

АНОТАЦІЯ

Яковець А. І. Експериментальне обґрунтування нових методів лікування глаукоми. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 22 Охорона здоров'я за спеціальністю 222 Медицина (наукова спеціальність «Офтальмологія»). – Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика МОЗ України, Київ, 2021.

Дисертація присвячена проблемі підвищення ефективності лікування глаукомної оптичної нейропатії шляхом визначення впливу культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня на морфо-функціональний стан зорового аналізатора в експерименті.

Глаукома – одне з найбільш інвалідизуючих захворювань серед головних причин слабобачення та сліпоти в усьому світі. На сьогоднішній день, за даними досліджень, 78 млн людей хворіють глаукомою, а за прогнозами до 2040 року кількість хворих на глаукому збільшиться до 111,8 млн. Загальна поширеність глаукоми серед осіб віком від 40 до 80 років становить 3,54% [1-3]. Крім того, принаймні, половина хворих на глаукому не знають, що хворіють цим захворюванням. А в деяких країнах, що розвиваються, 90% глаукоми залишаються недіагностованими [4].

В Україні ситуація з поширеністю глаукоми також невтішна. Тривалий безсимптомний перебіг, несвоєчасна діагностика та лікування, і як наслідок – прогресуюча втрата зорових функцій призводять до слабобачення та сліпоти, зниження професійної працездатності та інвалідності по зору, відносять глаукому до соціально-значущих захворювань. Так, поширеність глаукоми у дорослих віком від 18 років і вище склала 612,7 на 100 000 населення, а серед населення працездатного віку становила 133,1 [5].

На сьогодні лікування глаукоми залишається надзвичайно складним завданням. Використання гіпотензивної терапії, лазерних та хірургічних методів лікування глаукоми, на жаль, не завжди призводить до зупинки дегенеративного процесу [6]. Саме тому все більшого поширення набуває нейропротекція, яка спрямована на

сповільнення та запобігання загибелі нейронів, для підтримки їх фізіологічної функції [7].

Одним з таких напрямків у лікуванні глаукоми є клітинна терапія з використанням стовбурових клітин. Результати досліджень показали позитивний вплив стовбурових клітин та можливості їх застосування в офтальмології. Ці досягнення ґрунтуються на таких унікальних властивостях стовбурових клітин, як здатність до самооновлення, можливість диференціювання в специфічні види клітин [8,9]. Однак, важливим аспектом є правильний та адекватний вибір клітинного типу.

Зокрема, на сьогоднішній день залишається нез'ясованим застосування культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня (мСК-ПНГ) при лікуванні глаукомної оптичної нейропатії.

Загалом, на підставі вищевикладеного, можна вважати, що вивчення нових ефективних методів лікування глаукоми із застосуванням клітинної терапії є актуальним та доцільним на сучасному етапі розвитку офтальмологічної науки.

Таким чином, метою нашого дослідження було підвищення ефективності лікування глаукомної оптичної нейропатії шляхом визначення впливу культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня на морфо-функціональний стан зорового аналізатора в експерименті.

У процесі виконання даного дисертаційного дослідження основними завданнями роботи були: вивчення впливу культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня на стан сітківки та зорового нерва при адреналіновій моделі глаукоми за умови внутрішньовенного, парабульбарного та ретробульбарного введення клітин. Крім того, ми вивчали зміни функціонального стану зорового аналізатора при різних способах введення культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня при адреналіновій моделі глаукоми. Вивчалися також маркери оксидативного стресу в тканинах сітківки після моделювання глаукоми та після введення культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня. На підставі отриманих результатів дослідження

теоретично обґрунтували ефективність застосування культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня у лікуванні глаукоми.

Об'єктом дослідження в роботі була глаукома (МКХ-10, код Н40.0 Глаукома).

Предметом дослідження в роботі були: морфо-функціональний стан зорового аналізатора при адреналіновій моделі глаукоми до та після введення культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня, маркери оксидативного стресу в тканинах сітківки ока після моделювання глаукоми та введення культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня.

У процесі дослідження були використані інструментальні, нейрофізіологічні, гістологічні, біохімічні та статистичні методи дослідження.

