

АНОТАЦІЯ

Білоус В.Л. Молекулярні механізми розвитку патологічних станів рогівки та розробка підходів до їх корекції. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія». – Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ, 2024.

Дисертація присвячена дослідженню молекулярних механізмів розвитку патологічних станів рогівки, індукованих різними чинниками, вплив яких асоційований з гіпоксією, запаленням та неоваскуляризацією. Важливою умовою для нормального світлопропускання та забезпечення високої якості зору є аваскулярність рогівки, яка у здоровому оці підтримується за рахунок балансу між про- та антиангіогенними регуляторами. Оскільки неоваскуляризація є загрозливим станом, що спричиняє погіршення зору або його повну втрату, на сьогоднішній день пошук нових ефективних і безпечних модуляторів судиноутворення є актуальною проблемою сучасної біохімії, біомедицини та клінічної офтальмології. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) у всьому світі кількість пацієнтів з очними хворобами, пов'язаними з розвитком неоваскуляризації рогівки, щорічно збільшується на 1,4 млн. з тенденцією до зростання. До факторів, що викликають неоваскулярні захворювання рогівки, відносяться фізичні травми, пил та інші абразивні матеріали, хімічні та термічні опіки, синдром сухого ока, хірургічні втручання, неконтрольоване носіння контактних лінз, інфекційний кератит, ультрафіолетове світло тощо. Хронічне запалення та неоваскуляризація є факторами, які можуть спровокувати відторгнення трансплантату після проведення кератопластики. Через активний перебіг бойових дій в Україні особливо гостро стоїть проблема лікування поранень ока та їхніх ускладнень, оскільки значний процент від усіх видів бойових травм складають пошкодження очного яблука та проникні поранення рогівки.

Фармакотерапія неоваскулярних захворювань рогівки за допомогою існуючих засобів, зокрема, кортикостероїдів, має обмежену ефективність і асоційована з проявом цілої низки побічних ефектів, що спонукає до розробки нових терапевтичних підходів та лікарських засобів. Серед фізіологічних інгібіторів неоваскуляризації особливу увагу привертають продукти обмеженого протеолізу плазміногену – ангіостатини (AS). Ці крингл-вмісні поліпептиди (K1-3, K1-4, K1-4,85, K1-5, K5) з різною ефективністю пригнічують ангіогенез через специфічне інгібування проангіогенного сигналіngu в ендотелійних клітинах та володіють протизапальними властивостями. У відділі хімії та біохімії ферментів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України раніше було розроблено та успішно реалізовано технологію отримання AS K1-3 та K5, ефекти яких вивчали у представленій дисертаційній роботі. Для виконання поставлених у дисертаційній роботі завдань було використано сучасні біохімічні, фізико-хімічні та імунохімічні методи (гель-електрофорез протеїнів, імуноблотинг, імуноензимний аналіз, афінна хроматографія, ензим-форез, спектрофотометричні методи), методи імунізації тварин та отримання поліклональних антитіл, методи культивування еукаріотичних клітин, гістологічні методи, тест Ефрона (визначення ступеня неоваскуляризації рогівки), методи статистичного аналізу.

Отже, була сформульована мета роботи: з'ясувати молекулярні механізми розвитку патологічних станів рогівки та розробити підходи до їх корекції.

Одним із завдань представленої дисертаційної роботи було оцінити біологічну активність та біосумісність AS в експериментах *in vivo* та *in vitro*. Антиангіогенну активність AS K1-3 вивчали на моделі лужного опіку рогівки кролів. У тварин експериментальної групи опік викликали аплікацією 1 N розчину NaOH на поверхню ока. Частина тварин з опіковою травмою рогівки отримувала AS K1-3 місцево у вигляді очних крапель щоденно протягом 14 днів після опіку у дозі 0,75 мкг (1,0 мкМ розчин). За

допомогою морфологічного тесту Ефрона було встановлено, що AS сприяв істотному регресу новоутворених судин у рогівці за лужного опіку. Результати морфологічного дослідження узгоджуються з даними гістологічного аналізу, які свідчать, що застосування AS зменшило ступінь дегенеративних змін, інфільтрації лейкоцитів та надмірного проростання судин в ушкодженій рогівці й сприяло регенерації епітелію. Вестерн-блот аналіз лізатів тканини рогівки показав, що опік призвів до істотного зростання рівня проангіогенного цитокіну VEGF в ушкодженій тканині (у 3,3 рази у порівнянні з контролем, $P < 0,01$), тоді як K1-3 сприяв нормалізації його вмісту. Крім того, драматичне збільшення у пошкодженій рогівці рівнів про-каспази-3 та беклін-1 (відповідно у 15,6 та 31 рази порівняно з контролем, $P < 0,001$) свідчить про активацію про-апоптотичних шляхів загибелі клітин та розвиток автофагії. Застосування K1-3 сприяло зменшенню рівня маркерів апоптозу та автофагії в рогівці після опіку відповідно у 4,5 та 12,9 разів у порівнянні з контролем ($P < 0,05$). Оскільки раніше було показано, що надактивація макрофагів рогівки тканинним дебрисом може бути однією з причин розвитку і підтримання неоваскуляризації, в роботі було досліджено вплив AS K1-3 (10-200 нМ) на метаболічну активність фагоцитарних клітин у тесті з нітросинім тетразолієм (НСТ-тест). Було встановлено, що K1-3 у концентрації > 50 нМ інгібує активність клітинних дегідрогеназ макрофагів лінії J744.2 у середньому на 30% у порівнянні з інтактними клітинами ($P < 0,05$). Отже, одним з механізмів антиангіогенної та цитопротекторної дії AS у рогівці за умов лужного опіку може реалізуватися через помірний супресорний вплив на активність резидентних макрофагів. Було встановлено, що показані ефекти AS K1-3 виявилися більш вираженими у порівнянні з відомим протекторним протеїном лактоферином (Lf), який був використаний в еквімолярній концентрації як препарат порівняння.

