

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
MEDICINOS AKADEMIJA

Rūta Mačiulaitienė

**NEUROPROTEKCINIŲ SAVYBIŲ
TURINČIŲ VAISTŲ SISTEMINIO IR
VIETINIO POVEIKIŲ TINKLAINĖS
LAŠTELĖMS VERTINIMAS NAUDOJANT
IKIKLINIKINĮ PELĖS REGOS NERVO
SUSPAUDIMO MODELĮ**

Daktaro disertacija
Medicinos ir sveikatos mokslai,
medicina (M 001)

Kaunas, 2025

Disertacija rengta 2014–2024 metais Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Akių ligų klinikoje.

Mokslinė vadovė

prof. dr. Ingrida Janulevičienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Konsultantas

doc. dr. Giedrius Kalesnykas (Tampėrės universitetas, Suomija, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Disertacija ginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkė

prof. dr. Dalia Žaliūnienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Narės:

prof. dr. Rasa Liutkevičienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001);

prof. dr. Ingrida Ulozienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001);

prof. dr. Janina Tutkuvienė (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001);

prof. dr. Miriam Kolko (Kopenhagos universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Disertacija ginama viešajame Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos mokslo krypties tarybos posėdyje 2025 m. kovo 28 d. 14 val. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Akių ligų klinikos Prof. P. Avižonio auditorijoje.

Disertacijos gynimo vietos adresas: Eivenių g. 2, LT-50161 Kaunas, Lietuva.

LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES
MEDICAL ACADEMY

Rūta Mačiulaitienė

**EVALUATION OF THE
NEUROPROTECTIVE PROPERTIES
OF LOCAL AND SYSTEMIC AGENTS
ON RETINAL CELLS IN THE MURINE
OPTIC NERVE CRUSH MODEL**

Doctoral Dissertation
Medical and Health Sciences,
Medicine (M 001)

Kaunas, 2025

The doctoral dissertation has been prepared at the Department of Ophthalmology of the Medical Academy of Lithuanian University of Health Sciences during period of 2014–2024.

Scientific Supervisor

Prof. Dr. Ingrida Janulevičienė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

Consultant

Assoc. Prof. Dr. Giedrius Kalesnykas (University of Tampere, Finland, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

Dissertation is defended at the Medical Research Council of Lithuanian University of Health Sciences:

Chairperson

Prof. Dr. Dalia Žaliūnienė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

Members:

Prof. Dr. Rasa Liutkevičienė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001);

Prof. Dr. Ingrida Ulozienė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001);

Prof. Dr. Janina Tutkuvienė (Vilnius University, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001);

Prof. Dr. Miriam Kolko (University of Copenhagen, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

Dissertation will be defended at the open session of the Medical Research Council of Lithuanian University of Health Sciences on 28th of March 2025 at 2 p.m. in the Prof. P. Avižonis Auditorium of the Department of Ophthalmology of Lithuanian University of Health Sciences.
Address: Eivenių 2, LT-50161 Kaunas, Lithuania.

TURINYS

SANTRUMPOS	7
ĮVADAS	8
1. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI.....	10
1.1. Darbo tikslas.....	10
1.2. Darbo uždaviniai	10
1.3. Mokslinis naujumas.....	10
1.4. Autoriaus indėlis.....	10
2. LITERATŪROS APŽVALGA	12
2.1. Glaukomos patofiziologiniai mechanizmai.....	12
2.1.1. Tinklainės ganglinių ląstelių svarba	12
2.1.2. TGL žūties mechanizmai sergant glaukoma.....	15
2.1.3. Glijos ląstelių vaidmuo glaukomos patogenezei.....	20
2.1.3.1. Makroglija.....	20
2.1.3.2. Mikroglija	22
2.1.3.3. Glijos ląstelių tarpusavio sąveika.....	23
2.2. Neuroprotekcija, neuroregeneracija ir neurostimuliacija.....	24
2.3. Farmakologiniai preparatai, turintys neuroprotekcinį poveikį tinklainės ląstelėms gydant neurodegeneracines ligas	25
2.3.1. Brimonidinas	28
2.3.2. Memantinas	29
2.3.3. Levetiracetamas.....	29
2.4. Iki klinikiniai gyvūnų neuroprotekcijos tyrimų modeliai	30
3. TIRIAMIEJI IR METODAI.....	32
3.1. Eksperimentinių tyrimų struktūra.....	32
3.1.1. I etapo tyrimo struktūra: brimonidino neuroprotekcijos tyrimai naudojant regos nervo suspaudimo Balb/c pelių modelį	32
3.1.2. II etapo tyrimo struktūra: memantino ir levetiracetamo neuroprotekcijos tyrimai naudojant regos nervo suspaudimo C57Bl/6J pelių modelį	35
3.2. Tiriamųjų gyvūnų charakteristika.....	37
3.3. Tyrimo metodai	38
3.3.1. Regos nervo suspaudimas pelės modelyje	38
3.3.2. Akių dugno nuotraukos	39
3.3.3. Spektrinė domeno–optinė koherentinė tomografija (SD-OKT), spalvinė OKT doplerografija.....	39
3.3.4. Ganglinių ląstelių komplekso storio matavimai.....	40
3.3.5. Vaistinių preparatų skyrimas ir paruošimas.....	41
3.3.5.1. Brimonidino vartojimas	41
3.3.5.2. Memantino paruošimas ir vartojimas.....	41
3.3.5.3. Levetiracetamo paruošimas ir vartojimas	42
3.3.6. Tinklainės preparatų ruošimas ir imunohistocheminis dažymas	42
3.3.7. Tinklainės ląstelių analizė	43
3.4. Statistinė analizė.....	44
4. REZULTATAI.....	45
4.1. I eksperimentinių tyrimų etapo rezultatai.....	45

4.1.1. Sistemiskai naudoto brimonidino šalutinis poveikis.....	45
4.1.2. Brimonidino poveikis tinklainės ląstelėms visame tinklainės plote.....	45
4.1.2.1. Neneuroninių tinklainės ląstelių analizė.....	45
4.1.2.2. NeuN teigiamų ląstelių vidurkio analizė.....	46
4.1.2.3. GFAP teigiamų ląstelių vidurkio analizė.....	49
4.1.2.4. Vietinio ir sisteminio brimonidino poveikių tinklainės ląstelėms vertinimas kontrolinėse akyse be RNS.....	50
4.1.3. Brimonidino poveikis tinklainės ląstelėms skirtingose tinklainės dalyse.....	50
4.1.3.1. Tinklainės centrinės dalies ląstelių skaičiaus analizė.....	50
4.1.3.2. Tinklainės vidurinės dalies ląstelių skaičiaus analizė.....	50
4.1.3.3. Tinklainės periferinės dalies ląstelių skaičiaus analizė.....	51
4.1.4. Brimonidino sukeltos tinklainės ląstelių neuroprotekcijos kintamumas skirtinguose tinklainės segmentuose.....	52
4.1.5. Tinklainės ląstelių vidurkio koreliacinė analizė visoje tinklainėje.....	53
4.1.6. Tinklainės ląstelių skaičiaus koreliacija skirtinguose tinklainės segmentuose ..	55
4.1.7. Tinklainės ląstelių skaičiaus koreliacija tarp skirtingų tinklainės segmentų.....	57
4.1.8. Tinklainės ląstelių dinamių pokyčių koreliacinė analizė.....	60
4.2. II eksperimentinių tyrimų etapo rezultatai.....	62
4.2.1. NeuN ir GFAP teigiamų ląstelių kiekybiniai rodikliai II eksperimentinio tyrimo etape.....	62
4.2.1.1. Sisteminių vaistų poveikio vertinimas tinklainės ląstelėms kontrolinėse akyse be RNS.....	64
4.2.2. Ląstelių skaičiaus pokyčio dinamika tinklainėje II eksperimentinio tyrimo etape.....	65
4.2.3. Akių dugno nuotraukų analizė.....	67
4.2.4. SD-OKT vaizdų analizė.....	67
4.2.5. Ganglinių ląstelių komplekso storio kitimų koreliacinė analizė.....	69
4.2.6. Ganglinių ląstelių komplekso storio pokyčio dinamikos analizė.....	71
4.2.7. Dvinarė logistinė regresinė analizė TGL žūčiai ir astroglizės rodiklių pokyčių prognozavimui.....	73
4.3. I ir II eksperimentinio tyrimo etapų rezultatų palyginimas.....	74
4.3.1. Neuroprotekcinų savybių turinčių vaistų poveikio palyginimas.....	76
5. REZULTATŲ APTARIMAS.....	78
5.1. I disertacinio darbo etapo rezultatų aptarimas.....	78
5.2. II disertacinio darbo etapo rezultatų aptarimas.....	80
5.3. Neuroprotekcinų savybių turinčių vaistų poveikio palyginimas.....	82
5.4. Disertacinio darbo trūkumai.....	83
IŠVADOS.....	84
REKOMENDACIJOS.....	85
SUMMARY.....	86
BIBLIOGRAFIJOS SĄRAŠAS.....	135
STRAIPSNIAI, KURIUOSE SKELBIAMI DISERTACIJOS REZULTATAI.....	153
MONOGRAFIJA, KURIOJE SKELBIAMI DISERTACIJOS DUOMENYS.....	154
KONFERENCIJOS, KURIOSE BUVO SKELBTI DISERTACIJOS REZULTATAI ..	155
DISERTACIJOS TEMA SPAUSDINTI DARBAI.....	157
CURRICULUM VITAE.....	183
PADĖKA.....	184

SANTRUMPOS

AMPA	– α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoazolepropiono rūgštis
BMD	– brimonidinas
cAMP	– ciklinio adenozino monofosfatas
CNTF	– ciliarinis neurotrofinis faktorius
DAPI	– 4',6-diamidino-2-fenylindolas
ET	– endoplazminis tinklas
GFAP	– glijos fibrilinis rūgštinis baltymas, pirminis antikūnas
GLK	– ganglinių ląstelių kompleksas
hEKL	– žmogaus embrioninės kamieninės ląstelės
iDKL	– indukuotos daugiagalės kamieninės ląstelės
IL	– interleukinas
IOS	– intraokulinis spaudimas/akispūdis
IP	– intraperitoninis
IVT	– intravitrealinis
KYNA	– kinureno rūgštis
KK	– kinurenino kelias
KKB	– kalcio kanalų blokatoriai
KMO	– kinurenino-3-monooksigenazės
LEV	– levetiracetamas
MEM	– memantinas
MMP	– matriksmetaloproteinazė
NeuN	– neuronams specifinis branduolių baltymas, pirminis antikūnas
NGS	– normalizuotas ožkos serumas
NMDA	– N-metil-D-aspartatas
NNF-α	– naviko nekrozės faktorius- α
PBS	– fosfato buferio tirpalas
PFA	– paraformaldehidas
RND	– regos nervo diskas
RNS	– regos nervo suspaudimas
SD-OKT	– spektrinė domeno – optinė koherentinė tomografija
SN	– standartinis nuokrypis
SNF	– smegenų neurotrofinis faktorius
SV	– sinapsinis pūslelės baltymas
TGL	– tinklainės ganglinės ląstelės

ĮVADAS

Glaukoma yra neurodegeneracinė liga, kuriai būdinga tinklainės ganglinių ląstelių (TGL) žūtis, akipločio pokyčiai; ir yra pagrindinė negrįžtamo aklumo priežastis pasaulyje [1]. Manoma, kad iki 2040 metų glaukoma sirgs daugiau nei 120 milijonų žmonių visame pasaulyje [2, 3]. Ankstyvomis ligos stadijomis regos aštrumas gali būti visiškai normalus, o ankstyvi akipločio pokyčiai nenustatomi, tačiau ligai progresuojant ir jos negydant, galimas vienos ar abiejų akių aklumas [4]. Retrospektyviajame tyrime, atliktame Švedijoje, tyrėjai nustatė, kad apie 38 proc. glaukoma sergančių pacientų apanka viena akimi, ir apie 13,5 proc. – abiem akimis, po 20 metų gydymo [4]. Iš šių duomenų galime teigti, jog glaukoma yra reikšminga sveikatos apsaugos sistemos ir ekonominė našta.

Neuroprotekcija yra glaukomos gydymo tikslas, nes degeneruojant TGL ir jų aksonams, prarandama rega [5–7]. Iki šiol TGL netiesiogiai apsaugome mažindami akispūdį (IOS) – pagrindinį glaukomos rizikos veiksnį [8] bei gerindami akies perfuziją. Tačiau vis dar neužpildytas kritinis glaukomos gydymo poreikis – neuroprotekcinis gydymas tiesiogiai veikiantis TGL išsaugojimą [9]. Moksliniai tyrimai įrodė, jog brimonidas, akispūdį mažinantis vaistas, turi neuroprotekcinį poveikį išsaugant TGL [10]. Brimonidas, α_2 adrenerginių receptorių agonistas, mažina TGL apoptozę, moduliudamas neuroūdegimo kelius, didindamas neurotrofinių faktorių išsiskyrimą ir mažindamas glutamato sukeltą ekscitotoksiškumą [10, 11]. Memantinas, N-metil-D-aspartato (NMDA) receptorių antagonistas, vartojamas Alzheimerio ligai gydyti, mažina glutamato sukeltą ekscitotoksiškumą – pagrindinį veiksnį, sukeltą TGL pažeidimus glaukomos atveju [12]. Klinikiniuose glaukomos tyrimuose memantino neuroprotekcinis poveikis nebuvo įrodytas, tačiau tyrimo struktūra turėjo daug trūkumų [13]. Levetiracetamas, tradiciškai vartojamas kaip vaistas nuo traukulių. Mokslinių tyrimų, nagrinėjančių tiesioginį jo poveikį TGL, stanga, tačiau mokslininkai nustatė neuroprotekcinį poveikį gydant neurodegeneracines ligas [14–16]. Levetiracetamas jungiasi prie sinapsinės pūslelės baltymo (SV) 2A, kuris moduliuoja neurotransmiterių išsiskyrimą. Levetiracetamas taip pat slopina reaktyvios astroglijos neurotoksinių molekulių išsiskyrimą, mažina oksidacinį stresą [17–19]. Iki klinikinių neuroprotekcijos tyrimų rezultatai yra nepakankami arba turintys ribotą klinikinį poveikį neurodegeneracinėms ligoms [9]. Todėl naujų vaistų, skirtų tiesiogiai apsaugoti TGL, kūrimo svarba turėtų būti prioritetinga, pradedant nuo oftalmologinių eksperimentinių tyrimų iki klinikinių modelių, kurių rezultatai padėtų kurti individualizuotąją mediciną kiekvienam pacientui, o tai labai pagerintų glaukomos gydymo rezultatus.

Šio disertacinio darbo tikslas – ištirti neuroprotekcinų savybių turinčių vaistų tiesioginį poveikį tinklainės ląstelėms ir suteikti duomenų tolesniems klinikiams tyrimams bei veiksmingam neuroprotekciniam gydymui kurti, kuris modifikuotų ligos eigą, tiesiogiai veiktų neuroninių ląstelių išsaugojimą ir padėtų kurti individualizuotąjį glaukomos gydymą pacientams.

1. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

1.1. Darbo tikslas

Įvertinti neuroprotekcinų savybių turinčių vaistų poveikį tinklainės ląstelėms naudojant ikiklinikinį pelės regos nervo suspaudimo (RNS) modelį.

1.2. Darbo uždaviniai

1. Atlikti kontrolinį genetiškai skirtingų pelių padermių regos nervo pažeidimo modelį ir pritaikyti eksperimentiniams neuroprotekcinės tyrimams vertinant sąsajas tarp TGL ir tinklainės astrocitų išgyvenamumo po RNS modelio atlikimo.
2. Įvertinti brimonidino neuroprotekcinį poveikį TGL ir tinklainės astrocitams pelės RNS modelyje bei palyginti vietinio ir sisteminio vaisto skyrimo poveikių skirtumus.
3. Įvertinti memantino ir levetiracetamo neuroprotekcinį poveikį TGL ir tinklainės astrocitams bei palyginti šių vaistų skirtingų dozių sąsajas su tinklainės ląstelių išgyvenamumu po pelės RNS modelio atlikimo.
4. Įvertinti ir palyginti gydymo brimonidinu, memantinu ir levetiracetamu sąsajas su neurodegeneraciniais pokyčiais RNS modelyje.

1.3. Mokslinis naujumas

Disertaciniame darbe vertinamas neuroprotekcinų savybių turinčių medikamentų poveikis TGL ir astrocitų išgyvenamumui, nustatytos sąsajos tarp TGL ir astrogliazės rodiklių, o tai leidžia vertinti neuroprotekcinės medikamentų savybes. Atliktame eksperimente vertinta vaistinių preparatų vietinio ir sisteminio skirtingų dozių gydymo poveikis tinklainės ląstelių išgyvenamumui visoje tinklainėje ir skirtinguose segmentuose. Taikant eksperimentinį glaukomos modelį nustatyta, kad sisteminis gydymas 2 mg/kg brimonidinu, 10 mg/kg memantinu, 40 mg/kg ir 80 mg/kg levetiracetamu sulėtino neurodegeneracinius pakitimus ir apsaugojo TGL. Struktūriniai tinklainės pokyčiai po RNS vertinti optinės koherentinės tomografijos tyrimu. Remiantis tyrimo pasiektais rezultatais, ateityje galima tikėtis klinikinių tyrimų, kurie padėtų plėsti ir tobulinti neuroprotekcinį, ligos eigą modifikuojantį, individualizuotą glaukomos gydymą visiems pacientams.

1.4. Autoriaus indėlis

Doktorantė išklaušė intensyvaus mokymo kurso programą „Mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo rei-

kalavimai“ ir įgijo sertifikatą. Autorė atliko visus eksperimentų su gyvūnais etapus Lietuvos sveikatos mokslų universitete bei Tamperės universitete, Suomijoje. Išpreparuotus tinklainės audinius imunohistochemiškai nudažė, atliko nuotraukas fluorescenciniu mikroskopu bei paruošė tolesniam ląstelių skaičiavimui. Ląstelių skaičiavimus atliko ImageJ programa. Autorė pritaikė matematinės statistikos metodus analizuodama duomenis ir interpretuodama gautus rezultatus. 2014 m. vykdytas Lietuvos mokslų tarybos projektas – konkursinis trumpalaikių mokslininkų vizitų finansavimas (VP1-3.1-ŠMM-01-V-02-001) „Eksperimentinio regos nervo pažeidimo modelio įdiegimas ir pritaikymas ikiklinikiniams tyrimams“. Gauti rezultatai buvo panaudoti disertacinio darbo metodikai tobulinti, publikuoti duomenis recenzuojamuose mokslo žurnaluose, pristatyti mokslinėse konferencijose.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

Glaukoma yra viena iš regos nervo neuropatijų, kuriai būdinga progresuojanti TGL žūtis [20] ir yra 11 proc. aklumo atvejų pasaulyje priežastis tarp vyresnių nei 50 metų žmonių [3]. Glaukomos sukulto aklumo rizika yra susijusi su nekontroliuojamu IOS, jo dideliais paros svyravimais [21], nustatyta toli pažengusia liga pirmojo vizito metu [22] bei dėl struktūrinių akies skysčio nutekėjimo kelių pokyčių, kurie sukelia akies hipertenziją. Dabartinis gydymas medikamentais, lazerinėmis procedūromis arba chirurginėmis intervencijomis mažina ir stabilizuoja IOS [23]. Pasiiekus tikslinį IOS, dažniausiai efektyviai lėtinamas glaukomos progresavimas ir atitolinamas regos praradimas [24, 25]. Tačiau kai kuriems pacientams TGL toliau žūva, nepaisant veiksmingo IOS mažinimo. Tai rodo kitų veiksnių, tokių kaip IOS paros svyravimų, akies kraujotakos pokyčių ar neurotoksiškumo, įtaką. Šiai dienai pirmo pasirinkimo glaukomos gydymas yra įvairūs akispūdį mažinantys lašai ar selektyvi lazerinė trabekuloplastika, kurie veiksmingai mažina IOS [26]. Tačiau vaistų poveikis į akies kraujotaką ir neuroprotekciją dar nėra visiškai ištirtas [27].

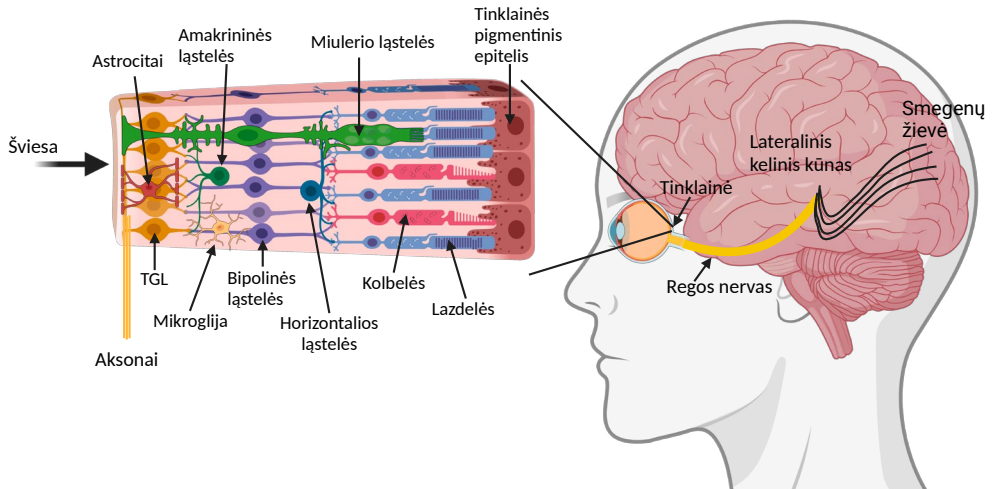
2.1. Glaukomos patofiziologiniai mechanizmai

Padidėjęs IOS yra svarbiausias glaukomos išsivystymo rizikos veiksnys [3, 28], o IOS mažinimas kol kas lieka vienintelis moksliniais įrodymais pagrįstas glaukomos gydymo būdas [29, 30]. Tačiau padidėjęs IOS nėra vienintelė ir būtina sąlyga glaukominiams pažeidimams ir akipločio pakitimams atsirasti. Labai svarbu suprasti glaukomos patofiziologiją, gydant pacientus, kuriems liga progresuoja, nepaisant geros IOS kontrolės. TGL apoptozę gali sukelti akies kraujotakos sutrikimai [31], oksidacinis stresas [32], mitochondrijų disfunkcija [33], autofagijos inaktyvacija [34], senėjimas [35] ir glijos ląstelių sukeltas neurouždegimas [36]. Nepaisant šių, jau žinomų veiksnių, daugelis glaukomos patogenezės aspektų vis dar lieka neaiškūs.

2.1.1. Tinklainės ganglinių ląstelių svarba

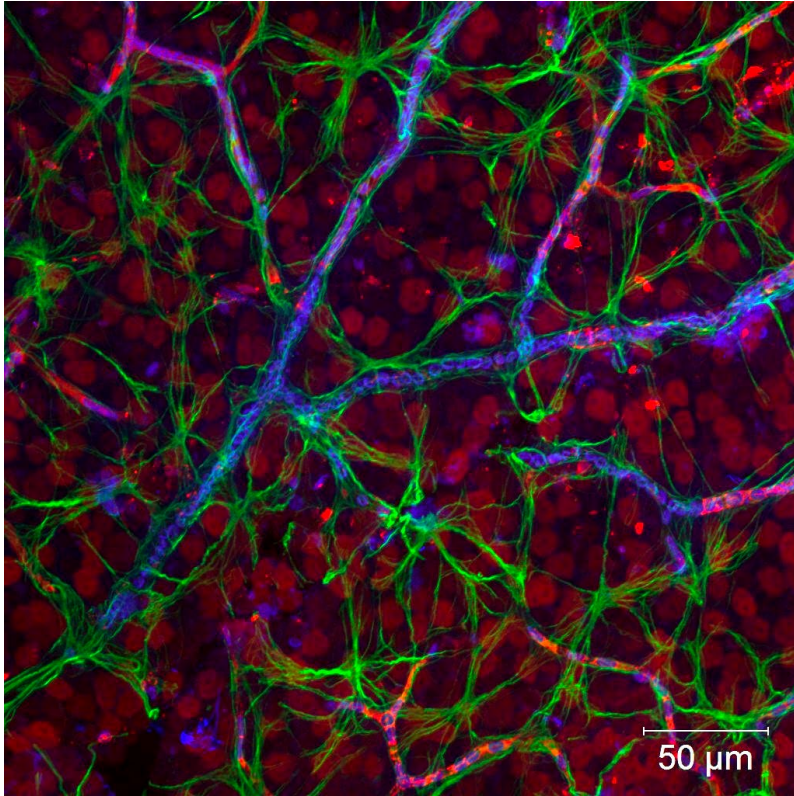
TGL yra tinklainės nervinės ląstelės, kurios perduoda vaizdinius signalus iš akies į smegenis. TGL priima signalus iš bipolinių bei amakrininių ląstelių [37] (2.1.1.1 ir 2.1.1.2 pav.). Šie signalai yra perduodami aksonais, kurie sudaro regos nervą, į tarpinių smegenų gumburo pagalvį ir branduolius. Regos laidai, kurie driekiasi iki keturkalnio viršutinių kalnelių ir lateralinių kelinių kūnų yra svarbūs refleksiniams ir suplanuotiems judesiams (2.1.1.1 pav.). Be to, impulsai TGL aksonais nukeliauja ir į kitas galvos smegenų sritis, susiju-

šias su svarbiomis regos funkcijomis, tokiomis kaip šviesos ciklą reguliavimas (virškryžminis branduolys, lateralinis kelinis kūnas, vidukelinis lapelis), akių judesių ir vaizdo stabilizavimas (regos trakto branduolys ir vidinis galinis branduolys) bei vyzdžio šviesos reakcija (alyvinis pretektalinis branduolys) [38]. Taigi, TGL yra būtinos ne tik sąmoningai regai, bet ir miego ciklą bei akių judesių reguliavimui (2.1.1.1 pav.).



2.1.1.1 pav. Scheminis regos kelio paveikslas. Šviesa, praėjusi skaidrias optines terpes pasiekia tinklainę. Fotoreceptoriai, esantys tinklainėje, šviesą paverčia elektriniais signalais, kurie perduodami į bipolines ląsteles ir TGL. TGL aksonai susitelkia ir sudaro regos nervą, kuris perduoda vaizdinius signalus iš akies į įvairias smegenų sritis, atsakingas už regos apdorojimą. Viena iš šių sričių yra lateralinis kelinis kūnas, kuris perduoda signalus į regos žievę tolimesniam vaizdinių signalų apdorojimui.

TGL – tinklainės ganglinės ląstelės.



2.1.1.2 pav. Balb/c pelės tinklainės preparatas (angl. retinal wholemount). Tinklainių preparatai imunohistochemiškai dažyti NeuN pirminiu antikūnu – tinklainės ganglinės ir amakrininės ląstelės (raudona spalva); GFAP pirminiu antikūnu – tinklainės astrocitai (žalia spalva). Mėlyna spalva žymi tinklainės kraujagysles ir eritrocitus. Mastelis – 50 μm

NeuN – neuronams specifinis branduolių baltymas, pirminis antikūnas; GFAP – glijos fibrilinis rūgštinis baltymas, pirminis antikūnas.

Nustatyta, kad TGL gali turėti kelias būsenas – ne tik gyvą ar žuvusią, bet ir heterogenišką būsenų mišinį: gyvas, stresinių veiksnių paveiktas, neveiksnias, žūstančias ir žuvusias ląsteles [39]. Sergant glaukoma, TGL gali tapti į „miegančios“ ar „komos“ būklės – tuo metu jos būna neveiksnios ar mažai veiksnios iki degeneracijos pradžios. Greičiausiai ši būseną atitinka lengvą arba vidutinį regos praradimą glaukoma sergantiesiems pacientams. Mokslininkų įrodyta, kad ši stadija yra itin tinkama neuroprotekciniams, neurostiprinantiems ar neuroregeneracinėms medžiagoms „pažadinti“ TGL ir apsaugoti jas nuo žūties [39].

Pirminė TGL pažeidimo vieta yra regos nervo diskas (RND), o ankstyvieji pažeidimai pasireiškia ir kituose TGL segmentuose [40]. Nustatyta, kad TGL

degeneraciją lemia ne tik apoptozinis mechanizmas pažeidimo vietoje, bet ir degeneraciniai bei savidestrukcijos procesai, vykstantys aplink jį [41].

2.1.2. TGL žūties mechanizmai sergant glaukoma

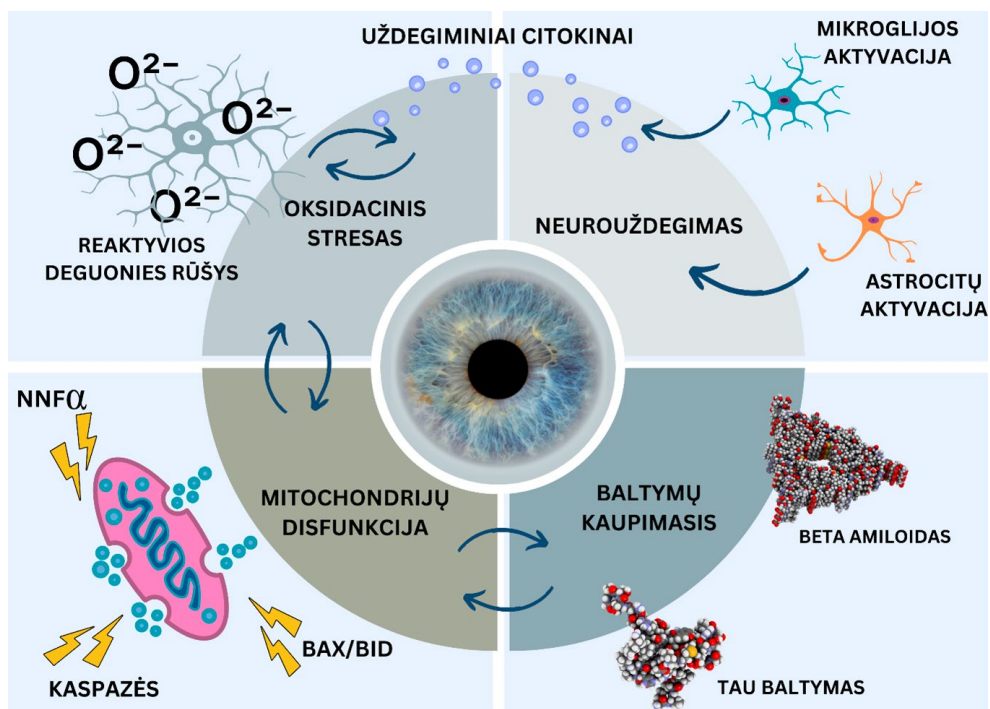
Neurodegeneracinėms ligoms būdinga progresuojanti neuronų ir jų aksonų žūtis. Glaukomą ir kitas neurodegeneracines ligas, tokias kaip Alzheimerio, Parkinsono ligą ar amžinę geltonosios dėmės degeneraciją sieja bendri neurodegeneraciniai patogenetiniai mechanizmai. Nepaisant skirtingų klinikinių apraiškų, šios ligos yra daugiaveiksnės ir dažnai turi bendrų molekulinį mechanizmą, susijusių su ligos atsiradimu, pvz., nenormaliu baltymų kaupimusi, mitochondrijų disfunkcija, oksidaciniu stresu ir uždegimu [42] (2.1.2.1 pav.).

Sergant glaukoma TGL žūties mechanizmai yra siejami su lėtine protarpine išemija, aktyviosiomis deguonies rūšimis (ROS), ekscitotoksiškumu, sutrikusia medžiagų pernaša aksonais, neurotrofinių faktorių trūkumu ir elektrinio laidumo netekimu [43]. Kraujagyslių spazmas, sutrikusi kraujotakos autoreguliacija ar kapiliarų mechaninis suspaudimas ties *lamina cribrosa* blogina RND perfuziją, o tai gali sukelti išeminius pakitimus, bei sumažinti TGL gyvybingumą. Tiek ūminė, tiek lėtinė išemija didina oksidacinį stresą, kuris pasižymi metabolitų ir laisvųjų radikalų arba ROS gamybos neatitikimu. Padidėjusios ROS ir sumažėjusios antioksidantų koncentracijos buvo pastebėtos glaukoma sergančiųjų stiklakūnyje kartu su oksidaciniais DNR pažeidimais bei pokyčiais trabekuliniame tinkle. Kalcio kanalų blokatoriai (KKB), turintys antispastinių ir galimai antiišeminių savybių, buvo tiriami kaip neuroprotektoriai gyvūnų modeliuose [44]. Tačiau lieka neaišku, ar KKB poveikis yra tiesiogiai susijęs su veikimu kalcio kanaluose, ar netiesiogiai – gerinant regos nervo kraujotaką. Galimą KKB naudą reikia vertinti atsižvelgiant į sisteminę hipotenzijos riziką, kuri gali sumažinti regos nervo disko perfuzinį spaudimą [45].

Ekscitotoksiškumas – mechanizmas, kuris pasireiškia, kai mirštančios ląstelės išskiria perteklinį neuromediatorių, tokių kaip glutamatas, kiekį. N-metil-D-aspartatui (NMDA) jautrių glutamato kanalų per didelę aktyvaciją gretimoje TGL gali lemti padidėjusį kalcio kiekį ląstelėje, azoto oksido sintezės aktyvaciją, azoto oksido gamybą ir kitus metabolinius sutrikimus, dėl kurių įvyksta antrinė ląstelių mirtis. Diskutuojama, ar TGL tiesiogiai pažeidžiamos dėl perteklinio glutamato poveikio, ar pirmiausia pažeidžiamos gretimos ląstelės, tokios kaip amakrininės ląstelės ar Miulerio glijos ląstelės, sukeldamos antrinę TGL mirtį. Padidėjusio glutamato aktyvumo blokavimas tebėra tyrimų objektas, o tokios medžiagos kaip aminoguanidinas rodo potencialų neuroprotektinį poveikį, nors rezultatai nėra vienareikšmiai [46, 47].

Sutrikusi medžiagų pernaša aksonais pirmą kartą buvo pastebėta gyvūnų modeliuose su eksperimentiškai padidintu IOS prieš daugiau nei 30 metų [48]. Padidėjęs IOS mechaniškai sukelia RND deformaciją ties *lamina cribrosa* ar antrinius išeminius pakitimus ir gali blokuoti normalią medžiagų pernašą išilgai aksono. TGL yra priklausomos nuo neurotrofinių veiksnių ir augimo signalų, sklindančių iš tinklainės, regos nervo ar smegenų centrų. Glaukoma sukelia atgalinės neurotrofinių faktorių, tokių kaip smegenų neurotrofinis faktorius (angl. *brain derived neurotrophic factor*), pernašos blokadą, kuri yra būtina TGL augimui ir gyvybingumui palaikyti. Po regos nervo pažaidos, dėl sumažėjusio elektrinio laidumo, TGL gali tapti mažiau jautrios neurotrofiniams faktoriams [49]. Vis dar nėra aišku, koku mastu tai sąlygoja TGL disfunkciją ar žūtį glaukomos atveju.

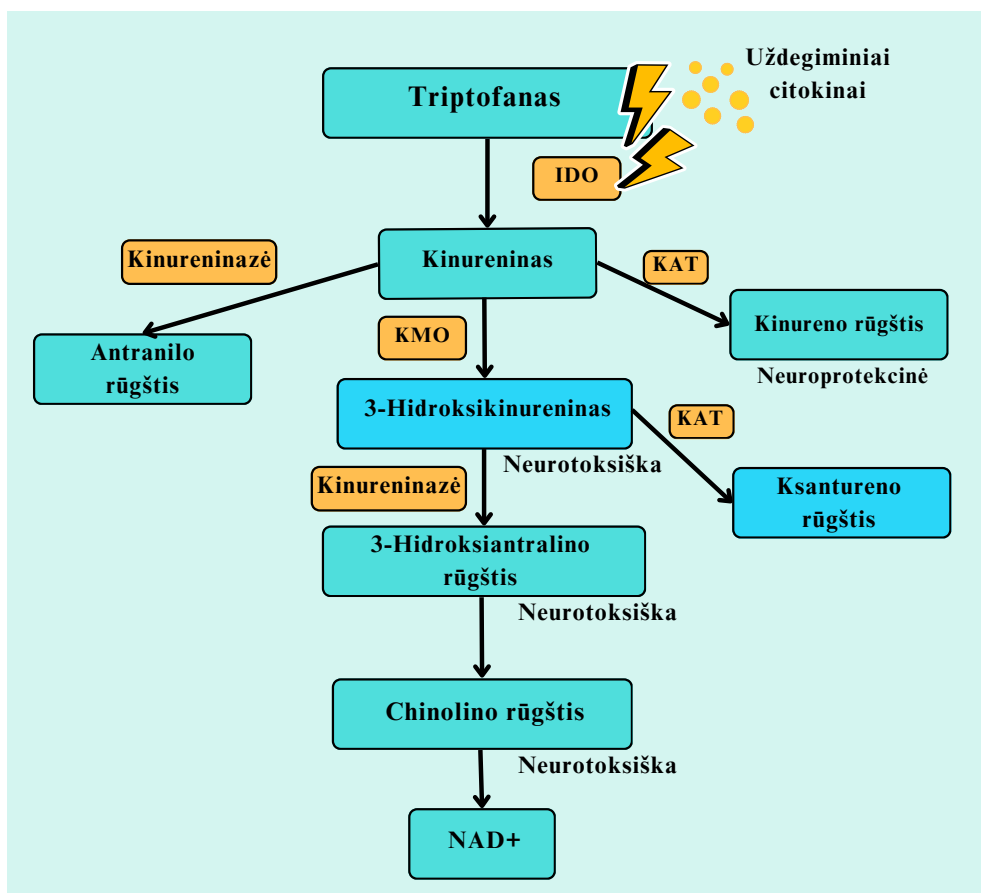
Be to, sergant glaukoma, ląstelių reguliacijos sutrikimai gali lemti hiperfosforilinto *tau* baltymo ir kitų nenormalių baltymų kaupimąsi tinklainėje, sukeliantį endoplazminio tinklo (ET) perkrovą ir TGL apoptozę [50]. Padidėjus akispūdžiui ar eksperimentiškai suleidus NMDA injekciją, TGL sluoksnyje buvo stebėti ET pokyčiai [51], todėl tikslingi tolesni tyrimai, kuriuose būtų vertinama, ar ateities glaukomos gydymas bus nukreiptas į ET perkrovos mažinimą (2.1.2.1 pav.).



2.1.2.1 pav. Pagrindiniai glaukomos ir kitų neurodegeneracinių ligų patogenetiniai mechanizmai siejasi tarpusavyje ir sąlygoja neuroninių ląstelių žūtį

NNF- α – naviko nekrozės faktorius- α ; Bax/Bid – pro-apoptoziniai genai.

Kinurenino kelias (KK) yra pagrindinis triptofano (TRP) metabolizmo kelias, kuris yra siejamas su neurodegeneraciniais procesais sergant glaukoma. KK metabolitai pasižymi neurotoksiškėmis (pvz., chinolino rūgštis; NMDA receptoriaus agonistas [52]) arba neuroprotektinėmis (pvz., kinureno rūgštis (KYNA); NMDA ir alfa-7 nikotino acetilcholino receptorių antagonistė [53, 54]) savybėmis. KK yra svarbus imuninės sistemos atsako bei energijos apykaitos reguliavimui [55]. Padidėjusi KYNA koncentracija tinklainėje buvo pastebėta po TGL pažeidimo, o KYNA kiekis skyrėsi priklausomai nuo pažeidimo pobūdžio [56]. Fiedorowicz su kolegomis ištyrė, jog DBA/2J pelėse sutrikęs triptofano metabolizmo kelias tinklainėje buvo susijęs su triptofano metabolizmo sutrikimais visame organizme [57] (2.1.2.2 pav.).



2.1.2.2 pav. Kinurenino kelias (KK) ir jo metabolitai. Indoleamino 2,3-dioksigenazė (IDO) yra pirmasis fermentas KK. IDO sintezę skatina uždegiminiai citokinai. Kinurenino 3-monooksigenazė (KMO) paverčia kinureniną į neurotoksinį 3-hidroksikinureniną, kuris toliau verčiamas į chinolino rūgštį, kuri yra N-metil-D-aspartato (NMDA) receptorių agonistė. Galutinis KK produktas yra oksiduotas nikotinamido adenino dinukleotidas (NAD⁺). Kinurenino aminotransferazės (KAT) paverčia kinureniną į neuroprotektinę kinureno rūgštį (KYNA), o kinureninazė verčia kinureniną į antranilo rūgštį

Literatūros duomenimis, KK fermentų aktyvumo reguliavimas turėjo neuroprotektinį poveikį TGL [58]. Pavyzdžiui, kinurenino-3-monooksigenazės (KMO) inhibitoriaus Ro-61-8048 vartojimas apsaugojo nuo tinklainės pažeidimo, kuris buvo sukeltas viršgarsinių smūginių bangų, o KMO nebuvimas turėjo apsauginį poveikį TGL esant tinklainės išemijos – reperfuzijos pažeidimui, sukeltam trumpalaikio IOS padidėjimo [57–59]. Buvo įrodytas

neuroprotekcinis intraveninės KYNA poveikis, nepaisant kai kurių mokslinių duomenų, teigiančių, jog KYNA turi sąlyginai mažą pralaidumą pro smegenų–kraujo barjerą ir galbūt kraujo–tinklainės barjerą [60]. Tačiau Nahomi ir kolegų atliktame tyrime, praėjus 2 val. po intraveninio suleidimo buvo nustatyta padidėjusi KYNA koncentracija tinklainėje [58].

Sinapsinės pūslelės baltymas 2 (SV) dalyvaujantis kalcio jonų reguliuojamoje sinapsinėje pernašoje, turi tris izoformas (SV2A, SV2B, SV2C). Šios izoformos pasiskirsto skirtingose smegenų srityse, o tai leidžia manyti, kad kiekviena izoforma turi sinapsei specifines funkcijas. Šios izoformos yra skirtingai pasiskirsčiusios tinklainės sinapsėse, pasižymi unikaliomis struktūromis išoriniame ir vidiniame tinkliniuose sluoksniuose. SV2 izoformos raiška vyksta skirtinguose presinapsiniuose galuose ankstyvose vystymosi stadijose, o SV2A laikinoji raiška vyksta vystantis horizontaliosioms ląstelėms. Horizontaliosios ląstelės yra tarpiniai neuronai, reguliuojantys vaizdinės informacijos srautą iš fotoreceptorių į bipolines ląsteles išoriniame tinkliniame sluoksnyje [61].

Net ir tiksliai nežinant visų molekulinį ir ląstelių glaukomos neurodegeneracinių procesų, pastaraisiais metais mokslas ženkliai pasistūmėjo nustatant mechanizmus, turinčius įtakos TGL disfunkcijai ir žūčiai [23, 27, 32–36, 39–42, 44]. TGL dažniausiai žūva dėl apoptozės – programuotos ląstelių žūties, kurios metu vyksta nuoseklus viduląstelių organelių irimas bei jų pašalinimas fagocituojančiomis ląstelėmis [49].

Apoptozę gali sukelti išoriniai veiksniai, tokie kaip naviko nekrozės faktorius- α (NNF- α), Fas ligandas ir su NNF susijęs apoptozę sukeliantis ligandas. Vidiniai veiksniai sukelia apoptozę, praradus išgyvenamumą skatinančius signalus iš aplinkinių ląstelių tinklainėje, regos nerve ar smegenyse [49]. Šie mitochondrijų skatinami signaliniai keliai dažnai apima kalcio aktyvintų baltymų (pvz., kalcineurino), kalpaino ir proteazių, vadinamų kaspazėmis, aktyvaciją, padidėjusią pro-apoptozinių genų (pvz., Bax/Bid) ir sumažėjusią antiapoptozinių genų (pvz., Bcl-2/Bcl-xl) raišką [49].

Šių sąveikų supratimas gali palengvinti specifinių antiapoptozinių vaistų kūrimą. Daugelis ląstelių žūties kelių yra bendri visoms regos nervo neuropatijoms, sukeliančioms TGL aksonų pažeidimą. Tokie pažeidimai kaip išeminės, kompresinės ar trauminės regos nervo neuropatijos, RND drūzos, regos nervo neuritas ir paburkimas sukelia nervinių skaidulų sluoksnio aksonų pažeidimą, regos nervo atrofiją ir regos praradimą. Specifiniai klinikiniai požymiai, tokie kaip RND ekskavacija ir specifiniai regos lauko defektai, leidžia nustatyti glaukomą. Šių sudėtingų mechanizmų ir signalinių kelių supratimas gali padėti kurti tikslinį glaukomos gydymą ir užkirsti kelią arba sulėtinti regos praradimą.

2.1.3. Glijos ląstelių vaidmuo glaukomos patogenezėi

Nors padidėjęs IOS išlieka pagrindiniu glaukomos rizikos veiksniu, atsiranda vis daugiau įrodymų, kad šios ligos patogenezėje dalyvauja glijos ląstelės [62–64]. Glijos ląstelės atlieka svarbų, įvairiapusišką ir sudėtingą vaidmenį tinklainės patologiniuose procesuose. Sutrikusi jų funkcija ir vėlesnė glijos ląstelių sąveika su tinklainės nervinėmis ląstelėmis yra kritiškai svarbios įvertinant neurodegeneracinius procesus tinklainėje.

Žmogaus tinklainėje yra nustatomi du pagrindiniai glijos ląstelių tipai: makroglija ir mikroglija. Tinklainės makrogliją sudaro Miulerio glijos ląstelės ir astrocitai (2.1.1.1 ir 2.1.1.2 pav.). Makroglijos ląstelės palaiko tinklainės homeostazę reguliuodamos jonų, gliukozės ir neurotransmiterių apykaitą [62]. Mikroglijos ląstelės reaguoja į tinklainės pažeidimą ir yra svarbios neuroninių tinklų homeostazei ir neuroūdegimo reguliavimui [65, 66]. Regos nervo sudėtyje makroglijai priklausantys oligodendrocitai, kartu su astrocitais, sudaro pagrindinius atraminius komponentus TGL aksonams, nusidriekiantiems į smegenis [67]. Mokslininkai nustatė, jog abiejų tipų glijos ląstelės sąveikauja su tinklainės ir regos nervo nervinėmis ląstelėmis ir yra svarbios patofiziologiniams TGL žūtį sukeliantiems procesams [62, 64, 68–71].

2.1.3.1. Makroglija

Miulerio glijos ląstelės yra išsidėsčiusios visuose tinklainės sluoksniuose, o jų ataugos, apsupdamos TGL, tęsiasi nuo išorinės iki vidinės ribojančios membranos. Jų unikali morfologija ir pasiskirstymas nulemia, jog Miulerio glijos ląstelės dalyvauja pernešant medžiagas tarp TGL, stiklakūnio, tinklainės kraujagyslių ir poretinio tarpo [64].

Miulerio glija atlieka įvairias funkcijas ir yra tiesiogiai susijusi su TGL. Viena iš pagrindinių Miulerio glijos funkcijų yra gebėjimas greitai pašalinti perteklinį glutamatą iš tarpląstelinio tarpo per amino rūgščių pernešėjus, tokiu būdu palaikant žemą glutamato koncentraciją ir išvengiant ekscitotoksiškumo [72–75]. Glijai specifinis fermentas glutamino sintetazė paverčia glutamatą į glutaminą, kuris vėliau tampa glutamato pirmtaku neuronuose. Manoma, kad padidėjęs glutamino lygis Miulerio glijos ląstelėse gali atsirasti dėl sumažėjusio glutamino poreikio pažeistose TGL [76]. Miulerio glija geba pašalinti perteklinį glutamatą, o taip pat jį naudoti kaip metabolinį substratą [63, 74, 77].

Itin svarbi Miulerio glijos savybė yra gebėjimas išskirti neurotrofinius faktorius. Tyrimai nustatė, kad išemijos sukelta glijos ląstelių aktyvacija lemia iš glijos ląstelių kilusio neurotrofinio faktoriaus, padidinančio glutamato pasisavinimą, išsiskyrimą. Tokiu būdu yra mažinamas glutamato sukeltas ekscitotoksiškumas ir skatinama neuroprotekcija [76, 78].

Pradinių pažeidimo stadijų metu įvykus Miulerio ląstelių gliozei, prasižda teigiamą neuroprotektinį poveikį turinčių antioksidantų, neurotrofinių faktorių bei ciliarinio neurotrofinio faktorių gamyba (CNTF) [79]. Vis dėlto, vėlyvosios gliozės stadijos metu neuronų regeneracija yra slopinama dėl ląstelių žūties ir glijos randų susidarymo [64, 80]. Gliozės patologinių procesų metu taip pat yra kaupiamas viduląstelinis pažeidimą sukeliantis azoto oksidas. Azoto oksidas slopina mitochondrijų funkciją, mažindamas adenosino trifosfato kiekį ir tiesiogiai pažeisdamas DNR. Atsiranda vis daugiau įrodymų, kad Miulerio glija yra būtina TGL gyvybingumui palaikyti, o Miulerio glijos funkcijos sutrikimas ir pažeidimas yra svarbūs glaukomos patogenezės veiksniai [77].

Tinklainės astrocitai, dar vadinami astroglija, jungia neuronus su kraujagyslėmis ir yra dažniausiai aptinkami tinklainės nervinių skaidulų sluoksnyje [81] (2.1.1.1 ir 2.1.1.2 pav.). Nustatyta, kad jie palaiko RND aksonų struktūrą ir fiziologines savybes [82], o padidėjęs IOS turi tiesioginį poveikį užląstelinės terpės persitvarkymui [82, 83]. Pažeidus tinklainę arba padidėjus IOS, astrocitai yra aktyvinami, atsiranda morfologinių astrocitų pokyčių – kūno hipertrofija, prarandamos sustorėjusios ataugėlės [82, 84]. Be to, įvykus aksonų žūčiai, astrocitų ataugėlės praranda lygiagretų išsidėstymą ir pasiskirstymą [85]. Naudodami glutamato–glutamino ciklą ir pernešdami laktatą bei piruvatą, tinklainės astrocitai gamina bioenergetinį substratą TGL [85, 86]. Manoma, kad astrocitai sudaro daugiau nei 70 proc. RND mitochondrijų [87, 88]. Astrocitai apgaubia ir suardo nebefunkcionuojančias aksonų mitochondrijas [89, 90]. Įrodyta, kad astrocitai iš tarpląstelinės ertmės pašalina jonus ir perdirba neurotransmitterius [66]. Padidėjus IOS ar vykstant natūraliems senėjimo procesams, prasideda astrocitų gliozė – neurocheminis ir morfologinis remodeliavimosi procesas [85, 91]. Glaukomos metu aktyvuota astroglija padidina endotelino-1, NNF- α , oksidacinio streso molekulių ir trofinių veiksnių kiekį, pvz., CNTF, pasižyminčio tiek neuroprotektinėmis, tiek neurotoksinėmis savybėmis raišką [69, 84, 92–94].

Moksliniai tyrimai nustatė, kad astrocitai yra būtini tinklainės homeostazei palaikyti, nes jie pašalina nereikalingas daleles iš TGL aksonų, tiekia TGL energetinius substratus, tokius kaip piruvatas ir laktatas, bei pašalina neurotransmiterių perteklių iš sinapsinio tarpo [86, 92, 95]. Vis dėlto, aktyvuoti astrocitai gali turėti ir žalingų savybių, tokių kaip neurotoksinių molekulių išskyrimas ir uždegiminio atsako formavimas [62, 84, 92, 96, 97]. Nors astrocitų yra sąlyginai mažiau nei Miulerio glijos ląstelių tinklainėje, tačiau abu makroglijos potipiai turi daug sutampančių funkcijų. Taip pat išlieka daug nežinomų ir neištirtų makroglijos ląstelių savybių.

Manoma, kad astrocitų aktyvacija yra svarbus glaukomos patogenezės veiksnys. Astrocitų aktyvinimo slopinimas padidina neuronų išgyvenamumą

eksperimentiniuose glaukomos modeliuose. Manoma, kad teigiamas poveikis kyla dėl tirozino kinazės inhibitorių reguliavimo [98] ar endotelino-1 blokavimo [99]. Manoma, kad kalcio kanalų blokatorių ir endotelino blokatorių neuroprotekcinis poveikis glaukoma sergantiems žmonėms, veikia šiuo mechanizmu [100].

Oligodendrocitai yra puikus metabolinio ryšio tarp glijos ląstelių ir TGL aksonų pavyzdys. Jie suteikia TGL aksonams pagrindinius metabolinius substratus [101]. Gliukozė yra paimama iš kraujo per astrocitų ataugėles ir paverčiama į laktatą ir piruvatą, kuris vėliau per tarpines jungtis pernešamas į oligodendrocitus, o vėliau į TGL aksonus [102].

2.1.3.2. Mikroglija

Neuroūždegimas yra pirminis tinklainės gynybinis procesas prasidėjus pažeidimui. Tačiau stiprus ir nevaldomas uždegimas gali turėti neurotoksinį poveikį ir sukelti tinklainės pažeidimą. Mikroglija yra įgimto imuniteto ląstelės centrinėje nervų sistemoje. Mikroglijos aktyvacija yra vienas iš pirmųjų glaukomos neurodegeneracijos procesų. Eksperimentiniuose gyvūnų glaukomos modeliuose padidėjęs akispūdis gali suaktyvinti tinklainės mikrogliją, kuri išskiria TGL pažeidžiančius uždegiminius citokinus [36]. Manoma, kad IOS mažinantis gydymas neveikia TGL pažeidimų, sukeltų aktyvintos mikroglijos.

Teigiamas mikroglijos aktyvacijos poveikis atsiranda dėl priešūždegiminių citokinių išskyrimo, tokių kaip interleukinas-4 (IL) ir IL-10, kurie slopina mikroglijos uždegiminių citokinių gamybą [103–105]. Esant toli pažengusiam pažeidimui, mikroglijos aktyvacija sukelia uždegiminių citokinių ir citotoksinų medžiagų, tokių kaip NNF- α , IL-1 β , IL-6, indukuotos azoto oksido sintetazės ir azoto oksido, išsiskyrimą, kurie naikina patogenus [106, 107]. Teigiama, kad mikroglija yra susijusi su daugeliu akių ligų, taip pat ir glaukoma [108–112]. Sergant glaukoma, mikroglijos aktyvacija stebėta sankaupomis aplink kraujagysles ir choriokapiliarus pažeistame RN, o tai rodo natūralų imuninės sistemos suaktyvėjimą [113, 114]. Sergant glaukoma, mikroglijos aktyvacija atlieka dvi funkcijas. Pirma, aktyvintos mikroglijos ląstelės gali fagocituoti degeneravusias ar žūstančias TGL, taip išlaikydamos gerą tinklainės ląstelių aplinką be toksinių molekulių [68]. Aktyvinta mikroglija turi gebėjimą išskirti neurotrofinius faktorius, tokius kaip smegenų neurotrofinis faktorius (SNF) ir CNTF [115], kurie turi neuroprotekcinį poveikį ir galbūt skatina neuroregeneraciją [92]. Antra vertus, dėl lėtinės mikroglijos aktyvacijos išsiskiria neurotoksinės ir uždegiminės molekulės [66].

2.1.3.3. Glijos ląstelių tarpusavio sąveika

Glija atlieka svarbų vaidmenį palaikant tinklainės homeostazę, struktūrą ir gyvybingumą [64, 116]. Sudėtinga tinklainės glijos ir neuronų sąveika lemia pagrindinius tinklainės homeostazės principus sveikos ir glaukomos pažeistos akies patogenezės metu [62, 71, 75, 116].

Glijos ląstelių tarpusavio sąveika palaiko tinklainės homeostazę ir reguluoja viena kitos veiklą. Sutrikusi sąveika tarp glijos ląstelių gali lemti tolesnę tinklainės ląstelių neurodegeneraciją. Normaliomis sąlygomis astroцитai ir mikroglia ekspresuoja matriksmetaloproteinazę-2 (MMP) glijos ląstelių ataugėlėse šalia kraujagyslių [117]. Tačiau suaktyvėjus astroцитams ir mikrogliai, MMP-2 kiekis padidėja, todėl padidėja kraujo ir tinklainės barjero pralaidumas [118], angiogenezė ir glijos randų susidarymas [119]. Atliktų tyrimų metu buvo vertinta glijos ląstelių tarpusavio sąveika tarp oligodendrocitų ir mikroglijos ląstelių bei astroцитų. Buvo nustatyta, kad mikroglijos aktyvacija gali sukelti astrogliozę ir oligodendrocitų apoptozę. Padidindama NNF- α , IL-1b, MMP-3 ir MMP-9 gamybą astroцитuose ir mikroglijoje, aktyvacija sukelia oksidacinį stresą, uždegimą ir glutamato toksiškumą [120–122]. Dėl TGL pažeidimo padidėjus glutamato kiekiui, NMDA receptoriai yra per daug stimuliuojami, tai padidina kalcio jonų išsiskyrimą ir ekscitotoksiškumą [123]. Šis patogenetinis mechanizmas, kurio metu sutrinka Miulerio glijos ląstelių gebėjimas efektyviai pašalinti glutamatą, yra siejamas su glaukoma ir diabetine retinopatija [76, 124, 125]. Grauzikų akių hipertenzijos modelyje naudojant nekonkurencinį NMDA receptorių antagonistą – memantino nano daleles – buvo nustatytas neuroprotekcinis poveikis TGL ląstelėms [126].

Kaip ir mikroglia, astroцитai, taip pat atlieka svarbų vaidmenį palaikant tinklainės homeostazę ir funkciją. Reaguojant į tinklainės pažeidimus ir ligas, astroцитai gali būti aktyvinami į du tipus: neurotoksinį arba uždegiminį fenotipą (A1) ir neuroprotekcinį arba priešuždegiminį fenotipą (A2). Mikroglijos ląstelės taip pat aktyvuojasi į du tipus: M1 mikroglijos ląstelės išskiria uždegiminius mediatorius, sukelia uždegimą ir neurotoksinį poveikį, o M2 mikroglia išskiria priešuždegiminius mediatorius, slopina uždegimą ir skatina neuroprotekcinį poveikį [127]. Suzuki T ir kolegų atliktame pelės glaukomos modelio tyrime buvo nustatyta padidėjusi IL-1 α , NNF- α ir C1q sekrecija mikroglijoje [94]. Tai įrodo, kad mikroglijos ląstelės aktyvuoja A1 astroцитus, dėl kurių glaukomos metu yra pažeidžiamos TGL. Kadangi A1 astroцитai ir M1 mikroglijos ląstelės stebimos neurouždegimo metu, yra labai svarbu atskirti A1 astroцитų ir M1 mikroglijos poveikį neurodegeneraciniam procesui.

Guttenplan KA ir kolegų nustatė, jog TGL tankis reikšmingai sumažėja po akispūdžio padidėjimo laukinio tipo pelės modelyje. Vis dėlto, pašalinus mikroglijos išskiriamus faktorius, tokius kaip IL-1 α , NNF- α ir C1q, kurie

neurotoksiškai reaktyvuoja astrocitus, mes galime užkirsti kelią TGL žūčiai, sukeltai po regos nervo suspaudimo arba ilgalaikio akispūdžio padidėjimo [94]. Šie trys citokinai sužadina neurouždegiminius reaktyvius astrocitus, kurie prisideda prie TGL žūties [94]. Tyrimas nustatė, jog mikroglijos išskirti citokinai yra kritiškai svarbūs valdant mikroglijos–astrocitų tarpusavio sąveiką glaukomos metu [128]. Tikėtina, kad mikroglija gali reguliuoti reaktyvią astrogliozę ir suaktyvinti neurotoksinį arba neuroprotekcinį astrocitų fenotipą [129].

2.2. Neuroprotekcija, neuroregeneracija ir neurostimuliacija

Neuroprotekcinio gydymo tikslas – silpninti antrinės degeneracijos procesą – sumažinti atsirandančius morfologinius ir funkcinius pažeidimus bei maksimaliai padidinti nervinių ląstelių atsigavimą po ūminio ar lėtinio pažeidimo. Kalbant apie regos nervo neuropatijas, neuroprotekcijos tikslas yra užkirsti kelią TGL žūčiai ir išsaugoti jų funkciją. Terminas „neuroprotekcija“ turėtų būti vartojamas tik norint apibūdinti procesų, atsirandančių po pirminio pažeidimo, sutrikdymą. Tai reiškia, kad neuroprotekcija trukdo procesams, susijusiems su antrine degeneracija, o ne su tiesioginiais pirminio pažeidimo padariniais [130].

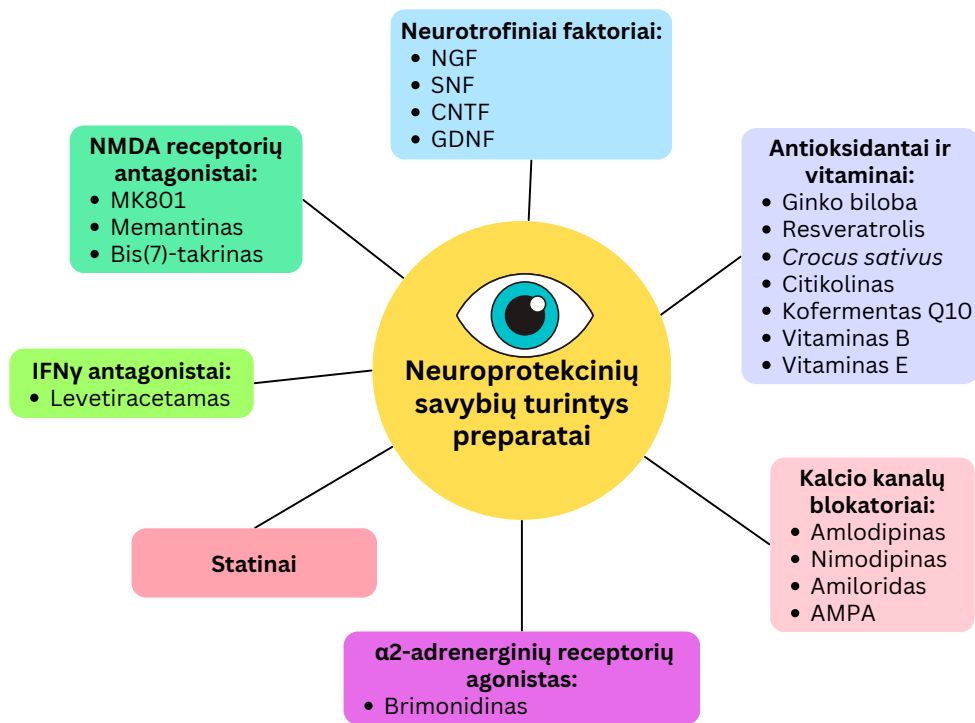
Neurostimuliacija, neurostiprinimu ar neurofunkciniu gerinimu (angl. *neuroenhancement*) siekiama išgelbėti neuronus iš sustingimo, sutrikusios funkcijos ar neaktyvios būsenos. Veiksmingai neuroprotekcijai ir neurostiprinimui yra būtina, jog esami tinklainės neuronai būtų gyvybingi, todėl šios gydymo metodikos labiausiai tinka ankstyvoms ir vidutinėms ligų stadijoms [130].

Nors neuroprotekcijos ir neurostiprinimo metodai gali būti naudingi sergant regos nervo neuropatijomis ankstyvosiose ligos stadijose ir esant lėtai degeneracijai, tačiau esant galutinei regos nervo neuropatijos stadijai teoriškai reikalingos ląstelių pakeitimu pagrįstos metodikos. Pažymėtina, kad žmogaus embrioninių kamieninių ląstelių (hEKL) ir indukuotų daugiagalių kamieninių ląstelių (iDKL) atsiradimas regos nervo regeneracijos sampratą keičia iš mokslinės fantastikos į realybę. Mokslininkai jau įrodė, kad iš hEKL diferencijuotos TGL spontaniškai depoliarizuojasi ir geba reaguoti į glutamato kiekio pasikeitimus [131, 132]. Vis dėlto, dabartiniai kamieninių ląstelių paruošimo protokolai negali užtikrinti pakankamai reikšmingo TGL kiekio, siekiant klinikinės, ekonominės naudos ir efektyvumo. Šiuo metu TGL kultūros išėiga svyruoja nuo 0,1 iki 30 proc. ląstelių kultūros [133]. Taip pat, net ir pagaminus pakankamą kiekį TGL, skirto suleisti į stiklakūnį, integracijos veiksmingumas tinklainėje tebėra žemas – 1–7 proc. [134, 135]. Viena iš sudėtingos integracijos priežasčių yra vidinė ribojanti tinklainės membrana. Ji veikia kaip kliūtis integracijai: ją pašalinus, ląstelių integracija padidėja

[136]. Taip pat, daugelis ląstelių auginimo protokolų yra parengti siekiant išgryninti ląstelių populiaciją pagal CD90 (Thy-1) paviršiaus antigeno grupę. Nors Thy-1 antigenas yra ekspresuojamas TGL, kiti CNS neuronai taip pat pasižymi šio geno raiška. Tai gali sumažinti iš kamieninių ląstelių gautų TGL grynumą. Galiausiai, nors ir į tinklainę integravusių TGL aksonai auga link regos nervo, tačiau tik nedidelis jų kiekis įauga į patį regos nervą [135]. Pastebėta, kad daugelis aksonų, kuriems pavyko pasiekti regos kryžmę, auga link netikslinių taikinių (pvz., į priešingą regos nervą arba atgal į save), o ne į atitinkamą regos pluoštą [137]. Šie tyrimai rodo, kad vien ląstelių transplantacijos – be signalų, skatinančių aksonogenezę ir tiesioginį aksonų augimą – nepakaks regos nervui atkurti [137].

2.3. Farmakologiniai preparatai, turintys neuroprotektinį poveikį tinklainės ląstelėms gydant neurodegeneracines ligas

Glaukoma ir neurodegeneracinės ligos, tokios kaip Alzheimerio ir Parkinsono ligos, sukelia progresuojantį neuronų praradimą, galintį lemti negrįžtamus funkcinius sutrikimus. Neuroprotektinės medžiagos sumažina ląstelių žūtį ir išsaugo neuronų funkciją, taip lėtindamos ligos progresavimą [6]. Tarp šių medžiagų išskiriamos šios pagrindinės klasės: NMDA receptorių antagonistai, antioksidantai, neurotrofiniai veiksniai, vitaminai, kalcio kanalų blokatoriai, α 2-adrenerginių receptorių blokatoriai, statinai, INF γ antagonistai [6] (2.3.1 pav.).



2.3.1 pav. Skirtingų klasių neuroprotekinių savybių turintys preparatai

MK801 – disokilpino maleatas; NGF – nervų augimo faktorius; SNF – iš smegenų kilęs neurotrofinis faktorius; CNTF – ciliarinis neurotrofinis veiksnys; GDNF – iš glijos ląstelių kilęs neurotrofinis faktorius; AMPA – α-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoazolepropiono rūgštis; INF – interferonas.

