokoaguliacija lazeriu, pakilęs akispūdis išsilaiko tik kelias dienas. Be to, nagrinėjant mokslinius literatūros šaltinius pastebima, jog skirtingi autoriai atlikdami episklerinių venų fotokoaguliacija lazeriu, pasirenka skirtingą lazerio šūvių skaičių. Anksčiau minėtame tyrime autoriai atliko 130–150 šūvių į episklerines *Wistar* žiurkių venas. Chiu ir kiti, 2007 atliktame tyrime su *Sprague Dawley* žiurkėmis, susumavus atliko apie 75-80 lazerio šūvių, o Levkovitch-Verbin su kolegomis, 2002 lazeruojant *Wistar* žiurkes atliko apie 100 šūvių. Atsižvelgus į tai, šiame darbe buvo nuspręsta atlikti eksperimentą, siekiant nustatyti efektyvų lazerio šūvių skaičių, kuris būtų pakankamai didelis, kad padidintų IOP ir sumažintų tinklainės ganglinių ląstelių skaičių *Long Evans* žiurkėse.

1.3.2. Trabekulinio tinklo užkimšimo modeliai

Kitas aukšto akispūdžio modelis yra paremtas tam tikrų medžiagų suleidimu į priekinę kamerą, kad būtų užkirstas kelias vandeniniam humoralinio skysčio nutekėjimui pro trabekulinį tinklą. *Mikrosferų (angl. microspheres) suleidimas į priekinę kamerą*, sąlygoja trabekulinio tinklo užkimšimą ir padidėjusį IOP. Weber ir Zelenak, 2001 pristatė šį aukšto akispūdžio modelį, suleisdami *latekso mikrosferas* (angl. *latex microspheres*) į beždžionių priekines kameras. Tyrėjai pasirinko naudoti 10µm latekso mikrosferas, atsižvelgami į tai, jog mikrosferos yra ženkliai didesnės, nei trabekulinio tinklo JCT sluoksnyje ir Šlemo kanalo vidinio endotelio dalyje esančios poros. Kiekvienam gyvūnui prireikė 8–10 injekcijų (2 injekcijos per savaitę), kad būtų pasiektas 1–2 dienų IOP padidėjimas. Vis dėl to, autorių nuomone šis modelis turi ir minusų, tokių kaip, stiprūs IOP svyravimai ir dažnų injekcijų reikalavimas. Urcola ir kiti, 2006 atliko mikrosferų injekcijas *Sprague Dawley* žiurkėse. Tyrimo rezultatai parodė padidėjusį IOP po devynių injekcijų (1 injekcija per savaitę). Be to, tyrimo rezultatai parodė 23.1 % sumažėjusį RGC kiekį lyginant su sveikomis akimis. Tyrimo metu autoriai pastebėjo, jog suleistos latekso mikrosferos ne visos nukeliaudavo iki trabekulinio tinklo, kaip tikėtasi. Ngumah su kolegomis, 2006 atliko panašią aukšto akispūdžio modelio indukciją Naujosios Zelandijos trušiuose. Tyrimo rezultatai parodė, jog po latekso mikrosferų injekcijų, pakilo triušų IOP, o tinklainės ganglinių ląstelių skaičius sumažėjo 24 %. Tačiau, autorių nuomone, suleistos latekso mikrosferos, patekusios į vyzdžio zoną, užkerto kelią fundoskopiniam ir funkciniam regos nervo ir tinklainės pažeidimo stebėjimui. Didžiausias šio metodo privalumas yra tas, jog mikrosferų suleidimas į priekinę kamerą yra nesudėtingas, tam nereikia specialios įrangos, todėl jį galima pritaikyti daugybei rūšių, atliekant tik nedidelius pakeitimus. Be to, yra galimybė reguliuoti IOP keičiant mikrosferų injekcijų kiekį bei dažnumą. Šio modelio trūkumai: reikalingos pakartotinės injekcijos; ne visos latekso mikrosferos nukeliauja iki trabekulinio tinklo; skaidrumo praradimas akyje po injekcijų.

Taip pat, literatūroje randama, jog siekiant indukuoti aukšto akispūdžio modelį gyvūnuose yra naudojamos *polistireno mikrosferų* (angl. *polystyrene microspheres*) injekcijos. Sappington ir kiti, 2010 atliko skirtingo kiekio injekcijas (2.5 - 7 µL) su 5 µm skermens polistireno mikrosferomis į žiurkių priekines kameras. Tyrimo rezultatai parodė, jog 2.5 µL injekcijos padidino akispūdį nuo iki 26.9 mmHg ± 1.7 mmHg, o 7 µL injekcijos iki 29.7 mmHg ± 1.2 mmHg. Toks skirtingų injekcijų kiekių sukeliamas skirtingo didumo akispūdis, yra puikus pavyzdys kaip keičiant injekcijų kiekį galima reguliuoti IOP didėjimą. Vėliau, Smedowski ir kiti, 2014 atliko polistireno mikrosferų injekcijas *Wistar* žiurkėms ir nustatė ne tik IOP padidėjimą, bet ir tinklainės ganglinių ląstelių sumažėjimą. Tyrimo rezultatai parodė, jog po

mikrosferų injekcijų padidėjo akispūdis ir 34.6 % sumažėjo tinklainės ganglinių ląstelių skaičius. Vis dėl to, autorių nuomone, kaip ir latekso mikrosferų injekcijų metu, šis modelis pasižymi vienu dideliu trūkumu: yra sunku sukontroliuoti mikrosferų keliavimą priekinėje kameroje link trabekulinio tinklo. Tad, Cone ir kiti, 2010 siekdami užtikrinti tinkamą mikrosferų pasiskirstymą, po polistireno mikrosferų injekcijų, papildomai atliko viskoelastinės medžiagos injekciją tam, kad nustumtų mikrosferas kuo arčiau trabekulinio tinklo. Kiti mokslininkai naudojo įmagnetintas polistireno mikrosferas ir magnetiniu žiedu pritraukdavo jas prie trabekulinio tinklo (Samsel ir kt., 2011). Abu šie mikrosferų nustūmimo link trabekulinio tinklo metodai buvo efektyvūs. Tačiau modeliai pasižymėjo ir tam tikrais trūkumais: buvo būtinos dažnos injekcijos; stiprūs IOP svyravimai; skaidrumo praradimas akyje po injekcijų.

Kitas trabekulinio tinklo užkimšimo būdas, tai *karbomero suleidimas į priekinę kamerą*. Karbomeras (angl. *carbomer*), tai sintetinis, didelės molekulinės masės, poliakrilinės rūgšties (polyacrylic acid, PAA) polimeras. Dažniausiai karbomeras yra naudojamas siekiant sukurti blizgantį skaidrumą ar klampumą, gaminant įvairius kosmetikos gaminius ir oftalmologinius akių lašus. Karbomero naudojimas aukšto akispūdžio modelio tyrimuose yra panašus į mikrosferų naudojimą: karbomeras užkemša trabekulinio tinklo bei Šlemo kanalo vidinio endotelio poras, pro kurias sunkiai praeina vandeninis humoralinis skystis ir padidėja IOP. Xu ir kiti, 2002 buvo vieni pirmųjų autorių išbandę karbomero injekcijas ant albinosinių triušių. Tyrėjai atliko 0.3% koncentracijos karbomero injekcijas į triušių priekines kameras. Tyrimo rezultatai parodė, jog akispūdis padidėjo 90 % triušių. Lei su kolegomis, 2009 patikrino ne tik IOP kitimą po karbomero injekcijų, bet ir karbomero sąlygotus trabekulinio tinklo bei Šlemo kanalo pokyčius. Po 0.3% koncentracijos karbomero injekcijų triušių akispūdis didėjo progresuojančiai ir išliko pakilęs apie tris mėnesius. Karbomero sukeltus trabekulinio tinklo ir Šlemo kanalo pokyčius autoriai padalino į dvi stadijas: ankstyvoje stadijoje pasireiškė uždegiminis atsakas, kuris sumažėjo arba išnyko po 3 savaičių, o vėlyvoje stadijoje pasireiškė trabekulinio tinklo ir Šlemo kanalo pokyčiai. Šiuos pokyčius sudarė trabekulinio tinklo išsiplėtimas ir deformacija bei kolageno skaidulų pagausėjimas trabekulinio tinklo tarpląstelinėje medžiagoje. Be to, buvo pastebėtas trabekulinio tinklo endotelio ląstelių atsiskyrimas. Taip pat, buvo rastas Šlemo kanalo vidinio endotelio dalyje esančių, milžiniškų vakuolių subliuškimas bei Šlemo kanalo užsikimšimas. Atsižvelgus į šiuos karbomero injekcijų sąlygotus pokyčius, nenuostabu, jog vandeninis humoralinio skysčio ištekėjimas pro trabekulinį tinklą ir Šlemo kanalą, buvo sutrikdytas. Nors aukščiau aprašyti karbomero indukuoti aukšto akispūdžio modeliai padidino IOP, tačiau autoriai nepranešė apie tinklainės ganglinių ląstelių pokyčius. Tad, Kim ir kiti, 2013 atliko tyrimą, kurio metu patikrino

karbomero injekcijų poveikį ne tik žiurkių akispūdžiui, bet ir tinklainės ganglinėms ląstelėms. Tyrimo metu buvo atliekamos 0.3% koncentracijos karbomero injekcijos į žiurkių priekines kameras. Injekcijos buvo atliktos du kartus (tyrimo pradžioje ir praėjus dviem savaitėms po pirmosios injekcijos) siekiant ilgiau išlaikyti pakilusį IOP. Tyrimo rezultatai parodė, jog žiurkių IOP padidėjo iki 36.90 mmHg ir išsilaikė apie 8 savaites. Be to, buvo rastas 38 % mažesnis tinklainės ganglinių ląstelių skaičius, lyginant su kontralateralinėmis žiurkėmis. Taip pat, autoriai nustatė, jog po karbomero injekcijų, žiurkės turėjo reikšmingai mažesnę aksonų tankį regos nerve, ir turėjo padidėjusį mikroglijos ląstelių kiekį. Šalia to, buvo pastebėtas ir regos disko įdubos gilėjimas. Visa tai rodo, jog karbomero injekcijos sąlygojo regos nervo atrofiją. Iš apžvelgtų tyrimų matyti, jog karbomero injekcijos progresuojančiai didina IOP, mažina RGC kiekį bei sąlygoja regos nervo atrofiją, tad yra efektyvus eksperimentinis aukšto akispūdžio gyvūnų modelis. Be to, karbomero injekcijos yra pigus ir lengvas metodas, nereikalaujantis specialios įrangos. Vis dėl to, kaip ir daugelyje modelių, yra randami tam tikri trūkumai: karbomero injekcijos sukelia ragenos drumstumą, tad tolimesnis fundoskopinis ar funkcinis regos nervo ir tinklainės pažeidimo įvertinimas yra neįmanomas.

1.3.3. Aukšto akispūdžio modeliuose naudojami gyvūnai

Eksperimentiniuose aukšto akispūdžio modeliuose yra dažnai naudojami šie gyvūnai: žiurkės, pelės ir triušiai. Žinoma yra sukurtų modelių ir su kitais laboratoriniais gyvūnais, tokiais kaip beždžionės (Weber ir Zelenak, 2001), ar net zebra žuvys (Link ir kt, 2004). Eksperimentiniai žiurkių modeliai siūlo keletą pranašumų, tokių kaip sąlyginai mažos gyvūnų įsigijimo ir priežiūros išlaidos. Taip pat, mokslinėje literatūroje yra sukauptas didelis žinių kiekis apie žiurkių akių anatomiją bei funkciją, o tai yra svarbu lyginant aukšto IOP sąlygotus trabekulinio tinklo, tinklainės ir regos nervo pokyčius. Lyginant žiurkių ir primatų akių anatomiją yra randama tiek panašumų, tiek skirtumų. Vienas svarbiausių panašumų yra tai, jog žiurkės kaip ir primatai regos diske turi akytoją plokštelę, nors žiurkių akytoji plokštelė yra retesnė, lyginant su primatų akimis (Morrison, 2005). Taip pat, literatūroje yra randami akytosios plokštelės skirtumai tarp žiurkių linijų: *Brown Norway* ir *Long Evans* žiurkių akytoji plokštelė yra tvirta ir panaši į primatų, o *Hooded* ar *Wistar* žiurkių akytoji plokštelė yra sudaryta negausių aksonų pluoštų (May, 2008). Be to, kaip ir primatų, žiurkių regos nervo aksonai yra nemielinizuoti, o astrocitai yra orientuoti statmenai aksonų ašiai (Morrison, 2005). Vis dėl to, yra randami skirtumai tarp primatų ir žiurkių kraujotakos regos nerve: primatuose regos nervas aprūpinamas kraujyje centriniame tinklainės arterijos ir gyslainės dėka, o žiurkių regos nervas tik centriniame tinklainės arterijos dėka (May, 2008). Taip pat, reikėtų atkreipti dėmesį, jog primatų ir žiurkių priekinės kameros dydis skiriasi (pvz. žmogaus siekia 3.05 mm, o žiurkių 0.87 mm), o tai yra svarbu nustatant į priekinę kamerą suleidžiamų medžiagų kiekį. Lyginant primatų ir žiurkių tinklaines, randami tinklainės ganglinių ląstelių kiekio skirtumai, vidutinis RGC skaičius visoje žiurkių tinklainėje yra apie 72,371 – 113,000, o žmonių tinklainėse suskaičiuojama apie 700,000 – 1,500,000 tinklainės ganglinių ląstelių (May, 2008). Tad, atsižvelgiant į didelį žiurkių prieinamumą, santykinai mažas pirkimo ir išlaikymo išlaidas, nesudėtingą eksperimentinį manipuliavimą bei panašią akies anatominę struktūrą ir funkciją, šio darbo eksperimentuose bus naudojamos *Long Evans* žiurkės.

4. METODIKA

2.1. Laboratoriniai gyvūnai, medžiagos, įranga

2.1.1. Laboratoriniai gyvūnai

Eksperimentai su laboratoriniais gyvūnais buvo atlikti gavus Lietuvos bandomųjų gyvūnų naudojimo etikos komisijos prie Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimą, dirbti su gyvūnais projekte nr. G2-100 (žr. 1 priedą). Visi gyvūnai buvo naudojami pagal ARVO pareiškimą dėl gyvūnų naudojimo oftalmologijos ir regėjimo tyrimuose ir ES direktyvą 2010/63/EU. Tyrimai buvo atlikti Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centre, Experimentica UAB įmonėje (Saulėtekio al. 7, LT-10257, Vilnius). Eksperimentams buvo naudojamos keturių ir penkių mėnesių amžiaus *Long Evans*, RjOrl:LE linijos, žiurkės (59 žiurkės) (2.1 lentelė).

Toks gyvūnų kiekis (59 žiurkės) buvo pasirinktas siekiant gauti statistiškai patikimus rezultatus trijuose eksperimentuose: 15 žiurkių buvo skirtos pirmajam eksperimentui, siekiant nustatyti efektyvią karbomero koncentraciją karbomero indukuoto aukšto akispūdžio gyvūnų modelyje; 20 žiurkių buvo skirtos antrajam eksperimentui, siekiant nustatyti efektyvų lazerių šūvių skaičių lazerio indukuoto aukšto akispūdžio gyvūnų modelyje; ir 24 žiurkės trečiajame eksperimente, siekiant nustatyti lazerio ir karbomero indukuotų aukšto akispūdžio modelių veiksmingumą naudojant gydymą timololiu. *Long Evans* žiurkės buvo gautos iš Janvier Labs laboratorijos, Prancūzijoje (žr. 2.1 lentelę).

2.1. lentelė. Informacija apie tyrimuose naudotus gyvūnus:

Rūšis (pavadinimas/ linija)	Gyvūnų amžius, lytis, fiziologinė būklė	Bendras kiekis	Gavimo šaltinis
<i>Long Evans</i> žiurkės, RjOrl:LE linija	4-5 mėnesių amžiaus patinėliai, sveiki	59	Janvier Labs, Route du Genest, 53940 Le Genest-Saint-Isle, Prancūzija, tel. +33 2 43 02 11 91

Long Evans žiurkės buvo laikomos specialiuose narvuose po penkias, kiekvienai žiurkei skiriant ne mažesnę kaip 250 cm² plotą. Žiurkės buvo laikomos patalpoje, kur buvo kontroliuojama šviesa (šviesa įjungiama nuo 7 iki 19 valandos), temperatūra (23±1 °C) bei drėgmė (55%). *Long Evans* žiurkės buvo maitinamos įprastu pašaru ir girdomos vandeniu iki

soties (ad libitum). Visi gyvūnai tyrimų eigoje patyrė nedidelį skausmą injekcijų po oda metu (VMT: 6.6), taip pat gyvūnai patyrė nedidelį stresą, kai buvo trumpam atskiriami nuo kitų bandomųjų gyvūnų procedūrų metu (VMT: 6.11).

Pirmo eksperimento metu *Long Evans* žiurkės buvo suskirtos į tris grupes:

1. 4 mėnesių senumo žiurkės, gavusios fiziologinio tirpalo injekciją į dešinės akies priekinę kamerą (n=5);
2. 4 mėnesių senumo žiurkės, gavusios 0.1% koncentracijos karbomero tirpalo injekciją į dešinės akies priekinę kamerą (n=5);
3. 4 mėnesių senumo žiurkės, gavusios 0.3% koncentracijos karbomero tirpalo injekciją į dešinės akies priekinę kamerą (n=5).

Antro eksperimento metu *Long Evans* žiurkės buvo suskirtos į keturias grupes:

1. 5 mėnesių senumo žiurkės, lazeruotos 50 kartų į dešinės akies episklerines venas (n=5);
2. 5 mėnesių senumo žiurkės, lazeruotos 100 kartų į dešinės akies episklerines venas (n=5);
3. 5 mėnesių senumo žiurkės, lazeruotos 200 kartų į dešinės akies episklerines venas (n=5);
4. 5 mėnesių senumo žiurkės, lazeruotos 400 kartų į dešinės akies episklerines venas (n=5);

Trečio eksperimento metu *Long Evans* žiurkės buvo suskirtos į keturias grupes:

1. 5 mėnesių senumo žiurkės, gavusios 0.3% koncentracijos karbomero tirpalo injekcijas į dešinės akies priekinę kamerą ir timololio gydymą (n=6)
2. 5 mėnesių senumo žiurkės, gavusios 0.3% koncentracijos karbomero tirpalo injekcijas į dešinės akies priekinę kamerą ir akių gelio (Systane Ultra) gydymą (n=6);
3. 5 mėnesių senumo žiurkės, lazeruotos 400 kartų į dešinės akies episklerines venas ir timololio gydymą (n=6);
4. 5 mėnesių senumo žiurkės, lazeruotos 400 kartų į dešinės akies episklerines venas ir akių gelio (Systane Ultra) gydymą (n=6);

2.1.2. Vaistiniai preparatai, reagentai ir kitos medžiagos

2.2. *lentelė. Vaistiniai preparatai ir kitos medžiagos naudotos tyrime bei jų paskirtis ir panaudojimas tyrime:*

Pavadinimas	Paskirtis	Panaudojimas tyrimuose
Systane® Ultra, Norbrook, Anglija	Drėkinamasis akių gelis, skirtas pašalinti dėl akių sausumo atsiradusius deginimo ir dirginimo pojūčius.	Systane Ultra akių gelis buvo sulašinamas ant abiejų žiurkių akių siekiant sudrėkinti akis procedūrų (injekcijų į priekinę kamerą ir fotokoaguliacijos lazeriu) metu. Be to, trečiojo eksperimento metu, trečioji ir penktoji žiurkių grupės gavo akių gelio (10µl) gydymą nuo 0 eksperimento dienos, tris kartus dienoje (8val., 12val. ir 17val.).
Mydriacyl®, Alcon, Saten, Suomija	Sterilus į akis lašinamas tirpalas, kuriame yra veikliosios medžiagos tropikamido. Jis išplėčia vyzdį (sukelia midriazę) bei atpalaiduoja akies krumplyną raumenį (sukelia cikloplegiją).	Lašai buvo sulašinami ant žiurkių dešinės akies prieš injekcijas į priekinę kamerą, tam, kad išsiplėstų vyzdis ir atliekant injekcijas stiklinė mikroadata neprisiliestų prie rainelės.
Alcaine®, Alcon- Couvreur, Belgija	Į akis lašinami lašai, turintys proksimetakaino hidroklorido veikliosios medžiagos, kurios dėka yra sukuriama greita ir trumpa vietinė akies paviršiaus nejautra.	Akių lašai buvo sulašinami ant žiurkių dešinės akies prieš procedūrų (injekcijų į priekinę kamerą ir fotokoaguliacijos lazeriu) atlikimą, kad būtų sukuriama vietinė akies paviršiaus nejautra ir gyvūnai nejustų jokio skausmo šių procedūrų atlikimo metu.
Oftan®, Timolol, Tampere, Suomija	Į akis lašinami lašai, kurių veiklioji medžiaga yra timololis. Jis mažina akies humoralinio skysčio gamybą.	Akių lašai buvo sulašinami ant žiurkių dešinės akies, trečiojo eksperimento metu pirmai ir trečiai grupei, siekiant sumažinti vandeninio humoralinio skysčio gamybą ir taip užkirsti kelią IOP padidėjimui.
Forane®, Isoflurane, USP, Vetpharma animal health, Spain	Inhaliacinis anestetikas bendrosios anestezijos indukcijai ir palaikymui.	Izofluranas buvo naudojamas siekiant anestezuoti žiurkes ir atlikti IOP matavimo procedūrą su tonometru..
Ketamidol 10%, Richterpharma ag Wels, Austria	Injekcinis tirpalas, kuriame yra veikliosios medžiagos ketamino, kuri yra reikalinga siekiant neilgai trunkančiai bendrajai anestezijai sukelti. Žiurkių anestezijai yra naudojamas ketamino, medetomidino ir 0.9% NaCl mišinys (1.5: 1: 2.5 santykiu).	Ketaminas buvo naudojamas, anestezijos mišinyje, siekiant sukelti bendrąją anesteziją žiurkėms prieš injekcijų į priekinę kamerą ir fotokoaguliacijos lazeriu procedūras. Žiurkės buvo anestezuotos po oda suleidus ketamino (60 mg/kg),

		meditomidino (0,4 mg/kg) ir 0.9% NaCl mišinio.
Sedator 1mg/ml, Eurovet animal health, Netherlands	Injekcinis tirpalas, kuriame yra veikliosios medžiagos medetomidino hidroklorido, kuris yra reikalingas siekiant neilgai trunkančiai bendrajai anestezijai sukelti. Žiurkių anestezijai yra naudojamas ketamino, meditomidino ir 0.9% NaCl mišinys (1.5: 1: 2.5 santykiu).	Sedator buvo naudojamas, anestezijos mišinyje, siekiant sukelti bendrąją anesteziją žiurkėms prieš injekcijų į priekinę kamerą ir fotokoaguliacijos lazeriu procedūras. Žiurkės buvo anestezuotos po oda suleidus ketamino (60 mg/kg), meditomidino (0,4 mg/kg) ir 0.9% NaCl mišinio.
Saline, Natrio Chloridas (NaCl) 0.9%, Braun	Fiziologinis tirpalas, 0,9% natrio chlorido mišinys vandenyje.	Fiziologinis tirpalas buvo naudojamas anestezijos mišinyje, siekiant sukelti bendrąją anesteziją žiurkėms prieš injekcijų į priekinę kamerą ir fotokoaguliacijos lazeriu procedūras. Taip pat NaCl buvo naudojamas atsikėlimui po anestezijos mišinyje, siekiant prikelti žiurkes po anksčiau minėtų procedūrų. Be to, NaCl buvo naudojamas pirmo eksperimento injekcijų metu.
Atipam, Eurovet animal health, Netherlands	Injekcinis tirpalas, turintis atipamezolio hidroklorido veikliosios medžiagos, kuris yra naudojamas medetomidino ir ketamino sukeltam slopinančiam poveikiui panaikinti. Žiurkių atsikėlimui po anestezijos yra naudojamas atipamo ir 0.9% NaCl mišinys (1: 9 santykiu).	Atipam buvo naudojamas atsikėlimui po anestezijos mišinyje, siekiant prikelti žiurkes po injekcijų į priekinę kamerą ir fotokoaguliacijos lazeriu procedūrų. Žiurkės buvo pažadinamos suleidus atipamo (5 mg/ml) ir fiziologinio tirpalo (0.9%) mišino.
Carbopol® 940, karbomeras, Acros Organics, Janssen Pharmaceuticaan, Belgija	Sintetinis, didelės molekulinės masės, poliakrilo rūgšties (polyacrylic acid, PAA) polimeras. Dažniausiai naudojamas siekiant sukurti blizgantį skaidrumą ar klampumą, gaminant įvairius kosmetikos gaminius ir oftalmologinius akių lašus.	Tyrimo metu karbomeras buvo naudojamas siekiant indukuoti aukšto akispūdžio modelį <i>Long Evans</i> žiurkėse. Karbomeras buvo praskiestas fiziologiniame tirpale. Eksperimentams atlikti buvo paruoštos dviejų koncentracijų karbomero tirpalai: 0.1% ir 0.3%.
4% paraformaldehidai (PFA) 0,1 M fosfato buferyje (1000 m), Electron Microscopy Sciences	4% PFA tirpalas ištirpintas fosfatinime buferiniame tirpale yra naudojamas perfuzijų metu, siekiant fiksuoti organizmo audinius bei fiksuoti jau išpreparuotus audinius (pvz. akis, smegenis).	Tyrimo metu 4% PFA buvo naudojamas žiurkių perfuzijoms atlikti. Atlikus perfuziją žiurkių akys buvo išpreparuojamos ir patalpinamos į 4% PFA.

