

RINGKASAN

Peran Transforming Growth Factor–beta dan Nitric Oxide terhadap timbulnya Apoptosis dan Nekrosis jaringan Trabecular Meshwork penderita Glaukoma Sudut Tertutup Primer.

Observasi klinis dan penelitian biomolekuler untuk menjelaskan patogenesis Glaukoma Sudut Tertutup Primer *Creeping*

Adelein Nannerl Witrya Hoetarjo-Pakasi

Glaukoma merupakan penyebab kebutaan nomor 2, baik di Indonesia maupun di dunia. Angka kebutaan yang tinggi ini disebabkan beberapa hal. Pertama adalah patogenesis kelainan yang belum dipahami dengan benar yang mengakibatkan penatalaksanaan yang tidak tepat. Kebutuhan akibat glaukoma juga disebabkan karena penanganan yang terlambat akibat ketidak-tahuan penderita akan kelainan yang sedang dideritanya.

Terdapat dua jenis glaukoma di mana penderita sering mendapatkan penanganan yang terlambat. Pertama, Glaukoma Sudut Terbuka Primer (GSBP) yang menunjukkan perjalanan penyakit panjang, menahun dan progresif, yang terjadi akibat meningkatnya Tekanan Intra Okuli (TIO) yang perlahan. Penderita GSBP tidak pernah merasakan sakit ataupun menunjukkan tanda merah pada matanya karena kemampuan adaptasi yang dimiliki makhluk hidup. Adaptasi juga menyebabkan penderita tak sadar akan kekurangannya. Ketika defek lapang pandang sudah amat luas barulah penderita sadar namun saat itu kerusakan saraf optik yang ireversibel telah terjadi.

Penanganan terlambat juga dialami penderita Glaukoma Sudut Tertutup Primer (GSTP) *Creeping* pada mana TIO meningkat amat perlahan; keadaan ini janggal untuk sebuah sudut tertutup. Tujuan penelitian adalah untuk mengungkapkan kejadian ini dengan cara membandingkannya terhadap dua bentuk glaukoma yang juga terjadi pada sebuah sudut tertutup yaitu GSTP Akut Lanjut dan GSTP Subakut.

GSTP Akut Lanjut dan GSTP Subakut terjadi karena *pupillary block* yang dapat dengan mendadak menghambat aliran keluar cairan akuos dari dalam bola mata. Keluhan penderita amat tergantung pada cepat dan tingginya TIO meningkat.

Pada GSTP Akut Lanjut, TIO meningkat amat cepat dan tinggi, sehingga timbul rasa sakit hebat di mata di sertai perasaan mual sampai (mau) muntah. Ketajaman penglihatan menurun dengan cepat karena timbulnya edema kornea. Semua keadaan ini menyebabkan penderita segera mencari pertolongan dokter.

Pada GSTP Subakut, TIO meningkat mendadak hanya untuk waktu yang singkat dan menjadi normal kembali secara spontan. Keadaan ini dapat di bantu dengan cara penderita menekan bola matanya (karena rasa sakit), dan ternyata tindakan ini dapat membantu karena TIO menurun spontan. Tekanan di dalam bola mata dapat meningkat lagi secara mendadak, peristiwa ini terjadi berulang sehingga akhirnya terjadi juga kenaikan TIO yang terlalu tinggi yang dapat merusakkan saraf optik.

Pada GSTP *Creeping*, TIO meningkat amat perlahan (bertahun-tahun) tanpa pernah menimbulkan rasa sakit. Ketidak-tahuan penderita akan adanya sebuah kelainan pada matanya menyebabkannya terlalu sering datang pada stadium akhir penyakit. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kejadian ini di sebabkan *iris crowding* pada dasar sudut Bilik Depan Mata sehingga ruangan BMD menjadi sempit / dangkal dan terjadi aposisi iris terhadap bagian perifer kornea. Dalam jangka panjang akan timbul perlekatan yang akan makin membuat sudut sempit itu menjadi lebih sempit lagi. Penyempitan yang perlahan menimbulkan hambatan perlahan dan kenaikan TIO yang perlahan pula.