Ekscitotoksiškumas, kurį sukelia per didelis glutamato išsiskyrimas, yra vienas pagrindinių veiksnių, pažeidžiančių neuronus sergant glaukoma ir kitomis neurodegeneracinėmis ligomis. NMDA receptorių antagonistai, tokie kaip memantinas, slopina glutamato sukeltą ekscitotoksiškumą, apsaugodami TGL glaukomos atveju ir neuronus, sergant Alzheimerio liga [138].

Oksidacinis stresas yra dar vienas svarbus neurodegeneracijos veiksnys. Tokios medžiagos kaip kofermentas Q10, resveratrolis ir vitaminas E veikia kaip laisvųjų radikalų šalintojai, mažindami lipidų peroksidaciją ir didindami neuronų atsparumą. Glaukoma sergantiems pacientams šie antioksidantai yra veiksmingi, palaikant tinklainės sveikatą ir apsaugant nuo oksidacinės žalos [9].

Neurotrofiniai faktoriai yra sekretuojami baltymai, gerai žinomi dėl savo poveikio užkertant kelią apoptozei ir palaikant neuronų vystymąsi [139–143]. Tyrimai nustatė, kad TGL žūtis po aksono pažeidimo dalinai įvyksta dėl sumažėjusios retrogradinės neurotrofinių faktorių pernašos [144]. Todėl moks-

lininkai siekia nustatyti šias molekules, tikėdamiesi, kad ilgalaikis jų taikymas galėtų apsaugoti pažeistas TGL. Neurotrofiniai faktoriai apima tokius baltymus kaip neurotrofinai (pvz., nervų augimo faktorius – NGF), SNF, neurokinai (pvz., CNTF) ir kiti augimo faktoriai. Nors buvo įrodyta, kad egzogeninių neurotrofinų, tokių kaip NGF ir SNF, injekcija į stiklakūnį arba atitolinti ūmią TGL žūtį po regos nervo pažeidimo graužikų modeliuose [145–148], monoterapija nebuvo tokia veiksminga TGL degeneracijos prevencijai. Kai SNF arba CNTF buvo skiriami kartu su periferinių nervų transplantatais į regos nervą, nebuvo pastebėta jokio pagerėjimo aksonų regeneracijoje, lyginant su kontrolinėmis grupėmis [147, 148].

Statinai yra vartojami hiperlipidemijos ir kardiovaskulinių ligų gydymui [149]. Pagrindinis jų veikimo mechanizmas yra cholesterolio sintezės mažinimas. Posch-Pertl atliktoje metaanalizėje tvirtinama, kad aukštas cholesterolio ir žemas didelio tankio lipoproteinų kiekis yra glaukomos išsivystymo rizikos veiksnys [150]. Statinų vartojimas buvo siejamas su akių ligų pagerėjimu pacientams, sergantiems normalaus spaudimo ir atviro kampo glaukoma pacientams [151, 152]. Vis dėlto, kiti tyrimai nenustatė ryšio tarp statinų vartojimo ir struktūrinių–funkcinių glaukomos pakitimų ir ligos progresavimo [153, 154].

KKB mažina TGL apoptozę sukeldami kraujagyslių išsiplėtimą ir mažindami kalcio jonų patekimą į ląstelės vidų [155]. Mokslininkai ištyrė, kad KKB mažina aksonų degeneraciją ir stimuliuoja aksonų regeneraciją [156]. Tyrimai su glaukomos pacientais nustatė prieštarigus rezultatus – dėl sukkelto kraujagysles plečiančio poveikio mažėja arterinis kraujo spaudimas ir nukenčia tinklainės kraujotaka, todėl KKB vartojimas neuroprotekciniais tikslais turėtų būti plačiau ištirtas [155, 157].

Brimonidinas yra $\alpha 2$ adrenerginių receptorių agonistas, kuris turi tiesioginį neuroprotekcinį poveikį TGL ir netiesiogiai apsaugo neuronines ląsteles mažindamas IOS [158]. Brimonidinas skatina neurotrofinių faktorių išsiskyrimą, mažina ekscitotoksiškumą ir taip apsaugo neuronines ląsteles nuo žūties [159].

Levetiracetamas – antiepilepsinis vaistas, turintis neuroprotekcinę savybę centriniame nervų sistemoje, tačiau jo poveikis tinklainės ląstelėms nėra pakankamai ištirtas [14, 15, 18, 160, 161]. Kadangi neurodegeneracinės ligos turi labai panašius molekulinis patogenetinius mechanizmus, levetiracetamas buvo pasirinktas šiame disertaciniame darbe dėl jo neuroprotekcinę savybę.

Šiam disertaciniam darbui buvo pasirinkta išanalizuoti tris skirtingų grupių preparatus, turinčius neuroprotekcinę savybę – brimonidiną, memantiną ir levetiracetamą. Brimonidinas ir memantinas mažina ekscitotoksiškumą susijusį su glutamato toksiškumu, o levetiracetamas slopina neurotoksinių ki-

nurenino kelio metabolitų išsiskyrimą astroglijoje ir ankstesniuose tyrimuose pasižymėjo neuroprotekcinio poveikiu Parkinsono ligos tyrimuose [15], o išsamių duomenų apie neuroprotekcinį poveikį tinklainės ląstelėms nėra.

2.3.1. Brimonidinas

Brimonidinas yra vaistas, skirtas glaukomai gydyti, lašų formuluotėje. Tai α_2 adrenerginių receptorių agonistas, turintis ikiklinikiniuose gyvūnų ir ląstelių tyrimuose įrodytą tinklainės ir regos nervo neuroprotekcinį savybių [158]. Manoma, kad brimonidinas skatina ląstelių išgyvenamumą, padidina neurotrofinių faktorių išsiskyrimą ir mažina ekscitotoksiškumą [159, 162]. Pagrindinis brimonidino veikimo mechanizmas yra slopinti adenilato ciklazės aktyvumą ir ciklinio adenozino monofosfato (cAMP) kiekį, taip sumažinant akies skysčio gamybą krumplyne [163]. Brimonidinas padidina akies skysčio nutekėjimą, stimuliuodamas α -adrenerginius receptorius, tokiu būdu atpalaiduodamas krumplyno raumenis ir skatindamas prostaglandinų išsiskyrimą [164]. Brimonidinas, žinomas dėl savo gebėjimo sumažinti akispūdį ir skatinti neuroprotekciją [10–12, 165], didina neurotrofinių faktorių išsiskyrimą [159, 166], mažina cAMP [167, 168], o taip pat reguliuoja amiloido beta [169, 170] ir NMDA receptorių, susijusių su glutamato toksiškumu, moduliavimą [169]. Tyrimai parodė, kad ir sisteminis, ir vietinis brimonidino vartojimas reikšmingai pagerina TGL išgyvenamumą įvairiuose ikiklinikiniuose graužikų pažeisto regos nervo ar ūminės tinklainės išemijos [171–173], ekscitotoksinio tinklainės pažeidimo [174], lėtinės akių hipertenzijos [175, 176] ir regos nervo suspaudimo sukeltų pažeidimų [177, 178] modeliuose. Taip pat yra nustatytų teigiamų klinikinių duomenų apie jo neuroprotekcinį poveikį pacientams, sergantiems glaukoma [179], su amžine geltonosios dėmės degeneracija [180], pigmentiniu retinitu [181], diabetine retinopatija [182] ir ūmine neareriitine priekine išemine regos nervo neuropatija [183].

Brimonidinas, buvo integruotas į polimerinę sistemą ir iširtas gydant geografinę atrofiją, amžinę geltonosios dėmės degeneraciją [184]. Ši sistema turėjo teigiamą terapinį poveikį, trunkantį iki 15 savaičių ir rodantį geografinės atrofijos pažeidimo sulėtėjimą. 30 mėnesių trukmės klinikiniame tyrime buvo tirti pacientai su žemu IOS ir gydomi brimonidino monoterapija. Tyrimo metu buvo pastebėta, kad glaukomos progresavimas buvo lėtesnis, lyginant su kontroline timololiu gydytų pacientų grupe (9 proc. ir 30 proc., atitinkamai) [179, 185]. Graužikų modelyje buvo įrodyta, kad brimonidinas reguliuoja glijos ląstelių glutamato įsisavinimą padidėjus IOS, o tai rodo, kad galima apsaugoti neuronus paveikiant makroglijos ląsteles [186].

Įrodyta, kad akispūdį mažinantys lašai lėtina arba užkerta kelią glaukoma sergantiems pacientams su padidėjusiu IOS [58, 172]. Nepaisant to, glauko-

minė neurodegeneracija gali atsirasti net ir pasiekus tikslinį IOS. Todėl labai svarbu sukurti gydymą, kuris būtų skirtas neurodegeneracinių padarinių gydymui ir padėtų išsaugoti TGL.

2.3.2. Memantinas

Memantinas (1-amino-3,5-dimetiladamantanas) yra stiprus neuroprotekcinis vaistas, kurį JAV maisto ir vaistų administracija (angl. *Food and Drug Administration, FDA*) ir Europos vaistų agentūra (angl. *European Medicines Agency, EMA*) patvirtino vidutinio sunkumo ir sunkios Alzheimerio ligos gydymui [187]. Nekonkurencingas NMDA receptorių „atvirų kanalų bloka torius“, memantinas nekonkuruoja su glutamatu dėl prisijungimo vietos, pasižymi santykinai mažu tapatumu ir greita kinetika [188]. Memantinas neturi beveik jokio poveikio, esant normaliam tarpląstelinio glutamato kiekiui ir tampa veiksmingas tik esant glutamato pertekliui.

Nors dauguma mokslininkų tiria memantino poveikį neuronams, tik keli tyrimai vertino jo poveikį astrogliai [189]. Wu ir kt. atliko tyrimą, kurio metu buvo nustatytos dvi pagrindinės neuroprotekcinės memantino savybės [190]. Jie įrodė, kad memantinas padidino glijos neurotrofinio faktoriaus, svarbaus neuronų išgyvenamumui, išsiskyrimą [190, 191]. Memantino priešuždegiminės savybės yra siejamos su uždegiminių veiksnių, tokių kaip superoksido, reaktyviųjų deguonies junginių, NNF- α , azoto oksido ir prostaglandino E2, išsiskyrimo mažinimu, taip yra slopinant per didelę mikroglijos aktyvaciją [190]. Dėl to astroglia yra svarbus neuronų apsaugos komponentas.

Gyvūnų glaukomos modelyje buvo nustatytas memantino neuroprotekcinis poveikis TGL [192, 193]. Nors ikiklinikiniuose glaukomos tyrimuose memantinas buvo daug žadantis, jis nepateisino lūkesčių III fazės kliniki niuose atviro kampo glaukomos tyrimuose, kuriuose dalyvavo 2298 pacientai (NCT00141882; NCT00168350) ir per 48 mėnesius nesugebėjo užkirsti kelio glaukomos progresavimui [13, 194]. Tai įrodo, kad reikia kito tyrimo plano, pvz., atrinkti pacientus, kurių progresavimas greitas, o taip pat ir jautresnių, išsamesnių tyrimų nustatyti progresavimui [13, 194].

2.3.3. Levetiracetamas

Vaistas nuo traukulių (S)- α -etil-2-okso-pirolidinas (levetiracetamas) pasi žymi neuroprotekcinio poveikiu ir turi platų antiepilepsinį veikimo spektrą [17, 195, 196]. Jis yra neretai naudojamas traukulių prevencijai po išeminio insulto. Neuroprotekcinis levetiracetamo poveikis Parkinsono ligai ir jos *in vitro* pažeidimo modeliuose buvo aprašytas jau 2011 metais [14, 15, 197, 198]. Manoma, kad pagrindinis levetiracetamo neuroprotekcijos mechanizmas yra susijęs su prisijungimu prie sinapsinės pūslelės glikoproteino 2A,

kuris moduliuoja neurotransmiterių išsiskyrimą [19, 199]. Buvo įrodytas ir kitas farmakologinis poveikis – N tipo įtampai jautrių kalcio ir kalio jonų kanalų slopinimas, α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoazolepropiono rūgšties (AMPA) receptorių ir kalcio jonų išsiskyrimas iš viduląstelių kalcio atsargų, veikiant į inozitolio 1,4,5-trifosfato (IP3) receptorių [160, 196, 200]. AMPA receptoriaus aktyvinimas atlieka svarbų vaidmenį prasidedant epilepsijos priepuoliams ir plintant iškrovai [201]. Tuo tarpu hiperaktyvus IP3 receptorių prisideda prie epilepsijos priepuolių, kylančių dėl neuronų pažeidimo, sukiamo epilepsijos priepuolių ir sutrikusios GABA egzocitozės priepuolio iškrovos metu [160, 202].

Lėtinis levetiracetamo vartojimas turi riziką padidinti prieštraukulinių metabolitų, kinureno ir ksantureno rūgščių išsiskyrimą astroglijoje bei sumažinti cinabarino rūgšties ir traukulius skatinančios chinolino rūgšties išsiskyrimą. Todėl panašu, kad levetiracetamas yra IFN γ , traukulius skatinančio farmakologinio poveikio, antagonistas. Tiek trumpalaikis, tiek ilgalaikis levetiracetamo vartojimas slopino hiperaktyvios astroglijos neurotoksinių molekulių išsiskyrimą, kurį sukelia AMPA ir IP3 receptorių aktyvacija. Trumpalaikis levetiracetamo vartojimas gali slopinti AMPA ir adenofostino-A sukeltą visų kinurenino metabolitų, tokių kaip kinureno, ksantureno, cinabarino ir chinolino rūgštys, išsiskyrimą. Tam, kad būtų slopinamas astroglijos kinurenino kelio metabolitų išsiskyrimas, levetiracetamo poveikis turėjo trukti bent 2 valandas [161].

Wang ir kolegų atliktame tyrime levetiracetamo vartojimas pagerino neurologinę funkcinę veiklą, sumažino histologinius neuronų pažeidimo ir vazospazmo požymius pelių uždaros galvos traumos ir subarachnoidinės hematomos modeliuose [61]. Šie rezultatai pabrėžia levetiracetamo potencialą kaip daugiafunkcio neuroprotekcinio vaisto, kuris gali būti vartojamas ne tik epilepsijai, bet ir įvairioms neurodegeneracinėms ligoms gydyti.

2.4. Iki klinikiniai gyvūnų neuroprotekcijos tyrimų modeliai

Regos nervo neuropatijų tyrimams yra taikomi keli iki klinikiniai gyvūnų modeliai. Vis dėlto, dažniausiai yra naudojamas RNS modelis. Nors RNS modelis tiesiogiai neatkartoja žmogaus glaukomos patofiziologinių mechanizmų, tačiau sukelia TGL degeneraciją, primenančią pirminį glaukominį pažeidimą. RNS modelis dažniausiai naudojamas tiriant mechanizmus, susijusius su TGL degeneracija bei tiriant farmakologinių preparatų terapinį poveikį glaukomos sukeltai neurodegeneracijai. RNS modelis pirmą kartą buvo išsamiai aprašytas 1999 m. [203], o vėliau buvo patobulintas, siekiant nustatyti ryšį tarp TGL žūties ir regos nervo suspaudimo jėgos bei trukmės [204, 205]. Be to, tiek pačios TGL, tiek RNS protokolui naudojama pelių

padermė gali skirtis savo atsparumu mechaniniams pažeidimams [206, 207]. Li ir kolegų atliktame tyrime buvo pastebėta, kad didžiausia TGL žūtis (~47 proc.) buvo nustatyta Balbc/cBYJ pelių padermėje, o mažiausia (26 proc.) – DBA/2J pelėse [207]. Tai įrodo, kad genetika gali turėti reikšmės TGL žūties lygiui po RNS [207]. Dėl greitos ir ganėtinai paprastos technikos RNS modelis yra patogus TGL žūčiai sukelti. Tokiu būdu galima veiksmingai tirti regos nervo neuropatijas, įskaitant glaukomą, nes stebima TGL pažaida yra homogeniška visoje tinklainėje. Taikant šį metodą, regos nervas suspaudžiamas už akies obuolio savaime susikleidžiamomis žnyplėmis, tokiu būdu užtikrinant tolygų ir kas kartą vienodą suspaudimo jėgos pasiskirstymą [208].

Regos nervo neuropatijoms tirti taip pat naudojami kiti ikiklinikiniai glaukomos modeliai, tokie kaip mikrorutuliukų (polistireno mikrorutuliukai su ar be viskoelastine medžiaga; magnetiniai mikrorutuliukai) suleidimas į priekinę kamerą, taip mechaniškai užkemšant akies skysčio nutekėjimo kelius. Šio modelio privalumas yra tas, jog yra atkuriamas patogenetinis glaukomos mechanizmas. Vis dėlto, neretai stebimas trumpalaikis ir staigus IOS pakilimas vėliau nusistovi ties 15–34 proc. IOS padidėjimu, o po 2 savaičių stebima TGL žūtis siekia 23–36 proc. Šiam modeliui reikalingos kelios chirurginės intervencijos, o IOS pakilimas gali varijuoti [209, 210].

Dar vienas modelis, sutrikdantis akies skysčio nutekėjimą yra episklerinių venų kauterizacija lazeriu arba hipertoniinio tirpalo suleidimas. Modelio metu yra stebimas IOS pakilimas nuo 6 iki 28 mmHg, o TGL žūtis varijuoja nuo 10 proc. iki 100 proc. Šiam modeliui atlikti reikalinga speciali įranga bei minimalūs chirurginiai įgūdžiai [211, 212].

3. TIRIAMIEJI IR METODAI

3.1. Eksperimentinių tyrimų struktūra

Eksperimentiniai tyrimai buvo suskirstyti į du etapus:

I etapas: brimonidino eksperimentiniai neuroprotekcijos tyrimai, vertinant vietinį ir sisteminį neuroprotektinį poveikį TGL ir tinklainės astroцитams pelės RNS modelyje analizuojant vaisto poveikį visoje tinklainėje ir skirtinguose tinklainės segmentuose.

II etapas: memantino ir levetiracetamo eksperimentiniai neuroprotekcijos tyrimai vertinant skirtingų dozių sisteminio gydymo poveikį TGL ir tinklainės astroцитams pelės RNS modelyje analizuojant pelės tinklainės struktūrinius pokyčius po RNS.

3.1.1. I etapo tyrimo struktūra: brimonidino neuroprotekcijos tyrimai naudojant regos nervo suspaudimo Balb/c pelių modelį

Tyrimo buvo naudotos keturiasdešimt viena Balb/c pelė. RNS buvo atliktas visoms pelėms dešiniojoje akyje, o kairioji akis buvo naudojama kaip kontrolinė. Gyvūnai buvo atsitiktinai priskirti vienai iš trijų eksperimentinių grupių:

1. Fiziologinio tirpalo grupė (sutrumpintai: dešinė akis – RNS/NaCl L + IP; kairioji akis – kontrolė/NaCl L + IP) – pelėms (n = 15) buvo lašinami fiziologinio tirpalo lašai du kartus per dieną septynias dienas. Pirmasis fiziologinio tirpalo akių lašas (vienas lašas (0,05 ml), 0,9 proc. NaCl) sulašintas 0 dieną prieš RNS atlikimą. Taip pat, buvo sušvirkštos dvi 100 µl fiziologinio tirpalo IP injekcijos prieš RNS 0 dieną ir 1 dieną po RNS (0,1 ml, 0,9 proc. NaCl). Likusiomis dienomis buvo tęsiami tik fiziologinio tirpalo lašai.

2. Brimonidino akių lašų grupė (sutrumpintai: dešinė akis – RNS/BMD L; kairioji akis – kontrolė/BMD L) – pelėms (n = 14) buvo skiriamas vietinis gydymas brimonidino tartrato akių lašais du kartus per dieną septynias dienas. Pirmasis brimonidino akių lašas buvo lašinamas 0 dieną prieš RNS (vienas lašas (0,05 ml); 2 mg/ml).

3. Brimonidino akių lašų ir IP injekcijų grupė (sutrumpintai: dešinė akis – RNS/BMD L + IP; kairė akis – kontrolė/BMD L + IP) – pelėms (n = 12) buvo skirtas vietinis gydymas brimonidino tartrato akių lašais du kartus per dieną septynias dienas. Pirmasis brimonidino akių lašas buvo lašinamas 0 dieną prieš RNS (vienas lašas (0,05 ml); 2 mg/ml). Taip pat, buvo sušvirkštos dvi IP brimonidino injekcijos prieš RNS 0 dieną ir 1 dieną po RNS (2 mg/kg per parą 2 mg/ml brimonidino tartrato). Likusias dienas buvo tęsiamas gydymas lašais.

Taip pat buvo vertintas memantino intravitrealinių injekcijų poveikis pelėms. Šio tyrimo metu buvo skirta vienkartinė intravitrealinė memantino injekcija (1 mg/ml 2 μ l) iš karto atlikus RNS. Dėl stebėtų uždegiminių reakcijų, neatitinkančių standartų tinklainės preparatų ir galimų duomenų iškreipimo, į tolimesnę analizę šios grupės duomenys neįtraukti.

Gyvūnams buvo atlikta eutanazija septintą dieną po RNS, o tinklainės iš abiejų akių buvo išpreparuotos tolimesnei analizei. Eksperimentinio tyrimo struktūra pavaizduota (3.1.1.1 pav.).



3.1.1.1 pav. I etapo eksperimentinio tyrimo struktūra

RNS – regos nervo suspaudimas; IP – intraperitoninis.

3.1.2. II etapo tyrimo struktūra: memantino ir levetiracetamo neuroprotekcijos tyrimai naudojant regos nervo suspaudimo C57Bl/6J pelių modelį

Tyrimė buvo naudojamos trisdešimt septynios C57Bl/6J pelės. RNS buvo atliktas visoms pelėms dešinėje akyje, o kairė akis buvo naudojama kaip kontrolinė grupė. Gyvūnai buvo atsitiktinai priskirti vienai iš penkių eksperimentinių grupių:

1. Fiziologinio tirpalo grupėje (sutrumpintai: dešinė akis – RNS/NaCl grupė; kairioji akis – kontrolė/NaCl) – pelėms (n = 16) buvo suleidžiamos fiziologinio tirpalo IP injekcijos (NaCl 0,9 proc. 0,01 ml) vieną kartą per dieną septynias dienas.

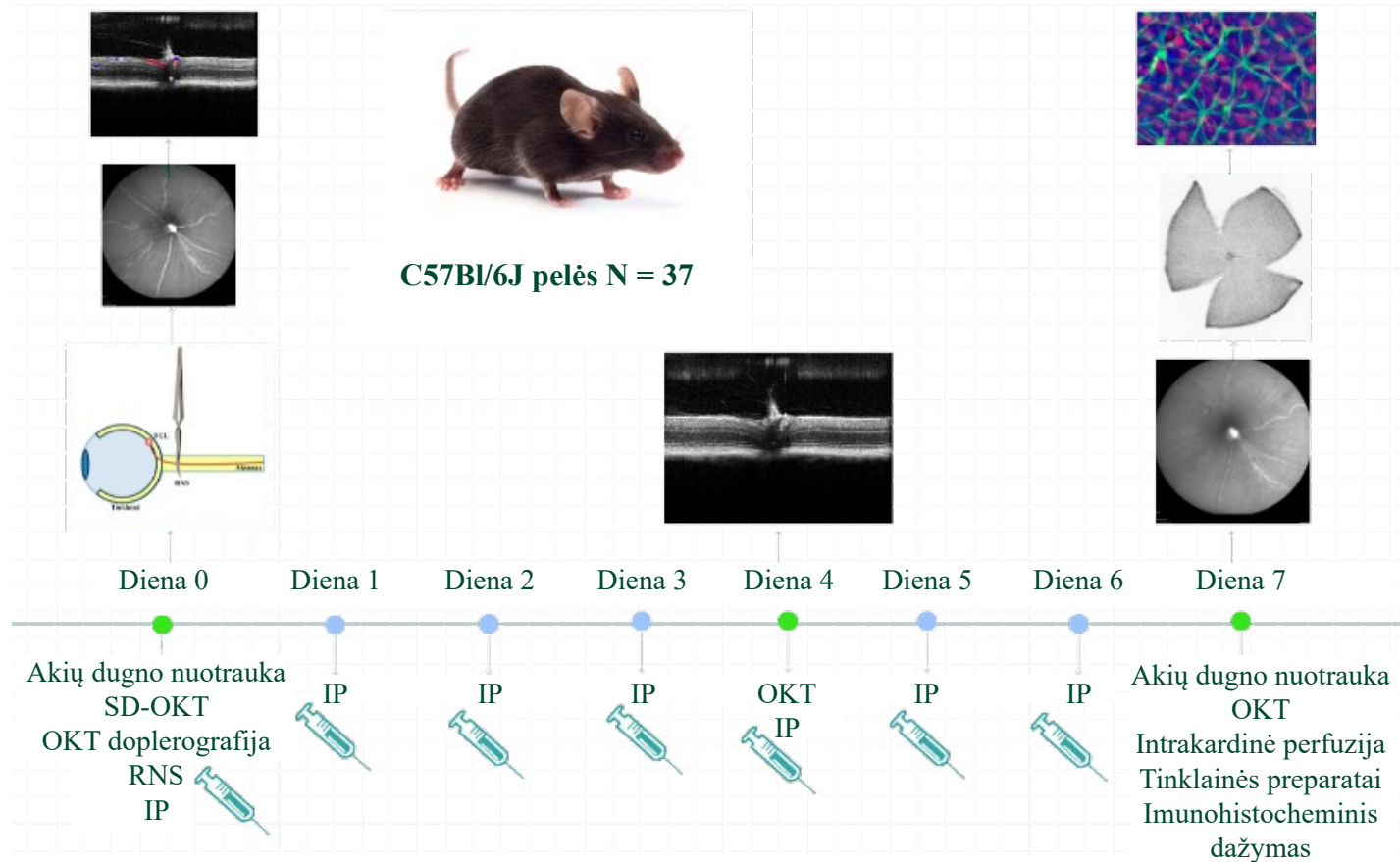
2. Memantino mažos dozės grupėje (sutrumpintai: dešinė akis – RNS/MEM MD, kairė akis – kontrolė/MEM MD) – pelėms (n = 6) vieną kartą per dieną septynias dienas buvo sušvirkštos memantino IP injekcijos (5 mg/kg).

3. Memantino didelės dozės grupėje (sutrumpintai: dešinė akis – RNS/MEM DD, kairė akis – kontrolė/MEM DD) – pelėms (n = 5) kartą per dieną septynias dienas buvo sušvirkštos memantino IP injekcijos (10 mg/kg).

4. Levetiracetamo mažos dozės grupėje (sutrumpintai: dešinė akis – RNS/LEV MD, kairė akis – kontrolė/LEV MD) – pelėms (n = 5) kartą per dieną septynias dienas buvo sušvirkštos levetiracetamo IP injekcijos (40 mg/kg).

5. Levetiracetamo didelės dozės grupėje (sutrumpintai: dešinė akis – RNS/LEV DD, kairė akis – kontrolė/LEV DD) – pelėms (n = 5) kartą per dieną septynias dienas buvo sušvirkštos levetiracetamo IP injekcijos (80 mg/kg).

Gyvūnams buvo atlikta eutanazija septintą dieną po RNS, o tinklainės iš abiejų akių buvo išpreparuotos tolimesnei analizei. Eksperimentinio tyrimo struktūra pavaizduota schemoje (3.1.2.1 pav.).



3.1.2.1 pav. II etapo eksperimentinio tyrimo struktūra

IP – intraperitoninis; SD-OKT – spektrinė domeno optinė koherentinė tomografija; RNS – regos nervo suspaudimas.

I ir II etapo eksperimentų metodikos santrauka pavaizduota lentelėje (3.1.2.1 lentelė).

3.1.2.1 lentelė. I ir II etapų eksperimentinių tyrimų metodologijos santrauka

Metodai	I etapas			II etapas		
	Diena 0	Diena 4	Diena 7	Diena 0	Diena 4	Diena 7
Regos nervo suspaudimas	+	-	-	+	-	-
Akių dugno nuotraukos	-	-	-	+	-	+
SD-OKT + OKT spalvinė doplerografija	-	-	-	+	+	+
Intrakardinė perfuzija	-	-	+	-	-	+
Tinklainės preparatų ruošimas	-	-	+	-	-	+
Imunohistocheminis dažymas	NeuN	+		+		
	GFAP	+		+		
	DAPI	+		-		
Tinklainės ląstelių skaičiavimas visoje tinklainėje	+			+		
Tinklainės ląstelių skaičiavimas trijuose tinklainės segmentuose (centre, viduryje, periferijoje)	+			-		

SD-OKT – spektrinė domeno optinė koherentinė tomografija; GFAP – glijos fibrilinis rūgštinis baltymas, pirminis antikūnas; NeuN – neuronams specifinis branduolių baltymas, pirminis antikūnas; DAPI – 4',6-diamidino-2-fenylindolas; RNS – regos nervo suspaudimas.

3.2. Tiriamųjų gyvūnų charakteristika

I etapo eksperimentiniai tyrimai ir analizė atlikta Lietuvos sveikatos mokslų universitete Akių ligų klinikoje, Veterinarijos akademijos Gyvūnų tyrimų centre ir Anatomijos institute. II etapas vykdytas Gyvūnų tyrimų centre, Tampėrės universitete, Suomijoje.

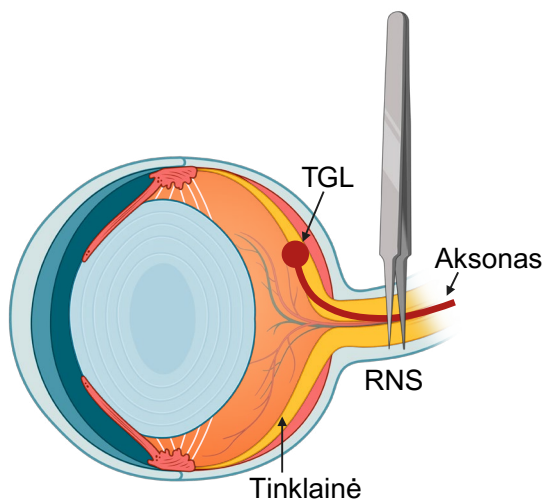
Visos procedūros ir gyvūnų priežiūra buvo atliekamos pagal Europos gyvūnų priežiūros konvenciją ir regos ir oftalmologinių tyrimų asociacijos (angl. *ARVO, Association for research in vision and ophthalmology*) pareiškimą dėl gyvūnų naudojimo oftalmologiniams ir regos tyrimams. Visi eksperimentai buvo patvirtinti Lietuvos valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos bei išduotas leidimas (Nr. G2-23). Šiame tyrime buvo panaudoti 41 sveiki 3 mėnesių Balb/c pelių patinai (vidutiniškai sveriantys $25 \text{ g} \pm 3,8 \text{ g}$) ir 37 sveiki 3 mėnesių C57Bl/6J pelių patinai (vidutiniškai sveriantys $22 \text{ g} \pm 4 \text{ g}$) (Suomijos eksperimentų su gyvūnais valdybos patvirtinimas ir protokolų stebėjimas (Experimentica Ltd gyvūnų licencijos numeris ESAVI/219/04.10.07/2014)). Pelės buvo laikomos LSMU VA ir Tampėrės universiteto gyvūnų tyrimų cen-

truose ir palaikomos normaliomis apšvietimo sąlygomis su maistu ir vandeniu *ad libitum*. Visos procedūros buvo atliktos taikant gilią intraperitoninę anesteziją, naudojant 1 mg/kg medetomidino (Domitor 1 mg/ml, Orion Corporation Pharma, Suomija) ir 75 mg/kg ketamino (Ketamidor 10 proc., Richter Pharma AG, Austrija). Gyvūnams buvo atlikta eutanazija taikant gilią anesteziją, atliekant intrakardinę perfuziją su aldehido pagrindo fiksatoriais.

3.3. Tyrimo metodai

3.3.1. Regos nervo suspaudimas pelės modelyje

Pasiekus gilią anesteziją, buvo padarytas pjūvis superolateralinėje akies obuolio junginės dalyje, kad būtų galima švelniai atitraukti akies obuolį į išorę naudojant pincetą ir patekti tarp akių judinančių raumenų, nepažeidžiant kraujomaišelių. Pagal Kalesnyko ir kolegų aprašytą metodiką, kai regos nervas yra aiškiai vizualizuojamas, 3 sekundėms buvo suspaudžiamas su savaime užsidarančiu Dumont pinctu (Sigma-Aldrich, Misūris, JAV), kad suspaustų ir pažeistų regos nervą, esantį maždaug 2 mm už akies obuolio [208] (3.3.1.1 pav.). Po RNS atlikimo TGL žūtis prasideda ganėtinai greitai ir po 7 dienų aptinkama 25–50 proc. žūtis (priklausomai nuo pelių padermės) [213].



3.3.1.1 pav. *Regos nervo suspaudimo modelis. Regos nervas suspaudžiamas savaime užsidarančiu Dumont pinctu 1–2 mm už akies obuolio. Spaudimas laikomas 3 sekundes*

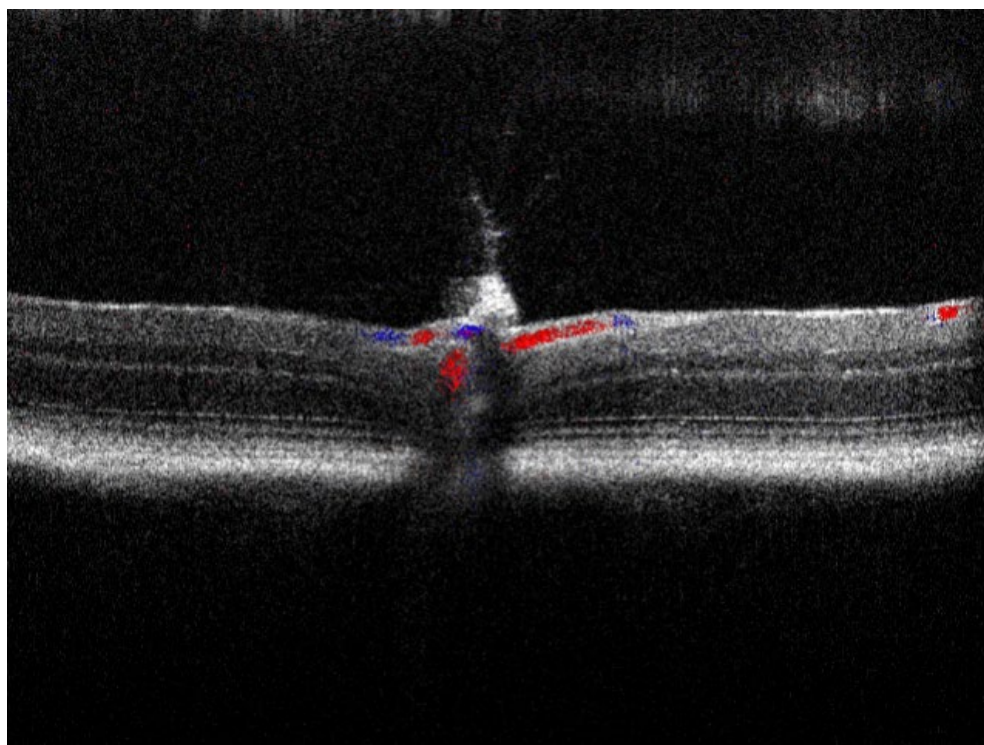
TGL – tinklainės ganglinės ląstelės; RNS – regos nervo suspaudimas.

3.3.2. Akių dugno nuotraukos

Akių dugno nuotraukos buvo atliktos II tyrimo etape penkioms eksperimentinėms grupėms 0 dieną (prieš RNS) ir 7 dieną. Pasiekus gilią anesteziją pelės buvo švelniai prifiksiuotos prie Heidelberg Spectralis HRA2 sistemos (Heidelberg Engineering GmbH, Vokietija). Vaizdas buvo sufokusuotas į tinklainę ir atliktos akių dugno nuotraukos. Tyrimo metu buvo lašintos dirbtinės ašaros į abi akis, apsaugant ragenas nuo išdžiūvimo.

3.3.3. Spektrinė domeno–optinė koherentinė tomografija (SD-OKT), spalvinė OKT doplerografija

II tyrimo etape penkioms eksperimentinėms grupėms buvo atlikta tinklainės OKT 0 dieną (iš karto po RNS atlikimo), 4 ir 7 eksperimento dieną. Sukėlus giliają anesteziją (patvirtinta pėdos reflekso nebuvimu), gyvūnas buvo dedamas ant graužikams skirto padėklo su galvos imobilizacija. SD-OKT sistemos (Bioptigen /Leica Envisu R2200) lęšis buvo nukreiptas į akį, kad būtų galima atlikti *in vivo* skenavimą naudojant X ir Y valdiklius. Regos nervo diskas buvo centruotas, atliekant OKT B skenavimą. Tinklainės sluoksniai buvo aiškiai vizualizuoti, o tinklainės skersiniai pjūviai, ekrane perteikti dvimačiu vaizdu. Sėkminga tinklainės perfuzija buvo patvirtinta naudojant spalvinę OKT doplerografiją iš karto po RNS 0 dieną, vėliau 4 ir 7 eksperimento dieną. Svarbu užtikrinti, kad dėl mechaninio regos nervo pažeidimo nebūtų užsitęsios išemijos (3.3.3.1 pav.). Tyrimo metu į abi akis buvo lašinamos dirbtinės ašaros, siekiant apsaugoti ragenas nuo išdžiūvimo.

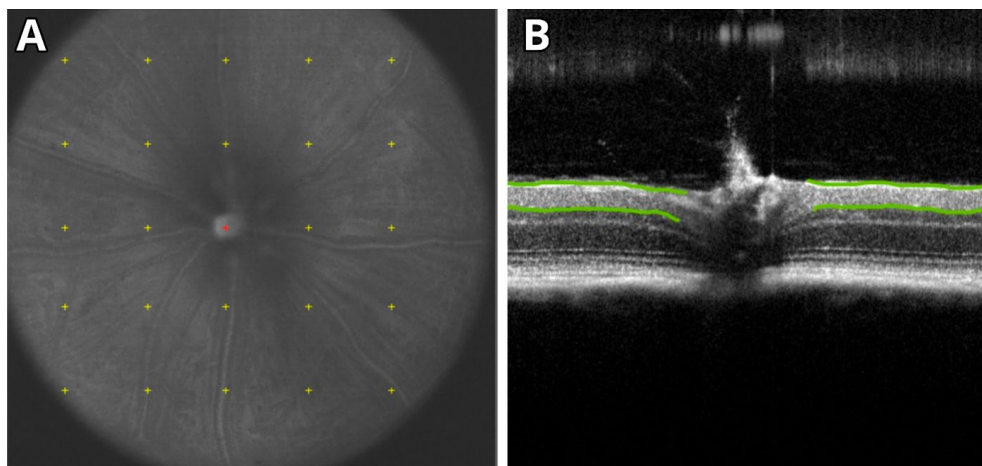


3.3.3.1 pav. Spalvinė OKT doplerografija. Arterinės ir veninės kraujotakos vizualizavimas – geros tinklainės perfuzijos patvirtinimas po RNS modelio atlikimo. Raudona spalva – arterinė kraujotaka, mėlyna spalva – veninė kraujotaka

OKT – optinė koherentinė tomografija.

3.3.4. Ganglinių ląstelių komplekso storio matavimai

Ganglinių ląstelių kompleksą (GLK) sudaro tinklainės nervinių skaidulų, TGL ir vidinis tinklinis sluoksnių. Šis segmentas yra vidinėje tinklainės dalyje, yra hiperreflektuojantis SD-OKT vaizduose, todėl ganėtinai lengvai diferencijuojamas nuo toliau esančio vidinio branduolių sluoksnio. Rankinis vidinių tinklainės sluoksnių storio įvertinimas iš *in vivo* vaizdo (SD-OKT) buvo atliktas 24 tinklainės taškuose (3.3.4.1 pav.).



3.3.4.1 pav. Pelės tinklainės SD-OKT vaizdas. A paveiksle SD-OKT 5×5 stačiakampio formos tinklelis, dydis $1,4 \text{ mm} \times 1,4 \text{ mm} \times 1,638 \text{ mm}$. Rankinis ganglinių ląstelių kompleksu storio matavimas buvo įvertintas 24 skirtinguose tinklainės taškuose 0, 4 ir 7 dienomis. Centrinė vieta (pažymėta raudonai A paveikslėlyje) žymi regos nervo diską. B paveiksle tinklainės sluoksnių skersiniai pjūviai, ekrane perteikti dvimačiu vaizdu. Žalios linijos riboja hiperreflektuojantį ganglinių ląstelių kompleksą
SD-OKT – spektrinė domeno optinė koherentinė tomografija.

3.3.5. Vaistinių preparatų skyrimas ir paruošimas

3.3.5.1. Brimonidino vartojimas

Ikiklinikinio tyrimo metu I etape Balb/c pelėms buvo skiriamas brimonidino tartrato tirpalas (Luxfen 2 mg/ml, Sanitas, Lietuva) akių lašais du kartus per dieną septynias dienas (vienas lašas (0,05 ml); 2 mg/ml, $n = 14$) RNS/BMD L grupėje. RNS/BMD L + IP grupei be brimonidino akių lašų 7 dienas, papildomai buvo atliktos ir dvi IP brimonidino injekcijos – pirmoji IP injekcija prieš RNS atlikimą 0 eksperimento dieną, antra IP injekcija 1 eksperimento dieną (2 mg/kg per parą 2 mg/ml brimonidino tartrato, $n = 12$) (3.1.1.1 pav.).

3.3.5.2. Memantino paruošimas ir vartojimas

Eksperimentinio tyrimo II etape C57Bl/6J pelėms buvo skiriamos IP memantino injekcijos (Merz & Co, Vokietija). Paruoštas tirpalas injekcijai ištirpinant 10 mg memantino 20 ml NaCl 0,9 proc. Gautas 0,5 mg/ml memantino tirpalas. RNS/MEM MD grupėje vieną kartą per dieną septynias dienas buvo sušvirkštos memantino IP injekcijos (5 mg/kg), o RNS/MEM DD grupėje

vieną kartą per dieną septynias dienas buvo sušvirškštos memantino IP injekcijos (10 mg/kg) pagal pelės svorį (3.1.2.1 pav.).

3.3.5.3. Levetiracetamo paruošimas ir vartojimas

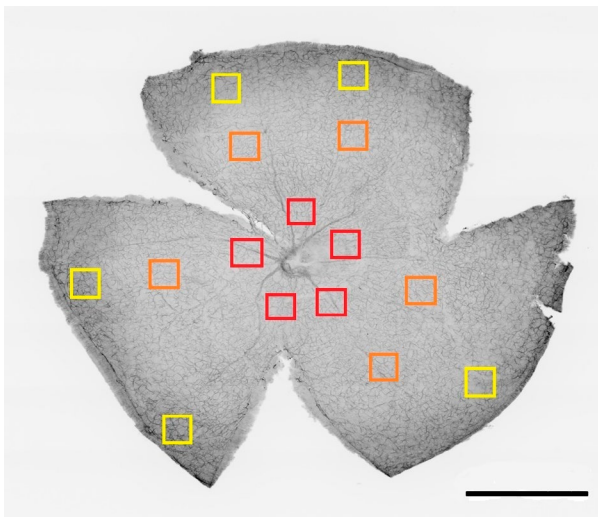
Pelėms buvo skiriamos IP levetiracetamo injekcijos (UCB Pharma, Belgija). Paruoštas tirpalas injekcijai ištirpinant 500 mg levetiracetamo 5 ml NaCl 0,9 proc. Gautas 100 mg/ml levetiracetamo tirpalas. RNS/LEV MD grupei buvo skirta vieną kartą per dieną septynias dienas levetiracetamo IP injekcija 40 mg/kg, o RNS/LEV DD grupei skirta 80 mg/kg levetiracetamo IP dozė vieną kartą per dieną septynias dienas pagal pelės svorį (3.1.2.1 pav.).

3.3.6. Tinklainės preparatų ruošimas ir imunohistocheminis dažymas

Pelėms buvo atlikta eutanazija taikant gilią bendrą IP anesteziją praėjus septynioms dienoms po RNS. Minkštųjų akių audinių fiksacija atlikta intrakardine perfuzija su aldehido pagrindo fiksatoriais. Abi akys buvo pašalintos ir fiksuotos 4 proc. paraformaldehido (PFA) tirpale 3 valandas. Abiejų akių tinklainės buvo atskirtos nuo odenos ir fiksuotos 4 proc. PFA per naktį. Vėliau tinklainės du kartus plaunamos 0,1 M fosfato buferio tirpalu (PBS) 5 minutes. Tada audiniai buvo inkubuojami 10 proc. normalizuotame ožkos serume (angl. *normal goat serum*, NGS; Colorado Serum Company, JAV) ir 0,5 proc. Triton tirpale (Sigma-Aldrich, Misūris, JAV) 30 min. Vėliau tinklainės buvo inkubuojamos su pirminiais antikūnais per naktį 4 °C temperatūroje: NeuN (neuronams specifinis branduolių baltymas, pirminis antikūnas) (1:500) (MAB377, MilliporeSigma, Masačiusetas, JAV); triušio glijos fibrilinis rūgštinis baltymas (specifiškas astroцитams, pirminis antikūnas) (GFAP, 1: 1000) (Dako (Z0334), Danija). Tinklainės tris kartus skalaujamos 1 proc. NGS ir 0,1 proc. Triton tirpale 5 minutes ir inkubuojamos antriniuose antikūnuose 3 valandas tamsoje: AlexaFluor Mouse 488 (1:250) (Life Technologies (A11001), Kalifornija, JAV) ir AlexaFluor Rabbit 594 (1:250) (Life Technologies (A11037), Kalifornija, JAV). Tinklainės buvo tris kartus skalaujamos 1 proc. NGS ir 0,1 proc. Triton tirpale 5 minutes po inkubacijos su antikūnais. Vėliau tinklainės buvo inkubuojamos su 4',6-diamidino-2-fenylindolo (DAPI) tirpalu (1:10000) (Sigma-Aldrich (D9542-5NG), Misūris, JAV) 30 minučių, po to tris kartus 5 minutes plaunamos PBS. Galiausiai tinklainės buvo išklotos ant objekcinio stiklelio naudojant Fluoroshield (Sigma-Aldrich (F6937), Misūris, JAV) ir uždengtos dengiamaisiais stikleliais.

3.3.7. Tinklainės ląstelių analizė

Imunohistochemiškai nudažyti tinklainės preparatai buvo analizuojami naudojant fluorescencinį mikroskopą (Zeiss Axio Imager Z1, Carl Zeiss AG, Jena, Vokietija) naudojant 40 kartų padidinimą. Analizuodami tinklainės visi preparatai buvo užkoduoti. Mėginius užkodavo vienas tyrėjas, o skaičiavimą atliko pagrindinis tyrimo autorius. Iš kiekvienos tinklainės buvo atsitiktinai parinkti 0,04 mm² ploto vaizdai analizei. I eksperimentinio darbo etape NeuN, GFAP ir DAPI teigiamos ląstelės buvo skaičiuotos rankiniu būdu, rezultatai apjungti ir apskaičiuoti į ląsteles/mm². I tyrimo etape NeuN, GFAP ir DAPI teigiamos ląstelės buvo skaičiuotos ir skirtinguose tinklainės dalyse – centre, viduriniame trečdalyje ir periferijoje (3.3.7.1 pav.). Kiekviename tinklainės segmente buvo atsitiktinai pasirinkta po penkis vaizdus, ląstelės apskaičiuotos viename mm². NeuN, GFAP ir DAPI teigiamos ląstelės buvo skaičiuojamos rankiniu būdu, naudojant Image J programinę įrangą (Wayne Rasband, Nacionaliniai sveikatos institutai, JAV). II eksperimento etape: NeuN ir GFAP teigiamos ląstelės buvo skaičiuotos rankiniu būdu, rezultatai apjungti ir apskaičiuoti į ląsteles/mm² (3.1.2.1 lentelė).



3.3.7.1 pav. Tinklainės ląstelių skaičiavimo metodika skirtinguose segmentuose (I tyrimo etapas). NeuN, GFAP ir DAPI teigiamos ląstelės buvo suskaičiuotos 15 atsitiktinai parinktų segmentų (0,04 mm²): centrinėje ($n = 5$, raudoni kvadratai), vidurinėje ($n = 5$, oranžiniai kvadratai) ir periferinėje ($n = 5$, geltoni kvadratai) tinklainės dalyse. Mastelis 1000 μ m
NeuN – neuronams specifinis branduolių baltymas, pirminis antikūnas; GFAP – glijos fibrilinis rūgštinis baltymas, pirminis antikūnas; DAPI – 4',6-diamidino-2-fenylindolas.

Astroцитų morfologija atitiko GFAP teigiamų ląstelių, kurių ląstelių kūnai yra tinklainės nervinių skaidulų sluoksnyje arba TGL sluoksnyje, kriterijus. Norint turėti patikimus rezultatus, tinklainės ląstelės buvo skaičiuojamos vi-
same vaizde, įskaitant kairę ir apatinę kraštines. Ląstelės, kirtusios dešinę ir viršutinę ribas, nebuvo įtrauktos į analizę.

3.4. Statistinė analizė

Kiekybiniai duomenys buvo analizuojami naudojant GraphPad Prism, 10.4.0 versija (GraphPad Software Inc., JAV) ir pateikiami kaip vidurkis (ląstelės/mm²) ± standartinis nuokrypis (SN). Hipotezės, ar kiekybinių požymių reikšmių skirstinys yra normalusis (Gauso), buvo tikrintos, taikant *Shapiro-Wilk* kriterijų. Kiekybinių požymių, netenkinančių normalumo sąlygos, reikšmių skirtumas lyginamosiose grupėse vertintas taikant neparametrinį *Mann-Whitney* kriterijų (dviejų nepriklausomų grupių atveju), *Kruskal-Wallis* kriterijų (kelių nepriklausomų grupių atveju). Jei kiekybinių požymių reikšmės populiacijoje buvo pasiskirsčiusios pagal normalųjį (Gauso) dėsnį, dviejų nepriklausomų populiacijų vidurkiai lyginti taikant *Student t* kriterijų, vienpusę ANOVA dispersiją su Tukey daugkartiniu palyginimo testu (kelių nepriklausomų grupių atveju). Kiekybinių požymių, tenkinusių normalaus (Gauso) skirstinio sąlygas, tarpusavio ryšiai analizuoti taikant *Pearson*, o netenkinusių normalaus (Gauso) skirstinio sąlygų *Spearman* koreliacijos koeficientą. Dvireikšmio priklausomojo kokybinio kintamojo prognozei atlikti buvo taikoma dvinarė logistinė regresinė analizė. Skirtumai ar ryšys tarp požymių buvo laikomi statistiškai reikšmingais, kai $p < 0,05$.

RNS analizei grupės vidurkiai buvo apskaičiuoti apjungiant ląstelių skaičiaus vidurkius. Vertinant dinامينius pokyčius, kiekvienos pelės ląstelių skaičiaus pokytis buvo apskaičiuojamas atskirai, lyginant dešinę akį (po RNS) su sveikąja kaire akimi (be RNS). Individualus kiekvieno tiriamojo pokytis (Δ) buvo apjungtas į grupes palyginimui.

4. REZULTATAI

4.1. I eksperimentinių tyrimų etapo rezultatai

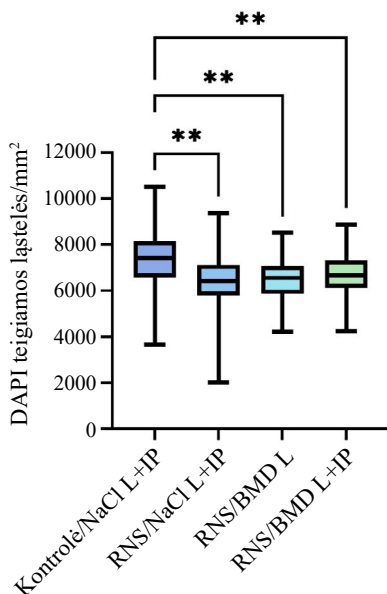
4.1.1. Sistemškai naudoto brimonidino šalutinis poveikis

Penkios iš 12 Balb/c pelių patyrė sedacinį šalutinį poveikį po IP brimonidino injekcijos, galimai dėl hipotenzinio brimonidino poveikio, tačiau po 60 minučių atgavo normalų aktyvumą.

4.1.2. Brimonidino poveikis tinklainės ląstelėms visame tinklainės plote

4.1.2.1. Neneuroninių tinklainės ląstelių analizė

Visose eksperimentinėse grupėse buvo atliktas RNS pažeidimas vienoje akyje. Tai buvo nustatyta dėl ženklaus DAPI nusidažiusių tinklainės ląstelių skaičiaus sumažėjimo RNS/NaCl L+IP (6463 ± 1117), RNS/BMD L ($6437 \pm 915,3$) ir RNS/BMD L+IP ($6691 \pm 901,5$) grupėse, palyginti su kontrolinėmis akimis be RNS (7413 ± 1208) ($p < 0,0001$). Nebuvo pastebėta reikšmingų skirtumų tarp DAPI nusidažiusių ląstelių skaičiaus eksperimentinėse grupėse po RNS (4.1.2.1.1 pav., 4.1.2.1.1 lentelė).



4.1.2.1.1 pav. DAPI teigiamų ląstelių vidurkių palyginimas visoje tinklainėje po RNS

RNS – regos nervo suspaudimas. p reikšmė remiantis neparametriniumi *Kruskal-Wallis* testu;

** $p < 0,0001$.

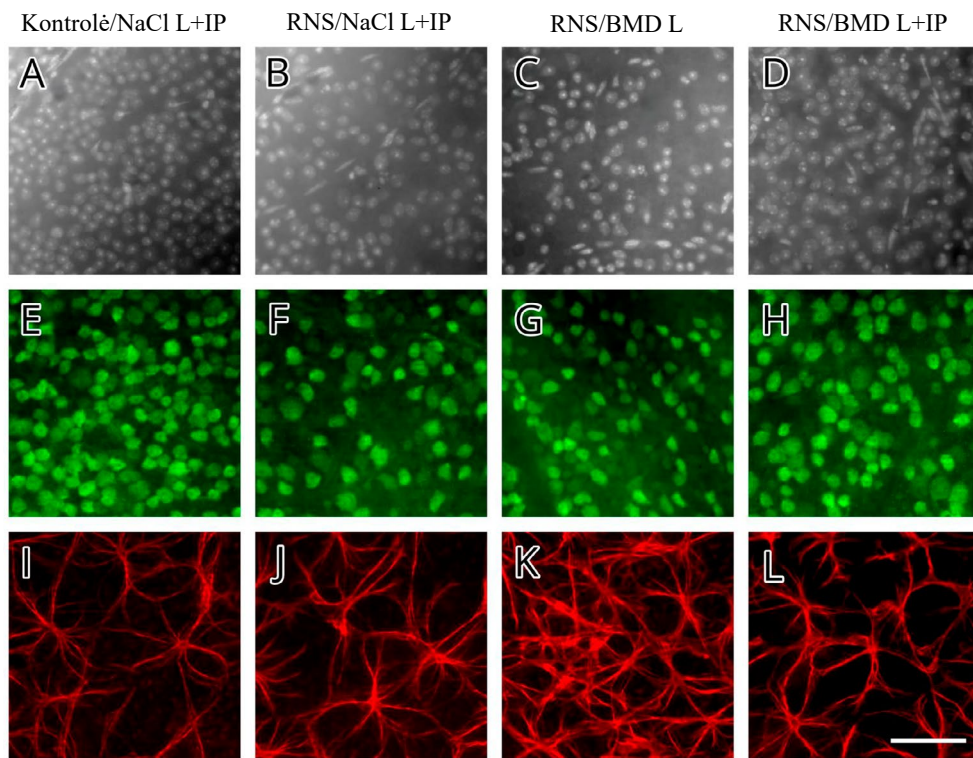
4.1.2.1.1 lentelė. DAPI teigiamų ląstelių skaičiaus vidurkis visame tinklainės plote ir skirtinguose regionuose (ląstelės/mm² ± SN) Balb/c pelių tinklainėje

	Visa tinklainė	Centras	Vidurys	Periferija
Kontrolė/NaCl L+IP	7413 ± 1208**	7930 ± 113**	7451 ± 1188*	6857 ± 1070*
RNS/NaCl L+IP	6463 ± 1117	6858 ± 1249	6559 ± 903	5954 ± 970,8
RNS/BMD L	6437 ± 915,3	6813 ± 807,3	6489 ± 863	6022 ± 905,4
RNS/BMD L+IP	6691 ± 901,5	7004 ± 711	6649 ± 929,6	6390 ± 966,6

p reikšmė remiantis neparametriniu *Kruskal-Wallis* testu. * *p* < 0,001; ** *p* < 0,0001.
kontrolė/NaCl L+IP vs. RNS/NaCl L+IP (visa tinklainė, centras **, vidurys, periferija *);
kontrolė/NaCl L+IP vs. RNS/BMD L (visa tinklainė, centras **, vidurys, periferija *);
kontrolė/NaCl L+IP vs. RNS/BMD L+IP (visa tinklainė, centras **, vidurys, periferija *).

4.1.2.2. NeuN teigiamų ląstelių vidurkio analizė

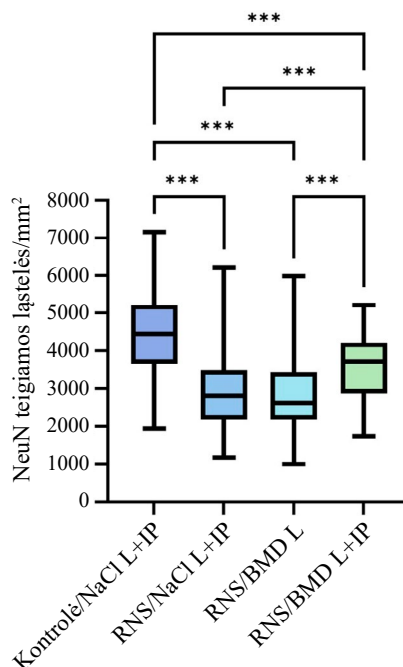
Likęs NeuN skaičius tinklainėje buvo žymiai mažesnis visose eksperimentinėse grupėse po RNS pažeidimo palyginti su sveikomis kontrolinėmis akimis be RNS (4450 ± 1140) (*p* < 0,0001). Papildomos IP brimonidino injekcijos ženkliai pagerino TGL išlikimą tinklainėje (3625 ± 817,9), palyginti su RNS/BMD L (2854 ± 1058) ir RNS/NaCl L+IP grupėmis (2912 ± 1083) (*p* < 0,0001) (4.1.2.2.1 ir 4.1.2.2.2 pav., 4.1.2.2.1 lentelė).



4.1.2.2.1 pav. Mikrofotografija, vaizduojanti imunofluorescentinį pelės tinklainės dažymą eksperimentinėse RNS grupėse. Nuotraukose stebimas tinklainės ląstelių tankis eksperimentinėse RNS ir kontrolinėse grupėse.

A, B, C, D: DAPI neneuroninių ląstelių branduolio žymeklis, reprezentuojantis visas tinklainės ganglinių ląstelių sluoksnio ląsteles; E, F, G, H – NeuN pirminiu antikūnu nudažytos TGL ir amakrininės ląstelės (žalia spalva); I, J, K, L – tinklainės astrocitai (raudona spalva), pažymėti antikūnais prieš GFAP

RNS – regos nervo suspaudimas; DAPI – 4',6-diamidino-2-fenylindolas; NeuN – neuronams specifinis branduolių baltymas, pirminis antikūnas; GFAP – glijos fibrilinis rūgštinis baltymas, pirminis antikūnas; mastelio juosta – 50 μm.



4.1.2.2.2 pav. NeuN dažytų ląstelių vidurkis tinklainėje po RNS kontrolinėje ir eksperimentinėse grupėse

NeuN – neuronams specifinis branduolių baltymas, pirminis antikūnas;
p reikšmė remiantis neparametriniu *Kruskal-Wallis* testu. *** *p* < 0,0001.

4.1.2.2.1 lentelė. NeuN teigiamų ląstelių skaičiaus vidurkis visoje tinklainėje ir skirtinguose tinklainės regionuose (ląstelės/mm² ± SN)

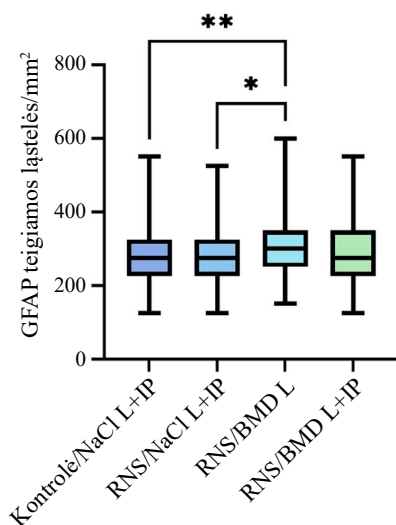
Grupė	Visa tinklainė	Centras	Vidurys	Periferija
Kontrolė/NaCl L+IP	4450 ± 1140***	4937 ± 1008***	4539 ± 1129**	3911 ± 1049***
RNS/NaCl L+IP	2912 ± 1083	3348 ± 1117	2970 ± 1139	2384 ± 721,4
RNS/BMD L	2854 ± 1058	2811 ± 1154	3057 ± 1055	2675 ± 968
RNS/BMD L+IP	3625 ± 817,9***	3505 ± 753,4*	3710 ± 934,5*	3630 ± 737,8**

p reikšmė remiantis neparametriniu *Kruskal-Wallis* testu. * *p* < 0,05; ** *p* < 0,001; *** *p* < 0,0001.

kontrolė/NaCl L+IP vs. RNS/NaCl L+IP (visa tinklainė, centras ***, vidurys, periferija **);
kontrolė/NaCl L+IP vs. RNS/BMD L (visa tinklainė, centras, periferija ***, vidurys **);
kontrolė/NaCl L+IP vs. RNS/BMD L+IP (visa tinklainė, centras ***, vidurys **);
RNS/BMD L+IP vs. RNS/NaCl L+IP (visa tinklainė ***, vidurys *, periferija **);
RNS/BMD L+IP vs. RNS/BMD L (visa tinklainė ***, centras *, periferija ***).

4.1.2.3. GFAP teigiamų ląstelių vidurkio analizė

Padidėjęs glijos fibrilinio rūgštinio baltymo (GFAP) imunoreaktyvumas nustatytas RNS/BMD L grupėje (302 ± 79), palyginti su kontroline grupe be RNS ($278,7 \pm 71,13$, $p < 0,01$) ir RNS/NaCl L+IP grupe ($280,7 \pm 77,15$, $p < 0,05$). Astrogliazės rodikliai statistiškai reikšmingai nesiskyrė gydant brimonidino lašais ar IP injekcijomis (4.1.2.3.1 pav., 4.1.2.3.1 lentelė).



4.1.2.3.1 pav. GFAP teigiamų ląstelių skaičiaus vidurkis visoje tinklainėje po RNS kontrolinėje ir eksperimentinėse grupėse

p reikšmė remiantis neparametriniu Kruskal-Wallis testu; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.1.2.3.1 lentelė. GFAP teigiamų ląstelių skaičiaus vidurkis visoje tinklainėje ir skirtinguose tinklainės regionuose (ląstelės/mm² ± SN)

	Visa tinklainė	Centras	Vidurys	Periferija
Kontrolė/NaCl L+IP	$278,7 \pm 71,13^{**}$	$310,3 \pm 85,54$	$263 \pm 55,9$	$262,7 \pm 58,26$
RNS/NaCl L+IP	$280,7 \pm 77,15^*$	$329,7 \pm 77,21$	$269,3 \pm 68,89$	$238,1 \pm 51,17$
RNS/BMD L	302 ± 79	$360,5 \pm 68,37$	$293,2 \pm 65,99$	$254,7 \pm 63,63$
RNS/BMD L+IP	$292,6 \pm 85,37$	$338,4 \pm 81,95$	$290,4 \pm 73,95$	$249,1 \pm 77,09$

p reikšmė remiantis neparametriniu Kruskal-Wallis testu; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

kontrolė/NaCl L+IP vs. RNS/BMD L (visa tinklainė **);

RNS/NaCl L+IP vs. RNS/BMD L (visa tinklainė *).

4.1.2.4. Vietinio ir sisteminio brimonidino poveikių tinklainės ląstelėms vertinimas kontrolinėse akyse be RNS

Siekdami įvertinti vietinio ir sisteminio brimonidino poveikius kontrolinėms akims be RNS, palyginome visos tinklainės ląstelių vidurkį tarp skirtingų gydymo grupių. Nustatėme, kad DAPI, NeuN, ir GFAP teigiamų ląstelių vidurkis tarp grupių statistiškai reikšmingai nesiskyrė (4.1.2.4.1 lentelė).

4.1.2.4.1 lentelė. Visos tinklainės ląstelių vidurkiai kontrolinėse akyse, kurioms nebuvo atliktas RNS, skirtingose gydymo grupėse

	Kontrolė/NaCl L+IP	Kontrolė/BMD L	Kontrolė/BMD L+IP
DAPI	7413 ± 1208	7741 ± 1229	7890 ± 1297
NeuN	4450 ± 1140	4881 ± 1137	4999 ± 1106
GFAP	278,7 ± 71,13	286 ± 66,38	282,1 ± 72,73

Analizė atlikta nparametriniu *Kruskal-Wallis* testu.

4.1.3. Brimonidino poveikis tinklainės ląstelėms skirtingose tinklainės dalyse

4.1.3.1. Tinklainės centrinės dalies ląstelių skaičiaus analizė

DAPI ir NeuN teigiamų ląstelių išgyvenamumas centrinėje tinklainės dalyje buvo panašus į bendrą ląstelių tankio vidurkį visoje tinklainėje. DAPI ir NeuN teigiamų ląstelių skaičius buvo žymiai mažesnis RNS/NaCl L+IP (atitinkamai, 6858 ± 1249 ir 3348 ± 1117), RNS/BMD L (atitinkamai, 6813 ± 807,3 ir 2811 ± 1154) ir RNS/BMD L+IP (atitinkamai, 7004 ± 711,6 ir 3505 ± 753,4) grupėse nei kontrolinėje grupėje (atitinkamai, 7930 ± 1133 ir 4937 ± 1008) ($p < 0,0001$). Sisteminių intraperitoninių brimonidino injekcijų skyrimas reikšmingai pagerino TGL išgyvenamumą centrinėje tinklainės dalyje, palyginti su RNS/BMD L grupe ($p < 0,05$) (4.1.2.1.1 ir 4.1.2.2.1 lentelė).

Reikšmingų skirtumų centrinėje tinklainės dalyje tarp DAPI ir GFAP teigiamų ląstelių visose eksperimentinėse RNS grupėse nebuvo nustatyta (4.1.2.3.1 lentelė).