Матеріал експериментального дослідження – лабораторні щурі лінії Wistar. Всі тварини були розподілені на 6 груп. Група контролю – 10 інтактних щурів (20 очей). В групі I – 10 щурів (20 очей) – проводилося моделювання глаукоми без введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ. В групі II – 10 щурів (20 очей) – проводилося моделювання глаукоми та досліджувався вплив культивованих постнатальних мСК-ПНГ на стан сітківки та зорового нерва при внутрішньовенному введенні клітин. В групі III – 10 щурів (20 очей) – проводилося моделювання глаукоми та досліджувався вплив культивованих постнатальних мСК-ПНГ при парабульбарному введенні клітин. В групі IV – 10 щурів (20 очей) – проводилося моделювання глаукоми та досліджувався вплив культивованих постнатальних мСК-ПНГ при ретробульбарному введенні клітин. В групі V, яка поділялась на дві підгрупи, досліджувався біохімічний стан сітківки: Va – 10 щурів (20 очей), проводилося моделювання глаукоми, та група Vб – 10 щурів (20 очей), проводилося введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ.

У першому розділі дисертації проведено детальний аналіз відомих моделей глаукомної оптичної нейропатії у лабораторних тварин та адреналін індукованої моделі глаукоми, який дозволив зробити висновок, що на сьогоднішній день дана модель є простою, доступною та адекватною клінічним вимогам. Також в першому

розділі детально описано дизайн дослідження та наведений методологічний шлях досліджень: інструментальних, нейрофізіологічних, гістологічних, біохімічних та статистичних методів.

Другий розділ дисертації присвячено вивченню морфологічних та морфометричних змін сітківки та зорового нерва після моделювання глаукоми та введення культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня різними способами доставки.

У третьому розділі дисертації представлено результати дослідження внутрішньоочного тиску та функціональних змін зорового аналізатора після моделювання глаукоми та введення культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня при різних способах доставки.

У четвертому розділі дисертації досліджено вплив культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня на маркери оксидативного стресу в сітківці ока при адреналіновій моделі глаукоми.

П'ятий розділ присвячено аналізу та узагальненню отриманих результатів проведеного дисертаційного дослідження, їх порівняння з існуючими даними, доведена наукова та практична цінність отриманих результатів, виявлені шляхи їх подальшого використання в наступних дослідженнях для лікування глаукоми.

Наукова новизна отриманих результатів. Завдяки проведенню цього дослідження, що носило експериментальний характер, вперше оцінено ефективність використання культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня при внутрішньовенному, парабульбарному та ретробульбарному введенні при адреналіновій моделі глаукоми.

Отримані нові наукові знання щодо впливу культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня на відновлення структури сітківки та зорового нерва, що відкрило принципово нові можливості в лікуванні глаукомної оптичної нейропатії.

Дослідженням встановлено, що після введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ відбувалася нормалізація гістологічної будови сітківки та зорового нерва, тобто зменшення набряку всіх шарів, відновлення кількості волокон і синаптичних

контактів у внутрішньому і зовнішньому сітчастих шарах, нормалізація і відновлення структурної організації зовнішнього та внутрішнього ядерного шару, зменшення набряку та впорядкованість розташування волокон в шарі паличок і колбочок.

Встановлено, що введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ ініціює прискорення та підвищення якості регенерації зорового нерва, про що свідчить відновлення кількості повноцінних нервових волокон, колонок гліальних клітин, які утворені переважно із олігодендроцитів. Виявлено, що через 1 місяць після парабульбарного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ, показник питомої кількості нервових волокон був достовірно більше за відповідний показник у групі тварин з моделлю глаукоми без введення клітин на 37,09% (K-W, Dunn's test, $p < 0,0001$) та на 53,97% (Tukey's test, $p < 0,0001$) через 3 місяці після введення клітин. При ретробульбарному введенні культивованих постнатальних мСК-ПНГ показник питомої кількості нервових волокон був більше на 55,42% (K-W, Dunn's test, $p < 0,0001$) та на 50,61% (Tukey's test, $p < 0,0001$), через 1 та 3 місяці після введення клітин, відповідно, у порівнянні з групою тварин після моделювання глаукоми без введення клітин. Також через 1 місяць після внутрішньовенного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ показник питомої кількості нервових волокон був більше на 30,40% (Tukey's test, $p = 0,0006$) та через 3 місяці не відрізнявся від показника у групі тварин з моделлю глаукоми без введення клітин (Tukey's test, $p = 0,1910$).

