

Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика
Міністерство охорони здоров'я України

Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика
Міністерство охорони здоров'я України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ЯКОВЕЦЬ АНТОНІНА ІВАНІВНА

УДК: 617.7-007.681-092.9-06:617.73-091.8-089.843:611-018.1-018.82-085.361-036.8

ДИСЕРТАЦІЯ

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ НОВИХ МЕТОДІВ
ЛІКУВАННЯ ГЛАУКОМИ**

22 – Охорона здоров'я

222 – Медицина

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ А. І. Яковець
(підпис, ініціали та прізвище здобувача)

Науковий керівник: Петренко Оксана Василівна, доктор медичних наук, професор

Київ – 2021

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. Риков 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 АИ, 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, parabolbar 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 parabolbar 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, parabolbar 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 μV (95% CI, 0.6 μV – 1.3 μV) ($p < 0.05$) was detected when injecting cells intravenously, by 1.5 μV (95% CI 1.2 μV – 1.6 μV) ($p < 0.05$) in case of parabolbar cell injection, and for retrobulbar cell injection it came to 1.5 μV (95% CI 1.2 μV – 1.6 μV) ($p < 0.05$). In addition, an average increase in the N1-P2 amplitude by 0.8 μV (95% CI 0.55 μV – 1.0 μV) ($p < 0.05$) was detected when injecting cells intravenously, by 1.75 μV (95% CI 1.6 μV – 1.85 μV) ($p < 0.05$) in case of parabolbar injection, and by 2.1 μV (95% CI 1.8 μV – 2.2 μV) ($p < 0.05$) 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 parabolbar and retrobulbar routes when comparing the groups with retrobulbar, parabolbar 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 parabolbar 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.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	19
ВСТУП	20
Список використаних джерел в анотації та вступі	30
РОЗДІЛ 1. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	35
1.1. Систематизація сучасних можливостей експериментального моделювання глаукоми	35
1.2. Матеріал і методи експериментальних досліджень	44
1.2.1. Моделювання індукованої адреналіновим стресом глаукоми	45
1.2.2. Методика отримання та характеристика культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня	46
1.2.3. Трансплантація культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня	48
1.2.4. Методи дослідження функціонального стану зорового аналізатора	50
1.2.5. Характеристика морфологічних методів дослідження	52
1.2.6. Характеристика біохімічних методів дослідження	53
1.3. Статистична обробка результатів дослідження	55
1.4. Дотримання етичних норм дослідження	55
Резюме до розділу 1	56
Список використаних джерел у розділі 1	57
РОЗДІЛ 2. Аналіз морфологічних та морфометричних змін сітківки та зорового нерва при різних способах введення культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня	67
2.1. Сучасний стан вивчення проблеми глаукоми	67
2.2. Особливості змін сітківки при різних способах введення культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня	77
2.2.1. Зміни сітківки щурів після моделювання глаукоми без введення культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-	

	17
похідних нервового гребеня	79
2.2.2. Особливості структури сітківки щурів через 1 місяць після введення культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня	88
2.2.3. Особливості структури сітківки щурів через 3 місяці після введення культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня	97
2.3. Особливості структури зорового нерва при різних способах введення культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня	105
2.3.1. Зміни зорового нерва щурів після моделювання глаукоми без введення культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня	106
2.3.2. Особливості структури зорового нерва щурів через 1 місяць після введення культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня	109
2.3.3. Особливості структури зорового нерва щурів через 3 місяці після введення культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня	113
Резюме до розділу 2	118
Список використаних джерел у розділі 2	122
РОЗДІЛ 3. Аналіз змін функціонального стану зорового аналізатора під впливом культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня	135
3.1. Методологія визначення змін функціонального стану зорового аналізатора та обґрунтування вибору методу лікування глаукоми	135
3.2. Зміни показників внутрішньоочного тиску у щурів в ході експерименту ...	141
3.3. Зміни показників зорових викликаних потенціалів після адреналінової моделі глаукоми та введення культивованих постнатальних мультипотентних	

стовбурових клітин-похідних нервового гребеня	144
Резюме до розділу 3	157
Список використаних джерел у розділі 3	160
РОЗДІЛ 4. Аналіз змін біохімічного стану сітківки під впливом культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин- похідних нервового гребеня	167
4.1. Сучасний погляд на патогенез глаукомної оптичної нейропатії.....	167
4.2. Особливості біохімічного стану сітківки після моделювання глаукоми та введення культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня	174
Резюме до розділу 4	177
Список використаних джерел у розділі 4	179
РОЗДІЛ 5. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ..	186
Список використаних джерел у розділі 5	195
ВИСНОВКИ	198
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	201
ДОДАТКИ	202
Додаток №1. Акти впровадження результатів роботи у науковій та практичній діяльності	202
Додаток №2. Список публікацій здобувача	208

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ВОТ	– внутрішньоочний тиск
ДЗН	– диск зорового нерва
МСК-ПНГ	– мультипотентні стовбурові клітини-похідні нервового гребеня
СК	– стовбурові клітини
ГОН	– глаукомна оптична нейропатія
МСК	– мезенхімальні стовбурові клітин
ЗВП	– зорові викликані потенціали
ЛП	– латентний період
ГКС	– гангліонарні клітини сітківки
АТ	– артеріальний тиск
NO	– оксид азоту
ЕТ-1	– ендотелін-1
цАМФ	– циклічний аденозинмонофосфат
BDNF	– нейротрофічний фактор мозку
GDNF	– гліальний нейротрофічний фактор
NGF	– фактор росту нервів
bFGF	– основний фактор росту фібробластів
АТФ	– аденозинтрифосфат
АФК	– активні форми кисню
ПОЛ	– перекисне окиснення ліпідів
·O₂⁻	– супероксидний аніон-радикал
·ОН-радикал	– гідроксильний радикал
LTC₄	– лейкотрієн C ₄
МДА	– малоновий діальдегід
ДК	– дієнові кон'югати

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Глаукома є однією з головних проблем охорони здоров'я та посідає одне з перших місць серед причин незворотної втрати зору в усьому світі [10-13]. На превеликий жаль, незважаючи на очевидні успіхи в діагностиці та лікуванні, на сьогодні глаукома залишається масштабною проблемою, а кількість осіб з цим захворюванням становить близько 67 млн, з яких 10% страждають на сліпоту обох очей [14,15]. В багатьох розвинених країнах світу на долю глаукоми припадає до 13-28% всієї сліпоти [16,17]. Так, в Китаї глаукомною оптичною нейропатією страждають 9,4 млн людей у віці 40 років та старше, з них у 5,2 млн (55%) хворих виявлена одностороння втрата зору, а 1,7 млн (18,1%) – двостороння втрата зору. Первинна закритокутова глаукома є основною причиною сліпоти в Китаї [18-20]. В США у 2011 році захворюваність на первинну відкритокутову глаукому склала 2,71 млн осіб та прогнозується зростання у 2050 році приблизно до 7,32 млн осіб [21].

В Україні поширеність глаукоми в 2014 році серед дорослого населення віком від 18 років і вище склала 601,9 на 100 000 населення, в 2016 році – 609,4 на 100 000 населення та в 2017 році – 612,7 на 100 000 населення. Захворюваність на глаукому серед працездатного населення склала 16,7 на 100 000 населення в 2014 році, 17,7 на 100 000 населення – в 2016 році, 16,1 на 100 000 населення – в 2017 році. Серед основних причин первинної інвалідності по зору в нашій країні глаукома складає 17,4% та серед працездатного населення – 19,2%. Такі дані свідчать про зростання захворюваності та вихід на первинну інвалідність осіб працездатного віку з цією патологією [22].

Одним з головних факторів, що призводять до порушення зору при глаукомі, є діагностика на пізній стадії захворювання, причому більше половини випадків не діагностуються у широких верств населення як у країнах, що розвиваються, так і у розвинутих країнах [23].

На сьогодні глаукому визначають як хронічне, мультифакторне нейродегенеративне захворювання, в процесі якого виникає загибель гангліонарних клітин сітківки та розвивається прогресуюча оптична нейропатія. Для глаукомної

оптичної нейропатії (ГОН) характерна картина специфічних змін, до яких належать ексавація диска зорового нерва, пошкодження шару нервових волокон сітківки і перипапільярної області та, відповідно, зниження світлочутливості сітківки. Дані спеціальних досліджень свідчать про те, що нейродегенеративні зміни відбуваються далі по зоровому шляху [24-26].

Згідно з сучасними уявленнями механізми розвитку ГОН багато в чому подібні до захворювань центральної нервової системи. Однак патогенез глаукомного процесу, незважаючи на отримані нові дані про закономірності гідродинаміки та біомеханіки, механізми виникнення та прогресування глаукоми, її патоморфологічні та клінічні форми, вивчений далеко не повністю.

Незаперечним фактором ризику розвитку ГОН є підвищення внутрішньоочного тиску. Але в результаті цілого ряду досліджень встановлено, що у пацієнтів з глаукомою після ефективної гіпотензивної терапії, лазерного чи хірургічного втручання або їх комбінації, спостерігається прогресування втрати гангліонарних клітин сітківки [27-30]. В наукових дослідженнях існують всебічні докази того, що до важливих факторів ризику розвитку ГОН відносять судинні, метаболічні та імунні порушення, які призводять до апоптозу гангліонарних клітин сітківки [31-34].

Саме тому все більшого визнання набуває нейропротекторна терапія, щоб впливати на ланки патогенезу глаукомної оптичної нейропатії. Метою нейропротекції є захист нейронів сітківки та волокон зорового нерва від ушкоджуючої дії негативних факторів, серед яких найважливішими є підвищений внутрішньоочний тиск, ішемія, оксидативний стрес та цілий каскад патологічних механізмів [35].

Таким чином, аналіз робіт вітчизняних та зарубіжних науковців свідчить про те, що глаукома є складним багатофакторним захворюванням, яке призводить до незворотної атрофії зорового нерва, що є результатом поєднаної дії багатьох патогенетичних механізмів, які включають не тільки підвищення ВОТ, але й порушення ауторегуляції, ішемію, ексайтотоксичність, окислювальний стрес, дефіцит нейротрофічних факторів та багато інших чинників [36-41]. Враховуючи

неухильне зростання захворюваності, прогресуюче погіршення та втрату зорових функцій, що призводить до втрати працездатності та інвалідності, глаукому відносять до соціально-значущих захворювань [42]. Саме тому пошук та дослідження нових методів лікування глаукоми залишається актуальним в сучасній офтальмології. Ці інноваційні стратегії включають дослідження нейротрофічних факторів, генну терапію, модуляцію імунної системи та нові шляхи нейрорегенерації.

Завдяки досягненням в галузі регенеративної медицини і клітинної терапії отримано позитивні результати використання стовбурових клітин, а їх унікальні властивості, включаючи здатність до самооновлення і можливість диференціювання в специфічні види клітин, служать підставою їх застосування для відновлення пошкоджених клітин, тканин і органів людини [43,44].

Сучасною наукою активно проводяться дослідження застосування клітинної терапії в офтальмології. Відомо чимало робіт, в яких описано позитивний ефект після трансплантації стовбурових клітин при експериментальних моделях глаукоми [45,46]. Проте важливим аспектом клітинної терапії є правильний та адекватний вибір клітинного типу.

Перспективним клітинним типом є постнатальні мультипотентні стовбурові клітини-похідні нервового гребеня (мСК-ПНГ). Однак вивчення впливу цього типу клітин на морфо-функціональний стан зорового аналізатора залишається невирішеним завданням сучасної офтальмологічної науки. Особливий інтерес також має оцінка впливу постнатальних мСК-ПНГ при адреналіновій моделі глаукоми.

Таким чином, вивчення ефективності застосування постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня при різних способах їх доставки в експерименті на моделі глаукоми є актуальним завданням, вирішення якого дозволить відкрити нові можливості в лікуванні глаукомної оптичної нейропатії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана на кафедрі офтальмології Національного медичного університету охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика і є фрагментом науково-дослідної

роботи «Клінічне та експериментальне обґрунтування діагностики, лікування та профілактики рефракційних, дистрофічних, травматичних та запальних захворювань органу зору» (номер державної реєстрації 0116U002821) – термін виконання 2016-2020 рр., в якій аспірант була співвиконавцем.

Мета дослідження – підвищення ефективності лікування глаукомної оптичної нейропатії на підставі вивчення впливу культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня на морфо-функціональний стан зорового аналізатора в експерименті.

Завдання дослідження:

1. Встановити морфологічні зміни сітківки та зорового нерва при адреналіновій моделі глаукоми.
2. Вивчити вплив культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня на стан сітківки при адреналіновій моделі глаукоми при внутрішньовенному, парабульбарному та ретробульбарному введенні клітин.
3. Дослідити вплив культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня на стан зорового нерва при адреналіновій моделі глаукоми при внутрішньовенному, парабульбарному та ретробульбарному введенні клітин.
4. Визначити зміни функціонального стану зорового аналізатора експериментальних тварин при різних способах введення культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня при адреналіновій моделі глаукоми.
5. Дослідити вплив культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня на маркери оксидативного стресу в сітківці експериментальних тварин при адреналіновій моделі глаукоми.

Об'єкт дослідження: глаукома – Н40.0 (МКХ-10).

Предмет дослідження: морфологічні та біохімічні зміни та функціональний стан зорового аналізатора при адреналіновій моделі глаукоми після введення культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних

нервового гребеня; маркери оксидативного стресу в сітківці після введення культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня.

Методи дослідження: в умовах експерименту на тваринах інструментальні методи – тонометрія (апланатичний тонометр TONOVET); визначення зорових викликаних потенціалів на спалах (комп'ютерний багатофункціональний комплекс «Нейро-ЕМГ-Мікро»); лабораторні методи – культивування клітин *in vitro*, характеристика клітин за допомогою імунофлуоресцентного аналізу, гістоморфометричний аналіз сітківки та зорового нерва, біохімічні дослідження сітківки; статистичні методи.

Наукова новизна дослідження. Розширено наукові знання щодо ефективності використання культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня при експериментальній моделі глаукоми для підвищення ефективності лікування глаукомної оптичної нейропатії.

Вперше визначено вплив культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня при внутрішньовенному, парабульбарному та ретробульбарному введенні на структуру сітківки та зорового нерва при адреналіновій моделі глаукоми. Встановлено, що найбільш виражений позитивний ефект трансплантації культивованих постнатальних мСК-ПНГ на відновлення структури сітківки та зорового нерва при адреналіновій моделі глаукоми спостерігався в групах з парабульбарним і ретробульбарним введенням клітин. Виявлено зменшення набряку всіх шарів сітківки, 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. При парабульбарному введенні культивованих постнатальних мСК-ПНГ зазначено позитивну динаміку до зменшення товщини внутрішнього сітчастого шару сітківки, середнє значення склало $18,2 \pm 3,2$ мкм, ($p < 0,05$) та $15 \pm 2,7$ мкм, ($p < 0,05$); внутрішнього ядерного шару сітківки – $16,7 \pm 1,7$ мкм, ($p < 0,05$) та $13,7 \pm 1,1$ мкм, ($p < 0,05$); зовнішнього ядерного шару сітківки –

40,4±1,6 мкм, (p<0,05) та 37,4±1,7 мкм, (p<0,05); шару паличок і колбочок – 16,5±0,6 мкм, (p<0,05) та 15,8±0,9 мкм, (p<0,05), через 1 та 3 місяці після введення клітин відповідно. При ретробульбарному введенні культивованих постнатальних мСК-ПНГ відмічено зменшення товщини внутрішнього сітчастого шару сітківки, середнє значення становило 16,5±2,9 мкм, (p<0,05) та 12,5±1,5 мкм, (p<0,05), через 1 та 3 місяці відповідно. Для внутрішнього ядерного шару сітківки середнє значення склало 15,4±1,5 мкм, (p<0,05) та 11,9±1,3 мкм, (p<0,05), зовнішнього ядерного шару сітківки – 39,5±1,2 мкм, (p<0,05) та 35,6±0,7 мкм, (p<0,05), шару паличок і колбочок – 15,9±0,4 мкм, (p<0,05) та 15,2±0,7 мкм, (p<0,05), через 1 та 3 місяці після введення клітин відповідно.

Введення культивованих потнатальних 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 при парабульбарному введенні культивованих потнатальних мСК-ПНГ показник питомої кількості нервових волокон був достовірно вищий 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 1 та 3 місяці після введення клітин. При ретробульбарному введенні культивованих потнатальних мСК-ПНГ виявлено збільшення показника питомої кількості нервових волокон 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 у порівнянні з групою тварин без введення клітин. Крім того, при внутрішньовенному введенні культивованих потнатальних мСК-ПНГ показник питомої кількості нервових волокон був вище на 30,40% (Tukey's test, p=0,0006) через 1 місяць після введення клітин та через 3 місяці не відрізнявся від показника у групі тварин з моделлю глаукоми без введення клітин (Tukey's test, p=0,1910).

Доповнено наукову інформацію щодо змін функціонального стану зорового аналізатора при адреналіновій моделі глаукоми за допомогою визначення зорових викликаних потенціалів на спалах у лабораторних тварин. Встановлено, що адреналінова модель глаукоми у щурів призводить до порушень параметрів зорових

викликаних потенціалів на спалах, а саме встановлено збільшення латентного періоду N1 в середньому на 2,0 мс (95% ВІ 1,5 мс – 2,5 мс) ($p < 0,001$) та латентного періоду P2 в середньому на 1,7 мс (95% ВІ 1,1 мс – 2,7 мс) ($p < 0,001$). Крім того, встановлено зменшення амплітуди P1-N1 в середньому на 0,6 мкВ (95% ВІ 0,2 мкВ – 0,8 мкВ) ($p < 0,05$) та амплітуди N1-P2 в середньому на 1,4 мкВ (95% ВІ 0,8 мкВ – 2,1 мкВ) ($p < 0,05$).

Вперше встановлено позитивну динаміку показників ЗВП при парабульбарному та ретробульбарному введенні культивованих постнатальних мСК-ПНГ. Виявлено 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) ($p < 0,05$). Виявлено збільшення показника амплітуди P1-N1 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) ($p < 0,05$). Встановлено збільшення показника амплітуди N1-P2 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) ($p < 0,05$).

Вперше встановлено, що після ретробульбарного та парабульбарного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ настають зміни надпродукції активних форм кисню в тканині сітківки ока щурів. Встановлено вірогідне зменшення супероксидного аніон-радикала на 48,31% ($p < 0,05$) та гідроксильного радикала на 55,1% ($p < 0,05$) порівняно зі значеннями в групі тварин без введення клітин.

Практичне значення отриманих результатів. Результати проведених експериментальних досліджень про застосування культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня при адреналіновій моделі глаукоми дозволяють поглибити існуючі знання в лікуванні

глаукоми та науково обґрунтувати необхідність розробки нових методів лікування глаукомної оптичної нейропатії.

Впровадження в практику. Положення дисертації було впроваджено в навчальний процес на кафедрі офтальмології Національного університету охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика МОЗ України, на кафедрі офтальмології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця МОЗ України, на кафедрі офтальмології Одеського національного медичного університету МОЗ України, на кафедрі офтальмології ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», на кафедрі оториноларингології з офтальмологією Української медичної стоматологічної академії, на кафедрі офтальмології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького МОЗ України (Акти впровадження, додаток №1).

Особистий внесок здобувача. Дисертація є особистою науковою роботою здобувача. Вибір теми дисертації, спрямованість дослідження належить науковому керівнику – доктору медичних наук, професору Петренко Оксані Василівні. Мета і завдання дослідження, методологія роботи визначені разом із науковим керівником. Дисертант самостійно провела патентний та інформаційний пошуки, аналіз наукової літератури з досліджуваної теми. Самостійно проведено моделювання глаукоми в експерименті.

Отриманні культури постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня, гістологічні дослідження сітківки та зорового нерва виконано в лабораторії цитогенетики, морфології і цитології (згідно Договору, за консультативної підтримки наукового співробітника, кандидата біологічних наук Р. Г. Васильєва та провідного наукового співробітника, кандидата біологічних наук П. П. Клименка, ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України») та на кафедрі гістології та ембріології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця (згідно Договору, за консультативної підтримки доцента кафедри, доктора медичних наук А. В. Корсак).

Визначення зорових викликаних потенціалів на спалах в експерименті у лабораторних тварин проведено на базі експериментально-біологічної клініки

(віварій) Національного університету охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика (згідно Договору, при консультативній допомозі головного лікаря, лікаря функціональної діагностики Д. С. Белущенко, ТОВ «Лікарська практика»).

Біохімічні дослідження проведено у відділі фізіології кровообігу Інституту фізіології імені О. О. Богомольця (завідувач відділу член-кореспондент НАН України, доктор медичних наук, професор В. Ф. Сагач) згідно Договору між Національним університетом охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика та Інститутом фізіології імені О. О. Богомольця.

Статистичний аналіз отриманих результатів експериментальних досліджень виконано здобувачем самостійно при консультативній допомозі доцента кафедри медичної і біологічної фізики Національного медичного університету імені О. О. Богомольця, кандидата фізико-математичних наук В. Г. Гур'янова.

У наукових роботах, опублікованих за темою дисертації в співавторстві, дисертанту належала провідна роль у формулюванні мети, завдань, методології дослідження, статистичній обробці та аналізі отриманих результатів. Разом з науковим керівником, професором О. В. Петренко, були обговорені та узагальнені основні наукові положення та оформлені висновки дисертації.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи доповідались та були обговорені на:

- міжнародних науково-практичних конгресах, симпозіумах і конференціях: конгресі Європейського товариства офтальмологів SOE (Барселона, Іспанія, 2017); міжнародній офтальмологічній конференції ТІОС 2017 (Тбілісі, Грузія, 2017);
- національних з'їздах, конгресах, симпозіумах: IV науково-практичній конференції «Інновації в нейрохірургії» в рамках VI Міжнародного медичного конгресу «Впровадження сучасних досягнень медичної науки в практику охорони здоров'я України» на платформі VIII Міжнародного медичного форуму «Інновації в медицині – здоров'я нації» (Київ, 2017); 4-му міні-симпозіуму «День стовбурової клітини» (Київ, 2017);
- науково-практичних конференціях державного рівня: науково-практичній конференції з міжнародною участю «Рефракційний пленер`20» (Київ, 2020);

Всеукраїнській науково-практичній конференції «Актуальні питання офтальмології» (Одеса, 2020); науково-практичній конференції офтальмологів України «Шевальовські читання`19» (Запоріжжя, 2019); XIV З'їзді офтальмологів України з міжнародною участю (Одеса, 2018); науково-практичній конференції офтальмологів, дитячих офтальмологів та оптометристів України з міжнародною участю «Рефракційний пленер`18» (Київ, 2018); науково-практичній конференції офтальмологів з міжнародною участю «Філатовські читання – 2017» (Одеса, 2017); міжнародній конференції «Регенеративні технології в сучасній медицині» присвяченій 25-річчю Інституту пластичної хірургії «Віртус» (Одеса, 2017); науково-практичній конференції офтальмологів та дитячих офтальмологів України з міжнародною участю «Рефракційний пленер`17» (Київ, 2017); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині» (Київ, 2017).

Публікації. Основні результати дисертаційної роботи викладені у 17 наукових працях. З них 4 статті у виданнях відповідно до «Переліку наукових фахових видань України, в яких можуть публікуватися результати дисертаційних робіт на здобуття наукових ступенів доктора наук, кандидата наук та ступеня доктора філософії», 1 – у періодичному науковому виданні держави, яка входить до Європейського Союзу, з наукового напрямку, за яким підготовлено дисертацію, 1 – одноосібно, 1 – аналітичний огляд літератури. Крім того, опубліковано 12 тез доповідей в матеріалах науково-практичних конференцій, з'їздів, симпозіумів, зокрема 2 іноземних.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена українською мовою на 156 сторінках комп'ютерного тексту. Робота містить: анотацію, зміст, перелік умовних позначень, вступ, основну частину, яка складається з викладу матеріалів та методів дослідження, трьох розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел літератури, додатків. Дисертація ілюстрована 46 рисунками та 10 таблицями. Список використаної літератури складає 389 робіт, з них 65 – кирилицею, 324 – латиницею, розміщеного за розділами та займає 45 сторінок.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ В АНОТАЦІЇ ТА ВСТУПІ

1. Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and in 2020. *Br J Ophthalmol*. 2006;90:262-7. DOI: 10.1136/bjo.2005.081224
2. Nduaguba C, Lee R. Glaucoma screening: current trends, economic issues, technology, and challenges. *Curr Opin Ophthalmol*. 2006;17:142-52. DOI: 10.1097/01.icu.0000193088.75432.c9
3. Flaxman SR, Bourne RRA, Resnikoff S, Ackland P, Braithwaite T, Cicinelli MV, et al. Vision Loss Expert Group of the Global Burden of Disease Study. Global causes of blindness and distance vision impairment 1990-2020: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*. 2017 Dec;5(12):e1221-e1234. DOI: 10.1016/S2214-109X(17)30393-5
4. Livingston PM, Lee SE, De Paola C, Carson CA, Guest CS, Taylor HR. Knowledge of glaucoma, and its relationship to self-care practices, in a population sample. *Aust N Z J Ophthalmol*. 1995;23(1):37-41.
5. Моїсеєнко РО, Голубчиков МВ, Михальчук ВМ, Риков СО, Заболотько ВМ, Аліфанова ТА та співав. Офтальмологічна допомога в Україні за роки Незалежності. Аналітично-статистичний довідник. Кропивницький: Поліум; 2019. 328 с.
6. Musch DC, Gillespie BW, Lichter PR, Niziol LM, Janz NK. Visual field progression in the Collaborative Initial Glaucoma Treatment Study the impact of treatment and other baseline factors. *J Ophthalmology*. 2009 Feb;116(2):200-7. DOI: 10.1016/j.optha.2008.08.051
7. Weinreb RN, Levin LA. Is Neuroprotection a Viable Therapy for Glaucoma? *Arch Ophthalmol*. 1999;117(11):1540-4.
8. Кузьменко ВВ, Ступникова ТВ, Хейфец ЮБ, Вавилова ЛМ: Возможности клинического применения стволовых клеток в офтальмологии. Журнал научных статей «Здоровье и образование в XXI веке». 2016;18 (1):34-42.
9. Elisseeff J, Madrid MG, Qiaozhi QL, et al. Future Perspectives for Regenerative Medicine in Ophthalmology. *Middle East African J. Ophthalmology*. 2013;20:38-45.

10. Stevens G, White R, Flaxman SR, et al. Global prevalence of visual impairment and blindness: magnitude and temporal trends, 1990-2010. *J Ophthalmology*. 2013;120:2377-84.
11. Foster A, Resnikoff S. The impact of Vision 2020 on global blindness. *Eye*. 2005;19:1133-5. DOI: 10.1038/sj.eye.6701973
12. Bourne RR, Taylor HR, Flaxman SR, Keeffe J, Leasher J, Naidoo K, et al. Number of People Blind or Visually Impaired by Glaucoma Worldwide and in World Regions 1990-2010: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016;11(10):e0162229. DOI: 10.1371/journal.pone.0162229
13. Taylor HR, Keeffe JE. World blindness: a 21st century perspective. *British Journal of Ophthalmology*. 2001;85:261-6.
14. Mantravadi AV, Vadhar N. Glaucoma. *Primary Care*. 2015 Sept; 42(3):437-49. DOI: 10.1016/j.pop.2015.05.008
15. GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence, Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. 2016 Oct 8; *Lancet*. 388 (10053):1545-1602. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)31678-6
16. National eye health program. National institutes of health. Available at: <https://www.nei.nih.gov>.
17. Thomas R. Glaucoma in developing countries. *Indian J Ophthalmol*. 2012 Sep-Oct;60(5):446-50.
18. Song P, Wang J, Bucan K, Theodoratou E, Rudan I, Chan KY. National and subnational prevalence and burden of glaucoma in China: A systematic analysis. *J Glob Health*. 2017 Dec;7(2):020705.
19. Foster PJ, Oen FT, Machin DS, et al. The prevalence of glaucoma in Chinese residents of Singapore. A cross-sectional population survey in Tanjong Pagar district. *Arch Ophthalmol*. 2000;118:1105-11.

20. Nolan WP, Aung T, Chan YH, et al. The relationship between gonioscopic angle width and prevalence of synechial damage to the drainage angle in two East Asian populations. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:S102.
21. Vajaranant TS, Wu S, Torres M, Varma R. The Changing Face of Primary Open-Angle Glaucoma in the United States: Demographic and Geographic Changes from 2011–2050. *Am J Ophthalmol.* 2012 Aug;154(2):303-314.e3. DOI: 10.1016/j.ajo.2012.02.024
22. Моїсеєнко РО, Голубчиков МВ, Михальчук ВМ, Риков СО, Заболотько ВМ, Аліфанова ТА та співав. Офтальмологічна допомога в Україні за 2014-2017 роки. Аналітично-статистичний довідник. Кропивницький: Поліум; 2018. 314 с.
23. Varma R, Lee PP, Goldberg I, Kotak S. An assessment of the health and economic burdens of glaucoma. *Am J Ophthalmol* 2011;152:515-22.
24. Conforti L, Adalbert R, Coleman MP. Neuronal death: where does the end begin? *Trends Neurosci.* 2007;30(4):159-66. DOI: 10.1016/j.tins.2007.02.004
25. Gupta N, Yücel YH. Glaucoma as a neurodegenerative disease. *Current Opinion in Ophthalmology.* 2007 Mar;18(2):110-14.
26. Harasymowycz P, Birt C, Gooi P, Heckler L, Hutnik C, Jinapriya D, et al. Medical Management of Glaucoma in the 21st Century from a Canadian Perspective. *Journal of Ophthalmology.* Published online 2016 Nov 8. 2016:6509809. DOI: 10.1155/2016/6509809
27. Lutjen-Drecoll E, Rohen JW. Morphology of aqueous outflow pathways in normal and glaucomatous eyes. In: Ritch R, Shields MB, Krupin T, editors. *The glaucomas.* St. Louis: Mosby Year; 1996. p. 89-123.
28. Chauhan BC, Pan J, Archibald ML, LeVatte TL, Kelly ME, Tremblay F. Effect of intraocular pressure on optic disc topography, electroretinography, and axonal loss in a chronic pressure-induced rat model of optic nerve damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:2969-76.
29. Le A, Mukesh BN, McCarty CA, Taylor HR. Risk Factors Associated with the Incidence of Open-Angle Glaucoma: The Visual Impairment Project. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003;44(9):3783-3789. DOI: 10.1167/iovs.03-0077

30. Ho CH, Wong JKW. Role of 24-Hour Intraocular Pressure Monitoring in Glaucoma Management. *Journal of Ophthalmology*. Published 2019 Sep 19.2019:3632197. DOI: 10.1155/2019/3632197
31. Flammer J, Mozaffarieh M. The Mechanism of Glaucomatous Damage to the Optic Nerve. *European Ophthalmic Review*. 2009;3(1):33-5. DOI: 10.17925/EOR.2009.03.01.33
32. Jonas JB, Budde WM. Diagnosis and pathogenesis of glaucomatous optic neuropathy: morphological aspects. *Prog Retin Eye Res*. 2000;19(1):1-40. DOI: 10.1016/s1350-9462(99)00002-6
33. Agarwal R, Gupta SK, Agarwal P, Saxena R, Agrawal SS. Current concepts in the pathophysiology of glaucoma. *Indian J Ophthalmol*. 2009 Jul-Aug;57(4):257-66. DOI: 10.4103/0301-4738.53049
34. Clark AF. The Cell and Molecular Biology of Glaucoma: Biomechanical Factors in Glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2012;53:2473-5. DOI: 10.1167/iovs.12-9483g
35. Аветисов СЭ, Еричев ВП, Яременко ТВ. Обоснование нейропротекции при глаукоме. *Национальный журнал глаукома*. 2019;18(1):85-94. DOI: 10.25700/NJG.2019.01.10
36. Sucher NJ, Lipton SA, Dreyer EB. Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells. *Vision Res*. 1997 Dec;37(24):3483-93. DOI: 10.1016/S0042-6989(97)00047-3
37. Fang JH, Wang XH, Xu ZR, Jiang FG. Neuroprotective effects of bis(7)-tacrine against glutamate-induced retinal ganglion cells damage. *BMC Neurosci*. 2010 Mar 3;11:31.
38. Izzotti A, Bagnis A, Saccà SC. The role of oxidative stress in glaucoma. *Mutat Res*. 2006 Mar;612(2):105-14. DOI:10.1016/j.mrrev.2005.11.001
39. Ferreira SM, Lerner SF, Brunzini R, Evelson PA, Llesuy SF. Oxidative stress markers in aqueous humor of glaucoma patients. *Am J Ophthalmol*. 2004 Jan;137(1):62-9.

40. Johnson JE, Barde YA, Schwab M, Thoenen H. Brain-derived neurotrophic factor supports the survival of cultured rat retinal ganglion cells. *J Neurosci*. 1986 Oct;6(10):3031-8. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.06-10-03031.1986
41. Sawai H, Clarke DB, Kittlerova P, Bray GM, Aguayo AJ. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 stimulate growth of axonal branches from regenerating retinal ganglion cells. *J Neurosci*. 1996 Jun 15;16(12):3887-94. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.16-12-03887.1996
42. Kingman S. Glaucoma is second leading cause of blindness globally. *Bull World Health Organ*. 2004 Nov;82(11):887-8.
43. Калинина НИ, Сысоева ВЮ, Рубина КА, и др. Мезенхимальные стволовые клетки в процессах роста и репарации тканей. *Acta Naturae*. 2011;3(4):32-9.
44. Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Harris DT. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose and cord tissue. *Cytherapy*. 2013 Mar;15(3):330-43. DOI: 10.1016/j.jcyt.2012.11.010
45. Levkovitch-Verbin H, Sadan O, Vander S, et al. Intravitreal injections of neurotrophic factors secreting mesenchymal stem cells are neuroprotective in rat eyes following optic nerve transection. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2010;51(12):6394-400.
46. Ohlemacher SK, Langer KB, Fligor CM, Feder EM, Edler MC, Meyer JS. Advances in the Differentiation of Retinal Ganglion Cells from Human Pluripotent Stem Cells. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1186:121-140. DOI:10.1007/978-3-030-28471-8_5

РОЗДІЛ 1

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

1.1. Систематизація сучасних можливостей експериментального моделювання глаукоми

Моделювання глаукоми, що дало б змогу зрозуміти патогенез даного захворювання, є одним із важливих та складних завдань у сучасній офтальмології. Крім того, складність становить вибір адекватної моделі глаукоми, а важливим критерієм вибору експериментальної тварини є можливість екстраполяції експериментальних даних на людину (принцип подоби). Принцип подоби людини і біологічної моделі в біомедицині визначається як подібність морфо-функціональних характеристик органів та систем, подібність їх метаболічних, нейрорегуляторних, ендокринних та екзокринних функцій в альтернативних моделях, а також часу і якості реакції на досліджуваний вплив і порівнянність кількісно оцінюваних параметрів [1,2]. Це завдання вирішується за допомогою використання в експерименті різних видів лабораторних тварин.

За даними літератури, відомі на сьогодні моделі глаукоми поділяють на математичні, *in vitro* та *in vivo*, які мають як переваги так і недоліки [3].

Математичні моделі, як правило, розглядають око як сукупність структур, яким властиві певні фізичні та гідродинамічні властивості. Такі системи певною мірою успішно застосовуються в моделюванні патологічних процесів для прогнозування власне перебігу процесу, визначення ефективності лікування та профілактики, однак вони не відображають всіх аспектів живої системи [4,5].

Останніми роками було розроблено моделі глаукоми *in vitro* та *ex vivo* заради кращої точності експериментальних умов і для вивчення клітинних та молекулярних механізмів, які можуть сприяти з'ясуванню виникнення та прогресування захворювання [6-9]. Для моделювання глаукоми *in vitro* використовується ізольована сітківка або культури її окремих клітин, а саме гангліонарних клітини сітківки, астроцитів і клітин мікроглії. Також використовують клітини периферійної крові при вивченні молекулярних процесів, наприклад, окисного фосфорилування [10,11]. У даному випадку методами моделювання глаукомних змін є підвищення

тиску в культуральній системі, обмеження трофіки, інгібування синтезу АТФ та оксидази цитохрому С, ініціація ексайтотоксичного ураження. Тим не менш, важливо враховувати, що моделі *in vitro* не можуть відтворити перебіг захворювання та не замінюють моделі *in vivo*, але вони дозволяють відповісти на деякі важливі питання більш швидким та менш дорогим способом, ніж моделі на лабораторних тваринах [12].

Саме тому набувають актуальності моделі *in vivo*, які дозволяють набагато краще прослідкувати за загальним ефектом експерименту та максимально близько відтворити клінічний перебіг захворювання.

Як відомо, глаукому можна індукувати у мавп, собак, щурів, кроликів, овець, корів та птахів. Однак, при моделюванні глаукоми використання дрібних гризунів як лабораторних тварин в експерименті має свої переваги, оскільки розведення та утримання як об'єкта моделювання з економічного боку більш доступне, а короткий життєвий цикл, що складає від 2-х до 3-х років, забезпечує отримання дорослих особин, необхідних для моделювання [13,14].

Незважаючи на певні відмінності ока людини та щура, всі структури ока, які зазнають змін, характерних для глаукоми людини, присутні в очах щурів. Тому при проведенні досліджень необхідно пам'ятати про особливості морфології очей у щурів, до яких відносять проходження ретинальних судин із порожнини ока в очницю під зоровим нервом, що важливо при створенні гістологічних препаратів диска зорового нерва. Решітчаста пластинка у щурів складається переважно з астроцитів і капілярів («гліальна ламіна»), які пов'язані один з одним і з аксонами гангліозних клітин сітківки [15,16]. Потрібно відзначити певні особливості діаметру зорового нерва та його мієлінізації. Одразу після мембрани Бруха діаметр зорового нерва становить 85 ± 7 мкм, через 100 мкм діаметр становить 95 ± 13 мкм і через 350 мкм збільшується до 236 ± 49 мкм за рахунок так званої «зони переходу», в якій починається мієлінізація. Приблизно через 400 мкм позаду мембрани Бруха зоровий нерв повністю мієлінізується [17]. Як свідчать дослідження, основний механізм відтоку водянистої вологи у щурів відбувається через трабекулярну сітку в шлемів канал, далі в лімбальне сплетіння та в епісклеральні вени. Також результати

досліджень показують добові коливання офтальмотонусу, а саме нічні підйоми внутрішньоочного тиску (ВОТ) на 10 мм рт. ст. [18,19].

Потрібно відзначити, що моделі *in vivo* поділяються на моделі власне глаукоми, які засновані на підвищенні ВОТ, та на моделі нейропатії, які не залежать від змін офтальмотонуса, так звані «чисті» моделі ішемії/реперфузії, моделі нормотензивної глаукоми.

Також можливе комбінування моделі глаукоми *in vitro* та *in vivo*. Так, в проведеному експерименті на щурах *in vivo* була змодельована офтальмогіпертензія за допомогою введення гіпертонічного розчину в епісклеральні вени для порушення відтоку водянистої вологи. Згідно отриманих даних, підвищення ВОТ спостерігали протягом 5 тижнів. Наступним етапом шар ганліонарних клітин сітківки (ГКС) ізолювали методом лазерної захоплюючої мікродисекції та за допомогою мікročіпів комплементарної ДНК визначали значно більшу кількість генів зі зміненою експресією, ніж при аналізі всіх шарів сітківки. Отримані дані порівнювалися з даними моделі *in vitro* – культури ГКС, яка піддавалася впливу високого тиску [20].

В 2010 році А. Kipfer-Kauer та співавторами [21] описана модель хронічного підвищення ВОТ у мишей C57BL/6, що досягається шляхом ін'єкції гіпертонічного розчину у лімбальну вену. Рекомендована молярність розчину 1,5 М. Підвищення ВОТ у групі тварин після введення гіпертонічного розчину становило 15,6 мм рт.ст., проти 11,6 мм рт. ст. у контрольній групі. Подібною є модель глаукоми за допомогою введення гіпертонічного розчину в епісклеральні вени у щурів Brown Norway, завдяки чому було досягнуто підвищення ВОТ від 7 до 28 мм рт. ст., який зберігався протягом 4 тижні. При дослідженні кута передньої камери зазначали формування периферичної передньої синехії, та на електронних мікрофотографіях очей виявлено пошкодження аксонів ГКС [22]. Однак недоліком цих моделей є відносна складність індукційної техніки, а введення мікроголки у епісклеральну вену щурів вимагає значних тренувань та досвіду. При цьому тривалість підйому ВОТ є відносно короткою, і необхідні послідовні ін'єкції гіпертонічного розчину для отримання більш тривалого підвищення ВОТ.

Крім того, були розроблені моделі глаукоми, в яких використовували лазерну фотокоагуляцію за допомогою діодного та аргонного лазерів [23]. Лазерний вплив на дренажні структури застосовувався з метою індукування глаукоми. При цьому підвищення ВОТ досягалось за допомогою лазерного впливу на трабекулярну сітку [24-26], лімбальне сплетення [27-29], епісклеральні вени [30] або при комбінованому транслімбальному впливі [31-33]. До особливостей даного методу відносять транзиторний характер гіпертензії, залежність ефективності підвищення ВОТ від пігментації структур кута передньої камери, а також повторне лазерне втручання викликає запалення ока і помутніння рогівки, що значно обмежує точність та достовірність тонометрії [34].

Щоб уникнути недоліків лазерного впливу, були застосовані інші варіанти індукування офтальмогіпертензії. Описано субкон'юнктивальне введення дексаметазону та місцева аплікація преднізолону протягом двох-чотирьох тижнів, що призводило до появи запальної реакції та незворотнього проліферативного процесу [35], введення аутологічних фіксованих еритроцитів [36,37] та стерильних латексних мікросфер [38] в передню камеру.

Р.А. Samsel та співавтори розробили методику підвищення ВОТ у щурів за допомогою введення магнітних мікросфер, що викликає такий же ефект, як латексні мікросфери, але в цьому випадку мікросфери можуть керуватися ручним магнітом та легко утримуватися в куті передньої камери [39].

Також була описана модель, заснована на введенні 25 мкл гіалуронової кислоти в передню камеру, завдяки чому було відзначено збільшення ВОТ у щурів на 80% протягом 7-8 днів, а при повторних введеннях – до 10 тижнів, внаслідок чого спостерігали 40% втрати ГКС [40].

Chenyng Guo зі співавторами представили модель хронічного підвищення ВОТ за допомогою фотополімеризуючої біоматриці, гліцидилметалату гіалуронової кислоти (НАМА). Мишам вводили 2 мкл 2% розчину НАМА- μ Beads зі швидкістю 2 мкл/хв за допомогою мікропіпети та проводили опроміненням ультрафіолетовим світлом А (УФА) для фотополімеризації НАМА на відстані 10 см протягом 10 секунд. Отримані результати показали підвищення ВОТ після проведення

маніпуляції на 45% протягом 4-х тижнів, а також зменшення на 35% ГКС та аксонів протягом місяця після підвищення ВОР [41].

Відома модель глаукоми хронічного підвищення ВОР на основі інфузії. У цьому дослідженні щурам Brown-Norway (самці) імплантували канюлю в передню камеру ока та з'єднували з фіксованою інфузійною системою, яка забезпечувала прямий контроль ВОР. Протягом 2-х місяців поступово підвищували ВОР на 10 мм рт. ст., що спричинило загибель ГКС, більш виражену на периферії сітківки, та пошкодження зорового нерва [42].

S.R. Shareef зі співавторами [43] в 1995 році розробили модель глаукоми, яка досягається шляхом каутеризації (припікання) двох і більше епісклеральних вен у щурів. Цей метод менш інвазивний, ніж лазерна фотокоагуляція, не викликає ускладнень в передній камері та надає можливість регулювати рівень гіпертензії шляхом визначення кількості каутеризованих вен [44]. А Vecino і Sharma в 2013 році для порівняння провели дослідження з використанням трьох експериментальних моделей глаукоми: припікання 3-х епісклеральних вен, введення латексних мікросфер та гідроксипропілметилцелюлози в передню камеру, що показало більш стабільне підвищення ВОР протягом 24-х тижнів в першому випадку моделювання глаукоми [45].

Відомо, що однією з найбільш простих моделей глаукоми, не зв'язаної з підвищенням ВОР, є модель на мишах, яка полягає в введенні вазоконстрикторного пептиду ендотеліну – ET-1 в зоровий нерв та призводить до зниження кровотоку і загибелі ГКС. У нових модифікаціях цієї методики ішемічний стрес, що обумовлює пошкодження ГКС і нейроглії, забезпечується хронічним підвищенням вироблення ET-1 в сітківці. Дорослим мишам C57BL/6 було проведено інтравітреальне введення аденовірусного вектора з геном людського ендотеліну та аденовірусного вектора, що відповідає за експресію GFP (green fluorescein protein – зелений флуоресцентний білок). Аналіз отриманих результатів, через 6 місяців після введення, показав зниження кількості ГКС на 37% в очах з експресією ET-1 [46].

Одним із методів індукування нейропатії без підвищення ВОР є механічне ушкодження аксонів, яке ініціює ретроградний дегенеративний процес нейронів, так

звана Валлерова дегенерація. При моделюванні глаукоми зоровий нерв перетискають або пересікають. Було показано, що через тиждень після проведеної маніпуляції кількість гангліонарних клітин зменшується до 27%, через два тижні – до 47% [47,48].

Певної уваги заслуговують дослідження із застосуванням індукування ексайтотоксичності для ініціювання оптичної нейропатії. Дослідниками була створена модель з інтравітреальним введенням у щурів N-метіл-D-аспартата (NMDA), каїнової кислоти або глутамату. При цьому одноразове інтравітреальне введення великого об'єму, який склав 20-200 нмоль, амінокислот призводило до загибелі гангліонарних клітин сітківки, більше 80%, протягом першої години після ін'єкції. При застосуванні малих доз глутамату об'ємом 2,5 нмоль протягом тривалого часу (кожні 5 діб) отримали загибель 42% гангліонарних клітин протягом 3-х місяців [49-51].

Викликають особливий інтерес моделі глаукоми з використанням ішемії. Зазвичай застосовується транзиторна ішемія протягом приблизно 60 хвилин, після чого проводиться реперфузія, що призводить до апоптичної втрати ГКС [52,53] та стоншення шару нервових волокон сітківки [54-56]. Існують різноманітні способи, щоб викликати ішемію. Mosinger та Olney описали метод внутрішньовенного введення бенгальського рожевого дорослим щурам з наступною стимуляцією сітківки лазерним випромінюванням, викликаючи фототромбоз ретинальних судин [57]. Також в літературі описано більш інвазивний метод накладання лігатури на зоровий нерв для зупинки кровотоку в центральній артерії сітківки та задніх циліарних артеріях, та передбачається можливість виділення центральної артерії сітківки із зорового нерва з незалежним її лігуванням [58]. Проте основним обмеженням даної методики є те, що перев'язка, крім ішемії, може призвести до механічного пошкодження.

На сьогодні також відомі генетичні моделі гризунів, при моделюванні яких застосовуються трансгенні миші сімейства DBA. Найбільш поширеним варіантом є штам DBA/2J з мутацією в генах *Tyrp1* та *Gprmb*. У таких мишей розвивається вторинна форма глаукоми, яка характеризується пігментною дисперсією, атрофією і

трансілюмінацією райдужки та розвитком передніх сінехій. Виявлено підвищення ВОТ на 9-му місяці життя, яке супроводжується втратою гангліонарних клітин сітківки та атрофією зорового нерва. Прогресування оптиконеуропатії спостерігалися у більшості мишей до 22 місяців [59]. Проте виникнення місцевих та системних ускладнень викликає труднощі в оцінці прогресування захворювання [60].

Також відома генетична модель глаукоми у тварин з дефіцитом Vav2 та Vav3 – факторів обміну гуанінових нуклеотидів (GEF). У цих мишей розвивалася спонтанна офтальмогіпертензія, внаслідок іридокорнеальних змін кута передньої камери, та прогресуюча оптиконеуропатія [61].

Крім того, описана модель нормотензивної глаукоми у мишей з недостатністю переносників глутамата GLAST та EAAC1. Доведено, що GLAST запобігає ексайтотоксичному ураженню сітківки. Також GLAST підтримує рівень антиоксиданту глутатіону в клітинах Мюллера, транспортуючи в клітини глутамат, який є субстратом для синтезу глутатіону, а його недостатність призводить до зниження рівня глутатіона. У сукупності недостатності GLAST призводить до ураження гангліонарних клітин сітківки та зорового нерва. При недостатності EAAC1 гангліонарні клітини більш сприятливі до оксидативного стресу [62].

При проведенні досліджень були виведені трансгенні миші, у яких в трабекулярній ділянці синтезується мутований мишиний міоцилін (Tyr423His) або мутований міоцилін людини (Tyr437His). Отримані результати демонстрували помірне підвищення внутрішньоочного тиску та прогресуючу апоптичну втрату гангліонарних клітин сітківки і аксональну дегенерацію зорового нерва [63,64]. У пацієнтів з діагнозом відкритокутова глаукома мутація гена міоциліну (MYOC) виявлена у 3–4%, при цьому глаукомні зміни більш виражені [65].

Особливий інтерес викликає моделювання глаукоми з подальшою трансплантацією стовбурових клітин як потенційної нейропротекторної терапії глаукоми. Thomas V. Johnson та співавторами при проведенні експериментального дослідження показано, що інтравітреальне введення мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) призводить до збільшення кількості та значного зниження швидкості

втрати аксонів ГКС. У даному дослідженні індукування підвищення ВОТ проводили шляхом лазерної фотокоагуляції в трабекулярній сітці [66].

Крім того, недавні дослідження продемонстрували здатність МСК до регенерації очних тканин. При індукованій лазером моделі глаукоми було проведено введення МСК в передню камеру ока гризунів, що призвело до зниження ВОТ шляхом регенерації клітин трабекулярної сітки. Ці результати показують, що МСК є перспективним інструментом для лікування офтальмогіпертензії та дегенерації клітин сітківки [67-70].

Незважаючи на те, що у більшості моделей глаукоми, завдяки механічному, хімічному або лазерному впливу, відбувається гостре підвищення ВОТ, що призводить до зміни диска зорового нерва, загибелі ГКС та їх аксонів, пошкодження шару нервових волокон, дані моделі не відтворюють хронічний патологічний процес, характерний для глаукоми, а є, по суті, наслідком гострого процесу.

Таким чином, проведений нами аналіз сучасної літератури показав, що створення доступної та адекватної клінічним вимогам моделі має важливе значення для розширення знань патогенезу глаукомної оптичної нейропатії, а вивчення механізмів впливу терапевтичної дії стовбурових клітин може стати базою для розробки нових ефективних методів лікування даного захворювання, яка на даному етапі починає свій розвиток в сучасній офтальмології.

Крім того, слід зазначити, що патофізіологічні та біологічні механізми, які лежать в основі глаукомного процесу, залишаються до кінця не вивченими. Однак завдяки чисельним дослідженням показано, що ВОТ відіграє важливу роль в захворюванні, а його підвищення є одним з основних факторів ризику прогресування глаукоми [71,72].

Потрібно відзначити, що високий рівень стресу має широкий спектр впливу на організм як людини, так і моделі тварини [73-75]. Активація, спричинена стресом, симпатичної нервової системи, призводить до каскаду метаболічних реакцій, підвищення вмісту катехоламінів у крові і різних тканинах організму [76]. Зміна рівня цих гормонів може призвести до системних захворювань, зокрема серцево-судинної системи [77].

За даними спеціальних досліджень встановлено причетність стресу до активації підвищення внутрішньоочного тиску у пацієнтів з глаукомою, а також взаємозв'язок психо-емоційного стресу і частоти розвитку даного захворювання [78-81]. Отримані результати показали порушення функціонування гіпоталамо-гіпофізарно-адреналової вісі та підвищення рівня катехоламінів (стрес-гормонів – кортизолу, адреналіну, норадреналіну) [82]. Патологічний стрес виникає внаслідок того, що активність стрес-індукованих факторів перевищує фізіологічні рамки і порушені функції регуляторних систем.

Рядом вчених показано, що активація β -адренорецепторів призводить до стимуляції синтезу циклічного аденозинмонофосфату (цАМФ) в тканинах ока, а його накопичення запускає складний комплекс внутрішньоклітинних процесів, що призводить до посиленого входження іонів кальцію через активовані кальцієві канали всередину клітини. Високий рівень кальцію сприяв дистрофічним змінам в тканинах ока, викликаних ішемією [83-85].

Також було проведене дослідження на лабораторних тваринах, яке показало підвищення ВОТ на 27% у відповідь на стресові подразники [86].

Таким чином, можна вважати, що хронічний адреналіновий стрес є індукованим механізмом розвитку глаукомної патології.

При проведенні нами експериментального дослідження на лабораторних тваринах була застосована індукована адреналіновим стресом модель глаукоми, яка характеризується хронічним підвищенням ВОТ і структурними змінами сітківки та зорового нерва, відтворює основну картину розвитку хронічного патологічного процесу, характерного для глаукоми, що дозволяє вважати дану модель адекватною моделі глаукоми у людини.

Дане дослідження проводилось на білих лабораторних щурах лінії Wistar, що надало ряд переваг, а саме: будова оптико-сенсорного апарата щурів ближче за своєю морфологічною структурою до людського, щури менш чутливі до токсичної дії адреналіну, розведення та утримання щурів як об'єкта моделювання з економічного боку більш доступне [87].

1.2. Матеріал і методи експериментальних досліджень

Експериментальні дослідження були проведені на 70 щурах лабораторної лінії Wistar, самці віком 10-15 місяців, масою тіла 250-450 г. Лабораторні щурі знаходилися в умовах експериментально-біологічної клініки (віварій) Національного університету охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика. Усі тварини утримувалися на звичайному режимі віварію та були розміщені в клітках по 5 особин. Самці отримувалися на стандартному раціоні віварію з вільним доступом до води. Місце утримання тварин було забезпечене необхідним простором, температурно-вологісний режимом, вентиляцією.

Усі експериментальні процедури проводили на базі експериментально-біологічної клініки (віварій) згідно норм Комітету з біоетики тварин НУОЗ України імені П. Л. Шупика та відповідали директивам європейської комісії (86/609/ЕЕС), з дотриманням Закону України №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (ВВР, № 27, ст. 230, від 2006 р. із змінами внесеними згідно із Законом №1759-VI від 15.12.2009, ВВР, 2010, №9, ст. 76) та загальними етичними принципами експериментів на тваринах (Перший Національний конгрес з біоетики 20.09.2001 р., м. Київ), а також Етичним кодексом вченого України (Національна академія наук України, 2009 р.), які узгоджуються з положеннями "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших цілей" (Страсбург, Франція, 1985). Були докладені усі зусилля для зменшення страждання тварин та мінімізації їх кількості. При проведенні усіх маніпуляцій дотримувалися умов антисептики та асептики.