4.1.3.2. Tinklainės vidurinės dalies ląstelių skaičiaus analizė

Išlikusios ląstelės po RNS ir jų skaičius tinklainės vidurinėje dalyje buvo panašus į bendrą ir centrinės tinklainės dalies ląstelių skaičių. Kontrolinėje grupėje be RNS tinklainės vidurinėje srityje buvo daugiau DAPI ir NeuN dažytų ląstelių (atitinkamai, 7451 ± 1188 ir 4539 ± 1129) nei RNS/BMD L (atitinkamai, 6489 ± 863 ir 3057 ± 1055) ir RNS/BMD L+IP grupėse (atitin-

kamai, $6649 \pm 929,6$ ir $3710 \pm 934,5$) ($p < 0,001$). Intraperitoninės brimonidino injekcijos reikšmingai pagerino TGL išgyvenamumą, palyginti su RNS/NaCl L+IP grupe ($p < 0,05$). Be to, RNS/BMD L+IP grupėje buvo pastebėta geresnio TGL išgyvenamumo tendencija, palyginti su RNS/BMD L grupe ($p = 0,07$) viduriniame tinklainės segmente (4.1.2.1.1 ir 4.1.2.2.1 lentelė).

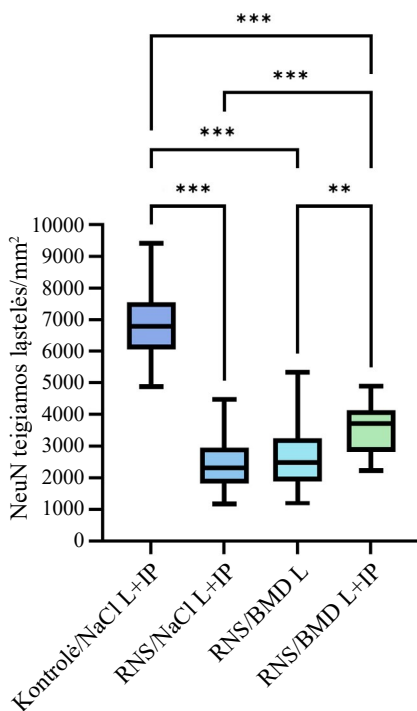
Vidurinėje tinklainės srityje DAPI ir GFAP teigiamų ląstelių reikšmingų skirtumų tarp grupių nenustatyta (4.1.2.3.1 lentelė).

4.1.3.3. Tinklainės periferinės dalies ląstelių skaičiaus analizė

Gydant IP brimonidino injekcijomis nustatytas didesnis DAPI teigiamų ląstelių išgyvenamumas periferinėje tinklainės srityje, priešingai nei centrinėje ir vidurinėje srityse. Nustatytas statistiškai nereikšmingas DAPI teigiamų ląstelių skaičiaus sumažėjimas RNS/BMD L+IP grupėje ($6390 \pm 966,6$), palyginti su kontroline grupe be RNS (6857 ± 1070). Rastas didelis DAPI teigiamų ląstelių skaičiaus sumažėjimas periferinėje tinklainės dalyje RNS/NaCl L+IP ($5954 \pm 970,8$) ir RNS/BMD L grupėse ($6022 \pm 905,4$), palyginti su kontroline grupe be RNS ($p < 0,0001$). Statistiškai reikšmingų skirtumų tarp DAPI teigiamų ląstelių periferinėje tinklainės srityje eksperimentinėse RNS grupėse nebuvo (4.1.2.1.1 lentelė).

Be to, TGL išgyvenamumas sumažėjo RNS/BMD L+IP grupėje periferijoje ($3630 \pm 737,8$), palyginti su kontroline grupe be RNS (3911 ± 1049), tačiau šis skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas. Priešingai, NeuN teigiamų ląstelių skaičius periferinėje tinklainės srityje išliko žymiai mažesnis RNS/NaCl L+IP ($2384 \pm 721,4$) ir RNS/BMD L grupėse (2675 ± 968) nei kontrolinėje grupėje ($p < 0,0001$). RNS/BMD L+IP grupėje nustatytas teigiamas poveikis NeuN dažytų ląstelių skaičiui periferinėje tinklainės srityje. NeuN teigiamų ląstelių vidurkis buvo didesnis nei RNS/NaCl L+IP ir RNS/BMD L grupėse ($p < 0,001$) (4.1.3.3.1 pav., 4.1.2.2.1 lentelė).

Statistiškai reikšmingų skirtumų tarp periferinės tinklainės dalies astroцитų skaičiaus visose eksperimentinėse RNS grupėse nenustatyta, kaip rodo palyginamasis GFAP dažymas (4.1.2.3.1 lentelė).



4.1.3.3.1 pav. NeuN teigiamų ląstelių skaičius pelės tinklainės periferinėje dalyje po RNS

p reikšmė remiantis neparametriniu Kruskal-Wallis testu; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

4.1.4. Brimonidino sukeltos tinklainės ląstelių neuroprotekcijos kintamumas skirtinguose tinklainės segmentuose

Ląstelių skaičiaus dinamikos analizė tik brimonidino akių lašais gydytoje grupėje atskleidė reikšmingą DAPI teigiamų ląstelių skirtumą tarp centrinės ir periferinės tinklainės sričių ($p < 0,05$). Be to, buvo pastebėtas didelis DAPI teigiamų ląstelių tankio skirtumas tarp vidurinio segmento ir periferijos RNS/BMD L+IP grupės ($p < 0,001$).

Nustatytas didesnis TGL išgyvenamumas fiziologinio tirpalo grupėje periferinėse dalyse, palyginti su centre ($p < 0,05$), tai rodo būdingą TGL išgyvenamumo kintamumą po RNS be neuroprotekcinių farmakologinių preparatų poveikio. Pažymėtina, kad reikšmingi TGL tankio skirtumai buvo pastebėti lyginant pokyčius tarp centrinės ir vidurinės dalių ($p < 0,01$), taip pat tarp centro ir periferijos ($p < 0,0001$) RNS/BMD L grupėje. Neuroprotektinis brimonidino poveikis, kai jis buvo vartojamas sistemškai, kartu su BMD lašais, dar labiau pabrėžė jo neuroprotektinį poveikį, kaip rodo geresnis TGL tankio

išsilaikymas periferijoje, palyginti su centrine dalimi ($p < 0,01$) (4.1.4.1 lentelė).

4.1.4.1 lentelė. Tinklainės ląstelių vidurkių pokytis skirtingose tinklainės dalyse (Δ ląstelių skaičiaus pokytis \pm SN)

Antikūnai	Tinklainės segmentas	RNS/NaCl L+IP	RNS/BMD L	RNS/BMD L+IP
DAPI	Centras	1391 \pm 730	1711 \pm 684,1	1399 \pm 652,3
	Vidury	1165 \pm 391,1	1640 \pm 566	2034 \pm 849,3
	Periferija	1041 \pm 504,7	951,6 \pm 538,6*	804,2 \pm 452,1***
NeuN	Centras	2272 \pm 550*	2900 \pm 760** ****	2106 \pm 962**
	Vidury	2088 \pm 569,1	1953 \pm 609	1748 \pm 807,8
	Periferija	1471 \pm 587,1	1282 \pm 419	871,5 \pm 528,8
GFAP	Centras	18,16 \pm 75,13	39,47 \pm 43,03	15,17 \pm 50,05
	Vidury	6,13 \pm 26,84	11,43 \pm 36,76	12,08 \pm 29,11
	Periferija	-25,87 \pm 41,2	-0,67 \pm 31,67	0,42 \pm 54,15

p reikšmė remiantis neparametriniu Kruskal-Wallis testu; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$;

*** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

RNS/BMD L, RNS/BMD L+IP: NeuN centras vs. periferija ***, ****;

RNS/BMD L: DAPI centras vs. Periferija *; DAPI vidury vs. periferija ***; NeuN centras vs. vidury**;

RNS/NaCl L+IP: NeuN centras vs. periferija *;

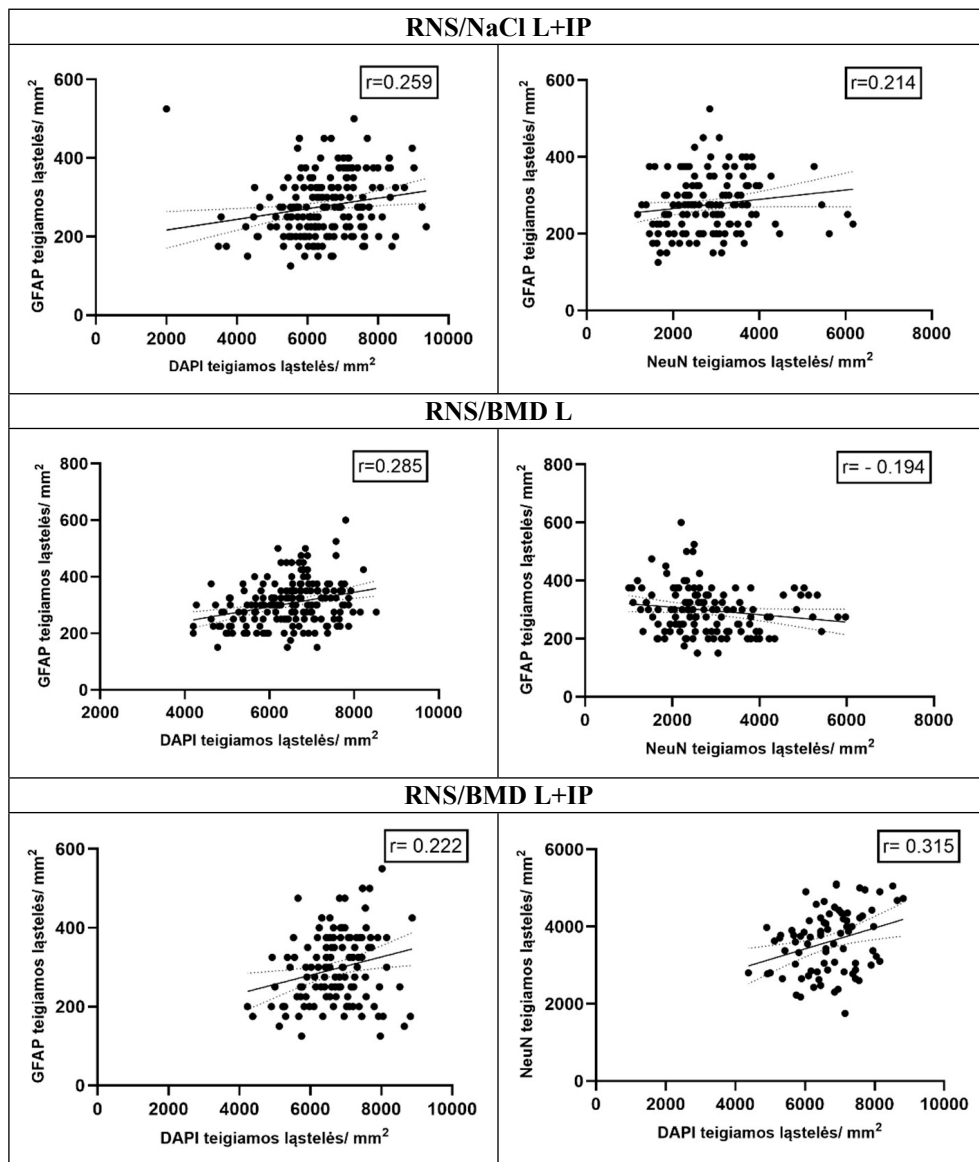
DAPI – 4',6-diamidino-2-fenylindolas; NeuN – neuronams specifinis branduolių baltymas, pirminis antikūnas; GFAP – glijos fibrilinis rūgštinis baltymas, pirminis antikūnas;

4.1.5. Tinklainės ląstelių vidurkio koreliacinė analizė visoje tinklainėje

Išanalizavome ryšius tarp DAPI nudažytų bendro visos tinklainės ląstelių skaičiaus, NeuN teigiamų ląstelių ir GFAP ekspresijos – gliozės rodiklio, skirtingose gydymo grupėse.

Fiziologiniu tirpalu gydomoje grupėje, kuriai buvo atliktas RNS, pastebėjome reikšmingą koreliaciją tarp visos tinklainės ląstelių, nudažytų DAPI, ir GFAP teigiamų ląstelių skaičiaus ($r = 0,259$; $p < 0,001$), o tai rodo vidutinį tiesioginį ryšį. Panašiai, koreliacija tarp TGL skaičiaus ir GFAP ekspresijos RNS/NaCl L+IP grupėje taip pat rodo tiesioginį, bet silpną ryšį tarp TGL išgyvenamumo ir astrogliozės be neuroprotekcinio gydymo ($r = 0,214$; $p < 0,05$). Nustatytas tiesioginis ryšys tarp DAPI ir GFAP ekspresijos RNS/BMD L grupėje ($r = 0,285$; $p < 0,0001$). Ir atvirkščiai, sudėtinga sąveika tarp TGL išgyvenamumo ir gliozės, kai brimonidinas buvo vartojamas tik vietiskai lašais, neigiamai koreliavo su TGL ir astrocitų skaičiumi toje pačioje grupėje ($r = -0,194$; $p < 0,05$) (4.1.5.1 pav.).

DAPI ir NeuN teigiamų ląstelių skaičiaus palyginimas parodė tiesioginę koreliaciją ($r = 0,315$; $p < 0,01$) RNS/BMD L+IP grupėje. Ši koreliacija paaiškina priklausomybę tarp neneuroninių ląstelių tankio ir specifinių ganglinių ląstelių pasiskirstymo. DAPI silpnai koreliavo su GFAP teigiamų ląstelių skaičiumi toje pačioje grupėje ($r = 0,222$; $p < 0,05$) (4.1.5.1 pav.).



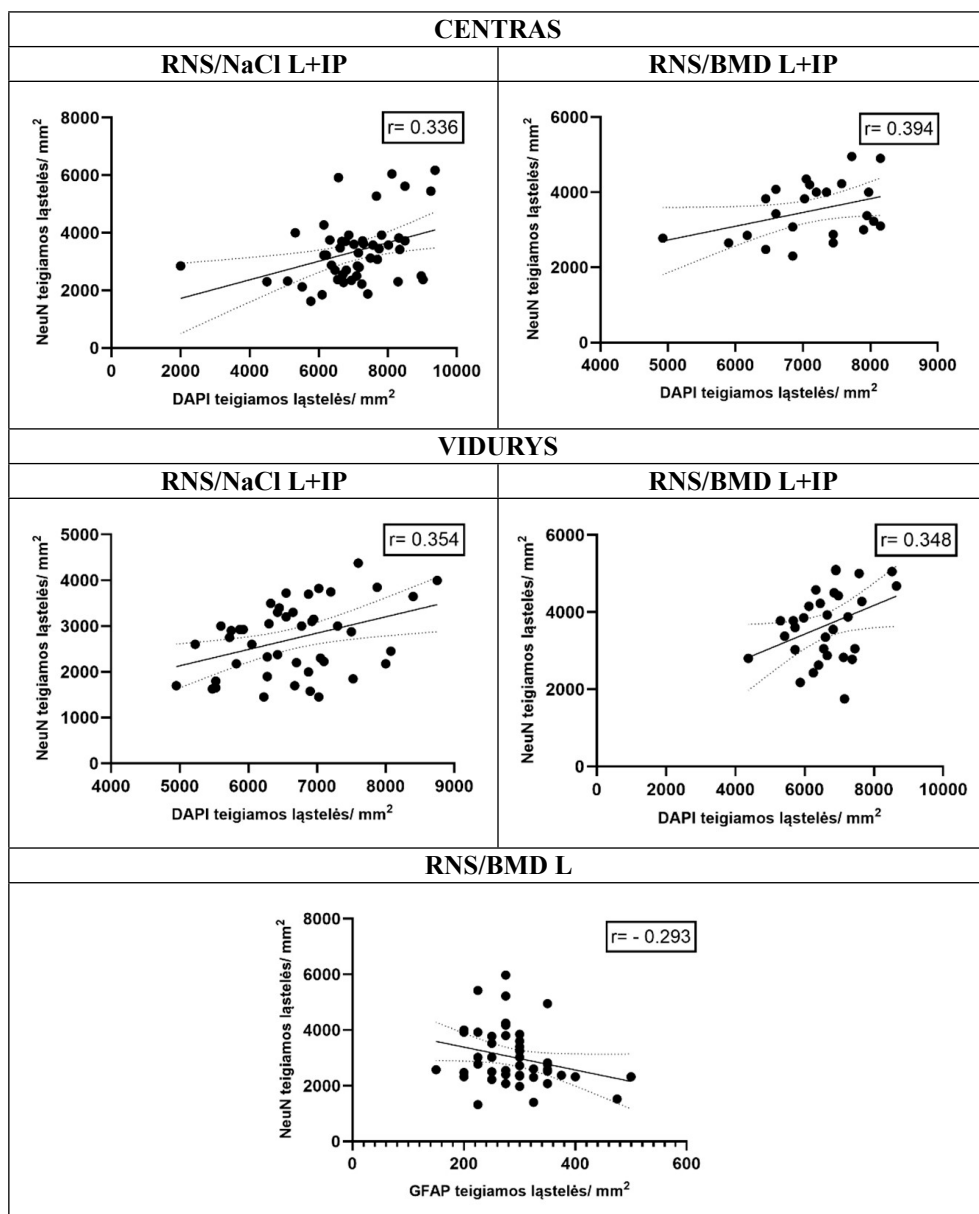
4.1.5.1 pav. DAPI, NeuN, GFAP teigiamų ląstelių vidurkių koreliacija visoje tinklainėje skirtingose eksperimentinėse grupėse

r – Spirmeno koreliacijos koeficientas, $p < 0,05$. DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindolas; NeuN – neuronams specifinis branduolių baltymas, pirminis antikūnas; GFAP – glijos fibrilinis rūgštinis baltymas, pirminis antikūnas.

4.1.6. Tinklainės ląstelių skaičiaus koreliacija skirtinguose tinklainės segmentuose

Centrinėje tinklainės dalyje buvo pastebėta reikšminga koreliacija tarp DAPI teigiamų tinklainės ląstelių skaičiaus ir TGL skaičiaus po gydymo fiziologiniu tirpalu ($r = 0,336$; $p < 0,05$). Tai rodo vidutiniškai teigiamą ryšį tarp neneuroninių ląstelių tankio ir specifinės TGL populiacijos centrinėje tinklainės dalyje RNS/NaCl L+IP grupėje. Nustatytas teigiamas ryšys tarp DAPI nusidažiusių tinklainės ląstelių vidurkio ir TGL vidurkio RNS/BMD L+IP grupėje ($r = 0,394$; $p = 0,057$), rodanti panašią neneuroninių ir neuroninių ląstelių tendenciją išgyvenamumui po RNS (4.1.6.1 pav.).

Vidurinėje tinklainės dalyje tiesioginė koreliacija tarp DAPI nudažytų ląstelių ir TGL skaičiaus RNS/NaCl L+IP grupėje buvo reikšminga ($r = 0,354$; $p < 0,05$), atskleidžianti vidutiniškai teigiamą ryšį tarp grupių. RNS/BMD L+IP gydymo grupė vidurinėje dalyje parodė beveik reikšmingą teigiamą koreliaciją tarp DAPI nudažytų tinklainės ląstelių skaičiaus ir TGL skaičiaus ($r = 0,348$; $p = 0,055$) bei tarp DAPI dažytų ląstelių ir GFAP gliozės ekspresijos ($r = 0,297$; $p = 0,059$). Nustatyta reikšminga neigiama koreliacija tarp TGL skaičiaus ir GFAP raiškos RNS/BMD L grupėje ($r = -0,293$; $p < 0,05$) (4.1.6.1 pav.).



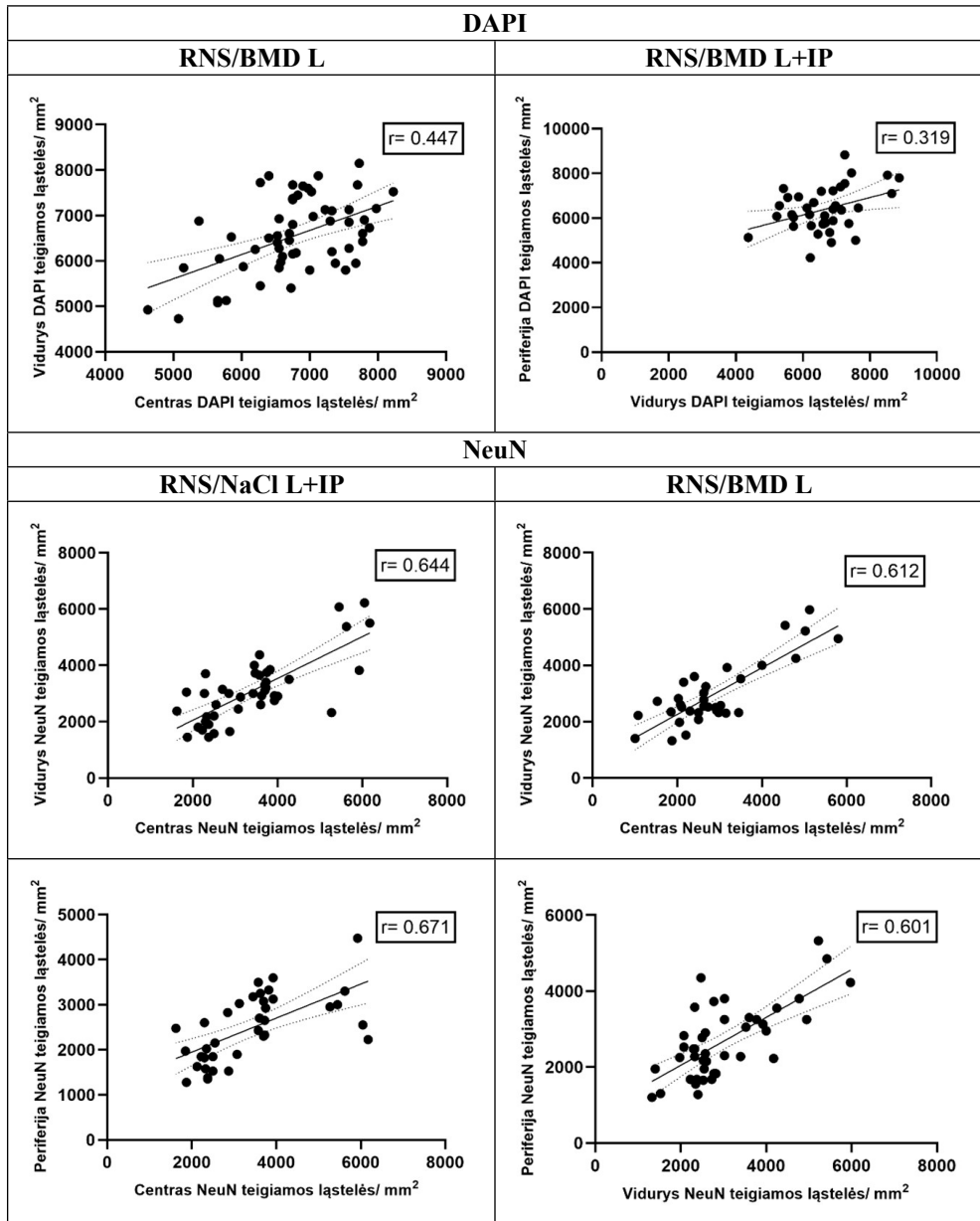
4.1.6.1 pav. DAPI, NeuN, GFAP teigiamų ląstelių vidurkių koreliacija skirtinguose tinklainės segmentuose eksperimentinėse grupėse
 r – Spirmeno koreliacijos koeficientas, $p < 0,05$. DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindolas; NeuN – neuronams specifinis branduolių baltymas, pirminis antikūnas; GFAP – glijos fibrilinis rūgštinis baltymas, pirminis antikūnas.

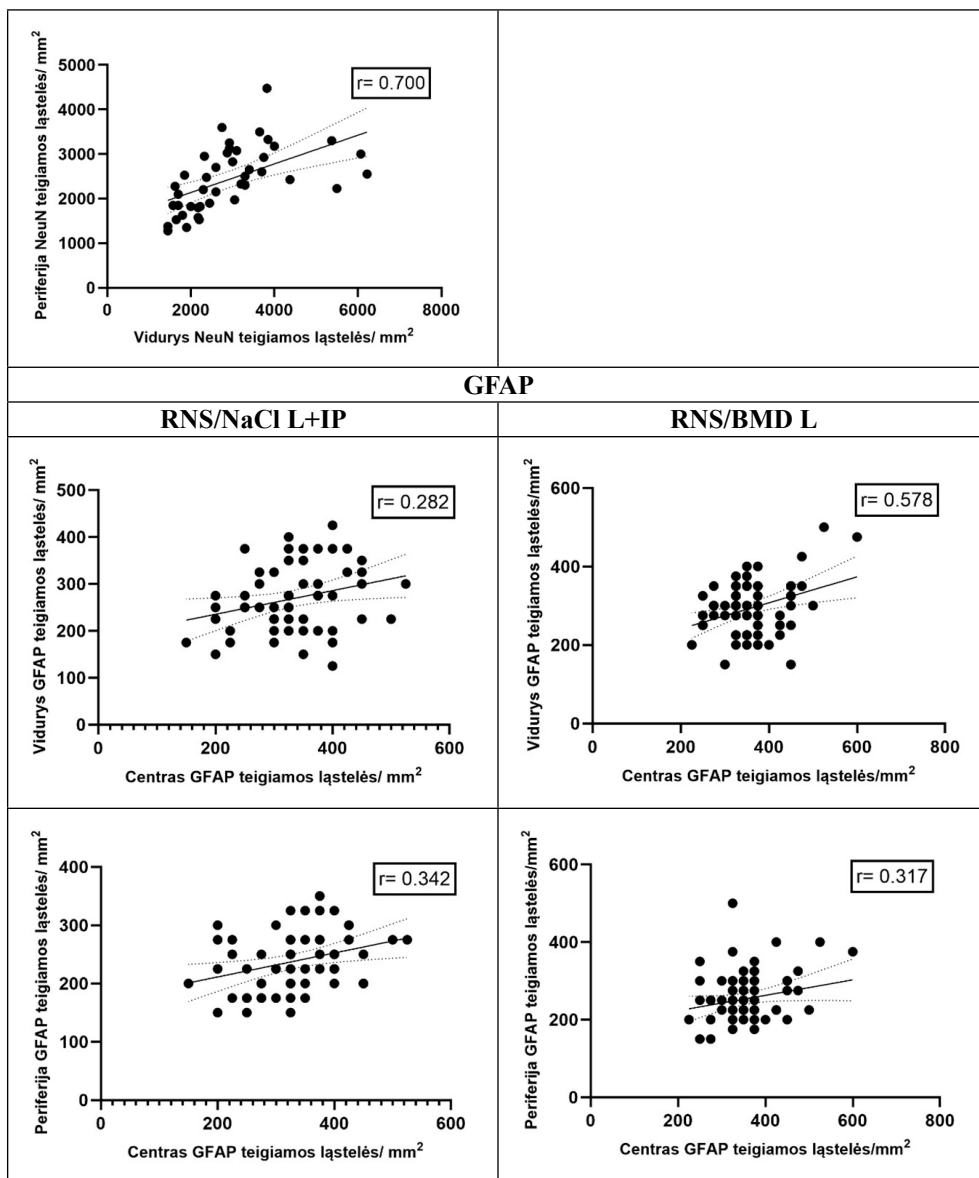
4.1.7. Tinklainės ląstelių skaičiaus koreliacija tarp skirtingų tinklainės segmentų

Siekiant nustatyti ląstelių pasiskirstymo nuoseklumą po RNS, atlikome koreliacinę analizę tarp skirtingų tinklainės segmentų. Pastebėta reikšminga koreliacija tarp DAPI dažytų ląstelių tankio centrinėje ir vidurinėje tinklainės dalyse RNS/BMD L grupėje, o tai rodo vidutiniškai teigiamą ryšį ($r = 0,447$; $p < 0,001$). Tarp vidurinių ir periferinių regionų RNS/BMD L+IP grupėje stebėta tendencija, tai rodo silpnesnę ryšį ($r = 0,319$; $p = 0,54$) (4.1.7.1 pav.).

Buvo nustatyta stipri koreliacija tarp skirtingų tinklainės sričių ir TGL tankio. Centrinėje ir vidurinėje srityse RNS/NaCl L+IP grupėje nustatyta stipri koreliacija ($r = 0,644$; $p < 0,0001$), kuri buvo stipresnė lyginant centrinius ir periferinius regionus ($r = 0,671$; $p < 0,0001$) ir vidurinį bei periferinį regionus ($r = 0,700$; $p < 0,0001$). Panašiai, RNS/BMD L grupėje, buvo pastebėtos reikšmingos koreliacijos tarp centrinio ir vidurinio regionų ($r = 0,612$; $p < 0,0001$) ir tarp vidurinio bei periferinio regionų ($r = 0,601$; $p < 0,0001$). Tai paaiškina nuoseklų TGL tankio pasiskirstymą tinklainėje po RNS, neatsižvelgiant į gydymą (4.1.7.1 pav.).

GFAP ekspresija, rodanti gliozę, parodė reikšmingą koreliaciją tarp skirtingų tinklainės segmentų. Palyginus centrinį ir vidurinį regioną RNS/NaCl L+IP grupėje, nustatyta silpna koreliacija ($r = 0,282$; $p < 0,05$) ir kiek stipresnė koreliacija tarp centrinio ir periferinio regionų ($r = 0,342$; $p < 0,01$). Pažymėtina, kad teigiamos koreliacijos buvo ryškesnės RNS/BMD L+IP grupėje, lyginant centrinį ir vidurinį segmentus ($r = 0,578$; $p < 0,0001$) ir centrą – periferiją ($r = 0,317$; $p < 0,05$) (4.1.7.1 pav.).





4.1.7.1 pav. DAPI, NeuN, GFAP teigiamų ląstelių skaičiaus koreliacija tarp skirtingų tinklainės segmentų. Diagramose vaizduojamas statistiškai reikšmingas teigiamas neneuroninių, specifinių TGL ir astrocytų ryšys tarp skirtingų tinklainės segmentų, o tai įrodo nuoseklų ląstelių tankio pasiskirstymą po RNS neatsižvelgiant į gydymą

r – Spirmeno koreliacijos koeficientas, $p < 0,05$. DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindolas; NeuN – neuronams specifinis branduolių baltymas, pirminis antikūnas; GFAP – glijos fibrilinis rūgštinis baltymas, pirminis antikūnas.

4.1.8. Tinklainės ląstelių dinaminių pokyčių koreliacinė analizė

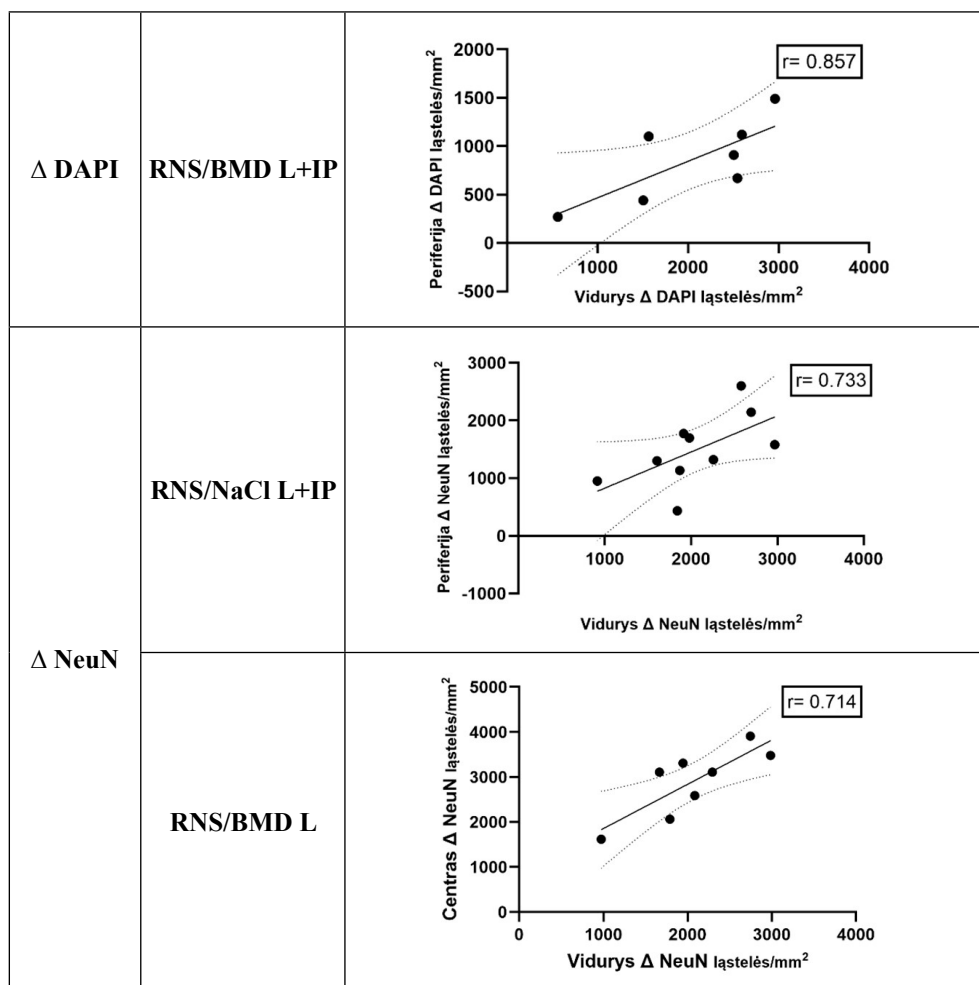
Nustatyta vidutinė atvirkštinė koreliacija tarp GFAP teigiamų ląstelių laipsniško kitimo dinamikos ir NeuN teigiamų ląstelių skaičiaus sumažėjimo visoje tinklainėje RNS/NaCl L+IP grupėje ($r = -0,644$; $p < 0,05$). Vidutinė teigiama koreliacija tarp astrocitų ir TGL pokyčio buvo nustatyta RNS/BMD L grupėje ($r = 0,7$; $p < 0,05$).

Ryški teigiama koreliacija nustatyta tarp TGL skaičiaus padidėjimo ir DAPI teigiamų ląstelių skaičiaus ($r = 0,857$; $p < 0,01$) RNS/BMD L grupėje tinklainės vidurinėje dalyje (4.1.8.1 pav.).

Neigiama koreliacija tarp TGL skaičiaus pokyčio ir GFAP ekspresijos viduriniame regione po gydymo fiziologiniu tirpalu ($r = -0,747$; $p = 0,01$) parbrėžia skirtingą regioninę sąveiką, kai sumažėjęs neuronų išgyvenamumas koreliuoja su padidėjusia glioze.

Palyginus DAPI teigiamų ląstelių skaičiaus pokyčius tarp vidurinio ir periferinio tinklainės segmento RNS/BMD L+IP grupėje, nustatyta reikšminga koreliacija ($r = 0,857$; $p < 0,05$).

Pastebėti reikšmingi TGL žūties koreliacijos skirtumai tarp periferinių ir vidurinių segmentų po gydymo fiziologiniu tirpalu ($r = 0,733$; $p < 0,05$), o panaši tendencija pastebėta tarp vidurinės ir centrinės tinklainės dalies po gydymo brimonidino akių lašais ($r = 0,714$; $p = 0,057$) (4.1.8.1 pav.).



4.1.8.1 pav. Balb/c pelės tinklainės ląstelių pokyčio po RNS koreliacinė analizė skirtinguose tinklainės segmentuose. Diagramose vaizduojamas statistškai reikšmingas teigiamas neneuroninių ir specifinių TGL ląstelių pokyčio ryšys tarp vidurinio ir periferinio, centrinio ir vidurinio tinklainės segmentų

r – Spirmeno koreliacijos koeficientas, $p < 0,05$. DAPI – 4',6-diamidino-2-fenylindolas; NeuN – neuronams specifinis branduolių baltymas, pirminis antikūnas; GFAP – glijos fibrilinis rūgštinis baltymas, pirminis antikūnas.

4.2. II eksperimentinių tyrimų etapo rezultatai

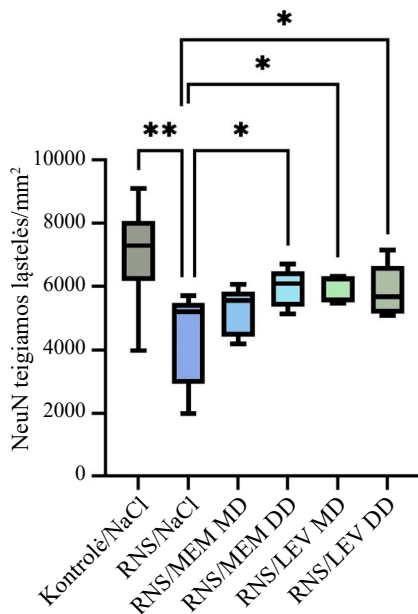
4.2.1. NeuN ir GFAP teigiamų ląstelių kiekybiniai rodikliai II eksperimentinio tyrimo etape

NeuN teigiamų ląstelių kiekybinis įvertinimas parodė statistiškai reikšmingus skirtumus tarp grupių. Fiziologiniu tirpalu gydytų eksperimentinių akių (po RNS) grupėje buvo pastebimas NeuN teigiamų ląstelių sumažėjimas, palyginus su dešiniąja kontroline akimi be RNS ($p < 0,0001$), tai patvirtina sėkmingą RNS atlikimą. Gydytas didesne memantino doze lėmė didesnę NeuN teigiamų ląstelių išgyvenamumą ($p < 0,05$), palyginti su RNS/NaCl grupe, o tai rodo pastebimą neuroprotekcinį poveikį. Panašiai, mažos ir didelės levetiracetamo dozės grupėse nustatytas ženkliai didesnis NeuN teigiamų ląstelių skaičius ($p < 0,05$), palyginti su RNS/NaCl grupe. Šie radiniai įrodo, kad ir memantinas, ir levetiracetamas turi neuroprotekcinę savybę po regos nervo pažeidimo priklausomai nuo dozės (4.2.1.1 lentelė, 4.2.1.1 pav.).

4.2.1.1 lentelė. *NeuN and GFAP teigiamų ląstelių kiekybiniai rodikliai II eksperimentinio tyrimo etape*

Grupė	NeuN	GFAP
Kontrolė/NaCl	7092 ± 1419	253,5 ± 41,81
RNS/NaCl	4493 ± 1362**	276,9 ± 30,94
RNS/MEM MD	5274 ± 747	257,2 ± 27,62
RNS/MEM DD	5967 ± 611,4	299 ± 31,76
RNS/LEV MD	5973 ± 438,1	255,6 ± 18,77
RNS/LEV DD	5856 ± 839,5	304,8 ± 30,90

Duomenys išreiškiami kaip vidurkis ± SN. Statistinis reikšmingumas buvo nustatytas naudojant nesuporuotą t-testą. * $p < 0,05$; ** $p < 0,0001$. NeuN – neuronams specifinis branduolių baltymas, pirminis antikūnas; GFAP – glijos fibrilinis rūgštinis baltymas, pirminis antikūnas.

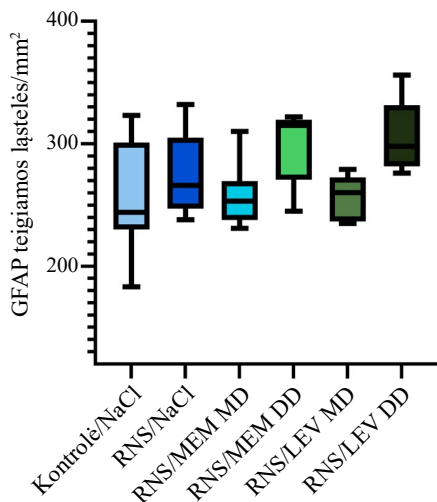


4.2.1.1 pav. *NeuN teigiamų ląstelių kiekybiniai rodikliai po memantino ir levetiracetamo IP injekcijų 7 dienos po RNS*

Statistinis reikšmingumas buvo nustatytas naudojant nesuporuotą t-testą;

* $p < 0,05$; ** $p < 0,0001$. NeuN – neuronams specifinis branduolių baltymas, pirminis antikūnas.

GFAP teigiamų ląstelių skirtumų tarp eksperimentinių grupių nerasta (4.2.1.1 lentelė, 4.2.1.2 pav.).



4.2.1.2 pav. GFAP teigiamų ląstelių kiekybiniai rodikliai atlikus RNS ir gydant 7 dienas IP memantino ir levetiracetamo injekcijomis

GFAP – glijos fibrilinis rūgštinis baltymas, pirminis antikūnas; RNS – regos nervo suspaudimas.

4.2.1.1. Sisteminių vaistų poveikio vertinimas tinklainės ląstelėms kontrolinėse akyse be RNS

Siekdami įvertinti sisteminio didelių ir mažų dozių memantino ir levetiracetamo poveikį kontrolinėms akims be RNS, palyginome tinklainės ląstelių vidurkį tarp skirtingų gydymo grupių. Nustatėme, kad NeuN, ir GFAP teigiamų ląstelių vidurkis tarp grupių statistiškai reikšmingai nesiskyrė (4.2.1.1.1 lentelė).

4.2.1.1.1 lentelė. Visos tinklainės ląstelių vidurkiaai kontrolinėse akyse, kurioms nebuvo atliktas RNS, skirtingose gydymo grupėse

	NeuN	GFAP
Kontrolė/NaCl	7092 ± 1419	253,5 ± 41,81
Kontrolė/MEM MD	6747 ± 531	256 ± 33,63
Kontrolė/MEM DD	7700 ± 478,4	271,8 ± 57,26
Kontrolė/LEV MD	7602 ± 1210	237,6 ± 15,27
Kontrolė/LEV DD	6471 ± 509,9	262,4 ± 51,77

Analizė atlikta neparametriniu *Kruskal-Wallis* testu.

4.2.2. Ląstelių skaičiaus pokyčio dinamika tinklainėje II eksperimentinio tyrimo etape

Ląstelių skaičiaus dinamikos analizė atskleidė reikšmingai mažesnę NeuN teigiamų ląstelių žūtį grupėse, gydomose didele memantino doze ir maža levetiracetamo doze, lyginant su fiziologinio tirpalo injekcijų grupe ($p < 0,05$) (4.2.2.1 lentelė, 4.2.2.1 pav.). GFAP teigiamų ląstelių skaičiaus pokytis buvo reikšmingai didesnis grupėse, kurioms buvo skirtos didelės memantino ir levetiracetamo dozės, lyginant su mažų memantino ir levetiracetamo dozių grupėmis ($p < 0,05$), o tai galimai rodo reaktyvią gliozę paskyrus didesnes vaistų dozes (4.2.2.1 lentelė, 4.2.2.2 pav.).

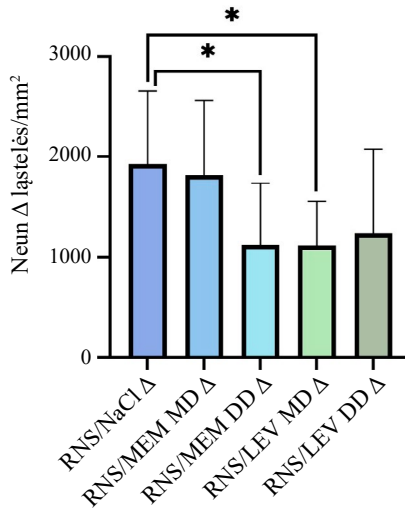
4.2.2.1 lentelė. II eksperimentinio tyrimo etapo NeuN ir GFAP teigiamų ląstelių skaičiaus pokytis tinklainėje (Δ ląstelės/mm² \pm SN) po 7 dienų po RNS, skiriant skirtingas memantino ir levetiracetamo dozes

	RNS/NaCl	RNS/MEM MD	RNS/MEM DD	RNS/LEV MD	RNS/LEV DD
Δ NeuN	1929 \pm 728	1818 \pm 747	1125 \pm 611,4*	1119 \pm 438,1*	1235 \pm 839,3
Δ GFAP	23,32 \pm 30,85	3,613 \pm 27,62	45,18 \pm 31,91*	2,047 \pm 18,77	51,38 \pm 31,11*

Statistinis reikšmingumas buvo nustatytas taikant neparametrinį *Mann-Whitney* kriterijų; * $p < 0,05$; NeuN – neuronams specifinis branduolių baltymas, pirminis antikūnas; GFAP – glijos fibrilinis rūgštinis baltymas, pirminis antikūnas.

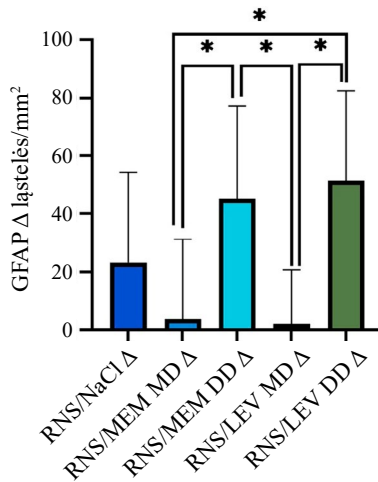
Δ NeuN: RNS/MEM DD vs. RNS/NaCl; RNS/LEV MD vs. RNS/NaCl*;

Δ GFAP: RNS/MEM MD vs. RNS/LEV DD; RNS/MEM MD vs. RNS/MEM DD; RNS/LEV MD vs. RNS/LEV DD; RNS/LEV MD vs. RNS/MEM DD*.



4.2.2.1 pav. II eksperimentinio tyrimo etapo NeuN teigiamų ląstelių skaičiaus pokytis tinklainėje (Δ ląstelės/mm²) po 7 dienų po RNS, gydant skirtingomis memantino ir levetiracetamo dozėmis

Statistinis reikšmingumas buvo nustatytas, taikant neparametrinį *Mann-Whitney* kriterijų; * $p < 0,05$; NeuN – neuronams specifinis branduolių baltymas, pirminis antikūnas.

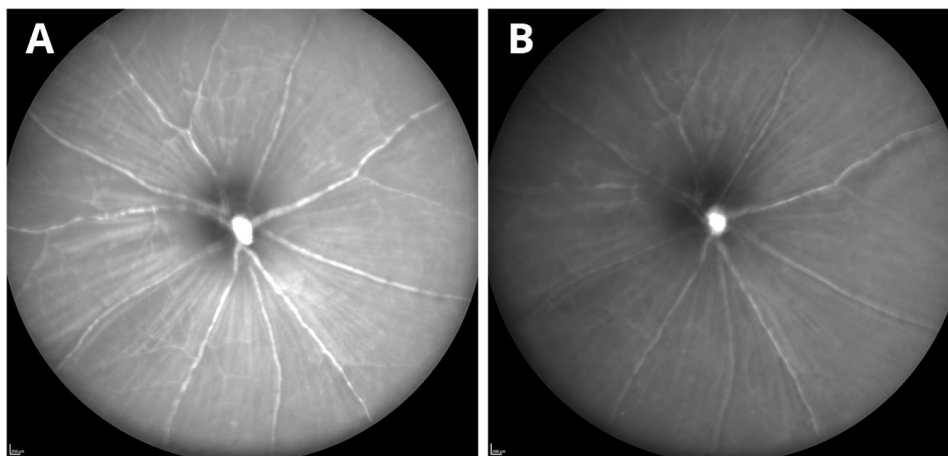


4.2.2.2 pav. II eksperimentinio tyrimo etapo GFAP teigiamų ląstelių skaičiaus pokytis tinklainėje (Δ ląstelės/mm²) po 7 dienų po RNS, gydant skirtingomis memantino ir levetiracetamo dozėmis

Statistinis reikšmingumas buvo nustatytas, taikant neparametrinį *Mann-Whitney* kriterijų; * $p < 0,05$; GFAP – glijos fibrilinis rūgštinis baltymas, pirminis antikūnas.

4.2.3. Akių dugno nuotraukų analizė

Atliktose akių dugno nuotraukose 0 ir 7 eksperimento dieną visose akyse, kuriose buvo atliktas RNS, nebuvo stebėti ūminiai akių dugno pakitimai, tokie kaip kraujosruvos. 7 dienos akių dugno nuotraukose visose grupėse buvo stebėtas nervinių skaidulų sluoksnio išretėjimas, o tai patvirtina visose akyse sėkmingai atliktą RNS (4.2.3.1 pav.).



4.2.3.1 pav. Akių dugno nuotraukos atliktos 0 (A) ir 7 (B) eksperimento dieną su Heidelberg Spectralis HRA2 sistema (Heidelberg Engineering, Vokietija). Tarp kraujagyslių stebimos nervinės skaidulos sueinančios į regos nervą. B paveiksle išretėjusios nervinės skaidulos 7 dieną po RNS

RNS – regos nervo suspaudimas.

4.2.4. SD-OKT vaizdų analizė

II eksperimentinio tyrimo etape tinklainės sluoksnių analizė buvo atliekama naudojant SD-OKT ir spalvinę OKT doplerografiją 0 dieną (iš karto po RNS atlikimo) ir 4 bei 7 dienomis (3.1.1.1 pav.). Skirtingose gydymo grupėse buvo pastebėti reikšmingi GLK storio skirtumai. Fiziologinio tirpalo grupėje (RNS/NaCl) GLK storis reikšmingai sumažėjo lyginant 0 ir 7 dienas ($p < 0,01$). Tiek mažos, tiek didelės memantino dozės grupėse GLK reikšmingai suplonėjo eksperimento 7 dieną ($p < 0,0001$). Panašiai, kaip ir memantinu gydytose grupėse, levetiracetamo mažos ir didelės dozės grupėse GLK storis reikšmingai sumažėjo lyginant 0 dieną su 7 dienos rezultatais ($p < 0,0001$), statistiškai reikšmingas suplonėjimas stebėtas ir 4 eksperimento dieną didelės levetiracetamo dozės grupėje ($p < 0,0001$). Stebėti reikšmingi skirtumai tarp RNS/NaCl ir priešingos kairės akies kontrolė/NaCl (be

RNS) grupių 4 ir 7 dienomis ($p < 0,05$). RNS grupės, kurioms buvo skirtos didelės dozės memantino ($p < 0,0001$) ir levetiracetamo (maža dozė, $p < 0,001$, didelė dozė, $p < 0,0001$), taip pat reikšmingai skyrėsi lyginant su RNS/NaCl grupe 4 eksperimento dieną. Mažos dozės memantino grupėje stebėtas reikšmingas skirtumas, palyginti su didele memantino doze ($p < 0,0001$), ir panašiai, mažų dozių levetiracetamo grupė reikšmingai skyrėsi nuo didelės levetiracetamo dozės grupės ($p < 0,001$) 7 dieną. GLK storio išsaugojimas po RNS leidžia vertinti neuroprotektinį memantino ir levetiracetamo poveikį (4.2.4.1 lentelė, 4.2.4.1 pav.).

4.2.4.1 lentelė. SD-OKT ganglinių ląstelių komplekso storio matavimo rezultatai 0, 4 ir 7 dienomis tiriamosiose ir kontrolinėse grupėse ($mm \pm SN$)

	Kontrolė/ NaCl	RNS/ NaCl	RNS/ MEM MD	RNS/ MEM DD	RNS/ LEV MD	RNS/ LEV DD
Diena 0	0,0593 ± 0,002	0,0598 ± 0,002	0,0605 ± 0,002	0,0597 ± 0,002	0,0618 ± 0,002	0,0599 ± 0,003
Diena 4	0,0603 ± 0,002*	0,0578 ± 0,002	0,06 ± 0,002	0,0528 ± 0,002****	0,061 ± 0,003***	0,0539 ± 0,003****
Diena 7	0,0603 ± 0,003	0,0571 ± 0,002**	0,055 ± 0,002****	0,059 ± 0,002****	0,056 ± 0,003***,****	0,0582 ± 0,003****

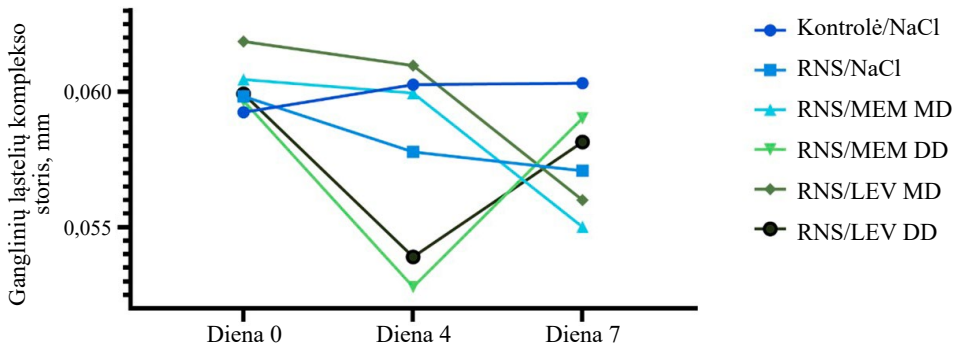
Statistinis reikšmingumas buvo nustatytas naudojant vienpusę ANOVA analizę su Tukey daugkartinio palyginimo testu; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

0 vs. 7 diena: RNS/NaCl**; RNS/MEM MD, RNS/MEM DD****; RNS/LEV MD, RNS/LEV DD**;

0 vs. 4 diena: RNS/LEV DD****;

4 dieną: RNS/NaCl vs. kontrolė/NaCl*; RNS/NaCl vs. RNS.MEM DD, RNS/NaCl vs. RNS/LEV MD, RNS/NaCl vs. RNS/LEV DD****;

7 dieną: RNS/NaCl vs. kontrolė/NaCl*; RNS/MEM MD vs. RNS/MEM DD****; RNS/LEV MD vs. RNS/LEV DD**.

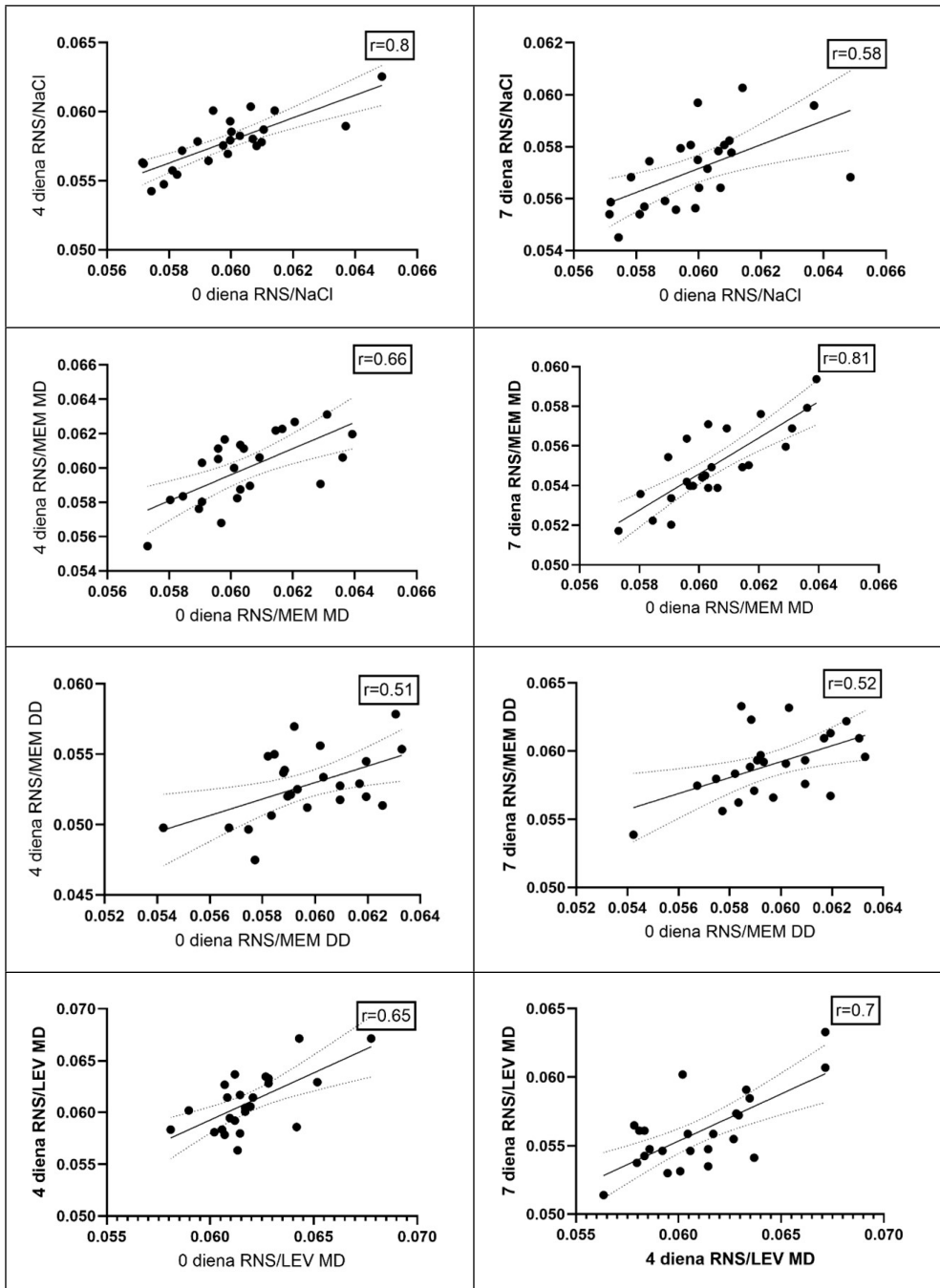


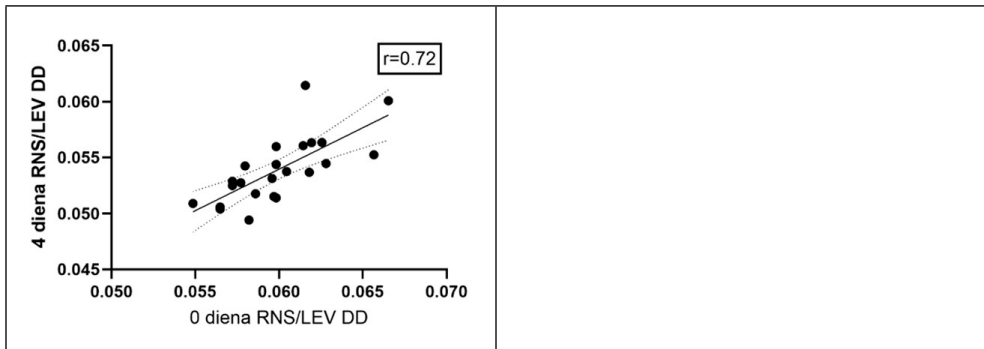
4.2.4.1 pav. SD-OKT ganglinių ląstelių komplekso storio pokyčiai 0, 4 ir 7 dienomis tiriamosiose ir kontrolinėse grupėse
SD-OKT – spektrinė domeno optinė koherentinė tomografija.

4.2.5. Ganglinių ląstelių komplekso storio kitimų koreliacinė analizė

Tiesinės koreliacinės analizės metodu nustatėme reikšmingus GLK storio pokyčio ryšius tarp įvairių gydymo grupių laikui bėgant. Fiziologiniu tirpalu gydytoje RNS grupėje buvo pastebėta stipri koreliacija tarp 0 ir 4 dienos ($r = 0,8$; $p < 0,0001$) ir tarp 0 ir 7 dienos ($r = 0,58$; $p < 0,005$). Panašiai, mažų memantino dozių grupėje stebėta stipri koreliacija tarp 0 ir 4-tos dienos ($r = 0,66$; $p < 0,001$) ir tarp 0 ir 7 dienos ($r = 0,81$; $p < 0,0001$). Didelės dozės memantino grupėje vidutinė tiesioginė koreliacija buvo nustatyta tarp 0 ir 4 dienos ($r = 0,51$; $p < 0,05$) ir tarp 0 ir 7 dienos ($r = 0,52$; $p < 0,01$). Mažų levetiracetamo dozių grupėje buvo stipri koreliacija tarp 0 ir 4 dienos ($r = 0,65$; $p < 0,001$) ir tarp 4 ir 7 dienos ($r = 0,7$; $p < 0,001$). Didelę levetiracetamo dozę gavusioje pelių grupėje buvo reikšminga tiesioginė koreliacija tarp 0 ir 4 dienos ($r = 0,72$; $p < 0,0001$) (4.2.5.1 pav.).

Šie radiniai pabrėžia laikiną GLK storio pokyčių koreliaciją, pabrėžiant memantino ir levetiracetamo neuroprotekcinį veiksmingumą išsaugant tinklainės struktūrą po RNS.





4.2.5.1 pav. Ganglinių ląstelių komplekso storio kitimų koreliacinė analizė eksperimentinėse grupėse. Stebėta teigiama GLK storio pokyčių koreliacija tarp 0 ir 4, 0 ir 7 dienų eksperimentinėse grupėse

r – Spirmeno koreliacijos koeficientas, $p < 0,05$.

4.2.6. Ganglinių ląstelių komplekso storio pokyčio dinamikos analizė

GLK storio kitimo dinamikos analizė tarp 0 ir 4 dienų nustatė žymiai didesnę GLK plonėjimą RNS/MEM MD grupėje, lyginant su RNS grupėmis, kurioms buvo skirtos fiziologinio tirpalo arba didelės memantino ir levetiracetamo dozės ($p < 0,05$). Didžiausias GLK storio išsaugojimas buvo stebimas RNS/MEM DD grupėje, palyginti su maža levetiracetamo doze tuo pačiu metu ($p < 0,05$). Rastas statistiškai reikšmingas skirtumas tarp kontrolinės akies be RNS GLK storio kitimo ir fiziologinio tirpalo, mažos memantino ir levetiracetamo dozės grupių, vertinant 0 ir 4, 4 ir 7, 0 ir 7 dienos pokyčius ($p < 0,001$). Mažiausias GLK storio pokytis tarp 4 ir 7 dienų nustatytas RNS/MEM DD grupėje, palyginti su mažomis memantino ir levetiracetamo dozėmis ($p < 0,05$); priešingai, didžiausias GLK storio pokytis buvo mažos memantino dozės grupėje, palyginti su didele levetiracetamo doze ($p < 0,05$). GLK storio pokyčiai, stebėti nuo 0 iki 7 dienos, parodė didesnę tinklainės storio išsaugojimo rodiklį RNS/MEM DD grupėje, lyginant su RNS grupėmis, gavusiomis mažos dozės memantino ir levetiracetamo IP injekcijas ($p < 0,05$). Priešingai, didžiausias GLK išplonėjimas buvo pastebėtas mažos memantino dozės grupėje ($p < 0,05$). Statistiškai reikšmingas skirtumas stebėtas tarp kontrolinės grupės be RNS ir RNS/LEV DD grupės, lyginant GLK pokytį per 7 dienas ($p < 0,05$), tačiau reikšmingų skirtumų su didelės dozės memantino grupe nenustatyta (4.2.6.1 lentelė, 4.2.6.1 pav.).

Reikšmingų koreliacijų tarp GLK storio pokyčių dinamikos nenustatyta.

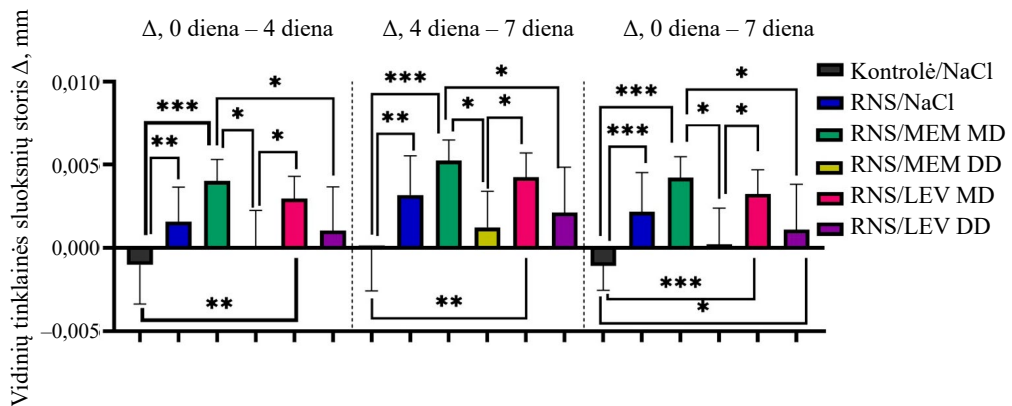
4.2.6.1 lentelė. SD-OKT ganglinių ląstelių komplekso storio pokytis tarp 0 ir 4 dienos, 4 ir 7 dienos, 0 ir 7 dienų eksperimentinėse ir kontrolinėje grupėje

Grupė	Δ 0 diena – 4 diena	Δ 4 diena – 7 diena	Δ 0 diena – 7 diena
Kontrolė/NaCl	$-0,001 \pm 0,002^{***}$	$-0,0001 \pm 0,002^{***}$	$-0,0011 \pm 0,001^{***}$
RNS/NaCl	$0,0016 \pm 0,002^*$	$0,0032 \pm 0,002$	$0,0022 \pm 0,002$
RNS/MEM MD	$0,004 \pm 0,004^*$	$0,0053 \pm 0,001^*$	$0,0042 \pm 0,001^*$
RNS/MEM DD	$0,000001 \pm 0,002^*$	$0,0012 \pm 0,002^*$	$0,0002 \pm 0,002^*$
RNS/LEV MD	$0,003 \pm 0,001$	$0,0043 \pm 0,001$	$0,0032 \pm 0,001$
RNS/LEV DD	$0,001 \pm 0,003$	$0,0021 \pm 0,003$	$0,0011 \pm 0,003$

SD-OKT – spektrinė domeno optinė koherentinė tomografija. Statistinis reikšmingumas buvo nustatytas naudojant nesuporuotą t-testą; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$.

Δ 0 diena – 4 diena, Δ 4 diena – 7 diena: ** kontrolė/NaCl vs. RNS/NaCl, kontrolė/NaCl vs. RNS/LEV MD; *** kontrolė/NaCl vs. RNS/MEM MD; *RNS/MEM MD vs. RNS/MEM DD, RNS/MEM MD vs. RNS/LEV DD, RNS/MEM DD vs. RNS/LEV MD;

Δ 0 diena – 7 diena: *** kontrolė/NaCl vs. RNS/NaCl, kontrolė/NaCl vs. RNS/LEV MD, kontrolė/NaCl vs. RNS/MEM MD; *RNS/MEM MD vs. RNS/MEM DD, RNS/MEM MD vs. RNS/LEV DD, RNS/MEM DD vs. RNS/LEV MD, kontrolė/NaCl vs. RNS/LEV DD.



4.2.6.1 pav. SD-OKT ganglinių ląstelių komplekso storio pokyčio dinamika tarp 0 ir 4 dienos, 4 ir 7 dienos, 0 ir 7 dienų eksperimentinėse ir kontrolinėje grupėje

Statistinis reikšmingumas buvo nustatytas naudojant nesuporuotą t-testą;

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$.

4.2.7. Dvinarė logistinė regresinė analizė TGL žūčiai ir astrogliazės rodiklių pokyčių prognozavimui

Remdamiesi dvinare logistine regresine analize, neatsižvelgiant į gydy-
mo grupes, galime prognozuoti, jog gyvūnams, kuriems po 7 dienų nusta-
tyti astrogliazės rodiklių pokyčiai didesni nei 10 proc., galimybių santykis
turėti mažesnę TGL žūtį nei 20 proc. yra 3,75 karto didesnis nei gyvūnams,
kurių tinklainėse nustatyta mažesni nei 10 proc. astrogliazės rodiklių poky-
tis. Pelių tinklainėse, kuriose GLK išplonėjimas buvo didesnis nei 0,0022
mm, nustatytas 1,63 galimybių šansas, kad TGL žūtis bus mažesnė nei 20
proc., palyginti su tinklainėmis, kuriose GLK išplonėjimas buvo mažesnis nei
0,0022 mm (4.2.7.1 lentelė). Prognostiniai rodmenys nebuvo statistiškai
reikšmingi galimai dėl mažos imties. Tikslėnei eksperimentinių duomenų
analizei tinkamesni paprastesni statistiniai metodai, kurie tiesiogiai lygina at-
sitiktinai parinktų grupių rezultatus ir yra mažiau jautrūs duomenų analizės
klaidoms [214, 215].