2.3. lentelė. Tyrimų metu naudoti reagentai:

Pavadinimas	Komponentai	Gamintojas	Ref. nr.
Tris buferinis druskos tirpalas 1x (TBS 1x)	(0,661% Tris HCl + 0,096% Tris bazė + 0,9% NaCl) dejonizuotame vandenyje	Tris HCl - Carl Roth; Tris bazė - Sigma-Aldrich; NaCl - Fisher Scientific	Tris HCl - 9090.2; Tris bazė - T1503-1KG; NaCl - 10428420
Blokavimo tirpalas	(10% normalus ožkos serumas (NGS) + 0,5% Triton X-100) Tris buferiniame druskos tirpale 1x	Normalus ožkos serumas (NGS) - Biowest; Triton X-100 - Sigma-Aldrich	Normalus ožkos serumas (NGS) - S2000-500; Triton X-100- T9284-100ML
Plovimo tirpalas	(1% normalaus ožkos serumas (NGS) + 0,1% Triton X-100) Tris buferiniame druskos tirpale 1x	Normalus ožkos serumas (NGS) - Biowest; Triton X-100- Sigma-Aldrich	Normalus ožkos serumas (NGS) - S2000-500; Triton X-100- T9284-100ML
Triušio RBPMS		Phosphosolution	1830-RBPMS
Triušio-anti AF594		Invitrogen	A32740
DAPI (1 mg / ml 4', 6-diamidino-2-fenilindolio dihidrochlorido tirpalas)		Carl Roth	6843.1
Fluoroshield		Sigma-Aldrich	F6937-20ML

2.1.3. Įranga

2.4. lentelė. Tyrimų metu naudota įranga, jos paskirtis ir panaudojimas tyrimuose

Pavadinimas	Paskirtis	Panaudojimas tyrimuose
Izoflurano garintuvas, E-Z SYSTEMS®, Palmer, USA	Izoflurano garintuve yra sumaišomas deguonis su skystu izofluranu ir išleidžiamos anestezijos dujos nustatytu deguonies ir izoflurano santykiu. Ši įranga yra naudojama bendrai anestezijos indukcijai ir palaikymui.	Tyrimo metu izoflurano garintuvas buvo naudojamas siekiant anestezuoti žiurkes ir atlikti IOP matavimo procedūrą su tonometru. Žiurkės buvo patalpinamos į žiurkių indukcijos kamerą, kurioje jos gavo anestezijos dujų dozę su nustatytu deguonies ir izoflurano santykiu.
Indukcijos kamera (angl. <i>Induction chamber</i>)	Šis prietaisas yra naudojamas siekiant atlikti bendrą anestezijos indukciją ir palaikymą. Gyvūnai yra patalpinami į indukcijos kamerą, į kurią yra leidžiamos anestezijos dujos.	Tyrimo metu buvo naudojama triušių indukcijos kamera, siekiant patalpinti didesnę žiurkių kiekį (5 žiurkes) vienu metu. Patalpintos į indukcijos kamerą žiurkės gaudavo anestezijos dujas nustatytu deguonies ir izoflurano santykiu. Tokia procedūra buvo

		atliekama siekiant atlikti IOP matavimo procedūrą su tonometru.
Tonometas, Tonolab tonometer (Icare, Finland)	Šis prietaisas yra naudojamas nustatyti gyvūnų akispūdį. Prietaise esantis zondas neinvaziškai prisiliedamas prie akies ragenos išmatuoja IOP gyvsidabrio milimetrais (mmHg).	Eksperimentų metu, tonometru žiurkėms buvo matuojamas akispūdis beveik kiekvieną dieną 9 valandą ryte. Vienai akiai buvo atliekami penki matavimai, iš kurių buvo išvestas bendras vidurkis.
Mikropipečių traukiklis, P- 1000 micropipette puller, Phymep, Paryžius	Šis prietaisas yra reikalingas gaminti stiklines mikroadatas iš stiklo kapiliarų. Dažniausiai vienas stiklinis kapiliaras yra įtaisomas į mikropipečių traukiklį ir nustačius tam tikrą programą, kapiliaras yra tempiamas į skirtingas puses, kol iš vieno kapiliaro yra gaunami du kapiliarai su suplonėjusiu galiuku.	Tyrimo metu mikropipečių traukiklis buvo naudojamas siekiant borosilikato stiklo kapiliaro galiuką padaryti apie 1 µm skersmens. Toks plonas kapiliarų galiukas paverčia kapiliarą į mikroadatą, kuri buvo naudojama gaminant švirkštą skirtą karbomero injekcijoms į žiurkių priekinę kamerą.
Borosilikato stiklo kapiliarai, World Precision Instruments, Florida, USA	Borosilikato stiklo kapiliarai, naudojami biomediciniuose tyrimuose, dažniausiai yra 100mm ilgio ir 1.5mm skersmens.	Šio tyrimo metu iš borosilikato stiklo kapiliarų buvo gaminamos stiklinės mikroadatos pasitelkus mikropipečių traukiklį. Stiklinės mikroadatos, su 1 µm skersmens galiuku, buvo reikalingos karbomero injekcijoms atlikti į žiurkių priekines kameras.
„Butterfly” adata (25G)	„Butterfly“ adata yra sudaryta iš 25G adatos turinčios du dvišalius lanksčius „sparnus“ ir vieną lankstų permatomą vamzdelį (dažniausiai 20–35 cm ilgio). Tokios adatos dažniausiai naudojamos klinikose kraujo paėmimui.	Šiame tyrime „butterfly” adatos vamzdelis buvo panaudotas gaminant švirkštą skirtą karbomero injekcijoms į žiurkių priekinę kamerą.
Laboratorinis parafilmas, Parafilm®, Bemis, Oškošas, USA	Tai lanksti medžiaga, kuri gali prikibti prie netaisyklingų formų ir paviršių. Dažniausiai naudojama siekiant apsaugoti tam tikrus indus nuo skysčio ištekėjimo.	Tyrimo metu laboratorinis parafilmas buvo naudotas gaminant švirkštą skirtą karbomero injekcijoms į žiurkių priekinę kamerą. Laboratoriniu parafilmu buvo apsupta mikroadatos ir „butterfly” adatos vamzdelio susijungimo dalis, bei insulininio švirkšto ir „butterfly” adatos vamzdelio susijungimo dalis, tam, kad susijungimų vietose neištekėtų karbomero tirpalas.
Insulino švirkštas	300 µL insulino švirkštas su 30G adata dažniausiai yra naudojamas savarankiškoms injekcijoms. Be to insulino švirkštai dėl plonos adatos dažnai yra naudojami	Šio tyrimo metu, atliekant karbomero injekcijas buvo panaudotas insulino švirkštas ir stiklinė mikroadata. Pilnai šis švirkštas buvo sudarytas iš stiklinės mikroadatos, „butterfly” adatos

	priešklinikiniuose tyrimuose atliekant injekcijas į laboratorinių gyvūnų akis.	vamzdelio, insulino švirškšto ir laboratorinio parafilmu (2.1 pav.).
Lumenis® Novus Spectra Photocoagulator with LaserLink HS Argon green laser, Germany	Dažniausiai fotokoaguliacija lazeriu yra naudojama klinikoje, gydant oftalmologines ligas. Taip pat fotokoaguliacija lazeriu gali būti naudojama kuriant aukšto akispūdžio modelius, pavyzdžiui atliekant episklerinių venų ar trabekulinio tinklo fotokoaguliaciją lazeriu.	Tyrimo metu šiuo lazeriu buvo atliekama episklerinių venų fotokoaguliacija. Lazero šūvio galia siekė 500 mW, trukmė 0,10 s, diametras 100µm. Eksperimentų metu buvo pasirinktas skirtingas lazero šūvių skaičius (50, 100, 200 ir 400).
Peristaltinė pompa, Watson – Marlow, Fluid Technology Group, USA	Reguliuojamo greičio pompa skirta skysčių pergabenimui iš vienos vietos į kitą.	Tyrimo metu žiurkių perfuzijoms atlikti buvo naudojama Watson – Marlow peristaltinė pompa. Šia pompa buvo pompuojamas natrio chloridas ir 4% PFA tirpalas į kairį žiurkių skilvelį 20ml/min greičiu, siekiant fiksuoti žiurkės audinius.
Mini shaker, Biosan, Latvia, Grida, PSU-2T	Reguliuojamo greičio purtyklė skirta užtikrinti vienodą reagentų ir antikūnų pasiskirstymą tirpale.	Purtyklė buvo naudojama tinklainės iškoltinių imunohistoheminio žymėjimo metu, siekiant užtikrinti vienodą antikūnų pasiskirstymą tirpale.
Plyšinė lempa, CSO srl, Italy	Prietaisas sudarytas iš intensyvaus šviesos šaltinio ir binokulinio mikroskopo, kuris vaizdą didina 5–60 kartų, naudojamas oftalmologiniams akies tyrimams.	Plyšinė lempa buvo naudojama lazero fotokoaguliacijos procedūrų metu, kad būtų priartintos episklerinės venos.
Kintamo tūrio pipetė, 0.5 - 10 µl Sartorius, Finland	Naudojamos laboratorijose siekiant perkelti tikslų skysčių tūrį.	Kintamo tūrio pipetė buvo naudojama trečio eksperimento metu lašinant Timolol ir Systane Ultra akių lašus.
Analitinės svarstyklės, RADWAG, Poland	Itin aukšto tikslumo svarstyklės, naudojamos laboratorijose, siekiant nustatyti tikslų medžiagų svorį.	Analitinės svarstyklės buvo naudojamos siekiant nustatyti tyrime naudojamų medžiagų svorį.
Leica EZ4 Stereo mikroskopas, 8x - 35x (Leica, Vokietija)	Stereo mikroskopas su 4.4:1 mastelio keitimu, suteikiantis LED apšvietimą, naudojamas pradinio lygio tyrimuose.	Naudotas karbomero ir fiziologinio tirpalo injekcijų metu.
Leica DM6 B fluorescencinis ir šviesinis mikroskopas su Leica DMC6200 šviensine ir fluorescencine kamera (Leica, Vokietija)	Fluorescencinis ir šviesinis mikroskopas leidžiantis naudoti automatines funkcijas ir programines įrangas. Su prijungta šviensine ir fluorescencine kamera, leidžiančia fotografuoti su 40x didinimo objektyvu.	Naudotas tinklainės išklotinių vaizdinime.

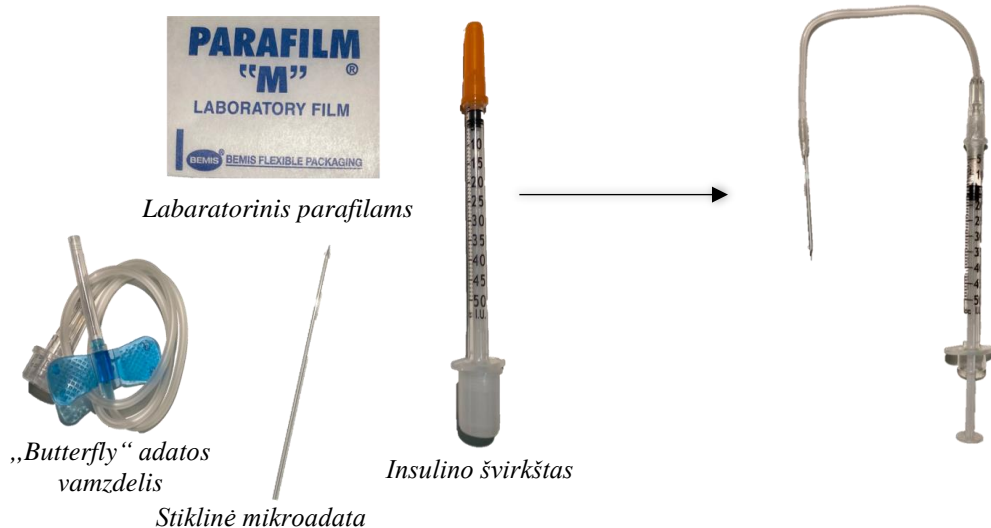
2.2. Metodai

2.2.1. Akispūdžio matavimas

Prieš atliekant akispūdžio matavimą žiurkės buvo patalpinamos į indukcinę kamerą (po penkias žiurkes), į kurią buvo leidžiamos anestezijos dujos nustatytu deguonies ir izoflurano santykiu. Anestezuotos žiurkės buvo išimamos iš indukcinės kameros ir buvo atliktas akispūdžio matavimas. Akispūdžio matavimas buvo atliktas visoms *Long Evans* žiurkėm 9 valandą ryte, naudojant tonometrą. Trys dienos prieš eksperimento pradžią visoms žiurkėms buvo atliktas pradinis (angl. *baseline*) akispūdžio matavimas. Vėliau, tyrimų eigoje akispūdžio matavimai buvo atlikti šiomis eksperimento dienomis: 1,2,4,7,8,9,11,14. Kiekvienai akiai akispūdžio matavimo metu buvo atliekami penki matavimai tonometru, iš kurių buvo išvestas bendras vidurkis.

2.2.2. Karbomero injekcija į priekinę kamerą

Siekiant sukelti aukšto akispūdžio modelį *Long Evans* žiurkėse, buvo atliekamos karbomero injekcijos į žiurkių priekinę kamerą, Karbomeras buvo ištirpintas steriliame vandenyje. Eksperimente buvo naudojami dviejų koncentracijų karbomero tirpalai: 0.1% ir 0.3%. Injekcijoms atlikti buvo paruoštas specialus švirkštas sudarytas iš stiklinės mikroadatos, „butterfly“ adatos vamzdelio, insulino švirkšto ir laboratorinio parafilmo (žr. 2.1 paveiklą).



2.1 pav. Karbomero injekcijoms atlikti skirtas švirkštas ir jo sudedamosios dalys (autoriaus nuotrauka)

Long evans žiurkės buvo anestezuotos į kojos raumenį suleidus ketamino (60 mg/kg), meditomidino (0,4 mg/kg) ir 0.9% NaCl mišinio (0,1ml/100g). Dešinės akies vyzdžiai buvo išplėsti užlašinus tropikamido tirpalo (10μl). Siekiant išvengti ragenos išdžiuvimo, ant abiejų akių buvo užlašinamas Systane Ultra akių gelis (10μl). Be to, prieš injekcijas žiurkėms buvo sulašinami Alcaine akių lašai (10μl) ant dešinės akies, kad būtų sukuriama vietinė paviršiaus nejautra. Naudojant chirurginį mikroskopą buvo atliekama karbomero arba fiziologinio tirpalo injekcija į dešinės akies priekinę kamerą, akį prilaikant pincetu. Pirmo eksperimento metu pirmoji grupė gavo fiziologinio tirpalo injekcijas (20μl) į dešinės akies priekinę kamerą (neigiama kontrolė), antroji grupė gavo 0.1% karbomero injekcijas (20μl) į dešinės akies priekinę kamerą, o trečioji grupė gavo 0.3% karbomero injekcijas (20μl) į dešinės akies priekinę kamerą. Trečiojo eksperimento metu pirmos ir antros grupės žiurkės gavo 0.3% karbomero injekcijas (20μl) į dešinės akies priekinę kamerą. Atlikus injekcijas žiurkės buvo pažadinamos į paodį suleidus atipamo (5 mg/ml) ir fiziologinio tirpalo (0.9%) mišinio (0,2ml/100g).

2.2.3. Episklerinių venų fotokoaguliacija lazeriu

Siekiant sukelti kitą aukšto akispūdžio modelį *Long Evans* žiurkėse, buvo atliekama episklerinių venų fotokoaguliacija lazeriu (žr. 2.2. paveikslą). Procedūra buvo atlikta eksperimento pradžioje ir pakartota 7-tą eksperimento dieną.



2.2. pav. Juodomis rodyklėmis pažymėtos žiurkių episklerinės venos, kurioms buvo atlikta fotokoaguliacija lazeriu (autorias nuotrauka)

Long Evans žiurkės buvo anestezuotos į raumenį suleidus ketamino (60 mg/kg), meditomidino (0,4 mg/kg) ir 0.9% NaCl mišinio (0,1ml/100g). Siekiant išvengti ragenos išdžiuvimo, ant abiejų akių buvo užlašinamas Systane Ultra akių gelis (10μl). Be to, prieš lazeravimą žiurkėms buvo sulašinami Alcaine akių lašai (10μl) ant dešinės akies, kad būtų sukuriama vietinė akies paviršiaus nejautra. Žiurkės buvo įtvirtinamos specialiame žiurkių

laikiklyje. Lumenis fotokoagulatoriaus lazerio galia buvo 500 mW, trukmė - 0,10 s, o diametras – 100µm. Antrojo eksperimento metu pirmosios grupės žiurkių episklerinės venos buvo fotokoaguliuojamos 50 kartų, antrosios – 100 kartų, trečiosios – 200 kartų, o ketvirtosios 400 kartų. Trečiojo eksperimento metu trečioji ir ketvirtoji žiurkių grupės buvo lazeruojamos 400 kartų. Atlikus episklerinių venų fotokoaguliaciją žiurkės buvo pažadinamos į paodį suleidus atipamo (5 mg/ml) ir fiziologinio tirpalo (0.9%) mišinio (0,2ml/100g).

2.2.4. Gydymas

Trečio eksperimento metu, trys dienos iki aukšto akispūdžio sukėlimo, pirmosios ir trečiosios grupės žiurkėms tris kartus per dieną (8val., 12val. ir 17val.) buvo lašinami akių lašai savo sudėtyje turintys timololį (veikimo pradžia 30-60 min., veikimo laikas 4-5 val.). Antros ir ketvirtos grupės žiurkėms buvo lašinamas Systane Ultra akių gelis. Visi gyvūnai gavo vienodą akių lašų kiekį – 10µl.

2.2.5. Histologija

2.2.5.1. Audinių paruošimas

Žiurkės buvo anestezuojamos į raumenį suleidus ketamino (60 mg/kg) ir medetomidino (0,4 mg/kg) mišinio. Anestezuotoms žiurkėms buvo atliekama perfuzija. Šios procedūros metu anestezuotai žiurkei buvo atveriamas krūtinės laštas. Į kairį skilvelį buvo įduriama buka adata, o dešinys prieširdis praduriamas smailia adata. Pro į kairį skilvelį įdurtą buką adatą 3 minutes buvo varomas 0.9% fiziologinis tirpalas ir 15 minučių 4% paraformaldehidą ištirpintas 0.1M fosfatiniame tirpale (pH 7.4), siekiant fiksuoti žiurkės audinius. Perfuzijai atlikti buvo naudojama peristaltinė pompa, kurioje buvo nustatytas 20ml/min greitis. Po perfuzijos išpreparuotos žiurkių akys buvo perkeltos į 4% paraformaldehidą. Praėjus 30 minučių iš žiurkių akių buvo paruošiamos tinklainių išklotinės (žr. 2.3 paveikslą).



2.3. pav. Žiurkių tinklainės išklotinė ant objektyvinio stikliuko įmerkta į 4% paraformaldehidą (autoraišius nuotrauka)

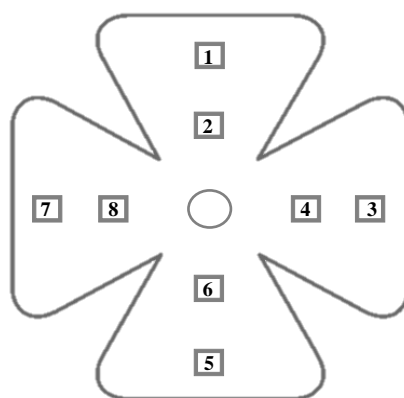
2.2.5.2. Visos tinklainės imunofluorescencinis žymėjimas

Tinklainės išklotinės buvo plaunamos tris buferiniu druskos tirpalu (TBS), pH 7.4, 5 valandas (+4°C), TBS buvo pakeistas 4 kartus per plovimo laikotarpį. Nuplautos tinklainės buvo blokuojamos 30 min TBS-triton (0,5%) tirpalu, turinčio 10% normalaus ožkos serumo (angl. *normal goat serum*, NGS). Vėliau mėginiai išplaunami TBS-Triton (0, 1%) tirpale, turinčio 1% NGS ir inkubuojami triušio RBPMS pirminiuose antikūniuose (skiedimas 1:200) per naktį prie +4°C. Po inkubacijos, mėginiai tris kartus po 10 min. praplaunami TBS-Triton (0, 1%) tirpale, turinčio 1% NGS kambario temperatūroje. Praplovus tinklaines, jos buvo inkubuojamos trim valandom +4°C temperatūroje su antriniais triušio anti-AF594 antikūnais (skiedimas 1:500). Uždėjus antrinius antikūnius mėginiai buvo apsaugomi nuo saulės šviesos, uždengus folija. Vėliau mėginiai yra dar kartą išplaunami tris buferiniu druskos tirpalu (TBS), pH 7.4, du kartus, kambario temperatūroje. Galiausiai tinklainė yra uždedama ant objekcinio stikliuko, o ant jos „Fluoroshield” klijais yra priklijuojamas dengiamasis stikliukas.

