

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О. В. ПАЛЛАДІНА

*Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису*

БІЛОУС ВАСИЛЬ ЛЕОНІДОВИЧ

УДК 577.152:617.713+735

ДИСЕРТАЦІЯ

«МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ ПАТОЛОГІЧНИХ СТАНІВ
РОГІВКИ ТА РОЗРОБКА ПІДХОДІВ ДО ЇХ КОРЕКЦІЇ»

091 «Біологія»

09 «Біологія»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
_____ / Білоус В. Л. /

Науковий керівник: Тихомиров Артем Олександрович, старший науковий
співробітник, доктор біологічних наук

Київ – 2024

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/>

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	26
ВСТУП.....	27
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	36
1.1. Особливості будови та функції рогівки.....	36
1.2. Молекулярно-клітинні зміни у рогівці за патологічних станів.....	39
1.2.1. Зміни функціонування рогівки за розвитку метаболічних порушень.....	39
1.2.2. Травмування рогівки та неоваскуляризація.....	41
1.2.3. Нейродегенеративні процеси за ушкодження ока.....	45
1.2.4. Протеом слізної рідини та його використання для діагностики очних хвороб.....	46
1.3. Фармакологічні підходи в корекції патологічних станів рогівки....	48
1.3.1. Вітаміни в лікуванні захворювань передньої камери ока.....	49
1.3.2. Ангіостатини як перспективні засоби корекції неоваскулярних захворювань рогівки.....	51
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	56
2.1. Обладнання та реактиви.....	56
2.2. Експериментальні моделі.....	60
2.2.1. Модель лужного опіку рогівки кролів.....	60
2.2.2. Модель лужного опіку рогівки щурів.....	61
2.2.3. Модель хронічної інтоксикації етанолом.....	62
2.2.4. Досліди на клітинах RPE (МТТ-тест).....	63
2.2.5. Досліди на макрофагах J744.2 (НСТ-тест).....	64
2.3. Клінічний матеріал (слізна рідина пацієнтів з непроникними травмами ока).....	65
2.4. Отримання поліклональних антитіл до лактоферину.....	67
2.5. Методи дослідження.....	69
2.5.1. Оцінювання ступеня неоваскуляризації рогівки за шкалою Ефрона.....	69

2.5.2. Пробопідготовка лізатів тканини рогівки щурів та кролів.....	69
2.5.3. Визначення вмісту загального протеїну.....	70
2.5.4. Електрофорез у поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію (SDS-PAGE).....	70
2.5.5. Вестерн блот аналіз.....	71
2.5.6. Імуноензимний аналіз.....	72
2.5.7. Ензим-форез (желатинова зимографія).....	73
2.5.8. Гістологічні дослідження.....	74
2.5.9. Статистичний аналіз отриманих результаті.....	75
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	76
3.1. Тестування біологічної активності ангіостатинів.....	76
3.1.1. Ангіостатин К1-3 інгібує неоваскуляризацію рогівки, індуковану лужним опіком.....	76
3.1.2. Ангіостатини К1-3 та К5 не впливають на життєздатність клітин пігментного епітелію сітківки (RPE).....	76
3.2. Вплив ангіостатинів на рівень ключових протеїнів-маркерів патофізіологічних процесів у рогівці за умов лужного опіку.....	80
3.3. Коригувальна дія вітаміну В ₁ на тканини рогівки щурів у моделі хронічного споживання етанолу.....	103
3.4. Нейропротекторні ефекти вітаміну В ₁ у рогівці щурів за умов хронічної алкоголізації.....	113
3.5. Характеристика та використання поліклональних антитіл до лактоферину	122
3.6. Аналіз протеїнів слізної рідини за травматизації ока.....	132
РОЗДІЛ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ.....	138
ВИСНОВКИ.....	141
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	143
Додаток 1. Список публікацій здобувача за темою дисертації та відомості про апробацію результатів дисертації	164

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ACE2	– ангиотензин-конвертувальний ензим 2
AS	– ангиостатини
Bax	– BCL2 associated X
Bcl-xl	– B-cell lymphoma-extra large
DAB	– діамінобензидин
ECL	– підсилена хемілюмінісценція
ECM	– екстрацелюлярний матрикс
ELISA	– імуноензимний аналіз
ER	– ендоплазматичний ретикулум
GFAP	– гліальний фібрилярний кислий протеїн
HIF-1 α	– фактор 1 α , індукований гіпоксією
Iba-1	– ionized calcium-binding adaptor molecule 1
K	– крингл
Lf	– лактоферин
MMP	– металопротеїнази
MTT	– 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
NF	– нейрофіламенти
NF- κ B	– ядерний фактор κ B
PBS	– забуферений фізіологічний розчин
PBST	– забуферений фізіологічний розчин, що містить Triton X-100
Pg/Pm	– плазміноген/плазмін
RPE	– retinal pigment epithelium
SDS-PAGE	– електрофорез у поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію
VEGF	– фактор росту ендотелію судин
ZO-1	– zonula occludens-1

ВСТУП

Актуальність теми. Людина отримує понад 80% інформації з навколишнього світу через зоровий аналізатор. 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 (*Di Zazzo et al., 2021*). Порухення цієї рівноваги за травматизації або патологічних станів рогівки, асоційованих з гіпоксією, запаленням, дисфункцією епітелійних та ендотелійних клітин і дегенеративними змінами тканини, призводить до неоваскуляризації передньої камери ока (*Feizi et al., 2017*). Неконтрольоване проростання судин у тканині рогівки є частою причиною вад зору та його можливої втрати, а отже, погіршення якості життя та інвалідизації. Ушкодження рогівки вважається другою за частотою причиною сліпоти після катаракти. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я у світі, у середньому, 1,4 млн. людей страждають на захворювання рогівки різної етіології, 12% з хворих мають у подальшому проблеми із зором або рецидиви (*Tidke et al., 2022*). З факторами, які можуть спричинити ураження рогівки, людина стикається щодня, як у повсякденному житті й побуті, так і на виробництві (механічне травмування ока, у тому числі, потрапляння сторонніх предметів, пилу та абразивів, хімічні та термічні опіки, ультрафіолетове світло, бактерійні та вірусні інфекційні хвороби, гіпертонічна хвороба, носіння контактних лінз, хірургічні втручання, синдром сухого ока та деякі метаболічні розлади й інтоксикації). Хронічне запалення та неоваскуляризація є факторами, які можуть спровокувати відторгнення трансплантату після проведення кератопластики (*Deshmukh et al., 2023*). В Україні через перебіг воєнних дій особливо гостро стоїть проблема лікування поранень ока та їхніх ускладнень, оскільки значний процент від усіх видів бойових травм складають розриви очного яблука та проникні поранення (*Жупан та ін., 2023*).

Крім того, запальні процеси в тканинах кон'юктиви та рогівки за неоваскуляризації супроводжуються надекспресією рецепторних протеїнів, які визначають тропність клітин ока до вірусів SARS-CoV-2, Зіка та простого герпесу першого типу (HSV-1), роблячи око «воротами» для проникнення вірусної інфекції до організму (*Hoffmann et al., 2020; Roehrich et al., 2020*). Оскільки рогівка є структурою зі щільною іннервацією, то її пошкодження або вплив нейродегенеративних чинників порушують функціонування периферичних нервів, які контролюють гомеостаз у цій тканині, забезпечуючи реалізацію кліпального рефлексу, формування слізної рідини та перебіг репаративних процесів (*Yang et al., 2018*). На сьогодні в якості першочергових засобів фармакотерапії неоваскулярних захворювань рогівки широко використовуються протизапальні стероїдні та нестероїдні препарати місцевої дії, а також інгібітори проангіогенних факторів, зокрема, моноклональні антитіла до фактора росту судинних ендотелійних клітин (VEGF). Однак, існуючі лікарські засоби не завжди демонструють позитивний терапевтичний ефект та часто проявляють побічну дію, що не забезпечує повноцінного лікування (*Ma et al., 2022*). Таким чином, існує нагальна потреба у пошуку та розробці нових, більш ефективних, фармакотерапевтичних засобів для лікування цієї групи офтальмологічних захворювань, для чого вкрай необхідним є знання молекулярних механізмів їхнього патогенезу. У цьому контексті перспективними кандидатами для застосування як антиангіогенних та протизапальних агентів є ангіостатини (AS) – протеолітичні фрагменти плазмін(оген)у, які є одними з найбільш потужних ендогенних інгібіторів росту судин, будучи при цьому нетоксичними, неімуногенними та біосумісними молекулами (*Feizi et al., 2017; Gabison et al., 2004*). Варіанти поліпептидів AS, які складаються з різної кількості крингл (K)-доменів плазмін(оген)у, з різною ефективністю виконують функцію антагоністів VEGF (*Chen et al., 2003*). Крім того, AS K1-3 та K5, проявляють протизапальні властивості, пригнічуючи міграцію макрофагів/моноцитів та

інгібуючи NF-κB-опосередковане прозапальне сигналювання (*Chavakis et al., 2005*). Можливість використання AS як лікарських препаратів в офтальмології робить привабливим ще й той факт, що ці поліпептиди містяться у слізній рідині здорового ока, залучаючись до регулювання ангиогенного балансу в нормі (*Sack et al., 1999*). Хоча антиангіогенні та протизапальні властивості AS є добре відомими, експресія низки молекул-мішеней на різних клітинах дозволяє припустити існування більш широкого спектра плейотропних біологічних ефектів цих поліпептидів, які наразі потребують детального дослідження.

Рогівка є структурою, надзвичайно чутливою не лише до зовнішніх впливів, але й до системних хвороб, інтоксикацій та інших порушень метаболізму, які викликають деструктивні зміни у тканині, у тому числі, нейродегенеративні. Етиловий спирт є найбільш вживаним токсикантом у світі, його хронічне споживання спричиняє низку порушень функціонування зорового апарату, у тому числі синдром «червоних очей» (*Karimi et al., 2021*), через розвиток гіпоксії, порушення ангиогенного балансу, індукування апоптозу клітин та погіршення захисних властивостей слізної плівки, а також структурно-функціональних змін у нейронах та клітинах сателітної глії. Втім, на сьогоднішній день інформація стосовно метаболічних змін у клітинах сателітної глії, індукованих етанолом, відсутня. Токсична дія етилового спирту та продуктів його обміну в рогівці може реалізовуватися через етанол-індукований дефіцит тіаміну (вітаміну B₁) (*Ucak et al., 2019*). Таким чином, є актуальною задачею оцінити вплив системної адміністрації вітаміну B₁ на рівні про- та антиапоптотичних регуляторів та протеїнів-маркерів функціонального стану клітин нейронально-гліального патерну в рогівці піддослідних тварин за хронічного споживання етилового спирту. Отримана інформація надасть можливість сформулювати рекомендації щодо використання тіаміновмісних вітамінних препаратів з метою коригування чи усунення офтальмологічних проявів хронічної алкогольної інтоксикації.

Окрім дизайну нових лікарських препаратів, ще однією важливою проблемою сучасної офтальмології є розробка неінвазивних діагностичних підходів (без забору тканини ока), заснованих на визначенні молекулярних маркерів, рівень яких відображає ступінь пошкодження рогівки та дозволяє проводити оцінювання ефективності лікування неоваскулярних захворювань. Для цих цілей як біоматеріал привабливим об'єктом є слізна рідина. За даними мас-спектрометричних досліджень, протеом сльози людини складається з більше, ніж 3 тисяч різних протеїнів, що за цим показником значно перевищує плазму крові (*Bruszel et al., 2024*). Найбільш масовим протеїном слізної рідини є лактоферин, концентрація якого в сльозі здорового ока становить 0,63–2,9 мг/мл (25% від концентрації загального протеїну) і може знижуватися за різних патологічних станів (*Zhang et al., 2023; Regueiro et al., 2023*). Тому визначення рівня лактоферину в слізній рідині за допомогою імунохімічних методів може скласти основу діагностикумів для моніторингу стану поверхні ока.

Отже, заплановані в дисертації експериментальні дослідження, є важливими для розвитку сучасної біохімії, формуючи уявлення про молекулярні механізми розвитку патологічних станів рогівки, а також становлять значний інтерес для прикладної офтальмології.

Мета і завдання роботи

Мета роботи: з'ясувати молекулярні механізми розвитку патологічних станів рогівки 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 рогівки 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 ретикулулу в рогівці тварин в експериментальній моделі лужного опіку рогівки.

3. Дослідити антиапоптотичні та нейропротекторні ефекти вітаміну В₁ (тіаміну) у рогівці 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 рогівки.

Об'єкт дослідження: молекулярні механізми розвитку неоваскулярних захворювань рогівки, спричинених лужним опіком рогівки та хронічною алкоголізацією, та механізми протекторної дії ангіостатинів і тіаміну (вітаміну В₁).

Предмет дослідження: рівень сигнальних протеїнів, які регулюють процеси, асоційовані з гіпоксією, ремоделюванням тканин, ангіогенезом, апоптозом, автофагією, стресом ендоплазматичного ретикулуму в рогівці та слізній рідині за ушкодження та корекції.

Методи дослідження. Для виконання поставлених у дисертаційній роботі завдань було використано сучасні біохімічні та імунохімічні методи, а саме: гель-електрофорез протеїнів, імуноблотинг, імуноензимний аналіз, афінна хроматографія, ензим-форез (желатинова зимографія), спектрофотометричні методи, гістологічні методи, а також методи культивування евкаріотичних клітин, імунізація тварин та отримання поліклональних антитіл, визначення ступеня неоваскуляризації за шкалою Ефрона, методи статистичної обробки результатів.

Наукова новизна отриманих результатів. У представленій роботі вперше встановлено на експериментальних моделях лужного опіку рогівки щурів та кролів, що ангіостатини (фрагменти плазміногену K1-3 та K5) у режимі місцевого застосування у вигляді очних крапель, крім загальновідомої здатності блокувати ріст новоутворених судин, проявляють широкий спектр захисних ефектів. Зокрема, вперше було показано, що ангіостатини дозозалежним чином сприяють зменшенню рівнів протеїнів-

маркерів, асоційованих з гіпоксією (HIF-1 α), ангиогенезом (VEGF), ремоделюванням і фіброзом тканин (MMP-9), автофагією (Beclin-1), а також стресом ендоплазматичного ретикулуму (GRP-78), як основних ланок патологічного процесу. Новими є дані стосовно того, що ангиостатин K1-3 сприяв зростанню рівня ZO-1 (протеїну щільних контактів) у пошкодженій рогівці, що свідчить про активацію ним реепітелізації рогівки після хімічного опіку. Новизну роботи складають також результати, які демонструють протекторні ефекти ангиостатинів щодо клітин сателітної глії в травмованій рогівці. Вперше показано, що ангиостатини регулюють рівень протеїну ACE2, який слугує рецептором вірусу SARS-CoV-2, та знижують рівень рецептора за ушкодження рогівки. Вперше доведено відсутність цитотоксичних ефектів ангиостатинів на клітини пігментного епітелію сітківки за терапевтичного діапазону концентрацій (2–100 нМ), що показано у досліджах на культурі клітин RPE.

Вперше показано, що введення тіаміну (25 мг/кг маси тіла) щурам з хронічною алкогольною інтоксикацією чинить коригувальну дію, зменшуючи наслідки токсичних ефектів етанолу в рогівці. Вперше встановлено, що вітамін B₁ сприяє збільшенню співвідношення Bcl_{XL}/Bax – показника, який свідчить про інгібування апоптозу та підсилення життєздатності клітин у тканині рогівки за умов токсичного впливу етанолу. Новими є результати, які доводять нейропротекторні властивості тіаміну в рогівці щурів за умов тривалого споживання етилового спирту, що проявляється в нормалізації вмісту нейрональних маркерів (NF-H, τ -протеїну та Neu-N), а також зменшенні рівня активації сателітної глії та експресії відповідного маркера GFAP.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані результати стосовно антиангіогенної дії ангиостатинів та їхніх плейотропних ефектів у рогівці за її пошкодження можуть слугувати основою для створення основи нових лікарських препаратів для терапії захворювань поверхні ока, асоційованих із запаленням та надмірною неоваскуляризацією.

Застосування ангіостатинів може бути перспективним засобом для нормалізації стану тканини рогівки під час операцій з кератопластики для створення умов для більш ефективного приживлення трансплантату. Зокрема, ангіостатини можуть бути рекомендовані до застосування у складі композиту, що використовується для створення бандажних (терапевтичних) контактних лінз. Очні краплі, що містять ангіостатини, можуть бути застосовані для профілактики хвороб, пов'язаних з вірусним інфікуванням, зокрема, SARS-CoV-2.

Застосування отриманих в роботі поліклональних антитіл до лактоферину може скласти платформу для розробки нових неінвазивних діагностичних підходів, заснованих на імунохімічній детекції рівня лактоферину в слізній рідині, що зробить лікування пацієнтів з травмами ока більш персоналізованим.

Результати, що доводять антиапоптотичні та нейропротекторні властивості тіаміну (вітаміну B₁), можуть бути корисними для розробки нових вітамінних препаратів як ефективних засобів корекції офтальмологічних проявів хронічної алкогольної інтоксикації.

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 B₁ у тканині рогівки щурів за умов хронічного впливу етилового спирту досліджено сумісно з д.б.н., проф. 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.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційну роботу виконано протягом 2020–2024 рр. у відділі хімії та біохімії ферментів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України у рамках проведення планових досліджень за держбюджетними темами: «Біохімічні механізми контролю системних міжклітинних взаємодій, регулювання сигнальних мереж та клітинних функцій за умов норми та патологічних станів» (№ державної реєстрації 0117U004344, 2017–2021 рр.); «Молекулярні та клітинні механізми реалізації дії плазміноген/плазмінової системи за норми та патології» (№ державної реєстрації 0118U000377, 2018–2022 рр.); «Дослідження функціональної ролі протеїнів плазміноген/плазмінової системи в регулюванні молекулярно-клітинних взаємодій у фібринолізі та за репаративних процесів» (№ державної реєстрації 0123U100516, 2023–2027 рр.).

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.

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 14 робіт, з них 7 статей, з яких 4 представлені в базах Scopus і Web of Science, та 7 тези доповідей у матеріалах вітчизняних та міжнародних наукових конференцій та конгресів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 168 сторінках друкованого тексту, складається зі анотації, вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів, результатів досліджень, їх обговорення, узагальнення, висновків та списку використаних літературних джерел, що включає 216 посилань. Робота містить 32 рисунків та 2 таблиці.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Особливості будови та функцій рогівки

Оптична система ока – це складна формація, яка потребує чіткої регуляції біохімічних та фізіологічних процесів у різних за походженням тканинах задля виконання своєї головної функції – забезпечення чіткості зору. Для фокусування зображення на сітківці ока орган зору потребує наявності міцної та оптично прозорої за своєю структурою передньої камери. Забезпечуючи приблизно дві третини здатності фокусування ока (*Sridhar, 2018*), рогівка є ключовим компонентом світлозаломлюючого апарату зорової системи людини, разом із кришталиком та скловидним тілом. За найменших біохімічних, фізіологічних та гістологічних змін у рогівці спостерігаються значні модифікації функціонального стану передньої камери ока, що можуть спричинити значні порушення заломлюючої функції рогівки (*Blackburn et al., 2019*).

Рогівка – це компонент передньої фіброзної оболонки ока, що має еліпсоїдну форму. Її діаметр становить приблизно 11-12 мм, товщина в центральній ділянці – 500-650 мкм, а на периферії – 650-800 мкм. Структура рогівки сприяє виконанню її функцій, які полягають головним чином у забезпеченні зміни коефіцієнта заломлення в оптичній системі ока. Прозорість, зволоженість та правильна форма цієї структури є обов'язковими передумовами нормальної гостроти зору. Заломлююча сила рогівки становить +43 діоптрій (сумарна заломлююча сила ока становить приблизно +60 дптр), що робить цю тканину надзвичайно важливою для нормальної рефракції (*Jonas et al., 2011*).

Окрім загальновідомої участі рогівки у процесі заломлення світла, ця структура ока виконує ще цілий ряд життєвоважливих функцій. Вона є захисним бар'єром від механічних часток (пилу, бруду) та ультрафіолету сонячних променів. Рогівка також сприяє структурній цілісності ока, надаючи органу зору сталої форми. Рогівка бере участь у формуванні слізної плівки, разом з якою забезпечує підтримку зволоженого стану поверхні ока.

За рахунок щільної іннервації тканини рогівки та високої чутливості цієї тканини забезпечується реалізація кліпального рефлексу та інших захисних механізмів (*Roszkowska et al., 2020*).

В сучасних джерелах літератури існує уявлення про те, що рогівка складається із 6 шарів – епітелію, мембрани Боумена, сполучнотканинної строми, шару Дюа, десцементової мембрани і ендотелію. Кожен із шарів має свої особливості будови та, відповідно, виконує різні функції задля забезпечення правильного функціонування передньої камери ока (Рис. 1.1.).

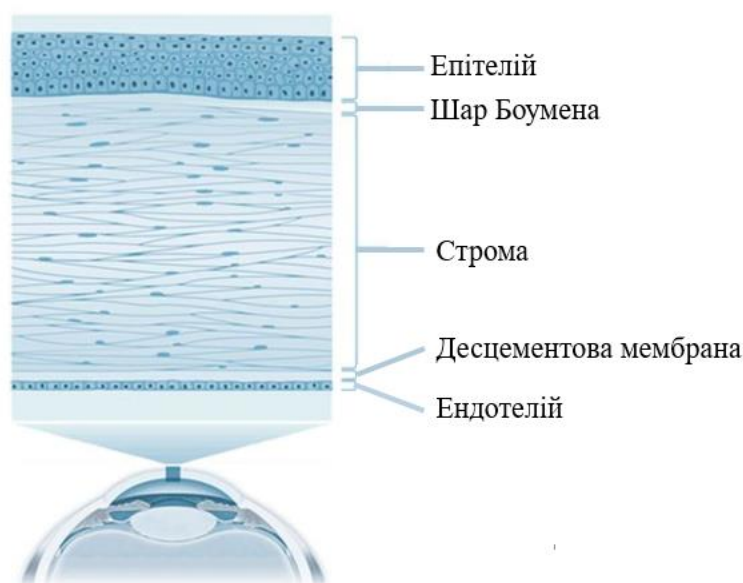


Рис. 1.1. Будова рогівки ока людини (за *Al-Fahdawi et al., 2015*).

Епітелійний шар рогівки є першим бар'єром, що захищає око від впливів зовнішнього середовища і відіграє вирішальну роль у заломлюючій здатності рогівки. Це стратифікований, однорідний, неороговілий плоский шар клітин, який розташований від лімба до лімба. Епітелій покритий слізною плівкою, що є оптично важливим для згладжування мікронерівностей його передньої поверхні (*Sridhar, 2018*).

Шар Боумена розташований спереду від строми, має товщину приблизно 15 мкм. Він не є мембранною структурою в прямому розумінні, а представляє собою скупчення колагенових фібрил і протеогліканів. У боуменовій мембрані відсутні клітини, можливі лише поодинокі випадки міграції кератоцитів зі строми. При пошкодженні вона відновлюється лише

шляхом утворення рубця, оскільки не має здатності регенерувати (Choudhary et al., 2023).

Строма є основною частиною структурного каркасу рогівки і становить приблизно 80%–85% від її товщини. Для цього шару характерна прозорість, що є результатом точної організації стромальних волокон та позаклітинного матриксу. Переважно у фібрилах рогівки представлений колаген типу I. Незважаючи на те, що спочатку вважалося, що рогівка містить лише незначну кількість поодиноких лімфоцитів у стромі, зараз прийнято вважати, що за нормальних фізіологічних умов рогівка містить гомеостатичні популяції макрофагів, які знаходяться між шарами колагену строми в передній і задній її ділянках і пов'язані із кератоцитами. Приблизно 30% резидентних макрофагів рогівки експресують головний комплекс гістосумісності (МНС) класу II (Slegers et al., 2000). Нещодавні клінічні дослідження свідчать про значний внесок вродженої імунної системи в ініціацію відторгнення трансплантата рогівки. Було встановлено, що макрофаги та моноцити є переважаючими типами клітин у зразках передньої камери ока у пацієнтів із гострим відторгненням трансплантата. У цьому плані було показано, що виснаження макрофагів подовжує виживання трансплантата в моделі кератопластики щурів (Betancor et al., 2018).

Задня частина строми рогівки (10-20 мкм) має ряд структурних та функціональних особливостей, що стало причиною її виділення в окрему структуру Dua et al. та названо предесцементовим шаром, або **шаром Дюа** (Dua et al., 2013). Шар Дюа складається з п'яти-восьми компактних тонких пластинок колагену типу I, містить значну кількість колагену типу VI, кератоцити відсутні або зустрічаються у дуже невеликій кількості.

Десцементова мембрана має товщину 7 мкм. Вона складається, головним чином, з колагену IV типу та ламініну. Ендотелійні клітини безперервно продукують компоненти десцементової мембрани. Передні 3 мкм, що утворюються до народження, мають характерний смугастий

вигляд. Десцементова мембрана, утворена після народження, має аморфну мікроструктуру. З віком може мати товщину до 10 мкм, за характером вона еластична і при ізолюванні скручується (*Medeiros et al., 2018*).

Ендотелій – це одношарова структура товщиною 5 мкм (*Sridhar, 2018*). Клітини гексагональні і метаболічно активні. Існує ендотелійний насос, який регулює вміст води. Бічна мембрана містить велику кількість ділянок з Na^+K^+ АТФазами. Базальна поверхня ендотелію містить численні гемідесмосоми, які сприяють адгезії до десцементової мембрани.

Безсудинний (аваскулярний) стан рогівки часто зберігається під час загоєння ран. Однак, у деяких випадках, нові кровоносні судини утворюються з уже існуючих лімбальних або кон'юнктивальних судин у процесі патологічного ангиогенезу, що призводить до неоваскуляризації рогівки. Більшість випадків ангиогенезу рогівки пов'язані з перебігом інфекційних захворювань, хронічним запаленням та за умов травматизації передньої камери ока різноманітними чинниками (*Nicholas et al., 2020*).

1.2. Молекулярно-клітинні зміни у рогівці за патологічних станів

1.2.1. Зміни функціонування рогівки за розвитку метаболічних порушень

Метаболічні розлади, що можуть мати різні причини розвитку, призводять до змін у загальному функціональному стані організму шляхом порушення метаболічних процесів. Метаболічні порушення провокують декомпенсацію біохімічних процесів в організмі, внаслідок чого спостерігається порушення функціонування ензимів. Одним із найбільш поширених зовнішніх тригерів розвитку порушень метаболічних шляхів організму є хронічне споживання алкоголю. Негативними наслідками хронічного вживання етилового спирту є хронічне запалення печінки, гепатоцелюлярна карцинома, серцево-судинні захворювання, абдомінальне ожиріння, порушення роботи нервової системи (*Kapoor et al., 2022*).

Окрім загальновідомих наслідків хронічного споживання етилового спирту, що лежать у межах соціальних та медичних проблем, роль етанолу відмічена також і у розвитку офтальмологічних порушень, що зараз активно вивчається. Відомо, що хронічне зловживання алкоголем може викликати низку невропатологічних та офтальмологічних проявів, серед яких на провідних позиціях залишається енцефалопатія Верніке, хвороба сухого ока, диплопія, дегенерація зорового нерва та ретинопатія (Karimi et al., 2021). При хронічному алкоголізмі у склоподібному тілі та водянистій волозі можна виявити високі концентрації етанолу та його метаболітів, які чинять прямий токсичний вплив на метаболізм рогівки та пошкоджують клітини ока шляхом пригнічення диференціювання клітин, індукції окисного стресу, розвитку запалення та інтенсифікації апоптозу клітин. Хронічне вживання алкоголю також пов'язане з ультраструктурними змінами рогівки (Ucak et al., 2019). На відміну від впливу етанолу на розвиток нейропатії зорового нерва та порушень функції сітківки, індукований алкоголем вплив на нейроспецифічні протеїни в рогівці досліджено дуже недостатньо. У той же час результати таких досліджень вказують на потенційну доцільність використання нейроспецифічних протеїнів рогівки як біомаркерів офтальмологічної картини з метою запобігання спричиненим зловживанням етанолу порушенням рогівки.

Наразі відомо, що негативний вплив етанолу в дослідженнях *in vitro* реалізується через активацію опосередкованих Nrf2 шляхів окисного стресу, зміни проникності мембран клітин, порушення водно-сольового обміну, клітинного циклу та індукції апоптозу (Ghosh et al., 2021).

Рогівка ока є зручним об'єктом вивчення метаболічних розладів, оскільки ця оптично прозора тканина дозволяє візуалізувати незначне відкладення метаболітів, що виявляється доволі складною процедурою відносно інших тканин організму. Такі розлади можуть вказувати на порушення певних метаболічних шляхів амінокислотного, ліпідного та вуглеводного обмінів. Як правило, метаболічний розлад є результатом

недостатності ензимів або зниження їхньої активності, що призводить до накопичення субстратів або локально, або після транспортування в кровотік (*Syed et al., 2021*).

1.2.2. Травмування рогівки та неоваскуляризація

Розташування рогівки на поверхні ока та особливості її організації роблять цю структуру вразливою для ряду чинників, що становлять небезпеку та можуть потенційно спричинювати травматизацію передньої камери ока. Серед таких чинників слід зазначити в першу чергу механічні пошкодження (удари, проникаючі і непроникаючі травми), кератокон'юктивіт (вірусні, бактерійні чи алергічні чинники), наслідки хірургічних втручань (кератотомія, рефрактивна хірургія), хімічні опіки (кислотні та лужні ураження), підвищення внутрішньоочного тиску, захворювання рогівки (дегенерація), порушення стабільності слизового шару, ультрафіолет (*Willmann et al., 2023*).

За умов хімічного пошкодження рогівки спостерігаються зміни у молекулярних процесах функціонування тканин, що призводять до розвитку патологічного ангиогенезу – неоваскуляризації. Таку фізіологічну відповідь організму можна розглядати як адаптаційний механізм, спрямований на захист тканин рогівки від впливу гіпоксичного стану. Неоваскуляризація рогівки – це патологічний стан, що характеризується утворенням і розростанням нових судинних капілярів усередині аваскулярних за нормальних умов ділянок цієї тканини (*Wang et al., 2024*). Незрілі нові кровоносні судини можуть призвести до ексудації ліпідів, стійкого запалення та утворення рубців, що загрожує порушеннями прозорості рогівки та зниженню гостроти зору включно з подальшою його втратою. Пізні стадії, на яких новоутворені кровоносні судини досягають зорової осі, можуть стати загрозливими для зору, а у пацієнтів з трансплантатами рогівки можуть сприяти їх відторгненню.

Внаслідок порушення балансу між про- та антиангіогенними факторами, реалізується розвиток нових, розгалужених та крихких судин у тканинах рогівки, що тісно пов'язано з стійким запальним процесом, активним ремоделюванням тканин та фіброзом. Під час важких ушкоджень або травм рогівки неоваскуляризація може мати значний негативний вплив на зір (*Sharif et al., 2019*).