4.2.7.1 lentelė. Astrogliazės rodiklių ir GLK storio pokyčių poveikis TGL žū- čiai po RNS

Rodiklis	<i>p</i>	GS	PI 95 proc.
Astrogliazės rodiklių pokytis > 10 proc.	0,11	3,75	0,74–19,14
GLK storio pokytis > 0,0022 mm	0,54	1,63	0,34–7,67

GS – galimybių santykis; PI – pasikliautinis intervalas; *p* – statistinio reikšmingumo lyg-
muo.

Gyvūnams, kurių tinklainėse GLK išplonėjimas buvo didesnis nei
0,0022 mm, nustatytas 3,93 kartus mažesnis galimybių šansas, jog astrogl-
iazės rodiklių pokytis po 7 dienų bus didesnis nei 10 proc., palyginti su gy-
vūnais, kurių tinklainėse GLK išplonėjimas buvo mažesnis nei 0,0022 mm
(*p* = 0,07) (4.2.7.2 lentelė).

4.2.7.2 lentelė. GLK storio pokyčio poveikis astrogliazės rodiklių pokyčiui praėjus 7 dienoms po RNS atlikimo

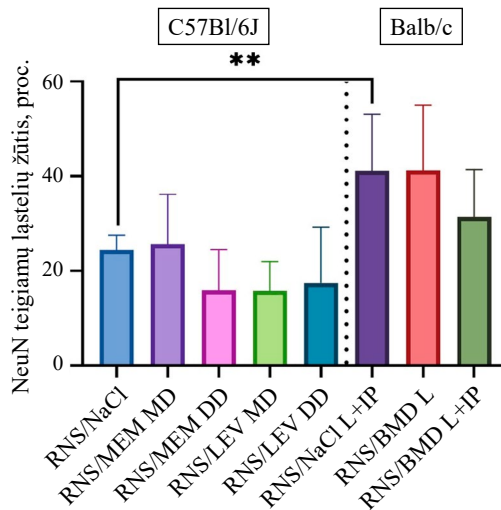
Rodiklis	<i>p</i>	GS	PI 95 proc.
GLK storio pokytis > 0,0022 mm	0,07	0,26	0,06–1,14

GS – galimybių santykis; PI – pasikliautinis intervalas; *p* – statistinio reikšmingumo ly-
gmuo.

4.3. I ir II eksperimentinio tyrimo etapų rezultatų palyginimas

Atlikus stereologinius tinklainės ląstelių skaičiavimus bei palyginus C57Bl/6J ir Balb/c pelių kontrolinių akių (be RNS) TGL ir astrocitų vidurkius, rastas statistiškai reikšmingas NeuN teigiamų ląstelių skirtumas ($7178 \pm 768,5$ ir 4716 ± 1115 , $p < 0,0001$) tarp skirtingų pelių padermių. Tačiau GFAP reaktyvių ląstelių vidurkiausiai sveikose akyse nesiskyrė ($250,6 \pm 34,63$ ir $282,4 \pm 68,74$).

Vertinant NeuN teigiamų ląstelių žūtį procentine išraiška, pastebėtas statistiškai reikšmingas skirtumas tarp C57Bl/6J ir Balb/c pelių padermių natrio chlorido grupėse po RNS ($24,36 \% \pm 3,131$ ir $41,12 \% \pm 12,03$, $p < 0,01$), o tai leidžia galvoti, kad tiriamųjų genetika gali turėti reikšmės vertinant nervinių ląstelių atsparumą regos nervo pažeidimams (4.3.1 pav., 4.3.1 lentelė).



4.3.1 pav. I ir II eksperimentinės dalies TGL ląstelių žūtis eksperimentinėse grupėse C57Bl/6J ir Balb/c pelės RNS modelyje

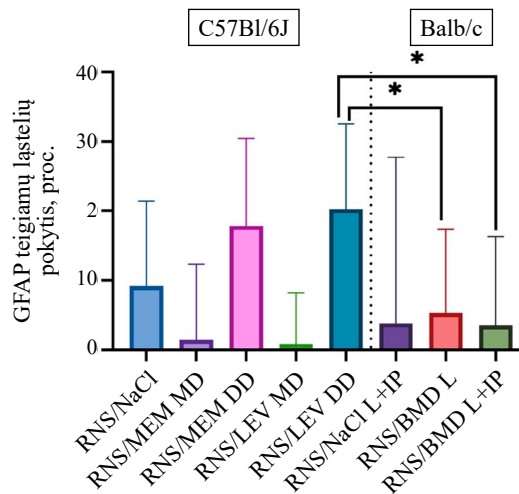
Statistinis reikšmingumas buvo nustatytas naudojant nesuporuotą t-testą; ** – $p < 0,01$;
NeuN – neuronams specifinis branduolių baltymas, pirminis antikūnas.

4.3.1 lentelė. Tinklainės ląstelių pokytis eksperimentinėse grupėse C57Bl/6J ir Balb/c pelės RNS modelyje

I eksperimentinio tyrimo etapas (Balb/c pelių padermė)		
Eksperimentinė grupė	NeuN pokytis, %	GFAP pokytis, %
RNS/NaCl L+IP	41,12 ± 12,03	5,92 ± 23,39
RNS/BMD L	41,19 ± 13,8	5,27 ± 12,06
RNS/BMD L+IP	31,40 ± 9,95	3,5 ± 12,82
II eksperimentinio tyrimo etapas (C57Bl/6J pelių padermė)		
RNS/NaCl	24,36 ± 3,13**	9,2 ± 12,17
RNS/MEM MD	25,63 ± 10,53	1,43 ± 10,89
RNS/MEM DD	15,86 ± 8,62	17,82 ± 12,59
RNS/LEV MD	15,78 ± 6,18	0,81 ± 7,4
RNS/LEV DD	17,42 ± 11,84	20,26 ± 12,27*

Statistinis reikšmingumas buvo nustatytas naudojant nesuporuotą t-testą; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; NeuN – neuronams specifinis branduolių baltymas, pirminis antikūnas.

GFAP pokyčio reikšmė yra reaktyvios gliozės rodiklis. Lyginant tinklainės gliozės rodiklį, grupėse, kurioms buvo skirtas fiziologinis tirpalas, statistiškai reikšmingo skirtumo tarp GFAP pokyčio tarp skirtingų pelių padermių nebuvo (9,2 % ± 12,17 ir 5,92 % ± 23,39). RNS/LEV DD grupėje stebėta ryškesnė astrogliazė lyginant su RNS/BMD L grupe (20,26 % ± 12,27 ir 5,27 % ± 12,06, $p < 0,05$) ar RNS/BMD L+IP grupe (3,5 % ± 12,82, $p < 0,05$) (4.3.2 pav., 4.3.1 lentelė).

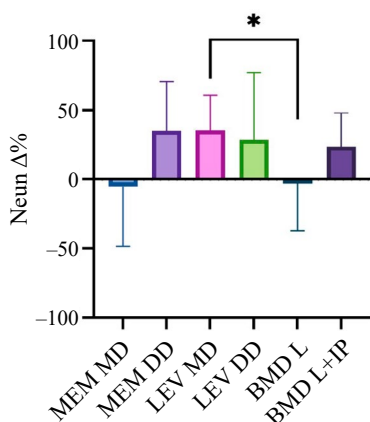


4.3.2 pav. I ir II eksperimentinės dalies GFAP imunoreaktyvių tinklainės ląstelių pokytis eksperimentinėse grupėse C57Bl/6J ir Balb/c pelės RNS modelyje

Statistinis reikšmingumas buvo nustatytas naudojant nesuporuotą t-testą; * $p < 0,05$. GFAP – glijos fibrilinis rūgštinis baltymas, pirminis antikūnas.

4.3.1. Neuroprotekcinų savybių turinčių vaistų poveikio palyginimas

Norėdami palyginti neuroprotekcinų savybių turinčių vaistų poveikį TGL tarp skirtingų gydymo grupių (ir pelių padermių), vertinome vaistų poveikio masto skirtumą. Didžiausias TGL poveikio masto skirtumas buvo stebėtas mažos dozės levetiracetamo grupėje ir statistiškai reikšmingai skyrėsi nuo brimonidino lašų gydymo grupės (atitinkamai, $35,24 \pm 25,35$ ir $-3,07 \pm 34,38$, $p < 0,05$) (4.3.1.1 pav., 4.3.1.1 lentelė).



4.3.1.1 pav. Neuroprotekcinų savybių turinčių vaistų poveikio masto skirtumas ($\Delta\%$). Diagramoje stebimas didžiausias skirtumas TGL mažos dozės levetiracetamo grupėje, kuris reikšmingai skyrėsi nuo brimonidino lašais gydytos grupės ($p < 0,05$)

Statistinis reikšmingumas buvo nustatytas naudojant neparametrinį *Mann-Whitney* testą; * $p < 0,05$; NeuN – neuronams specifinis branduolių baltymas, pirminis antikūnas.

4.3.1.1 lentelė. Neuroprotekcinų savybių turinčių vaistų poveikio masto skirtumas ($\Delta\%$)

	MEM MD	MEM DD	LEV MD	LEV DD	BMD L	BMD L+IP
NeuN	-5,21 ± 43,23	34,89 ± 35,39	35,24 ± 25,35*	28,50 ± 48,58	-3,07 ± 34,38	23,63 ± 24,19
GFAP	-165 ± 96,02*	93,75 ± 136,9*	-91,22 ± 80,49*	120,3 ± 133,4	-51,04 ± 217,7	-40,91 ± 216,5

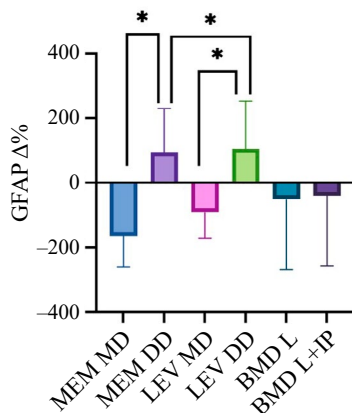
Statistinis reikšmingumas buvo nustatytas naudojant neparametrinį *Mann-Whitney* testą; * $p < 0,05$;

NeuN $\Delta\%$: LEV MD vs. BMD L*;

GFAP $\Delta\%$: MEM MD vs. MEM DD; MEM DD vs. LEV DD; LEV MD vs. LEV DD;

NeuN – neuronams specifinis branduolių baltymas, pirminis antikūnas; GFAP – glijos fibrilinis rūgštinis baltymas, pirminis antikūnas.

Palyginus vaistų poveikio masto skirtumą GFAP imunoreaktyvioms ląstelėms, tarp eksperimentinių grupių nustatyti reikšmingi skirtumai tarp mažos ir didelės dozės memantino grupių (atitinkamai, $-165 \pm 96,02$ ir $93,75 \pm 136,9$, $p < 0,05$). Nustatytas statistiškai reikšmingas vaisto poveikio masto skirtumas tarp didelių dozių memantino ir levetiracetamo grupių (atitinkamai, $93,75 \pm 136,9$ ir $120,3 \pm 133,4$, $p < 0,05$). Didelė levetiracetamo doze gydytoje grupėje stebėtas statistiškai reikšmingas vaisto poveikio masto skirtumas, palyginti su mažos dozės levetiracetamo grupe ($91,22 \pm 80,49$, $p < 0,05$) (4.3.1.2 pav.).



4.3.1.2 pav. Vaistų poveikio masto skirtumas GFAP teigiamoms ląstelėms ($\Delta\%$). Stebimas statistiškai reikšmingas vaisto poveikio masto skirtumas didelių dozių memantino ir levetiracetamo grupėse ($p < 0,05$)

Statistinis reikšmingumas buvo nustatytas naudojant neparametrinį *Mann-Whitney* testą;

* $p < 0,05$; GFAP — glijos fibrilinis rūgštinis baltymas, pirminis antikūnas.

5. REZULTATŲ APTARIMAS

5.1. I disertacinio darbo etapo rezultatų aptarimas

Naudodami ikiklinikinį RNS pelių modelį ištyrėme brimonidino lašų atskirai ir kartu su IP injekcijomis poveikį TGL ir tinklainės astroцитų išgyvenamumui visoje tinklainėje ir skirtinguose segmentuose. Rezultatai parodė, kad pelių, kurioms buvo skirtas sudėtinis gydymas brimonidino lašais ir sistemiškai, TGL išgyvenamumas po RNS visoje tinklainėje buvo 81,46 proc., palyginti su 65,44 proc. TGL išgyvenamumu fiziologinio tirpalo grupėje arba 64,13 proc. išgyvenamumu brimonidino akių lašų gydymo grupėje. Šie rezultatai rodo, kad gydymas brimonidino lašais, papildytas brimonidino IP injekcijomis, turėjo pridėtinės naudos TGL išgyvenamumui po RNS.

Mūsų rezultatai sutampa su ankstesnių tyrimų rezultatais, kurie parodė sistemiškai vartojamo brimonidino neuroprotekcinį poveikį. Wheeler ir kt. įrodė, kad brimonidino akių lašų vartojimas turi neuroprotekcinį poveikį ir apsaugo TGL nuo žūties po dalinio regos nervo sužalojimo žiurkės modelyje, o neuroprotekcinis poveikis priklausė nuo dozės [162]. Lambert ir kt. panašiai įvertino sisteminio brimonidino vartojimą ir jo poveikį išsaugojant TGL [165]. Po sisteminio brimonidino 1 mg/kg per parą skyrimo buvo nustatytos reikšmingai pagerėjusios aksonų pernašos savybės ir išsaugoti aksonai. Taip pat buvo nustatyta sumažėjusi TGL žūtis žiurkės tinklainėje [165]. Wolde-Mussie ir kt. ištyrė 0,5 arba 1 mg/kg/d. poodinio brimonidino vartojimo poveikį TGL ir palygino jį su gydymo timololiu poveikiu. Jų rezultatai parodė, kad brimonidinas, bet ne timololis, turi nuo dozės priklausomą neuroprotekcinį poveikį tinklainei. Įdomu, kad poodinis brimonidino skyrimo būdas turėjo nereikšmingą poveikį akispūdžiui [175]. Marangoz ir kt. atliktame tyrime buvo palygintas brimonidino ir melatonino IP vartojimas glaukomos pažeidimo atveju. Rezultatai atskleidė, kad tik 1 mg/kg per dieną 0,15 proc. brimonidino turėjo akispūdį mažinantį poveikį ir veikė kaip neuroprotekcinė priemonė TGL [11]. Panašiai Hernandez ir kolegų eksperimentiniame tyrime su žiurkėmis nustatė, kad 12 savaičių vartojant 1 mg/kg brimonidino kartą per savaitę IP, padidėjo TGL išgyvenamumas. Be to, panašus teigiamas poveikis buvo pastebėtas po latanoprosto skyrimo. Autoriai manė, kad neuroprotekcinį poveikį lėmė skirtingi mechanizmai. Po IP brimonidino injekcijų buvo slopinama apoptozinė grandinė ir mažinamas glutamato toksiskumas. Skiriant latanoprostą, nustatytas palaiptis akispūdžio mažėjimas [176].

Apibendrinant galima pasakyti, kad geresnis TGL išgyvenamumas buvo nustatytas daugumoje eksperimentinių tyrimų, kuriuose buvo naudojama 0,5–1 mg/kg IP brimonidino dozė skirtingais režimais 3–12 savaičių [175, 176, 216]. Mūsų rezultatai rodo, kad trumpesnė – dviejų dienų – trukmė,

bet didesnė 2 mg/kg dozė gali turėti panašų poveikį TGL išsaugojimui. Penkioms iš 12 pelių nustatyti 1 laipsnio, savaimė praeinantys nepageidaujami reiškiniai. Be to, vidutinė veiksminga dozė ir mirtina dozė į pilvaplėvės ertmę pelėms suleisto brimonidino yra atitinkamai 75,7 mg/kg ir 379 mg/kg [217].

Vertinant brimonidino neuroprotekcinį poveikį bei siekiant nustatyti vidutinį TGL tankį, TGL yra analizuojamos 1–4 mm nuotoliu nuo regos nervo disko arba skirtinguose tinklainės taškuose bei apskaičiuojamas šių skaičių vidurkis [165, 171, 175, 216, 218, 219]. Šiuo metodu galima nenustatyti tikslaus brimonidino poveikio konkrečioms sritims, nes TGL laipsniškai pasiskirsto tinklainėje nuo centro iki periferijos. Eksperimentiniuose glaukomos modelių tyrimuose nustatyta, kad didesnis TGL tankis yra centre, o periferijoje jis yra retesnis [176]. Vienuose tyrimuose nustatyta, kad padidėjęs akispūdis lėmė didesnę TGL žūtį centriniuose segmentuose, o kituose tyrimuose, dėl įvykusios trabekulinio tinklo blokados ir uždegiminių reakcijų, rasta padidėjusi TGL žūtis tinklainės periferijoje [220–222]. Hernandez ir kt. eksperimentiniame tyrime nustatė, kad esant aukštam akispūdžiui TGL nuosekliai išgyvena tinklainėje po gydymo brimonidinu [176]. Mūsų tyrimo metu nustatyta, kad reikšminga TGL žūtis centrinėje dalyje yra susijusi su regos nervo pažeidimu, o tai rodo, kad pažeidimo vieta ir pažaidos modelio savitumai turi didelės įtakos TGL išsaugojimui skirtinguose tinklainės segmentuose. Skirtingų eksperimentinių modelių savitumai pabrėžia tolesnių mokslinių tyrimų svarbą, nagrinėjant uždegiminių veiksnių ir mechaninio pažeidimo poveikį TGL išsaugojimui.

Mūsų tyrimo duomenimis geriau TGL buvo išsaugotos periferiniuose tinklainės segmentuose, o po gydymo brimonidino akių lašais ir dviem papildomomis IP dozėmis išliko 92,82 proc. TGL. Šis išgyvenamumas buvo daug didesnis nei vartojant tik brimonidino akių lašus (68,4 proc.) arba fiziologinio tirpalo kontrolinėse grupėse (60,96 proc.). Panašūs rezultatai buvo nustatyti ir visoje tinklainėje, o tai patvirtino sisteminį neuroprotekcinį brimonidino poveikį.

Nustatytas itin svarbus tinklainės glijos vaidmuo sergant glaukoma, nes įprastomis sąlygomis glijos ląstelės palaiko neuroninių ląstelių metabolizmą ir homeostazę [84, 223]. Dėl astrocitų ir Miulerio ląstelių reakcijos į neuronų pažeidimus glaukomos metu atsiranda gliozė. Jos metu šios ląstelės tampa uždegiminės ir prisideda prie glijos randų susidarymo. Padidėjęs uždegimą skatinančių tarpininkų kiekis neigiamai veikia TGL išgyvenamumą [224]. Mūsų atliktame tyrime nustatytas tinklainės astrocitų, turinčių svarbios įtakos jonų pusiausvyrai, neurotransmisijai ir neurodegeneracijai, skaičiaus padidėjimas brimonidinu gydytų gyvūnų grupėse, palyginti su kontrolinėmis grupėmis [225–227]. Šis radinys kelia klausimų dėl sisteminio ir vietinio brimonidino poveikių glijos aktyvumui. Tiksliau – ar IP brimonidino injekcijos gali su-

mažinti pernelyg didelę aktyvaciją? Šie klausimai rodo sudėtingą sisteminio ir vietinio gydymo poveikio skirtumą koreguojant astrogliozę. Įdomu, kad fiziologinio tirpalo lašais ir IP injekcijomis gydomų RNS gyvūnų grupėse astrocitų statistiškai reikšmingai nepadaugėjo. Būtų tikslingas vertinimas, kaip įvairūs gydymo būdai veikia glijos aktyvaciją ir ar šie poveikiai yra tiesiogiai susiję su brimonidino veikimo mechanizmu. Autoriai teigia, kad astrocitų atsakas į glaukominį pažeidimą yra heterogeniškas, priklausantis nuo ligos stadijos, regiono ir erdvinės padėties. Esant ūminiam pažeidimui astrocitai gali turėti neuroprotekcinę savybę, tačiau pažeidimai užsitęsus išryškėja neuronų žalojančios savybės [228].

Mūsų atliktame tyrime, analizuodami tinklainės astrocitų ir TGL skaičių tinklainėje, pastebėjome reikšmingą atvirkštinę koreliaciją RNS/BMD L grupėje. Šis ryšys nustatytas vidurinėje tinklainės dalyje, ir rodo, kad geresnis TGL išgyvenamumas koreliavo su mažesne astroglioze. Šioje grupėje brimonidino lašai nebuvo veiksmingi išsaugojant TGL. Ir atvirkščiai – fiziologinio tirpalo grupės tiriamiesiems, nustatėme tiesioginę koreliaciją tarp astrocitų ir TGL skaičiaus. Astrocitų skaičiaus pokyčiai RNS/NaCl L+IP ir RNS/BMD L+IP grupėse vidutiniškai koreliavo centriniuose ir periferiniuose tinklainės regionuose, o tai rodo valdomą gliozę. Papildomų klausimų kyla dėl brimonidino svarbos tinklainės astroglizės patogenetiniams mechanizms ir nuo dozės priklausomam poveikiui. RNS/BMD L+IP grupės periferinėje tinklainės srityje pastebėtas ryškus apsauginis poveikis neneuroninėms ląstelėms. Tačiau DAPI ląstelių skaičiaus skirtumas šiose grupėse nebuvo reikšmingas, palyginti su kontroline grupe. RNS/NaCl L+IP ir RNS/BMD L+IP grupėse nustatyta mažiau neneuroninės kilmės ląstelių, palyginti su kontroline grupe, o tai rodo, kad brimonidinas gali netiesiogiai būti svarbus tiek neuroninėms, tiek neneuroninėms ląstelėms, vartojant vaistą sistemškai ir vietiškai.

5.2. II disertacinio darbo etapo rezultatų aptarimas

Memantinas yra nekonkurencinis NMDA receptorių blokatorius, kuris apsaugo nuo žalingo glutamato ekscitotoksiškumo tinklainės pažeidimo vietoje ir aplinkinėse ląstelėse [229]. RNS sukelia jonų koncentracijos pokyčius TGL, kurie prasideda nuo natrio patekimo ir tarpląstelinio kalcio padidėjimo [230]. Vėliau išsiskiria glutamatas, padidėja tarpląstelinė kalcio koncentracija ir galiausiai TGL žūva. Šie procesai sukelia pirminę TGL neurodegeneraciją, bei per jungtis su TGL aksonais – astrocitų aktyvaciją [231]. Zhang ir kt. paskelbė rezultatus, kad astrocitų aktyvacija sukelia pirminę ir antrinę TGL žūtį [232], o Ridet ir kt. teigė, kad aktyvinti astrocitai sudaro sąlygas aksonams regeneruoti [233]. Tačiau tikslus astrocitų vaidmuo ir astrocitų aktyvacijos mechanizmai sergant glaukoma dar nėra galutinai suprantami.

Trotman komandos atliktame darbe pastebėta, kad mažos (0,2 mg/kg) memantino koncentracijos turėjo neuroprotekcinę poveikį, vidutinės (2–10 mg/kg) neapsaugojo neuroninių ląstelių, o didelės (20 mg/kg) memantino koncentracijos sukėlė neurotoksinę poveikį, tiriant peles po smegenų insulto [234]. Ferrer-Acosta taip pat įrodytas mažos memantino koncentracijos neuroprotekcinis poveikis *in vitro* tyrimuose [235]. Tiriant memantino neuroprotekcinę poveikį TGL neuroprotekcijos ikiklinikiniuose tyrimuose, gydymas 10 mg/kg memantinu turėjo neuroprotekcinę efektą tinklainės neuroninėms ląstelėms [236]. Deja, atlikus klinikinį tyrimą glaukoma sergantiems pacientams, memantino neuroprotekcinis poveikis nenustatytas, tačiau memantino dozė buvo tik ~0,28 mg/kg [13]. Mūsų atliktame tyrime memantinas sukėlė neuroprotekcinę poveikį TGL, jei buvo skiriamas 10 mg/kg doze 1 kartą per dieną septynias dienas.

Levetiracetamas yra antiepilepsinis vaistas, dažniausiai vartojamas daliniams ir generalizuotiems traukulių priepuoliams gydyti. Levetiracetamas, prisijungęs prie sinapsinio pūslelės baltymo SV2A, sukelia neuromoduliacinį ir neuroinhibicinį poveikius. Eksperimentiniai tyrimai parodė, kad levetiracetamas turi neuroprotekcinę savybių gydant ne tik epilepsiją, bet ir kitas ligas, įskaitant ir degeneracines [14, 15, 197, 198, 237–239]. Gydymas levetiracetamu gali slopinti hiperaktyvios astroglijos neurotoksinę molekulių išsiskyrimą [161]. Literatūroje aprašytas teigiamas jo poveikis slopinant neurodegeneracinius procesus diabetinės neuropatijos metu, tačiau nėra duomenų apie levetiracetamo poveikį tinklainės astroцитams ir TGL. Ikiklinikiniuose neuroprotekcinuose levetiracetamo tyrimuose mokslininkai analizavo 15–150 mg/kg dozės įtaką neuroninėms ląstelėms ir pastebėjo, kad didesnės levetiracetamo dozės turėjo geresnę neuroprotekcinę poveikį centrinei nervų sistemai [18, 240, 241]. Nėra levetiracetamo tyrimų, vertinančių neuroprotekcinę poveikį TGL, tačiau šiame darbe stebėtas levetiracetamo nuo dozės priklausomas neuroprotekcinis poveikis TGL po RNS.

Mūsų darbe nagrinėjome levetiracetamo bei mažų ir didelių memantino dozių neuroprotekcijos poveikį tinklainės ląstelėms, ir struktūriniais tinklainės storio pokyčiams. Įvertinus TGL vidurkį ir OKT duomenis nustatyta, kad silpniausią neuroprotekcinę poveikį turėjo mažos memantino dozės grupė. Tačiau šios grupės tiriamųjų TGL vidurkis statistiškai reikšmingai nesiskyrė nuo fiziologinio tirpalo grupės, o OKT duomenimis, GLK buvo ploniausias po RNS modelio, palyginti su kitomis eksperimentinėmis grupėmis. Stipriausias neuroprotekcinis poveikis buvo didelės memantino dozės ir mažos levetiracetamo dozės grupėse. Memantino mažos dozės grupėje TGL žūtis buvo panaši kaip mažos dozės levetiracetamo grupėje (15,86 proc. ir 15,78 proc.). GLK storis geriausiai išsaugotas RNS/MEM DD grupėje vertinant po 7 eksperimento dienų, palyginti su mažos dozės memantino ir levetiracetamo gru-

pėmis. Mažos dozės levetiracetamo grupėje (kaip ir didelės dozės memantino grupėje) TGL žūtis buvo mažesnė, tačiau GLK storis buvo išsaugotas geriau didelių dozių memantino ir levetiracetamo grupėse. Nustebino tai, jog didelių dozių grupėse astroglizės rodikliai buvo didžiausi. Tikėtina, tai turėjo įtakos 7 dienos OKT GLK storiui. Žinoma, kad astrocitai skleidžia signalus, reikalingus neuronų išgyvenamumui, aprūpina energija ir atlieka aktyvią funkciją formuodami sinapses [242]. Be to, padidėjusi aktyvintų astrocitų viduląstelinė kalcio koncentracija gali sukelti stiprų kraujagysles sutraukiantį poveikį, padedantį išlaikyti kraujo ir tinklainės barjerą po streso ir (arba) sužalojimo. Atsižvelgiant į aktyvacijos tipą, yra suaktyvinami įvairūs mechanizmai, dėl kurių kraujagyslės išsiplečia arba susiaurėja [231, 233, 242, 243]. Taigi, norint kurti naujus oftalmologinius neurodegeneracinių ligų gydymo būdus, labai svarbu yra suprasti šiuos mechanizmus ir kaip juos veikia neuroprotekciniai savybių turintys vaistai.

5.3. Neuroprotekciniai savybių turinčių vaistų poveikio palyginimas

Ryšys tarp akispūdžio ir glaukomos nėra pastovus kintamasis. Kai kuriems pacientams, sergantiems akių hipertenzija, glaukoma niekada nepasireiškia, o kitiems, kurių akispūdis normalus, glaukominis pažeidimas toliau progresuoja. Viena hipotezė – TGL jautrumas apoptoziniams veiksniams yra genetinio pagrindo dalis. Nagrinėjant disertacinio darbo duomenis buvo pastebėta, kad skirtingos pelių padermės ne tik turėjo skirtingą neuroninių ląstelių skaičių, bet ir skirtingą atsparumą regos nervo pažeidimui. Netaikant neuroprotekcinio gydymo žuvo 24,36 proc. C57Bl/6J pelių, o Balb/c pelių tinklainėse vidutiniškai žuvo 41,12 proc. TGL. Įdomu, kad astrocitų vidurkis tinklainėse tarp skirtingų padermių statistiškai reikšmingai nesiskyrė, todėl palyginę skirtingų vaistinių preparatų poveikį astroцитams pastebėjome, kad ryškiausia astroglizė stebėta didelės levetiracetamo dozės grupėje, palyginti su brimonidinu gydytomis grupėmis. Antrosios darbo dalies tyrimai su levetiracetamu parodė teigiamą poveikį TGL, tačiau po RNS TGL išgyvenamumas buvo didesnis mažos levetiracetamo dozės grupėje. Vertinant neuroprotekciniai savybių turinčių vaistų poveikio masto skirtumą, memantinu ir levetiracetamu gydytose grupėse poveikis TGL buvo didžiausias. Vertindami vaistų poveikio masto skirtumą tinklainės astroцитams pastebėjome, kad didžiausias poveikis buvo grupėse, gydytose didelėmis memantino ir levetiracetamo dozėmis. Iš šio darbo duomenų galime daryti išvadas, kad skiriant gydymą 80 mg/kg levetiracetamu reaktyvios astroglizės sukeltas neurotoksinių molekulių išsiskyrimas turėjo neigiamą poveikį TGL išgyvenamumui.

5.4. Disertacinio darbo trūkumai

Mūsų tyrimas turėjo trūkumų. Vienas iš mūsų tyrimo apribojimų – negalime visiškai atmesti anestezijos poveikio neuroprotekcijai. Tačiau visoms pelėms buvo skirtos vienodos anestetikų dozės ir skyrimo dažnis, o tai sumažino galimai netikslų rezultatų vertinimą.

Nors įrodėme teigiamą neuroprotektinių savybių turinčių vaistų poveikį TGL išgyvenamumui, tačiau funkciniam neuroprotektiniam poveikiui vertinti būtų naudinga atlikti elektroretinogramą. Li ir kolegų atliktame tyrime nustatyta, kad pERG jautrumas yra didelis pirmąją parą po RNS, tačiau vėlesniam dinaminiam TGL pokyčių vertinimui tikslesnis ir detalesnis yra GLK vertinimas OKT [244]. Būsiami tyrimai turėtų ištirti skirtingų dozių ir gydymo trukmės poveikį TGL išgyvenimui po RNS. Atsižvelgiant į pastebėtus TGL išgyvenamumo rezultatus, skirtingų glaukomos modelių tyrimas gali suteikti gilesnių įžvalgų apie gydymo veiksmingumą. Kiekvienas modelis turi unikalių patofiziologinių savybių, kurios gali skirtingai paveikti TGL išgyvenamumą. Tai pabrėžia, kad reikia atlikti tolesnius tyrimus analizuojant šią daugialypės prigimties ligą – glaukomą. Nagrinėjant skirtingiems modeliams taikomas įvairias dozes ir gydymo laikotarpius, būsimuose tyrimuose galėtų būti išsamesnis neuroprotektinių mechanizmų vertinimas ir platesnis jų pritaikymas, gydant glaukomą. Toks visapusiškas požiūris suteiktų papildomų žinių apie TGL atsparumą pažeidimui ir paskatintų veiksmingesnių bei labiau pacientams pritaikytų glaukomos gydymo vystymo tyrimų.

IŠVADOS

1. Atliktas genetiškai skirtingų pelių padermių RNS modelis. Natrio chlorido grupės pelių dešinėse akyse (po RNS) stebėtas statistiškai reikšmingas TGL sumažėjimas, kuris patvirtina sėkmingai atliktą RNS. C57Bl/6J pelių padermė turi ne tik daugiau neuroninių ląstelių (kontrolinių tiriamųjų akių, kurioms nebuvo atliktas RNS), bet ir yra atsparesnės regos nervo pažeidimui. Po RNS TGL išgyvenamumas C57Bl/6J pelių padermėje siekė 75,64 proc., Balb/c pelių – 58,88 proc., netaikant neuroprotekcinio gydymo. Tinklainės astrocitų vidurkis tarp pelių padermių nesiskyrė.
2. Sistemiskai vartojant brimonidiną, TGL išgyvenamumas tinklainės periferijoje siekė 92,82 proc. palyginti su natrio chlorido grupe, kurioje po RNS išliko 60,96 proc. TGL. Lygindami sisteminį ir vietinį brimonidino poveikius nustatėme, kad TGL išgyvenamumas taikant vietinį gydymą brimonidino lašais siekė 58,81 proc., o papildomos 2 mg/kg brimonidino IP injekcijos statistiškai patikimai apsaugojo visos tinklainės TGL (68,6 proc.). Astrogliozės rodikliai buvo didžiausi brimonidino lašų grupėje, palyginti su kontroline ir natrio chlorido tiriamųjų grupe.
3. Nustatytas statistiškai reikšmingas neuroprotekcinis poveikis TGL po RNS gydant 10 mg/kg memantino, 40 mg/kg ir 80 mg/kg levetiracetamo 7 dienų IP injekcijomis (atitinkamai, TGL išsaugojimas 84,14 proc., 84,22 proc. ir 82,58 proc.). Struktūriniai tinklainės pokyčiai, vertinant GLK storį OKT tyrimu, buvo statistiškai reikšmingai mažesni gydant 10 mg/kg memantino IP injekcijomis 7 dienas. Skiriant dideles memantino ir levetiracetamo dozes atlikus OKT tyrimą GLK nesuplonėjo, o gydant mažomis dozėmis – stebėtas tinklainės išplonėjimas.
4. Palyginti su brimonidino lašus vartojusia grupe, stebėtas statistiškai reikšmingai didesnis santykinis vidutinis neuroprotekcinis poveikis mažos dozės levetiracetamo grupėje, o didelių memantino ir levetiracetamo dozių bei sisteminio brimonidino grupėse stebėtos panašios vidutinio neuroprotekcinio poveikio tendencijos. Pastebėtas saugus sisteminio memantino, levetiracetamo vartojimas ir laikinas nepageidaujamas brimonidino poveikis.

REKOMENDACIJOS

1. Sisteminio 2 mg/kg brimonidino, 10 mg/kg memantino, 40 mg/kg ir 80 mg/kg levetiracetamo saugūs ir veiksmingi neuroprotektiniai poveikiai turi būti taikomi tolesniuose glaukoma sergančių pacientų tyrimuose. Planuojant tyrimus reikia pradėti nuo patvirtintų saugių memantino ir levetiracetamo dozių. Mūsų tyrime nustatytas nuo dozės priklausantis neuroprotektinis poveikis leidžia prognozuoti, kad didesnės nei anksčiau klinikuose tyrimuose vartotos memantino dozės visgi gali būti veiksmingos. Tai – klinikinio tyrimo objektas. Analogiškai, optimalios levetiracetamo dozės (veiksmingos ir saugios) nustatymas turėtų būti tolesnė glaukoma sergančių pacientų tyrinėjimo kryptis.
2. Remiantis šio disertacinio darbo rezultatais, ateityje būtų tikslinga įvertinti papildomo sisteminio neuroprotektinio gydymo ir profilaktikos poveikį ankstyvosios stadijos ir didelės rizikos glaukoma sergantiems pacientams, ypač turintiems papildomų rizikos veiksnių sirgti neurodegeneracinėmis ligomis, ypač Alzheimerio, Parkinsono liga ar gresiančiu insultu. Panašu, kad kiekvienas iš trijų potencialių neuroprotektorių, pasižymi savitais nepageidaujamais reiškiniais. Ateities tyrimuose tikslinga pritaikyti svarbiausias sisteminės memantino, brimonidino ir levetiracetamo savybes ir individualizuoti geriausią jų pritaikomumą glaukoma sergantiems pacientams.

SUMMARY

ABBREVIATIONS

BMD	–	brimonidine
GCC	–	ganglion cells complex
HD	–	high dose
IOP	–	intraocular pressure
IP	–	intraperitoneal
LD	–	low dose
LEV	–	levetiracetam
MEM	–	memantine
NMDA	–	N-methyl-D-aspartate
OCT	–	optical coherence tomography
ONC	–	optic nerve crush
RGC	–	retinal ganglion cell
SD	–	standart deviation
SD-OCT	–	spectral domain-optical coherence tomography

Introduction

Glaucoma is a neurodegenerative disease characterized by the death of retinal ganglion cells (RGCs) and visual field changes. It is the leading cause of irreversible blindness worldwide [1]. It is estimated that over 120 million people will be affected by glaucoma globally by 2040 [2, 3]. Visual acuity often remains normal in the early stages, and early visual field changes may go unnoticed. However, as the disease progresses and remains untreated, it can lead to blindness in one or both eyes [4]. A retrospective study conducted in Sweden found that approximately 38 % of glaucoma patients became blind in one eye and approximately 13.5 % in both eyes despite 20 years of treatment [4]. These findings emphasize the substantial burden of glaucoma on healthcare systems and the economy.

Neuroprotection is the objective of glaucoma treatment, as the degeneration of RGCs and their axons directly leads to vision loss [5–7]. Currently, treatment strategies focus on indirectly protecting RGCs by lowering intraocular pressure (IOP), the primary risk factor for glaucoma [8], and improving ocular perfusion. However, a critical gap remains in glaucoma therapy: the absence of neuroprotective treatments that directly target the preservation of RGCs [9]. Research has shown that brimonidine, an intraocular pressure-

reducing drug, has a neuroprotective effect by preserving RGCs [10]. Brimonidine, α_2 adrenergic receptor agonist, reduces RGC apoptosis by modulating neuroinflammation pathways by increasing the release of neurotrophic factors and reducing glutamate-induced excitotoxicity [10, 11]. Memantine, an N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist used for the treatment of Alzheimer's disease, reduces glutamate-induced excitotoxicity – the main factor causing RGC lesions in glaucoma [12]. Although the neuroprotective effects of memantine were not proven in glaucoma clinical trials, the study design had many limitations [13]. Levetiracetam is traditionally used as an anticonvulsant drug. Scientific studies examining the direct effects of levetiracetam on RGC are lacking, but researchers have found the neuroprotective effects of levetiracetam in treating neurodegenerative diseases [14–16]. Levetiracetam binds to synaptic vesicle glycoprotein 2A, which modulates neurotransmitter release. Levetiracetam also inhibits the release of neurotoxic molecules from reactive astroglia, reducing oxidative stress [17–19]. Preclinical neuroprotection studies have demonstrated limited or insufficient clinical effects in neurodegenerative diseases [9], highlighting the pressing need for new drugs designed to safeguard RGCs directly. This process begins with experimental ophthalmological studies and progresses to clinical models, which could pave the way for personalized medicine and significantly improve the treatment outcomes for glaucoma.

This dissertation aimed to investigate the direct effects of drugs with neuroprotective properties on retinal cells and establish a foundation for future clinical studies. It seeks to advance the development of effective neuroprotective treatments that alter the course of the disease, directly preserve neuronal cells, and contribute to personalized glaucoma therapies tailored to individual patients.

Aim of the study

To assess the effects of neuroprotective drugs on retinal cells using a preclinical mouse optic nerve crush (ONC) model.

Objectives of the study

1. To perform a control model of ONC in genetically diverse mouse strains and adapt it for experimental neuroprotection studies by analyzing the correlation between RGC survival and retinal astrocyte viability in the ONC model.

2. This study aimed to investigate the neuroprotective effects of brimonidine on RGCs and retinal astrocytes in a mouse ONC model and compare the effectiveness of local and systemic drug administration.
3. To evaluate the neuroprotective effects of memantine and levetiracetam on RGCs and retinal astrocytes, we examined the dose-dependent effects of these drugs on retinal cell survival following ONC in a mouse model.
4. To evaluate and compare the associations of treatment with brimonidine, memantine, and levetiracetam with neurodegenerative changes in the ONC model.

The scientific novelty of the study

This dissertation explores the effects of neuroprotective drugs on the survival of RGCs and astrocytes, examining the correlations between RGC viability and astroglial markers to evaluate the neuroprotective properties of the tested compounds. This study assessed the effects of local and systemic drug administration at varying doses on retinal cell survival. An experimental glaucoma model revealed that systemic treatment with 2 mg/kg brimonidine, 10 mg/kg memantine, and 40 or 80 mg/kg levetiracetam significantly mitigated neurodegenerative changes and preserved RGCs. The structural changes in the retina were evaluated with optical coherence tomography (OCT). These results provide a foundation for future research that would allow the development of personalized neuroprotective therapies for glaucoma patients.

1. MATERIALS AND METHODS OF THE STUDY

1.1. Experimental study design

The experimental study was conducted in two stages.

Stage I: Neuroprotective studies of brimonidine, evaluating its local and systemic neuroprotective effects on RGCs and retinal astrocytes in a mouse ONC model. The analysis included examining the impact of drugs on different segments of the retina.

Stage II: Neuroprotective studies of memantine and levetiracetam were conducted to assess the effects of various systemic treatment doses on RGCs and retinal astrocytes in a mouse ONC model. This study also analyzed structural changes in the mouse retina following ONC.

1.1.1. Stage I study design: brimonidine neuroprotection studies using ONC Balb/c mouse model

Forty-one BALB/c mice were used in this study. An ONC was performed on the right eye of all mice, while the left eye served as a control. Animals were randomly divided into three experimental groups:

1. **Saline group** (right eye – ONC/NaCl D + IP; left eye – control/NaCl D + IP). Fifteen mice ($n = 15$) received saline eye drops twice daily for seven days. The first saline drop (one drop, 0.05 mL, 0.9 % NaCl) was administered on day 0 prior to ONC. Additionally, two intraperitoneal (IP) injections of saline (0.1 mL, 0.9 % NaCl) were administered, one on day 0 before ONC and another on day 1 after ONC. During the remaining days, only saline eye drops were administered.
2. **Brimonidine eye drop group** (right eye – ONC/BMD D; left eye – control/BMD D). Fourteen mice ($n = 14$) were treated with local brimonidine tartrate eye drops (one drop, 0.05 mL, and 2 mg/mL) twice daily for seven days. The first drop was administered on day 0 prior to ONC.
3. **Brimonidine eye drops and IP injections** (right eye – ONC/BMD D + IP; left eye – control/BMD D + IP). Twelve mice ($n = 12$) were treated with local brimonidine tartrate eye drops (one drop, 0.05 mL, and 2 mg/mL) twice daily for seven days. The first drop was administered on day 0 prior to ONC. Additionally, two IP injections of brimonidine (2 mg/kg per day, 2 mg/mL brimonidine tartrate) were administered – one on day 0 before ONC and another on day 1 after ONC. On the remaining days, only the eye drop treatment was continued.

The effects of intravitreal memantine injections in mice were also evaluated. In this study, a single intravitreal injection of memantine (1 mg/mL, 2 μ L) was administered immediately after ONC. Due to observed inflammatory reactions that did not meet the standards for retinal wholemounts and the potential for data misrepresentation, the data from this group were excluded from further analysis.

The animals were euthanized on day seven after ONC, and retinas from both eyes were collected for further analysis. The experimental study design is illustrated in the figure below. (Fig. 1.1.1.1).

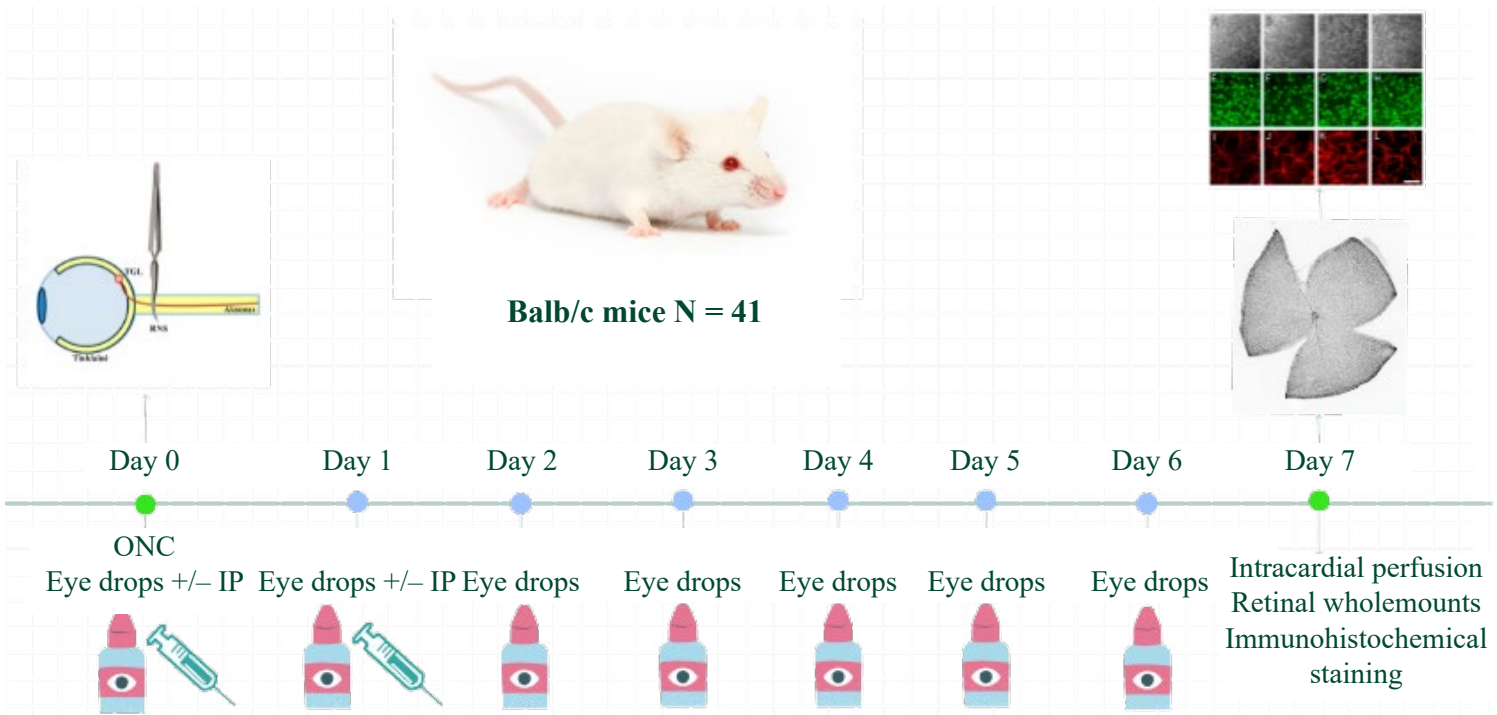


Fig. 1.1.1.1. Schematic study design of Stage I of the experimental investigation.

IP – intraperitoneal; ONC – optic nerve crush.

1.1.2. Stage II study design: memantine and levetiracetam neuroprotection studies using ONC C57Bl/6J mouse model

In the Stage II study, thirty-seven C57Bl/6J mice were used. An ONC was performed on the right eye of each mouse, while the left eye served as the control. Animals were randomly divided into five experimental groups.

1. **Saline group** (*right eye – ONC/NaCl group; left eye – control/NaCl*)
Sixteen mice ($n = 16$) received daily intraperitoneal (IP) injections of saline solution (0.9 % NaCl, 0.01 mL) for seven days.
2. **Low-dose memantine** (*right eye – ONC/MEM LD; left eye – control/MEM LD*). Six mice ($n = 6$) received daily intraperitoneal (IP) injections of memantine (5 mg/kg) for seven days.
3. **High-dose memantine** (*right eye – ONC/MEM HD; left eye – control/MEM HD*). Five mice ($n = 5$) received daily intraperitoneal (IP) injections of memantine (10 mg/kg) for seven days.
4. **Low-dose levetiracetam** (*right eye – ONC/LEV LD; left eye – control/LEV LD*). Five mice ($n = 5$) received daily IP injections of levetiracetam (40 mg/kg) for seven days.
5. **High-dose levetiracetam** (*right eye – ONC/LEV HD; left eye – control/LEV HD*). Five mice ($n = 5$) received daily IP injections of levetiracetam (80 mg/kg) for seven days.

All animals were euthanized on the seventh day after ONC, retinas from both eyes were collected for further analysis. The experimental study design is shown in a schematic diagram (Fig. 1.1.2.1).

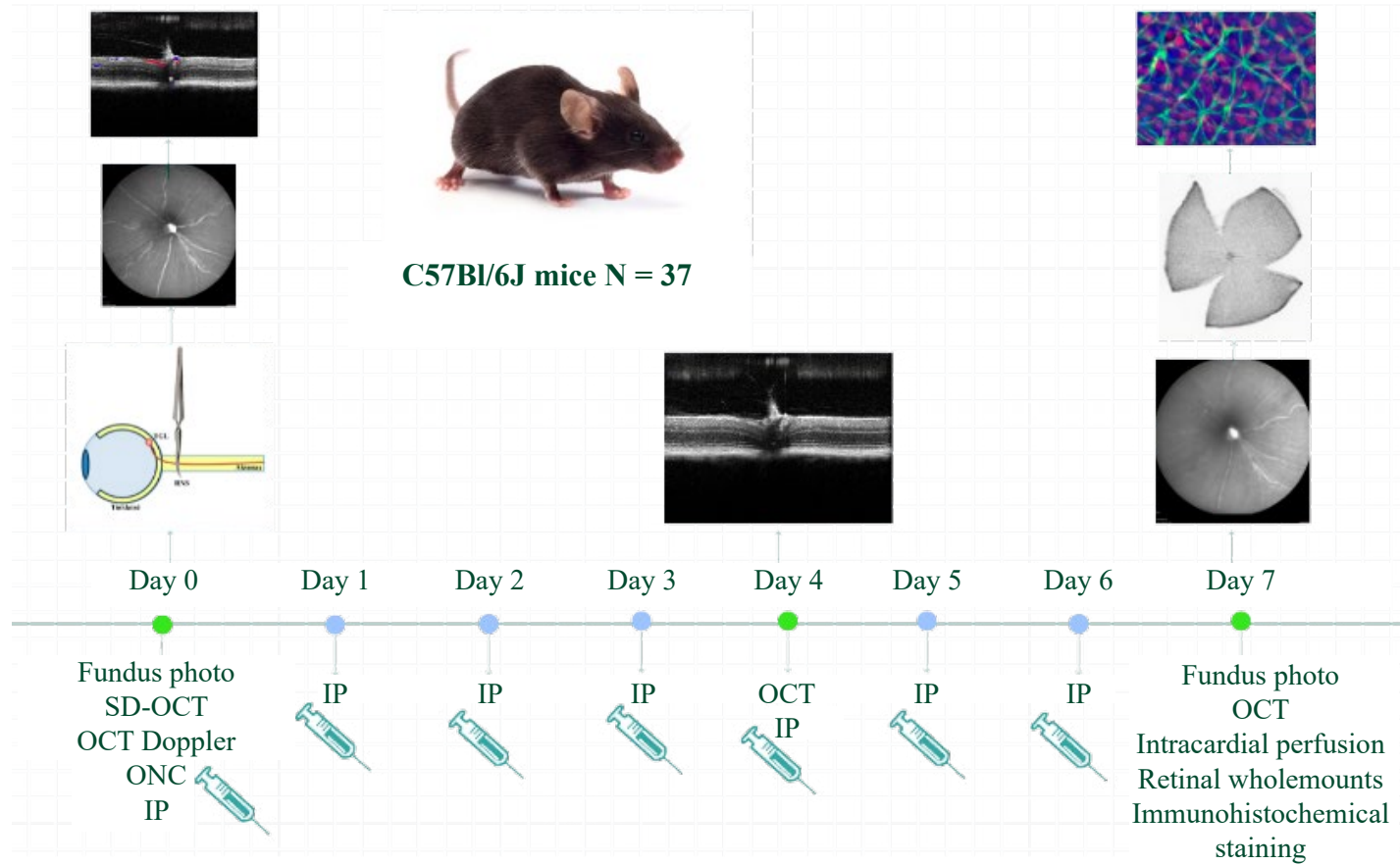


Fig. 1.1.2.1. Schematic study design of stage II of the experimental investigation.

ONC – optic nerve crush; IP – intraperitoneal; SD-OCT – spectral domain optical coherence tomography.

A summary of the methodologies for stage I and stage II of the experiments is presented in Table 1.1.2.1.

Table 1.1.2.1. Summary of the methodologies for Stage I and Stage II of the experimental study

Methods	Stage I			Stage II		
	Day 0	Day 4	Day 7	Day 0	Day 4	Day 7
Optic nerve crush	+	-	-	+	-	-
Fundus photo	-	-	-	+	-	+
SD-OCT + OCT Doppler	-	-	-	+	+	+
Intracardial perfusion	-	-	+	-	-	+
Retinal wholemounts	-	-	+	-	-	+
Immunohistochemical staining	NeuN	+		+		
	GFAP	+		+		
	DAPI	+		-		
Retinal cell counts in total retina	+			+		
Retinal cell counting different retinal eccentricities (center, middle, periphery)	+			-		

SD-OCT – spectral domain optical coherence tomography; GFAP – glial fibrillary acidic protein; NeuN – neuronal nuclei protein; DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole; ONC – optic nerve crush.

1.2. Characteristics of the experimental animals

The study was conducted at the Department of Ophthalmology, Animal Research Center of the Veterinary Academy and the Institute of Anatomy of the Lithuanian University of Health Sciences. Stage II of the dissertation research was carried out at the Animal Research Center of Tampere University, Finland.

Doctoral candidate Rūta Mačiulaitienė completed an intensive training course on “Requirements for the Housing, Care, and Use of Animals for Scientific and Educational Purposes,” obtaining certification. She was responsible for conducting all phases of this dissertation research.

All procedures and animal care were conducted in accordance with the European Convention for the Protection of Animals and the statement by the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) regarding the use of animals in ophthalmological and vision research. All experiments were approved by the State Food and Veterinary Service of Lithuania, and a permit was issued (No. G2-23). In this study, 41 healthy 3-month-old male

Balb/c mice (average weight $25 \text{ g} \pm 3.8 \text{ g}$) and 37 healthy 3-month-old male C57Bl/6J mice (average weight $22 \text{ g} \pm 4 \text{ g}$) were used, with approvals from the Finnish Animal Experiment Board and protocol monitoring (Experimentica Ltd animal license number ESAVI/219/04.10.07/2014). The animals were housed at the Animal Research Centers of Lithuanian University of Health Sciences and Tampere University under standard lighting conditions, with food and water available *ad libitum*.

All experimental procedures were performed under deep intraperitoneal anesthesia using 1 mg/kg medetomidine (Domitor 1 mg/mL ; Orion Corporation Pharma, Finland) and 75 mg/kg ketamine (Ketamidol 10% ; Richter Pharma AG, Austria). Euthanasia was performed under deep anesthesia, followed by intracardiac perfusion with aldehyde-based fixatives.

1.3. Research methods

1.3.1. Optic nerve crush in the mouse model

After deep anaesthesia was achieved, an incision was made in the superolateral conjunctival region of the eyeball. Using forceps, the eyeball was gently retracted outward to access the space between the extraocular muscles, while ensuring that the surrounding blood vessels remained intact. Following the methodology described by Kalesnykas et al., the optic nerve was clearly visualized, and a self-closing Dumont forceps (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) was applied to compress and damage the optic nerve approximately 2 mm behind the eyeball for 3 s [208] (Fig. 1.3.1.1). Following ONC, RGC death occurs rapidly, with $25\text{--}50 \%$ cell loss observed after seven days, depending on the mouse strain [213]. This procedure is illustrated in Figure 1.3.1.1.

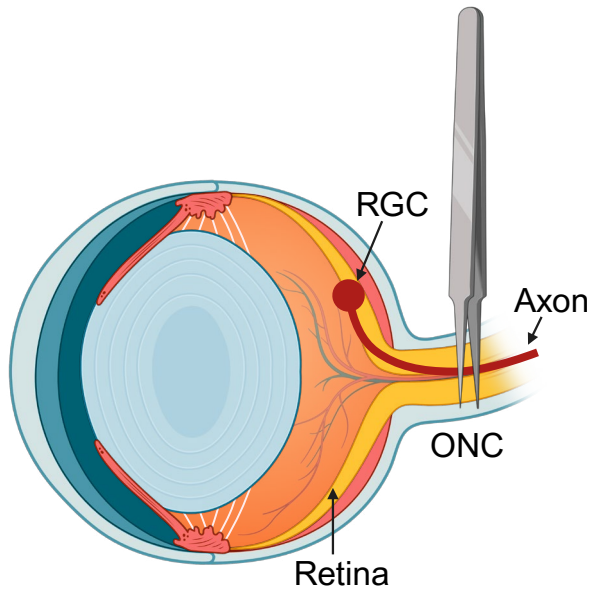


Fig. 1.3.1.1. *Optic nerve crush model: the optic nerve is compressed using a self-closing Dumont forceps 1-2 mm behind the eyeball. The pressure is maintained for 3 seconds.*

RGC – retinal ganglion cell; ONC – optic nerve crush.

1.3.2. Fundus photography

Fundus photographs were taken for the five experimental groups in Stage I on Day 0 (prior to ONC) and day 7. After deep anaesthesia, the mice were carefully positioned and secured to the Heidelberg Spectralis HRA2 system (Heidelberg Engineering GmbH, Germany). The imaging system focuses on the retina to obtain high-quality fundus photographs. During the procedure, artificial tears were applied to both eyes to prevent corneal drying.

1.3.3. Spectral domain-optical coherence tomography (SD-OCT) and color Doppler OCT

In the Stage II study, spectral-domain optical coherence tomography (SD-OCT) retinal scans were performed on the five experimental groups on days 0 (immediately after ONC), 4, and 7. Following the induction of deep anaesthesia, confirmed by the absence of pedal reflex, the animals were placed on a rodent holder with head immobilization. The lens of the SD-OCT system (Bioptigen/Leica Envisu R2200) was directed toward the eye to perform *in vivo* scans using X and Y controls.

The optic nerve head was centered during OCT B scans, and the retinal layers were visualized. Retinal perfusion was successfully confirmed using color Doppler OCT immediately after ONC on Day 0, and on days 4 and 7. This step was crucial to ensure that prolonged ischemia did not occur because of mechanical damage to the optic nerve (Fig. 1.3.3.1). Throughout the procedure, artificial tears were applied to both eyes to prevent corneal drying.

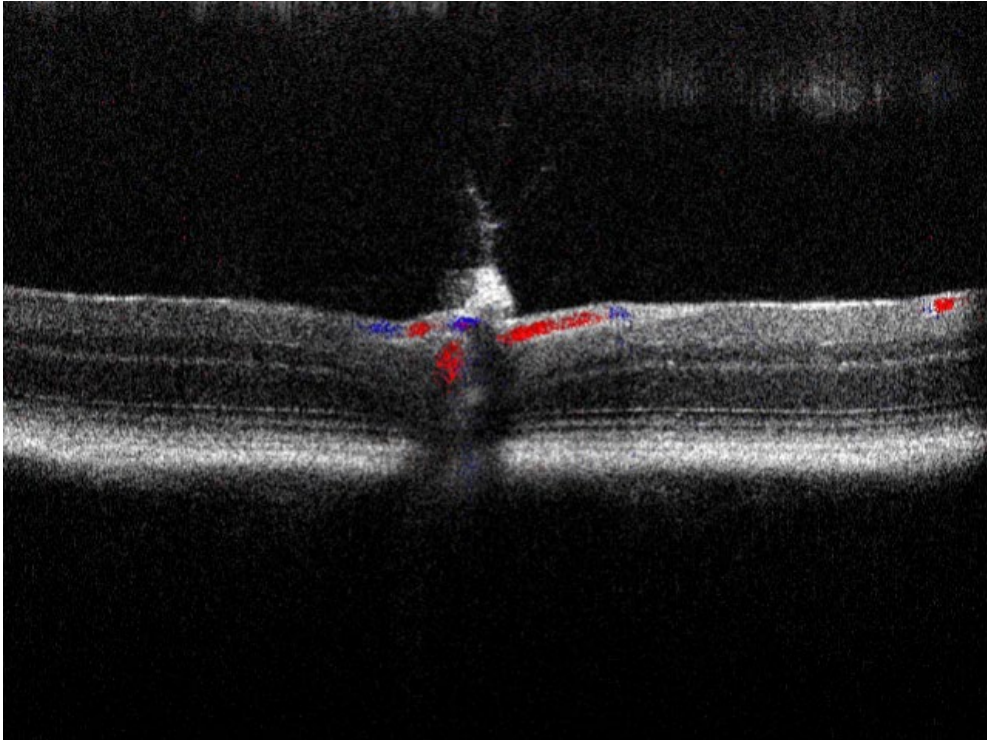


Fig. 1.3.3.1. Color Doppler OCT. Visualization of arterial and venous blood flow: confirmation of good retinal perfusion following ONC. Red color indicates arterial blood flow, while blue indicates venous blood flow.

OCT – optical coherence tomography; ONC – optic nerve crush.

1.3.4. Ganglion cells complex thickness measurements

The ganglion cell complex (GCC) comprises of the retinal nerve fiber, ganglion cell, and inner plexiform layers. This segment is located in the inner retina and appears hyperreflective on SD-OCT images, making it relatively easy to distinguish it from the more posterior inner nuclear layer. Manual inner retinal layer thickness measurements were performed using in vivo SD-OCT images at 24 specific retinal points (Fig. 1.3.4.1).

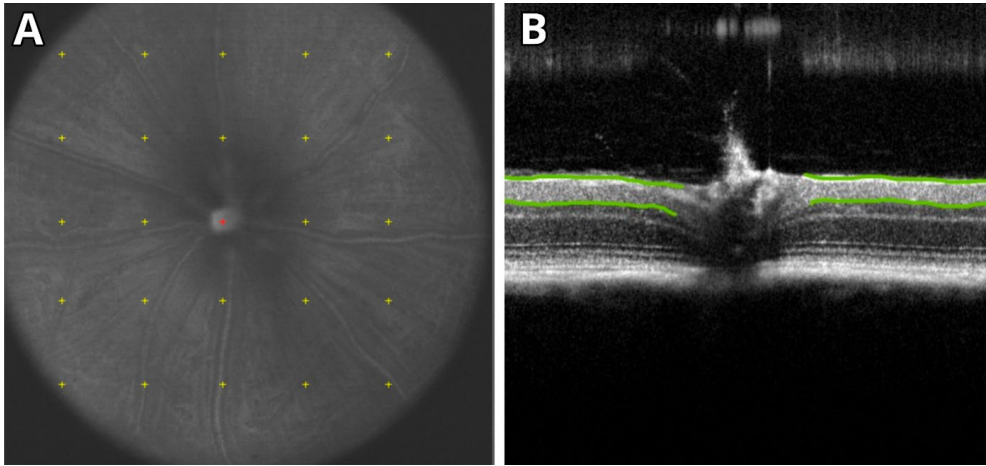


Fig. 1.3.4.1. *SD-OCT image of the mouse retina.*

Panel A shows the SD-OCT image with a 5 × 5 rectangular grid, measuring 1.4 mm × 1.4 mm × 1.638 mm. GCC thickness was manually measured at 24 retinal points on days 0, 4, and 7. The central location (marked in red in panel A) indicates the head of the optic nerve. Panel B shows the cross-section of the retinal layers in the SD-OCT scan. Green lines indicate hyperreflective inner retinal layers.

SD-OCT – spectral domain optical coherence tomography; GCC – ganglion cell complex.

1.3.5. Preparation of retinal samples and immunohistochemical staining

Mice were euthanized seven days after ONC using deep general intraperitoneal (IP) anaesthesia. Ocular tissues were fixed through intracardiac perfusion with aldehyde-based fixatives. Both eyes were enucleated and fixed in a 4 % paraformaldehyde (PFA) solution for three hours. Retinas were carefully detached from the sclera and fixed in 4 % PFA overnight.

After fixation, the retinas were washed twice in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) for five minutes. Tissues were incubated in 10 % normal goat serum (NGS; Colorado Serum Company, USA) with 0.5 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) for 30 min. Subsequently, retinas were incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies: NeuN (neuronal nuclei; 1:500) (MAB377, MilliporeSigma, Massachusetts, USA) and rabbit glial fibrillary acidic protein (GFAP; specific for astrocytes; 1:1000) (Dako, Z0334, Denmark).

Retinas were then washed three times for five minutes in a solution containing 1 % NGS and 0.1 % Triton X-100. Following the washes, the

tissues were incubated with secondary antibodies in the dark for three hours: AlexaFluor Mouse 488 (1:250) (Life Technologies, A11001, California, USA) and AlexaFluor Rabbit 594 (1:250) (Life Technologies, A11037, California, USA). After incubation, the retinas were washed three more times with 1 % NGS and 0.1 % Triton X-100 solution for five minutes each.

The retinas were then incubated in 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 1:10000) (Sigma-Aldrich, D9542-5NG, Missouri, USA) for 30 min, followed by three washes in PBS for five minutes each. Finally, the retinas were mounted on glass slides using Fluoroshield (Sigma-Aldrich, F6937, Missouri, USA) and covered with coverslips.

1.3.6. Retinal cells analysis

Immunohistochemically stained retinal whole mounts were analyzed using a fluorescence microscope (Zeiss Axio Imager Z1; Carl Zeiss AG, Jena, Germany) at 40x magnification. All retinal samples were coded during analysis to ensure objectivity. A single researcher assigned the codes while the primary author performed cell counting. For each retina, images of 0.04 mm² were randomly selected for analysis.

In the first part of the experiment, NeuN, GFAP, and DAPI-positive cells were counted in different retinal regions: the center, middle third, and periphery (Fig. 1.3.6.1). Five images were randomly selected from each retinal segment and cell counts were normalized per mm². The manual counting of NeuN, GFAP, and DAPI-positive cells was performed using ImageJ software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) (Table 1.1.2.1).

In the second part of the study, NeuN and GFAP-positive cells were similarly counted manually, with the results aggregated and expressed as cells/mm² (Table 1.1.2.1).

Astrocyte morphology was identified based on the criteria for GFAP-positive cells, with cell bodies located in the retinal nerve fiber or ganglion cell layer. Cell counting included all the cells within the image boundaries to ensure reliability, specifically those along the left and bottom edges. Cells crossing the right and upper edges were excluded from the analysis.