Лабораторні щурі лінії Wistar були розподілені на 6 груп, згідно завданням експериментального дослідження. Групу контролю становили 10 інтактних щурів (20 очей). У I групі тварин (10 щурів, 20 очей) проводилося моделювання глаукоми без введення культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних-нервового гребеня (мСК-ПНГ). В II групі тварин (10 щурів, 20 очей) було проведено моделювання глаукоми та досліджувався вплив культивованих постнатальних мСК-ПНГ на стан сітківки та зорового нерва при внутрішньовенному введенні клітин. У III групі тварин (10 щурів, 20 очей) проводилося моделювання

глаукоми та досліджувався вплив культивованих постнатальних мСК-ПНГ на стан сітківки та зорового нерва при парабульбарному введенні клітин. У IV групі тварин (10 щурів, 20 очей) проводилося моделювання глаукоми та досліджувався вплив культивованих постнатальних мСК-ПНГ на стан сітківки та зорового нерва при ретробульбарному введенні клітин. В V групі тварин, яка була розподілена на дві підгрупи, досліджувався біохімічний стан сітківки: в групі Va (10 щурів, 20 очей) – проводилося моделювання глаукоми, в групі Vб (10 щурів, 20 очей) – проводилося парабульбарне та ретробульбарне введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ.

1.2.1. Моделювання індукованої адреналіновим стресом глаукоми

Моделювання глаукоми проводилося за методикою Михейцевої І. М. [87,88] шляхом внутрішньочеревного введення 0,18% розчину адреналіну гідротартрату (діюча речовина ерінефрине, «Дарниця», Україна) в дозі, починаючи з 10 мкг, доводячи до 15 мкг на 100 г маси. Було проведено 20 ін'єкцій протягом 6 тижнів, по 3 ін'єкції на тиждень. Через кожні 5 ін'єкцій доза введеного адреналіну збільшувалася. Перших 5 ін'єкцій починали з розрахунку 10 мкг/100г, поступово збільшуючи дозу до 15 мкг/100 г.

Вимірювання ВОТ у правому і лівому очах здійснювали за допомогою апланатійного тонометра (Icare® TONOVET tonometer, Finland) на різних етапах спостереження (рис. 1.1), а саме: до моделювання глаукоми, під час моделювання глаукоми перед збільшенням дози введення адреналіну, після моделювання глаукоми та через 1 місяць після введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ. Тонометр TONOVET відноситься до групи ручних контактних апланатійних тонометрів для вимірювання істинного ВОТ і калібрований по тонометру Гольдмана, що є світовим стандартом. Нами була застосована загальновідома методика вимірювання ВОТ у гризунів [89], яку широко використовують в ветеринарній практиці. Вимірювання ВОТ тонометром TONOVET не потребувало додаткової підготовки тварин та використання анестезії. ВОТ у період індукції

адреналіном вимірювали до ін'єкції. Усі вимірювання ВОТ здійснювали в ранкові часи.



Рис. 1.1. Вимірювання ВОТ за допомогою апланаційного тонометра TONOVET

1.2.2. Методика отримання та характеристика культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня

Отримання культури постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня проводили в лабораторії цитогенетики ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України» (згідно Договору, за консультативної підтримки наукового співробітника, кандидата біологічних наук Р. Г. Васильєва).

Культуру мСК-ПНГ отримували з волосяного фолікула вібрисів дорослих щурів самців лінії Wistar методом експлантів за оригінальною технологією (модифікований метод M. Sieber-Blum). Клітини культивували в мультигазовому інкубаторі CB210 (Binder, Німеччина) при 5% O₂ і 5% CO₂ в ростовому середовищі наступного складу: базальне середовище α MEM (Gibco, Великобританія), 5% ембріональної телячої сироватки (Gibco, Великобританія), 5 нг/мл bFGF (Sigma, США), 5 нг/мл EGF (Sigma, США), 1% поживної добавки ITS (Gibco, Великобританія), 2 мМ стабільного глютаміну (Biowest, Франція) і 1% розчину антибіотиків-антимикотика (Biowest, Франція) [90].

Щурячі культивовані постнатальні мСК-ПНГ були охарактеризовані за допомогою імунофлуоресцентного аналізу.

Щурячі культивовані постнатальні мСК-ПНГ експресували маркери, характерні для клітин, що мають походження з нервового гребеня, а саме транскрипційний фактор Sox10⁺ та білок проміжних філаментів Nestin (рис. 1.2).

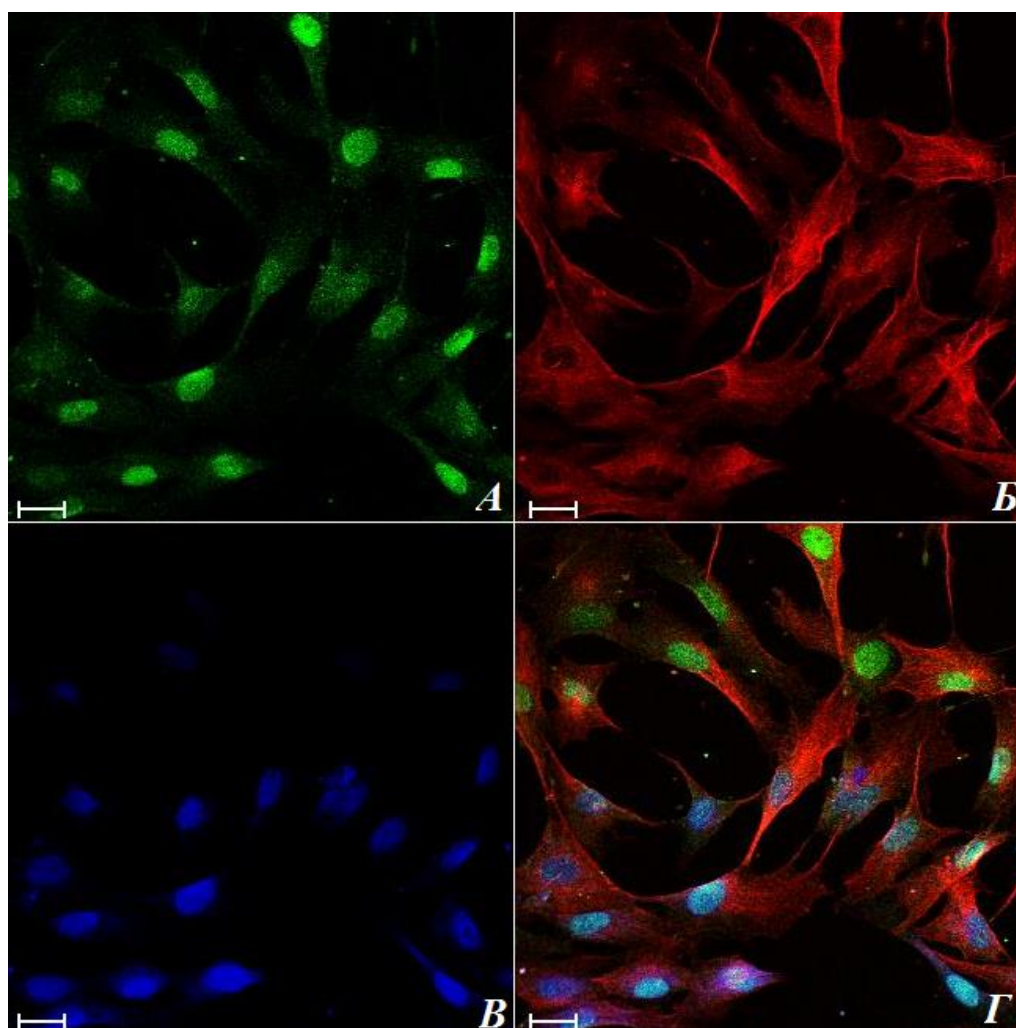


Рис. 1.2. Імунофлуоресцентний аналіз культури мСК-ПНГ щурів. А – детекція транскрипційного фактору Sox10 (зелений колір); Б – детекція білка проміжних філаментів Nestin (червоний колір); В – забарвлення ядер клітин Hoechst 33342 (голубий колір); Г – поєднане зображення (merged). Масштабний відрізок – 20 мкм

Крім того, культивовані постнатальні мСК-ПНГ експресували маркери CD44, CD73, CD90 і Sca-1, характерні для мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин, та CD117, маркер мігруючих клітин нервового гребеня і меланобластів.

Стосовно біологічних властивостей культивованих постнатальних мСК-ПНГ потрібно відзначити, що вони мають потенціал до диференціювання в основні клітинні типи – похідні нервового гребеня: в нейрони і глію периферичної нервової системи, меланоцити, клітини строми та ендотелію рогівки, деякі типи ендокринних клітин і багато інших [91].

Крім того, існують експериментальні докази того, що постнатальні мСК-ПНГ здатні до лінійної конверсії в нейральні стовбурові клітини ЦНС [92]. Важливо, що постнатальні мСК-ПНГ можуть після трансплантації в новому мікрооточенні трансдиференціюватися в диференційовані клітинні типи, характерні для ЦНС, такі як олігодендроцити [93]. Це дає підґрунтя для дослідження можливої трансдиференціації постнатальних мСК-ПНГ в тому числі у гангліонарні клітини сітківки і фоторецепторні клітини.

У культурі *in vitro* отримані мСК-ПНГ були здатні диференціювати в β -III-тубулін позитивні нейрони і клітини з морфологією і маркерами гліальних (в сукупності маркерів – швановські клітин) – S100 β , GFAP (гліальний фібрилярний кислий білок) і MBP (основний білок мієліну). Крім того, мСК-ПНГ в культурі секретували важливі нейротрофічні фактори (нейротрофічний фактора мозку (BDNF), нейротрофін 3, нейротрофін 4/5 і фактор росту нервів (NGF)) і факторів росту (основний фактор росту фібробластів (bFGF), фактор росту ендотелію судин (VEGF)). Це обумовлює їх нейропротекторний і регенеративний потенціал. Таким чином, дані властивості роблять культивовані постнатальні мСК-ПНГ перспективним клітинним типом для розробки нових методів лікування захворювань зорового аналізатора.

1.2.3. Трансплантація культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня

Введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ здійснювали наступними способами: внутрішньовенно – 5 млн клітин в 0,5 мл фізіологічного розчину, ретробульбарно – по 0,5 млн клітин в 0,05 мл фізіологічного розчину, парабульбарно – по 0,5 млн клітин в 0,05 мл фізіологічного розчину (рис. 1.3).

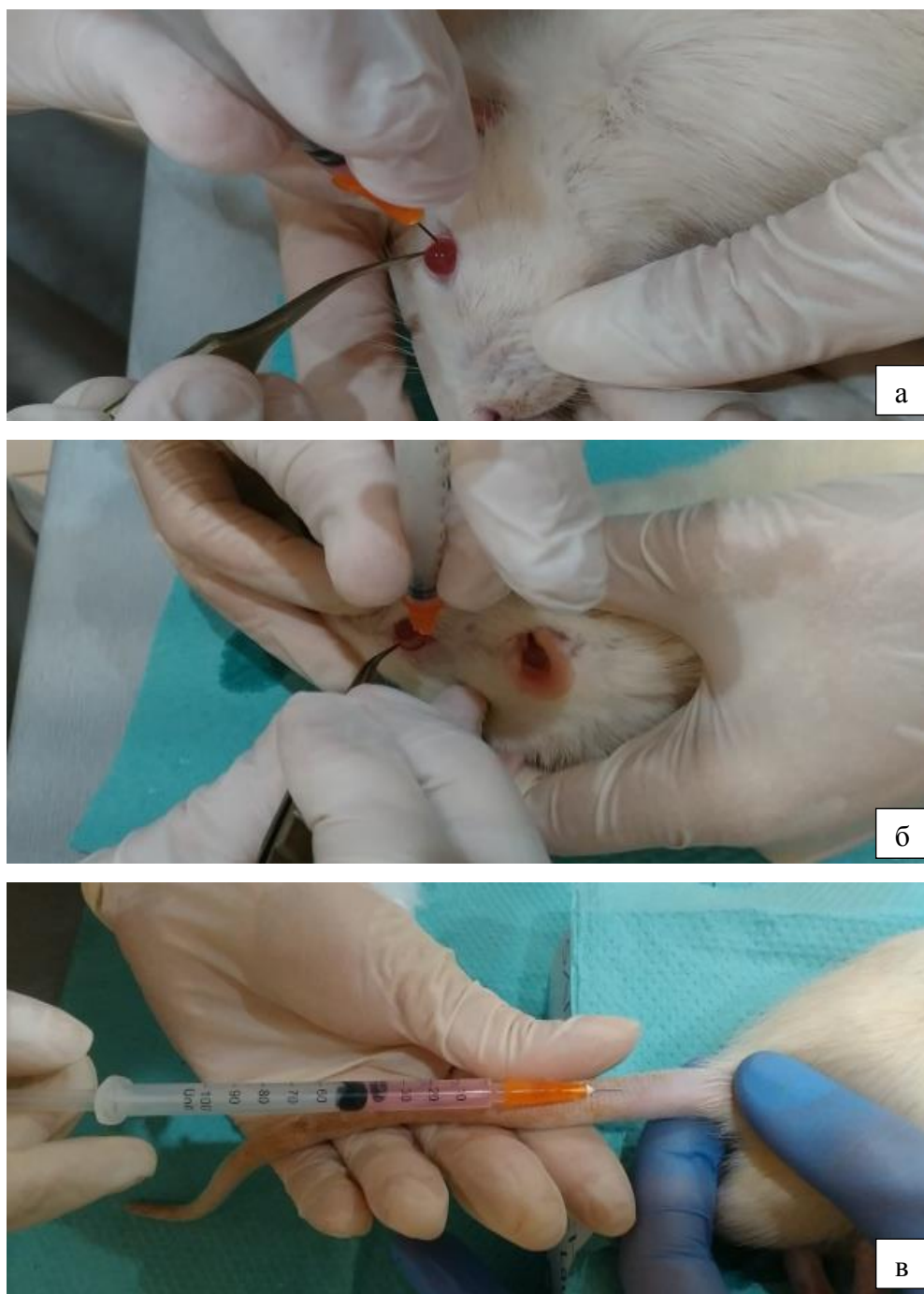


Рис. 1.3. а – ретробульбарне введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ;
б – парабульбарне введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ;
в – внутрішньовенне введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ

Перед введенням культивованих постнатальних мСК-ПНГ проводилась медикаментозна седация щура 0,1% розчином «Медитин» (діюча речовина медетомідину гідрохлорид, «Арі-San», Російська Федерація), який вводився внутрішньом'язово, та місцева анестезія очей «Алкаїном» (діюча речовина

проксиметакаїну гідрохлорид, «Alcon-Couvreur», Бельгія). Після введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ внутрішньом'язово вводився антидот 0,5% розчин «Антимедин» (діюча речовина атіпамезолугідрохлорид, «Арі-San», Російська Федерація).

1.2.4. Методи дослідження функціонального стану зорового аналізатора

Функціональний стан зорового аналізатора оцінювали за допомогою зорових викликаних потенціалів (ЗВП). Дослідження проведено на базі експериментально-біологічної клініки (віварій) Національного університету охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика (згідно Договору, за консультативної підтримки головного лікаря ТОВ «Лікарська практика», лікаря функціональної діагностики Д. С. Белущенко).

За допомогою даного метода проводиться реєстрація біоелектричної активності нейронів потиличної кори головного мозку у відповідь на фізіологічне подразнення сітківки.

У нашому експерименті здійснювали фізіологічну стимуляцію сітківки світловим спалахом, основними перевагами якої є незалежність результатів від фіксації зору та рівня свідомості лабораторної тварини.

Запис зорових викликаних потенціалів проводили на комп'ютерному багатофункціональному комплексі «Нейро-ЕМГ-Мікро», виробник ТОВ «Укрмедспектр», Україна, м. Харків.

Перед обстеженням була проведена медикаментозна седация щура 0,1% розчином «Медитин» (діюча речовина медетомідину гідрохлорид, «Арі-San», Російська Федерація), який вводився внутрішньом'язово. Після обстеження внутрішньом'язово введено антидот 0,5% розчин «Антимедин» (діюча речовина атіпамезолугідрохлорид, «Арі-San», Російська Федерація). Доза розраховувалась згідно ваги тварини.

Для реєстрації коркової активності головного мозку використовувались одноразові монополярні голкові електроди, які фіксувались підшкірно над поверхнею черепа. Для проведення фізіологічної стимуляції сітківки був

індивідуально виготовлений фотостимулятор з двох світлодіодів червоного кольору внутрішнім діаметром 12 мм (рис. 1.4). Проводилась монокулярна стимуляція відкритого ока тварини у стані седатції.

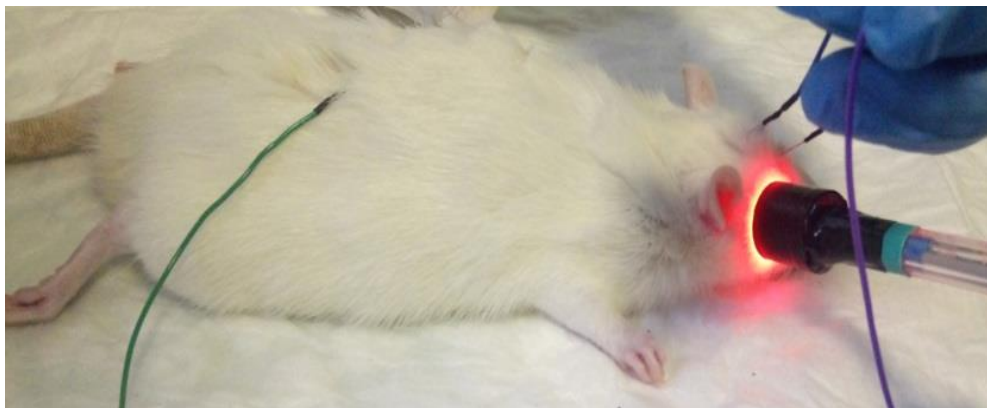


Рис. 1.4. Реєстрації зорових викликаних коркових потенціалів на спалах у щурів

Скелетотопічно референтний реєструючий електрод знаходився на середині лінії, яка з'єднує верхні краї зіниць щура; активний електрод – на відстані 15 мм від референтного; заземлюючий електрод – між активним і референтним. Використовувалась відстань у 15 мм, оскільки такий сагітальний розмір в середньому мають тім'яні кістки дорослих щурів. Таким чином активний електрод знаходився на межі між потиличною і тім'яною кісткою, що максимально співпадало з локалізацією зорової кори у щурів. Після перевірки імпедансу, який був менше 5 кОм, проводилась почергова монокулярна стимуляція обох очей з частотою 1 Гц, тривалістю стимула 5 мс. Кількість серій стимуляцій становила 3-4, по 60 стимулів в серії на кожне око. Наступним проводилась суперпозиція кривих, визначення амплітуди та латенції для кожного ока. Для статистичної обробки використовувалась латенція N1, P2 та амплітуда P1-N1, N1-P2.

Латентність N1 – це початковий компонент ЗВП на реверсивний паттерн або подразник, результат збудження нейронів первинної зорової кори (17-е поле Бродмана). Латентність P2 – найбільший за амплітудою і найбільш відтворений компонент ЗВП, який є результатом генерації в корі стріатума (17-18-е поле Бродмана). Латентність (латентний період) потенціалу дії зорового аналізатора

оцінюється в мілісекундах (мс). Амплітуда піків P1-N1, N1-P2 – відображає обсяг зорової аферентації до кори головного мозку і оцінюється в мкВ [94].

1.2.5. Характеристика морфологічних методів дослідження

Дослідження гістологічних змін сітківки та зорового нерва виконані в лабораторії морфології і цитології ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України» (згідно Договору, за консультативної підтримки провідного наукового співробітника, кандидата біологічних наук П. П. Клименка) та на кафедрі гістології та ембріології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця (згідно Договору, за консультативної підтримки доцента кафедри, доктора медичних наук А. В. Корсак).

Виведення піддослідних тварин (щурів) з експерименту відбувалося шляхом евтаназії (передозування тіопенталового наркозу). Після забору енуклеювані очні яблука обколювали 4% розчином формаліну і поміщались в 4% формалін. Через 24 години очі промивалися в проточній воді і проводилися відповідно до загальноприйнятої методики. Проведено зневоднення в спиртах зростаючої концентрації і залито в парапласт. Зрізи отримували за допомогою мікротома MICROM HM 325 (Японія). Проводили гістоморфометричний аналіз сітківки на забарвлених гематоксилін-еозином зрізах товщиною 5 мкм з використанням мікроскопа Olympus BX 51 (Японія).

На отриманих зображеннях за допомогою ПО Image J (США) проводилися морфометричні дослідження наступних параметрів: товщина внутрішнього сітчастого шару, товщина внутрішнього ядерного шару, товщина зовнішнього ядерного шару, товщина фоторецепторного шару (паличок і колбочок).

Матеріалом для морфологічного дослідження також був зоровий нерв (внутрішньоочна, внутрішньоорбітальна, внутрішньоканальна, внутрішньочерепна частина до зорового перехресту).

Матеріал фіксували у 10%-му розчині формаліну. Для дослідження змін зорового нерва було використано загальногістологічний метод (забарвлення гематоксиліном та еозином) та нейрогістологічна методика (імпрегнація

азотнокислим сріблом). Зорові нерви промивали та виробляли зрізи на заморожуючому мікромомі, згодом імпрегнували азотнокислим сріблом за швидким методом імпрегнації азотнокислим сріблом елементів периферійної нервової системи. Після стандартної проводки зоровий нерв замикали у парафінові блоки та отримували поздовжні зрізи, які зафарбовували гематоксиліном та еозином.

Фотографії гістологічних препаратів робили за допомогою світлового мікроскопу Olympus BX51 із під'єднаною цифровою камерою Olympus Zoom-4040 (Olympus, Японія).

Для морфометричного дослідження використовували програму аналізу біомедичних зображень ImageJ ver. 1.51 (NIH, USA, Open-source). На поздовжніх зрізах підраховували число нервових волокон, що пересікають лінію перпендикулярну поздовжній осі нерва, після чого підраховували питому кількість нервових волокон (од/мм²), використовуючи формулу:

$$N_s = (N * 10^6) / (L * h), \quad (1.1)$$

де: N_s – питома кількість нервових волокон, од/мм²; N – кількість нервових волокон, що пересікають лінію, перпендикулярну поздовжній осі нерва; L – довжина вказаної вище лінії, мкм; h – товщина зріза, мкм.

Питому кількість гліальних клітин (од/мкм²) підраховували у випадково обраній ділянці орбітальної частини нерва шляхом поділу кількості клітин у полі зору на площу поля зору.

1.2.6. Характеристика біохімічних методів дослідження

Біохімічні дослідження сітківки проводили у відділі фізіології кровообігу Інституту фізіології імені О. О. Богомольця (завідувач відділу член-кореспондент НАН України, доктор медичних наук, професор В. Ф. Сагач).

Для біохімічних досліджень зразки тканини ока подрібнювали та негайно заморожували у рідкому азоті. Інтенсивність оксидативного метаболізму вивчали за зміною швидкості генерації нестабільних вільних радикалів кисню – супероксидного аніон-радикалу (O_2^-), гідроксильного радикала ($\cdot OH$) і кінцевих

продуктів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) – малонового діальдегіду (МДА), дієнових кон'югатів (ДК), ейкозаноїда лейкотрієну C_4 (LTC₄).

Швидкість генерації $\cdot O_2^-$ в гомогенатах тканин визначали за окисненням цитохрому *C* у тріс-НСІ-буфері (10 ммоль/л; рН=7,4) фіксуючи зміни екстинції ($\lambda=550$ нм) після інкубації проби при 37°C, протягом 30 хв. Вміст O_2^- , генерованого пробами під час інкубації, визначали за коефіцієнтом молярної екстинції $\lambda=21\ 000$ моль⁻¹ · см⁻¹ [95].

Для визначення швидкості генерації $\cdot OH$ готували інкубаційну суміш у складі (ммоль/л): дезоксирибоза – 20; H₂O₂ – 1; натрій-фосфатний буфер – 20; рН=7,4. Пробу інкубували при 37°C протягом 60 хв, додавали 0,5 мл 1%-го розчину тіобарбітурової кислоти (ТБК) в розчині NaOH (50 ммоль/л) і 0,5 мл 2,8%-го розчину трихлороцтової кислоти (ТХК). Отриману суміш витримували на водяній бані 20 хв, охолоджували та реєстрували величину екстинції при $\lambda=532$ нм. Кількість $\cdot OH$ -радикала виражали в умовних одиницях $\Delta E \cdot 10^2$ за 60 хв на 1 мг білка проби [96].

Вміст МДА визначали за допомогою додавання до аліквот проб 0,5 мл 1%-го розчину ТБК в 50 ммоль/л NaOH і 0,5 мл 2,8%-го розчину ТХК. Отриману суміш витримували 20 хв на водяній бані. Також в цей час формувався триметиновий комплекс як похідне червоного забарвлення, охолоджували і вимірювали екстинцію при $\lambda=532$ нм. Вміст МДА розраховували з використанням коефіцієнту молярної екстинції 15 600 моль⁻¹ · см⁻¹ [97].

Вміст LTC₄ визначали в спиртових екстрактах із заморожених в рідкому азоті та розтертих у порошок пробах за допомогою радіоімунного методу, користуючись стандартними добірками реактивів «Amersham» (Велика Британія). Радіоактивність проб вимірювали на лічильнику фірми «Bachman» (Німеччина). Методика визначення вмісту ДК включала екстракцію ліпідів із зразків за допомогою органічних розчинників (гептан/ізопропанол 1:1) і вимірювання екстинції при $\lambda=232$ нм [98]. Для перерахунку використовували коефіцієнт молярної екстинції 21000 моль⁻¹ · см⁻¹. Вміст загального білка в пробах визначали за методом Лоурі [99].

1.3. Статистична обробка результатів дослідження

Аналіз результатів дослідження був проведений у пакеті EZR v.1.35 (R statistical software version 3.4.3, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) [100]. Кількісні змінні представлені середнім значенням (\bar{X}) та стандартним відхиленням ($\pm SD$) або стандартною помилкою ($\pm m$) у випадку нормального закону розподілу чи медіаною (Me) та міжквартильним інтервалом (Q_I-Q_{III}) у випадку закону розподілу, відмінного від нормального. Для перевірки розподілу на нормальність використано критерій Шапіро-Уїлка. Відмінність між показниками дослідної та контрольної груп оцінювали за t-критерієм Стюдента або непараметричним критерієм Манна-Уїтні. Для виявлення відмінностей між показниками у 5-и групах використано дисперсійний аналіз, постеріорне порівняння проводилося за критерієм Шефе (нормальний закон розподілу) або критерій Крускала-Уолліса, постеріорне порівняння проводилося за критерієм Данна (закон розподілу відрізнявся від нормального) [101]. Аналіз зміни показників з часом проводився з використанням дисперсійного аналізу для повторних вимірювань або непараметричним критерієм Фрідмана [101]. Величини зміни показників з часом представлені середнім значенням зміни, розраховано 95% вірогідний інтервал (95% ВІ) [101]. При проведенні аналізу у всіх випадках критичний рівень значимості прийнятий рівним 0,05.

1.4. Дотримання етичних норм дослідження

Дослідження проводили з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи щодо прав людини та біомедицину; принципів біоетики, законодавчих норм та вимог щодо використання лабораторних тварин у медичних і біологічних експериментах, викладених в Хельсінкській декларації (1964-2013); Закону України №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006); Етичного кодексу вченого України (Національна академія наук України, 2009); загальних етичних принципів експериментів на лабораторних тваринах (Перший Національний конгрес з біоетики, 2001), які розроблено у відповідності до основних положень біоетики та біоетичної експертизи, в інтересах захисту людини і всього

біологічного різноманіття світу та узгоджуються з положеннями "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших цілей" (Страсбург, Франція, 1985).

Резюме до розділу 1

Таким чином, проведений нами аналіз відомих моделей глаукомної оптичної нейропатії у лабораторних тварин, і зокрема адреналін індукованої моделі глаукоми, дозволяє зробити висновок, що на сьогоднішній день дана модель є простою, доступною та адекватною клінічним вимогам.

Саме тому для експериментального дослідження нами була вибрана ця модель глаукоми, яка дозволяє відтворити хронічний судинно-генералізований нейродегенеративний процес в оці в експериментальних умовах та є важливим інструментом для вивчення ефективності нових методів лікування глаукоми.

У роботі були використані наступні методи досліджень: інструментальні, біохімічні, гістоморфометричний аналіз. Показані методи статистичної обробки даних.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ У РОЗДІЛІ 1

1. Петров СЮ, Суббот АМ, Габашвили АН, Волжанин АВ, Витков АА. Способы моделирования глаукомной оптической нейропатии в эксперименте на крысах. Национальный журнал глаукома. 2017;16(4):79-85.
2. Красовский ГН, Егорова НА, Антонова МГ. Проблема экстраполяции результатов биотестирования на человека. Токсик. Вест. 2000;6:13-19.
3. Петров СЮ, Суббот АМ, Волжанин АВ. Экспериментальная модель глаукомы у животных. Точка зрения. Восток-Запад. 2018;3:139-42. DOI: 10.25276/2410-1257-2018-139-142
4. Морщинина АА, Морщинина ДА. О математическом моделировании глаукомы. Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 1. Математика. Механика. Астрономия. 2014;1(1):144-51.
5. Павлюченко КП, Сердюк ВН, Могилевский СЮ. Многофакторная математическая модель эффективности лечения первичной открытоугольной глаукомы. Офтальмология Восточная Европа. 2014;4(23):267-71.
6. Wax MB, Tezel G, Kobayashi S, Hernandez MR. Responses of different cell lines from ocular tissues to elevated hydrostatic pressure. British Journal of Ophthalmology. 2000;84(4):423-8.
7. Levin LA. Animal and culture models of glaucoma for studying neuroprotection. Eur J Ophthalmol. 2001;11(2):23-9.
8. Palmero M, Bellot JL, Castillo M, Garcia-Cabanes C, Miquel J, Orts A. An in vitro model of ischemic-like stress in retinal pigmented epithelium cells: protective effects of antioxidants. Mech Ageing Dev. 2000;114(3):185-90.
9. Ishikawa M, Yoshitomi T, Zorumski CF, Izumi Y. Effects of acutely elevated hydrostatic pressure in a rat ex vivo retinal preparation. Investigative Ophthalmology and Visual Science. 2010;51(12):6414-23.
10. Izzotti A, Sacca SC, Longobardi M, Cartiglia C. Mitochondrial damage in the trabecular meshwork of patients with glaucoma. Arch Ophthalmol. 2010;128(6):724-730. DOI: 10.1001/archophthalmol.2010.87

11. Lee S, Van Bergen NJ, Kong GY, Chrysostomou V, Waugh HS, O'Neill EC, et al. Mitochondrial dysfunction in glaucoma and emerging bioenergetic therapies. *Exp Eye Res.* 2011 Aug;93(2):204-12. DOI: 10.1016/j.exer.2010.07.015
12. Aires ID, Ambrósio AF, Santiago AR. Modeling Human Glaucoma: Lessons from the in vitro Models. *Ophthalmic Res.* 2017;57:77-86. DOI: 10.1159/000448480
13. Bouhenni RA, Dunmire J, Sewell A, Edward DP. Animal Models of Glaucoma. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:692609.
14. Mitchell MA, Tully TN Jr, editors. *Manual of Exotic Pet Practice.* 2009. Chapter 12, Mice and rats; p. 326-44. DOI: 10.1016/b978-141600119-5.50015-9
15. Morrison JC, Cepurna WO, Johnson EC. Modeling glaucoma in rats by sclerosing aqueous outflow pathways to elevate intraocular pressure. *Exp Eye Res* 2015;141:23-32. DOI: 10.1016/j.exer.2015.05.012
16. Tehrani S, Johnson EC, Cepurna WO, Morrison JC. Astrocyte processes label for filamentous actin and reorient early within the optic nerve head in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(10):6945-52.
17. Nguyen JV, Soto I, Kim KY, Bushong EA, Oglesby E, Valiente-Soriano FJ, et al. Myelination transition zone astrocytes are constitutively phagocytic and have synuclein dependent reactivity in glaucoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(3):1176-81. DOI: 10.1073/pnas.1013965108
18. Morrison JC, Fraunfelder FW, Milne ST, Moore CG. Limbal microvasculature of the rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36(3):751-6.
19. Jia L, Cepurna WO, Johnson EC, Morrison JC. Patterns of intraocular pressure elevation after aqueous humor outflow obstruction in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(6):1380-5.
20. Guo Y, Johnson EC, Cepurna WO, Dyck JA, Doser T, Morrison JC. Gene Expression Changes in the Retinal Ganglion Cell Layer of a Rat Glaucoma Model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011 Mar;52(3):1460-73.
21. Kipfer-Kauer A, McKinnon SJ, Frueh BE, Goldblum D. Distribution of amyloid precursor protein and amyloid- β in ocular hypertensive C57BL/6 mouse eyes. *Current Eye Research.* 2010;35(9):828-34.

22. Morrison JC, Moore CG, Deppmeier LMH, Gold BG, Meshul CK, Johnson EC. A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. *Experimental Eye Research*. 1997;64(1):85-96.
23. Ishikawa M, Yoshitomi T, Zorumski CF, Izumi Y. Experimentally induced mammalian models of glaucoma. *Biomed Res. Int.* 2015; Article ID 281214. DOI: 10.1155/2015/281214
24. Johnson TV, Tomarev SI. Rodent models of glaucoma. *Brain Res Bull.* 2010;81:349-58.
25. Kwong JM, Quan A, Kyung H, Piri N, Caprioli J. Quantitative analysis of retinal ganglion cell survival with Rbpms immunolabeling in animal models of optic neuropathies. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:9694-702.
26. Kwong JM, Vo N, Quan A, Nam M, Kyung H, Yu F, et al. The dark phase intraocular pressure elevation and retinal ganglion cell degeneration in a rat model of experimental glaucoma. *Exp Eye Res.* 2013;112:21-8.
27. Biermann J, van Oterendorp C, Stoykow C, et al. Evaluation of intraocular pressure elevation in a modified laser-induced glaucoma rat model. *Exp Eye Res.* 2012;104:7-14.
28. Feng L, Chen H, Suyeoka G, Liu X. A laserinduced mouse model of chronic ocular hypertension to characterize visual defects. *J Visual Exp* 2013 Aug 14;78:50440. DOI: 10.3791/50440
29. Yun H, Lathrop KL, Yang E, Sun M, Kagemann L, Fu V, et al. A Laser-Induced Mouse Model with Long-Term Intraocular Pressure Elevation. *PLoS One.* 2014 Sep 12;9(9):e107446. DOI: 10.1371/journal.pone.0107446
30. Zhang L, Li G, Shi M, et al. Establishment and Characterization of an Acute Model of Ocular Hypertension by Laser-Induced Occlusion of Episcleral Veins. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017;58(10):3879-86.
31. Ou Y, Jo RE, Ullian EM, Wong RO, Della Santina L. Selective Vulnerability of Specific Retinal Ganglion Cell Types and Synapses after Transient Ocular Hypertension. *J Neurosci.* 2016;36(35):9240-52. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0940-16.2016

32. Liu HH, Zhang L, Shi M, Chen L, Flanagan JG. Comparison of laser and circumlimbal suture induced elevation of intraocular pressure in albino CD-1 mice. *PLoS One*. 2017;12(11):e0189094. DOI: 10.1371/journal.pone.0189094
33. De Hoz R, Ramírez AI, González-Martín R, Ajoy D, Rojas B, Salobar-Garcia E. Bilateral early activation of retinal microglial cells in a mouse model of unilateral laser-induced experimental ocular hypertension. *Exp Eye Res*. 2018;17:12-29. DOI: 10.1016/j.exer.2018.03.006
34. Biswas S, Wan KH. Review of rodent hypertensive glaucoma models. *Acta Ophthalmologica*. 2019;97:e331-40. DOI: 10.1111/aos.13983
35. Overby DR, Clark AF. Animal Models of Glucocorticoid-Induced Glaucoma. *Exp Eye Res*. 2015 Dec;141:15-22. DOI: 10.1016/j.exer.2015.06.002
36. Quigley HA, Addicks EM. Chronic experimental glaucoma in primates. I. Production of elevated intraocular pressure by anterior chamber injection of autologous ghost red blood cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 1980;19(2):126-36.
37. Quigley HA, Addicks EM. Chronic experimental glaucoma in primates. II. Effect of extended intraocular pressure elevation on optic nerve head and axonal transport. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 1980;19(2):137-52.
38. Weber AJ, Zelenak D. Experimental glaucoma in the primate induced by latex microspheres. *Journal of Neuroscience Methods*. 2001;111(1):39-48.
39. Samsel PA, Kisiswa L, Erichsen JT, Cross SD, Morgan JE. A novel method for the induction of experimental glaucoma using magnetic microspheres. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2011;52(3):1671-5.
40. Mayordomo-Febrer A, Lopez-Murcia M, Morales-Tatay JM, Monleon-Salvado D, Pinazo-Duran MD. Metabolomics of the aqueous humor in the rat glaucoma model induced by a series of intracameral sodium hyaluronate injection. *Exp Eye Res*. 2015 Feb;131:84-92. DOI: 10.1016/j.exer.2014.11.012
41. Guo Ch, Qu X, Rangaswamy N, Leehy B, Xiang C, Rice D, et al. A murine glaucoma model induced by rapid *in vivo* photopolymerization of hyaluronic acid

glycidyl methacrylate. PLoS One. 2018;13(6):e0196529. DOI: 10.1371/journal.pone.0196529

42. Ficarrota KR, Mohamed YH, Passaglia CL. Experimental glaucoma model with controllable intraocular pressure history. *Sci Rep.* 2020;10:126. DOI: 10.1038/s41598-019-57022-5
43. Shareef SR, Garcia-Valenzuela E, Salierno A, Walsh J, Sharma SC. Chronic ocular hypertension following episcleral venous occlusion in rats. *Exp Eye Res.* 1995;61(3):379-82.
44. Yu S, Tanabe T, Yoshimura N. A rat model of glaucoma induced by episcleral vein ligation. *Experimental Eye Research.* 2006;83(4):758-70.
45. Vecino E, Sharma SC. Glaucoma – Glaucoma-Basic and Clinical Aspects. Rijeka, Croatia; 2011. Chapter 15, Glaucoma animal models; p. 319-34.
46. Алябьева ЖЮ, Романова ТБ, Липатова ВА, Ботчей ВМ. Экспериментальные модели глаукомы в свете исследований новых нейропротекторов. *PMЖ «Клиническая Офтальмология».* 2015;3:145-9.
47. Levkovitch-Verbin H, Harris-Cerruti C, Groner Y, Wheeler LA, Schwartz M, Yoles E. RGC Death in Mice after Optic Nerve Crush Injury: Oxidative Stress and Neuroprotection. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000;41(13):4169-74.
48. Blair M, Pease ME, Hammond J, Valenta D, Kielczewski J, Levkovitch-Verbin H, et al. Effect of Glatiramer Acetate on Primary and Secondary Degeneration of Retinal Ganglion Cells in the Rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2005;46(3):884-890. DOI: 10.1167/iovs.04-0731
49. Vorwerk CK, Lipton SA, Zurakowski D, Hyman BT, Sabel BA, Dreyer EB. Chronic low-dose glutamate is toxic to retinal ganglion cells. Toxicity blocked by memantine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37(8):1618-24.
50. Schuettauf F, Vorwerk C, Naskar R, Orlin A, Quinto K, Zurakowski D, et al. Adeno-associated viruses containing bFGF or BDNF are neuroprotective against excitotoxicity. *Curr Eye Res.* 2004;29:379-86.

51. Li Y, Schlamp CL, Poulsen GL, Jackson MW, Griep AE, Nickells RW. p53 regulates apoptotic retinal ganglion cell death induced by N-methyl-D-aspartate. *Mol Vis*. 2002;8:341-50.
52. Inoue-Matsuhisa E, Sogo S, Mizota A, Tani ai M, Takenaka H, Mano T. Effect of MCI-9042, a 5-HT₂ receptor antagonist, on retinal ganglion cell death and retinal ischemia. *Exp Eye Res*. 2003;76:445-52.
53. Junk AK, Mammis A, Savitz SI, Singh M, Roth S, Malhotra S, et al. Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci*. 2002;99:10659-64.
54. Chidlow G, Schmidt KG, Wood JP, Melena J, Osborne NN. Alpha-lipoic acid protects the retina against ischemia-reperfusion. *Neuropharmacology*. 2002;43:1015-25.
55. Dijk F, Kamphuis W. An immunocytochemical study on specific amacrine cell subpopulations in the rat retina after ischemia. *Brain Res*. 2004;1026:205-17.
56. Nashine S, Liu Y, Kim BJ, Clark AF, Pang IH. Role of C/EBP Homologous Protein in Retinal Ganglion Cell Death After Ischemia/Reperfusion Injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;56:221-31.
57. Mosinger JL, Olney JW. Photothrombosis-induced ischemic neuronal degeneration in the rat retina. *Exp Neurol*. 1989;105(1):110-13.
58. Stefansson E, Wilson CA, Schoen T, Kuwabara T. Experimental ischemia induces cell mitosis in the adult rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1988;29(7):1050-5.
59. John SW, Smith RS, Savinova OV, Hawes NL, Chang B, Turnbullet D, et al. Essential iris atrophy, pigment dispersion, and glaucoma in DBA/2J mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39:951-62.
60. Turner AJ, Vander Wall R, Gupta V, Klistorner A, Graham SL. DBA/2J mouse model for experimental glaucoma: pitfalls and problems. *Clin Exp Ophthalmol*. 2017;45(9):911-922.
61. Fujikawa K, Iwata T, Inoue K, Akahori M, Kadotani H, Fukaya M, et al. VAV2 and VAV3 as candidate disease genes for spontaneous glaucoma in mice and humans. *PLoS One*. 2010;5(2):e9050.

62. Harada T, Harada C, Nakamura K, Quah Hun-Meng A, Okumura A, Namekata K, et al. The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. *The Journal of Clinical Investigation*. 2007;117(7):1763-70. DOI: 10.1172/JCI30178
63. Senatorov V, Malyukova I, Fariss R, Wawrousek EF, Swaminathan S, Sharan SK, et al. Expression of Mutated Mouse Myocilin Induces Open-Angle Glaucoma in Transgenic Mice. *Journal of Neuroscience*. 2006;26(46):11903-14. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3020-06.2006
64. Zhou Y, Grinchuk O, Tomarev SI. Transgenic mice expressing the Tyr437His mutant of human myocilin protein develop glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(5):1932-9.
65. Fingert JH, Stone EM, Sheffield VC, Alward WL. Myocilin glaucoma. *Surv Ophthalmol*. 2002;47:547-61.
66. Johnson TV, Bull ND, Hunt DP, Marina N, Tomarev SI, Martin KR. Neuroprotective effects of intravitreal mesenchymal stem cell transplantation in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010 Apr;51(4):2051-9.
67. Harrell CR, Fellabaum C, Arsenijevic A, et al. Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells and Their Secretome in the Treatment of Glaucoma. *Stem Cells Int*. 2019 Dec 27;2019:7869130. DOI: 10.1155/2019/7869130.
68. Roubex C, Godefroy D, Mias C, et al. Intraocular pressure reduction and neuroprotection conferred by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in an animal model of glaucoma. *Stem Cell Res Ther*. 2015 Sep 16;6(1):177. DOI: 10.1186/s13287-015-0168-0
69. Manuguerra-Gagné R, Boulos PR, Ammar A, Leblond FA, Kros G, Pichette V, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells promotes tissue regeneration in a glaucoma model through laser-induced paracrine factor secretion and progenitor cell recruitment. *Stem Cells*. 2013;31(6):1136-1148. DOI:10.1002/stem.1364
70. Zhou Yi, Xia X, Yang E, Wang Y, Marra KG, Ethier CR, et al. Adipose-derived stem cells integrate into trabecular meshwork with glaucoma treatment potential. *The FASEB Journal*. 2020;34(5):7160-77. DOI: 10.1096/fj.201902326R

71. Boland MV, Ervin AM, Friedman DS, Jampel HD, Hawkins BS, Vollenweider D, et al. Comparative effectiveness of treatments for open-angle glaucoma: a systemic review for the US preventive services task force. *Ann Intern Med.* 2013;158:271-9. DOI: 10.7326/0003-4819-158-4-201302190-00008
72. Nickells RW, Howell GR, Soto I, John SWM, et al. Under pressure: cellular and molecular responses during glaucoma, a common neurodegeneration with axonopathy. *Annu Rev Neurosci.* 2012;35:153-79. DOI: 10.1146/annurev.neuro.051508.135728
73. Vors O, Marqueste T, Mascret N. The Trier social stress test and the Trier social stress test for groups: qualitative investigations. *PLoS One.* 2018;13(4):e0195722.
74. Yeager MP, Guyre CA, Sites BD, Collins JE, Pioli PA, Guyre PM. The stress hormone cortisol enhances interferon- γ -mediated Proinflammatory responses of human immune cells. *Anesth Analg.* 2018;127(2):556-63.
75. Ensminger DC, Owen DAS, MacLeod KJ, Sheriff MJ. Maternal stress alters the phenotype of the mother, her eggs, and her offspring in a wild caught lizard. *J Anim Ecol.* 2018;87(6):1685-97.
76. Miller DB, O'Callaghan JP. Neuroendocrine aspects of the response to stress. *Metabolism.* 2002;51(6 Suppl 1):5-10.
77. Ayari H. Respective roles of cortisol, aldosterone and angiotensin II during pathophysiology of atherosclerosis. *Ann Biol Clin (Paris).* 2013;71(4):381-8.
78. Афендулова ИС, Захарова ИА. Влияние психо-эмоционального стресса на развитие первичной глаукомы. *Глаукома.* 2008;4:35-36.
79. Kaluza G, Maurer H. Stress and intraocular pressure in open angle glaucoma. *Psychology & Health.* 1997;12(5):667-75.
80. Sanz A, Méndez-Ulrich JL. Intraocular Pressure Reactivity to Social Stressors. *Journal of Psychophysiology.* 2020;83:1-13.
81. Shily BG. Psychophysiological stress, elevated intraocular pressure, and acute closed-angle glaucoma. *Am J Optom Physiol Opt.* 1987;64(11):866-870. DOI: 10.1097/00006324-198711000-00011
82. Schwarts B. Differences of adrenal stress control mechanisms in subjects with glaucoma and normal subjects. *Arch. Ophthalmol.* 1981;10:170-77.

83. Крыжановский ГН, Кашинцева ЛТ, Михейцева ИН, и др. Циклические нуклеотиды при экспериментальной глаукоме. Бюл. эксп. биол. и мед. 1988;10:419-21.
84. Михейцева ИМ. Фармакологічна корекція експериментальної відкритокутової глаукоми. Автореферат кан. біол. наук. Одеса. 1998. 16 с.
85. Mikheyitseva I, Kashintseva L, Krizanovsky G. et al. The influence of the calcium channels blocker verapamil on experimental glaucoma. Intern Ophthalmol. 2004;25:75-9.
86. Turner DC, Miranda M, Morris JS, Girkin CA, Downs JC. Intraocular pressure increases rapidly and significantly in response to stressful situations in the NHP. Ophthalmology Glaucoma. 2019;2(4):210-14.
87. Михейцева ИМ, винахідник. Спосіб моделювання хронічного підвищеного внутрішньоочного тиску у щурів. Патент України №38446. 2009 Січ 12.
88. Михейцева ИН. Моделирование глаукомы и адреналиновый стресс. J. Clin. Exp Med. Res. 2014;2(4):427-37.
89. Rocha LR, Huu VA, Torre CP, Xu Q, Jabari M, Krawczyk M, et al. Early removal of senescent cells protects retinal ganglion cells loss in experimental ocular hypertension. Aging Cell. 2019;19(2): e13089.
90. Васильев РГ, Родниченко АЕ, Зубов ДА, Губарь ОС, Шестакова ТС, Литвинова ЛС, и соавт. Исследование *in vitro* биологических свойств мультипотентных стволовых клеток-производных нервного гребня из бульбарного региона волосяного фолликула взрослых млекопитающих. Стволовые клетки и регенеративная медицина. 2014;2:39-57.
91. Liu JA, Cheung M. Neural crest stem cells and their potential therapeutic applications. Dev Biol. 2016;419(2):199-216. DOI: 10.1016/j.ydbio.2016.09.006
92. Weber M, Apostolova G, Widera D, Mittelbronn M, Dechant G, Kaltschmidt B, et al. Alternative generation of CNS neural stem cells and PNS derivatives from neural crest-derived peripheral stem cells. Stem Cells. 2015;33(2):574-88. DOI: 10.1002/stem.1880

93. Binder E, Rukavina M, Hassani H, Weber M, Nakatani H, Reiff T, et al. Peripheral nervous system progenitors can be reprogrammed to produce myelinating oligodendrocytes and repair brain lesions. *J Neurosci*. 2011;31(17):6379-91. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0129-11.2011
94. Гнездицкий ВВ. Вызванные потенциалы мозга в клинической практике. Таганрог: ТРТУ; 1997. 252 с.
95. Kuthan H, Ullrich V, Estabrook RW. A quantitative test for superoxide radicals produced in biological systems. *Biochem J*. 1982;203(3):551-8.
96. Humphries KM, Yoo Y, Szweda LI. Inhibition of NADHlinked mitochondrial respiration by 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry*. 1998;37(2):552-7.
97. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*. 1978;86(1):271-8.
98. Gavrilov VB, Gavrilova AR, Khmara NF. Measurement of dieneconjugates in blood plasma using the UV absorption of heptane and isopropanol extracts. *Lab Delo*. 1988;(2):60-4.
99. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
100. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48:452-8.
101. Гур'янов ВГ, Лях ЮС, Парій ВД, Короткий ОВ, Чалий ОВ, Чалий КО, Цехмістер ЯВ. Посібник з біостатистики. Аналіз результатів медичних досліджень у пакеті EZR (R–statistics). Навчальний посібник. Київ: Вістка; 2018. 208 с.

РОЗДІЛ 2

АНАЛІЗ МОРФОЛОГІЧНИХ ТА МОРФОМЕТРИЧНИХ ЗМІН СІТКІВКИ ТА ЗОРОВОГО НЕРВА ПРИ РІЗНИХ СПОСОБАХ ВВЕДЕННЯ КУЛЬТИВОВАНИХ ПОСТНАТАЛЬНИХ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ СЛОВБУРОВИХ КЛІТИН-ПОХІДНИХ НЕРВОВОГО ГРЕБЕНЯ

2.1. Сучасний стан вивчення проблеми глаукоми

Глаукома залишається актуальною проблемою офтальмології як в Україні, так і в усьому світі. На сьогоднішній день глаукома є провідною причиною зниження зору та незворотної сліпоты серед дорослого населення [1]. За результатами епідеміологічних досліджень кількість людей у віці 40-80 років з діагнозом глаукома в усьому світі становить 64,3 млн і за прогнозами очікується їх збільшення до 76,0 млн в 2020 році та до 111,8 млн в 2040 р. [2].

Результати досліджень представили відмінності в розповсюдженості і захворюваності різних форм глаукоми. Первинна відкрита кутова глаукома – найпоширеніша форма захворювання у всьому світі. За даними досліджень, виявлені показники поширеності первинної відкритокутової глаукоми у віці після 40 років становили 2,31% в Азії та 3,65% у Латинській Америці. Інші азіатські етноси мали показники – в діапазоні 0,5-3,9%, проте найвища поширеність становила в африканських країнах – 4,20% [3-6].

В результаті епідеміологічного дослідження, проведеного в США, встановлено, що глаукомою хворіє понад 2,71 млн осіб, а у 2050 році поширеність на первинну відкритокутову глаукому складатиме приблизно 7,32 млн людей, при цьому найвища кількість захворювання становитиме серед населення у віковій групі 70-79 років, частіше зустрічатиметься у жінок – 50% та латиноамериканців – 50% [7,8].

Генетичні дослідження дозволяють припустити, що успадкування первинної відкритокутової глаукоми, як правило, є мультигенним і багатофакторним, не виявляючи зв'язку з певним геном у більшості популяцій. Фактори навколишнього середовища та модифікуючі гени, ймовірно, грають важливу роль у розвитку даного захворювання [9,10].

У результаті інших досліджень показано, що первинна закритокутова глаукома не менш поширена форма захворювання. Вже давно встановлено, що дане захворювання частіше зустрічається серед населення Азії – в Південно-Східній Азії – 1,16%, в Східній Азії – 1,1% та в Південній Азії – 0,66%. Поширеність була вище у жінок, ніж у чоловіків – 1,5:1 [11,12].

За даними дослідження *The prevalence of primary angle closure glaucoma in European derived populations: a systematic review*, поширеність первинної закритокутової глаукоми у віці старше 40 років в європейській популяції становила 0,4%. Частота первинної відкритокутової глаукоми в середньому склала 0,02% серед осіб 40-49 років, 0,60% у віковій категорії 50-59 років, 0,20% у осіб 60-69 років та 0,94 % серед осіб старше 70 років. Поширеність первинної закритокутової глаукоми становить 130 000 людей у Великобританії, 1,60 млн в Європі та 581 000 в США. Враховуючи вікову структуру населення в цих районах, прогнозується зростання випадків захворювання у Великобританії на 19%, в Європі на 9% та в США на 18% протягом наступного десятиліття. Найчастіше глаукома зустрічається у жінок, а співвідношення жінок і чоловіків складає 3,25:1 [13].

У нашій країні статистика захворюваності також невтішна. Щорічно в Україні виявляється понад 25 тисяч нових випадків захворювання на глаукому. За останнє десятиліття (2000-2010 рр.) поширеність глаукоми серед дорослого населення України зросла більше ніж на 40%. Одночасне збільшення при цьому показників первинної інвалідності з приводу глаукоми свідчить про сформовані тенденції накопичення цієї патології серед дорослого населення України, що підкреслює її соціальну значущість як одного з найбільш інвалідизуючих захворювань [14]. Таке неухильне зростання пояснюється безсимптомним перебігом субклінічних та початкових стадій глаукоми, відсутністю єдиного алгоритму профілактичних і діагностичних заходів, що необхідні для виявлення захворювання на ранніх стадіях його розвитку [15-17].

Проблема профілактики, своєчасної діагностики та лікування цього захворювання залишається однією з найбільш актуальних в сучасній офтальмології, оскільки близько половини хворих глаукомою не знають про своє захворювання і

приблизно такий же відсоток пацієнтів з поставленим діагнозом не отримують необхідного лікування в повному обсязі.

Сучасні методи терапії, медикаментозні чи хірургічні, спрямовані на ефективне зниження внутрішньоочного тиску (ВОТ), не гарантують довготривалу стабілізацію глаукомного процесу. У кожного п'ятого пацієнта з первинною відкритокутовою глаукомою з часом спостерігається прогресивне зниження зорових функцій [18], що вказує на механізми розвитку глаукомної оптичної нейропатії, не зв'язаної із зниженням ВОТ.

Таким чином, для розробки нових ефективних методів лікування, що доповнюватимуть загальноприйняті стандарти, потрібно розуміти механізми пошкодження зорового аналізатора при глаукомі.

На сьогодні, відповідно до сучасних уявлень, глаукома розглядається як хронічне, мультифакторне нейродегенеративне захворювання, в процесі якого виникає загибель гангліонарних клітин сітківки (ГКС) та розвивається прогресуюча оптична нейропатія. Хвороба характеризується структурним ураженням клітинних компонентів сітківки та аксональних елементів в зоровому нерві, збільшенням екскавації диска зорового нерва та дефектами поля зору [19-22]. Механізми розвитку глаукомної оптичної нейропатії (ГОН) багато в чому схожі з цілим рядом захворювань центральної нервової системи, наприклад, хворобою Альцгеймера. А основним механізмом загибелі нейронів при нейродегенеративних захворюваннях вважається апоптоз [23-25].