За умов запалення рогівки ока, що розвивається внаслідок гіпоксичного стану, епітелійні та ендотелійні клітини, а також макрофаги виробляють ангіогенні фактори росту, а саме фактор росту ендотелію судин (VEGF) і фактори росту фібробластів. Індукований гіпоксією фактор-1 α (HIF-1 α) розглядається як основний транскрипційний фактор, який регулює адаптивну відповідь на гіпоксію (Рис.1.2.) і, отже, є основним фактором, що сприяє ангіогенній відповіді. VEGF є важливим учасником стимуляції мітозу ендотелійних клітин і утворення нових кровоносних судин, і є однією з мішеней HIF-1 α (*Peral et al., 2022*). Крім того, активація HIF-1 α може реалізуватися внаслідок надмірної експресії матриксних металопротеїназ (MMP) що відомі як проангіогенні та профіброзні ензими. Їх експресія може змінюватися внаслідок деградації позаклітинного матриксу, ремоделювання тканин і міграції клітин (*Caban et al., 2022*).

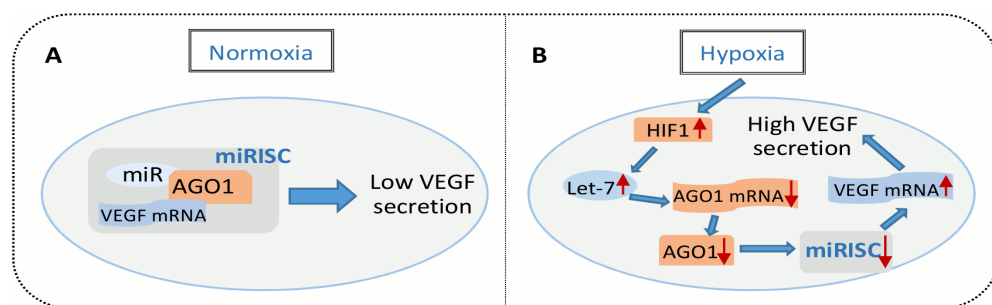


Рис 1.2. Молекулярні механізми секреції VEGF за нормальних умов та за гіпоксичного стану під впливом HIF-1 α (за *Plastino et al., 2021*)

Незначні пошкодження рогівки можуть самотійно відновитися, в той час як більш значні травми та наслідки метаболічних впливів часто призводять до розвитку негативних порушень на молекулярному рівні,

серед яких стрес ендоплазматичного ретикулуму (*Guindolet et al., 2022*) і нерегульована аутофагія (*Frost et al., 2014*), що спричиняє помутніння рогівки, фіброз та подальше утворення рубців. Це, в першу чергу, призводить до патофізіологічних порушень функціонування рогівки, що можуть прогресувати до появи захворювань поверхні ока та подальшої втрати зору.

Пошкодження рогівки, спричинене різними чинниками (проникне та непроникне травмування ока, опіки, вірусне інфікування, хірургічне втручання, синдром сухого ока тощо) призводить до порушення її оптичних властивостей, погіршення або втрати зору, а отже, й загальної якості життя. Згідно з даними ВООЗ на пошкодження рогівки отримують близько 1,4 млн. людей щорічно, причому 12% з них у подальшому страждає на проблеми з якістю зору.

Неконтрольовані запальні процеси, які відбуваються у тканині рогівки внаслідок гіпоксії, супроводжуються активацією неоваскуляризації, що є головною причиною порушення нормальних оптичних властивостей рогової оболонки ока. В Україні особливо гостро стоїть проблема лікування поранень передньої камери ока через перебіг воєнних дій. Хронічне запалення, ангіогенез та підсилене ремоделювання тканини рогівки є факторами, що негативно впливають на приживлення донорської рогівки при кератопластиці. Крім того, запальні процеси в кон'юнктивальній тканині супроводжуються надекспересією певних рецепторних протеїнів, які зумовлюють її тропність до вірусу SARS-CoV-2, вірусу Зіка та вірусу простого герпесу першого типу (HSV-1) та деяких інших вірусів, що робить око шляхом проникнення вірусної інфекції до організму (*Petrillo et al., 2022*).

За розвитку запальних процесів у епітелійних клітинах рогівки відбувається підвищення експресії ангіотензинперетворювального ензиму 2 (ACE2). Показано, що експресія ACE2 в епітелійних клітинах рогівки регулюється TNF α або IL-1 β , а також посилюється за умов запалення тканин

рогівки, внаслідок травматизації, в тому числі і за умов лужного опіку рогівки (*Schnichels et al., 2021*). Оскільки спайковий протеїн SARS-CoV-2 має високу спорідненість зв'язування з ACE2, індукована запаленням надекспресія цього протеїну робить рогівку потенційним шляхом проникнення вірусу в організм (рис. 1.3.). Хоча зв'язок між рівнями експресії ACE2 в епітелії рогівки та інфікуванням SARS-CoV-2 все ще недостатньо вивчений, можна припустити, що зниження експресії ACE2 у пошкодженій рогівці може бути захисним механізмом, спрямованим на попередження вірусної інвазії через поверхню ока (*Jiang et al., 2021*).

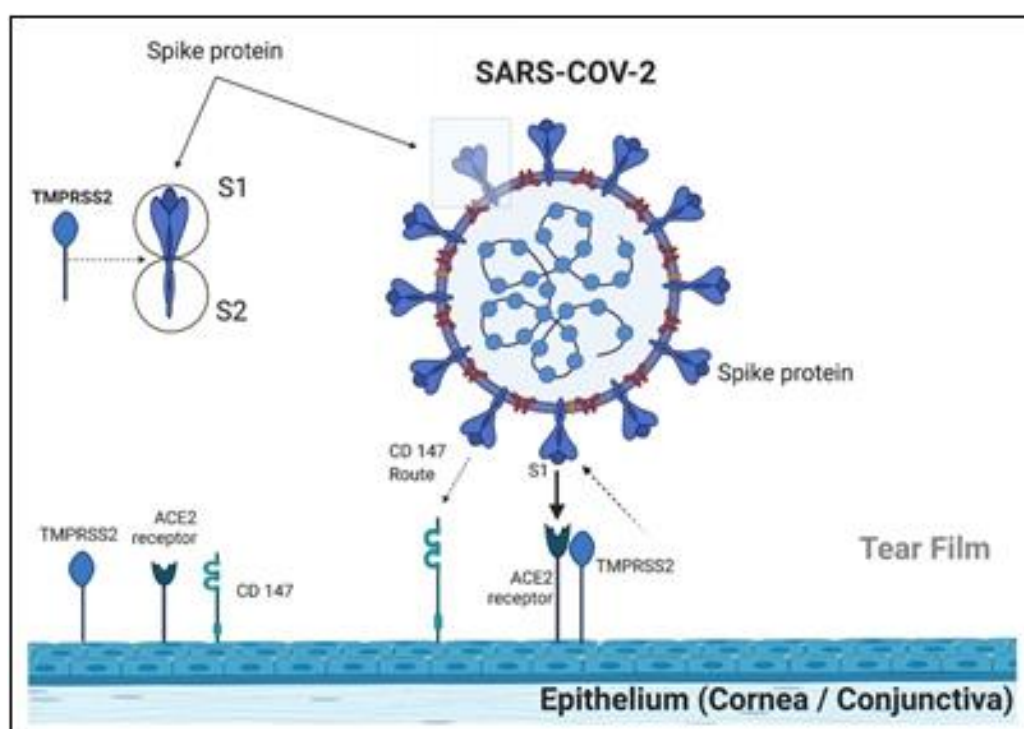


Рис. 1.3. Схема проникнення вірусу Sars-CoV-2 через рецептори ACE2 на рогівці ока (за *Santoro et al., 2021*).

Отже, розробка нових фармакотерапевтичних засобів плейотропної дії має велике медико-соціальне значення для профілактики та корекції патологічних станів рогівки.

1.2.3. Нейродегенеративні процеси за ушкодження рогівки

Рогівка іннервується офтальмологічною гілкою трійчастого нерву та є однією з найбільш щільно іннервованих структур організму (Yang et al., 2018). Механічні або метаболічні впливи на передню камеру ока призводять до пошкодження нервових закінчень рогівки, що є можливим завдяки поверхневого розташування периферійних нервових волокон. За умов порушення регуляції проліферативних процесів епітелійних клітин, що виникає за умов ушкодження різної природи, спостерігається порушення процесів загоєння ран, зниження захисних властивостей та сльозовиділення, а також втрата чутливості тканини. Крім того, за пошкодження тканини рогівки ока зазнають впливу і клітини-супутники, які відповідають за трофічну та захисну функції для периферійних нервових волокон. Сателітні клітини гліального походження можуть набувати реактивного фенотипу за пошкодження, що може призводити до негативних змін, серед яких надмірне продукування прозапальних цитокінів, активних форм кисню та азоту (Bargagna et al., 2021).

Біомаркери нейродегенеративних процесів у рогівці викликають особливий інтерес. Нервова система рогівки складна і розгалужена, тому завдяки детекції протеїнів рогівки можна виявити велику кількість нервових і системних розладів організму загалом. Останніми роками поява неінвазивних, швидких і широкодоступних методів візуалізації та кількісного вимірювання маркерів різних станів з високою роздільною здатністю, створила нову область офтальмологічної і нейрональної діагностики багатьох захворювань, зокрема і хвороби Альцгеймера (Majeed et al., 2021).

Нейрональні порушення поверхні ока можуть викликати або посилити сухість ока, а тривала сухість може спричинити зміни в структурі та функції поверхневих нервових закінчень органу зору. Порушення функціонування нервів рогівки, головним чином, проявляється у гострому пошкодженні аксонів, що знижує пороговий потенціал іонних каналів у

нервових закінченнях рогівки через вивільнення медіаторів запалення, таких як речовина P, фактор некрозу пухлини α та інтерлейкін-1. Під час регенерації пошкоджені нерви можуть утворювати нервові пучки та мікроневроми, що також може викликати спонтанний біль, печіння та світлобоязнь (*Ren et al., 2020*). У сателітних гліальних клітинах за умов активації підсилюється синтез гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP), який є важливим елементом цитоскелету і може слугувати маркером гліальної відповіді на патологічні зміни, за аналогією з тканиною центральної нервової системи (*Simões et al., 2016*).

За порушень функціонування рогівки ока, зокрема при гострій вірусній інфекції HSV-1, у рогівці знижується рівень маркеру GFAP, втім, на пізніх стадіях його рівень зростає, що свідчить про те, що GFAP може відігравати важливу роль під час зараження HSV-1 у рогівці, а також бути маркером перебігу вірусного захворювання (*Carr et al., 2002*).

1.2.4. Протеом слізної рідини та його використання для діагностики очних хвороб

Поверхня ока вкрита слізною плівкою, тонким шаром рідини, що забезпечує безсудинну за нормальних умов рогівку ока поживними речовинами, сприяє поглинанню кисню, зволожує та відіграє роль у реалізації процесів заломлення світла в оці, а також здійснює антибактеріальний, противірусний захист. Крім того, сльоза сприяє формуванню гладкої оптичної поверхні, що є необхідною умовою для забезпечення гостроти зору (*Pflugfelder et al., 2020*). Найближче до поверхні ока знаходиться гідрофільний глікокалікс, який складається з асоційованих із клітинами муцинів і галектинів, що виробляються епітелійними клітинами рогівки та кон'юнктиви. Слизово-водяний шар містить рідину, протеїни та електроліти, що секретуються слізними залозами, а також розчинні муцини. Різноманітний склад цієї біологічної рідини має критичне значення для її життєво важливої участі в гомеостазі поверхні ока. Слізна

рідина, яка омиває рогівку і кон'юнктиву, є складною сумішшю протеїнів, ліпідів і різноманітних за своєю структурою та функціональними властивостями метаболітів. За допомогою протеомного аналізу було встановлено наявність більше ніж 3000 різних протеїнів у сльозі здорових людей (*Jones et al., 2022*).

Слізна рідина все ширше використовується у діагностичних цілях для виявлення метаболічних розладів, нейродегенеративних станів та травматизації ока (*Ma et al., 2021*). Таке застосування є можливим завдяки доступності сльози та її насиченню різноманітними біомаркерами (за їхньою кількістю переважають такі в плазмі крові), отримання якої є малоінвазійним процесом, ідеально підходить для діагностики системних захворювань. Крім того, на сьогоднішній день слізну рідину можна вважати інформативним джерелом маркерів тромбозу, гіпоксії та ангиогенезу в пошкодженій тканині ока, оскільки ці процеси часто розвиваються за умов травматизації і відображають ступінь пошкодження поверхні ока.

Серед великої кількості протеїнів слізної рідини важливу роль у процесах загоєння відіграє лактоферин. Лактоферин – це поліфункціональний протеїн сімейства трансферинів. Він є найбільш масовим протеїном слізної рідини (концентрація, у середньому, складає 1,42 мг/мл, що становить 25% від загальної кількості протеїнів сльози) (*Vagge et al., 2020*). Лактоферин відіграє важливу роль у підтриманні функціонального стану ока. Він володіє антимікробною активністю, модулює функціонування імунної системи, проявляє антиоксидантні та протизапальні властивості та чинить ранозагоювальну дію.

Відомо, що лактоферин має антиоксидантні, антиангіогенні та протипухлинні властивості, а також відіграє роль у диференціації нейронів, остеогенезі та загоєнні ран (*Bielecka et al., 2022*). Лактоферин також перешкоджає опосередкованому плазміном перицелюлярному протеолізу шляхом інгібування активації плазміногену урокіназою, таким чином пригнічуючи міграцію онкотрансформованих клітин (*Zwirzitz et al., 2018*).

На додачу, в основі антитромботичної активності лактоферину лежить інгібування утворення тромбоцитів із мегакаріоцитів та інші антитромбоцитарні ефекти (*Matsumura et al., 2008*).

Розвиток низки офтальмологічних хвороб, зокрема і прогресії запального процесу за травматизації передньої камери ока, супроводжується пригніченням синтезу лактоферину та його дефіцитом, тому екзогенне застосування цього протеїну окремо або у комплексі з іншими лікувальними фармакологічними засобами, може бути корисним підходом для корекції наслідків травмування рогівки (*Regueiro et al., 2023*).

1.3. Фармакологічні підходи в корекції патологічних станів рогівки

Діагностика і своєчасне лікування патологій рогівки є основною передумовою повноцінного знешкодження негативного впливу деструктивних змін на якість зору, а також необхідне для його відновлення та уникнення втрати зору. На сьогоднішній день успішно використовуються методи оперативного втручання та розроблені фармацевтичні підходи до корекції порушень рогівки. Активно використовуються протизапальні та зволожувальні краплі, антибіотики або кортикостероїди, кератопластика, носіння бандажних контактних лінз, кератотомія, та лазерна хірургічна процедура – кератомалаяція (LASIK, PRK, LASEK) (*Yahalomi et al., 2023*). Ефективність лікування залежить від причин появи і розвитку конкретного захворювання рогівки та стадії, до якої воно прогресувало.

Серед препаратів, що пропонуються для корекції неоваскуляризації рогівки наразі поширені кортикостероїди (дексаметазон), антиваскулярні препарати (бевацизумаб (Avastin) – моноклональне антитіло, блокатор VEGF), імуномодулятори (циклоспорин), кератопротектори (гіалуронат натрію) та препарати для контролю внутрішньоочного тиску (*Liu et al., 2023*). Існуючі на сьогодні консервативні методи лікування неоваскулярних захворювань, які зосереджені на застосуванні анти-VEGF агентів, не завжди

забезпечують позитивний терапевтичний ефект, що часто пов'язано з порушеннями репаративно-регенеративних процесів в оці, а існуючі на сьогоднішній день лікарські засоби, що пригнічують надмірну васкуляризацію ока, характеризуються наявністю побічних ефектів, а також часто не демонструють повноцінного лікування патологічного стану (*Motevasseli et al., 2021*). Таким чином, є нагальна потреба у пошуку альтернативних способів профілактики та лікування цієї групи офтальмологічних захворювань. Антиангіогенна терапія цих розладів є надзвичайно перспективною і проводиться для інволюції новоутвореної судинної мережі та/або нормалізації будови нових судин через пригнічення функціональної активності ключових проангіогенних факторів.

1.3.1. Вітаміни в лікуванні захворювань передньої камери ока

Вітаміни відіграють важливу роль у збереженні здоров'я очей та рогівки. Оскільки вітаміни є різними за своєю хімічною природою, їх вплив на рогівку може бути різноманітним, і вони можуть сприяти її повноцінному функціонуванню та забезпечувати протекторну роль у випадках розвитку різноманітних захворювань та полегшенню їх наслідків.

Особливий інтерес до вітамінів як фармакологічної групи терапевтичних агентів засереджено на тіаміні (вітамін B₁), що розглядається як протекторна сполука широкого спектру дії, зокрема, за розвитку хвороби сухого ока, а також має загальновідомі нейропротекторні властивості (*Ren et al., 2022*).

Тіамін є водорозчинним вітаміном, рекомендована доза якого становить 1,4 мг на добу або 0,5 мг на 1000 ккал спожитої їжі дорослою людиною (*Sechi et al., 2007*). Загальновідомою є участь тіаміну у обміні вуглеводів як коензиму піруватдегідрогеназного комплексу циклу Кребса. Проте останні дослідження цього вітаміну як попередника ацетилхоліну дозволили розглядати його нейропротекторні функції (*Parkhomenko et al., 2016*).

В даний час встановлено, що вітамін В₁ і деякі його похідні є багатофункціональними мікроелементами, що відіграють важливу роль у енергетичному обміні, регуляції окисно-відновного балансу, підтримці транспорту іонів, гомеостазу та виживання клітин (*Hrubša et al., 2022*). Крім того, тіамін надзвичайно важливий для забезпечення життєздатності та функціонування нервових клітин, включаючи і нерви рогівки (*Pavlova et al., 2022*).

Тіамін опосередковано посилює аксональний транспорт, таким чином сприяючи відновленню пошкодженої нервової тканини рогівки, що має щільні периферійні нервові волокна. Тіамін широко використовується в терапії больових відчуттів, що супроводжують такі патологічні стани як діабетична нейропатія та постхірургічний біль (*Alemanno et al., 2016*). Попереднє дослідження показало, що лікування пацієнтів з глаукомою харчовими добавками, що містять вітамін В₁, може покращити симптоми сухого ока (*Nebbioso et al., 2013*).

Спостерігається позитивний ефект перорального прийому тіаміну, який сприяв зменшенню довжини, ширини та невриноми нерва рогівки у пацієнтів з синдромом сухого ока, а також спостерігається покращення деяких симптомів і ознак, таких як біль, світлобоязнь і гіперемія кон'юнктиви, а також покращувало результати за використання фарбування флюоресцеїном рогівки. Основним механізмом позитивного впливу тіаміну може бути нейротрофізм. Проте потрібні додаткові дослідження стосовно інших варіантів ушкодження нервів рогівки, наприклад за умов рефракційної хірургії та безпосередньої хірургії рогівки. В тому числі відмічається і покращення реіннервації та реепітелізації рогівки після травми (*Ren et al., 2022*).

1.3.2. Ангіостатини як перспективні засоби корекції неоваскуляризації

Ангіостатини є протеолітичними крингл-вмісними фрагментами плазміноген/плазміну, які утворюються у позаклітинному матриксі та на поверхні клітин за участі матриксних металопротеїназ, катепсинів, еластаз нейтрофілів, а також внаслідок автопротеолізу плазміну. Крім початкових уявлень про те, що основним джерелом ангіостатинів є онкотрансформовані клітини, на даний час існують дані про їх утворення і нормальними клітинами (нейтрофіли, моноцити/макрофаги, тромбоцити, астроцити, кардіоміоцити та ін.) (*Chen et al., 2010, Cornelius et al., 1998 Tykhomyrov et al., 2017*).

За фізіологічних умов в рогівці присутній плазміноген у достатніх кількостях для того, що з нього утворювалися ангіостатини для підтримання ангіогенного балансу в передній камері ока. Ключовим агентом, що утворює ангіостатини в рогівці є катепсин V, який здатний гідролізувати плазміноген (*Purez et al., 2008*).

Вперше ангіостатин було ідентифіковано як пептид з молекулярною масою 38 кДа у мишей з карциномою легень Льюїса, де він пригнічував метастазування пухлин. Було встановлено, що це фрагмент молекули плазміногену, який містив кринглові домени. Виходячи зі знань про їх структуру та наявність дисульфідних зв'язків, були доведені їх антиангіогенні властивості (*O'Reilly et al., 1994*).

Традиційно ангіостатин розглядають як структуру, що відповідає фрагменту домену 1-3 крингла (K1-3) або фрагменту домену 1-4 крингла (K1-4) молекули плазміноген/плазміну. Кожен крингл складається з 80 амінокислотних залишків, з'єднаних трьома дисульфідними зв'язками та структурно утворює петлю. Пізніше шляхом протеолізу плазміногену або автолізу плазміну були отримані ангіостатин K1-3, що містить перші три крингли, і ангіостатин K1-4,5, що містить крингли 1-4 і 85% кринглу 5 плазміногену. Показано, що ангіостатин K1-3 не так ефективно інгібує

проліферацію ендотелійних клітин, як ангіостатин K1-4 (Lee et al., 2009). Ангіостатин K1-4.5 пригнічував ангіогенез і ріст пухлини в дозі, яка в 50 разів менша, ніж K1-4 (Cao et al., 1999). Проте, порівняльні дослідження фрагментів плазміногену (ангіостатин, K1, K3, K2-3 та ін.) показали, що найбільшу інгібіторну активність проявляє крингл 5 (Cao et al., 1997). Різноманітність та просторову структуру AS показано на рис. 1.4.

Реалізація біологічної активності ангіостатинів відбувається завдяки їх здатності специфічно пригнічувати проліферацію та міграцію ендотеліоцитів, індукувати апоптоз цих клітин та інгібувати синтез VEGF. Потужні антиангіогенні властивості фрагментів плазміногену зумовлюють їх протипухлинні та антиметастатичні ефекти. Результати експериментальних досліджень останніх років значно розширюють уявлення про біологічну активність ангіостатинів, розкриваючи їх участь у розвитку різних патологічних станів, асоційованих з васкулярною дисфункцією та розвитком запальних процесів, що є наслідком серцево-судинних хвороб, ускладнень цукрового діабету та аутоімунних розладів. Є підстави припускати, що зміни рівня циркулюючих або тканинних ангіостатинів, які мають місце при порушенні активаторно-інгібіторної рівноваги протеолітичних систем, можуть відображати перебіг патологічного процесу.

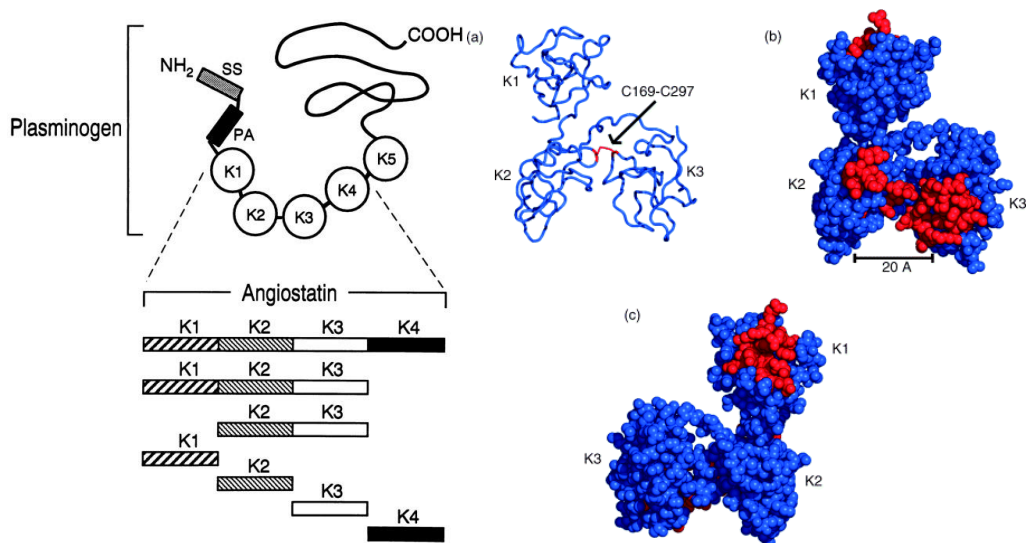


Рис 1.4. Схематична будова плазміногену та його протеолітичних фрагментів – AS. K 1-3. (Geiger et al., 2004, Cao et al., 1996)

Біологічна активність ангіостатинів залежить від особливостей структури кринглових доменів, а їхні ефекти можуть бути реалізовані через різні молекулярні механізми. На поверхні мембран ендотелійних клітин ідентифіковано різні протеїни, що можуть виступати лігандами для ангіостатинів. Серед них важливу роль відіграють F1-FoАТР-синтаза, ангіомотин, інтегрин $\alpha\beta 3$, анексин II, HGF-рецептор (c-met), протеоглікан NG2, β -актин (*Wahl et al., 2005*). Встановлено, що зв'язування ангіостатинів з АТР-синтазою призводить до поширення апоптичних сигналів. Взаємодія протеолітичних фрагментів плазміноген/плазміну з іншими лігандами та сигнальні механізми, до яких залучені ці процеси, наразі активно досліджується. Окрім прямого впливу на клітинні мішені, ангіостатини здатні реалізовувати свою активність шляхом опосередкованих антиангіогенних ефектів на VEGF. Показано, що ангіостатини пригнічують синтез VEGF та інгібують VEGF/bFGFіндуковану активацію кіназ (ERK-1 та -2) (*Chen et al., 2003*).

Місцеве утворення ангіостатинів відіграє важливу роль у підтриманні ангіогенного балансу через супресію реалізації проангіогенних властивостей VEGF у рогівці. У слізній рідині, зібраній після нічного сну, виявився підвищений рівень плазміногену, а також його фрагментів, таких як K1-3, K1-4 і K5 (*Sack et al., 1999*). Таким чином, було зроблено висновок, що фрагменти плазміногену (AS) виконують захисну функцію в рогівці під час вимушеної фізіологічної гіпоксії за умов заплющеного ока, запобігаючи в такий спосіб неоваскуляризації та розвитку запальних процесів.

Було показано, що ангіостатини проявляють протизапальні та антиадгезивні властивості, що реалізуються шляхом пригнічення адгезії лейкоцитів, опосередкованої інтегринами, а також міграції лейкоцитів у межах ендотелійних клітин. Ангіостатини також залучені до пригнічення активації ядерного фактору NF- κ B, у тому числі впливаючи на експресію тканинного фактору, що є індуктором утворення тромбів. Фрагменти

плазміногену K1-4 та K1-3 відмічені у пригніченні міграції нейтрофілів, що індукована деякими хемокінами та HIV-Tat-протеїном (*Benelli et al., 2003*).

Рекомбінантні ангіостатини людини наразі активно досліджуються і впроваджуються у клінічну практику. Рекомбінантний K1-3 людини помітно зменшує ступінь інфільтрації макрофагів за умов розвитку експериментального атеросклерозу (*Moulton et al., 2003*). Також було зафіксовано дозозалежний ефект K1-3 щодо пригнічення хемоатрактант-індукованої міграції макрофагів та моноцитів у експериментальних моделях мишей, що призводило до порушення процесів реорганізації актинового цитоскелету (*Perri et al., 2007*).

Раніше було показано, що за цукрового діабету та тривалої гіперглікемії, окрім порушення функціонування сітківки, спостерігається також і дегенерація нервових закінчень рогівки. Внаслідок цього сповільнюються ранозагоювальні процеси епітелійної тканини та знижується чутливість рогівки. Інгібування полі(АДФ-рибозо)полімерази (PARP) покращує стан інервації передньої камери ока (Вуен 2015). За існуючими даними, спостерігається підвищення рівня ангіостатину за використання інгібіторів PARP у сітківці ока щурів, що є свідченням відновлення ангіогенного балансу. Продемонстровано, що інгібування PARP запобігає утворенню VEGF у сітківці та рогівці внаслідок розвитку ускладнень цукрового діабету, що супроводжується гіпоксичним станом. Таким чином, ангіостатини можна вважати потенційними терапевтичними агентами у врівноваженні ангіогенного балансу за умов ускладнень цукрового діабету. Крім того, показано, що пригнічення активності PARP-1 має більш широкий вплив на ангіогенний баланс сітківки, не лише впливаючи на експресію факторів росту та цитокінів, але також і модулюючи утворення ангіостатичних речовин (*Guzyk 2016*).

Спираючись на існуючі дослідження, існує можливість розгляду використання AS в офтальмологічній практиці як аваскулогенних агентів для профілактики та лікування захворювань ока, асоційованих з

патологічною неоваскуляризацією рогівки. Головною перевагою використання ангіостатинів як інгібіторів ангіогенезу є їхнє ендогенне походження, і як наслідок – відсутність у них алергічної і цитотоксичної дії.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Обладнання та реактиви

Для виконання експериментальних досліджень використовували наступне лабораторне обладнання: камери для вертикального гел-електрофорезу протеїнів BioRad (США), камера для вестерн-блот аналізу Bio-Rad Mini-PROTEAN (США), джерело живлення SPN300-03C (Німеччина), спектрофотометр СФ-2000 (РФ), ваги електронні Radwag XAS160/C (Польща), рН-метр Eutech Instruments рН 510 (Сінгапур), ультразвуковий дезінтегратор Labsonic M (Sartorius, ФРН), настільна центрифуга з охолодженням Eppendorf 5415R (ФРН), вортекс Biosan FVL-2400N Combi-Spin (Латвія), шейкер-термостат ES-20 (BIOSAN, РФ), ультрацентрифуга центрифуга УЦП-2-85, центрифуга ОПН-3, центрифуга РС-6, магнітна мішалка ММ-5, термобаня EL-20, термостат ТВ-3, холодильники Snaige, холодильна камера Liebherr, центрифужні фільтри з різним діаметром пор (Amicon Ultra, Millipore, Ірландія), пластикові 175-см³ флакони (Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, ФРН), скляні хроматографічні колонки, автоматичні піпетки Biohit на різні об'єми. Культивування клітин RPE-1 проводилося у ламінарних шафах біологічної безпеки ESCO 2-го рівня біобезпеки (Сінгапур) з використанням автоматичного лічильника клітин Thermo Fisher Countess FL II з Invitrogen EVOS GFP світловим кубом.

У роботі були використані наступні реактиви та речовини: тріс(гідроксиметил)амінометан, хлорид натрію, акриламід, N,N'-метиленбіс-акриламід, персульфат амонію, сечовина (Merck Millipore, ФРН); гліцин (Fisher Scientific, США); протеїн А-сефароза із *Staphylococcus aureus*, тіамін, азид натрію, ЕДТО, хлорид цинку, хлорид кальцію, β -меркаптоетанол, Triton X-100, Tween-20, параформальдегід, люминол 97%, р-кумарова кислота, пероксид водню, 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолій бромід (МТТ-реагент), желатин із шкіри свині, повний та неповний

ад'юванти Фрейнда (Sigma-Aldrich, США); поживне середовище для вирощування клітин DMEM (Gibco, США); бичача ембріональна сироватка (fetal bovine serum, FBS), коктейль інгібіторів протеїназ та фосфатаз Pierce™, суміш антибіотиків-антимікотиків (Thermo Scientific, США); розчин для дисоціації клітин (Millipore, США); протеїнові маркери молекулярної маси в діапазоні від 10 до 270 кДа (PageRuler Prestained Protein Ladder, Fermentas, Литва); натрій-фосфорнокислий двозаміщений 12-водний, натрій-фосфорнокислий однозаміщений 2-водний, діамінобензидин тетрагідрохлорид (ДАБ), карбонат натрію, бікарбонат натрію (Shanghai Synnad Chemical Co., Китай); натрію додецилсульфат (AppliChem, ФРН); сухе знежирене молоко (Carnation, США або Apex™, Bioresearch Products, США); барвник кумасі діамантовий синій R-250 (Serva, США); барвник SERVA Blau R (Fluka, ФРН); метанол (Macron Avantor, США); бичачий сироватковий альбумін (BSA) (Amresco, США); лактоферин (Novax Pharma, Монако); амоній сірчаноокислий (CFL, ФРН); тетраметилендіамін (ТЕМЕД), оцтова кислота, трихлороцтова кислота, гліцерин (ТОВ «НВП «Альфарус», Україна); рентгенівська плівка, розчини проявника та фіксажу для обробки рентгенівських плівок (Kodak, США або ОНІКО, Україна); нітроцелюлозна мембрана для блотингу з діаметром пор 0,45 мкм (GE Healthcare, Amersham, Велика Британія).