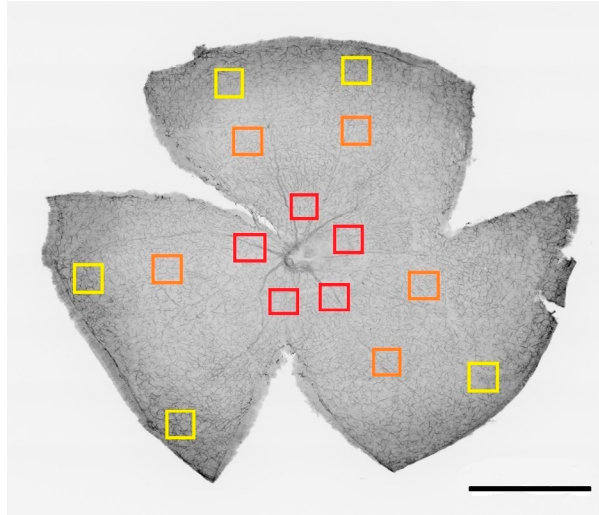


Fig. 1.3.6.1. Methodology for counting retinal cells in different segments (Stage I). NeuN, GFAP, and DAPI positive cells were counted in 15 randomly selected segments (0.04 mm^2) of the retina: central ($n = 5$, red squares), middle ($n = 5$, orange squares), and peripheral ($n = 5$, yellow squares) regions. Scale: $1000 \mu\text{m}$.

NeuN – neuronal nuclei; GFAP – glial fibrillary acidic protein;
DAPI – 4',6-Diamidino-2-phenylindole.

1.4. Statistical analysis

Quantitative data were analyzed using GraphPad Prism, version 10.4.0 (GraphPad Software Inc., USA), and are presented as the mean \pm standard deviation (SD). The normality of the quantitative variable distributions was assessed using the Shapiro-Wilk test. For variables that did not meet the normality assumption, differences between groups were analyzed using nonparametric tests: the Mann-Whitney U test for two independent groups or the Kruskal-Wallis test for multiple independent groups. For variables with distributions meeting the normality assumption (Gaussian distribution), the Student's t-test was used to compare the means of two independent groups, and one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test was applied for various independent groups. Relationships between quantitative variables with a normal distribution were assessed using Pearson's correlation coefficient, whereas Spearman's correlation coefficient was used for variables that did not meet the normality assumption. Binary logistic regression analysis

was applied to predict the binary-dependent qualitative variable. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

For ONC analysis, group means were calculated by aggregating mean cell counts. Cell count differences were calculated for each mouse to evaluate dynamic changes by comparing the right eye (post-ONC) with the healthy left eye (no ONC). These individual changes (Δ) were then aggregated within groups for comparative analysis.

2. RESULTS

2.1. Results of the Stage I study of the experimental study

2.1.1. Systemic side effects of brimonidine

Five out of 12 Balb/c mice exhibited sedative side effects following IP brimonidine injection, likely attributable to the drug's hypotensive effects; however, regular activity was restored within 60 min.

2.1.2. Effect of brimonidine on retinal cells in the total retina

2.1.2.1. Analysis of non-neuronal retinal cells

RGC damage was induced in one eye of all experimental groups, as demonstrated by a significant reduction in the number of DAPI-stained retinal cells in the ONC/NaCl D+IP (6463 ± 1117), ONC/BMD D (6437 ± 915.3), and ONC/BMD D+IP (6691 ± 901.5) groups compared to control eyes without ONC (7413 ± 1208) ($p < 0.0001$). No statistically significant differences were observed in the number of DAPI-stained cells between the experimental groups after ONC (Fig. 2.1.2.1.1, Table 2.1.2.1.1).

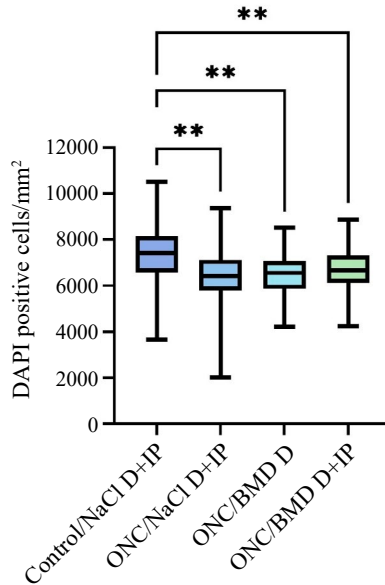


Fig. 2.1.2.1.1. Average number of DAPI-positive cells across the entire retina following ONC.

ONC – optic nerve crush; p-value determined using the non-parametric Kruskal-Wallis test; ** $p < 0.0001$.

Table 2.1.2.1.1. The average number of DAPI-positive cells across the entire retinal area and in different regions (cells/mm² ± SD) in the retinas of Balb/c mice

	Total retina	Center	Middle	Periphery
Control/NaCl D+IP	7413 ± 1208**	7930 ± 113**	7451 ± 1188*	6857 ± 1070*
ONC/NaCl D+IP	6463 ± 1117	6858 ± 1249	6559 ± 903	5954 ± 970.8
ONC/BMD D	6437 ± 915.3	6813 ± 807.3	6489 ± 863	6022 ± 905.4
ONC/BMD D+IP	6691 ± 901.5	7004 ± 711	6649 ± 929.6	6390 ± 966.6

The p -value was determined using the non-parametric Kruskal-Wallis test. * $p < 0.001$; ** $p < 0.0001$.

Control/NaCl D+IP vs. ONC/NaCl D+IP (total retina, center **, middle, periphery *);

Control/NaCl D+IP vs. ONC/BMD D (total retina, center **, middle, periphery *);

Control/NaCl D+IP vs. ONC/BMD D+IP (total retina, center **, middle, periphery *).

2.1.2.2. Analysis of NeuN positive cell count average

The number of NeuN-positive cells in the retina was significantly reduced in all experimental groups following ONC compared to that in healthy control eyes without ONC (4450 ± 1140) ($p < 0.0001$). However,

additional IP brimonidine injections significantly enhanced RGC survival (3625 ± 817.9) compared to the ONC/BMD D group (2854 ± 1058) and the ONC/NaCl D+IP group (2912 ± 1083) ($p < 0.0001$) (Fig. 2.1.2.2.1 and 2.1.2.2.2, Table 2.1.2.2.1).

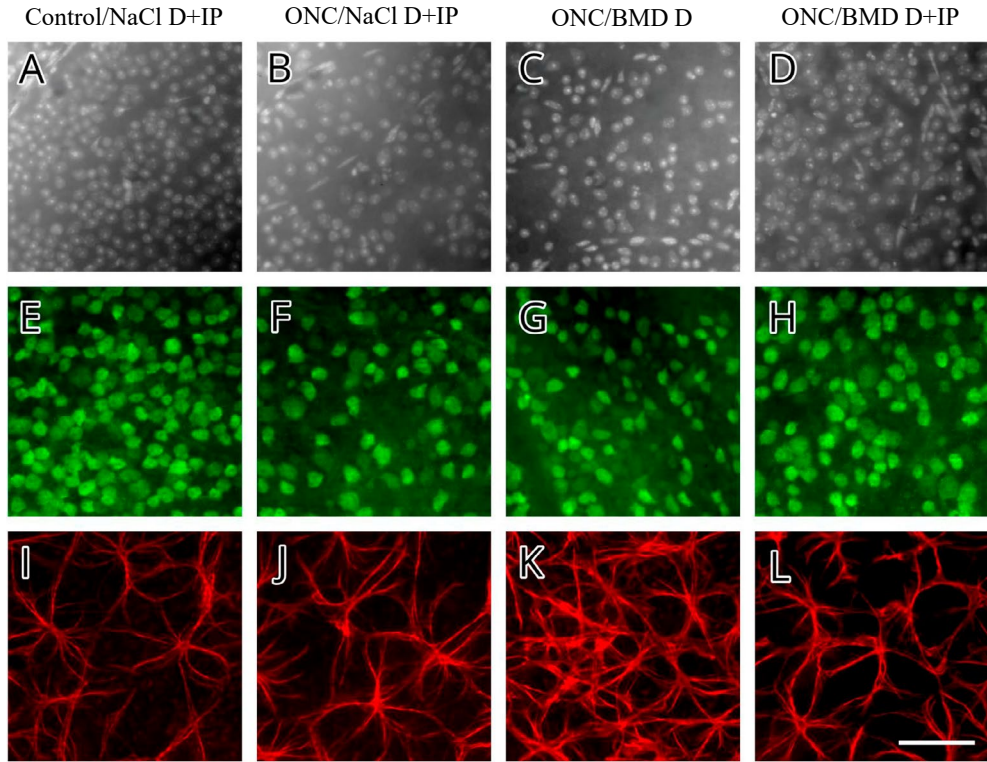


Fig. 2.1.2.2.1. Microphotographs showing immunofluorescent staining of the mouse retina in experimental ONC groups. The images depict retinal cell density in the experimental ONC and control groups. A, B, C, D: DAPI, a nuclear marker for non-neuronal cells, representing all cells in the retinal ganglion cell layer; E, F, G, H: NeuN-stained retinal ganglion cells and amacrine cells (green) using a primary antibody against NeuN; I, J, K, L: retinal astrocytes (red), labelled with antibodies against GFAP.

ONC – optic nerve crush; DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole; NeuN – neuron-specific nuclear protein; GFAP – glial fibrillary acidic protein; primary antibody; scale bar: 50 μm .

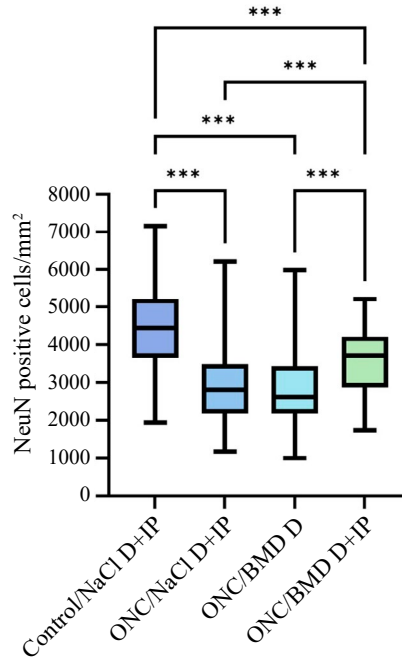


Fig. 2.1.2.2.2. Number of NeuN-positive cells in the retina following ONC in control and experimental groups.

NeuN – neuron-specific nuclear protein, primary antibody; p-value determined using the non-parametric Kruskal-Wallis test; *** $p < 0.0001$.

Table 2.1.2.2.1. The average number of NeuN-positive cells in the total retina and different retinal regions (cells/mm² ± SD)

Group	Total retina	Center	Middle	Periphery
Control/NaCl D+IP	4450 ± 1140***	4937 ± 1008***	4539 ± 1129**	3911 ± 1049***
ONC/NaCl D+IP	2912 ± 1083	3348 ± 1117	2970 ± 1139	2384 ± 721.4
ONC/BMD D	2854 ± 1058	2811 ± 1154	3057 ± 1055	2675 ± 968
ONC/BMD D+IP	3625 ± 817.9***	3505 ± 753.4*	3710 ± 934.5*	3630 ± 737.8**

The p -value was determined using the non-parametric Kruskal-Wallis test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$.

Control/NaCl D+IP vs. ONC/NaCl D+IP (total retina, center ***, middle, periphery **);

Control/NaCl D+IP vs. ONC/BMD D (total retina, center, periphery ***, middle **);

Control/NaCl D+IP vs. ONC/BMD D+IP (total retina, center ***, middle**);

ONC/BMD D+IP vs. ONC/NaCl D+IP (total retina ***, middle *, periphery **);

ONC/BMD D+IP vs. ONC/BMD D (total retina ***, center *, periphery **).

2.1.2.3. Analysis of GFAP positive cell count average

Increased GFAP immunoreactivity was observed in the ONC/BMD D group (302 ± 79) compared to the control group without ONC (278.7 ± 71.13 , $p < 0.01$) and the ONC/NaCl D+IP group (280.7 ± 77.15 , $p < 0.05$). Astroglial activation was significantly elevated exclusively in the ONC/BMD D group (Fig. 2.1.2.3.1, Table 2.1.2.3.1).

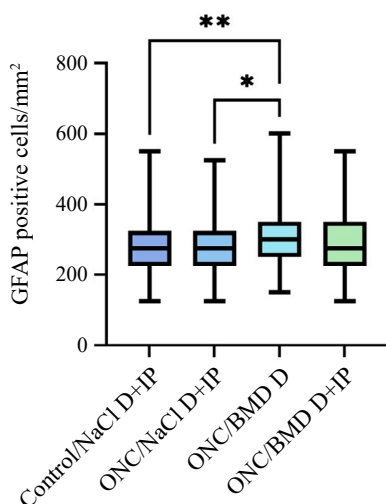


Fig. 2.1.2.3.1. GFAP-positive cell counts in total retina after ONC in control and experimental groups.

p-value determined using the non-parametric Kruskal-Wallis test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Table 2.1.2.3.1. GFAP-positive cells in the total retina and in different retinal regions (cells/mm² ± SD)

	Total retina	Center	Middle	Periphery
Control/NaCl D+IP	278.7 ± 71.13**	310.3 ± 85.54	263 ± 55.9	262.7 ± 58.26
ONC/NaCl D+IP	280.7 ± 77.15*	329.7 ± 77.21	269.3 ± 68.89	238.1 ± 51.17
ONC/BMD D	302 ± 79	360.5 ± 68.37	293.2 ± 65.99	254.7 ± 63.63
ONC/BMD D+IP	292.6 ± 85.37	338.4 ± 81.95	290.4 ± 73.95	249.1 ± 77.09

p-value determined using the non-parametric Kruskal-Wallis test; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Control/NaCl D+IP vs. ONC/BMD D (total retina **);

ONC/NaCl D+IP vs. ONC/BMD D (total retina *).

2.1.2.4. Evaluation of local and systemic brimonidine effect on retinal cells in control eyes without ONC

To assess the effect of local and systemic brimonidine on retinal cells in control eyes without ONC, we compared the average number of retinal cells across different treatment groups. We found that the average number of DAPI, NeuN, and GFAP-positive cells did not differ statistically significantly between the groups (Table 1.1.2.4.1).

Table 1.1.2.4.1. Retinal cells average of total retina in control eye without ONC in different treatment groups

	control/NaCl L+IP	control/BMD L	control/BMD L+IP
DAPI	7413 ± 1208	7741 ± 1229	7890 ± 1297
NeuN	4450 ± 1140	4881 ± 1137	4999 ± 1106
GFAP	278.7 ± 71.13	286 ± 66.38	282.1 ± 72.73

The analysis was performed using the non-parametric *Kruskal-Wallis* test.

2.1.3. Effect of brimonidine on retinal cells in different regions of the retina

2.1.3.1. Analysis of cell counts in the central retina

The survival of DAPI and NeuN-positive cells in the central retina was consistent with the overall average cell density across the retina. The number of DAPI and NeuN-positive cells was significantly lower in the ONC/NaCl D+IP group (6858 ± 1249 and 3348 ± 1117, respectively), ONC/BMD D group (6813 ± 807.3 and 2811 ± 1154, respectively), and ONC/BMD D+IP group (7004 ± 711.6 and 3505 ± 753.4, respectively) compared to the control group (7930 ± 1133 and 4937 ± 1008, respectively) ($p < 0.0001$).

Additional intraperitoneal brimonidine injections significantly enhanced RGC survival in the central retina compared to the ONC/BMD D group ($p < 0.05$) (Tables 2.1.2.1.1 and 2.1.2.2.1). However, there were no significant differences in the number of DAPI and GFAP-positive cells in the central retina among the experimental ONC groups (Table 2.1.2.3.1).

2.1.3.2. Analysis of cell counts in the middle part of the retina

The number of surviving cells after ONC and their counts in the middle region of the retina were consistent with the overall and central retinal cell counts. In the control group without ONC, the middle retinal region contained significantly more DAPI and NeuN-positive cells (7451 ± 1188 and 4539

± 1129 , respectively) than the ONC/BMD D group (6489 ± 863 and 3057 ± 1055 , respectively) and ONC/BMD D+IP group (6649 ± 929.6 and 3710 ± 934.5 , respectively) ($p < 0.001$). Intraperitoneal brimonidine injections significantly enhanced RGC survival in the middle retina compared to that in the ONC/NaCl D+IP group ($p < 0.05$). Additionally, a trend toward improved RGC survival was observed in the ONC/BMD D+IP group compared to the ONC/BMD D group ($p = 0.07$) in this region (Tables 2.1.2.1.1 and 2.1.2.2.1).

No significant differences were detected in the number of DAPI and GFAP-positive cells in the mid-retinal region across all experimental groups (Table 2.1.2.3.1).

2.1.3.3. Analysis of cell counts in the peripheral retina

The addition of two IP brimonidine injections to brimonidine eye drops positively affected the survival of DAPI-positive cells in the peripheral retina, but not in the central and mid-retinal regions. This was evidenced by the statistically insignificant decrease in the number of DAPI-positive cells in the ONC/BMD D+IP group (6390 ± 966.6) compared to the control group without ONC (6857 ± 1070). In contrast, there was a significantly decreased number of DAPI-positive cells in the peripheral retina in the ONC/NaCl D+IP (5954 ± 970.8) and ONC/BMD D (6022 ± 905.4) groups than in the control group without ONC ($p < 0.0001$). No statistically significant differences in the number of DAPI-positive cells were observed among the experimental ONC groups in the peripheral retina (Table 2.1.2.1.1).

Moreover, RGC survival in the peripheral retina was only slightly reduced in the ONC/BMD D+IP group (3630 ± 737.8) compared to that in the control group without ONC (3911 ± 1049), but this difference was not statistically significant. In contrast, the number of NeuN-positive cells in the peripheral retina was significantly lower in the ONC/NaCl D+IP (2384 ± 721.4) and ONC/BMD D (2675 ± 968) groups than in the control group ($p < 0.0001$). Notably, the ONC/BMD D+IP group demonstrated a positive effect on the number of NeuN-positive cells in the peripheral retina, with significantly higher counts than those in the ONC/NaCl D+IP and ONC/BMD D groups ($p < 0.001$) (Fig. 2.1.3.3.1, Table 2.1.2.2.1).

As indicated by comparable GFAP staining (Table 2.1.2.3.1), no statistically significant differences were observed among the experimental ONC groups in the number of astrocytes in the peripheral retina.

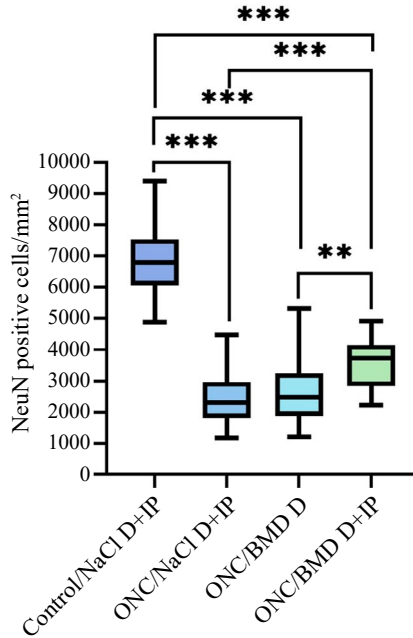


Fig. 2.1.3.3.1. NeuN-positive cells in the peripheral region of the mouse retina after ONC.

The p -value is based on the nonparametric *Kruskal-Wallis* test;

** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$.

2.1.4. Variability of brimonidine-induced neuroprotection of retinal cells in different retinal eccentricities

Dynamic analysis of cell counts in the group treated solely with brimonidine eye drops revealed a significant difference in the number of DAPI-positive cells between the central and peripheral retinal regions ($p < 0.05$). Additionally, in the ONC/BMD D+IP group, a highly significant difference in DAPI-positive cell density was observed between the middle and peripheral regions ($p < 0.001$).

Higher RGC survival was observed in the peripheral regions compared to the central region in the saline-treated group ($p < 0.05$), reflecting the characteristic variability of RGC survival following ONC in the absence of neuroprotective pharmacological agents. In the ONC/BMD D group, significant differences in RGC density were noted between the central and middle regions ($p < 0.01$), and between the central and peripheral regions ($p < 0.0001$).

The neuroprotective effect of systemic brimonidine administration in combination with brimonidine eye drops further underscored its efficacy. This combination demonstrated improved RGC density maintenance in the periphery compared to the central region ($p < 0.01$) (Table 2.1.4.1).

Table 2.1.4.1. Average change in retinal cells in different retinal regions (Δ change in cell count \pm SD)

Antibody	Retinal segment	ONC/NaCl D+IP	ONC/BMD D	RNS D+IP
DAPI	Center	1391 \pm 730	1711 \pm 684.1	1399 \pm 652.3
	Middle	1165 \pm 391.1	1640 \pm 566	2034 \pm 849.3
	Periphery	1041 \pm 504.7	951.6 \pm 538.6*	804.2 \pm 452.1***
NeuN	Center	2272 \pm 550*	2900 \pm 760**,****	2106 \pm 962**
	Middle	2088 \pm 569.1	1953 \pm 609	1748 \pm 807.8
	Periphery	1471 \pm 587.1	1282 \pm 419	871.5 \pm 528.8
GFAP	Center	18.16 \pm 75.13	39.47 \pm 43.03	15.17 \pm 50.05
	Middle	6.13 \pm 26.84	11.43 \pm 36.76	12.08 \pm 29.11
	Periphery	-25.87 \pm 41.2	-0.67 \pm 31.67	0.42 \pm 54.15

The p-value is based on the nonparametric *Kruskal-Wallis* test; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

ONC/BMD L, ONC/BMD L+IP: NeuN center vs. periphery ***, ****;

ONC/BMD L: DAPI center vs. periphery *; DAPI middle vs. periphery ***; NeuN center vs. middle**;

ONC/NaCl L+IP: NeuN center vs. periphery *;

DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; NeuN, neuron-specific nuclear protein; GFAP, glial fibrillary acidic protein.

2.1.5. Correlational analysis of retinal cell count averages across the retina

We analyzed the relationship between the total number of DAPI-stained retinal cells, NeuN-positive cells, and GFAP expression, a marker of gliosis, across different treatment groups.

In the saline-treated group that underwent ONC, a significant correlation was observed between the total number of DAPI-stained retinal cells and the number of GFAP-positive cells ($r = 0.259$; $p < 0.001$), indicating a moderate positive relationship. Similarly, in the ONC/NaCl D+IP group, the correlation between RGCs and GFAP expression suggested a weak positive relationship between RGC survival and gliosis in the absence of neuroprotective treatment ($r = 0.214$; $p < 0.05$). A stronger positive correlation between DAPI-stained cells and GFAP expression was observed in the ONC/BMD D group ($r = 0.285$; $p < 0.0001$). Conversely, in the same group, the interaction between RGC survival and gliosis was negatively correlated with RGC and astrocyte numbers ($r = -0.194$; $p < 0.05$) when brimonidine was administered locally as eye drops (Fig. 2.1.5.1).

In the ONC/BMD D+IP group, a direct correlation was noted between DAPI and NeuN-positive cell counts ($r = 0.315$; $p < 0.01$), highlighting the dependence between the density of non-neuronal cells and the distribution of retinal ganglion cells. DAPI-positive cells showed a weak correlation with GFAP-immunoreactive cells in this group ($r = 0.222$; $p < 0.05$) (Fig. 2.1.5.1).

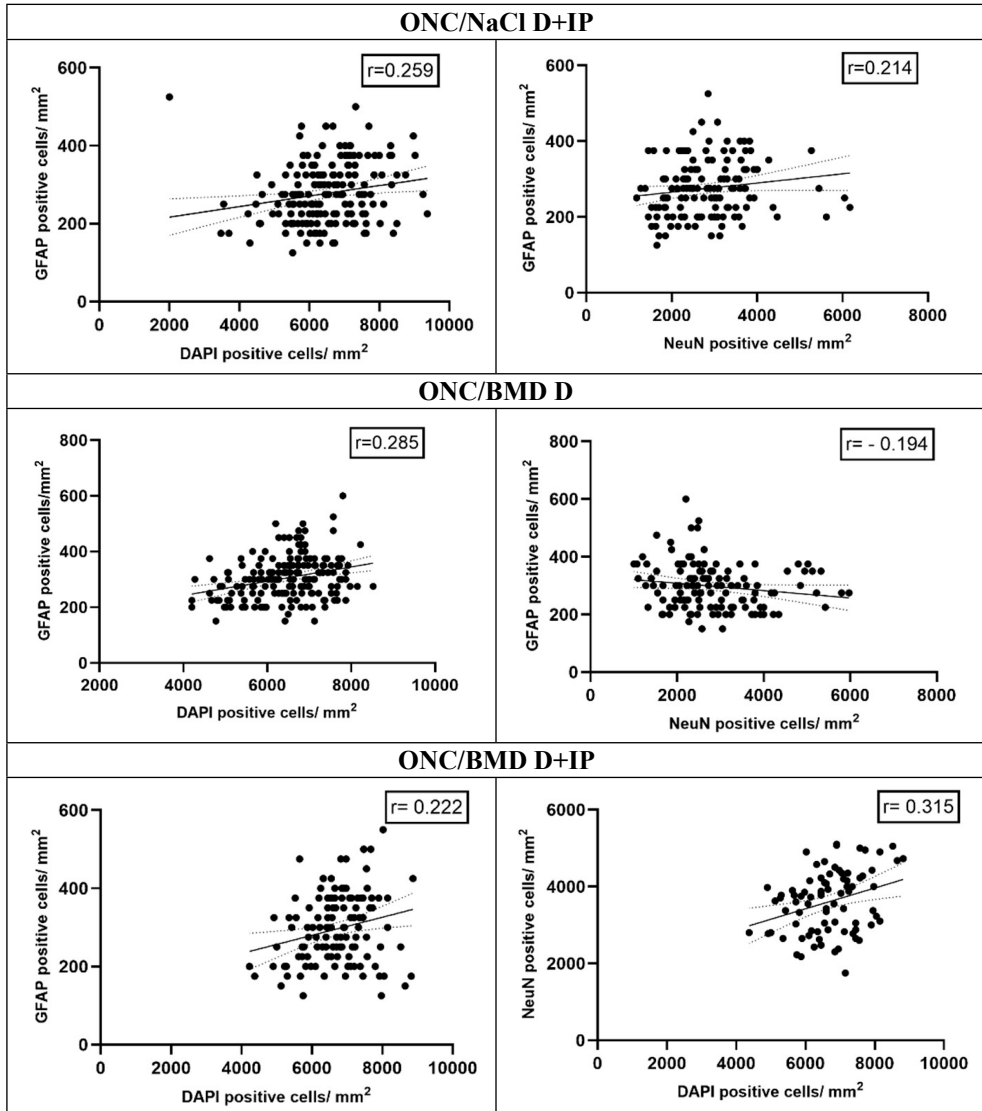


Fig. 2.1.5.1. Correlation of the averages of DAPI, NeuN, and GFAP positive cells across the retina in different experimental groups.

r – Spearman’s correlation coefficient, $p < 0.05$. DAPI – 4’,6-diamidino-2-phenylindole; NeuN – neuron-specific nuclear protein, primary antibody; GFAP – glial fibrillary acidic protein, primary antibody.

2.1.6. Correlation of retinal cell counts in different retinal segments

In the central retina, a significant positive correlation was observed between the number of DAPI-positive retinal cells and RGCs in the saline-treated group after ONC ($r = 0.336$; $p < 0.05$). This indicated a moderately positive relationship between the density of non-neuronal cells and the RGC population in the ONC/NaCl D+IP group. In the ONC/BMD D+IP group, a positive correlation between the number of DAPI-positive cells and RGCs was observed ($r = 0.394$; $p = 0.057$), suggesting a similar trend in the survival of non-neuronal and neuronal cells following ONC (Fig. 2.1.6.1).

In the mid-retina, Spearman's analysis revealed a significant positive correlation between the number of DAPI-stained cells and RGCs in the ONC/NaCl D + IP group ($r = 0.354$; $p < 0.05$), indicating a moderately positive relationship. In the ONC/BMD D+IP group, a near-significant positive correlation was found between DAPI-stained cells and RGCs ($r = 0.348$; $p = 0.055$), as well as between DAPI-stained cells and GFAP expression ($r = 0.297$; $p = 0.059$). Conversely, in the ONC/BMD D group, a significant negative correlation was observed between the RGC count and GFAP expression ($r = -0.293$; $p < 0.05$), suggesting an inverse relationship between RGC survival and astrocytic gliosis (Fig. 2.1.6.1).

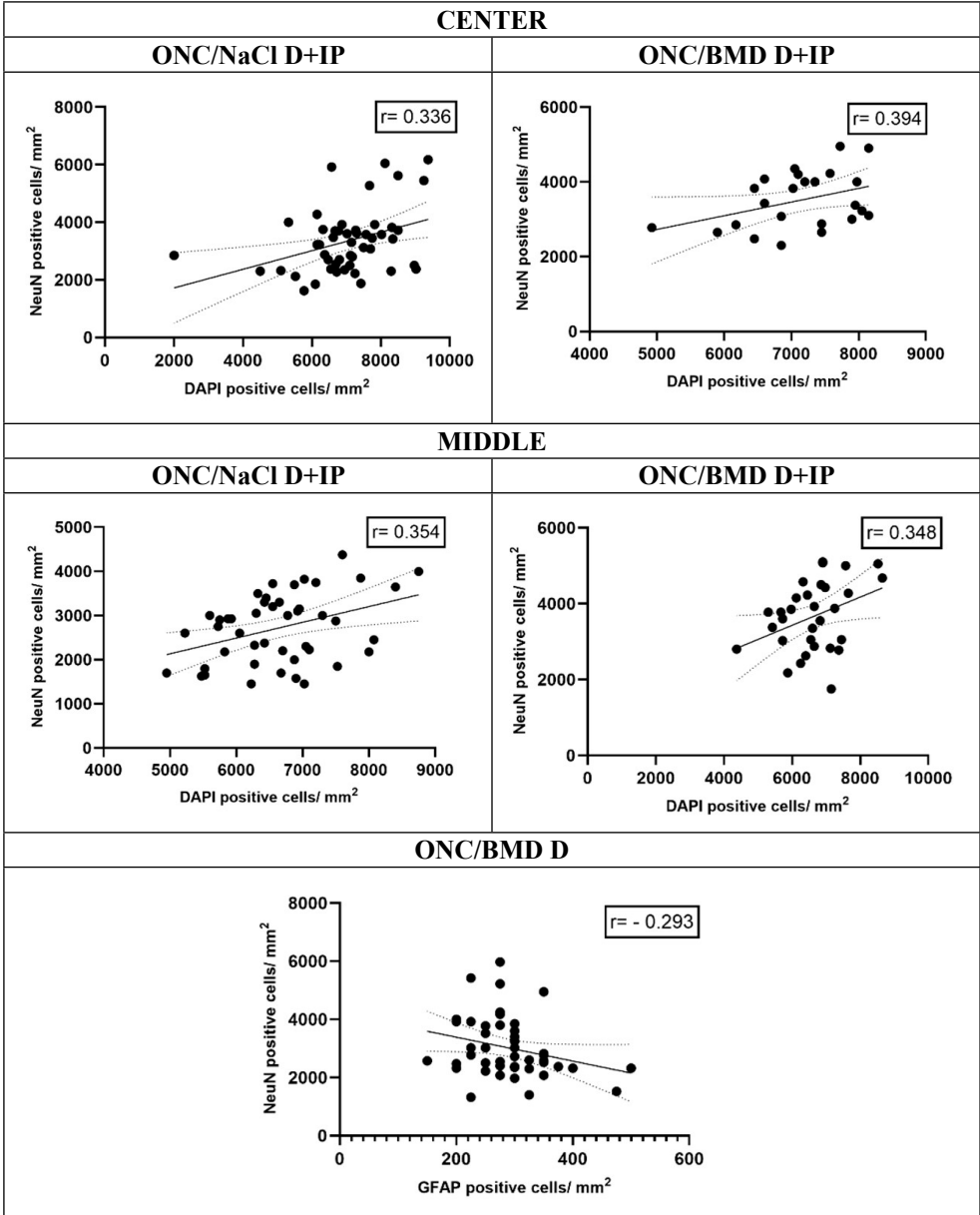


Fig. 2.2.6.1. Correlation of the averages of DAPI, NeuN, and GFAP positive cells in different retinal segments across experimental groups.

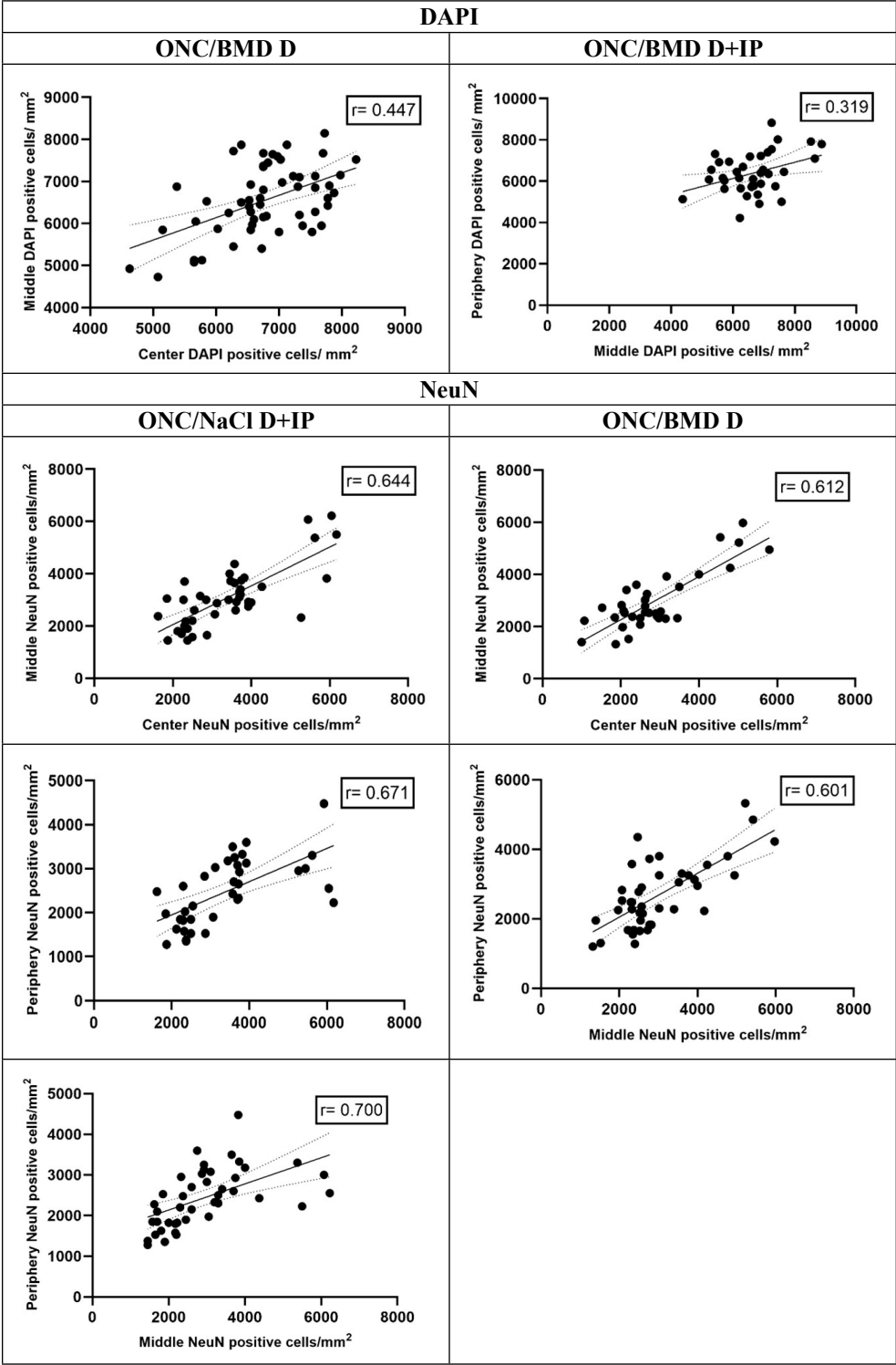
r – Spearman’s correlation coefficient, *p* < 0.05. DAPI – 4’,6-diamidino-2-phenylindole; NeuN – neuron-specific nuclear protein, primary antibody; GFAP – glial fibrillary acidic protein, primary antibody.

2.1.7. Inter-regional correlations of retinal cell count

A significant correlation was observed between the density of DAPI-stained cells in the central and middle retinal regions in the ONC/BMD D group, indicating a moderately positive correlation ($r = 0.447$; $p < 0.001$). However, in the ONC/BMD D+IP group, the correlation between the middle and peripheral regions was weaker ($r = 0.319$; $p = 0.054$) (Fig. 2.1.7.1).

Strong correlations were found between the different retinal regions and RGC density. In the ONC/NaCl D+IP group, the central and middle regions exhibited a highly significant correlation ($r = 0.644$; $p < 0.0001$), which was even stronger when comparing the central and peripheral regions ($r = 0.671$; $p < 0.0001$), and the middle and peripheral regions ($r = 0.700$; $p < 0.0001$). Similarly, in the ONC/BMD D group, significant correlations were observed between the central and middle regions ($r = 0.612$; $p < 0.0001$), and between the middle and peripheral regions ($r = 0.601$; $p < 0.0001$), suggesting a consistent distribution of RGC density across the retina after ONC, regardless of treatment (Fig. 2.1.7.1).

GFAP expression, which is indicative of gliosis, also demonstrated significant correlations between different retinal segments. In the ONC/NaCl D+IP group, a moderate correlation was found between the central and middle regions ($r = 0.282$; $p < 0.05$), and a stronger correlation between the central and peripheral regions ($r = 0.342$; $p < 0.01$). In the ONC/BMD D+IP group, positive correlations were more pronounced, with significant relationships observed between the central and middle segments ($r = 0.578$; $p < 0.0001$), and between the central and peripheral regions ($r = 0.317$; $p < 0.05$) (Fig. 2.1.7.1).



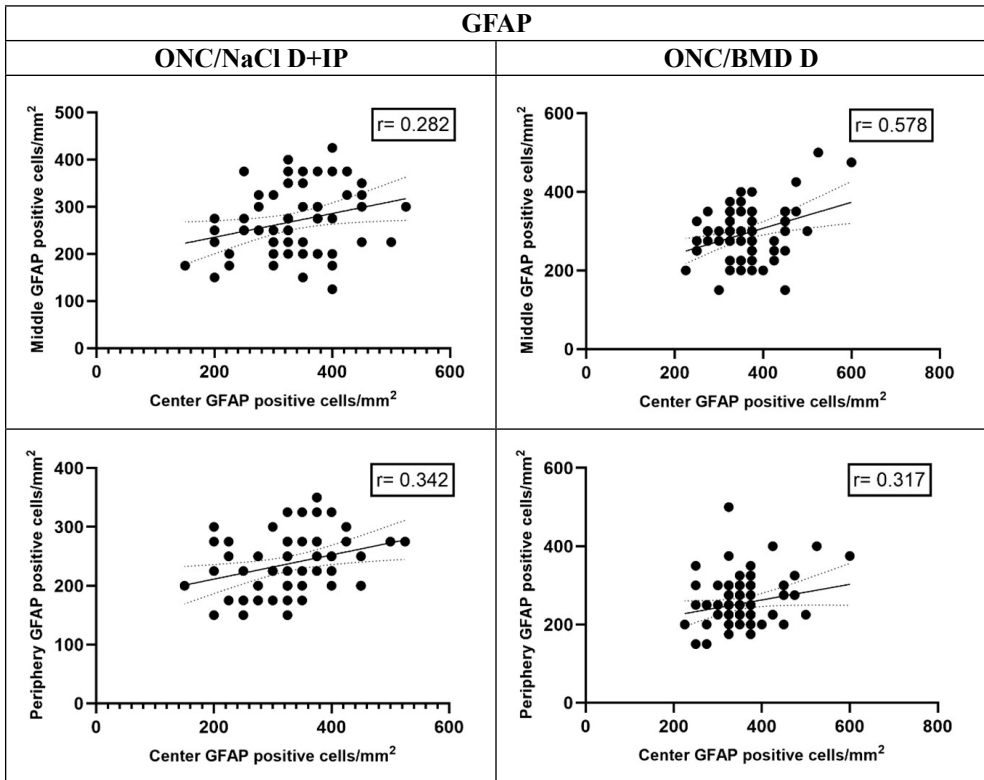


Fig. 2.1.7.1. Correlation of DAPI, NeuN, and GFAP cell counts across different retinal segments. The charts display a statistically significant positive relationship between non-neuronal cells, specific RGCs, and astrocytes across different retinal segments, demonstrating a consistent cell density distribution following ONC, regardless of treatment.

r – Spearman’s correlation coefficient, $p < 0.05$. DAPI – 4’,6-diamidino-2-phenylindole; NeuN – neuron-specific nuclear protein, primary antibody; GFAP – glial fibrillary acidic protein, primary antibody.

2.1.8. Correlations of retinal cell count dynamics after treatment

A moderate inverse correlation was observed between the gradual increase in GFAP-positive cells and the reduction in NeuN-positive cells across the retina in the ONC/NaCl D+IP group ($r = -0.644$; $p < 0.05$). Interestingly, a moderate positive correlation between astrocyte changes and the RGC count was identified in the ONC/BMD D group ($r = 0.7$; $p < 0.05$).

In the middle retinal region of the ONC/BMD D group, a strong positive correlation was noted between the increase in RGC count and the number of DAPI-positive cells ($r = 0.857$; $p < 0.01$) (Fig. 2.1.8.1). A negative correlation

between RGC count and GFAP expression in the middle region following saline treatment ($r = -0.747$; $p = 0.01$) highlights a distinct regional interaction, where reduced neuronal survival correlates with increased gliosis.

In the ONC/BMD D+IP group, a significant correlation was observed between the changes in DAPI-positive cells in the middle and peripheral retinal segments ($r = 0.857$; $p < 0.05$). Significant correlations in RGC loss were observed between the peripheral and middle retinal segments after saline treatment ($r = 0.733$; $p = 0.02$). A similar trend was observed between the middle and central retinal regions after brimonidine eye drop treatment ($r = 0.714$; $p = 0.057$) (Fig. 2.1.8.1).

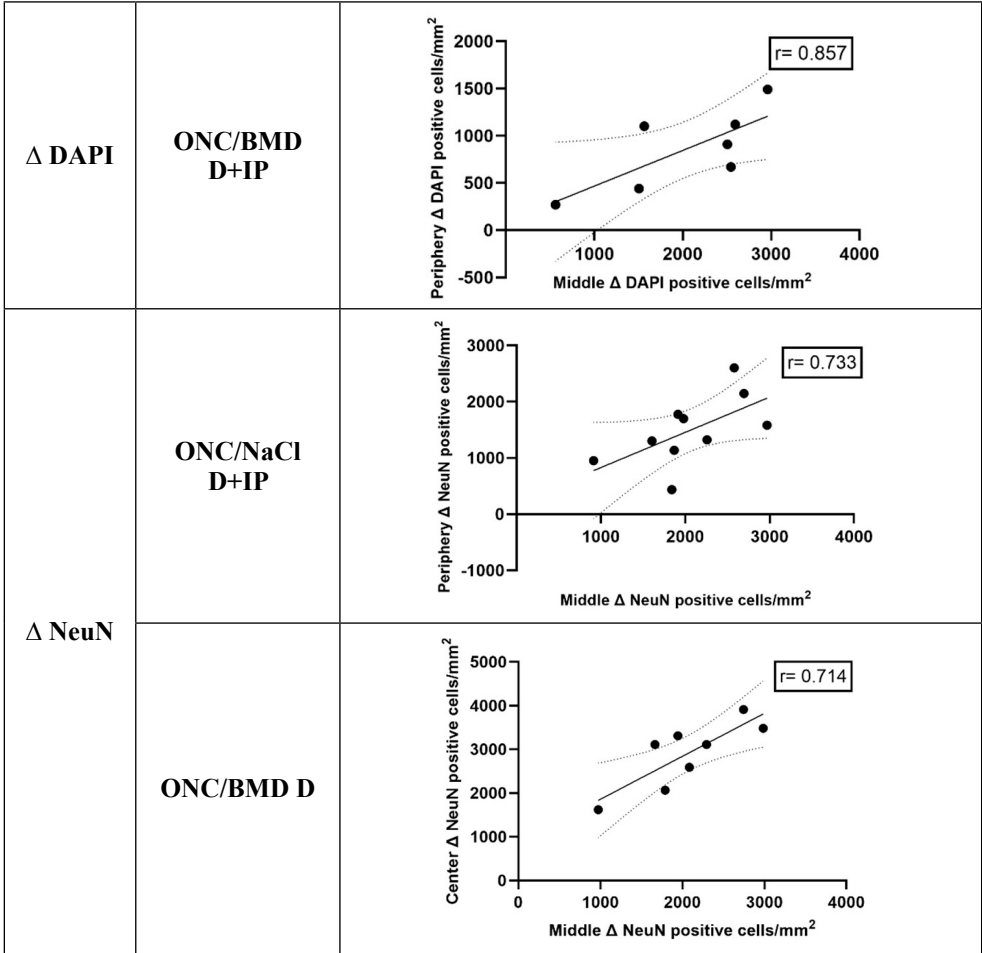


Fig. 2.1.8.1. Spearman correlation analysis of retinal cell changes in Balb/c mice after ONC across different retinal segments. The charts display a statistically significant positive correlation of changes in non-neuronal and specific RGC cells between the middle and peripheral, as well as central and middle retinal segments.

r – Spearman’s correlation coefficient, *p* < 0.05. DAPI – 4’,6-diamidino-2-phenylindole; NeuN – neuron-specific nuclear protein, primary antibody; GFAP – glial fibrillary acidic protein, primary antibody.

2.2. Results of the Stage II study of the experimental study

2.2.1. Quantitative indicators of NeuN and GFAP positive cells in the Stage II of the experiment

Quantitative assessment of NeuN-positive cells revealed statistically significant differences between the groups. In the experimental eyes treated with physiological saline post-ONC, a notable decrease in NeuN-positive cells was observed compared with the right control eye without optic nerve injury ($p < 0.0001$), confirming the successful execution of the optic nerve crush procedure. Treatment with a higher dose of memantine resulted in a significantly greater survival of NeuN-positive cells compared to the ONC/NaCl group ($p < 0.05$), demonstrating a pronounced neuroprotective effect. Similarly, in groups treated with low and high doses of levetiracetam, a significantly higher number of NeuN-positive cells was observed than in the ONC/NaCl group ($p < 0.05$). These findings indicate that both memantine and levetiracetam exhibit dose-dependent neuroprotective properties following ONC, as evidenced by the preservation of RGCs (Table 2.2.1.1, Figure 2.2.1.1).

Table 2.2.1.1. *Quantitative indicators of NeuN and GFAP positive cells in Stage II of the experimental study*

Group	NeuN	GFAP
Control/NaCl	7092 ± 1419	253.5 ± 41.81
ONC/NaCl	4493 ± 1362 ^{**}	276.9 ± 30.94
ONC/MEM LD	5274 ± 747	257.2 ± 27.62
ONC/MEM HD	5967 ± 611.4	299 ± 31.76
ONC/LEV LD	5973 ± 438.1	255.6 ± 18.77
ONC/LEV HD	5856 ± 839.5	304.8 ± 30.90

Data are expressed as mean ± SD. Statistical significance was determined using an unpaired t-test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.0001$. NeuN – neuron-specific nuclear protein, primary antibody; GFAP – glial fibrillary acidic protein, primary antibody.

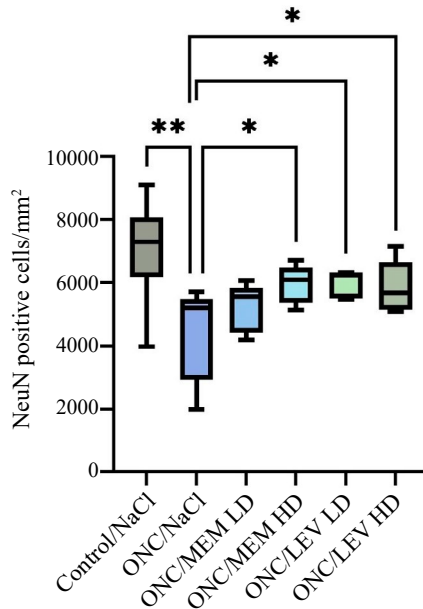


Fig. 2.2.1.1. Quantitative indicators of NeuN-positive cells after memantine and levetiracetam intraperitoneal injections seven days post-ONC. The ONC/NaCl group exhibited a significant reduction in the number of NeuN-positive cells compared to the control group ($p < 0.0001$). Treatment with high doses of memantine resulted in greater survival of NeuN-positive cells than in the ONC/NaCl group. Similarly, both low and high doses of levetiracetam increased the survival of NeuN-positive cells compared with the ONC/NaCl group.

Statistical significance was determined using an unpaired t-test; * $p < 0.05$; ** $p < 0.0001$. NeuN – neuron-specific nuclear protein, primary antibody.

There were no differences in GFAP-positive cells among experimental groups (Table 2.2.1.1, Figure 2.2.1.2).

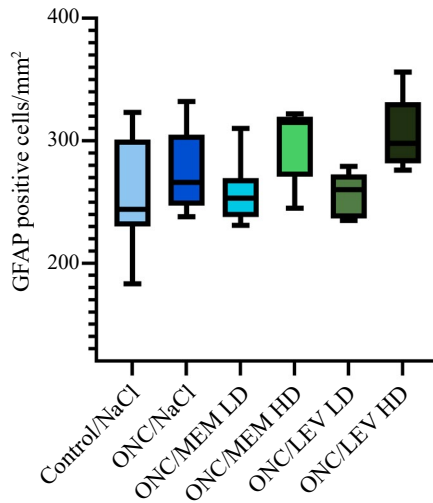


Fig. 2.2.1.2. Quantitative indicators of GFAP-positive cells after memantine and levetiracetam IP injections, seven days following ONC.

GFAP – glial fibrillary acidic protein, primary antibody; ONC – optic nerve crush.

2.2.1.1. Evaluation of effects of systemic medications on retinal cells in control eyes without ONC

To evaluate the effects of systemic high- and low-dose memantine and levetiracetam on retinal cells in control eyes without ONC, we compared the average number of retinal cells across different treatment groups. We found that the average number of NeuN- and GFAP-positive cells did not differ statistically significantly between the groups (Table 2.2.1.1.1).

Table 2.2.1.1.1. Retinal cells average in control eyes without ONC in different treatment groups

	NeuN	GFAP
Control/NaCl	7092 ± 1419	253.5 ± 41.81
Control/MEM LD	6747 ± 531	256 ± 33.63
Control/MEM HD	7700 ± 478.4	271.8 ± 57.26
Control/LEV LD	7602 ± 1210	237.6 ± 15.27
Control/LEV HD	6471 ± 509.9	262.4 ± 51.77

The analysis was performed using the non-parametric *Kruskal-Wallis* test.

2.2.2. Dynamics of cell count change in the retina in Stage II of experimental study

The analysis of cell count dynamics revealed a significantly lower death rate of NeuN-positive cells in the groups treated with a high dose of memantine and a low dose of levetiracetam compared to the saline group ($p < 0.05$) (Table 2.2.2.1, Figure 2.2.2.1).

Additionally, the number of GFAP-positive cells was significantly higher in the groups that received high doses of memantine and levetiracetam than in those that received low doses ($p < 0.05$). This finding may indicate reactive gliosis associated with the administration of higher drug doses (Table 2.2.2.1, Figure 2.2.2.2).

Table 2.2.2.1. *NeuN and GFAP-positive cell changes in the retina (Δ cells/mm² \pm SD) 7 days post-ONC, after administration of different doses of memantine and levetiracetam*

	ONC/NaCl	ONC/MEM LD	ONC/MEM HD	ONC/LEV LD	ONC/LEV HD
Δ NeuN	1929 \pm 728	1818 \pm 747	1125 \pm 611.4*	1119 \pm 438.1*	1235 \pm 839.3
Δ GFAP	23.32 \pm 30.85	3.613 \pm 27.62	45.18 \pm 31.91*	2.047 \pm 18.77	51.38 \pm 31.11*

Statistical significance was determined using nonparametric Mann-Whitney test; * $p < 0.05$. NeuN – neuronal specific nuclear protein, primary antibody; GFAP – glial fibrillary acidic protein, primary antibody.

Δ NeuN: ONC/MEM HD vs. ONC/NaCl; ONC/LEV LD vs. ONC/NaCl*;

Δ GFAP: ONC/MEM LD vs. ONC/LEV HD; ONC/MEM LD vs. ONC/MEM HD; ONC/LEV LD vs. ONC/LEV HD; ONC/LEV LD vs. ONC/MEM HD*.

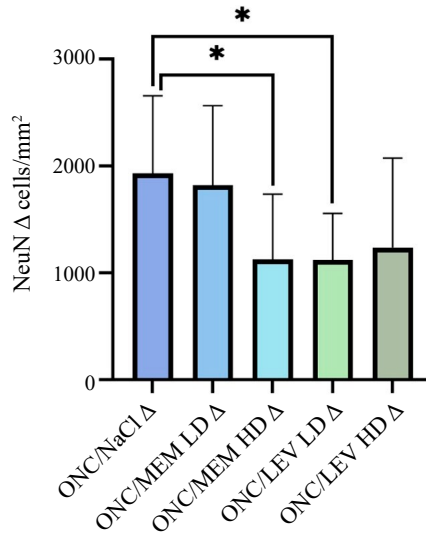


Fig. 2.2.2.1. Change of NeuN-positive cells in the retina (Δ cells/mm²) 7 days post-ONC, treated with different doses of memantine and levetiracetam.

Statistical significance was determined using the nonparametric Mann-Whitney test; * $p < 0.05$. NeuN – neuronal specific nuclear protein, primary antibody.

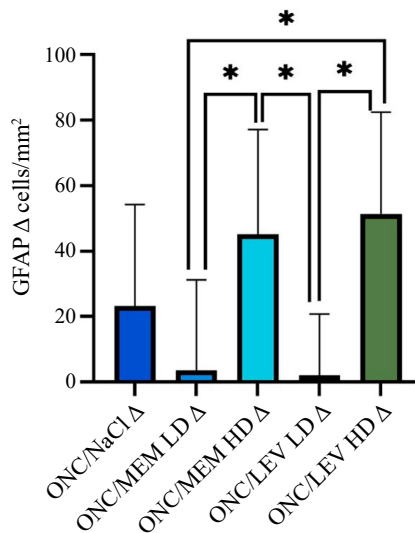


Fig. 2.2.2.2. Change in the number of GFAP-positive cells in the retina (Δ cells/mm²) 7 days post-ONC, treated with different doses of memantine and levetiracetam.

Statistical significance was determined using the nonparametric Mann-Whitney test; * $p < 0.05$. GFAP – glial fibrillary acidic protein, primary antibody.

2.2.3. Analysis of fundus photographs

The analysis of fundus photographs taken on days 0 and 7 of the experiment revealed no acute changes, such as hemorrhages, in the fundus of any eye that underwent ONC. By Day 7, all groups exhibited thinning of the nerve fiber layer in the photographs, confirming the successful execution of ONC in all eyes (Fig. 2.2.3.1).

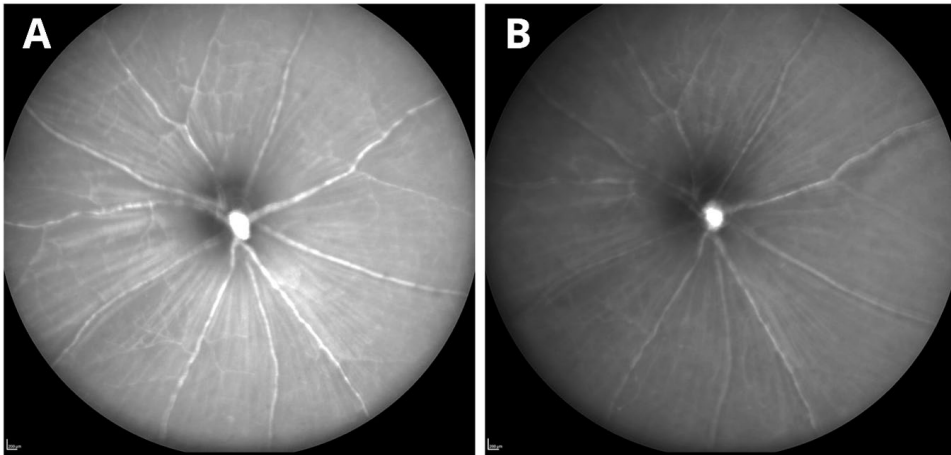


Fig. 2.2.3.1. Fundus photographs taken on Day 0 (A) and Day 7 (B) of the experiment using the Heidelberg Spectralis HRA2 system (Heidelberg Engineering, Germany). Retinal nerve fibers converging toward the optic nerve are observed between the blood vessels. Image B shows the thinning of retinal nerve fibers on day 7 post-ONC.

ONC – optic nerve crush.

2.2.4. SD-OCT image analysis

In Stage II of the experimental study, retinal scans were performed using SD-OCT and color Doppler OCT on Day 0 (immediately after ONC), and on Days 4 and 7 (Figure 1.1.1.1). Significant differences in the GCC thickness were observed between the treatment groups. In the saline-treated group (ONC/NaCl), GCC thickness significantly decreased on days 0 and 7 ($p < 0.01$). Both low and high memantine doses resulted in significant GCC thinning by day 7 ($p < 0.0001$). Similarly, in the groups treated with levetiracetam, both low and high doses showed a significant reduction in GCC thickness between days 0 and 7 ($p < 0.0001$), with significant thinning already observed on day 4 in the high-dose levetiracetam group ($p < 0.0001$). Significant differences were noted between the ONC/NaCl and contralateral left eye (control/NaCl,

without ONC) groups ($p < 0.05$) on day 4 and 7. The ONC groups receiving a high dose of memantine ($p < 0.0001$) or levetiracetam (low dose, $p < 0.001$; high dose, $p < 0.0001$) also demonstrated significant differences compared with the ONC/NaCl group on day 4. A significant difference was observed between the low-dose memantine group and the high-dose memantine group ($p < 0.0001$). Similarly, the low-dose levetiracetam group differed significantly from the high-dose levetiracetam group ($p < 0.001$) on day 7. The preservation of GCC thickness following ONC treatment highlights the neuroprotective effects of memantine and levetiracetam (Table 2.2.4.1, Fig. 2.2.4.1).

Table 2.2.4.1. Results of SD-OCT measurements of GCC thickness on Days 0, 4, and 7 in experimental and control groups (mm \pm SD)

	Control/ NaCl	ONC/NaCl	ONC/MEM LD	ONC/MEM HD	ONC/LEV LD	ONC/LEV HD
Day 0	0.0593 \pm 0.002	0.0598 \pm 0.002	0.0605 \pm 0.002	0.0597 \pm 0.002	0.0618 \pm 0.002	0.0599 \pm 0.003
Day 4	0.0603 \pm 0.002*	0.0578 \pm 0.002	0.06 \pm 0.002	0.0528 \pm 0.002****	0.061 \pm 0.003***	0.0539 \pm 0.003****
Day 7	0.0603 \pm 0.003	0.0571 \pm 0.002**	0.055 \pm 0.002****	0.059 \pm 0.002****	0.056 \pm 0.003***, ****	0.0582 \pm 0.003****

Statistical significance was determined using one-way ANOVA analysis with Tukey's multiple comparison test; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Day 0 vs. Day 7: ONC/NaCl **; ONC/MEM LD, ONC/MEM HD ****; ONC/LEV LD, ONC/LEV HD ***;

Day 0 vs. Day 4: ONC/LEV DD ****;

Day 4: ONC/NaCl vs. control/NaCl **; ONC/NaCl vs. ONC/MEM HD, ONC/NaCl vs. ONC/LEV LD, ONC/NaCl vs. ONC/LEV HD ****;

Day 7: ONC/NaCl vs. control/NaCl **; ONC/MEM LD vs. ONC/MEM HD ****, ONC/LEV LD vs. ONC/LEV HD ***.

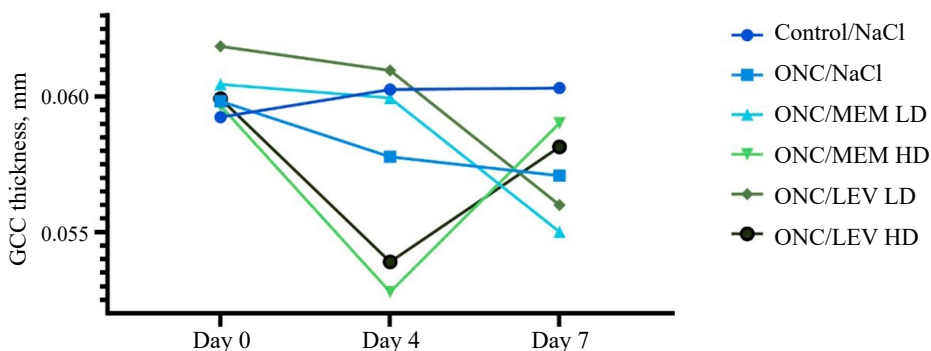


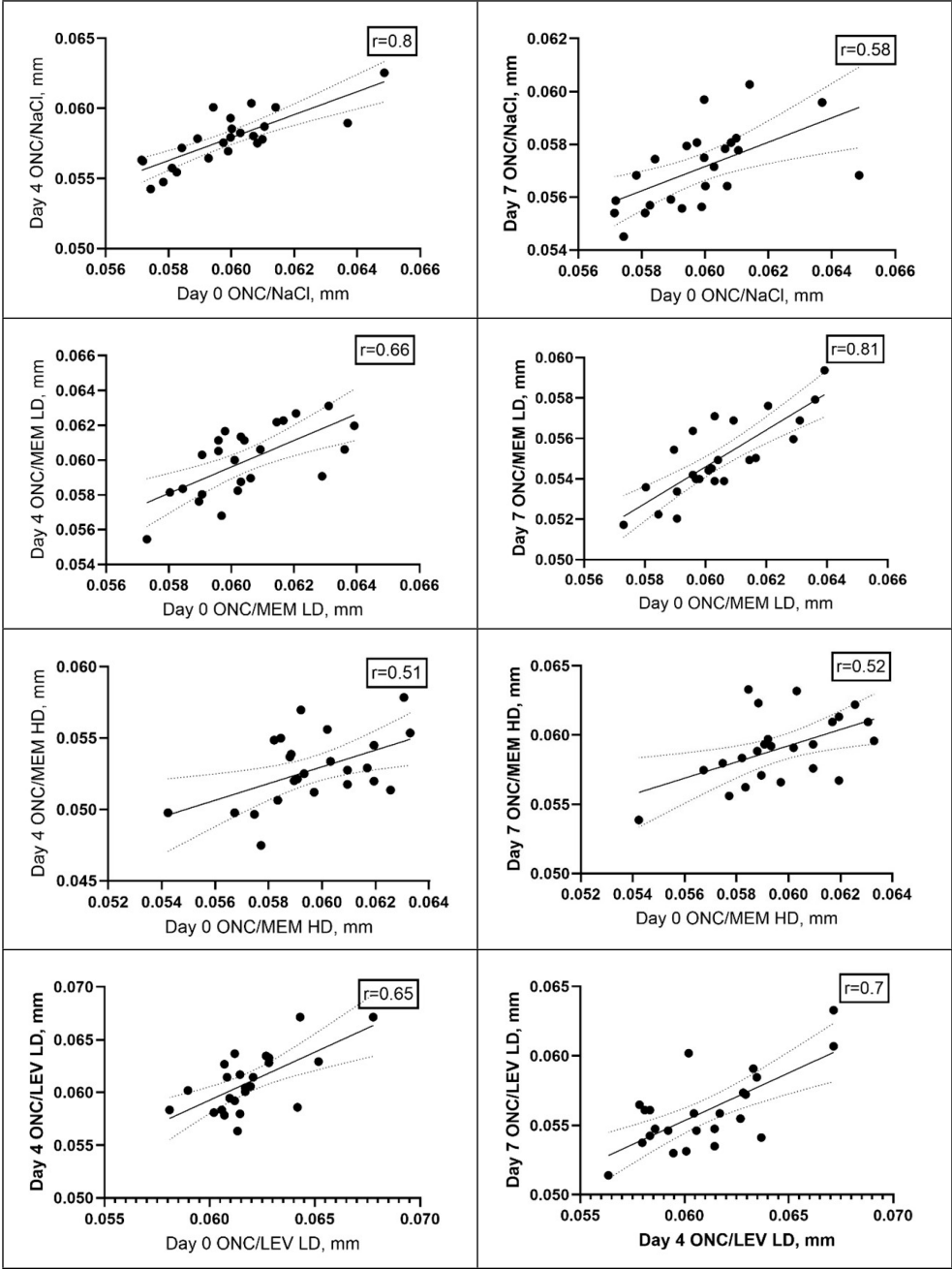
Fig. 2.2.4.1. Changes in the thickness of the ganglion cells complex as measured by SD-OCT on days 0, 4, and 7 in the experimental and control groups.

SD-OCT – spectral domain optical coherence tomography; GCC – ganglion cell complex.

2.2.5. Correlation analysis of ganglion cells complex thickness changes

Linear correlation analysis revealed significant associations in GCC thickness changes across different treatment groups over time. In the saline-treated ONC group, strong correlations were observed between days 0 and 4 ($r = 0.8$; $p < 0.0001$) and between days 0 and 7 ($r = 0.58$; $p < 0.005$). Similarly, in the low-dose memantine group, strong correlations were found between days 0 and 4 ($r = 0.66$; $p < 0.001$) and between days 0 and 7 ($r = 0.81$; $p < 0.0001$). In the high-dose memantine group, a moderate direct correlation was observed between days 0 and 4 ($r = 0.51$; $p < 0.05$), and between days 0 and 7 ($r = 0.52$; $p < 0.01$). In the low-dose levetiracetam group, strong correlations were noted between days 0 and 4 ($r = 0.65$; $p < 0.001$) and between days 4 and 7 ($r = 0.7$; $p < 0.001$). Finally, in the high-dose levetiracetam group, a significant direct correlation was observed between days 0 and 4 ($r = 0.72$; $p < 0.0001$) (Fig. 2.2.5.1).

These findings highlight the temporal correlations in GCC thickness changes, underscoring the neuroprotective efficacy of memantine and levetiracetam in preserving the retinal structure following ONC.



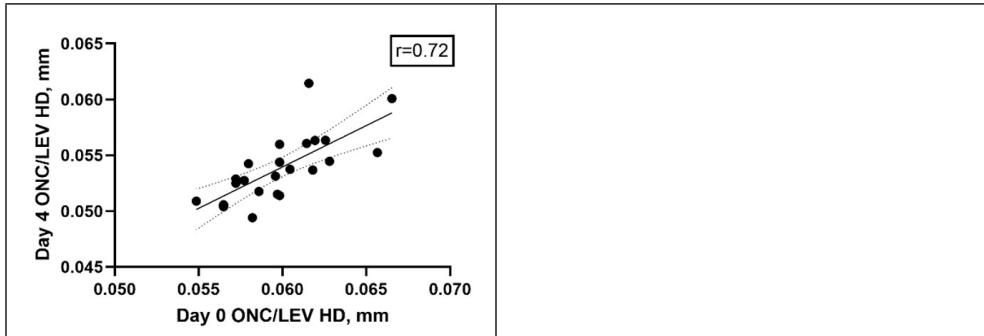


Fig. 2.2.5.1. Correlation analysis of changes in ganglion cells complex thickness in experimental groups. A positive correlation of GCC thickness changes was observed between day 0 and day 4, as well as between day 0 and day 7 in the experimental groups.

r – Spearman’s correlation coefficient, $p < 0.05$.