Виявлено позитивну динаміку показників ЗВП на спалах при різних способах доставки культивованих постнатальних мСК-ПНГ. Встановлено зниження латентного періоду за параметром N1 при парабульбарному введенні клітин, в середньому на 1,5 мс (95% ВІ 1,3 мс – 1,7 мс) ($p < 0,05$), при ретробульбарному введенні клітин в середньому на 1,75 мс (95% ВІ 1,5 мс – 1,95 мс) ($p < 0,05$) та за параметром P2 при парабульбарному введенні клітин в середньому на 1,4 мс (95% ВІ 0,95 мс – 2,0 мс) ($p < 0,05$), при ретробульбарному введенні клітин в середньому на 2,15 мс (95% ВІ 1,8 мс – 2,5 мс) ($p < 0,05$). Крім того, при внутрішньовенному введенні клітин відзначено тенденцію до зниження латентного періоду за

параметром N1 в середньому на 0,85 мс (95% ВІ 0,6 мс – 1,1 мс) ($p<0,05$) та за параметром P2 в середньому на 1,3 мс (95% ВІ 0,8 мс – 2,0 мс) ($p<0,05$).

Виявлено збільшення показника амплітуди P1-N1 при внутрішньовенному введенні клітин в середньому на 0,9 мкВ (95% ВІ 0,6 мкВ – 1,3 мкВ) ($p<0,05$), при парабульбарному введенні клітин в середньому на 1,5 мкВ (95% ВІ 1,2 мкВ – 1,6 мкВ) ($p<0,05$) та при ретробульбарному введенні клітин в середньому на 1,5 мкВ (95% ВІ 1,2 мкВ – 1,6 мкВ) ($p<0,05$). Крім того, встановлено збільшення показника амплітуди N1-P2 при внутрішньовенному введенні клітин в середньому на 0,8 мкВ (95% ВІ 0,55 мкВ – 1,0 мкВ) ($p<0,05$), при парабульбарному введенні клітин в середньому на 1,75 мкВ (95% ВІ 1,6 мкВ – 1,85 мкВ) ($p<0,05$) та при ретробульбарному введенні клітин в середньому на 2,1 мкВ (95% ВІ 1,8 мкВ – 2,2 мкВ) ($p<0,05$).

Встановлено, що при порівнянні груп з ретробульбарним, парабульбарним та внутрішньовенним введенням культивованих постнатальних мСК-ПНГ між собою позитивний ефект трансплантації клітин при адреналіновій моделі глаукоми найбільш виражений при парабульбарному та ретробульбарному введенні клітин.

Доповнені наукові дані про особливості біохімічного стану сітківки при адреналіновій моделі глаукоми в експерименті на тваринах. Встановлено збільшення продукції активних форм кисню та продуктів перекисного окислення ліпідів в сітківці ока лабораторних тварин. Ці дані свідчать про розвиток оксидативного стресу, який призводить до загибелі гангліонарних клітин сітківки та їх аксонів.

Виявлено зміни маркерів оксидативного стресу в сітківці ока після введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ, а саме відмічено вірогідне зниження супероксидного аніон-радикала на 48,31% ($p<0,05$) та гідроксильного радикала на 55,1% ($p<0,05$) при парабульбарному та ретробульбарному введенні клітин.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані результати проведених експериментальних досліджень щодо застосування культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня при

адреналіновій моделі глаукоми дозволили поглибити та доповнити існуючі знання у лікуванні глаукомної оптичної нейропатії.

Ключові слова: глаукома, культивовані постнатальні мультипотентні стовбурові клітини-похідні нервового гребеня, адреналінова модель глаукоми, глаукомна оптична нейропатія.

