


«ЗАТВЕРДЖУЮ»

  
Директор Інституту біохімії  
ім. О. В. Палладіна НАН України,  
академік НАН України,  
доктор біологічних наук, професор  
Сергій КОМІСАРЕНКО

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України  
Ідентифікаційний код 05417288  
М. Київ

протокол № 1 від 28.05 2024 р.

## ВИСНОВОК

про наукову новизну, теоретичне та практичне  
значення результатів дисертації  
Василя БІЛОУСА

«Молекулярні механізми розвитку патологічних станів рогівки та розробка  
підходів до їх корекції»,

поданої на здобуття освітньо-наукового ступеня доктора  
філософії в галузі знань 09 – Біологія, за спеціальністю 091 –  
Біологія

**1. Актуальність теми дисертаційної роботи.** Дисертаційна робота присвячена дослідженню молекулярних механізмів розвитку патологічних станів рогівки, що розвиваються під внаслідок дії різних чинників та пов'язані з гіпоксією, запаленням та неоваскуляризацією. Для забезпечення нормального світлопропускання та високої якості зору важливою умовою є аваскулярність рогівки, яка у здоровому оці підтримується за рахунок балансу між про- та антиангіогенними регуляторами. Оскільки неоваскуляризація загрожує погіршенням зору або його втратою, на сьогоднішній день актуальною проблемою сучасної біохімії, біомедицини та клінічної офтальмології є пошук нових ефективних та безпечних модуляторів судиноутворення. Фактори, що викликають неоваскулярні захворювання рогівки, включають 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 можуть спричинити відторгнення трансплантата після кератопластики. Через активні бойові дії в Україні особливо актуальною є проблема лікування поранень ока та їхніх ускладнень, оскільки значний відсоток бойових травм складають пошкодження очного яблука та проникні поранення рогівки. Фармакотерапія неоваскулярних захворювань рогівки існуючими на сьогодні засобами, зокрема кортикостероїдами, має обмежену ефективність і супроводжується численними побічними ефектами, що і

стимулює пошук і розробку нових терапевтичних підходів та лікарських засобів. Особливу увагу серед фізіологічних інгібіторів неоваскуляризації привертають ангіостатини (AS), які є продуктами обмеженого протеолізу плазміногену. Вони з різною ефективністю пригнічують ангіогенез через специфічне інгібування проангіогенного сигналіngu в ендотеліальних клітинах та мають протизапальні властивості.

**2. Мета роботи:** з'ясувати молекулярні механізми розвитку патологічних станів роги́вки та розробити підходи до їх корекції. Для досягнення поставленої мети необхідно було виконати наступні завдання:

1. Оцінити біологічну активність та біосумісність фрагментів плазміногену (ангіостатинів) в експериментальних моделях пошкодження роги́вки тварин і тестах *in vitro*.

2. Визначити вплив ангіостатинів на рівень ключових протеїнів-маркерів, асоційованих з гіпоксією, ангіогенезом, ремоделюванням тканин, апоптозом, автофагією та стресом ендоплазматичного ретикулуму в роги́вці тварин в експериментальній моделі лужного опіку роги́вки.

3. Дослідити антиапоптотичні та нейропротекторні ефекти вітаміну B<sub>1</sub> (тіаміну) у роги́вці щурів за умов хронічної інтоксикації етиловим спиртом.

4. Отримати та охарактеризувати поліклональні антитіла до лактоферину людини.

5. Провести імунохімічний аналіз рівня лактоферину та протеїнів-біомаркерів у слізній рідині пацієнтів з непроникними травмами роги́вки.