2.2.5.3. Tinklainės ganglinių ląstelių skaičiavimas

Žymėtos tinklainės buvo stebimos fluorescenciniu mikroskopu Leica DM6 B (Leica, Vokietija) bei fotografuojamos Leica DMC6200 (Leica, Vokietija) kamera, su 40x didinimo objektyvu. Tinklainės išklotinės nuotraukos buvo padarytos naudojant LAS X (Leica, Vokietija) programinę įrangą. Nuotraukos (0,041 μm^2 ploto) buvo daromos 8-iose skirtingose tinklainės vietose (paveikslas 2.4).

Padarius nuotraukas, tinklainės ganglinių ląstelių skaičius buvo įvertintas naudojant ImageJ (Viskonsino universitetas, USA) programinę įrangą. Rankiniu būdu nustatytas tinklainės ganglinių ląstelių skaičius buvo padalintas iš 0,041 μm^2 ploto, ir tokiu būdu buvo gautas RBPMS-pozityvių ląstelių skaičius kvadratiniam milimetre.



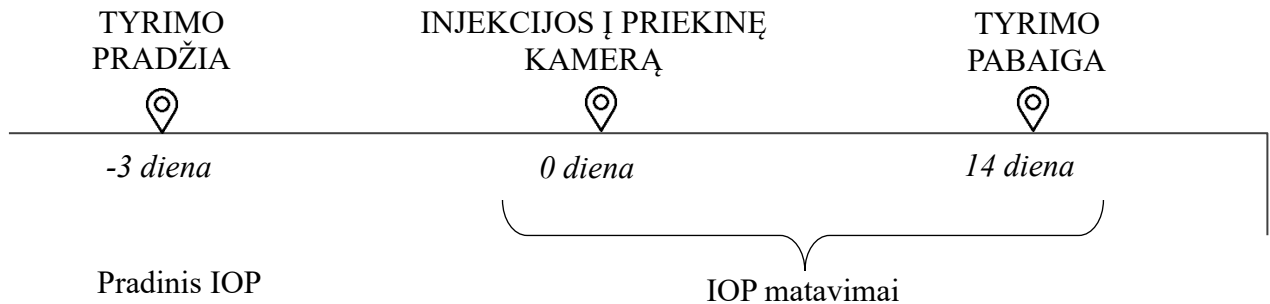
2.4. pav. Tinklainės išklotinėje pažymėtos 8 skirtingos tinklainės vietos, kuriose buvo atliktos nuotraukos (autorias nuotrauka)

2.2.6. Statistinė rezultatų analizė

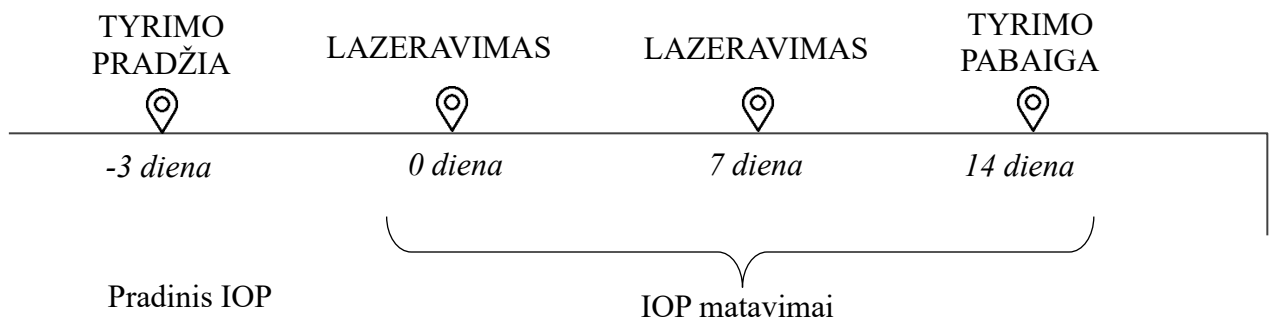
Eksperimentų rezultatų analizė buvo atlikta naudojant GraphPad Prism (versija: 8.4.2 (464), San Diego, California, USA) programinę įrangą. Atliekant statistinę rezultatų analizę buvo naudojami šie metodai: Kolmogorovo– Smirnovo kriterijus (angl. *Kolmogorov-Smirnov test*), vienfaktorinė dispersinė analizė (angl. *One-way ANOVA*), Pearsono koreliacijos testas (angl. *Pearson correlation test*) bei aprašomosios statistikos (angl. *descriptive statistics*) kriterijus. Visais atvejais p reikšmė <0.05 buvo laikoma reikšminga. Apskaičiuojant rezultatus buvo patikrintas duomenų normalingumas (Kolmogorovo– Smirnovo kriterijus). Duomenys buvo pateikiami kaip vidutiniai su standartine vidurkio paklaida (angl. *standard error of mean, SEM*).

2.3. Tyrimų eiga

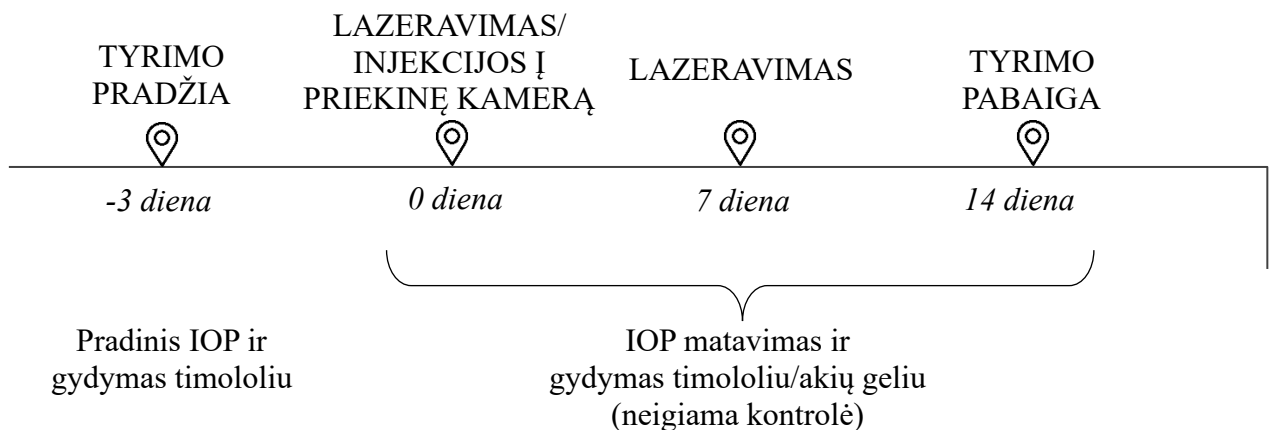
2.3.1. Pirmas eksperimentas: efektyvios karbomero koncentracijos nustatymas



2.3.2. Antras eksperimentas: efektyvaus lazerio šūvių skaičiaus nustatymas



2.3.3. Trečias eksperimentas: lazerio ir karbomero indukuotų aukšto akispūdžio modelių veiksmingumo nustatymas gydant timololiu



3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Efektyvios karbomero koncentracijos nustatymas

Siekiant nustatyti efektyvią karbomero koncentraciją, karbomero indukuoto aukšto akispūdžio modelyje penkiolikai *Long Evans* žiurkių buvo atliktos injekcijos į dešinės akies priekinę kamerą. Penkios žiurkės gavo fiziologinio tirpalo injekciją (neigiama kontrolė), penkios – 0.3% koncentracijos karbomero injekciją ir penkios 0.1 % koncentracijos karbomero injekciją. Gautos vidutinės žiurkių IOP ir RGC vertės buvo lyginamos su kontralateralinėmis (kairiosiomis) akimis, kurioms nebuvo atlikta jokio procedūra.

3.1.1. Akispūdžio kitimas

Atlikus rezultatų analizę (žr. 3.1 lentelę) buvo nustatyta, jog žiurkėms gavusioms fiziologinio tirpalo injekcijas (neigiama kontrolė), vidutinė akispūdžio vertė ir pikas statistiškai reikšmingai nesiskyrė nuo kontralateralinių akių ($p=0.9075$). IOP vidurkis po fiziologinio tirpalo injekcijų buvo apie $11.78 \text{ mmHg} \pm 0.29 \text{ mmHg}$ ir pikas siekė $13.15 \text{ mmHg} \pm 0.29 \text{ mmHg}$, o kontralateralinių akių IOP vidurkis buvo $12.72 \text{ mmHg} \pm 0.20 \text{ mmHg}$ ir pikas $13.15 \pm 0.29 \text{ mmHg}$.

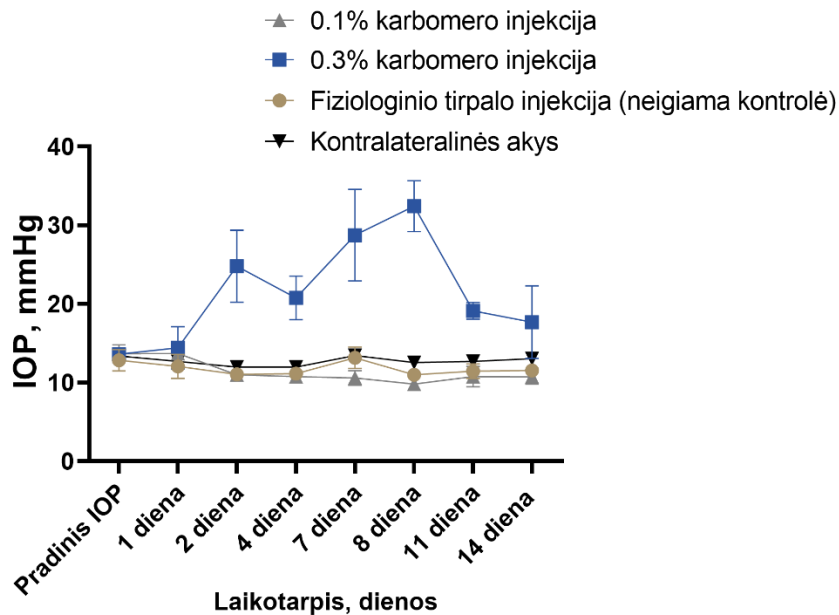
3.1 lentelė. Akispūdžio vidurkiai ir pikai po fiziologinio tirpalo (neigiama kontrolė) ir karbomero (0.1% ir 0.3%) injekcijų į priekinę kamerą, palyginti su kontralateralinėmis žiurkių akimis.

Eksperimentinės grupės	Visų eksperimento dienų IOP vidurkis (mmHg \pm SEM*)	IOP pikas (mmHg \pm SEM*)	p-reikšmė
Kontralateralinės žiurkių akys	12.72 ± 0.20	13.45 ± 0.20	-
Fiziologinio tirpalo injekcijos (neigiama kontrolė) (n=5)	11.78 ± 0.29	13.15 ± 0.29	0.9075
0.1% karbomero injekcijos (n=5)	11.38 ± 0.51	13.70 ± 0.51	0.7818
0.3% karbomero injekcijos (n=5)	21.45 ± 2.37	32.43 ± 2.37	<0.0001

*SEM - standartinė vidurkio paklaida (angl. *standard error of mean*)

Taip pat, iš pateiktos 3.1 lentelės matyti, jog žiurkių vidutinis akispūdis (11.38 ± 0.51) mmHg ir IOP pikas (13.70 ± 0.51) mmHg po 0.1 % koncentracijos karbomero injekcijos į priekinę kamerą statistiškai reikšmingai nesiskyrė nuo kontralateralinių akių ($p=0.7818$).

Žiurkės gavusios 0.3% koncentracijos karbomero injekciją į priekinę kamerą pasižymėjo statistiškai reikšmingai didesniu akispūdžio vidurkiu ($21.45 \text{ mmHg} \pm 2.37 \text{ mmHg}$) ir piku ($32.43 \text{ mmHg} \pm 2.37 \text{ mmHg}$), lyginant su kontralateralinėmis žiurkių akimis ($p < 0.0001$).



3.1 pav. Vidutinio akispūdžio pokyčiai 2 savaitių laikotarpyje, po fiziologinio tirpalo (neigiama kontrolė) ir karbomero (0.1% ir 0.3%) injekcijų į žiurkių priekinę kamerą, palyginti su kontralateralinėmis žiurkių akimis.

Be to, iš pateikto grafiko (žiūrėti 3.1 paveikslą) matyti, jog žiurkių IOP padidėjo jau antrą dieną po 0.3% koncentracijos karbomero injekcijos į priekinę kamerą ($24,80 \text{ mmHg} \pm 1.16 \text{ mmHg}$), kuris išliko gana aukštas iki 11-tos eksperimento dienos. Taip pat, tyrimo metu buvo pastebėta, jog po 0.3% karbomero injekcijos, žiurkių IOP palaipsniui didėjo, kol pasiekė piką 8-tąją eksperimento dieną ($32.43 \text{ mmHg} \pm 2.37 \text{ mmHg}$), nors 4-tąją eksperimento dieną pastebimas nedidelis IOP sumažėjimas iki $20,75 \text{ mmHg} \pm 0.34 \text{ mmHg}$. Pasiekus piką akispūdis palaipsniui mažėjo, kol nukrito iki $17,68 \text{ mmHg} \pm 2.43 \text{ mmHg}$ paskutinę eksperimento dieną (14-tą dieną). Praėjus dviem savaitėms nuo karbomero injekcijų, tarp žiurkių kontralateralinių ir dešinių akių skirtumo nebebuvo ($p=0.6054$).

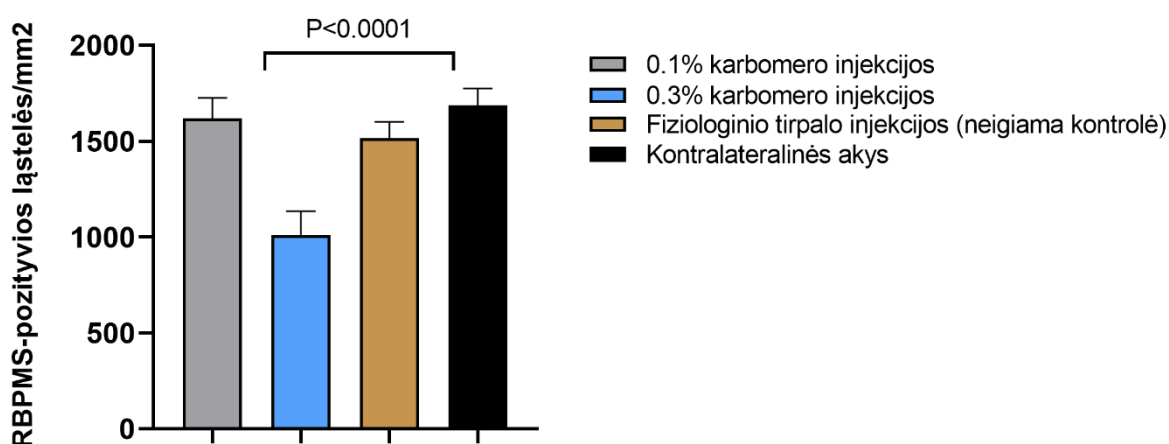
3.1.2. Tinklainės ganglinių ląstelių išgyvenamumas

Atsižvelgiant į tai, jog padidėjęs IOP lemia sumažėjusį tinklainės ganglinių ląstelių (RGC) skaičių, tyrimo metu buvo apskaičiuotas tinklainės ganglinių ląstelių išgyvenamumas, po fiziologinio tirpalo (neigiama kontrolė) ir karbomero (0.1% ir 0.3%) injekcijų į priekinę kamerą (žr. 3.2 lentelę). Pažymėjus tinklainių išklotines triušio RBPMS antikūniais buvo pastebėta, jog žiurkių, gavusių fiziologinio tirpalo injekcijas (neigiama kontrolė) RBPMS-pozityvių ląstelių skaičius statistiškai reikšmingai nesiskyrė nuo kontralateralinių akių (fiziologinio tirpalo injekcijas gavusios akys [1516 ląst./mm² ± 86.05 ląst./mm²] prieš kontralateralines akis [1687 ląst./mm² ± 88.95 ląst./mm²], p=0.4127).

3.2 lentelė. RBPMS-pozityvių ląstelių vidurkis po fiziologinio tirpalo (neigiama kontrolė) ir karbomero (0.1% ir 0.3%) injekcijų į priekinę kamerą, palygintas su kontralateralinėmis žiurkių akimis.

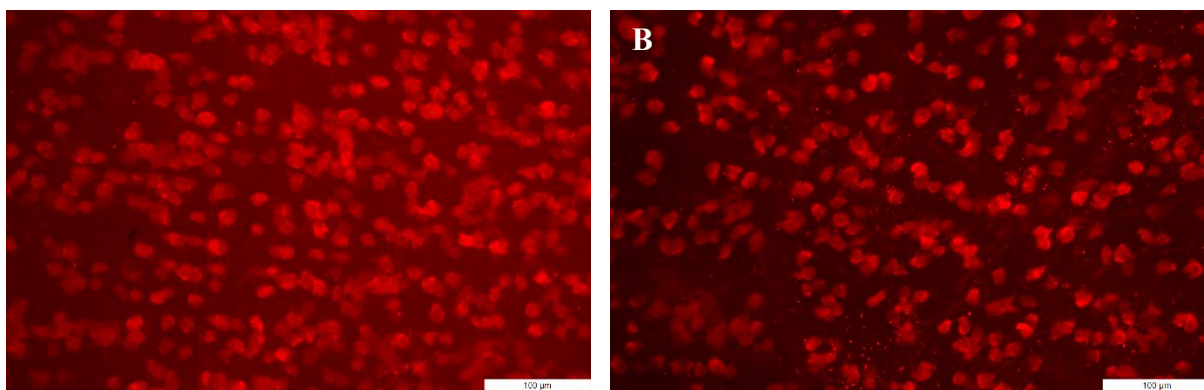
Eksperimentinės grupė	RBPMS-pozityvių ląstelių vidurkis (ląst./mm² ± SEM*)	p-reikšmė
Kontralateralinės akys	1687 ± 88.95	-
Fiziologinio tirpalo injekcijos (neigiama kontrolė) (n=5)	1516 ± 86.05	0.4127
0.1% karbomero injekcijos (n=5)	1619 ± 108.2	0.9365
0.3% karbomero injekcijos (n=5)	1009 ± 127.1	<0.0001

*SEM - standartinė vidurkio paklaida (angl. *standard error of mean*)



3.2 pav. RBPMS-pozityvių ląstelių vidurkis, po fiziologinio tirpalo (neigiama kontrolė) ir karbomero (0.1% ir 0.3%) injekcijų į žiurkių priekinę kamerą, palygintas su kontralateralinėmis žiurkių akimis.

Taip pat, statistiškai reikšmingas skirtumas nebuvo pastebėtas tarp žiurkių, gavusių 0.1% koncentracijos karbomero injekciją ($1619 \text{ ląst./mm}^2 \pm 108.2 \text{ ląst./mm}^2$) ir kontralateralinių žiurkių akių ($p=0.9365$). O po 0.3% koncentracijos karbomero injekcijos, žiurkės turėjo statistiškai reikšmingą **35%** RGC sumažėjimą lyginat su kontralateralinėmis akimis (0.3% karbomero injekcijas gavusios akys [$1009 \text{ ląst./mm}^2 \pm 127.1 \text{ ląst./mm}^2$] prieš kontralateralines akis [$1687 \text{ ląst./mm}^2 \pm 88.95 \text{ ląst./mm}^2$], $p<0.0001$) (žr. 3.2 ir 3.3 paveikslus).



3.3 pav. *Triušio RBPMS antikūniais žymėtos žiurkių tinklainių ganglinės ląstelės. A – kontralateralinės akies RBPMS-pozityvios ląstelės; B – žiurkės, gavusios 0.3% karbomero injekciją, tinklainės ganglinės ląstelės.*

3.2. Efektyvaus lazerio šūvių skaičiaus nustatymas

Šio eksperimento metu, siekiant nustatyti efektyvų lazerio šūvių skaičių, lazerio indukuoto aukšto akispūdžio modelyje, 20 *Long Evans* žiurkių buvo suskirstytos į keturias grupes po penkias žiurkes: pirmos grupės žiurkės buvo lazeruotos 50 kartų, antros – 100 kartų, trečios – 200 kartų, ketvirtos – 400 kartų. Gautos vidutinės žiurkių IOP ir RGC vertės buvo lyginamos su kontralateralinėmis (kairiosiomis) akimis, kurioms nebuvo atlikta jokio procedūra.

3.2.1. Akispūdžio kitimas

Žiurkių, kurios buvo lazeruotos 50 kartų, vidutinė akispūdžio vertė ($13.90 \text{ mmHg} \pm 0.42 \text{ mmHg}$) ir pikas ($14.76 \text{ mmHg} \pm 0.29 \text{ mmHg}$) nebuvo statistiškai reikšmingai didesnis, nei kontralateralinių akių IOP ($13.64 \text{ mmHg} \pm 0.28 \text{ mmHg}$) ir pikas ($15.36 \text{ mmHg} \pm 0.23 \text{ mmHg}$) ($p=0.9999$).

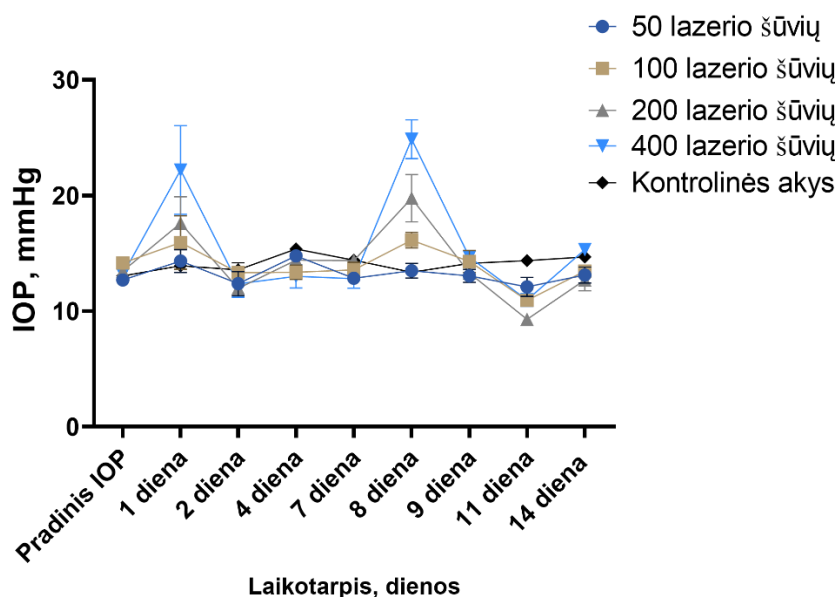
3.3 lentelė. Akispūdžio vidurkiai ir pikai po 50, 100, 200 ir 400 lazerio šūvių į žiurkių episklerines venas, atliktų 0- linę ir 7-tą eksperimento dieną, palyginti su kontralateralinėmis žiurkių akimis.