Список публікацій здобувача:

1. Петренко ОВ, Яковець АІ. Оцінка функціонального стану зорового аналізатора після клітинної терапії глаукоми в експерименті. Вісник проблем біології і медицини. 2020;2(156):143-8. DOI: 10.29254/2077-4214-2020-2-156-143-148
2. Рыков СО, Шаргородська ІВ, Яковець АІ, та співавтори. Катехоламініндуковані морфофункціональні порушення і окисний стрес у сітківці ока щурів. Фізіологічний журнал. 2020;66(2-3):27-36. DOI: 10.15407/fz66.2-3.027
3. Яковець АІ. Клітинна терапія глаукомної оптичної нейропатії в експерименті (короткострокові результати). «Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П. Л. Шупика». 2018;32:33-40.
4. Rykov S, Petrenko O, Yakovets A, Zubov D, Vasyliiev R. Experimental rationale of the use of cell therapy for the treatment of glaucoma optical neuropathy. «EUREKA: Health Sciences». 2020;2:40-6. DOI: 10.21303/2504-5679.2020.001187
5. Петренко ОВ, Яковець АІ, Васильєв РГ. Роль мультипотентних стовбурових клітин у офтальмології (огляд літератури). Архів офтальмології України. 2018;6(2):75-9.

Наукові праці які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

6. Рыков СА, Петренко ОВ, Яковець АІ, и соавторы. Мультипотентные стволовые клетки-производные нервного гребня в лечении индуцированной адреналиновым стрессом глаукомы. Матеріали ІV наук.-практ. конф. "Інновації в нейрохірургії" в рамках VI Міжнародного медичного конгресу "Впровадження сучасних досягнень медичної науки в практику охорони здоров'я України"; 2017 Квіт 25-26; Київ.

Київ: ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України»; 2017, с. 52.

7. Рыков СА, Петренко ОВ, Яковец АИ, и соавторы. Перспективы регенеративной медицины в лечении глаукомной оптической нейропатии. Международная конференция. Регенеративные технологии в современной медицине; 2017 Май 25-26; Одесса. Одесса; 2017, с. 60-1.
8. Рыков СА, Петренко ОВ, Яковец АИ, и соавторы. Исследование терапевтического потенциала мультипотентных стволовых клеток-производных нервного гребня на модели индуцированной адреналиновым стрессом глаукомы. Материалы науч.-практ. конф. с междунар. участием. Филатовские чтения – 2017; 2017 Май 25-26; Одесса. Одесса; 2017, с. 68.
9. Rykov S, Petrenko O, Yakovets A, et al. Evaluation of the effectiveness of stem cell therapy with use of adult multipotent neural crest-derived stem cells for modeled adrenal-induced glaucoma treatment. European Society of Ophthalmology Congress. 2017 June 10-13; Barcelona, Spain. 2017, p. 106.
10. Петренко ОВ, Яковець АІ, Клименко ПП, Зубов ДА, Родніченко АЕ, Васильєв РГ. Застосування клітинних технологій в лікуванні глаукомної оптичної нейропатії. В: Рыков СО, редактор. Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю. Рефракційний пленер'17; 2017 Жов 20-21; Київ. Київ; 2017, с. 94-5.
11. Рыков СО, Петренко ОВ, Яковець АІ, та співавтори. Клітинна терапія в офтальмології. Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю. Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині; 2017 Лист 9-10; Київ. Клітинна та органна трансплантологія. 2017;5(2):245.
12. Rykov SA, Petrenko OV, Yakovets AI, et al. Experimental Study of the Influence of Neural Crest-Derived Multipotent Stem Cells on the State of the Visual Analyzer in Glaucoma. Tbilisi International Ophthalmology Conference. 2017 December 16-17; Tbilisi, Georgia. 2017, p. 22.
13. Рыков СА, Петренко ОВ, Яковец АИ, Зубов ДА, Васильев РГ. Перспективы использования мультипотентных стволовых клеток-производных нервного гребня