Обов'язковою умовою при тестуванні нових препаратів-ангіостатиків є перевірка їхніх можливих цитотоксичних властивостей на клітини очного

дна, зокрема, сітківки. У представленій роботі вивчали ефекти AS K1-3 та K5 на життєздатність клітин пігментного епітелію сітківки (лінія RPE-1 hTERT) за допомогою МТТ-тесту. Було показано, що обидва варіанти ангіостатинів у діапазоні досліджуваних концентрацій 2-100 нМ не чинять цитотоксичних ефектів на клітини пігментного епітелію сітківки за умов *in vitro*. Ці дані становлять значний практичний інтерес з огляду на можливість безпечного застосування досліджуваних інгібіторів ангіогенезу з метою таргетного і специфічного пригнічення активності ендотелійних клітин судин за терапії різних хвороб ока, асоційованих з неоваскуляризацією.

Попри значний прогрес у з'ясуванні механізмів біологічної активності фрагментів плазміногену, інші ефекти AS у рогівці за її ушкодження, окрім інгібування проангіогенного сигналювання, залишаються наразі невивченими. Наступним завданням дисертаційної роботи було дослідити вплив двох поліпептидів AS (K1-3 і K5) на рівень протеїнів-маркерів ключових патофізіологічних патернів у моделі лужного опіку рогівки щурів. Піддослідні тварини отримували AS K1-3 місцево у вигляді очних крапель у дозі 0,075 або 0,75 мкг (у вигляді 0,1 або 1,0 мкМ розчинів відповідно) або 0,3 мкг AS K5 (1,0 мкМ) щоденно протягом 14 днів після травми. За допомогою Вестерн-блот аналізу лізатів тканини рогівки показано, що застосування AS сприяло зменшенню рівнів протеїнів-маркерів, асоційованих з гіпоксією (HIF-1 α), ангіогенезом (VEGF), ремоделюванням і фіброзом тканин (MMP-9), автофагією (beclin-1), а також стресом ендоплазматичного ретикулуму (GRP-78), як основних ланок патологічного процесу. Крім того, AS K1-3 сприяв зростанню рівня протеїну щільних контактів ZO-1, що свідчить про ініціацію регенеративних процесів та реепітелізацію рогівки після лужного опіку.

Відомо, що епітелійні клітини поверхні ока є мішенню для низки вірусів, які використовують експоновані на них рецептори для проникнення до організму. У дисертаційній роботі досліджували вплив AS на рівень рецептора SARS-CoV-2 ангіотензинконвертувального протеїну-2 (ACE2) у

тканині рогівки в експериментальній моделі лужного опіку. Пошкодження поверхні ока, викликане лугом, спричинило збільшення рівня ACE2 у 7,7 разів порівняно з контролем ($P < 0,001$), що вказує на більшу вразливість пошкодженого ока до інфікування. Застосування AS K5 або K1-3 (1,0 мкМ) знижувало рівень експресії ACE2 в ушкодженій рогівці вдвічі ($P < 0,05$ порівняно з групою Опік), тоді як K1-3 у меншій концентрації (0,1 мкМ) знижував вміст ACE2 у 3,4 рази ($P < 0,05$). Отримані результати свідчать про те, що AS можуть зменшувати потенційний ризик проникнення SARS-CoV-2 через поверхню ока шляхом зниження експресії його рецептора. Також було досліджено вплив AS K1-3 і K5 на рівень маркера активованої сателітної глії GFAP (гліальний фібрилярний кислий протеїн) у пошкодженій рогівці щурів. Слід зауважити, що в здоровій рогівці цей протеїн синтезується в слідових кількостях, що свідчить про функціонування гліальних клітин у стані фізіологічного спокою. Втім, було показано драматичне зростання вмісту GFAP у тканині рогівки за опікової травми (у 62 рази порівняно з контролем, $P < 0,001$). Слід зазначити, що K5 виявився вдвічі ефективнішим за K1-3 за здатністю інгібувати реактивацію сателітної глії, про що свідчить зменшення рівня GFAP у 10,9 разів порівняно з групою Опік ($P < 0,01$). Більша ефективність K5 може бути пов'язаною з меншими розмірами його молекул (14 кДа) у порівнянні з K1-3 (35 кДа), що визначає більшу біодоступність K5. Отримані результати свідчать на користь реалізації ангіостатинами нейропротекторних властивостей через пригнічення надмірної активації сателітної глії в пошкодженій рогівці. Загалом, дані, отримані на експериментальній моделі лужного опіку рогівки, вказують на перспективи застосування AS для розробки ефективних та безпечних офтальмологічних препаратів з комплексним механізмом захисної дії.