Вивченню патогенезу ГОН присвячено чималу кількість робіт як зарубіжних, так і вітчизняних вчених [26-28]. Проте, незважаючи на численні дослідження, патофізіологічні механізми, що призводять до розвитку та прогресування ГОН, залишаються не до кінця з'ясованими, а існуючі на сьогодні теорії різноманітні і нерідко суперечливі [29].

Проведені протягом багатьох років дослідження свідчать, що основним фактором розвитку та прогресування ГОН є компресія аксональних пучків, що входять до складу нервових волокон, внаслідок деформації гратчастої пластинки склери з наступним порушенням в них аксоноплазматичного струму, що в свою

чергу гальмує ретроградне переміщення нейротрофінів і запускає механізм апоптозу [30,31]. Згідно досліджень, перші ознаки дефіциту нейротрофінів виявлялися в зоровому нерві при експериментальній глаукомі, але виражена дегенерація аксонів розвивалася після появи порушень в гангліонарних клітинах сітківки. Крім того, результати досліджень показали характерну реакцію астроцитів, які обмежували зону пошкодження. Вважають, що астроцити виконують роль аутокринного регулятора ендогенної гліальної функції і починають на місці виробляти відсутні нейротрофіни, таким чином підвищувати життєздатність ГКС [32,33].

Встановлено, що найважливішим фактором в попередженні розвитку апоптозу гангліонарних клітин сітківки вважається BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor), який має виражені нейропротекторні властивості. Також ряд досліджень свідчить, що BDNF бере активну участь в процесах нейротрофічної регуляції і дисрегуляції. У лабораторних щурів в процесі моделювання глаукоми спостерігалось різке зниження вмісту BDNF у структурах ока, а при інтавітреальному введенні відзначалося збільшення виживання ГКС [34-37].

Одним із основних чинників патогенезу ГОН, в якості механічного агента, виступає підвищений внутрішньоочний тиск. Проведені дослідження в сфері глаукоми, спрямовані на зниження ВОТ, підтвердили уповільнення прогресування дегенеративних змін в сітківці. Однак з'ясовано, що навіть успішне застосування сучасних методів зниження ВОТ, не у всіх випадках може зупинити зниження зорових функцій та прогресування глаукомного процесу [38-40].

Підвищення ВОТ виникає внаслідок порушення балансу між утворенням циліарним тілом водянистої вологи та її відтоком через основний шлях відтоку – трабекулярну сітку, а також увеосклеральний шлях відтоку. Патологічні зміни в дренажній системі ока ведуть до порушення відтоку внутрішньоочної рідини, підвищення ВОТ, що в свою чергу призводить до деформації решітчастої пластинки склери [41-43]. Саме тому підвищений ВОТ вважається важливим, але не єдиним фактором, що відповідає за пошкодження зорового нерва та призводить до апоптозу гангліонарних клітин сітківки.

Також потрібно відзначити, що внутрішньочерепний тиск є важливим фактором ризику розвитку глаукомної оптиконеуропатії. Різниця між ВОТ та внутрішньочерепним тиском по обидві сторони від решітчастої пластини визначає ступінь її прогину, а, отже, і ступінь стискання аксонів гангліонарних клітин сітківки [44-46].

В той же час ряд досліджень свідчать про те, що прогресування ГОН спостерігається у пацієнтів з нормальним ВОТ [47-49]. Це свідчить про критичну роль інших факторів у ініціації та прогресуванні глаукомних змін.

На сьогодні вчені визначили, що підвищення ВОТ або дія інших факторів ризику є результатом недостатності кровопостачання, яке супроводжується порушенням циркуляції кровотоку в тканинах очного яблука з розвитком ішемії зорового нерва і загибеллю гангліонарних клітин сітківки та їх аксонів. А одною з головних причин порушення кровопостачання зорового нерва є порушення судинної регуляції, яке викликає зниження перфузії сітківки ока і порушення місцевої саморегуляції, що веде до підвищення чутливості зорового нерва до коливань офтальмотонуса [50].

Останнім часом все більше уваги приділяється зв'язку між судинною недостатністю та глаукомою. Отримані результати досліджень свідчать, що розвиток ГОН пов'язаний з ішемією, до якої призводять такі порушення кровообігу в оці, як зниження перфузійного тиску, вазоспазм, збільшення опору внутрішньоочних судин, порушення ауторегуляції, зміни в'язкості крові [51,52]. Крім того відзначено, що судинні фактори ризику можуть бути значно виражені при артеріальній гіпертензії, вегетативній судинній дисрегуляції, атеросклерозі, та можуть спровокувати порушення кровотоку в оці [53].

Зниження перфузійного тиску для судин ока може бути обумовлено великою варіабельністю артеріального тиску (АТ) при судинній дистонії, нічними падіннями АТ, апное, ортостатичною гіпотонією, реперфузією. Артеріальна гіпотензія створює зменшення очного кровотоку, особливо, коли АТ перевищує можливості судинної ауторегуляції, що призводить до гіпоперфузії та ішемії. Доведено, що при перфузійному тиску менше 50 мм рт. ст. ризик розвитку глаукомної оптичної

нейропатії збільшується у порівнянні з хворими, у яких перфузійний тиск вище 80 мм рт. ст. [54-57].

Також важливу роль в розвитку та прогресуванні ГОН відіграє вазоспазм, який передбачає звуження судин або недостатню дилатацію мікроциркуляції, що може зменшити приплив крові до навколишньої тканини і, як наслідок, ішемії різного ступеня важкості. Такі порушення призводять до дисфункції системної ауторегуляції [58]. В результаті проведених досліджень показано, що вазоспазм призводить до порушення регуляції кровотоку сітківки та зорового нерва та в подальшому веде до перфузійної нестабільності, ішемічних змін, реперфузійного ураження та втрати аксонів [59].

Останнім часом все більше досліджень приділяють увагу впливу ендотеліальної дисфункції на розвиток ГОН. Ендотелій судин регулює мікроциркуляцію, як правило, за рахунок вивільнення основних вазорегуляторних факторів оксид азоту (NO) та ендотеліну-1 (ET-1) [60]. Оксид азоту, стимулюючи гладку мускулатуру судин, сприяє вазодилатації. Основним механізмом порушення активації NO є оксидативний стрес. Відомо, що активація NO сприяє ауторегуляції очей і виконує важливу ендотеліальну та нейрональну захисну функцію проти патологічних змін при ГОН. ET-1, який синтезується ендотеліальними клітинами та взаємодіє з рецепторами ET_A і ET_B, в основному сприяє вазоконстрикції, на відміну від NO. Отже, порушення рівнів синтезу NO та ET-1 може призвести до переваги вазоконстрикції над вазодилатацією, яка викликає вазоспазм. Крім того, локальне пошкодження клітин ендотелію, наприклад, в результаті запалення судинної стінки, може погіршувати ефективність місцевої регуляції. Така нестабільність кровотоку викликає повторну реперфузію, яка за рахунок оксидативного стресу сприяє розвитку глаукомної оптиконеуропатії [61-63].

Проте, незважаючи на значні досягнення у вивченні патогенезу глаукомної оптичної нейропатії, залишається ряд важливих аспектів, які остаточно не визначені. На сьогоднішній день продовжується пошук ключових патогенетичних ланок, що дозволило б ефективно боротися з прогресуванням глаукомного процесу.

Лікування глаукоми в наш час, незважаючи на чисельну кількість досліджень, залишається надзвичайно складним завданням. Адже не існує ідеальних методів лікування, які дозволили б досягти повного лікування хворого або зупинили б подальший розвиток даного захворювання.

Сучасні методи лікування глаукоми в основному спрямовані на зниження внутрішньоочного тиску, що є важливою умовою стабілізації глаукомного процесу. Нині розроблено декілька напрямків лікування, а саме медикаментозний, лазерний, хірургічний та комбінований, що направлені на зниження ВОТ до індивідуального цільового рівня, який запобігає подальшому розвитку та прогресуванню ураження зорового нерва.

Провідним напрямком медикаментозної терапії глаукоми є місцева гіпотензивна терапія. Гіпотензивні препарати впливають на продукцію водянистої вологи та/або покращують відтік водянистої вологи через трабекулярну сітку та увеосклеральний шлях. В результаті проведених міжнародних мультицентрових досліджень доведено, що при зниженні ВОТ потрібно досягти рівня «тиску мети», зниження ВОТ не менше ніж на 30% від початкового рівня, а також мінімального коливання офтальмотонуса протягом доби, що пригнічує подальше прогресування глаукоми. Антиглаукомні препарати в монотерапії чи в комбінації повинні бути ефективними та достатніми для того, щоб контролювати рівень ВОТ, з гарною переносимістю та відсутністю тахіфілаксії [64,65].

Для призначення гіпотензивної терапії пацієнтам з глаукомою використовують наступні основні групи препаратів, які мають як гіпотензивний ефект, так і нейропротекторний вплив [66], а саме: альфа-2 агоністи [67-69], бета-адреноблокатори [70-72], інгібітори карбоангідази [73-75], аналоги простагландину [76-78].

Крім цього, гіпотензивна терапія включає м-холіноміметики, найвідоміший представник цієї групи пілокарпін гідрохлорид. Препарат стимулює мускаринові рецептори, наслідком чого є скорочення м'яза-звужувача зіниці та цилиарного м'яза, що призводить до звуження зіниці та відкриття кута передньої камери, і, як результат, зниження ВОТ та покращення трофіки в тканинах ока. Результати

експериментальних досліджень на щурах показали, що пілокарпін надає ефективний захист від глутамат-індукованого апоптозу нейронів через мускариновий рецептор M1 [79].

Також можливе використання системної терапії для зниження ВОТ. Так, на даний момент, одним з ефективних засобів є ацетазоламід із групи інгібіторів карбоангідрази, який при пероральному застосуванні може знижувати ВОТ на 30% в залежності від введеної дози [80]. На думку вчених, препарати даної групи застосовуються в тих випадках, коли місцева терапія неефективна або проведена за короткий проміжок часу, враховуючи побічні ефекти [81]. Деякі дослідники вважають, що системне введення ацетазоламиду покращує загальний хоріоїдальний кровоток, але далеко не всі дослідження виявили такий ефект [82,83].

Деякі вчені рекомендують застосування блокаторів кальцієвих каналів, які можуть бути ефективні при глаукомі у пацієнтів з вазоспастичним синдромом. В основному такі препарати призначають у малих дозах, які практично не впливають на артеріальний тиск, щоб запобігти згубному впливу на перфузійний тиск, викликаючи місцеве розширення судин ока [84,85].

На сьогодні кількість рандомізованих масштабних клінічних досліджень достатньо обмежена, тому важко повною мірою дослідити вплив системної терапії на патогенез та прогресування глаукоми.

Відомо, що у випадку, коли консервативне лікування недостатньо ефективне, для зниження ВОТ показані лазерні або хірургічні методи лікування, а вибір типу втручання буде залежати від форми глаукоми.

Розробка патогенетично спрямованих антиглаукомних операцій досягли певних успіхів в офтальмології. Так, завдяки лазерним втручанням можна досягти зниження ВОТ за рахунок збільшення відтоку водянистої вологи або ж за рахунок зменшення вироблення водянистої вологи [86]. В клінічній практиці при глаукомі використовують такі найбільш поширені лазерні втручання, як лазерна трабекулопластика, яка включає аргонову лазерну трабекулопластику, селективну лазерну трабекулопластику, мікроімпульсну лазерну трабекулопластику та титано-

сапфірову лазерну трабекулопластику [87-89], іридопластика [90-92], лазерна периферична іридотомія [93,94] та циклофотокоагуляція [95,96].

Однак, якщо шанси досягти зниження ВОТ до рівня «тиску мети» та зупинити подальший розвиток захворювання за допомогою консервативного чи лазерного лікування або їх комбінації, низькі, тоді слід розглянути можливість проведення хірургічного лікування.

У сучасній офтальмології існує безліч видів мікрохірургічної техніки, які постійно вдосконалюються або ж розробляються нові методи для лікування глаукоми. В залежності від певного механізму дії та точки впливу основні види хірургічних втручань спрямовані на покращення дренажу водянистої вологи, до яких відносяться внутрішня та зовнішня фістулізація шлемового каналу (трабекулоектомія, клапанна трабекулоектомія, синусотомія, каналопластика, непроникаюча глибока склеректомія, непроникаючі методи задньої фільтрації), операції, що спрямовані на усунення зіничного або ангулярного блоку, звільнення кута передньої камери ока від мезодермальної тканини або гоніосинехій [97-102]. Також застосовують хірургічні втручання на циліарному тілі ока, які сприяють зменшенню продукції внутрішньоочної рідини (циклокріоаплікація, транскон'юнктивальна проникаюча циклодіатермія) [103,104]. А «золотим стандартом» фістулізуючої операції традиційно вважається трабекулоектомія [105].

Однак чисельною кількістю досліджень показано, що крім ВОТ існують й інші фактори ризику, які або ж модифікують наслідки підвищеного ВОТ, або ж самостійно викликають прогресування глаукоми. Саме тому для їх усунення необхідне комплексне лікування глаукоми із залученням нейропротекції, що може забезпечити захист ГКС від шкідливих впливів та блокування патогенетичних процесів.

Весь сучасний світ спрямовано на нейропротекторне лікування, щоб впливати на ланки патогенезу глаукомної оптичної нейропатії, тому що ефективно зниження ВОТ не може гарантувати стабілізацію глаукомного процесу. На думку вчених, нейропротекцію можна вважати терапевтичною парадигмою, що спрямована на запобігання каскаду реакцій, які викликають ураження та загибель гангліонарних

клітин сітківки та їх аксонів. Нейропротекція спрямована на блокування шляхів загибелі або дисфункції ГКС, таких як цитотоксичність позаклітинного глутамату, мітохондріальна дисфункція, оксидативний стрес, вплив запальних цитокінів, а також спрямована на посилення механізмів збереження як функціональних, так і структурних характеристик ГКС [106,107].

Останніми роками здійснюється чимало експериментальних досліджень, які демонструють новий терапевтичний підхід на основі стовбурових клітин (СК). Досягнення в області регенеративної медицини і клітинної терапії ґрунтуються на унікальних властивостях СК, які включають здатність до самовідновлення і здатність до диференціації в специфічні види клітин, що служить підставою їх застосування для регенерації пошкоджених тканин при різних патологіях очного яблука [108-110].

В результаті експериментальних досліджень, присвячених вивченню впливу мезенхімальних стовбурових клітин на структуру сітківки, було встановлено, що даний тип клітин володіє потенціалом до диференціювання в нейроноподібні клітини, гліальні та фоторецепторні клітини. Також вони здатні до секреції нейротрофічних чинників, таких як білки нейротрофічного фактору мозку (BDNF) і фактори росту клітин, наприклад, фактор росту нейронів NGF, що забезпечує нові можливості в лікуванні дегенеративних змін сітківки [111,112].

Сучасною наукою активно здійснюються дослідження застосування клітинної терапії в лікуванні глаукоми. Результати досліджень свідчать, що мезенхімальні стовбурові клітини, які являють собою мультипотентні клітини, можуть бути ідеальним джерелом для нейропротекції через секрецію різноманітних нейротрофінів [113,114].

Також Christophe Roubeyx та співавторами було проведено дослідження *in vivo* та *in vitro*, що показало позитивний нейропротекторний ефект у патофізіології глаукоми через захист трабекулярної сітки. Введення клітин в передню камеру сприяло зниженню ВОТ на очах щурів після моделювання глаукоми шляхом припікання 3 епісклеральних вен [115].

Загалом нинішні результати досліджень демонструють два основних механізми дії трансплантованих СК, які при використанні аутологічних клітин часто комбінуються. У випадку структурного механізму дії після трансплантації СК відбувається їх приживлення, диференціація та інтеграція в пошкоджену тканину з заміною втрачених клітин. Паракринний (трофічний) механізм дії реалізується за рахунок того, що трансплантовані СК секретують сигнальні молекули (переважно фактора росту), які мають широкий спектр ефектів, такий як антиапоптичний, ангіогенний, імуномодулюючий, протизапальний та антимікробний, нейропротекторний, здатність до активація резидентних і хоумінг ендогенних стовбурових клітин [116-119].

Однак важливим аспектом клітинної терапії є правильний та адекватний вибір клітинного типу. У нашому дослідженні ми зупинилися на культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітинах-похідних нервового гребеня (мСК-ПНГ). Даний вибір зумовлено рядом причин, до яких можна віднести легку доступність та малоінвазивність процедури отримання цього типу клітин, перспективним джерелом для ізоляції та культивування яких у тварин та людини є волосяний фолікул [120], а також їх біологічні властивості, а саме потенціал до мультилінійної диференціації та продукцію широкого спектру факторів росту та цитокінів, що мають нейротрофічну, нейропротекторну, ангіогенну та антиапоптичну дію [121].

2.2. Особливості змін сітківки при різних способах введення культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня

Проведені морфологічні дослідження сітківки у інтактних щурів показали, що гангліонарний шар містить один ряд гангліонарних клітин з базофільним ядром. Внутрішній сітчастий шар складається з еозинофільних волокон помірної щільності.

Внутрішній ядерний шар містить два, іноді три, ряди щільно прилеглих клітин, які мають щільні базофільні ядра. До цього шару щільно прилягає тонкий еозинофільний зовнішній сітчастий шар.

Зовнішній ядерний шар містить тіла фоторецепторних клітин з базофільними ядрами помірної щільності. Ядра цих клітин на більшій площі зрізу утворюють впорядковані вертикально орієнтовані стовпчики. У сітківці також добре помітна щільна еозинофільна зовнішня гліальна погранична мембрана. Фоторецепторний шар (паличок і колбочок) еозинофільний, помірної щільності (рис. 2.1).

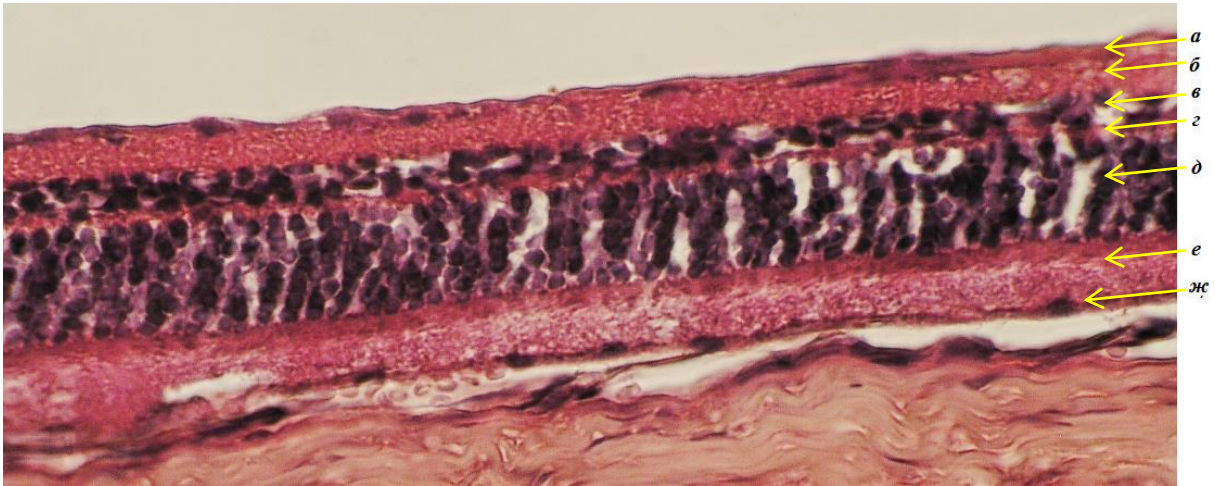


Рис. 2.1. Гістологічний препарат сітківки інтактних щурів. Забарвлення гематоксилін-еозином. Об.40, ок.10. *а* – шар нервових волокон та гангліонарних клітин; *б* – внутрішній сітчастий шар; *в* – внутрішній ядерний шар; *г* – зовнішній сітчастий шар; *д* – зовнішній ядерний шар; *е* – шар паличок і колбочок; *ж* – пігментний епітелій сітківки

Під шаром паличок і колбочок розташовується пігментний епітелій сітківки, який представлено одним рядом витягнутих клітин. Набряк шарів сітківки відсутній.

Також потрібно зазначити, що внутрішній та зовнішній ядерний шари сітківки містять упорядковане розташування ядер. У внутрішньому ядерному шарі ядра розташовані паралельно в два ряди. У зовнішньому ядерному шарі вони орієнтуються у вигляді стовпчиків. У судинній оболонці не спостерігається кровонаповнення судин.

2.2.1. Зміни сітківки щурів після моделювання глаукоми без введення культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня

У результаті моделювання глаукоми при гістологічному дослідженні відзначається розвиток дегенеративних змін характерних для глаукомної оптичної нейропатії.

У сітківці щурів з адреналіновою моделлю глаукоми аксони гангліонарних клітин частково відшаровуються від внутрішнього сітчастого шару, утворюючи при цьому лакуни. В ядрах гангліонарних клітин сітківки слабшає базофілія та спостерігається їх гіпертрофія. Крім того, відзначена міграція клітин внутрішнього ядерного шару у внутрішній сітчастий шар (рис. 2.2). Відбувається розпушення внутрішнього сітчастого шару. Зазначено ділянки розриву зовнішнього сітчастого шару (рис. 2.3).

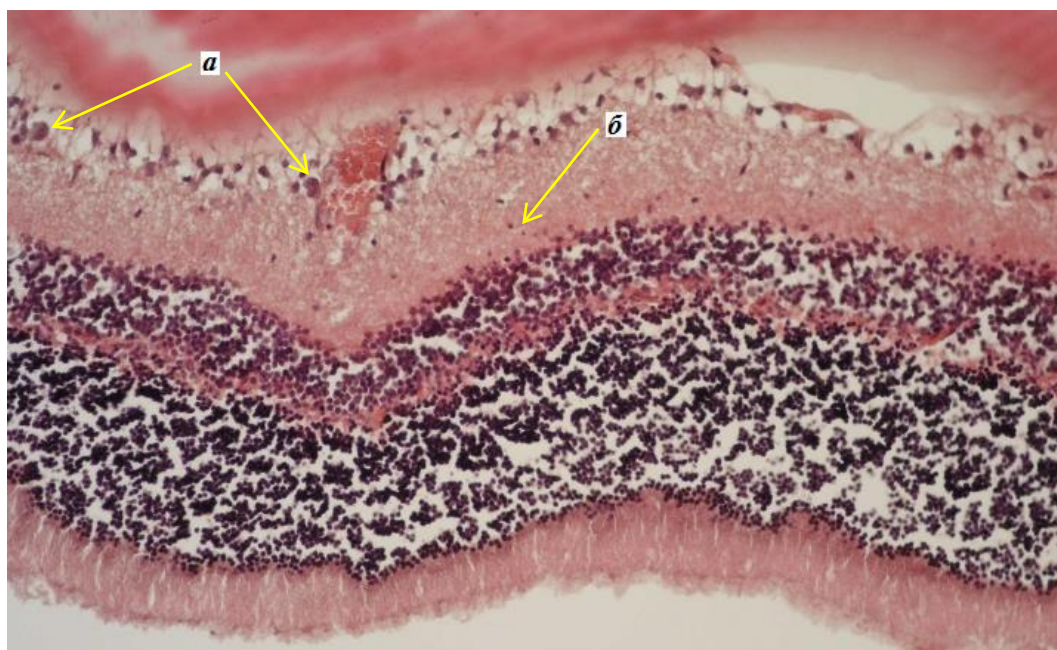


Рис. 2.2. Гістологічний препарат сітківки після моделювання глаукоми, центральна ділянка. Забарвлення гематоксилін-еозином. Об.20, ок.10. *a* – гіпертрофія ядер гангліонарних клітин; *б* – міграція клітин внутрішнього ядерного шару у внутрішній сітчастий шар

До того ж внутрішній сітчастий шар набуває вигляду сітки, в якій добре помітні відростки нервових клітин. У внутрішньому ядерному шарі порушується щільність і рядність розташування клітин. Ядра частини клітин стають оптично світлими, зберігаючи базofilію. Розвивається набряк, що призводить до значного збільшення товщини внутрішнього ядерного шару (табл. 2.2).

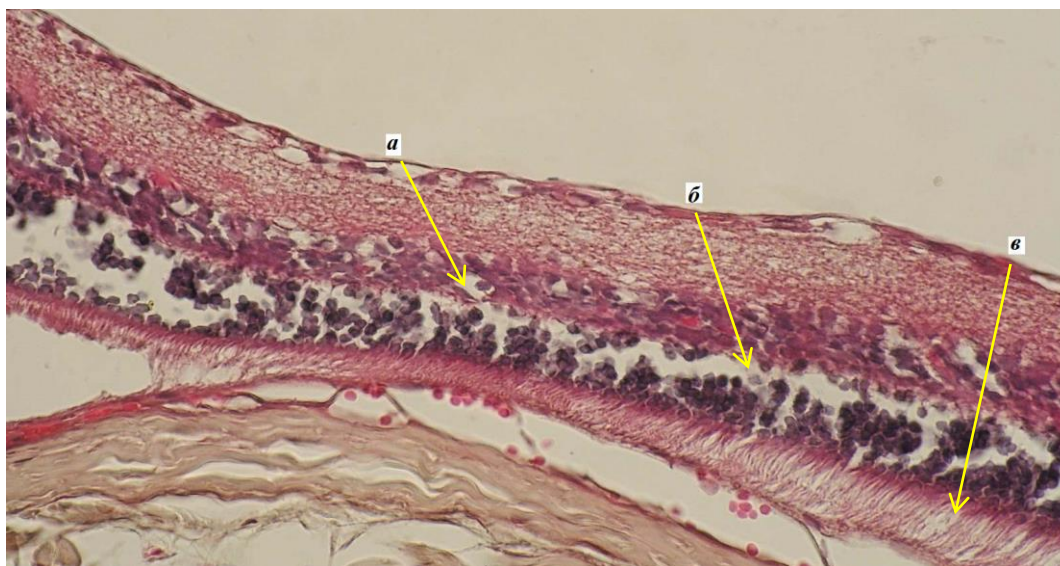


Рис. 2.3. Гістологічний препарат сітківки після моделювання глаукоми, периферична ділянка. Забарвлення гематоксилін-еозином. Об.40, ок.10. *a* – ділянки розриву зовнішнього сітчастого шару; *б* – базофільні оптично світлі ядра частини клітин зовнішнього ядерного шару; *в* – набряк шару паличок і колбочок

У зовнішньому сітчастому шарі спостерігається поява ядер клітин, а у зовнішньому ядерному шарі поряд з базофільними оптично світлими ядрами розташовуються пікнотичні ядра. З'являються зони, позбавлені клітинних ядер і порушується упорядкованість їх розташування. При цьому ядра клітин утворюють скупчення. В шарі паличок і колбочок відзначено розвиток набряку, що призводить до збільшення товщини шару, розпушення шару і порушення цілісності мембран (рис. 2.3). У ряді випадків відзначається відшарування сітківки [122,123].

В цілому спостерігається значне потовщення всіх шарів сітківки в результаті розвитку набряку (табл. 2.1-2.4) у порівнянні з сітківкою інтактних щурів.

У судинній оболонці ока виражено кровонаповнення, стаз, складж еритроцитів та геморагії (рис. 2.4).

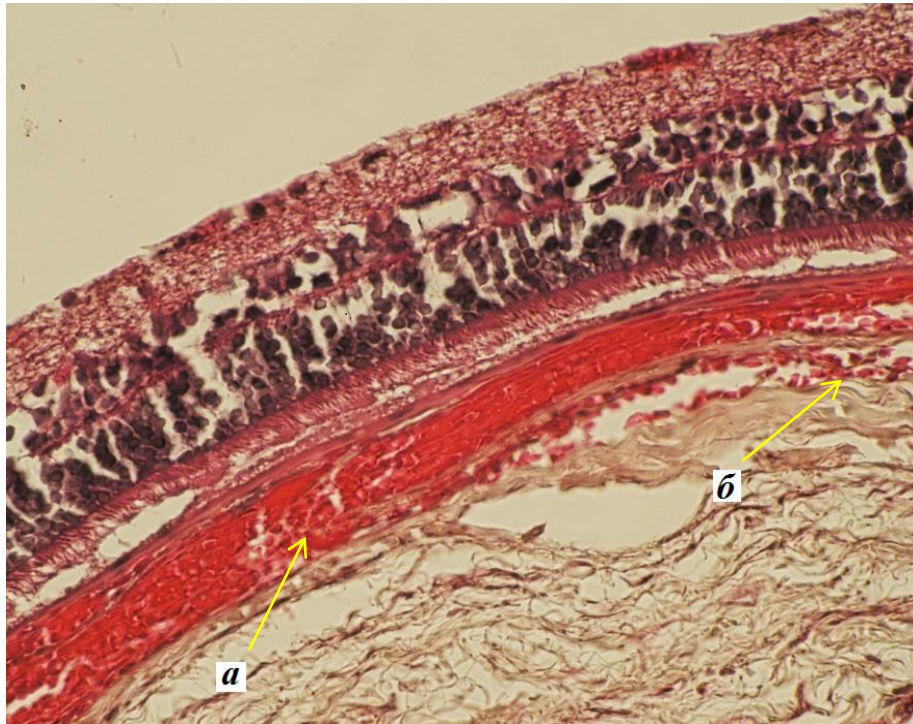


Рис. 2.4. Гістологічний препарат сітківки після моделювання глаукоми, периферична ділянка. набряк шарів сітківки, виражений крововилив в судинну оболонку сітківки.

Забарвлення гематоксилін-еозином. Об.40, ок.10.

a – складж еритроцитів; *б* – геморагії

На другий термін після моделювання глаукоми, через 3 місяці, поряд зі слабкою базофілією частини ядер гангліонарних клітин, відзначається збереження і подальший розвиток набряку нервових волокон та внутрішнього сітчастого шару. Внутрішній ядерний шар набряклий, містить ділянки зі слабо базофільними ядрами (рис. 2.5).

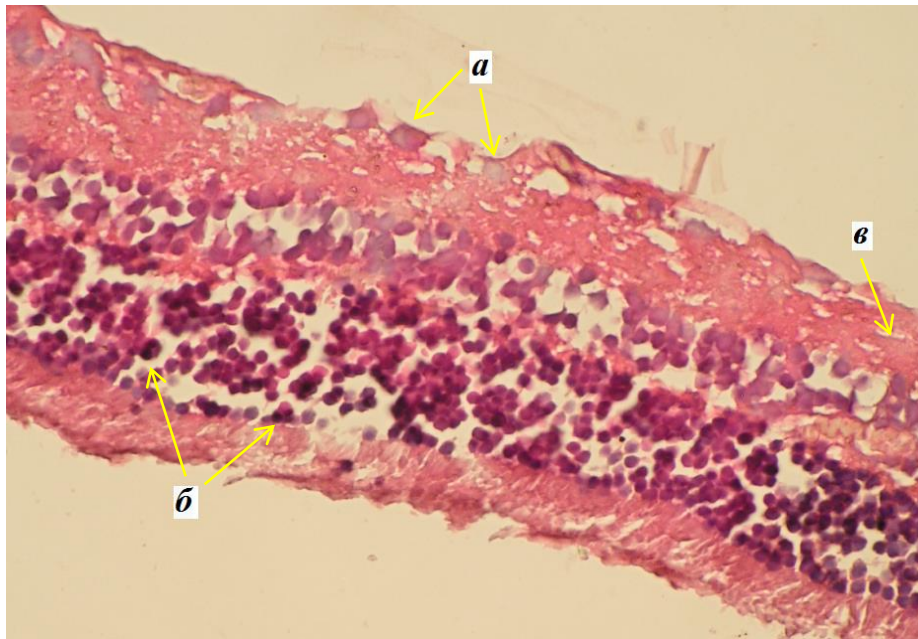


Рис. 2.5. Гістологічний препарат сітківки після моделювання глаукоми, периферична ділянка. Забарвлення гематоксилін-еозином. Об.40, ок.10. *a* – слабка базофілія частини ядер гангліонарних клітин; *б* – каріопікноз ядер клітин зовнішнього ядерного шару; *в* – набряк внутрішнього сітчастого шару

Серед волокон внутрішнього сітчастого шару також, як і на першому терміні спостереження, відмічене патологічне розміщення ядер клітин. Зовнішній сітчастий шар пухкий, не утворює цілісну структуру, яка відокремлює внутрішній і зовнішній ядерні шари. У зовнішньому ядерному шарі зберігається набряк, ядра клітин розташовуються поодинокі або утворюють неструктуровані скупчення. Ядра містять хроматин з високим ступенем конденсації, відзначається каріопікноз (рис. 2.5).

Крім того, відзначається набряк шару паличок і колбочок, що характеризується розволокненням шару фоторецепторів. Відбувається втрата упорядкованості орієнтації волокон і утворення зон запустіння (рис. 2.6).

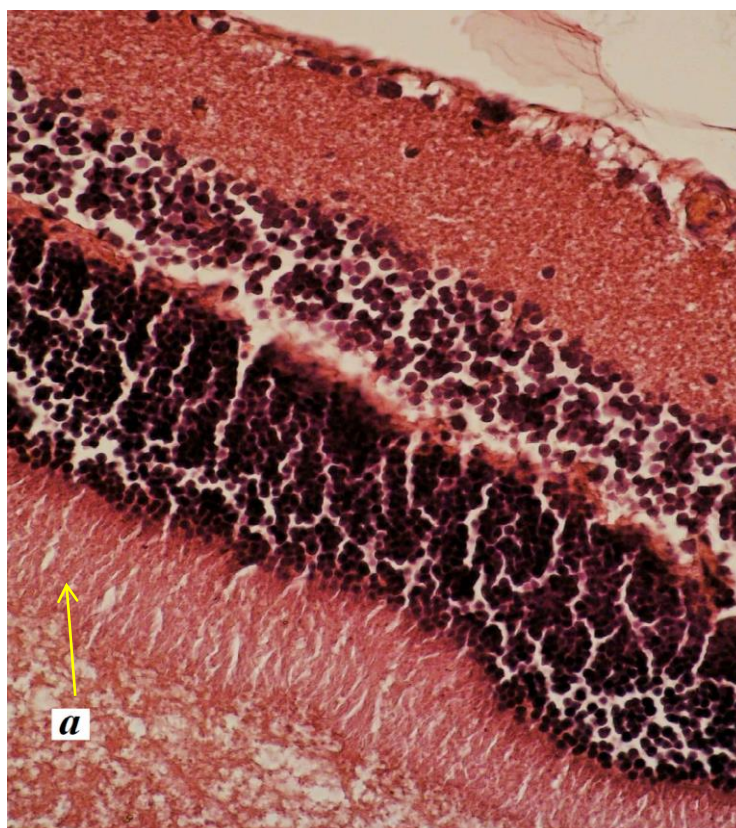


Рис. 2.6. Гістологічний препарат сітківки після моделювання глаукоми, центральна ділянка. Забарвлення гематоксилін-еозином. Об.40, ок.10.

a – набряк шару паличок і колбочок

Потрібно відзначити, що в усіх прошарках сітківки спостерігається збільшення товщини в результаті посилення набряку в порівнянні з першим терміном спостереження (табл. 2.1-2.4).

Аналіз показників товщини внутрішнього сітчастого шару, внутрішнього ядерного шару, зовнішнього ядерного шару та шару паличок і колбочок показав суттєве збільшення ($p < 0,05$) товщини при експериментальній глаукомі у порівнянні з групою інтактних тварин, а саме через місяць після моделювання глаукоми середнє значення товщини внутрішнього сітчастого шару сітківки склало $27,6 \pm 4,5$ мкм, внутрішнього ядерного шару сітківки – $21,2 \pm 2,4$ мкм, зовнішнього ядерного шару сітківки – $51,2 \pm 4,5$ мкм та шару паличок і колбочок – $20,1 \pm 1,9$ мкм, в той час як середнє значення товщини сітчастого шару сітківки у групі інтактних тварин становило $9,4 \pm 1,5$ мкм, внутрішнього ядерного шару сітківки – $9,5 \pm 1,2$ мкм,

зовнішнього ядерного шару сітківки – 31,5 мкм та шару паличок і колбочок – 13,2 мкм.

Таблиця 2.1

Динаміка показників товщини внутрішнього сітчастого шару сітківки очей щурів (M±SD, мкм)

Період вимірювання	ГрК (n=10)	ГрІ (n=10)	ГрІІ (n=10)	ГрІІІ (n=10)	ГрІV (n=10)	Рівень значущості відмінності між групами, p
1 місяць	9,4±1,5 ^{1,2,3,4}	27,6±4,5 ^{0,2,3,4}	22,9±3,4 ^{0,1,3,4}	18,2±3,2 ^{0,1,2}	16,5±2,9 ^{0,1,2}	<0,001
3 місяці	9,4±1,5 ^{1,2}	30,9±4,8 ^{0,3,4}	18,7±2,1 ⁰	15±2,7 ¹	12,5±1,5 ¹	<0,001
Рівень значущості відмінності показників у різні періоди, p	–	0,160	0,011	0,045	0,009	

Примітки: При проведенні порівняння між групами використано ANOVA, та для проведення постеріорних порівнянь використано критерій Шеффе (у випадку нормального закону розподілу); критерій Крускала–Уолліса та для проведення постеріорних порівнянь використано критерій Данна (у випадку закону розподілу відмінного від нормального).

⁰ – відмінність від ГрК статистично значима, p<0,05;

¹ – відмінність від ГрІ статистично значима, p<0,05;

² – відмінність від ГрІІ статистично значима, p<0,05;

³ – відмінність від ГрІІІ статистично значима, p<0,05;

⁴ – відмінність від ГрІV статистично значима, p<0,05.

При проведенні порівняння між показниками на 1 місяці та 3 місяці використано t-критерій для пов'язаних вибірок (у випадку нормального закону розподілу); критерій Т-Вілкоксона (у випадку закону розподілу відмінного від нормального).

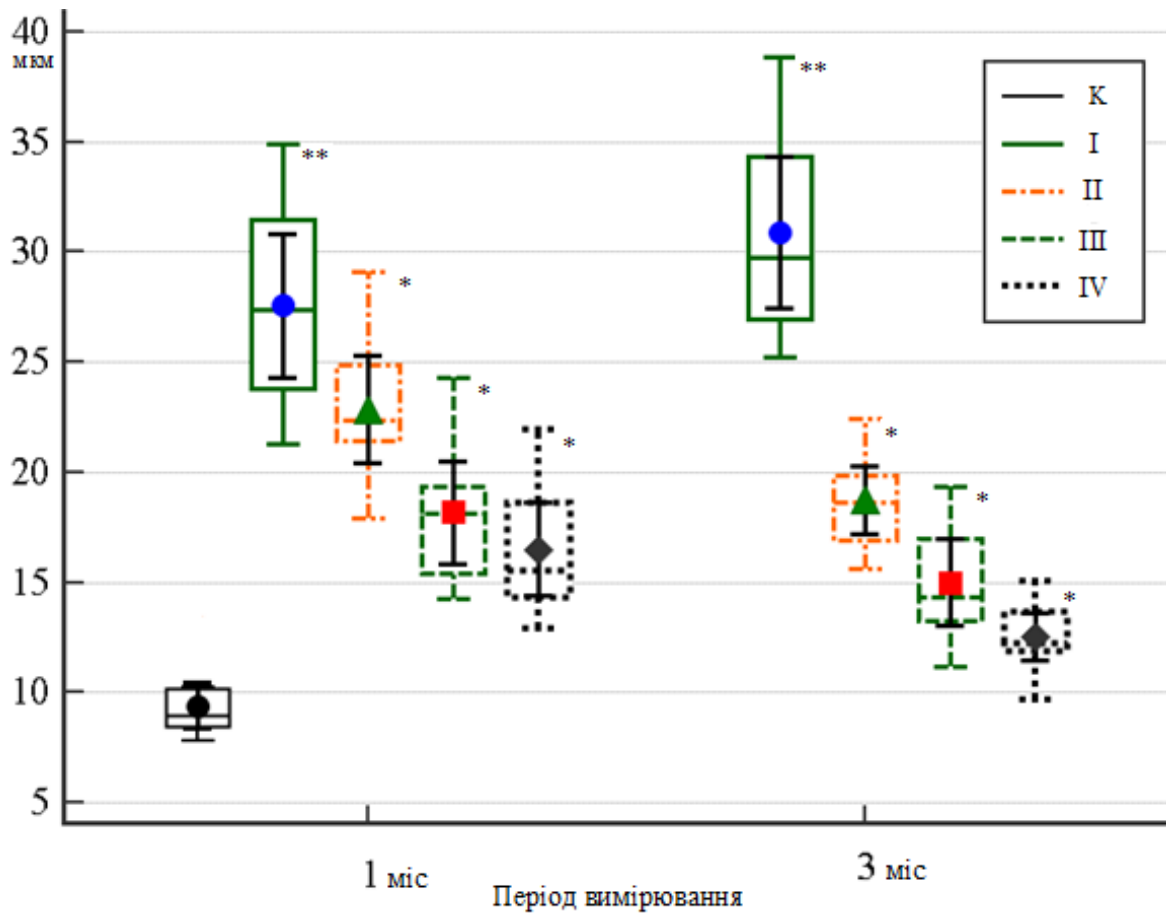


Рис. 2.7. Аналіз товщини внутрішнього сітчастого шару сітківки на очах інтактних тварин, при експериментальній моделі глаукоми та після введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ різними способами. Представлено мінімальне та максимальне значення, медіана та міжквартильний інтервал, середнє значення (95% ВІ). * – відмінність від групи тварин з моделлю глаукоми без введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ ($p < 0,05$). ** – відмінність від групи інтактних тварин ($p < 0,05$)

Як видно з аналізу (рис. 2.7), середнє значення товщини внутрішнього сітчастого шару сітківки у групі I через 3 місяці після моделювання глаукоми без введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ становило $30,9 \pm 4,8$ мкм, тоді як у групі III та IV, після введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ, становило $15 \pm 2,7$ мкм (відрізняється від групи I $p < 0,05$) та $12,5 \pm 1,5$ мкм (відрізняється від групи I $p < 0,05$) відповідно, та статистично значимо не відрізнялося від групи контролю ($p > 0,05$).

При проведенні аналізу показника товщини внутрішнього ядерного шару сітківки (табл. 2.2) встановлено суттєве збільшення ($p < 0,05$) після моделювання глаукоми в порівнянні з групою контролю. Середнє значення товщини внутрішнього ядерного шару сітківки через 1 місяць після моделювання глаукоми склало $21,2 \pm 2,4$ мкм, тоді як середнє значення товщини внутрішнього ядерного шару сітківки у групі контролю становило $9,5 \pm 1,2$ мкм.

Таблиця 2.2

Динаміка показників товщини внутрішнього ядерного шару сітківки очей щурів ($M \pm SD$, мкм)

Період вимірювання	ГрК (n=10)	ГрI (n=10)	ГрII (n=10)	ГрIII (n=10)	ГрIV (n=10)	Рівень значущості відмінності між групами, p
1 місяць	$9,5 \pm 1,2^{1,2,3,4}$	$21,2 \pm 2,4^{0,2,3,4}$	$18,5 \pm 1,4^{0,1,4}$	$16,7 \pm 1,7^{0,1}$	$15,4 \pm 1,5^{0,1,2}$	<0,001
3 місяці	$9,5 \pm 1,2^{1,2,3,4}$	$24,8 \pm 2,3^{0,2,3,4}$	$16,3 \pm 1,7^{0,1,3,4}$	$13,7 \pm 1,1^{0,1,2}$	$11,9 \pm 1,3^{0,1,2}$	<0,001
Рівень значущості відмінності показників у різні періоди, p	–	0,009	0,010	0,029	0,001	

Примітки: При проведенні порівняння між групами використано ANOVA, та для проведення постеріорних порівнянь використано критерій Шеффе (у випадку нормального закону розподілу); критерій Крускала–Уолліса та для проведення постеріорних порівнянь використано критерій Данна (у випадку закону розподілу відмінного від нормального).

⁰ – відмінність від ГрК статистично значима, $p < 0,05$;

¹ – відмінність від ГрI статистично значима, $p < 0,05$;

² – відмінність від ГрII статистично значима, $p < 0,05$;

³ – відмінність від ГрIII статистично значима, $p < 0,05$;

⁴ – відмінність від ГрIV статистично значима, $p < 0,05$.

При проведенні порівняння між показниками на 1 місяці та 3 місяці використано t-критерій для пов'язаних вибірок (у випадку нормального закону

розподілу); критерій Т-Вілкоксона (у випадку закону розподілу відмінного від нормального).

Через 3 місяці у групі I після моделювання глаукоми без введення клітин середнє значення товщини внутрішнього ядерного шару сітківки становило $24,8 \pm 2,3$ мкм, статистично значимо відрізнялося від групи контролю ($p < 0,05$) (рис. 2.8).

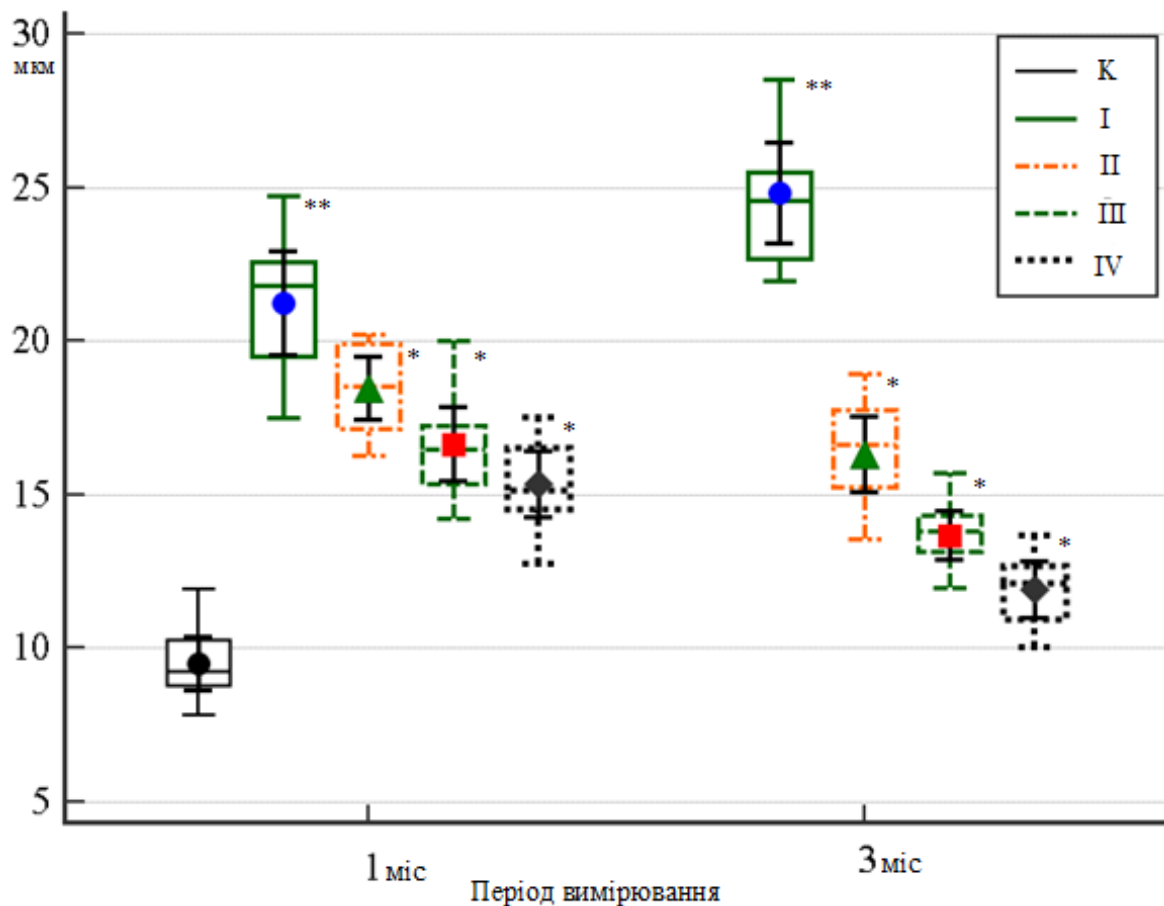


Рис. 2.8. Аналіз товщини внутрішнього ядерного шару сітківки на очах інтактних тварин, при експериментальній моделі глаукоми та після введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ різними способами. Представлено мінімальне та максимальне значення, медіана та міжквартильний інтервал, середнє значення (95% ВІ). * – відмінність від групи тварин з моделлю глаукоми без введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ ($p < 0,05$). ** – відмінність від групи інтактних тварин ($p < 0,05$)

У групі II показник внутрішнього ядерного шару значимо не відрізнявся від групи I, середнє значення товщини внутрішнього ядерного шару сітківки через 1 місяць та через 3 місяці становило $18,5 \pm 1,4$ мкм та $16,3 \pm 1,7$ мкм, відповідно (відмінність статистично значима у порівнянні з групою контролю, $p < 0,05$).

2.2.2. Особливості структури сітківки щурів через 1 місяць після введення культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня

У групі II, після внутрішньовенного введення клітин, на першому періоді спостереження також, як і в групі I, після моделювання глаукоми без введення клітин, спостерігали набряк нервових волокон та внутрішнього сітчастого шару, а також гомогенізацію їх цитоплазми. Також залишається вираженим набряк внутрішнього ядерного шару.

Однак ці патологічні зміни виражені набагато слабше, ніж в групі I без введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ.

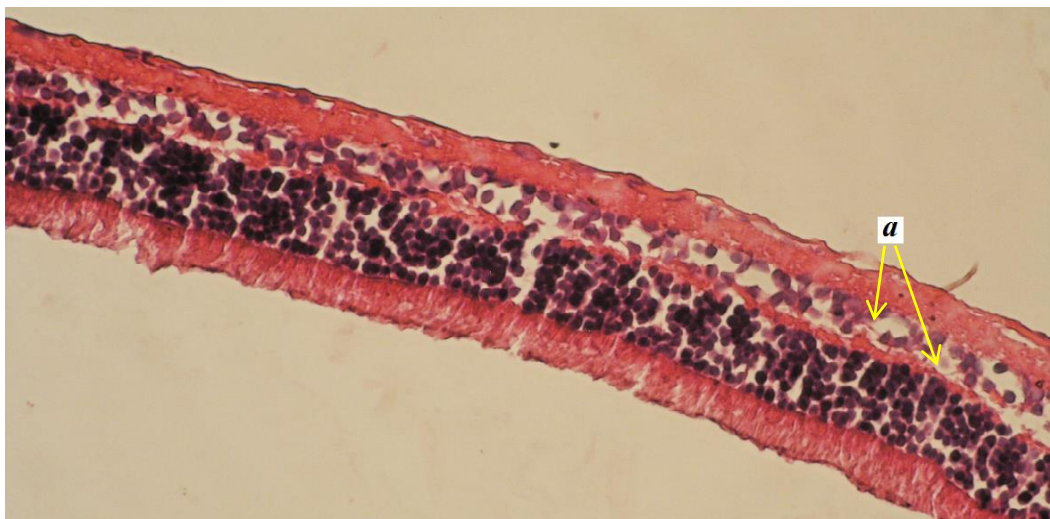


Рис. 2.9. Гістологічний препарат сітківки після моделювання глаукоми та внутрішньовенного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ, периферична ділянка. Забарвлення гематоксилін-еозином. Об.40, ок.10. *a* – утворення контактів цитоплазматичними виростами між одиничними клітинами внутрішнього ядерного шару

Ядра клітин внутрішнього ядерного шару розрізнені, слабо базофільні і не утворюють поздовжньо орієнтовані шари. Крім того, виражене порушення цілісності зовнішнього сітчастого шару.

Необхідно відзначити, що зовнішній ядерний шар на окремих ділянках периферичної частини сітківки зберігає вертикальне впорядковане розташування ядер клітин. Шар паличок і колбочок характеризується значно меншим набряком цитоплазми і міжклітинного простору у порівнянні з групою щурів без введення клітин (табл. 2.4).

До позитивних відмінностей в порівнянні з групою щурів без введення клітин слід віднести те, що між одиничними клітинами внутрішнього ядерного шару виявлено утворення контактів цитоплазматичними виростами (рис. 2.9).

Серед клітин зовнішнього ядерного шару спостерігали поодинокі бластоподібні клітини (рис. 2.10).

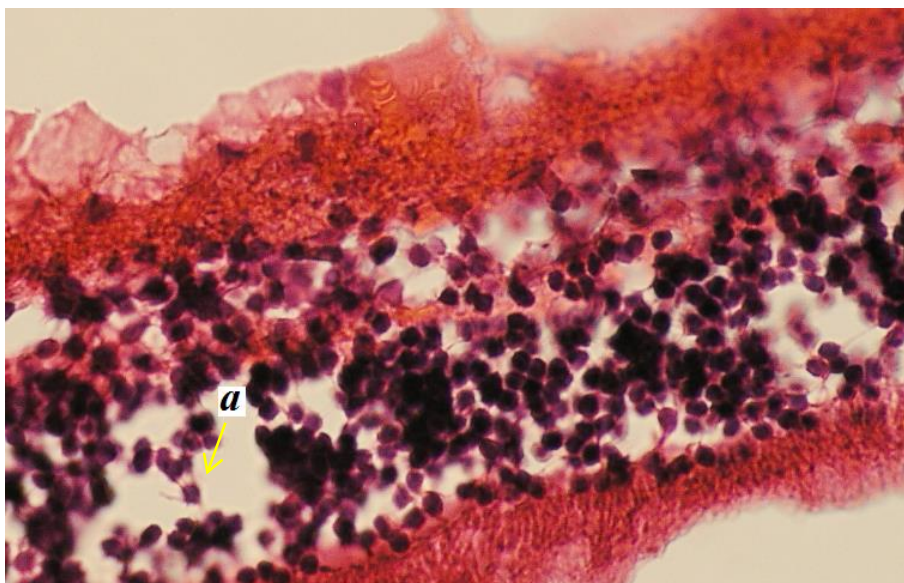


Рис. 2.10. Гістологічний препарат сітківки після моделювання глаукоми та внутрішньовенного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ, центральна ділянка. Забарвлення гематоксилін-еозином. Об.40, ок.10. *a* – поодинокі бластоподібні клітини в зовнішньому ядерному шарі

Виявлено значний набряк всіх шарів сітківки з порушенням цитоархітекτονіки, виражений каріопікноз і утворення невеликих конгломератів ядер (рис. 2.11).