- в офтальмології. Матеріали XIV з'їзду офтальмологів України; 2018 Трав 23-25; Одеса. Одеса: Чорномор'я; 2018, с. 264-5.
14. Rykov S, Petrenko O, Yakovets A, et al. Regenerative medicine approaches in ophthalmology. В: Риков СО, редактор. Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю. Рефракційний пленер'18; 2018 Жов 18-19; Київ. Київ; 2018, с. 90-1.
 15. Петренко ОВ, Яковець АІ, Васильєв РГ. Перспективи клітинної терапії в лікуванні глаукомної оптичної нейропатії. В: Завгородня НГ, Риков СО, редактори. Матеріали наук.-практ. конф. офтальмологів України. Шевальовські читання'19; 2019 Черв 20-21; Запоріжжя. Запоріжжя; 2019, с. 37-9.
 16. Петренко ОВ, Яковець АІ. Вплив мультипотентних стовбурових клітин на функціональний стан зорового аналізатора в експерименті. Матеріали Всеукраїнської наук.-практ. конф. «Актуальні питання офтальмології»; 2020 Вер 23-24; Телеміст Одеса – Тернопіль. Одеса; 2020, с. 130-2.
 17. Риков СО, Шаргородська ІВ, Яковець АІ, та співавтори. Дослідження катехоламініндукованих морфофункціональних порушень і окисного стресу при моделюванні глаукоми. Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю. Рефракційний пленер'20; 2020 Жов 15-17; Київ. Київ; 2020, с. 95-7.

ANNOTATION

Yakovets A.I. Experimental justification of new glaucoma treatment options. – Qualified scientific work on the rights of the manuscript.

The dissertation for the degree of a Doctor of Philosophy in the field of knowledge 22 – «Healthcare» in the specialty 222 “Medicine” (academic specialty “Ophthalmology”). – Shupyk National Healthcare University of Ukraine of the MoH of Ukraine, Kyiv, 2021.

This dissertation is devoted to the issue of how to enhance the treatment effectiveness in glaucomatous optic nerve by identifying the effect of cultured adult multipotent neural crest-derived stem cells on the structure and functionality of the visual system in the experiment.

Glaucoma is one of the most debilitating diseases and among the leading causes of low vision and blindness worldwide. Currently, the research evidences that 78 million

people suffer from glaucoma, and, according to the projections, the number of glaucoma patients will rise to 111.8 million by 2040. The overall prevalence of glaucoma among individuals aged 40-80 comes to 3.54% [1-3]. Additionally, at least half of glaucoma patients are unsuspecting of having this disease. While, in some developing countries, 90% of glaucoma cases remain undiagnosed [4].

The prevalence pattern of glaucoma in Ukraine is unpromising as well. Durable latent progression, late diagnosis and treatment and gradual vision loss, as a result, lead to low vision and blindness, decreased work capacity and visual impairment; glaucoma is classified as a socially significant disease. Thus, the prevalence of glaucoma among adults aged 18 and older accounted for 612.7 per 100,000 population, and it came to 133.1 among the working-age population [5].

Nowadays, glaucoma treatment remains an extremely challenging task. Antihypertensive therapy, laser and surgical treatment techniques for glaucoma do not always terminate degeneration [6]. For this reason neuroprotection turns out to be increasingly widespread, and is aimed at slowing down and preventing neuronal cell death in order to maintain their physiological function [7].

One of the trends in glaucoma treatment is cell therapy using stem cells. Research findings has shown the health-promoting effect of stem cells and opportunities for using them in ophthalmology. These achievements are based on the unique properties of stem cells such as both the ability to self-renew and the ability to differentiate into specific cell types [8,9]. However, a crucial aspect is the correct and adequate selection of a cell type.

Among other things, benefits of using cultured adult multipotent neural crest-derived stem cells (NCSCs) in the treatment of glaucomatous optic nerve remain unclear to this date.

Generally speaking and based on the foregoing, we can consider the study of new effective techniques of glaucoma treatment, using cell therapy, as relevant and reasonable at the current stage of ophthalmology development.

Thus, the objective of our study was to increase the treatment effectiveness for glaucomatous optic nerve by identifying the effect of cultured adult multipotent neural

crest-derived stem cells on the structure and functionality of the visual system in the experiment.