Відомо, що різні розлади метаболізму, які часто супроводжуються формуванням гіпо- або авітамінозних станів, призводять до порушення функціонування рогівки. Зокрема, хронічне зловживання алкоголю є частою

причиною патологічних змін ока, таких як катаракта, синдром сухого ока, синдром червоного ока, нейродегенерація, які призводять до погіршення зору та сліпоти. Проте наразі мало відомо про молекулярні механізми впливу хронічного споживання алкоголю на рогівку. Тривала інтоксикація етиловим спиртом, крім впливу на орган зору власно етанолу та токсичних продуктів його метаболізму, є вкрай небезпечною через зниження рівня вітамінів групи В, особливо В₁ (тіаміну). Отже, наступне завдання роботи полягало у перевірці гіпотези, що введення вітаміну В₁ може чинити протекторну дію у рогівці за умов тривалого споживання етанолу. З цією метою було сформовано експериментальну модель хронічної алкоголізації, в якій щури отримували 15% розчин етанолу (EtOH) протягом 9 місяців. За тиждень до закінчення експерименту частина щурів отримувала тіамін *per os* у добовій дозі 25 мг/кг маси тіла. Було встановлено, що тривале споживання етилового спирту призводить до істотного зростання вмісту HIF-1 α у рогівці (у 3,24 рази порівняно з контролем, $P < 0,05$), що свідчить про розвиток гіпоксичного стану в тканині тварин з інтоксикацією. Зростання рівня інших регуляторних протеїнів – маркерів патологічних станів, асоційованих з гіпоксією (VEGF, MMP-2 і -9), свідчить про активацію шляхів проангіогенного сигналювання та ремоделювання тканини рогівки як компенсаторного механізму за умов впливу токсиканта. Деструктивні зміни, індуковані етанолом у рогівці, супроводжувалися зменшенням рівня протеїну щільних контактів ZO-1 у 2,8 рази у порівнянні з контролем ($P < 0,05$), що є ознакою руйнування цілісності епітелійного шару рогівки. Означені зміни відбувалися на тлі розвитку проапоптотичного стану в рогівці, на що вказує істотне зменшення величини співвідношення Bcl-xL/Bax у щурів за тривалого впливу етанолу (у 20 разів порівняно з контролем, $P < 0,01$). Введення тіаміну щурам, що зазнали хронічного впливу етилового спирту, в 2,6 рази зменшило рівень HIF-1 α у рогівці у порівнянні з групою EtOH ($P < 0,05$), а також сприяло статистично достовірним змінам рівня VEGF, MMP та ZO-1 у бік нормалізації. Зростання величини

співвідношення V_{cl-xL}/V_{ax} у 6,5 разів за введення вітаміну B_1 у порівнянні з групою EtOH ($P < 0,05$) може пояснюватися сприятливою дією вітаміну B_1 на аеробний метаболізм, коригуванням мітохондрійної дисфункції, антиоксидантній та протизапальній активності тіаміну в клітинах рогівки за умов хронічної інтоксикації етанолом.

Рогівка є найбільш щільно іннервованою структурою організму (довжина нервів > 20 мм/мм² або 27 тис. рецепторів/мм², що у 300-600 разів більше, ніж у шкірі). Нейрони очного розгалуження трійчастого нерву, що іннервують рогівку, у комплексі з клітинами сателітної глії відповідають за трофіку та виживання епітелійних клітин, функціонування слізних залоз, кліпальний рефлекс, репаративні процеси тощо. Наступним завданням роботи було дослідити вплив вітаміну B_1 на вміст маркерів нейродегенерації та стану гліальних клітин у рогівці щурів, що зазнавали пролонгованої дії етанолу. Було показано, що етиловий спирт як речовина з нейротоксичними властивостями викликає нейродегенеративні зміни в рогівці, про що свідчить статистично достовірне зниження рівня ядерного маркеру нейронів NeuN та втрата важкої субодиниці нейрофіламентів NF-H на тлі накопичення гіперфосфорильованого протеїну тау (ознаки дегенерації аксонів у сенсорних нервах рогівки та розвитку тауопатії). Нейродегенеративні зміни, індуковані хронічним споживанням етанолу, супроводжувалися підвищенням реактивності сателітної глії (зростання рівня GFAP у 4,2 рази у порівнянні з контролем, $P < 0,01$). Введення тіаміну тваринам з хронічною алкогольною інтоксикацією сприяло нормалізації експресії нейрональних та гліальних маркерів у тканині рогівки, що вказує на зменшення ступеня нейродегенерації, стабілізації цитоскелета нейрональних клітин і модуляції функції сателітної глії. Отже, отримані дані доводять, що застосування тіаміну може бути науково обґрунтованим підходом для корекції нейротоксикологічного ефектів хронічного споживання етилового спирту в рогівці.