**3. Наукова новизна одержаних результатів.** У представленій роботі вперше на експериментальних моделях лужного опіку роги́вки щурів та кролів було встановлено, що ангіостатини (фрагменти плазміногену K1-3 та K5), застосовані місцево у вигляді очних крапель, крім здатності блокувати ріст новоутворених судин, мають широкий спектр захисних ефектів. Вперше показано, що ангіостатини дозозалежним чином знижують рівні протеїнів-маркерів, пов'язаних з гіпоксією (HIF-1 $\alpha$ ), ангіогенезом (VEGF), ремоделюванням та фіброзом тканин (MMP-9), автофагією (Beclin-1) і стресом ендоплазматичного ретикулуму (GRP-78), що є ключовими ланками патологічного процесу. Нові дані свідчать, що ангіостатин K1-3 підвищує рівень ZO-1 (протеїну щільних контактів) у пошкодженій роги́вці, сприяючи реепітелізації після хімічного опіку. Новизну роботи підтверджують результати, які демонструють протекторні ефекти ангіостатинів на клітини сателітної глії у травмованій роги́вці. Вперше показано, що ангіостатини регулюють рівень протеїну ACE2, який слугує рецептором вірусу SARS-CoV-2, та знижують його рівень за ушкодження роги́вки. Також вперше доведено

відсутність цитотоксичних ефектів ангіостатинів на клітини пігментного епітелію сітківки у терапевтичному діапазоні концентрацій (2–100 нМ), що підтверджено дослідженнями на культурі клітин RPE. Вперше встановлено, що введення тіаміну (25 мг/кг маси тіла) щуром з хронічною алкогольною інтоксикацією чинить коригувальну дію, зменшуючи токсичні ефекти етанолу на рогівку. Вітамін В1 сприяє збільшенню співвідношення VclxL/Vax, що вказує на інгібування апоптозу та підвищення життєздатності клітин у тканині рогівки за умов токсичного впливу етанолу. Нові результати також доводять нейропротекторні властивості тіаміну в рогівці щурів за тривалого споживання етилового спирту, що виявляється у нормалізації вмісту нейрональних маркерів (NF-H,  $\tau$ -протеїну та Neu-N), а також зменшенні рівня активації сателітної глії та експресії маркера GFAP.

**4. Теоретичне значення одержаних результатів.** Теоретичні положення, сформульовані за результатами проведених досліджень та опрацювання інших теоретичних і практичних даних, розширюють існуючі уявлення про розвиток патологічних станів рогівки різного генезу. Отримані результати щодо ефектів ангіостатинів на різні патофізіологічні ланки становить значний інтерес і формує теоретичний базис подальшого використання протеолітичних фрагментів плазміногену як у фундаментальних біохімічних дослідженнях, так і у офтальмології. Використані у роботі експериментальні підходи розширюють уявлення про плейотропність ангіостатинів поза межами їх антиангіогенних властивостей, що дозволяє розглядати фрагменти плазміногену як ендогенних, ефективних та біосумісних агентів у лікуванні патологій рогівки, що асоційовані із неоваскуляризацією. Отримані дані створюють теоретичне підґрунтя для використання ряду протеїнів-біомаркерів для оцінки ступеня деструктивних змін у рогівці за її травмування як основи неінвазивної діагностики з використанням слізної рідини.

**5. Практичне значення отриманих результатів.** Отримані результати щодо антиангіогенної дії ангіостатинів та їхніх плейотропних ефектів у рогівці при її пошкодженні можуть стати основою для розробки нових лікарських препаратів для терапії захворювань поверхні ока, пов'язаних із запаленням та надмірною неоваскуляризацією. Застосування ангіостатинів має потенціал нормалізувати стан тканини рогівки під час операцій з кератопластики, забезпечуючи більш ефективне приживлення трансплантату. Зокрема, ангіостатини можуть бути рекомендовані для використання у складі композиту, що застосовується для створення бандажних (терапевтичних) контактних лінз. Очні краплі, що містять ангіостатини, можуть використовуватись для профілактики захворювань, пов'язаних із вірусним інфікуванням, зокрема

SARS-CoV-2. Застосування отриманих у роботі поліклональних антитіл до лактоферину може стати основою для розробки нових неінвазивних діагностичних методів, заснованих на імунохімічній детекції рівня лактоферину в слізній рідині, що зробить лікування пацієнтів з травмами ока більш персоналізованим. Результати, що підтверджують антиапоптотичні та нейропротекторні властивості тіаміну (вітаміну B1), можуть бути корисними для розробки нових вітамінних препаратів як ефективних засобів корекції офтальмологічних проявів хронічної алкогольної інтоксикації.