Плазміноген людини та його фрагменти K1-3 та K5 було отримано у відділі хімії та біохімії ферментів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України за загальною схемою, представленою на рис. 2.1.

Нативний, або Glu-, плазміноген, необхідний для отримання ангіостатинів, ізолювали з донорської плазми за допомогою афінної хроматографії на лізин-сефарозі за методикою, описаною раніше (*Deutsch et al., 1970*). AS (фрагмент K1-3) було отримано за допомогою обмеженого протеолізу плазміногену панкреатичною еластазою з подальшим очищенням на лізин-сефарозі та гель-фільтрацією на Sephadex G-75 за (*Sottrup-Jensen et al., 1978*) з мінорними модифікаціями (*Tykhomyrov et al.,*

2013). Міні-плазміноген, який отримується в ході еластоліза плазміногену разом з K1-3, було використано для напрацювання фрагменту K5. Отримання AS K5 проводили шляхом гідролізу міні-плазміногену пепсином з подальшим ізолюванням K5 за допомогою афінної хроматографії на аміногексил (АН)-сефарозі згідно з методикою, описаною раніше (Kapustianenko, 2017).

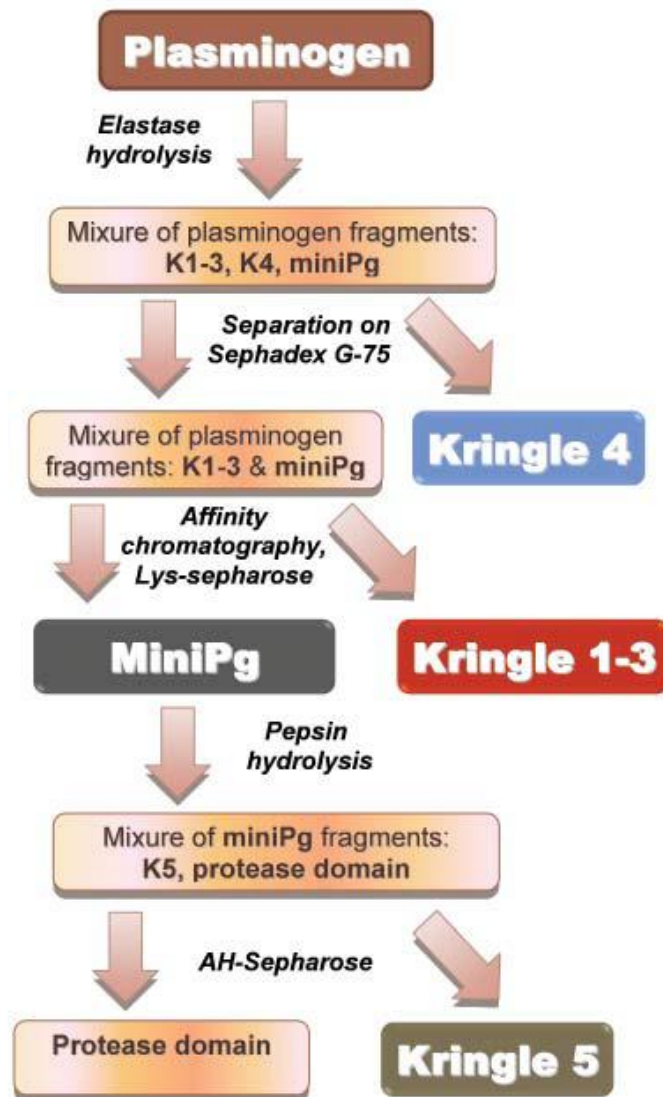


Рис. 2.1. Схема отримання крингл-вмісних фрагментів плазміногену (ангіостатинів) (Bilous et al., 2021).

Виділенні та очищені протеїни були електрофоретично гомогенними та не містили протеолітично активних домішок (рис. 2.2).

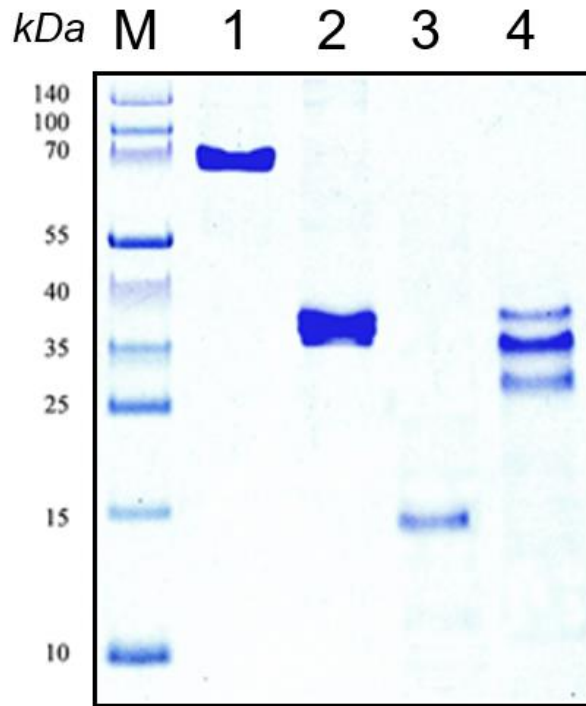


Рис. 2.2. Електрофореграма Glu-плазміногену (1) та його протеолітичних фрагментів: міні-плазміногену (2), К1-3 (3) та К5 (4); М – маркери молекулярної маси.

Перелік комерційних антитіл, що використовували у роботі для проведення вестерн-блот аналізу, наведено у таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Перелік комерційних антитіл, що використовувалися в роботі

Антитіло	Вид	Виробник	Кат. номер
<i>Первинні</i>			
Anti-actin (BA-3R), monoclonal (for loading control)	Миша	ThermoFisher Scientific (США)	MA5-15739
Anti-Bax, polyclonal	Кріль	Sigma-Aldrich (США)	B3428
Anti-Bcl-x1, polyclonal	Кріль	ThermoFisher Scientific (США)	21676
Anti-HIF-1 α , polyclonal	Кріль	Sigma-Aldrich (США)	HPA001275
Anti-VEGF, monoclonal	Миша	ThermoFisher Scientific (США)	MA5-12184
Anti-caspase-3, monoclonal	Миша	Abcam (США)	ab208161
Anti-MMP-9, polyclonal	Кріль	Sigma-Aldrich (США)	AV33090
Anti-NF- κ b, monoclonal	Миша	ThermoFisher Scientific (США)	PA5-27617
Anti-beclin-1, monoclonal	Миша	Santa Cruz Biotechnology (США)	sc-48341
Anti-vimentin, monoclonal	Миша	Santa Cruz Biotechnology (США)	sc-6260
Anti-ZO-1, polyclonal	Кріль	Sigma-Aldrich (США)	AB2272
Anti-ACE2, monoclonal	Миша	Millipore Inc. (США)	MABN59

Продовження табл. 2.1

Anti-GRP78, polyclonal	Кріль	ThermoFisher Scientific (США)	PA5-34941
Anti-neurofilament 200, monoclonal	Миша	Sigma-Aldrich (США)	N0142
Anti-GFAP, polyclonal	Кріль	Santa Cruz Biotechnology (США)	sc-9065
Anti-tau-protein, polyclonal	Кріль	Santa Cruz Biotechnology (США)	SAB4504557
Anti-Iba-1, polyclonal	Миша	ThermoFisher Scientific (США)	PA5-18039
Anti-Neu-N	Миша	Merck Millipore (США)	MAB377
<i>Вторинні</i>			
Anti-rabbit IgG, HRP-conjugated	Коза	ThermoFisher Scientific (США)	G-21234
Anti-mouse IgG, HRP-conjugated	Коза	ThermoFisher Scientific (США)	G-31430

У роботі використовували клітини пігментного епітелію сітківки RPE-1 hTERT та макрофаги миші лінії J744.2 (ATCC, Manassas, VA, США).

2.2. Експериментальні моделі

У представлений 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.).

2.2.1. Модель лужного опіку рогівки кролів

Існують загальна гомологія в анатомічних особливостях і тканинній побудові рогівки ока кроля і людини, тому око кроля зазвичай використовується як експериментальна модель для моделювання захворювань поверхні ока людини (Vezina, 2012). Модель було створено відповідно до раніше опублікованих рекомендацій щодо стандартизації

методології опіку рогівки кролів лугом на основі спостережень, що 1 н. NaOH викликає більший фіброз стромы та гарантовано спричиняє неоваскуляризацію в рогівці (*Villabona et al., 2023*). Кролі породи Шиншила (самці, вік 2 міс., маса 1800–2200 г) було розділено на три групи: I) інтактний контроль (n = 2); II) опік лугом (n = 3); III) опік лугом + K1-3 (n = 3); IV) опік лугом + лактоферин як препарат порівняння (n = 3). Перед експериментальною процедурою проводили знеболювання з використанням тетракаїну як високоефективного анестетику місцевої дії. Далі фільтрувальний папір Ватман № 1 діаметром 4 мм, змочений 1 н. розчином NaOH, поміщали на лімбальну зону поверхні рогівки рівно на 30 с. Після видалення паперу око ретельно промивали 10 мл фізіологічного розчину. У кролів лужний опік викликали лише в правому оці, тоді як у ліве око закрапували відповідний об'єм фізіологічного розчину. Місцеве застосування (у вигляді крапель) ангіостатину K1-3, розчиненого в стерильному буферному фізіологічному розчині, в пошкоджене око проводили щодня протягом 14 днів в об'ємі приблизно 25 мкл на око. Таким чином, разова доза 1,0 мкМ розчину K1-3 містила 0,75 мкг поліпептиду-ангіостатику. Задля визначення, чи має досліджуваний AS будь-які побічні ефекти у здоровому оці кроля, кролям із групи III щодня протягом усього періоду експерименту капали в ліве око розчин K1-3 у тій же концентрації. Lf використовували у тій самій молярній концентрації, що й K1-3. Після закінчення експерименту кролів термінізували, виділяли рогівку для подальших імунохімічних та гістологічних досліджень.

2.2.2. Модель лужного опіку рогівки щурів

Для створення експериментальної моделі використовували самців щурів віком 6 місяців масою 190-220 г. Перед початком процедури щурів піддавали анестезії за допомогою внутрішньочеревинної ін'єкції кетаміна (50-100 мг/кг маси тіла) та місцевого знеболювального (очні краплі тетракаїну). Для індукування лужного опіку ока фільтрувальний папір

Ватман № 1 діаметром 4 мм, змочений 1 н. розчином NaOH, поміщали на поверхню рогівки обох очей рівно на 30 с. Після видалення паперу око ретельно промивали 10 мл фізіологічного розчину. Далі щурів з пошкодженням рогівок рандомним способом розділяли на наступні групи: I) інтактний контроль (закапування фізіологічним розчином); II) опік без лікування (закапування фізіологічним розчином); III) опік з лікуванням К5 (1,0 мкМ); IV) опік з лікуванням К1-3 (1.0 мкМ); V) опік з лікуванням К1-3 (0.1 мкМ). Ангіостатини, розчинені в стерильному фізіологічному розчині, закрапували щоденно протягом 14 днів в об'ємі приблизно 25 мкл на око. Разова доза 1,0 мкМ розчину К1-3 містила 0,75 мкг поліпептиду-ангіостатику, відповідно, 0,1 мкМ – 0,075 мкг, тоді як разова доза 1,0 мкМ розчину К5 містила 0,3 мкг цього ангіостатину. К5 використовувався в одній концентрації через обмежену кількість отриманого препарату. Після закінчення експерименту всіх щурів піддавали ефірній евтаназії та забирали біологічний матеріал.

2.2.3. Модель хронічної інтоксикації етанолом щурів

Самці білих безпородних лабораторних щурів (n=12) отримували 15% (об./об.) водний розчин етилового спирту як безальтернативне джерело питної води протягом 9 місяців (*Pavlova et al., 2019, Nunes et al., 2019*). Контрольні тварини споживали чисту питну воду у вільному доступі. За весь період експерименту летальних випадків не спостерігалось. За тиждень до закінчення експерименту половині кількості щурів, які зазнали хронічного впливу етанолу, щодня перорально вводили тіамін (25 мг/кг маси тіла) (Sigma Aldrich, США, кат. № W332208). Після закінчення експерименту всіх щурів декапітували під глибокою анестезією діетиловим ефіром і забирали біологічний матеріал.

2.2.4. Досліди на клітинах RPE (MTT-тест)

Лінію клітин пігментного епітелію сітківки людини (RPE-1 hTERT, ATCC, Manassas, VA, США) культивували у 96-лункових планшетах та вирощували за температури 37 °C в атмосфері 5% CO₂ до досягнення ~90% конфлюентності (1×10⁵ клітин на лунку). Кондиційне середовище DMEM (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI, США), що містило 10% фетальну телячу сироватку (Invitrogen, Carlsbad, CA, США) та пеніцилін/стрептоміцин (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI, США), заміняли на свіже кожні три дні. Перед внесенням ангіостатинів клітини відмивали, а середовище заміняли на таке, що не містило сироватку. Потім клітини RPE-1 ретельно промивали PBS і витримували протягом ночі у безсироватковому DMEM перед внесенням AS. K1-3 та K5 у діапазоні концентрацій 2-100 нМ вносили до клітин RPE, та інкубували протягом 24 год. за умов, описаних вище.

Вплив ангіостатинів на життєздатність клітин RPE оцінювали за допомогою MTT-тесту з використанням реактиву 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide згідно з методикою, описаною раніше (*Abhishek et al., 2018*). Після культивування клітин за присутності AS клітини відмивали у декількох змінах PBS та додавали до 100 мкл кондиційного середовища 20 мкл стокового розчину MTT-реактиву (5 мг/мл, Sigma-Aldrich, США). Клітини інкубували 4 год. за 37°C, після чого обережно видаляли середовище. Після промивки клітин кристали формагану, що утворилися після відновлення клітинними дегідрогеназами MTT-реактиву, в кожній лунці розчиняли у 200 мкл ДМСО за кімнатної температури протягом 15 хв. шляхом струшування. Оптичну густину вимірювали на довжині хвилі 570 нм за допомогою спектрофотометру 1510 Multiskan GO, використовуючи поглинання на 620 нм як референтне значення. Життєздатність клітин виражали у відсотках від оптичної густини зразків інтактних клітин (контроль). Вимірювання досліджуваного параметру за кожної концентрації ангіостатинів проводили у трьох повторах.

2.2.5. Досліди на макрофагах J744.2 (НСТ-тест)

Тест з використанням нітросинього тетразолію (НСТ-тест) проведено згідно з методикою, як описано раніше (Choi et al., 2006) з мінорними модифікаціями. НСТ-тест характеризує стан та ступінь активації внутрішньоклітинної НАДФ-Н-оксидазної системи, є відносно простим у виконанні, високовідтворюваним та чутливим. Принцип методу заснований на відновленні поглиненого фагоцитуючими клітинами розчинного барвника тетразолію та перетворенні його на нерозчинний диформазан під впливом супероксиданіону (O_2^-), що утворюється в результаті НАДФ-Н-оксидазної реакції. Для дослідження впливу AS K1-3 на метаболічну активність макрофагальних клітин використовували клітини лінії J744.2 (макрофаги миші). Клітини нарощували до конфлюентного стану (90-95%) у 96-лункових планшетах (кат. № 655950, Greiner, Німеччина) у середовищі DMEM (Sigma-Aldrich, США) з додаванням 10% фетальної бичачої сироватки. Кількість клітин становила $2,5 \times 10^5$ на лунку. За 24 год. перед проведенням тестування ангіостатину середовище відбирали, до клітин вносили по 90 мкл середовища DMEM без фетальної сироватки, додавали K1-3, розведений у стерильному PBS, у діапазоні концентрацій 10-200 нМ і культивували 24 год. за стандартних умов (5% CO_2 , 100% вологість, 37°C). До клітин, які використовували як контроль, додавали відповідний об'єм PBS. Надалі культуральне середовище замінювали на свіже із додаванням НСТ реагенту (Sigma-Aldrich, США) у відповідній до рекомендацій виробника концентрації (1,0 мг/мл) та інкубували протягом 4 год. за стандартних умов. Після інкубування середовище обережно відбирали, додавали по 0,2 мл розчину диметилсульфоксиду (ДМСО) для лізису клітин та витримували ще 5 хв. за умов інтенсивного струшування. Оптичне поглинання розчину визначали на довжині хвилі 550 нм (тест) та 620 нм (порівняння). Вимірювання значень контрольних клітин та кожної концентрації ангіостатину K1-3 проводили у дев'яти повторях (n=9). Для

представлення результатів поглинання зразків клітин, які не були оброблені ангіостатином (контроль), приймали за 100%.

2.3. Клінічний матеріал (слізна рідина пацієнтів з непроникними травмами ока)

Дослідження проводилося у рамках Договору про науково-технічне співробітництво між Інститутом біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України та Національним медичним університетом ім. О. В. Богомольця МОЗ України (каф. офтальмології), 2022-2024 рр., № 03.03.2022). Обстежено 32 пацієнти з непроникаючими ушкодженнями рогівки, які проходили лікування в клініці «Олександрівська клінічна лікарня», що є клінічною базою НМУ імені О. О. Богомольця. Від усіх учасників було отримано інформовану письмову згоду. Дослідження було розглянуто етичним комітетом НМУ імені О. О. Богомольця (протокол №138 від 10.11.20), усі процедури було проведено відповідно до принципів біоетики, викладених у Гельсінській Декларації Всесвітньої медичної асоціації “Етичні принципи медичних досліджень за участю людини як об’єкта дослідження” та “Загальної декларації з біоетики та прав людини” (ЮНЕСКО).

Клініко-демографічні дані наведено у таблиці 2.2. На підставі огляду хворого на щілинній лампі та застосування методу фарбування рогівки флюоресцеїном фаховими лікарями-офтальмологами встановлювався діагноз непроникаючого пошкодження рогівки.

Таблиця 2.2

Демографічні та клінічні характеристики пацієнтів

Характеристики	Значення
<i>Стать</i>	
Чоловіки	19 (59.4%)
Жінки	13 (40.6%),
<i>Вік Середня ± SD</i>	40.5 ± 2.2
<i>Гострота зору</i>	Від 0.06 до 0.8

Продовження табл. 2.2

<i>Природа пошкодження</i>	
Виробниче	14(43.8%)
Побутове	18 (56.2%)
<i>Локалізація пошкодження рогівки</i>	
Центральне (оптична зона)	11(34.4%)
Парацентральне	21 (65.6%)
<i>Глибина пошкодження</i>	
Поверхнєве	18(43.8%)
Глибоке	14(43.8%)
<i>Особливості пошкодження</i>	
Зі стороннім тілом	5(15.6%)
Без стороннього тіла	27(84.4%)

За етіологією травми переважав механічний фактор: удар металевим стороннім тілом, пальцем дитини, гілкою дерева, листком рослини, котяча подрпина. Середня тривалість від появи симптомів до госпіталізації становила $2,4 \pm 1,2$ дня. Контрольну групу склали 15 здорових пацієнтів.

Зразки слізної рідини були взяті у пацієнтів і здорових добровольців за допомогою мікропіпетки з одноразовим наконечником. З нижнього меніска без інстиляції анестетика слюзи збирали в стерильні пластикові пробірки типу Епендорф і зберігали при -20 °С до лабораторного дослідження.

Для проведення біохімічного та імунохімічного аналізу слізну рідину центрифугували при 3 тис. g протягом 30 хв. за 4 °С для видалення тканинного дебрису та фібринових асоціатів. У супернатантах визначали вміст загального протеїну, готували зразки з буфером Леммлі для проведення гель-електрофорезу як попереднього етапу імуноблотингу та желатинової зимографії. На пластину 10% РААГ зразки слізної рідини наносили із розрахунку 50 мкг на трек.

2.4. Отримання поліклональних антитіл до лактоферину

Для напрацювання антитіл проти лактоферину людини використовували двох статевозрілих кролів-самців англійської ангорської породи масою 2,27 та 2,72 кг. Як антиген був використаний високоочищений препарат лактоферину (Novax[®]Pharma, Монако). Антиген вводився у вигляді емульсії з ад'ювантами Фрейнда внутрішньошкірно у чотири точки уздовж хребта кролів у об'ємі 0,25 мл на точку. Імунізація тварин проводилася за схемою, наведеною на рис. 2.3. Кров збирали з вушної вени до скляних центрифужних пробірок. Після утворення згустку сироватку зливали та центрифугували за 1 тис. g протягом 30 хв. за кімнатної температури, аліквотили до пластикових пробірок, визначали титри за допомогою ELISA та використовували для подальшого ізолювання антитіл. Виділення загальної фракції IgG проводили шляхом двоетапного фракціонування сироватки крові імунізованих лактоферином кролів. На першому етапі отримували глобулінову фракцію сироватки, що містить антитіла до лактоферину, висолюванням у напівнасиченому розчині сульфату амонію на холоді протягом 12 годин. Потім осад, який містив грубу фракцію глобулінів, відокремлювали центрифугуванням при 3000 g протягом 30 хв. за 4 °C і розчиняли в 0,05 М трис-НСl, рН 7,4, що містив 0,15 М NaCl (TBS). Розчин глобулінів діалізували проти шести змін 100 об'ємів TBS за 4 °C протягом 30 хв. на кожну зміну для видалення залишків сульфату амонію. Після діалізу до розчину глобуліну додавали п-нітрофенілгуанідин бензоат (Sigma Aldrich, США) до кінцевої концентрації 1 мМ.

На другому етапі фракцію IgG очищали методом афінної хроматографії на протеїн А-сефарозі (Sigma Aldrich, США). Колонку об'ємом 2,0 см³, заповнену протеїн А-сефарозою, врівноважували 10 об'ємами TBS. Розчин IgG вносили до афінного сорбенту у співвідношенні сорбент – розчин IgG - 2:1, протеїни, що не зв'язалися, відмивали TBS. IgG,

абсорбований на протеїн А-сефарозі, елюювали гліциновим буфером, рН 2,2.

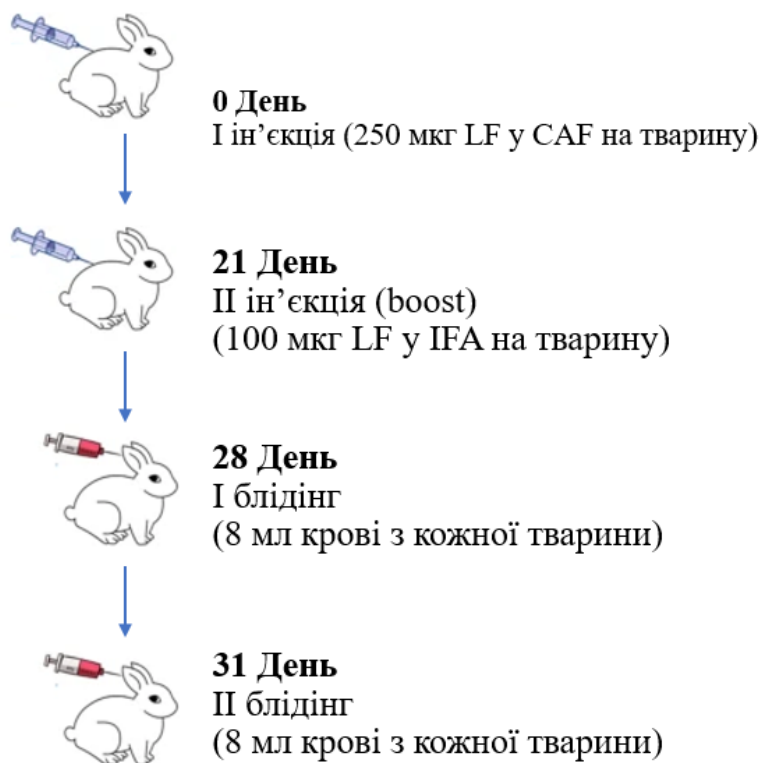


Рис. 2.3. Схема імунізації кролів з метою отримання поліклональних антитіл до лактоферину.

Відбирали зразки об'ємом по 1 мл і негайно нейтралізували рН, додаючи 1 М трис-НСl, рН 8,5. Концентрацію IgG в елюатах контролювали спектрофотометрично при довжині хвилі 280 нм. Потім аліквоти, що містили IgG, об'єднували та діалізували проти трьох змін 100-кратних об'ємів TBS за 4 °С протягом 30 хв. на кожну зміну з використанням центрифужних ультрафільтрів Amicon®Ultra з діаметром відсічення за M_m 100 кДа (Millipore, Ірландія). Високоочищену фракцію IgG використовували як джерело специфічних антитіл проти лактоферину.

2.5. Методи дослідження

2.5.1. Оцінювання ступеня неоваскуляризації рогівки за шкалою Ефрона

Через відносно малий розмір поверхні ока щура, що технічно обмежує морфологічні спостереження, оцінювання ступеня неоваскуляризації рогівки та антиангіогенні ефекти K1-3 (1,0 мкМ), найпоширенішого природного варіанту AS, досліджували у моделі лужного опіку рогівки кролів. На 14-й день після травми бульбарне почервоніння як показник ступеня неоваскуляризації рогівки оцінювали за шкалою Ефрона (від 0 = норма до 4 = важкий) (Efron et al., 2000) за допомогою фахівця-офтальмолога.

2.5.2. Пробопідготовка лізатів тканин рогівки щурів та кролів

Рогівки щурів та кролів отримували відразу після енуклеації ока за допомогою мікрохірургічних ножиць, проводячи розріз навколо лімба. Виділені рогівки промивали охолодженим PBS. Обидві рогівки, виділені з кожної тварини, об'єднували, розтирали у скрапленому нітрогені та гомогенізували у буфері для лізису наступного складу: 0,05 М Tris-HCl (pH 7,4), 0,15 М NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, який містив коктейль інгібіторів протеаз та фосфатаз. Співвідношення тканина : буфер становило 1 : 5 (m/v). Після додаткової обробки ультразвуком за допомогою дезінтегратора Sartorius гомогенати центрифугували за 16 тис. g протягом 45 хв. за 4 °C. Супернатанти відбирали до чистих пластикових пробірок типу Епандорф, визначали вміст загального протеїну та готували зразки для електрофорезу, використовуючи ×2 буфер Леммлі наступного складу: 62,5 мМ Tris-HCl (pH 6,8), 0,1% SDS, 10% β-меркаптоетанол, 10% гліцерол, 0,001% бромфеноловий синій (зразки, у яких проводили детекцію ангіостатинів, готували із використанням невідновлюючого буферу, що не

містив β -меркаптоетанол). Зразки кип'ятили на водяній бані протягом 5 хв. для солюбілізації та денатурації протеїнів.

2.5.3. Визначення вмісту загального протеїну

Вміст загального протеїну в лізатах тканини рогівки визначали спектрофотометрично, вимірюючи поглинання зразку за довжинами хвиль 280 та 260 нм (*Stoscheck, 1990; Goldring, 2019*). Для розрахунку вмісту протеїну використовували формулу Калькара:

$$C \text{ (мг/мл)} = 1,45 \cdot A_{280} - 0,74 \cdot A_{260}.$$

2.5.4. Електрофорез у поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію (SDS-PAGE)

У дисертаційному дослідженні гель-електрофорез протеїнів проводили з метою оцінювання чистоти протеїнових препаратів та отриманих антитіл, а також для попереднього розділення протеїнів перед електроблотом на нітроцелюлозну мембрану з подальшою детекцією із застосуванням специфічних антитіл проти цільових протеїнів у вестерн-блот аналізі.

Електрофорез у PAAG за присутності 0,1% SDS проводили за класичною методикою, описаною раніше (*Laemmli, 1970*). У залежності від цілей аналізу електрофорез проводили у гелях з фіксованою концентрацією акриламідну (8 або 10%). Для проведення електрофорезу використовували камери для вертикального гель-електрофорезу виробництва BioRad (США). Для полімеризації акриламідну при формуванні гелів для концентрування (рН 6,8) та розділення зразків (рН 8,8) використовували TEMED та 10% розчин персульфату амонію. Концентрація загального протеїну не перевищувала 100 мкг на трек. Як електродний використовували буферний розчин, який містив 25 мМ трис-НСl (рН 8,3), 0,192 М гліцин та 0,1% SDS.

Концентрування зразків проводили при напрузі 30-35 В (15-18 мА), розділення – 70-110 В (30-35 мА).

Після проведення електрофорезу протеїни, розіслані у гелі, фіксували у 5% розчині ТХО протягом 30 хв. за кімнатної температури. Візуалізацію поліпептидних зон проводили, забарвлюючи гель у 0,1% розчині Coomassie R-250 або його аналогу Blau-R, розчинених у суміші 25 % етанолу та 10% оцтової кислоти. Знебарвлення проводили у розчині етанолу та оцтової кислоти, що не містив барвника. Молекулярну масу протеїнів у зразках визначали, порівнюючи їхню міграцію з розташуванням маркерів Prestained Page Ruler у діапазоні 10-230 кДа. Гелі сканували для отримання цифрового зображення. Гелі, які у подальшому застосовували для проведення імуноблот-аналізу, після закінчення електрофорезу обережно виймали з камери та промивали у трансфер-буфері, що містив 20% метанолу.

2.5.5. Вестерн блот аналіз

У представлений роботі вестерн блот, або імуноблотинг, використовувався для визначення рівнів протеїнів-маркерів у тканині роги тварин або слізній рідині пацієнтів, а також для перевірки імунної відповіді імунізованих лактоферином кролів. Імуноблот проводили за класичною методикою (*Towbin et al., 1979*) з мінорними модифікаціями. Після електрофоретичного розділення протеїни з гелю переносили на нітроцелюлозну мембрану електроблотом у буферному розчині, що містив 0,025 М Tris-HCl, 0,192 М гліцин та 25% метанол. Напруга при переносі складала 42-48 В при силі струму 220-240 мА, тривалість переносу становила 120 хв.