Meskipun tidak berbeda bermakna namun secara klinis ternyata penderita GSTP *Creeping* merupakan kelompok usia yang paling tua di antara ketiga jenis GSTP. Berbeda dengan kedua jenis GSTP lainnya yang di dominasi oleh penderita perempuan, maka pada GSTP *Creeping* jumlah penderita laki-laki sama dengan perempuan. Penderita GSTP *Creeping* adalah mereka yang datang ke RS paling lambat (sampai bertahun) dan berbeda dengan kedua jenis GSTP lainnya yang ketika datang masih mempunyai tajam penglihatan yang cukup baik maka penderita GSTP *Creeping* datang ketika kedua belah matanya telah menderita atrofi saraf optik lanjut. Hal tersebut di buktikan dengan terdapatnya penggaungan cawan optik yang besar, yang berbeda bermakna di banding dua bentuk GSTP lainnya.

Melalui sebuah gonioskop, ketiga bentuk GSTP dapat di bedakan secara kwalitatif. Apabila di gunakan sebuah *Ultrasound Biomicroscope* maka membedakan besarnya sudut BMD dapat di lakukan secara kwantitatif dan akurat, namun belum

seluruh pusat Glaukoma di dunia mempunyai alat canggih ini (juga belum di RSSA Malang).

Dengan mempelajari reaksi sel endotel TM pada berbagai bentuk GSTP di harapkan di temukan perbedaan mendasar pada ketiga bentuk glaukoma sudut tertutup karena pada ketiga bentuk glaukoma tersebut terdapat perbedaan kenaikan TIO.

Telah di buktikan beberapa peneliti sebelumnya bahwa *shear stress* yang perlahan dan ringan akibat aliran cairan dalam pembuluh merangsang timbulnya Transforming Growth Factor beta (TGF- β) sedangkan tekanan hidraulik yang tinggi dan mendadak yang di berikan pada endotel merangsang timbulnya Nitric Oxide (NO).

TGF- β berfungsi pada TM sebagai penyeimbang TIO, melalui mekanisme perubahan matrik ekstra seluler pada membrana basalis endotel TM. NO berfungsi pada TM sebagai penyeimbang TIO melalui perubahan vakuol TM dengan cara merelaksasi vakuol apabila tekanan mulai meningkat. Dalam jumlah yang tinggi dan mendadak NO tidak lagi mungkin menjamin keseimbangan cairan akuos dalam TM bahkan dapat menimbulkan apoptosis dan dalam jumlah amat berlebihan, iskemia yang timbul dapat menyebabkan timbulnya nekrosis.

Konsentrasi NO dan TGF- β yang akan di periksa di ambil dari cairan akuos, sedangkan apoptosis serta nekrosis di tentukan berdasarkan pemeriksaan jaringan TM.

Hipotesis yang di ajukan adalah bahwa nilai ke empat variabel (TGF- β , NO, Apoptosis dan Nekrosis) pada GSTP *Creeping* berada di luar kedua GSTP lainnya, karena secara klinis GSTP *Creeping* di anggap mempunyai patogenesis yang berbeda di banding kedua jenis GSTP lainnya.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa variabel NO dan indek Apoptosis berbeda bermakna, sedangkan variabel TGF- β dan indek Nekrosis tidak berbeda bermakna. Untuk variabel yang berbeda bermakna, GSTP *Creeping* mempunyai nilai yang berada di antara GSTP Akut Lanjut dan GSTP Subakut. Untuk variabel yang tidak berbeda bermakna justru nilainya di luar variabel kedua jenis GSTP lainnya.

Kesimpulan yang dapat di tarik adalah bahwa GSTP *Creeping* mempunyai mekanisme seperti GSTP Akut Lanjut dan GSTP Subakut, namun juga mempunyai mekanisme tersendiri. Dengan demikian pada GSTP *Creeping* ada sebuah multi mekanisme (*pupillary block* dan *iris crowding*).

Variabel NO yang bermakna menunjukkan bahwa sifat dan amplitudo stres yang mengenai endotel berpengaruh. Variabel apoptosis yang bermakna menunjukkan bahwa mungkin ada peran tTgase (dan bukan TGF- β 2) pada peristiwa ini. Untuk kedua variabel yang bermakna ini tidak ada *cut off* yang bisa di peroleh untuk GSTP *Creeping*.