**6. Особистий внесок здобувача.** Дисертаційна робота є завершеним дослідженням, яке було виконано автором відповідно до розкладу експериментальних досліджень, запланованих і реалізованих протягом 2020–2023 рр. Дисертантом було самостійно проведено аналіз сучасних джерел літератури стосовно обраної наукової проблеми, виконано експериментальні дослідження ефектів ангіостатинів на моделях лужного опіку рогівки щурів та кролів. Дисертантом самостійно проведено роботу з пробопідготовки, проведено визначення рівня маркерних протеїнів у тканині рогівки експериментальних тварин та слізній рідині пацієнтів, здійснено статистичну обробку отриманих результатів та їх узагальнення. Коригувальні ефекти вітаміну B<sub>1</sub> у тканині рогівки щурів за умов хронічного впливу етилового спирту досліджено сумісно з д.б.н. Пархоменко Ю. М. та к.б.н. Павловою О. С. Визначення протеїнів-маркерів у слізній рідині за травмування ока проводилося сумісно зі співробітниками кафедри офтальмології Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця к.м.н. Гребінь Н. К. та Гавриляк І. В. у рамках договору про науково-технічну співпрацю. Визначення ефектів ангіостатинів на виживання клітин RPE та метаболічну активність макрофагів J744.2 проводили сумісно з доцентом Джан Алі Агджа (Університет Бінгол, Туреччина) у рамках міжнародного договору про науково-технічне співробітництво. Препаративне отримання ангіостатинів проводилося за участі співробітників відділу хімії та біохімії ферментів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України к.б.н. Юсової О. І. та к.б.н. Капустяненко Л. Г. Планування експериментальної роботи, розробка методології, аналіз та обговорення результатів проведено спільно з науковим керівником, д.б.н., с.н.с. Тихомировим Артемом Олександровичем.

**7. Публікації результатів роботи, їх обговорення.** За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 7 статей, з яких 4 представлені в базах Scopus і Web of Science:

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> (Особистий внесок здобувача – збір інформації щодо антиангіогенних властивостей ангіостатинів у різних тканинах ока за умов розвитку неоваскуляризації, написання оригінальної чернетки рукопису).

2. I. V. Gavrylyak, N. K. Greben, **V. L. Bilous**, V. V. Korska, D. G. Zhaboiedov, C. A. Ağca, 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> (Особистий внесок здобувача – збір даних щодо протеому слізної рідини, електрофоретичні дослідження рівнів протеїнів-маркерів перебігу патологічних процесів у слізній рідині).

3. A. Tykhomyrov, O. Yusova, L. Kapustianenko, **V. Bilous**, T. Drobotko, I. Gavryliak, N. Greben, C. A. Ağca. 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> (Особистий внесок здобувача – отримання, очистка та характеристика антитіл до лактоферину людини, підготовка чернетки 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> (Особистий внесок здобувача – отримання лізатів тканини рогівки, електрофоретичні дослідження нейроспецифічних протеїнів та протеїнів-регуляторів апоптозу в тканині рогівки щурів з хронічною інтоксикацією етанолом, участь у написанні рукопису).

5. **V. L. Bilous**, L. G. Kapustianenko, O. I. Yusova, V. V. Korska, V. S. Nedzvetsky, C. A. Ağca, 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> (Особистий внесок здобувача – отримання лізатів тканини рогівки, електрофоретичне дослідження протеїнів-маркерів нейродегенеративних процесів та запального процесу у рогівці щурів за умов лужного опіку, написання оригінальної чернетки рукопису).

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> (Особистий внесок здобувача – отримання лізатів тканини рогівки, електрофоретичне дослідження протеїнів-маркерів

основних патофізіологічних ланок за умов лужного опіку, написання оригінальної чернетки рукопису).