Після переносу сайти неспецифічного зв'язування антитіл на мембрані блокували у 5% розчині знежиреного сухого молока у PBST протягом 90 хв. при 37 °С. Після блокування блоти інкубували з

первинними антитілами проти цільових протеїнів, розведеними згідно з рекомендаціями виробника, у розчині протеїнів молока, протягом 16 год. (протягом ночі) при 4 °С. В ході детекції лактоферину для блокування та розведення антитіл використовували 3% розчин BSA у PBST. Після цього мембрани відмивали 6 разів по 5 хв. у PBST для видалення неспецифічно зв'язаних антитіл та інкубували з відповідними анти-видовими вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому, протягом 120 хв. за 37 °С. Після інкубації з антитілами-кон'югатами мембрани промивали PBST у режимі, зазначеному вище. Розвинення імунозabarвлення фіксували за допомогою ECL, використовуючи 0,25 М розчин люмінолу у ДМСО, 0,09 М розчин кумарової кислоти у ДМСО, 0,1 М трис-НСl (рН 8,4) та 0,0035% H₂O₂, в ході авторадіографії на рентгенівських плівках, як описано раніше (*Alegria-Schaffer 2014*). У залежності від інтенсивності сигналу хемілюмінісценції час експозиції мембрани на плівці становив від 2 с до 15 хв. Для проявлення блотів рентгенівські плівки обробляли комерційними розчинами проявнику та фіксажу. Для імунозabarвлення мажорних протеїнів блоти проявляли менш чутливим методом, використовуючи як субстрат пероксидази та хромоген відповідно H₂O₂ (0,01%) та ДАБ (0,05%), розчинених у 0,05 М Tris-НСl (рН 7,4). Після проявлення плівки або мембрани сканували, напівкількісний аналіз рівня протеїнів проводили за допомогою програмного забезпечення TotalLab (TL120, Nonlinear Inc, США). Рівень імунореактивної зони цільового протеїну виражали в умовних одиницях (у. о.) оптичної густини.

2.5.6. Імуноензимний аналіз (ELISA)

За допомогою твердофазного ELISA визначали титр антитіл у сироватці крові кролів, імунізованих Lf. Для цього до лунок 96-лункового мікропланшету Multi-Sorp вносили Lf, розчинений у Na-PBS, у кількості 2 мкг в об'ємі 100 мкл на лунку, або 3% розчин BSA у тому ж об'ємі як контроль неспецифічного зв'язування досліджуваних антитіл. Аналіз

проводили у трьох повторях. Сорбція протеїнів на поверхні лунок тривала 14-16 год. за 4 °С. Після іммобілізації антиген, що не зв'язався, видаляли, промиваючи плашку в п'яти змінах дистильованої води і п'яти змінах Na-PBS, рН 7,4. Далі до лунок вносили 3% розчин BSA в об'ємі 200 мкл/лунка та інкубували протягом 1 год. при 37 °С для блокування сайтів неспецифічного зв'язування антитіл. Імунну сироватку у серії розведень (1:50 – 1:50000) вносили в об'ємі 100 мкл/лунка. Для контролю специфічності імунної відповіді паралельно використовували сироватку крові неімунізованого кроля. Інкубацію з первинними антитілами здійснювали за 37 °С протягом 1 год. Видалення антитіл, що не зв'язалися, проводили 10-разовим промиванням Na-PBS, рН 7,4. Вторинні антитіла проти IgG кроля, кон'юговані з лужною фосфатазою, розводили у Na-PBS, рН 7,4, що містив 0,025% Tween-20 (Na-PBST) у співвідношенні 1:20000, вносили до лунок мікропланшета в об'ємі 100 мкл та інкубували за 37 °С протягом 1 год. Для контролю неспецифічного зв'язування вторинних антитіл, анти-IgG, кон'юговані з лужною фосфатазою, вносили відразу до лунок з антигенами без попереднього додавання антисироватки. Відмивку від вторинних антитіл, що не зв'язалися, проводили у 10 змінах дистильованої води, 5 змінах Na-PBST, рН 7,4, і двох змінах карбонат/бікарбонатного буферу (КББ), рН 9,6. Виявлення комплексів антиген-антитіло проводили з використанням субстрату лужної фосфатази дінатрієвої солі пара-нітрофенілфосфату (п-НФФ). Для цього одну таблетку (5 мг) п-НФФ розчиняли у 10 мл КББ, рН 9,6, і отриманий розчин вносили до лунок в об'ємі 100 мкл. Оптичну густину вимірювали при довжинах хвиль $\lambda = 405$ і 492 нм на рідері Multiscan EX з використанням відповідного програмного забезпечення через 20 хв. після внесення розчину субстрату.

2.5.7. Ензим-форез (желатинова зимографія)

Желатинова зимографія є різновидом ензим-форезу, що застосовувався у роботі для визначення активних желатиназ, перед усім

ММР-9, у зразках слізної рідини пацієнтів з непроникними травмами рогівки, використовуючи методику, запропоновану раніше (*Beurden et al., 2005*). Зразки для нанесення готували аналогічним чином, як описано у п. 2.5.4, використовуючи для цього невідновлюючий буфер Леммлі. Безпосередньо перед нанесенням зразки прогрівали при 37 °С протягом 5 хв. задля уникнення незворотної інактивації протеаз. Електрофоретичне розділення протеїнів для проведення зимографії виконували у пластині сополімеру 8 % РААГ та водорозчинного колагену (3 мг/мл) у присутності 0,1% SDS за умов, описаних вище. Концентрація протеїну у зразках слізної рідини становила 50 мкг на лунку. Після закінчення електрофорезу гель відмивали у холодній бідистильованій воді, а потім в охолодженому 2,5% водному розчині Triton X-100 для видалення залишків SDS та ренатурації протеїнів, і зрештою – у п'яти змінах холодної бідистильованої води. Для розвитку колагенолітичної активності проводили інкубацію гелю при 37 °С протягом 16 год. у розчині наступного складу: 0,05 мМ трис-НСІ (рН 7,6), 0,15 М NaCl, 0,01М CaCl₂, 0,05 М ZnCl₂, 0,05% Tween-20 та 0,02% NaN₃. В ході термостатування желатинази, що мігрували в гелі, розщеплюють субстрат. Далі гелі забарвлювали у розчині барвника Coomassie Brilliant Blue R-250, розчиненого у водному розчині 10% оцтової кислоти та 30% етанолу. Знебарвлення гелів проводили у розчині, що не містив барвника. Присутність активних ММР визначали за наявністю світлих смуг на темнозабарвленому фоні, при цьому інтенсивність та площа смуг є пропорційними активності ензимів. Молекулярну масу ММР визначали за міграцією стандартних маркерів молекулярної ваги.

2.5.8. Гістологічні дослідження

Для гістологічного дослідження брали рогівки кролів контрольної групи, рогівки після лужного опіку на 14-й пост-опіковий день та рогівки після курсу лікування опікової патології з використанням AS K1-3 протягом 14 днів. Фрагменти тканини фіксували 16 год. у 10% нейтральному

забуференому формаліні. Обробку тканини проводили в гістопроесорі LOGOSone (Milestone, Італія). Парафінові зрізи рогівки (товщина 5-6 мкм) фарбували гематоксиліном (Gill III Hematoxylin) та еозіном за методикою, описаною раніше (Грабовий та ін., 2020). Мікроскопічні дослідження зрізів проводили за допомогою мікроскопа Olympus BX51. Ультраструктурний аналіз мікрофотографій тканин рогівки проводили з використанням програмного забезпечення Image J (Wayne Rasband NIH, USA).

2.5.9. Статистичний аналіз отриманих результатів

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням однофакторного або двофакторного (у разі використання двох концентрацій AS для корекції ушкодження рогівки) дисперсійного аналізу (ANOVA) з наступним застосуванням *post-hoc* U-теста Манна-Уїтні або використовували *t*-критерій Стьюдента для перевірки нульової (H_0) гіпотези щодо рівності двох групових середніх величин. Рівень значущості $P < 0,05$ вважали за статистично достовірний.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Тестування біологічної активності ангіостатинів

З метою дослідження ефективності біологічної активності (передусім, антиангіогенні властивості) отриманих препаратів AS, а також оцінки їх потенційних токсичних ефектів на деякі клітини ока, були проведені експерименти на моделі неоваскуляризації рогівки *in vivo* та тестування цитотоксичних властивостей *in vitro*.

3.1.1. Ангіостатин K1-3 інгібує неоваскуляризацію рогівки, індуковану лужним опіком.

За допомогою теста Ефрона було отримано наступні результати щодо інтенсивності неоваскуляризації рогівки за створеної експериментальної моделі: інтактний контроль: 0 од. (n=4); контроль з K1-3: $0,33 \pm 0,58$ од. (n=3); лужний опік; $3,67 \pm 0,56$ од. (n=3); лужний опік + K1-3: $1,33 \pm 0,58$ од. (n=3), $P < 0,05$ у порівнянні з опіком без лікування (Рис. 3.1). Отримані результати вказують на адекватність створеної моделі неоваскуляризації рогівки, індукованої NaOH. Застосування AS K1-3 значно зменшило ступінь неоваскуляризації ушкодженої ділянки ока кролів, що свідчить про виражені антиангіогенні властивості отриманого фрагменту плазміногену.

3.1.2. Ангіостатини K1-3 та K5 не впливають на життєздатність клітин пігментного епітелію сітківки (RPE).

Оскільки речовини, що застосовуються місцево у вигляді очних крапель, можуть досягати задніх структур ока та впливати на клітини сітківки, необхідною є тестування нових офтальмологічних препаратів на наявність потенційних цитотоксичних властивостей. Раніше було показано, що AS конститутивно утворюються у сітківці за нормального фізіологічного стану та залучаються до підтримання ангіогенного балансу в

оці, запобігаючи надмірній неоваскуляризації його тканин (*Guzyk et al., 2016*).

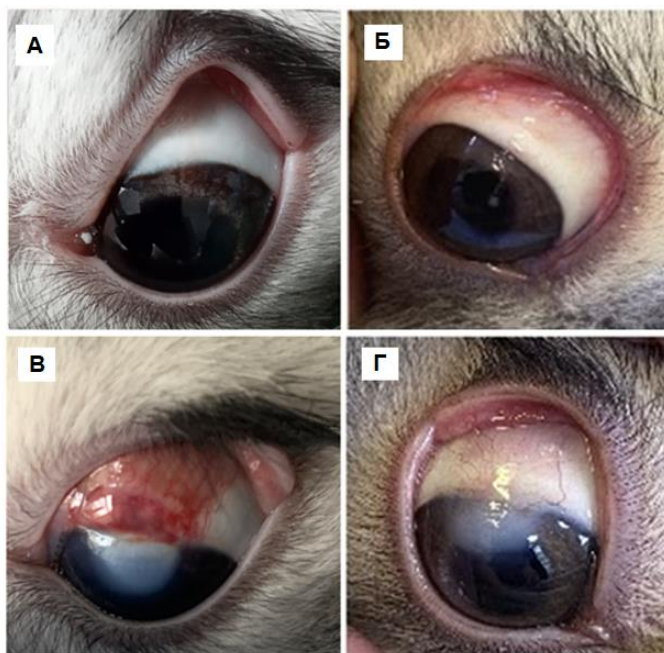


Рис. 3.1. Ефективність ангіостатину К1-3 у пригніченні неоваскуляризації рогівки за експериментальної моделі лужного опіку ока кролів (оцінювання з використанням тесту Ефрона): А – інтактний контроль (n=4), Б – контроль з К1-3 (n=3), В – лужний опік (n=3), Г – лужний опік + К1-3 (n=3).

Нативні поліпептиди-AS та їхні рекомбінантні аналоги розглядаються як потенційні засоби для антиангіогенної терапії проліферативної ретинопатії як супресори активності ендотелійних клітин. Однак, практично недослідженими залишаються ефекти різних форм ангіостатинів на інші клітини сітківки ока. На сьогоднішній день у науковій літературі зустрічаються поодинокі повідомлення стосовно ефектів AS на нормальні епітелійні клітини. Зокрема, у роботі (*Lucas et al., 1998*) встановлено, що різні форми AS, ефективно пригнічуючи міграцію та спричинюючи апоптоз ендотелійних клітин, не впливають на функціональний стан епітелійних клітин (лінія MDCK). Для тестування можливих цитотоксичних властивостей AS (К1-3 і К5) по відношенню до клітин сітківки у представленому дослідженні були використані клітини пігментного

епітелію сітківки (RPE) людини, які виконують функції, критичні для підтримання нормального зору (*Hellinen et al., 2020*). Отже, метою цієї частини дослідження було дослідити вплив двох варіантів AS на життєздатність клітин RPE.

Ретинальний пігментний епітелій є моношаром клітин шестигоноальної форми, який відіграє важливу роль у функціонуванні та життєдіяльності фоторецепторів та усієї нейросенсорної сітківки у цілому (рис. 3.2). Ретинальні пігментні епітелійні клітини (RPE) мають нейроепітелійне походження, беруть участь у формуванні гематоретинального бар'єру, виконують фагоцитарну та трофічну функції, забезпечують транспортування та регенерацію зорового пігменту, відведення тепла (*Sparrow et al., 2010*). Дисфункція цих клітин є ключовою ланкою розвитку цілої низки розладів зорового апарату, зокрема, макулярної дистрофії, що супроводжується втратою зору (*Yang et al., 2021*). Однак, на сьогоднішній день інформація стосовно впливу AS на ці клітини RPE повністю відсутня.

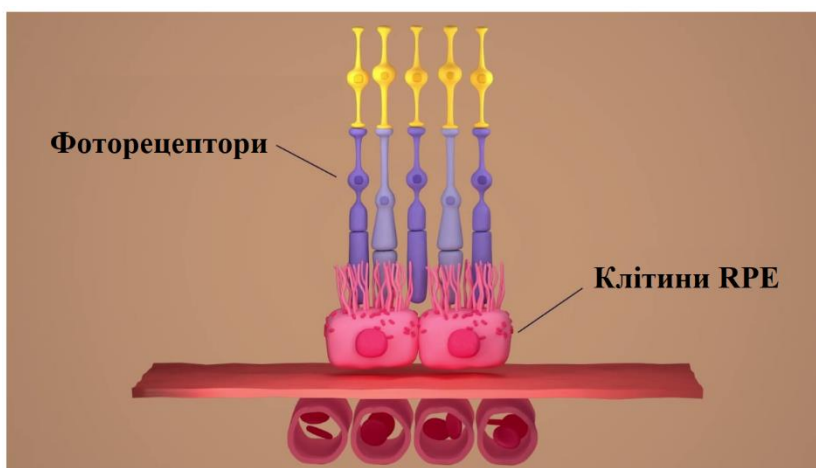


Рис. 3.2. Локалізація ретинальних клітин пігментного епітелію (RPE) у структурі сітківки ока.

Результати МТТ-тесту щодо впливу AS K1-3 та K5 на життєздатність клітин RPE наведено на рис. 3.3. Як видно з отриманих результатів, жодний з досліджуваних протеїнів-ангіостатиків у діапазоні концентрацій 2-100 нМ

не вплинув на активність мітохондрійних дегідрогеназ як інтегральну характеристику активності метаболізму клітин (*Bilous et al., 2023*).

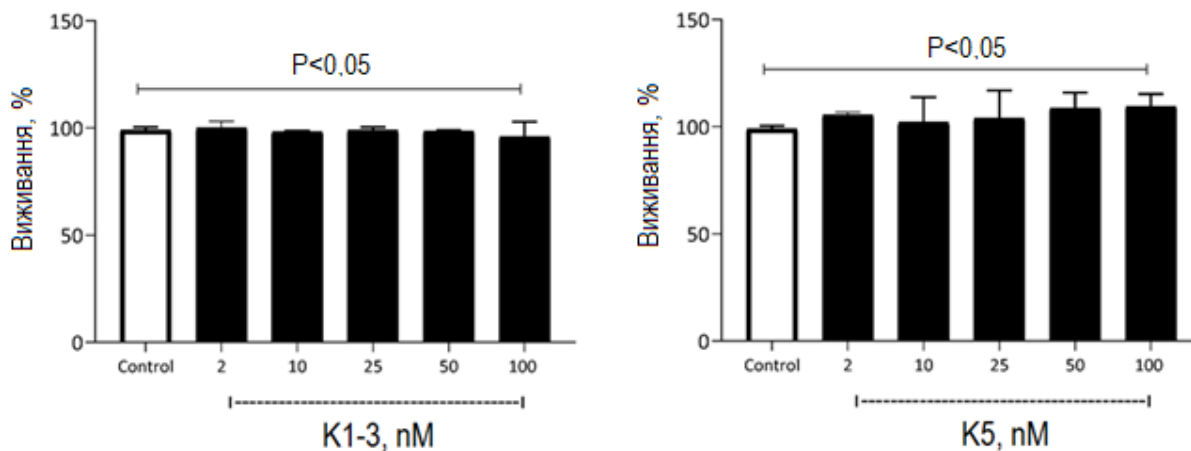


Рис. 3.3. Оцінювання впливу ангіостатинів K1-3 і K5 на життєздатність клітин пігментного епітелію сітківки (RPE) за допомогою МТТ-тесту ($n=3$, $P>0,05$ – статистично недостовірною різниця у порівнянні з контролем).

Відомо, що будь-які порушення метаболізму та функціонування ретинального пігментного епітелію опосередковують пошкодження фоторецепторів, що призводить до порушення функціонування усього зорового апарату. Дисфункція клітин RPE є головною причиною розвитку таких розладів, як хвороба Штаргардта, макулярна дистрофія Беста, пігментний ретиніт, палички-колбочкова дистрофія сітківки, вік-залежна макулярна дегенерація та ін. (*Ао et al., 2018*). Отримані у дисертаційному дослідженні результати свідчать про відсутність цитотоксичних ефектів ангіостатинів на клітини пігментного епітелію сітківки лінії RPE-1. Ці дані становлять значний практичний інтерес з огляду на можливість безпечного застосування досліджуваних інгібіторів ангіогенезу з метою таргетного і специфічного пригнічення активності ендотеліальних клітин судин за терапії різних хвороб ока, асоційованих з неоваскуляризацією.

Висновки до підрозділу 3.1.

1. Показано, що фрагмент плазміногену ангіостатин K1-3 володіє вираженою антиангіогенною активністю, ефективно пригнічуючи

неоваскуляризацію рогівки кроля за умов експериментальної моделі лужного опіку.

2. Встановлено, що фрагменти плазміногену K1-3 та K5 у діапазоні концентрації 2-100 нМ не чинять цитотоксичних ефектів на клітини пігментного епітелію сітківки (RPE) за умов *in vitro*.

3.2. Вплив ангіостатинів на рівень ключових протеїнів-маркерів патофізіологічних процесів у рогівці за умов лужного опіку

Наступним завданням роботи було дослідити вплив AS на рівень маркерних протеїнів, які регулюють ключові патофізіологічні процеси в рогівці ока за умов пошкодження, викликаного лугом. Дослідження було проведено на описаній вище моделі лужного опіка ока кролів та сформованій моделі лужного опіка ока щурів. У дослідженні на кролях вивчали ефекти AS K1-3 на рівень маркерів ангіогенезу (VEGF), апоптозу (caspase-3) і автофагії (beclin-1). Як референтний препарат у цьому експерименті використовували Lf. Вибір на користь цього протеїну було зроблено, виходячи з вимог Європейської медичної агенції (European Medical Agency, EMA). Згідно з Настановою щодо дослідження біоеквівалентності (Guideline On The Investigation Of Bioequivalence, 2016), на досліджувані речовини поширюється правило фармацевтичної еквівалентності (або фармацевтичної альтернативності). Референтний препарат, який використовується для порівняння ефектів з новим лікарським препаратом, має відповідати низці основних критеріїв: 1) містити ідентичну кількість діючої речовини та застосовуватися в однаковій концентрації чи дозуванні; 2) бути застосованими в однаковій лікарській формі; 3) мати однаковий шлях введення; 4) впливати на прийнятні або співставні фармакологічні точки (мішені). Lf цілком задовольняє усім основним вимогам щодо референтного препарату для дослідження ефектів AS у пошкодженій внаслідок лужного опіку рогівці. Lf застосовували в однаковій з AS концентрації (1,0 мкМ) у вигляді очних крапель, які

використовували у тому ж режимі, що й AS K1-3. Співставність біологічних ефектів Lf та AS заснована на їхній антиангіогенній дії, добре відомої для фрагментів плазміногену. Втім, Lf також проявляє значну антиангіогенну активність, як було нещодавно показано на моделі пухлиноіндукованого ангіогенезу (*Ayuningtyas et al., 2023*). Виявилось, що Lf здатний гальмувати неоваскуляризацію за рахунок інгібування p-p65 через зв'язування з TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6), пригнічуючи в такий спосіб активацію HIF-1 α та, у подальшому, експресію VEGF.

Результати Вестерн-блот аналізу рівня проангіогенного фактора VEGF в ушкодженій лужним опіком рогівці ока кролів наведено на рисунку 3.4.

Встановлено, що пошкодження рогівки індукує зростання рівня VEGF, у середньому у 3,3, рази у порівнянні з контролем ($P < 0,01$). Слід зазначити, що вказані зміни стосуються більшою мірою димера VEGF – біологічно активної форми ростового фактора. Внесення AS або Lf до ока контрольних кролів не вплинуло на рівень VEGF у рогівці здорового ока, тоді як протеїни, що тестувалися, сприяли зниженню рівня активатора ангіогенезу в рогівці ока з лужним опіком практично до контрольної величини. Цікаво, що AS при цьому продемонстрував більш виражену дію у порівнянні з Lf, яка, втім, не сягає рівня статистичної достовірності. Отримані результати свідчать про індукування проангіогенного сигналювання в тканині рогівки за хімічного опіку, що узгоджуються з даними морфологічних досліджень, наведеними у п. 3.1. Отже, антиангіогенна активність AS може опосередковуватися інгібуванням експресії VEGF у пошкодженій тканині.

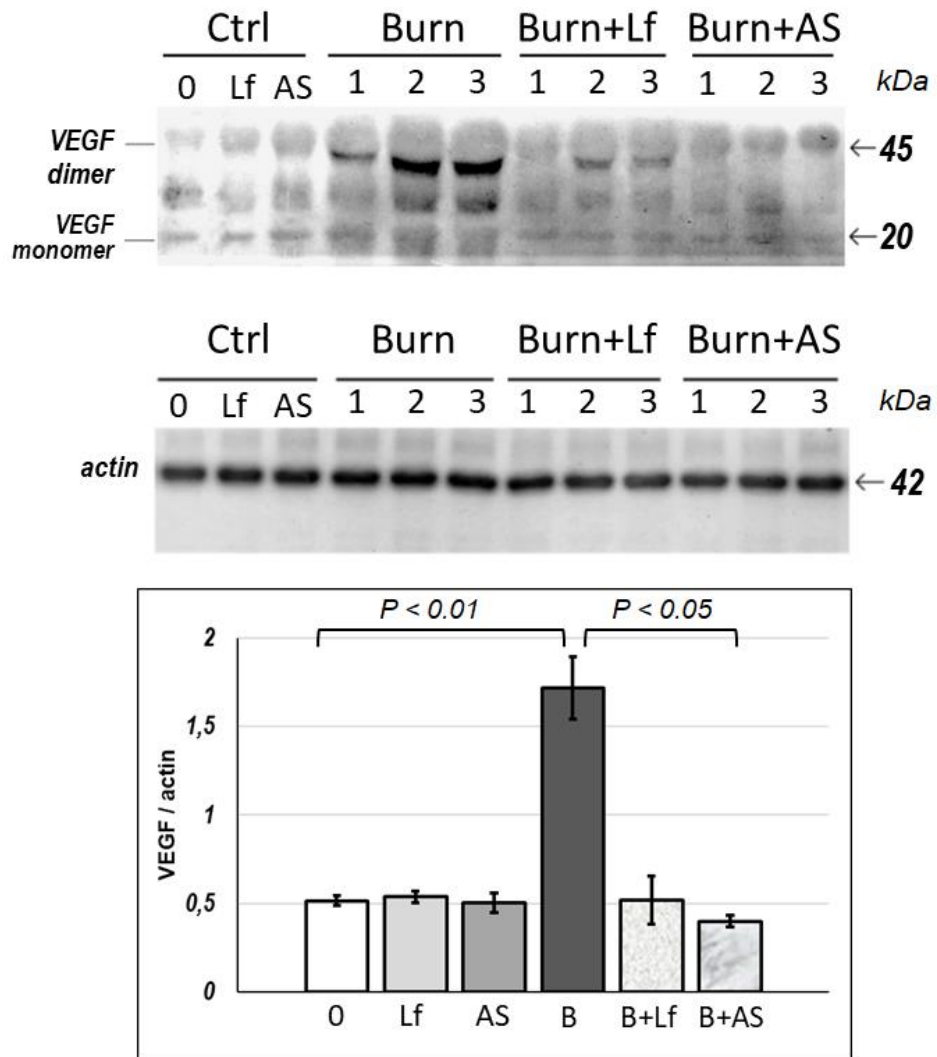


Рис. 3.4. Вестерн-блот аналіз рівня VEGF та ефектів ангіостатину (AS) K1-3 і лактоферину (Lf) у рогівці кролів за умов лужного опіку: 0 – інтактний контроль, В (Burn) – лужний опік, В+Lf – застосування лактоферину за лужного опіку, В+AS – застосування ангіостатину за лужного опіку. $P < 0,05$ – достовірна різниця у порівнянні з контролем.

Результати Вестерн-блот аналізу рівня проапоптотичного сигнального протеїну каспази-3 в ушкодженій лужним опіком рогівці кролів наведено на рисунку 3.5.

Показано, що цей ензим у тканині неушкодженої рогівки контрольних тварин міститься в слідових кількостях, тоді як за опікової травми рівень про-каспази-3 (зимоген) драматично зростає в 15,6 разів у порівнянні з контрольною величиною ($P < 0,001$). Крім того, в ушкодженій тканині з'являється поліпептид з M_m 17 кДа, який відповідає активній формі цієї

каспази. Встановлено, що AS і Lf не впливають на вміст цього регулятора апоптозу. Однак, застосування Lf і AS у вигляді очних крапель за умов лужного опіку рогівки сприяло статистично достовірному зменшенню рівня каспази-3 у 1,8 та 4,5 разі відповідно ($P < 0,05$ у порівнянні з групою Опік). Важливо зазначити, що антиапоптотична дія K1-3 статистично достовірно виявилася більш вираженою, ніж у Lf ($P < 0,05$). Отримані результати вказують на активацію апоптотичного шляху загибелі клітин рогівки, спричиненого лужним опіком. K1-3 в обраній дозі чинить виражені антиапоптотичні ефекти за умов створеної експериментальної моделі лужного опіку рогівки.

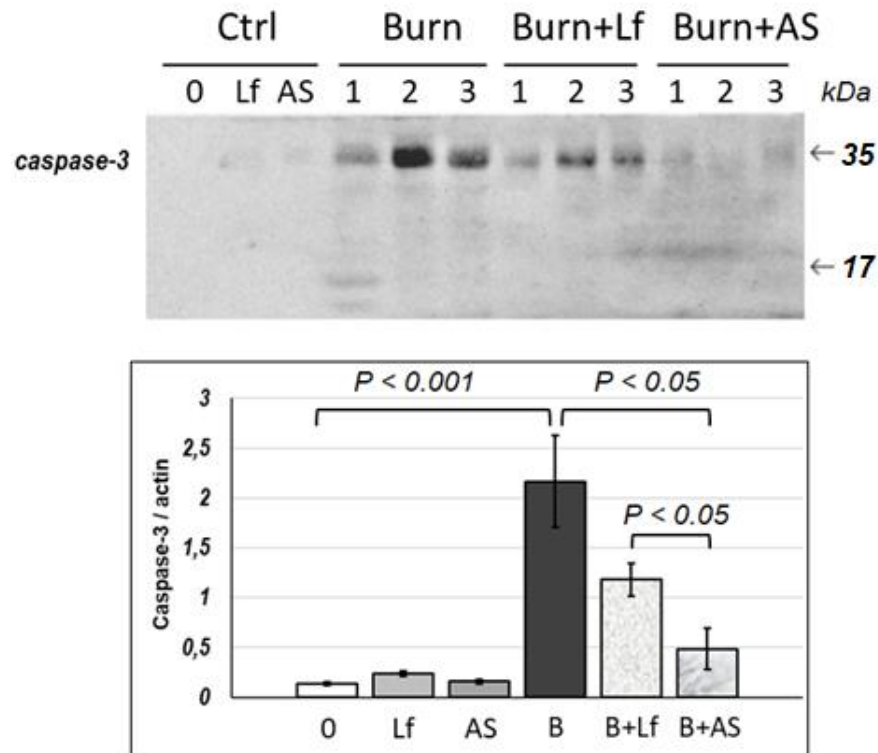


Рис. 3.5. Вестерн-блот аналіз рівня каспази-3 та ефектів ангіостатину (AS) K1-3 та лактоферину (Lf) у рогівці кролів за умов лужного опіку: 0 – інтактний контроль, В (Burn) – лужний опік, В+Lf – застосування лактоферину за лужного опіку, В+AS – застосування ангіостатину за лужного опіку. $P < 0,05$ – достовірна різниця у порівнянні з контролем.

Результати Вестерн-блот аналізу рівня маркера автофагії беклін-1 в ушкодженій лужним опіком рогівці кролів наведено на рисунку 3.6. У зразках контрольних тварин цей маркерний протеїн визначається у незначній кількості, що вказує на підтримання автофагії у здоровій тканині на відносно низькому базальному рівні. Однак, за опікової патології рогівки рівень беклін-1 істотно зростає (у 31 раз у порівнянні з контролем, $P < 0,001$).

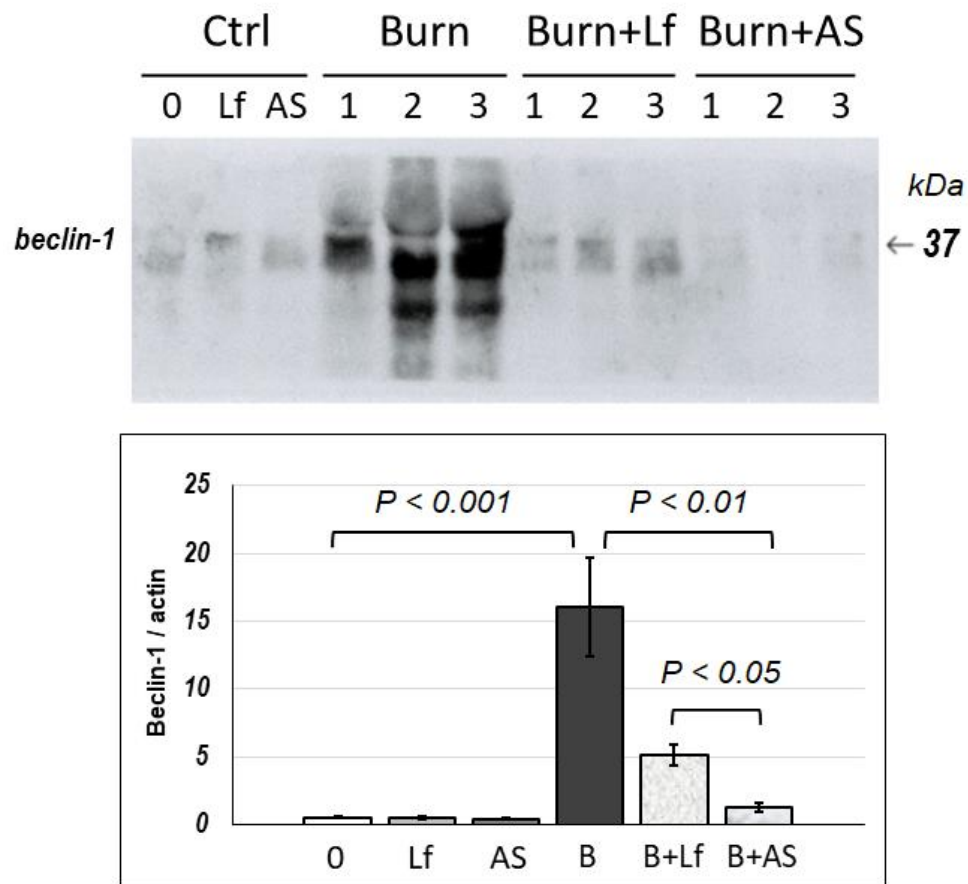


Рис. 3.6. Вестерн-блот аналіз рівня беклін-1 та ефектів ангіостатину (AS) K1-3 та лактоферину (Lf) у рогівці кролів за умов лужного опіку: 0 – інтактний контроль, В (Burn) – лужний опік, В+Lf – застосування лактоферину за лужного опіку, В+AS – застосування ангіостатину за лужного опіку.