2.2.6. Analysis of ganglion cells complex thickness dynamics

Analysis of GCC thickness changes between days 0 and 4 revealed significantly greater thinning of the GCC in the ONC/MEM LD group than in the saline-treated groups and the groups treated with high doses of memantine and levetiracetam ($p < 0.05$). The greatest preservation of retinal thickness during this period was observed in the ONC/MEM HD group, which showed significantly better outcomes than the low-dose levetiracetam group at the same time point ($p < 0.05$). A statistically significant difference was found between GCC thickness changes in the control eye without ONC and the groups treated with saline, low-dose memantine and levetiracetam when comparing changes between day 0 and day 4, day 4 and day 7, day 0 and day 7 ($p < 0.001$). Between Days 4 and 7, the smallest change in GCC thickness was observed in the ONC/MEM HD group compared to the low-dose memantine and levetiracetam groups ($p < 0.05$). Conversely, the greatest change in GCC thickness during this period was noted in the low-dose memantine group, which differed significantly from the high-dose levetiracetam group ($p < 0.05$).

When analyzing GCC thickness changes over the entire study period (days 0 to 7), the ONC/MEM HD group demonstrated the highest retinal thickness preservation compared to the groups treated with low doses of memantine and levetiracetam ($p < 0.05$). In contrast, the greatest GCC thinning over this period was observed in the low-dose memantine group ($p < 0.05$). A statistically significant difference was observed between the control group without ONC and the ONC/LEV HD group when comparing GCC changes

over 7 days ($p < 0.05$). However, no significant differences were found with the high-dose memantine group (Table 2.2.6.1, Figure 2.2.6.1).

No significant correlations were identified in the dynamics of the GCC thickness changes.

Table 2.2.6.1. SD-OCT measurement of ganglion cells complex thickness changes between days 0 and 4, days 4 and 7, and days 0 and 7 in the experimental and control groups

Group	Δ Day 0 – Day 4	Δ Day 4 – Day 7	Δ Day 0 – Day 7
Control/NaCl	$-0.001 \pm 0.002^{***}$	$-0.0001 \pm 0.002^{*,***}$	$-0.0011 \pm 0.001^{*,***}$
ONC/NaCl	$0.0016 \pm 0.002^*$	0.0032 ± 0.002	0.0022 ± 0.002
ONC/MEM LD	$0.004 \pm 0.004^*$	$0.0053 \pm 0.001^*$	$0.0042 \pm 0.001^*$
ONC/MEM HD	$0.000001 \pm 0.002^*$	$0.0012 \pm 0.002^*$	$0.0002 \pm 0.002^*$
ONC/LEV LD	0.003 ± 0.001	0.0043 ± 0.001	0.0032 ± 0.001
ONC/LEV HD	0.001 ± 0.003	0.0021 ± 0.003	0.0011 ± 0.003

SD-OCT – spectral domain optical coherence tomography. Statistical significance was determined using an unpaired t-test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$.

Δ Day 0 – Day 4, Δ Day 4 – Day 7: ** control/NaCl vs. ONC/NaCl, control/NaCl vs. ONC/LEV LD; *** control/NaCl vs. ONC/MEM LD; * ONC/MEM LD vs. ONC/MEM HD, ONC/MEM LD vs. ONC/LEV HD, ONC/MEM HD vs. ONC/LEV LD;

Δ Day 0 – Day 7: *** control/NaCl vs. ONC/NaCl, control/NaCl vs. ONC/LEV LD, control/NaCl vs. ONC/MEM LD; * ONC/MEM LD vs. RNS/MEM HD, ONC/MEM LD vs. ONC/LEV HD, ONC/MEM HD vs. ONC/LEV LD, control/NaCl vs. ONC/LEV HD.

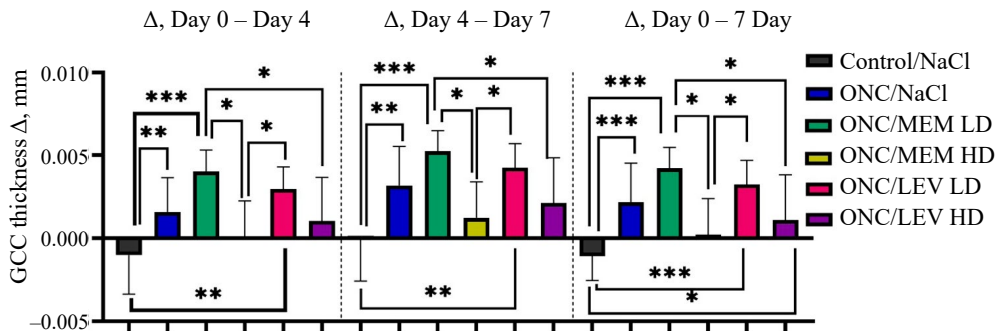


Fig. 2.2.6.1. SD-OCT dynamics of ganglion cell complex thickness changes between days 0 and 4, days 4 and 7, and days 0 and 7 in the experimental and control groups.

Statistical significance was determined using an unpaired t-test;

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$.

2.2.7. Binary logistic regression analysis for predicting RGC loss and changes in astroglial markers.

Based on binary logistic regression analysis, irrespective of treatment groups, it can be predicted that animals exhibiting more than a 10 % change in GFAP immunoreactivity 7 days post ONC have an odds ratio of 3.75 for experiencing less than 20 % RGC loss compared to animals with less than a 10 % change in GFAP count. It was determined that retinas with GCC thinning greater than 0.0022 mm had an odds ratio of 1.63 for RGC loss being less than 20 %, compared to retinas with GCC thinning less than 0.0022 mm (Table 4.2.7.1). The prognostic indicators were not statistically significant, possibly due to the small sample size. Simpler statistical methods, which directly compare the results of randomly selected groups and are less sensitive to data interpretation errors, are more suitable for more accurate analysis of experimental data [212, 213].

Table 4.2.7.1. *The influence of changes in GFAP immunoreactivity and GCC thickness on RGC death following ONC*

Indicator	<i>p</i>	OR	95 % CI
GFAP positive cell count >10 %	0.11	3.75	0.74–19.14
GCC thickness change >0.0022 mm	0.54	1.63	0.34–7.67

OR – odds ratio; CI – confidence interval; *p* – statistical significance level.

A strong trend was observed, indicating that GCC change greater than 0.0022 mm had 3.93 times lower odds of showing a change in astrogliosis greater than 10 % 7 days post ONC, compared to GCC thinning less than 0.0022 mm (*p* = 0.07) (Table 4.2.7.2).

Table 4.2.7.2. *The influence of GCL thickness changes on astroglial marker changes 7 days post-ONC*

Indicator	<i>p</i>	OR	95 % CI
GCC thickness change >0,0022 mm	0,07	0,26	0,06–1,14

OR – odds ratio; CI – confidence interval; *p* – statistical significance level.

2.3. Comparison of results from Stage I and Stage II experimental studies

Stereological counts of retinal cells and a comparison of RGC and astrocyte averages in the control eyes (without ONC) of C57Bl/6J and BALB/c mice revealed a statistically significant difference in the number of NeuN-positive

cells (7178 ± 768.5 and 4716 ± 1115 , respectively; $p < 0.0001$) between the two mouse strains. However, no significant difference was observed in the averages of GFAP-reactive cells in healthy eyes (250.6 ± 34.63 and 282.4 ± 68.74 , respectively).

When evaluating the percentage of NeuN-positive cell death, a statistically significant difference was identified between the C57Bl/6J and Balb/c mouse strains in the sodium chloride-treated groups after ONC (24.36 ± 3.131 and 41.12 ± 12.03 , cell death % \pm SD, respectively; $p < 0.01$). These findings demonstrate a strong genetic basis for neuronal resistance to optic nerve injury (Fig. 2.3.1, Table 2.3.1).

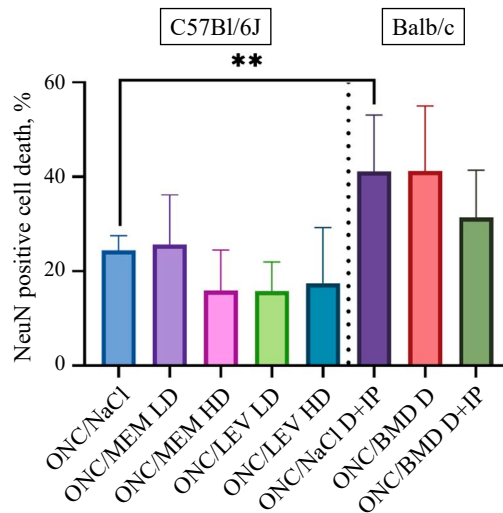


Fig. 2.3.1. Retinal ganglion cell death in experimental groups in Stage I and Stage II experimental work in the ONC model of C57Bl/6J and Balb/c mice.

Statistical significance was determined using an unpaired t-test;
 ** $p < 0.01$. NeuN – neuron-specific nuclear protein, primary antibody.

Table 2.3.1. Retinal cell death in experimental groups of C57Bl/6J and Balb/c mice in the ONC model

Stage I experimental study (Balb/c mice strain)		
Group	NeuN change, %	GFAP change, %
ONC/NaCl D+IP	41.12 ± 12.03	5.92 ± 23.39
ONC/BMD D	41.19 ± 13.8	5.27 ± 12.06
ONC/BMD D+IP	31.4 ± 9.95	3.5 ± 12.82
Stage II experimental study (C57Bl/6J mice strain)		
ONC/NaCl	24.36 ± 3.13***	9.2 ± 12.17
ONC/MEM LD	25.63 ± 10.53	1.43 ± 10.89
ONC/MEM HD	15.86 ± 8.62	17.82 ± 12.59
ONC/LEV LD	15.78 ± 6.18	0.81 ± 7.4
ONC/LEV HD	17.42 ± 11.84	20.26 ± 12.27*

Statistical significance was determined using an unpaired t-test; * $p < 0.05$; *** $p < 0.01$. NeuN – neuron-specific nuclear protein, primary antibody.

When comparing the retinal gliosis marker, no statistically significant difference was observed in GFAP changes between the saline-treated groups of different mouse strains (9.2 ± 12.17 and 5.92 ± 23.39 , cell change % ± SD). Changes in GFAP immunoreactivity serve as an indicator of astrogliosis.

In the ONC/LEV HD group, more pronounced astrogliosis was observed compared to the ONC/BMD D group (20.26 ± 12.27 and 5.27 ± 12.06 , cell change % ± SD; $p < 0.05$) and the ONC/BMD D+IP group (3.45 ± 12.82 , cell change % ± SD; $p < 0.05$) (Figure 2.3.2, Table 2.3.1).

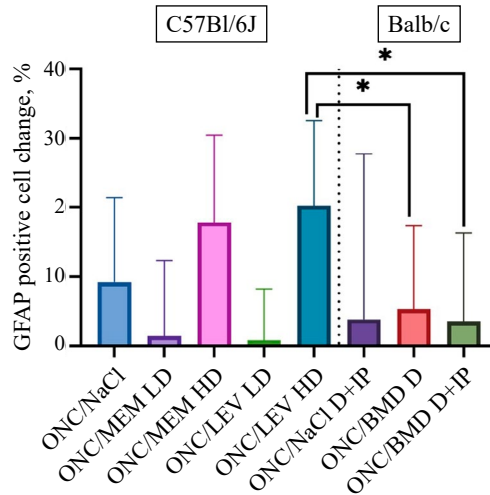


Fig. 2.3.2. Changes in GFAP-immunoreactive retinal cells in experimental groups of Balb/c and C57Bl/6J mice in the ONC model in Stage I and Stage II experimental studies.

Statistical significance was determined using an unpaired t-test; * $p < 0.05$. GFAP – glial fibrillary acidic protein, primary antibody.

2.3.1. Evaluation of effect size differences of brimonidine, memantine and levetiracetam

To compare the neuroprotective effects of different medications on RGCs across the treatment groups and mouse strains, we evaluated the effect size. The greatest effect size for RGC preservation was observed in the low-dose levetiracetam group, which was statistically significant compared to the brimonidine drops treatment group (35.24 ± 25.35 and -3.07 ± 34.38 , respectively; $p < 0.05$) (Figure 2.3.1.1, Table 2.3.1.1).

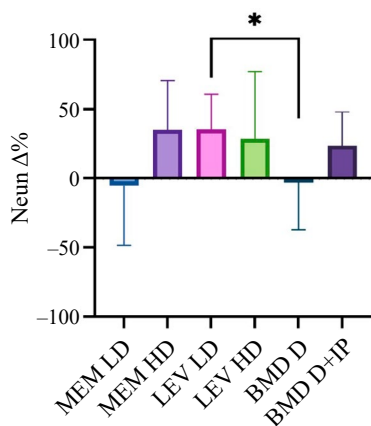


Fig. 2.3.1.1. Difference in the effect size (% Δ) of drugs with neuroprotective properties. The diagram shows the largest difference in NeuN positive cells observed in the low-dose levetiracetam group, which was significantly different from the group treated with brimonidine drops only ($p < 0.05$).

Statistical significance was determined using the nonparametric Mann-Whitney test; * $p < 0.05$; NeuN – neuron-specific nuclear protein, primary antibody.

Table 2.3.1.1. Effect size of different medical agents with neuroprotective properties (Δ %)

	MEM LD	MEM HD	LEV LD	LEV HD	BMD D	BMD D+IP
NeuN	-5.21 ± 43.23	34.89 ± 35.39	35.24 ± 25.35*	28.50 ± 48.58	-3.07 ± 34.38	23.63 ± 24.19
GFAP	-165 ± 96.02*	93.75 ± 136.9*	-91.22 ± 80.49*	120.3 ± 133.4	-51.04 ± 217.7	-40.91 ± 216.5

Statistical significance was determined using the nonparametric Mann-Whitney test; * $p < 0.05$;

NeuN Δ %: LEV MD vs. BMD L*;

GFAP Δ %: MEM MD vs. MEM DD; MEM DD vs. LEV DD; LEV MD vs. LEV DD;

NeuN – neuron-specific nuclear protein, primary antibody; GFAP – glial fibrillary acidic protein, primary antibody.

A comparison of the effect sizes of GFAP-immunoreactive cells between the experimental groups revealed significant differences. A statistically significant difference was observed between the low and high-dose memantine groups (-165 ± 96.02 and 93.75 ± 136.9, respectively; $p < 0.05$). Similarly, a significant difference in effect size was noted between the high-dose memantine and high-dose levetiracetam groups (93.75 ± 136.9 and 120.3 ± 133.4, respectively; $p < 0.05$). Additionally, in the high-dose levetiracetam group, the effect size significantly differed compared to the low-dose levetiracetam group (91.22 ± 80.49; $p < 0.05$) (Figure 2.3.1.2).

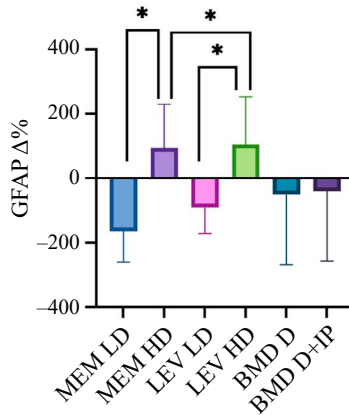


Fig. 2.3.1.2. *Difference in the effect size on GFAP-positive cells (%Δ). A statistically significant difference in effect size was observed between the high-dose memantine and levetiracetam groups ($p < 0.05$).*

Statistical significance was determined using the nonparametric Mann-Whitney test;

* $p < 0.05$; GFAP – glial fibrillary acidic protein, primary antibody.

CONCLUSIONS

1. The ONC model was successfully established using genetically distinct mouse strains. A statistically significant reduction in RGCs was observed in the right eye of sodium chloride-treated mice (post-ONC), confirming the successful implementation of the model. Data from this study demonstrated that the C57Bl/6J mouse strain not only exhibited a higher baseline number of neuronal cells (in control eyes without ONC) but also showed greater resilience to optic nerve injury. Post-ONC, the RGC survival rate in the C57Bl/6J strain was 75.64 % compared to 58.88 % in the Balb/c strain without neuroprotective treatment. The average number of retinal astrocytes did not differ significantly between the mouse strains.
2. With systemic administration of brimonidine, RGC survival in the peripheral retina reached 92.82 % compared to the sodium chloride-treated group, where 60.96 % of RGCs remained after ONC. Comparing systemic and topical brimonidine effects, we found that RGC survival with topical brimonidine drops was 58.81 %. However, an additional 2 mg/kg brimonidine IP injections provided statistically significant protection to RGCs across the entire retina (68.6 %). Astroglial marker levels were highest in the brimonidine drops group compared to the control and sodium chloride-treated groups.

3. A statistically significant neuroprotective effect on RGCs after ONC was observed with 7-day IP injections of 10 mg/kg memantine, 40 mg/kg, and 80 mg/kg levetiracetam (RGC survival rates of 84.14 %, 84.22 %, and 82.58 %, respectively). Structural retinal changes, assessed by GCC thickness using OCT, were significantly reduced with 7-day IP injections of 10 mg/kg memantine. High doses of memantine and levetiracetam preserved GCC thickness, whereas retinal thinning was observed with low-dose treatments.
4. Compared to the brimonidine drops group, the low-dose levetiracetam group demonstrated a statistically significantly higher neuroprotective effect. Similar trends in neuroprotective effects were observed in the high-dose memantine and levetiracetam groups, as well as in the systemic brimonidine group. The systemic use of memantine and levetiracetam was found to be safe, whereas transient adverse effects were noted with brimonidine.

RECOMMENDATIONS

1. The safe and effective neuroprotective effects of systemic 2 mg/kg brimonidine, 10 mg/kg memantine, 40 mg/kg and 80 mg/kg levetiracetam should be translated to patients with glaucoma, with future studies starting from the established safe doses of memantine and levetiracetam. The dose-dependent neuroprotective effects observed in our study suggest that higher doses of memantine than those used in previous clinical trials may still prove to be effective. This remains a subject for clinical investigation. Similarly, identifying the optimal dose of levetiracetam (both effective and safe) should be a future direction for research in patients with glaucoma.
2. Based on the findings of this dissertation, it would be worthwhile to evaluate the effects of additional systemic neuroprotective treatments and preventive strategies in patients with early-stage and high-risk glaucoma, particularly those with other risk factors for neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, or an impending stroke. Each of the three potential neuroprotectants appears to have distinct adverse effects, necessitating the adaptation of the key systemic properties of memantine, brimonidine, and levetiracetam in future studies to personalize their optimal applicability for glaucoma patients.

BIBLIOGRAFIJOS SĄRAŠAS

1. Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, Kocur I, Pararajasegaram R, Pokharel GP, Mariotti SP. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull World Health Organ.* 2004 Nov;82(11):844-51. Epub 2004 Dec 14. PMID: 15640920; PMCID: PMC2623053.
2. Tham YC, Li X, Wong TY, Quigley HA, Aung T, Cheng CY. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology.* 2014 Nov;121(11):2081-90. doi: 10.1016/j.ophtha.2014.05.013. Epub 2014 Jun 26. PMID: 24974815.
3. Bourne RRA, Steinmetz JD, Saylan M, Mersha AM, Weldemariam AH, Wondmeneh TG, et al. Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years, and prevalence of avoidable blindness in relation to VISION 2020: The Right to Sight: An analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet Glob Health.* 2021 Feb 1;9(2):e144–60. doi: 10.1016/S2214-109X(20)30489-7. Epub 2020 Dec 1. Erratum in: *Lancet Glob Health.* 2021 Apr;9(4):e408. doi: 10.1016/S2214-109X(21)00050-4. PMID: 33275949; PMCID: PMC7820391.
4. 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. Epub 2013 Aug 7. PMID: 23932216.
5. Doozandeh A, Yazdani S. Neuroprotection in Glaucoma. *J Ophthalmic Vis Res.* 2016 Apr-Jun;11(2):209-20. doi: 10.4103/2008-322X.183923. PMID: 27413504; PMCID: PMC4926571.
6. Pei K, Georgi M, Hill D, Lam CFJ, Wei W, Cordeiro MF. Review: Neuroprotective Nanocarriers in Glaucoma. *Pharmaceuticals (Basel).* 2024 Sep 10;17(9):1190. doi: 10.3390/ph17091190. PMID: 39338350; PMCID: PMC11435059.
7. Xuejiao Y, Junwei Y. New strategies for neuro protection in glaucoma. *Front Cell Dev Biol.* 2022 Sep 15;10:983195. doi: 10.3389/fcell.2022.983195. PMID: 36187483; PMCID: PMC9520966.
8. Spaeth GL. European Glaucoma Society Terminology and Guidelines for Glaucoma, 5th Edition. Vol. 105, *British Journal of Ophthalmology.* BMJ Publishing Group; 2021. p. 1–169. doi: 10.1136/bjophthalmol-2021-egsguidelines. PMID: 34675001.
9. Boccaccini A, Cavaterra D, Carnevale C, Tanga L, Marini S, Bocedi A, Lacal PM, Manni G, Graziani G, Sbardella D, Tundo GR. Novel frontiers in neuroprotective therapies in glaucoma: Molecular and clinical aspects. *Mol Aspects Med.* 2023 Dec;94:101225. doi: 10.1016/j.mam.2023.101225. Epub 2023 Nov 24. PMID: 38000334.
10. Conti F, Romano GL, Eandi CM, Toro MD, Rejdak R, Di Benedetto G, Lazzara F, Bernardini R, Drago F, Cantarella G, Bucolo C. Brimonidine is Neuroprotective in Animal Paradigm of Retinal Ganglion Cell Damage. *Front Pharmacol.* 2021 Jul 21;12:705405. doi: 10.3389/fphar.2021.705405. PMID: 34366858; PMCID: PMC8333612.
11. Marangoz D, Guzel E, Eyuboglu S, Gumusel A, Seekin I, Ciftci F, Yilmaz B, Yalvac I. Comparison of the neuroprotective effects of brimonidine tartrate and melatonin on retinal ganglion cells. *Int Ophthalmol.* 2018 Dec;38(6):2553-2562. doi: 10.1007/s10792-017-0768-z. Epub 2017 Nov 20. PMID: 29159432.
12. Boia R, Ruzafa N, Aires ID, Pereiro X, Ambrósio AF, Vecino E, Santiago AR. Neuroprotective Strategies for Retinal Ganglion Cell Degeneration: Current Status and Challenges Ahead. *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 25;21(7):2262. doi: 10.3390/ijms21072262. PMID: 32218163; PMCID: PMC7177277.
13. Weinreb RN, Liebmann JM, Cioffi GA, Goldberg I, Brandt JD, Johnson CA, Zangwill LM, Schneider S, Badger H, Bejanian M. Oral Memantine for the Treatment of Glaucoma: Design and Results of 2 Randomized, Placebo-Controlled, Phase 3 Studies.

- Ophthalmology. 2018 Dec;125(12):1874-1885. doi: 10.1016/j.ophtha.2018.06.017. Epub 2018 Aug 3. PMID: 30082073.
14. Erbaş O, Oltulu F, Yılmaz M, Yavaşoğlu A, Taşkıran D. Neuroprotective effects of chronic administration of levetiracetam in a rat model of diabetic neuropathy. *Diabetes Res Clin Pract*. 2016 Apr;114:106-16. doi: 10.1016/j.diabres.2015.12.016. Epub 2016 Jan 12. PMID: 26795972.
 15. Erbaş O, Yılmaz M, Taşkıran D. Levetiracetam attenuates rotenone-induced toxicity: A rat model of Parkinson's disease. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2016 Mar;42:226-30. doi: 10.1016/j.etap.2016.02.005. Epub 2016 Feb 11. PMID: 26896611.
 16. Miyazaki I, Murakami S, Torigoe N, Kitamura Y, Asanuma M. Neuroprotective effects of levetiracetam target xCT in astrocytes in parkinsonian mice. *J Neurochem*. 2016 Jan;136(1):194-204. doi: 10.1111/jnc.13405. Epub 2015 Nov 10. PMID: 26485447.
 17. Belcastro V, Pierguidi L, Tambasco N. Levetiracetam in brain ischemia: clinical implications in neuroprotection and prevention of post-stroke epilepsy. *Brain Dev*. 2011 Apr;33(4):289-93. doi: 10.1016/j.braindev.2010.06.008. Epub 2010 Jul 13. PMID: 20630672.
 18. Imai T, Sugiyama T, Iwata S, Nakamura S, Shimazawa M, Hara H. Levetiracetam, an Antiepileptic Drug has Neuroprotective Effects on Intracranial Hemorrhage Injury. *Neuroscience*. 2020 Apr 1;431:25-33. doi: 10.1016/j.neuroscience.2020.01.036. Epub 2020 Feb 11. PMID: 32058064.
 19. Contreras-García IJ, Cárdenas-Rodríguez N, Romo-Mancillas A, Bandala C, Zamudio SR, Gómez-Manzo S, Hernández-Ochoa B, Mendoza-Torreblanca JG, Pichardo-Macías LA. Levetiracetam Mechanisms of Action: From Molecules to Systems. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022 Apr 13;15(4):475. doi: 10.3390/ph15040475. PMID: 35455472; PMCID: PMC9030752.
 20. Ventura LM, Sorokac N, De Los Santos R, Feuer WJ, Porciatti V. The relationship between retinal ganglion cell function and retinal nerve fiber thickness in early glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006 Sep;47(9):3904-11. doi: 10.1167/iovs.06-0161. PMID: 16936103; PMCID: PMC1808329.
 21. Kooner KS, AlBdoor M, Cho BJ, Adams-Huet B. Risk factors for progression to blindness in high tension primary open angle glaucoma: Comparison of blind and nonblind subjects. *Clin Ophthalmol*. 2008 Dec;2(4):757-62. doi: 10.2147/opth.s3139. PMID: 19668427; PMCID: PMC2699782.
 22. Oliver JE, Hattenhauer MG, Herman D, Hodge DO, Kennedy R, Fang-Yen M, Johnson DH. Blindness and glaucoma: a comparison of patients progressing to blindness from glaucoma with patients maintaining vision. *Am J Ophthalmol*. 2002 Jun;133(6):764-72. doi: 10.1016/s0002-9394(02)01403-4. PMID: 12036667.
 23. Mozaffarieh M, Flammer J. New insights in the pathogenesis and treatment of normal tension glaucoma. *Curr Opin Pharmacol*. 2013 Feb;13(1):43-9. doi: 10.1016/j.coph.2012.10.001. Epub 2012 Oct 22. PMID: 23092679.
 24. Virani S, Rewri P. A Narrative Review of Pharmacotherapy of Glaucoma. *Future Pharmacology*. 2024; 4(2):395-419. <https://doi.org/10.3390/futurepharmacol4020022>
 25. Paula JS, Furtado JM, Santos AS, Coelho Rde M, Rocha EM, Rodrigues Mde L. Risk factors for blindness in patients with open-angle glaucoma followed-up for at least 15 years. *Arq Bras Oftalmol*. 2012 Jul-Aug;75(4):243-6. doi: 10.1590/s0004-27492012000400004. PMID: 23258653.
 26. Boland MV, Ervin AM, Friedman DS, Jampel HD, Hawkins BS, Vollenweider D, Chelladurai Y, Ward D, Suarez-Cuervo C, Robinson KA. Comparative effectiveness of treatments for open-angle glaucoma: a systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*. 2013 Feb 19;158(4):271-9. doi: 10.7326/0003-4819-158-4-201302190-00008. PMID: 23420235.

27. Tribble JR, Hui F, Quintero H, El Hajji S, Bell K, Di Polo A, Williams PA. Neuroprotection in glaucoma: Mechanisms beyond intraocular pressure lowering. *Mol Aspects Med.* 2023 Aug;92:101193. doi: 10.1016/j.mam.2023.101193. Epub 2023 Jun 16. PMID: 37331129.
28. 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. PMID: 16488940; PMCID: PMC1856963.
29. Sihota R, Angmo D, Ramaswamy D, Dada T. Simplifying “target” intraocular pressure for different stages of primary open-angle glaucoma and primary angle-closure glaucoma. *Indian J Ophthalmol.* 2018 Apr;66(4):495-505. doi: 10.4103/ijo.IJO_1130_17. PMID: 29582808; PMCID: PMC5892050.
30. The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS): 7. The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. The AGIS Investigators. *Am J Ophthalmol.* 2000 Oct;130(4):429-40. doi: 10.1016/s0002-9394(00)00538-9. PMID: 11024415.
31. Kiyota N, Shiga Y, Omodaka K, Pak K, Nakazawa T. Time-Course Changes in Optic Nerve Head Blood Flow and Retinal Nerve Fiber Layer Thickness in Eyes with Open-angle Glaucoma. *Ophthalmology.* 2021 May;128(5):663-671. doi: 10.1016/j.ophtha.2020.10.010. Epub 2020 Oct 14. PMID: 33065167.
32. Himori N, Yamamoto K, Maruyama K, Ryu M, Taguchi K, Yamamoto M, Nakazawa T. Critical role of Nrf2 in oxidative stress-induced retinal ganglion cell death. *J Neurochem.* 2013 Dec;127(5):669-80. doi: 10.1111/jnc.12325. Epub 2013 Jun 17. PMID: 23721546.
33. Ju WK, Liu Q, Kim KY, Crowston JG, Lindsey JD, Agarwal N, Ellisman MH, Perkins GA, Weinreb RN. Elevated hydrostatic pressure triggers mitochondrial fission and decreases cellular ATP in differentiated RGC-5 cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007 May;48(5):2145-51. doi: 10.1167/iovs.06-0573. PMID: 17460273.
34. Ishikawa M, Takaseki S, Yoshitomi T, Covey DF, Zorumski CF, Izumi Y. The neurosteroid allopregnanolone protects retinal neurons by effects on autophagy and GABRs/GABA_A receptors in rat glaucoma models. *Autophagy.* 2021 Mar;17(3):743-760. doi: 10.1080/15548627.2020.1731270. Epub 2020 Feb 27. PMID: 32070183; PMCID: PMC8032250.
35. Yu AL, Birke K, Moriniere J, Welge-Lüssen U. TGF- β 2 induces senescence-associated changes in human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010 Nov;51(11):5718-23. doi: 10.1167/iovs.10-5679. Epub 2010 Jun 16. PMID: 20554622.
36. Tezel G. Molecular regulation of neuroinflammation in glaucoma: Current knowledge and the ongoing search for new treatment targets. *Prog Retin Eye Res.* 2022 Mar;87:100998. doi: 10.1016/j.preteyeres.2021.100998. Epub 2021 Aug 1. PMID: 34348167; PMCID: PMC8803988.
37. Masland RH. The neuronal organization of the retina. *Neuron.* 2012 Oct 18;76(2):266-80. doi: 10.1016/j.neuron.2012.10.002. Epub 2012 Oct 17. PMID: 23083731; PMCID: PMC3714606.
38. Dhande OS, Huberman AD. Retinal ganglion cell maps in the brain: implications for visual processing. *Curr Opin Neurobiol.* 2014 Feb;24(1):133-42. doi: 10.1016/j.conb.2013.08.006. Epub 2013 Nov 19. PMID: 24492089; PMCID: PMC4086677.
39. Fry LE, Fahy E, Chrysostomou V, Hui F, Tang J, van Wijngaarden P, Petrou S, Crowston JG. The coma in glaucoma: Retinal ganglion cell dysfunction and recovery. *Prog Retin Eye Res.* 2018 Jul;65:77-92. doi: 10.1016/j.preteyeres.2018.04.001. Epub 2018 Apr 6. PMID: 29631042.

40. Syc-Mazurek SB, Libby RT. Axon injury signaling and compartmentalized injury response in glaucoma. *Prog Retin Eye Res.* 2019 Nov;73:100769. doi: 10.1016/j.preteyeres.2019.07.002. Epub 2019 Jul 10. PMID: 31301400; PMCID: PMC6898776.
41. Whitmore AV, Libby RT, John SW. Glaucoma: thinking in new ways—a rôle for autonomous axonal self-destruction and other compartmentalised processes? *Prog Retin Eye Res.* 2005 Nov;24(6):639-62. doi: 10.1016/j.preteyeres.2005.04.004. PMID: 15953750.
42. Chan JW, Chan NCY, Sadun AA. Glaucoma as Neurodegeneration in the Brain. *Eye Brain.* 2021 Jan 18;13:21-28. doi: 10.2147/EB.S293765. PMID: 33500674; PMCID: PMC7822087.
43. Corredor RG, Goldberg JL. Retinal Ganglion Cell Life and Death – Mechanisms and Implications for Ophthalmology. *European Ophthalmic Review [Internet].* 2009;03(02):109. Available from: <http://www.touchophthalmology.com/articles/retinal-ganglion-cell-life-and-death-mechanisms-and-implications-ophthalmology>.
44. Fitzgerald M, Payne SC, Bartlett CA, Evill L, Harvey AR, Dunlop SA. Secondary retinal ganglion cell death and the neuroprotective effects of the calcium channel blocker lomerizine. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009 Nov;50(11):5456-62. doi: 10.1167/iovs.09-3717. Epub 2009 May 27. PMID: 19474405.
45. Costa VP, Arcieri ES, Harris A. Blood pressure and glaucoma. *Br J Ophthalmol.* 2009 Oct;93(10):1276-82. doi: 10.1136/bjo.2008.149047. Epub 2009 Mar 30. PMID: 19336425.
46. Neufeld AH. Pharmacologic neuroprotection with an inhibitor of nitric oxide synthase for the treatment of glaucoma. *Brain Res Bull.* 2004 Feb 15;62(6):455-9. doi: 10.1016/j.brainresbull.2003.07.005. PMID: 15036557.
47. Pang IH, Johnson EC, Jia L, Cepurna WO, Shepard AR, Hellberg MR, Clark AF, Morrison JC. Evaluation of inducible nitric oxide synthase in glaucomatous optic neuropathy and pressure-induced optic nerve damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005 Apr;46(4):1313-21. doi: 10.1167/iovs.04-0829. PMID: 15790897.
48. Adlerberg JL. The optic nerve. In: Levin LA, Nilsson SF, Ver Hoeve J, et al., editors. *Adler's Physiology of the Eye.* 11th ed. New York: Saunders/Elsevier; 2011.
49. Corredor RG, Goldberg JL. Electrical activity enhances neuronal survival and regeneration. *J Neural Eng.* 2009 Oct;6(5):055001. doi: 10.1088/1741-2560/6/5/055001. Epub 2009 Sep 1. PMID: 19721179.
50. Gupta N, Fong J, Ang LC, Yücel YH. Retinal tau pathology in human glaucomas. *Can J Ophthalmol.* 2008 Feb;43(1):53-60. doi: 10.3129/i07-185. PMID: 18219347.
51. Shimazawa M, Inokuchi Y, Ito Y, Murata H, Aihara M, Miura M, Araie M, Hara H. Involvement of ER stress in retinal cell death. *Mol Vis.* 2007 Apr 5;13:578-87. PMID: 17438523; PMCID: PMC2652022.
52. Guillemin GJ. Quinolinic acid, the inescapable neurotoxin. *FEBS J.* 2012 Apr;279(8):1356-65. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08485.x. Epub 2012 Mar 27. PMID: 22248144.
53. Pierozan P, Biasibetti-Brendler H, Schmitz F, Ferreira F, Pessoa-Pureur R, Wyse ATS. Kynurenic Acid Prevents Cytoskeletal Disorganization Induced by Quinolinic Acid in Mixed Cultures of Rat Striatum. *Mol Neurobiol.* 2018 Jun;55(6):5111-5124. doi: 10.1007/s12035-017-0749-2. Epub 2017 Aug 24. PMID: 28840509.
54. Ferreira FS, Biasibetti-Brendler H, Pierozan P, Schmitz F, Bertó CG, Prezzi CA, Manfredini V, Wyse ATS. Kynurenic Acid Restores Nrf2 Levels and Prevents Quinolinic Acid-Induced Toxicity in Rat Striatal Slices. *Mol Neurobiol.* 2018 Nov;55(11):8538-8549. doi: 10.1007/s12035-018-1003-2. Epub 2018 Mar 21. PMID: 29564809.

55. Savitz J. The kynurenine pathway: a finger in every pie. *Mol Psychiatry*. 2020 Jan;25(1):131-147. doi: 10.1038/s41380-019-0414-4. Epub 2019 Apr 12. PMID: 30980044; PMCID: PMC6790159.
56. Rejdak R, Zarnowski T, Turski WA, Kocki T, Zagorski Z, Zrenner E, Schuettauf F. Alterations of kynurenic acid content in the retina in response to retinal ganglion cell damage. *Vision Res*. 2003 Mar;43(5):497-503. doi: 10.1016/s0042-6989(02)00682-x. PMID: 12594996.
57. Fiedorowicz M, Choragiewicz T, Thaler S, Schuettauf F, Nowakowska D, Wojtunik K, Reibaldi M, Avitabile T, Kocki T, Turski WA, Kaminska A, Grieb P, Zrenner E, Rejdak R, Toro MD. Tryptophan and Kynurenine Pathway Metabolites in Animal Models of Retinal and Optic Nerve Damage: Different Dynamics of Changes. *Front Physiol*. 2019 Oct 1;10:1254. doi: 10.3389/fphys.2019.01254. PMID: 31632294; PMCID: PMC6781742.
58. Nahomi RB, Nam MH, Rankenberg J, Rakete S, Houck JA, Johnson GC, Stankowska DL, Pantcheva MB, MacLean PS, Nagaraj RH. Kynurenic Acid Protects Against Ischemia/Reperfusion-Induced Retinal Ganglion Cell Death in Mice. *Int J Mol Sci*. 2020 Mar 5;21(5):1795. doi: 10.3390/ijms21051795. PMID: 32151061; PMCID: PMC7084183.
59. Harper MM, Woll AW, Evans LP, Delcau M, Akurathi A, Hedberg-Buenz A, Soukup DA, Boehme N, Hefti MM, Dutca LM, Anderson MG, Bassuk AG. Blast Preconditioning Protects Retinal Ganglion Cells and Reveals Targets for Prevention of Neurodegeneration Following Blast-Mediated Traumatic Brain Injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2019 Oct 1;60(13):4159-4170. doi: 10.1167/iovs.19-27565. PMID: 31598627; PMCID: PMC6785841.
60. Orhan F, Schwieler L, Engberg G, Samuelsson M. Kynurenine Metabolites in CSF and Plasma in Healthy Males. *Int J Tryptophan Res*. 2024 Apr 24;17:11786469241245323. doi: 10.1177/11786469241245323. PMID: 38665132; PMCID: PMC11044574.
61. Wang MM, Janz R, Belizaire R, Frishman LJ, Sherry DM. Differential distribution and developmental expression of synaptic vesicle protein 2 isoforms in the mouse retina. *J Comp Neurol*. 2003 May 19;460(1):106-22. doi: 10.1002/cne.10636. PMID: 12687700.
62. Chong RS, Martin KR. Glial cell interactions and glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol*. 2015 Mar;26(2):73-7. doi: 10.1097/ICU.0000000000000125. Erratum in: *Curr Opin Ophthalmol*. 2015 Nov;26(6):553. PMID: 25490529; PMCID: PMC4323570.
63. Vohra R, Kolko M. Neuroprotection of the inner retina: Müller cells and lactate. *Neural Regen Res*. 2018 Oct;13(10):1741-1742. doi: 10.4103/1673-5374.238612. PMID: 30136688; PMCID: PMC6128066.
64. Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN, Reichenbach A. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res*. 2006 Jul;25(4):397-424. doi: 10.1016/j.preteyeres.2006.05.003. Epub 2006 Jul 12. PMID: 16839797.
65. Colonna M, Butovsky O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu Rev Immunol*. 2017 Apr 26;35:441-468. doi: 10.1146/annurev-immunol-051116-052358. Epub 2017 Feb 9. PMID: 28226226; PMCID: PMC8167938.
66. Wang JW, Chen SD, Zhang XL, Jonas JB. Retinal Microglia in Glaucoma. *J Glaucoma*. 2016 May;25(5):459-65. doi: 10.1097/IJG.0000000000000200. PMID: 25646715.
67. Simons M, Nave KA. Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015 Jun 22;8(1):a020479. doi: 10.1101/cshperspect.a020479. PMID: 26101081; PMCID: PMC4691794.

68. Silverman SM, Wong WT. Microglia in the Retina: Roles in Development, Maturity, and Disease. *Annu Rev Vis Sci.* 2018 Sep 15;4:45-77. doi: 10.1146/annurev-vision-091517-034425. Epub 2018 May 31. PMID: 29852094.
69. Wei X, Cho KS, Thee EF, Jager MJ, Chen DF. Neuroinflammation and microglia in glaucoma: time for a paradigm shift. *J Neurosci Res.* 2019 Jan;97(1):70-76. doi: 10.1002/jnr.24256. Epub 2018 May 18. Erratum in: *J Neurosci Res.* 2019 Mar;97(3):374. doi: 10.1002/jnr.24381. PMID: 29775216; PMCID: PMC6239948.
70. Vecino E, Rodriguez FD, Ruzafa N, Pereiro X, Sharma SC. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res.* 2016 Mar;51:1-40. doi: 10.1016/j.preteyeres.2015.06.003. Epub 2015 Jun 23. PMID: 26113209.
71. de Hoz R, Rojas B, Ramírez AI, Salazar JJ, Gallego BI, Triviño A, Ramírez JM. Retinal Macrogial Responses in Health and Disease. *Biomed Res Int.* 2016;2016:2954721. doi: 10.1155/2016/2954721. Epub 2016 May 18. PMID: 27294114; PMCID: PMC4887628.
72. Reichenbach A, Bringmann A. New functions of Müller cells. *Glia.* 2013 May;61(5):651-78. doi: 10.1002/glia.22477. Epub 2013 Feb 26. PMID: 23440929.
73. Ola MS, Hosoya K, LaNoue KF. Regulation of glutamate metabolism by hydrocortisone and branched chain keto acids in cultured rat retinal Müller cells (TR-MUL). *Neurochem Int.* 2011 Oct;59(5):656-63. doi: 10.1016/j.neuint.2011.06.010. Epub 2011 Jul 3. PMID: 21756956.
74. Skytt DM, Toft-Kehler AK, Brændstrup CT, Cejvanovic S, Gurubaran IS, Bergersen LH, Kolko M. Glia-Neuron Interactions in the Retina Can Be Studied in Cocultures of Müller Cells and Retinal Ganglion Cells. *Biomed Res Int.* 2016;2016:1087647. doi: 10.1155/2016/1087647. Epub 2016 Jun 26. PMID: 27429974; PMCID: PMC4939199.
75. Kawasaki A, Otori Y, Barnstable CJ. Müller cell protection of rat retinal ganglion cells from glutamate and nitric oxide neurotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000 Oct;41(11):3444-50. PMID: 11006237.
76. Carter-Dawson L, Shen F, Harwerth RS, Smith EL 3rd, Crawford ML, Chuang A. Glutamine immunoreactivity in Müller cells of monkey eyes with experimental glaucoma. *Exp Eye Res.* 1998 May;66(5):537-45. doi: 10.1006/exer.1997.0447. PMID: 9628801.
77. Toft-Kehler AK, Skytt DM, Kolko M. A Perspective on the Müller Cell-Neuron Metabolic Partnership in the Inner Retina. *Mol Neurobiol.* 2018 Jun;55(6):5353-5361. doi: 10.1007/s12035-017-0760-7. Epub 2017 Sep 19. PMID: 28929338.
78. Vohra R, Tsai JC, Kolko M. The role of inflammation in the pathogenesis of glaucoma. *Surv Ophthalmol.* 2013 Jul-Aug;58(4):311-20. doi: 10.1016/j.survophthal.2012.08.010. PMID: 23768921.
79. Dahlmann-Noor AH, Vijay S, Limb GA, Khaw PT. Strategies for optic nerve rescue and regeneration in glaucoma and other optic neuropathies. *Drug Discov Today.* 2010 Apr;15(7-8):287-99. doi: 10.1016/j.drudis.2010.02.007. Epub 2010 Mar 1. PMID: 20197108.
80. Nomura-Komoike K, Saitoh F, Fujieda H. Phosphatidylserine recognition and Rac1 activation are required for Müller glia proliferation, gliosis and phagocytosis after retinal injury. *Sci Rep.* 2020 Jan 30;10(1):1488. doi: 10.1038/s41598-020-58424-6. PMID: 32001733; PMCID: PMC6992786.
81. Rashid K, Akhtar-Schaefer I, Langmann T. Microglia in Retinal Degeneration. *Front Immunol.* 2019 Aug 20;10:1975. doi: 10.3389/fimmu.2019.01975. PMID: 31481963; PMCID: PMC6710350.
82. Tehrani S, Davis L, Cepurna WO, Delf RK, Lozano DC, Choe TE, Johnson EC, Morrison JC. Optic Nerve Head Astrocytes Display Axon-Dependent and -Independent Reactivity in Response to Acutely Elevated Intraocular Pressure. *Invest Ophthalmol*

- Vis Sci. 2019 Jan 2;60(1):312-321. doi: 10.1167/iovs.18-25447. PMID: 30665231; PMCID: PMC6343680.
83. Jones EV, Bouvier DS. Astrocyte-secreted extracellular matrix proteins in CNS remodelling during development and disease. *Neural Plast.* 2014;2014:321209. doi: 10.1155/2014/321209. Epub 2014 Jan 16. PMID: 24551460; PMCID: PMC3914553.
 84. Vecino E, Rodriguez FD, Ruzafa N, Pereiro X, Sharma SC. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res.* 2016 Mar;51:1-40. doi: 10.1016/j.preteyeres.2015.06.003. Epub 2015 Jun 23. PMID: 26113209.
 85. Cooper ML, Collyer JW, Calkins DJ. Astrocyte remodeling without gliosis precedes optic nerve axonopathy. *Acta Neuropathol Commun.* 2018 May 10;6(1):38. doi: 10.1186/s40478-018-0542-0. PMID: 29747701; PMCID: PMC5946396.
 86. Nehlig A, Coles JA. Cellular pathways of energy metabolism in the brain: is glucose used by neurons or astrocytes? *Glia.* 2007 Sep;55(12):1238-1250. doi: 10.1002/glia.20376. PMID: 17659529.
 87. Perge JA, Koch K, Miller R, Sterling P, Balasubramanian V. How the optic nerve allocates space, energy capacity, and information. *J Neurosci.* 2009 Jun 17;29(24):7917-28. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5200-08.2009. PMID: 19535603; PMCID: PMC2928227.
 88. Cooper ML, Crish SD, Inman DM, Horner PJ, Calkins DJ. Early astrocyte redistribution in the optic nerve precedes axonopathy in the DBA/2J mouse model of glaucoma. *Exp Eye Res.* 2016 Sep;150:22-33. doi: 10.1016/j.exer.2015.11.016. Epub 2015 Dec 2. PMID: 26646560; PMCID: PMC4889569.
 89. Davis CH, Kim KY, Bushong EA, Mills EA, Boassa D, Shih T, Kinebuchi M, Phan S, Zhou Y, Bihlmeyer NA, Nguyen JV, Jin Y, Ellisman MH, Marsh-Armstrong N. Transcellular degradation of axonal mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Jul 1;111(26):9633-8. doi: 10.1073/pnas.1404651111. Epub 2014 Jun 16. PMID: 24979790; PMCID: PMC4084443.
 90. Boya P, Esteban-Martínez L, Serrano-Puebla A, Gómez-Sintes R, Villarejo-Zori B. Autophagy in the eye: Development, degeneration, and aging. *Prog Retin Eye Res.* 2016 Nov;55:206-245. doi: 10.1016/j.preteyeres.2016.08.001. Epub 2016 Aug 23. PMID: 27566190.
 91. Calkins DJ, Pekny M, Cooper ML, Benowitz L; Lasker/IRRF Initiative on Astrocytes and Glaucomatous Neurodegeneration Participants. The challenge of regenerative therapies for the optic nerve in glaucoma. *Exp Eye Res.* 2017 Apr;157:28-33. doi: 10.1016/j.exer.2017.01.007. Epub 2017 Jan 30. PMID: 28153739; PMCID: PMC5937264.
 92. Alqawlaq S, Flanagan JG, Sivak JM. All roads lead to glaucoma: Induced retinal injury cascades contribute to a common neurodegenerative outcome. *Exp Eye Res.* 2019 Jun;183:88-97. doi: 10.1016/j.exer.2018.11.005. Epub 2018 Nov 14. PMID: 30447198.
 93. Prasanna G, Krishnamoorthy R, Yorio T. Endothelin, astrocytes and glaucoma. *Exp Eye Res.* 2011 Aug;93(2):170-7. doi: 10.1016/j.exer.2010.09.006. Epub 2010 Sep 16. PMID: 20849847; PMCID: PMC3046320.
 94. Guttenplan KA, Stafford BK, El-Danaf RN, Adler DI, Münch AE, Weigel MK, Huberman AD, Liddelow SA. Neurotoxic Reactive Astrocytes Drive Neuronal Death after Retinal Injury. *Cell Rep.* 2020 Jun 23;31(12):107776. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107776. Erratum in: *Cell Rep.* 2024 Jun 25;43(6):114299. doi: 10.1016/j.celrep.2024.114299. PMID: 32579912; PMCID: PMC8091906.
 95. Jha MK, Morrison BM. Glia-neuron energy metabolism in health and diseases: New insights into the role of nervous system metabolic transporters. *Exp Neurol.* 2018 Nov;309:23-31. doi: 10.1016/j.expneurol.2018.07.009. Epub 2018 Jul 22. PMID: 30044944; PMCID: PMC6156776.

96. Davis CH, Marsh-Armstrong N. Discovery and implications of transcellular mitophagy. *Autophagy*. 2014;10(12):2383-4. doi: 10.4161/15548627.2014.981920. PMID: 25484086; PMCID: PMC4502649.
97. Wang R, Seifert P, Jakobs TC. Astrocytes in the Optic Nerve Head of Glaucomatous Mice Display a Characteristic Reactive Phenotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017 Feb 1;58(2):924-932. doi: 10.1167/iovs.16-20571. PMID: 28170536; PMCID: PMC5300248.
98. Liu B, Neufeld AH. Activation of epidermal growth factor receptor causes astrocytes to form cribriform structures. *Glia*. 2004 Apr 15;46(2):153-68. doi: 10.1002/glia.10358. PMID: 15042583.
99. García-Bermúdez MY, Freude KK, Mouhammad ZA, van Wijngaarden P, Martin KK, Kolko M. Glial Cells in Glaucoma: Friends, Foes, and Potential Therapeutic Targets. *Front Neurol*. 2021 Mar 16;12:624983. doi: 10.3389/fneur.2021.624983. PMID: 33796062; PMCID: PMC8007906.
100. Mozaffarieh M, Flammer J. Is there more to glaucoma treatment than lowering IOP? *Surv Ophthalmol*. 2007 Nov;52 Suppl 2:S174-9. doi: 10.1016/j.survophthal.2007.08.013. PMID: 17998043.
101. Chamberlain KA, Sheng ZH. Mechanisms for the maintenance and regulation of axonal energy supply. *J Neurosci Res*. 2019 Aug;97(8):897-913. doi: 10.1002/jnr.24411. Epub 2019 Mar 18. PMID: 30883896; PMCID: PMC6565461.
102. Philips T, Rothstein JD. Oligodendroglia: metabolic supporters of neurons. *J Clin Invest*. 2017 Sep 1;127(9):3271-3280. doi: 10.1172/JCI90610. Epub 2017 Sep 1. PMID: 28862639; PMCID: PMC5669561.
103. Shemer A, Scheyltjens I, Frumer GR, Kim JS, Grozovski J, Ayanaw S, Dassa B, Van Hove H, Chappell-Maor L, Boura-Halfon S, Leshkowitz D, Mueller W, Maggio N, Movahedi K, Jung S. Interleukin-10 Prevents Pathological Microglia Hyperactivation following Peripheral Endotoxin Challenge. *Immunity*. 2020 Nov 17;53(5):1033-1049. e7. doi: 10.1016/j.immuni.2020.09.018. Epub 2020 Oct 12. PMID: 33049219.
104. Lively S, Schlichter LC. Microglia Responses to Pro-inflammatory Stimuli (LPS, IFN γ +TNF α) and Reprogramming by Resolving Cytokines (IL-4, IL-10). *Front Cell Neurosci*. 2018 Jul 24;12:215. doi: 10.3389/fncel.2018.00215. PMID: 30087595; PMCID: PMC6066613.
105. Yi S, Jiang X, Tang X, Li Y, Xiao C, Zhang J, Zhou T. IL-4 and IL-10 promotes phagocytic activity of microglia by up-regulation of TREM2. *Cytotechnology*. 2020 Aug;72(4):589-602. doi: 10.1007/s10616-020-00409-4. Epub 2020 Jul 4. PMID: 32623621; PMCID: PMC7450013.
106. Dheen ST, Kaur C, Ling EA. Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr Med Chem*. 2007;14(11):1189-97. doi: 10.2174/092986707780597961. PMID: 17504139.
107. Hou L, Bao X, Zang C, Yang H, Sun F, Che Y, Wu X, Li S, Zhang D, Wang Q. Integrin CD11b mediates α -synuclein-induced activation of NADPH oxidase through a Rho-dependent pathway. *Redox Biol*. 2018 Apr;14:600-608. doi: 10.1016/j.redox.2017.11.010. Epub 2017 Nov 9. PMID: 29154191; PMCID: PMC5975218.
108. Ramirez AI, de Hoz R, Salobar-Garcia E, Salazar JJ, Rojas B, Ajoy D, López-Cuenca I, Rojas P, Triviño A, Ramírez JM. The Role of Microglia in Retinal Neurodegeneration: Alzheimer's Disease, Parkinson, and Glaucoma. *Front Aging Neurosci*. 2017 Jul 6;9:214. doi: 10.3389/fnagi.2017.00214. PMID: 28729832; PMCID: PMC5498525.
109. Zeng HY, Green WR, Tso MO. Microglial activation in human diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol*. 2008 Feb;126(2):227-32. doi: 10.1001/archophthalmol.2007.65. PMID: 18268214.

110. Karlstetter M, Scholz R, Rutar M, Wong WT, Provis JM, Langmann T. Retinal microglia: just bystander or target for therapy? *Prog Retin Eye Res.* 2015 Mar;45:30-57. doi: 10.1016/j.preteyeres.2014.11.004. Epub 2014 Dec 2. PMID: 25476242.
111. Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol.* 2006 Jan;147 Suppl 1(Suppl 1):S232-40. doi: 10.1038/sj.bjp.0706400. PMID: 16402109; PMCID: PMC1760754.
112. Madeira MH, Boia R, Santos PF, Ambrósio AF, Santiago AR. Contribution of microglia-mediated neuroinflammation to retinal degenerative diseases. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:673090. doi: 10.1155/2015/673090. Epub 2015 Mar 22. PMID: 25873768; PMCID: PMC4385698.
113. van Horsen J, Singh S, van der Pol S, Kipp M, Lim JL, Peferoen L, Gerritsen W, Kooi EJ, Witte ME, Geurts JJ, de Vries HE, Peferoen-Baert R, van den Elsen PJ, van der Valk P, Amor S. Clusters of activated microglia in normal-appearing white matter show signs of innate immune activation. *J Neuroinflammation.* 2012 Jul 2;9:156. doi: 10.1186/1742-2094-9-156. PMID: 22747960; PMCID: PMC3411485.
114. Yuan L, Neufeld AH. Activated microglia in the human glaucomatous optic nerve head. *J Neurosci Res.* 2001 Jun 1;64(5):523-32. doi: 10.1002/jnr.1104. PMID: 11391707.
115. Quigley HA, McKinnon SJ, Zack DJ, Pease ME, Kerrigan-Baumrind LA, Kerrigan DF, Mitchell RS. Retrograde axonal transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000 Oct;41(11):3460-6. PMID: 11006239.
116. Bringmann A, Wiedemann P. Müller glial cells in retinal disease. *Ophthalmologica.* 2012;227(1):1-19. doi: 10.1159/000328979. Epub 2011 Sep 15. PMID: 21921569.
117. Lorenzl S, Albers DS, Narr S, Chirichigno J, Beal MF. Expression of MMP-2, MMP-9, and MMP-1 and their endogenous counterregulators TIMP-1 and TIMP-2 in postmortem brain tissue of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2002 Nov;178(1):13-20. doi: 10.1006/exnr.2002.8019. PMID: 12460604.
118. Giebel SJ, Menicucci G, McGuire PG, Das A. Matrix metalloproteinases in early diabetic retinopathy and their role in alteration of the blood-retinal barrier. *Lab Invest.* 2005 May;85(5):597-607. doi: 10.1038/labinvest.3700251. PMID: 15711567.
119. Hsu JY, McKeon R, Goussev S, Werb Z, Lee JU, Trivedi A, Noble-Haussels LJ. Matrix metalloproteinase-2 facilitates wound healing events that promote functional recovery after spinal cord injury. *J Neurosci.* 2006 Sep 27;26(39):9841-50. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1993-06.2006. PMID: 17005848; PMCID: PMC2659718.
120. Deng Y, Lu J, Sivakumar V, Ling EA, Kaur C. Amoeboid microglia in the periventricular white matter induce oligodendrocyte damage through expression of proinflammatory cytokines via MAP kinase signaling pathway in hypoxic neonatal rats. *Brain Pathol.* 2008 Jul;18(3):387-400. doi: 10.1111/j.1750-3639.2008.00138.x. Epub 2008 Mar 26. PMID: 18371179; PMCID: PMC8095524.
121. Ma Y, Wang J, Wang Y, Yang GY. The biphasic function of microglia in ischemic stroke. *Prog Neurobiol.* 2017 Oct;157:247-272. doi: 10.1016/j.pneurobio.2016.01.005. Epub 2016 Feb 2. PMID: 26851161.
122. Jalal FY, Yang Y, Thompson J, Lopez AC, Rosenberg GA. Myelin loss associated with neuroinflammation in hypertensive rats. *Stroke.* 2012 Apr;43(4):1115-22. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.643080. Epub 2012 Feb 23. PMID: 22363061; PMCID: PMC3598597.
123. M K. Present and New Treatment Strategies in the Management of Glaucoma. *Open Ophthalmol J.* 2015 May 15;9:89-100. doi: 10.2174/1874364101509010089. PMID: 26069521; PMCID: PMC4460216.
124. Carter-Dawson L, Shen FF, Harwerth RS, Crawford ML, Smith EL 3rd, Whitetree A. Glutathione content is altered in Müller cells of monkey eyes with experimental

- glaucoma. *Neurosci Lett*. 2004 Jun 24;364(1):7-10. doi: 10.1016/j.neulet.2004.03.082. PMID: 15193745.
125. Coughlin BA, Feenstra DJ, Mohr S. Müller cells and diabetic retinopathy. *Vision Res*. 2017 Oct;139:93-100. doi: 10.1016/j.visres.2017.03.013. Epub 2017 Sep 5. PMID: 28866025; PMCID: PMC5794018.
 126. Sánchez-López E, Egea MA, Davis BM, Guo L, Espina M, Silva AM, Calpena AC, Souto EMB, Ravindran N, Ettcheto M, Camins A, Garcia ML, Cordeiro MF. Memantine-Loaded PEGylated Biodegradable Nanoparticles for the Treatment of Glaucoma. *Small*. 2018 Jan;14(2). doi: 10.1002/sml.201701808. Epub 2017 Nov 20. PMID: 29154484.
 127. Guo S, Wang H, Yin Y. Microglia Polarization From M1 to M2 in Neurodegenerative Diseases. *Front Aging Neurosci*. 2022 Feb 16;14:815347. doi: 10.3389/fnagi.2022.815347. PMID: 35250543; PMCID: PMC8888930.
 128. Suzuki T, Hide I, Ido K, Kohsaka S, Inoue K, Nakata Y. Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. *J Neurosci*. 2004 Jan 7;24(1):1-7. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3792-03.2004. PMID: 14715932; PMCID: PMC6729576.
 129. Liddel SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, Bennett ML, Münch AE, Chung WS, Peterson TC, Wilton DK, Frouin A, Napier BA, Panicker N, Kumar M, Buckwalter MS, Rowitch DH, Dawson VL, Dawson TM, Stevens B, Barres BA. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*. 2017 Jan 26;541(7638):481-487. doi: 10.1038/nature21029. Epub 2017 Jan 18. PMID: 28099414; PMCID: PMC5404890.
 130. Johnson TV, Di Polo A, Sahel JA, Schuman JS. Neuroprotection, Neuroenhancement, and Neuroregeneration of the Retina and Optic Nerve. *Ophthalmol Sci*. 2022 Sep 5;2(3):100216. doi: 10.1016/j.xops.2022.100216. PMID: 36245765; PMCID: PMC9559091.
 131. Sluch VM, Davis CH, Ranganathan V, Kerr JM, Krick K, Martin R, Berlinicke CA, Marsh-Armstrong N, Diamond JS, Mao HQ, Zack DJ. Differentiation of human ESCs to retinal ganglion cells using a CRISPR engineered reporter cell line. *Sci Rep*. 2015 Nov 13;5:16595. doi: 10.1038/srep16595. PMID: 26563826; PMCID: PMC4643248.
 132. Lamba DA, Karl MO, Ware CB, Reh TA. Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Aug 22;103(34):12769-74. doi: 10.1073/pnas.0601990103. Epub 2006 Aug 14. PMID: 16908856; PMCID: PMC1568922.
 133. Miltner AM, La Torre A. Retinal Ganglion Cell Replacement: Current Status and Challenges Ahead. *Dev Dyn*. 2019 Jan;248(1):118-128. doi: 10.1002/dvdy.24672. Epub 2018 Oct 11. PMID: 30242792; PMCID: PMC7141838.
 134. Hertz J, Qu B, Hu Y, Patel RD, Valenzuela DA, Goldberg JL. Survival and integration of developing and progenitor-derived retinal ganglion cells following transplantation. *Cell Transplant*. 2014;23(7):855-72. doi: 10.3727/096368913X667024. Epub 2013 Apr 29. PMID: 23636049.
 135. Venugopalan P, Wang Y, Nguyen T, Huang A, Muller KJ, Goldberg JL. Transplanted neurons integrate into adult retinas and respond to light. *Nat Commun*. 2016 Feb 4;7:10472. doi: 10.1038/ncomms10472. PMID: 26843334; PMCID: PMC4742891.
 136. Johnson TV, Bull ND, Martin KR. Identification of barriers to retinal engraftment of transplanted stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010 Feb;51(2):960-70. doi: 10.1167/iops.09-3884. Epub 2009 Oct 22. PMID: 19850833; PMCID: PMC2868445.
 137. Pernet V, Joly S, Dalkara D, Jordi N, Schwarz O, Christ F, Schaffer DV, Flannery JG, Schwab ME. Long-distance axonal regeneration induced by CNTF gene transfer is

- impaired by axonal misguidance in the injured adult optic nerve. *Neurobiol Dis.* 2013 Mar;51:202-13. doi: 10.1016/j.nbd.2012.11.011. Epub 2012 Nov 27. PMID: 23194670.
138. Liu J, Chang L, Song Y, Li H, Wu Y. The Role of NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci.* 2019 Feb 8;13:43. doi: 10.3389/fnins.2019.00043. PMID: 30800052; PMCID: PMC6375899.
 139. Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS, Jacobsen C, Kliemann M, Schwarz E, Willnow TE, Hempstead BL, Petersen CM. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature.* 2004 Feb 26;427(6977):843-8. doi: 10.1038/nature02319. PMID: 14985763.
 140. Cui Q. Actions of neurotrophic factors and their signaling pathways in neuronal survival and axonal regeneration. *Mol Neurobiol.* 2006 Apr;33(2):155-79. doi: 10.1385/MN:33:2:155. PMID: 16603794.
 141. Roberti G, Mantelli F, Macchi I, Massaro-Giordano M, Centofanti M. Nerve growth factor modulation of retinal ganglion cell physiology. *J Cell Physiol.* 2014 Sep;229(9):1130-3. doi: 10.1002/jcp.24573. PMID: 24501088.
 142. Frade JM, Rodriguez-Tébar A, Barde YA. Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature.* 1996 Sep 12;383(6596):166-8. doi: 10.1038/383166a0. PMID: 8774880.
 143. Almasieh M, Wilson AM, Morquette B, Cueva Vargas JL, Di Polo A. The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma. *Prog Retin Eye Res.* 2012 Mar;31(2):152-81. doi: 10.1016/j.preteyeres.2011.11.002. Epub 2011 Dec 4. PMID: 22155051.
 144. Harrington AW, Ginty DD. Long-distance retrograde neurotrophic factor signalling in neurons. *Nat Rev Neurosci.* 2013 Mar;14(3):177-87. doi: 10.1038/nrn3253. PMID: 23422909.
 145. Benowitz LI, Yin Y. Optic nerve regeneration. *Arch Ophthalmol.* 2010 Aug;128(8):1059-64. doi: 10.1001/archophthalmol.2010.152. PMID: 20697009; PMCID: PMC3072887.
 146. Guo L, Davis BM, Ravindran N, Galvao J, Kapoor N, Haamedi N, Shamsher E, Luong V, Fico E, Cordeiro MF. Topical recombinant human Nerve growth factor (rh-NGF) is neuroprotective to retinal ganglion cells by targeting secondary degeneration. *Sci Rep.* 2020 Feb 25;10(1):3375. doi: 10.1038/s41598-020-60427-2. PMID: 32099056; PMCID: PMC7042238.
 147. Weibel D, Kreutzberg GW, Schwab ME. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) prevents lesion-induced axonal die-back in young rat optic nerve. *Brain Res.* 1995 May 15;679(2):249-54. doi: 10.1016/0006-8993(95)00238-1. PMID: 7543356.
 148. Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ. Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Mar 1;91(5):1632-6. doi: 10.1073/pnas.91.5.1632. PMID: 8127857; PMCID: PMC43217.
 149. Chou R, Dana T, Blazina I, Daeges M, Jeanne TL. Statins for Prevention of Cardiovascular Disease in Adults: Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. *JAMA.* 2016 Nov 15;316(19):2008-2024. doi: 10.1001/jama.2015.15629. Erratum in: *JAMA.* 2020 Feb 18;323(7):669. doi: 10.1001/jama.2020.0298. PMID: 27838722.
 150. Posch-Pertl L, Michelitsch M, Wagner G, Wildner B, Silbernagel G, Pregartner G, Wedrich A. Cholesterol and glaucoma: a systematic review and meta-analysis. *Acta Ophthalmol.* 2022 Mar;100(2):148-158. doi: 10.1111/aos.14769. Epub 2021 Jan 28. PMID: 33506616; PMCID: PMC9292534.
 151. Kim JA, Kim TW, Weinreb RN, Lee EJ, Girard MJA, Mari JM. Lamina Cribrosa Morphology Predicts Progressive Retinal Nerve Fiber Layer Loss In Eyes with Suspected Glaucoma. *Sci Rep.* 2018 Jan 15;8(1):738. doi: 10.1038/s41598-017-17843-8. PMID: 29335420; PMCID: PMC5768684.