Eksperimentinės grupė	Visų eksperimento dienų IOP vidurkis (mmHg \pm SEM*)	IOP pikas (mmHg \pm SEM*)	p-reikšmė
Kontralateralinės akys	13.64 ± 0.28	15.36 ± 0.28	-
50 lazerio šūvių (n=5)	13.90 ± 0.42	14.76 ± 0.42	0.9999
100 lazerio šūvių (n=5)	16.02 ± 0.10	16.12 ± 0.10	0.9997
200 lazerio šūvių (n=5)	18.68 ± 1.08	19.76 ± 1.08	0.8849
400 lazerio šūvių (n=5)	23.53 ± 1.32	24.85 ± 1.32	<0.05

*SEM - standartinė vidurkio paklaida (angl. *standard error of mean*)

Taip pat, statistiškai reikšmingo IOP padidėjimo nebuvo pastebėta ir po fotokoaguliacijos lazeriu su 100 lazerio šūvių ($16.02 \text{ mmHg} \pm 0.10 \text{ mmHg}$), lyginant su kontralateralinėmis akimis ($p=0.9997$). Nors po 200 lazerio šūvių į žiurkių episklerines venas, pastebimas IOP vidurkio (18.68 ± 1.08) mmHg ir piko (19.76 ± 1.02) mmHg padidėjimas, tačiau jis nebuvo statistiškai reikšmingai didesnis už kontrolines akis ($p=0.8849$). Tačiau, po

fotokoaguliacijos lazeriu su 400 lazerio šūviais, pastebimas statistiškai reikšmingas akispūdžio ($23.53 \text{ mmHg} \pm 1.32 \text{ mmHg}$) ir piko ($24.85 \text{ mmHg} \pm 1.59 \text{ mmHg}$) padidėjimas, lyginant su kontralateralinėmis akimis ($p < 0.05$).



3.4 pav. Vidutinio akispūdžio pokyčiai 2 savaičių laikotarpyje, po 50, 100, 200 ir 400 lazerio šūvių į žiurkių episklerines venas, atliktų 0-linę ir 7-tą eksperimento dieną, palyginti su kontralateralinėmis žiurkių akimis.

Iš aukščiau pateikto grafiko (žr. 3.4 paveikslą) matyti, jog žiurkių, lazeruotų 400 kartų, vidutinė akispūdžio vertė, praėjus vienai dienai po pirmosios procedūros, padidėjo iki $22.2 \text{ mmHg} \pm 1.59 \text{ mmHg}$. Po IOP padidėjimo pirmąją eksperimento dieną, IOP krito ir pasiekė pradinį lygį $12.8 \text{ mmHg} \pm 0.23 \text{ mmHg}$, septintą eksperimento dieną. Po antrosios fotokoaguliacijos lazeriu procedūros, aštuntą eksperimento dieną, akispūdis vėl padidėjo ir pasiekė IOP piką $24.8 \text{ mmHg} \pm 0.10 \text{ mmHg}$. Paskutinę eksperimento dieną vidutinė akispūdžio vertė ($15.3 \pm 0.12 \text{ mmHg}$) beveik nesiskyrė nuo kontralateralinių žiurkių akių IOP (15.1 ± 0.20) mmHg.

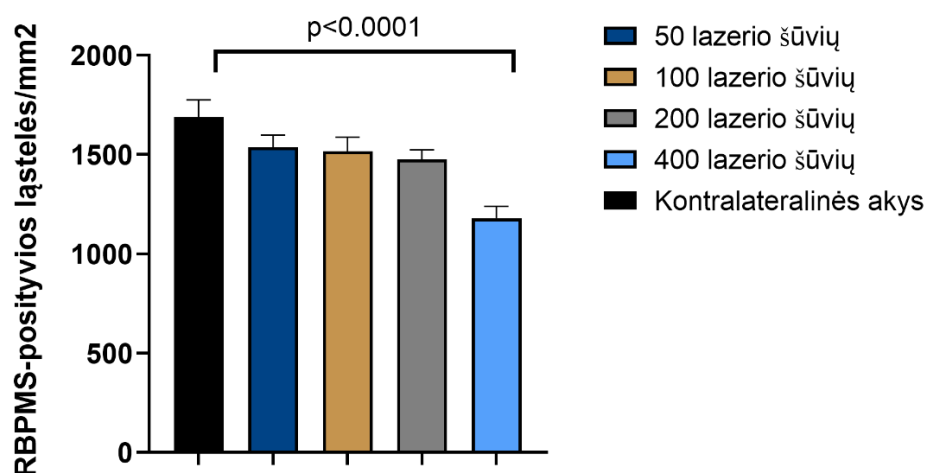
3.2.2. Tinklainės ganglinių ląstelių išgyvenamumas

Tiriant tinklainės ganglinių ląstelių skaičių po episklerinių venų fotokoaguliacijos lazeriu (žr. 3.4 lentelę), buvo nustatyta, jog žiurkių RBPMS-pozityvių ląstelių skaičius po 50 lazerių šūvių statistiškai reikšmingai nesiskyrė nuo kontralateralinių akių ($1538 \text{ ląst./mm}^2 \pm 59.70 \text{ ląst./mm}^2$ ir $1687 \text{ ląst./mm}^2 \pm 88.95 \text{ ląst./mm}^2$, atitinkamai; $p=0.3064$). Taip pat, žiurkių lazeruotų 100 kartų į episklerines venas, tinklainės ganglinių ląstelių skaičius (1517 ± 69.78) ląst./mm² nebuvo statistiškai reikšmingai mažesnis nei kontralateralinių akių ($p=0.2559$).

3.4 lentelė. RBPMS-pozityvių ląstelių vidurkis po 50, 100, 200 ir 400 lazerio šūvių į žiurkių episklerines venas, atliktų 0-linę ir 7-tą eksperimento dieną, palygintas su kontralateralinėmis žiurkių akimis.

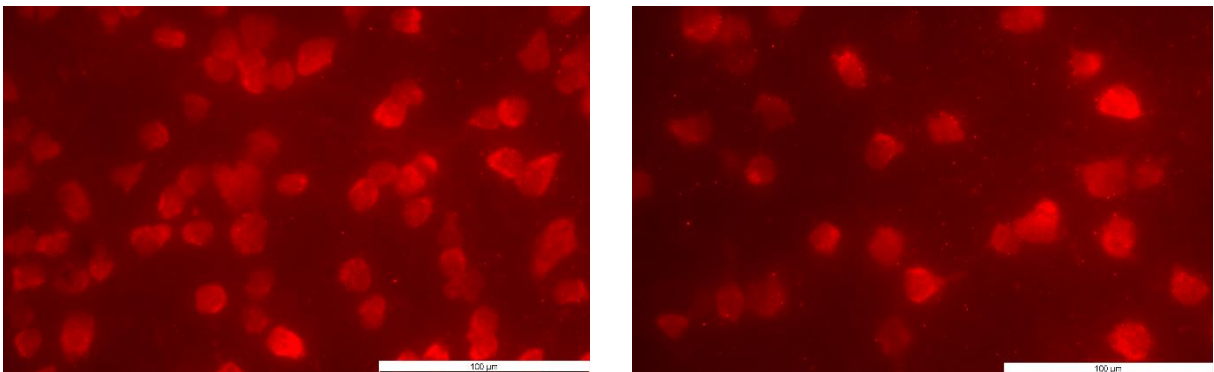
Eksperimentinės grupės	RBPMS-pozityvių ląstelių vidurkis (ląst./mm² ± SEM*)	p-reikšmė
Kontralateralinės akys	1687 ± 88.95	-
50 lazerio šūvių (n=5)	1538 ± 59.70	0.3064
100 lazerio šūvių (n=5)	1517 ± 69.78	0.2559
200 lazerio šūvių (n=5)	1475 ± 48.25	0.0700
400 lazerio šūvių (n=5)	1179 ± 59.48	<0.0001

*SEM - standartinė vidurkio paklaida (angl. *standard error of mean*)



3.6 pav. RBPMS-pozityvių ląstelių vidurkis, po 50, 100, 200 ir 400 lazerio šūvių į žiurkių episklerines venas, atliktų 0-linę ir 7-tą eksperimento dieną, palygintas su kontralateralinėmis žiurkių akimis.

Be to, nors yra pastebimas RBPMS-pozityvių ląstelių skaičiaus sumažėjimas po fotokoaguliacijos lazeriu atlikus 200 lazerio šūvių (1475 ± 48.25) ląst./mm², tačiau šis ląstelių sumažėjimas nepasiekė statistiškai reikšmingo pokyčio, lyginant su kontralateralinėmis žiurkių akimis ($p=0.0700$). Žiurkės lazeruotos 400 kartų į episklerines venas, pasižymėjo statistiškai reikšmingu **25 %** RGC sumažėjimu lyginant su kontralateralinėmis akimis (400 lazerio šūvių akys [1179 ląst./mm² \pm 59.48 ląst./mm²] prieš kontralateralines akis [1687 ląst./mm² \pm 88.95 ląst./mm²], **$p<0.0001$**) (žr. 3.6 ir 3.7 paveikslus).



3.7 pav. *Triušio RBPMS antikūniais žymėtos žiurkių tinklainių ganglinės ląstelės. A – kontralateralinės akies RGC; B – žiurkės, lazeruotos 400 kartų į episklerines venas, tinklainės ganglinės ląstelės.*

3.3. Karbomero ir lazerio indukuotų aukšto akispūdžio modelių veiksmingumo nustatymas gydant timololiu

Nustačius efektyvią karbomero koncentraciją ir efektyvų lazerių šūvių skaičių, buvo atliktas karbomero ir lazerio indukuotų aukšto akispūdžio modelių veiksmingumo nustatymas, gydant timololiu. Šio eksperimento metu, 24 *Long Evans* žiurkės buvo suskirstytos į keturias grupes:

Pirmos grupės žiurkėms į priekinę kamerą buvo suleistas 0,3% koncentracijos karbomero tirpalas. Trys dienos prieš injekciją žiurkėms buvo pradėtas gydymas timololiu (n=6).

Antros grupės žiurkėms į priekinę kamerą buvo suleistas 0,3% koncentracijos karbomero tirpalas. Trys dienos prieš injekciją žiurkėms buvo pradėtas gydymas drėkinamuoju akių geliu Systane Ultra (neigiama kontrolė) (n=6).

Trečios grupės žiurkių episklerinės venos buvo fotokoaguliuojamos 400 kartų. Trys dienos prieš injekciją žiurkėms buvo pradėtas gydymas timololiu (n=6).

Ketvirtos grupės žiurkių episklerinės venos buvo fotokoaguliuojamos 400 kartų. Trys dienos prieš injekciją žiurkėms buvo pradėtas gydymas drėkinamaisiais akių geliu Systane Ultra (neigiama kontrolė) (n=6).

Šio eksperimento metu gautos vidutinės žiurkių IOP ir RGC vertės buvo lyginamos su kontralateralinėmis (kairiosiomis) akimis, kurioms nebuvo atlikta jokio procedūra.

3.3.1. Akispūdžio kitimas

3.3.1.1. Akispūdžio kitimas karbomero indukuoto aukšto akispūdžio modelyje, gydant timololiu

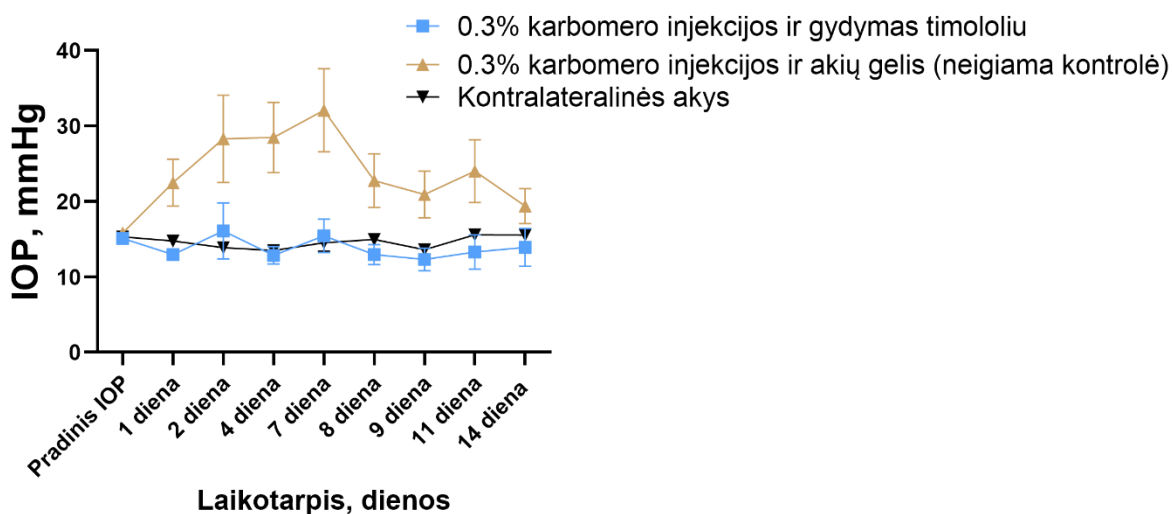
Trečiojo eksperimento duomenų analizė (žr. 3.5 lentelę) parodė, jog gydymas timololiu, karbomero indukuoto aukšto akispūdžio modelyje, buvo sėkmingas. Žiurkių, gydytų timololiu, IOP vidutinė vertė (13.88 ± 0.44) mmHg ir pikas (16.10 ± 0.44) mmHg statistiškai reikšmingai nesiskyrė nuo kontralateralinių akių akispūdžio (14.63 ± 0.26) mmHg ir piko (15.57 ± 0.26) mmHg ($p=0.8254$). O žiurkės gydytos akių geliu turėjo statistiškai reikšmingą IOP padidėjimą lyginat su kontralateralinėmis akimis (akių geliu gydytos akys [$23.81 \text{ mmHg} \pm 1.68 \text{ mmHg}$] prieš kontralateralines akis [$14.63 \text{ mmHg} \pm 0.26 \text{ mmHg}$], $p<0.0001$).

3.5 lentelė. Akispūdžio vidurkiai ir pikai po 0.3% karbomero injekcijų su timololio gydymu ir akių geliu (neigiama kontrolė), palyginti su kontralateralinėmis žiurkių akimis.

Eksperimentinės grupės	Visų eksperimento dienų IOP vidurkis (mmHg ± SEM*)	IOP pikas (mmHg ± SEM*)	p-reikšmė
Kontralateralinės akys	14.63 ± 0.26	15.57 ± 0.26	-
0.3% karbomero injekcijos ir gydymas timololiu (n=6)	13.88 ± 0.44	16.10 ± 0.44	0.8254
0.3% karbomero injekcijos ir akių gelis (neigiama kontrolė) (n=6)	23.81 ± 1.68	32.10 ± 1.68	<0.0001

*SEM - standartinė vidurkio paklaida (angl. *standard error of mean*)

Kaip ir matyti žemiau pateiktame grafike (žr. 3.9 paveikslą), žiurkių gavusių akių gelį (neigiama kontrolė), IOP padidėjo jau pirmąją eksperimento dieną iki 22,5 mmHg ± 1.38 mmHg ir toliau palaipsniui didėjo kol pasiekė piką (32.10 ± 1.68) mmHg, septintą eksperimento dieną. Vėliau akispūdis pradėjo žemėti, kol galiausiai 14-tą eksperimento dieną tarp žiurkių kontralateralinių ir dešinių akių reikšmingo skirtumo nebebuvo (p=0.6054).



3.9 pav. Vidutinio akispūdžio pokyčiai 2 savaitių laikotarpyje, po 0.3% karbomero injekcijų su timololio gydymu ir akių geliu (neigiama kontrolė), palyginti su kontralateralinėmis žiurkių akimis.

3.3.1.2. Akispūdžio kitimas lazerio indukuoto aukšto akispūdžio modelyje, gydant timololiu

Gydymas timololiu, lazeruotų žiurkių akispūdžiui reikšmės neturėjo (žr. 3.6 lentelę). Žiurkių, gydytų timololiu, IOP vidutinė vertė (27.26 ± 1.91) mmHg ir pikas (29.52 ± 1.91) mmHg buvo statistiškai reikšmingai didesni, nei kontralateralinių akių akispūdis (14.81 ± 0.26) mmHg ir pikas (15.72 ± 0.26) mmHg (p<0.05). Taip pat, neigiamos kontrolės žiurkių akispūdis

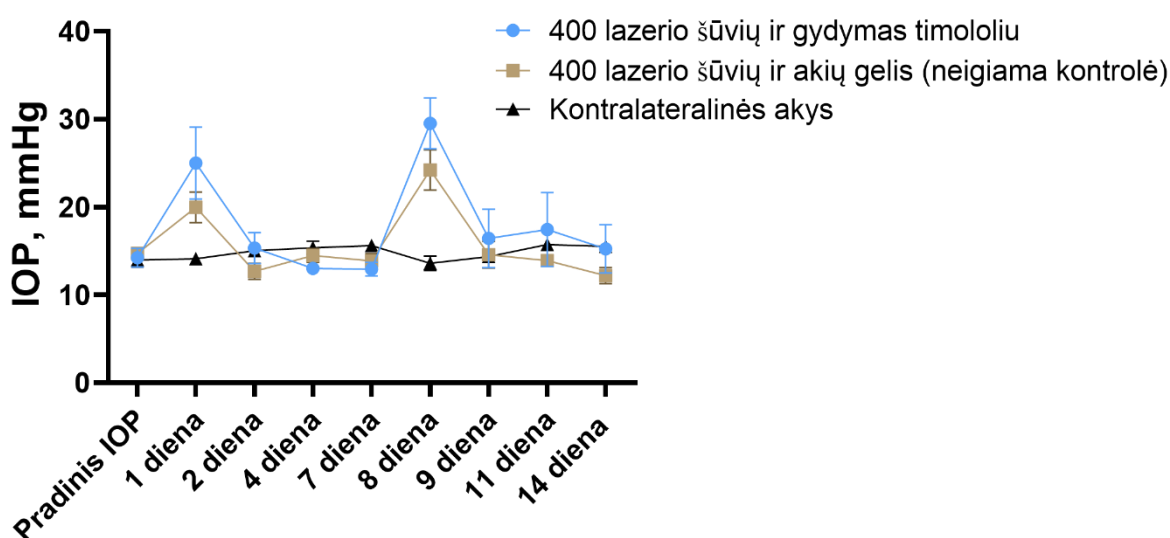
(22.08 ± 1.30) mmHg ir pikas (24.20 ± 1.30) mmHg. buvo statistiškai reikšmingai didesnis, nei kontralateralinių akių ($p < 0.05$).

3.6 lentelė. Akispūdžio vidurkiai ir pikai po 400 lazerio šūvių į žiurkių episklerines venas su timololio gydymu ir akių geliu (neigiama kontrolė), palyginti su kontralateralinėmis žiurkių akimis.

Eksperimentinės grupės	Visų eksperimento dienų IOP vidurkis (mmHg \pm SEM*)	IOP pikas (mmHg \pm SEM*)	p-reikšmė
Kontralateralinės akys	14.81 ± 0.26	15.72 ± 0.26	-
400 lazerio šūvių ir gydymas timololiu (n=6)	27.26 ± 1.91	29.52 ± 1.91	<0.05
400 lazerio šūvių ir akių gelis (neigiama kontrolė) (n=6)	22.08 ± 1.30	24.20 ± 1.30	<0.05

*SEM - standartinė vidurkio paklaida (angl. *standard error of mean*)

Iš pateikto grafiko (žr. 3.10 paveikslą) matyti, jog žurkių gydytų timololiu, praėjus vienai dienai po pirmosios fotokoaguliacijos lazeriu procedūros, IOP padidėjo iki $25.08 \text{ mmHg} \pm 2.16 \text{ mmHg}$, o po antrosios procedūros akispūdis pakilo iki $29.52 \text{ mmHg} \pm 1.91 \text{ mmHg}$ ir statistiškai nesiskyrė nuo akių geliu gydytų žiurkių (pirmos dienos IOP buvo $20.0 \pm 0.32 \text{ mmHg}$; aštuntos dienos IOP - $24.20 \pm 1.30 \text{ mmHg}$). Paskutinę eksperimento dieną (14-tą dieną) timololiu gydytų žiurkių, vidutinė akispūdžio vertė ($15,24 \pm 0.58$) mmHg buvo panaši į kontralateralinių akių IOP ($15,18 \pm 0.20$) mmHg.



3.10 pav. Vidutinio akispūdžio pokyčiai 2 savaitių laikotarpyje, po 400 lazerio šūvių į žiurkių episklerines venas su timololio gydymu ir akių geliu (neigiama kontrolė), palyginti su kontralateralinėmis žiurkių akimis.

3.3.2. Tinklainės ganglinių ląstelių išgyvenamumas

3.3.2.1. Tinklainės ganglinių ląstelių išgyvenamumas, karbomero indukuoto aukšto akispūdžio modelyje, gydant timololiu

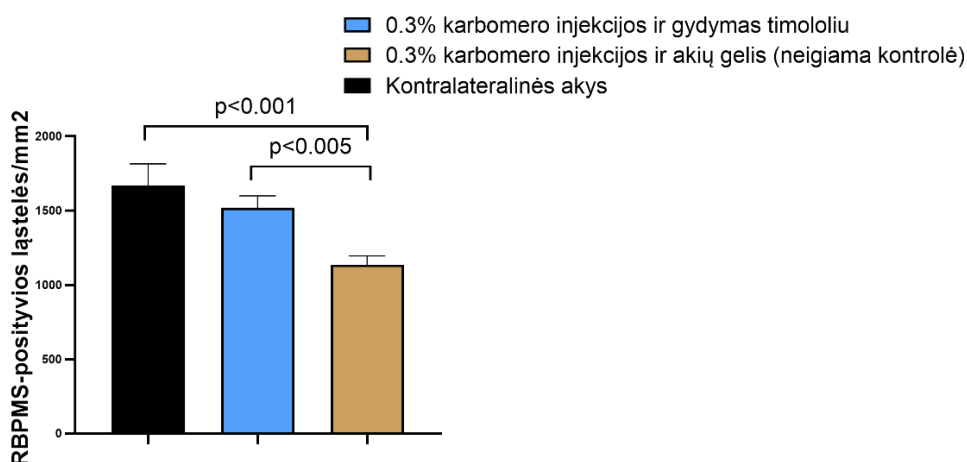
Atliekant tinklainės ganglinių ląstelių išgyvenamumo analizę (žr. 3.7 lentelę), buvo pastebėta, jog timololiu gydytų žiurkių RGC skaičius nesiskyrė nuo kontralateralinių akių (timololiu gydytos akys [$1519 \text{ ląst/mm}^2 \pm 81.46 \text{ ląst/mm}^2$] prieš kontralateralines akis [$1667 \text{ ląst/mm}^2 \pm 148.2 \text{ ląst/mm}^2$], $p=0.4523$).