$P < 0,05$ – достовірна різниця у порівнянні з контролем.

Обидва протеїни, що тестувалися, не вплинули істотним чином на базальний рівень маркера автофагії в інтактному оці. Однак, застосування Lf та AS як потенційних модуляторів патофізіологічних процесів, які супроводжують лужний опік рогівки, сприяло статистично достовірному зменшенню рівня беклін-1 у 3,2 та 12,9 разів відповідно у порівнянні з групою Опік ($P < 0,05$). Як і у випадку регулювання апоптозу, AS K1-3 виявився більш ефективним у порівнянні з Lf, взятим в еквімолярній кількості. Отже, отримані результати свідчать про надмірну активацію шляху автофагії в рогівці, спричинену лужним опіком, що, разом з активацією апоптозу, може бути в основі деструктивних змін у пошкодженому оці, які коригуються AS.

Ефекти AS виявилися співставними з ефективністю дії еквімолярної дози Lf, взятого за препарат порівняння, який використовується для фармакотерапії очних хвороб. Lf, у тому числі бичачого походження (bLf), який використовується як лікарський препарат у складі очних крапель, охарактеризовано у дослідженнях *in vitro* та *in vivo* як біосумісну й безпечну субстанцію. Lf включено до групи речовин GRAS (Generally Recognized As Safe Substance) Food and Drug Administration (FDA) та European Food Safety Authority (EFSA) (Rosa et al., 2017).

Відповідь рогівки на ушкодження лужним опіком, що проявляється, зокрема, у підсиленні продукування про-ангіогенного фактора VEGF та розвитку надмірної автофагії, може пояснюватися активацією макрофагів. Попри те, що рогівка вважається імунопривілейованою структурою, дендритні клітини та макрофаги можуть мігрувати та активуватися в ній у відповідь на проникнення інфекційного агенту або пошкодження (Mallapaty, 2022). Було показано, що ці патрульні імунокомпетентні клітини забезпечують швидку, але «грубу» відповідь, залишаючись у тканині тривалий час. При цьому цитотоксичні Т-клітини перетворюються на довгоживучі клітини пам'яті, що присутні в рогівці. Важливе спостереження було зроблено авторами (Betancor et al., 2018), якими

показано, що тканинні фрагменти рогівки здатні активувати моноцити/макрофаги, індукувати рекрутинг інших імунокомпетентних клітин та спричинювати при цьому викид різних цитокінів (СР-1, МІР-1 α та МІР-1 β). Було доведено, що потужна наактивація макрофагів тканинним дебрисом може бути однією з причин розвитку неоваскуляризації та відторгнення алотрансплантату після пересадки рогівки у людей. В ході дисертаційного дослідження було встановлено, що вплив АS К1-3 на макрофаги лінії J744.2 у діапазоні дозозалежним чином пригнічує метаболічну активність цих клітин (рис. 3.7).

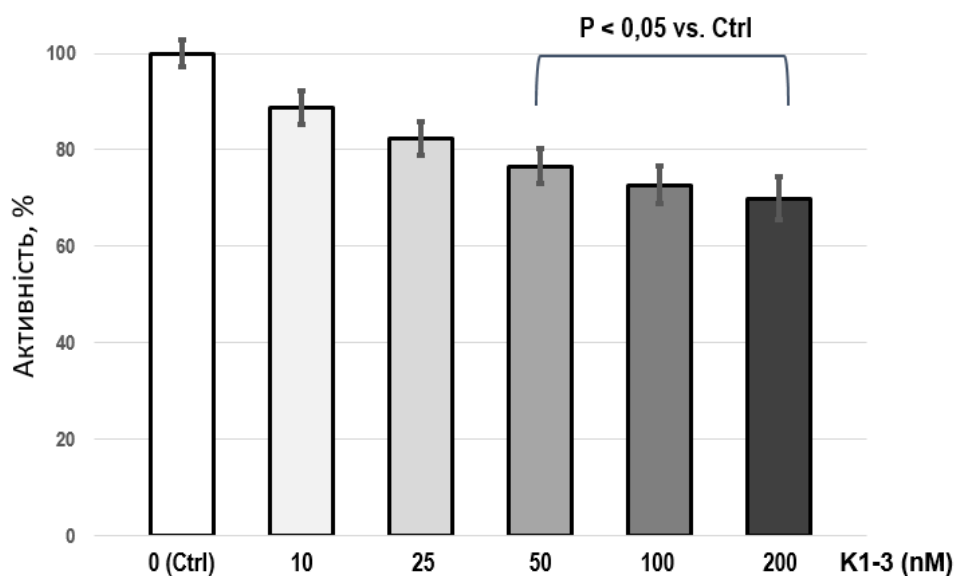


Рис. 3.7. Оцінювання впливу ангіостатину К1-3 на метаболічну активність макрофагів лінії J744.2 у спонтанному НСТ-тесті (n=9, P<0,05 – статистично достовірна різниця у порівнянні з контролем).

Показано, що ангіостатин К1-3 у дослідженому діапазоні концентрації 50 нМ пригнічує активність НАДФ-Н-оксидоредуктазної системи макрофагів миші J744.2, у середньому, на 30% у порівнянні з інтактними клітинами (P<0,05). Попри відносну видоспецифічність ангіостатинів і консервативні механізми їхньої дії, можна припустити, що вплив цих поліпептидів на макрофаги людини може бути більш потужним, але це питання потребує подальшого з'ясування. Втім, отримані у роботі дані

загалом узгоджуються з результатами дослідження (*Perri et al., 2007*), які демонструють, що ангіостатин людини K1-3 ефективно пригнічував міграцію перитонеальних моноцитів/макрофагів миші у моделі атеросклерозу. Отже, описані ефекти ангіостатинів інгібувати активність фагоцитарних клітин можуть бути корисними для модулювання процесів, асоційованих з гіпоксією, не лише за пухлинного росту та атеросклерозу, але й при пошкодженні рогівки для запобігання надмірної неоваскуляризації, оскільки саме макрофаги є головним джерелом VEGF та інших проангіогенних цитокінів (*Hadrian et al., 2021*).

Результати гістологічного дослідження тканин рогівки експериментальних тварин наведено на рисунку 3.8.

На рисунку 3.8А (контроль) представлено зріз фрагменту білкової оболонки (склери), вкритої кон'юнктивою, на межі яких чітко розрізняються епісклеральні вени. Тканинна структура кута ока має типову будову. Склера складається з впорядковано розташованих пластинок щільної волокнистої сполучної тканини, між якими заходяться поодинокі фібробластоподібні клітини. Слід зазначити, що кровоносні капіляри зустрічаються в поодиноких випадках, мікросудини частіше за все виявляються на межі кон'юнктиви і склери. У кон'юнктиві, що вкриває склеру, чітко розрізняється багат шаровий незроговілий епітелій. Під ним знаходиться пухка волокниста сполучна тканина, в якій переважає аморфна речовина, а також міститься невелика кількість тонких пучків колагенових волокон. У цій ділянці також виявляються у невеликій кількості резидентні клітини фібробластичного ряду та нерезидентні клітини (лімфоцити та плазмоцити, макрофаги, іноді поодинокі тканинні базофіли).

На зрізах рогівки кролів, що зазнали хімічного опіку, видно, що внутрішній край кон'юнктиви та прилегла периферійна поверхнева ділянка рогівки зазнали некрозу (рисунок 3.8Б). Фібринозно-некротичні маси створюють щільний струп, який розташовувався на поверхні тканинного дефекту. Безпосередньо під ним спостерігається набряк і значна запальна

інфільтрація підлеглої сполучної тканини. Відмічається збільшення кількості клітин, головним чином лейкоцитів, у прилеглих ділянках склери. Виразні ознаки регенерації сполучної тканини не виявлялися. Присутні в значній кількості тонкостінні кровоносні мікросудини, які орієнтовані до поверхні ранового дефекту. Край епітелію кон'юнктиви був реактивно потовщеним, але не виявляв тенденції до вrostання між некротизованими та життєздатними тканинами.

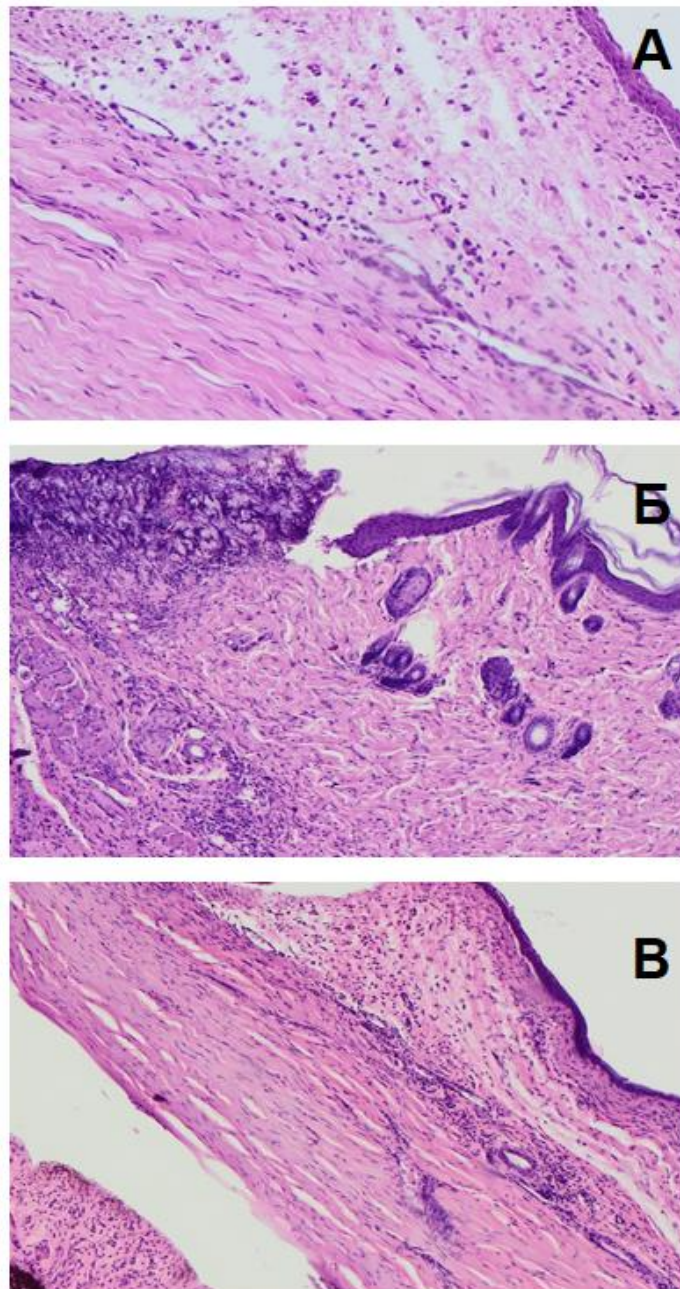


Рис. 3.8. Мікрофотографії зрізів рогівки кролів: А – контроль, Б – опік, В – опік + AS K1-3 (зabarвлення гематоксіліном та еозіном, збільшення $\times 200$).

На зрізах рогівки кролів, що зазнали хімічного опіку, видно, що внутрішній край кон'юнктиви та прилегла периферійна поверхнева ділянка рогівки зазнали некрозу (рисунок 3.8Б). Фібринозно-некротичні маси створюють щільний струп, який розташовувався на поверхні тканинного дефекту. Безпосередньо під ним спостерігається набряк і значна запальна інфільтрація підлеглої сполучної тканини. Відмічається збільшення кількості клітин, головним чином лейкоцитів, у прилеглих ділянках склери. Виразні ознаки регенерації сполучної тканини не виявлялися. Присутні в значній кількості тонкостінні кровоносні мікросудини, які орієнтовані до поверхні ранового дефекту. Край епітелію кон'юнктиви був реактивно потовщеним, але не виявляв тенденції до вrostання між некротизованими та життєздатними тканинами.

У тварин з опіком рогівки, що отримували лікування у вигляді очних крапель з AS K1-3 протягом 14 днів, у ділянці тканинного дефекту спостерігається виражена регенерація сполучної тканини (рисунок 3.8В). Важливо зазначити, що при цьому рановий дефект заповнюється молодого сполучною тканиною. Спостерігається суттєве потовщення власної пластинки кон'юнктиви у місці ураження, її набряк, помірна лейкоцитарна інфільтрація. У більш глибоких шарах вже виявлялися судини більшого діаметру з ознаками диференціювання оболонок стінки. Сполучнотканинна основа рогівки у цих випадках була практично збереженою і характеризувалася помірною інфільтрацією. У регенераті були присутні фібробласти, а також клітини лейкоцитарного ряду, зустрічалися тканинні базофіли. Відмічалися ознаки регенерації епітелію, більш виразні з боку кон'юнктиви, який наростав на новоутворену сполучну тканину. Таким чином, морфологічні спостереження підтверджуються результатами гістологічного аналізу рогівки кролів стосовно протекторного впливу AS K1-3 на процеси регенерації тканини після лужного опіку та зниження ступеня індукованої неоваскуляризації. Одним з механізмів, завдяки якому AS здатні модулювати запальні процеси у рогівці після хімічного

пошкодження, є помірний інгібувальний вплив на макрофаги, що може зменшити ступінь їхньої інфільтрації до пошкодженої тканини, запобігаючи в такий спосіб надмірному продукуванню прозапальних цитокінів та деструктивним явищам у рогівці під час відновлення після опіку.

Для того, щоб перевірити гіпотезу про те, що ангіостатини можуть мати різнонаправлений характер ефектів, спрямованих на процеси загоєння ран рогівки, що лежать поза межами звичного уявлення про їх антиангіогенні функції, було додатково досліджено їх вплив на експресію ключових регуляторних протеїнів-маркерів гіпоксії, ангіогенезу, ремоделювання екстрацелюлярного матриксу (ECM), реепітелізацію, епітелійно-мезенхімний перехід (EMT) та аутофагію.

Результати вестерн-блот аналізу кількісного визначення відповідних маркерів зображені на рисунку 3.9.

Було показано, що опікова патологія рогівки викликала статистично достовірне підвищення HIF-1 α (у два рази порівняно з контролем), VEGF (як мономерної, так і димерної форм, за 4,5 і 2 рази, відповідно, порівняно з контролем), MMP-9 (у 2,7 рази порівняно з контролем), GRP-78 (у 3,4 рази порівняно з контролем) і *bccl-1* (у 2,6 рази порівняно з контролем) станом на 14 добу після травматизації. Крім того, спостерігалось зниження рівня протеїну ZO-1 вдвічі ($P < 0,05$ порівняно з контролем), що пов'язано з порушеннями щільними міжклітинними контактів. Це вказує на розвиток дефекти епітелію та сповільнення процесів епітелізації рогівки за умов лужного опіку. Вміст маркера EMT віментину мав тенденцію до збільшення в групі опікової патології без лікування, але ці зміни не демонстрували рівня статистичної значущості.

Було встановлено, що обидва варіанти AS, які використовувалися у експериментальній моделі у формі очних крапель, майже однаково зменшували спричинену опіком гіперекспресію HIF-1 α , VEGF, віментину та GRP-78. Слід зазначити, що K1-3 і K5, взяті в концентрації 1,0 мкМ, виявилися більш потужними супресорами експресії VEGF, ніж 0,1 мкМ

розчин K1-3. Крім того, K1-3 у високій концентрації був єдиним досліджуваним препаратом, який зміг знизити рівень MMP-9 у пошкодженій тканині рогівки (у 7,55 разів порівняно з групою опіку, $P < 0,05$). Так само найвища доза K1-3 відновлювала рівень ZO-1, який був знижений після опіку лугом, до нормального значення. AS, або 1,0 мкМ K1-3, або K5, значно знижував регульовану експресію beclin-1 в пошкодженій рогівці, що доводить дозозалежний спосіб ефективності AS.

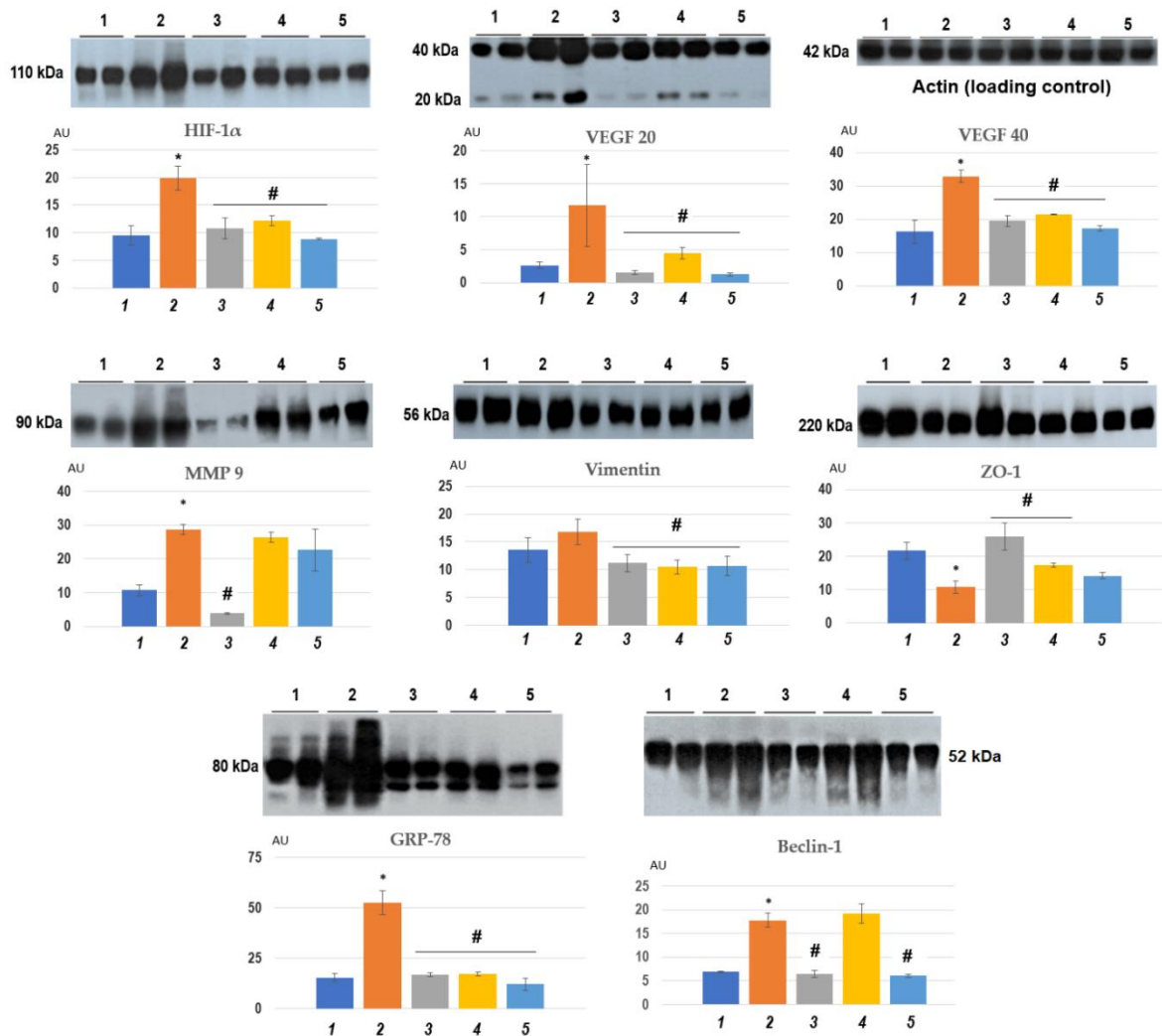


Рис 3.9. Вестерн-блот аналіз протеїнів-маркерів ключових ланок патофізіологічного процесу та ефектів ангіостатинів у рогівці щурів за умов лужного опіку: 1 – інтактний контроль 2 – лужний опік; 3 – лужний опік + K1-3 (1.0 μM); 4 – лужний опік + K1-3 (0.1 μM); 5 – лужний опік + K5 (1.0 μM). Результати вестерн-блотингу було проаналізовано денситометрично. * - $P < 0.05$ порівняно з контролем; # - $P < 0.05$ порівняно з лужним опіком.

Вперше було продемонстровано, що AS, відомі за своєю канонічною роллю потужних інгібіторів неоваскуляризації *in vivo*, здатні впливати на різноманітні ланки клітинної відповіді, пов'язані з посттравматичними процесами за умов хімічного ушкодження рогівці, окрім пригнічення ангиогенезу. Розробка адекватної тваринної моделі пошкодження рогівки має ключове значення для отримання цінної інформації про основні ланки патогенезу офтальмологічних захворювань людини. На відміну від кислот, які здатні зв'язуватися з протеїнами, розташованими на зовнішньому шарі рогівки, гідроксильні іони NaOH, викликають омилення жирних кислот, денатурацію та розчинення колагену стромы, а також можуть руйнувати нижній шар ECM (*Sprogyte et al., 2023*). Неоваскуляризація рогівки є загрозливим для зору станом, внаслідок утворення розгалуженої мережі крихких судин в аваскулярній за нормальних умов тканині рогівки, тому регресія розростання таких судин вважається новою дієвою концепцією лікування в терапії неоваскулярних захворювань очей, пов'язаних із травматизацією ока. Тим не менш, окрім неоваскуляризації, багато інших патологічних процесів виникають як серйозні ускладнення хімічного ураження рогівки, включаючи хронічне запалення, фіброз стромального шару, порушення функціонального стану та структури епітелію або повільну епітелізацію, перфорацію та помутніння рогівки, які можуть бути потенційними мішенями для нових терапевтичних засобів (*Barrientez et al., 2019*).

Сучасні підходи до лікування неоваскулярних захворювань поверхні ока полягають, головним чином, у використанні низки стероїдних та нестероїдних препаратів. Проте, вони мають деякі побічні ефекти, що головним чином проявляються у підвищенні внутрішньоочного тиску, розвитку катаракти або глаукоми та виникненні ризику супутніх інфекційних захворювань (*Sharif et al., 2019*). З огляду на це очищені фрагменти плазміногену останнім часом викликають значний інтерес як прогресивні терапевтичні засоби для терапії пошкоджень рогівки. AS у

широкому діапазоні концентрацій не виявляють ані токсичних, ані імуногенних властивостей та не викликають описаних для інших препаратів побічних ефектів. Оскільки захист поверхні ока є надзвичайно важливою умовою у лікуванні пошкоджень рогівки, результати проведених дослідження дають підстави розглядати перевірені протеїни як можливі терапевтичні засоби для забезпечення широкого спектру терапевтичних ефектів на пошкоджену рогівку, включаючи контроль неоваскуляризації та запалення, що розвиваються як ускладнення пошкодження передньої камери ока, але в той же час дозволяють контролювати процеси загоєння ран.

Інтерес до вичення AS як теперапевтичних агентів у моделі лужного опіку рогівки визначається рядом причин. По-перше, плазміноген, як попередник ангіостатинів, локально продукується у тканині рогівки у концентраціях, які дозволяють утворювати фізіологічно необхідну кількість ангіостатинів.

За даними літератури, після використання K5 у кролів з опіковими травмами рогівки спостерігалось пригнічення проліферації ендотелію, регресія новоутворених судин та протизапальний ефект (*Zhang et al., 2004*). Внаслідок лужного опіку також було виявлено зменшення ступеня неоваскуляризації рогівки у мишей після введення K5 (*Ambati 2002*). Зменшення інтенсивності розвитку виразок рогівки при місцевому лікуванні AS пояснюється не тільки пригніченням продукції металопротеїназ, а і їх впливом на імунні процеси. Показано, що ендогенні AS є імуномодуляторами, оскільки підсилюють продукцію інтерлейкіну-12 макрофагами (*Albini et al., 2009*). Отримані дані свідчать про перспективність розробки препаратів на основі AS K1-4.5 для супресії неоваскуляризації рогівки, а також для лікування захворювань, що супроводжуються виразкою передньої камери ока.

Було показано, що ангіостатини пригнічують неоваскуляризацію, спричинену опіками рогівки ока кролів *in vivo*. Пригнічення утворення

плазміногену ангіостатинами є одним із механізмів їх комплексної антиангіогенної дії. Так, за допомогою фрагмента плазміногену виявлено пригнічення ангіогенезу рогівки. Плазміноген перетворюється активатором плазміногену в плазмін. Таким чином, активатори плазміногену відіграють важливу роль у ангіогенному процесі, особливо деградації базальної мембрани (*Vogten et al., 2003*). Фрагмент плазміногену також може пригнічувати неоваскуляризацію рогівки шляхом зниження ступеня активації активаторів плазміногену, і тому він може бути корисним для лікування ангіогенних розладів рогівки.

Продемонстровано, що AS перманентно утворюються в рогівці цистеїновими протеазами (катепсинами) та є вкрай необхідними для підтримання ангіогенного балансу шляхом протидії надмірній експресії VEGF (*Coppini 2015*). Крім того, біологічна активність AS, ізольованих із пухлинної тканини, була продемонстрована для різних тканин організму, включаючи рогівку (*Ambati et al., 2002*). Вважається, що активне утворення AS за умов травматизації ока може забезпечити адаптаційний механізм, що спрямований на захист передньої камери ока від надмірної неоваскуляризації, яка є наслідком травматичного ушкодження. Існують дані, які вказують на те, що окрім антиангіогенних, AS демонструють потужні протизапальні властивості. Авторами (*Chavakis et al., 2005, Perri et al., 2007*) було показано, що AS K1-3 людини майже повністю блокує міграцію макрофагів за рахунок руйнування актинового цитоскелету, проте не впливаючи на життєздатність макрофагів. За нормальних умов у рогівці відсутні кровоносні і лімфатичні судини, а у різних частинах цієї тканини наявні клітини імунної відповіді у невеликих кількостях. Проте, за пошкодження рогівки спостерігається інфільтрація та накопичення макрофагів, які у цьому випадку відіграють подвійну роль у ранозагоювальному процесі. За хронічного запалення макрофаги продукують велику кількість біологічно активних молекул, таких як фактори росту, цитокіни, MMP, активні форми кисню та ряд ще низку

факторів, які підтримують міграцію клітин, процеси ремоделювання тканин та ангиогенез. Проте за умов надмірної активації макрофагів може спостерігатися погіршення перебігу патологічного процесу.

Наслідком гострого ушкодження рогівки може бути виникнення критичного дисбалансу ангиогенних факторів, що реалізується надлишком проангиогенних, таких як VEGF, внаслідок його активної продукції макрофагами. (*Hadrian et al., 2021*). Раніше повідомлялося (*Di Zazzo et al., 2020*), що VEGF є найбільш значущим проангиогенним фактором у розвитку неоваскулярних патологій рогівки. Було показано, що як гіпоксія, так і модуляція запального процесу призводять до надмірної експресії і стабілізації HIF-1 α , що є основним фактором транскрипції, необхідним для індукції синтезу VEGF (*Ramakrishnan et al., 2014*). У відповідь на гіпоксію експресія VEGF зростає в 30 разів протягом хвилин (*Di Zazzo et al., 2020*). Важливість HIF-1 α в регуляції експресії VEGF у макрофагах вже на ранніх посттравматичних стадіях, а також у набутті запального фенотипу макрофагами рогівки достатньо вивчена (*Droho et al., 2020*). Надмірна експресія HIF-1 α , що розвивається паралельно зі збільшенням рівнів проангиогенних і профіброзних факторів (VEGF і MMP-9 відповідно), підтверджується результатами вестерн-блот аналізу. Це є свідченням розвитку гіпоксичного стану у рогівці за умов травматизації. Оскільки підвищена експресія HIF-1 α і VEGF макрофагами значною мірою сприяє процесу утворення нових судин, які пронизують рогівку, призводячи до подальшої втрати нею фізіологічно необхідної прозорості, цілеспрямована модуляція активності макрофагів може являти собою перспективний підхід до зменшення неоваскуляризації рогівки за умов патології. Існують дані, що вказують на інгібування HIF-1 α за допомогою siRNA для лікування неоваскуляризації рогівки (*Peral et al., 2022*). Крім того, подвійна спрямованість на мішені VEGF і HIF-1 α виявилася ефективною в інгібуванні неоваскуляризації у кролів після опіку рогівки лугом (*Fu et al., 2019*). Можна припустити, що зниження експресії HIF-1 α і VEGF,

паралельно з регресією судин, що спостерігається у тварин з опіком рогівки лугом після місцевого застосування AS, може бути результатом інгібуючої дії досліджуваних протеїнів на активність макрофагів.

Вважається, що рання репаративна фаза (від 8 до 21 дня) супроводжується значними динамічними змінами стосовно запальних процесів, неоваскуляризації, та реепітелізації. Оскільки недостатньо швидка епітелізація та порушення процесів оновлення епітелію призводять до стійких дефектів цієї тканини і перфорації рогівки, а також є одними з найсерйозніших ускладнень хімічного опіку, на цій стадії критичним є лікування дефектів рогівки (*Park et al., 2020*). Протеїн ZO-1 є компонентом епітелійних щільних з'єднань, який експресується в поверхневих і підповерхневих шарах клітин епітелію рогівки і забезпечує її бар'єрну функцію. Раніше було показано, що гіпоксичний стан викликає зміну розподілу ZO-1, що в свою чергу призводить до порушення бар'єрної функції в культивованих епітеліальних клітинах рогівки людини (*Yanai et al., 2009*). На експериментальній моделі лужного опіку рогівки ока шурів нами було показано, що місцеве застосування K1-3 у вигляді 1,0 мкМ розчину відновлює вміст протеїну ZO-1 в ушкодженій рогівці до базального рівня. Ці результати свідчать про те, що AS можуть сприяти утворенню та відновленню щільних контактів, а також відігравати важливу роль у диференціації епітеліальних клітин рогівки за умов пошкодження. На додачу, цитоскелетний протеїн віментин, який міститься у клітинах мезенхімного походження, асоціюється з підвищеною рухливістю клітин і може слугувати маркером EMT під час процесів загоєння ран (*de Castro et al., 2017*). Для епітеліоцитів та кератоцитів неушкодженої рогівки відносно низькі рівні віментину вважаються нормальними, тоді як епітелійні клітини тимчасово експресують віментин під час загоєння рани. Надмірна експресія віментину може сприяти розвитку фіброзу, рубцювання травмованої тканини та помутніння рогівки під час процесів загоєння ран (*Das et al., 2014*). Отримані результати вестерн-блот аналізу вказують на

опосередковану АС активацію ZO-1 разом із тенденцією до зниження рівня маркера ЕМТ і профіброзного фактора віментину. Ці результати можуть свідчити про те, що досліджені АС можуть відновлювати щільні з'єднання та модулювати ЕМТ у рогівці за умов лужного опіку.