Kata Kunci : Trabecular meshwork, TGF- β 2, NO, Apoptosis, Nekrosis



SUMMARY

Transforming Growth Factor-Beta2 and Nitric Oxide as inducible factors of Apoptosis and Necrosis on the onset of Creeping Angle Closure Glaucoma

A clinical observation and biomolecular study to explain the mechanism of Creeping Angle Closure Glaucoma

Adelein Nannerl Witrya Hoetarjo-Pakasi

Glaucoma is the second cause of blindness in the whole world. This big sum of blindness is caused by the unknown pathogenesis of glaucoma that prevents doctors to help glaucoma patients properly. There are also a lot of patients who got too late a help caused by their ignorance.

There are two types of glaucoma where patients got too late a help. The first is a type of glaucoma in a wide open anterior chamber. It is called Primary Open Angle Glaucoma (POAG), a chronic longstanding and progressive disease caused by an increased intra ocular pressure (IOP). Patients suffering from POAG never show signs and symptoms until late in their disease when their visual fields are reduced to a minimum. In this stage an irreversible blindness occur.

The second is Creeping Angle Closure Glaucoma (CrACG) occurring in a closed anterior chamber in which also an increased IOP happened to raise very slowly. It is unusual to have a slow raised pressure in a closed angle. The 2 other types of glaucoma are Acute Angle Closure Glaucoma (AACG) and Subacute Angle Closure Glaucoma (SACG). In AACG there is sudden increase of IOP caused by pupillary block. Patients with AACG show a painful red eye with a sudden decrease of visual acuity. This will bring patients directly to a doctor and they can be helped early in the progress of their disease. In SACG a sudden raise in IOP occur but it relieves directly without any drugs or surgery. Afterwards it will again raise the IOP, patients are aware if it already burden the optic nerve.

In patients with CrACG the anterior chamber is closing slowly from the base of the angle. This is caused by iris crowding at the base of the angle and apposition of iris

to the peripheral part of the cornea. This process leads to a resistance for aqueous to flow into the Trabecular Meshwork and a slow raised IOP found. After years this close position sticks these organs together..

A big question that needs an answer is how it is possible to have that slow raised IOP in a closed angle. Purpose of this study is to find pathogenesis of CrACG by comparing it with the 2 other types of angle closure glaucoma. A biomolecular study was done to find an answer for the pathogenesis of CrACG.

Although not significantly different, clinically CrACG patients turned out to be the oldest group comparing to AACG and SACG. In AACG and SACG there is domination of women suffering the disease, but in CrACG the ratio of man is equal to women. Patients with CrACG come very late in their disease, this is true according to the c/d ratio that is significantly bigger than AACG and SACG.

A gonioscope can differentiate these 3 types of angle closure glaucoma qualitatively. If an UBM is used than a quantitative measurement can differentiate them better, but not every glaucoma center can provide this sophisticate machine.

Studying the endothelial cell reaction to stress put on these cell may help differentiate these 3 types of ACG and may tell the pathogenesis or mechanism of the slow rise of IOP in CrACG.

From studies earlier done with cultured trabecular cells it was found that an acute rise from hydraulic pressure can stimulate cells to produce Nitric Oxide (NO). On the other hand a slow shear stress in a vessel stimulate endothelium to produce Transforming Growth Factor Beta. (TGF- β).

TGF- β has a role in proliferation and if a big amount of TGF- β is produced there will be fibrosis in tissues. NO has a regularly role in the vascular endothelium and smooth muscle elsewhere to keep pressure in a balance. If NO is produced in an abundance, apoptosis and necrosis will occur.

Concentration of TGF- β 2 and NO will be measured from the aqueous humor tapped on site of operation. Apoptosis and necrosis could be counted from the TM that was cut on operation.

Hypotheses for the study is that TGF- β 2, NO, Apoptosis and Necrosis are variables that will be different in CrACG, since CrACG is another type of ACG. Concentration of TGF- β 2 will be the highest in CrACG and NO the lowest in Cr ACG.

Index of apoptosis will be the biggest in CrACG and index of necrosis will be the smallest in CrACG.