3.7 lentelė. RBPMS-pozityvių ląstelių vidurkis po 0.3% karbomero injekcijų į priekinę kamerą, su timololio gydymu ir akių geliu (neigiama kontrolė), palygintas su kontralateralinėmis žiurkių akimis.

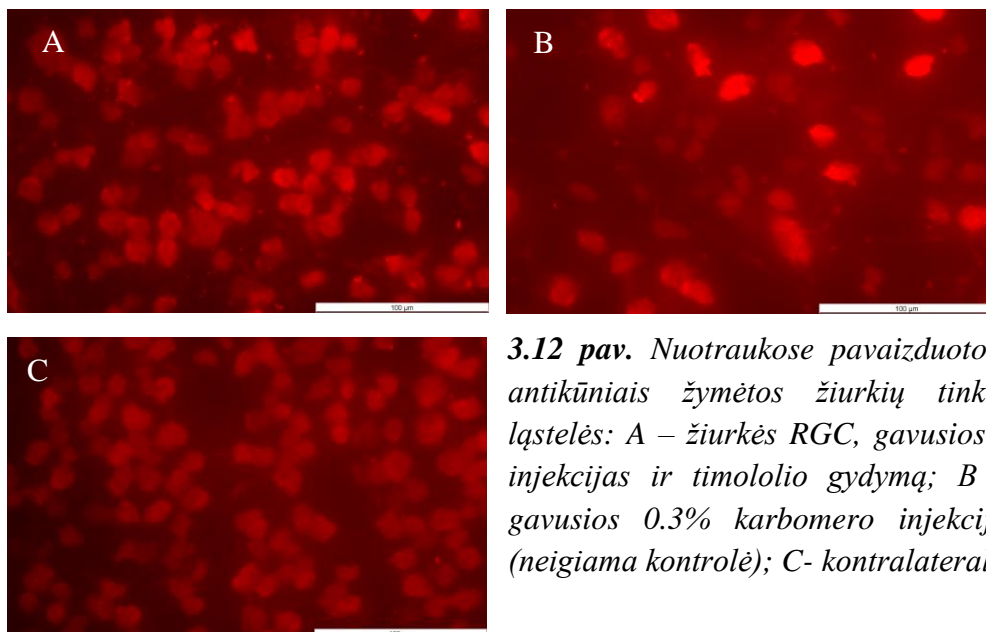
Eksperimentinės grupės	RBPMS-pozityvių ląstelių vidurkis ($\text{ląst/mm}^2 \pm \text{SEM}^*$)	p-reikšmė
Kontralateralinės akys	1667 ± 148.2	-
0.3% karbomero injekcijos ir gydymas timololiu (n=7)	1519 ± 81.46	0.4523
0.3% karbomero injekcijos ir akių gelis (neigiama kontrolė) (n=6)	1134 ± 60.76	<0.001

*SEM - standartinė vidurkio paklaida (angl. *standard error of mean*)

Žiurkės gydytos akių geliu turėjo statistiškai reikšmingą **35%** RGC sumažėjimą lyginat su kontralateralinėmis akimis (akių geliu gydytos akys [$1134 \text{ ląst/mm}^2 \pm 60.76 \text{ ląst/mm}^2$] prieš kontralateralines akis [$1667 \text{ ląst/mm}^2 \pm 148.2 \text{ ląst/mm}^2$], $p<0,001$). Timololiu gydytų akių RGC skaičius buvo reikšmingai didesnis nei akių geliu gydytų akių ($p<0.005$) (žr. 3.11 ir 3.2 paveikslus).



3.11 pav. Grafike pavaizduotas RBPMS-pozityvių ląstelių vidurkis, po 0.3% karbomero injekcijų į priekinę kamerą, su timololio gydymu ir akių geliu (neigiama kontrolė), palygintas su kontralateralinėmis žiurkių akimis.



3.12 pav. Nuotraukose pavaizduotos triušio RBPMS antikūniais žymėtos žiurkių tinklainių ganglinės ląstelės: A – žiurkės RGC, gavusios 0.3% karbomero injekcijas ir timololio gydymą; B – žiurkės RGC, gavusios 0.3% karbomero injekcijas ir akių gelį (neigiama kontrolė); C- kontralateralinės akies RGC.

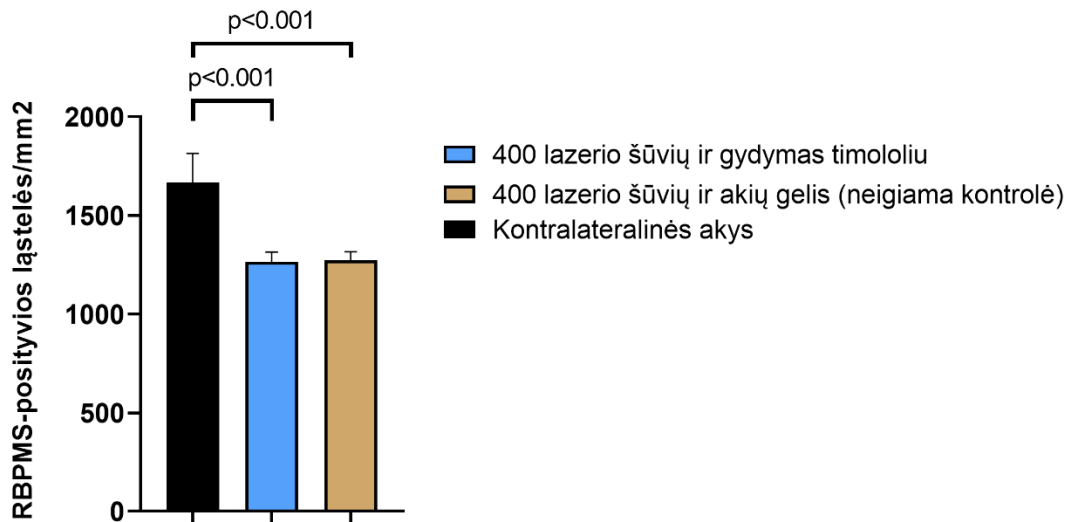
3.3.2.2. Tinklainės ganglinių ląstelių išgyvenamumas lazerio indukuoto aukšto akispūdžio modelyje, gydant timololiu

3.8 lentelė. RBPMS-pozityvių ląstelių vidurkis po 400 lazerio šūvių į žiurkių episklerines venas, su timololio gydymu ir akių geliu (neigiama kontrolė), palygintas su kontralateralinėmis žiurkių akimis

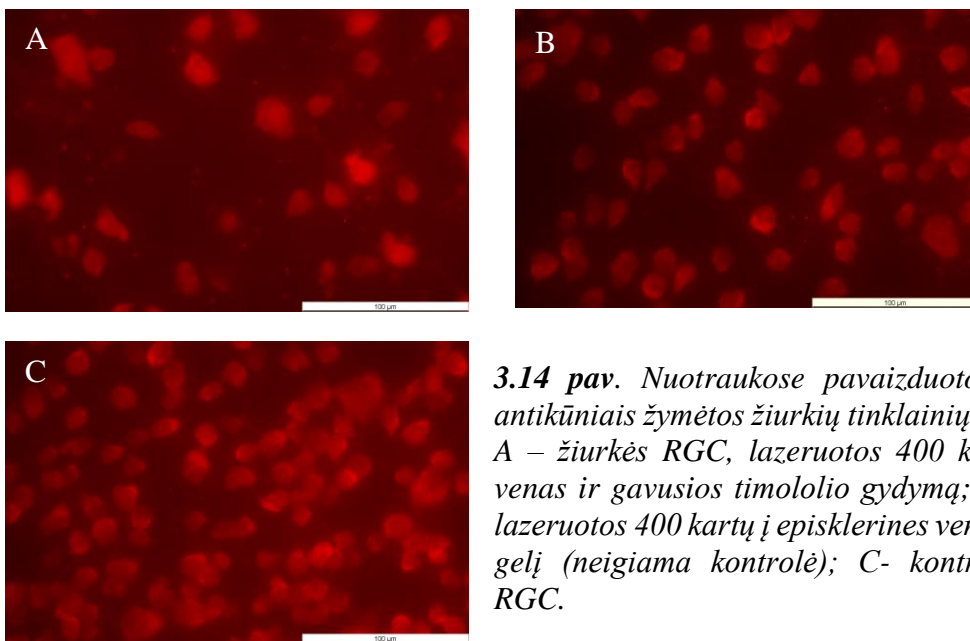
Eksperimentinės grupės	RBPMS-pozityvių ląstelių vidurkis (ląst./mm² ± SEM*)	p-reikšmė
Kontralateralinės akys	1667 ± 148.2	-
400 lazerio šūvių ir gydymas timololiu (n=5)	1264 ± 49.97	<0.001
400 lazerio šūvių ir akių gelis (neigiama kontrolė) (n=6)	1272 ± 44.35	<0.001

*SEM - standartinė vidurkio paklaida (angl. *standard error of mean*)

Iš pateiktų rezultatų (žr. 3.8 lentelę; 3.13 ir 3.14 paveikslus) matyti, jog timololiu ir akių geliu gydytos grupės RBPMS-pozityvių ląstelių skaičius buvo **25 %** mažesnis (1264 ląst/mm² ± 49.97 ląst/mm² ir 1272 ląst/mm² ± 44.35 ląst/mm², atitinkamai), nei kontralateralinių akių (1667 ląst./mm² ± 148.2 ląst./mm²) (**p<0.001**).



3.13 pav. RBPMS-pozityvių ląstelių vidurkis, po 400 lazerio šūvių į žiurkių episklerines venas, su timololio gydymu ir akių geliu (neigiama kontrolė), palygintas su kontralateralinėmis žiurkių akimis.



3.14 pav. Nuotraukose pavaizduotos triušio RBPMS antikūniais žymėtos žiurkių tinklainių ganglinės ląstelės: A – žiurkės RGC, lazeruotos 400 kartų į episklerines venas ir gavusios timololio gydymą; B – žiurkės RGC, lazeruotos 400 kartų į episklerines venas ir gavusios akių gelį (neigiama kontrolė); C- kontralateralinės akies RGC.

3.4. Lazerio ir karbomero indukuotų aukšto akispūdžio modelių palyginimas *Long Evans* žiurkėse

Siekiant palyginti lazerio ir karbomero indukuotų aukšto akispūdžio modelius *Long Evans* žiurkėse, buvo naudoti trečio eksperimento rezultatai, atsižvelgiant į tai, jog šio tyrimo metu abiem aukšto akispūdžio modeliams indukuoti buvo naudojamos tokio pačio amžiaus žiurkės ir abu modeliai buvo indukuoti tuo pačiu laikotarpiu. Šio eksperimento metu gautos vidutinės žiurkių IOP ir RGC vertės buvo lyginamos su kontralateralinėmis (kairiosiomis) akimis, kurioms nebuvo atlikta jokio procedūra.

3.4.1 Akispūdžio kitimas

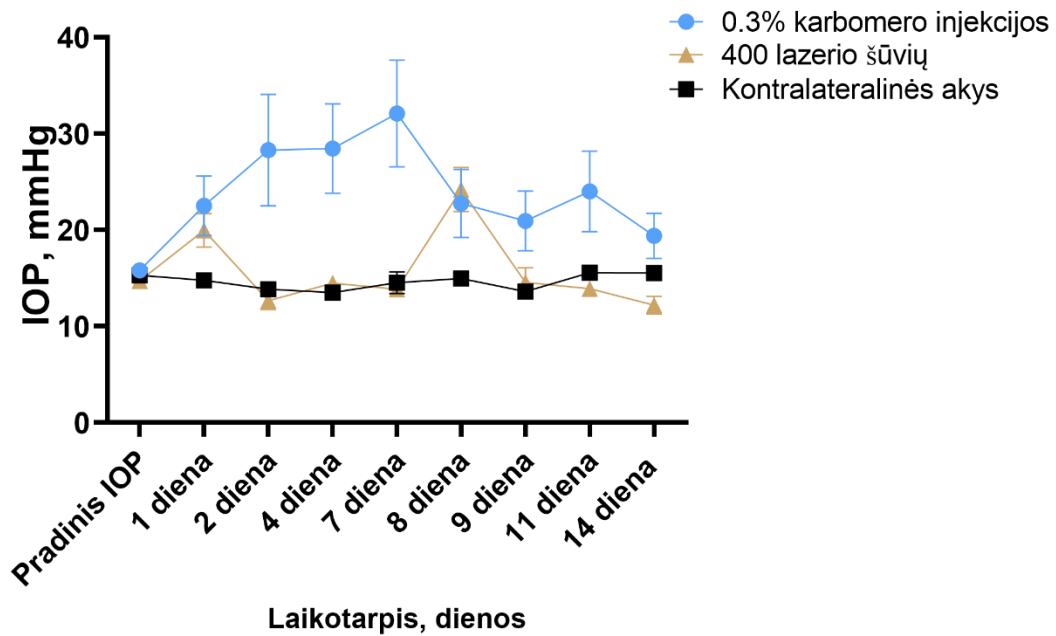
Iš 3.9 lentelėje pateiktų rezultatų matyti, jog abu modeliai buvo sėkmingi, siekiant padidinti žiurkių akispūdį. Žiurkių, gavusių 0.3% karbomero injekcijas į priekinę kamerą (23.81 ± 1.68) mmHg ir žiurkių, lazeruotų 400 kartų (22.08 ± 1.30) mmHg, akispūdžiai buvo statistiškai reikšmingai didesni nei kontralateralinių akių ($p < 0.0001$ ir $p < 0.05$, atitinkamai).

3.9 lentelė. Akispūdžio vidurkiai ir pikai po 0.3% karbomero injekcijų ir po 400 lazerio šūvių, palyginti su kontralateralinėmis žiurkių akimis.

Eksperimentinės grupės	IOP vidurkis (mmHg \pm SEM*)	IOP pikas (mmHg \pm SEM*)	p-reikšmė
Kontralateralinės akys	14.63 \pm 0.26	15.57 \pm 0.26	-
0.3% karbomero injekcijos (n=6)	23.81 \pm 1.68	32.10 \pm 1.68	<0.0001
400 lazerio šūvių (n=6)	22.08 \pm 1.30	24.20 \pm 1.30	<0.05

*SEM - standartinė vidurkio paklaida (angl. *standard error of mean*)

Vis dėl to, išsamiau lyginant aukšto akispūdžio modelius, pastebima, jog karbomero indukuotas modelis buvo efektyvesnis, nes žiurkės pasižymėjo aukštesniu akispūdžiu, nei žiurkės lazerio indukuotame aukšto akispūdžio modelyje. Po 0.3% karbomero injekcijų, žiurkių IOP pikas siekė 32.10 mmHg \pm 1.68 mmHg, o po 400 lazerio šūvių, akispūdžio pikas buvo apie 24.20 mmHg \pm 1.30 mmHg.



3.15 pav. Vidutinio akispūdžio pokyčiai 2 savaičių laikotarpyje, po 0.3% karbomero injekcijų ir po 400 lazerio šūvių, palyginti su kontralateralinėmis žiurkių akimis.

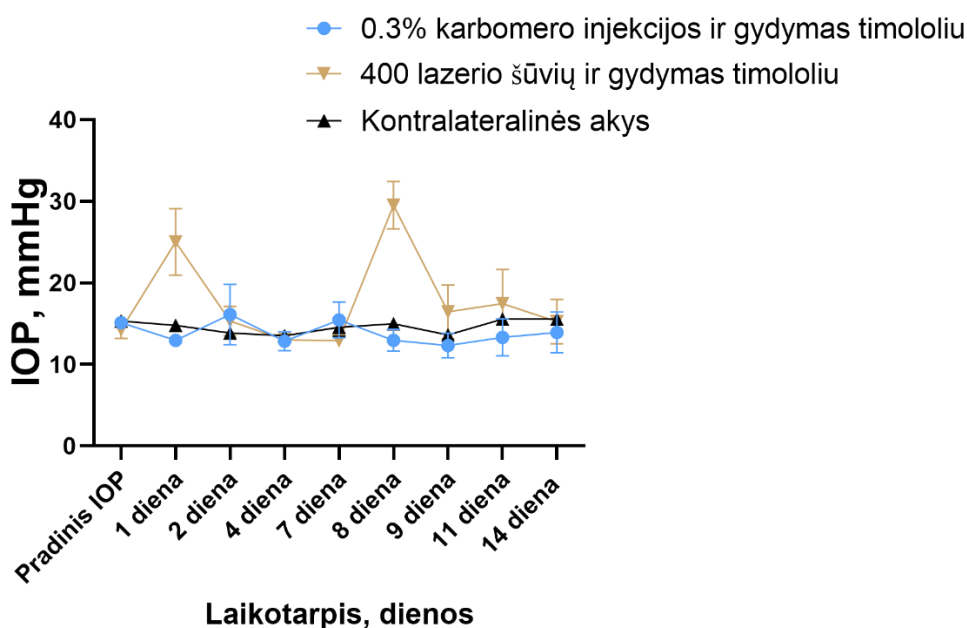
Be to, iš 3.15 paveiksle pateikto grafiko matyti, jog žiurkių akispūdis po 0.3% karbomero injekcijos, palapsniui didėjo, kol pasiekė piką (32.10 ± 1.68) mmHg, ir vėliau IOP palapsniui žemėjo, kol eksperimento pabaigoje pasiekė panašų lygį, kaip kontrolinės žiurkių akys. Žiurkėms, atlikus 400 lazerio šūvių į episklerines venas, pastebimi akispūdžio svyravimai: po pirmosios procedūros IOP padidėja iki $20.0 \text{ mmHg} \pm 0.32 \text{ mmHg}$ ir nukrenta iki $12.7 \text{ mmHg} \pm 0.21 \text{ mmHg}$, praėjus dviem dienom po lazeravimo. Vėliau, po antrosios fotokoaguliacijos lazeriu procedūros žiurkių akispūdis padidėja iki $24.20 \text{ mmHg} \pm 1.30 \text{ mmHg}$ ir vėl nukrenta iki $14.5 \text{ mmHg} \pm 2.10 \text{ mmHg}$, 9-tą eksperimento dieną. Taip pat, karbomero indukuotame aukšto akispūdžio modelyje reikėjo tik vienos 0.3% karbomero injekcijos į dešinės akies priekinę kamerą, norit palaikyti pakilusį žiurkių akispūdį iki eksperimento pabaigos, o, lazerio fotokoaguliacijos metu prireikė dviejų procedūrų (0 ir 7 eksperimento dienomis).

3.10 lentelė. Akispūdžio vidurkiai ir pikai po 0.3% karbomero injekcijų ir po 400 lazerio šūvių, su timololio gydymu, palyginti su kontralateralinėmis žiurkių akimis.

Eksperimentinės grupės	IOP vidurkis (mmHg ± SEM*)	IOP pikas (mmHg ± SEM*)	p-reikšmė
Kontralateralinės akys	14.81 ± 0.26	15.72 ± 0.26	-
0.3% karbomero injekcijos ir gydymas timololiu (n=7)	13.88 ± 0.44	16.10 ± 0.44	0.8254
400 lazerio šūvių ir gydymas timololiu (n=5)	27.26 ± 1.91	29.52 ± 1.91	<0.05

*SEM - standartinė vidurkio paklaida (angl. *standard error of mean*)

Gydymas timololiu buvo veiksmingas tik karbomero sukeltame akšto akispūdžio modelyje. Akispūdis buvo ženkliai mažesnis ir nesiskyrė nuo kontralateralinių akių (0.3 % karbomero injekcijas ir gydymą timololiu gavusios akys [13.88 mmHg ± 0.44 mmHg] prieš kontralateralines akis [14.81 mmHg ± 0.26], p=0.8254). Lazerio indukuoto aukšto akispūdžio modelyje timololis neturėjo jokio efekto (400 kartų lazeruotos ir gydymą timololiu gavusios akys [27.26 mmHg ± 1.91 mmHg] prieš kontralateralines akis [14.81 mmHg ± 0.26], p<0.05). (žr. 3.10 lentelę ir 3.16 paveikslą).



3.16 pav. Vidutinio akispūdžio pokyčiai 2 savaičių laikotarpyje, po 400 lazerio šūvių ir po 0.3% karbomero injekcijų, su timololio gydymu, palyginti su kontralateralinėmis žiurkių akimis.

3.4.2. Tinklainės ganglinių ląstelių išgyvenamumas

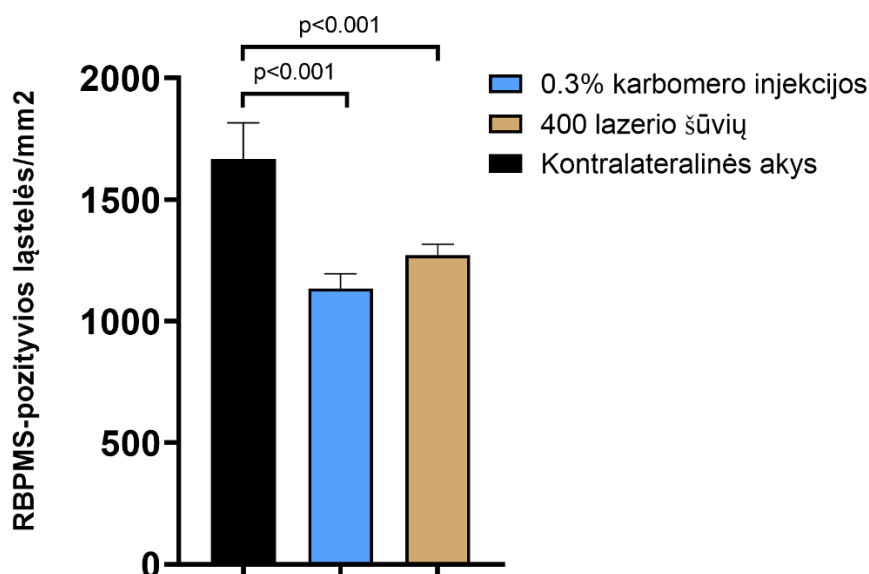
Žvelgiant į rezultatus pateiktus 3.11 lentelėje, matyti, jog abu aukšto akispūdžio modeliai sėkmingai sumažino tinklainės ganglinių ląstelių skaičių. RBPMS-pozityvių ląstelių skaičius, indukavus karbomero aukšto akispūdžio modelį ($1134 \text{ ląst./mm}^2 \pm 60.76 \text{ ląst./mm}^2$) ir lazerio aukšto akispūdžio modelį (1272 ± 44.35) ląst./mm², buvo statistiškai reikšmingai mažesnis, lyginant su kontralateralinėmis žiurkių akimis ($p < 0.001$).

3.11 lentelė. RBPMS-pozityvių ląstelių vidurkis po 0.3% karbomero injekcijų ir po 400 lazerio šūvių, palygintas su kontralateralinėmis žiurkių akimis.