Автофагія – це еволюційно консервативний катаболічний процес, спрямований на підтримку виживання клітин шляхом перетравлення внутрішньоклітинних молекул і органел у відповідь на подразнення різної природи. Компоненти автофагічних шляхів конститутивно експресуються на високих рівнях у різних структурах ока, включаючи рогівку, кришталик та сітківку. Автофагія може бути важливим шляхом, що впливає на загоєння рани рогівки в різних умовах та/або стадіях загоєння ран (*Kempuraj et al., 2022*). Порушення регуляції автофагії має місце у патогенезі очних розладів, включаючи і патології рогівки. Наприклад, постійно високий рівень стресу або гостра травма можуть призвести до посилення автофагії. Було продемонстровано (*Frost et al., 2014*), що підвищення рівнів протеїнів, залучених до процесів автофагії, пов'язано з дистрофією ендотелію рогівки. Таким чином, механізм автофагії привертає значну увагу як потенційна терапевтична мішень при корекції захворювань ока. Надмірна автофагія може призвести до загибелі клітини, таким чином, порушення регуляції цього процесу може представляти потенційно перспективні механізми для дослідження патофізіологічних змін у тканині рогівки (*Ayilam et al., 2023*). Beclin-1 є одним із пов'язаних з аутофагією протеїнів, який зазвичай використовується як маркер для моніторингу перебігу процесів автофагії у клітині. Він ініціює та регулює утворення автофагосоми (фагофора) (*Tran et al., 2021*). У проведених дослідженнях було відмічено надмірну експресію beclin-1 в пошкодженій рогівці, що вказує на посилення автофагії внаслідок хімічного опіку. Однак або K1-3, або K5 у концентрації 1 мкМ модулюють поступову автофагію, зменшуючи її ступінь майже до контрольного рівня, але не повністю пригнічуючи цей процес. Це важливе спостереження, оскільки базальний рівень автофагії в пошкодженій тканині є незамінним

для підтримки фізіологічного стану епітелію рогівки шляхом деградації та переробки пошкоджених макромолекул і органел, відновлення нормального ЕСМ після опіку та забезпечення енергетичного постачання та виживання клітин у стані стресу.

Крім того, вестерн-блот аналіз показав, що експресія GRP-78 значно зростає внаслідок лужного опіку рогівки, що є свідченням розвитку ER стресу. Стрес ER – це стан, який розвивається внаслідок значного накопичення неправильно згорнутих протеїнів у ER, і його поява пов'язана з різними фізіологічними станами, включаючи гіпоксичний стрес. Надмірно активований ER-стрес супроводжується мітохондрійною дисфункцією та окисним стресом, що призводить до загибелі клітин (*Chen et al., 2023*). На даний час існує мало інформації стосовно участі ER стресу в патологічних станах ока. Було відмічено, що разом із автофагією, ER-стрес сприяє дегенерації фоторецепторів у культурі клітин сітківки свиней, яка піддається циклічному тьмяному освітленню (*Mohlin et al., 2014*). Інші автори підкреслюють участь ER-стресу в діабетичній ендотелійній дисфункції рогівки (*Chen et al., 2022*), тоді як інгібування ER-стресу виявилось ефективним для підвищення життєздатності епітелійних клітин рогівки людини в умовах гіперосмотичного стану (*Guindolet et al., 2022*). Вважається, що фармакологічне інгібування ER стресу може полегшити індуковані гіперглікемією патологічні зміни в рогівці шляхом покращення мітохондрійної біоенергетики, запобігання втрати ендотелійних клітин і сприяння загоєнню ран епітелію рогівки. Шаперон GRP-78 є основним регулятором так званої розгорнутої відповіді протеїнів, яка лежить в основі ER-стресу (*Liu et al., 2023*). Наші дані вказують на те, що місцеве застосування AS за умов пошкодження рогівки може мати терапевтичний потенціал за рахунок зниження експресії GRP-78, що є ознакою послаблення стресу ER. Оскільки автофагія та ER-стрес пов'язані між собою (*Chipurupalli et al., 2021*), пригнічення ER-стресу може знижувати надмірно

активовану автофагію та покращувати процеси загоєння пошкодженої рогівки.

Результати проведених досліджень розширюють розуміння функціонального значення AS у пошкодженій тканині рогівки, яке виходить далеко за межі їх загальноновизнаної функції пригнічення ангиогенезу. Отримані результати мають практичне значення, а застосування AS в офтальмологічній практиці може бути перспективним і ефективним способом для корекції захворювань передньої камери ока. Було задокументовано, що 20% зразків тканин, отриманих після трансплантації рогівки, мали гістологічні ознаки неоваскуляризації (*Peral et al., 2022*). Оскільки надмірна протеолітична активність MMP і лізосомальних ензимів, а також і неоваскуляризація є основними факторами, що перешкоджають трансплантації рогівки (*Di Zazzo et al., 2020*), AS місцевого застосування можуть пропонуватися як модулятори багатофункціональної дії, окремо або в синергії з іншими препаратами або ж агентами для зменшення ризиків відторгнення трансплантата шляхом інгібування протеолітичних шляхів. AS можна застосовувати як терапевтичний засіб у складі бандажних контактних лінз, які використовують як лікувальну пов'язку для очей, що створює захисну стабілізуючу оболонку навколо рогівки. Така пов'язка може бути корисною для контролю неоваскуляризації та ступеня запалення, а також сприяти повторній епітелізації тканини рогівки після лазерної корекції зору, хірургічних втручань або інших пошкоджень.

У доповнення до досліджених раніше ланок патологічного процесу також було вивчено ефекти AS стосовно їх захисного та нейропротекторного потенціалів. Блотограми ACE2 і GFAP у лізатах тканини рогівки щурів на 14-й посттравматичний день представлені на рис. 3.10 (А). Результати денситометричного аналізу відповідних блотограм інтенсивності імунозабарвлення представлено на рис. 3.10 (В). Вестерн-блот аналіз показав, що імунореактивність ACE2 проявлялася у вигляді однієї поліпептидної смуги 110 кДа. У контрольних групах експресія ACE2

відмічається на незначному базальному рівні, як і очікувалося. Денситометричний аналіз показав, що рівень ACE2 зростає у травмованій рогівці (у 7,7 порівняно з контролем, $P < 0,01$), таким чином вказуючи на надмірну експресію ACE2 в рогівці внаслідок лужного опіку. Лікування або K5, або K1-3 (1,0 мкМ) викликало зниження рівня ACE2 (вдвічі порівняно з опіковою групою, $P < 0,05$). Серед усіх протестованих варіантів AS K1-3 (0,1 мкМ) сприяв найбільш помітному впливу на експресію ACE2, зменшуючи його експресію в 3,4 рази порівняно з групою Burn ($P < 0,01$).

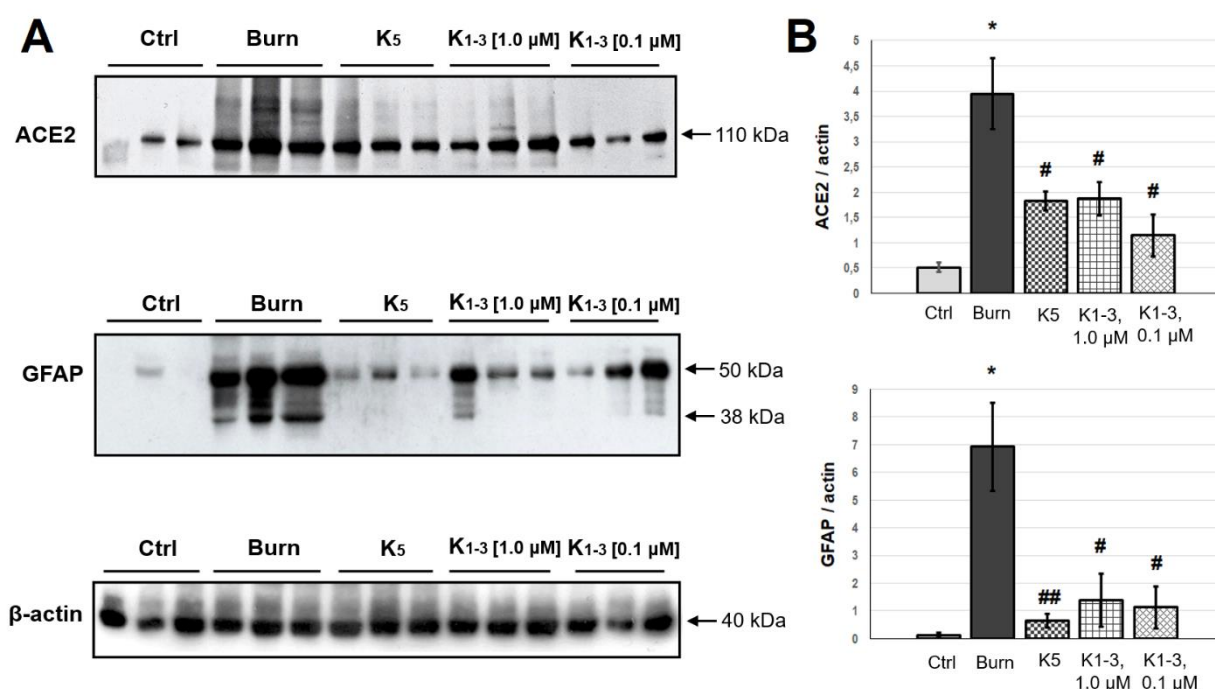


Рис. 3.10. Блотограми ангіотензин-перетворювального протеїну (ACE2) та гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP) у рогівці щурів: 1 – інтактний контроль 2 – лужний опік; 3 – лужний опік + K5 (1.0 μM); 4 – лужний опік + K1-3 (1.0 μM); 5 – 3 – лужний опік + K1-3 (0.1 μM). Результати вестерн-блотингу було проаналізовано денситометрично. * - $P < 0.001$ vs. Control, # - $P < 0.05$ vs. Burn, ## - $P < 0.01$ vs. Burn.

Вестерн-блот аналіз GFAP виявив гетерогенність імунореактивних смуг маркеру сателітної гліальної відповіді. У контролі виявлено нативний поліпептид молекулярною масою 49 кДа у незначних кількостях, що свідчить про неактивований стан сателітних гліальних клітин у здоровій

рогівці. Проте травма спричинила різке збільшення експресії GFAP у тканині рогівки (у 62 рази порівняно з контролем, $P < 0,001$). Крім того, внаслідок лужного опіку тканини рогівки, окрім основної смуги GFAP (49 кДа), спостерігалось кілька менших за молекулярною масою поліпептидів, включаючи найбільш інтенсивну смугу з M_m 38 кДа. Надмірна експресія GFAP разом із підвищеним вмістом продуктів його протеолітичного розщеплення у пошкодженій тканині є ознаками реактивного гліозу. Серед усіх протестованих AS K5 мав найбільш виражений нейропротекторний ефект по відношенню до гліальної реактивності через зниження рівня GFAP (у 10,9 разів порівняно з групою Burn, $P < 0,01$). K1-3 в обох концентраціях виявився вдвічі менш ефективним з точки зору пригнічення гліальної реактивності в травмованій рогівці, ніж K5.

Одним із найбільш цікавих спостережень, зроблених у ході виконання цього дослідження, виявилось опосередковане AS зниження експресії ACE2 у рогівці щурів за умов лужного опіку. Оскільки ACE2 відомий як рецептор, що забезпечує вірусну інфазію та інфікування організму людини вірусом SARS-CoV-2, посилення експресії ACE2 у рогівці за розвитку запального процесу збільшує тропність тканин до даного патогену та підвищує ризик його можливої передачі через поверхню ока (*Jiang 2021*).

Існуюча наукова література описує високу частоту очних проявів у пацієнтів з COVID-19 (*Karakus et al., 2022*). Хоча механізм, за допомогою якого AS можуть зменшити рівень ACE2, що експресується в клітинах рогівки після пошкодження, все ще невідомий. Проте ефекти AS на перебіг процесу запалення можуть бути потенційною відповіддю на це запитання. Можна зробити висновок, що фрагменти плазміногену можна використовувати як потенційні ліки для зниження рівня інфікування SARS-CoV-2.

Сателітні гліальні клітини, які представляють основну популяцію гліальних клітин рогівки, відіграють важливу роль у регуляції активності сенсорних нервів і мають критичне значення для забезпечення

нейропротекції. Інтенсивність гліальної активації корелює зі ступенем шкідливого впливу, тоді як перевищення гліальної реактивності може мати негативні шкідливі наслідки для регенеративних процесів нервових закінчень через надмірне вивільнення прозапальних цитокінів і АФК реактивними гліоцитами (*Stephenson et al., 1995*). Відомо, що GFAP, специфічний гліальний проміжний філаментний білок, виявляється в сателітній глії в стані спокою та за нормальних фізіологічних умов у залишкових кількостях, що було підтверджено і даними дослідженнями за допомогою вестерн-блот аналізу. Внаслідок пошкодження нерва навколо пошкоджених нейронів відбувається активація GFAP-позитивних сателітних гліальних клітин. Таким чином, регуляція GFAP зазвичай використовується як маркер активації сателітних гліальних клітин у периферійній нервовій системі (*del Amo, 2022*). Оскільки активація сателітних гліальних клітин і розвиток запального процесу у пошкодженій рогівці взаємопов'язані, було перевірено гіпотезу про те, що модуляція запальної відповіді у травмованій рогівці за допомогою AS може пом'якшити надмірну реакцію глії. У цьому дослідженні вперше показано, що AS знижують рівень експресії GFAP у пошкодженій рогівці шурів. Було продемонстровано, що K5 є більш ефективним супресором гліальної реактивності рогівки, ніж K1-3. Враховуючи поверхневе розташування сателітних гліальних клітин в оці, K5 здатний легше вражати ці клітини порівняно з K1-3 через відносно малий розмір молекули.

Висновки до підрозділу 3.2.

1. Доведено, що ангіостатин K1-3 володіє антиангіогенними властивостями та інгібує автофагію в тканині рогівки кролів, пошкодженої лужним опіком.

2. Ангіостатин K1-3 пригнічує метаболічну активність макрофагів, що корелює зі зменшенням ступеня інфільтрації до пошкодженої тканини

рогівки, пригніченням надмірної неоваскуляризації, асоційованою з гіпоксією, та підсиленням регенерації епітелійного шару (реепітелізації) рогівки.

3. Встановлено, що ангіостатини значною мірою нормалізують рівень протеїнів-маркерів основних патофізіологічних ланок в ушкодженій рогівці, а саме: гіпоксії, неоваскуляризації, реепітелізації, ремоделювання тканин, автофагії та стресу ендоплазматичного ретикулуму, що свідчить про коригувальні властивості протеолітичних фрагментів плазміногену в рогівці за умов лужного опіку.

4. Показано, що ангіостатини K1-3 та K5 сприяють зниженню рівня маркера активованих клітин сателітної глії GFAP у пошкодженій рогівці, що є ознакою реалізації нейропротекторних властивостей.

5. Встановлено, що застосування ангіостатинів чинить інгібувальну дію на експресію ACE2, відомого як рецептор вірусу SARS-CoV-2, за опікового ушкодження рогівки.

3.3. Коригувальна дія вітаміну B₁ у тканині рогівки щурів у моделі хронічного споживання етанолу

Незважаючи на поширене використання етанолу і його широке вживання, його токсична дія на рогівку ока досліджена недостатньо. Тому одним із завдань роботи було дослідження впливу етанолу та ефекти тіаміну на тканину рогівки за такими патофізіологічними аспектами як апоптоз, ангіогенез, гіпоксія, ремоделювання екстрацелюлярного матриксу, міжклітинні контакти.

Результати вестерн-блот аналізу кількісного визначення маркерів патологічного стану за розвитку метаболічної дисфункції зображені на рис. 3.11.

Розвиток гіпоксичного стану тісно пов'язаний із хронічним споживанням етанолу. HIF-1 α , який утворюється у клітинах за дефіциту кисню, зростає (у 3,24 рази порівняно з контролем, $P < 0,05$) у щурів із

хронічним вживанням етилового спирту, що свідчить про розвиток гіпоксії при інтоксикації. При використанні тіаміну його рівень значно знижується (у 2,6 разів порівняно з EtOH-групою, $P < 0,05$). Дефіцит кисню сприяє підвищенню рівня VEGF (у 5,7 разів порівняно з контролем, $P < 0,05$), оскільки фактор росту ендотелію судин є однією з мішеней HIF-1 α , рівень якого зростає за умов інтоксикації. VEGF є проангіогенним фактором, який в свою чергу експресується у відповідь на гіпоксію як компенсаторний механізм за умов недостатності кисню у тканинах.

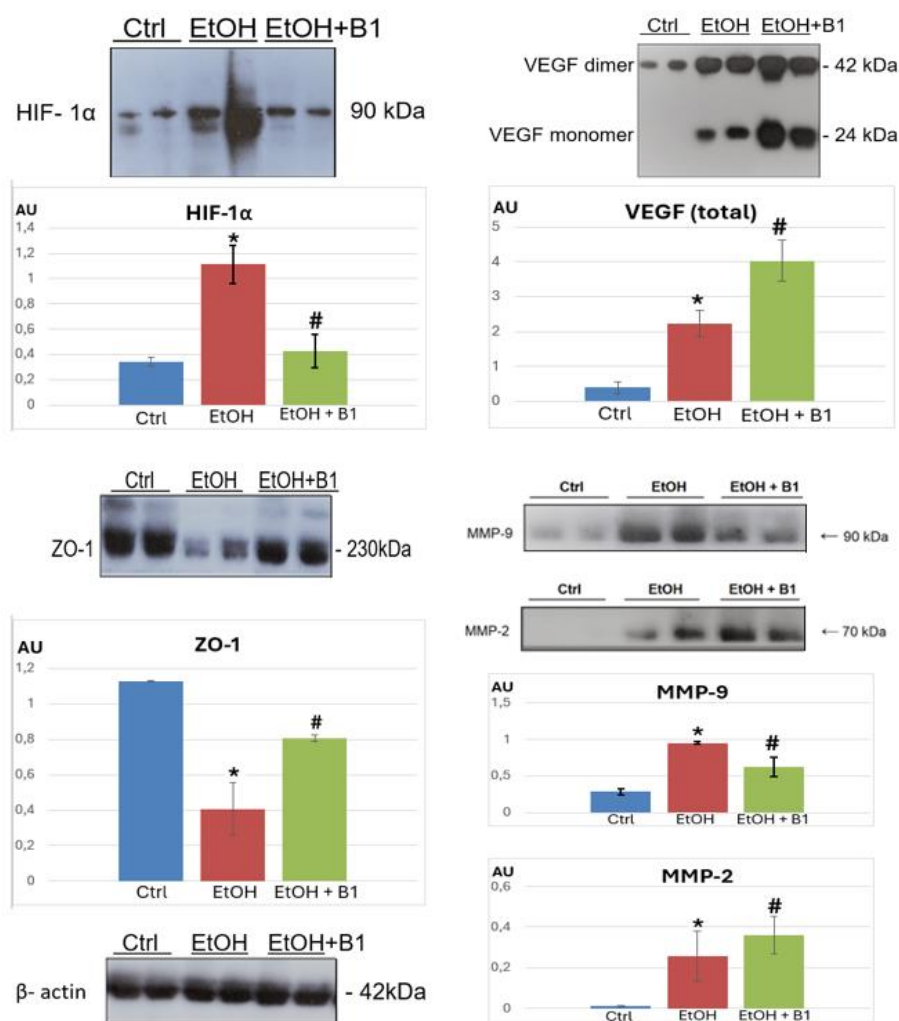


Рис 3.11. Вестерн-блот аналіз ефектів тіаміну на модулювання рівнів регуляторних протеїнів рогівки щурів за умов хронічного споживання етанолу: Результати вестерн-блотингу було проаналізовано денситометрично. * - $P < 0.05$ порівняно з контролем; # - $P < 0.05$ порівняно з хронічним споживанням етанолу.

Основною функцією ендотеліального фактору росту судин є утворення і ріст нових судин, що можна вважати початком активації патологічного ангиогенезу.

При хронічному споживанні етанолу у клітинах підвищується рівень матриксних металопротеїназ, які є маркерами ремоделювання тканин. Запальний процес та гіпоксія викликають перебудови екстрацелюлярного матриксу, що пов'язані з активним розвитком ангиогенезу. Але крім того, MMP залучені до протеолітичного розщеплення плазміногену і подальшого утворення ангиостатинів, рівень яких залишається високим навіть за терапевтичного впливу тіаміну за умов хронічного вживання етанолу. Тіамін сприяє зниженню рівня MMP-9 (у 1,5 рази порівняно з EtOH-групою, $P < 0,05$) в свою чергу підсилюючи синтез MMP-2 (у 1,4 рази порівняно з EtOH-групою, $P < 0,05$), що забезпечує сталий рівень ангиостатину у тканині. Це корелює із даними, отриманими для маркера ангиогенезу – VEGF. Такі зміни рівнів маркерів пояснюють той факт, що тіамін виявляє проангіогенні властивості, що ілюструє зростання VEGF при незмінному вмісті ангиостатинів за хронічного споживання етанолу.

При хронічному вживанні етанолу спостерігається різке зменшення (у 2,78 рази порівняно з контролем, $P < 0,05$) рівня протеїну щільних контактів, що вказує на порушення міжклітинних взаємодій. В роботі було продемонстровано, що тіамін позитивно впливає на функціональні властивості ендотеліальних клітин шляхом відновлення рівня протеїну міжклітинних контактів ZO-1 (у 2 рази порівняно з EtOH-групою, $P < 0,05$).

Хронічне вживання алкоголю призводить до збільшення потреб у кисні різними тканинами та провокує розвиток гіпоксичного стану. HIF-1 є гетеродимерним транскрипційним фактором, що складається з субодиниць HIF-1 α і HIF-1 β . Основною функцією цього комплексу є забезпечення клітинної адаптації за умов дефіциту кисню. Субодиниця HIF-1 α експресується конститутивно. Однак за умов нормоксії HIF-1 α посттрансляційно модифікується на кисневозалежному домені деградації

шляхом гідроксилювання та ацетилювання пролілгідроксилазами (PHDs). PHDs використовують як субстрат кисень і залізо як кофактор, що сприяє гідроксилюванню пролінів на субодиниці HIF-1 α , внаслідок чого стає можливим убіквітування HIF-1 α убіквітин-лігазою фон Гіппеля Ліндау E3 (VHL) з його подальшою деградацією. В умовах гіпоксії субодиниця HIF-1 α не зазнає посттрансляційних модифікацій пролілгідроксилазами, що дозволяє HIF-1 α транслокуватися до ядра та зв'язуватися з HIF-1 β , утворюючи гетеродимер HIF-1 (Ke et al., 2006). Фактори, які залучені до модуляції запального процесу (такі як NF- κ B, фактор некрозу пухлини (TNF)- α , трансформуючий фактор росту (TGF)- β 1 та інтерлейкін (IL)-1 β), регулюють транскрипцію та стабілізацію HIF-1 α шляхом зниження експресії PHD у ссавців (van Uden et al., 2008).

Численні дослідження показують прямий зв'язок між рівнем HIF-1 α та розвитком патологічних станів, пов'язаних із алкогольною інтоксикацією. Розуміння механізмів, за допомогою яких вплив алкоголю призводить до пошкодження органів (серед яких і експресія HIF-1 α), може допомогти у розробці потенційних терапевтичних стратегій для зниження наслідків несприятливих ефектів етанолу. Варіанти терапії, направленої на пом'якшення ефектів HIF-1 α , зосереджені на використанні антиоксидантів, мікроРНК та пробіотиків. Сучасні джерела літератури вказують на участь HIF-1 α у опосередкованому алкоголем поліорганному ураженні, включаючи і наслідки для рогівки (Morris et al., 2018). Отримані в ході роботи результати корелюють із існуючими даними і підтверджують зростання рівня HIF-1 α за умов хронічного споживання етанолу, що є свідченням розвитку метаболічних порушень, а також розвитку запального процесу у тканинах рогівки. Тіамін, знижуючи рівень HIF-1 α , сприяє покращенню функціонування передньої камери ока, впливаючи на низку ланок патофізіологічного процесу. На сьогоднішній день ідентифіковано понад сто генів-мішеней HIF-1, які відіграють ключову роль у регуляції ангіогенезу, виживання та проліферації клітин, стійкості до хіміотерапії та

радіації, інвазії та метастазування, іморталізації, послаблення імунної відповіді, підтримки метаболізму та функціонування стовбурових клітин (*Vadlapatla et al., 2013*).

Крім того, було показано, що HIF1 α є основним регулятором індукованої дефіцитом тіаміну нейротоксичності *in vitro* та *in vivo*. Дефіцит тіаміну підвищує рівень експресії регульованого HIF1 α проапоптозного протеїна BNIP3. Активація BNIP3 призводить до опосередкованої цим дефіцитом токсичності шляхом зниження потенціалу мітохондрійної мембрани та посилення фрагментації хроматину. Окислювальний стрес необхідний для ініціювання опосередкованої BNIP3 загибелі клітин, індукованої HIF1 α , за умов дефіциту тіаміну. Ці дані свідчать про те, що індукований таким дефіцитом тіаміну HIF1 α може відігравати роль вирішального ініціатора транскрипції, який безпосередньо регулює нейротоксичність і розвиток патологічних змін (*Valle et al., 2022*).

Цілком очікуваним виявився і результат дослідження рівнів VEGF, який демонструє значне підвищення рівня маркера ангіогенезу у тканинах рогівки за умов хронічного споживання етанолу. Причинами такого різкого підвищення може слугувати тривала гіпоксія, що розвивається під впливом етанолу на організм та виникненням метаболічних розладів (*Ang et al., 2019*). Існують дослідження на тваринних моделях, які продемонстрували, що алкоголь впливає на розвиток неоваскуляризації передньої камери ока за умов вікової макулярної дегенерації, що реалізується за рахунок посилення процесів ангіогенезу (*Wilkerson et al., 2023*). Проте, відкритим залишається питання стосовно механізмів впливу етанолу на розростання судин у рогівці. Було з'ясовано, що етанол не індукував експресію VEGF у RPE, проте значно посилював ангіогенез *in vitro*, що реалізовувалося через розвиток гіпоксичного стану (*Jung et al., 2022*). Різноманітні дослідження підтвердили, що схильність до гіпоксичних станів, внаслідок астми, гіпертонії, серцевої недостатності, атеросклерозу, ниркової недостатності та інсульту, а також куріння та вживання алкоголю, можуть призвести до

підвищення рівня VEGF у сироватці крові (*Gomulka et al., 2019, Tual-Chalot et al., 2020*). Крім того, показано, що зловживання алкоголем пов'язане зі значними змінами щільності та морфології ендотелію рогівки. Ці зміни є свідченням перебудови тканин внаслідок активізації процесів ангиогенезу (*Karmakar et al., 2023*).

Ще одним свідченням перебудови позаклітинного матриксу є отримані дані стосовно рівнів матриксних металопротеїназ. На сьогоднішній день MMPs, зокрема MMP-9 та MMP-2, становлять значний інтерес як нова мішень для з'ясування молекулярних механізмів впливу споживання етанолу на організм. Існують дані стосовно гіперекспресії MMP-9 у нейронах гіпокампу мишей, що призводить до зниження щільності дендритних шипів і співвідношення F-актину/G-актину. Ці перебудови можуть бути пояснені надмірним споживанням етанолу (*Yin et al., 2020*). Проте стосовно механізмів, які реалізуються у тканинах рогівки за умов хронічного споживання етанолу, інформації недостатньо. Проте, відомо, що неконтрольоване підвищення рівня та активності матриксної металопротеїнази-9 (MMP-9) було виявлено в сльозах і поверхні ока у пацієнтів із синдромом сухого ока, що, як було доведено, пов'язане з порушенням щільних з'єднань у апікальному епітелії рогівки. Ці неконтрольовані зміни MMP-9 призводять до десквамації поверхневого епітелію ока. Отримані в роботі результати можуть свідчити про терапевтичний ефект тіаміну на стан перебудови позаклітинного матриксу. MMP-2 і MMP-9 здатні генерувати матрикіни під час деградації протеїнів позаклітинного матриксу, а матрикіни, в свою чергу, беруть участь у процесі ангиогенезу, виконуючи роль супресорів неконтрольованого судинного росту. (*Wells et al., 2015*). Методом вестерн-блот аналізу при виконанні роботи було виявлено, що експресія MMP-2 та MMP-9 були на низькому рівні в епітелії рогівки контрольної групи; однак збільшення рівня за умов хронічного споживання етанолу та за використання тіаміну вказує на те, що матриксні металопротеїнази беруть активну участь у процесі

розвитку і контролю неоваскуляризації та запального процесу передньої камери ока (*Zhang et al., 2018*).

Зниження рівня ZO-1 відмічається у рогівці за різних порушень. Окрім травматизації, таке зниження може спостерігатися за тривалої гіперглікемії та метаболічних розладах. Порушення міжклітинних контактів та пригнічення експресії ZO-1 призводить до зменшення бар'єрної функції та посилення міграції клітин. Отримані в роботі дані корелюють із існуючими дослідженнями, які вказують на те, що відновлення рівня ZO-1 є показником стабілізації міжклітинних контактів за умов відновлення тканини. Головною причиною зниження рівня ZO-1 може бути гіпоксичний стан та утворення АФК у тканині за умов порушення її функціонування. Зважаючи на це, тіамін може бути позитивним терапевтичним агентом для стабілізації і відновлення міжклітинних взаємодій, які порушуються внаслідок активізації MMPs та процесів ангіогенезу. (*Jiang et al., 2019*)

Оскільки етиловий спирт прямо чи опосередковано шляхом впливу на організм через свої метаболіти може викликати апоптоз кількох типів клітин рогівки (епітеліоцитів, стромальних кератоцитів, фібробластів та ін.) (*Liu et al., 2022*), було визначено рівні регуляторів апоптозу в тканині рогівки з метою з'ясування чи може тіамін відігравати роль антиапоптичного агента для захисту рогівки від загибелі клітин, спричиненої етанолом. У багатьох роботах припускається, що співвідношення експресії Bcl-xL/Bax (або навпаки) можна використовувати як чутливий показник моніторингу життєздатності клітин, так що зменшення співвідношення Bcl-xL/Bax спричиняє втрату життєздатності клітин і посилює апоптоз (*Lee et al., 2008*). Було досліджено три різні параметри: рівні експресії Bax і Bcl-xL і співвідношення між цими про- і антиапоптичними протеїнами. Вестерн-блот аналіз виявив різке підвищення рівня Bax, проапоптичного регулятора, і зниження вмісту Bcl-xL, антиапоптичного протеїну, у тканині рогівки щурів, що хронічно споживали етанолом. Розрахунок співвідношення між вмістом Bcl-xL і загальним рівнем Bax дав 20-кратне зниження цього

показника у рогівці щурів, які зазнали дії етанолу ($P < 0,01$ порівняно з контролем). Таким чином, результати досліджень, наведені на рисунку 3.12. підтверджують, що хронічне споживання етанолу індукує мітохондріально-залежний апоптоз шляхом зниження регуляції Bcl-xL і підвищення регуляції Bax, тоді як зниження співвідношення Bcl-xL/Bax означає втрату життєздатності клітин і посилення апоптичних процесів.