152. Whigham B, Oddone EZ, Woolson S, Coffman C, Allingham RR, Shieh C, Muir KW. The influence of oral statin medications on progression of glaucomatous visual field loss: A propensity score analysis. *Ophthalmic Epidemiol.* 2018 Jun;25(3):207-214. doi: 10.1080/09286586.2017.1399427. Epub 2017 Nov 27. PMID: 29172840.
153. Kang JM, Jammal AA, Medeiros FA. Association between statin use and rates of structural and functional loss in glaucoma. *Br J Ophthalmol.* 2023 Sep;107(9):1269-1274. doi: 10.1136/bjophthalmol-2021-320734. Epub 2022 May 10. PMID: 35537803; PMCID: PMC10287059.
154. Yuan Y, Xiong R, Wu Y, Ha J, Wang W, Han X, He M. Associations of statin use with the onset and progression of open-angle glaucoma: A systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine.* 2022 Apr 5;46:101364. doi: 10.1016/j.eclinm.2022.101364. PMID: 35399812; PMCID: PMC8987630.
155. Kuo CY, Liu CJ. Neuroprotection in Glaucoma: Basic Aspects and Clinical Relevance. *J Pers Med.* 2022 Nov 10;12(11):1884. doi: 10.3390/jpm12111884. PMID: 36579616; PMCID: PMC9697907.
156. Ribas VT, Koch JC, Michel U, Bähr M, Lingor P. Attenuation of Axonal Degeneration by Calcium Channel Inhibitors Improves Retinal Ganglion Cell Survival and Regeneration After Optic Nerve Crush. *Mol Neurobiol.* 2017 Jan;54(1):72-86. doi: 10.1007/s12035-015-9676-2. Epub 2016 Jan 5. PMID: 26732591.
157. Yilmaz KC, Sur Gungor S, Ciftci O, Akman A, Muderrisoglu H. Relationship between primary open angle glaucoma and blood pressure. *Acta Cardiol.* 2020 Feb;75(1):54-58. doi: 10.1080/00015385.2018.1549004. Epub 2019 Jan 16. PMID: 30650042.
158. Wheeler LA, Woldemussie E. Alpha-2 adrenergic receptor agonists are neuroprotective in experimental models of glaucoma. *Eur J Ophthalmol.* 2001 Jul-Sep;11 Suppl 2:S30-5. doi: 10.1177/112067210101102s03. PMID: 11592528.
159. Gao H, Qiao X, Cantor LB, WuDunn D. Up-regulation of brain-derived neurotrophic factor expression by brimonidine in rat retinal ganglion cells. *Arch Ophthalmol.* 2002 Jun;120(6):797-803. doi: 10.1001/archoph.120.6.797. PMID: 12049586.
160. Fukuyama K, Tanahashi S, Nakagawa M, Yamamura S, Motomura E, Shiroyama T, Tani H, Okada M. Levetiracetam inhibits neurotransmitter release associated with CICR. *Neurosci Lett.* 2012 Jun 19;518(2):69-74. doi: 10.1016/j.neulet.2012.03.056. Epub 2012 Mar 28. PMID: 22484014.
161. Fukuyama K, Okada M. Effects of levetiracetam on astroglial release of kynurenine-pathway metabolites. *Br J Pharmacol.* 2018 Nov;175(22):4253-4265. doi: 10.1111/bph.14491. Epub 2018 Oct 6. PMID: 30153331; PMCID: PMC6193875.
162. Wheeler LA, Lai R, Woldemussie E. From the lab to the clinic: activation of an alpha-2 agonist pathway is neuroprotective in models of retinal and optic nerve injury. *Eur J Ophthalmol.* 1999 Jan-Mar;9 Suppl 1:S17-21. doi: 10.1177/112067219900901S09. PMID: 10230601.
163. Ogidigben M, Chu TC, Potter DE. Alpha-2 adrenoceptor mediated changes in aqueous dynamics: effect of pertussis toxin. *Exp Eye Res.* 1994 Jun;58(6):729-36. doi: 10.1006/exer.1994.1070. PMID: 7925712.
164. Toris CB, Camras CB, Yablonski ME. Acute versus chronic effects of brimonidine on aqueous humor dynamics in ocular hypertensive patients. *Am J Ophthalmol.* 1999 Jul;128(1):8-14. doi: 10.1016/s0002-9394(99)00076-8. PMID: 10482088.
165. Lambert WS, Ruiz L, Crish SD, Wheeler LA, Calkins DJ. Brimonidine prevents axonal and somatic degeneration of retinal ganglion cell neurons. *Mol Neurodegener.* 2011 Jan 13;6(1):4. doi: 10.1186/1750-1326-6-4. PMID: 21232114; PMCID: PMC3035592.
166. Degos V, Charpentier TL, Chhor V, Brissaud O, Lebon S, Schwendimann L, Bednareck N, Passemard S, Mantz J, Gressens P. Neuroprotective effects of dexmedetomidine against glutamate agonist-induced neuronal cell death are related to increased astrocyte

- brain-derived neurotrophic factor expression. *Anesthesiology*. 2013 May;118(5):1123-32. doi: 10.1097/ALN.0b013e318286cf36. PMID: 23353792.
167. Lee KY, Nakayama M, Aihara M, Chen YN, Araie M. Brimonidine is neuroprotective against glutamate-induced neurotoxicity, oxidative stress, and hypoxia in purified rat retinal ganglion cells. *Mol Vis*. 2010 Feb 17;16:246-51. PMID: 20161817; PMCID: PMC2822551.
 168. Fu L, Kwok SS, Chan YK, Ming Lai JS, Pan W, Nie L, Shih KC. Therapeutic Strategies for Attenuation of Retinal Ganglion Cell Injury in Optic Neuropathies: Concepts in Translational Research and Therapeutic Implications. *Biomed Res Int*. 2019 Nov 11;2019:8397521. doi: 10.1155/2019/8397521. PMID: 31828134; PMCID: PMC6885158.
 169. Dong CJ, Guo Y, Agey P, Wheeler L, Hare WA. Alpha2 adrenergic modulation of NMDA receptor function as a major mechanism of RGC protection in experimental glaucoma and retinal excitotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008 Oct;49(10):4515-22. doi: 10.1167/iops.08-2078. Epub 2008 Jun 19. PMID: 18566471.
 170. Nizari S, Guo L, Davis BM, Normando EM, Galvao J, Turner LA, Bizrah M, Dehabadi M, Tian K, Cordeiro MF. Non-amyloidogenic effects of $\alpha 2$ adrenergic agonists: implications for brimonidine-mediated neuroprotection. *Cell Death Dis*. 2016 Dec 8;7(12):e2514. doi: 10.1038/cddis.2016.397. PMID: 27929541; PMCID: PMC5260990.
 171. Lafuente MP, Villegas-Pérez MP, Sobrado-Calvo P, García-Avilés A, Miralles de Imperial J, Vidal-Sanz M. Neuroprotective effects of alpha(2)-selective adrenergic agonists against ischemia-induced retinal ganglion cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001 Aug;42(9):2074-84. PMID: 11481275.
 172. Vidal-Sanz M, Lafuente MP, Mayor S, de Imperial JM, Villegas-Pérez MP. Retinal ganglion cell death induced by retinal ischemia. neuroprotective effects of two alpha-2 agonists. *Surv Ophthalmol*. 2001 May;45 Suppl 3:S261-7; discussion S273-6. doi: 10.1016/s0039-6257(01)00205-3. PMID: 11377446.
 173. Lai RK, Chun T, Hasson D, Lee S, Mehrbod F, Wheeler L. Alpha-2 adrenoceptor agonist protects retinal function after acute retinal ischemic injury in the rat. *Vis Neurosci*. 2002 Mar-Apr;19(2):175-85. doi: 10.1017/s0952523802191152. PMID: 12385629.
 174. Galindo-Romero C, Harun-Or-Rashid M, Jiménez-López M, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M, Hallböök F. Neuroprotection by $\alpha 2$ -Adrenergic Receptor Stimulation after Excitotoxic Retinal Injury: A Study of the Total Population of Retinal Ganglion Cells and Their Distribution in the Chicken Retina. *PLoS One*. 2016 Sep 9;11(9):e0161862. doi: 10.1371/journal.pone.0161862. PMID: 27611432; PMCID: PMC5017579.
 175. WoldeMussie E, Ruiz G, Wijono M, Wheeler LA. Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001 Nov;42(12):2849-55. PMID: 11687528.
 176. 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 May;86(5):798-806. doi: 10.1016/j.exer.2008.02.008. Epub 2008 Mar 4. PMID: 18394603.
 177. Yoles E, Wheeler LA, Schwartz M. Alpha2-adrenoreceptor agonists are neuroprotective in a rat model of optic nerve degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999 Jan;40(1):65-73. Erratum in: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 199 Oct;40(11):2470. PMID: 9888428.
 178. Saylor M, McLoon LK, Harrison AR, Lee MS. Experimental and clinical evidence for brimonidine as an optic nerve and retinal neuroprotective agent: an evidence-based review. *Arch Ophthalmol*. 2009 Apr;127(4):402-6. doi: 10.1001/archophthalmol.2009.9. PMID: 19365015.
 179. Krupin T, Liebmann JM, Greenfield DS, Ritch R, Gardiner S; Low-Pressure Glaucoma Study Group. A randomized trial of brimonidine versus timolol in preserving visual

- function: results from the Low-Pressure Glaucoma Treatment Study. *Am J Ophthalmol*. 2011 Apr;151(4):671-81. doi: 10.1016/j.ajo.2010.09.026. Epub 2011 Jan 22. Erratum in: *Am J Ophthalmol*. 2011 Jun;151(6):1108. PMID: 21257146.
180. Ferencz JR, Gilady G, Harel O, Belkin M, Assia EI. Topical brimonidine reduces collateral damage caused by laser photocoagulation for choroidal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2005 Sep;243(9):877-80. doi: 10.1007/s00417-005-1160-7. Epub 2005 Mar 23. PMID: 15785924.
 181. Merin S, Obolensky A, Farber MD, Chowers I. A pilot study of topical treatment with an alpha2-agonist in patients with retinal dystrophies. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2008 Feb;24(1):80-6. doi: 10.1089/jop.2007.0022. PMID: 18201138.
 182. Mondal LK, Baidya KP, Bhattacharya B, Chatterjee PR, Bhaduri G. The efficacy of topical administration of brimonidine to reduce ischaemia in the very early stage of diabetic retinopathy in good controlled type-2 diabetes mellitus. *J Indian Med Assoc*. 2004 Dec;102(12):724-5, 729. PMID: 15871360.
 183. Wilhelm B, Lüdtke H, Wilhelm H; BRAION Study Group. Efficacy and tolerability of 0.2 % brimonidine tartrate for the treatment of acute non-arteritic ischemic optic neuropathy (NAION): a 3-month, double-masked, randomised, placebo-controlled trial. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2006 May;244(5):551-8. doi: 10.1007/s00417-005-0102-8. Epub 2005 Sep 8. PMID: 16151785.
 184. Freeman WR, Bandello F, Souied E, Guymer RH, Garg SJ, Chen FK, Rich R, Holz FG, Patel SS, Kim K, López FJ; BEACON Study Group. Randomized Phase IIB Study of Brimonidine Drug Delivery System Generation 2 for Geographic Atrophy in Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmol Retina*. 2023 Jul;7(7):573-585. doi: 10.1016/j.oret.2023.03.001. Epub 2023 Mar 10. PMID: 36906177.
 185. Cvenkel B, Kolko M. Current Medical Therapy and Future Trends in the Management of Glaucoma Treatment. *J Ophthalmol*. 2020 Jul 21;2020:6138132. doi: 10.1155/2020/6138132. PMID: 32774906; PMCID: PMC7391108.
 186. Jung KI, Kim JH, Park CK. α 2-Adrenergic modulation of the glutamate receptor and transporter function in a chronic ocular hypertension model. *Eur J Pharmacol*. 2015 Oct 15;765:274-83. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.08.035. Epub 2015 Aug 20. PMID: 26300392.
 187. Parsons CG, Gruner R, Rozental J, Millar J, Lodge D. Patch clamp studies on the kinetics and selectivity of N-methyl-D-aspartate receptor antagonism by memantine (1-amino-3,5-dimethyladamantan). *Neuropharmacology*. 1993 Dec;32(12):1337-50. doi: 10.1016/0028-3908(93)90029-3. PMID: 8152525.
 188. Schanne FA, Kane AB, Young EE, Farber JL. Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science*. 1979 Nov 9;206(4419):700-2. doi: 10.1126/science.386513. PMID: 386513.
 189. Torrez VR, Zimmer ER, Kalinine E, Haas CB, Zenki KC, Muller AP, Souza DO, Portela LV. Memantine mediates astrocytic activity in response to excitotoxicity induced by PP2A inhibition. *Neurosci Lett*. 2019 Mar 23;696:179-183. doi: 10.1016/j.neulet.2018.12.034. Epub 2018 Dec 23. PMID: 30586637.
 190. Wu HM, Tzeng NS, Qian L, Wei SJ, Hu X, Chen SH, Rawls SM, Flood P, Hong JS, Lu RB. Novel neuroprotective mechanisms of memantine: increase in neurotrophic factor release from astroglia and anti-inflammation by preventing microglial activation. *Neuropsychopharmacology*. 2009 Sep;34(10):2344-57. doi: 10.1038/npp.2009.64. Epub 2009 Jun 17. PMID: 19536110; PMCID: PMC3655438.
 191. Chen PS, Peng GS, Li G, Yang S, Wu X, Wang CC, Wilson B, Lu RB, Gean PW, Chuang DM, Hong JS. Valproate protects dopaminergic neurons in midbrain neuron/glia cultures by stimulating the release of neurotrophic factors from astrocytes. *Mol*

- Psychiatry. 2006 Dec;11(12):1116-25. doi: 10.1038/sj.mp.4001893. Epub 2006 Sep 12. PMID: 16969367.
192. Hare WA, Wheeler L. Experimental glutamatergic excitotoxicity in rabbit retinal ganglion cells: block by memantine. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009 Jun;50(6):2940-8. doi: 10.1167/iovs.08-2103. Epub 2009 Jan 10. PMID: 19136701.
 193. Yücel YH, Gupta N, Zhang Q, Mizisin AP, Kalichman MW, Weinreb RN. Memantine protects neurons from shrinkage in the lateral geniculate nucleus in experimental glaucoma. *Arch Ophthalmol.* 2006 Feb;124(2):217-25. doi: 10.1001/archophth.124.2.217. PMID: 16476892.
 194. Osborne NN. Recent clinical findings with memantine should not mean that the idea of neuroprotection in glaucoma is abandoned. *Acta Ophthalmol.* 2009 Jun;87(4):450-4. doi: 10.1111/j.1755-3768.2008.01459.x. Epub 2009 Jan 9. PMID: 19141144.
 195. Berkovic SF, Knowlton RC, Leroy RF, Schiemann J, Falter U; Levetiracetam N01057 Study Group. Placebo-controlled study of levetiracetam in idiopathic generalized epilepsy. *Neurology.* 2007 Oct 30;69(18):1751-60. doi: 10.1212/01.wnl.0000268699.34614.d3. Epub 2007 Jul 11. PMID: 17625106.
 196. De Smedt T, Raedt R, Vonck K, Boon P. Levetiracetam: part II, the clinical profile of a novel anticonvulsant drug. *CNS Drug Rev.* 2007 Spring;13(1):57-78. doi: 10.1111/j.1527-3458.2007.00005.x. PMID: 17461890; PMCID: PMC6494152.
 197. Sendrowski K, Boćkowski L, Sobaniec W, Ilendo E, Jaworowska B, Smigielska-Kuzia J. Levetiracetam protects hippocampal neurons in culture against hypoxia-induced injury. *Folia Histochem Cytobiol.* 2011;49(1):148-52. doi: 10.5603/fhc.2011.0021. PMID: 21526502.
 198. Yan BC, Shen H, Zhang Y, Zhu X, Wang J, Xu P, Jiang D, Yu X. The antiepileptic drug levetiracetam promotes neuroblast differentiation and expression of superoxide dismutase in the mouse hippocampal dentate gyrus via PI3K/Akt signalling. *Neurosci Lett.* 2018 Jan 1;662:84-90. doi: 10.1016/j.neulet.2017.10.010. Epub 2017 Oct 9. PMID: 29024726.
 199. Lynch BA, Lambeng N, Nocka K, Kensel-Hammes P, Bajjalieh SM, Matagne A, Fuks B. The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jun 29;101(26):9861-6. doi: 10.1073/pnas.0308208101. Epub 2004 Jun 21. PMID: 15210974; PMCID: PMC470764.
 200. Carunchio I, Pieri M, Ciotti MT, Albo F, Zona C. Modulation of AMPA receptors in cultured cortical neurons induced by the antiepileptic drug levetiracetam. *Epilepsia.* 2007 Apr;48(4):654-62. doi: 10.1111/j.1528-1167.2006.00973.x. Epub 2007 Feb 5. PMID: 17284293.
 201. Rogawski M. Principles of antiepileptic drug action. In: Mattson RH, Meldrum B, Perucca E, editors. *Antiepileptic Drugs.* 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002. p. 3–22.
 202. Pal S, Sun D, Limbrick D, Rafiq A, DeLorenzo RJ. Epileptogenesis induces long-term alterations in intracellular calcium release and sequestration mechanisms in the hippocampal neuronal culture model of epilepsy. *Cell Calcium.* 2001 Oct;30(4):285-96. doi: 10.1054/ceca.2001.0236. PMID: 11587552.
 203. Li Y, Schlamp CL, Nickells RW. Experimental induction of retinal ganglion cell death in adult mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999 Apr;40(5):1004-8. PMID: 10102300.
 204. Liu X, Feng L, Shinde I, Cole JD, Troy JB, Saggere L. Correlation between retinal ganglion cell loss and nerve crush force-impulse established with instrumented tweezers in mice. *Neurol Res.* 2020 May;42(5):379-386. doi: 10.1080/01616412.2020.1733322. Epub 2020 Feb 26. PMID: 32100638; PMCID: PMC7113087.

205. Norat P, Gao J, Soldozy S, Zhang HF, Liu X. A standardized crush tool to produce consistent retinal ganglion cell damage in mice. *Neural Regen Res.* 2021 Jul;16(7):1442-1443. doi: 10.4103/1673-5374.301015. PMID: 33318446; PMCID: PMC8284260.
206. Tran NM, Shekhar K, Whitney IE, Jacobi A, Benhar I, Hong G, Yan W, Adiconis X, Arnold ME, Lee JM, Levin JZ, Lin D, Wang C, Lieber CM, Regev A, He Z, Sanes JR. Single-Cell Profiles of Retinal Ganglion Cells Differing in Resilience to Injury Reveal Neuroprotective Genes. *Neuron.* 2019 Dec 18;104(6):1039-1055.e12. doi: 10.1016/j.neuron.2019.11.006. Epub 2019 Nov 26. PMID: 31784286; PMCID: PMC6923571.
207. Y. Li, C.L. Schlamp, R.W. Nickells; Variable Susceptibility of Ganglion Cells to Optic Nerve Crush in Inbred Mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003;44(13):1131.
208. Kalesnykas G, Oglesby EN, Zack DJ, Cone FE, Steinhart MR, Tian J, Pease ME, Quigley HA. Retinal ganglion cell morphology after optic nerve crush and experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012 Jun 22;53(7):3847-57. doi: 10.1167/iovs.12-9712. PMID: 22589442; PMCID: PMC3630905.
209. Pang IH, Clark AF. Inducible rodent models of glaucoma. *Prog Retin Eye Res.* 2020 Mar;75:100799. doi: 10.1016/j.preteyeres.2019.100799. Epub 2019 Sep 23. PMID: 31557521; PMCID: PMC7085984.
210. Sappington RM, Carlson BJ, Crish SD, Calkins DJ. The microbead occlusion model: a paradigm for induced ocular hypertension in rats and mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010 Jan;51(1):207-16. doi: 10.1167/iovs.09-3947. Epub 2009 Oct 22. PMID: 19850836; PMCID: PMC2869054.
211. Danias J, Shen F, Kavalarakis M, Chen B, Goldblum D, Lee K, Zamora MF, Su Y, Brodie SE, Podos SM, Mittag T. Characterization of retinal damage in the episcleral vein cauterization rat glaucoma model. *Exp Eye Res.* 2006 Feb;82(2):219-28. doi: 10.1016/j.exer.2005.06.013. Epub 2005 Aug 16. Erratum in: *Exp Eye Res.* 2006 Oct;83(4):1002. Brodie, Scott E [added]. PMID: 16109406; PMCID: PMC1401487.
212. Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Martin KR, Valenta D, Baumrind LA, Pease ME. Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002 Feb;43(2):402-10. PMID: 11818384.
213. Cammalleri M. Optic nerve crush as a model of retinal ganglion cell degeneration. *Ann Eye Sci.* 2022 Jun 1;7.
214. Matthews JN, Badi NH. Inconsistent treatment estimates from mis-specified logistic regression analyses of randomized trials. *Stat Med.* 2015 Aug 30;34(19):2681-94. doi: 10.1002/sim.6508. Epub 2015 Apr 14. Erratum in: *Stat Med.* 2017 Nov 30;36(27):4418. doi: 10.1002/sim.7417. PMID: 25869059.
215. Freedman DA. Randomization does not justify logistic regression. *Statistical Science.* 2008;23(2):237-49.
216. Ma K, Xu L, Zhang H, Zhang S, Pu M, Jonas JB. Effect of brimonidine on retinal ganglion cell survival in an optic nerve crush model. *Am J Ophthalmol.* 2009 Feb;147(2):326-31. doi: 10.1016/j.ajo.2008.08.005. Epub 2008 Oct 4. PMID: 18835468.
217. Bin C, Xiaohui W, Mengrou S, Xin L, Ting Z, Ping G. Preliminary evaluation of the efficacy and safety of brimonidine for general anesthesia. *BMC Anesthesiol.* 2021 Dec 3;21(1):305. doi: 10.1186/s12871-021-01516-1. PMID: 34861822; PMCID: PMC8641169.
218. Lafuente MP, Villegas-Pérez MP, Mayor S, Aguilera ME, Miralles de Imperial J, Vidal-Sanz M. Neuroprotective effects of brimonidine against transient ischemia-induced retinal ganglion cell death: a dose response in vivo study. *Exp Eye Res.* 2002 Feb;74(2):181-9. doi: 10.1006/exer.2001.1122. PMID: 11950228.
219. Valiente-Soriano FJ, Ortin-Martínez A, Di Pierdomenico J, García-Ayuso D, Gallego-Ortega A, Miralles de Imperial-Ollero JA, Jiménez-López M, Villegas-Pérez MP, Wheeler LA, Vidal-Sanz M. Topical Brimonidine or Intravitreal BDNF, CNTF, or bFGF

- Protect Cones Against Phototoxicity. *Transl Vis Sci Technol.* 2019 Dec 16;8(6):36. doi: 10.1167/tvst.8.6.36. PMID: 31890348; PMCID: PMC6919195.
220. Urcola JH, Hernández M, Vecino E. Three experimental glaucoma models in rats: comparison of the effects of intraocular pressure elevation on retinal ganglion cell size and death. *Exp Eye Res.* 2006 Aug;83(2):429-37. doi: 10.1016/j.exer.2006.01.025. Epub 2006 May 6. PMID: 16682027.
 221. Ahmed FA, Chaudhary P, Sharma SC. Effects of increased intraocular pressure on rat retinal ganglion cells. *Int J Dev Neurosci.* 2001 Apr;19(2):209-18. doi: 10.1016/s0736-5748(00)00073-3. PMID: 11255034.
 222. Weber AJ, Zelenak D. Experimental glaucoma in the primate induced by latex microspheres. *J Neurosci Methods.* 2001 Oct 15;111(1):39-48. doi: 10.1016/s0165-0270(01)00443-5. PMID: 11574118.
 223. Zhao X, Sun R, Luo X, Wang F, Sun X. The Interaction Between Microglia and Macroglia in Glaucoma. *Front Neurosci.* 2021 May 28;15:610788. doi: 10.3389/fnins.2021.610788. PMID: 34121982; PMCID: PMC8193936.
 224. Ganesh BS, Chintala SK. Inhibition of reactive gliosis attenuates excitotoxicity-mediated death of retinal ganglion cells. *PLoS One.* 2011 Mar 31;6(3):e18305. doi: 10.1371/journal.pone.0018305. PMID: 21483783; PMCID: PMC3069086.
 225. Halassa MM, Fellin T, Haydon PG. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med.* 2007 Feb;13(2):54-63. doi: 10.1016/j.molmed.2006.12.005. Epub 2007 Jan 4. PMID: 17207662.
 226. Halassa MM, Fellin T, Haydon PG. Tripartite synapses: roles for astrocytic purines in the control of synaptic physiology and behavior. *Neuropharmacology.* 2009 Sep;57(4):343-6. doi: 10.1016/j.neuropharm.2009.06.031. Epub 2009 Jul 3. PMID: 19577581; PMCID: PMC3190118.
 227. Neufeld AH, Liu B. Glaucomatous optic neuropathy: when glia misbehave. *Neuroscientist.* 2003 Dec;9(6):485-95. doi: 10.1177/1073858403253460. PMID: 14678581.
 228. Tang Y, Chen Y, Chen D. The heterogeneity of astrocytes in glaucoma. *Front Neuroanat.* 2022 Nov 17;16:995369. doi: 10.3389/fnana.2022.995369. PMID: 36466782; PMCID: PMC9714578.
 229. Gao L, Chen X, Tang Y, Zhao J, Li Q, Fan X, Xu H, Yin ZQ. Neuroprotective effect of memantine on the retinal ganglion cells of APP^{sw}/PS1 Δ E9 mice and its immunomodulatory mechanisms. *Exp Eye Res.* 2015 Jun;135:47-58. doi: 10.1016/j.exer.2015.04.013. Epub 2015 Apr 23. PMID: 25912193.
 230. Wells J, Kilburn MR, Shaw JA, Bartlett CA, Harvey AR, Dunlop SA, Fitzgerald M. Early in vivo changes in calcium ions, oxidative stress markers, and ion channel immunoreactivity following partial injury to the optic nerve. *J Neurosci Res.* 2012 Mar;90(3):606-18. doi: 10.1002/jnr.22784. Epub 2011 Oct 31. PMID: 22038561.
 231. Oliet SH, Piet R, Poulain DA. Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science.* 2001 May 4;292(5518):923-6. doi: 10.1126/science.1059162. PMID: 11340204.
 232. Zhang X, Cheng M, Chintala SK. Optic nerve ligation leads to astrocyte-associated matrix metalloproteinase-9 induction in the mouse retina. *Neurosci Lett.* 2004 Feb 12;356(2):140-4. doi: 10.1016/j.neulet.2003.10.084. PMID: 14746883.
 233. Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* 1997 Dec;20(12):570-7. doi: 10.1016/s0166-2236(97)01139-9. Erratum in: *Trends Neurosci* 1998 Feb;21(2):80. PMID: 9416670.
 234. Trotman M, Vermehren P, Gibson CL, Fern R. The dichotomy of memantine treatment for ischemic stroke: dose-dependent protective and detrimental effects. *J Cereb Blood*

- Flow Metab. 2015 Feb;35(2):230-9. doi: 10.1038/jcbfm.2014.188. Epub 2014 Nov 19. PMID: 25407270; PMCID: PMC4426739.
235. Ferrer-Acosta Y, Rodriguez-Massó S, Pérez D, Eterovic VA, Ferchmin PA, Martins AH. Memantine has a nicotinic neuroprotective pathway in acute hippocampal slices after an NMDA insult. *Toxicol In Vitro*. 2022 Oct;84:105453. doi: 10.1016/j.tiv.2022.105453. Epub 2022 Aug 6. PMID: 35944748; PMCID: PMC10026604.
236. Hare W, WoldeMussie E, Lai R, Ton H, Ruiz G, Feldmann B, Wijono M, Chun T, Wheeler L. Efficacy and safety of memantine, an NMDA-type open-channel blocker, for reduction of retinal injury associated with experimental glaucoma in rat and monkey. *Surv Ophthalmol*. 2001 May;45 Suppl 3:S284-9; discussion S295-6. doi: 10.1016/s0039-6257(01)00200-4. PMID: 11377450.
237. Shetty AK. Prospects of levetiracetam as a neuroprotective drug against status epilepticus, traumatic brain injury, and stroke. *Front Neurol*. 2013 Nov 4;4:172. doi: 10.3389/fneur.2013.00172. PMID: 24204362; PMCID: PMC3816384.
238. Zou H, Brayer SW, Hurwitz M, Niyonkuru C, Fowler LE, Wagner AK. Neuroprotective, neuroplastic, and neurobehavioral effects of daily treatment with levetiracetam in experimental traumatic brain injury. *Neurorehabil Neural Repair*. 2013 Nov-Dec;27(9):878-88. doi: 10.1177/1545968313491007. Epub 2013 Jun 27. PMID: 23812605.
239. Wang H, Gao J, Lassiter TF, McDonagh DL, Sheng H, Warner DS, Lynch JR, Laskowitz DT. Levetiracetam is neuroprotective in murine models of closed head injury and subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit Care*. 2006;5(1):71-8. doi: 10.1385/NCC:5:1:71. PMID: 16960300.
240. Zhang Y, Li Y, Zuo L, Bao H, Xu X, Hao J, Wang X, Li G. Levetiracetam Prevents Perforin Mediated Neuronal Injury Induced by Acute Cerebral Ischemia Reperfusion. *Mol Neurobiol*. 2016 Oct;53(8):5480-91. doi: 10.1007/s12035-015-9467-9. Epub 2015 Oct 10. PMID: 26454821.
241. Cuomo O, Rispoli V, Leo A, Politi GB, Vinciguerra A, di Renzo G, Cataldi M. The antiepileptic drug levetiracetam suppresses non-convulsive seizure activity and reduces ischemic brain damage in rats subjected to permanent middle cerebral artery occlusion. *PLoS One*. 2013 Nov 13;8(11):e80852. doi: 10.1371/journal.pone.0080852. PMID: 24236205; PMCID: PMC3827478.
242. Blondel O, Collin C, McCarran WJ, Zhu S, Zamostiano R, Gozes I, Brenneman DE, McKay RD. A glia-derived signal regulating neuronal differentiation. *J Neurosci*. 2000 Nov 1;20(21):8012-20. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-21-08012.2000. PMID: 11050122; PMCID: PMC6772724.
243. Naskar R, Quinto K, Romann I, Schuettauf F, Zurakowski D. Phenytoin blocks retinal ganglion cell death after partial optic nerve crush. *Exp Eye Res*. 2002 Jun;74(6):747-52. doi: 10.1006/exer.2002.1173. PMID: 12126947.
244. Li L, Huang H, Fang F, Liu L, Sun Y, Hu Y. Longitudinal Morphological and Functional Assessment of RGC Neurodegeneration After Optic Nerve Crush in Mouse. *Front Cell Neurosci*. 2020 Apr 29;14:109. doi: 10.3389/fncel.2020.00109. PMID: 32410964; PMCID: PMC7200994 .

STRAIPSNIAI, KURIUOSE SKELBIAMI DISERTACIJOS REZULTATAI

1. **Mačiulaitienė R**, Kalesnykas G, Pauža DH, Janulevičienė I. A combination of topical and systemic administration of brimonidine is neuroprotective in the murine optic nerve crush model. PLoS One. 2024 Aug 8;19(8): e0308671. doi: 10.1371/journal.pone.0308671. PMID: 39116180; PMCID: PMC11309405.
2. **Mačiulaitienė R**, Pakulienė G, Kaja S, Pauža DH, Kalesnykas G, Janulevičienė I. Glioprotection of Retinal Astrocytes After Intravitreal Administration of Memantine in the Mouse Optic Nerve Crush Model. Med Sci Monit. 2017 Mar 7; 23:1173-1179. doi: 10.12659/msm.899699. PMID: 28265105; PMCID: PMC5352005.

**MONOGRAFIJA, KURIOJE SKELBIAMI
DISERTACIJOS DUOMENYS**

1. **Mačiulaitienė R.**, Janulevičienė I. Structure and Function Congruency in Glaucoma. In: Janulevičienė I, Harris A., editors. Biophysical properties in glaucoma: diagnostic technologies. Cham, Switzerland: Springer Nature; 2019.

KONFERENCIJOS, KURIOSE BUVO SKELBTI DISERTACIJOS REZULTATAI

1. **Mačiulaitienė Rūta**; Pakulienė Giedrė; Pauža Dainius Haroldas; Kalesnykas Giedrius; Janulevičienė Ingrida. Assessment of neuroprotective effects of topical brimonidine administration in the mouse optic nerve crush model. World Glaucoma Congress (WGC 2017): June 28 – July 1, Helsinki, Finland: Abstracts & Posters.
2. Pakulienė, Giedrė; **Mačiulaitienė, Rūta**; Pauža, Dainius Haroldas; Kalesnykas, Giedrius; Janulevičienė, Ingrida. Brimonidine neuroprotective properties in experimental optic nerve crush model. Congress of the European Society of Ophthalmology (SOE 2017): 10-13 June, 2017, Barcelona, Spain: abstract e-book / European Society of Ophthalmology. Barcelona: European Society of Ophthalmology, 2017., 2017-06-10, p. 168-168, no. EP-RET-583.
3. **Mačiulaitienė Rūta**; Ragauskas Symantas; Pakulienė Giedrė; Kaja Simon; Janulevičienė Ingrida; Kalesnykas Giedrius. Assessment of the effects of systemically administered levetiracetam in an ocular model for neuroprotection. ARVO Annual Meeting: Baltimore, USA, 6-11 May, 2017: Abstract & Posters.
4. **Mačiulaitienė, Rūta**. Tinklainės ganglinių ląstelių neuroprotekcija šiandien: realybė ar siekiamybė? Lietuvos glaukomos draugijos metinė konferencija; Glaukomų perspektyva: vakar, šiandien, rytoj: 2017 gegužės 19 d., Kaunas / Lietuvos glaukomos draugija. [Kaunas: Lietuvos glaukomos draugija, 2017]., 2017-05-19, p. 1-1.
5. Tamoševičiūtė Giedrė; **Baršauskaitė (Mačiulaitienė) Rūta**; Kuzmienė Loreta; Janulevičienė, Ingrida; Kalesnykas, Giedrius. Intravitreal administration of memantine preserves mouse retinal astrocytes after optic nerve crush. European Society of Ophthalmology (SOE 2015) [elektroninis išteklius]: June 6-9, 2015, Vienna, Austria In conjunction with AAO and APAO: Abstract e-book / European Society of Ophthalmology. Vienna: European Society of Ophthalmology, 2015., 2015-06-06, p. 202-202, no. EP-RET-0728.
6. **Baršauskaitė (Mačiulaitienė) Rūta**; Tamoševičiūtė Giedrė; Kalesnykas Giedrius; Janulevičienė Ingrida. Intravitrealinio memantino poveikis pelės tinklainės astroцитams regos nervo suspaudimo modelyje. VIII nacionalinė doktorantų mokslinė konferencija Mokslas – sveikatai: konferencijos pranešimų tezės [skirta] Pasaulinei sveikatos dienai paminėti, kuri minima balandžio 7-ąją. Šių metų tema – “Maisto sauga”: 2015 m. balandžio 10 d., Kaunas / Lietuvos sveikatos mokslų uni-

versitetas. [LSMU Doktorantų taryba. LSMU Mokslo centras. LSMU Mokslo fondas; Org. Vaiva Lesauskaitė]. Kaunas: Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Leidybos namai, 2015. ISBN 9789955153863 (978-9955-15-386-3)., 2015-04-10, p. 14-15.

Received: 2016.05.23
Accepted: 2016.06.07
Published: 2017.03.07

e-ISSN 1643-3750
© Med Sci Monit, 2017; 23: 1173-1179
DOI: 10.12659/MSM.899699

Glioprotection of Retinal Astrocytes After Intravitreal Administration of Memantine in the Mouse Optic Nerve Crush Model

Authors' Contribution:
Study Design A
Data Collection B
Statistical Analysis C
Data Interpretation D
Manuscript Preparation E
Literature Search F
Funds Collection G

ABCDEF 1 Ruta Maciulaitiene
BCDEF 1 Giedre Pakuliene
ADE 2,3,4 Simon Kaja
CDE 5 Dainius Haroldas Pauza
ABCDEFG 4,6 Giedrius Kalesnykas
ABCDEF 1 Ingrida Januleviciene

1 Department of Ophthalmology, Lithuanian University of Health Sciences, Academy of Medicine, Kaunas, Lithuania
2 Vision Research Center and Department of Ophthalmology, University of Missouri, School of Medicine, Kansas City, MO, U.S.A.
3 K&P Scientific LLC, Kansas City, MO, U.S.A.
4 Experimentica Ltd., Kuopio, Finland
5 Institute of Anatomy, Lithuanian University of Health Sciences, Academy of Medicine, Kaunas, Lithuania
6 University of Tampere, Tampere, Finland

Corresponding Author: Ruta Maciulaitiene, e-mail: ruta.maciulaitiene@gmail.com
Source of support: This research was supported in part by a grant from the Research Council of Lithuania, for a project entitled "The competitive funding of short-term researcher visits", Nr. VP1-3.1-ŠMM-01-V-02-001

Background: In glaucoma, non-intraocular pressure (IOP)-related risk factors can result in increased levels of extracellular glutamate, which triggers a cascade of neurodegeneration characterized by the excessive activation of N-methyl-D-aspartate (NMDA). The purpose of our study was to evaluate the glioprotective effects of memantine as a prototypic uncompetitive NMDA blocker on retinal astrocytes in the optic nerve crush (ONC) mouse model for glaucoma.




Material/Methods: Optic nerve crush was performed on all of the right eyes (n=8), whereas left eyes served as contralateral healthy controls (n=8) in Balb/c/Sca mice. Four randomly assigned mice received 2- μ l intravitreal injections of memantine (1 mg/ml) after ONC in the experimental eye. One week after the experiment, optic nerves were dissected and stained with methylene blue. Retinae were detached from the sclera. The tissue was immunostained. Whole-mount retinae were investigated by fluorescent microscopy. Astrocyte counts for each image were performed manually.

Results: Histological sections of crushed optic nerves showed consistently moderate tissue damage in experimental groups. The mean number of astrocytes per image in the ONC group was significantly lower than in the healthy control group (7.13 \pm 1.5 and 10.47 \pm 1.9, respectively). Loss of astrocytes in the memantine-treated group was significantly lower (8.83 \pm 2.2) than in the ONC group. Assessment of inter-observer reliability showed excellent agreement among observations in control, ONC, and memantine groups.

Conclusions: The ONC is an effective method for investigation of astrocytic changes in mouse retina. Intravitreally administered memantine shows a promising glioprotective effect on mouse retinal astrocytes by preserving astrocyte count after ONC.

MeSH Keywords: Astrocytes • Glaucoma • Memantine • Neuroprotective Agents

Full-text PDF: <http://www.medscimonit.com/abstract/index/idArt/899699>

 2049  1  4  42



This work is licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0)

1173

Indexed in: [Current Contents/Clinical Medicine] [SCI Expanded] [ISI Alerting System] [ISI Journals Master List] [Index Medicus/MEDLINE] [EMBASE/Excerpta Medica] [Chemical Abstracts/CAS] [Index Copernicus]

Background

Glaucoma is a multifactorial optic neuropathy characterized by progressive loss of retinal ganglion cells (RGC), leading to gradual deterioration of visual function [1,2]. The exact etiological mechanism of glaucoma is still unknown, despite numerous scientific advances in recent decades. The main goal of currently available glaucoma treatment is to lower intraocular pressure (IOP). However, reducing increased IOP alone cannot entirely prevent the progression of neurodegeneration and ensuing vision loss [3]. Furthermore, a significant number of glaucoma patients have normal IOP, suggesting non-IOP-mediated mechanisms. Therefore, new treatment strategies targeting neuroprotection pathways are urgently needed [3].

Various animal models exist that mimic different pathophysiological aspects of glaucoma: optic nerve transection, optic nerve crush (ONC), injection of polystyrene beads into the anterior chamber, laser trabecular photocoagulation, and genetic models [4].

ONC triggers a series of events in the optic nerve and retina, characterized by primary acute axonal damage in some of the optic nerve axons and secondary retinal neurodegeneration [4]. Therefore, the ONC model is particularly well-suited for investigation of neuroprotective approaches to glaucoma-tous optic neuropathy.

Retinal astrocytes are located in the nerve fiber layer below the inner limiting membrane, covering the lamina cribrosa and expanding throughout the optic tract [5].

Astrocytes are capable of transmitting electric signals and maintaining highly specialized connections to RGCs that control synaptic strength and provide a source of energy [6]. Astrocytes have processes reaching RGC synapses and interact with RGCs through G protein-coupled receptors. In glaucoma, RGC damage is accompanied by astrocyte activation and hypertrophy [7], resulting in changes in gene expression [8]. Reactive astrocytes release neurotrophic factors and serve as a mechanical scaffold for the remaining neurons. Astrocytes are also capable of keeping the blood-brain barrier intact by sealing damaged areas [9]. Elucidation of astrocytic changes in glaucoma is thus critical for devising novel anti-glaucoma therapies.

Glutamate excitotoxicity is the primary factor responsible for neuronal cell death in neurodegenerative diseases [1,2,10], and glutamate is known to exert toxic effects on the retina, mainly on RGCs [14–17]. In glaucoma, non-IOP-related risk factors can result in increased levels of extracellular glutamate [18–20], which triggers a cascade of neurodegeneration characterized by excessive activation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors [2,21], glutamate excitotoxicity [22–25], and retinal

ischemia. The associated increase in the intracellular calcium concentration ultimately induces neuronal death by either apoptotic or necrotic mechanisms [13,26].

Memantine (1-amino-3,5-dimethyladamantane) is a potent neuroprotective agent that is approved by the US Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency (EMA) for moderate-to-severe Alzheimer disease [27,28]. As an uncompetitive “open channel blocker” of NMDA receptors, memantine does not compete with glutamate for binding sites, and possesses a relatively low affinity and fast kinetics [29]. Thus, memantine has almost no effect when extracellular glutamate levels are normal and only becomes effective in the presence of excess glutamate. While memantine showed great promise in preclinical glaucoma research, it failed to meet expectations in phase III clinical trials for open-angle glaucoma (NCT00141882; NCT00168350).

While most research groups have studied the effects of memantine on neurons, only a few studies have analyzed its effect on astroglia. Wu et al. performed a study showing there are two main neuroprotective effects of memantine [30]. They proved that memantine increased the release of neurotrophic factors, such as glial cell line-derived neurotrophic factor [30], which has an important role in neuronal survival [31]. Also, memantine anti-inflammatory properties are mediated through the reduction of pro-inflammatory factors such as superoxide, ROS, TNF- α , NO, and PGE $_2$ release, thus resulting in inhibition of microglial over-activation [30]. Therefore, astroglia is a crucial component in neuronal protection.

The purpose of our study was to evaluate the glioprotective effects of memantine as a prototypic uncompetitive NMDA blocker on retinal astrocytes in the ONC mouse model for glaucoma.

Material and Methods

Animals

All procedures and animal care were carried out according to the European Convention of Animal Care and the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. All experiments were approved by the Lithuanian State Food and Veterinary Service (No. G2-23). Eight healthy 6-month old male Balb/c/Sca mice were used for the study. Mice were housed in a vivarium (Veterinary Academy, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania) and maintained on a 12-h light-dark cycle with food and water *ad libitum*. All procedures were performed under deep intraperitoneal anesthesia using 1 mg/kg medetomidine hydrochloride (Domitor 1mg/ml, Orion Corporation Orion Pharma, Finland) and 75 mg/kg ketamine (Ketamidol 10%, Richter Pharma AG, Austria). We used artificial

tears (Systane Ultra UD, Alcon Inc., USA) to avoid corneal dryness. The animals were sacrificed under deep anesthesia by cervical dislocation 7 days after the ONC.

Optic nerve crush

We performed ONC on all of the right eyes (n=8), whereas left eyes served as contralateral healthy controls (n=8). An incision in the conjunctivae was made in the superolateral part, bluntly dissected posteriorly, the muscle cone was entered, and the optic nerve was clearly exposed. The optic nerve was crushed with cross-action Dumont tweezers [27] for 3 seconds, approximately 2 mm posterior to the globe.

Four randomly assigned mice received 2- μ l intravitreal injections of memantine (1 mg/ml) immediately after ONC in the experimental eye. Special care was taken to protect surrounding blood vessels. After the procedure, the mouse was placed into the cage for full recovery after anesthesia.

Tissue preparation

One week after the initial experiment, mice were euthanized by cervical dislocation under general intraperitoneal anesthesia; both eyes were enucleated and post-fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) solution for 3 h. Optic nerves were dissected from the eyeball, fixated in glutaraldehyde overnight (O/N), and stained with methylene blue. Optic nerves were cut in semi-thin sections and cover-slipped.

Retinae were detached from the sclera and were post-fixed in the 4% PFA solution O/N. Subsequently, the retinae were washed in 0.1 M phosphate buffer solution (PBS), pH 7.4, 4 times for 5 min. Then the tissue was incubated in 10% normal goat serum (NGS; Colorado Serum Company, CO) for 30 min, after which the retinae were washed in 0.1 M PBS, pH 7.4 4 times for 5 min, and incubated in rabbit anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP; 1:10 000) overnight at 4°C. Retinae were subsequently washed in 0.1 M PBS, pH 7.4, 4 times for 5 min and incubated in anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 (1:500) overnight at room temperature. Following the incubation, retinae were washed in 0.1 M PBS, pH 7.4 4 times for 5 min and flat-mounted on a glass slide facing astrocytes layering up, topping it with glycerol and cover-slipped.

Imaging

Immunostained whole-mount retinae were investigated by fluorescent microscopy using a Zeiss Axio Imager M2 (Carl Zeiss AG, Jena, Germany) (Figure 1). Astrocyte counts for each image were performed manually using ImageJ 1.49m software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Twelve randomly chosen images of 222 \times 170 μ m in size were taken

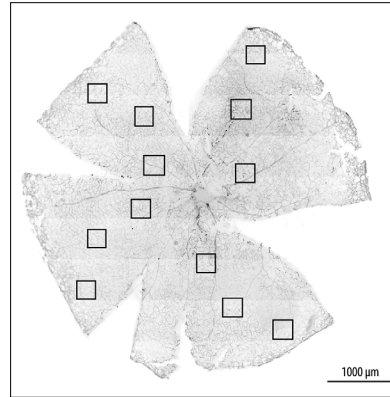


Figure 1. Retinal whole-mount. Black squares indicate randomly chosen parts of the retina: periphery, mid-periphery, and central. Scale bar – 1 mm.

from each retina for further evaluation (Figure 1). Astrocytic somata were manually counted from each image. To achieve credible results, astrocyte somata were counted in the whole image, including left and lower borders. Astrocytic somata that crossed right and upper borders were excluded. Counts were taken manually and in a blinded manner by 2 examiners.

Semi-thin sections of the optic nerves were analyzed by light microscopy (Zeiss Axio Imager M1, Carl Zeiss AG, Jena, Germany), under 100x magnification. We randomly acquired 10 images of each optic nerve and evaluated ONC damage by grading it as control, mild, moderate, or severe [32].

Inter-observer variation

To assess inter-observer variation, manual astrocyte counts were performed by 2 independent observers blinded to the treatment condition. All observations were performed using the same microscope.

Statistical analysis

IBM SPSS Statistics 22.0 Program Package (IBM Corporation, USA) was used for statistical analysis. The Kruskal-Wallis test was used to compare the 3 groups. A *P* value of *p*<0.05 was considered statistically significant. Inter-observer variability was examined using intra-class correlation coefficient (ICC) statistics. ICC cut-off values were defined as follows: <0.40 – poor agreement; 0.41–0.60 – moderate agreement; 0.61–0.79 – good agreement; and \geq 0.80 – excellent agreement [33,34].

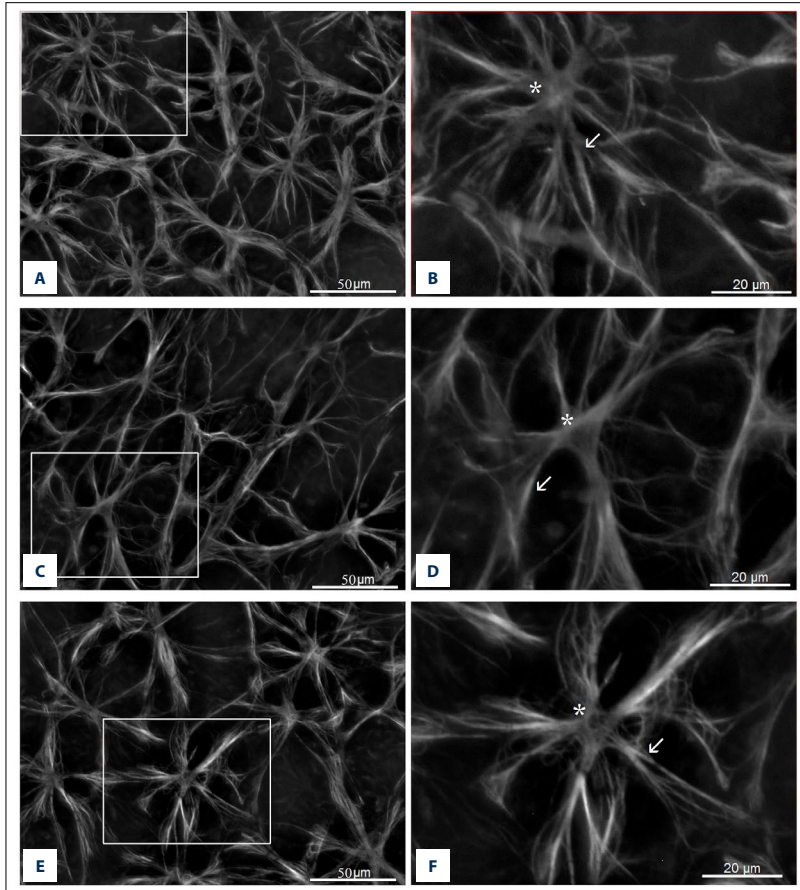


Figure 2. Representative images of GFAP immunoreactivity in whole-mount retinæ showing astrocyte loss after ONC (C) compared with the control condition (A) and glioprotection by memantine (E). Scale bar 50 µm. Boxed areas are enlarged (B, D, F). White arrows point to astrocyte processes, and asterisks indicate astrocyte soma (B, D, F). GFAP – glial fibrillary acidic protein; ONC – optic nerve crush.

Results

Memantine significantly reduced the loss of retinal astrocytes after ONC. The mean number of astrocytes per image in the control group was 10.47 ± 1.9 (mean \pm SD). ONC reduced the

number of astrocytes to 7.13 ± 1.5 . Loss of astrocytes in the memantine-treated group was significantly attenuated (8.83 ± 2.2 ; $n=4$, ANOVA, $p<0.001$) (Figure 2). Post hoc analysis using the Kruskal-Wallis test revealed a statistically significant difference between the untreated ($p<0.001$) and memantine-treated

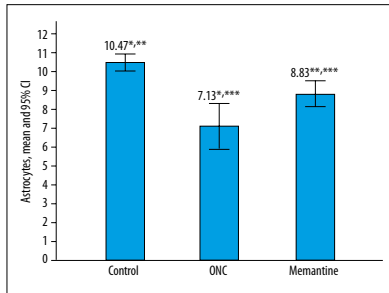


Figure 3. Memantine significantly reduced the loss of retinal astrocytes after ONC. ONC significantly reduced the mean number of astrocytes compared to the control condition ($p < 0.001$). Memantine treatment resulted in a statistically significant smaller loss of the number of astrocytes compared to the untreated ONC condition ($p = 0.047$). Data are shown as means with the 95% CI. $F = 16.041$, $df = 2$, $p < 0.001$; $\chi^2 = 26.143$, $df = 2$, $p < 0.001$; *, **, *** $p < 0.05$. ONC – optic nerve crush.

ONC condition ($p = 0.048$) compared with the control condition (Figure 3). Furthermore, the loss of astrocytes in the memantine condition was significantly attenuated compared to the untreated condition ($p = 0.047$).

Assessment of inter-observer reliability showed excellent agreement among observations in control, ONC, and memantine groups (Table 1).

To exclude effects resulting from variability in execution of the ONC model, we graded optic nerve damage severity. We found a moderate severity optic nerve crush in all right eyes (ONC and memantine groups) on which ONC was performed. Representative images of semi-thin sections are shown in Figure 4.

Discussion

Our study investigated the effect of intravitreal memantine injection on the number of astrocytes in the mouse retina after ONC. Our study revealed that intravitreally administered memantine preserves retinal astrocytes after ONC in Balb/c mice. To the best of our knowledge, this is the first study to show evidence of glioprotective effects by memantine in an experimental glaucoma model.

To ascertain the successful and consistent execution of ONC, we evaluated and graded all optic nerve histological sections by severity of tissue damage [32]. Crushed optic nerves were graded as moderate severity, thus indicating that the ONC

Table 1. Inter-observer reliability for manual retinal astrocyte count between 2 observers.

Group	Intra-class correlation	95% confidence interval
Control	0.942	0.908–0.964
ONC	0.892	0.427–0.979
Memantine	0.956	0.918–0.977

ONC – optic nerve crush.

was performed uniformly, and confounding effects of the experimental model were excluded. The moderate ONC severity better mimics glaucomatous changes in comparison with optic nerve transection [35].

Memantine is an uncompetitive NMDA receptor blocker that prevents deleterious glutamate excitotoxicity on the target damage site and in surrounding cells [36]. ONC induces ionic concentration changes in RGCs, which begin with sodium influx and intracellular calcium elevation [37]. This leads to the sequence of events resulting in the further release of glutamate, elevation of the intracellular calcium concentration, and, eventually, death of RGCs. These processes cause primary neurodegeneration of RGCs, which induces astrocyte activation through junctions with RGCs axons [38]. Zhang et al. reported that astrocyte activation leads to both primary and secondary RGC death [39], while Ridet et al. suggested that activated astrocytes create conditions for axonal regeneration [40]. However, the exact role of astrocytes and the mechanisms of astrocyte activation in glaucoma are not yet fully understood.

Our study shows a greater reduction in astrocyte number following ONC in the untreated vs. the memantine group. It is likely that this is due to greater RGC death [41]; however, further studies analyzing both astrocytes and RGCs counts at the same time are needed.

It is well established that astrocytes release signals that are needed for neuronal survival, provide energy supply, and play an active role in synapse formation [42]. Furthermore, the elevated intracellular calcium concentration of activated astrocytes can result in potent vasoactive effects that help maintain the blood-retinal barrier after pathologic stress and/or injury. Depending on the trigger, different mechanisms are activated which result in either vascular dilatation or constriction [38–42]. Thus, it is crucial to understand these mechanisms and how memantine affects them, for the development of novel anti-glaucoma therapies.

To fully describe the effect of memantine on astrocytes and RGCs after ONC, larger-scale studies are needed to overcome some limitations of the present study: it was a short-term study, with a small sample size, and used a single memantine injection.

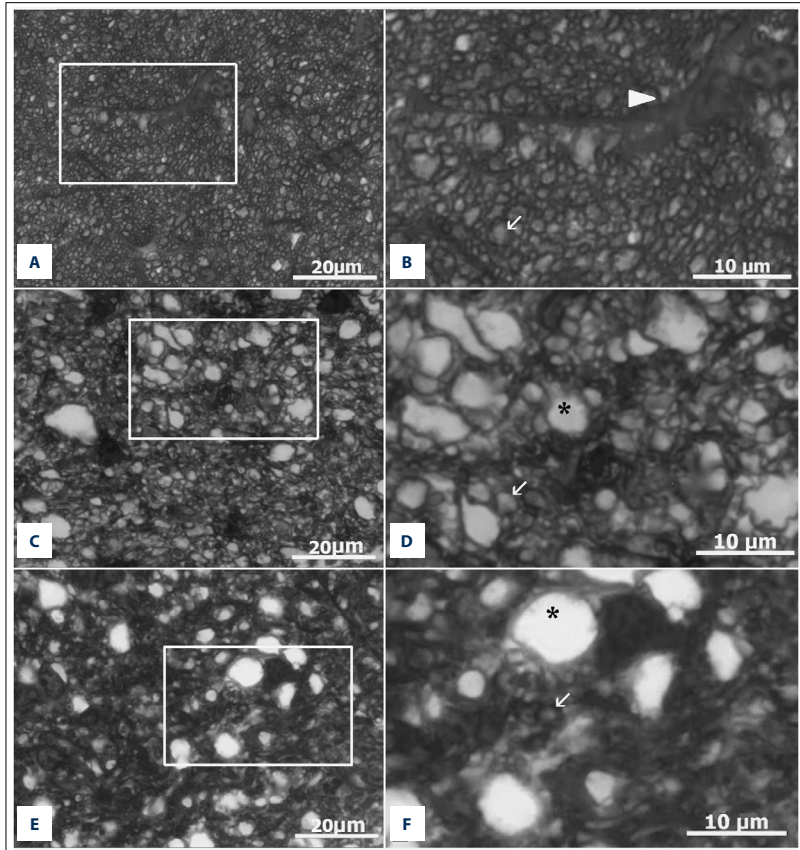


Figure 4. Representative photomicrographs (100× magnification) showing optic nerve sections from control (A), ONC (C), and memantine (E) groups. Scale bar 50 μm. Boxed areas are enlarged (B, D, F). Images A and B show a healthy optic nerve, while C–F were graded as moderate optic nerve damage. Arrow head indicates astrocyte (B), arrows – axons (B, D, F), and asterisks point to swollen axons (D, F). ONC – optic nerve crush.

Conclusions

Herein, we present the first report of the glioprotective effects of intravitreally administered memantine on retinal astrocytes in the mouse ONC model. Despite its limitations, our study provides an important foundation for future studies that should include the systematic morphological, biochemical,

immunological, and electrophysiological characterization of the signaling between retinal astrocytes and RGCs.

Conflict of interest

All authors certify that they have no affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest

(such as honoraria; educational grants; participation in speakers' bureaus; membership, employment, consultancies, stock ownership, or other equity interest; and expert testimony or patent/licensing arrangements), or non-financial interest (such

as personal or professional relationships, affiliations, knowledge, or beliefs) in the subject matter or materials discussed in this manuscript.

References:

1. Gupta N, Ang LC, Noel de Tilly L et al: Human glaucoma and neural degeneration in intracranial optic nerve, lateral geniculate nucleus, and visual cortex. *Br J Ophthalmol*, 2006; 90: 674-78
2. Quigley HA, Nickells RW, Kerrigan LA et al: Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1995; 36: 774-86
3. Chang EE, Goldberg JL: Glaucoma 2.0. Neuroprotection, neuroregeneration, neuroenhancement. *Ophthalmology*, 2012; 119(5): 979-86
4. Ishikawa M, Yoshitomi T, Zorunski CF, Izumi Y: Experimentally induced mammalian models of glaucoma. *BioMed Res Intl*, 2015; 2015: 281214
5. Ling TL, Stone J: The development of astrocytes in the rat retina: Evidence of migration from the optic nerve. *Brain Res Dev Brain Res*, 1988; 44(1): 73-85
6. Yoles E, Schwartz M: Degeneration of spared axons following partial white matter lesion: implications for optic nerve neuropathies. *Exp Neurol*, 1988; 153(1): 1-7
7. Jourdain P, Bergersen LH, Bhaukaurally K et al: Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat Neurosci*, 2007; 10(5): 331-39
8. Prasanna G, Krishnamoorthy R, Yorfo T: Endothelin, astrocytes and glaucoma. *Exp Eye Res*, 2011; 93(2): 170-77
9. Qu J, Jakobs TC: The time course of gene expression during reactive gliosis in the optic nerve. *PLoS One*, 2013; 8(6): e67094
10. Voskuhl RR, Peterson RS, Song B et al: Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune inflammation of the CNS. *J Neurosci*, 2009; 29: 11511-22
11. Tezel G: The immune response in glaucoma: a perspective on the roles of oxidative stress. *Exp Eye Res*, 2011; 93: 178-86
12. Haberg A, Qu H, Saether O et al: Differences in neurotransmitter synthesis and intermediary metabolism between glutamatergic and GABAergic neurons during 4 hours of middle cerebral artery occlusion in the rat: The role of astrocytes in neuronal survival. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001; 21(12): 1451-63
13. Choi DW: Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, 1998; 1(8): 623-34
14. Meldrum B, Garthwaite J: Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci*, 1990; 11(9): 379-87
15. Lipton SA, Rosenberg RA: Mechanisms of disease: Excitatory amino acids as a final common pathway in neurologic disorders. *N Engl J Med*, 1994; 330(9): 613-22
16. Lucas DR, Newhouse JP: The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch Ophthalmol*, 1957; 58(2): 193-201
17. Olney JW: Glutamate-induced retinal degeneration in neonatal mice. Electron microscopy of the acutely evolving lesion. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1969; 28(3): 455-74
18. Vorwerk CK, Lipton SA, Zurakowski D et al: Chronic low-dose glutamate is toxic to retinal ganglion cells. Toxicity blocked by memantine. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1996; 37(8): 1618-24
19. Hare WA, Wheeler L: Experimental glutamatergic excitotoxicity in rabbit retinal ganglion cells: block by memantine. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009; 50(6): 2940-48
20. Yamamoto T, Kitazawa Y: Vascular pathogenesis of normal-tension glaucoma: A possible pathogenic factor, other than intraocular pressure, of glaucomatous optic neuropathy. *Prog Retinal Eye Res*, 1998; 17: 127-43
21. Massey SC, Miller RF: Glutamate receptors of ganglion cells in the rabbit retina: Evidence for glutamate as a bipolar cell transmitter. *J Physiol*, 1988; 405: 635-55
22. Chung HS, Harris A, Evans DW et al: Vascular aspects in the pathophysiology of glaucomatous optic neuropathy. *Surv Ophthalmol*, 1999; 43: 43-50
23. Flammer J, Orgul S, Costa VP et al: The impact of ocular blood flow in glaucoma. *Prog Retinal Eye Res*, 2002; 21: 359-93
24. Otori Y, Wei JY, Barnstable CI: Neurotoxic effects of low doses of glutamate on purified rat retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998; 39: 972-81
25. Luo X, Heidegger V, Picaud S et al: Selective excitotoxic degeneration of adult pig retinal ganglion cells *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001; 42: 1096-106
26. Aizenman E, Frosch MP, Lipton SA: Responses mediated by excitatory amino acid receptors in solitary retinal ganglion cells from rat. *J Physiol*, 1988; 396: 75-91
27. Trump BF, Bereznytskiy IK: Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J*, 1995; 9(2): 219-28
28. Parsons CG, Gruner R, Rozental J et al: Patch clamp studies on the kinetics and selectivity of N-methyl-D-aspartate receptor antagonism by memantine (l-amino-3,5-dimethyladamantane). *Neuropharmacology*, 1993; 32: 1337-50
29. Schanne FA, Kane AB, Young EE, Farber JL: Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science*, 1979; 206(4419): 700-2
30. Wu HM, Tzeng NS, Qian L et al: Novel neuroprotective mechanisms of memantine: increase in neurotrophic factor release from astroglia and anti-inflammation by preventing microglial activation. *Neuropsychopharmacology*, 2009; 34(10): 2344-57
31. Chen PS, Peng GS, Yang S et al: Valproate protects dopaminergic neurons in midbrain neuron/glia cultures by stimulating the release of neurotrophic factors from astrocytes. *Mol Psychiatry*, 2006; 11(12): 1116-25
32. Kalesnykas G, Oglesby EN, Zack DJ et al: Retinal ganglion cell morphology after optic nerve crush and experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012; 53(7): 3847-57
33. Haber M, Barnhart HX, Song J, Gruden J: Observer variability: A new approach in evaluating interobserver agreement. *Journal of Data Science*, 2005; 3: 69-83
34. Landis JR, Koch GG: The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 1977; 33: 159-74
35. McKinnon SJ, Schlamp CL, Nickells RW: Mouse models of retinal ganglion cell death and glaucoma. *Exp Eye Res*, 2009; 88: 816-24
36. Gao L, Chen X, Tang Y et al: Neuroprotective effect of memantine on the retinal ganglion cells of APPsw/PS1A9 mice and its immunomodulatory mechanisms. *Exp Eye Res*, 2015; 135: 47-58
37. Wells J, Kilburn MR, Shaw JA et al: Early *in vivo* changes in calcium ions oxidative stress markers, and ion channel immunoreactivity following partial injury to the optic nerve. *J Neurosci Res*, 2012; 90: 606-18
38. Olliet SH, Piet R, Poulain DA: Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science*, 2001; 292: 923-26
39. Zhang X, Cheng M, Chintala SK: Optic nerve ligation leads to astrocyte-associated matrix metalloproteinase-9 induction in the mouse retina. *Neurosci Lett*, 2004; 356: 140-44
40. Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FG: Reactive astrocytes: Cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci*, 1997; 20: 570-77
41. Naskar R, Quinto K, Romani I et al: Phenytoin blocks retinal ganglion cell death after partial optic nerve crush. *Exp Eye Res*, 2002; 74(6): 747-52
42. Blondel O, Collin C, Mccarran WJ et al: A glia-derived signal regulating neuronal differentiation. *J Neurosci*, 2000; 20: 8012-20

RESEARCH ARTICLE

A combination of topical and systemic administration of brimonidine is neuroprotective in the murine optic nerve crush model

Ruta Maciulaitiene^{1☯*}, Giedrius Kalesnykas^{2,3,4☯}, Dainius Haroldas Pauza^{5☯}, Ingrida Januleviciene^{1☯}

1 Department of Ophthalmology, Academy of Medicine, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania, **2** Experimentica Ltd., Kuopio, Finland, **3** Experimentica UAB, Vilnius, Lithuania, **4** Faculty of Medicine and Health Technology, Tampere University, Tampere, Finland, **5** Academy of Medicine, Institute of Anatomy, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania

☯ These authors contributed equally to this work.

* ruta.maciulaitiene@ismuni.lt



OPEN ACCESS

Citation: Maciulaitiene R, Kalesnykas G, Pauza DH, Januleviciene I (2024) A combination of topical and systemic administration of brimonidine is neuroprotective in the murine optic nerve crush model. PLoS ONE 19(8): e0308671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0308671>

Editor: Sanjoy Bhattacharya, Bascom Palmer Eye Institute, UNITED STATES OF AMERICA

Received: March 7, 2024

Accepted: July 22, 2024

Published: August 8, 2024

Copyright: © 2024 Maciulaitiene et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its [Supporting Information files](#).