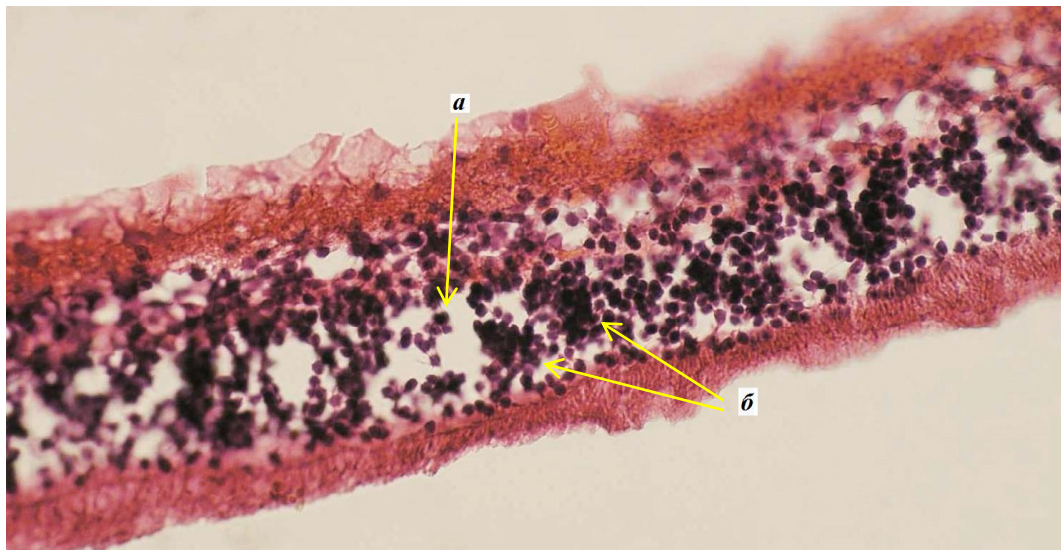


Рис. 2.11. Гістологічний препарат сітківки після моделювання глаукоми та внутрішньовенного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ, центральна ділянка. Забарвлення гематоксилін-еозином. Об.20, ок.10.

a – каріопікноз ядер клітин зовнішнього ядерного шару;

б – невеликі конгломерати ядер зовнішнього ядерного шару

Таким чином, у порівнянні з групою I, зміни товщини шарів сітківки в групі II характеризуються зменшенням їх товщини, за винятком шару паличок і колбочок. Також зменшується кількість ядер у внутрішньому і зростає в зовнішньому ядерних шарах. Однак товщина шарів залишається вищою, ніж в групі контролю (табл. 2.1-2.4).

Парабульбарне введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ після моделювання глаукоми, група III, призвело до покращення морфології волокон внутрішнього сітчастого шару при відсутності їх ущільнення. Однак відзначалася міграція одиничних ядер клітин у внутрішній сітчастий шар сітківки (рис. 2.12).

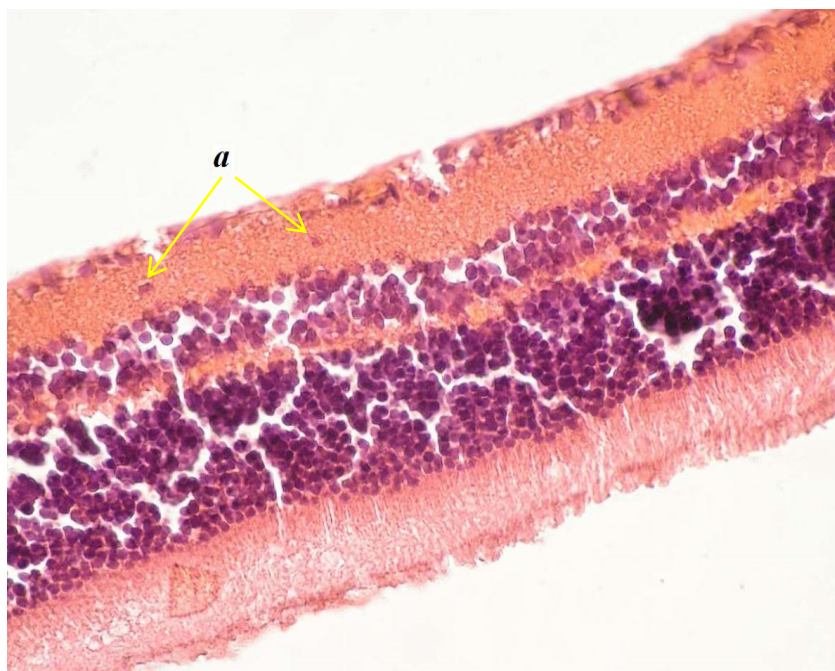


Рис. 2.12. Гістологічний препарат сітківки після моделювання глаукоми та парабульбарного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ, периферична ділянка. Забарвлення гематоксилін-еозином. Об.40, ок.10.

a – міграція одиничних ядер клітин у внутрішній сітчастий шар

Ядра клітин внутрішнього ядерного шару на більшій площі сітківки прилягають один до одного, утворюючи 4-5 шарів. Однак спостерігалися зони набряку, в яких ядра розташовані розрізнено.

Зовнішній сітчастий шар добре помітний, без розривів з ділянками стоншування. Відзначається його заселення клітинами внутрішнього і зовнішнього ядерних шарів. Особливо цей процес виражений в центральній частині сітківки (рис. 2.13).

У зовнішньому ядерному шарі виявлено виражений набряк, але на окремих ділянках, переважно на периферії сітківки, збережено вертикальне впорядковане розташування ядер клітин. Іноді в зовнішньому ядерному шарі спостерігали розрізнені ядра або утворення скупчень щільно прилягаючих ядер (рис. 2.14).

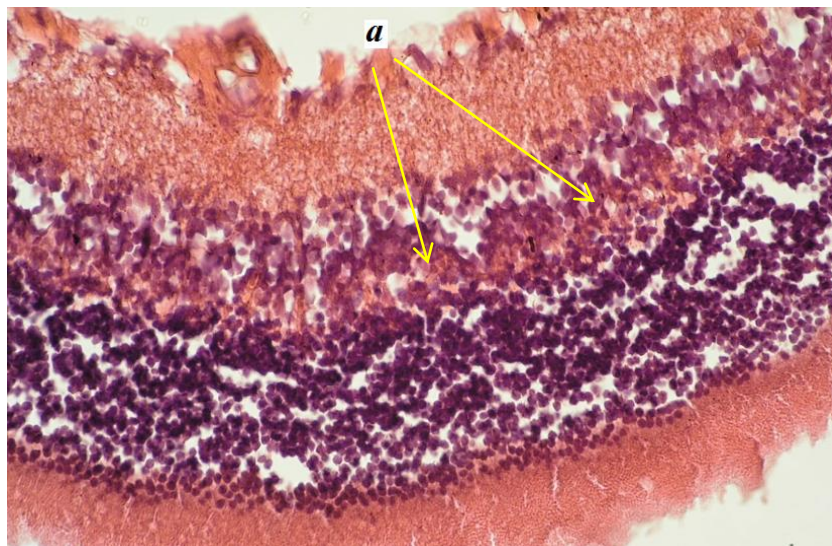


Рис. 2.13. Гістологічний препарат сітківки після моделювання глаукоми та парабульбарного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ, центральна ділянка. Забарвлення гематоксилін-еозином. Об.20, ок.10. *a* – заселення зовнішнього сітчастого шару ядрами клітин внутрішнього і зовнішнього ядерних шарів

Шар паличок і колбочок характеризувався значно меншим набряком цитоплазми і міжклітинного простору у порівнянні з групою шурів I, після моделювання глаукоми без введення клітин.

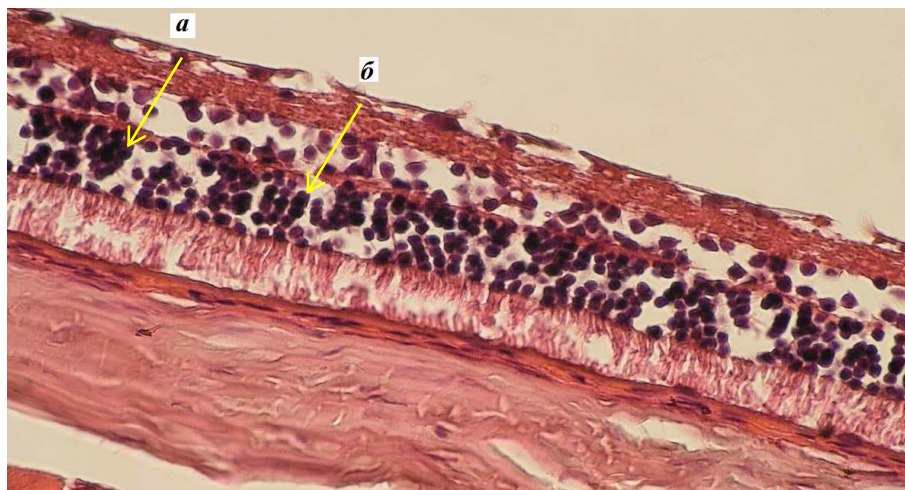


Рис. 2.14. Гістологічний препарат сітківки після моделювання глаукоми та парабульбарного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ, периферична ділянка. Забарвлення гематоксилін-еозином. Об.40, ок.10. *a* – утворення скупчень щільно прилягаючих ядер та *б* – вертикальне впорядковане розташування ядер клітин в зовнішньому ядерному шарі

Дані морфометричного аналізу показують значне зменшення набряку всіх шарів сітківки в порівнянні з групою I та групою II (табл. 2.1-2.4).

У групі IV, після ретробульбарного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ, набряк шарів сітківки був найменшим. У внутрішньому ядерному шарі ядра клітин на окремих ділянках формують два, три шари. В інших ділянках вони розташовані поодинокі або невеликими скупченнями [124,125].

Зовнішній сітчастий шар добре виражений, хоча спостерігається набряк та розриви волокон. Відзначено розташування ядер внутрішнього і зовнішнього ядерного шару в ділянках розривів та між волокнами зовнішнього сітчастого шару (рис. 2.15).

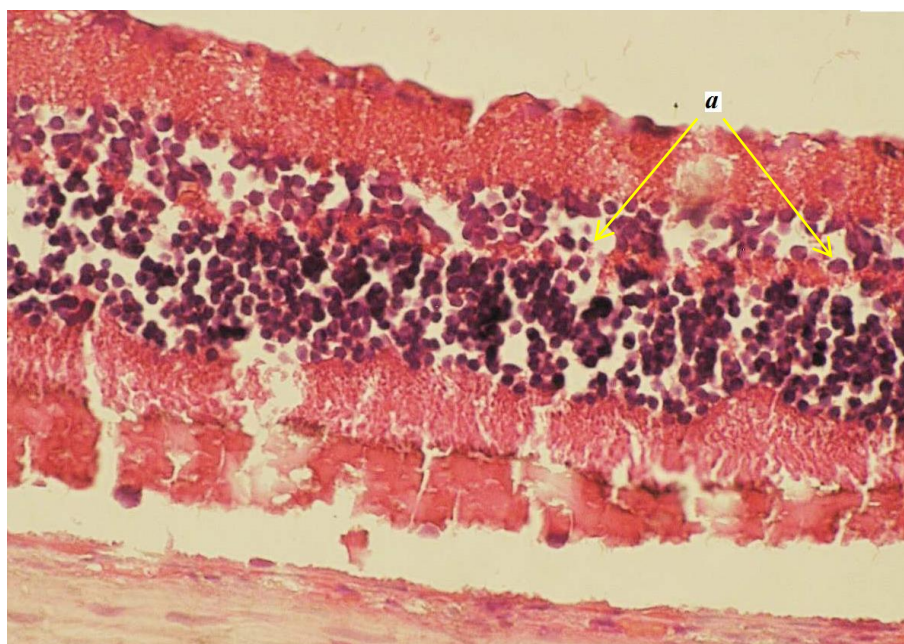


Рис. 2.15. Гістологічний препарат сітківки після моделювання глаукоми та ретробульбарного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ, периферична ділянка. Забарвлення гематоксилін-еозином. Об.40, ок.10. *a* – ядра внутрішнього і зовнішнього ядерних шарів між волокнами зовнішнього сітчастого шару

Зовнішній ядерний шар має помірний набряк і представлений в основному впорядковано організованими вертикально розташованими ланцюжками ядер, хоча також зустрічаються скупчення ядер і ядра, які лежать розрізнено (рис. 2.16). Шар паличок і колбочок спостерігається з ділянками набряку і порушеннями цілісності.

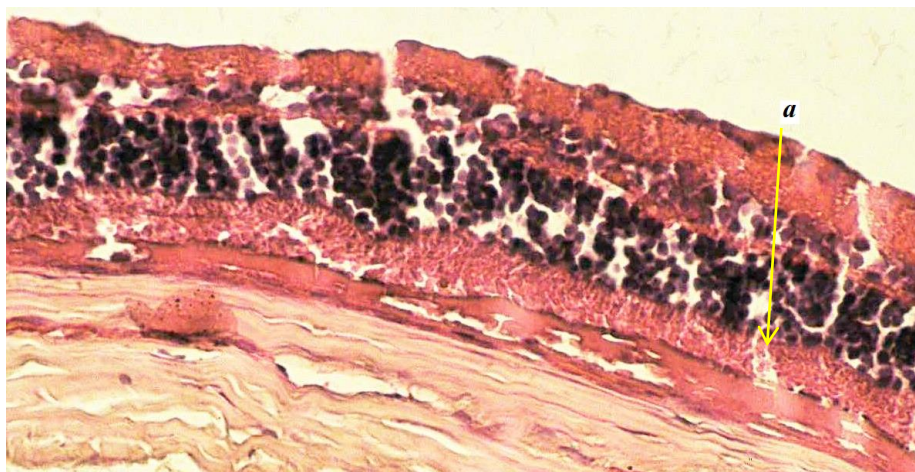


Рис. 2.16. Гістологічний препарат сітківки після моделювання глаукоми та ретробульбарного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ, периферична ділянка. Забарвлення гематоксилін-еозином. Об.40, ок.10.

a – ділянки набряку шару паличок і колбочок

У цілому дані морфометричного аналізу показують, що в даній групі набряк сітківки виражений найменше (табл. 2.1-2.4).

В групі IV відмічено суттєві відмінності щодо відновлення внутрішнього сітчастого шару сітківки при ретробульбарному введенні. Середні значення товщини внутрішнього сітчастого шару сітківки через 1 місяць після введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ становило $16,5 \pm 2,9$ мкм, ($p < 0,05$) та $12,5 \pm 1,5$ мкм, ($p < 0,05$) через 3 місяці.

Через 1 місяць після введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ у групі III та IV відмічено позитивну динаміку до зменшення товщини внутрішнього ядерного шару сітківки, так, середні значення показника склали $16,7 \pm 1,7$ мкм та $15,4 \pm 1,5$ мкм, відповідно (відрізняється від групи I $p < 0,05$). Однак показник товщини внутрішнього ядерного шару сітківки залишався більшим ніж у групі контролю.

Згідно з даними таблиці 2.3, показник зовнішнього ядерного шару сітківки збільшився у групі I ($p < 0,05$) у порівнянні з групою контролю, а середні значення товщини зовнішнього ядерного шару сітківки склали $51,2 \pm 4,5$ мкм через 1 місяць та $56,3 \pm 4,5$ мкм через 3 місяці після моделювання глаукоми.

В групі II, після внутрішньовенного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ, показник зовнішнього ядерного шару залишався вище показника у групі контролю, але значимо не відрізнявся від групи I через 1 та 3 місяці. Середнє значення товщини зовнішнього ядерного шару сітківки у групі II становило $46,8 \pm 2,4$ мкм та $44,1 \pm 2,2$ мкм відповідно, а у групі контролю – $31,5 \pm 1,8$ мкм ($p < 0,05$).

Таблиця 2.3

Динаміка показників товщини зовнішнього ядерного шару сітківки очей щурів (M±SD, мкм)

Період вимірювання	ГрК (n=10)	ГрI (n=10)	ГрII (n=10)	ГрIII (n=10)	ГрIV (n=10)	Рівень значущості відмінності між групами, p
1 місяць	$31,5 \pm 1,8^{1,2}$	$51,2 \pm 4,5^{0,3,4}$	$46,8 \pm 2,4^{0,4}$	$40,4 \pm 1,6^1$	$39,5 \pm 1,2^{1,2}$	<0,001
3 місяці	$31,5 \pm 1,8^{1,2,3,4}$	$56,3 \pm 4,5^{0,2,3,4}$	$44,1 \pm 2,2^{0,1,3,4}$	$37,4 \pm 1,7^{0,1,2}$	$35,6 \pm 0,7^{0,1,2}$	<0,001
Рівень значущості відмінності показників у різні періоди, p	–	0,032	0,072	0,007	<0,001	

Примітки: При проведенні порівняння між групами використано ANOVA, та для проведення постеріорних порівнянь використано критерій Шеффе (у випадку нормального закону розподілу); критерій Крускала–Уолліса та для проведення постеріорних порівнянь використано критерій Данна (у випадку закону розподілу відмінного від нормального).

⁰ – відмінність від ГрК статистично значима, $p < 0,05$;

¹ – відмінність від ГрI статистично значима, $p < 0,05$;

² – відмінність від ГрII статистично значима, $p < 0,05$;

³ – відмінність від ГрIII статистично значима, $p < 0,05$;

⁴ – відмінність від ГрIV статистично значима, $p < 0,05$.

При проведенні порівняння між показниками на 1 місяці та 3 місяці використано t-критерій для пов'язаних вибірок (у випадку нормального закону

розподілу); критерій Т-Вілкоксона (у випадку закону розподілу відмінного від нормального).

Аналіз впливу культивованих постнатальних мСК-ПНГ, після парабульбарного та ретробульбарного введення, на товщину зовнішнього ядерного шару сітківки показав суттєві відмінності щодо відновлення даного шару (рис. 2.17). Середнє значення товщини зовнішнього ядерного шару сітківки у групі III склало $40,4 \pm 1,6$ мкм ($p < 0,05$) та у групі IV – $39,5 \pm 1,2$ мкм ($p < 0,05$) через 1 місяць після введення клітин відповідно.

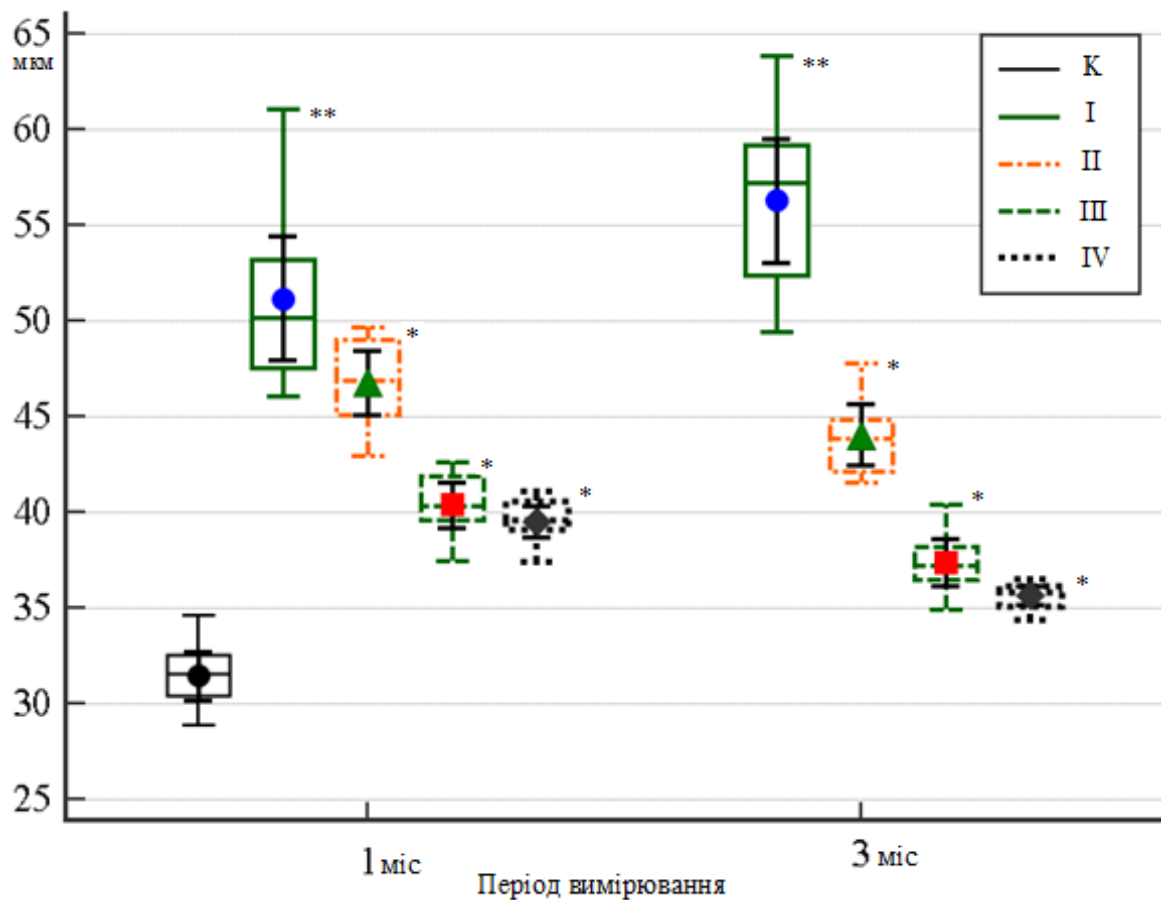


Рис. 2.17. Аналіз товщини зовнішнього ядерного шару сітківки на очах інтактних тварин, при експериментальній моделі глаукоми та після введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ різними способами. Представлено мінімальне та максимальне значення, медіана та міжквартильний інтервал, середнє значення (95% ВІ). * – відмінність від групи тварин з моделлю глаукоми без введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ ($p < 0,05$).

** – відмінність від групи інтактних тварин ($p < 0,05$)

Аналізуючи отримані результати експерименту, необхідно відзначити позитивну динаміку зменшення товщини внутрішнього сітчастого шару сітківки, внутрішнього та зовнішнього ядерних шарів сітківки в групі III та IV.

Однак найбільш виражена позитивна динаміка в зменшенні набряку і відновлення цитоархітекτονіки шарів сітківки спостерігалась в групі IV, при ретробульбарному введенні культивованих постнатальних мСК-ПНГ.

2.2.3. Особливості структури сітківки щурів через 3 місяці після введення культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня

На другий термін в групі II, через 3 місяці після внутрішньовенного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ, зберігається набряк нервових волокон. При цьому відбувається зменшення набряку внутрішнього сітчастого шару сітківки та збільшується його щільність (рис. 2.18).

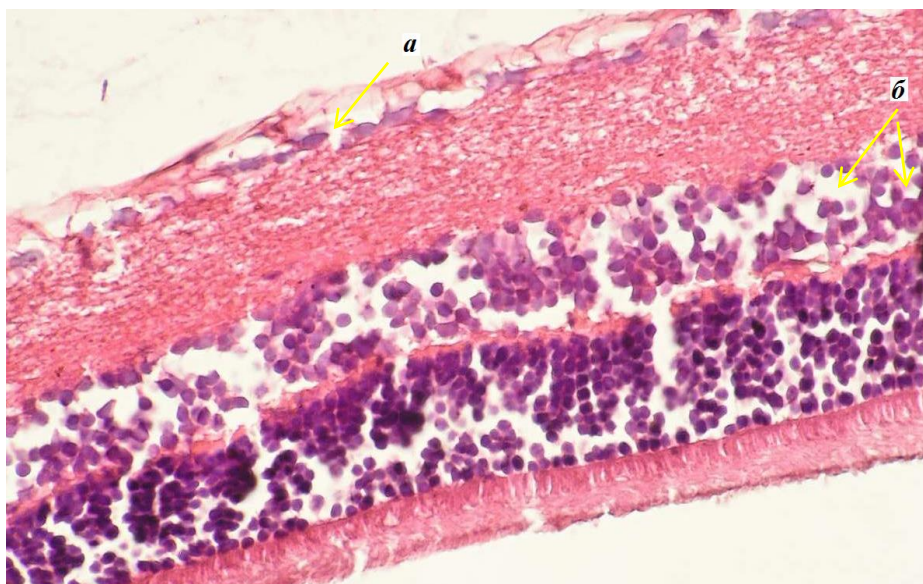


Рис. 2.18. Гістологічний препарат сітківки після моделювання глаукоми та внутрішньовенного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ, периферична ділянка. Забарвлення гематоксилін-еозином. Об.40, ок.10. *a* – слабка базофілія частини ядер; *б* – набряк внутрішнього ядерного шару

Набряк внутрішнього ядерного шару виражений у меншій мірі, у порівнянні з першим терміном спостереження і у порівнянні з групою I. Цілісність зовнішнього сітчастого шару залишається порушеною. Зовнішній ядерний шар набряклий, при цьому в периферичних ділянках ядра утворюють ділянки вертикальної впорядкованої структури. В шарі паличок і колбочок набряк зберігається (рис. 2.18 та рис. 2.19). Дані морфометричного аналізу свідчать про зменшення набряку всіх шарів сітківки (табл. 2.1-2.4) [126].

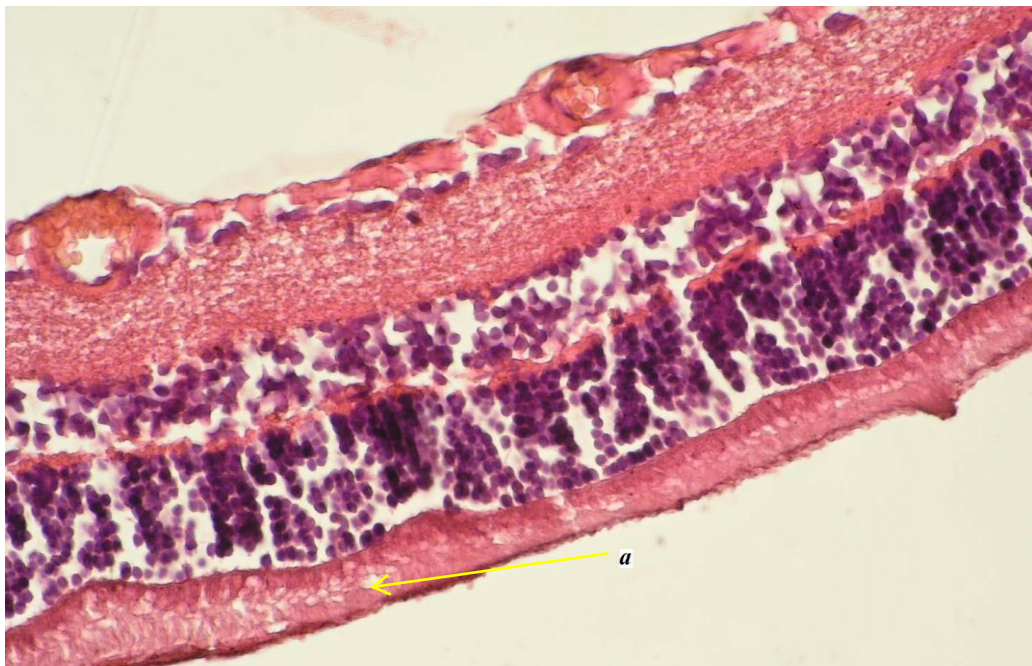


Рис. 2.19. Гістологічний препарат сітківки після моделювання глаукоми та внутрішньовенного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ. Часткове відновлення цитоархітектоніки в зовнішньому ядерному шарі. Забарвлення гематоксилін-еозином. Об.40, ок.10. *a* – ділянки набряку шару паличок і колбочок

Після парабульбарного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ спостерігали базофільні ядра гангліонарних клітин (рис. 2.20).

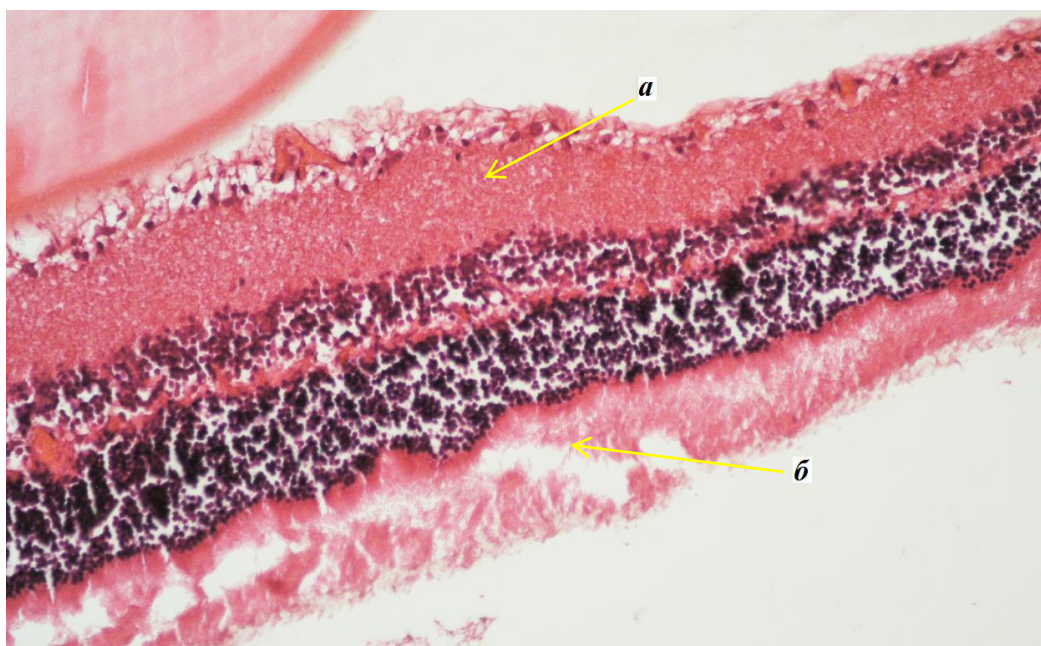


Рис. 2.20. Гістологічний препарат сітківки після моделювання глаукоми та парабульбарного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ, центральна та периферична ділянка. Забарвлення гематоксилін-еозином. Об.20, ок.10. *a* – гіпертрофія внутрішнього сітчастого шару, *б* – порушення цілісності шару паличок і колбочок

У внутрішньому сітчастому шарі розташовані базофільні ядра неправильної форми. Зовнішній сітчастий шар стоншений та не має цілісної структури. Внутрішній ядерний шар містить базофільні ядра, які у більшій частині шару не утворюють впорядковану структуру.

Однак на периферії сітківки відмічається відновлення цитоархітекtonіки внутрішнього і зовнішнього ядерних шарів з формуванням вертикально розташованих упорядкованих структур (рис. 2.21). Здебільшого впорядковані ділянки знаходяться в периферичній частині сітківки. Шар паличок і колбочок зберігає набряк, який виражений в значно меншій мірі, ніж в групі I і в групі II [127].

Дані морфометричного аналізу свідчать про значне зниження набряку і відновлення цитоархітекtonіки сітківки (табл. 2.1-2.4).



Рис. 2.21. Гістологічний препарат сітківки після моделювання глаукоми та парабульбарного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ, периферична ділянка. Забарвлення гематоксилін-еозином. Об.20, ок.10. *a* – відновлення упорядкованого розташування ядер у зовнішньому ядерному шарі периферичної частини сітківки

На другий термін спостереження, після ретробульбарного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ, в групі IV відзначається поява ділянок центральної і периферичної сітківки з незначним набряком та вираженим ступенем відновленої цитоархітектоніки шарів, набряк нервових волокон не виражений [128].

Ядра гангліонарних клітин слабо базofilні. Ядра внутрішнього ядерного шару базofilні, на невеликих ділянках формують утворення, подібні до шарів.

Зовнішній сітчастий шар безперервний, добре виражений. Зовнішній ядерний шар містить значні ділянки з впорядковано розташованими ядрами, що утворюють вертикальні структури (рис. 2.22).

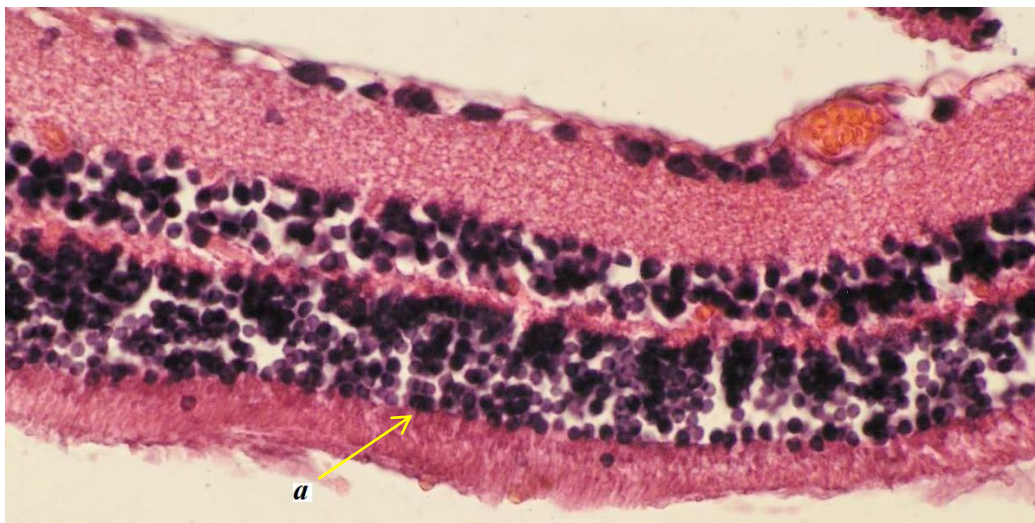


Рис. 2.22. Гістологічний препарат сітківки після моделювання глаукоми та ретробульбарного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ, периферична ділянка. Забарвлення гематоксилін-еозином. Об.40, ок.10. *a* – впорядковане розташування ядер, які утворюють вертикальні структури

Також у зовнішньому ядерному шарі помічено повне відновлення вертикальних структур, які спостерігаються в сітківці інтактних щурів (рис. 2.23 та рис. 2.24).

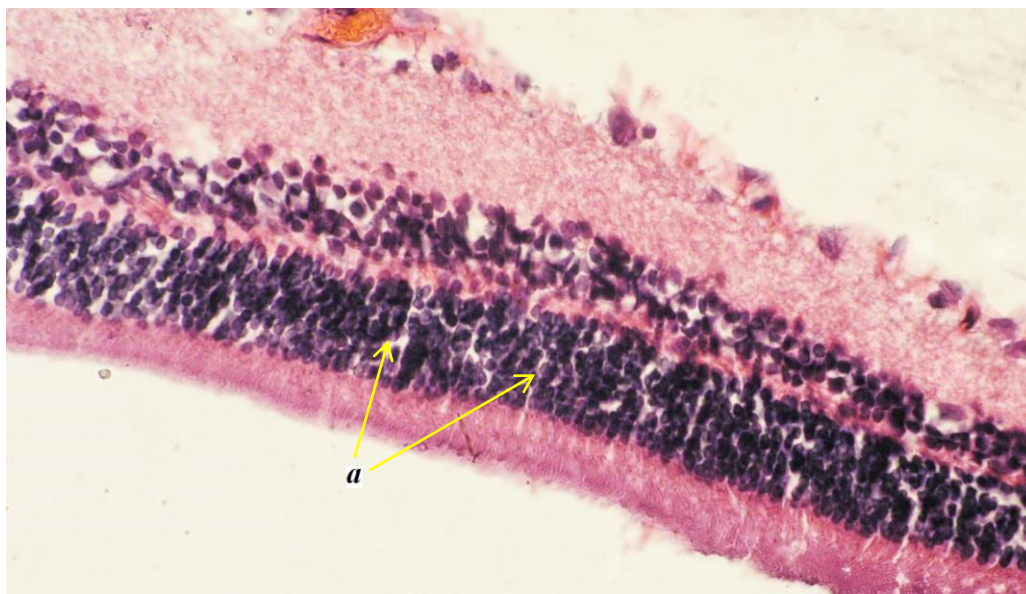


Рис. 2.23. Гістологічний препарат сітківки після моделювання глаукоми та ретробульбарного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ, периферична ділянка та частина центральної ділянки. Забарвлення гематоксилін-еозином. Об.40, ок.10. *a* – упорядкування стовпчастих структур в зовнішньому ядерному шарі

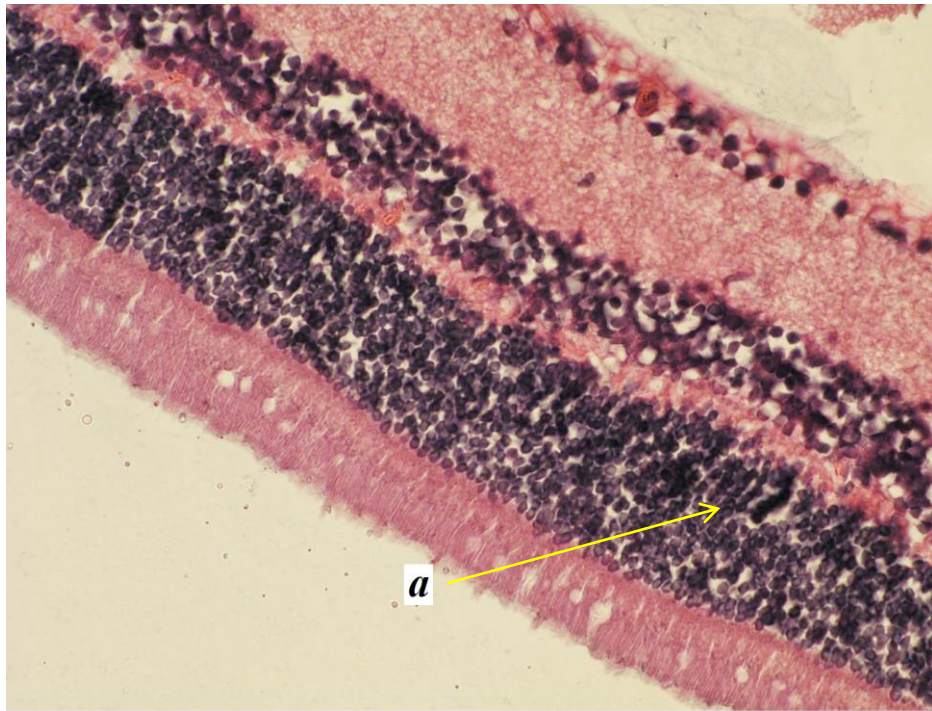


Рис. 2.24. Гістологічний препарат сітківки після моделювання глаукоми та ретробульбарного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ, центральна ділянка. Забарвлення гематоксилін-еозином. Об.40, ок.10. *a* – зовнішній ядерний шар містить значні ділянки з упорядкованою структурою

При аналізі показника товщини шару паличок і колбочок відзначено його збільшення в групі I ($p < 0,05$) у порівнянні з групою K, а середнє значення склало $20,1 \pm 1,9$ мкм через 1 місяць та $21,5 \pm 2,8$ мкм через 3 місяці після моделювання глаукоми. Тоді як у групі K середнє значення товщини шару паличок і колбочок склало $13,2 \pm 1,9$ мкм (табл. 2.4).

Аналіз впливу культивованих постнатальних мСК-ПНГ, після парабульбарного та ретробульбарного введення, на товщину шару паличок і колбочок виявлено відмінності щодо відновлення даного шару сітківки (рис. 2.25).

В групі III середнє значення товщини шару паличок і колбочок склало $16,5 \pm 0,6$ мкм ($p < 0,05$) та $15,8 \pm 0,9$ мкм ($p < 0,05$) через 1 та 3 місяці після введення клітин. Тоді як в групі IV середнє значення становило – $15,9 \pm 0,4$ мкм ($p < 0,05$) та $15,2 \pm 0,7$ мкм ($p < 0,05$) в перший та другий терміни спостереження після введення клітин відповідно.

Таблиця 2.4

**Динаміка показників товщини шару паличок і колбочок сітківки
очей щурів (M±SD, мкм)**

Період вимірювання	ГрК (n=10)	ГрI (n=10)	ГрII (n=10)	ГрIII (n=10)	ГрIV (n=10)	Рівень значущості відмінності між групами, p
1 місяць	13,2±1,9 ^{1,2}	20,1±1,9 ^{0,3,4}	18,2±1,1 ^{0,4}	16,5±0,6 ¹	15,9±0,4 ^{1,2}	<0,001
3 місяці	13,2±1,9 ^{1,2}	21,5±2,8 ^{0,3,4}	17,5±0,7 ⁰	15,8±0,9 ¹	15,2±0,7 ¹	<0,001
Рівень значущості відмінності показників у різні періоди, p	–	0,214	0,135	0,056	0,006	

Примітки: При проведенні порівняння між групами використано ANOVA, та для проведення постеріорних порівнянь використано критерій Шеффе (у випадку нормального закону розподілу); критерій Крускала–Уолліса та для проведення постеріорних порівнянь використано критерій Данна (у випадку закону розподілу відмінного від нормального).

⁰ – відмінність від ГрК статистично значима, p<0,05;

¹ – відмінність від ГрI статистично значима, p<0,05;

² – відмінність від ГрII статистично значима, p<0,05;

³ – відмінність від ГрIII статистично значима, p<0,05;

⁴ – відмінність від ГрIV статистично значима, p<0,05.

При проведенні порівняння між показниками на 1 місяці та 3 місяці використано t-критерій для пов'язаних вибірок (у випадку нормального закону розподілу); критерій Т-Вілкоксона (у випадку закону розподілу відмінного від нормального).

Отримані результати морфометричного аналізу свідчать про значне зниження набряку шарів сітківки після ретобульбарного введення клітин. В даній групі щурів

через 3 місяці після трансплантації культивованих постнатальних мСК-ПНГ відбувається значне відновлення цитоархітекtonіки і структури всіх шарів сітківки.

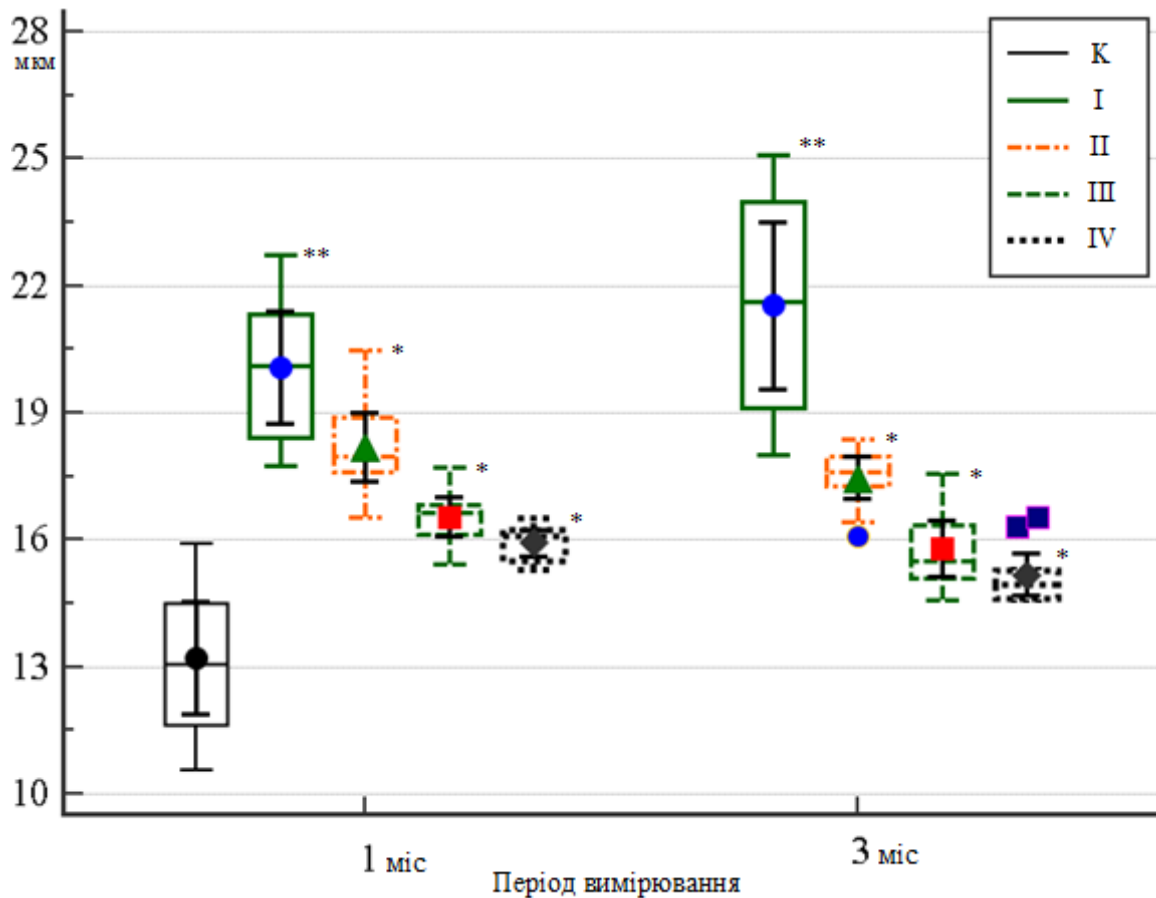


Рис. 2.25. Аналіз товщини шару паличок і колбочок сітківки на очах інтактних тварин, при експериментальній глаукомі та після введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ різними способами. Представлено мінімальне та максимальне значення, медіана та міжквартильний інтервал, середнє значення (95% ВІ). * – відмінність від групи тварин з моделлю глаукоми без введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ ($p < 0,05$). ** – відмінність від групи інтактних тварин $p < 0,05$)

Таким чином, аналіз результатів дослідження виявив, що трансплантація культивованих постнатальних мСК-ПНГ викликала позитивні зміни різного ступеня при всіх способах доставки. Так, при внутрішньовенному введенні клітин відзначено зменшення набряку всіх шарів сітківки та незначне відновлення цитоархітекtonіки шарів сітківки. Парабульбарне введення клітин приводило до зменшення набряку і відновлення цитоархітекtonіки шарів, найбільш виражене в шарі гангліонарних клітин

і у внутрішньому шарі сітківки. Однак, найбільш виражене зменшення набряку і відновлення цитоархітекτονіки шарів сітківки спостерігали при ретробульбарному введенні клітин [129-133].

2.3. Особливості структури зорового нерва при різних способах введення культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня

У внутрішньоорбітальній, внутрішньоканальній та внутрішньочерепній частинах зорового нерва групи контролю (інтактні тварини) виявляється значна кількість паралельно розташованих мієлінових нервових волокон різного діаметру, які побудовані із аксонів гангліонарних клітин сітківки (рис. 2.26).

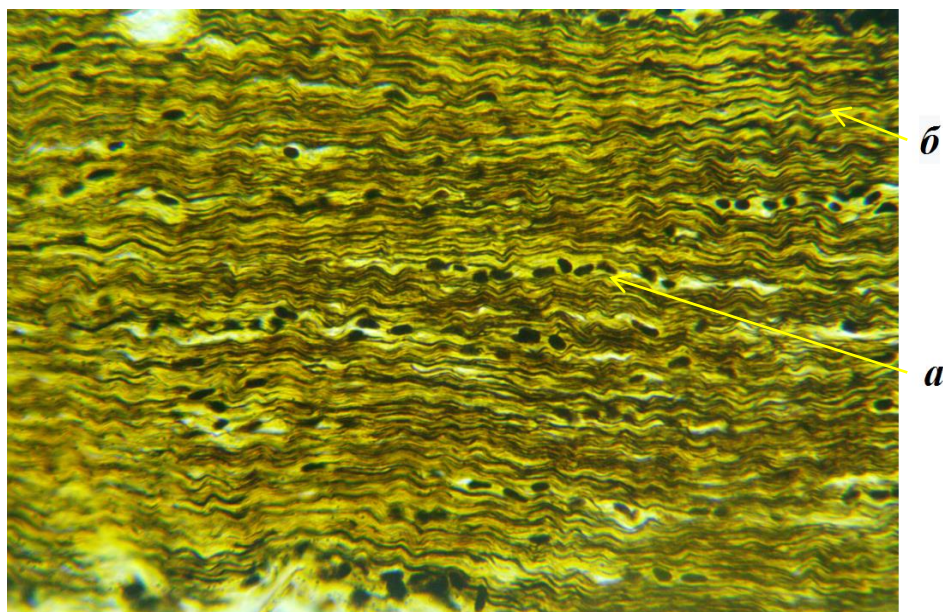


Рис. 2.26. Гістологічний препарат зорового нерва інтактних тварин. Імпрегнація нітратом срібла. Об.40, ок.10. *a* – вузькі колонки гліальних клітин, *б* – значна кількість нервових волокон та впорядковане їх розташування

Нервові волокна прямують впорядковано вздовж осі нерва. Аксони поєднуються у пучки, поміж яких вузькими колонками тягнуться гліальні клітини. Серед клітинного складу колонок гліальних клітин виявлено помірну кількість астроцитів та олігодендроцитів, що розташовані у 1-3 ряди.

Внутрішньоочна зона зорового нерва відрізняється будовою від решти частин. В цій зоні наявні поверхневий шар нервових волокон, прелямінарна частина, решітчаста зона та ретролямінарна частина. В прелямінарній частині пучки аксонів гангліонарних клітин, які не мають мієлінової оболонки, охоплені астроцитами та прошарками сполучної тканини, у якій пролягають капіляри. У решітчастій зоні багато безмієлінових нервових волокон, які проходять крізь решітчасту пластинку впорядковано. Решітчаста пластинка складається зі сполучної тканини та має достатньо отворів для розташування відростків гангліонарних клітин. Ретролямінарна частина зорового нерва побудована пучками мієлінових нервових волокон, між якими пролягають астроцити, олігодендроцити та мікроглія у вигляді колонок. Ця частина зорового нерва зовні вкрита мозковою оболонкою та за будовою подібна внутрішньоорбітальній, внутрішньоканальній та внутрішньочерепній частинам зорового нерва.

При проведенні аналізу розподілів показника питомої кількості нервових волокон встановлено, що розподіл значень даного показника у групі контролю (інтактні тварини) відрізнявся від нормального (тест Д'Агостіно-Пірсона $p=0,1186$, проте тест Шапіро-Уїлка $p=0,0076$). Розподіл значень даного показника у тварин інших груп на різних періодах спостереження не відрізнявся від нормального.

За результатами дослідження питома кількість нервових волокон у групі контролю становила 20020; 19141-21680; 7422 (Median, 95% CI of median, Range).

2.3.1. Зміни зорового нерва щурів після моделювання глаукоми без введення культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня

Моделювання глаукоми у щурів, група I, через 1 та 3 місяці викликало явища дегенерації та атрофії зорового нерва. У внутрішньоочній частині (решітчаста пластинка) виявляється порушення впорядкованості колонок астроцитів. У відрізку зорового нерва, що відповідає внутрішньоочній та внутрішньоорбітальній частинам, атрофія та дегенерація проявляються у вигляді зниження кількості нервових волокон та підвищення кількості клітинних елементів, порушення впорядкованості

нервових волокон та колонок гліальних клітин. Кількість клітинних елементів щодо контролю значно збільшена, серед них спостерігаються астроцити, мікроглія та меншою мірою – олігодендроцити (рис. 2.27 та рис. 2.28).

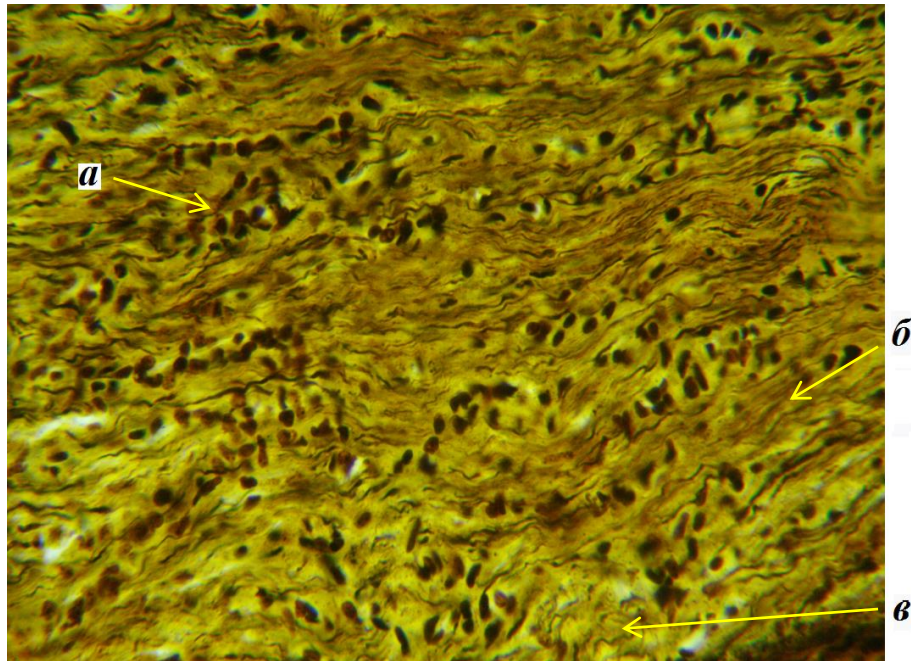


Рис. 2.27. Гістологічний препарат зорового нерва через 1 місяць після моделювання глаукоми без введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ. Ознаки атрофії зорового нерва. Імпрегнація нітратом срібла. Об.40, ок.10. *a* – збільшення кількості клітинних елементів, *б* – зменшення кількості нервових волокон та хаотичне їх розташування, *в* – поява сполучної тканини

При внутрішньогруповому порівнянні у тварин після моделювання глаукоми без введення клітин, група I, встановлено відсутність відмінностей у значенні показника питомої кількості нервових волокон у різні періоди спостереження (одразу після моделювання глаукоми, через 1 та 3 місяці після моделювання глаукоми) ($p=0,0317$).

До того ж у тварин групи I одразу ж після відтворення моделі глаукоми питома кількість нервових волокон склала 14378 ± 1994 од/мм², що було достовірно менше в порівнянні з групою контролю на 30,46% (K-W, Dunn's test, $p < 0,0001$).

Через 1 місяць після моделювання глаукоми питомо кількість нервових волокон становила 13249 ± 2759 од/мм², що достовірно менше на 35,92% (K-W, Dunn's test, $p < 0,0001$), ніж у групі контролю та достовірно не відрізнялося від значень показника даної групи тварин в попередньому періоді спостереження (t-test, $p = 0,1279$) (табл. 2.5).

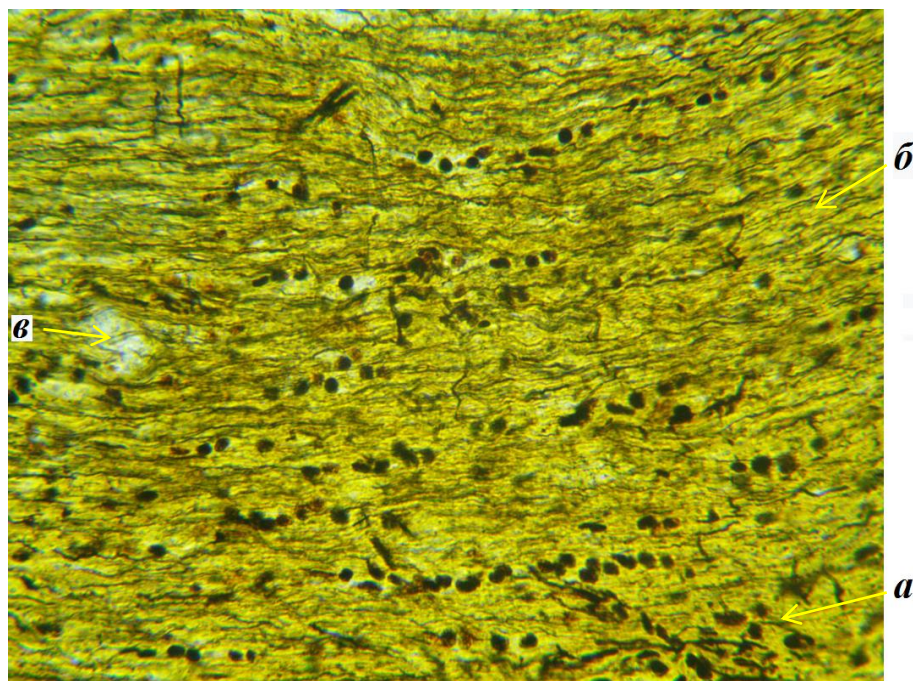


Рис. 2.28. Гістологічний препарат зорового нерва через 3 місяці після моделювання глаукоми без введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ. Ознаки атрофії зорового нерва. Імпрегнація нітратом срібла. Об.40, ок.10. *a* – збільшення кількості клітинних елементів, *б* – зменшення кількості нервових волокон та хаотичне їх розташування, *в* – поява сполучної тканини

Через 3 місяці після моделювання глаукоми без введення клітин питомо кількість нервових волокон склала 13021 ± 1345 од/мм², що достовірно менше, ніж у групі контролю на 37,02% (K-W, Dunn's test, $p < 0,0001$) та достовірно не відрізнялося від значень аналогічного показника даної групи тварин в попередньому періоді спостереження (t-test, $p = 0,7554$) (табл. 2.5).