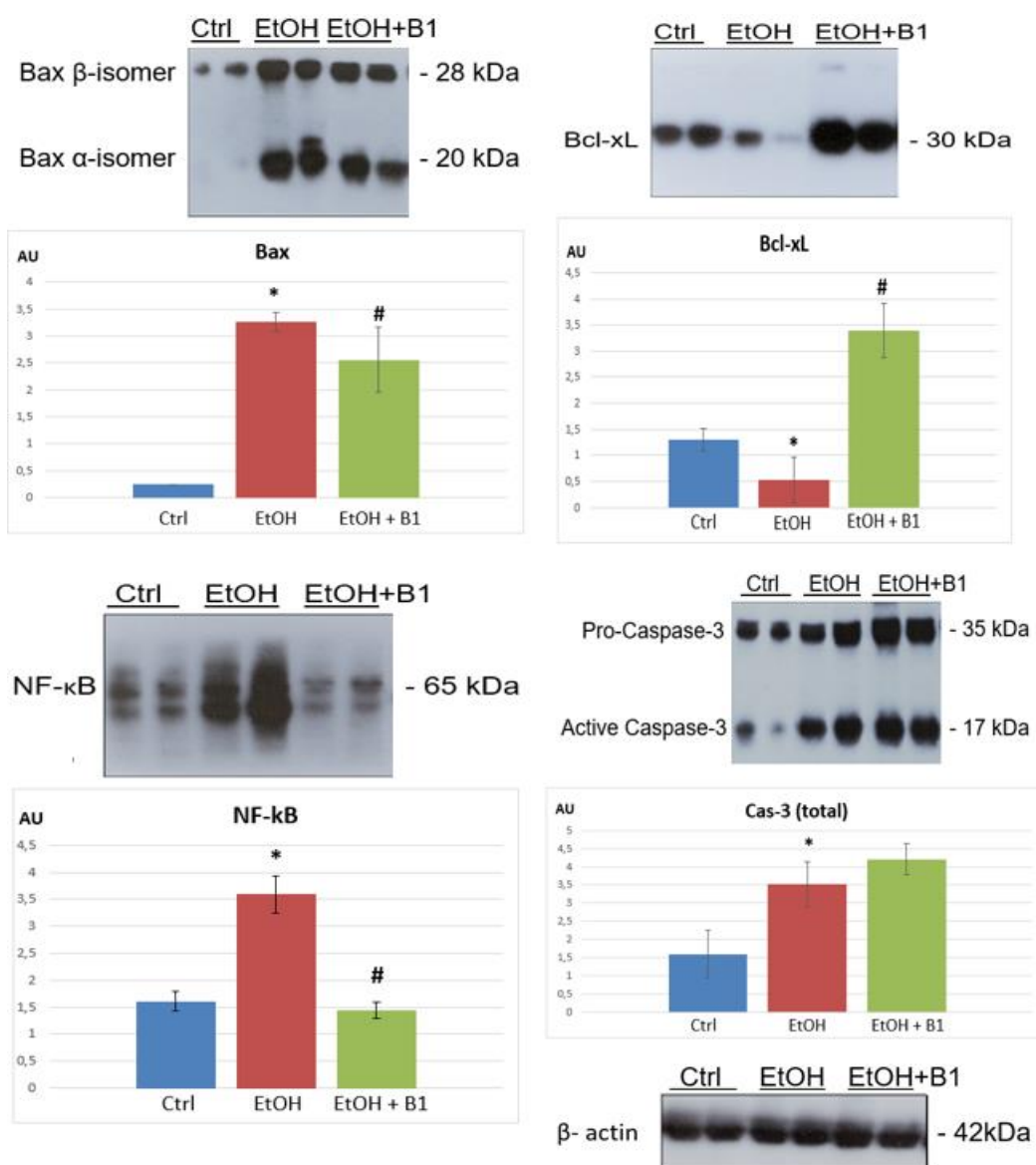


Рис 3.12. Вестерн-блот аналіз ефектів тіаміну на модулювання рівнів регуляторів апоптозу у рогівці щурів за умов хронічного споживання етанолу: Результати вестерн-блотингу було проаналізовано денситометрично. * - $P < 0.05$ порівняно з контролем; # - $P < 0.05$ порівняно з хронічним споживанням етанолу.

Введення тіаміну частково відновлювало високе значення співвідношення Bcl-xL/Bax у рогівці щурів, які споживали етанол (у 6,5 разів порівняно з EtOH-групою, $P < 0,05$). Показано, що вітамін B1 може пригнічувати апоптотичну реакцію в рогівці щурів, які хронічно споживають етиловий спирт, шляхом зниження рівня мономеру Bax і одночасного підвищення вмісту Bcl-xL.

Bax – проапоптотичний протеїн, що синтезується у мономерній формі. Він утворює олігомери при стимуляції, що викликає апоптоз. Олігомеризація Bax сприяє його транслокації з цитозолу на мембрани мітохондрій. Через взаємодію з білками пор на мембранах, олігомери Bax збільшують проникність зовнішньої мембрани мітохондрій з подальшим вивільненням цитохрому C і активацією каспази-9. Такі події активують шлях апоптотичної загибелі клітини (*Pawlowski et al., 2000*). За нормальних умов у клітинах антиапоптотичний білок Bcl-xL зв'язується з доменами BH3 проапоптотичних регуляторів (включаючи Bax), таким чином, пригнічуючи їх здатність сприяти загибелі клітин (*Cheng et al., 2001*).

Доказом антиапоптотичних властивостей тіаміну можуть слугувати і дані, отримані для NF- κ B. Цей протеїн виконує функції як антиапоптотичного так і проапоптотичного фактору. Його активність корелює із даними, отриманими для маркеру гіпоксії, при якій утворюється АФК, в свою чергу активуючи NF- κ B. Значне зменшення його рівня після введення тіаміну (у 2,5 рази порівняно з групою хронічного споживання етанолу) також відповідає даним, отриманим стосовно гіпоксії. Каспаза-3, один із ключових ензимів апоптозу, також активується внаслідок дії етанолу. Для обґрунтування результатів важливим був рівень активної каспази, для якої спостерігається підвищення рівня при алкоголізмі (у 2,2 рази порівняно з контролем) і незмінний рівень за використання тіаміну (порівняно з споживанням етанолу). Ці дані відповідають інформації стосовно впливу каспази-3 на рівень NF- κ B і корелюють між собою, вказуючи на розвиток апоптотичних процесів під час хронічного алкоголізму і помірного

покращенню картини за використання тіаміну. Багато зовнішніх чинників, що мають безпосередній вплив на рогівку можуть бути потенційними активаторами NF-κB, який є ключовим елементом у розвитку запальної реакції, проліферації та процесів виживання клітин (*Eluard et al., 2020*). Існують дані про активацію NF-κB в епітелійних клітинах рогівки, макрофагах і кератоцитах, наслідком чого є утворення цитокінів, які запускають запальний процес, але з іншого боку, відповідають і за розвиток регенеративних процесів у рогівці (*Jhou et al., 2021*). Одним із пояснень таких ефектів є те, що активація NF-κB сприяє посиленню ранозагоювальних ефектів шляхом посилення експресії CCCTC-зв'язувальних факторів в епітелійних клітинах. Вважається, що опосередковане каспазою-3 розщеплення p65 пригнічує опосередковану NF-κB антиапоптотичну трансактивацію в клітинах, що є стимулом до апоптозу (*Wier et al., 2015*). Тому зниження рівня NF-κB може мати декілька наслідків, серед яких пригнічення запального процесу, але з іншого боку – пригнічення антиапоптичного сигналювання

Основний висновок проведених досліджень полягає в тому, що дисбаланс між рівнями Вах і Bcl-xL, спричинений хронічною інтоксикацією етанолом свідчить про наявність метаболічних порушень і розвиток проапоптичних станів у рогівці алкоголізованих щурів. Ці наслідки хронічного споживання етанолу можна частково компенсувати застосуванням тіаміну.

Висновки до підрозділу 3.3.

1. Встановлено, що хронічна інтоксикація етиловим спиртом спричиняє патологічні зміни у рогівці щурів, на що вказує зростання вмісту маркерів гіпоксії та апоптозу, порушення балансу регуляторів ангіогенезу, зменшення рівня протеїну міжклітинних контактів ZO-1.

2. Доведено, що тіамін (вітамін B₁) виявляє антиапоптичні властивості, сприяючи зростанню рівня антиапоптичного регулятора Bcl-xL

та зменшенню вмісту проапоптотичного фактора Вах у рогівці щурів за хронічного споживання етилового спирту.

3. Показано, що тіамін проявляє коригувальні ефекти у рогівці щурів з алкогольною інтоксикацією, нормалізуючи рівень маркерів ангиогенезу, реепітелізації та ремоделювання тканин за хронічного споживання етанолу.

3.4. Нейропротекторні ефекти вітаміну В₁ у рогівці щурів за умов хронічної алкоголізації

Відомо, що хронічне вживання етанолу викликає активацію запальних і дегенеративних процесів, пов'язаних з дисфункцією мітохондрій. Етанол метаболізується до ацетальдегіду ензимом алкогольдегідрогеназою та цитохромом P450 2E1. Ацетальдегід є надзвичайно токсичним для нервових клітин, оскільки він сприяє утворенню активних форм кисню, розвитку окисного стресу та індукції апоптозу (*Song et al., 2014*). Одним із відомих механізмів шкідливого впливу етанолу на нейрони є також зниження доступності тіаміну та розвиток його дефіциту (*Chatterton et al., 2020*). Окрім вирішальної ролі у вуглеводному та енергетичному метаболізмі, тіамін та ензими, що використовують тіамін як коензим, регулюють збудливість і синтез нейромедіаторів, нуклеїнових кислот, жирних кислот і стероїдів у нейронах. Хронічне вживання алкоголю часто асоціюється з розвитком синдрому Верніке-Корсакова, який може супроводжуватися порушеннями окорухових здібностей та офтальмопарезом. Таким чином, пошкодження нейронів, викликане дефіцитом тіаміну, і нейротоксичність, спричинена етанолом, мають спільні механізми. Наприклад, обидва порушення спричиняють дисфункцію мітохондрій, окислювальний стрес і стрес ендоплазматичного ретикулуму (*Liu et al., 2017*). Тіамін є незамінною біологічно активною сполукою, оскільки він не може бути синтезований в організмі. Цей вітамін бере участь в обміні глюкози, амінокислот і ліпідів у фізіологічних умовах. Було виявлено, що додавання або превентивне лікування тіаміном може бути корисним при його дефіциті та при розладах

нервової системи. Завдяки своїм корисним ефектам тіамін використовується як терапевтичний засіб для лікування різних захворювань, у тому числі неврологічних (*Ergul et al., 2021*).

Дослідження нейропротекторних ефектів тіаміну на тканини рогівки ока щурів в експериментальній моделі хронічного споживання етанолу раніше не були детально описані. Більшість робіт зосереджено на дослідженні сітківки ока, яка є чутливою до етанолу (*Han et al., 2017*), тоді як спричинені етанолом нейродегенеративні зміни в рогівці залишаються недослідженими повною мірою. Травматизація нервових закінчень рогівки або їх хронічна дисфункція можуть ініціювати розвиток нейрозапалення і в підсумку призвести до помутніння рогівки та погіршення зору (*Lasagni Vitar et al., 2022*). Дефіцит тіаміну часто розвивається як наслідок станів, що спричиняють тривалі порушення метаболізму, таких як хронічний алкоголізм (*Gratton et al., 2014*), і виникає майже під час усіх відомих нейродегенеративних захворювань (*Parkhomenko et al., 2016*).

Результати вестерн-блот аналізу, наведені на рисунку 3.13 вказують на те, що за умов хронічного вживання етанолу, спостерігається значне зниження рівня NeuN, специфічного ядерного маркера виживання нейронів (у 2,63 раза порівняно з контролем, $P < 0,05$). Введення тіаміну майже повністю відновлює рівень NeuN, що доводить захисні ефекти вітаміну B₁, як протектора відносно процесів дегенерації нейронів, спричиненої етанолом.

Оскільки нейродегенеративні процеси зазвичай пов'язані з гліальною активацією, було проаналізовано зміни астрогліальних та мікрогліальних маркерів, GFAP та Iba-1 відповідно, у рогівці за умов інтоксикації організму етиловим спиртом. Показано, що хронічне вживання алкоголю сприяє значному зростанню рівня макрогліального маркера GFAP (у 4,24 раза порівняно з контролем, $P < 0,01$), що вказує на розвиток астрогліальної активації. З іншого боку, тіамін значно знижує рівень цього протеїну у тканинах рогівки (у 2,32 раза порівняно з групою EtOH, $P < 0,05$),

полегшуючи гліоз та компенсуючи порушення функціонування астроцитів, спричинених етанолом. На відміну від астрогліального маркера, тривале вживання алкоголю не впливало на рівень специфічного мікрогліального/макрофагального протеїну Iba-1. Однак варто зазначити, що вживання вітаміну B₁ сприяло значному підвищенню рівня Iba-1 у рогівці щурів порівняно з контрольною групою та групою EtOH (у 1,8 та 2,97 раза відповідно, $P < 0,05$). Ці результати вказують на здатність тіаміну активувати функцію макрофагів у рогівці, що необхідно для підтримання відновлення та регенерації пошкоджень тканин, викликаних етанолом.

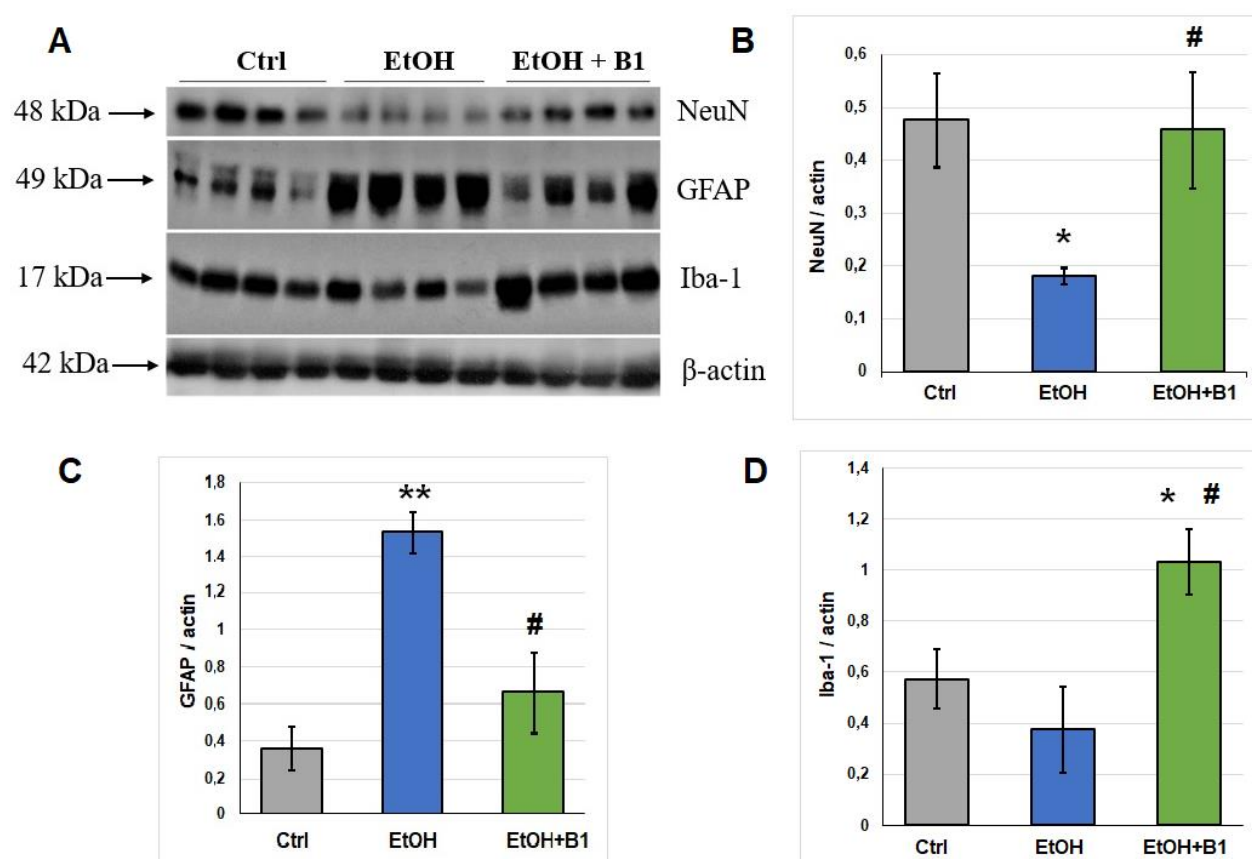


Рис. 3.13. Вестерн-блот аналіз нейроспецифічних протеїнів рогівки щурів: репрезентативні блотограми (A), результати денситометричного аналізу NeuN (B), GFAP (C), та Iba-1 (D). * - $P < 0,05$ порівняно з контролем; ** - $P < 0,01$ порівняно з контролем; # - $P < 0,05$ порівняно з EtOH-групою.

Подальші дослідження нейропротекторних ефектів тіаміну були зосереджені на впливі хронічного споживання етанолу на специфічні

цитоскелетні протеїни, що також може додатково вказувати на порушення функціонування нейронів. Тривале вживання етилового спирту викликало порушення регуляції експресії двох нейрональних цитоскелетних протеїнів. У рогівці тварин було виявлено десятикратне зниження важкої субодиниці нейрофіламенту (NF-H) порівняно з контролем ($P < 0,01$). Введення тіаміну частково відновлювало рівень NF-H (у 3,36 раза порівняно з групою EtOH, $P < 0,05$), що свідчить про позитивний вплив вітаміну B_1 на метаболізм протеїнів цитоскелета.

Крім того, було відмічено, що етанол впливає на рівень іншого елемента цитоскелета нейронів – тау-протеїна. Тау-протеїн у здоровій рогівці міститься в низькій кількості, переважно у вигляді гіперфосфорильованої форми з молекулярною масою понад 100 кДа, тоді як за умов хронічного споживання етанолу рівень фосфорильованого тау був різко підвищений (у 7,14 раза порівняно з контролем, $P < 0,05$). Крім високомолекулярної форми тау, поліпептиди приблизно 60 кДа і нижчі були ідентифіковані в рогівці групи EtOH і групи лікування B_1 , які відповідають інтактній субодиниці тау та продуктам її протеолітичного розщеплення. Було показано, що тіамін суттєво знижував гіперфосфорильовану форму тау в рогівці тварин з алкоголізмом (у 3 рази порівняно з контролем, $P < 0,05$), одночасно збільшуючи рівні інтактного протеїну тау та його продуктів деградації. Результати досліджень наведено на рисунку 3.14.

Результати проведених досліджень повністю узгоджуються з даними, які вказують на зниження рівня NeuN, що розвивається під впливом етанолу. NeuN є зручним маркером постмітотичних нейронів, оскільки раніше було встановлено, що антитіла проти NeuN можуть ідентифікувати більшість типів нейронів у всій нервовій системі за рідкісними винятками (*Thompson et al., 2018*). Існують також дані про експресію NeuN клітинами поза межами органів центральної нервової системи (ЦНС) (*Cannon et al., 2009*). Маркерний протеїн NeuN не спостерігається у гліальних клітинах взагалі, а тому його можна вважати специфічним маркером нейрональної

активності. NeuN часто використовується для встановлення співвідношення нейрони/глія (*Azevedo et al., 2009*).

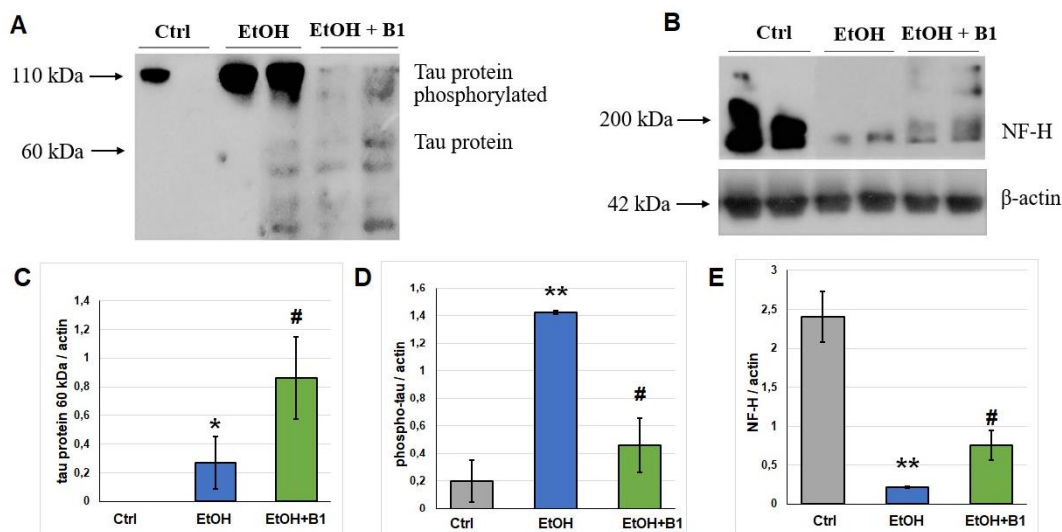


Рис. 3.14. Вестерн-блот аналіз нейроспецифічних протеїнів рогівки щурів: репрезентативні блотограми (A, B), результати денситометричного аналізу тау-протеїну (C), фосфорильованого тау-протеїну (D), та NF-H (E). * - $P < 0.05$ порівняно з контролем; ** - $P < 0.01$ порівняно з контролем; # - $P < 0.05$ порівняно з EtOH-групою.

Зниження рівня цього маркера зазвичай розглядається як показник відмирання нейронів. Проте імунореактивність NeuN також помітно знижується за умов різних метаболічних розладів, тому таке зниження можна вважати скоріше як індикатор метаболічної дисфункції нейронів (*Unal-Cevik et al., 2004*). Дослідження рогівки на експериментальній моделі хронічного споживання етанолу вперше вказують на експресію NeuN у нервових закінченнях передньої камери ока. З усім тим, поряд з епітелійними клітинами, кератоцитами та фібробластами, нейрональні клітини рогівки виявилися дуже чутливі до розвитку нейрональних дисфункцій внаслідок зловживання етаноловим спиртом.

Реактивний гліоз і нейрозапалення розглядаються як реакція клітин на розвиток нейродегенеративних захворювань. Накопичення доказів дає розуміння того, що, з одного боку, активація мікроглії та астроцитів сприяє виживанню нейронів, тоді як надмірна активація глії запускає хронічні

нейрозапальні процеси, які посилює прогресування патологічних станів (Leyns et al., 2017). Етанол має кілька мішеней в астроцитах та інших типах гліальних клітин, погіршуючи окисно-відновний потенціал, ріст і диференціювання клітин, а також змінюючи експресію цитоскелетних протеїнів (Vizueté et al., 2022). Внаслідок надмірної активації астроцити стають гіпертрофованими та експресують GFAP у великих кількостях. Цей протеїн вважається цінним біомаркером астрогліозу. GFAP – протеїн проміжних філаментів, який винятково міститься в астроцитах ЦНС і немієлінізуючих шваннівських клітинах периферичної нервової системи (Guzyk et al., 2016). Було встановлено, що під час різноманітних нейрозапальних захворювань підвищується експресія GFAP, що корелює з тяжкістю астрогліальної активації (Yang et al., 2015). Вживання алкоголю викликає різні зміни рівнів GFAP залежно від дози та тривалості впливу (Lundgaard et al., 2018). Переважна кількість робіт показує, що вплив етанолу призводить до гіпертрофії астроглії та збільшення кількості клітин, що продукують GFAP (Kim et al., 2021). Базуючись на попередніх даних (Masuoka et al., 2020), які надають докази того, що ганглії трійчастого нерва та нейрони рогівки оточені GFAP-імунопозитивними сателітними гліальними клітинами, було визначено рівень GFAP у рогівці, що можна вважати потенційним критерієм гліальної активації, індукованої етанолом. Підвищення рівня GFAP у рогівці щурів, які вживали етиловий спирт, вказує на те, що хронічне споживання алкоголю викликає активацію GFAP-позитивних сателітних гліальних клітин, таким чином маючи подібність з канонічною відповіддю астрогліальних клітин у мозку на різні шкідливі подразники. Роль гліальних клітин у функціонуванні рогівкових нервів все ще недостатньо вивчена. Різні патологічні стани та травми можуть модулювати експресію GFAP рогівки, що, можливо, відіграє певну роль у перебігу патологічних процесів (Zhang et al., 2017). GFAP також є складовою цитоскелету шваннівських клітин, що активуються внаслідок пошкодження. Встановлено, що GFAP бере участь у проліферації та

регенерації нервових волокон шляхом зв'язування інтегрину $\alpha\beta 8$, який ініціює мітотичні сигнали після пошкодження (*Triolo et al., 2006*). Цікаво, що певна популяція епітелійних клітин рогівки може трансформуватися і функціонувати як сурогатні шваннівські клітини з метою підтримки внутрішньоепітелійних нервів (*Stepp et al., 2017*). Існують дані, що епітелійні клітини рогівки можуть активуватися у відповідь на пошкодження за допомогою механізмів, подібних до тих, що індукуються в клітинах Шванна, і ці сурогатні гліальні клітини здатні підтримувати внутрішньоепітелійні нервові волокна рогівки та покращувати їх відновлення після пошкодження. На підставі цих спостережень ми припускаємо, що гліальну активацію, яка спостерігається в рогівці щурів, які зазнали впливу етанолу, можна розглядати скоріше як компенсаторну реакцію, яка розвивається для зменшення нейротоксичних ефектів негативних факторів. Знижена гліальна активація після лікування тіаміном, ймовірно, є результатом нейропротекторної дії вітаміну, яка реалізується шляхом стимулювання енергетичного обміну та полегшення нейрозапалення в клітинах рогівки. Добре відомо, що астрогліальні клітини є основною мішенню для дії тіаміну (*Hazell, 2009*). Раніше, використовуючи ту саму експериментальну модель, було встановлено, що одноразова ін'єкція тіаміну справляє сприятливий вплив на астроцити головного мозку у щурів, які зазнають хронічного впливу етанолу (*Pavlova et al., 2019*). Було показано, що лікування тіаміном зменшує активацію астрогліальних клітин, спричинену етиловим спиртом у корі головного мозку, гіпокампі та мозочку алкоголізованих щурів. Таким чином, нейропротекторна функція, опосередкована тіаміном, очевидно, реалізується через модуляцію гліальної активності в тканині мозку, а також мікрооточення рогівкових нервів.

Запалення є добре встановленою формою індукованих етанолом патологічних змін рогівки. Хоча алкоголь, як правило, вважається імуносупресивним засобом, кілька звітів вказують на те, що експресія прозапальних цитокінів і хемокінів була значно підвищена в епітеліальних

і стромальних клітинах рогівки, які зазнали впливу етанолу (*Oh et al., 2013*). Як чітко визначений мікрогліальний біомаркер (*Zhang et al., 2021a*), Iba-1 (іонізована кальцій-зв'язуюча адаптерна молекула 1) легко експресується більшістю CD45+ резидентних макрофагічних клітин у рогівці гризунів (*Loi et al., 2022*). Тому, щоб оцінити реакцію макрофагів на хронічне поглинання етанолу рогівкою, ми оцінили зміни рівнів Iba1 за допомогою вестерн-блот аналізу. Попри те, що вплив етанолу індукує активацію мікроглії в ЦНС, як було показано (*Li et al., 2019*), ми не виявили статистично значущого підвищення рівня Iba-1 у тканині рогівки щурів, які зазнали EtOH. Тим часом лікування тіаміном значно посилювало регуляцію Iba-1 у рогівці алкогольних щурів. Це важливе спостереження, яке вказує на те, що тіамін здатний модулювати функціональну активність макрофагів рогівки. Вважається, що макрофаги відіграють вирішальну роль, очищаючи клітинне сміття та усуваючи запалення, що важливо для підтримки прозорості рогівки та архітектури ока під час тривалого споживання етанолу (*Qazi et al., 2010*).

Отже, можна вважати, що тіамін здатний активувати шляхи деградації протеїнів, щоб захистити нейрони рогівки від накопичення тау, що може призвести до розвитку тауопатії (*Marquez et al., 2021*). На підставі отриманих результатів можна припустити, що порушення функціонування рогівки внаслідок хронічного споживання етилового спирту пов'язані з широкими дефектами метаболізму цитоскелетних протеїнів, яке можна нормалізувати лікуванням тіаміном.

Раніше було показано, що хронічне споживання етилового спирту також пов'язане з дегенерацією зорового нерва та ультраструктурними змінами у тканинах рогівки (*Kim et al., 2016*). Додатковим доказом негативного впливу хронічного споживання етилового спирту на метаболізм нейронів рогівки може бути зміна рівня нейронального цитоскелетного протеїну. Нейрофіламенти, які складаються з триплету протеїнів, включаючи нейрофіламент важкого ланцюга (NF-H),

нейрофіламент середнього ланцюга (NF-M) і нейрофіламент легкого ланцюга (NF-L), є проміжними волокнами цитоскелета нейронів, що відповідають за аксональний транспорт і є необхідними елементами для росту та диференціювання нейронів (*Yuan et al., 2017*). Дослідження, що демонструють зниження рівня NF-Н за умов алкоголізму у рогівці щурів, узгоджуються з раніше опублікованою інформацією, яка описує втрату протеїнів нейрофіламентів у культурі нейронів гіпокампа під дією етанолу (*Saunders et al., 1997*).

Крім того, результати вестерн-блот аналізу щодо детекції цитоскелетного τ -протеїну в тканині рогівки демонструють накопичення гіперфосфорильованої форми цього маркера як ознаку розвитку тауопатії. τ -протеїн асоційований з мікротрубочками й особливо поширений в аксонах нейронів ЦНС, де він сприяє розподілу мікротрубочок і підтримує стабільність їх структури (*Barbier et al., 2019*). Доведено, що τ -протеїни залучені до розвитку патогенезу нейродегенеративних захворювань і енцефалопатій, головним чином хвороби Паркінсона та особливо хвороби Альцгеймера. У пацієнтів із хворобою Альцгеймера спостерігається надмірне гіперфосфорилування τ -протеїну в тканинах головного мозку, крім того, відмічено і тенденцію до агрегації цих форм, що призводить до утворення нейрофібрилярних клубків. Внаслідок цього порушується аксональний транспорт, розвивається дисфункція мітохондрій і виникає порушення енергозабезпечуючих процесів у нейронах. Отже, утворення таких агрегатів можна розглядати як причину розвитку нейрональної дисфункції та дегенерації аксонів (*Guo et al., 2017*).

Поза межами своєї ролі в ЦНС, τ -протеїн також експресується у периферичній нервовій системі. Відмічена його участь у процесах регенерації периферичних нервів, проте механізми та специфічність ролі τ -протеїну за умов пошкодження нервових закінчень ще повністю не розкриті. Надмірна експресія τ -протеїну порушує регенеративні процеси нервової тканини рогівки, що може бути пояснено розвитком тауопатії та

подальшого зниження синтезу протеїну *de novo* (Jiao et al., 2020). Проведені дослідження вперше надали експериментальні докази того, що накопичення гіперфосфорильованого τ може слугувати чутливим біомаркером нейродегенеративних змін в рогівці, спричинених хронічним споживанням етанолу. Вважається, що тіамін здатний модулювати процеси фосфорилування та деградації τ -протеїну для захисту нервів рогівки від його накопичення та утворення агрегатів, що можна розглядати як потенційну терапевтичну мішень для лікування ушкоджень периферичних нервів.

Висновки до підрозділу 3.4.