Funding: The author(s) received no specific funding for this work.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Glaucoma is a multifactorial optic neuropathy that primarily affecting retinal ganglion cells (RGC). Brimonidine is an intraocular pressure-lowering drug with reported neuroprotective properties. This study aimed to compare the neuroprotective effects of topical and intraperitoneal (IP) brimonidine on RGCs from different retinal segments in a murine optic nerve crush (ONC) model. Methods: forty-one Balb/c mice underwent unilateral ONC and were divided into three study groups: fifteen animals received saline drops twice per day and two additional IP injections of saline; fourteen mice received brimonidine drops twice per day; and 12 mice received brimonidine eye drops twice per day and two additional IP brimonidine injections. Animals were sacrificed seven days post-ONC, and immunohistochemical staining of retinal whole mounts was performed using neuronal NeuN and GFAP staining. Microscopic pictures of the central, middle, and peripheral regions of the retina were taken. The density of the retinal cells was assessed. Results: The total RGC density after ONC and RGC densities in all retinal eccentricities were significantly higher in the brimonidine eye drop and IP combination treatment group than in the saline drop + saline IP, and brimonidine drop treatment groups. Conclusions: brimonidine eye drops supplemented with IP brimonidine injections improved RGC survival in a preclinical model of ONC.

Introduction

Glaucoma is the most common type of optic neuropathy [1]. Multiple pathogenic mechanisms primarily affect retinal ganglion cells (RGC) [2, 3]. These include the disruption of axonal transport, neurotrophic factor deprivation, metabolic failure, oxidative stress, calcium imbalance, vascular dysregulation, and neuroinflammation. Due to the multifaceted nature of the

disease and the limited adaptability of retinal ganglion cells to neurodegenerative changes, glaucoma frequently results in irreversible blindness [4].

In addition to these multiplex neurodegenerative mechanisms, increased intraocular pressure (IOP) and aging are pivotal stressors for RGC in glaucoma [5]. Hence, the primary strategy to treat glaucoma is to lower IOP by decreasing aqueous production and/or promoting aqueous outflow via dedicated conventional or unconventional aqueous outflow pathways [2, 6].

The optic nerve crush (ONC) model has been extensively employed in glaucoma research because of its ability to induce RGC death and axonal degeneration. The ONC model provides a precise framework for investigating traumatic optic neuropathies and the role of axonal damage in glaucomatous pathologies, which mirrors certain human glaucoma characteristics, particularly mechanical stress-induced RGC injury at the optic nerve head [7]. Previous studies have demonstrated that ONC leads to rapid RGC and axon death, with significant decreases in neurite outgrowth parameters and dendritic complexity [8]. The ability of the ONC model to accurately simulate many signaling responses following RGC apoptosis observed in experimental glaucoma models makes it invaluable for elucidating the cellular and molecular mechanisms of glaucomatous diseases.

The topical anti-glaucoma drug brimonidine is an α -2 adrenergic receptor agonist that has shown promising results in protecting the retina and optic nerve in non-clinical animal and cell studies [9]. Brimonidine has been suggested to stimulate cell-survival signaling pathways, upregulate neurotrophic factors, and interfere with excitotoxic signaling [10, 11]. The primary mechanism of action is to inhibit adenylate cyclase activity and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels, thereby decreasing aqueous humor production in the ciliary body [12]. Brimonidine increases aqueous humor outflow due to ciliary muscle relaxation and prostaglandin release due to α -adrenergic stimulation [13]. Brimonidine is known for its strong ability to lower intraocular pressure and its diverse neuroprotective effects [14–17]. These effects include enhancement of neurotrophic factors [10, 18], reduction of cAMP [19, 20], regulation of amyloid beta pathways [21, 22], and modulation of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, which are implicated in glutamate toxicity [21]. Studies have shown that both systemic and topical applications of brimonidine significantly improve the survival of retinal ganglion cells in various rodent models of optic nerve injuries, including acute retinal ischemia [23–25], excitotoxic retinal injury [26], chronic ocular hypertension [27, 28], and optic nerve crush injuries [29, 30].

Furthermore, there is clinical evidence of neuroprotective effects in patients with glaucoma [31], age-related macular degeneration (AMD) [32], retinitis pigmentosa [33], diabetic retinopathy [34], and acute nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy [35].

Brimonidine integrated into a polymer-based delivery system has been explored for the treatment of geographic atrophy (GA) associated with AMD [36]. This system exhibited a therapeutic impact lasting up to 15 weeks with encouraging outcomes, indicating a slowdown in the growth of GA lesions.

It has been proven that topical ocular hypotensive drugs delay or prevent glaucoma in patients with ocular hypertension [24, 25]. Nevertheless, subsequent glaucomatous neurodegeneration may occur even when the target IOP is reached. Therefore, it is essential to develop treatments that target neurodegeneration and aid in the preservation of RGC.

Extensive research on the neuroprotective properties of brimonidine has highlighted its potential beyond intraocular pressure reduction, particularly in managing glaucomatous neurodegeneration. This study contributes to the literature by evaluating the effects of topical and systemic administration of brimonidine, including a systemic booster shot approach, in a mouse optic nerve crush (ONC) model.

Specifically, we investigated the regional variations in the survival of retinal ganglion cells and astrocytes across different retinal segments. This approach provides a nuanced understanding of the protective efficacy of brimonidine, potentially enhanced by booster administration, which could lead to more effective targeted therapies to address the complex pathology of optic neuropathies. By integrating comprehensive analyses of drug delivery methods, spatial variability in therapeutic effects, and regional disease variation, this study provides insights that could inform future therapeutic strategies and optimize outcomes in patients with optic nerve injuries.

Materials and methods

Experimental design

A total of 41 BALB/c mice were used in this study. An ONC was performed in all mice unilaterally (right eye), and the contralateral eye (left eye) was used as a control group without ONC. Mice were randomly assigned to one of three experimental groups.

1. Group 1 (ONC/ Saline drop + IP)–mice (n = 15) received saline drops twice daily for seven days. First saline eye drop was instilled on day 0 before ONC. In addition, two doses of 100 μ L saline IP injections before ONC at Day 0 and day 1 post-ONC were administered.
2. Group 2 (ONC/BMD drop): mice (n = 14) received topical brimonidine tartrate eye drop treatment twice daily for seven days. First brimonidine eye drop was instilled on day 0 prior to ONC.
3. Group 3 (ONC/BMD drop +IP) mice (n = 12) received topical brimonidine tartrate eye drops twice a day for seven days. First brimonidine eye drop was instilled on day 0 before ONC. In addition, two IP brimonidine injections were administered before ONC on days 0 and 1 post-ONC.

Animals were sacrificed on day seven post-ONC, and retinas from both eyes were collected for subsequent analysis. A schematic of the experimental design is shown in Fig 1.

Animals

All procedures and animal care were performed according to the European Convention of Animal Care and the Association for Research in Vision and Ophthalmology statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. All experiments were approved by the Lithuanian State Food and Veterinary Service (no. G2-23). Forty-one healthy 3-month-old male BALB/c/Sca mice were used in this study. The mice were housed in an animal center and maintained under normal light conditions with food and water ad libitum. All procedures were performed under deep intraperitoneal anesthesia using 1 mg/kg medetomidine (Domitor 1 mg/ml; Orion Corporation Pharma, Finland) and 75 mg/kg ketamine (Ketamidol 10%; Richter Pharma AG, Austria). The animals were sacrificed under deep anesthesia by performing intracardial perfusion with aldehyde-based fixatives.

Mouse model of optic nerve crush

After induction of deep anesthesia, an incision was made in the superolateral conjunctiva to allow gentle outward retraction of the globe using forceps and insertion of the muscle cone. After visual exposition of the optic nerve, self-closing Dumont tweezers were applied for 3 seconds to crush the optic nerve, approximately 2 mm posterior to the globe, according to the methodology described by Kalesnykas et al. [8].

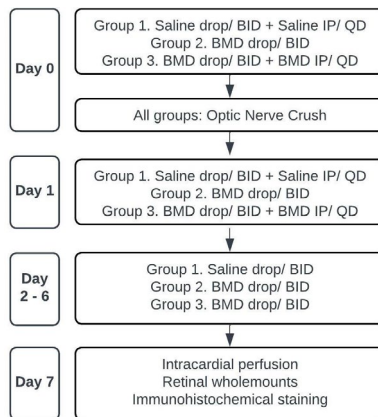


Fig 1. Flowchart of the experimental design. ONC, optic nerve crush; BMD, brimonidine; QD, once daily; BID, twice daily.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0308671.g001>

Brimonidine administration

Mice were treated with brimonidine tartrate ophthalmic solution (Luxfen 2 mg/5 mL, Sanitas, Lithuania) in two forms: topical eye drops twice per day for seven days (one drop (0.05 ml); 2 mg/5 mL, $n = 14$); and two intraperitoneal injections: first IP injection before the ONC, second IP injection on day 1 post-ONC (2 mg/kg/day 2 mg/5 mL brimonidine tartrate, $n = 12$). Group 1 received one saline IP injection before ONC and a second IP injection on day 1 post-ONC (0.1 ml, 0.9% NaCl, $n = 15$), and saline drops (one drop (0.05 ml), 0.9% NaCl) twice a day for seven days.

Immunohistochemistry and preparation of retinal whole mounts

The mice were euthanized under deep general IP anesthesia seven days after ONC. Soft eye tissue fixation was performed using intracardial perfusion with aldehyde-based fixatives. Both eyes were enucleated and post-fixed in a 4% paraformaldehyde (PFA) solution for 3 h. The retinas of both eyes were detached from the sclera and post-fixed in 4% PFA overnight (O/N). Subsequently, the retinas were washed twice in 0.1 M phosphate buffer solution (PBS) for 5 min. Tissues were incubated in 10% normal goat serum (NGS; Colorado Serum Company, CO) and 0.5% Triton solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Louis, MO, USA) for 30 min. Retinas were subsequently incubated with primary antibodies overnight at 4°C: NeuN (1:500) (MAB377, Millipore Sigma, Massachusetts, USA) and rabbit anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP, 1:1000) (Dako (Z0334), Denmark). The retinas were rinsed three times in 1% NGS and 0.1% Triton solution for 5 min and incubated with AlexaFluor Mouse 488 (1:250) (Life Technologies (A11001), California, USA) and Alexa Fluor Rabbit 594 (1:250) (Life Technologies (A11037), California, USA) secondary antibodies for 3 h in the dark. Retinas were rinsed thrice in 1% NGS and 0.1% Triton solution for 5 min, followed by incubation with antibodies. Subsequently, the retinas were incubated with DAPI solution (1:10000) (Sigma-Aldrich (D9542-5NG), Missouri, USA) for 30 min, followed by three rinses in PBS for 5 min. Finally,

retinas were mounted on a glass slide using Fluoroshield (Sigma-Aldrich (F6937), Missouri, USA) and covered with coverslips.

Retinal analysis

The blinding was used for every single analysis. All samples were blinded by a single researcher, and the counting was performed by a lead author of the study.

Immunostained whole-mount retinas were analyzed using a fluorescence microscope (Zeiss Axio Imager Z1; Carl Zeiss AG, Jena, Germany) at 40x magnification. Fifteen randomly chosen images of a 0.04 mm² area were taken from each retina. Five images of each representative central, mid-periphery, and peripheral region of the retina were included for further evaluation (Fig 2). NeuN-, GFAP-, and DAPI-positive cells were manually counted from each image using ImageJ software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). The morphology of astrocytes met the criteria of being GFAP-positive cells with cell bodies residing in the nerve fiber layer or ganglion cell layer. DAPI-, NeuN-, and GFAP-positive cells were manually counted in five images from each retinal eccentricity in all whole-mounted retinas. To achieve credible results, cells were counted in the entire image, including the left and lower borders. Cells that crossed the right and upper borders were excluded from the analysis.

Statistical analysis

Quantitative data were analyzed using IBM SPSS (version 26.0; IBM Corporation, USA) and are presented as the mean \pm standard deviation (SD).

For ONC analysis, the group averages were calculated by pooling the cell averages. When evaluating dynamic changes, each mouse's change was calculated individually by comparing the ONC eye with its healthy fellow eye. Individual deltas (Δ) were pooled into groups for comparison.

Parametric data were analyzed using one-way ANOVA variance with Tukey's multiple comparison test. Non-parametric data were analyzed using the Kruskal-Wallis test. Spearman's correlation test was used to non-normally distributed data to correlate the variables. Differences were considered statistically significant at $p \leq 0.05$.

Results

Systemic brimonidine side effect

Five out of 12 mice experienced sedative side effects after IP brimonidine injection but regained normal locomotor activity after 60 min.

Effect of brimonidine treatment on total retinal cells

Non-neuronal retinal cells analysis. Optic nerve crush injury was sustained in all the experimental groups. This was evident by the significantly lower DAPI-stained retinal cell count in the ONC/saline drop + IP (6463 ± 1117 , cells/mm² \pm SD), ONC/BMD drop (6437 ± 915.3 , cells/mm² \pm SD), and ONC/BMD drop + IP (6691 ± 901.5 , cells/mm² \pm SD) groups than in the control eyes without ONC (7413 ± 1208 , cells/mm² \pm SD) ($p < 0.0001$). No significant differences were observed between the DAPI-stained cell counts in all the experimental groups after ONC (Fig 3 and S1 Fig and S1 Table).

RGC survival analysis. The remaining NeuN count in the retina was significantly lower in all experimental groups after ONC injury than that in the healthy control group (4450 ± 1140 , cells/mm² \pm SD) ($p < 0.0001$). The additional intraperitoneal administration of brimonidine significantly improved the survival of RGC in the retina (3625 ± 817.9 , cells/mm²

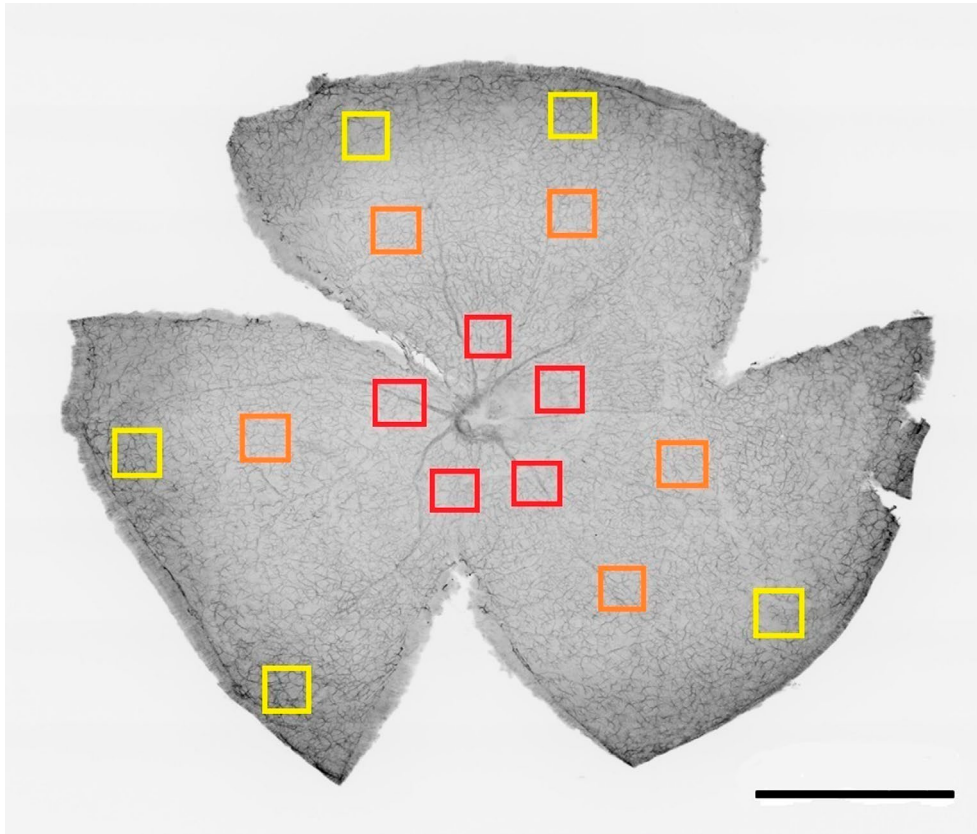


Fig 2. Sampling method for cell counting in retinal whole-mounts. DAPI-, NeuN-, and GFAP-positive cells were counted in 15 randomly chosen sampling boxes (0.04 mm^2): the central ($n = 5$, red squares), mid-periphery ($n = 5$, orange squares), and peripheral ($n = 5$, yellow squares) regions of the retina. DAPI, 4',6'-diamidino-2-phenylindole; NeuN, neuronal nuclei; GFAP, glial fibrillary acidic protein. Scale bar 1000 μm .

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0308671.g002>

\pm SD) when compared to the ONC/BMD drop (2854 ± 1058 , cells/ $\text{mm}^2 \pm$ SD) and ONC/Saline drop + IP groups (2912 ± 1083 , cells/ $\text{mm}^2 \pm$ SD) ($p < 0.0001$) (Figs 3 and 4 and Table 1).

Retinal astrocytes analysis. Increased glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity was found in the ONC/BMD drop group (302 ± 79 , cells/ $\text{mm}^2 \pm$ SD) compared to the control group without ONC (278.7 ± 71.13 , cells/ $\text{mm}^2 \pm$ SD) ($p < 0.05$). No significant differences were observed in the number of GFAP-positive cells in any of the experimental ONC groups. Interestingly, increased gliosis was evident only in the ONC/BMD drop group ($p < 0.05$) (Fig 3 and S2 Fig and S2 Table).

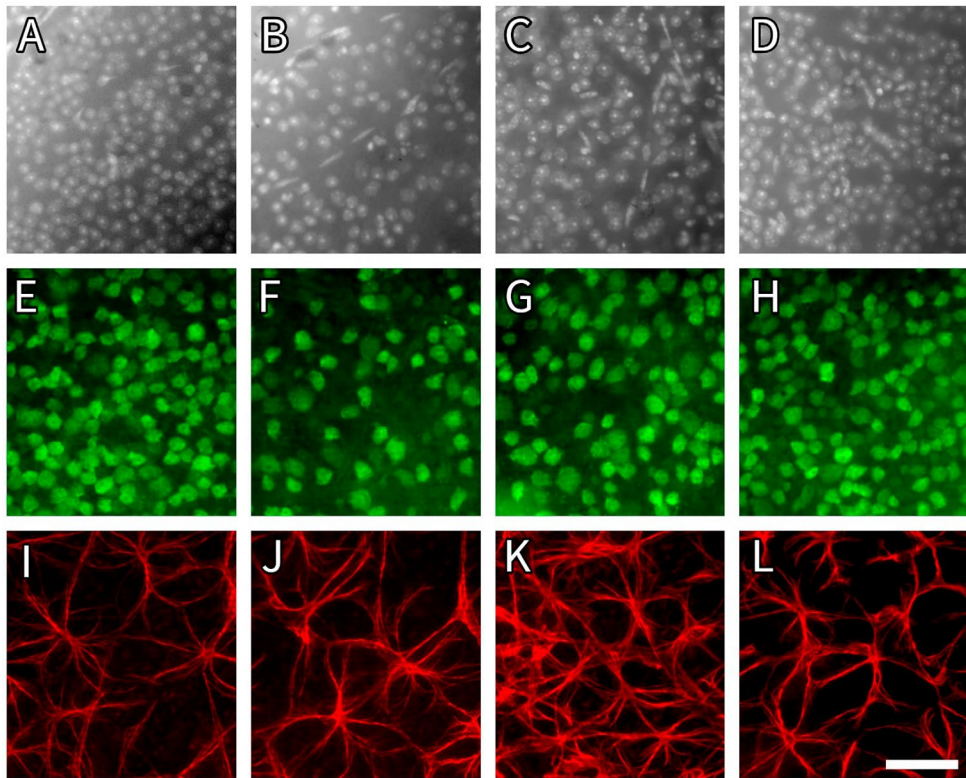


Fig 3. Photomicrograph illustrating immunofluorescence staining of mouse retinal whole-mount in experimental ONC groups, representing retinal cell densities in the experimental ONC and control groups. A, B, C, D: Grey scale DAPI nuclear marker representing all cells of retinal ganglion cell layer; E, F, G, H - NeuN-stained retinal ganglion cells and amacrine cells in green; I, J, K, L-retinal astrocytes (in red) labeled with antibodies against GFAP. A, E, I: retinal whole-mount explant from control group (without ONC); B, F, J: retinal whole mount explant from ONC/saline drop + IP group; C, G, K: retinal whole mount in ONC/BMD drop group; D, H, L: retinal whole mount in ONC/BMD drop + IP group. ONC, optic nerve crush; BMD, brimonidine; IP, intraperitoneal; DAPI, 4',6'-diamidino-2-phenylindole; NeuN, neuronal nuclei; GFAP, glial fibrillary acidic protein. Scale bar- 50 μ m.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0308671.g003>

Regional effect of brimonidine treatment on retinal cells

Analysis of the central region of the retina. The survival of DAPI- and NeuN-positive cells in the central region of the retina was comparable to the total cell densities per retina. DAPI- and NeuN-positive cell counts were significantly lower in the ONC/saline drop + IP (6858 ± 1249 and 3348 ± 1117 , respectively, cells/ $\text{mm}^2 \pm \text{SD}$), ONC/BMD drop (6813 ± 807.3 and 2811 ± 1154 , respectively, cells/ $\text{mm}^2 \pm \text{SD}$), and ONC/BMD drop + IP (7004 ± 711.6 and 3505 ± 753.4 , respectively, cells/ $\text{mm}^2 \pm \text{SD}$) groups than in the control group (7930 ± 1133 and 4937 ± 1008 , respectively, cells/ $\text{mm}^2 \pm \text{SD}$) ($p < 0.0001$). The additional intraperitoneal

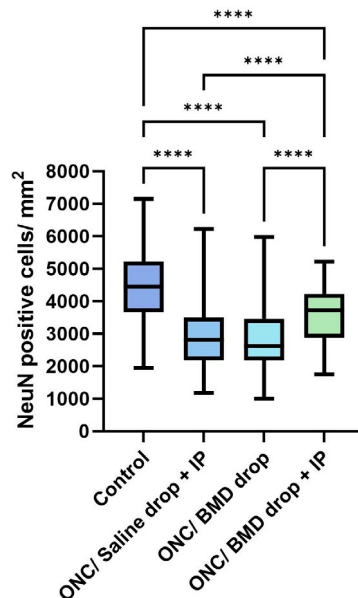


Fig 4. NeuN-stained cell counts in the retina after ONC. **** $p < 0.0001$. ONC, optic nerve crush; BMD, brimonidine; IP, intraperitoneal; NeuN, neuronal nuclei.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0308671.g004>

administration of brimonidine significantly improved the survival of RGC in the central part of the retina compared to the ONC/BMD drop group ($p < 0.05$).

No significant differences were evident between the central region DAPI- and GFAP-positive cells in all experimental ONC groups.

Table 1. NeuN-positive cell count average (cells/mm² ± SD) in the total and different regions of murine retina.

	Total retina	Central region	Middle region	Peripheral region
Control group	4450 ± 1140****	4937 ± 1008****	4539 ± 1129***	3911 ± 1049****
Group 1	2912 ± 1083	3348 ± 1117	2970 ± 1139	2384 ± 721.4
Group 2	2854 ± 1058	2811 ± 1154	3057 ± 1055	2675 ± 968
Group 3	3625 ± 817.9****	3505 ± 753.4*	3710 ± 934.5*	3630 ± 737.8***

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Total retina: **** - Control group vs. Group 1; Control group vs. Group 2; Control group vs. Group 3; Group 3 vs. Group 1; Group 3 vs. Group 2.

Central region: **** - Control group vs. Group 1; Control group vs. Group 2; Control group vs. Group 3; * Group 3 vs. Group 2.

Middle region: *** - Control group vs. Group 1; Control group vs. Group 2; Control group vs. Group 3; * Group 3 vs. Group 1.

Peripheral region: *** - Group 3 vs. Group 1; Group 3 vs. Group 2; **** - Control group vs. Group 1; Control group vs. Group 2

Control group-left eyes without ONC; Group 1 -ONC/Saline drop + IP; Group 2 -ONC/BMD drop; Group 3 -ONC/BMD drop +IP.

ONC, optic nerve crush; BMD, brimonidine; IP, intraperitoneal, NeuN, neuronal nuclei.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0308671.t001>

Analysis of the middle region of the retina. The resultant remaining cells and their counts in the middle region of the retina resembled the total and central retinal part cell counts.

There were significantly fewer DAPI- and NeuN-stained cells in the middle region of the retina of the control group (7451 ± 1188 and 4539 ± 1129 , respectively, cells/mm² \pm SD) than in the ONC/BMD drop (6489 ± 863 and 3057 ± 1055 , respectively, cells/mm² \pm SD) and ONC/BMD drop + IP groups (6649 ± 929.6 and 3710 ± 934.5 , respectively, cells/mm² \pm SD) ($p < 0.001$). Intraperitoneal brimonidine injection significantly improved RGC survival compared to the ONC/saline drop + IP group ($p < 0.05$). In addition, a tendency for superior RGC survival was observed in the ONC/BMD drop + IP group compared to the ONC/BMD drop group ($p = 0.07$).

No significant differences were found between the groups in DAPI- and GFAP-positive cells localized to the middle retinal region.

Retinal peripheral region analysis. The addition of IP brimonidine injection to brimonidine eye drops had a positive effect on the survival of DAPI-stained cells in the peripheral region of the retina, in contrast to the central and middle regions. This was evident by the insignificant reduction in the DAPI-positive cell count in the ONC/BMD drop + IP group (6390 ± 966.6 , cells/mm² \pm SD) compared to the control group (6857 ± 1070 , cells/mm² \pm SD). Markedly decreased DAPI-positive cell counts were found in the peripheral part of the retina in the ONC/saline drop + IP (5954 ± 970.8 , cells/mm² \pm SD) and ONC/BMD drop groups (6022 ± 905.4 , cells/mm² \pm SD) compared with the control group ($p < 0.0001$). No statistically significant differences were evident between DAPI-positive cells in the peripheral retinal region among all experimental ONC groups.

In addition, the survival of RGCs only numerically declined in the periphery of the ONC/BMD drop + IP group (3630 ± 737.8 , cells/mm² \pm SD) compared with the control group (3911 ± 1049 , cells/mm² \pm SD). In contrast, the NeuN-positive cell count in the peripheral region of the retina remained significantly lower in the ONC/saline drop + IP (2384 ± 721.4 , cells/mm² \pm SD) and ONC/BMD drop groups (2675 ± 968 , cells/mm² \pm SD) than in the control group ($p < 0.0001$).

Most importantly, the ONC/BMD drop + IP group showed a positive effect on the NeuN-stained cell count in the peripheral region of the retina. It was significantly higher than that in the ONC/saline drop + IP and ONC/BMD drop groups ($p < 0.001$) (Fig 5). No statistically significant differences between peripheral region astrocyte counts in all experimental ONC groups were noted, as evidenced by comparable GFAP staining.

Regional variability in brimonidine-induced neuroprotection of retinal cells

Analysis of cell count dynamics in the groups treated with brimonidine eye drops revealed a significant difference in DAPI-positive cells between the central and peripheral regions of the retina ($p < 0.05$). Furthermore, a markedly significant difference in DAPI-positive density was observed between the middle region and periphery in the ONC/BMD drop + IP group ($p < 0.001$).

The superior retention of RGC-positive cells in the peripheral regions of saline-treated groups compared to the central regions ($p < 0.05$) underscores the inherent variability in RGC survival after ONC without neuroprotective intervention. Notably, significant differences were also observed in RGC densities when comparing changes between the center and middle ($p < 0.01$), as well as between the center and peripheral regions ($p < 0.0001$), in groups treated with brimonidine drops alone. The neuroprotective effect of brimonidine when administered

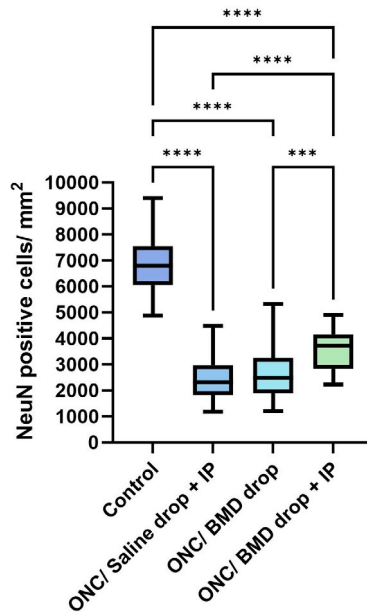


Fig 5. NeuN-stained cell count in the peripheral region of the mouse retina after ONC. ONC, optic nerve crush; BMD, brimonidine; IP, intraperitoneal; NeuN, neuronal nuclei. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0308671.g005>

systemically, in addition to topical application, further emphasized its neuroprotective capability, as evidenced by the superior retention of RGC densities in the periphery compared to the central part ($p < 0.01$) (Table 2).

Group 1 –ONC/Saline drop + IP; Group 2 –ONC/BMD drop; Group 3 –ONC/BMD drop +IP. ONC–optic nerve crush; BMD–brimonidine; IP–intraperitoneal, NeuN–primary antibody.

ONC, optic nerve crush; BMD, brimonidine; IP, intraperitoneal; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; NeuN, neuronal nuclei; GFAP, glial fibrillary acidic protein.

Correlations between total counts of retinal cells

We analyzed the relationships between DAPI-stained total retinal cell counts, NeuN-positive cells, and GFAP expression as indicators of gliosis across different treatment groups.

In the saline-treated groups subjected to ONC, we observed significant correlations between the total number of retinal cells stained with DAPI and GFAP-positive cells ($p < 0.001$; $r = 0.259$), indicating a modest direct relationship. Similarly, the correlation between RGC counts and GFAP expression in the ONC/ Saline drop + IP group further suggested a direct but weak association between RGC survival and gliosis without neuroprotective treatment ($p < 0.05$, $r = 0.214$). A stronger direct relationship between DAPI and GFAP expression was evident in

Table 2. Cell count dynamics between retinal regions (Δ cell change \pm SD).

Staining method	Retinal region	Group 1	Group 2	Group 3
DAPI	Central retina	1391 \pm 730	1711 \pm 684.1	1399 \pm 652.3
	Middle retina	1165 \pm 391.1	1640 \pm 566	2034 \pm 849.3
	Peripheral retina	1041 \pm 504.7	951.6 \pm 538.6 *	804.2 \pm 452.1 ***
NeuN	Central retina	2272 \pm 550 *	2900 \pm 760 **,****	2106 \pm 962 **
	Middle retina	2088 \pm 569.1	1953 \pm 609	1748 \pm 807.8
	Peripheral retina	1471 \pm 587.1	1282 \pm 419	871.5 \pm 528.8
GFAP	Central retina	-18.16 \pm 75.13	-39.47 \pm 43.03	-15.17 \pm 50.05
	Middle retina	-6.13 \pm 26.84	-11.43 \pm 36.76	-12.08 \pm 29.11
	Peripheral retina	25.87 \pm 41.2	0.67 \pm 31.67	-0.42 \pm 54.15

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$.<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0308671.t002>

the ONC/BMD drop group ($p < 0.0001$; $r = 0.285$). Conversely, a complex interaction between RGC survival and gliosis when brimonidine was applied topically only was negatively correlated with RGC and astrocyte count in the same group ($p < 0.05$, $r = -0.194$) (S3 Fig).

A comparison between DAPI- and NeuN-positive cell counts indicated a direct correlation ($p < 0.01$; $r = 0.315$) in the ONC/BMD drop + IP group. This correlation highlights the dependency between non-neuronal cell density and a specific ganglion cell distribution. DAPI was weakly correlated with GFAP in the same group ($p < 0.05$; $r = 0.222$) (S3 Fig).

Intraregional correlations between the retinal cell count

In the central section of the retina, significant correlations were observed between total DAPI-stained retinal cell counts and RGC counts following saline treatment post-ONC ($p < 0.05$, $r = 0.336$). This suggests a moderately positive relationship between the non-neuronal cell density and the specific RGC population in the central region of ONC/saline drop + IP group. When comparing the DAPI-stained total retinal cell counts with the RGC counts in the ONC/BMD drop + IP group, a positive correlation was observed ($p = 0.057$, $r = 0.394$), indicating a similar trend in non-neuronal and neuronal cell retention (S4 Fig).

In the middle section of the retina, the correlation between DAPI-stained cells and RGC counts in the ONC/saline drop + IP group was significant ($p < 0.05$, $r = 0.354$), revealing a moderately positive relationship between the groups. The ONC/BMD drop + IP treatment group in the middle section showed a nearly significant positive correlation between DAPI-stained total retinal cell counts and RGC counts ($p = 0.055$, $r = 0.348$), and between DAPI-stained cells and GFAP gliosis expression ($p = 0.059$, $r = 0.297$). A significant negative correlation was found between RGC counts and GFAP expression in the ONC/BMD drop treatment group ($p < 0.05$, $r = -0.293$) (S4 Fig).

Interregional correlations between the retinal cell count

A significant correlation was observed between the DAPI-stained cell densities in the central and middle regions of the retina in the ONC/BMD drop group, indicating a moderately positive relationship ($p < 0.001$, $r = 0.447$). However, the correlation between the middle and peripheral regions in the ONC/BMD drop + IP group showed a trend towards significance, suggesting a weaker relationship ($p = 0.054$, $r = 0.319$) (S5 Fig).

Strong correlations were found between the retinal eccentricities and RGC densities. The central and middle regions treated with saline drops exhibited a highly significant correlation ($p < 0.0001$, $r = 0.644$), which was stronger when comparing the central to peripheral regions ($p < 0.0001$, $r = 0.671$) and the middle to peripheral regions ($p < 0.0001$, $r = 0.700$). Similarly, under ONC/BMD drop treatment, significant correlations were noted between the central and middle regions ($p < 0.0001$, $r = 0.612$) and between the middle and peripheral regions ($p < 0.0001$, $r = 0.601$), indicating a consistent pattern of RGC density distribution across the retina post-ONC, irrespective of treatment (S5 Fig).

GFAP expression, which is indicative of gliosis, also showed significant correlations across retinal regions. Central to middle region comparisons in the ONC/saline drop + IP group showed a moderate correlation ($p < 0.05$, $r = 0.282$) and a stronger correlation between the central and peripheral regions ($p < 0.01$, $r = 0.342$). Notably, positive correlations were more pronounced in the ONC/BMD drop + IP treatment group, with central-to-middle ($p < 0.0001$, $r = 0.578$) and central-to-peripheral comparisons ($p < 0.05$, $r = 0.317$) (S5 Fig).

Correlations of retinal cells count dynamics after treatment

A moderate inverse correlation between the incremental change dynamics of GFAP-positive cells and a decrease in NeuN-positive cells in the total retina of the ONC/saline drop + IP group was observed ($p < 0.05$, $r = -0.644$). Interestingly, a moderate positive correlation was observed between astrocytes and RGC incremental change in the ONC/BMD drop group ($p < 0.05$, $r = 0.7$).

A pronounced positive correlation was observed between the increase in RGC counts and total DAPI-stained cell counts ($p < 0.01$, $r = 0.857$) in the middle region of the retinas of the ONC/BMD drop group (S6 Fig).

The negative correlation between changes in RGC counts and GFAP expression in the middle region following saline treatment ($p = 0.01$, $r = -0.747$) underscores a distinct regional interplay, where decreased neuronal survival correlates with increased gliosis.

A comparison of DAPI-stained cell count changes between the middle and peripheral regions following ONC/BMD drop + IP treatment showed a significant correlation ($p < 0.05$, $r = 0.857$).

Significant variations were noted in the correlation of the RGC count changes between the peripheral and middle regions after saline treatment ($p = 0.02$, $r = 0.733$), and a similar trend was observed between the middle and central regions after brimonidine eye drop treatment ($p = 0.057$, $r = 0.714$) (S6 Fig).

Discussion

We investigated the effects of topical administration of brimonidine alone and in combination with IP on the survival of retinal cells in different retinal segments after ONC in a non-clinical murine model. The results suggest that mice receiving combined treatment with topical and systemic brimonidine after ONC showed an overall RGC survival rate of 81.46% in the retina compared to 65.44% RGC survival in the saline treatment group or 64.13% survival rate in the brimonidine eye drop alone treatment group. These results indicate that IP injections of brimonidine supplemented with brimonidine eye drops had an additional benefit for RGC survival after ONC.

Our results are in agreement with those of previous studies, which demonstrated the neuroprotective effects of systemically administered brimonidine. Wheeler et al. showed that local administration of brimonidine eye drops exerts potent neuroprotection and prevents RGC death in a rat model of partial optic nerve crush injury, and that neuroprotection was dose-

dependent [11]. Similarly, a systemic brimonidine administration and its effect on the preservation of retinal ganglion cells was evaluated by Lambert et al. [15]. In addition to significantly improved axonal transport and survival of axons, a reduced loss of RGC in the rat retina after 1 mg/kg/day of systemically administered brimonidine has been reported [15]. WoldeMussie et al. studied the effect of 0.5 or 1 mg/kg/d subcutaneous brimonidine administration on RGC survival and compared it with the timolol treatment effect. Their results revealed that brimonidine, but not timolol, has dose-related neuroprotective effects in the retina. Brimonidine had an insignificant effect on IOP if administered subcutaneously [27]. In the study by Marangoz et al., IP administration of brimonidine and melatonin in glaucomatous injury was compared. The results revealed that only 1 mg/kg/day of 0.15% brimonidine had an IOP-lowering effect and acted as a neuroprotective agent in RGCs [16]. Similarly, Hernandez et al. confirmed that once-weekly IP administration of 1 mg/kg brimonidine for 12 weeks increased RGC survival. Additionally, a comparable positive effect was observed after latanoprost. Consequently, the authors assumed that similar neuroprotective results have been achieved via different mechanisms. Inhibition of the apoptotic cascade and reduction of glutamate toxicity have been achieved after IP brimonidine injections, in contrast to latanoprost administration, which resulted in progressively lowered IOP [28].

In summary, most studies that used a 0.5–1 mg/kg dose of IP brimonidine in different regimes [27, 28, 37] from 3 to 12 weeks reported higher RGC survival rates. Our results suggest that a shorter duration of two days but a higher dosage of 2 mg/kg, may have a comparable effect on RGC survival. The observed mild grade 1 adverse events in 5 of 12 mice resolved spontaneously. In addition, the median effective dose (ED50) and lethal dose (LD50) of intraperitoneally administered brimonidine in hypnotized mice were 75.7 mg/kg and the LD50 was 379 mg/kg, respectively [38].

Many studies examining brimonidine's neuroprotective effects analyze RGCs 1–4 mm from the optic disk or across different retinal regions, averaging these counts to determine mean RGC density [15, 23, 27, 37, 39, 40]. This method may not fully reveal the impact of brimonidine on specific areas because RGC distribution varies across the retina, showing a gradient from the center to the periphery. Research on experimental glaucoma models has noted dense RGCs centrally and sparse RGCs peripherally [28]. Unlike our findings, where elevated IOP led to higher RGC death centrally, previous models showed increased peripheral RGC death due to trabecular blockage and inflammatory responses [41–43]. Hernandez et al. observed consistent RGC survival across the retina following brimonidine treatment under high IOP conditions [28]. Our study contradicts these findings, showing significant central RGC death linked to optic nerve damage, suggesting that injury proximity and model characteristics critically influence RGC survival. This variation across models highlights the importance of further research into the impact of local factors, such as inflammation or mechanical damage, on retinal cell survival.

Our study found that RGCs showed greater survival in the peripheral regions, with a 92.82% survival rate following treatment with brimonidine eye drops and two additional intraperitoneal doses. This survival rate was significantly higher than that with only brimonidine eye drops (68.4%) and the saline control group (60.96%). These results were consistent across the entire retina, confirming the systemic neuroprotective effect of brimonidine.

In addition, studies have highlighted the crucial role of retinal glia in glaucoma, where glial cells support neuronal metabolism and homeostasis under normal conditions [44, 45]. During glaucoma, gliosis occurs as astrocytes and Müller cells react to neuronal damage by becoming inflammatory and contributing to glial scar formation, adversely affecting RGC survival owing to increased pro-inflammatory mediators [46]. Retinal astrocytes, important in ionic balance,

neurotransmission, and neurodegeneration, show increased numbers in our brimonidine-treated groups compared to controls, with consistent gliosis across all experimental groups [47–49].

This finding raises questions about the effects of systemic versus topical brimonidine in moderating glial activity. Specifically, whether the addition of IP brimonidine injections could modify the excessive peripheral activation noted, underscoring the complex interplay between systemic and topical treatments in managing gliosis. Interestingly, ONC groups treated with saline drops and IP injections did not show an increase in astrocytes, prompting a reassessment of how various treatments affect glial activation and whether these effects are directly linked to brimonidine's mechanisms.

In our study examining retinal astrocytes and RGC counts across the retina, we noted a significant inverse correlation in the ONC/BMD drop group, a trend that persisted in the middle retina, indicating that reduced gliosis correlated with higher RGC survival. Conversely, saline treatment showed a direct correlation between astrocyte and RGC counts. Changes in the number of astrocytes in the ONC/saline drop + IP and ONC/BMD drop + IP groups correlated moderately across central to peripheral regions, suggesting controlled gliosis and raising questions about the role of brimonidine in retinal astrogliosis and its dose-dependent effects. Additionally, the ONC/BMD drop + IP group displayed a pronounced protective effect on non-neuronal cells in the peripheral region of the retina, although the difference in DAPI cell counts was not significant compared with the control group. The ONC/saline drop + IP and ONC/BMD drop + IP groups had fewer non-neuronal cells than the control group, suggesting that brimonidine may indirectly benefit both neuronal and non-neuronal cells through systemic and topical application.

Our study has some limitations. One of the limitations of our study was the absence of confirmation of successful application of brimonidine in animals. Ensuring effective delivery and uptake of the treatment would be beneficial for interpreting the neuroprotective outcomes. Additionally, there is a lack of data on the effects of brimonidine treatment on RGCs in the absence of ONC. We cannot entirely rule out the influence of anesthesia on neuroprotection. Nevertheless, all mice were uniformly anesthetized (at the same doses and frequencies), which minimized the potential confounding effects on the results. Further studies are necessary to evaluate the specific impact of brimonidine and anesthesia on RGCs without ONC to better understand their roles in neuroprotection. Using NeuN in conjunction with Brn3a and RBPMS would leverage the strengths of each marker, ensuring a comprehensive assessment of RGC loss and understanding of the broader neuronal context within the ganglion cell layer, enhancing the reliability of our conclusions regarding RGC viability and loss.

In addition, as the main goal of described study was morphological evaluation of RGC and astrocyte survival with an emphasis on possible regional differences of neuroprotective effect of brimonidine, we did not see a viable option to include evaluation of molecular markers from different regions of retina due to the size of sampled tissue and uncertainty on variability. Despite the previously published data confirming the correlation of systemic brimonidine administration and decrease of cAMP [50] and the increase of BDNF [10] in preclinical studies, the study could have benefited from the additional measurement of cAMP or neurotrophic factors to assess the general action of brimonidine in our model.

While we demonstrated the positive impact of additional IP brimonidine injections alongside eye drops on RGC survival, further assessment could benefit from using a pattern electroretinogram to measure functional neuroprotection. Future studies should explore the effects of varying dosages and treatment durations on RGC survival after ONC. Given the observed variations in RGC survival, investigating different glaucoma models may provide deeper insights into treatment efficacy. Each model has unique pathophysiological characteristics that may affect RGC survival differently, underscoring the need for further research across diverse

glaucoma paradigms. By examining various dosages and treatment periods across different models, future studies could offer a more detailed understanding of the neuroprotective mechanisms and their broader applicability in managing glaucoma. Such a comprehensive approach would enhance our knowledge of RGC resilience and lead to more effective and tailored treatments for glaucoma.

Conclusions

IP injections of brimonidine, when used alongside brimonidine eye drops, enhanced RGCs survival across all retinal regions in the mouse ONC model. The reduction in the RGC count was more significant in the central area of the retina. In contrast, gliosis in the retina is predominantly observed in central regions. Our findings indicate that a higher brimonidine dosage of 2 mg/kg or a shorter treatment duration of two days exhibits neuroprotective effects. Further research is necessary to explore the dependency on brimonidine dosage and treatment duration as well as their effects on RGC functional outcomes. Additionally, more detailed studies on the interaction between glial cells and neurons in various segments of the retina would enrich our understanding of neuroprotective mechanisms within the retina.

Supporting information

S1 Fig. DAPI positive cell counts in the total retina after ONC. **** $p < 0.0001$. DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole—the fluorescent stain; ONC - optic nerve crush; BMD - Brimonidine, IP - intraperitoneal. (TIFF)

S2 Fig. GFAP positive cell counts in the retina after ONC. * $p < 0.05$. GFAP - glial fibrillary acidic protein; ONC, optic nerve crush; BMD, Brimonidine, IP, intraperitoneal. (TIFF)

S3 Fig. Correlations between total counts of retinal cells. ONC—optic nerve crush; BMD—brimonidine; IP—intraperitoneal; NeuN—primary antibody; GFAP - glial fibrillary acidic protein; DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole—the fluorescent stain; ONC - optic nerve crush; BMD, Brimonidine, IP, intraperitoneal. (PDF)

S4 Fig. Correlations between the regions of the retina. ONC—optic nerve crush; BMD—brimonidine; IP—intraperitoneal; NeuN—primary antibody; GFAP - glial fibrillary acidic protein; DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole—the fluorescent stain; ONC - optic nerve crush; BMD, Brimonidine, IP, intraperitoneal. (PDF)

S5 Fig. Correlational analysis of cell density and gliosis across retinal regions. ONC—optic nerve crush; BMD—brimonidine; IP—intraperitoneal; NeuN—primary antibody; GFAP - glial fibrillary acidic protein; DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole—the fluorescent stain; ONC - optic nerve crush; BMD, Brimonidine, IP, intraperitoneal. (PDF)

S6 Fig. Correlations of change dynamics. ONC—optic nerve crush; BMD—brimonidine; IP—intraperitoneal; NeuN—primary antibody; GFAP - glial fibrillary acidic protein; DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole—the fluorescent stain; ONC - optic nerve crush; BMD, Brimonidine, IP, intraperitoneal. (PDF)

S1 Table. DAPI-positive cell count average (cells/mm² ± SD) in the total and different regions of murine retina. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Total retina: **** - Control group vs. Group 1; Control group vs. Group 2; Control group vs. Group 3; Central region: **** - Control group vs. Group 1; Control group vs. Group 2; Control group vs. Group 3; Middle region: *** - Control group vs. Group 1; Control group vs. Group 2; Control group vs. Group 3; Peripheral region. *** - Control group vs. Group 1; Control group vs. Group 2. Control group-left eyes without ONC; Group 1 -ONC/Saline drop + IP; Group 2 -ONC/BMD drop; Group 3 -ONC/BMD drop +IP. ONC-optic nerve crush; BMD-brimonidine; IP-intraperitoneal, NeuN-primary antibody.
(PDF)

S2 Table. GFAP-positive cell count average (cells/mm² ± SD) in the total and different regions of murine retina. * $p < 0.05$. Total retina: * - Control group vs. Group 2; Control group-left eyes without ONC; Group 1 -ONC/Saline drop + IP; Group 2 -ONC/BMD drop; Group 3 -ONC/BMD drop +IP. ONC-optic nerve crush; BMD-brimonidine; IP-intraperitoneal, NeuN-primary antibody.
(PDF)

Acknowledgments

The authors would like to thank the personnel of the Institute of Anatomy and Animal Center in Veterinary Academy at the Lithuanian University of Health Sciences for advice and technical support.

Author Contributions

Conceptualization: Ruta Maciulaitiene, Giedrius Kalesnykas, Ingrida Januleviciene.

Data curation: Ruta Maciulaitiene, Giedrius Kalesnykas, Ingrida Januleviciene.

Formal analysis: Ruta Maciulaitiene, Giedrius Kalesnykas, Ingrida Januleviciene.

Funding acquisition: Ruta Maciulaitiene, Giedrius Kalesnykas, Ingrida Januleviciene.

Investigation: Ruta Maciulaitiene, Giedrius Kalesnykas.

Methodology: Ruta Maciulaitiene, Giedrius Kalesnykas, Dainius Haroldas Pauza, Ingrida Januleviciene.

Project administration: Ruta Maciulaitiene, Giedrius Kalesnykas, Ingrida Januleviciene.

Resources: Ruta Maciulaitiene, Giedrius Kalesnykas, Dainius Haroldas Pauza, Ingrida Januleviciene.

Software: Ruta Maciulaitiene, Giedrius Kalesnykas.

Supervision: Giedrius Kalesnykas, Dainius Haroldas Pauza, Ingrida Januleviciene.

Visualization: Ruta Maciulaitiene, Giedrius Kalesnykas, Dainius Haroldas Pauza.

Writing – original draft: Ruta Maciulaitiene, Giedrius Kalesnykas, Ingrida Januleviciene.

Writing – review & editing: Ruta Maciulaitiene, Giedrius Kalesnykas, Dainius Haroldas Pauza, Ingrida Januleviciene.

References

1. Nakazawa T, Fukuchi T. What is glaucomatous optic neuropathy? *Jpn J Ophthalmol.* 2020 May 1; 64(3):243–9. <https://doi.org/10.1007/s10384-020-00736-1> PMID: 32394134

2. Weinreb RN, Aung T, Medeiros FA. The pathophysiology and treatment of glaucoma: A review. Vol. 311, *JAMA*. American Medical Association; 2014. p. 1901–11.
3. Calkins DJ. Adaptive responses to neurodegenerative stress in glaucoma. *Prog Retin Eye Res* [Internet]. 2021 Sep 1; 84:100953. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350946221000148> <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2021.100953> PMID: 33640464
4. Vernazza S, Oddone F, Tirendi S, Bassi AM. Risk Factors for Retinal Ganglion Cell Distress in Glaucoma and Neuroprotective Potential Intervention. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Jul 27; 22(15):7994. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/15/7994> <https://doi.org/10.3390/ijms22157994> PMID: 34360760
5. Davis BM, Crawley L, Pahlitzsch M, Javadi F, Cordeiro MF. Glaucoma: the retina and beyond. Vol. 132, *Acta Neuropathologica*. Springer Verlag; 2016. p. 807–26.
6. Conlon R, Saheb H, Ahmed IIK. Glaucoma treatment trends: a review. Vol. 52, *Canadian Journal of Ophthalmology*. Elsevier B.V.; 2017. p. 114–24.
7. Cameron EG, Xia X, Galvao J, Ashouri M, Kapiloff MS, Goldberg JL. Optic Nerve Crush in Mice to Study Retinal Ganglion Cell Survival and Regeneration. *Bio Protoc*. 2020 Mar 20; 10(6). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3559> PMID: 32368566
8. Kalesnykas G, Oglesby EN, Zack DJ, Cone FE, Steinhart MR, Tian J, et al. Retinal ganglion cell morphology after optic nerve crush and experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012 Jun; 53(7):3847–57. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-9712> PMID: 22589442
9. Wheeler LA, Woldemussie E. Alpha-2 adrenergic receptor agonists are neuroprotective in experimental models of glaucoma. *Eur J Ophthalmol*. 2001; 11(Suppl 2):S30–5. <https://doi.org/10.1177/112067210101102s03> PMID: 11592528
10. Gao H. Up-regulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor Expression by Brimonidine in Rat Retinal Ganglion Cells. *Archives of Ophthalmology* [Internet]. 2002 Jun 1; 120(6):797. Available from: <http://archophth.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archophth.120.6.797> <https://doi.org/10.1001/archophth.120.6.797> PMID: 12049586
11. Wheeler LA, Lai R, Woldemussie E. From the lab to the clinic: Activation of an alpha-2 agonist pathway is neuroprotective in models of retinal and optic nerve injury. Vol. 9, *European Journal of Ophthalmology*. 1999.
12. Ogidigben M, Chu TC, Potter DE. Alpha-2 Adrenoceptor Mediated Changes in Aqueous Dynamics: Effect of Pertussis Toxin. *Exp Eye Res* [Internet]. 1994 Jun; 58(6):729–36. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014483584710700> <https://doi.org/10.1006/exer.1994.1070> PMID: 7925712
13. Toris CB, Camras CB, Yablonski ME. Acute versus chronic effects of brimonidine on aqueous humor dynamics in ocular hypertensive patients. *Am J Ophthalmol* [Internet]. 1999 Jul; 128(1):8–14. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002939499000768> [https://doi.org/10.1016/s0002-9394\(99\)00076-8](https://doi.org/10.1016/s0002-9394(99)00076-8) PMID: 10482088
14. Boia R, Ruzafa N, Aires ID, Pereiro X, Ambrósio AF, Vecino E, et al. Neuroprotective Strategies for Retinal Ganglion Cell Degeneration: Current Status and Challenges Ahead. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Mar 25; 21(7):2262. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/7/2262> <https://doi.org/10.3390/ijms21072262> PMID: 32218163
15. Lambert WS, Ruiz L, Crish SD, Wheeler LA, Calkins DJ. Brimonidine prevents axonal and somatic degeneration of retinal ganglion cell neurons. *Mol Neurodegener*. 2011; 6(1). <https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-4> PMID: 21232114
16. Marangoz D, Guzel E, Eyuboglu S, Gumusel A, Seckin I, Ciftci F, et al. Comparison of the neuroprotective effects of brimonidine tartrate and melatonin on retinal ganglion cells. *Int Ophthalmol*. 2018 Dec 1; 38(6):2553–62. <https://doi.org/10.1007/s10792-017-0768-z> PMID: 29159432
17. Conti F, Romano GL, Eandi CM, Toro MD, Rejdak R, Di Benedetto G, et al. Brimonidine is Neuroprotective in Animal Paradigm of Retinal Ganglion Cell Damage. *Front Pharmacol*. 2021 Jul 21;12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.705405> PMID: 34366858
18. Degos V, charpentier T Le, Chhor V, Brissaud O, Lebon S, Schwendimann L, et al. Neuroprotective Effects of Dexmedetomidine against Glutamate Agonist-induced Neuronal Cell Death Are Related to Increased Astrocyte Brain-derived Neurotrophic Factor Expression. *Anesthesiology* [Internet]. 2013 May 1; 118(5):1123–32. Available from: <https://pubs.asahq.org/anesthesiology/article/118/5/1123/13664/Neuroprotective-Effects-of-Dexmedetomidine-against> <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e318286cf36> PMID: 23353792
19. Lee KYC, Nakayama M, Aihara M, Chen YN, Araie M. Brimonidine is neuroprotective against glutamate-induced neurotoxicity, oxidative stress, and hypoxia in purified rat retinal ganglion cells. *Mol Vis* [Internet]. 2010 Feb 17; 16:246–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20161817> PMID: 20161817

20. Fu L, Kwok SS, Chan YK, Ming Lai JS, Pan W, Nie L, et al. Therapeutic Strategies for Attenuation of Retinal Ganglion Cell Injury in Optic Neuropathies: Concepts in Translational Research and Therapeutic Implications. *Biomed Res Int* [Internet]. 2019 Nov 11; 2019:1–10. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2019/8397521/> <https://doi.org/10.1155/2019/8397521> PMID: 31828134
21. Dong CJ, Guo Y, Agey P, Wheeler L, Hare WA. $\alpha 2$ adrenergic modulation of NMDA receptor function as a major mechanism of RGC protection in experimental glaucoma and retinal excitotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008 Oct; 49(10):4515–22.
22. Nizari S, Guo L, Davis BM, Normando EM, Galvao J, Turner LA, et al. Non-amyloidogenic effects of $\alpha 2$ adrenergic agonists: Implications for brimonidine-mediated neuroprotection. *Cell Death Dis*. 2016; 7(12).
23. Lafuente MP, Villegas-Pérez MP, Sobrado-Calvo P, García-Avilés A, Miralles de Imperial J, Vidal-Sanz M. Neuroprotective effects of alpha(2)-selective adrenergic agonists against ischemia-induced retinal ganglion cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 2001 Aug; 42(9):2074–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11481275> PMID: 11481275
24. Vidal-Sanz M, Lafuente MP, Mayor S, de Imperial JM, Villegas-Pérez MP. Retinal Ganglion Cell Death Induced by Retinal Ischemia. *Surv Ophthalmol* [Internet]. 2001 May; 45:S261–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039625701002053>
25. Lai RK, Chun T, Hasson D, Lee S, Mehrbod F, Wheeler L. Alpha-2 adrenoceptor agonist protects retinal function after acute retinal ischemic injury in the rat. *Vis Neurosci*. 2002; 19(2):175–85. <https://doi.org/10.1017/s0952523802191152> PMID: 12385629
26. Galindo-Romero C, Harun-Or-Rashid M, Jiménez-López M, Vidal-Sanz M, Agudo-Barruio M, Hallböök F. Neuroprotection by $\alpha 2$ -adrenergic receptor stimulation after excitotoxic retinal injury: A study of the total population of retinal ganglion cells and their distribution in the chicken retina. *PLoS One*. 2016 Sep 1; 11(9).
27. WoldeMussie E, Ruiz G, Wijono M, Wheeler LA. Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 2001 Nov; 42(12):2849–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11687528>
28. 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 May; 86(5):798–806.
29. Yoles E, Wheeler LA, Schwartz M. Alpha2-adrenoreceptor agonists are neuroprotective in a rat model of optic nerve degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 1999 Jan; 40(1):65–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9888428> PMID: 9888428
30. Saylor M, Mcloon LK, Harrison AR, Lee MS. Experimental and Clinical Evidence for Brimonidine as an Optic Nerve and Retinal Neuroprotective Agent An Evidence-Based Review. Vol. 127, *Arch Ophthalmol*. 2009.
31. Krupin T, Liebmann JM, Greenfield DS, Ritch R, Gardiner S. A randomized trial of brimonidine versus timolol in preserving visual function: Results from the low-pressure glaucoma treatment study. *Am J Ophthalmol*. 2011 Apr; 151(4):671–81. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2010.09.026> PMID: 21257146
32. Ferencz JR, Gilady G, Harel O, Belkin M, Assia EI. Topical brimonidine reduces collateral damage caused by laser photocoagulation for choroidal neovascularization. *Graefes's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2005 Sep; 243(9):877–80. <https://doi.org/10.1007/s00417-005-1160-7> PMID: 15785924
33. Merin S, Obolensky A, Farber MD, Chowers I. A pilot study of topical treatment with an $\alpha 2$ -agonist in patients with retinal dystrophies. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2008 Feb 1; 24(1):80–6.
34. Mondal LK, Baidya KP, Bhattacharya B, Chatterjee PR, Bhaduri G. The efficacy of topical administration of brimonidine to reduce ischaemia in the very early stage of diabetic retinopathy in good controlled type-2 diabetes mellitus. *J Indian Med Assoc*. 2004 Dec; 102(12):724–5, 729. PMID: 15871360
35. Wilhelm B, Lüdtke H, Wilhelm H, Gamer D, Knappe S, Vick HP, et al. Efficacy and tolerability of 0.2% brimonidine tartrate for the treatment of acute non-arteritic anterior ischemic optic neuropathy (NAION): A 3-month, double-masked, randomised, placebo-controlled trial. *Graefes's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2006 May; 244(5):551–8. <https://doi.org/10.1007/s00417-005-0102-8> PMID: 16151785
36. Freeman WR, Bandello F, Souied E, Guymer RH, Garg SJ, Chen FK, et al. Randomized Phase IIb Study of Brimonidine Drug Delivery System Generation 2 for Geographic Atrophy in Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmol Retina*. 2023 Jul 1; 7(7):573–85. <https://doi.org/10.1016/j.oret.2023.03.001> PMID: 36906177
37. Ma K, Xu L, Zhang H, Zhang S, Pu M, Jonas JB. Effect of Brimonidine on Retinal Ganglion Cell Survival in an Optic Nerve Crush Model. *Am J Ophthalmol*. 2009 Feb; 147(2):326–31. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2008.08.005> PMID: 18835468

38. Bin C, Xiaohui W, Mengrou S, Xin L, Ting Z, Ping G. Preliminary evaluation of the efficacy and safety of brimonidine for general anesthesia. *BMC Anesthesiol*. 2021 Dec 1; 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12871-021-01516-1> PMID: 34861822
39. Lafuente MP, Villegas-Pérez MP, Mayor S, Aguilera ME, Miralles de Imperial J, Vidal-Sanz M. Neuroprotective effects of brimonidine against transient ischemia-induced retinal ganglion cell death: A dose response in vivo study. *Exp Eye Res*. 2002; 74(2):181–9. <https://doi.org/10.1006/exer.2001.1122> PMID: 11950228
40. Valiente-Soriano FJ, Ortín-Martínez A, Pierdomenico J Di, García-Ayuso D, Gallego-Ortega A, Miralles de Imperial-Ollero JA, et al. Topical brimonidine or intravitreal bdnf, cntf, or bfgf protect cones against phototoxicity. *Transl Vis Sci Technol*. 2019 Nov 1;8(6). <https://doi.org/10.1167/tvst.8.6.36> PMID: 31890348
41. Urcola JH, Hernández M, Vecino E. Three experimental glaucoma models in rats: Comparison of the effects of intraocular pressure elevation on retinal ganglion cell size and death. *Exp Eye Res*. 2006 Aug; 83(2):429–37. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2006.01.025> PMID: 16682027
42. Ahmed FAKM, Chaudhary P, Sharma SC. Effects of increased intraocular pressure on rat retinal ganglion cells [Internet]. Vol. 19, *Int. J. Devl Neuroscience*. 2001. Available from: www.elsevier.nl/locate/ijdevneu
43. Weber AJ, Zelenak D. Experimental glaucoma in the primate induced by latex microspheres [Internet]. Vol. 111, *Journal of Neuroscience Methods*. 2001. Available from: www.elsevier.com/locate/jneumeth
44. Zhao X, Sun R, Luo X, Wang F, Sun X. The Interaction Between Microglia and Macrogliia in Glaucoma. Vol. 15, *Frontiers in Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2021.
45. Vecino E, Rodríguez FD, Ruzafa N, Pereiro X, Sharma SC. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. Vol. 51, *Progress in Retinal and Eye Research*. Elsevier Ltd; 2016. p. 1–40.
46. Ganesh BS, Chintala SK. Inhibition of reactive gliosis attenuates excitotoxicity-mediated death of retinal ganglion cells. *PLoS One*. 2011; 6(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018305> PMID: 21483783
47. Halassa MM, Fellin T, Haydon PG. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med*. 2007 Feb; 13(2):54–63. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.12.005> PMID: 17207662
48. Halassa MM, Fellin T, Haydon PG. Tripartite synapses: Roles for astrocytic purines in the control of synaptic physiology and behavior. Vol. 57, *Neuropharmacology*. 2009. p. 343–6.
49. Neufeld AH, Liu B. Glaucomatous Optic Neuropathy: When Glia Misbehave. Vol. 9, *Neuroscientist*. 2003. p. 485–95.
50. Benozzi J, Jaliffa CO, Lacoste FF, Llomovatte DW, Sarmiento MIK, Rosenstein RE. Effect of Brimonidine on Rabbit Trabecular Meshwork Hyaluronidase Activity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000; Jul; 41(8):2268–72. PMID: 10892872

CURRICULUM VITAE

Name, Surname: Rūta Mačiulaitienė
Address: Eivenių g. 2, LT-50009 Kaunas, Lithuania
Phone: +370 683 53522
E-mail: ruta.maciulaitiene@lsmu.lt

Education:

Since 2014 Department of Ophthalmology, Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, PhD studies
2013 Professional qualification of ophthalmologist
2010–2013 Department of Ophthalmology, Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, residency in ophthalmology
2010 Profession qualification of medical doctor
2010 Kaunas Red Cross Hospital, medical internship
2010 Kaunas University of Medicine (KMU), Master's qualification degree in medicine and qualification of doctor

Current position:

Ophthalmologist at the Department of Ophthalmology, Hospital of Lithuanian University of Health Sciences, since August 2013.

Membership of professional societies:

Lithuanian Ophthalmology Society
Kaunas Ophthalmological Society
Lithuanian Glaucoma Society
World Society of Paediatric Ophthalmology and Strabismus (WSPOS)

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju šio mokslinio darbo vadovei, gerb. prof. dr. Ingridai Janulevičienei už neįkainojamą pagalbą, patarimus, paskatinimą siekti aukščiausių rezultatų ir tikėjimą viso mokslinio darbo proceso metu. Jūsų įžvalgos ir nuoseklus vadovavimas ne tik praturtino mano akademinės žinias, bet ir suteikė galimybę augti.

Esu dėkinga doc. dr. Giedriui Kalesnykui už visapusišką pagalbą, vertingus patarimus ir palaikymą.

Ypatinga padėka prof. dr. D.H. Paužai už prieglobstį LSMU MA Anatomijos institute, sudarytas sąlygas tinklainės preparatams ruošti, analizei, vertingus patarimus ir šiltą palaikymą visais disertacijos rengimo etapais. Taip pat dėkoju visiems LSMU MA Anatomijos instituto ir Veterinarijos akademijos Gyvūnų tyrimo centro darbuotojams už bendradarbiavimą, idėjų mainus ir pagalbą. Jūsų parama ir draugiška atmosfera yra neįkainojama.

Už vertingus patarimus ir pastabas dėkoju LSMU Kauno klinikų Akių ligų klinikos vadovei prof. dr. Redai Žemaitienei. Dėkoju prof. dr. Daliai Žaliūnienei ir prof. dr. Rasai Liutkevičienei už man skirtą laiką bei vertingas įžvalgas, kurios reikšmingai prisidėjo prie šio darbo tobulinimo.

Nuoširdūs padėkos žodžiai skiriami LSMU Kauno klinikų Akių ligų klinikos Vaikų akių ligų skyriaus vadovui doc. dr. Arvydui Gelžiniui ir kolegoms už supratimą ir palaikymą. Dr. Giedrei Pakulienei dėkoju už pagalbą atliekant eksperimentinius tyrimus Lietuvoje ir Suomijoje.

Dėkoju draugėms Daivai, Renatai, Kristinai, Gintautei, Evelinai, Linai, Viktorijai, kurių draugija visada yra ir bus man ypatinga.

Didžiausia padėka mano mamai Nijolei, kuri visad palaikė, suteikė galimybę studijuoti ir siekti užsibrėžtų tikslų. Ačiū, mama ir Gerald. Padėka skiriama mano visai šeimai – sesei, geriausiai draugei Ievai ir Dimitri, tėčiui Gintarui, tetai Violetai ir Audriui, močiutei Joanai, diedukui Pranui, už visokeriopą palaikymą, pagalbą bei tikėjimą manimi visus šiuos metus.

Noriu padėkoti visai vyro Justino šeimai, kuri prisidėjo prie šio darbo įgyvendinimo. Ačiū jums. Ypatinga padėka uošviui – prof. dr. Romaldui Mačiulaičiui, kuris tikėjo manimi, palaikė, padaršino, pasidalijo savo sukauptomis žiniomis ir patirtimi. Esu jums labai dėkinga už man skirtą dėmesį ir laiką.

Iš visos širdies dėkoju savo vyrui Justinui už beribę meilę, supratimą, kantrybę, palaikymą, pastūmėjimą į priekį, buvimą šalia ir patvirtinimą, kad viskas bus gerai. Galiausiai, noriu padėkoti mūsų vaikams, Eglei ir Simonui – mylėsiu amžinai.