Слізна рідина забезпечує повноцінне функціонування рогівки, зокрема, завдяки наявності в ній більш ніж 3 тис. різних протеїнів. Найбільш масовим протеїном сльози є Lf – мультифункціональний протеїн, який володіє антимікробною та імуномодуляторною активністю та відіграє провідну роль в репаративних процесах, а його рівень може варіювати у залежності від ступеня пошкодження ока. Отже, наступним завданням роботи було одержати поліклональні антитіла до Lf людини для їхнього подальшого використання у визначенні цього протеїну в слізній рідині пацієнтів з непроникною травмою рогівки. Поліклональні антитіла до Lf було ізольовано із сироватки крові імунізованих кролів (титр антитіл відповідав розведенню сироватки 1:15000). Отримані високоафінні антитіла у вестерн блот аналізі розпізнавали відповідний антиген як поліпептидну зону 75 кДа, яка відповідає за молекулярною масою інтактному поліпептиду Lf людини. Було встановлено, що рівень Lf в сльозі, зібраної в пацієнтів з непроникними травмами рогівки був у 3,2 рази нижчим за цей показник у нормі ($P < 0,05$). Зміни вмісту Lf обернено корелюють з підвищенням рівня HIF-1 α , MMP-9 та AS у слізній рідині пацієнтів, що додатково підтверджують розвиток запальних процесів, асоційованих з гіпоксією в ушкодженій тканині. Крім того, слізна рідина пацієнтів з пошкодженнями рогівки у значних кількостях містила імунореактивні продукти розщеплення Lf, а також високомолекулярні поліпептиди, які можуть відповідати комплексам Lf з іншими протеїнами, що надекспресуються за запальних процесів, зокрема, церулоплазміном. Таким чином, зниження вмісту Lf може слугувати прогностичним біомаркером перебігу ранового процесу в оці, зокрема, за непроникних травм рогівки, що є зручним для визначення в простий та неінвазійний спосіб. Згідно з наведеними даними, отримані антитіла до Lf можуть бути використані як корисний інструмент для створення новітніх тестів для діагностики очних хвороб, пов'язаних з ушкодженням рогівки.

Ключові слова: ангіостатини, рогівка, опік, неоваскуляризація, хронічний вплив етанолу, вітамін В₁ (тіамін), гіпоксія, апоптоз, автофагія, ММР, нервовоспецифічні протеїни, слізна рідина, лактоферин, макрофаги, антитіла.

SUMMARY

Bilous V. L. Molecular mechanisms of corneal pathologies and development of approaches for their correction.

Thesis for a doctor of philosophy (Ph.D.) scientific degree in specialty 091 “Biology” – Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2024.

The dissertation is devoted to the study of molecular mechanisms of the development of corneal pathologies induced by various factors associated with hypoxia, inflammation, and neovascularization. Avascularity of the cornea is thought to be an important condition for normal light transmission and ensuring high quality of vision, which is maintained by the balance between pro- and anti-angiogenic regulators in a healthy eye. Since neovascularization is a threatening condition that causes vision impairment or its complete loss, today the search for new effective and safe modulators of angiogenesis is an urgent problem of current biochemistry, biomedicine, and clinical ophthalmology. According to the World Health Organization (WHO) data, globally, the number of patients with eye diseases associated with the development of corneal neovascularization increases annually by 1.4 million with a growing trend. Factors that may cause neovascular diseases of the cornea include physical trauma, dust and other abrasive materials, chemical and thermal burns, dry eye syndrome, surgical interventions, uncontrolled wearing of contact lenses, infectious keratitis, ultraviolet light, etc. Chronic inflammation and neovascularization are factors that can trigger graft rejection after keratoplasty. Due to a full-scale Russian invasion of the territory of Ukraine and active military phase of war, the problem of eye treatment and diagnostic interventions is particularly acute, since a significant percentage of all types of combat ocular traumas are various corneal injuries.

Pharmacotherapy of corneal neovascular diseases with the use of existing medications, in particular, corticosteroids, has limited effectiveness and is associated with the manifestation of a number of side effects, which prompts the development of new therapeutic approaches and drug discovery. Among

physiological inhibitors of neovascularization, the products of limited proteolysis of plasminogen, known as angiostatins (AS), attract a special attention. These kringle-containing polypeptides (K1-3, K1-4, K1-4,85, K1-5, K5) inhibit angiogenesis with varying effectiveness through specific inhibition of proangiogenic signaling in endothelial cells and have anti-inflammatory properties. In the Department of Enzyme Chemistry and Biochemistry of Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, technology protocols for producing AS K1-3 and K5 have been previously developed and successfully implemented, allowing to obtain AS for investigation in the present study. Modern biochemical, physicochemical, and immunochemical methods (gel electrophoresis of proteins, immunoblotting, immunoenzyme analysis, affinity chromatography, enzyme phoresis, spectrophotometric methods), methods of animal immunization and production of polyclonal antibodies, cultivation of eukaryotic cells, histological methods, Efron's test (evaluation of the degree of corneal neovascularization), methods of statistical analysis were used to fulfill the tasks of the dissertation.

Therefore, the aim of the thesis was formulated as follows: to investigate the molecular mechanisms of the development of pathological conditions in the cornea and to develop approaches for their correction. To achieve the set goal, it was necessary to perform the following tasks.