2.3.2. Особливості структури зорового нерва щурів через 1 місяць після введення культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня

У групі II, після моделювання глаукоми та внутрішньовенного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ, у зоровому нерві виявлено ознаки атрофії та слабкі ознаки регенерації (рис. 2.29).

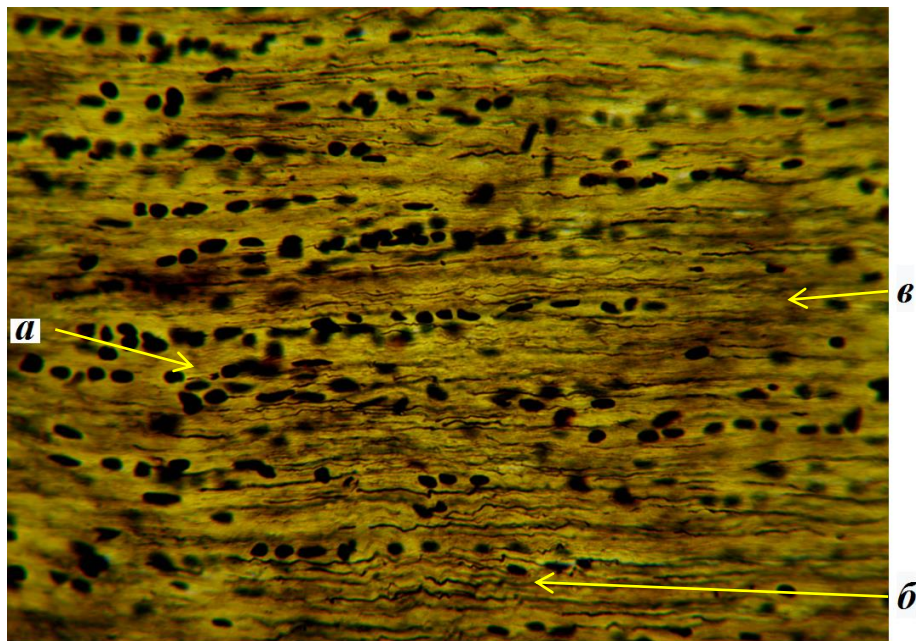


Рис. 2.29. Гістологічний препарат зорового нерва через 1 місяць після моделювання глаукоми та внутрішньовенного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ. Ознаки регенерації зорового нерва. Імпрегнація нітратом срібла. Об.40, ок.10. *a* – збільшення кількості клітинних елементів, *б* – зменшення кількості нервових волокон та впорядковане їх розташування, нервові волокна малого діаметру, *в* – незначна кількість сполучної тканини

Виявлено, що у зоровому нерві очей щурів групи II кількість клітинних елементів підвищена та знижена кількість нервових волокон по відношенню до групи контролю. Крім того, кількість клітинних елементів дещо менша, а кількість нервових волокон дещо вища щодо групи тварин після моделювання глаукоми без

введення клітин. Серед клітинних елементів виявляються переважно астроцити, мікроглія та меншою мірою – олігодендроцити.

При цьому, у групі II, через 1 місяць після внутрішньовенного введення клітин, питома кількість нервових волокон становила 17277 ± 2733 од/мм², що було достовірно менше за аналогічний показник у групі контролю на 16,44% (K-W, Dunn's test, $p=0,0243$). Проте, показник питомої кількості нервових волокон був більше, ніж у групі I на 30,40% (Tukey's test, $p=0,0006$) через 1 місяць після моделювання глаукоми (табл. 2.5).

Встановлено, що після парабульбарного (група III) та ретробульбарного (група IV) введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ у зоровому нерві виявляються приблизно ідентичні зміни у вигляді залишків ознак атрофії та виражені ознаки регенерації. У зоровому нерві цих груп тварин кількість клітинних елементів по відношенню до групи контролю помірно підвищена, а по відношенню до попередньої групи дещо менша (рис. 2.30 та рис. 2.31).

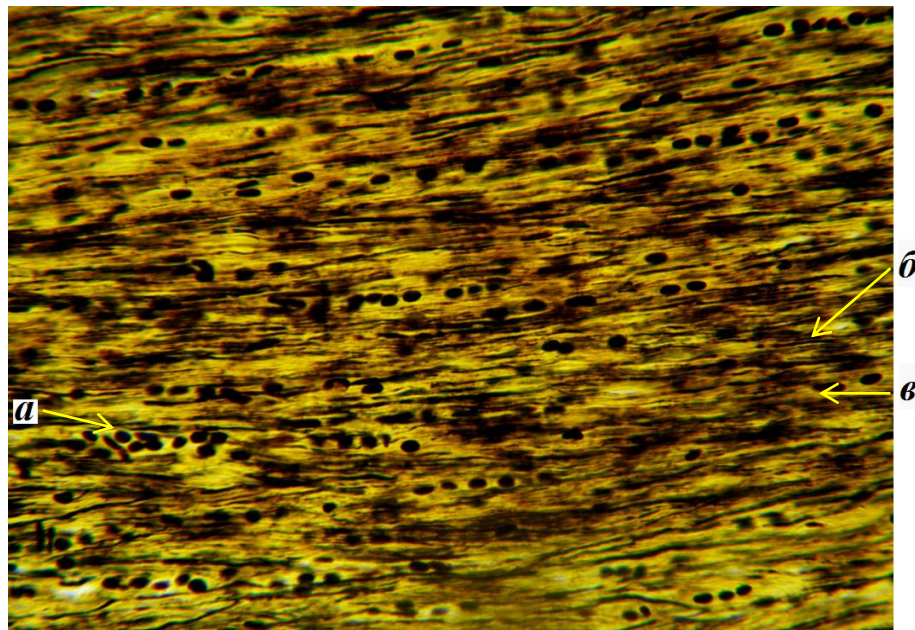


Рис. 2.30. Гістологічний препарат зорового нерва через 1 місяць після моделювання глаукоми та парабульбарного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ. Ознаки регенерації зорового нерва. Імпрегнація нітратом срібла. Об.40, ок.10. *a* – збільшення кількості клітинних елементів, *б* – збільшення кількості нервових волокон та впорядковане їх розташування, *в* – незначна кількість сполучної тканини

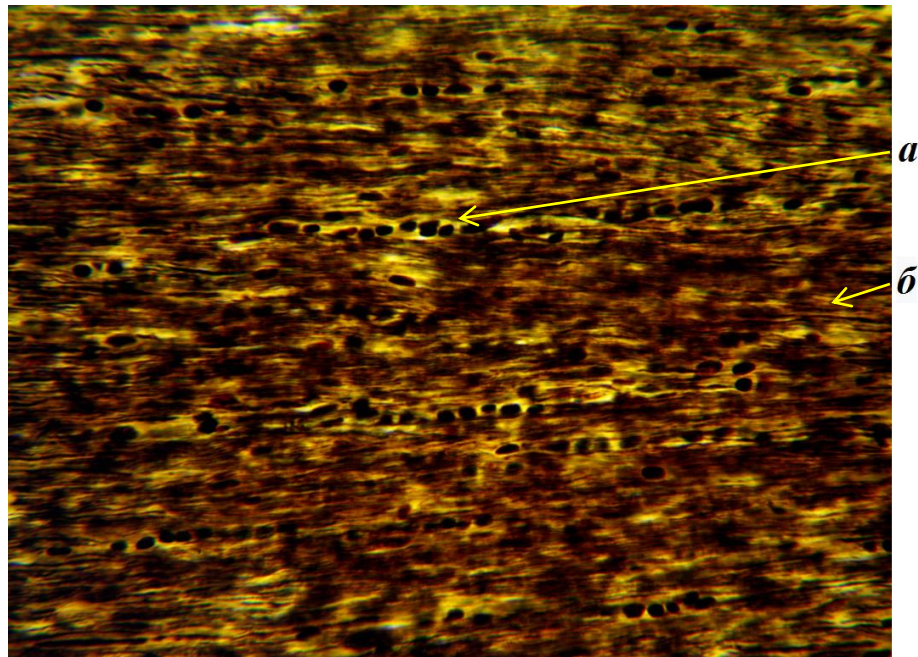


Рис. 2.31. Гістологічний препарат зорового нерва через 1 місяць після моделювання глаукоми та ретробульбарного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ.

Ознаки регенерації зорового нерва. Імпрегнація нітратом срібла. Об.40, ок.10.

Кількість клітинних елементів (*a*) та нервових волокон (*б*) практично відповідає контролю, вони впорядковано розташовані

До того ж у групі III питома кількість нервових волокон склала 18164; 17188-20313; 6836 од/мм² (Median, 95% CI of median, Range), що достовірно не відрізнялося від аналогічного показника у групі контролю (K-W, Dunn's test, $p > 0,9999$). Цей показник був достовірно більше у порівнянні з групою I одразу ж після моделювання глаукоми на 26,33% (K-W, Dunn's test, $p = 0,0003$) та через 1 місяць після моделювання глаукоми на 37,09% (K-W, Dunn's test, $p < 0,0001$) (табл. 2.5).

Крім того, показник питомої кількості нервових волокон у групі III через 1 місяць після парабульбарного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ був достовірно більшим у порівнянні з групою II на 9,27% (Tukey's test, $p = 0,1756$, проте, M-W test $p = 0,0183$).

В групі IV, з моделюванням глаукоми та ретробульбарним введенням культивованих постнатальних мСК-ПНГ, показник питомої кількості нервових волокон становив 20592 ± 1910 од/мм², що достовірно не відрізнялося від аналогічного показника у групі інтактних тварин (група К) (K-W, Dunn's test, $p > 0,9999$) (табл. 2.5).

Таблиця 2.5

**Динаміка показників питомої кількості нервових волокон
очей щурів (M±SD, 1/мм²)**

	0 діб	1 місяць	3 місяці	Порівняння всередині груп, різні періоди
Група К (n=10)	20676±2256; 20020; 19141-21680; 7422			
Група I (n=10)	14378±1994	13249±2759	13021±1345	ANOVA p=0,0317
Група II (n=10)	–	17277±2733	11809±1541	ANOVA p<0,0001
Група III (n=10)	–	18880±2313; 18164; 17188- 20313; 6836	20049±2633	K-W P<0,0001
Група IV (n=10)	–	20592±1910	19611±3560	ANOVA p<0,0001

Примітки: Попередньо визначали нормальність розподілу величин отриманих даних за допомогою тесту Д'Агостіно-Пірсона та Шапіро-Уїлка, розподіл вважали нормальним при $p > 0,05$.

За умов відповідності Гаусівському розподілу величини дані надавали у вигляді Mean±SD. При проведенні порівняння між групами використано критерій ANOVA із апостеріорним (post hoc) аналізом за допомогою критеріїв Даннетта Т3 (Dunnnett T3), Тьюкі для множинних порівнянь та t-тестом Стюдента для попарних порівнянь. Відмінності вважали достовірними при $p < 0,05$.

У випадку розподілу, що відрізнявся від нормального, дані надавали у вигляді Median, 95% CI of median, Range. Для оцінки відмінностей між групами використовували критерій Краскела-Уолліса із апостеріорним (post hoc) аналізом за допомогою критерію Данна (Dunn's test) для множинних порівнянь та критерію Мана-Уїтні для попарних порівнянь. Відмінності вважали достовірними при $p < 0,05$.

Крім того, показник питомої кількості нервових волокон в групі IV був достовірно більше на 43,21% (K-W, Dunn's test, $p < 0,0001$) у порівнянні з групою I одразу ж після моделювання глаукоми та на 55,42% (K-W, Dunn's test, $p < 0,0001$)

через 1 місяць після моделювання глаукоми. Також даний показник в групі IV був достовірно більше на 19,18% (Tukey's test, $p=0,0015$; M-W test $p=0,0001$) та на 13,36% (K-W, Dunn's test $p=0,9863$, проте M-W test $p=0,0263$), у порівнянні з групою II та групою III, відповідно, через 1 місяць після введення клітин.

2.3.3. Особливості структури зорового нерва щурів через 3 місяці після введення культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня

У групі II, після моделювання глаукоми та внутрішньовенного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ, у зоровому нерві виявлено ознаки атрофії та слабкі ознаки регенерації. Зазначено, що кількість клітинних елементів у зоровому нерві по відношенню до групи контролю підвищена, а по відношенню до групи I, щурів з моделюванням глаукоми без введення клітин, дещо менша (рис. 2.32).

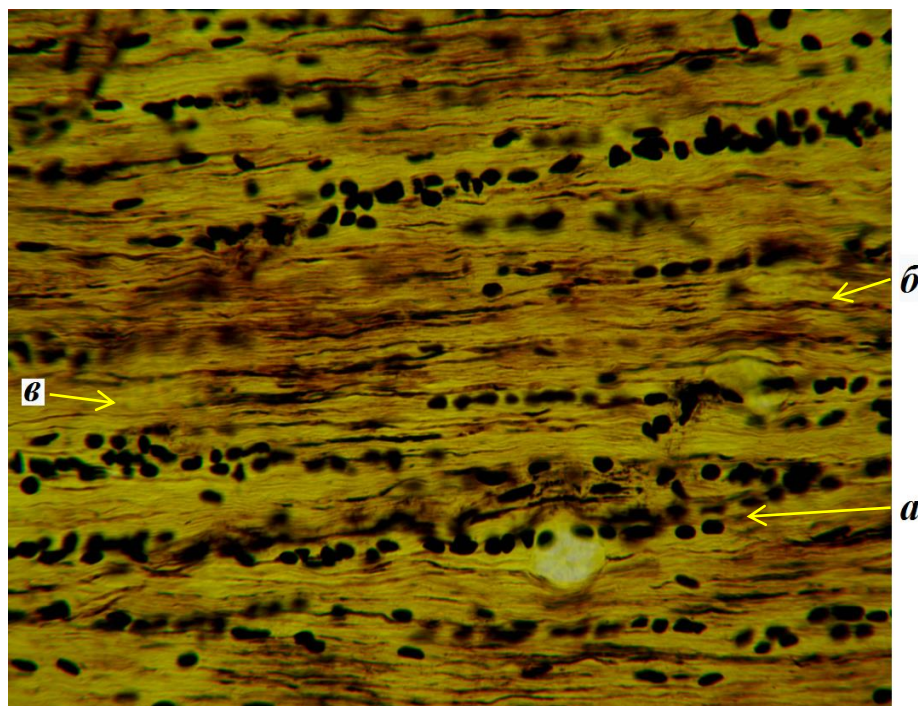


Рис. 2.32. Гістологічний препарат зорового нерва через 3 місяці після моделювання глаукоми та внутрішньовенного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ.

Ознаки регенерації зорового нерва. Імпрегнація нітратом срібла. Об.40, ок.10. *a* – збільшення кількості клітинних елементів, *б* – зменшення кількості нервових волокон та впорядковане їх розташування, *в* – незначна кількість сполучної тканини

Також відзначено, що кількість нервових волокон по відношенню до контролю знижена, а по відношенню до групи I дещо вища. Серед клітинних елементів виявляються переважно астроцити, мікроглія та меншою мірою – олігодендроцити. У внутрішньоочній частині, що відповідає решітчастій пластинці центрального відрізка наявні астроцити, впорядкованість розташування яких порушена.

До того ж через 3 місяці після внутрішньовенного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ (група II) питома кількість нервових волокон становила 11809 ± 1541 од/мм², що достовірно менше на 42,88% (K-W, Dunn's test, $p < 0,0001$) у порівнянні з групою контролю (рис. 2.33).

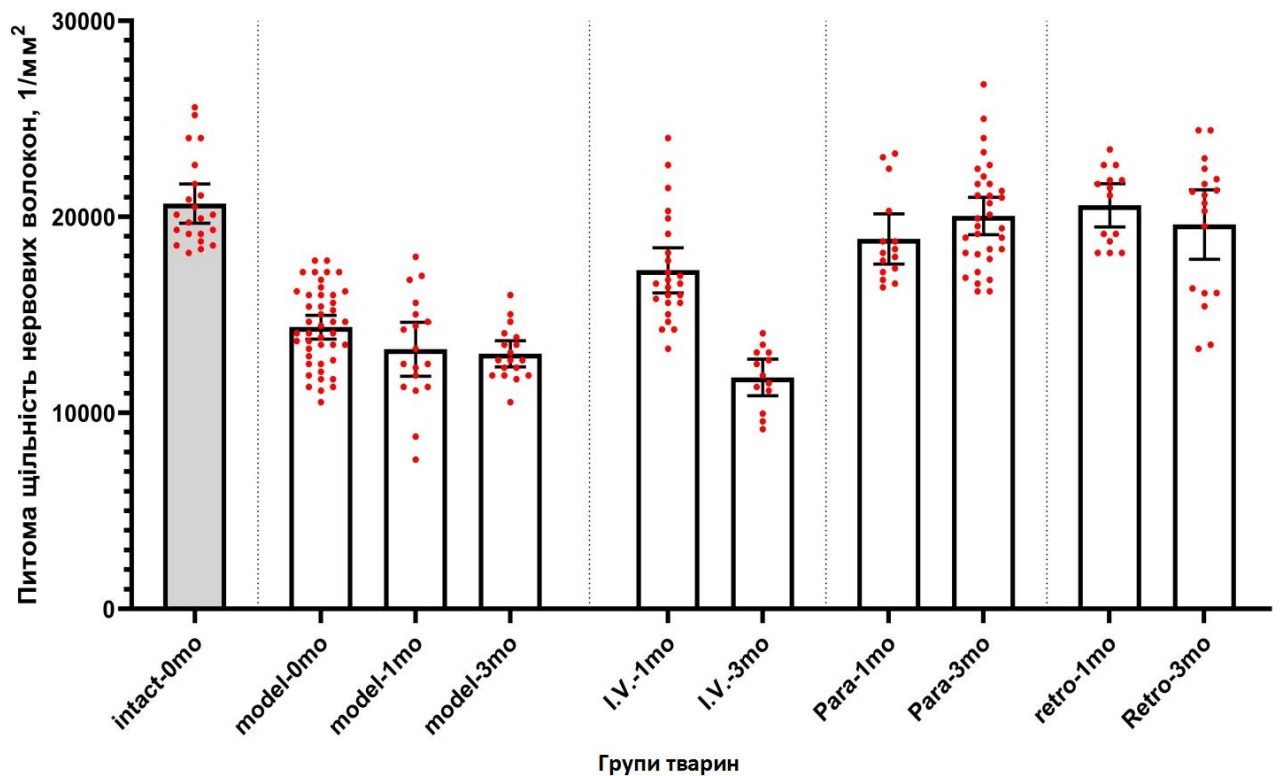


Рис. 2.33. Аналіз питомої щільності нервових волокон на очах інтактних тварин, при експериментальній моделі глаукоми та після введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ різними способами

Показник питомої кількості нервових волокон у групі II достовірно не відрізнявся від показника у групі I одразу ж після моделювання глаукоми (K-W, Dunn's test, $p = 0,3971$) та був менше на 30,64% (t-test, $p < 0,0001$) від значень

аналогічного показника даної групи тварин через 1 місяць після внутрішньовенного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ. Також показник питомої кількості нервових волокон не відрізнявся від показника у групі I через 3 місяці після моделювання глаукоми без введення клітин (Tukey's test, $p=0,1910$) (рис. 2.33).

У групі III, після парабульбарного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ, та у групі IV, після ретробульбарного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ, у зоровому нерві виявлено виражені ознаки регенерації (рис. 2.34 та рис. 2.35).

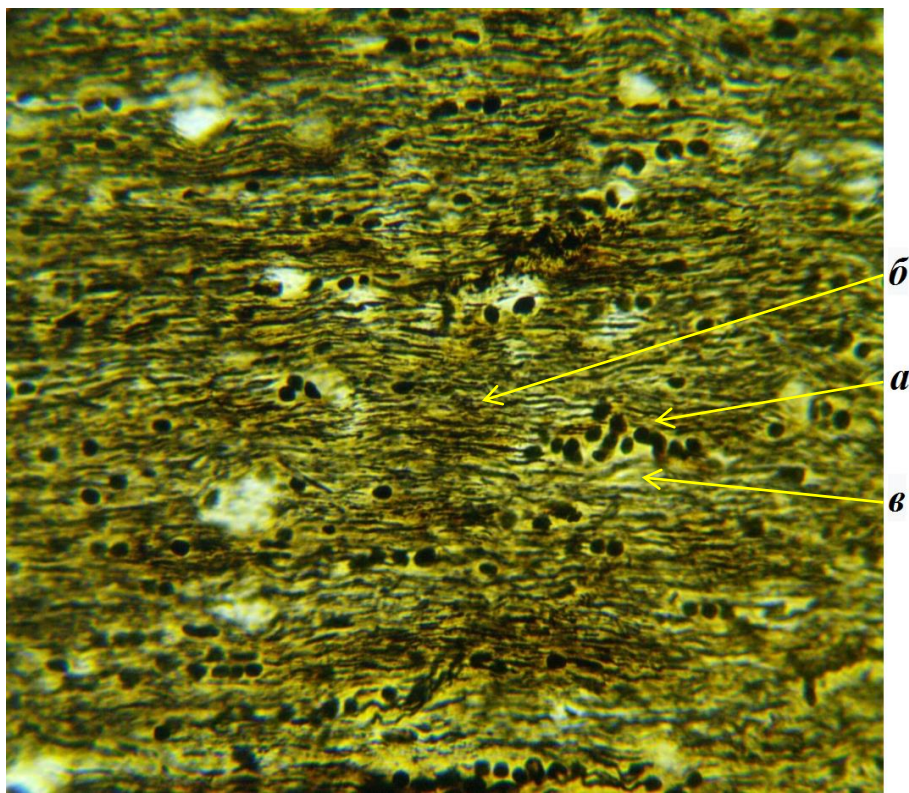


Рис. 2.34. Гістологічний препарат зорового нерва через 3 місяці після моделювання глаукоми та парабульбарного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ.

Ознаки регенерації зорового нерва. Імпрегнація нітратом срібла. Об.40, ок.10.

a – збільшення кількості клітинних елементів, *б* – збільшення кількості нервових волокон та впорядковане їх розташування, *в* – незначна кількість сполучної тканини

Кількість нервових волокон доходила практично до значень контролю, але переважали волокна меншого діаметру, наявні зміни імпрегнаційних властивостей, які менш виражені у тварин з ретробульбарним введенням клітин. Серед клітинних елементів виявлено менше астроцитів та мікроглії, наявні олігодендроцити. Кількість клітинних елементів по відношенню до контролю більша, однак менша від групи тварин після моделювання глаукоми без введення клітин. У внутрішньоочній частині, що відповідає решітчастій пластинці центрального відрізка, наявні астроцити, впорядкованість розташування яких відновлюється.

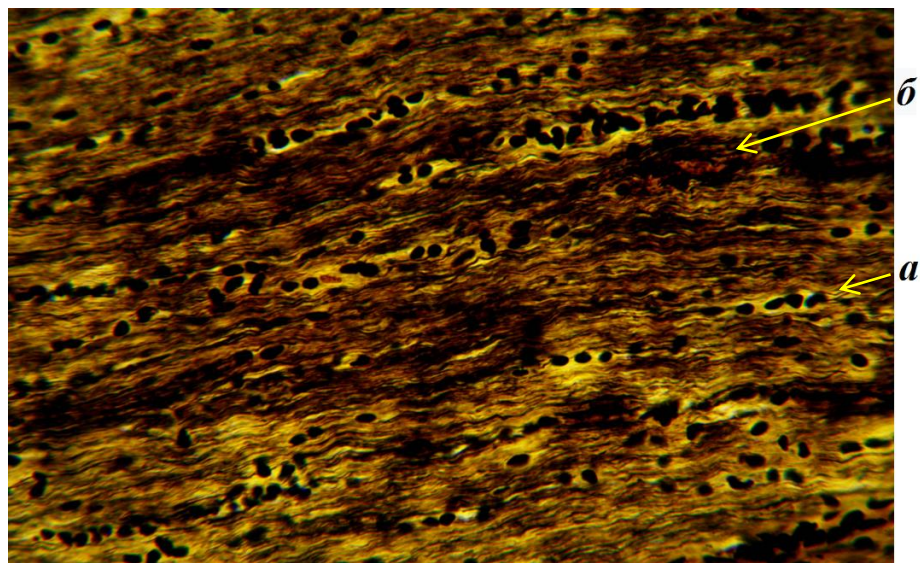


Рис. 2.35. Гістологічний препарат зорового нерва через 3 місяці після моделювання глаукоми та ретробульбарного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ.

Ознаки регенерації зорового нерва. Імпрегнація нітратом срібла. Об.40, ок.10.

Кількість клітинних елементів (*a*) та нервових волокон (*б*) практично відповідає контролю, вони впорядковано розташовані

Крім того, в групі III, після парабульбарного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ, показник питомої кількості нервових волокон склав 20049 ± 2633 од/мм² (табл. 2.5) та достовірно не відрізнявся від показника у групі контролю (K-W, Dunn's test, $p > 0,9999$). До того ж показник був достовірно більше на 39,44% (K-W, Dunn's test, $p < 0,0001$) по відношенню до групи I одразу ж після

моделювання глаукоми. Також показник питомої кількості нервових волокон достовірно не відрізнявся від показника через 1 місяць спостереження (t-test, $p=0,1327$).

Однак відмічено достовірне збільшення показника питомої кількості нервових волокон в групі III на 53,97% (Tukey's test, $p<0,0001$) у порівнянні з групою I та на 69,77% (Tukey's test, $p<0,0001$) у порівнянні з групою II, через 3 місяці спостереження (рис. 2.33).

У групі IV показник питомої кількості нервових волокон становив 19611 ± 3560 од/мм², що достовірно не відрізнялося від аналогічного показника у групі контролю (K-W, Dunn's test, $p>0,9999$) (табл. 2.5).

Також при проведенні аналізу показника питомої кількості нервових волокон в групі IV відзначено достовірне збільшення за відповідний показник у групі I на 36,39% (K-W, Dunn's test, $p<0,0001$) одразу ж після моделювання без введення клітин. До того ж даний показник достовірно не відрізнявся від показника через 1 місяць спостереження після ретробульбарного введення клітин (Tukey test, $p=0,6243$).

Показник питомої кількості нервових волокон в групі IV був достовірно більшим на 50,61% (Tukey's test, $p<0,0001$) від показника у групі I, на 66,06% (Tukey's test, $p<0,0001$) від показника у групі II та достовірно не відрізнявся від показника у групі III (Tukey's test, $p=0,9603$), через 3 місяці спостереження (рис. 2.33).

Таким чином, за даними нашого дослідження встановлено, що застосування 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, зниження кількості клітинних елементів астроцитів. Такі результати були найбільш виражені при парабульбарному та ретробульбарному введенні клітин.

Відновлення кількості повноцінних нервових волокон у тварин, яким вводились культивовані постнатальні мСК-ПНГ, можна пояснити здатністю клітин до

протекції гангліонарних нейронів сітківки та макроглії (астроцитів, олігодендроцитів), а також покращенням васкуляризації ушкодженого нерва, що обумовлено здатністю стовбурових клітин експресувати відповідні фактори.

Крім того, появу більшої кількості впорядкованих колонок олігодендроцитів можна пов'язати з можливістю культивованих постнатальних мСК-ПНГ диференціювати у напрямку незрілих олігодендроцитів.

Резюме до розділу 2

Аналізуючи одержані нами результати досліджень, встановлено розвиток дегенеративних змін, що характерні для глаукомної оптичної нейропатії після моделювання глаукоми. У сітківці щурів відзначено часткове відшарування аксонів від внутрішнього сітчастого шару, в ядрах гангліонарних клітин сітківки слабшає базofilія та спостерігається їх гіпертрофія. Крім того, виявлено міграцію клітин внутрішнього ядерного шару у внутрішній сітчастий шар, відбувається розпушення внутрішнього сітчастого шару. В шарі паличок і колбочок зазначено розвиток набряку, що призводить до збільшення товщини шару, розпушення шару і порушення цілісності мембран. Загалом відзначено значне потовщення всіх шарів сітківки в результаті розвитку набряку у порівнянні з сітківкою інтактних щурів. Середнє значення товщини внутрішнього сітчастого шару сітківки склало $30,9 \pm 4,8$ мкм, внутрішнього ядерного шару сітківки – $24,8 \pm 2,3$ мкм, зовнішнього ядерного шару сітківки – $56,3 \pm 4,5$ мкм та шару паличок і колбочок – $21,5 \pm 2,8$ мкм через 3 місяці після моделювання глаукоми.

Крім того, відтворена адреналінова модель глаукоми викликає атрофію та дегенерацію зорового нерва.

Виявлено, що у відрізку зорового нерва, який відповідає внутрішньоочній та внутрішньоорбітальній частинам, атрофія та дегенерація проявляються у вигляді зниження кількості нервових волокон та підвищення кількості клітинних елементів, порушення впорядкованості нервових волокон та колонок гліальних клітин. Відзначено зменшення показника питомої кількості нервових волокон на 35,92% ($p < 0,0001$) та на 37,02% ($p < 0,0001$), через 1 та 3 місяці відповідно, після моделювання глаукоми без введення клітин по відношенню до групи контролю.

Після введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ встановлено зменшення набряків шарів сітківки та нормалізацію гістологічної будови. Виявлено зменшення набряку всіх шарів, відновлення кількості волокон і синаптичних контактів у внутрішньому і зовнішньому сітчастих шарах, нормалізацію і відновлення структурної організації зовнішнього та внутрішнього ядерного шару. В шарі паличок і колбочок зменшується набряк та виявлено впорядкованість розташування волокон. Через 3 місяці після введення клітин середнє значення товщини внутрішнього сітчастого шару сітківки при парабульбарному та ретробульбарному введенні клітин становило $15 \pm 2,7$ мкм та $12,5 \pm 1,5$ мкм, внутрішнього ядерного шару сітківки – $13,7 \pm 1,1$ мкм та $11,9 \pm 1,3$ мкм, зовнішнього ядерного шару сітківки – $37,4 \pm 1,7$ мкм та $35,6 \pm 0,7$ мкм, шару паличок і колбочок – $15,8 \pm 0,9$ мкм та $15,2 \pm 0,7$ мкм, відповідно.

Однак поряд з позитивними морфологічними змінами зберігалися морфологічно ознаки, характерні для патологічних процесів. Так, відзначено ядра клітин у внутрішньому сітчастому шарі, що можливо обумовлено міграцією клітин внутрішнього ядерного шару, імовірно біполярних нейронів. Крім того, відзначена слабка базофілія частини ядер внутрішнього ядерного шару, що можливо свідчить про збереження деструктивних процесів в цих ядрах. Також, варто зазначити, що через 3 місяці після введення постнатальних культивованих мСК-ПНГ кількість слабо базофільних ядер зменшувалася.

У зоровому нерві виявлено виражені ознаки регенерації. Кількість нервових волокон доходить практично до значень контролю. Встановлено збільшення показника питомої кількості нервових волокон на 53,97% (Tukey's test, $p < 0,0001$) через 3 місяці після парабульбарного введення клітин та на 50,61% (Tukey's test, $p < 0,0001$) – після ретробульбарного введення клітин у порівнянні з групою тварин після моделювання глаукоми без введення клітин.

Однак у зоровому нерві також були присутні зміни у вигляді залишків ознак атрофії. Переважали волокна меншого діаметру, наявні зміни імпрегнаційних властивостей, які менш виражені у тварин з ретробульбарним введенням клітин.

Серед клітинних елементів виявлено менше астроцитів та мікроглії, а також наявні олігодендроцити.

Отже, з огляду на наведений вище аналіз впливу культивованих постнатальних мСК-ПНГ на структуру сітківки та зорового нерва при адреналіновій моделі глаукоми спостерігався позитивний ефект трансплантації клітин, який був найбільш виражений при парабульбарному та ретробульбарному введенні клітин.

Матеріали розділу висвітлено в наступних працях:

1. [130] Яковець АІ. Клітинна терапія глаукомної оптичної нейропатії в експерименті (короткострокові результати). «Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П. Л. Шупика». 2018;32:33-40.
2. [129] 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
3. [108] Петренко ОВ, Яковець АІ, Васильєв РГ. Роль мультипотентних стовбурових клітин у офтальмології (оглід літератури). Архів офтальмології України. 2018;6(2):75-9.
4. [123] Рыков СА, Петренко ОВ, Яковець АИ, и соавторы. Мультипотентные стволовые клетки-производные нервного гребня в лечении индуцированной адреналиновым стрессом глаукомы. Матеріали IV 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.
5. [131] Рыков СА, Петренко ОВ, Яковець 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.
6. [125] Рыков СА, Петренко ОВ, Яковець 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.
7. [128] 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.
 8. [126] Петренко ОВ, Яковець АІ, Клименко ПП, Зубов ДА, Родніченко АЕ, Васильєв РГ. Застосування клітинних технологій в лікуванні глаукомної оптичної нейропатії. В: Риков СО, редактор. Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю. Рефракційний пленер'17; 2017 Жов 20-21; Київ. Київ; 2017, с. 94-5.
 9. [132] Риков 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.
 10. [127] 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.
 11. [133] Рыков СА, Петренко ОВ, Яковець АИ, Зубов ДА, Васильев РГ. Перспективы использования мультипотентных стволовых клеток-производных нервного гребня в офтальмологии. Матеріали XIV з'їзду офтальмологів України; 2018 Трав 23-25; Одеса. Одеса: Чорномор'я; 2018, с. 264-5.
 12. [124] 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.
 13. [122] 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.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ У РОЗДІЛІ 2

1. Stevens G, White R, Flaxman SR, et al. Global prevalence of visual impairment and blindness: magnitude and temporal trends, 1990–2010. *J Ophthalmology*. 2013;120:2377-84.
2. Tham YC, Li X, Wong TY et al. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology*. 2014;121:2081-90.
3. Kosoko-Lasaki O, Gong G, Haynatzki G, Wilson MR. Race, ethnicity and prevalence of primary open-angle glaucoma. *J Natl Med Assoc*. 2006;98(10):1626-9.
4. Cho HK, Kee C. Population-based glaucoma prevalence studies in Asians. *Surv Ophthalmol*. 2014;59(4):434-47.
5. Iwase A, Suzuki Y, Araie M, et al. The prevalence of primary open-angle glaucoma in Japanese: the Tajimi Study. *Ophthalmology*. 2004;111(9):1641-8.
6. Delgado MF, Abdelrahman AM, Terahi M, Miro Quesada Woll JJ, Gil-Carrasco F, Cook C, et al. Management Of Glaucoma In Developing Countries: Challenges And Opportunities For Improvement. *Clinicoecon Outcomes Res*. 2019;11:591-604. DOI: 10.2147/CEOR.S218277
7. Vajaranant TS, Wu S, Torres M, Varma R. The Changing Face of Primary Open-Angle Glaucoma in the United States: Demographic and Geographic Changes from 2011–2050. *Am J Ophthalmol*. 2012 Aug;154(2):303-314.e3. DOI: 10.1016/j.ajo.2012.02.024
8. American academy of ophthalmology. Eye disease statistics [Internet]. 2012. Available from: <https://www.aaof.org/eye-disease-statistics>
9. Williams SE, Carmichael TR, Allingham RR, et al. The Genetics of POAG in Black South Africans: A Candidate Gene Association Study. *Sci Rep*. 2015;5:8378.
10. Takamoto M, Araie M. Genetics of primary open angle glaucoma. *Jpn J Ophthalmol*. 2014;58(1):1-15.
11. Casson RJ, Newland HS, Muecke J, et al. Prevalence of glaucoma in rural Myanmar: the Meiktila Eye Study. *Br J Ophthalmol*. 2007 Jun;91(6):710-4.
12. Cheng JW, et al. The prevalence of primary angle closure glaucoma in adult Asians: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014 Jul 24;9(7):e103222.

13. Day AC, Baio G, Gazzard G, Bunce C, Azuara-Blanco A, Beatriz Munoz B, et al. The prevalence of primary angle closure glaucoma in European derived populations: a systematic review. *Br J Ophthalmol*. 2012;96(9):1162-7.
14. Риков СО, Медведовська НВ, Троянов ДП. Сучасний стан та динаміка поширеності глаукоми серед дорослого населення України. *Україна. Здоров'я нації*. 2012; 2(22):119-21.
15. Либман ЕС. Эпидемиологическая характеристика глаукомы. *Глаукома*. 2009;1:2-3.
16. Разумовский МИ. Состояние инвалидности и медико-социальная экспертиза. *Современная офтальмология: Руководство*. 2009;2:541-56.
17. Моїсеєнко РО, Голубчиков МВ, Михальчук ВМ, Риков СО, Заболотько ВМ, Аліфанова ТА та співав. Офтальмологічна допомога в Україні за роки Незалежності. Аналітично-статистичний довідник. Кропивницький: Поліум; 2019. 328 с.
18. Conforti L, Adalbert R, Coleman MP. Neuronal death: where does the end begin? *Trends Neurosci*. 2007;30(4):159-66. DOI: 10.1016/j.tins.2007.02.004
19. Еричев ВП, Туманов ВП, Панюшкина ЛА. Глаукома и нейродегенеративные заболевания. *Национальный журнал глаукома*. 2012;1:62-8.
20. Gupta N, Weinreb RN. New definitions of glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol* 1997;8:38-41.
21. Quigley HA. Neuronal death in glaucoma. *Prog Retin Eye Res*. 1999 Jan;18(1):39-57. DOI: 10.1016/s1350-9462(98)00014-7
22. Quigley HA, Dunkelbarger GR, Green WR. Retinal ganglion cell atrophy correlated with automated perimetry in human eyes with glaucoma. *Am J Ophthalmol*. 1989;107:453-64.
23. Аветисов СЭ, Еричев ВП, Туманов ВП, Панюшкина ЛА, Федоров АА. Глаукома и болезнь Альцгеймера: поиск морфологических доказательств тождественности. *Волгоградский научно-медицинский журнал*. 2017;4(56):24-32.

24. Ghiso JA, Doudevski I, Ritch R, Rostagno AA. Alzheimer's Disease and Glaucoma: Mechanistic Similarities and Differences. *J Glaucoma*. 2013 Jun-Jul;22(0 5):S36-8. DOI: 10.1097/IJG.0b013e3182934af6
25. Wostyn P, Audenaert K, De Deyn PP. Alzheimer's disease and glaucoma: Is there a causal relationship? *British Journal of Ophthalmology*. 2009;93:1557-9.
26. Нестеров АП. Патогенез и проблемы патогенетического лечения глаукомы. *Клинич. офтальмол*. 2003;4(2):47-8.
27. Flammer J. Die glaukomatöse Optikusatropie: Ein Reperfusionsschaden [Glaucomatous optic neuropathy: a reperfusion injury]. *Klin Monbl Augenheilkd*. 2001 May;218(5):290-1. German. DOI: 10.1055/s-2001-15883
28. Нестеров АП. Глаукома. 2-е изд. Москва: Медицинское информационное агентство; 2014. 360 с.
29. Gupta N, Yücel YH. Glaucoma as a neurodegenerative disease. *Current Opinion in Ophthalmology*. 2007 Mar;18(2):110-14.
30. Hail JrN, Carter BZ, Konopleva M, Andreeff M. Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys. *Apoptosis*. 2006;11:889-904.
31. Macaya A. Apoptosis in the nervous system. *Rev-Neurol*. 1996;135:1356-60.
32. Mckinnon SJ. Glaucoma, apoptosis and neuroprotection. *Curr Opin Ophthalmol*. 1997;8:28-37.
33. Spaeth GL. Glaucoma, apoptosis, death and life. *Prog Retin Eye Res*. 1999;18(1):39-57.
34. Борзенко СА, Хубецова МХ, Гаврилова НА, Сабурова ИН, Тонаева ХД. Нейротрофические факторы и клеточная терапия в лечении глаукомной оптической нейропатии. *Офтальмохирургия*. 2016;1:78-84. DOI: 10.25276/0235-4160-2016-1-78-84
35. Гомазков ОА. Нейротрофические факторы мозга: Справочно-информационное издание. М.; 2004. 311 с.
36. Ko ML, Hu DN, Ritch R, et al. Patterns of retinal ganglion cell survival after brain-derived neurotrophic factor administration in hypertensive eyes of rats. *Neurosci. Lett*. 2001;305(2):139-42.

37. Quigley HA, McKinnon SJ, Zack DJ, et al. Retrograde axonal transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000;41(11):3460-6.
38. Pascale A, Drago F, Govoni S. Protecting the retinal neurons from glaucoma: lowering ocular pressure is not enough. *Pharmacol Res.* 2012;66(1):19-32. DOI:10.1016/j.phrs.2012.03.002
39. Vidal-Sanz M, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, et al. Understanding glaucomatous damage: anatomical and functional data from ocular hypertensive rodent retinas. *Prog Retin Eye Res.* 2012;31(1):1-27. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2011.08.001
40. Heijl A, Leske MC, Bengtsson B, et al. Reduction of Intraocular Pressure and Glaucoma Progression: Results from the Early Manifest Glaucoma Trial. *Arch Ophthalmol.* 2002;120(10):1268-79. DOI: 10.1001/archoph.120.10.1268
41. Lee EJ, Kim TW, Kim M, Kim H. Influence of lamina cribrosa thickness and depth on the rate of progressive retinal nerve fiber layer thinning. *Ophthalmology.* 2015;122(4):721-9. DOI: 10.1016/j.ophtha.2014.10.007
42. Burgoyne CF, Downs JC, Bellezza AJ, Suh JK, Hart RT. The optic nerve head as a biomechanical structure: a new paradigm for understanding the role of IOP-related stress and strain in the pathophysiology of glaucomatous optic nerve head damage. *Prog Retin Eye Res.* 2005;24(1):39-73. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2004.06.001
43. Anderson DR, Hendrickson A. Effect of intraocular pressure on rapid axoplasmic transport in monkey optic nerve. *Investigative ophthalmology.* 1974;13(10):771-83.
44. Roy Chowdhury U, Fautsch MP. Intracranial Pressure and Its Relationship to Glaucoma: Current Understanding and Future Directions. *Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol.* 2015;4(3):71-80.
45. Garg P, Diwedi S, Mullick R. To Evaluate the Correlation between Intracranial Pressure and Intraocular Pressure in Neurological Patients: A Prospective Cohort Study. *Int J Ophthalmol Clin Res.* 2019;6:104. DOI: 10.23937/2378-346X/1410104
46. Czarnik T, Gawda R, Kolodziej W, Latka D, Sznajd-Weron K, Weron R. Associations between intracranial pressure, intraocular pressure and mean arterial

- pressure in patients with traumatic and non-traumatic brain injuries. *Injury*. 2009;40(1):33-9. DOI: 10.1016/j.injury.2008.10.010
47. Mi XS, Yuan TF, So KF. The current research status of normal tension glaucoma. *Clinical Interventions in Aging*. 2014;9:1563-71. DOI: 10.2147/CIA.S67263
48. Mudumbai RC. Clinical update on normal tension glaucoma. *Seminars in Ophthalmology*. 2013;28(3):173-9. DOI: 10.3109/08820538.2013.771202
49. Mroczkowska S, Benavente-Perez A, Negi A, Sung V, Patel SR, Gherghel D. Primary open-angle glaucoma vs normal-tension glaucoma: the vascular perspective. *JAMA Ophthalmology*. 2013;131(1):36-43. DOI: 10.1001/2013.jamaophthalmol.1
50. Курышева НИ, Нагорнова НД. Роль вазоспазма в патогенезе глаукомной оптической нейропатии. *Глаукома*. 2004;2:18-24.
51. Flammer J. The vascular concept of glaucoma. *Surv Ophthalmol*. 1994 May;38 Suppl:S3-6. DOI: 10.1016/0039-6257(94)90041-8
52. Agarwal R, Gupta SK, Agarwal P, Saxena R, Agrawal SS. Current concepts in the pathophysiology of glaucoma. *Indian J Ophthalmol*. 2009 Jul-Aug;57(4):257-66. DOI: 10.4103/0301-4738.53049
53. Загидуллина АШ, Нугманова АР. Влияние нарушений системной гемодинамики на развитие открытоугольной глаукомы. *Медицинский вестник Башкортостана*. 2018;13(1):116-21.
54. Bowe A. Circadian variation in arterial blood pressure and glaucomatous optic neuropathy – a systematic review and meta-analysis. *American Journal of Hypertension*. 2015 Sep;28(9):1077-82. DOI: 10.1093/ajh/hpv016
55. Raajaseharan T, Rajasekaran M. Distribution of ocular perfusion pressure in hypertensive patients and its relationship in development of open angle glaucoma. *J. Evid. Based Med. Healthc*. 2016;3(69):3748-51. DOI: 10.18410/jebmh/2016/802
56. Schmidl D, Garhofer G, Schmetterer L. The complex interaction between ocular perfusion pressure and ocular blood flow – relevance for glaucoma. *Exp Eye Res*. 2011;93(2):141-55. DOI: 10.1016/j.exer.2010.09.002
57. Hulsman CA, Vingerling JR, Hofman A, et al. Blood pressure, arterial stiffness and open angle glaucoma. The Rotterdam study. *Arch Ophthalmol*. 2007;125:805-12.

58. Delaney Y, Walshe TE, O'Brien C. Vasospasm in glaucoma: clinical and laboratory aspects. *Optom Vis Sci.* 2006;83(7):406-14. DOI: 10.1097/01.opx.0000225877.13217.01
59. Broadway DC, Drance SM. Glaucoma and vasospasm. *British Journal of Ophthalmology.* 1998;82:862-70.
60. Adams JA. Endothelium and cardiopulmonary resuscitation. *Crit Care Med.* 2006;34(12):458-65.
61. Toda N, Nakanishi-Toda M. Nitric oxide: Ocular blood flow, glaucoma, and diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res.* 2007;26:205-38.
62. Rubanyi GM, Polokoff MA. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev.* 1994;46:325-415.
63. Henry E, Newby DE, Webb DJ, Hadoke PWF, O'Brien CJ. Altered Endothelin-1 Vasoreactivity in Patients with Untreated Normal-Pressure Glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2006;47(6):2528-32. DOI: 10.1167/iovs.05-0240
64. The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS): 7. The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. The AGIS Investigators. *American Journal of Ophthalmology.* 2000 Oct;130(4):429-40. DOI: 10.1016/s0002-9394(00)00538-9
65. Нестеров АП, и соавторы. Национальное руководство по глаукоме. Издание 2-е. Москва: ГЭОТАР-Медиа; 2008. Глава 4, Медикаментозное лечение глаукомы; с. 83-122.
66. Schmidl D, Schmetterer L, Garhöfer G, Popa-Cherecheanu A. Pharmacotherapy of Glaucoma. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2015;31(2):63-77. DOI: 10.1089/jop.2014.0067
67. Kalapesi FB, Coroneo MT, Hill MA. Human ganglion cells express the alpha-2 adrenergic receptor: relevance to neuroprotection. *Br J Ophthalmol.* 2005;89:758-63.
68. Dong C-J, Guo Y, Agey P, Wheeler L, Hare WA. α 2 adrenergic modulation of NMDA receptor function as a major mechanism of RGC protection in experimental glaucoma and retinal excitotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:4515-22. DOI: 10.1167/iovs.08-2078

69. Hernández M, Urcola JH, Vecino E. Retinal ganglion cell neuroprotection in a rat model of glaucoma following brimonidine, latanoprost or combined treatments. *Exp Eye Res.* 2008;86(5):798-806. DOI: 10.1016/j.exer.2008.02.008
70. Lama PJ. Systemic adverse effects of beta-adrenergic blockers: an evidence-based assessment. *Am J Ophthalmol.* 2002;134(5):749-60. DOI: 10.1016/s0002-9394(02)01699-9
71. Osborne NN, Wood JP, Chidlow G. Invited review: neuroprotective properties of certain beta-adrenoceptor antagonists used for the treatment of glaucoma. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2005;21:175-81. DOI: 10.1089/jop.2005.21.175
72. Ставицкая ТВ. Прямое и непрямое нейропротективное действие некоторых гипотензивных препаратов. *Клиническая офтальмология.* 2003;4:184-6.
73. Siesky B, Harris A, Cantor LB, et al. A comparative study of the effects of brinzolamide and dorzolamide on retinal oxygen saturation and ocular microcirculation in patients with primary open-angle glaucoma. *Br J Ophthalmol.* 2008;92(4):500-4. DOI: 10.1136/bjo.2007.125187
74. Zanon-Moreno V, Garcia-Medina JJ, Gallego-Pinazo R, Vinuesa-Silva I, Moreno-Nadal MA, Pinazo-Duran MD. Antioxidant status modifications by topical administration of dorzolamide in primary open-angle glaucoma. *Eur J Ophthalmol.* 2009;19(4):565-71. DOI: 10.1177/112067210901900408
75. Saccà SC, La Maestra S, Micale RT, et al. Ability of dorzolamide hydrochloride and timolol maleate to target mitochondria in glaucoma therapy. *Arch Ophthalmol.* 2011;129(1):48-55. DOI: 10.1001/archophthalmol.2010.324
76. Weinreb RN, Toris CB, Gabelt BT, Lindsey JD, Kaufman PL. Effects of prostaglandins on the aqueous humor outflow pathways. *Surv Ophthalmol.* 2002;47(1):53-64. DOI: 10.1016/s0039-6257(02)00306-5
77. Yamagishi R, Aihara M, Araie M. Neuroprotective effects of prostaglandin analogues on retinal ganglion cell death independent of intraocular pressure reduction. *Exp Eye Res.* 2011;93(3):265-70. DOI: 10.1016/j.exer.2011.06.022

78. Kanamori A, Naka M, Fukuda M, Nakamura M, Negi A. Latanoprost protects rat retinal ganglion cells from apoptosis in vitro and in vivo. *Exp Eye Res.* 2009;88(3):535-41. DOI: 10.1016/j.exer.2008.11.012
79. Zhou W, Zhu X, Zhu L, et al. Neuroprotection of muscarinic receptor agonist pilocarpine against glutamate-induced apoptosis in retinal neurons. *Cell Mol Neurobiol.* 2008;28(2):263-275. DOI: 10.1007/s10571-007-9251-0
80. Kaur IP, Smitha R, Aggarwal D, Kapil M. Acetazolamide: future perspective in topical glaucoma therapeutics. *Int J Pharm.* 2002;248(1-2):1-14. DOI: 10.1016/s0378-5173(02)00438-6
81. Molina-Castañer S. Terminology and guidelines for glaucoma. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología.* 2009;84(10):543-4.
82. Zinkernagel MS, Ebnetter A. Acetazolamide influences ocular pulse amplitude. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2009;25(2):141-4. DOI: 10.1089/jop.2008.0077
83. Hausteiner M, Spoerl E, Boehm AG. The effect of acetazolamide on different ocular vascular beds. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2013;251(5):1389-98. DOI: 10.1007/s00417-012-2242-y
84. Flammer J, Pache M, Resink T. Vasospasm, its role in the pathogenesis of diseases with particular reference to the eye. *Prog Retin Eye Res.* 2001; 20(3):319-49. DOI: 10.1016/s1350-9462(00)00028-8
85. Mayama C, Araie M. Effects of antiglaucoma drugs on blood flow of optic nerve heads and related structures. *Jpn J Ophthalmol.* 2013;57(2):133-49. DOI: 10.1007/s10384-012-0220-x
86. Traverso CE, Stalmans I, Topouzis F, Bagnasco L (eds). *Glaucoma. ESASO Course Series.* Basel, Karger. 2016;8:76-90. DOI: 10.1159/000446138
87. Ang M, Tham CC, Sng, CCA. Selective laser trabeculoplasty as the primary treatment for open angle glaucoma: time for change? *Eye.* 2020;34:789-91. DOI: 10.1038/s41433-019-0625-6
88. Heijl A, Peters D, Leske MC, Bengtsson B. Effects of argon laser trabeculoplasty in the Early Manifest Glaucoma Trial. *Am J Ophthalmol.* 2011;152:842-8.

89. Hong Y, Song SJ, Liu B, Hassanpour K, Zhang C, Loewen N. Efficacy and safety of micropulse laser trabeculoplasty for primary open angle glaucoma. *Int J Ophthalmol*. 2019 May 18;12(5):784-8. DOI: 10.18240/ijo.2019.05.13
90. Lai JS, Tham CC, Chua JK, Poon AS, Chan JC, Lam SW, et al. To compare argon laser peripheral iridoplasty (ALPI) against systemic medications in treatment of acute primary angle-closure: mid-term results. *Eye (Lond)*. 2006 Mar;20(3):309-14. DOI: 10.1038/sj.eye.6701867
91. Ritch R, Tham CC, Lam DS. Long-term success of argon laser peripheral iridoplasty in the management of plateau iris syndrome. *Ophthalmology*. 2004 Jan;111(1):104-8. DOI: 10.1016/j.opthta.2003.05.001
92. Tham CC, Lai JS, Poon AS, Chan JC, Lam SW, Chua JK, et al. Immediate argon laser peripheral iridoplasty (ALPI) as initial treatment for acute phacomorphic angle-closure (phacomorphic glaucoma) before cataract extraction: a preliminary study. *Eye (Lond)*. 2005 Jul;19(7):778-83. DOI: 10.1038/sj.eye.6701651
93. De Silva DJ, Day AC, Bunce C, Gazzard G, Foster PJ. Randomised trial of sequential pretreatment for Nd: YAG laser iridotomy in dark irides. *Br J Ophthalmol*. 2012 Feb;96(2):263-6. DOI: 10.1136/bjo.2010.200030. Epub 2011 Apr 21. PMID: 21515562.
94. Liebmann JM, Ritch R. Laser surgery for angle closure glaucoma. *Semin Ophthalmol*. 2002 Jun;17(2):84-91. DOI: 10.1076/soph.17.2.84.14720
95. Pucci V, Tappainer F, Borin S, Bellucci R. Long-term follow-up after transscleral diode laser photocoagulation in refractory glaucoma. *Ophthalmologica*. 2003 Jul-Aug;217(4):279-83.
96. Schlote T, Derse M, Rassmann K, Nicaeus T, Dietz K, Thiel HJ. Efficacy and safety of contact transscleral diode laser cyclophotocoagulation for advanced glaucoma. *J Glaucoma*. 2001 Aug;10(4):294-301. DOI: 10.1097/00061198-200108000-00009
97. Stefan C, Batras M, Iliescu Daniela A, Timaru Cristina M, De Simone A, Hosseini-Ramhormozi J. Current options for surgical treatment of glaucoma. *Rom J Ophthalmol*. 2015 Jul-Sep;59(3):194-201.