Eksperimentinės grupės	RBPMS-pozityvių ląstelių vidurkis (ląst./mm ² ± SEM*)	p-reikšmė
Kontralateralinės akys	1667 ± 148.2	-
0.3% karbomero injekcijos (n=6)	1134 ± 60.76	<0.001
400 lazerio šūvių (n=6)	1272 ± 44.35	<0.001

*SEM - standartinė vidurkio paklaida (angl. *standard error of mean*)

Įdėmiau palyginamus šiuos modelius (žr. 3.17 paveikslėlį) pastebimas nedidelis skirtumas: po 0.3% karbomero injekcijų, RGC skaičius sumažėja maždaug 35 %, o po 400 lazerio šūvių, RBPMS-pozityvių ląstelių skaičius sumažėja apie 25 % ($p < 0.001$).



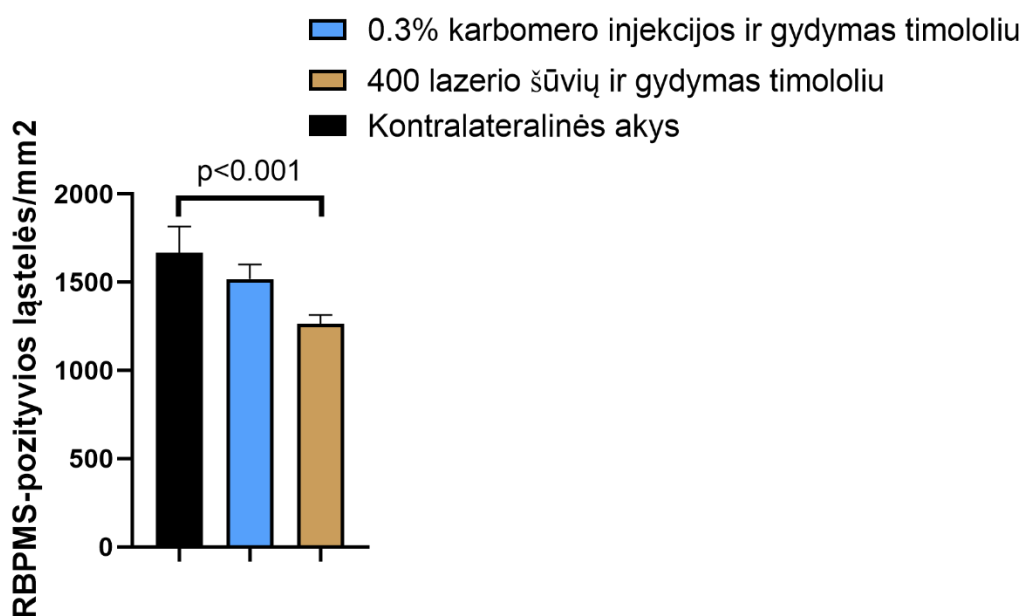
3.17 pav. Grafike pavaizduotas RBPMS-pozityvių ląstelių vidurkis, po 400 lazerio šūvių į žiurkių episklerines venas, su timololio ir akių gelio (neigiama kontrolė) gydymu, palygintas su kontralateralinėmis žiurkių akimis.

Karbomero indukuotame aukšto akispūdžio modelyje gydant timololiu RGC skaičius buvo ženkliai mažesnis ir nesiskyrė nuo kontralateralinių akių (0.3 % karbomero injekcijas ir gydymą timololiu gavusios akys [$1519 \text{ ląst/mm}^2 \pm 81.46 \text{ ląst/mm}^2$] prieš kontralateralines akis [$1667 \text{ ląst/mm}^2 \pm 148.2 \text{ ląst/mm}^2$], $p=0.4523$). Lazerio indukuoto aukšto akispūdžio modelyje timololis neturėjo jokio efekto (400 kartų lazeruotos ir gydymą timololiu gavusios akys [$1264 \text{ ląst/mm}^2 \pm 49.97 \text{ ląst/mm}^2$] prieš kontralateralines akis [$1667 \text{ ląst/mm}^2 \pm 148.2 \text{ ląst/mm}^2$], $p<0.001$) (žr. 3.12 lentelę ir 3.18 paveikslą).

3.12 lentelė. RBPMS-pozityvių ląstelių vidurkis po 0.3% karbomero injekcijų ir po 400 lazerio šūvių, ir timololio gydymu, palygintas su kontralateralinėmis žiurkių akimis

Eksperimentinės grupės	RBPMS-pozityvių ląstelių vidurkis (ląst/mm^2) \pm SEM*)	p-reiškė
Kontralateralinės akys	1667 ± 148.2	-
0.3% karbomero injekcijos ir gydymas timololiu (n=7)	1519 ± 81.46	0.4523
400 lazerio šūvių ir gydymas timololiu (n=5)	1264 ± 49.97	<0.001

*SEM - standartinė vidurkio paklaida (angl. *standard error of mean*)



3.18 pav. Grafike pavaizduotas RBPMS-pozityvių ląstelių vidurkis, po 0.3% karbomero injekcijų ir po 400 lazerio šūvių, su timololio gydymu, palygintas su kontralateralinėmis žiurkių akimis.

3.5. Rezultatų aptarimas

Kiek yra žinoma, tai yra pirmasis tyrimas, kuriame buvo lyginami lazerio ir karbomero indukuoti aukšto akispūdžio modeliai. Visų pirma, atsižvelgiant į tai, jog ankstesnių tyrimų metu (X. W. Lei ir kt., 2009; Y. Xu ir kt., 2002; H. G. Kim ir kt., 2013) 0.3% koncentracijos karbomero injekcijos sąlygojo ragenos drumstumą ir tai užkirto kelią fundoskopiniam ir funkciniam regos nervo ir tinklainės pažeidimo stebėjimui, šiame darbe pirmo eksperimento metu buvo siekiama nustatyti efektyvią karbomero koncentraciją, kuri padidintų akispūdį ir sumažintų tinklainės ganglinių ląstelių skaičių, tačiau nesukeltų ragenos drumstumo. Eksperimento metu buvo atliekamos 0.1% ir 0.3% koncentracijos karbomero ir fiziologinio tirpalo (neigiama kontrolė) injekcijos (20 μ l) į žiurkių priekines kameras. Tyrimo rezultatai, parodė, jog 0.1% koncentracijos karbomero injekcijos nebuvo pakankamai veiksmingos padidinti žiurkių IOP ir sumažinti RGC skaičių. Tačiau, po 0.3% koncentracijos karbomero injekcijų žiurkių akispūdžio vidutinė vertė padidėjo iki $21.45 \text{ mmHg} \pm 2.37 \text{ mmHg}$, o pikas 8-tąją eksperimento dieną siekė $32.43 \text{ mmHg} \pm 2.37 \text{ mmHg}$. Tinklainės ganglinių ląstelių skaičius po 0.3% koncentracijos karbomero injekcijų, sumažėjo 35 %. Gauti rezultatai yra panašūs į Kim ir kitų, 2013 atlikto tyrimo rezultatus, kur po 0.3% koncentracijos karbomero injekcijų, žiurkių vidutinis IOP buvo apie $36.90 \text{ mmHg} \pm 6.21 \text{ mmHg}$ ir IOP pikas siekė $40.41 \pm 10.52 \text{ mmHg}$, o tinklainės ganglinės ląstelės, tyrimo metu, sumažėjo 38 %, praėjus 8 savaitėms po pirmosios injekcijos. Be to, šio darbo pirmojo eksperimento metu, kaip ir kitų autorių (X. W. Lei ir kt., 2009; Y. Xu ir kt., 2002; H. G. Kim ir kt., 2013) tyrimuose buvo pastebėtas žiurkių ragenos drumstumas, kuris užkirto kelią fundoskopiniam ir funkciniam regos nervo ir tinklainės pažeidimo stebėjimui. Vienintėlis skirtumas tarp kitų autorių ir mūsų atlikto tyrimo buvo padidėjusio akispūdžio išsilaikymas. Kim ir kitų, 2013 atliktame tyrime aukštas IOP išsilaikė apie 6 savaites, o mūsų tyrime žiurkių akispūdis nukrito iki paradinio lygio praėjus 2 savaitėms po pirmosios injekcijos. Tačiau šį skirtumą paaiškina tyrimo metu atliktų injekcijų skaičius. Kim ir kitų, 2013 tyrimo metu injekcijos žiurkėms buvo atliktos du kartus (tyrimo pradžioje ir praėjus dviem savaitėms po pirmosios injekcijos) siekiant ilgiau išlaikyti pakilusį IOP, o mūsų tyrimo metu buvo atlikta tik viena injekcija, tyrimo pradžioje. Be to, nors Kim ir kitų, 2013 tyrime buvo naudojama pakartotinė injekcija ir IOP buvo išlaikomas net 6 savaites, tačiau ganglinių ląstelių sumažėjimas buvo panašus kaip ir mūsų tyrime.

Atsižvelgiant į tai, jog skirtingi autoriai (E. WoldeMussie ir kt., 2001; W. Hare ir kt., 2001; K. Chiu ir kt. 2007) atlikdami episklerinių venų fotokoaguliaciją lazeriu, pasirenka skirtingą lazerio šūvių skaičių, šio darbo antrojo eksperimento metu buvo siekiama nustatyti efektyvų lazerio šūvių skaičių, kuris padidintų akispūdį ir sumažintų tinklainės ganglinių

ląstelių skaičių *Long Evans* žiurkėse. Tyrimo metu buvo atlikta 50, 100, 200 arba 400 lazerio šūvių į episklerines venas, 0-linę ir 7-tą eksperimento dienomis. Atlikus rezultatų analizę, buvo nustatyta, jog 50, 100 ar 200 lazerio šūvių skaičius į episklerines venas nebuvo pakankamas, siekiant padidinti žiurkių IOP ir sumažinti RGC skaičių. O žiurkių, lazeruotų 400 kartų į episklerines venas vidutinė akispūdžio vertė padidėjo iki $23.53 \text{ mmHg} \pm 1.32 \text{ mmHg}$ ir IOP pikas siekė $24.85 \text{ mmHg} \pm 1.59 \text{ mmHg}$. Tinklainės ganglinių ląstelių skaičius sumažėjo apie 25 %. Gauti rezultatai yra panašūs į kitų autorių rezultatus tuo, jog atlikus dvi fotokoaguliacijos lazeriu procedūras, yra pastebimas žiurkių akispūdžio padidėjimas ir tinklainės ganglinių ląstelių skaičiaus sumažėjimas. Vis dėl to, nustatytas efektyvus lazerio šūvių skaičius - 400, su kitais tyrimais nesutampa. Tačiau, šis neatitikimas gali būti paaiškintas tyrimuose naudota skirtinga lazerio šūvių galia bei trukme. WoldeMussie ir kitų, 2001 atliktame tyrime padidėjo žiurkių IOP ($25.0 \text{ mmHg} \pm 0.4 \text{ mmHg}$) ir sumažėjo RGC skaičius (44%), naudojant tik 130–150 šūvių į episklerines venas, tačiau tyrimo metu naudota lazerio šūvių galia siekė 1 vatą (W), o trukmė 0,2 sekundes, o mūsų tyrimo metu buvo naudota tik 500 milivatų (mW) lazerio šūvių galia, o trukmė 0,10 sekundes. Taip pat lazerio šūvių skaičiaus neatitikimą gali lemti ir skirtingos žiurkių linijos. Kadangi yra anatominių skirtumų tarp skirtingų žiurkių linijų, tai ir taikomas lazerio šūvių skaičius galimai reikalingas skirtingas. Nors autorių (Chiu ir kt., 2007; H. Levkovitch-Verbin ir kt., 2002) atliktuose tyrimuose buvo naudojama panaši lazerio šūvių galia ir trukmė, tačiau *Sprague Dawley* žiurkėms, užteko apie 75-80 lazerio šūvių, o *Wistar* žiurkėms reikėjo apie 100 šūvių, kad padidinti žiurkių IOP ir sumažinti RGC skaičių.

Taip pat, siekiant nustatyti lazerio ir karbomero indukuotų aukšto akispūdžio modelių veiksmingumą, šio darbo metu buvo atliktas trečiasis eksperimentas, kur žiurkėms buvo indukuoti aukšto akispūdžio modeliai ir paskirtas timololio gydymas. Tyrimo metu buvo tikimasi, jog gydymas timololiu sustabdys vandeninio humoralinio skysčio gamybą, o tai užkirs kelią akispūdžio padidėjimui ir tinklainės ganglinių ląstelių sumažėjimui. Tyrimo rezultatai parodė, jog gydymas timololiu, karbomero indukuoto aukšto akispūdžio modelyje, užkirto kelią IOP padidėjimui ir RGC sumažėjimui. Kiek žinoma, tai yra pirmasis tyrimas, kurio metu, buvo patikrintas timololio efektyvumas karbomero indukuoto aukšto akispūdžio modelyje. Tačiau, gydymas timololiu, lazerio indukuoto aukšto akispūdžio modelyje, reikšmės neturėjo. Žiurkių, lazeruotų 400 kartų į episklerines venas ir gydytų timololiu, IOP vidutinė vertė (27.26 ± 1.91) mmHg ir pikas (29.52 ± 1.91) mmHg buvo statistiškai reikšmingai didesni, nei kontralateralinių akių, o tinklainės ganglinių ląstelių skaičius sumažėjo 25 %. Šie gauti rezultatai nesutapo su literatūroje vyraujama nuomone, galimai dėl tyrimuose naudotų skirtingų žiurkių linijų. Seki ir kiti, 2005 atliktame tyrime, buvo rasta, jog timololis užkirto kelią žiurkių IOP padidėjimui ir RGC sumažėjimui, lazerio indukuotame aukšto akispūdžio modelyje su *Wistar* žiurkėmis.

Kadangi *Wistar* ir *Long Evans* žiurkės turi keletą struktūrinių ir funkcinių akių skirtumų, tai galbūt ir aukšto akispūdžio modelio veiksmingumui nustatyti turi būti naudojami skirtingi farmakologiniai medikamentai. Be to, vertėtų atkreipti dėmesį į tai, jog nors šio tyrimo metu gydymas timololiu neužkirto kelio žiurkių IOP padidėjimui ir RGC sumažėjimui, lazerio indukuotame aukšto akispūdžio modelyje, tai nereiškia, jog modelis neveiksmingas, ir šio modelio veiksmingumą vertėtų patikrinti kitais medikamentais, nukreiptais į neuroprotektinius tinklainės ganglinių ląstelių ir regos nervo mechanizmus.

Analizuojant lazerio ir karbomero indukuotus aukšto akispūdžio modelius, akivaizdu, jog abu modeliai buvo sėkmingi, siekiant padidinti žiurkių akispūdį ir sumažinti tinklainės ganglinių ląstelių skaičių. Vis dėl to, išsamiau lyginant aukšto akispūdžio modelius, pastebima, jog karbomero indukuotas modelis buvo efektyvesnis, nes žiurkės pasižymėjo aukštesniu akispūdžiu ($23.81 \text{ mmHg} \pm 1.68 \text{ mmHg}$), nei lazerio indukuotame aukšto akispūdžio modelyje ($22.08 \text{ mmHg} \pm 1.30 \text{ mmHg}$). Be to, karbomero indukuotame aukšto akispūdžio modelyje matomas kryptingas akispūdžio didėjimas iki piko (32.10 ± 1.68) mmHg ir tuomet kryptingas IOP mažėjimas. O lazerio indukuotame akispūdžio modelyje pastebimi akispūdžio svyravimai: IOP po pirmosios procedūros IOP padidėja iki $20.0 \text{ mmHg} \pm 0.32 \text{ mmHg}$ ir nukrenta iki $12,7 \text{ mmHg} \pm 0.21 \text{ mmHg}$ praėjus dviem dienom po lazeravimo. Vėliau, po antrosios fotokoaguliacijos lazeriu procedūros žiurkių akispūdis vėl padidėja iki $24.20 \text{ mmHg} \pm 1.30 \text{ mmHg}$ ir nukrenta iki $14,5 \text{ mmHg} \pm 2.10 \text{ mmHg}$, 9-tą eksperimento dieną. Tokia skirtinga IOP kitimo dinamika laike modeliuose gali būti paaiškinta skirtingais indukuotų modelių veikimo mechanizmais: karbomero indukuotame modelyje yra užkemšamas trabekulinis tinklas, kuris sukuria pagrindinį pasipriešinimą vandeniniam humoralinui skysčiui. O lazerio indukuotame modelyje yra uždeginamos episklerinės venos, kurios tokio svarbaus vaidmenio AH skysčio pasipriešime neatlieka. Taip pat, tinklainės ganglinių ląstelių skaičius sumažėjo labiau po 0.3% koncentracijos karbomero injekcijų (35 %), nei po 400 lazerio šūvių į episklerines venas (25 %). Šalia to, kaip ir minėta anksčiau, gydymas timololiu, karbomero indukuoto aukšto akispūdžio modelyje užkirto kelią IOP padidėjimui ir RGC sumažėjimui, o lazerio indukuoto aukšto akispūdžio modelyje, timololis reikšmės neturėjo. Taip pat, lyginant aukšto akispūdžio modelius, svarbu atkreipti dėmesį į tai, jog karbomero indukuotame aukšto akispūdžio modelyje reikėjo tik vienos 0.3% karbomero injekcijos į dešinės akies priekinę kamerą, norit padidinti IOP ir sumažinti tinklainės ganglinių ląstelių skaičių, o lazerio indukuotame aukšto akispūdžio modelyje prireikė dviejų procedūrų (0-linę ir 7-tą eksperimento dienomis). Be to, karbomero suleidimas į priekinę kamerą yra lengvesnis, pigesnis ir specialios įrangos nereikalaujantis metodas, ko nebūtų galima pasakyti apie episklerinių venų fotokoaguliaciją lazeriu. Nors iš pateiktos informacijos atrodo, jog karbomero indukuotas aukšto akispūdžio

modelis yra pranašesnis, tačiau šis modelis turi ir tam tikrų apribojimų. Karbomero injekcijos sąlygojo žiurkių ragenos drumstumą, o tai užkerto kelią fundoskopiniam ir funkciniam regos nervo ir tinklainės pažeidimo stebėjimui. Žiurkių ragenos, po episklerinių venų fotokoaguliacija lazeriu, išliko skaidrios.

IŠVADOS

- Nustatyta, jog 0.3% karbomero koncentracija, yra efektyvi siekiant padidinti akispūdį ir sumažinti tinklainės ganglinių ląstelių skaičių, žiurkių karbomero indukuoto aukšto akispūdžio modelyje.
- Nustatyta, jog 400 (galia 500 mW, trukmė - 0,10 s, diametras – 100µm) yra efektyvus lazerio šūvių skaičius, siekiant padidinti akispūdį ir sumažinti tinklainės ganglinių ląstelių skaičių, žiurkių lazerio indukuoto aukšto akispūdžio modelyje.
- Nustatyta, jog karbomero indukuotame aukšto akispūdžio modelyje gydymas 0.5 % timololiu buvo veiksmingas siekiant užkirsti kelią akispūdžio padidėjimui ir tinklainės ganglinių ląstelių sumažėjimui, o lazerio indukuotame aukšto akispūdžio modelyje gydymas 0.5 % timololiu reikšmės neturėjo.
- Palyginus lazerio ir karbomero indukuotus aukšto akispūdžio modelius *Long Evans* žiurkėse, nustatyta, jog abu modeliai buvo sėkmingi, siekiant padidinti akispūdį ir sumažinti tinklainės ganglinių ląstelių skaičių. Tačiau, karbomero indukuotas aukšto akispūdžio modelis yra pigesnis, specialios įrangos nereikalaujantis metodas, kuriame padidėjęs IOP išsilaiko ilgesnį laikotarpį, užtenka vienos procedūros modeliui sukelti ir gydymas timololiu yra sėkmingas.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOSKLŲ CENTRAS
BIOMOKSLŲ INSTITUTAS
NEUROBIOLOGIJOS IR BIOFIZIKOS KATEDRA

Inesa Lelytė

Magistro baigiamasis darbas

**LAZERIO IR KARBOMERO INDUKUOTŲ AUKŠTO AKISPŪDŽIO MODELIŲ
PALYGINIMAS *LONG EVANS* ŽIURKĖSE**

SANTRAUKA

Pagrindinis šio tyrimo tikslas buvo palyginti lazerio ir karbomero indukuotus aukšto akispūdžio modelius *Long Evans* žiurkėse. Tyrimo metu buvo atlikti trys eksperimentai: pirmojo eksperimento metu buvo siekiama nustatyti efektyvią karbomero koncentraciją, karbomero indukuoto aukšto akispūdžio modelyje; antrojo eksperimento metu buvo tikimasi nustatyti efektyvų lazerio šūvių skaičių, lazerio indukuoto aukšto akispūdžio modelyje; ir trečiojo eksperimento metu buvo nustatomas lazerio ir karbomero indukuotų aukšto akispūdžio modelių veiksmingumas, gydant timololiu. Tyrimui atlikti buvo naudojamos 4-5 mėnesio amžiaus *Long Evans* žiurkės. Karbomero aukšto akispūdžio modelio indukcijai sukelti buvo atliekamos 0.1% ir 0.3% karbomero injekcijos (20 μ l) į žiurkių priekines kameras. Lazerio aukšto akispūdžio modelio indukcijai sukelti buvo atlikta 50, 100, 200 arba 400 lazerio šūvių į žiurkių episklerines venas. Siekiant nustatyti abiejų aukšto akispūdžio modelių veiksmingumą, buvo paskirtas timololio (10 μ l) gydymas tris kartus dienoje (8val., 12val. ir 17val.). IOP matavimai tonometru buvo atlikti visų eksperimentų metu beveik kiekvieną dieną, o tyrimų pabaigoje buvo suskaičiuotas tinklainės ganglinių ląstelių skaičius. Tyrimo rezultatai parodė, jog 0.3% karbomero injekcijos, karbomero indukuoto aukšto akispūdžio modelyje ir 400 lazerio šūvių, lazerio indukuoto aukšto akispūdžio modelyje, yra efektyvus variantas siekiant padidinti akispūdį ir sumažinti tinklainės ganglinių ląstelių skaičių. Karbomero indukuotame aukšto akispūdžio modelyje gydymas timololiu buvo veiksmingas siekiant užkirsti kelią IOP padidėjimui ir RGC sumažėjimui, tačiau lazerio indukuotame aukšto akispūdžio modelyje gydymas timololiu reikšmės neturėjo. Palyginus lazerio ir karbomero indukuotus aukšto akispūdžio modelius *Long Evans* žiurkėse, nustatyta, jog abu modeliai buvo sėkmingi siekiant padidinti akispūdį ir sumažinti tinklainės ganglinių ląstelių skaičių. Tačiau karbomero indukuotas aukšto akispūdžio modelis yra pigesnis, specialios įrangos nereikalaujantis metodas, kuriame padidėjęs IOP išsilaiko ilgesnį laikotarpį, užtenka vienos procedūros modeliui sukelti ir gydymas timololiu yra sėkmingas.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCE CENTER
INSTITUTE OF BIOSCIENCES
DEPARTMENT OF NEUROBIOLOGY AND BIOPHYSICS