One of the tasks of the dissertation was to evaluate the biological activity and biocompatibility of AS in *in vivo* and *in vitro* experiments. The antiangiogenic activity of AS K1-3 was studied in the model of corneal alkaline burns in rabbits. In animals of experimental group, a burn was caused by applying 1 N NaOH solution to the surface of the eye. Part of the animals with corneal burn pathology received AS K1-3 topically in the form of eye drops for 14 days after the burn at a dose of 0.75 μg (1.0 μM solution) daily. Using Efron's morphological test, it was established that AS-based treatment resulted in a significant regression of newly formed vessels in the cornea after an alkaline burn.

The results of the morphological observation are consistent with the data of the histological analysis, which indicate that the use of AS reduced the degree of degenerative changes, infiltration of leukocytes, and excessive proliferation of vessels in the damaged cornea and promoted the regeneration of the epithelium. Western blot analysis of corneal tissue lysates showed that the burn led to a significant increase in the level of the proangiogenic cytokine VEGF in the damaged tissue (by 3.3 times compared to the control, $P < 0.01$), while K1-3 contributed to the normalization of its content. In addition, a dramatic increase in the levels of pro-caspase-3 and beclin-1 in the damaged cornea (by 15.6 and 31 times, respectively, compared to the control, $P < 0.001$) indicates the activation of pro-apoptotic pathways of cell death and the development of autophagy. The use of K1-3 contributed to a decrease in the level of apoptosis and autophagy markers in the burn-injured cornea by 4.5 and 12.9 times, respectively, compared to the control ($P < 0.05$). Since it was previously shown that the overactivation of corneal macrophages by tissue debris can be one of the causes for the development and maintenance of neovascularization, the effect of AS K1-3 (10-200 nM) on the metabolic activity of phagocytic cells in the nitro blue tetrazolium test (HST test) was investigated in this study. It was established that K1-3 at a concentration > 50 nM inhibits the activity of cellular dehydrogenases of J744.2 macrophages by approximately by 30% compared to the intact cells ($P < 0.05$). Therefore, one of the mechanisms of antiangiogenic and cytoprotective action of AS in the cornea under the conditions of an alkaline burn can be realized through a moderate suppressive effect on the activity of resident macrophages. It was established that the shown effects of AS K1-3 were more pronounced in comparison with the known protector protein lactoferrin (Lf), which was used in an equimolar concentration as a referent drug.

A mandatory condition when testing new angiostatic drugs is to check their possible cytotoxic properties on the cells of the posterior segment of the eye, in particular, the retina. In the present study, the effects of AS K1-3 and K5 on the viability of cells of the retinal pigment epithelium (RPE-1 hTERT line) were

assessed by MTT test. It was shown that both variants of angiostatins in the studied concentration range of 2-100 nM do not have any cytotoxic effects on cells of the retinal pigment epithelium under *in vitro* conditions. These data are of significant practical interest in view of the possibility of safe use of the investigated angiostatic polypeptides for the purpose of targeted and specific suppression of the activity of vascular endothelial cells in the treatment of various ocular pathologies associated with neovascularization.

Despite significant progress in elucidating the mechanisms of biological activity of plasminogen fragments, different effects of AS in the damaged cornea, apart from inhibition of proangiogenic signaling, remain unexplored. Thus, the next task of the dissertation was to investigate the effect of two AS polypeptides (K1-3 and K5) on the level of protein markers of key pathophysiological patterns in the rat corneal alkaline burn model. Experimental animals received AS K1-3 topically in the form of eye drops at a dose of 0.075 or 0.75 μg (in the form of 0.1 or 1.0 μM solutions, respectively) or 0.3 μg AS K5 (1.0 μM) daily for 14 days after the injury. Using Western blot analysis of corneal tissue lysates, it was shown that the AS caused a decrease in the levels of protein markers associated with hypoxia (HIF-1 α), angiogenesis (VEGF), tissue remodeling and fibrosis (MMP-9), autophagy (beclin-1), as well as endoplasmic reticulum stress (GRP-78), as the main patterns of the pathological process. In addition, AS K1-3 contributed to the increase of the tight junction protein ZO-1 level that indicates the initiation of regenerative processes and re-epithelialization of the cornea after its alkaline burn.

It is known that the epithelial cells of the ocular surface are a target for various viruses that use the surface-exposed receptors to penetrate the body. The thesis investigated the effect of AS on the corneal level of the SARS-CoV-2 receptor, angiotensin-converting protein-2 (ACE2), in an experimental model of alkaline burn. Alkali-induced damage to the ocular surface caused a 7.7-fold increase in ACE2 levels compared to control ($P < 0.001$), indicating a greater vulnerability of the injured eye to infection. The use of AS K5 or K1-3 (1.0 μM)

reduced the expression level of ACE2 in the damaged cornea by half ($P < 0.05$ compared to the Burn group), while K1-3 at a lower concentration ($0.1 \mu\text{M}$) reduced the content of ACE2 by 3.4 times ($P < 0.05$). The obtained results indicate that AS can minimize the potential risk of SARS-CoV-2 penetration through the ocular surface by reducing the expression of its receptor. The effect of AS K1-3 and K5 on the level of GFAP (glial fibrillary acidic protein), a marker of activated satellite glia, in the damaged cornea of rats was also investigated. It should be noted that in a healthy cornea, this protein is synthesized in trace amounts, which indicates the functioning of glial cells in a physiologically resting state. However, a dramatic increase in the GFAP content in corneal tissue with burn pathology was shown (by 62 times compared to control, $P < 0.001$). It should be noted that K5 was twice as effective as K1-3 in its ability to inhibit the reactivation of satellite glia, as evidenced by a 10.9-fold decrease in the level of GFAP compared to the Burn group ($P < 0.01$). The greater effectiveness of K5 may be related to the smaller size of its molecules (14 kDa) compared to K1-3 (35 kDa), which determines the greater bioavailability of K5. The obtained results testify in favor of the implementation of neuroprotective properties by angiostatins due to the inhibition of excessive activation of satellite glia in the damaged cornea. In general, the data obtained on the experimental model of alkaline corneal burn indicate the prospects of AS application for the development of effective and safe ophthalmic drugs with a complex mechanism of protective action.