It turned out that there are significant differences for NO and Apoptosis but not for TGF- β 2 and Necrosis. For the significant variable differences, CrACG is located between AACG and SACG. For the not significant variable differences, CrACG is outside the variables of AACG and SACG.

Nitric Oxide, the variable that is significant different explains that amplitude of stress plays a significant role. Apoptosis, the variable that is also significant different will then explain the role of NO, maybe through tTgase (tissue transglutaminase) and not the role of TGF- β 2 (since TGF- β 2 is not a significant variable). For both these significant variables, biomolecular parameters of CrACG lies between AACG and SACG.

Conclusion is that CrACG has a multiple mechanism, both an iris crowding as well as a pupillary block mechanism. This study was not able to produce a cut off parameter for NO and Apoptosis especially for CrACG. If a further study should be done than variables like NO, Apoptosis and tTgase should be taken first.

Keywords : Trabecular Meshwork, TGF- β 2, NO, Apoptosis and Necrosis.

ABSTRACT

Transforming Growth Factor-Beta2 and Nitric Oxide as inducible factors for Apoptosis and Necrosis on the onset of Angle Closure Glaucoma

A clinical observation and biological and molecular study to explain the mechanism of Creeping Angle Closure Glaucoma

Adelein Nannerl Witrya Hoetarjo-Pakasi

OBJECTIVE: Creeping Angle Closure Glaucoma (CrACG) is one type of closed angle caused by iris crowding. Although it is a closed angle but it has symptoms mimicking symptoms of open angle glaucoma. It often put patients in a badly condition (blind) without knowing. Up till now there is no solid explanation for the patogenesis or mechanism of the disease. A study was done to measure biomolecular parameters of aqueous humor and trabecular meshwork (TM) in order to explain mechanism of CrACG. The study was done by comparing it with Acute Angle Closure Glaucoma (AACG) and Subacute Angle Closure Glaucoma (SACG), since these later ones are closed angles glaucomas caused by pupillary blocking with different symptoms compared to CrACG.

Design: Aqueous humor and TM tissue was taken during trrabeculectomy Transforming Growth Factor-Beta2 (TGF- β 2) is a cytokine produced when endothelial cells are exposed to shear stress, this kind of stress can be found in CrACG. Nitirc Oxide is a gas produced when endothelial cells are exposed to acute and high hydraulic pressure, this kind of pressure can be found in AACG and SACG. TGF- β 2 and NO are different products after different stress on endothelial cells.

TGF- β 2 which is produced by trabecular cells, has an effect on regulation of aqueous humor dynamics by changing extra cellular matrix of the endothelium. Nitric Oxide is produced by oxidation of L-arginine through Nitric Oxide Synthases, which is found on epithelial cells of the iris and ciliary body. Nitirc Oxide has also an effect on homeostasis of intraocular pressure by changing volume of vacuoles in the TM.

Over production of TGF- β 2 is followed by fibrosis and apoptosis. Overproduction of NO is followed by apoptosis and if it is too much then necrosis will occur.

TGF- β 2 is measured by the immunosorbent assay (ELISA). Nitric Oxide (NO) is measured by chemiluminescence assay.

Apoptosis is measured through caspase3 by Apoptag Kit. TGF- β 2 and necrosis is measured by hematoxylin eosin. Data obtained was tested through ANOVA and correlation analysis.

Result : NO ($p=0.026$) and Apoptosis ($p = 0.01$) are the only 2 variables that significantly differentiates CrACG from Acute Angle Closure Glaucoma (AACG) and Subacute Angle Closure Glaucoma (SACG), but the parameters of CrACG lies between parameters of AACG and SACG.

It means that CrACG has a pupillary blocking factor also.

Apoptosis is a factor caused by TGF- β 2 and also by NO. Since TGF- β 2 is a variable not significant different but NO is a variable of significant different, it means that apoptosis in CrACG is caused by NO. Necrosis is a not factor of importance in this study.

Conclusion : CrACG is a type of angle closure glaucoma with a multimechanism, that is both and iris crowding and pupillary blocking. A cut off variable of NO and Apoptosis for CrACG can not be produced in this study.

Keywords : Creeping Angle Closure Glaucoma, TGF- β 2 , NO, Apoptosis, Necrosis.