Inesa Lelytė

Master thesis

**COMPARISON OF LASER AND CARBOMER INDUCED HIGH INTRAOCULAR
PRESSURE MODELS IN *LONG EVANS* RATS**

SUMMARY

The primary objective of this study was to compare laser and carbomer-induced high intraocular pressure models in *Long Evans* rats. Three experiments were performed during the study: the first experiment was aimed to determine the effective concentration of carbomer solution in a carbomer-induced high intraocular pressure model; the second experiment was performed to determine the effective number of laser shots in laser-induced high intraocular pressure model; and a third experiment demonstrated the efficacy of carbomer and laser-induced high intraocular pressure models with timolol administration. 4-5 months *Long Evans* rats were used in the study. Induction of 0.1% and 0.3% carbomer solution (20µl) into anterior chamber of rats was performed in order to induce high intraocular pressure model of carbomer. In order to induce laser high intraocular pressure model 50, 100, 200, or 400 laser shots were performed into the episcleral veins of rats. In order to determine the efficacy of both high intraocular pressure models, timolol (10 µl) was administered daily three times per day (8 am., 12 pm., and 5pm.). IOP measurements with tonometer were performed almost every day during all experiments, and the number of retinal ganglion cells was counted at the end of the study. The study results showed that 0.3% carbomer solution injections in the carbomer-induced high intraocular pressure model, and 400 laser shots in the laser-induced high intraocular pressure model were the effective choice in order to increase intraocular pressure and to reduce retinal ganglion cell number. In carbomer-induced high intraocular pressure model, timolol treatment was effective in preventing an increase in IOP and a decrease in RGC, but in the laser-induced high intraocular pressure model, timolol treatment was not significant. Comparison of laser and carbomer-induced high intraocular pressure models in *Long Evans* rats showed that both models were successful in increasing intraocular pressure and reducing retinal ganglion cell number. However, the carbomer-induced high intraocular pressure model is a less expensive, no-equipment required method in which increased IOP persists for a longer period of time, only a single procedure is needed to induce the model, and treatment with timolol is successful.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Ascher, K. W. (1953). Aqueous veins: Their status eleven years after their detection. *AMA archives of ophthalmology*, 49(4), 438-451.
2. Ascher, K. W. (1961). The aqueous veins, vol. 1. *Springfield: Charles C. Thomas*, 251.
3. Brilakis, H. S., & Johnson, D. H. (2001). Giant vacuole survival time and implications for aqueous humor outflow. *Journal of glaucoma*, 10(4), 277-283.
4. Camras, L. J., Stamer, W. D., Epstein, D., Gonzalez, P., & Yuan, F. (2014). Circumferential tensile stiffness of glaucomatous trabecular meshwork. *Investigative ophthalmology & visual science*, 55(2), 814-823.
5. Delamere, N. A. (2005). Ciliary body and ciliary epithelium. *Advances in organ biology*, 10, 127-148.
6. Grossmann, J. (2002). Molecular mechanisms of “detachment-induced apoptosis—Anoikis”. *Apoptosis*, 7(3), 247-260.
7. Guo, L., Moss, S. E., Alexander, R. A., Ali, R. R., Fitzke, F. W., & Cordeiro, M. F. (2005). Retinal ganglion cell apoptosis in glaucoma is related to intraocular pressure and IOP-induced effects on extracellular matrix. *Investigative ophthalmology & visual science*, 46(1), 175-182.
8. Hann, C. R., Vercnocke, A. J., Bentley, M. D., Jorgensen, S. M., & Fautsch, M. P. (2014). Anatomic changes in Schlemm's canal and collector channels in normal and primary open-angle glaucoma eyes using low and high perfusion pressures. *Investigative ophthalmology & visual science*, 55(9), 5834-5841.
9. Izzotti, A., Saccà, S. C., Longobardi, M., & Cartiglia, C. (2010). Mitochondrial damage in the trabecular meshwork of patients with glaucoma. *Archives of ophthalmology*, 128(6), 724-730.
10. Johnstone, M., Jamil, A., & Martin, E. (2010). Aqueous veins and open angle glaucoma. In *The Glaucoma Book* (pp. 65-78). Springer, New York, NY.
11. Morgan, J. E. (2000). Optic nerve head structure in glaucoma: astrocytes as mediators of axonal damage. *Eye*, 14(3), 437-444.
12. Russell, P., & Johnson, M. (2012). Elastic modulus determination of normal and glaucomatous human trabecular meshwork. *Investigative ophthalmology & visual science*, 53(1), 117-117.
13. Virk, J. K., Singh, M., & Singh, M. (2015, September). Cup-to-disk ratio (CDR) determination for glaucoma screening. In *2015 1st International Conference on Next Generation Computing Technologies (NGCT)* (pp. 504-507). IEEE.

14. Abu-Hassan, D. W., Acott, T. S., & Kelley, M. J. (2014). The trabecular meshwork: a basic review of form and function. *Journal of ocular biology*, 2(1).
15. Agarwal, R., & Agarwal, P. (2012). Glaucomatous neurodegeneration: an eye on tumor necrosis factor-alpha. *Indian journal of ophthalmology*, 60(4), 255.
16. Agarwal, R., Gupta, S. K., Agarwal, P., Saxena, R., & Agrawal, S. S. (2009). Current concepts in the pathophysiology of glaucoma. *Indian journal of ophthalmology*, 57(4), 257.
17. Ahmad, S. S., Ghani, S. A., Singh, D., & Wah, L. P. (2014). The dynamics of aqueous humor outflow—a major review. *Journal-The Dynamics of Aqueous Humor Outflow—A Major Review*.
18. Aihara, M., Lindsey, J. D., & Weinreb, R. N. (2003). Ocular hypertension in mice with a targeted type I collagen mutation. *Investigative ophthalmology & visual science*, 44(4), 1581-1585.
19. ALLINGHAM, R. R., de KATER, A. W., & ETHIER, R. C. (1996). Schlemm's canal and primary open angle glaucoma: correlation between Schlemm's canal dimensions and outflow facility. *Experimental eye research*, 62(1), 101-110.
20. Andrés-Guerrero, V., García-Feijoo, J., & Konstas, A. G. (2017). Targeting Schlemm's canal in the medical therapy of glaucoma: current and future considerations. *Advances in therapy*, 34(5), 1049-1069.
21. Avila, M. Y., Stone, R. A., & Civan, M. M. (2001). A1-, A2A- and A3-subtype adenosine receptors modulate intraocular pressure in the mouse. *British journal of pharmacology*, 134(2), 241-245.
22. Avila, M. Y., Stone, R. A., & Civan, M. M. (2002). Knockout of A3 adenosine receptors reduces mouse intraocular pressure. *Investigative ophthalmology & visual science*, 43(9), 3021-3026.
23. Becker, B. (1980). Vanadate and aqueous humor dynamics. Proctor Lecture. *Investigative ophthalmology & visual science*, 19(10), 1156-1165.
24. Bentley, M. D., Hann, C. R., & Fautsch, M. P. (2016). Anatomical variation of human collector channel orifices. *Investigative ophthalmology & visual science*, 57(3), 1153-1159.
25. Bhattacharya, S. K., Annangudi, S. P., Salomon, R. G., Kuchtey, R. W., Peachey, N. S., & Crabb, J. W. (2005). Cochlin deposits in the trabecular meshwork of the glaucomatous DBA/2J mouse. *Experimental eye research*, 80(5), 741-744.
26. Bill, A. (1965). The aqueous humor drainage mechanism in the cynomolgus monkey (*Macaca irus*) with evidence for unconventional routes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 4(5), 911-919.

27. Bill, A., & Hellsing, K. (1965). Production and drainage of aqueous humor in the cynomolgus monkey (*Macaca irus*). *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 4(5), 920-926.
28. BILL, A., & SVEDBERGH, B. (1972). Scanning electron microscopic studies of the trabecular meshwork and the canal of Schlemm-an attempt to localize the main resistance to outflow of aqueous humor in man. *Acta ophthalmologica*, 50(3), 295-320.
29. Bill, A., & Walinder, P. E. (1966). The effects of pilocarpine on the dynamics of aqueous humor in a primate (*Macaca irus*). *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 5(2), 170-175.
30. Bosco, A., Inman, D. M., Steele, M. R., Wu, G., Soto, I., Marsh-Armstrong, N., ... & Vetter, M. L. (2008). Reduced retina microglial activation and improved optic nerve integrity with minocycline treatment in the DBA/2J mouse model of glaucoma. *Investigative ophthalmology & visual science*, 49(4), 1437-1446.
31. Bosco, A., Steele, M. R., & Vetter, M. L. (2011). Early microglia activation in a mouse model of chronic glaucoma. *Journal of Comparative Neurology*, 519(4), 599-620.
32. Braakman, S. T., Pedrigi, R. M., Read, A. T., Smith, J. A., Stamer, W. D., Ethier, C. R., & Overby, D. R. (2014). Biomechanical strain as a trigger for pore formation in Schlemm's canal endothelial cells. *Experimental eye research*, 127, 224-235.
33. Bradley, J. M., Vranka, J., Colvis, C. M., Conger, D. M., Alexander, J. P., Fisk, A. S., ... & Acott, T. S. (1998). Effect of matrix metalloproteinases activity on outflow in perfused human organ culture. *Investigative ophthalmology & visual science*, 39(13), 2649-2658.
34. Cagatay, H. H., Ekinci, M., Sendul, S. Y., Uslu, C., Demir, M., Ulusay, S. M., ... & Şeker, S. (2014). Elevated Intraocular Pressure due to Arteriovenous Fistula between External Carotid Artery and Facial Vein. *Case reports in ophthalmological medicine*, 2014.
35. Caiado, R. R., Badaró, E., & Kasahara, N. (2014). Intraocular pressure fluctuation in healthy and glaucomatous eyes: a comparative analysis between diurnal curves in supine and sitting positions and the water drinking test. *Arquivos brasileiros de oftalmologia*, 77(5), 288-292.
36. Calafiore, S., Perdicchi, A., Scuderi, G., Contestabile, M. T., Abdolrahimzadeh, S., & Recupero, S. M. (2016). Glaucoma management in carotid cavernous fistula. *Case reports in ophthalmology*, 7(2), 296-302.
37. Calera, M. R., Wang, Z., Sanchez-Olea, R., Paul, D. L., Civan, M. M., & Goodenough, D. A. (2009). Depression of intraocular pressure following inactivation of connexin43 in the nonpigmented epithelium of the ciliary body. *Investigative ophthalmology & visual science*, 50(5), 2185-2193.

38. Carré, D. A., Mitchell, C. H., Peterson-Yantorno, K., Coca-Prados, M., & Civan, M. M. (2000). Similarity of A3-adenosine and swelling-activated Cl⁻ channels in nonpigmented ciliary epithelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 279(2), C440-C451.
39. Cellerino, A., Carroll, P., Thoenen, H., & Barde, Y. A. (1997). Reduced size of retinal ganglion cell axons and hypomyelination in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 9(5-6), 397-408.
40. Cheng, Y., Feng, J., Zhu, X., & Liang, J. (2019). Cytokines concentrations in aqueous humor of eyes with uveal melanoma. *Medicine*, 98(5).
41. Chiu, K., Chang, R., & So, K. F. (2007). Laser-induced chronic ocular hypertension model on SD rats. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (10), e549.
42. Civan, M. M. (2013). DIDS and the Janus-faced Na⁺-K⁺-activated ATPase. Focus on “DIDS inhibits Na-K-ATPase activity in porcine nonpigmented ciliary epithelial cells by a Src family kinase-dependent mechanism”.
43. Civan, M. M., & Macknight, A. D. (2004). The ins and outs of aqueous humour secretion. *Experimental eye research*, 78(3), 625-631.
44. Colafrancesco, V., Parisi, V., Sposato, V., Rossi, S., Russo, M. A., Coassin, M., ... & Aloe, L. (2011). Ocular application of nerve growth factor protects degenerating retinal ganglion cells in a rat model of glaucoma. *Journal of glaucoma*, 20(2), 100-108.
45. Cone, F. E., Gelman, S. E., Son, J. L., Pease, M. E., & Quigley, H. A. (2010). Differential susceptibility to experimental glaucoma among 3 mouse strains using bead and viscoelastic injection. *Experimental eye research*, 91(3), 415-424.
46. Cone, F. E., Steinhart, M. R., Oglesby, E. N., Kalesnykas, G., Pease, M. E., & Quigley, H. A. (2012). The effects of anesthesia, mouse strain and age on intraocular pressure and an improved murine model of experimental glaucoma. *Experimental eye research*, 99, 27-35.
47. Counillon, L., Touret, N., Bidet, M., Peterson-Yantorno, K., Coca-Prados, M., Stuart-Tilley, A., ... & Civan, M. M. (2000). Na⁺/H⁺ and Cl⁻/HCO₃⁻ antiporters of bovine pigmented ciliary epithelial cells. *Pflügers Archiv*, 440(5), 667-678.
48. Crawford, K., & Kaufman, P. L. (1987). Pilocarpine antagonizes prostaglandin F_{2α}-induced ocular hypotension in monkeys: evidence for enhancement of uveoscleral outflow by prostaglandin F_{2α}. *Archives of ophthalmology*, 105(8), 1112-1116.
49. Crook, R. B., & Riese, K. (1996). Beta-adrenergic stimulation of Na⁺, K⁺, Cl⁻-cotransport in fetal nonpigmented ciliary epithelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, 37(6), 1047-1057.

50. Dane, Ş., Aslankurt, M., Yazici, A. T., & Gümüştekin, K. (2003). Sex-related difference in intraocular pressure in healthy young subjects. *Perceptual and motor skills*, 96(3_suppl), 1314-1316.
51. Danias, J., Kontiola, A. I., Filippopoulos, T., & Mittag, T. (2003). Method for the noninvasive measurement of intraocular pressure in mice. *Investigative ophthalmology & visual science*, 44(3), 1138-1141.
52. Dautriche, C. N., Tian, Y., Xie, Y., & Sharfstein, S. T. (2015). A closer look at Schlemm's canal cell physiology: implications for biomimetics. *Journal of functional biomaterials*, 6(3), 963-985.
53. Ejimadu, C. S., & Awoyesuku, E. A. (2018). Relationship between Intra Ocular Pressure and Visual Acuity in Port Harcourt, Nigeria.
54. Esporcatte, B. L. B., Lopes, F. S. S., Fonseca Netto, C., Rebouças-Santos, V., Dias, D. T., Marujo, F. I., & Rolim-de-Moura, C. (2015). Rebound tonometry versus Goldmann tonometry in school children: feasibility and agreement of intraocular pressure measurements. *Arquivos brasileiros de oftalmologia*, 78(6), 359-362.
55. Fern, K. D., Manny, R. E., Gwiazda, J., Hyman, L., Weise, K., Marsh-Tootle, W., & COMET Study Group. (2012). Intraocular pressure and central corneal thickness in the COMET cohort. *Optometry and vision science: official publication of the American Academy of Optometry*, 89(8), 1225.
56. Fortune, B., Hardin, C., Reynaud, J., Cull, G., Yang, H., Wang, L., & Burgoyne, C. F. (2016). Comparing optic nerve head rim width, rim area, and peripapillary retinal nerve fiber layer thickness to axon count in experimental glaucoma. *Investigative ophthalmology & visual science*, 57(9), OCT404-OCT412.
57. Fourman, S. (1989). Acute closed-angle glaucoma after arteriovenous fistulas. *American journal of ophthalmology*, 107(2), 156-159.
58. Funk, R. H. W., Gehr, J., & Rohen, J. W. (1996). Short-term hemodynamic changes in episcleral arteriovenous anastomoses correlate with venous pressure and IOP changes in the albino rabbit. *Current eye research*, 15(1), 87-93.
59. Gabelt, B. T., Kiland, J. A., & Tian, B. (2006). PLK. Aqueous humor: Secretion and Dynamics. *Duane's Foundations of Clinical Ophthalmology*. Lippincott Williams & Wilkins.
60. Gao, X., Zhu, Q., & Gu, W. (2014). Effects of variation of hydration and glycosaminoglycan content on the flow facility in trabecular meshwork. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 55(13), 5662-5662.

61. Ghaffariyeh, A., Honarpisheh, N., Heidari, M. H., Puyan, S., & Abasov, F. (2011). Brain-derived neurotrophic factor as a biomarker in primary open-angle glaucoma. *Optometry and Vision Science*, 88(1), 80-85.
62. Giaconi, J. A., Law, S. K., Nouri-Mahdavi, K., Coleman, A. L., & Caprioli, J. (Eds.). (2016). *Pearls of glaucoma management*. Springer.
63. Goel, M., Picciani, R. G., Lee, R. K., & Bhattacharya, S. K. (2010). Aqueous humor dynamics: a review. *The open ophthalmology journal*, 4, 52.
64. Gottanka, J., Johnson, D. H., Martus, P., & Lütjen-Drecoll, E. (1997). Severity of optic nerve damage in eyes with POAG is correlated with changes in the trabecular meshwork. *Journal of glaucoma*, 6(2), 123-132.
65. Grierson, I., & Hogg, P. (1995). The proliferative and migratory activities of trabecular meshwork cells. *Progress in Retinal and Eye Research*, 15(1), 33-67.
66. Grierson, I., & Howes, R. C. (1987). Age-related depletion of the cell population in the human trabecular meshwork. *Eye*, 1(2), 204-210.
67. Guo, L., Salt, T. E., Maass, A., Luong, V., Moss, S. E., Fitzke, F. W., & Cordeiro, M. F. (2006). Assessment of neuroprotective effects of glutamate modulation on glaucoma-related retinal ganglion cell apoptosis in vivo. *Investigative ophthalmology & visual science*, 47(2), 626-633.
68. Gurdita, A., Tan, B., Joos, K. M., Bizheva, K., & Choh, V. (2017). Pigmented and albino rats differ in their responses to moderate, acute and reversible intraocular pressure elevation. *Documenta Ophthalmologica*, 134(3), 205-219.
69. Haddadin, R. I., Oh, D. J., Kang, M. H., Filippopoulos, T., Gupta, M., Hart, L., ... & Rhee, D. J. (2009). SPARC-null mice exhibit lower intraocular pressures. *Investigative ophthalmology & visual science*, 50(8), 3771-3777.
70. Haddadin, R. I., Oh, D. J., Kang, M. H., Villarreal, G., Kang, J. H., Jin, R., ... & Rhee, D. J. (2012). Thrombospondin-1 (TSP1)-null and TSP2-null mice exhibit lower intraocular pressures. *Investigative ophthalmology & visual science*, 53(10), 6708-6717.
71. Hah, Y. S., Chung, H. J., Sontakke, S. B., Chung, I. Y., Ju, S., Seo, S. W., ... & Kim, S. J. (2017). Ascorbic acid concentrations in aqueous humor after systemic vitamin C supplementation in patients with cataract: pilot study. *BMC ophthalmology*, 17(1), 121.
72. Hamanaka, T., Matsuda, A., Sakurai, T., & Kumasaka, T. (2016). Morphological abnormalities of Schlemm's canal in primary open-angle glaucoma from the aspect of aging. *Investigative ophthalmology & visual science*, 57(2), 692-706.

73. Hann, C. R., Springett, M. J., Wang, X., & Johnson, D. H. (2001). Ultrastructural localization of collagen IV, fibronectin, and laminin in the trabecular meshwork of normal and glaucomatous eyes. *Ophthalmic research*, 33(6), 314-324.
74. Hänninen, V. A., Pantcheva, M. B., Freeman, E. E., Poulin, N. R., & Grosskreutz, C. L. (2002). Activation of caspase 9 in a rat model of experimental glaucoma. *Current eye research*, 25(6), 389-395.
75. Hare, W., WoldeMussie, E., Lai, R., Ton, H., Ruiz, G., Feldmann, B., ... & Wheeler, L. (2001). Efficacy and safety of memantine, an NMDA-type open-channel blocker, for reduction of retinal injury associated with experimental glaucoma in rat and monkey. *Survey of Ophthalmology*, 45, S284-S289.
76. Heichel, J., Hammer, T., Solymosi, L., Brandt, S., & Winter, I. (2015). Pressure-Lowering Effect of Fistula Occlusion in a Patient with Secondary Glaucoma Due to an Intracranial Arteriovenous Fistula. *Ophthalmology and therapy*, 4(2), 135-141.
77. Heinz, C., Bograd, N., Koch, J., & Heiligenhaus, A. (2013). Ocular hypertension and glaucoma incidence in patients with scleritis. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 251(1), 139-142.
78. Hernandez, M. R., Miao, H., & Lukas, T. (2008). Astrocytes in glaucomatous optic neuropathy. *Progress in brain research*, 173, 353-373.
79. Hillier, R. J., Ojaimi, E., Wong, D. T., Mak, M. Y., Berger, A. R., Kohly, R. P., ... & Altomare, F. (2017). Aqueous humor cytokine levels as biomarkers of disease severity in diabetic macular edema. *Retina*, 37(4), 761-769.
80. Hogg, P., Calthorpe, M., Batterbury, M., & Grierson, I. (2000). Aqueous humor stimulates the migration of human trabecular meshwork cells in vitro. *Investigative ophthalmology & visual science*, 41(5), 1091-1098.
81. Hogg, P., Calthorpe, M., Ward, S., & Grierson, I. (1995). Migration of cultured bovine trabecular meshwork cells to aqueous humor and constituents. *Investigative ophthalmology & visual science*, 36(12), 2449-2460.
82. Huang, W., Chen, S., Gao, X., Yang, M., Zhang, J., Li, X., ... & Zhang, X. (2014). Inflammation-related cytokines of aqueous humor in acute primary angle-closure eyes. *Investigative ophthalmology & visual science*, 55(2), 1088-1094.
83. Huang, W., Fan, Q., Wang, W., Zhou, M., Laties, A. M., & Zhang, X. (2013). Collagen: a potential factor involved in the pathogenesis of glaucoma. *Medical science monitor basic research*, 19, 237.

84. Huang, W., Hu, F., Wang, M., Gao, F., Xu, P., Xing, C., ... & Wu, J. (2018). Comparative analysis of retinal ganglion cell damage in three glaucomatous rat models. *Experimental eye research*, 172, 112-122.
85. Inomata, H., Bill, A., & Smelser, G. K. (1972). Unconventional routes of aqueous humor outflow in cynomolgus monkey (*Macaca irus*). *American journal of ophthalmology*, 73(6), 893-907.
86. Inoue, T., Kawaji, T., Inatani, M., Kameda, T., Yoshimura, N., & Tanihara, H. (2012). Simultaneous increases in multiple proinflammatory cytokines in the aqueous humor in pseudophakic glaucomatous eyes. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 38(8), 1389-1397.
87. Irshad, F. A., Mayfield, M. S., Zurakowski, D., & Ayyala, R. S. (2010). Variation in Schlemm's canal diameter and location by ultrasound biomicroscopy. *Ophthalmology*, 117(5), 916-920.
88. Johnson, M. (2006). What controls aqueous humour outflow resistance?. *Experimental eye research*, 82(4), 545-557.
89. Kagemann, L., Wang, B., Wollstein, G., Ishikawa, H., Nevins, J. E., Nadler, Z., ... & Schuman, J. S. (2014). IOP elevation reduces Schlemm's canal cross-sectional area. *Investigative ophthalmology & visual science*, 55(3), 1805-1809.
90. Kaufman, P. L. (1989). Prostaglandin F2 α increases uveoscleral outflow in the cynomolgus monkey. *Experimental eye research*, 49(3), 389-402.
91. Keller, K. E., & Acott, T. S. (2013). The juxtacanalicular region of ocular trabecular meshwork: a tissue with a unique extracellular matrix and specialized function. *Journal of ocular biology*, 1(1), 3.
92. Keller, K. E., Bradley, J. M., Kelley, M. J., & Acott, T. S. (2008). Effects of modifiers of glycosaminoglycan biosynthesis on outflow facility in perfusion culture. *Investigative ophthalmology & visual science*, 49(6), 2495-2505.
93. Kiland, J. A., Gabelt, B. T., & Kaufman, P. L. (2004). Studies on the mechanism of action of timolol and on the effects of suppression and redirection of aqueous flow on outflow facility. *Experimental eye research*, 78(3), 639-651.
94. Kim, H. G., Park, J. W., & Park, S. W. (2013). Experimental chronic ocular hypertension by anterior chamber injection of 0.3% carbomer solution in the rat. *Clinical & experimental ophthalmology*, 41(4), 404-412.
95. Kobayashi, M., & Naito, K. (2000). Pharmacological profiles of the potent carbonic anhydrase inhibitor dorzolamide hydrochloride, a topical antiglaucoma agent. *Nihon yakurigaku zasshi. Folia pharmacologica Japonica*, 115(6), 323-328.