It is known that various metabolic disorders, which are often accompanied by the formation of hypo- or vitamin deficiency states, lead to corneal dysfunction. In particular, chronic alcohol abuse is a frequent cause of pathological changes in the eye, such as cataracts, dry eye syndrome, red eye syndrome, neurodegeneration, which lead to impaired vision and blindness. However, little is currently known about the molecular mechanisms of the effects of chronic alcohol consumption on the cornea. Long-term intoxication with ethyl alcohol, in addition to the effect of ethanol itself or toxic products of its metabolism on the organ of vision, is extremely dangerous due to a decrease in

the level of group B vitamins, especially B₁ (thiamine). Therefore, the next task of the study was to test the hypothesis that the administration of vitamin B₁ can have a protective effect in the cornea under the conditions of long-term ethanol consumption. For this purpose, an experimental model of chronic alcoholism was formed, in which rats received a 15% ethanol solution (EtOH) for 9 months. For a week before the end of the experiment, part of the rats received thiamine *per os* in a daily dose of 25 mg/kg of body weight. It was established that long-term consumption of ethyl alcohol leads to a significant increase in the content of HIF-1 α in the cornea (by 3.24 times compared to the control, $P < 0.05$), which indicates the development of hypoxia in the tissue of intoxicated animals. The increase in the level of other regulatory proteins-markers of pathological conditions associated with hypoxia (VEGF, MMP-2 and -9) indicates the activation of proangiogenic signaling pathways and corneal tissue remodeling as a compensatory mechanism under conditions of toxicant exposure. Destructive changes induced by ethanol in the cornea were accompanied by a 2.8-fold decrease in the level of the tight junction protein ZO-1 compared to the control ($P < 0.05$), which is a sign of integrity loss of the corneal epithelial layer. Observed changes occurred in parallel with the development of a pro-apoptotic state in the cornea, as indicated by significant decrease in the value of the Bcl-xL/Bax ratio in rats with long-term exposure to ethanol (by 20 times compared to the control, $P < 0.01$). Administration of thiamine to rats chronically exposed to ethyl alcohol reduced the level of HIF-1 α in the cornea by 2.6-fold compared with the EtOH group ($P < 0.05$), and also promoted statistically significant changes in the level of VEGF, MMPs, and ZO-1 toward the normalization. A 6.5-fold increase in the ratio of Bcl-xL/Bax after administration of vitamin B₁ compared to the EtOH group ($P < 0.05$) can be explained by the beneficial effect of thiamine on aerobic metabolism, alleviation of mitochondrial dysfunction, improving antioxidant and anti-inflammatory activities corneal tissue under conditions of chronic ethanol intoxication.

The cornea is the most densely innervated structure of the body (length of nerves $> 20 \text{ mm/mm}^2$, containing 27 thousand receptors/ mm^2 , which is 300-600 times more than in the skin). Neurons of the ocular branch of the trigeminal nerve, which innervate the cornea, in a complex with cells of satellite glia, are responsible for the trophic and survival of epithelial cells, the functioning of the lacrimal glands, the blink reflex, reparative processes, and others. Thus, the next task of the study was to investigate the effect of vitamin B₁ on the content of neurodegeneration markers and the state of glial cells in the cornea of rats exposed to prolonged ethanol exposure. It was shown that ethyl alcohol as a substance with neurotoxic properties causes neurodegenerative changes in the cornea, as evidenced by a statistically significant decrease in the level of the nuclear marker of neurons NeuN and the loss of the heavy subunit of neurofilaments NF-H occurring in parallel with the accumulation of hyperphosphorylated tau protein (signs of degeneration of axons in the sensory nerves of the cornea and the development of tauopathy). Neurodegenerative changes induced by chronic ethanol consumption were accompanied by increased reactivity of satellite glia (by 4.2-fold increase in GFAP level compared to control, $P < 0.01$). The administration of thiamine to animals with chronic alcohol intoxication contributed to the normalization of the expression of neuronal and glial markers in the cornea tissue, which indicates a decrease in the degree of neurodegeneration, stabilization of the cytoskeleton of neuronal cells and modulation of the function of satellite glia. Therefore, based on the obtained data, it can be assumed that the use of thiamine can represent a scientifically approved approach for correcting the neurotoxicological effects of chronic consumption of ethyl alcohol in the cornea.