98. Skaat A, Goldenfeld M, Cotlear D, Melamed S. CO2 laser-assisted deep sclerectomy in glaucoma patients. *J Glaucoma*. 2014 Mar;23(3):179-84. DOI: 10.1097/IJG.0b013e3182707406
99. Chiselita D. Non-penetrating deep sclerectomy versus trabeculectomy in primary open-angle glaucoma surgery. *Eye (Lond)*. 2001 Apr;15(P2):197-201. DOI: 10.1038/eye.2001.60
100. Grieshaber MC, Pienaar A, Olivier J, Stegmann R. Canaloplasty for primary open-angle glaucoma: long-term outcome. *Br J Ophthalmol*. 2010 Nov;94(11):1478-82. DOI: 10.1136/bjo.2009.163170
101. Chan JE, Netland PA. EX-PRESS Glaucoma Filtration Device: efficacy, safety, and predictability. *Med Devices (Auckl)*. 2015 Sep 2;8:381-8. DOI: 10.2147/MDER.S63350
102. Карлова ЕВ. Хирургическая активация увеосклерального оттока в лечении больных первичной открытоугольной глаукомой. *Офтальмохирургия*. 2014;2:52-6.
103. Demols E, Brihaye-Van Geertruyden M. Cyclocryoapplication. *Ophthalmologica*. 1975;171(4-5):332-45. DOI: 10.1159/000307542
104. Barak Y, Lee ES, Schaal S. Sealing Effect of external diathermy on leaking sclerotomies after small-gauge vitrectomy: a clinicopathological report. *JAMA Ophthalmol*. 2014;132(7):891-2. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2014.341
105. Koike KJ, Chang PT. Trabeculectomy: A Brief history and review of current trends. *Int Ophthalmol Clin*. 2018 Summer;58(3):117-33. DOI: 10.1097/IO.0000000000000231
106. Weinreb RN, Levin LA. Is neuroprotection a viable therapy for glaucoma? *Arch Ophthalmol*. 1999;117(11):1540-4. DOI: 10.1001/archopht.117.11.1540
107. Yoles E, Schwartz M. Potential neuroprotective therapy for glaucomatous optic neuropathy. *Surv Ophthalmol*. 1998 Jan-Feb;42(4):367-72. DOI: 10.1016/s0039-6257(97)00123-9
108. Петренко ОВ, Яковець АІ, Васильєв РГ. Роль мультипотентних стовбурових клітин у офтальмології (оглід літератури). *Архів офтальмології України*. 2018;6(2):75-9.

109. Кузьменко ВВ, Ступникова ТВ, Хейфец ЮБ, Вавилова ЛМ. Возможности клинического применения стволовых клеток в офтальмологии. *Здоровье и образование в XXI веке*. 2016;18(1):34-42.
110. Elisseeff J, Madrid MG, Qiaozhi QL, et al. Future perspectives for regenerative medicine in ophthalmology. *Middle East African J. Ophthalmology*. 2013; 20:38-45.
111. Jiang D, Xiong G, Feng H, Zhang Z, Chen P, Yan B, et al. Donation of mitochondria by iPSC-derived mesenchymal stem cells protects retinal ganglion cells against mitochondrial complex I defect-induced degeneration. *Theranostics*. 2019 Apr 13;9(8):2395-410. DOI: 10.7150/thno.29422
112. Chamling X, Sluch VM, Zack DJ. The potential of human stem cells for the study and treatment of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016 Apr 1;57(5):ORSF11-6. DOI: 10.1167/iovs.15-18590
113. Harper MM, Grozdanic SD, Blits B, et al. Transplantation of BDNF-secreting mesenchymal stem cells provides neuroprotection in chronically hypertensive rat eyes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2011;52(7):4506-15. DOI: 10.1167/iovs.11-7346
114. Xu W, Xu GX. Mesenchymal stem cells for retinal diseases. *International Journal of Ophthalmology*. 2011;4(4):413-21. DOI: 10.3980/j.issn.2222-3959.2011.04.19
115. Roubeyx C, Godefroy D, Mias C, Sapienza A, Riancho L, Degardin J, et al. Intraocular pressure reduction and neuroprotection conferred by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in an animal model of glaucoma. *Stem Cell Res Ther*. 2015 Sep 16;6(1):177. DOI: 10.1186/s13287-015-0168-0
116. Baraniak PR, McDevitt TC. Stem cell paracrine actions and tissue regeneration. *Regen Med*. 2010;5(1):121-43. DOI: 10.2217/rme.09.74
117. Fu Y, Karbaat L, Wu L, Leijten J, Both SK, Karperien M. Trophic effects of mesenchymal stem cells in tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*. 2017 Dec;23(6):515-28. DOI: 10.1089/ten.TEB.2016.0365
118. Spees JL, Lee RH, Gregory CA. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Res Ther*. 2016 Aug 31;7(1):125. DOI: 10.1186/s13287-016-0363-7

119. Oswald J, Baranov P. Regenerative medicine in the retina: from stem cells to cell replacement therapy. *Ther Adv Ophthalmol.* 2018 Apr 26;10:1-21. DOI: 10.1177/2515841418774433
120. Vasyliiev RG, Rodnichenko AE, Zubov DA et al. In vitro Properties of neural crest-derived multipotent stem cells from a bulge region of whisker follicle. *Biotechnologia Acta.* 2014;7 (4):73-9. DOI: 10.15407/biotech7.04.071
121. Vasyliiev RG, Gubar OS, Gordiienko IM, Litvinova LS, Rodnichenko AE, Shupletsova VV, et al. Comparative analysis of biological properties of large-scale expanded adult neural crest-derived stem cells isolated from human hair follicle and skin dermis. *Stem Cells Int.* 2019 Feb 19; 2019:9640790. DOI: 10.1155/2019/9640790
122. 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.
123. Рыков СА, Петренко ОВ, Яковець АИ, и соавторы. Мультипотентные стволовые клетки-производные нервного гребня в лечении индуцированной адреналиновым стрессом глаукомы. Матеріали IV 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.
124. 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.
125. Рыков СА, Петренко ОВ, Яковець АИ, и соавторы. Исследование терапевтического потенциала мультипотентных стволовых клеток-производных нервного гребня на модели индуцированной адреналиновым стрессом глаукомы. Матеріали науч.-практ. конф. с междунар. участием. Филатовские чтения – 2017; 2017 Май 25-26; Одесса. Одесса; 2017, с. 68.

126. Петренко ОВ, Яковець АІ, Клименко ПП, Зубов ДА, Родніченко АЕ, Васильєв РГ. Застосування клітинних технологій в лікуванні глаукомної оптичної нейропатії. В: Риков СО, редактор. Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю. Рефракційний пленер'17; 2017 Жов 20-21; Київ. Київ; 2017, с. 94-5.
127. 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.
128. 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.
129. 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
130. Яковець АІ. Клітинна терапія глаукомної оптичної нейропатії в експерименті (короткострокові результати). «Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П. Л. Шупика». 2018;32:33-40.
131. Рыков СА, Петренко ОВ, Яковець 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.
132. Риков 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.
133. Рыков СА, Петренко ОВ, Яковець АИ, Зубов ДА, Васильев РГ. Перспективы использования мультипотентных стволовых клеток-производных нервного гребня в офтальмологии. Матеріали XIV з'їзду офтальмологів України; 2018 Трав 23-25; Одеса. Одеса: Чорномор'я; 2018, с. 264-5.

РОЗДІЛ 3

АНАЛІЗ ЗМІН ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ЗОРОВОГО АНАЛІЗАТОРА ПІД ВПЛИВОМ КУЛЬТИВОВАНИХ ПОСТНАТАЛЬНИХ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН-ПОХІДНИХ НЕРВОВОГО ГРЕБЕНЯ

3.1. Методологія визначення змін функціонального стану зорового аналізатора та обґрунтування вибору методу лікування глаукоми

Глаукома – це прогресуюча оптична нейропатія, що характеризується структурними та функціональними змінами сітківки і зорового нерва та призводить до появи ексавації диска зорового нерва і відповідного до неї зниження світлочутливості сітківки [1-3]. Ця патологія є провідною глобальною причиною незворотної сліпоти в усьому світі [4-7]. Хоча останнім часом приділяється велика увага механізмам патогенезу глаукоми, однак це питання залишається предметом дискусії і на сьогодні.

Глаукома часто асоціюється з тривалим та безсимптомним початком і, як правило, виявляється на пізніх стадіях, коли відбулося незворотне ураження. Саме тому рання діагностика та ретельний моніторинг розвитку хвороби є критично важливими для запобігання втрати зору, що відіграє важливу роль в профілактиці сліпоти внаслідок цього захворювання [8].

Одним із основних методів оцінки функції зорового аналізатора є статична периметрія, що є важливим показником в діагностиці глаукоми та дозволяє виявити дефекти в полі зору внаслідок втрати нервових волокон сітківки [9,10]. Відомо, що структурні пошкодження можуть передувати функціональним втратам при глаукомі. Однак чисельні рандомізовані клінічні дослідження показали, що функціональні зміни можна виявити за відсутності структурних пошкоджень [11-13].

За останні десятиліття було запропоновано цілий ряд нових нейрофізіологічних методів дослідження, що допомагають виявляти зміни функціонального стану зорового аналізатора на ранніх, доклінічних стадіях та проводити моніторинг динаміки захворювання [14-17]. Саме електрофізіологічні методи дослідження

дозволяють об'єктивно оцінити зорове сприйняття і якість переробки зорової інформації за рахунок реєстрації біоелектричних потенціалів, що генеруються нейронами зорової системи у відповідь на спалах або патерн-стимул. Дані методи дослідження є функціональними тестами, оскільки викликані біоелектричні потенціали є результатом проведення сигналів зоровим шляхом та дозволяють отримати об'єктивну інформацію про локалізацію функціональних порушень [18].

У даний час серед електрофізіологічних методів дослідження в офтальмології найбільш поширеним і ефективним методом для виявлення ранніх глаукомних змін та динамічного спостереження пацієнтів з глаукомою є зорові викликані коркові потенціали (ЗВКП), які відображають функцію зорової кори головного мозку і зорового нерва, а також є перспективними для оцінки стану нейронів сітківки [19,20].

Реєстрація зорових викликаних потенціалів (ЗВП) – це сучасний та інформативний метод, що дозволяє отримати об'єктивну інформацію щодо функціонального стану різних ланок зорового аналізатора та за допомогою якого можна відстежувати порушення передачі імпульсів в сітківці, демієлінізації нервових волокон на різних рівнях зорового шляху, що характерно для глаукомної оптичної нейропатії (ГОН). До того ж будь-який нервовий сигнал, що досягає зорової кори головного мозку, повинен проходити через шар гангліонарних клітин сітківки (ГКС). Таким чином, реєстрація ЗВП також репрезентує спосіб електрофізіологічного дослідження функцій ГКС [21-24].

За результатами проведених досліджень відомо, що при глаукомі відзначаються зміни показників ЗВКП, а саме збільшення періоду латентності та зменшення амплітуди. Якщо зміни відбуваються в сітківці або в проведенні сигналу від зорового нерва до кори, буде виявлено зниження амплітуди сигналу. При змінах функції зорового нерва, як при демієлінізуючих захворюваннях, виникає затримка сигналу та подовження латентного періоду [25-27].

Як відомо, в клінічній та науковій практиці при реєстрації короткі зорові стимули можуть подаватися у вигляді спалахів, реверсії шахових паттернів різного розміру у зв'язках з достатньо вираженою їх чутливістю до патологічних змін.

Стимуляція шаховим паттерном має більш стабільні і чутливі показники, але має і деякі недоліки, які унеможливають її використання у лабораторних тварин. Головним з них є необхідність фіксації зору та обов'язкова зосередженість на стимулюючому моніторі тривалий час, на якому демонструється зміна білих квадратів на чорні. Цей метод може бути достовірно використаний тільки у дітей віком від 4 років і дорослих людей.

Викликають також особливий інтерес проведені дослідження ЗВП у лабораторних тварин, результати яких свідчать про зміни показників ЗВП в дослідженні функціонального стану зорового аналізатора при експериментальних моделях глаукоми, а саме подовження тривалості латентного періоду (ЛП) та зниження амплітуди [28-31].

Крім того, електрофізіологічні методи дослідження зорових функцій, а саме ЗВКП, набувають важливого значення не лише для діагностики ранніх глаукомних змін, але й для оцінки ефективності застосування нейропротекторного лікування.

На думку багатьох вчених, нейропротекція при глаукомі спрямована на захист нейронів сітківки та нервових волокон зорового нерва від пошкоджуючої дії патогенетичних агентів [32,33]. Як відомо, існує пряма та непряма нейропротекція. Прямі нейропротектори поділяються на первинні, дія яких спрямована на переривання ранніх процесів ішемічного каскаду (антагоністи NMDA-рецепторів, блокатори кальцієвих каналів), та вторинні, дія яких спрямована на переривання відстрочених механізмів загибелі нейронів (нейротрофіни, антиоксиданти, цитоколіни, цитомедіни). Непряма нейропротекція спрямована на підвищення стійкості різних функціональних систем до зниження перфузійного тиску кисню в тканинах та на усунення різних чинників, що збільшують ризик пошкодження клітин, таких як атеросклероз, зміна реологічних властивостей крові, ангіоспазм [34].

Згідно з багатьма дослідженнями, проведеними на моделях хвороби Паркінсона, розсіяного склерозу та хвороби Альцгеймера як нейродегенеративних захворювань, нейропротекторний потенціал показали мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) [35-39]. Оскільки стовбурові клітини володіють унікальними

властивостями, включаючи здатність до самооновлення і можливість диференціювання в специфічні види клітин в організмі, це робить їх чудовим джерелом клітинної терапії та є підставою щодо їх застосування для регенерації пошкоджених тканин і органів. Крім того, стовбурові клітини або клітини-попередники також секретують нейротрофічні фактори, що перешкоджають втраті клітин [40-42]. Саме тому для лікування глаукомної оптичної нейропатії все більшого поширення набуває клітинна терапія з використанням стовбурових клітин.

Стовбурові клітини (СК) – недиференційовані (незрілі) клітини, наявні у багатьох видів багатоклітинних організмів, що здатні до самовідновлення, утворюючи нові стовбурові клітини, та поділу за допомогою мітозу і диференціюватися в спеціалізовані клітини, тобто перетворення в клітини різних органів і тканин [43]. СК поділяють на види, такі як ембріональні, дорослі або індуковані плюрипотентні стовбурові клітини та класи – це плюрипотентні стовбурові клітини, які здатні породжувати будь-який тип клітини в організмі, але крім тих, які необхідні для підтримки та розвитку плоду в утробі матері, та мультипотентні стовбурові клітини, які здатні породжувати лише невелику кількість різних типів клітин [44].

Мезенхімальні стовбурові клітини (Mesenchymal Stem Cells) являють собою популяцію мультипотентних клітин, здатних диференціюватися в остеобласти, хондроцити і адипоцити. Мезенхімальні стовбурові клітини можна отримати з кісткового мозку, гемопоетичні стовбурові клітини якого в організмі ссавців постійно диференціюються в клітини крові та імунної системи, та з жирової тканин, серед стовбурових клітин якої виявлено в різному ступені попередники адипоцитів. З іншого боку, дорослі клітини можуть бути перепрограмовані за допомогою перенесення ядер або злиття клітин [45,46].

Відкриття мезенхімальних стовбурових клітин з їх несподіваними властивостями створює нову концептуальну схему розвитку клітинних ліній. Однак для розуміння біологічної ролі клітин, їх природи, здатності до диференціювання, їх фізіологічного значення в процесі ембріонального розвитку, постнатального росту,

дозрівання і старіння, а також при захворюваннях людини необхідні подальші міждисциплінарні дослідження [47].

Аналіз результатів досліджень щодо ролі мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин в офтальмології свідчить про потенційну терапевтичну цінність при захворюваннях сітківки та зорового нерва. Відомо, що вони володіють потенціалом до диференціювання в нейроноподібні клітини, гангліонарні клітини сітківки, гліальні та фоторецепторні клітини. Вони здатні до секреції нейротрофічних чинників, таких, як білки нейротрофічного фактору мозку (BDNF) і фактори росту клітин, наприклад, фактор росту нервів (NGF), що забезпечує нові можливості в лікуванні дегенеративних змін сітківки [48].

Проведені дослідження встановили, що стовбурові клітини можуть продовжувати життя фоторецепторів, а також забезпечують терапевтичний ефект при пігментних ретинітах [49,50]. Інші дослідження визначили, що трансплантація клітин покращує морфологічний та функціональний стан сітківки при «сухій» формі вікової макулярної дегенерації [51], а трофічні фактори, або цитокіни, можуть надавати антиангіогенну властивість, яка бере участь у відновленні судинних захворювань очей. Виявлено покращення зорових функцій після субретинальної трансплантації клітин-попередників сітківки, отриманих із ембріональних стовбурових клітин людини (hESC) при моделі вродженого амаврозу Лебера на мишах [52].

Результати інших досліджень свідчили про те, що клітинна терапія з використанням клітин пігментного епітелію сітківки, отриманих з hESC, може бути перспективним способом лікування у пацієнтів із хворобою Штаргардта та віковою атрофічною дегенерацією жовтої плями [53]. Однак питання механізмів впливу трансплантованих клітин на відновлення структури сітківки потребують подальшого вивчення.

Крім того, ряд досліджень свідчать, що МСК мають потенційну терапевтичну цінність у відновленні рогівки, оскільки їм властива протизапальна та моделююча дія, та здатні як пригнічувати відторгнення трансплантата, так і сприяти загоєнню ран рогівки [54]. Також успішне відновлення прозорості рогівки з

диференційованими епітеліальними клітинами спостерігали в дослідженнях на тваринах після трансплантації ембріональних СК [55]. Але перед клінічним використанням МСК повинні бути вирішені питання вибору способу і терміну їх введення, з'ясовано конкретні механізми дії, можливості трансдиференціювання в епітеліальні клітини рогівки, для чого необхідні додаткові експериментальні дослідження *in vitro* та *in vivo*.

Згідно з результатами експериментальних дослідів на лабораторних тваринах з моделлю глаукоми виявилось, що, завдяки виробленню нейротрофінів та імуномодельючих факторів, стовбурові клітини індукують регенерацію ГКС, сприяють відновленню клітин трабекулярної сітки та зниженню запалених процесів сітківки. МСК можуть модулювати функцію клітин трабекулярної сітки паракринним способом і підтримувати цілісність трабекулярної сітки, що дозволяє зменшити внутрішньоочний тиск (ВОТ) [56,57].

Також виявлено, що інтравітреальне введення МСК у щурів з високим ВОТ, моделювання за допомогою лазерної фотокоагуляція трабекулярної сітки, призводить до значного зниження швидкості втрати аксонів ГКС [58].

Результати інших досліджень показали покращення зорових функції та структурних змін сітківки у щурів після трансплантації стовбурових клітин на моделі травматичної оптичної нейропатії. До того ж захисний механізм корелює з постійною секрецією трансплантованими клітинами нейротрофічних факторів BDNF та GDNF *in vivo* з ураженням зорового нерва [59,60].

Отже, метою клітинної терапії з використанням стовбурових клітин в контексті дегенеративних змін сітківки та зорового нерва є відновлення зорових функції за допомогою нейрорегенерації пошкоджених ГКС та їх аксонів.

Одним з найбільш перспективних для використання в офтальмології типів стовбурових клітин є постнатальні мультипотентні стовбурові клітини-похідні нервового гребеня (МСК-ПНГ), а одним з можливих джерел дорослих мСК-ПНГ є волосяний фолікул через мінімальну інвазивність його біопсії.

Нервовий гребінь – транзиторна структура в ході ембріонального розвитку хребетних, яка в дорослому організмі дає широке розмаїття різних

диференційованих клітинних типів – нейрони і глія периферичної нервової системи, меланоцити шкіри, сполучна, хрящова і кісткова тканина в ділянці голови та шиї, деякі ендокринні клітини і т. д. Так, похідними нервового гребеня є, наприклад, ендотелій і строма рогівки. Крім того, в ряді робіт показано, що як *in vitro*, так і після трансплантації *in vivo* мСК-ПНГ здатні трансдиференціювати в клітинні типи, характерні для ЦНС [61-63].

Останніми роками постнатальні мСК-ПНГ були ідентифіковані в цілому ряді тканин і органів дорослих ссавців, включаючи людину. При цьому, крім здатності до самооновлення, постнатальні мСК-ПНГ демонструють здатність до мультилінійної диференціації. Також, окрім можливості прямої інтеграції в ушкоджені тканини, постнатальні мСК-ПНГ можуть реалізовувати свій нейропротекторний та регенеративний потенціал за рахунок паракринної дії – продукуючи широкий спектр нейротрофічних факторів (BDNF, GDNF, нейротрофін 3, нейротрофін 4/5 та NGF) і факторів росту (bFGF) [64].

Сумарно ці властивості роблять постнатальні мСК-ПНГ перспективним клітинним типом для розробки нових методів лікування захворювань сітківки та зорового нерва.

У зв'язку з цим в нашому дослідженні ми зупинилися на культивованих постнатальних мСК-ПНГ з волосяного фолікула вібрисів щурів для оцінки морфофункціональних змін зорового аналізатора після введення клітин різними способами при адреналіновій моделі глаукоми.

3.2. Зміни показників внутрішньоочного тиску у щурів в ході експерименту

При експериментальному дослідженні вимірювання внутрішньоочного тиску проводилося на першому етапі у всіх п'яти групах тварин до моделювання глаукоми. Також проведено вимірювання ВОТ після введення адреналіну та через 1 місяць після моделювання глаукоми, що відповідає другому та третьому етапам вимірювання. На четвертому етапі було проведено вимірювання ВОТ через 1 місяць після введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ.

Аналіз отриманих даних показав, що на першому етапі вимірювання у всіх п'яти групах значення ВОТ не відрізнялися ($p=0,490$ за критерієм Крускала-Уолліса). Після моделювання глаукоми, за результатами аналізу (відмінність статистично значима, $p<0,001$), можна зробити висновок, що виявлено підвищення ВОТ у чотирьох групах у порівнянні з групою інтактних тварин, а саме: у групі I середнє значення ВОТ склало $20,2\pm 1,51$ мм рт. ст. ($<0,001$), у групі II – $20,6\pm 1,64$ мм рт. ст. ($<0,001$), у групі III – $20,9\pm 1,62$ мм рт. ст. ($<0,001$) та у групі IV середнє значення ВОТ становило $21,05\pm 1,54$ мм рт. ст. ($<0,001$). Також потрібно відзначити, що на другому етапі вимірювання ВОТ не виявлено статистично значимої відмінності між групами з адреналіновою моделлю глаукоми (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Величина ВОТ на різних етапах вимірювання, мм рт. ст., $\bar{x}\pm SD$

Етапи вимірювання	ГрК (n=20)	ГрI (n=20)	ГрII (n=20)	ГрIII (n=20)	ГрIV (n=20)	Рівень значущості відмінності, p
I	$7,3\pm 0,92$	$7,65\pm 1,09$	$7,45\pm 0,89$	$7,5\pm 1,05$	$7,1\pm 0,85$	0,490
II	$7,7\pm 0,98^{1234}$	$20,2\pm 1,51^0$	$20,6\pm 1,64^0$	$20,9\pm 1,62^0$	$21,05\pm 1,54_0$	$<0,001$
III	$7,8\pm 0,95^{1234}$	$20,9\pm 1,55^0$	$21,7\pm 1,34^0$	$21,45\pm 1,19^0$	$21,8\pm 1,51^0$	$<0,001$
IV	$7,55\pm 1,05^{123}_4$	$22,05\pm 2,06_0$	$21,9\pm 1,97^0$	$20,7\pm 1,53^0$	$20,8\pm 1,36^0$	$<0,001$

Примітки: при проведенні порівняння між групами використано критерій Крускала-Уолліса, для постеріорних порівнянь використано критерій Данна:

- ⁰ – відмінність від ГрК статистично значима, $p<0,05$;
- ¹ – відмінність від ГрI статистично значима, $p<0,05$;
- ² – відмінність від ГрII статистично значима, $p<0,05$;
- ³ – відмінність від ГрIII статистично значима, $p<0,05$;
- ⁴ – відмінність від ГрIV статистично значима, $p<0,05$.

При аналізі динаміки показника ВОТ у інтактних тварин не виявлено статистично значимої зміни показника ($p=0,473$ за критерієм Фрідмана).

На рисунку 3.1 відображено статистично значущу зміну показника VOT у групах I, II, III та IV ($p < 0,001$ за критерієм Фрідмана). При цьому на другому етапі вимірювання після моделювання глаукоми спостерігали збільшення показника VOT ($p < 0,05$) у порівнянні з першим вимірюванням. Потрібно відзначити, що у групі I на четвертому етапі вимірювання спостерігали збільшення показника VOT ($p < 0,05$) у порівнянні з третім етапом вимірювання. Отже, тривале введення адреналіну викликає стійке підвищення VOT (у три рази) у дослідних групах тварин в порівнянні з інтактними тваринами.

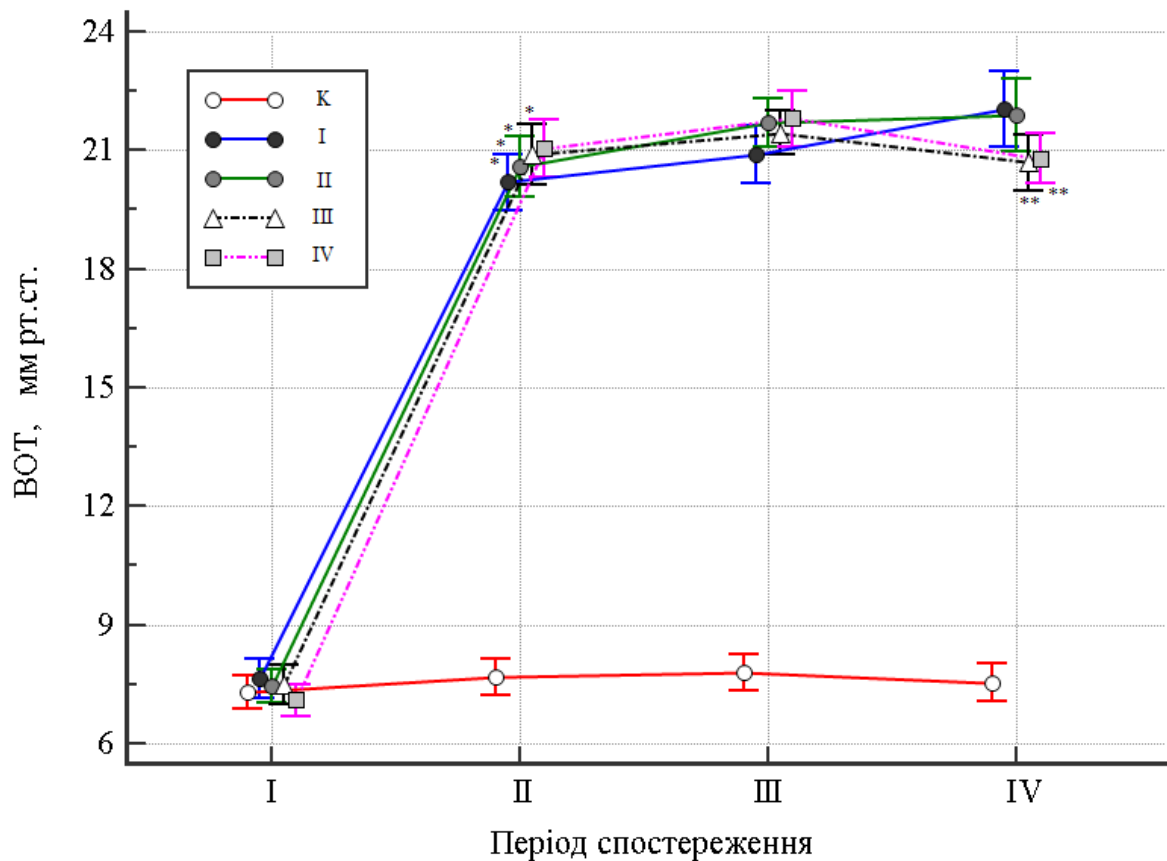


Рис. 3.1. Динаміка показника VOT у досліджуваних групах на всіх етапах вимірювання. Зазначене середнє значення та 95% ВІ. * – відмінність від групи інтактних тварин ($p < 0,001$). ** – відмінність від групи тварин з моделлю глаукоми без введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ ($p < 0,05$)

При аналізі отриманих даних особливо цікавою є відмінність показника VOT у групах дослідних тварин (I, II, III та IV) між третім та четвертим етапами

вимірювання, що відображає ефективність лікування. Так, для тварин групи I у ці періоди відбулося підвищення ($p < 0,05$) величини VOT в середньому на 1,2 мм рт. ст. (95% ВІ 0,4 мм рт. ст. \pm 1,9 мм рт. ст.). При цьому для тварин групи II у дані періоди не виявлено зміни показника VOT ($p > 0,05$), відмінність не відрізнялася від 0 і становила в середньому 0,2 мм рт. ст. (95% ВІ -0,6 мм рт. ст. \pm 1,0 мм рт. ст.). У той же час для тварин групи III у ці періоди відбулося зниження ($p < 0,05$) величини VOT, зміна становила -0,8 мм рт. ст. (95% ВІ -1,3 мм рт. ст. \pm 0,2 мм рт. ст.), та для тварин групи IV у ці періоди також відбулося зниження ($p < 0,05$) величини VOT, зміна становила -1,0 мм рт. ст. (95% ВІ -1,6 мм рт. ст. \pm 0,4 мм рт. ст.).

Таким чином, можна вважати, що клітинна терапія з використанням культивованих постнатальних мСК-ПНГ має тенденцію до позитивного впливу на величину VOT. Встановлено, що ефективність клітинної терапії (зниження VOT) при парабульбарній та ретробульбарній доставці клітин є кращою ($p < 0,05$) ніж при внутрішньовенному введенні клітин.

Однак, необхідні подальші дослідження механізмів впливу культивованих постнатальних мСК-ПНГ на зміни VOT при адреналіновій моделі глаукоми, оскільки в нашій роботі ми не проводили гістологічних досліджень структур переднього відрізка ока.

3.3. Зміни показників зорових викликаних потенціалів після адреналінової моделі глаукоми та введення культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня

В рамках експериментального дослідження ми проводили вивчення впливу культивованих постнатальних мСК-ПНГ на показники зорових викликаних потенціалів при адреналіновій моделі глаукоми для п'яти груп лабораторних тварин в чотири періоди вимірювання.

У перший період вимірювання проводили визначення ЗВП на спалах в п'яти групах лабораторних тварин до моделювання глаукоми (К, I, II, III та IV); в другий період вимірювання проводили визначення ЗВП на спалах в чотирьох групах лабораторних тварин після моделювання глаукоми (I, II, III, IV) та лабораторних

тварин, які склали групу контролю – інтактні тварини (група К); в третій період вимірювання проводили визначення ЗВП на спалах в групі лабораторних тварин після моделювання глаукоми (група І) та в групах лабораторних тварин через 1 місяць після введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ наступними способами: внутрішньовенно (група ІІ), парабульбарно (група ІІІ), ретробульбарно (група ІV), а також інтактним тваринам (група К); в четвертий період вимірювання проводили визначення ЗВП на спалах в групі лабораторних тварин після моделювання глаукоми (група І) без введення клітин та в групах лабораторних тварин через 3 місяці після введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ різними способами, а саме внутрішньовенно (група ІІ), парабульбарно (група ІІІ), ретробульбарно (група ІV) та інтактним тваринам (група К).

Отримані значення показників ЗВП на спалах для п'яти груп щурів в різні періоди вимірювання представлені в таблицях 3.2-3.5.

Аналіз показника латентного періоду N1 показав його збільшення в групах тварин після моделювання глаукоми при другому вимірюванні ЗВП на спалах в порівнянні з першим вимірюванням (табл. 3.2). Для гурпи ІІ, ІІІ, ІV через 1 місяць після введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ, тобто в третій період вимірювання, була помітна тенденція до зменшення показника ЛПН1. Проте показник ЛПН1 залишався більшим, ніж в перший період вимірювання. В четвертий період вимірювання було відзначено тенденцію до зменшення показника ЛПН1 у порівнянні з третім періодом вимірювання (табл. 3.2).

При проведенні аналізу другого, третього та четвертого періодів вимірювання значення показника ЛПН1 в групі І було вищим, ніж у групі інтактних тварин та в групах ІІ, ІІІ, ІV.

Для групи контролю виявлено статистично значиме зниження показника ЛПН1 ($p=0,02$) від першого до третього періоду вимірювання в середньому на 0,4 мс (95% ВІ 0,2 мс – 0,6 мс), та незначне підвищення показника ЛПН1 в четвертий період вимірювання у порівнянні з другим та третім періодами вимірюваннями. Тоді як для групи тварин з моделлю глаукоми без введення клітин виявлено статистично

значиме зростання показника ЛПН1 ($p < 0,001$) від першого до четвертого періоду вимірювання, в середньому, на 2,0 мс.

Таблиця 3.2

Електрофізіологічні показники латентного періоду ЗВП на спалах за параметром N1 в групах експериментальних тварин, ЛПН1, мс, Me ($Q_I - Q_{III}$)

Період	ГрК (n=20)	ГрI (n=20)	ГрII (n=20)	ГрIII (n=20)	ГрIV (n=20)	Рівень значущості відмінності між групами, p
I	59,7 ^{3,4} (56,2–60,2)	59,55 ^{3,4} (58,4–60,35)	57,4 ⁴ (56,5–58,1)	56,1 ^{0,1} (55,3–56,85)	55,35 ^{0,1,2} (54,3–56,4)	<0,001
II	59,15 ¹ (56,0–60,15)	60,75 ^{0,3,4} (59,3–62,25)	59,35 ⁴ (58,4–60,2)	58,3 ¹ (57,85–58,9)	57,8 ^{1,2} (56,2–58,35)	<0,001
III	59,2 ^{1,2} (56,0–59,7)	61,25 ^{0,3,4} (59,75–62,4)	59 ^{0,4} (57,85–59,7)	57,3 ¹ (56,5–57,9)	56,45 ^{1,2} (54,95–57,2)	<0,001
IV	59,4 (56,9–59,8)	61,7 ^{2,3,4} (59,5–62,8)	58,55 ¹ (56,0–59,4)	57,15 ¹ (56,7–58,0)	56,55 ¹ (56,2–56,9)	0,001

Примітки: При проведенні порівняння використано критерій Крускала–Уолліса, для проведення постеріорних порівнянь використано критерій Данна.

⁰ – відмінність від ГрК статистично значима, $p < 0,05$;

¹ – відмінність від ГрI статистично значима, $p < 0,05$;

² – відмінність від ГрII статистично значима, $p < 0,05$;

³ – відмінність від ГрIII статистично значима, $p < 0,05$;

⁴ – відмінність від ГрIV статистично значима, $p < 0,05$.

При проведенні аналізу динаміки показника ЛПН1 для груп тварин з моделлю глаукоми та після введенням культивованих постнатальних мСК-ПНГ (рис. 3.2) виявлено статистично значиму зміну показника ($p < 0,001$). При цьому для гурпи II від

першого до другого періоду вимірювання відбувається зростання показника ЛПН1 ($p < 0,05$) в середньому на 1,8 мс (95% ВІ 1,3 мс – 2,2 мс), для групи III – зростання показника ЛПН1 ($p < 0,05$) від першого до другого періоду вимірювання в середньому на 2,2 мс (95% ВІ 1,85 мс – 2,6 мс) та групи IV – від першого до другого періоду вимірювання відбувається зростання показника ($p < 0,05$) в середньому на 1,95 мс (95% ВІ 1,65 мс – 2,4 мс).

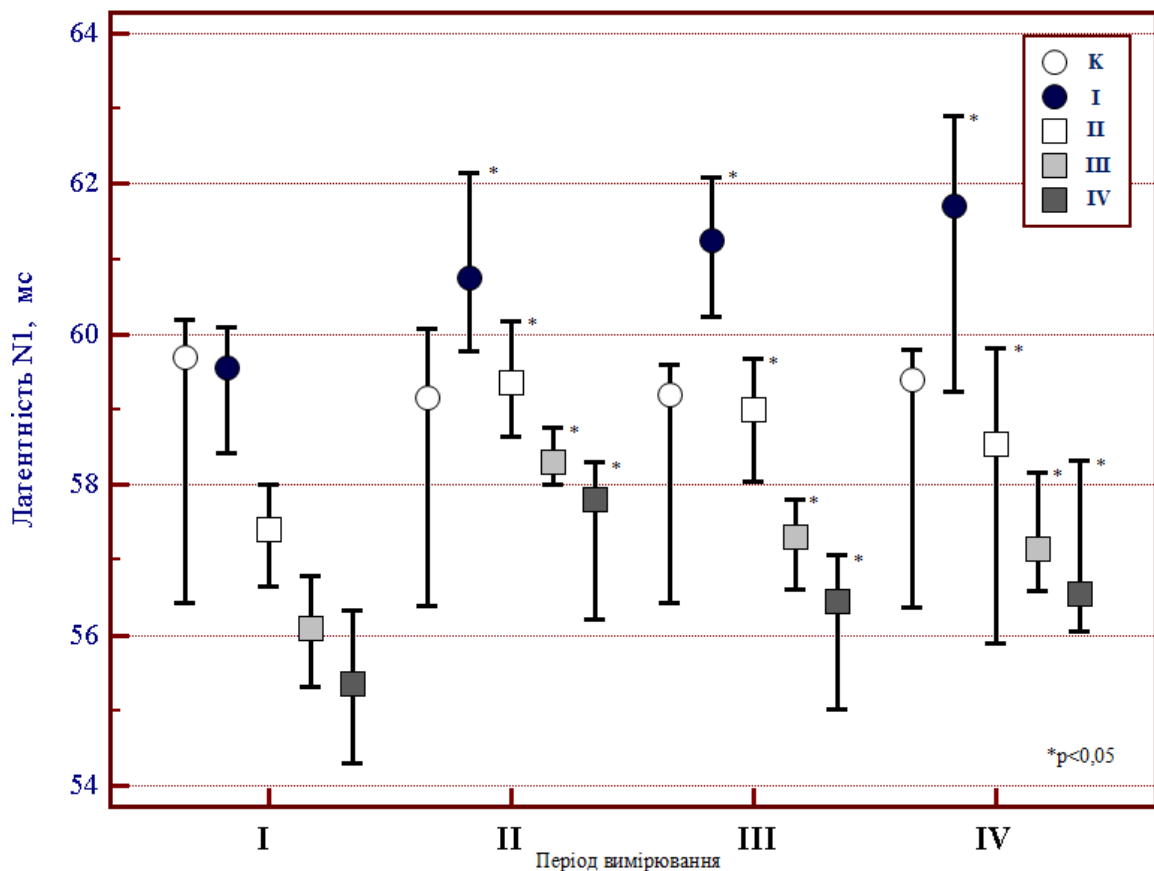


Рис. 3.2. Аналіз динаміки показника ЛПН1 в п'яти групах, наведено медіанне значення та 95% ВІ. При проведенні аналізу динаміки показника ЛПН1 використано критерій Фрідмана. * – відмінність у порівнянні з відповідною групою у період вимірювання до моделювання глаукоми статистично значима $p < 0,05$

Через 1 та 3 місяці після введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ від другого до четвертого періоду вимірювання відмічено позитивну динаміку до зниження ЛПН1 (рис. 3.2), а саме: в групі тварин з внутрішньовенним введенням

клітин відбувається зниження показника ЛПН1 ($p < 0,05$) в середньому на 0,85 мс (95% ВІ 0,6 мс – 1,1 мс), в групі тварин з парабульбарним введенням клітин – зниження показника ЛПН1 ($p < 0,05$) в середньому на 1,5 мс (95% ВІ 1,3 мс – 1,7 мс) та в групі тварин з ретробульбарним введенням клітин – зниження показника ($p < 0,05$) в середньому на 1,75 мс (95% ВІ 1,5 мс – 1,95 мс).

При проведенні аналізу виявлено, збільшення латентного періоду за параметром N1 у групі тварин з моделлю глаукоми без введення клітин у порівнянні з групою контролю. Тоді як у групах тварин після введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ відмічено тенденцію до зниження латентного періоду за параметром N1 при всіх способах доставки, проте позитивна динаміка зменшення показника ЛПН1 найбільш виражена при парабульбарному та ретробульбарному введенні культивованих постнатальних мСК-ПНГ.

При проведенні аналізу показника латентного періоду P2 (табл. 3.3) відзначено його збільшення в групах тварин після моделювання глаукоми в другому періоді вимірюванні ЗВП на спалах у порівнянні з першим вимірюванням, а саме: в групі I показник ЛПР2 становив 82,1 мс (81,85 мс – 84,05 мс), в групі II – 82,6 мс (82,0 мс – 83,0 мс), в групі III – 81,05 мс (79,25 мс – 82,5 мс) та в групі IV – 81,1 мс (78,75 мс – 81,85 мс). Тоді як в перший період вимірювання показник ЛПР2 в групі I становив 80,8 мс (80,35 мс – 81,95 мс), в групі II – 80,5 мс (80,15 мс – 81,2 мс), в групі III – 78,75 мс (77,0 мс – 80,0 мс) та в групі IV – 78,5 (76,15 мс – 79,8 мс).

Через місяць після введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ, тобто в третій період вимірювання, для групи II, III, IV була помітна тенденція до зменшення показника ЛПР2, середнє значення показника склало 82,05 мс (81,45 мс – 82,35 мс), 80,15 мс (78,2 мс – 81,5 мс) та 79,55 мс (77,3 мс – 80,45 мс) відповідно. Однак показник ЛПР2 залишався більшим, ніж в перший період вимірювання.

Після четвертого вимірювання було відзначено незначне зменшення показника ЛПР2, який склав для групи II – 81,2 мс (81,0 мс – 81,8 мс), для групи III – 80,75 мс (80,3 мс – 82,2 мс) та групи IV – 79,45 мс (78,9–81,4) у порівнянні з третім періодом вимірювання (табл. 3.3).

Крім того, при проведенні аналізу другого, третього та четвертого періодів вимірювання значення показника ЛПР2 в групі I було вищим, ніж у групі контролю та в II, III, IV групах тварин.

Таблиця 3.3

Електрофізіологічні показники латентного періоду ЗВП на спалах за параметром P2 в групах експериментальних тварин, ЛПР2, мс, Me (Q_I – Q_{III})

Період	ГрК (n=20)	ГрI (n=20)	ГрII (n=20)	ГрIII (n=20)	ГрIV (n=20)	Рівень значущості відмінності між групами, p
I	79,8 ¹ (78,75–80,25)	80,8 ^{0,3,4} (80,35–81,95)	80,5 ^{3,4} (80,15–81,2)	78,75 ^{1,2} (77,0–80,0)	78,5 ^{1,2} (76,15–79,8)	<0,001
II	79,6 ^{1,2} (78,4–80,1)	82,1 ⁰ (81,85–84,05)	82,6 ⁰ (82,0–83,0)	81,05 (79,25–82,5)	81,1 (78,75–81,85)	<0,001
III	79,55 ^{1,2} (78,65–79,8)	82,4 ^{0,3,4} (81,9–84,25)	82,05 ^{0,4} (81,45–82,35)	80,15 ¹ (78,2–81,5)	79,55 ^{1,2} (77,3–80,45)	<0,001
IV	79,45 ¹ (78,8–79,9)	82,9 ^{0,4} (82,4–83,1)	81,2 (81,0–81,8)	80,75 (80,3–82,2)	79,45 ¹ (78,9–81,4)	<0,001

Примітки: При проведенні порівняння використано критерій Крускала–Уолліса, для проведення постеріорних порівнянь використано критерій Данна.

⁰ – відмінність від ГрК статистично значима, p<0,05;

¹ – відмінність від ГрI статистично значима, p<0,05;

² – відмінність від ГрII статистично значима, p<0,05;

³ – відмінність від ГрIII статистично значима, p<0,05;

⁴ – відмінність від ГрIV статистично значима, p<0,05.

На рисунку 3.3 представлені отримані дані щодо динаміки змін показника ЛПР2. Протягом чотирьох періодів вимірювання не виявлено зміни показника ЛПР2

($p=0,31$) у групі контролю. Для групи тварин з моделлю глаукоми без введення клітин виявлено статистично значиме збільшення показника ЛПР2 ($p<0,001$) в другий період вимірювання та поступове зростання в третьому, четвертому періодах вимірювання в середньому на 1,7 мс (95% ВІ 1,1 мс – 2,7 мс).

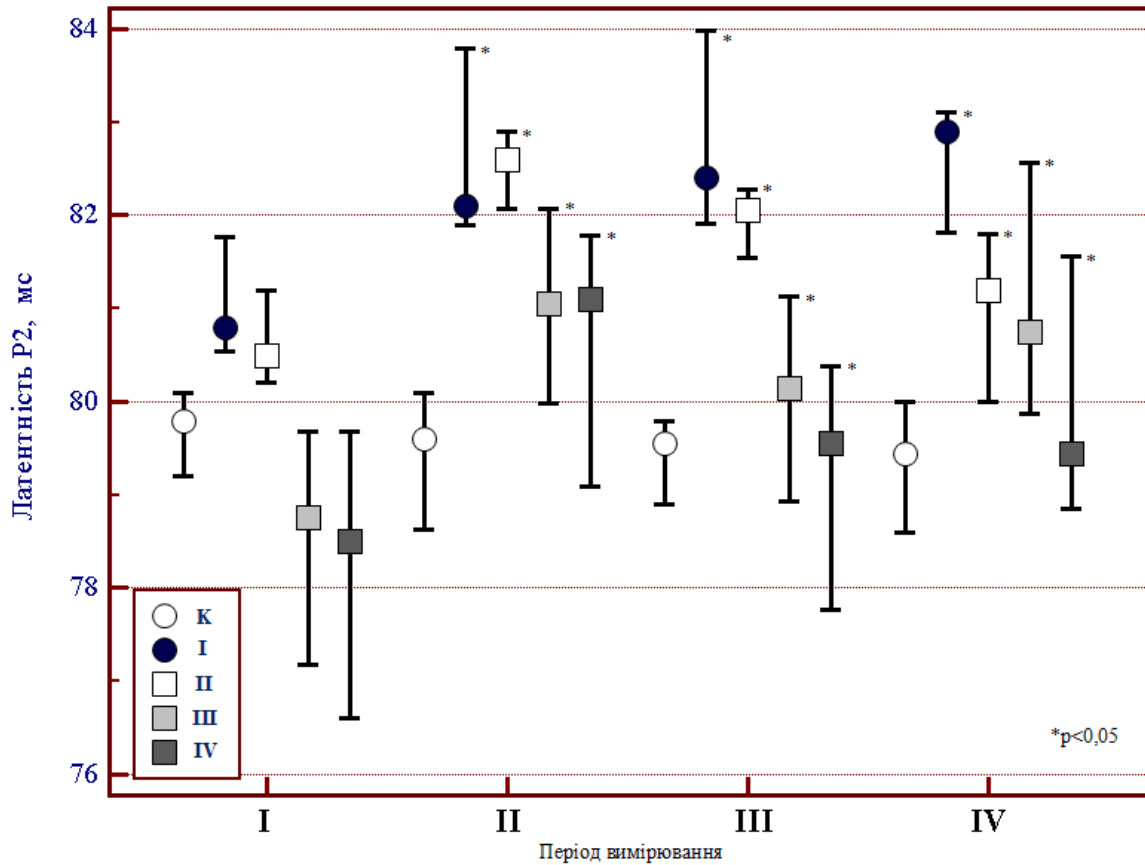


Рис. 3.3. Аналіз динаміки показника ЛПР2 в п'яти групах, наведено медіанне значення та 95% ВІ. При проведенні аналізу динаміки показника ЛПР2 використано критерій Фрідмана. * – відмінність у порівнянні з відповідною групою у період вимірювання до моделювання глаукоми статистично значима $p<0,05$

При проведенні аналізу динаміки показника ЛПР2 для груп тварин після введенням культивованих постнатальних мСК-ПНГ (рис. 3.3) виявлено статистично значиму зміну показника ($p<0,001$). При цьому для групи II від першого до другого періоду вимірювання відбувається зростання показника ЛПР2 ($p<0,05$) в середньому на 2,0 мс (95% ВІ 1,3 мс – 2,5 мс), для групи III – від першого до другого періоду вимірювання відбувається зростання показника ЛПР2 ($p<0,05$) в середньому на 2,3 мс

(95% ВІ 1,95 мс – 2,75 мс) та групи IV – від першого до другого періоду вимірювання відбувається зростання показника ЛПР2 ($p < 0,05$) в середньому на 2,4 мс (95% ВІ 1,9 мс – 2,95 мс).

Крім того, від другого до четвертого періоду вимірювання через 1 та 3 місяці після введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ різними способами (рис. 3.3), ми спостерігали позитивну динаміку до зниження ЛПР2, а саме, при внутрішньовенному введенні клітин відбувається зниження показника ЛПР2 ($p < 0,05$) в середньому на 1,3 мс (95% ВІ 0,8 мс – 2,0 мс), при парабульбарному введенні клітин відбувається зниження показника ЛПР2 ($p < 0,05$) в середньому на 1,4 мс (95% ВІ 0,95 мс – 2,0 мс) та при ретробульбарному введенні клітин відбувається зниження показника ЛПР2 ($p < 0,05$) в середньому на 2,15 мс (95% ВІ 1,8 мс – 2,5 мс).

Таким чином, аналіз показників латентного періоду за параметром Р2 показав його збільшення у групі тварин з моделлю глаукоми без введення клітин в другому періоді вимірювання та подальше збільшення в третьому, четвертому періодах вимірювання у порівнянні з групою контролю в усі періодах вимірювання. Тоді як у групах тварин після введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ в третьому та четвертому періодах вимірювання відмічено зниження латентного періоду за параметром Р2 при всіх способах доставки, проте позитивна динаміка зменшення показника ЛПР2 більш виражена при парабульбарному та ретробульбарному введенні культивованих постнатальних мСК-ПНГ.

При проведенні аналізу показника амплітуди Р1-Н1 відзначено її зменшення в групах тварин після моделювання глаукоми при другому вимірюванні ЗВП на спалах в порівнянні з першим вимірюванням (табл. 3.4).

У групах II, III та IV через 1 місяць після введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ, тобто в третій період вимірювання, була помітна позитивна динаміка до збільшення амплітуди Р1-Н1, а середнє значення показника склало 10,6 мкВ (9,705 мкВ – 10,85 мкВ), 12,25 мкВ (11,6 мкВ – 13,05 мкВ) та 11,5 мкВ (10,4 мкВ – 12,65 мкВ) відповідно. Однак показник амплітуди Р1-Н1 залишався більшим, ніж в перший період вимірювання. Крім того, через 3 місяці після введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ, в четвертий період вимірювання, амплітуда Р1-Н1 мала

покращення і становила для групи II – 11,3 мкВ (10,5 мкВ – 12,1 мкВ), для групи III – 12,25 мкВ (11,4 мкВ – 13,3 мкВ) та групи IV – 12,45 мкВ (10,4 мкВ – 13,3 мкВ), в порівнянні з третім періодом вимірювання.

Таблиця 3.4

Електрофізіологічні показники амплітуди ЗВП на спалах за параметром P1-N1 в групах експериментальних тварин, мкВ, Ме (Q_I – Q_{III})

Період	ГрК (n=20)	ГрI (n=20)	ГрII (n=20)	ГрIII (n=20)	ГрIV (n=20)	Рівень значущості відмінності між групами, p
I	14,45 (12,8–15,05)	12,9 (10,01–14,5)	12,5 (12,15–14,4)	14,25 (13,2–15,2)	13,25 (12,05–14,65)	0,07
II	14,65 ^{1,2,3,4} (13,2–15,4)	10,35 ⁰ (8,555–11,4)	10,1 ⁰ (9,34–10,55)	11,35 ⁰ (10,65–12,05)	10,3 ⁰ (9,26–11,55)	<0,001
III	14,5 ^{1,2,3,4} (13,2–15,25)	10,1 ^{0,3,4} (8,15–10,85)	10,6 ^{0,3} (9,705–10,85)	12,25 ^{0,1,2} (11,6–13,05)	11,5 ^{0,1} (10,4–12,65)	<0,001
IV	14,25 ^{1,2} (12,8–14,8)	9,925 ^{0,3,4} (9,38–10,4)	11,3 ⁰ (10,5–12,1)	12,25 ¹ (11,4–13,3)	12,45 ¹ (10,4–13,3)	<0,001

Примітки: При проведенні порівняння між групами використано ANOVA та для проведення постеріорних порівнянь використано критерій Шеффе (у випадку нормального закону розподілу); критерій Крускала–Уолліса та для проведення постеріорних порівнянь використано критерій Данна (у випадку закону розподілу відмінного від нормального).

⁰ – відмінність від ГрК статистично значима, p<0,05;

¹ – відмінність від ГрI статистично значима, p<0,05;

² – відмінність від ГрII статистично значима, p<0,05;

³ – відмінність від ГрIII статистично значима, p<0,05;

⁴ – відмінність від ГрIV статистично значима, p<0,05.

При проведенні аналізу другого, третього та четвертого періодів вимірювання спостерігали зменшення показника амплітуди P1-N1 в групі I, який був нижчим, ніж у групі контролю та в групах II, III, IV (табл. 3.4).

При проведенні аналізу динаміки показника амплітуди P1-N1 використано критерій Фрідмана.

Аналіз даних показав (рис. 3.4) статистично значиму зміну показника амплітуди P1-N1, при цьому відмічалось збільшення амплітуди P1-N1 ($p < 0,05$) в середньому на 0,9 мкВ (95% ВІ 0,6 мкВ – 1,3 мкВ) при внутрішньовенному введенні культивованих постнатальних мСК-ПНГ від другого до четвертого періоду вимірювання; при парабульбарному введенні культивованих постнатальних мСК-ПНГ – збільшення показника ($p < 0,05$) в середньому на 1,5 мкВ (95% ВІ 1,2 мкВ – 1,6 мкВ) від другого до четвертого періоду вимірювання; при ретробульбарному введенні культивованих постнатальних мСК-ПНГ – зростання показника ($p < 0,05$) в середньому на 1,5 мкВ (95% ВІ 1,2 мкВ – 1,6 мкВ) від другого до четвертого періоду вимірювання.