When doing this dissertation research, the main tasks were the following: investigating the effect of cultured adult multipotent neural crest-derived stem cells on the retina and the optic nerve in case of the adrenaline model of glaucoma by means of intravenous, parabulbar and retrobulbar cell injections. Additionally, we studied functionality changes in the visual system in different routes of injecting cultured adult multipotent neural crest-derived stem cells in case of the adrenaline model. Markers of oxidative stress in retinal tissues were also studied after glaucoma simulation and injection of cultured adult multipotent neural crest-derived stem cells. The effectiveness of cultured adult multipotent neural crest-derived stem cells in glaucoma treatment was theoretically based on the study findings.

Glaucoma served as a study object (ICD-10, code H40.0, Glaucoma).

Study objects in the research project were: structure and functionality of the healthy visual system in case of the adrenaline model of glaucoma before and after injecting cultured adult multipotent neural crest-derived stem cells, markers of oxidative stress in retinal tissues after modeling glaucoma and injecting cultured adult multipotent neural crest-derived stem cells.

Medical imaging, neurophysiological, histological, biochemical and statistical methods were used in the research.

Wistar rats are the material of the research study. All animals were divided into 6 groups. The control group – 10 intact rats (20 eyes). Glaucoma, without injecting cultured adult NCSCs, was modeled in the group I, consisting of 10 rats (20 eyes). In the group II, consisting of 10 rats (20 eyes), glaucoma was modeled, and the effect of cultured adult NCSCs on the retina and the optic nerve, when injecting cells intravenously, was investigated. In the group III, including 10 rats (20 eyes), glaucoma was modeled and the effect of cultured adult NCSCs was studied in case of the parabulbar injection of cells. In the group IV – 10 rats (20 eyes), glaucoma was modeled and the effect of cultured adult NCSCs was studied in case of the retrobulbar injection of cells. Biochemical parameters of the retina were analyzed in the group V, divided into two subgroups: Va – 10 rats (20

eyes), glaucoma was modeled; and Vb – 10 rats (20 eyes), cultured adult NCSCs were injected.

The first section of the dissertation provides an in-depth analysis of widely accepted models of glaucomatous optic nerve in lab animals and adrenaline-induced glaucoma that enabled to conclude that this model is currently extra simple, available and adequately complying with clinical requirements. In the first section, we also described in detail the study design and demonstrated the methodological experimental approach: imaging, neurophysiological, histological, biochemical and statistical methods.

The second section of this dissertation is devoted to the study of the structural and morphometric changes in the retina and the optic nerve after modeling glaucoma and injecting cultured adult multipotent neural crest-derived stem cells when using different routes for injection.

The third section of the dissertation represents intraocular pressure values and the functional changes in the visual system after modeling glaucoma and injecting cultured adult multipotent neural crest-derived stem cells when using different routes for injection.

The effect of cultured adult multipotent neural crest-derived stem cells on the markers of oxidative stress in the retina when choosing the adrenaline model of glaucoma, was studied in the fourth section of the dissertation.

The fifth section is devoted to the analysis and consolidation of the results obtained in this dissertation research, their comparison with the data existing; scientific and practical value of the results was proved and the ways of using them in the following research on glaucoma treatment were identified.

Scientific novelty of the results. The effectiveness of cultured adult multipotent neural crest-derived stem cells, when using intravenous, parabulbar and retrobulbar injections in case of the adrenaline model of glaucoma, was assessed for the first time due to this research.

We have got new scientific knowledge of the effect of cultured adult multipotent neural crest-derived stem cells on the structure recovery of the retina and the optic nerve, and it provided fundamentally new opportunities for the treatment of glaucomatous optic nerve.

The studies revealed that after injecting cultured adult NCSCs the histologic structure of the retina and the optic nerve was recovered, namely the reduction of edema in all layers, restoration of the fiber number and synapses in inner and outer reticular layers, normalization and recovery of the structure of outer and inner nuclear layers, edema reduction and fiber orderliness in the layer of rods and cones.