Tear fluid maintains the proper functioning of the cornea, in particular, thanks to the presence of more than 3 thousand different lacrimal proteins. The most abundant tear protein is Lf, a multifunctional protein that exerts antimicrobial and immunomodulatory activity and plays a pivotal role in reparative processes, while its tear level can vary depending on the degree of

damage extent. Therefore, the next task of the study was to obtain polyclonal antibodies to human Lf for their further use in the determination of this protein in the tear fluid of patients with non-penetrating corneal injuries. Polyclonal antibodies to Lf were isolated from the blood serum of immunized rabbits (antibody titer corresponded to a serum dilution of about 1:15,000). The obtained high-affinity antibodies recognized the relevant antigen as a polypeptide band of 75 kDa in the Western blot, which corresponds to the intact human Lf polypeptide in terms of molecular weight. It was found that the level of Lf in tears collected from patients with non-penetrating corneal injuries was 3.2 times lower than that in normal subjects ($P < 0.05$). Changes in the Lf levels appeared to be inversely correlated with an increased levels of HIF-1 α , MMP-9, and AS in the tear fluid of patients that further confirms the development of inflammatory processes associated with hypoxia in the damaged tissue. In addition, the tear fluid of patients with corneal damage contained significant quantities of immunoreactive cleavage products of Lf, as well as high molecular weight polypeptides, which may correspond to the complexes of Lf with other proteins, in particular, ceruloplasmin, overexpressed during inflammatory processes. Thus, the decreased Lf level can serve as a prognostic biomarker of the course of the wounding process in the eye, in particular, for non-penetrating injuries of the cornea, which is convenient for determination in a simple and non-invasive way. According to the presented data, the obtained anti-Lf antibodies can be used as a useful tool for the development of new tests for the diagnosis of eye diseases associated with corneal damage.

Key words: angiostatins, cornea, burn injury, neovascularization, chronic ethanol consumption, vitamin B₁ (thiamine), hypoxia, apoptosis, autophagy, MMP, neurospecific proteins, tear fluid, lactoferrin, macrophages, antibodies.

Список публікацій здобувача за темою дисертації:

1. **V. L. Bilous**, L. G. Kapustianenko, A. A. Tykhomyrov. Production and application of angiostatins for the treatment of ocular neovascular diseases. *Biotechnologia Acta*, 2021 V. 14, N 1. P. 5-24.

<https://doi.org/10.15407/biotech14.01.005>

Білоус В. Л. – візуалізація, написання оригінальної чернетки;

Капустяненко Л. Г. – візуалізація, написання оригінальної чернетки;

Тихомиров А. О. – концептуалізація, візуалізація, написання рукопису.

2. I. V. Gavrylyak, N. K. Greben, **V. L. Bilous**, V. V. Korsа, D. G. Zhaboiedov, S. A. Aǵca, A. O. Tykhomyrov The levels of hypoxia- and angiogenesis-related regulators and matrix metalloproteinase 9 activity in tear fluid of patients with non-penetrating ocular traumas. *Medicni perspektivi*, 2022 V. 27, N 4, P. 168-176.

<https://doi.org/10.26641/2307-0404.2022.4.271217>

Гавриляк І. В. – проектування та виконання дослідження, аналіз результатів та написання рукопису;

Гребень Н. К. – методологія, ресурси;

Білоус В. Л. – збір даних, інтерпретація результатів;

Корса В. В. – збір даних, інтерпретація результатів;

Жабоедов Д. Г. - концептуалізація, рецензування та редагування;

Аǵса С. А. – візуалізація, ресурси, вчитка рукопису;

Тихомиров А. О. – концепція та дизайн дослідження, підготовка чернетки рукопису.

3. A. Tykhomyrov, O. Yusova, L. Kapustianenko, **V. Bilous**, T. Drobotko, I. Gavryliak, N. Greben, S. A. Aǵca. Production of anti-lactoferrin antibodies and their application in analysis of the tear fluid in health and corneal injuries. *Biotechnologia Acta*, 2022, V. 15, N. 5, P. 31-40.

<https://doi.org/10.15407/biotech15.05.031>

Тихомиров А. О. – адміністрування проєкту, дослідження, концептуалізація, підготовка чернетки рукопису, написання огляду та редагування;

Юсова О. І. – дослідження, візуалізація;

Капустяненко Л. Г. – дослідження, візуалізація;

Білоус В. Л. – дослідження, збір даних, підготовка чернетки рукопису;

Дроботько Т. Ф. – дослідження, збір даних;

Гавриляк І. В. – ресурси, методологія;

Гребень Н. К. – ресурси, методологія;

Аґса С. А. – візуалізація, ресурси, вчитка рукопису.

4. O. S. Pavlova, **V. L. Bilous**, V. V. Korska, S. P. Stepanenko, Yu. M. Parkhomenko, A. O. Tykhomyrov. Changes in the levels of neurospecific proteins and indices of apoptosis in the rat cornea at chronic ethanol consumption: protective effects of thiamine administration. *Neurophysiology*, 2022, V. 54, N. 1–2, P. 25-36.

<https://doi.org/10.1007/s11062-023-09932-4>

Павлова О. С. – концептуалізація, методологія, візуалізація, ресурси;

Білоус В. Л. – методологія, дослідження, візуалізація, інтерпретація результатів;

Корса В. В. – дослідження, ресурси, інтерпретація результатів;

Степаненко С. П. – методологія, ресурси;

Пархоменко Ю. М. – концептуалізація, методологія, нагляд, редагування рукопису;

Тихомиров А. О. – концептуалізація, візуалізація, написання оригінальної чернетки, написання огляду та редагування.