96. Lambiase, A., Aloe, L., Centofanti, M., Parisi, V., Mantelli, F., Colafrancesco, V., ... & Levi-Montalcini, R. (2009). Experimental and clinical evidence of neuroprotection by nerve growth factor eye drops: Implications for glaucoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(32), 13469-13474.
97. Lei, X. W., Wei, P., Li, X. L., Yang, K., & Lei, J. Z. (2009). Changes of structures of anterior chamber angle in rabbit chronic high intraocular pressure model. [*Zhonghua yan ke za zhi*] *Chinese journal of ophthalmology*, *45*(10), 892-897.
98. Leidl, M. C., Choi, C. J., Syed, Z. A., & Melki, S. A. (2014). Intraocular pressure fluctuation and glaucoma progression: what do we know?. *British Journal of Ophthalmology*, *98*(10), 1315-1319.
99. Leite, M. T., Prata, T. S., Kera, C. Z., Miranda, D. V., De Moraes Barros, S. B., & Melo Jr, L. A. (2009). Ascorbic acid concentration is reduced in the secondary aqueous humour of glaucomatous patients. *Clinical & experimental ophthalmology*, *37*(4), 402-406.
100. Levkovitch-Verbin, H., Quigley, H. A., Martin, K. R., Valenta, D., Baumrind, L. A., & Pease, M. E. (2002). Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats. *Investigative ophthalmology & visual science*, *43*(2), 402-410.
101. Lim, K. S., Nau, C. B., O'Byrne, M. M., Hodge, D. O., Toris, C. B., McLaren, J. W., & Johnson, D. H. (2008). Mechanism of action of bimatoprost, latanoprost, and travoprost in healthy subjects: a crossover study. *Ophthalmology*, *115*(5), 790-795.
102. Lindsey, J. D., & Weinreb, R. N. (2002). Identification of the mouse uveoscleral outflow pathway using fluorescent dextran. *Investigative ophthalmology & visual science*, *43*(7), 2201-2205.
103. Link, B. A., Gray, M. P., Smith, R. S., & John, S. W. (2004). Intraocular pressure in zebrafish: comparison of inbred strains and identification of a reduced melanin mutant with raised IOP. *Investigative ophthalmology & visual science*, *45*(12), 4415-4422.
104. Llobet, A., Gasull, X., & Gual, A. (2003). Understanding trabecular meshwork physiology: a key to the control of intraocular pressure?. *Physiology*, *18*(5), 205-209.
105. Mabuchi, F., Aihara, M., Mackey, M. R., Lindsey, J. D., & Weinreb, R. N. (2003). Optic nerve damage in experimental mouse ocular hypertension. *Investigative ophthalmology & visual science*, *44*(10), 4321-4330.
106. Majima, K. (1995). Human lens epithelial cells proliferate in response to exogenous EGF and have EGF and EGF receptor. *Ophthalmic research*, *27*(6), 356-365.
107. May, C. A. (2008). Comparative anatomy of the optic nerve head and inner retina in non-primate animal models used for glaucoma research. *The open ophthalmology journal*, *2*, 94.

108. Mclaughlin, C. W., Peart, D., Purves, R. D., Carre, D. A., Macknight, A. D., & Civan, M. M. (1998). Effects of HCO₃-on cell composition of rabbit ciliary epithelium: a new model for aqueous humor secretion. *Investigative ophthalmology & visual science*, *39*(9), 1631-1641.
109. Medeiros, F. A., Zangwill, L. M., Anderson, D. R., Liebmann, J. M., Girkin, C. A., Harwerth, R. S., ... & Weinreb, R. N. (2012). Estimating the rate of retinal ganglion cell loss in glaucoma. *American journal of ophthalmology*, *154*(5), 814-824.
110. Mermoud, A., Baerveldt, G., Minckler, D. S., Lee, M. B., & Rao, N. A. (1994). Intraocular pressure in Lewis rats. *Investigative ophthalmology & visual science*, *35*(5), 2455-2460.
111. Mitchell, C. H., Peterson-Yantorno, K., Carré, D. A., McGlenn, A. M., Coca-Prados, M., Stone, R. A., & Civan, M. M. (1999). A3 adenosine receptors regulate Cl⁻ channels of nonpigmented ciliary epithelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *276*(3), C659-C666.
112. Moreno, M. C., Sande, P., Marcos, H. A., de Zavalía, N., Sarmiento, M. I. K., & Rosenstein, R. E. (2005). Effect of glaucoma on the retinal glutamate/glutamine cycle activity. *The FASEB Journal*, *19*(9), 1161-1162.
113. Morrison, J. C. (2005). Elevated intraocular pressure and optic nerve injury models in the rat. *Journal of glaucoma*, *14*(4), 315-317.
114. MORRISON, J. C., Moore, C. G., Deppmeier, L. M., Gold, B. G., Meshul, C. K., & JOHNSON, E. C. (1997). A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. *Experimental eye research*, *64*(1), 85-96.
115. Mukai, R., Park, D. H., Okunuki, Y., Hasegawa, E., Klokman, G., Kim, C. B., ... & Connor, K. M. (2019). Mouse model of ocular hypertension with retinal ganglion cell degeneration. *PloS one*, *14*(1).
116. Munemasa, Y., & Kitaoka, Y. (2013). Molecular mechanisms of retinal ganglion cell degeneration in glaucoma and future prospects for cell body and axonal protection. *Frontiers in cellular neuroscience*, *6*, 60.
117. Nakazawa, T., Nakazawa, C., Matsubara, A., Noda, K., Hisatomi, T., She, H., ... & Benowitz, L. I. (2006). Tumor necrosis factor- α mediates oligodendrocyte death and delayed retinal ganglion cell loss in a mouse model of glaucoma. *Journal of Neuroscience*, *26*(49), 12633-12641.
118. Naskar, R., Vorwerk, C. K., & Dreyer, E. B. (2000). Concurrent downregulation of a glutamate transporter and receptor in glaucoma. *Investigative ophthalmology & visual science*, *41*(7), 1940-1944.

119. Negri, L., Ferreras, A., & Iester, M. (2019). Timolol 0.1% in glaucomatous patients: efficacy, tolerance, and quality of life. *Journal of ophthalmology*, 2019.
120. Ngumah, Q. C., Buchthal, S. D., & Dacheux, R. F. (2006). Longitudinal non-invasive proton NMR spectroscopy measurement of vitreous lactate in a rabbit model of ocular hypertension. *Experimental eye research*, 83(2), 390-400.
121. Orzalesi, N., Rossetti, L., Invernizzi, T., Bottoli, A., & Autelitano, A. (2000). Effect of timolol, latanoprost, and dorzolamide on circadian IOP in glaucoma or ocular hypertension. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41(9), 2566-2573.
122. Osaiyuwu, A. B., Edokpa, G. D., & Egharevba, R. (2018). GENDER DIFFERENCE IN INTRA-OCULAR PRESSURE AMONG PATIENTS WITH PRIMARY OPEN ANGLE GLAUCOMA IN BENIN CITY, NIGERIA.
123. Otulana, T. O., Onabolu, O. O., & Fafiolu, V. O. (2008). Unilateral Idiopathic Dilated Episcleral Vein with Secondary Open Angle Glaucoma (Radius–Maumenee Syndrome) in an African—A case report and literature review. *Nigerian Journal of Ophthalmology*, 16(1), 20-22.
124. Overby, D. R., Zhou, E. H., Vargas-Pinto, R., Pedrigi, R. M., Fuchshofer, R., Braakman, S. T., ... & Dang, Q. (2014). Altered mechanobiology of Schlemm’s canal endothelial cells in glaucoma. *Proceedings of the national Academy of Sciences*, 111(38), 13876-13881.
125. Overby, D. R., Zhou, E. H., Vargas-Pinto, R., Pedrigi, R. M., Fuchshofer, R., Braakman, S. T., ... & Dang, Q. (2014). Altered mechanobiology of Schlemm’s canal endothelial cells in glaucoma. *Proceedings of the national Academy of Sciences*, 111(38), 13876-13881.
126. Pardo, A. C., Wong, V., Benson, L. M., Dykes, M., Tanaka, K., Rothstein, J. D., & Maragakis, N. J. (2006). Loss of the astrocyte glutamate transporter GLT1 modifies disease in SOD1G93A mice. *Experimental neurology*, 201(1), 120-130
127. Pederson, J. E., Gaasterland, D. E., & MacLellan, H. M. (1977). Uveoscleral aqueous outflow in the rhesus monkey: importance of uveal reabsorption. *Investigative ophthalmology & visual science*, 16(11), 1008-1007.
128. Quigley, H. A., McKinnon, S. J., Zack, D. J., Pease, M. E., Kerrigan–Baumrind, L. A., Kerrigan, D. F., & Mitchell, R. S. (2000). Retrograde axonal transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats. *Investigative ophthalmology & visual science*, 41(11), 3460-3466.
129. Rohen, J. W. (1970). The morphologic organization of the chamber angle in normal and glaucomatous eyes. *Bibliotheca ophthalmologica: supplementa ad ophthalmologica*, 81, 80.

130. Rotatori, D. S., Kerr, N. C., Raphael, B., McLaughlin, B. J., Shimizu, R., Stern, G. A., & Schultz, G. S. (1994). Elevation of transforming growth factor alpha in cat aqueous humor after corneal endothelial injury. *Investigative ophthalmology & visual science*, 35(1), 143-149.
131. Saccà, S. C., Pulliero, A., & Izzotti, A. (2015). The dysfunction of the trabecular meshwork during glaucoma course. *Journal of cellular physiology*, 230(3), 510-525.
132. Samples, J. R., & Ahmed, I. I. K. (Eds.). (2014). *Surgical innovations in glaucoma*. Springer New York.
133. Samsel, P. A., Kisiswa, L., Erichsen, J. T., Cross, S. D., & Morgan, J. E. (2011). A novel method for the induction of experimental glaucoma using magnetic microspheres. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(3), 1671-1675.
134. Sappington, R. M., Carlson, B. J., Crish, S. D., & Calkins, D. J. (2010). The microbead occlusion model: a paradigm for induced ocular hypertension in rats and mice. *Investigative ophthalmology & visual science*, 51(1), 207-216.
135. Sarthy, V. P., Pignataro, L., Pannicke, T., Weick, M., Reichenbach, A., Harada, T., ... & Marc, R. (2005). Glutamate transport by retinal Müller cells in glutamate/aspartate transporter-knockout mice. *Glia*, 49(2), 184-196.
136. Schroedl, F., Kaser-Eichberger, A., Schlereth, S. L., Bock, F., Regenfuss, B., Reitsamer, H. A., ... & Dana, R. (2014). Consensus statement on the immunohistochemical detection of ocular lymphatic vessels. *Investigative ophthalmology & visual science*, 55(10), 6440-6442.
137. Seki, M., Tanaka, T., Matsuda, H., Togano, T., Hashimoto, K., Ueda, J., ... & Abe, H. (2005). Topically administered timolol and dorzolamide reduce intraocular pressure and protect retinal ganglion cells in a rat experimental glaucoma model. *British journal of ophthalmology*, 89(4), 504-507.
138. Shaarawy, T. M., Sherwood, M. B., Hitchings, R. A., & Crowston, J. G. (2009). *Glaucoma: Expert Consult Premium Edition-Enhanced Online Features, Print, and DVD, 2-Volume Set*. Elsevier Health Sciences.
139. Shahidullah, M., & Delamere, N. A. (2012). DIDS Causes Src-Dependent Inhibition of Na, K-ATPase in the Nonpigmented Ciliary Epithelium and Slows Aqueous Humor Secretion by the Intact Porcine Eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53(14), 1984-1984.
140. Sihota, R., Saxena, R., Agarwal, H. C., & Gulati, V. (2004). Crossover Comparison of Timolol and Latanoprost in Chronic Primary Angle-closure Glaucoma. *Archives of Ophthalmology*, 122(2), 185-189.

141. Smedowski, A., Pietrucha-Dutczak, M., Kaarniranta, K., & Lewin-Kowalik, J. (2014). A rat experimental model of glaucoma incorporating rapid-onset elevation of intraocular pressure. *Scientific reports*, 4(1), 1-11.
142. Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, 119(1), 7-35.
143. Stamer, W. D., Braakman, S. T., Zhou, E. H., Ethier, C. R., Fredberg, J. J., Overby, D. R., & Johnson, M. (2015). Biomechanics of Schlemm's canal endothelium and intraocular pressure reduction. *Progress in retinal and eye research*, 44, 86-98.
144. Stamer, W. D., Braakman, S. T., Zhou, E. H., Ethier, C. R., Fredberg, J. J., Overby, D. R., & Johnson, M. (2015). Biomechanics of Schlemm's canal endothelium and intraocular pressure reduction. *Progress in retinal and eye research*, 44, 86-98.
145. Stamper, R. L., Lieberman, M. F., & Drake, M. V. (2009). *Becker-Shaffer's Diagnosis and Therapy of the Glaucomas E-Book*. Elsevier Health Sciences.
146. Streilein, J. W. (2003). Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature. *Nature Reviews Immunology*, 3(11), 879-889.
147. Strohmaier, C. A., Reitsamer, H. A., & Kiel, J. W. (2013). Episcleral venous pressure and IOP responses to central electrical stimulation in the rat. *Investigative ophthalmology & visual science*, 54(10), 6860-6866.
148. Tai, M. C., Chen, P. L., Wu, J. N., & Lu, D. W. (2005). Clinical evaluation of the intraocular pressure in patients with glaucoma or ocular hypertension by a self-assessable tonometer. *Journal of Ocular Pharmacology & Therapeutics*, 21(1), 55-61.
149. Tamm, E. R. (2010). *The Role of the Ciliary Body in Aqueous Humor Dynamics Structural Aspects*.
150. Tamm, E. R. (2015). Functional morphology of the trabecular meshwork outflow pathways. In *Glaucoma* (pp. 40-46). WB Saunders.
151. Tamm, E. R., & Dowling, J. E. (2017). Astrocytes and glaucomatous neurodegeneration. *Experimental eye research*, 157, 1-4.
152. Tatham, A. J., Weinreb, R. N., Zangwill, L. M., Liebmann, J. M., Girkin, C. A., & Medeiros, F. A. (2013). The relationship between cup-to-disc ratio and estimated number of retinal ganglion cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, 54(5), 3205-3214.
153. Toda, N., & Nakanishi-Toda, M. (2007). Nitric oxide: ocular blood flow, glaucoma, and diabetic retinopathy. *Progress in retinal and eye research*, 26(3), 205-238.
154. Tonnu, P. A., Ho, T., Newson, T., El Sheikh, A., Sharma, K., White, E., ... & Garway-Heath, D. (2005). The influence of central corneal thickness and age on intraocular pressure

- measured by pneumotometry, non-contact tonometry, the Tono-Pen XL, and Goldmann applanation tonometry. *British Journal of Ophthalmology*, 89(7), 851-854.
155. Van Buskirk, E. M., Bacon, D. R., & Fahrenbach, W. H. (1990). Ciliary vasoconstriction after topical adrenergic drugs. *American journal of ophthalmology*, 109(5), 511-517.
156. Vareilles, P., Conquet, P., & Le Douarec, J. C. (1977). A method for the routine intraocular pressure (IOP) measurement in the rabbit: range of IOP variations in this species. *Experimental eye research*, 24(4), 369-375.
157. Wallentin, N., Wickström, K., & Lundberg, C. (1998). Effect of cataract surgery on aqueous TGF-beta and lens epithelial cell proliferation. *Investigative ophthalmology & visual science*, 39(8), 1410-1418.
158. Wang, H., Wang, R., Thrimawithana, T., Little, P. J., Xu, J., Feng, Z. P., & Zheng, W. (2014). The nerve growth factor signaling and its potential as therapeutic target for glaucoma. *BioMed research international*, 2014.
159. Wang, K., Read, A. T., Sulchek, T., & Ethier, C. R. (2017). Trabecular meshwork stiffness in glaucoma. *Experimental eye research*, 158, 3-12.
160. Wang, R., Seifert, P., & Jakobs, T. C. (2017). Astrocytes in the optic nerve head of glaucomatous mice display a characteristic reactive phenotype. *Investigative ophthalmology & visual science*, 58(2), 924-932.
161. Weber, A. J., & Zelenak, D. (2001). Experimental glaucoma in the primate induced by latex microspheres. *Journal of neuroscience methods*, 111(1), 39-48.
162. Wei, L., Liang, G., Cai, C., & Lv, J. (2016). Association of vitamin C with the risk of age-related cataract: a meta-analysis. *Acta ophthalmologica*, 94(3), e170-e176.
163. Weinreb, R. N., Aung, T., & Medeiros, F. A. (2014). The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review. *Jama*, 311(18), 1901-1911.
164. Welge-Lüssen, U., May, C. A., Neubauer, A. S., & Priglinger, S. (2001). Role of tissue growth factors in aqueous humor homeostasis. *Current opinion in ophthalmology*, 12(2), 94-99.
165. WoldeMussie, E., Ruiz, G., Wijono, M., & Wheeler, L. A. (2001). Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension. *Investigative ophthalmology & visual science*, 42(12), 2849-2855.
166. Xu, Y., Chen, Z., & Song, J. (2002). A study of experimental carbomer glaucoma and other experimental glaucoma in rabbits. [*Zhonghua yan ke za zhi*] *Chinese journal of ophthalmology*, 38(3), 172-175.

167. Yang, H., Avila, M. Y., Peterson-Yantorno, K., Coca-Prados, M., Stone, R. A., Jacobson, K. A., & Civan, M. M. (2005). The cross-species A3 adenosine-receptor antagonist MRS 1292 inhibits adenosine-triggered human nonpigmented ciliary epithelial cell fluid release and reduces mouse intraocular pressure. *Current eye research*, 30(9), 747-754.
168. Yuan, L., & Neufeld, A. H. (2000). Tumor necrosis factor- α : A potentially neurodestructive cytokine produced by glia in the human glaucomatous optic nerve head. *Glia*, 32(1), 42-50.
169. Yücel, Y. H., Johnston, M. G., Ly, T., Patel, M., Drake, B., Gümüş, E., ... & Horvath, E. (2009). Identification of lymphatics in the ciliary body of the human eye: a novel “uveolymphatic” outflow pathway. *Experimental eye research*, 89(5), 810-819.
170. Zeng, H. L., & Shi, J. M. (2018). The role of microglia in the progression of glaucomatous neurodegeneration-a review. *International journal of ophthalmology*, 11(1), 143.
171. Zhao, J., Wang, S., Zhong, W., Yang, B., Sun, L., & Zheng, Y. (2016). Oxidative stress in the trabecular meshwork. *International journal of molecular medicine*, 38(4), 995-1002.

VALSTYBINĖ MAISTO IR VETERINARIJOS TARNYBA

LEIDIMAS
ATLIKTI BANDYMO SU GYVŪNAIS PROJEKTĄ2019-01-14 Nr. G2-100
Vilnius

Vadovaujantis Lietuvos Respublikos gyvūnų gerovės ir apsaugos įstatymo 16 straipsnio 4 dalimi, Mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimais, patvirtintais Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos direktoriaus 2012 m. spalio 31 d. įsakymu Nr. B1-866 „Dėl Mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimų patvirtinimo“, Europos konvencija dėl eksperimentiniais ir kitais mokslo tikslais naudojamų stuburinių gyvūnų apsaugos (OL 2004 m. specialusis leidimas, 15 skyrius, 4 tomas, p. 325) ir remiantis Lietuvos bandomųjų gyvūnų naudojimo etikos komisijos prie Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos 2018-12-14 išvada Nr. 19 „Dėl leidimo atlikti bandymus su gyvūnais“;

l e i d i m a toliau nurodytam ūkio subjektui atlikti bandymo su gyvūnais projektą.

Duomenys apie ūkio subjektą:

pavadinimas Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centras;

adresas Saulėtekio al. 7, Vilnius;

kodas Juridinių asmenų registre 211950810.

Duomenys apie bandymo su gyvūnais projektą:

pavadinimas „Akių ligų medikamentinio gydymo efektyvumo, farmakokinetikos ir farmakodinamikos tyrimas naudojant pelių ir žiurkių modelius mokslo ir mokymo tikslais“;

vadovas dr. Symantas Ragauskas;

naudojami gyvūnai 790 vnt. žiurkių ir 1570 vnt. pelių

Duomenys apie bandymo su gyvūnais projekto atlikimo vietą:

pavadinimas Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centras;

adresas Saulėtekio al. 7, Vilnius.

Duomenys apie veterinarinius vaistus, vaistinius preparatus ar kitas medžiagas (toliau – vaistai), kurie bus naudojami vykdant bandymo su gyvūnais projektą*:

Eil. Nr.	Vaisto pavadinimas	Gamintojas	Vaistinė forma	Kiekis, reikalingas vykdant bandymo su gyvūnais projektą
1.	BIOKETAN	Vetoquinol Biowet Sp.z.o.o.	Injekcinis tirpalas	620 ml
2.	ANTISEDAN VET	Orion Corporation Orion Pharma	Injekcinis tirpalas	750 ml
3.	DOMITOR VET	Orion Corporation Orion Pharma	Injekcinis tirpalas	600 ml
4.	BUPAQ	Richter Pharma AG	Injekcinis tirpalas	50 ml

Leidimas atlikti bandymo su gyvūnais projektą (toliau – leidimas) galioja iki 2021 m. gruodžio 31 d.

Direktorius



Darius Remeika

* – Nurodomi naudojamo (-ų) vaisto (-ų) pavadinimas (-ai), gamintojas (-ai), vaistinė (-ės) forma (-os), kiekis, reikalingas vykdant bandymo su gyvūnais projektą. Jei vykdant bandymo su gyvūnais projektą vaistai gyvūnams nenaudojami, leidime įrašomas žodis „Nenaudojama“.