Injections of cultured adult NCSCs were identified to initiate faster and more qualitative regeneration of the optic nerve, as evidenced by regaining the number of normal nerve fibers, radial glial cells, originating from oligodendrocytes. It was found that 1 month after parabolbar injection of cultured adult NCSCs the proportion of nerve fibers was significantly higher than the corresponding value in the group of animals, where the glaucoma model did not imply cell injection, by 37.09% (K-W, Dunn's test, $p<0.0001$) and 53.97% (Tukey's test, $p<0.0001$) 3 months after cell injection. The proportion of nerve fibers was higher by 55.42% (K-W, Dunn's test, $p<0.0001$) and 50.61% (Tukey's test, $p<0.0001$) in 1 and 3 months respectively in case of retrobulbar injection of cultured adult NCSCs as opposed to the group of animals after modeling glaucoma without cell injection. The proportion of nerve fibers was also higher by 30.40% (Tukey's test, $p=0.0006$) 1 month after intravenous injection of cultured adult NCSCs and, in 3 months, did not differ from the value in the group of animals, where glaucoma was modeled without cell injection (Tukey's test, $p=0.1910$).

We detected the positive shift of VEP values during flashes when choosing different routes of injecting cultured adult NCSCs. There was a decrease in the N1 parameter of the latent period by 1.5 ms (95% CI, 1.3 ms – 1.7 ms) ($p<0.05$) averagely in case of parabolbar cell injection, in case of retrobulbar cell injection – by 1.75 ms (95% CI, 1.5 ms – 1.95 ms) ($p<0.05$) averagely, and in the P2 parameter – by 1.4 ms (95% CI, 0.95 ms – 2.0 ms) ($p<0.05$) in case of parabolbar injection, and by 2.15 ms (95% CI, 1.8 ms – 2.5 ms) averagely in case of retrobulbar injection. Additionally, intravenous cell injection was indicative of a tendency to reduce the latent period in terms of the N1 parameter by 0.85 ms (95% CI, 0.6 ms – 1.1 ms) ($p<0.05$) averagely, and in terms of the P2 parameter by 1.3 ms (95% CI, 0.8 ms – 2.0 ms) ($p<0.05$) averagely.

An average increase in the P1-N1 amplitude by 0.9 μ V (95% CI, 0.6 μ V – 1.3 μ V) ($p < 0.05$) was detected when injecting cells intravenously, by 1.5 μ V (95% CI 1.2 μ V – 1.6 μ V) ($p < 0.05$) in case of parabulbar cell injection, and for retrobulbar cell injection it came to 1.5 μ V (95% CI 1.2 μ V – 1.6 μ V) ($p < 0.05$). In addition, an average increase in the N1-P2 amplitude by 0.8 μ V (95% CI 0.55 μ V – 1.0 μ V) ($p < 0.05$) was detected when injecting cells intravenously, by 1.75 μ V (95% CI 1.6 μ V – 1.85 μ V) ($p < 0.05$) in case of parabulbar injection, and by 2.1 μ V (95% CI 1.8 μ V – 2.2 μ V) ($p < 0.05$) for retrobulbar injection.

The positive effect of cell transplantation in case of the adrenaline model of glaucoma was found to be the most prominent if using parabulbar and retrobulbar routes when comparing the groups with retrobulbar, parabulbar and intravenous routes of injecting cultured adult NCSCs.

Research data on the biochemical features of the retina, in case of the adrenaline model of glaucoma in experiments involving animals, have been updated. The increased production of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation products was detected in the retina of lab animals. Such data indicated the occurrence of oxidative stress, leading to the death of retinal ganglion cells and their axons.

We detected shifts of the markers of oxidative stress in the retina after injecting cultured adult NCSCs, or, in other words, we observed a probable decrease in superoxide levels by 48.31% ($p < 0.05$) and hydroxyl radical by 55.1% ($p < 0.05$) in case of parabulbar and retrobulbar cell injections.

Practical importance of the results. The results, obtained in experimental studies investigating the use of cultured adult multipotent neural crest-derived stem cells in case of the adrenaline model of glaucoma, enabled to deepen and update the existing knowledge of how to treat glaucomatous optic nerve.

Keywords: glaucoma, cultured adult multipotent neural crest-derived stem cells, adrenaline model of glaucoma, glaucomatous optic nerve.