5. **V. L. Bilous**, L. G. Kapustianenko, O. I. Yusova, V. V. Korska, V. S. Nedzvetsky, C. A. Aґsa, S. V. Ziablitsev, A. O. Tykhomyrov. Angiostatins modulate ACE2 and GFAP levels in injured rat cornea and do not affect viability of retinal pigment epithelial cells. *Biopolymers and Cell*, 2023, V. 39, N. 4, P. 299-310.

<https://doi.org/10.7124/bc.000AA1>

Білоус В. Л. – дослідження, ресурси, написання оригінальної чернетки;
 Капустяненко Л. Г. – ресурси, візуалізація, інтерпретація результатів;
 Юсова О. І. – ресурси, візуалізація, інтерпретація результатів;
 Корса В. В. – методологія, ресурси, інтерпретація результатів;
 Недзвецкий В. С. – візуалізація, вчитка рукопису;
 Аґса С. А. – візуалізація, методологія, ресурси, вчитка рукопису;
 Зябліцев С. В. – візуалізація, ресурси, вчитка рукопису;
 Тихомиров А. О. – концептуалізація, написання оригінальної чернетки,
 написання огляду та редагування.

6. **V. Bilous**, A. Tykhomyrov. Multiple effects of angiostatins in injured cornea. *Ukr. Biochem. J.* 2024, V. 96, N. 1, P. 37-48.

<https://doi.org/10.15407/ubj96.01.037>

Білоус В. Л. – методологія, дослідження, ресурси, візуалізація;
 Тихомиров А. О. – методологія, концептуалізація, написання оригінальної чернетки, редагування.

7. **V. Bilous**, N. Greben, I. Gavryliak, C. A. Aґса. Beneficial effects of angiostatin K1-3 and lactoferrin in alkali-burned rabbit cornea: a comparative study. *Biotechnologia Acta*, 2024, V. 17, N. 3, (in press).

Білоус В. Л. – методологія, дослідження, ресурси, написання оригінальної чернетки.

Гребень Н. К. – концептуалізація, методологія, ресурси, вчитка рукопису;
 Гавриляк І. В. – методологія, дослідження, візуалізація;
 Аґса С. А. – візуалізація, вчитка рукопису.

8. **Bilous V. L.**, Pavlova O. S., Kyryliuk I. R. Protective effects of thiamine and Metovitan treatment in cornea of rats exposed to chronic ethanol consumption // Матеріали конференції-конкурсу молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії і біотехнології-2021», Київ, 20-21 травня 2021р.

https://biochemistry.org.ua/index.php?option=com_content&view=article&id=5749:2021-2&catid=951&Itemid=1187&lang=uk

9. I. V. Gavrylyak, **V. L. Bilous**, V. V. Korsya, N. K. Greben. Protein markers of hypoxia and angiogenesis in tear fluid of patients with traumatic corneal injury // Матеріали конференції-конкурсу молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії і біотехнології-2022», Київ, 31 травня 2022 р.
<https://doi.org/10.15407/biotech15.02.053>

10. Pavlova O., **Bilous V.**, Tykhomyrov A. Anti-apoptotic and neuroprotective effects of thiamine high dose in the cornea of rats exposed to chronic ethanol consumption // 46th FEBS Congress, Lisbon, Portugal, July 9-14, 2022.

11. **Bilous V. L.**, Pavlova O. S., Korsya V. V. Neuroprotective efficacy of the thiamine high dose administration in cornea of chronically alcoholized rats // V International (XV Ukrainian) scientific conference for students and young scientists “Current Problems of Chemistry”, Vinnytsya, 27-29 March 2022.
<https://docs.google.com/a/donnu.edu.ua/viewer?a=v&pid=sites&srcid=ZG9ubnUuZWR1LnVhfGhwc3xneDo1NjQ4NWY5NmM2ZDkzOGY4>

12. **Білоус В.**, Юсова О., Капустяненко Л., Дроботько Т., Гавриляк І., Гребень Н., Тихомиров А. Імунохімічна детекція вмісту лактоферину в слізній рідині за норми та за травмування рогівки // VI Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології” м. Дніпро, 6-7 жовтня 2022.
<https://www.biochemistry-dnu.dp.ua/conference-2022/>

13. **Bilous V. L.**, Kapustianenko L. G., Korsya V. V., Tykhomyrov A. A. Effects of exogenous angiostatins on alkali burn corneal wounds: beyond the neovascularization // 47th FEBS Congress, Tours, France, July 8-12, 2023 (personal poster report).

14. **Bilous V.L.**, Kapustianenko L.G., Yusova O.I., Greben N.K., Gavrylyak I.V., Tykhomyrov A.O. Production of native plasminogen-derived angiostatins and their perspective application in the treatment of corneal injury // IV Міжнародна науково-практична інтернет-конференція “Проблеми та досягнення сучасної біотехнології”, м. Харків, 22 березня 2024 року.
<https://biotech.nuph.edu.ua/konferentsiia-2024/>