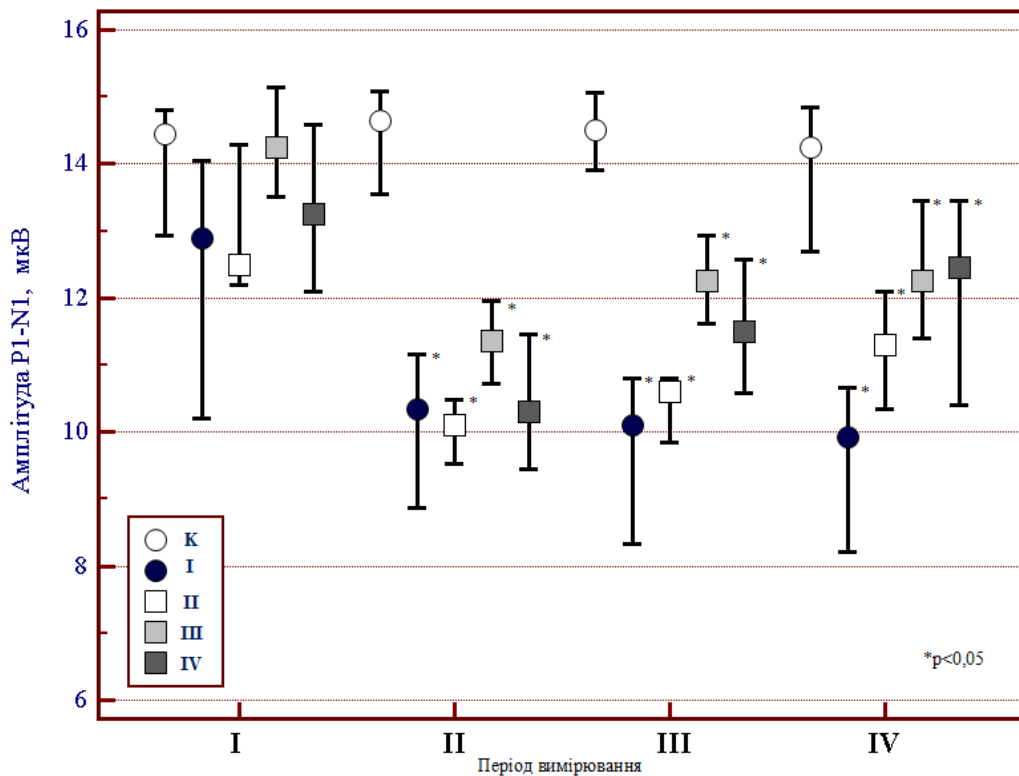


Рис. 3.4. Аналіз динаміки показника амплітуди P1-N1 в п'яти групах, наведено медіанне значення та 95%ВІ. * – відмінність у порівнянні з відповідною групою у період вимірювання до моделювання глауками статистично значима $p < 0,05$

Проте найбільш виражена позитивна динаміка була помітна при введенні культивованих постнатальних мСК-ПНГ папабульбарно в третьому періоді вимірювання та ретробульбарно в четвертому періоді вимірювання, ніж у групах тварин з внутрішньовенним введенням та без введення клітин. Проте показник амплітуди P1-N1 залишався більшим, ніж в перший період вимірювання.

Тоді як групі тварин з моделлю глаукоми без введення клітин від першого до другого періоду вимірювання відбувається зниження показника амплітуди P1-N1 ($p < 0,05$) в середньому на 2,3 мкВ (95% ВІ 1,8 мкВ – 2,9 мкВ) та подальше зниження показника ($p < 0,05$) в середньому на 0,6 мкВ (95% ВІ 0,2 мкВ – 0,8 мкВ) від другого до четвертого періоду вимірювання, що свідчить про зміни функціонального стану зорового аналізатора при адреналіновій моделі глаукоми.

Потрібно відзначити, що у групі контролю не виявлено зміни показника амплітуди P1-N1 (рис. 3.4) на протязі чотирьох періодів вимірювання ($p = 0,42$).

Результати аналізу показали, що через 1 та 3 місяці після введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ відзначалася позитивна динаміка та покращення функціональних показників у групах тварин з моделлю глаукоми, що підтверджувало покращення електрофізіологічних показників при всіх способах доставки, проте позитивна динаміка найбільш виражена при парабульбарному та ретробульбарному введенні культивованих постнатальних мСК-ПНГ ($p < 0,05$) [65].

При проведенні аналізу показника амплітуди N1-P2 (табл. 3.5) відзначено її зменшення в групах тварин після моделювання глаукоми при другому вимірюванні ЗВП на спалах в порівнянні з першим вимірюванням, а саме: в групі I показник амплітуди N1-P2 склав 12,3 мкВ (11,65 мкВ – 13,45 мкВ), в групі II – 11,7 мкВ (10,65 мкВ – 12,4 мкВ), в групі III – 12,35 мкВ (11,6 мкВ – 13,3 мкВ) та в групі IV – 12,2 мкВ (11,2 мкВ – 12,7 мкВ). Тоді як в перший період вимірювання показник амплітуди N1-P2 в групі I становив 14,65 мкВ (13,85 мкВ – 16,15 мкВ), в групі II – 14,8 мкВ (14,15 мкВ – 15,3 мкВ), в групі III – 15,8 мкВ (14,4 мкВ – 16,35 мкВ) та в групі IV – 15,1 мкВ (13,95 мкВ – 16,0 мкВ).

Таблиця 3.5

**Електрофізіологічні показники амплітуди ЗВП на спалах за параметром N1-P2
в групах експериментальних тварин, мкВ, Ме (Q_I – Q_{III})**

Період	ГрК (n=20)	ГрI (n=20)	ГрII (n=20)	ГрIII (n=20)	ГрIV (n=20)	Рівень значущості відмінності між групами, p
I	15 (14,1– 15,65)	14,65 (13,85– 16,15)	14,8 (14,15– 15,3)	15,8 (14,4– 16,35)	15,1 (13,95– 16,0)	0,32
II	14,95 ^{1,2,3,4} (14,25– 15,9)	12,3 ⁰ (11,65– 13,45)	11,7 ⁰ (10,65– 12,4)	12,35 ⁰ (11,6–13,3)	12,2 ⁰ (11,2–12,7)	<0,001
III	15,15 ^{1,2,3,4} (14,1– 15,95)	11,95 ⁰ (11,3–12,7)	12 ^{0,3,4} (11,2–12,9)	13,3 ^{0,2} (12,7–14,3)	13,55 ^{0,2} (12,6– 14,15)	<0,001
IV	15,5 ¹ (13,2–15,9)	10,85 ^{0,3,4} (10,1–11,2)	12,9 (12,4–13,5)	13,95 ¹ (13,5–15,0)	14,35 ¹ (13,8–14,9)	<0,001

Примітки: При проведенні порівняння використано критерій Крускала–Уолліса, для проведення постеріорних порівнянь використано критерій Данна.

⁰ – відмінність від ГрК статистично значима, p<0,05;

¹ – відмінність від ГрI статистично значима, p<0,05;

² – відмінність від ГрII статистично значима, p<0,05;

³ – відмінність від ГрIII статистично значима, p<0,05;

⁴ – відмінність від ГрIV статистично значима, p<0,05.

У групах II, III та IV через місяць після введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ, тобто в третій період вимірювання, була помітна позитивна динаміка до збільшення амплітуди N1-P2, а середнє значення показника склало 12 мкВ (11,2 мкВ – 12,9 мкВ), 13,3 мкВ (12,7 мкВ – 14,3 мкВ) та 13,55 мкВ (12,6 мкВ – 14,15 мкВ) відповідно. Проте показник амплітуди N1-P2 залишався більшим, ніж в перший період вимірювання. Крім того, в четвертий період вимірювання було відмічено

збільшення амплітуди N1-P2, яка становила для групи II – 12,9 мкВ (12,4 мкВ – 13,5 мкВ), для групи III – 13,95 мкВ (13,5 мкВ – 15,0 мкВ) та групи IV – 14,35 мкВ (13,8 мкВ – 14,9 мкВ), у порівнянні з третім періодом вимірювання (табл. 3.5).

Результати свідчили, що показник амплітуди N1-P2 в другому, третьому та четвертому періодах вимірювання зменшився в групі I та був нижчим, ніж у групі контролю та в групах II, III, IV.

При проведенні аналізу динаміки показника амплітуди N1-P2 (рис. 3.5) використано критерій Фрідмана та виявлено статистично значиму зміну показника ($p < 0,001$).

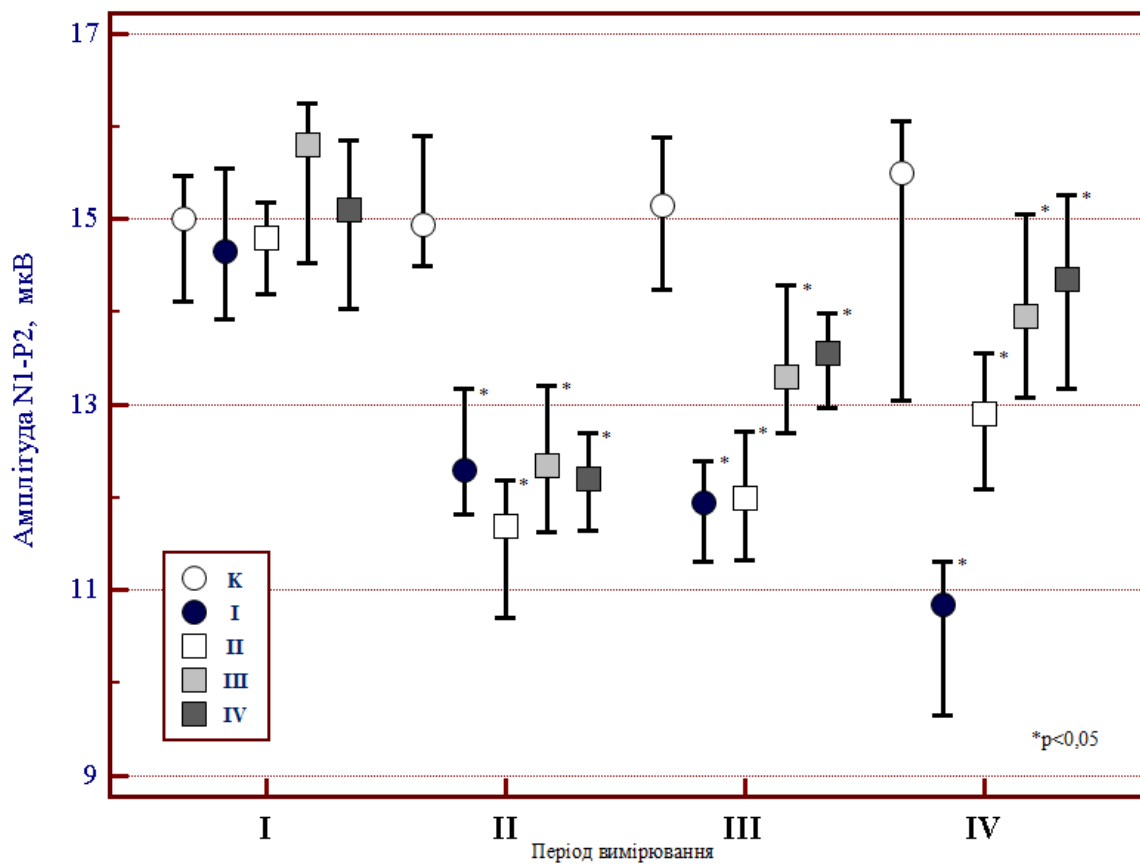


Рис. 3.5. Аналіз динаміки показника амплітуди N1-P2 в п'яти групах, наведено медіанне значення та 95%ВІ. * – відмінність у порівнянні з відповідною групою у період вимірювання до моделювання глаукоми статистично значима $p < 0,05$

В результаті проведених досліджень відзначалося збільшення амплітуди N1-P2 ЗВП на спалах від другого до четвертого періоду вимірювання, а саме: при

внутрішньовенному введенні клітин відбувається невелике зростання показника ($p < 0,05$) в середньому на 0,8 мкВ (95% ВІ 0,55 мкВ – 1,0 мкВ); при парабульбарному введенні клітин – зростання показника ($p < 0,05$) в середньому на 1,75 мкВ (95% ВІ 1,6 мкВ – 1,85 мкВ); при ретробульбарному введенні клітин відбувається зростання показника ($p < 0,05$) в середньому на 2,1 мкВ (95% ВІ 1,8 мкВ – 2,2 мкВ), у порівнянні з другим періодом вимірювання. Однак показник амплітуди N1-P2 залишається більшим, ніж в перший період вимірювання.

Тоді як у групі тварин з моделлю глаукоми без введення клітин від першого до другого періоду вимірювання відбувається зниження показника амплітуди N1-P2 ($p < 0,05$) в середньому на 2,4 мкВ (95% ВІ 2,1 мкВ – 2,7 мкВ) та відмічено подальше зниження показника ($p < 0,05$) в середньому на 1,4 мкВ (95% ВІ 0,8 мкВ – 2,1 мкВ), від другого до четвертого періоду вимірювання, а також від першого до другого періоду вимірювання в групі II відбувається зниження показника ($p < 0,05$) в середньому на 2,9 мкВ (95% ВІ 2,4 мкВ – 3,45 мкВ), в групі III – зниження показника ($p < 0,05$) в середньому на 3,05 мкВ (95% ВІ 2,8 мкВ – 3,35 мкВ) та в групі IV – зниження показника ($p < 0,05$) в середньому на 2,9 мкВ (95% ВІ 2,5 мкВ – 3,2 мкВ), що свідчить про зміни функціонального стану зорового аналізатора при адреналіновій моделі глаукоми (рис. 3.5).

Варто зазначити, що у групі контролю при проведенні аналізу за критерієм Фрідмана не виявлено зміни показника протягом чотирьох періодів вимірювання ($p = 0,23$).

Отже, виявлене збільшення амплітуди ЗВП на спалах є свідченням покращення функціональної стану зорового аналізатора. Показники амплітуди N1-P2 збільшились на тлі введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ при парабульбарному та ретробульбарному введенні клітин ($p < 0,05$) [66].

Резюме до розділу 3

Отже, за результатами аналізу (відмінність статистично значима, $p < 0,001$), можна зробити висновок, що адреналінова модель глаукоми призводить до хронічного підвищення внутрішньоочного тиску. У чотирьох групах у порівнянні з

групою контролю відмічено підвищення внутрішньоочного тиску: у групі I середнє значення склало $20,2 \pm 1,51$ мм рт. ст. ($<0,001$), у групі II – $20,6 \pm 1,64$ мм рт. ст. ($<0,001$), у групі III – $20,9 \pm 1,62$ мм рт. ст. ($<0,001$) та у групі IV – $21,05 \pm 1,54$ мм рт. ст. ($<0,001$). Також потрібно відзначити, що на другому етапі вимірювання внутрішньоочного тиску не виявлено статистично значимої відмінності між групами з адреналіновою моделлю глаукоми. Після введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ відмічено позитивний вплив на зниження величини внутрішньоочного тиску при парабульбарній та ретробульбарній доставці клітин ($p < 0,05$).

Отримані нами результати також свідчать про те, що адреналінова модель глаукоми у щурів призводить до порушень параметрів зорових викликаних потенціалів на спалах. Встановлено збільшення латентного періоду за параметром N1 та P2 у групі тварин з моделлю глаукоми в середньому на 2,0 мс (95% ВІ 1,5 мс – 2,5 мс) ($p < 0,001$) та на 1,7 мс (95% ВІ 1,1 мс – 2,7 мс) ($p < 0,001$) відповідно. Також відзначено зменшення амплітуди P1-N1 та амплітуди N1-P2 в середньому на 0,6 мкВ (95% ВІ 0,2 мкВ – 0,8 мкВ) ($p < 0,05$) та на 1,4 мкВ (95% ВІ 0,8 мкВ – 2,1 мкВ) ($p < 0,05$) відповідно.

Результатом дослідження стало виявлення позитивної динаміки показників ЗВП на спалах при різних способах введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ через 1 та 3 місяці. Відзначено зниження латентного періоду за параметром N1 при внутрішньовенному, парабульбарному та ретробульбарному введенні клітин в середньому на 0,85 мс (95% ВІ 0,6 мс – 1,1 мс) ($p < 0,05$), на 1,5 мс (95% ВІ 1,3 мс – 1,7 мс) ($p < 0,05$) та на 1,75 мс (95% ВІ 1,5 мс – 1,95 мс) ($p < 0,05$) відповідно. Також відзначено зниження латентного періоду за параметром P2 при внутрішньовенному, парабульбарному та ретробульбарному введенні клітин в середньому на 1,3 мс (95% ВІ 0,8 мс – 2,0 мс) ($p < 0,05$), на 1,4 мс (95% ВІ 0,95 мс – 2,0 мс) ($p < 0,05$) та на 2,15 мс (95% ВІ 1,8 мс – 2,5 мс) ($p < 0,05$) відповідно.

Крім того, встановлено 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 – на 1,5 мкВ (95% ВІ 1,2 мкВ – 1,6 мкВ) ($p < 0,05$) та при ретробульбарному введенні клітин – на 1,5 мкВ (95% ВІ 1,2

мкВ – 1,6 мкВ) ($p < 0,05$). Показник амплітуди N1-P2 при внутрішньовенному введенні клітин виріс в середньому на 0,8 мкВ (95% ВІ 0,55 мкВ – 1,0 мкВ) ($p < 0,05$), при парабульбарному введенні клітин – на 1,75 мкВ (95% ВІ 1,6 мкВ – 1,85 мкВ) ($p < 0,05$) та при ретробульбарному введенні клітин – на 2,1 мкВ (95% ВІ 1,8 мкВ – 2,2 мкВ) ($p < 0,05$).

Отже, за результатами дослідження виявлено позитивний ефект трансплантації культивованих постнатальних мСК-ПНГ при адреналіновій моделі глаукоми, який був найбільш виражений при ретробульбарному та парабульбарному введенні клітин.

Матеріали розділу висвітлено в наступних працях:

1. [66] 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. [65] 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.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ У РОЗДІЛІ 3

1. Gauthier AC, Liu J. Neurodegeneration and Neuroprotection in Glaucoma. *Yale J Biol Med.* 2016 Mar 24;89(1):73-9.
2. Alekseev V, Gàzizova I. Meaning of neurodegeneration in the pathogenesis of glaucoma. 11th EGS Congress. 2014 June 7-11; Nice, France; 2014, p. 60.
3. Flammer J. Glaucoma. Verlag Hans Huber. 2011. 416 p.
4. Quigley UA. Glaucoma. *Lancet.* 2011 Apr 16;377(9774):1367-77.
5. Tham YC, Li X, Wong TY, et al. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology.* 2014;121:2081-90.
6. Pascolini D, Mariotti SP. Global estimates of visual impairment: 2010. *Br J Ophthalmol.* 2012;96:614-8. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2011-300539
7. Ramulu P. Glaucoma and disability: which tasks are affected, and at what stage of disease? *Curr Opin Ophthalmol.* 2009;20:92. DOI: 10.1097/ICU.0b013e32832401a9
8. Nduaguba C, Lee R. Glaucoma screening: current trends, economic issues, technology, and challenges. *Curr Opin Ophthalmol.* 2006;17:142-52. DOI: 10.1097/01.icu.0000193088.75432.c9
9. Sethi S, Fay C, Bollinger KE. Functional Testing in Glaucoma Diagnosis. *Curr Ophthalmol Rep.* 2013;1:89-97. DOI: 10.1007/s40135-013-0010-8
10. Mönter VM, Crabb DP, Artes PH. Reclaiming the Periphery: Automated Kinetic Perimetry for Measuring Peripheral Visual Fields in Patients With Glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017 Feb 1;58(2):868-75. DOI: 10.1167/iovs.16-19868
11. O'hnell H, Heijl A, Anderson H, Bengtsson B. Detection of glaucoma progression by perimetry and optic disc photography at different stages of the disease: results from the Early Manifest Glaucoma Trial. *Acta Ophthalmologica.* 2017;95(3):281-7. DOI: 10.1111/aos.13290
12. Kass MA, Heuer DK, Higginbotham EJ, et al. The Ocular Hypertension Treatment study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol.* 2002;120(6):701-13. DOI: 10.1001/archophth.120.6

13. Miglior S ZT, Pfeiffer N, Cunha-Vaz J, Torri V, Adamsons I; European Glaucoma Prevention Study (EGPS) Group. Results of the European Glaucoma Prevention Study. *Ophthalmology*. 2005 Mar;112(3):366-75. DOI: 10.1016/j.ophtha.2004.11.030. PMID: 15745761.
14. Huber C, Wagner T. Electrophysiological evidence for glaucomatous lesions in the optic nerve. *Ophtalmol*. 1978;10:22-9.
15. Parisi V, Miglior S, Manni G, Centofanti M, Bucci MG. Clinical ability of pattern electroretinograms and visual evoked potentials in detecting visual dysfunction in ocular hypertension and glaucoma. *Ophthalmology*. 2006;113:216-28. DOI: 10.1016/j.ophtha.2005.10.044
16. Стоцька ЛМ, Чокова ІБ, Ромоданова КС, Решетняу ВБ. Дослідження зорових викликаних потенціалів в клінічній практиці у пацієнтів з первинною відкритокутовою глаукомою. *Офтальмологіческий журнал*. 2016;1(468):19-23.
17. Tai TYT. Visual Evoked Potentials and Glaucoma. *Asia-Pacific Journal of Ophthalmology*. 2018 Sep;7(5):352-5. DOI: 10.22608/APO.2017532
18. Курышева НИ, Маслова ЕВ. Электрофизиологические исследования в диагностике глаукомы. *Национальный журнал глаукома*. 2017;16(1):102-13.
19. Юрьева ТН, Худоногов АА. Эффективность электрофизиологических методов диагностики допериметрической стадии глаукомы. *Вестник ОГУ* 2010;12:247-9.
20. Кошелев ДИ, Галаутдинов МФ, Вахмянина АА. Опыт применения зрительных вызванных потенциалов на вспышку в оценке функций зрительной системы. *Вестник ОГУ*. 2014;12(173):181-7.
21. Mitchell KW, Wood CM, Howe JW, Church WH, Smith GTH, Spencer SR. The visual evoked potential in acute primary angle closure glaucoma. *Br J Ophthalmol*. 1989;73:448-56.
22. Jha MK, Thakur D, Limbu N, Badhu BP, Paudel BH. Visual Evoked Potentials in Primary Open Angle Glaucoma. *J Neurodegenerative Dis*. [Internet]. 2017;1-4. DOI: 10.1155/2017/9540609. Epub 2017 Jul 20. PMID: 28808597; PMCID: PMC5541795.

23. Heckenlively JR, Arden GB, editors. Principles and practice of clinical electrophysiology of vision. Second edition; 2006. 977 p.
24. Шамшинова АМ, Андреева ТМ. Клиническая физиология зрения. Москва; 2006. 956 с.
25. Korth M, Kohl S, Martus P, Sembritzki T. Motion-Evoked pattern visual evoked potentials in glaucoma. *Journal of Glaucoma*. 2000 Oct;9(5):376-87. DOI: 10.1097/00061198-200010000-00006
26. Firan AM, Istrate S, Iancu R, et al. Visual evoked potential in the early diagnosis of glaucoma. Literature review. *Romanian Journal of Ophthalmology*. 2020 Jan-Mar;64(1):15-20.
27. Watts MT, Good PA, O'Neill EC. The flash stimulated VEP in the diagnosis of glaucoma. *Eye (Lond)*. 1989;3(6):732-7. DOI: 10.1038/eye.1989.113
28. Rocha LR, Huu VA, Torre CP, Xu Q, Jabari M, Krawczyk M, et al. Early removal of senescent cells protects retinal ganglion cells loss in experimental ocular hypertension. *Aging Cell*. 2019;19(2):e13089. DOI: 10.1111/acer.13089
29. Bond WS, Hines-Beard J, GoldenMerry YPL, Davis M, Farooque A, Sappington RM, et al. Virus-mediated EpoR76E Therapy Slows Optic Nerve Axonopathy in Experimental Glaucoma. *Mol Ther*. 2016 Feb;24(2):230-9. DOI: 10.1038/mt.2015.198
30. Tsai TI, Bui BV, Vingrys AJ. Effect of Acute Intraocular Pressure Challenge on Rat Retinal and Cortical Function. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55:1067-77. DOI: 10.1167/iovs.13-13003
31. You Y, Klistorner A, Graham SL. Visual Evoked Potential Recording in Rodents. Stimulation and Inhibition of Neurons. *Neuromethods*. 2013;78:275-85. DOI: 10.1007/978-1-62703-233-9_16
32. Casson RJ, Franzco D, Dphil GC, et al. Review translational neuroprotection research in glaucoma: a review of definitions and principles. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2012;40:350-7.
33. Chang EE, Goldberg JL. Glaucoma 2.0: neuroprotection, neuroregeneration, neuroenhancement. *Ophthalmology*. 2012;119:979-86.

34. Sigireddi RR, Frankfort BJ. Neuroprotection in Glaucoma. *Int Ophthalmol Clin*. 2018 Summer;58(3):51-67. DOI: 10.1097/IIO.0000000000000228
35. Canesi M, Giordano R, Lazzari L, et al. Finding a new therapeutic approach for no-option Parkinsonisms: mesenchymal stromal cells for progressive supra nuclear palsy. *J Transl Med*. 2016;14:1-11.
36. Meamar R, Nematollahi S, Dehghani L, et al. The role of stem cell therapy in multiple sclerosis: an overview of the current status of the clinical studies. *Adv Biomed Res*. 2016;5:1-10.
37. Llufríu S, Sepúlveda M, Blanco Y, et al. Randomized placebo-controlled phase II trial of autologous mesenchymal stem cells in multiple sclerosis. *PLoS One*. 2014;9:1-5.
38. Kang JM, Yeon BK, Cho S-J, Suh Y-H. Stem cell therapy for Alzheimer's disease: a review of recent clinical trials. *J Alzheimers Dis*. 2016;54:879-89.
39. Paul G, Anisimov SV. The secretome of mesenchymal stem cells: potential implications for neuroregeneration. *Biochimie*. 2013;95:2246-56.
40. Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Harris DT. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose and cord tissue. *Cytherapy*. 2013 Mar;15(3):330-43. DOI: 10.1016/j.jcyt.2012.11.010
41. Das M, Sundell IB, Koka PS. Adult mesenchymal stem cells and their potency in the cellbased therapy. *J Stem Cells*. 2013;8(1):1-16.
42. Decot V, Omar R, Beroud J, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell based therapies? *Tissue Eng Part B Rev*. 2014;20(5):523-44.
43. Семченко ВВ, Степанов СС, Дюрягин НМ, и др. Фундаментальные и клинические аспекты регенеративной биологии и медицины. *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2013;4:138-41.
44. Stem cell information [Electronic resource]. National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services; 2016. Available from: <https://stemcells.nih.gov/info/faqs.htm>
45. Калинина НИ, Сыроева ВЮ, Рубина КА, и др. Мезенхимальные стволовые клетки в процессах роста и репарации тканей. *Acta naturae*. 2011;3(4):32-9.

46. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*; 2006;126:663-76.
47. Шаблий В, Кучма М, Кирик В, и др. Мезенхимальные стромальные клетки из нативной и криоконсервированной плаценты человека: фенотип, мультипотентность и миграционный потенциал *in vivo*. *Проблемы криобиологии*. 2012;22(2):157-60.
48. Ding SLS, Kumar S, Mok PL. Cellular Reparative Mechanisms of Mesenchymal Stem Cells for Retinal Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(8):1406.
49. Arnhold S, Absenger Y, Klein H, et al. Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells rescue photoreceptor cells in the dystrophic retina of the rhodopsin knockout mouse. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2007;245(3):414-22.
50. Wang Sh, Lu B, Girman S. Non-Invasive Stem Cell Therapy in a Rat Model for Retinal Degeneration and Vascular Pathology. *PLoS ONE*. 2010;5(2):e9200.
51. Dang Y, Zhang Ch, Zhu Yu. Stem cell therapies for age-related macular degeneration: the past, present, and future *Clinical Interventions in Aging*. 2015;10:255-64.
52. Lamba DA, Gust J, Reh TA. Transplantation of human embryonic stem cell-derived photoreceptors restores some visual function in Crx-deficient mice, *Cell Stem Cell*. 2009;4:73-9.
53. Schwartz SD, Regillo CD, Lam BL, Elliott D, Rosenfeld PJ, Gregori NZ, et al. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet*. 2015 Feb 7;385(9967):509-16. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)61376-3
54. Повещенко АФ, Лыков АП, Бондаренко НА, Никонорова ЮВ, Дружинин ИБ, Коненков ВИ. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки для терапии дисфункции лимбального эпителия. *Бюллетень Сибирского отделения академии медицинских наук*. 2014;34(3):48-55.
55. Zhang W, Yang W, Liu X, et al. Rapidly constructed scaffold-free embryonic stem cell sheets for ocular surface reconstruction. *Scanning*. 2014;36:286-92.

56. Roubeyx C, Godefroy D, Mias C, et al. Intraocular pressure reduction and neuroprotection conferred by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in an animal model of glaucoma. *Stem Cell Res Ther.* 2015 Sep 16;6(1):177. DOI: 10.1186/s13287-015-0168-0
57. Manuguerra-Gagné R, Boulos PR, Ammar A, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells promotes tissue regeneration in a glaucoma model through laser-induced paracrine factor secretion and progenitor cell recruitment. *Stem Cells.* 2013;31:1136-48.
58. Johnson TV, Bull ND, Hunt DP, Marina N, Tomarev SI, Martin KR. Neuroprotective effects of intravitreal mesenchymal stem cell transplantation in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010 Apr;51(4):2051-9. DOI: 10.1167/iovs.09-4509
59. Zhao T, Li Y, Tang L, Li Y, Fan F, Jiang B. Protective effects of human umbilical cord blood stem cell intravitreal transplantation against optic nerve injury in rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2011 Jul;249(7):1021-8. DOI: 10.1007/s00417-011-1635-7
60. Jiang B, Zhang P, Zhou D, Zhang J, Xu X, Tang L. Intravitreal transplantation of human umbilical cord blood stem cells protects rats from traumatic optic neuropathy. *PLoS One.* 2013 Aug 5;8(8):e69938. DOI: 10.1371/journal.pone.0069938
61. Weber M, Apostolova G, Widera D, Mittelbronn M, Dechant G, Kaltschmidt B, et al. Alternative generation of CNS neural stem cells and PNS derivatives from neural crest-derived peripheral stem cells. *Stem Cells.* 2015;33(2):574-88. DOI: 10.1002/stem.1880
62. Narytnyk A, Verdon B, Loughney A, et al. Differentiation of human epidermal neural crest stem cells (hEPI-NCSC) into virtually homogenous populations of dopaminergic neurons. *Stem Cell Rev.* 2014;10(2):316-26. DOI: 10.1007/s12015-013-9493-9
63. Binder E, Rukavina M, Hassani H, Weber M, Nakatani H, Reiff T, et al. Peripheral nervous system progenitors can be reprogrammed to produce myelinating oligodendrocytes and repair brain lesions. *J Neurosci.* 2011;31(17):6379-91. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0129-11.2011

64. Vasyliiev RG, Gubar OS, Gordiienko IM, et al. Comparative analysis of biological properties of large-scale expanded adult neural crest-derived stem cells isolated from human hair follicle and skin dermis. *Stem Cells Int.* 2019;2019:9640790. DOI: 10.1155/2019/9640790
65. 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.
66. 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

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ЗМІН БІОХІМІЧНОГО СТАНУ СІТКІВКИ ПІД ВПЛИВОМ КУЛЬТИВОВАНИХ ПОСТНАТАЛЬНИХ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН-ПОХІДНИХ НЕРВОВОГО ГРЕБЕНЯ

4.1. Сучасний погляд на патогенез глаукомної оптичної нейропатії

Глаукома – одна з найпоширеніших форм хронічної, постійно прогресуючої оптичної нейропатії, яка є провідною причиною незворотної сліпоти та вражає понад 70 мільйонів людей у всьому світі [1,2]. В Україні третій рік поспіль глаукома займає перше місце за поширеністю та рівнем інвалідності серед офтальмологічної патології та, на жаль, немає тенденції до зниження. Для глаукомної оптичної нейропатії (ГОН) характерні пошкодження зорового нерва (збільшення екскавації і співвідношення екскавації до диска) та поява дефектів полів зору, причиною яких є поступова втрата гангліонарних клітин сітківки (ГКС), нейронів, що впливає на передачу сигналу від сітківки до потиличної долі кори головного мозку [3,4].

Згідно сучасних уявлень, до патогенетичних механізмів глаукомного процесу відносять – ішемічні: порушення органної та тканинної гемодинаміки, розвиток ішемії тканин диска зорового нерва внаслідок гіпоксії та реперфузії; апоптоз гангліонарних клітин сітківки, зокрема через порушення аксоплазматичного струму у нервових волокнах та біомеханічні чинники: порушення відтоку водянистої вологи з передньої камери внаслідок ретенції; підвищення внутрішньоочного тиску (ВОТ) вище цільового рівня; механічний вплив на волокна зорового нерва внаслідок деформації гратчастої пластинки, які викликають розвиток глаукомної оптичної нейропатії, що призводить до зниження та/або втрати зорових функцій. Прогресування апоптичного процесу при глаукомі веде до ураження ядер латеральних колінчастих тіл і зорової кори [5,6], що замикає порочне коло.

Загальновідомо, що основним механізмом загибелі нейронів при нейродегенеративних захворюваннях є апоптоз [7]. Його роль в патогенезі таких нейродегенеративних захворювань, як хвороба Альцгеймера і хвороба Паркінсона,

неодноразово підтверджувалася результатами клінічних та експериментальних досліджень [8-11].

Чимало досліджень знаходять все більше підстав для віднесення глаукоми саме до групи захворювань, в основі яких лежать процеси апоптозу або запрограмованої загибелі клітин. Проте на сьогоднішній день механізми апоптозу загибелі гангліозних клітин сітківки недостатньо вивчені, а питання запуску програми апоптозу залишаються відкритими. Можна відзначити тригери апоптозу, які пов'язані з глаукомою та включають блокування аксонального транспорту, глутамат ексайтотоксичність, ішемію, вазоактивні регулятори, такі як ендотелін та оксид азоту [12,13].

Слід зауважити, що попри чисельні сучасні дослідження, які визначають глаукому як багатофакторне нейродегенеративне захворювання, його патогенез залишається до кінця не вивченим і може бути унікальним для кожного пацієнта. Пошук причини розвитку цієї хвороби не повинен обмежуватися рамками офтальмопатології, а мати мультидисциплінарний підхід. У більшості випадків глаукомна оптична нейропатія є проявом загального стану організму, а традиційне уявлення про глаукому як про захворювання, що викликане високим рівнем внутрішньоочного тиску, є спрощеним і неповною мірою відображає її розвиток [14].

Серед факторів ризику розвитку ГОН слід зазначити системні фактори, а саме: похилий вік, расова і спадкова схильність, судинні захворювання, гіперхолістеринемія, брадикардія, мігрені, аутоімунні захворювання, цукровий діабет, куріння та локальні фактори, до яких відносять індивідуальні особливості анатомії головки зорового нерва, дренажної системи і судинних структур ока, міопію, синдром пігментної дисперсії, псевдоексфоліативний синдром [15-18].

Не можна не відзначити вплив генетичних факторів на розвиток захворювання. За результатами досліджень останніх років отримано цілий ряд генів та генетичних локусів різних форм глаукоми [19]. Встановлено, що мутація гена, який кодує міоцилін (MYOC, GLC1A), може протікати в 10% випадків як ювенільна відкритокутова глаукома, а також в 3-5% випадків як первинна відкритокутова

глаукома. Сучасні дослідження демонструють, що внутрішньоклітинне накопичення міоциліну може спричинити сенсibiliзацію клітин трабекулярної сітки до апоптозу. Однак патогенні механізми «міоцилінової глаукоми» досі залишаються не до кінця з'ясованими [20-22].

Дослідження ряду вчених [23] припускають, що мутації гена Neurotrophin-4 (NTF4) може сприяти розвитку первинної відкритокутової глаукоми (переважно у осіб європеїдної раси). Виявлено зниження спорідненості до білка нейротрофіну 4 (NT-4) з його специфічним рецептором В тирозинкінази (TrkB), що призводить до зниження активації TrkB. Результати свідчать про те, що втрата нейротрофічної функції може бути одним із основних механізмів у патогенезі глаукоми.

За результатами інших досліджень встановлено, що мутація гена OPTN (GLC1E) зустрічається у пацієнтів з глаукомою низького тиску, а білок оптиневрин може впливати на апоптоз гангліонарних клітин сітківки безпосередньо через передачу сигналів *gab8* [24-26]. Крім того, дослідження лімфоцитів у пацієнтів з глаукомою низького тиску продемонстрували змінену експресію гена *p53*, відомого регулятора апоптозу [27].

Викликає також особливий інтерес роль імунних процесів, які беруть участь в патогенезі глаукоми. Так, у пацієнтів з первинною відкритокутовою глаукомою та з нормотензивною глаукомою були виявлені зміни профілю антитіл у сироватці крові та водянистої вологи [28,29]. Рядом досліджень було виявлено підвищений титр циркулюючих антитіл HSP (білки теплового шоку), як HSP27, у глаукомних пацієнтів, які можуть викликати загибель ГКС [30]. Крім того, встановлено, що підвищений рівень ВОТ може спричинити інфільтрацію аутореактивних Т-клітин в сітківці, які викликають нейродегенерацію [31]. Отже, дисрегуляція імунітету являється важливим фактором розвитку та прогресування ГОН.

Таким чином, на сьогодні доведена участь в патогенезі ГОН різних факторів, які сприяють появі незворотних ознак пошкодження зорового нерва, що можна поділити на ішемічні чинники, які не залежать від рівня ВОТ і біомеханічні – пов'язані з ним [32]. Але кінцева крапка у вирішенні суперечок по цьому питанню, на жаль, буде поставлена не скоро.

Дослідження свідчать, що дисрегуляція судин, яка спричиняє ішемію та реперфузію, може бути основним патогенним етапом у виникненні оксидативного стресу [33]. Зниження концентрації кисню призводить до порушення окислювано-відновлювального стану клітин та підвищення рівня активних форм кисню. Високий рівень активних форм кисню (АФК), таких як супероксидний радикал ($\cdot\text{O}_2^-$), гідроксильний радикал ($\cdot\text{OH}$), ініціюють перекисне окислення ліпідів (ПОЛ), пошкодження білків і структур клітин [34].

Посилення утворення вільних радикалів і цитотоксичних агентів за рахунок розвитку оксидативного стресу, призводить до дисфункції мітохондрій, викликаючи пошкодження ГКС та їх аксонів [35].

В процесі оксидативного стресу значно зростає концентрація збуджуючих нейротрансмітерних амінокислот (глутамату, аспартату). Відомо, що глутамат є важливим нейромедіатором у центральній нервовій системі та сітківці, однак надмірне вивільнення і його взаємодія з NMDA-рецепторами сприяє надходженню занадто великої кількості кальцію та призводить до глутаматної ексайтотоксичності і апоптозу ГКС. До того ж такі патологічні процеси можуть посилюватись за рахунок змін в оточуючих тканинах, що викликані активацією гліальних клітин [36,37].

Крім того, підвищений рівень кальцію, з одного боку, активує фосфоліпази, які призводять до окислення арахідонової кислоти та утворення вільних радикалів. З іншого боку, сприяє активації ксантиндегідрогенази до ксантинооксидази, яка катаболізує пурини до сечової кислоти і за рахунок поєднаної реакції відновлює кисень до супероксида. Також збільшення внутрішньоклітинного кальцію та вплив глутамату зменшують споживання цистеїну. Цистеїн є попередником глутатіону, який важливий для виведення вільних радикалів [38,39].

Викликає особливий інтерес роль оксиду азоту (NO) в метаболічних порушеннях, які спостерігаються при ГОН. NO має як нейродеструктивні, так і нейропротекторні властивості та відіграє важливу роль у нейротрансмісії та регуляції кровообігу сітківки та зорового нерва. В утворенні NO основна роль належить амінокислоті L-аргінін та оксидатозним синтетазам (NOS – Nitric Oxide

Synthase). Також в утворенні NO беруть участь активовані астроцити внаслідок експресії NOS-2 (індуцибельної NO-синтаза). Потрібно зазначити, що активація астроцитів відбувається в результаті механічного пошкодження аксонів як підвищеним гідростатичним тиском, так і в результаті ішемії. Надмірне утворення NO призводить до нейротоксичності ГКС та їх загибелі. При одночасній інтенсивній генерації супероксиду і NO створюються умови для синтезу токсичного пероксинітриду (ONOO^-), який просочується вдовж аксонів вглиб сітківки та бере участь в процесі апоптозу ГКС [40-42].

Оскільки NO міститься в різних станах, пов'язаних з окислювально-відновними процесами, він також виконує захисну функцію. Результати досліджень свідчать про те, що низька концентрація NO відіграє захисну роль у нейротоксичності глутамату на ГКС, подавляючи збудження у NMDA рецепторах [43].

Встановлено також, що фактор некрозу пухлини- α (TNF α) відіграє важливу роль як в регуляції нормального диференціювання, росту і метаболізму різних клітин, так і виступає в ролі медіатора запальних процесів при різних захворюваннях [44]. Результати досліджень свідчать, що TNF α сприяє прогресуванню дегенерації зорового нерва при ГОН за рахунок безпосереднього впливу на аксони ГКС. Крім того, при дослідженні *in vitro* виявлено здатність астроцитів експресувати рецептор фактора некрозу пухлини-1 (TNF-R1), а стимуляція TNF α індукує експресію NOS-2, що також призводить до дегенеративних змін при ГОН [45].

Встановлено, що нейтрофіни (зокрема, BDNF – нейротрофічний фактора мозку) рухаються від бічного колінчастого тіла до гангліонарних клітин сітківки шляхом ретроградного аксонального транспорту та беруть участь у їх виживанні. Таким чином, блокада аксонального транспорту BDNF, у зв'язку з підвищенням рівня ВОТ, призводить до апоптичної загибелі ГКС. Дослідження *in vitro* та *in vivo* демонструють, що BDNF не лише сприяє виживанню ГКС, але й допомагає зберегти структурну цілісність нейронів, що в свою чергу призводить до покращення зорової функції [46,47].

Отже, аналіз сучасної літератури свідчить про те, що глаукомна оптична нейропатія є мультифакторним захворюванням та супроводжується значною

втратою гангліонарних клітин сітківки. Цей процес виникає внаслідок поєднаної дії цілого ряду патогенетичних механізмів, до яких входить не тільки підвищений ВОР, але й імунологічні порушення, вплив генетичних чинників, порушення ауторегуляції, ішемія, оксидативний стрес, ексайтотоксичність, дефіцит нейротрофічних факторів тощо.

Однак, попри чисельні досягнення у вивченні проблеми ГОН, залишається невирішеним важливе науково-прикладне завдання сучасної офтальмології – визначення можливостей запобігання прогресуванню глаукомного процесу.

На сьогоднішній день пошук ефективних методів лікування та профілактики глаукомної оптичної нейропатії призводить до збільшення інтересу дослідників до нових напрямків медицини. Одним з таких напрямків є клітинна терапія, яка ґрунтується на унікальних властивостях стовбурових клітин, включаючи здатність до самооновлення і можливість диференціювання в специфічні види клітин [48]. Результати експериментальних досліджень, отриманих на моделях тварин, свідчать про можливий терапевтичний потенціал різних типів стовбурових клітин у лікуванні дегенеративних захворювань сітківки, включаючи ембріональні стовбурові клітини, індуковані плюрипотентні стовбурові клітини, мезенхімальні стовбурові клітини [49].

Згідно з багатьма дослідженнями відомих закордонних та вітчизняних вчених, стовбурові клітини здатні до нейропротекції та імуномодуляції. Встановлено, що стовбурові клітини продукують широкий спектр нейротрофічних факторів, тим самим покращують виживання та регенерацію ГКС. Визначено, що трансплантовані мезенхімальні стовбурові клітини зменшують ВОР, підтримуючи цілісність трабекулярної сітки, що призводить до зменшення втрати ГКС. Також описано, що мезенхімальні стовбурові клітини здатні пригнічувати запальні процеси сітківки, забезпечуючи захист пошкодженої тканини сітківки. Саме тому на сьогодні клітинна терапія з використанням стовбурових клітин є перспективною для розробки нових додаткових нейропротекторних та нейрорегенеративних методів лікування глаукоми [50-53].

Дослідження свідчать, що серед різних типів стовбурових клітин саме мезенхімальні стовбурові клітини як найкраще підходять для трансплантації, оскільки вони мають імунодепресивні властивості та інгібують вивільнення прозапальних цитокінів, дозволяючи аутологічну та алогенну трансплантацію без необхідності застосування фармакологічної імуносупресії [54].

Проте відповіді на питання, чи можливо застосовувати стовбурові клітини як нейропротекторне лікування глаукоми, які джерела та типи є оптимальними для нейропротекції, яка кількість клітин необхідна для трансплантації та який шлях трансплантації найбільш ефективний при глаукомній оптичній нейропатії, на сьогодні не отримані, що потребує подальшого дослідження.

Під час виконання нашого дослідження ми зупинилися на постнатальних мультипотентних стовбурових клітинах-похідних нервового гребеня (мСК-ПНГ), оскільки експериментально встановлені основні біологічні властивості клітин – потенціал до самооновлення та мультилінійної диференціації, можливість продукції широкого спектру факторів росту та цитокінів, що мають нейротрофічну, нейропротекторну та анти-апоптичну дію. Перспективним джерелом для ізоляції та культивування цього клітинного типу у тварин та людини є волосяний фолікул, а процедура отримання невеликого біоптату шкіри малоінвазивна [55,56].

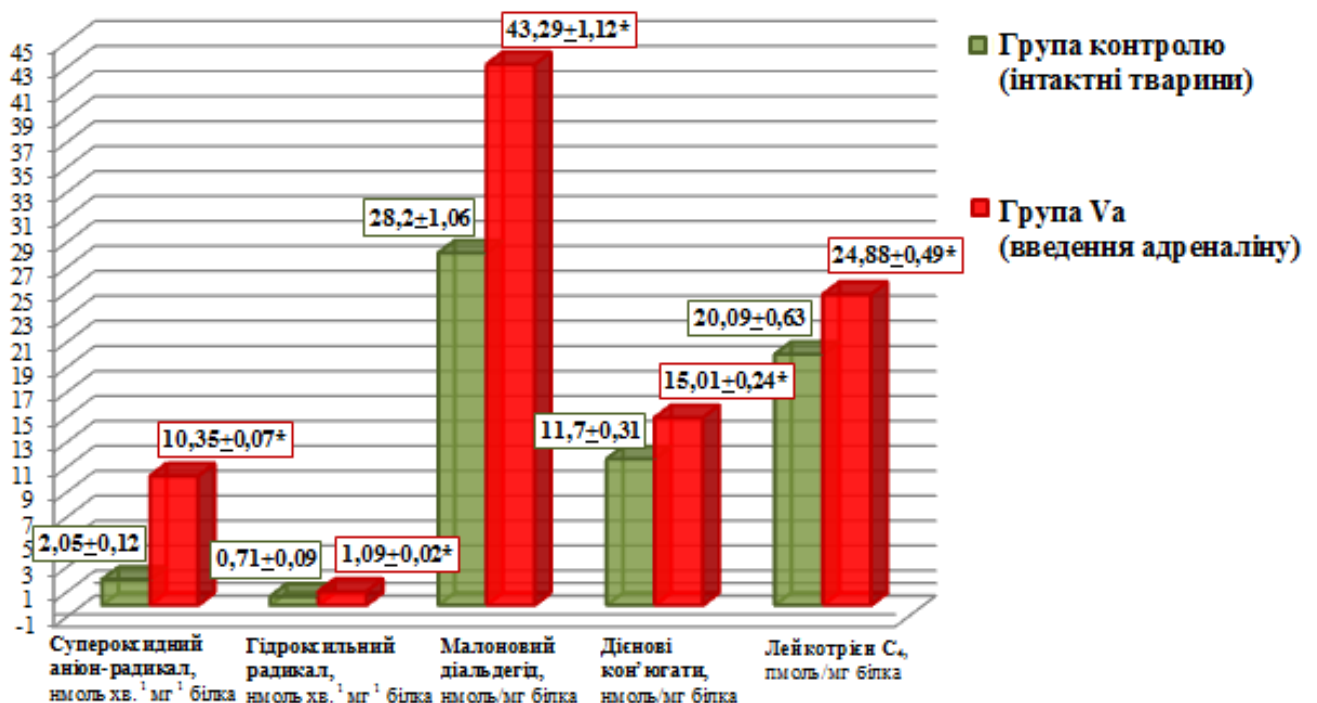
Дослідження ряду вчених показали, що постнатальні мСК-ПНГ мають здатність безпосередньо трансформуватися *in vitro* в шваннівські клітини. Крім того, після трансплантації клітин у місце пошкодження (перерізу) сідничного нерва у мишей виявлено посилення регенерації. Також зростала інтенсивність васкуляризації та оновлення ендоневрію. Відмічено збільшення кількості нервових волокон у дистальній частині пошкодженого нерва [57].

Таким чином, аналіз проведених останніми роками досліджень доводить, що перспективним типом стовбурових клітин є мСК-ПНГ, що дозволить сприяти відновленню гангліонарних клітин сітківки, зменшити прогресування втрати зорових функцій, розробити нові методики комплексного лікування глаукоми та вирішити важливе науково-прикладне завдання сучасності.

У доступній нам сучасній літературі ми не знайшли робіт щодо дослідження впливу культивованих постнатальних мСК-ПНГ на біохімічний стан сітківки при глаукомі, що могли б допомогти у вирішенні питання впливу на оксидативний стрес як один із основних факторів, що призводить до апоптозу гангліонарних клітин сітківки. Це стало предметом проведення нашого дисертаційного дослідження.

4.2. Особливості біохімічного стану сітківки після моделювання глаукоми та введення культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня

У ході виконання даної дисертаційної роботи нами були проведені біохімічні дослідження визначення ступеня оксидативного стресу після адреналінової моделі глаукоми та після введення культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня. Аналіз отриманих результатів маркерів оксидативного стресу представлено на рисунках 4.1 та 4.2.



Примітка: * – статистично значимі зміни відносно контролю ($p < 0,05$).

Рис. 4.1. Показники маркерів оксидативного стресу в тканинах сітківки ока щурів після моделювання глаукоми ($M \pm m$)

Як свідчать результати дослідження, майже всі показники були вищими у щурів після адреналінової моделі глаукоми (рис. 4.1).

Відзначалося вірогідне збільшення швидкості генерації $\cdot\text{O}_2^-$ у 5,1 рази ($p < 0,05$). Також було зазначено збільшення швидкості утворення $\cdot\text{OH}$ -радикала у 1,6 рази ($p < 0,05$) у порівнянні зі значеннями у інтактних тварин.

Як наслідок підвищення швидкості утворення активних форм кисню, спостерігалась активація перекисного окиснення ліпідів мембран, а саме – вірогідне збільшення вмісту кінцевого продукту ПОЛ малонового діальдегіду (МДА) на 53,5% ($p < 0,05$), вміст дієнових кон'югатів (ДК) збільшився на 28,3% ($p < 0,05$) та вміст лейкотрієну C_4 (LTC_4) – на 23,9% ($p < 0,05$) порівняно з контролем.

Слід зазначити, що збільшення лейкотрієну C_4 вказує на активацію ліпоксигеназного шляху розщеплення арахідонової кислоти, яка являється одним з джерел вільних радикалів.

До того ж крім збільшення різних маркерів оксидативного стресу спостерігалось зростання VO_2 , що вказує на значну чутливість зорового аналізатора до підвищення концентрації катехоламінів в організмі і до будь-яких змін оксидативного метаболізму, зокрема тих, що ведуть до збільшення продукції активних форм кисню – супероксидного аніон-радикала чи гідроксильного радикала, які в свою чергу ініціюють ПОЛ, пошкодження білків і структур клітин.

Низка робіт свідчить про те, що катехоламіни мають здатність посилювати продукцію АФК, що відбувається за рахунок активації β_2 -адренорецепторів. Також відомо, що адреналін може піддаватись аутоокисленню з утворенням хінону і семіхінону, які вступають в окисно-відновний цикл з утворенням великої кількості АФК і індукцією оксидативного стресу. Результати дослідів на модельних системах *in vitro* свідчать, що адреналін має здатність посилювати ПОЛ мембран безпосередньо мітохондрій та зменшувати їх мембранний потенціал, що наймовірніше веде до зміни їх об'єму і корелює із морфологічними порушеннями їх цілісності. Крім того, виявлено здатність адреналіну знижувати вміст глутатіону в мітохондріях [58-60].

Таким чином, встановлено, що дія адреналіну призводить до послаблення антиоксидантних властивостей і розвитку оксидативного стресу в тканинах ока, про що свідчать підвищення маркерів ПОЛ, які отримані у тварин з адреналіновою моделлю глаукоми.

Відомо, що основним джерелом $\cdot\text{O}_2^-$ в клітині є дихальний ланцюг мітохондрій, а також ряд ензимів, таких як ксантиноксидаза, NO-синтаза, НАДН-оксидази та ін. Основним шляхом генерації $\cdot\text{OH}$ -радикала є не лише традиційний – утворення з H_2O_2 у реакції Фентона за наявності йонів металів (Fe^{2+} , Cu^{2+}), але й розпад пероксинітриту, який може утворитися при одночасній інтенсивній генерації супероксиду і NO у випадку неспряження NO-синтаз [61].

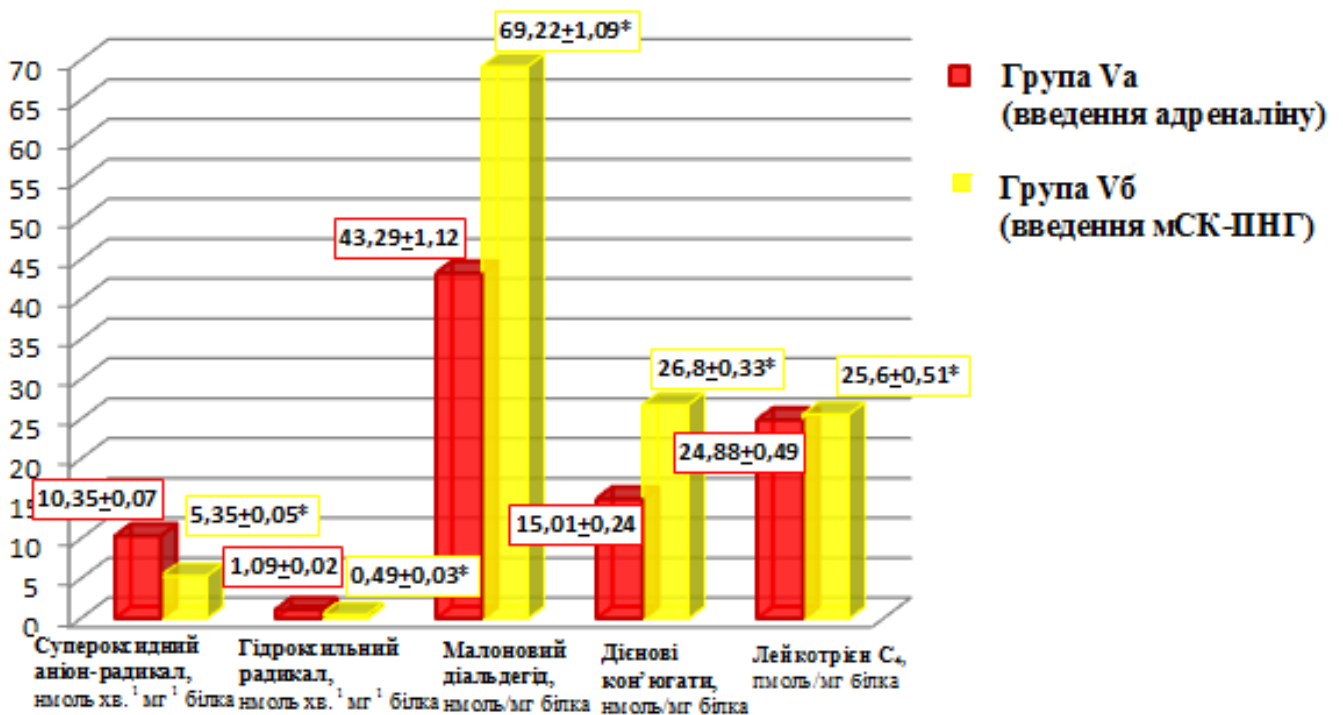
Очевидно, при адреналін індукованій моделі глаукоми так само відбувається неспряження NO-синтаз в тканинах сітківки, на що вказує збільшений ВОТ, навіть після припинення введення препарату. $\cdot\text{OH}$ -радикал призводить до пошкодження мітохондріальних мембран, що веде до зниження продукції ними АТФ. У результаті збільшення продукції АФК під дією адреналіну впливає на енергопродукуючу функцію мітохондрій, що лягає в основу розвитку патологічного процесу, характерного при глаукомі [62,63].