7. **V. Bilous**, N. Greben, I. Gavryliak, C. A. Ağca. 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). (Особистий внесок здобувача – відтворення експериментальної моделі лужного опіку рогівки кролів, електрофоретичне дослідження протеїнів-маркерів основних патофізіологічних ланок за умов лужного опіку, написання оригінальної чернетки рукопису)

8. **Апробація результатів дисертації.** Результати досліджень були представлені на вітчизняних та міжнародних конгресах та конференціях: конференція-конкурс молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії і біотехнології-2021», Київ, 2021р.; V Міжнародна (XV Українська) наукова конференція студентів, аспірантів і молодих учених «Хімічні проблеми сьогодення», Вінниця, 2022; VI Міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології» м. Дніпро, 2022; 46th FEBS Congress, Lisbon, Portugal, July 9-14, 2022; 47th FEBS Congress, Tours, France, July 8-12, 2023; IV Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології», Харків, 2024 р.

9. **Інформація щодо проведення біоетичної експертизи дисертаційних досліджень.** У представленій роботі було створено дві експериментальні моделі лужного опіку рогівки кролів та щурів. Усі дослідження проводили з дотриманням норм біоетики згідно з рекомендаціями та настановами ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. Проведення досліджень на моделях з використанням лабораторних тварин було ухвалено комітетом з біоетики Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України (протокол № 4 від 8 червня 2021 р. та протокол № 1 від 15 лютого 2022 р.). Робота проводилася з дотриманням принципів біоетики та норм біологічної безпеки відповідно до вказівок та рекомендацій Гельсінської декларації (1975) з доповненнями від 2000 та 2008 років для роботи з використанням людського матеріалу. Це підтверджено експертним рішенням Комісії з біологічної безпеки та біоетики Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України (протокол №2, від 13 травня 2024 року).

Таким чином, за результатами публічної презентації Василем БІЛОУСОМ наукових результатів дисертації «Молекулярні механізми розвитку патологічних станів рогівки та розробка підходів до їх корекції» та її

обговорення на розширеному засіданні професорсько- викладацького складу Випускної кафедри ЗВО Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України та наукового семінару «Актуальні проблеми сучасної біохімії» Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна Національної академії наук України ухвалили:

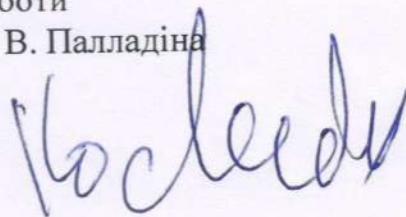
1. Вважати, що дисертація Василя БІЛОУСА на тему «Молекулярні механізми розвитку патологічних станів рогівки та розробка підходів до їх корекції» є завершеною науковою працею та відповідає спеціальності 091 «Біологія»

2. Вважати, що дисертація Василя БІЛОУСА відповідає «Порядку підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії та доктора наук у закладах вищої освіти (наукових установах)», затвердженого постановою №261 Кабінету Міністрів України від 23 березня 2016 року, та «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» (пп. 6, 7, 8), затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 р.

3. Рекомендувати дисертацію Василя БІЛОУСА на тему «Молекулярні механізми розвитку патологічних станів рогівки та розробка підходів до їх корекції» до захисту на засіданні разової спеціалізованої вченої ради за спеціальністю 091 «Біологія».

10.06.2024 р.

Головуючий, заступник  
директора з наукової роботи  
Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна  
НАН України,  
академік НАН України,  
д.б.н., професор



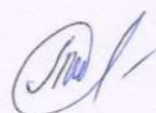
Сергій КОСТЕРІН

Завідувач Випускної кафедри  
ЗВО Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна  
НАН України,  
д.б.н., с.н.с.



Лідія БАБІЧ

Секретар засідання, старший науковий  
співробітник відділу хімії та біохімії  
ферментів  
Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна  
НАН України,  
к.б.н.



Тетяна ЯЦЕНКО