Під час дослідження проведено аналіз показників маркерів оксидативного стресу після введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ. Результати свідчать про зниження розвитку оксидативного стресу у тканинах сітківки ока щурів (рис.4.2).

Отримані результати свідчать про реалізацію антирадикальної дії клітин. Відзначено вірогідне зменшення швидкості продукції гідроксильного радикала в середньому на 55,1% ($p < 0,05$), при ретробульбарному та парабульбарному введенні культивованих постнатальних мСК-ПНГ, а також зниження супероксидного аніон-радикала після парабульбарного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ в середньому на 48,31% ($p < 0,05$).

До того ж відзначалося збільшення вмісту проміжних продуктів окислення ліпідів мембран – дієнових кон'югатів на 78,6% ($p < 0,05$). Також виявлено збільшення вмісту кінцевого метаболіту ПОЛ малонового діальдегіду на 59,9%.

Крім того, відмічено зменшення показника лейкотрієну C_4 в середньому на 3% після ретробульбарного введення клітин.



Примітка: * – статистично значимі зміни відносно дослідної групи без введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ ($p < 0,05$).

Рис. 4.2. Зміни показників маркерів окисативного стресу в тканинах сітківки ока щурів після введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ ($M \pm m$)

Зазначені зміни свідчать про вплив культивованих постнатальних мСК-ПНГ на різні ланки ферментативного окислення ліпідів мембран.

Отже, проведений аналіз результатів показників маркерів окисативного стресу в тканинах сітківки ока щурів після ретробульбарного та парабульбарного введення клітин свідчить про зменшення продукції АФК.

Резюме до розділу 4

Встановлено, що введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ має позитивний вплив на біохімічні зміни в сітківці ока при адреналіновій моделі глаукоми.

При дослідженні маркерів оксидативного стресу в сітківці ока щурів виявлено зміни надпродукції активних форм кисню та продуктів перекисного окислення ліпідів після парабульбарного та ретробульбарного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ. Встановлено вірогідне зменшення супероксидного аніон-радикала на 48,31% і гідроксильного радикала на 55,1% ($p < 0,05$). Крім того, відмічено збільшення дієнових кон'югантів на 78,6% ($p < 0,05$) та збільшення малонового діальдегіду на 59,9% ($p < 0,05$).

Матеріали розділу висвітлено в наступних працях:

1. [62] Риков 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
2. [63] 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.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ У РОЗДІЛІ 4

1. Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020, *Br J Ophthalmol*, 2006;90:262-7. DOI: 10.1136/bjo.2005.081224
2. Weinreb RN, Aung T, Medeiros FA. The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review. *JAMA*. 2014 May 14;311(18):1901-11. DOI: 10.1001/jama.2014.3192
3. Quigley HA, Glaucoma. *Lancet*. 2011 Apr 16;377(9774):1367-77.
4. Lee MC, Chan AS, Goh SR, et al. Expression of the primary angle closure glaucoma (PACG) susceptibility gene PLEKHA7 in endothelial and epithelial cell junctions in the eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2014;55(6):3833-41.
5. Schacknow PN, Samples JR, editors. *The Glaucoma Book: A Practical, Evidence-Based Approach to Patient Care*. New York: Springer-Verlag; 2010. 1043 p.
6. Аветисов СЭ, Еричев ВП, Яременко ТВ. Обоснование нейропротекции при глаукоме. *Национальный журнал глаукома*. 2019;18(1):85-94. DOI: 10.25700/NJG.2019.01.10
7. Ярилин АА. Апоптоз и его роль в целостном организме. *Глаукома*. 2003;2:46-54.
8. Ley N, Melamed D, Offen D. Melamed Apoptosis and Parkinson`s disease. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2003;27(2):245-50.
9. Shimohama S. Apoptosis in Alzheimer`s disease. *Apoptosis*. 2000;5(1):9-16.
10. Hasanov S, Demirkilinc Biler E, Acarer A, Akkin C, Colakoglu Z, Uretmen O. Functional and morphological assessment of ocular structures and follow-up of patients with early-stage Parkinson`s disease. *Int Ophthalmol*. 2019;39:1255-62. DOI: 10.1007/s10792-018-0934-y
11. McKinnon SJ. Glaucoma: ocular Alzheimer`s disease? *Frontiers in Bioscience*. 2003;8(1):1140-56.
12. Cordeiro MF, Normando EM, Cardoso J, Miodragovic S, Jeylani S, Davis BM, et al. Real-time imaging of single neuronal cell apoptosis in patients with glaucoma. *Brain*. 2017;140(6):1757-67. DOI: 10.1093/brain/awx088
13. Nickells RW. Apoptosis of retinal ganglion cells in glaucoma: An Update of the Molecular Pathways Involved in Cell Death. *Survey of Ophthalmology*. 1999;43(1):151-61.

14. Петров СЮ, Фокина НД, Шерстнева ЛВ, Вострухин СВ, Сафонова ДМ. Этиология первичной глаукомы: современные теории и исследования. Офтальмологические ведомости. 2015;7(2):47-56.
15. Астахов ЮС, Рахманов ВВ. Наследственность и глаукома. Офтальмол. ведомости. 2012;5(4):51-7.
16. Flammer J. Die glaukomatöse Optikusneuropathie: Ein Reperfusionsschaden [Glaucomatous optic neuropathy: a reperfusion injury]. *Klin Monbl Augenheilkd.* 2001 May;218(5):290-1. German. DOI: 10.1055/s-2001-15883
17. Dandona L. Glaucoma Intervention Study. *Ophthalmology.* 2000;107:1710-16.
18. Doyle A, Bensaïd A, Lachkar Y. Central corneal thickness in normal tension glaucoma: is it lower in patient without vascular risk factors. *European Glaucoma Society: Abstract Book; 2004, p. 93.*
19. Wiggs JL. Genetic etiologies of glaucoma. *Arch Ophthalmol.* 2007 Jan;125(1):30-7. DOI: 10.1001/archophth.125.1.30
20. Wiggs JL, Allingham RR, Vollrath D, Jones KH, De La Paz M, Kern J, et al. Prevalence of mutations in TIGR/Myocilin in patients with adult and juvenile primary open-angle glaucoma. *Am J Hum Genet.* 1998 Nov;63(5):1549-52. DOI: 10.1086/302098
21. Fingert JH, Héon E, Liebmann JM, Yamamoto T, Craig JE, Rait J, et al. Analysis of myocilin mutations in 1703 glaucoma patients from five different populations. *Hum Mol Genet.* 1999 May;8(5):899-905. DOI: 10.1093/hmg/8.5.899
22. Joe MK, Tomarev SI. Expression of myocilin mutants sensitizes cells to oxidative stress-induced apoptosis: implication for glaucoma pathogenesis. *Am J Pathol.* 2010 Jun;176(6):2880-90. DOI: 10.2353/ajpath.2010.090853
23. Pasutto F, Matsumoto T, Mardin CY, Sticht H, Brandstätter JH, Michels-Rautenstrauss K, et al. Heterozygous NTF4 mutations impairing neurotrophin-4 signaling in patients with primary open-angle glaucoma. *Am J Hum Genet.* 2009 Oct;85(4):447-56. DOI: 10.1016/j.ajhg.2009.08.016
24. Hauser MA, Sena DF, Flor J, Walter J, Auguste J, Larocque-Abramson K, et al. Distribution of optineurin sequence variations in an ethnically diverse population of

- low-tension glaucoma patients from the United States. *J Glaucoma*. 2006 Oct;15(5):358-63. DOI: 10.1097/01.jig.0000212255.17950.42
25. Swarup G, Sayyad Z. Altered Functions and Interactions of Glaucoma-Associated Mutants of Optineurin. *Front Immunol*. 2018 Jun 6;9:1287. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01287
26. Chalasani ML, Radha V, Gupta V, Agarwal N, Balasubramanian D, Swarup G. A glaucoma-associated mutant of optineurin selectively induces death of retinal ganglion cells which is inhibited by antioxidants. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007 Apr;48(4):1607-14. DOI: 10.1167/iovs.06-0834
27. Golubnitschaja-Labudova O, Liu R, Decker C, Zhu P, Haefliger IO, Flammer J. Altered gene expression in lymphocytes of patients with normal-tension glaucoma. *Curr Eye Res*. 2000 Nov;21(5):867-76. DOI: 10.1076/ceyr.21.5.867.5534
28. Grus FH, Joachim SC, Hoffmann EM, Pfeiffer N. Complex autoantibody repertoires in patients with glaucoma. *Mol Vis*. 2004 Feb 25;10:132-7.
29. Boehm N, Wolters D, Thiel U, Lossbrand U, Wiegel N, Pfeiffer N, et al. New insights into autoantibody profiles from immune privileged sites in the eye: a glaucoma study. *Brain Behav Immun*. 2012 Jan;26(1):96-102. DOI: 10.1016/j.bbi.2011.07.241
30. Tezel G, Seigel GM, Wax MB. Autoantibodies to small heat shock proteins in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998 Nov;39(12):2277-87.
31. Chen H, Cho KS, Vu THK, Shen CH, Kaur M, Chen G, et al. Commensal microflora-induced T cell responses mediate progressive neurodegeneration in glaucoma. *Nat Commun*. 2018 Aug 10;9(1):3209. DOI: 10.1038/s41467-018-05681-9
32. Mantravadi AV, Vadhar N. Glaucoma. *Prim Care*. 2015 Sep;42(3):437-49. DOI: 10.1016/j.pop.2015.05.008
33. Flammer J, Haefliger IO, Orgül S, Resink T. Vascular dysregulation: a principal risk factor for glaucomatous damage? *J Glaucoma*. 1999 Jun;8(3):212-9.
34. Ko ML, Peng PH, Ma MC, Ritch R, Chen CF. Dynamic changes in reactive oxygen species and antioxidant levels in retinas in experimental glaucoma. *Free Radic Biol Med*. 2005 Aug 1;39(3):365-73. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.03.025

35. Chrysostomou V, Rezania F, Trounce IA, Crowston JG. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in glaucoma. *Curr Opin Pharmacol*. 2013 Feb;13(1):12-5. DOI: 10.1016/j.coph.2012.09.008
36. Neal MJ, Cunningham JR, Hutson PH, Hogg J. Effects of ischaemia on neurotransmitter release from the isolated retina. *J Neurochem*. 1994 Mar;62(3):1025-33. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1994.62031025.x
37. Sucher NJ, Lipton SA, Dreyer EB. Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells. *Vision Res*. 1997 Dec;37(24):3483-93. DOI: 10.1016/S0042-6989(97)00047-3
38. Kaur C, Foulds WS, Ling EA. Hypoxia-ischemia and retinal ganglion cell damage. *Clin Ophthalmol*. 2008 Dec;2(4):879-89. DOI: 10.2147/opth.s3361
39. Shoeb Ahmad S, Abdul Ghani S, Hemalata Rajagopal T. Current Concepts in the Biochemical Mechanisms of Glaucomatous Neurodegeneration. *J Curr Glaucoma Pract*. 2013 May-Aug;7(2):49-53. DOI: 10.5005/jp-journals-10008-1137
40. Liu B, Neufeld AH. Nitric oxide synthase-2 in human optic nerve head astrocytes induced by elevated pressure in vitro. *Arch Ophthalmol*. 2001 Feb;119(2):240-5.
41. Жабоедов ГД, Курилина ЕИ, Петренко ОВ. Значение оксидного звена метаболизма в патогенезе первичной открытоугольной глаукомы. *Международ. мед. журнал*. 2003;9(2):62-4.
42. Курышева НИ. Глаукомная оптическая нейропатия. Москва: МЕДпресс-информ; 2006. 135 с.
43. Kashii S, Mandai M, Kikuchi M, Honda Y, Tamura Y, Kaneda K, et al. Dual actions of nitric oxide in N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotoxicity in cultured retinal neurons. *Brain Res*. 1996 Mar 4;711(1-2):93-101. DOI: 10.1016/0006-8993(95)01330-x
44. Воронина ЕВ, Лобанова НВ, Яхин ИР, Романова НА, Серегин ЮА. Роль фактора некроза опухолей-альфа в иммунопатогенезе заболеваний различной этиологии и его значимость в развитии антицитокиновой терапии моноклональными антителами. *Медицинская иммунология*. 2018;20(6):797-806. DOI: 10.15789/1563-0625-2018-6-797-806

45. Yuan L, Neufeld AH. Tumor necrosis factor-alpha: a potentially neurodestructive cytokine produced by glia in the human glaucomatous optic nerve head. *Glia*. 2000 Oct;32(1):42-50.
46. Weber AJ, Harman CD, Viswanathan S. Effects of optic nerve injury, glaucoma, and neuroprotection on the survival, structure, and function of ganglion cells in the mammalian retina. *J Physiol*. 2008 Sep 15;586(18):4393-400. DOI: 10.1113/jphysiol.2008.156729
47. Johnson EC, Guo Y, Cepurna WO, Morrison JC. Neurotrophin roles in retinal ganglion cell survival: lessons from rat glaucoma models. *Exp Eye Res*. 2009 Apr;88(4):808-15. DOI: 10.1016/j.exer.2009.02.004
48. Stern JH, Tian Y, Funderburgh J, Pellegrini G, Zhang K, Goldberg JL, et al. Regenerating Eye Tissues to Preserve and Restore Vision. *Cell Stem Cell*. 2018 Jun 1;22(6):834-849. DOI: 10.1016/j.stem.2018.05.013
49. Lewallen M, Xie T. Cell-based therapies for retinal degenerative diseases: a thousand strategies. *J Glaucoma*. 2013 Jun-Jul;22 Suppl 5:S42-5. DOI: 10.1097/IJG.0b013e3182934b45
50. Harrell CR, Fellabaum C, Arsenijevic A, Markovic BS, Djonov V, Volarevic V. Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells and Their Secretome in the Treatment of Glaucoma. *Stem Cells Int*. 2019 Dec 27;2019:7869130. DOI: 10.1155/2019/7869130
51. Mathew B, Ravindran S, Liu X, Torres L, Chennakesavalu M, Huang CC, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles and retinal ischemia-reperfusion. *Biomaterials*. 2019 Mar;197:146-160. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2019.01.016
52. Bull ND, Martin KR. Concise review: toward stem cell-based therapies for retinal neurodegenerative diseases. *Stem Cells*. 2011 Aug;29(8):1170-5. DOI: 10.1002/stem.676
53. Johnson TV, Bull ND, Martin KR. Stem cell therapy for glaucoma: possibilities and practicalities. *Expert Rev Ophthalmol*. 2011 Apr 1;6(2):165-174. DOI: 10.1586/eop.11.3

54. Cen LP, Ng TK. Stem cell therapy for retinal ganglion cell degeneration. *Neural Regen Res.* 2018 Aug;13(8):1352-3. DOI: 10.4103/1673-5374.235237
55. Vasyliiev RG, Gubar OS, Gordiienko IM, et al. Comparative analysis of biological properties of large-scale expanded adult neural crest-derived stem cells isolated from human hair follicle and skin dermis. *Stem Cells Int.* 2019;2019:9640790. DOI: 10.1155/2019/9640790
56. Vasyliiev RG, Rodnichenko AE, Zubov DA, et al. In vitro Properties of neural crest-derived multipotent stem cells from a bulge region of whisker follicle. *Biotechnologia Acta.* 2014;7(4):73-9. DOI: 10.15407/biotech7.04.071
57. Vasyliiev RG, Rodnichenko AE, Shamalo SN, et al. Effects of Neural Crest-Derived Multipotent Stem Cells on Regeneration of an Injured Peripheral Nerve in Mice. *Neurophysiology.* 2015;47:80-3. DOI: 10.1007/s11062-015-9501-6
58. Sun F, Ding XP, An SM, Tang YB, Yang XJ, Teng L, et al. Adrenergic DNA damage of embryonic pluripotent cells via β 2receptor signalling, *Sci. Rep.* 2015;5:15950. DOI: 10.1038/srep15950
59. Bindoli A, Deeble DJ, Rigobello MP, Galzigna L. Direct and respiratory chainmediated redox cycling of adrenochrome. *Biochim. Biophys. Acta.*1990;1016:349-56. DOI: 10.1016/0005-2728(90)90168-4
60. Mishra S, Chattopadhyay A, Naaz S, Ghosh AK, Das AR, Bandyopadhyay D. Oleic acid ameliorates adrenaline induced dysfunction of rat heart mitochondria by binding with adrenaline: An isothermal titration calorimetry study. *Life Sci.* 2019;218(1):96-111. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.12.035
61. Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.* 1995;268(5):699-722. DOI: 10.1152/ajplung.1995.268.5.699
62. Риков 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

63. 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.

РОЗДІЛ 5

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Глаукома є основною причиною незворотної сліпоти у всьому світі та займає найбільш важливе медико-соціальне місце серед первинної інвалідності по зору [1,2]. На жаль, незважаючи на високий рівень розвитку сучасних методів лікування даного захворювання, у більшості пацієнтів відзначається прогресування глаукомного процесу із втратою зорових функцій та порушенням якості життя [3]. Саме тому пошук нових підходів у лікуванні глаукоми залишається актуальною проблемою офтальмології.

За останні десятиліття проведено велику кількість досліджень у вивченні патогенетичних механізмів, які можуть призвести до апоптичної загибелі гангліонарних клітин сітківки (ГКС) при глаукомній оптичній нейропатії (ГОН). Ці механізми включають порушення аксонального транспорту, гіпоксію, екситотоксичність глутамату, аномальну імунну відповідь, мітохондріальну дисфункцію та розвиток оксидативного стресу. Проте підвищений внутрішньоочний тиск як механічний агент відіграє одну з основних ролей в патогенезі розвитку глаукомної оптичної нейропатії [4-6].

Насамперед запропоновані експериментальні моделі глаукоми, як *in vitro*, так *in vivo*, дають можливість поновому поглянути на патогенез ГОН. Результати цих досліджень дають уявлення про клітинні та молекулярні механізми апоптозу гангліонарних клітин сітківки при ГОН та сприяють розробці нейропротекторних методів лікування [7-9].

На сьогодні все більше досліджень спрямовані у бік нейропротекції, оскільки традиційні методи лікування глаукоми не можуть запобігти прогресуючій втраті ГКС [10]. Нейропротекцію можна визначити як терапевтичний підхід, спрямований на посилення шляхів виживання клітин та придушення шляхів дисфункції ГКС, що ведуть до їх загибелі. Пошук нових ефективних засобів з нейропротекторною дією триває і досі.

Так, завдяки досягненням в галузі біотехнології, молекулярної та клітинної біології, інтенсивно розвивається новий напрямок регенеративної медицини, що

націлений на заміну або відновлення відсутніх, дисфункціональних чи пошкоджених клітин. Одним з основних підходів регенеративної медицини є клітинна терапія з використанням стовбурових клітин (СК) [11].

При проведенні аналізу доступної нам літератури ми визначили, що результати експериментальних досліджень свідчать про два основних механізми дії трансплантованих стовбурових клітин, які також часто комбінуються. Структурний механізм дії – у цьому випадку після трансплантації СК відбувається їх приживлення, диференціація та інтеграція у пошкоджену тканину з заміною втрачених клітин. Паракринний (трофічний) механізм дії реалізується за рахунок секреції СК сигнальних молекул (переважно фактора росту), які мають широкий спектр ефектів, а саме: антиапоптичний, ангиогенний, імуномодулюючий, протизапальний та антимікробний, нейропротекторний, здатність до активація резидентних і хоумінг ендогенних стовбурових клітин [12].

Однак важливим питанням клітинної терапії залишається правильний і адекватний вибір клітинного типу. На сьогоднішній день в літературі зустрічається мало відомостей про можливість застосування постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня (мСК-ПНГ) при захворюваннях очей, а особливо глаукоми.

Постнатальні мультипотентні стовбурові клітини-похідні нервового гребеня з ряду причин є перспективним типом застосування клітинної терапії в лікуванні глаукомної оптичної нейропатії. Дорослі мСК-ПНГ, після трансплантації, в новому мікрооточенні здатні трансдиференціюватися в диференційовані клітинні типи, характерні для ЦНС, такі як олігодендроцити. Крім того, постнатальні мСК-ПНГ ідентифікуються в багатьох тканинах дорослих ссавців, зокрема і людей [13].

Результати досліджень, проведених на тваринних моделях, демонструють позитивний ефект використання постнатальних мСК-ПНГ для стимуляції регенерації ушкоджених периферичних нервів [14]. Крім того, ведення клітин після експериментального пошкодження орбіти та її вмісту стимулює відновні процеси в окоорухових м'язах та ретробульбарній клітковині [15].

Згідно сучасних уявлень нервовий гребінь (neural crest) – транзиторна структура в ході ембріонального розвитку хребетних. Нервовий гребінь (НГ) походить з ектодерми та формується із нейроктодерми на її кордоні з соматичною ектодермою. Після завершення процесу нейруляції клітини НГ зазнають епітеліо-мезенхімальної трансформації та мігрують дистантно по основних шляхах в тканини і органи ембріона, який розвивається, де і диференціюються в надзвичайно широкий спектр клітинних типів. Так, в дорослому організмі ссавців похідними НГ є нейрони і глія периферичної нервової системи, більшість сенсорних нейронів, клітини Меркеля, меланоцити, ряд ендокринних клітин, та частина строми тимуса [16,17]. Саме тому такий діапазон диференційованих клітинних типів похідних НГ передбачає існування мультипотентних стовбурових клітин НГ.

Протягом останнього десятиліття з цілого ряду тканин і органів дорослих ссавців виділені клітини-похідні НГ, які *in vitro* демонструють властивості мультипотентних стовбурових клітин. На сьогодні мСК-ПНГ виділені з наступних джерел: кістковий мозок, серце, тонкий кишковик, пульпа зуба, а також волосяний фолікул (бульбарний регіон – волосся голови і тулуба) [18-20].

Однак найбільш зручним з можливих джерел дорослих мСК-ПНГ є бульбарний регіон волосяного фолікула (вібрис лабораторних тварин) через мінімальну інвазивність його біопсії. Слід зазначити, що вперше постнатальні мСК-ПНГ були ідентифіковані та виділені з волосяного фолікула вібрисів миші [21].

Зауважимо, що вищевикладені дані дають підґрунтя для дослідження можливої трансдиференціації постнатальних мСК-ПНГ, зокрема у гангліонарні клітини сітківки та фоторецепторні клітини. Крім того, у культурі *in vitro* отримані мСК-ПНГ були здатні диференціювати в β -III-тубулін позитивні нейрони і клітини з морфологією і маркерами гліальних (в сукупності маркерів – швановські клітин) – S100 β , GFAP (гліальний фібрилярний кислий білок) і MBP (основний білок мієліну). Також мСК-ПНГ в культурі секретували важливі ангіогенні (FGF-2 (фактор росту фібробластів) і VEGF (фактор росту ендотелію судин)) та нейротрофічні фактори (NGF (фактор росту нервів), BDNF (мозковий нейротрофічний фактор), NT-3 і NT-

4/5 (нейротрофіни 3 і 4/5)), які здатні стимулювати проліферацію і диференціацію ендогенних клітин реципієнта.

Саме тому при плануванні нашого дослідження нас зацікавили властивості постнатальних мСК-ПНГ та можливість їх застосування при глаукомній оптичній нейропатії. Крім того, ми враховували той факт, що розробка нових ефективних методів лікування глаукоми залишається одним з найпоширеніших та актуальних питань сучасної офтальмології.

При проведенні аналізу відомих експериментальних моделей глаукоми ми відкинули математичні моделі, оскільки вони не відображають усіх аспектів живої системи [22]. Також ми не використовували моделі з короткотривалим підвищенням внутрішньоочного тиску (ВОТ), оскільки глаукома є хронічним довготривалим процесом.

Враховуючи відомі на сьогодні механізми розвитку глаукомної оптичної нейропатії, ми зупинили свій вибір на моделі підвищеного внутрішньоочного тиску із хронічним механізмом розвитку і структурними змінами сітківки та зорового нерва, що дозволила відтворити основну картину розвитку патологічного процесу [23].

Таким чином, завданнями нашого дослідження було вивчити вплив культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня на морфо-функціональний стан зорового аналізатора та біохімічний стан сітківки при адреналіновій моделі глаукоми за умов різних способів доставки клітин.

У дослідження були включені лабораторні тварини – щурі Wistar, самці віком 10-15 місяців (n=70), які склали групу інтактних щурів, групу з моделюванням глаукоми без введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ, групу з внутрішньовенним введенням культивованих постнатальних мСК-ПНГ, групу з парабульбарним введенням культивованих постнатальних мСК-ПНГ та групу з ретробульбарним введенням культивованих постнатальних мСК-ПНГ. У дослідженні була відтворена адреналін індукована модель глаукоми. Тваринам проводилось вимірвання ВОТ та визначення зорових викликаних потенціалів на

спалах. Проведені морфологічні, морфометричні та біохімічні дослідження сітківки та зорового нерва. Аналізувались дані, отримані до моделювання глаукоми, після моделювання глаукоми, через 1 та 3 місяці після введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ.

Аналіз отриманих результатів досліджень показав вірогідну позитивну динаміку щодо відновлення морфо-функціонального стану сітківки та зорового нерва після трансплантації культивованих постнатальних мСК-ПНГ.

Встановлено зменшення набряків шарів сітківки та нормалізація цитоархітекtonіки після введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ. Через 1 місяць після парабульбарного введення клітин відзначено покращення морфології волокон внутрішнього сітчастого шару, ядра клітин внутрішнього ядерного шару прилягають один до одного. У зовнішньому ядерному шарі збережено вертикальне впорядковане розташування ядер клітин, однак, виявлено виражений набряк на окремих ділянках, переважно на периферії сітківки. В шарі паличок і колбочок відмічено значно менший набряк цитоплазми і міжклітинного простору. Після ретробульбарного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ набряк шарів сітківки був найменшим. При цьому зовнішній сітчастий шар добре виражений, в зовнішньому ядерному шарі виявлено помірний набряк.

Через 3 місяці після введення клітин середнє значення товщини внутрішнього сітчастого шару сітківки становило $15 \pm 2,7$ мкм та $12,5 \pm 1,5$ мкм, внутрішнього ядерного шару сітківки – $13,7 \pm 1,1$ мкм та $11,9 \pm 1,3$ мкм, зовнішнього ядерного шару сітківки – $37,4 \pm 1,7$ мкм та $35,6 \pm 0,7$ мкм, шару паличок і колбочок – $15,8 \pm 0,9$ мкм та $15,2 \pm 0,7$ мкм, при парабульбарному та ретробульбарному введенні клітин відповідно.

Через 3 місяці після введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ відмічається відновлення цитоархітекtonіки внутрішнього і зовнішнього ядерних шарів, ядра гангліонарних клітин базофільні при парабульбарному введенні клітин. При ретробульбарному введенні культивованих постнатальних мСК-ПНГ відмічено появу ділянок центральної і периферичної сітківки з незначним набряком та

вираженим ступенем відновленої цитоархітекτονіки шарів. Ядра гангліонарних клітин слабо базофільні.

Аналіз результатів показав найбільш виражений ефект від клітинної терапії з парабульбарним і ретробульбарним введенням культивованих постнатальних мСК-ПНГ – зменшення набряку всіх шарів сітківки, відновлення кількості волокон і синаптичних контактів у внутрішньому і зовнішньому сітчастих шарах, нормалізація і відновлення структурної організації зовнішнього та внутрішнього ядерних шарів сітківки.

Проте, поряд з позитивними морфологічними змінами зберігалися морфологічні ознаки, характерні для патологічних процесів. Відмічено ядра клітин у внутрішньому сітчастому шарі, що можливо обумовлено міграцією клітин внутрішнього ядерного шару, імовірно, біполярних нейронів та слабка базофілія частини ядер внутрішнього ядерного шару, що можливо свідчить про збереження деструктивних процесів в цих ядрах.

Також на 1 та 3 місяці спостереження після внутрішньовенного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ спостерігали набряк нервових волокон та внутрішнього сітчастого шару, а також гомогенізацію їх цитоплазми. Крім того, залишався вираженим набряк внутрішнього ядерного шару. Однак, такі патологічні зміни виражені набагато слабше, ніж в групі тварин з моделлю глаукоми без введення клітин.

Крім того, 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, зниження кількості клітинних елементів астроцитів. Виявлено, що через 1 місяць після парабульбарного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ показник питомої кількості нервових волокон був достовірно більше 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 відносно групи тварин з моделлю глаукоми без введення клітин. Після ретробульбарного введення 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, $p = 0,0006$) відносно групи тварин з моделлю глаукоми без введення клітин та через 3 місяці не відрізнявся від показника у групі тварин з моделлю глаукоми без введення клітин (Tukey's test, $p = 0,1910$).

У нашому дослідженні для оцінки ступеня збереження зорового шляху на різних рівнях та функціонального стану різних ланок зорового аналізатора ми використовували зорові викликані коркові потенціали на спалах [24]. За результатами проведених досліджень встановлено, що протягом розвитку глаукомного процесу відзначаються зміни показників зорових викликаних коркових потенціалів, а саме, тенденція до подовження періоду латентності та зменшення амплітуди [25].

Аналіз результатів дослідження функціонального стану зорового аналізатора після введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ показав, що при парабульбарному введенні клітин настає зниження латентного періоду за параметром N1 та P2 на 1,5 мс (95% ВІ 1,3 мс – 1,7 мс) ($p < 0,05$) та на 1,4 мс (95% ВІ 0,95 мс – 2,0 мс) ($p < 0,05$), при ретробульбарному введенні клітин на 1,75 мс (95% ВІ 1,5 мс – 1,95 мс) ($p < 0,05$) та на 2,15 мс (95% ВІ 1,8 мс – 2,5 мс) ($p < 0,05$) відповідно. При внутрішньовенному введенні клітин виявлено тенденцію до зниження латенції N1 та P2, а саме, на 0,85 мс (95% ВІ 0,6 мс – 1,1 мс) ($p < 0,05$) та 1,3 мс (95% ВІ 0,8 мс – 2,0 мс) ($p < 0,05$) відповідно.

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

ВІ 1,6 мкВ – 1,85 мкВ) ($p < 0,05$), при ретробульбарному введенні – на 2,1 мкВ (95% ВІ 1,8 мкВ – 2,2 мкВ) ($p < 0,05$).

Завдяки експериментальним дослідженням останніх років щодо можливості застосування клітинної терапії із застосуванням культивованих постнатальних мСК-ПНГ як нейропротекції стало відомо про такі основні біологічні властивості культивованих постнатальних мСК-ПНГ, як продукція широкого спектру факторів росту та цитокінів, що мають нейротрофічну, нейропротекторну та анти-апоптичну дію [26,27]. Саме тому ми вирішили дослідити вплив культивованих постнатальних мСК-ПНГ на біохімічний стан сітківки при адреналіновій моделі глаукоми.

Результати наших досліджень виявили зміни надпродукції активних форм кисню та продуктів перекисного окислення ліпідів після парабульбарного та ретробульбарного введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ. Встановлено зменшення супероксидного аніон-радикала на 48,31% ($p < 0,05$) та гідроксильного радикала на 55,1% ($p < 0,05$), відмічено збільшення вмісту проміжних продуктів окислення ліпідів мембран дієнових кон'югатів на 78,6% ($p < 0,05$) та вмісту кінцевого метаболіту перекисного окислення ліпідів малонового діальдегіду на 59,9% ($p < 0,05$) порівняно зі значеннями в групі тварин без введення клітин.

Дуже цікавим, на нашу думку, виявився факт наявності тенденції до позитивного впливу культивованих постнатальних мСК-ПНГ на зниження величини ВОТ. Згідно результатів дослідження встановлено, що парабульбарна та ретробульбарна доставка клітин є кращою ($p < 0,05$), ніж внутрішньовенне введення клітин. Однак необхідні подальші дослідження механізмів впливу культивованих постнатальних мСК-ПНГ на зміни ВОТ при адреналіновій моделі глаукоми.

Таким чином, проведені нами дослідження дозволили встановити позитивний вплив культивованих постнатальних мСК-ПНГ на морфо-функціональні зміни зорового аналізатора при адреналіновій моделі глаукоми, який найбільш виражений при парабульбарному та ретробульбарному введенні клітин.

На нашу думку, отримані результати дослідження щодо відновлення кількості повноцінних нервових волокон у тварин після введення культивованих постнатальних мСК-ПНГ можна пояснити здатністю клітин до протекції

гангліонарних нейронів сітківки та макроглії (астроцитів, олігодендроцитів) та покращенням васкуляризації ушкодженого нерва, що обумовлено здатністю стовбурових клітин експресувати відповідні фактори.

Таким чином, співставлення літературних даних з нашими вказує на важливу роль культивованих постнатальних мСК-ПНГ в процесах нейрорегенерації і може свідчити про можливість їх використання як нейропротекторного лікування глаукоми.

Слід зазначити, що отримані нами результати досліджень відкривають широкі перспективи щодо застосування клітинної терапії з використанням культивованих постнатальних мСК-ПНГ як нових шляхів нейрорегенерації. Крім того, все вищезазначене свідчить про доцільність подальших досліджень з метою вивчення та удосконалення застосування культивованих постнатальних мСК-ПНГ у пацієнтів з глаукомою та дозволить знизити рівень слабобачення та сліпоти від цього складного інвалідизуючого захворювання.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ У РОЗДІЛІ 5

1. Flaxman SR, Bourne RRA, Resnikoff S, Ackland P, Braithwaite T, Cicinelli MV, et al. Vision Loss Expert Group of the Global Burden of Disease Study. Global causes of blindness and distance vision impairment 1990-2020: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*. 2017 Dec;5(12):e1221-e1234. DOI: 10.1016/S2214-109X(17)30393-5
2. Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol*. 2006 Mar;90(3):262-7. DOI: 10.1136/bjo.2005.081224
3. Peters D, Bengtsson B, Heijl A. Lifetime risk of blindness in open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol*. 2013 Oct;156(4):724-30. DOI: 10.1016/j.ajo.2013.05.027
4. Hail JrN, Carter BZ, Konopleva M, Andreeff M. Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys. *Apoptosis*. 2006;11:889-904.
5. Mönter VM, Crabb DP, Artes PH. Reclaiming the Periphery: Automated Kinetic Perimetry for Measuring Peripheral Visual Fields in Patients With Glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017 Feb 1;58(2):868-75. DOI: 10.1167/iovs.16-19868
6. Cordeiro MF, Normando EM, Cardoso J, Miodragovic S, Jeylani S, Davis BM, et al. Real-time imaging of single neuronal cell apoptosis in patients with glaucoma. *Brain*. 2017;140(6):1757-67. DOI: 10.1093/brain/awx088
7. Петров СЮ, Суббот АМ, Волжанин АВ. Экспериментальная модель глаукомы у животных. Точка зрения. Восток-Запад. 2018;3:139-42. DOI: 10.25276/2410-1257-2018-139-142
8. Almasieh M, Levin LA. Neuroprotection in Glaucoma: Animal Models and Clinical Trials. *Annu Rev Vis Sci*. 2017 Sep 15;3:91-120. DOI: 10.1146/annurev-vision-102016-061422
9. Алябьева ЖЮ, Романова ТБ, Липатова ВА, Ботчей ВМ. Экспериментальные модели глаукомы в свете исследований новых нейропротекторов. *РМЖ Клиническая офтальмология* 2015;15(3):145-9.
10. Gauthier AC, Liu J. Neurodegeneration and Neuroprotection in Glaucoma. *Yale J Biol Med*. 2016 Mar 24;89(1):73-9.

11. Mao AS, Mooney DJ. Regenerative medicine: Current therapies and future directions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Nov 24;112(47):14452-9. DOI: 10.1073/pnas.1508520112
12. Oswald J, Baranov P. Regenerative medicine in the retina: from stem cells to cell replacement therapy. *Ther Adv Ophthalmol*. 2018 Apr 26;10:1-21. DOI: 10.1177/2515841418774433
13. Коломийцев АК, Чайковский ЮБ, Терещенко ТЛ. Быстрый метод импрегнации азотнокислым серебром элементов периферической нервной системы, пригодный для целлоидиновых и парафиновых срезов. *Архив анатомии, гистологии и эмбриологии*. 1981;8:93-6.
14. Цимбалюк ВІ, Петрів ТІ, Васильєв РГ, та співав. Відновлення функції сідничного нерва з використанням засобів тканинної інженерії після його повного перетину в експерименті. *Міжнародний неврологічний журнал*. 2018;1(95):12-18.
15. Чепурний ЮВ, Кустрьо ТВ, Корсак АВ, та співав. Вплив постнатальних мультипотентних стовбурових клітин (похідних нервового гребня) на перебіг регенерації в зоні експериментального пошкодження м'якотканинного вмісту орбіти ока. *Проблемы криобиологии и криомедицины*. 2018;28(1):59-63.
16. Dupin E, Creuzet S, Le Douarin N. The contribution of the neural crest to the vertebrate body. *Adv Exp Med Biol*. 2006;589:96-119.
17. Hall BK. *The neural crest and neural crest cells in vertebrate development and evolution*. New York: Springer; 2009. 400 p.
18. Hunt D, Sajic M, Phillips H, et al. Origins of gliogenic stem cell populations within adult skin and bone marrow. *Stem Cells Dev*. 2010;19(7):1055-65.
19. Janebodin K, Horst OV, Ieronimakis N, et al. Isolation and characterization of neural crest-derived stem cells from dental pulp of neonatal mice. *PLoS One*. 2011;6(11):e27526. DOI: 10.1371/journal.pone.0027526
20. Sieber-Blum M, Grim M, Hu Y, et al. Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle. *Dev Dyn*. 2004;231(2):258-69.
21. Achilleos A, Trainor PA. Neural crest stem cells: discovery, properties and potential for therapy. *Cell Res*. 2012 Feb;22(2):288-304. DOI: 10.1038/cr.2012.11

22. Морщина АА, Морщина ДА. О математическом моделировании глаукомы. Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 1. Математика. Механика. Астрономия. 2014;1(1):144-51.
23. Михейцева ІМ, винахідник. Спосіб моделювання хронічного підвищеного внутрішньоочного тиску у щурів. Патент України №38446. 2009 Січ 12.
24. Heckenlively JR, Arden GB, editors. Principles and practice of clinical electrophysiology of vision. Second edition; 2006. 977 p.
25. Firan AM, Istrate S, Iancu R, et al. Visual evoked potential in the early diagnosis of glaucoma. Literature review. Romanian Journal of Ophthalmology. 2020 Jan-Mar;64(1):15-20.
26. Vasyliiev RG, Gubar OS, Gordiienko IM, et al. Comparative analysis of biological properties of large-scale expanded adult neural crest-derived stem cells isolated from human hair follicle and skin dermis. Stem Cells Int. 2019;2019:9640790. DOI: 10.1155/2019/9640790
27. Vasyliiev RG, Rodnichenko AE, Shamalo SN, et al. Effects of Neural Crest-Derived Multipotent Stem Cells on Regeneration of an Injured Peripheral Nerve in Mice. Neurophysiology. 2015;47:80-3. DOI: 10.1007/s11062-015-9501-6

ВИСНОВКИ

1. Глаукома – займає одне з перших місць серед причин сліпоти в усьому світі. Пошук нових засобів та методів лікування глаукомної оптичної нейропатії, які можуть бути використані як нейропротекторне лікування триває і досі. Питання щодо можливості застосування стовбурових клітин як нейропротекторне лікування глаукоми, які джерела та типи є оптимальними для нейропротекції, яка кількість клітин та який шлях трансплантації найбільш ефективний при глаукомній оптичній нейропатії, залишається актуальним науково-прикладним завданням сучасної офтальмології.
2. Після моделювання глаукоми відзначено розвиток дегенеративних змін, що характерні для глаукомної оптичної нейропатії. У сітківці щурів відзначено часткове відшарування аксонів від внутрішнього сітчастого шару, в ядрах гангліонарних клітин сітківки слабшає базофілія та спостерігається їх гіпертрофія. Виявлено міграцію клітин внутрішнього ядерного шару у внутрішній сітчастий шар, в шарі паличок і колбочок відзначено розвиток набряку, що призводить до порушення цілісності мембран. Відмічено значне потовщення всіх шарів сітківки в результаті розвитку набряку у порівнянні з групою інтактних щурів. У зривому нерві атрофічні та дегенеративні зміни проявляються у вигляді зниження кількості нервових волокон та підвищення кількості клітинних елементів, порушення впорядкованості нервових волокон та колонок гліальних клітин.
3. В результаті введення культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня відбувалось зменшення набряків всіх шарів сітківки, відновлення кількості волокон і синаптичних контактів у внутрішньому і зовнішньому сітчастих шарах, нормалізація і відновлення структурної організації зовнішнього та внутрішнього ядерних шарів, зменшення набряку та впорядкованість розташування волокон в шарі паличок і колбочок, що найбільш виражено при парабульбарному та ретробульбарному введенні клітин. При цьому, середнє значення товщини внутрішнього сітчастого шару сітківки становило $15 \pm 2,7$ мкм та $12,5 \pm 1,5$ мкм, внутрішнього ядерного шару сітківки – $13,7 \pm 1,1$ мкм та $11,9 \pm 1,3$ мкм, зовнішнього ядерного шару сітківки – $37,4 \pm 1,7$ мкм

та $35,6 \pm 0,7$ мкм, шару паличок і колбочок – $15,8 \pm 0,9$ мкм та $15,2 \pm 0,7$ мкм, через 3 місяці після парабульбарного та ретробульбарного введення клітин відповідно, та статистично значимо не відрізнялось від групи контролю ($p > 0,05$).

4. Встановлено, що введення культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня ініціює прискорення та підвищення якості регенерації зорового нерва, про що свідчить відновлення кількості повноцінних нервових волокон, колонок гліальних клітин, які утворені переважно із олігодендроцитів, зниження кількості клітинних елементів астроцитів. Виявлено, що при парабульбарному введенні культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня показник питомої кількості нервових волокон був більше на 53,97% (Tukey's test, $p < 0,0001$) та при ретробульбарному введенні – на 50,61% (Tukey's test, $p < 0,0001$) відносно групи тварин з моделлю глаукоми без введення клітин, через 3 місяці спостереження.
5. Введення культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня у експериментальних тварин призводить до зниження латентного періоду зорових викликаних потенціалів на спалах 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) ($p < 0,05$); також призводить до збільшення амплітуди P1-N1 при парабульбарному введенні клітин в середньому на 1,5 мкВ (95% ВІ 1,2 мкВ – 1,6 мкВ) ($p < 0,05$), при ретробульбарному введенні клітин в середньому на 1,5 мкВ (95% ВІ 1,2 мкВ – 1,6 мкВ) ($p < 0,05$) та збільшення амплітуди N1-P2 при парабульбарному введенні клітин в середньому на 1,75 мкВ (95% ВІ 1,6 мкВ – 1,85 мкВ) ($p < 0,05$), при ретробульбарному введенні клітин в середньому на 2,1 мкВ (95% ВІ 1,8 мкВ – 2,2 мкВ) ($p < 0,05$).

6. Парабульбарне та ретробульбарне введення культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня мало позитивний вплив на зміни маркерів оксидативного стресу сітківки при адреналіновій моделі глаукоми. Встановлено зменшення супероксидного аніон-радикала на 48,31% ($p < 0,05$) та гідроксильного радикала на 55,1% ($p < 0,05$) порівняно зі значеннями у групі тварин без введення клітин.
7. Отримані результати дослідження впроваджені в навчальний процес на кафедрах офтальмології Національного університету охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика (м. Київ), Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (м. Львів), Української медичної стоматологічної академії (м. Полтава), Одеського національного медичного університету (м. Одеса), Національного медичного університету імені О. О. Богомольця (м. Київ), ДЗ «Дніпропетровська медична академія» (м. Дніпро).

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Розроблений метод клітинної терапії з використанням культивованих постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня при індукованій адреналіновим стресом моделі глаукоми за умов різних способів доставки клітин в експерименті може бути рекомендований для включення в програми навчання лікарів-інтернів, підвищення кваліфікації лікарів-офтальмологів, гістологів, морфологів, біотехнологів задля вивчення властивостей клітин, засобів моделювання глаукоми, ступеня відновлення морфо-функціональних змін зорового аналізатора при різних способах доставки клітин та оцінки ефективності і можливості застосування нейропротекторної терапії у пацієнтів з глаукомою.

ДОДАТКИ

Додаток №1

Акти впровадження результатів роботи у науковій та практичній діяльності

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор

Національної медичної

академії післядипломної освіти

імені П. Л. Шупика

член кор. НАМН України,

професор Вдовиченко Ю.П.



2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** Визначення ефективності застосування постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня при адреналіновій моделі глаукоми в експерименті.
2. **Установа – розробник, автор:** Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика (вул. Дорогожицька, 9, м. Київ, 04112), кафедра офтальмології, Риков Сергій Олександрович, Петренко Оксана Василівна, Яковець Антоніна Іванівна.
3. **Джерело інформації:** 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; 2:40-46.
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра офтальмології Національної медичної академії післядипломної освіти імені П.Л. Шупика.
5. **Форми впровадження:** матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри – лекційному курсі та при проведенні практичних занять, в лікувально-діагностичній роботі.
6. **Термін впровадження:** січень 2019 – квітень 2020 року.
7. **Зауваження та пропозиції:** впровадження дозволить підвищити ефективність лікування глаукоми; розробити засоби моделювання глаукоми та визначити метод застосування клітинної терапії з використанням постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня в лікуванні глаукоми при різних способах доставки; деталізувати метод застосування клітинної терапії при лікуванні захворювань органу зору під час викладання теми «Методи лікування в офтальмології».
8. **Протокол засідання кафедри №4 від 01 квітня 2020 року.**

Завідувач кафедри офтальмології
д. мед. н., професор

Риков С.О.

Продовження додатку №1



ЗАТВЕРДЖУЮ

Ректор Львівського національного
медичного університету
імені Данила Галицького
академік НАМН України

проф. Б.С. Зіменковський
13 "березня" 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** Визначення ефективності застосування постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня при адреналіновій моделі глаукоми в експерименті.
2. **Установа – розробник, автор:** Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика (вул. Дорогожицька, 9, м. Київ, 04112), кафедра офтальмології, Риков Сергій Олександрович, Яковець Антоніна Іванівна.
3. **Джерело інформації:** Яковець А. І. Клітинна терапія глаукомної оптичної нейропатії в експерименті (короткострокові результати). Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П. Л. Шупика». 2018; 32:33-40.
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра офтальмології ФПДО Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.
5. **Форми впровадження:** матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри – лекційному курсі та при проведенні практичних занять, у лікувально-діагностичній роботі.
6. **Термін впровадження:** січень 2019 – березень 2020 року.
7. **Зауваження та пропозиції:** впровадження дозволить підвищити ефективність лікування глаукоми; розробити засоби моделювання глаукоми та визначити метод застосування клітинної терапії з використанням постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня в лікуванні глаукоми при різних способах доставки; деталізувати метод застосування клітинної терапії при лікуванні захворювань органу зору під час викладання теми «Методи лікування в офтальмології».
8. **Протокол засідання кафедри № 9 від 10 березня 2020 року.**

Завідувач кафедри офтальмології ФПДО
Львівського національного медичного університету
імені Данила Галицького,
д.мед.н., проф.

Гудзь А.С.

Продовження додатку №1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор з науково-педагогічної роботи
Української медичної
стоматологічної академії
професор, д. мед. н. Дворник В. М.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** Визначення ефективності застосування постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня при адреналіновій моделі глаукоми в експерименті.
2. **Установа – розробник, автор:** Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика (вул. Дорогожицька, 9, м. Київ, 04112), кафедра офтальмології, Риков Сергій Олександрович, Яковець Антоніна Іванівна.
3. **Джерело інформації:** Яковець А. І. Клітинна терапія глаукомної оптичної нейропатії в експерименті (короткострокові результати). Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П. Л. Шупика». 2018; 32:33-40.
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра офтальмології Української медичної стоматологічної академії.
5. **Форми впровадження:** матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри – лекційному курсі та при проведенні практичних занять, в лікувально-діагностичній роботі.
6. **Термін впровадження:** січень 2019 – квітень 2020 року.
7. **Зауваження та пропозиції:** впровадження дозволить підвищити ефективність лікування глаукоми; розробити засоби моделювання глаукоми та визначити метод застосування клітинної терапії з використанням постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня в лікуванні глаукоми при різних способах доставки; деталізувати метод застосування клітинної терапії при лікуванні захворювань органу зору під час викладання теми «Методи лікування в офтальмології».

Протокол засідання кафедри № 18 від 27 квітня 2020 року.

Відповідальний за впровадження
Професор кафедри оториноларингології
з офтальмологією
д. мед. н., професор

Безкоровайна І. М.

Продовження додатку №1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

в. о. проректора з науково-педагогічної
(учбово-методичної) роботиОдеського національного медичного
університету МОЗ України,
д. мед. н., професор Шмакова І. П.

« 02 » 06 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** Визначення ефективності застосування постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня при адреналіновій моделі глаукоми в експерименті.
2. **Установа – розробник, автор:** Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика (вул. Дорогожицька, 9, м. Київ, 04112), кафедра офтальмології, Риков Сергій Олександрович, Петренко Оксана Василівна, Яковець Антоніна Іванівна.
3. **Джерело інформації:** 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; 2:40-46
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра офтальмології Одеського національного медичного університету МОЗ України.
5. **Форми впровадження:** матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри – лекційному курсі та при проведенні практичних занять, в лікувально-діагностичній роботі.
6. **Термін впровадження:** січень 2019 – квітень 2020 року.
7. **Зауваження та пропозиції:** впровадження дозволить підвищити ефективність лікування глаукоми; розробити засоби моделювання глаукоми та визначити метод застосування клітинної терапії з використанням постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня в лікуванні глаукоми при різних способах доставки; деталізувати метод застосування клітинної терапії при лікуванні захворювань органу зору під час викладання теми «Методи лікування в офтальмології».
8. **Протокол засідання кафедри № 8 від 29.05. 2020 року.**

Завідувач кафедри офтальмології
Д. мед. н., професор

Л. В. Венгер

Продовження додатку №1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор
з науково-педагогічної роботи та
післядипломної освіти
Національного медичного
університету імені О. О. Богомольця
МОЗ України,
професор Кучин Ю.Л.



2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** Визначення ефективності застосування постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня при адреналіновій моделі глаукоми в експерименті.
2. **Установа – розробник, автор:** Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика (вул. Дорогожицька, 9, м. Київ, 04112), кафедра офтальмології, Риков Сергій Олександрович, Петренко Оксана Василівна, Яковець Антоніна Іванівна.
3. **Джерело інформації:** 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; 2:40-46.
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра офтальмології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця.
5. **Форми впровадження:** матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри – лекційному курсі та при проведенні практичних занять, в лікувально-діагностичній роботі.
6. **Термін впровадження:** січень 2019 – квітень 2020 року.
7. **Зауваження та пропозиції:** впровадження дозволить підвищити ефективність лікування глаукоми; розробити засоби моделювання глаукоми та визначити метод застосування клітинної терапії з використанням постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня в лікуванні глаукоми при різних способах доставки; деталізувати метод застосування клітинної терапії при лікуванні захворювань органу зору під час викладання теми «Методи лікування в офтальмології».
8. **Протокол засідання кафедри №14 від 10.06.2020 року.**

Завідувач кафедри офтальмології
Національного медичного університету
імені О. О. Богомольця МОЗ України
д. мед. н., доцент

Д. Г. Жабоедов

Продовження додатку №1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор
з науково-педагогічної роботи
ДЗ «Дніпропетровська медична
академія МОЗ України»

д. мед. н., професор
Науменко Л. Ю.



«16» _____ 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** Визначення ефективності застосування постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня при адреналіновій моделі глаукоми в експерименті.
2. **Установа – розробник, автор:** Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика (вул. Дорогожицька, 9, м. Київ, 04112), кафедра офтальмології, Риков Сергій Олександрович, Петренко Оксана Василівна, Яковець Антоніна Іванівна.
3. **Джерело інформації:** 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; 2:40-46.
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра офтальмології ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»
5. **Форми впровадження:** матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри – лекційному курсі та при проведенні практичних занять, в лікувально-діагностичній роботі.
6. **Термін впровадження:** січень 2019 – квітень 2020 року.
7. **Зауваження та пропозиції:** впровадження дозволить підвищити ефективність лікування глаукоми; розробити засоби моделювання глаукоми та визначити метод застосування клітинної терапії з використанням постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня в лікуванні глаукоми при різних способах доставки; деталізувати метод застосування клітинної терапії при лікуванні захворювань органу зору під час викладання теми «Методи лікування в офтальмології».
8. **Протокол засідання кафедри № 20 від 12.06. 2020 року.**

Професор кафедри
офтальмології
д. мед. н., професор

В.М. Сакович

Додаток №2. Список публікацій здобувача

Наукові праці в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

1. [66] 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. [62] Риков 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. [130] 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. [129] 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. [108] 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. [123] 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. (Тези, стендова доповідь).
7. [131] Рыков СА, Петренко ОВ, Яковець АІ, 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. (Тези).

8. [125] 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. (*Тези*).
9. [128] 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. (*Тези, стендова доповідь*).
10. [126] Петренко ОВ, Яковець АІ, Клименко ПП, Зубов ДА, Родніченко АЕ, Васильев РГ. Застосування клітинних технологій в лікуванні глаукомної оптичної нейропатії. В: Риков СО, редактор. Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю. Рефракційний пленер'17; 2017 Жов 20-21; Київ. Київ; 2017, с. 94-5. (*Тези, усна доповідь*).
11. [132] Риков 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. (*Тези, усна доповідь*).
12. [127] 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. (*Тези, усна доповідь*).
13. [133] Рыков СА, Петренко ОВ, Яковец АИ, Зубов ДА, Васильев РГ. Перспективы использования мультипотентных стволовых клеток-производных нервного гребня в офтальмологии. Матеріали XIV з'їзду офтальмологів України; 2018 Трав 23-25; Одеса. Одеса: Чорномор'я; 2018, с. 264-5. (*Тези, стендова доповідь*).
14. [124] 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. (*Тези*).

15. [122] 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. *(Тези, усна доповідь)*.
16. [65] 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. *(Тези)*.
17. [63] 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. *(Тези, усна доповідь)*.