1. Показано, що тривале надходження етилового спирту викликає зміни рівня NeuN, NF-H, тау-протеїну та GFAP, що вказує на розвиток дегенеративних змін у нейрональних клітинах рогівки, які супроводжуються абераціями їх цитоскелету та підсиленням реактивності клітин сателітної глії.

2. Встановлено, що введення тіаміну сприяє нормалізації вмісту нейрональних та гліальних маркерів у рогівці щурів з алкогольною інтоксикацією, що свідчить про нейропротекторну активність вітаміну B₁ за умов хронічного впливу токсиканта.

3.5. Характеристика та використання поліклональних антитіл до лактоферину

Основним завданням цього підрозділу дисертаційної роботи було розробити протокол отримання поліклональних антитіл проти Lf людини (anti-Lf Abs), що включає процедури імунізації й очищення фракції IgG з імунної сироватки кролів. Отримані антитіла були використані для імунохімічної детекції Lf в слізній рідині пацієнтів з непроникним травмуванням рогівки з метою з'ясувати, чи існує зв'язок між кількісними

змінами цього протеїну та його поліпептидного складу з пошкодженням рогівки. Для цього проводили визначення відносного вмісту цільового протеїну та аналізували склад його імунореактивних поліпептидів методом вестерн-блоту із застосуванням отриманих антитіл (Tykhomurov *et al.*, 2022). В ході виділення антитіл протеїни плазми крові імунізованих кролів, фракцію глобулінів, висолених сульфатом амонію, та фракцію IgG, що очищували за допомогою афінної хроматографії на протеїні А, аналізували за допомогою SDS-PAGE (рис. 3.15).

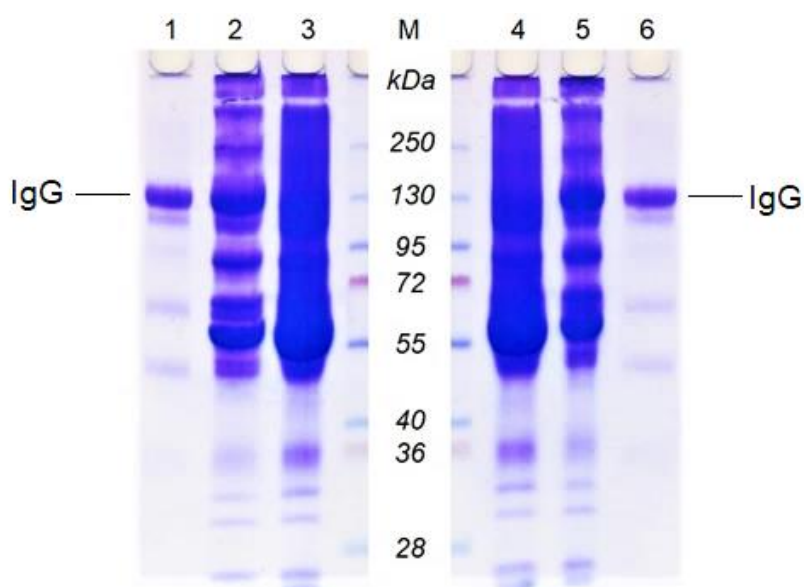


Рис. 3.15. Електрофореграма протеїнів сироватки (доріжки 3 і 4) двох кролів, імунізованих лактоферином людини, протеїнів глобулінової фракції (доріжки 2 і 5) і очищеного на протеїн А-агарозі IgG (доріжки 1 і 6). Кількість протеїну складала 150, 50 і 10 мкг відповідно, 8% SDS-PAGE. Доріжка М – стандартні маркери молекулярної маси.

Електрофоретичний профіль протеїнів сироватки та глобулінової фракції мав стандартний вигляд. Доріжки 1 і 6 містять протеїни піку елюції кролячих IgG ($M_m \sim 130$ кДа), отриманих за допомогою афінної хроматографії на протеїн А-агарозі та концентрованих з використанням ультрамолекулярних фільтрів. Результати гел-електрофорезу показали, що елюйовані зразки IgG містять низьку кількість протеїнових домішок,

відносна кількість яких за даними денситометричного аналізу не перевищує 7-8% від загального вмісту протеїну. У подальших експериментах було показано, що ці незначні домішки не впливають на імуногенність отриманих антитіл.

Надалі титри антитіл в імунних сироватках визначали за допомогою твердофазного ELISA, використовуючи сироватку крові неімунізованого кроля як контроль. Результати ІЕА наведено на рисунку 3.16.

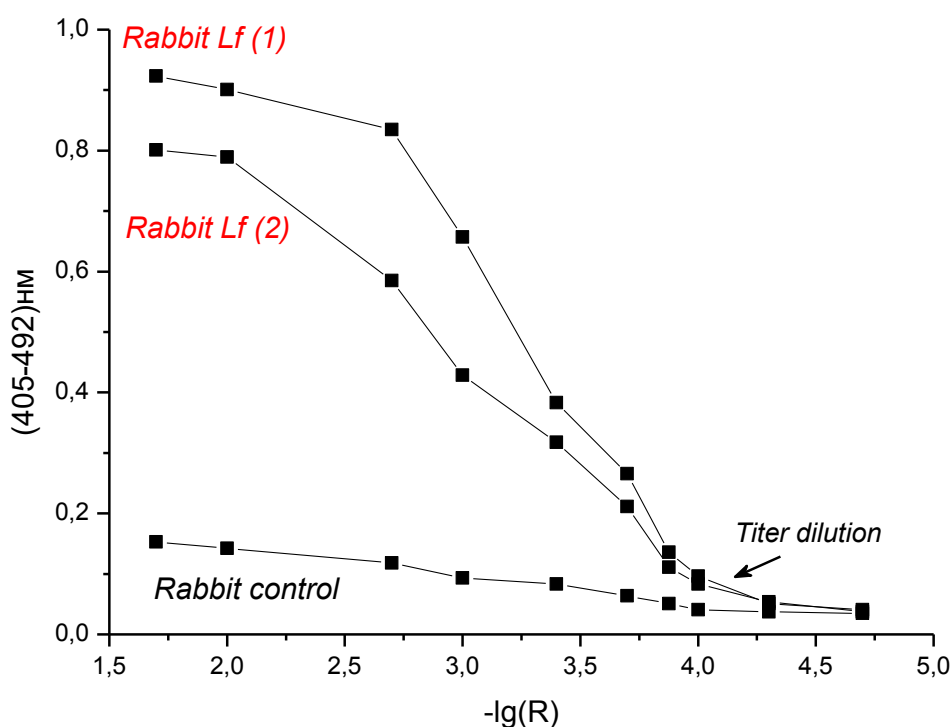


Рис. 3.16. Результати твердофазного імуноензимного аналізу сироваток крові кролів ($n=2$), імунізованих лактоферином людини. Сироватку неімунізованого кроля використовували як контроль. $-\lg(R)$ – від’ємний логарифм фактору розведення.

Результати ELISA свідчать про потужну імунну відповідь кролів на введення Lf людини. Обидва імунізовані кролі продемонстрували наявність антитіл проти Lf, які були відсутні у неімунізованій тварини. Згідно з результатами ELISA величина титра антитіл знаходиться в межах фактора розведення 4,3-4,0 що відповідає розведенню 1:15000. Таким чином, було доведено присутність високоафінних anti-Lf Abs у крові імунізованих

кролів. Оскільки за величиною титра імунні сироватки обох імунізованих тварин достовірно не відрізнялися, їхні препарати IgG було об'єднано для подальшого використання в імунохімічному аналізі.

Антитіла до Lf були протестовані за допомогою Вестерн-блот аналізу, у якому було використано очищений препарат Lf як антиген (рис. 3.17). Як показано на рисунку 3.17 А, за допомогою денатуруючого гелелектрофорезу виявлено інтактний поліпептид Lf, що відповідає молекулярній масі ~ 75 кДа. Цю основну смугу було візуалізовано за допомогою Вестерн-блоту з ECL-детекцією або імунозабарвленням хромогенним субстратом (DAB). Видно, що детекція із застосуванням ECL як більш чутливий підхід була здатна виявити кілька мінорних смуг більш низькомолекулярних поліпептидів (рис. 3.17 Б), порівняно з розвитком імунозабарвлення з використанням DAB як хромогенного субстрату (рис. 3.17 В).

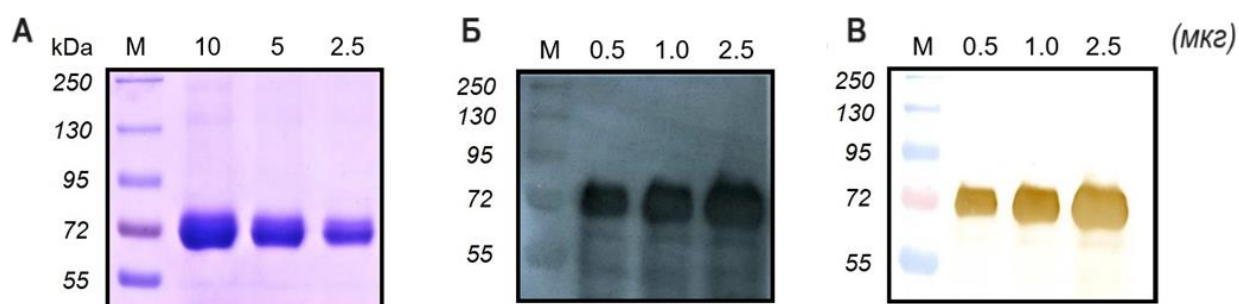


Рис. 3.17. Електрофореграма лактоферину (А) та його вестерн-блот аналіз з використанням детекції ECL (Б) або забарвлення хромогенним субстратом (В).

Отримані результати узгоджуються з даними про те, що система проявлення блотів ECL є на два порядки більш чутливою до виявлення антигену в порівнянні з хромогенною детекцією у вестерн-блоті (*Mruk et al., 2011*) і, таким чином, є більш прийнятним підходом до виявлення Lf у біологічному матеріалі. Мінорні імунореактивні зони з M_m менше 70 кДа можуть відповідати різним ізоформам молекули Lf, що присутні у

біологічному матеріалі, або його фрагментованим поліпептидам, оскільки Lf є відносно чутливим до обмеженого протеолізу різними протеазами, включаючи трипсин, хімотрипсин, пепсин, субтилізин і протеїназу К (Hopp *et al.*, 2022). Описано здатність Lf до автопротеолізу завдяки наявності власної протеолітичної активності (Massucci *et al.*, 2004). Очищені та протестовані антитіла до Lf у подальшому використовували для визначення рівня цього протеїну в зразках слізної рідини пацієнтів з непроникними травмами рогівки. Було проведено електрофоретичний аналіз слізної рідини, отриманої від здорових осіб і пацієнтів з пошкодженням рогівки. Електрофореграма протеїнів слізної рідини, наведена на рисунку 3.18, демонструє суттєву різницю в профілі протеїнів сльози між зразками.

Порівняння профілю смуги зразків слізної рідини, зібраної із здорового ока і сльози пацієнтів з ушкодженою рогівкою показало істотну різницю в інтенсивності двох основних смуг з M_m 70 кДа, що відповідає Lf, і 55 кДа, що відповідає сироватковому альбуміну. З результатів електрофореми є очевидним, що слізна рідина із здорового ока містить більшу кількість Lf, ніж зразки, отримані з пошкодженого ока. І навпаки, у пацієнтів з ранами рогівки рівень альбуміну виявився вищим порівняно з контролем. Підвищений рівень альбуміну в зразках сльози з пацієнтів може бути результатом ексудації альбуміну з пошкоджених капілярів кон'юнктиви. Для підтвердження результатів електрофореми було проведено імунохімічну детекцію Lf у зразках сльози та виконано порівняльний аналіз вмісту цього протеїну у сльозі здорових людей та пацієнтів з ушкодженнями рогівки. З результатів Вестерн-блоту, наведених на рисунку 3.19, видно, що усі зразки сльози осіб контрольної групи містять основну інтактну смугу Lf з M_m 75 кДа і мінорний поліпептид з M_m 55 кДа, тоді як слізна рідина пацієнтів з травмованою рогівкою містить у 3,2 рази ($P < 0,05$) меншу кількість нативного поліпептиду Lf (Tykhomurov *et al.*, 2022).

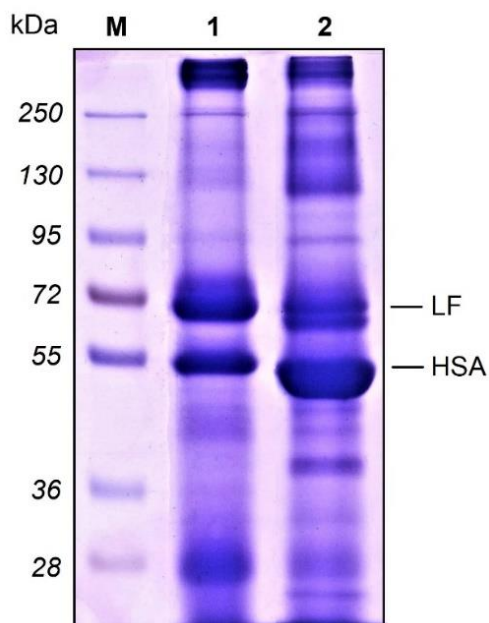


Рис. 3.18. Типова електрофореграма профілю протеїнів слізної рідини здорового ока (1) і за непроникаючою травмою рогівки (2) (результати SDS-PAGE, нанесення 50 мкг загального протеїну на доріжку, Lf – лактоферин, HSA – сироватковий альбумін).

Крім відносного зниження рівня Lf в усіх зразках слізної рідини пацієнтів з пошкодженням рогівки міститься виражена смуга з M_m 30 кДа, яка відповідає продукту протеолітичної деградації лактоферину. Також показано, що зразки сльози кількох пацієнтів містять високомолекулярні імунореактивні зони, які можуть відображати здатність лактоферину утворювати стабільні комплекси з іншими протеїнами. Це спостереження узгоджується з раніше опублікованими даними щодо здатності Lf зв'язуватися з іншими протеїнами, включаючи IgA, секреторні компоненти, альбумін і лізоцим, і тому у сльозі він може бути присутнім у різних молекулярних формах (Kell *et al.*, 2020). Зокрема, раніше було показано, що Lf людини утворює комплекс із мідьвмісним протеїном плазми церулоплазміном як *in vitro*, так й *in vivo*, який присутній у слізній рідині у підвищених кількостях під час запальних процесів у рогівці (Sabatucci *et al.*, 2007).

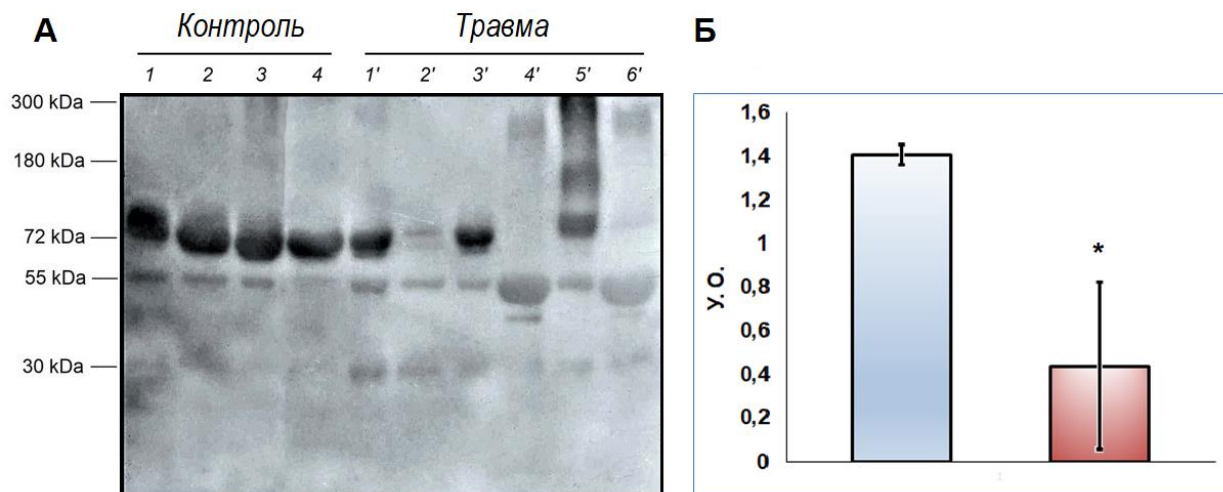


Рис. 3.19. Імунохімічна детекція лактоферину в зразках слізної рідини контрольної групи ($n = 4$) та пацієнтів з непроникною травмою рогівки ($n = 6$) (А) та результати денситометричного аналізу (Б) (у. о. – умовні одиниці оптичної густини). * - $P < 0,05$ у порівнянні з контролем.

Отримані результати кількісного аналізу вмісту Lf за допомогою імунохімічної детекції, які демонструють зниження рівня Lf у зразках слізної рідини, зібраної у пацієнтів з непроникною травмою рогівки, порівняно зі сльозозою здорових осіб, можуть мати клінічне застосування та мати значення для офтальмологічної травматології. Подальше тестування отриманих антитіл на вибірках більшого розміру є актуальною задачею майбутніх досліджень. Нещодавно опубліковане скринінгове дослідження може слугувати ще одним прикладом використання отриманих у роботі anti-Lf Abs в офтальмологічній практиці. Автори (*Gavrylyak, 2024*) провели визначення рівнів Lf і церулоплазмину в слізній рідині пацієнтів з непроникними ранами рогівки різного походження і встановили обернену кореляцію між вмістом цих протеїнів, а також їх рівнем і ступенем пошкодження ока.

Lf, який також відомий як лактотрансферин, вперше був виділений з молока (*від лат. lacte + ferrum = молоко + залізо*) є негемовим залізовмісним протеїном, що відноситься до сімейства трансферинів (*Kowalczyk et al.,*

2022). Lf є найбільш масовим протеїном слізної рідини, оскільки становить 25% від загального вмісту протеїнів цієї біологічної рідини. Lf може існувати у вигляді холопротеїну, який складається з одного поліпептидного ланцюга, згорнутого у дві глобули, кожна з яких містить один зв'язування заліза. Lf також існує у вигляді апопротеїну з менш ніж 5% насиченням залізом, який є більш чутливим до протеолізу через свою молекулярну структуру, оскільки знаходиться у конформації, яка характеризується більш «відкритою» структурою. Lf виконує кілька біологічних функцій, зокрема, володіє протимікробною та імуномодулювальною дією. Цей «усюдисущий» глікопротеїн володіє багатофункціональними захисними властивостями і присутній у різних секретах слизових оболонок, таких як слюза, слина, молоко та носові виділення. Lf, що міститься у значній кількості секреторних виділень, майже повністю представлений у вигляді апоформи і, таким чином, має здатність міцно зв'язувати будь-яке вільне залізо та ефективно конкурувати з бактеріями за цей важливий кофактор (*Flanagan et al., 2009*). Крім того, Lf притаманна противірусна дія широкого спектру як *in vitro*, так і *in vivo*. Результати експериментів *in vitro* демонструють, що Lf інгібує реплікацію респіраторно-синцитіального вірусу, вірусу грипу А (варіантів H3N2, H1N1, H3N2), а також вірусу пташиного грипу А (H5N1), ротавірусу, аденовірусу, поліовірусу, еховірусу, вірусу простого герпесу (HSV-1, HSV-2) та деяких інших вірусів. Було показано, що пероральне введення бичачого Lf полегшує перебіг захворювань, викликаних вірусними інфекціями, включаючи ротавірус і норовірус (*Wakabayashi et al., 2014; Valenti et al., 2005*). Lf здатний зв'язуватися з рецепторами, такими як ангіотензинконвертувальний ензим 2 (ACE2) і гепарансульфат-протеоглікани (HSPG), які використовуються вірусом SARS-CoV-2 як

якірні місця на клітинній мембрані, і в такий спосіб пригнічувати адсорбцію патогена до клітини-мішені (рис. 3.20).

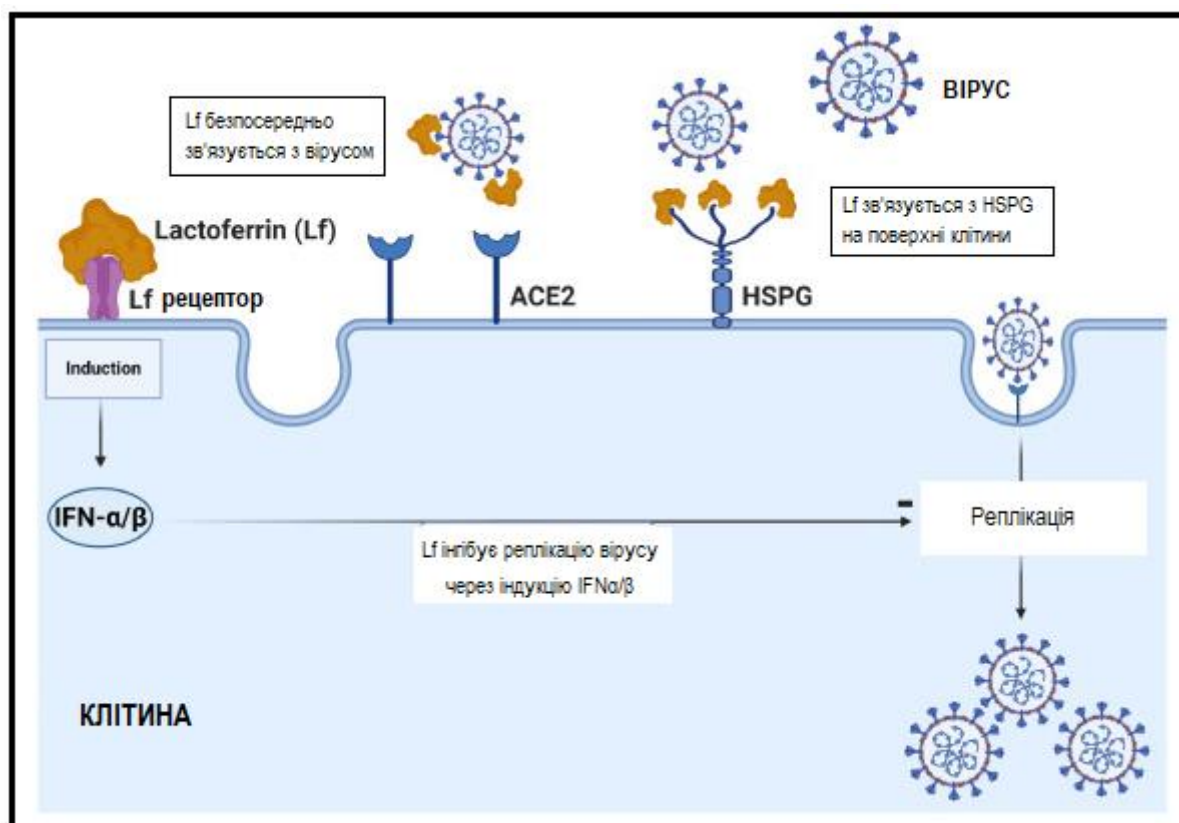


Рис. 3.20. Потенційні механізми противірусної дії лактоферину (Lf): (1) пряме зв'язування Lf з вірусом; (2) зв'язування Lf з протеогліканом гепарансульфатом (HSPG) на поверхні клітини-господаря, що зменшує вірусний серфінг і подальше проникнення вірусу; (3) Lf інгібує реплікацію вірусу шляхом індукції внутрішньоклітинного сигналювання (ACE2 – ангіотензинперетворювальний ензим 2; IFN – інтерферон) (за Chang et al., 2020).

Крім того, припускається, що Lf здатний блокувати зв'язування вірусів з їхніми поверхневими рецепторами через блокування самого збудника, що запобігає його проникненню до клітини-мішені (Wotring et al., 2022). Встановлено, що Lf проявляє не лише потужні антивірусні ефекти проти SARS-CoV-2 *in vitro*, але й полегшує офтальмологічні прояви Covid-19 (Alpogan et al., 2021; Vagge et al., 2020). Таким чином, зменшення вмісту

Lf у слізному шарі за пошкодження рогівки може слугувати чинником, який підсилює тропність клітин рогівки до вірусів, що робить око потенційними «воротами» для проникнення вірусів до організму.

Дані попередніх досліджень доводять існування тісного кореляційного зв'язку між низьким у порівнянні зі здоровими особами рівнем Lf у сльозі та розвитком деяких очних захворювань, таких як хвороба сухого ока, хронічний мейбоміт і кератоконус (*Ohashi et al., 2003; Kuo et al., 2019*). Таким чином, рівень Lf у сльозі пацієнтів з різними очними хворобами має великий потенціал для використання як релевантного біомаркера з метою визначення, діагностики та прогнозу розвитку офтальмопатологічного стану. Результати інших досліджень також свідчать про зв'язок між зниженням рівня Lf у слізній рідині зі старінням та розвитком деяких захворювань, таких як синдром Шегрена (автоімунне захворювання, що вражає також і слізну залозу), ідіопатична сухість ока, міотонічна м'язова дистрофія, алергічний (весняний) кон'юнктивіт, гігантський папілярний кон'юнктивіт, спричинений носінням контактних лінз, трахома, кератит, викликаний простим герпесом, хронічний іритативний кон'юнктивіт, сухий кератокон'юнктивіт, очний пемфігоїд, який супроводжується сухістю очей, шкіряна пухирчатка та клінічна сухість ока з вираженою кератопатією, післяопераційна хірургія катаракти, й спостерігається у безсимптомних ВІЛ-позитивних пацієнтів та у хворих на хронічний гепатит С і пацієнтів, які страждають на реакцію типу 2 при проказі (*Ponzini et al., 2020*).

Протягом останніх десятиріч було розроблено низку підходів до кількісного визначення рівня Lf, а саме: гель-електрофорез, високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), мас-спектрометрія, імуноензимний аналіз (*Zhang et al., 2021b*). Слід відзначити, що Вестерн-блот Lf у слізній рідині з використанням отриманих у представленій роботі поліклональних антитіл дозволяє провести напівкількісний аналіз рівня Lf у здорових осіб і пацієнтів з травматичним пошкодженням очей, а також

виявити відмінності у поліпептидному складі досліджуваного протеїну в зразках сльози. Таким чином, разом із кількісним визначенням рівня Lf у сльозі, гетерогенність його поліпептидного складу може бути додатковим діагностичним показником. Отримані антитіла можуть стати цінним інструментом для фундаментальних імунологічних та імуногістохімічних досліджень, діагностичного тестування біологічного матеріалу та контролю якості ліків.

Висновки до підрозділу 3.5

1. Отримано високоафінні кролячі поліклональні антитіла до лактоферину людини, титр імуносироваток відповідає розведенню 1:15,000.

2. Застосування отриманих антитіл дозволило визначити, що рівень лактоферину в слізній рідині пацієнтів з непроникною травмою рогівки у 3,2 рази ($P < 0,05$) менший порівняно з цим показником у сльозі осіб з неушкодженим оком. Зниження рівня лактоферину може бути показником пошкодження рогівки й використовуватися в діагностичних цілях у клінічній офтальмології.

3.6. Аналіз протеїнів слізної рідини за травматизації ока

Слізна рідина є складною сумішшю протеїнів, ліпідів, муцинів, води та солей, при цьому, за даними протеомного аналізу, у сльозі людини міститься понад 3500 різних протеїнів (*Jones et al., 2022*). Ця обставина робить сльозу більш складною рідиною організму, ніж сироватка або плазма крові. Завдяки доступності і зручності забору зразків сльози неінвазивним способом, вона є зручним об'єктом для визначення біомаркерів для діагностики очних захворювань, включаючи непроникаюче пошкодження рогівки. У представленій роботі за допомогою вестерн-блот аналізу визначали рівень протеїнів, які є маркерами найголовніших патогенетичних патернів ранового процесу в рогівці: гіпоксії (HIF-1 α), ремоделювання тканин/фіброзу (MMP-9) та ангиогенезу (AS) (рис. 3.21).

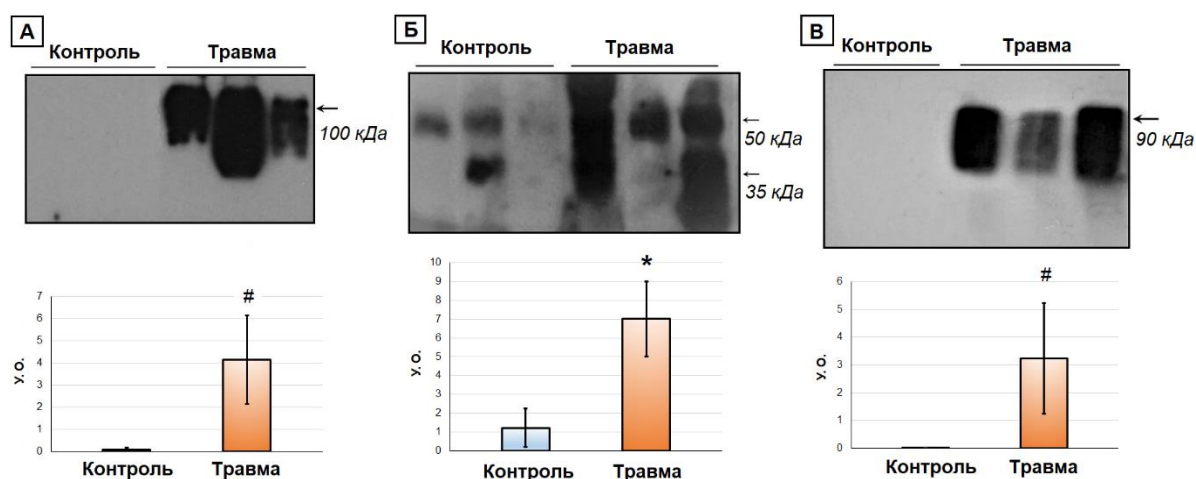


Рис. 3.21. Типові блотограми та результати денситометричного аналізу протеїнів-маркерів у слізній рідині зі здорового ока (n=15) та за непроникної травми рогівки (n=32): А – HIF-1 α , Б – ангіостатини, В – ММР-9 (* - P<0,05 у порівнянні з контролем, # - P<0,001 у порівнянні з контролем).

Результати Вестерн-блот аналізу демонструють драматичне зростання рівня HIF-1 α – ключового транскрипційного фактора, пов'язаного з гіпоксією, вміст якого у слізній рідині пацієнтів з травмою ока збільшується у 56 разів (P < 0,001) порівняно з контролем (рис. 3.10 А). Ці дані свідчать на користь того, що травма рогівки супроводжується розвитком гіпоксії, про що свідчить активація експресії транскрипційного фактора HIF-1 α (Gavrylyak et al., 2022). Як показано на рис. 3.10 Б, у зразках слізної рідини було виявлено два основні поліпептиди AS з M_n близько 50 і 35 кДа, які відповідають AS K1-4.5 і K1-3. Денситометричний аналіз блотограм показав зростання сумарного вмісту AS у слізній рідині пацієнтів з травмою рогівки у середньому 5,8 разів порівняно з цією величиною у контрольній групі (P < 0,05). Слід зазначити, що результати імуноблоту свідчать про присутність AS у помітних кількостях у слізній рідині здорових добровольців. Це спостереження узгоджується з даними джерел літератури щодо конститутивного утворення AS клітинами епітелію рогівки. Показано, що ці ангіостатичні поліпептиди беруть участь у підтриманні фізіологічної аваскулярності та оптичної прозорості рогівки через інгібування проангіогенного VEGF-опосередкованого сигналювання та пригнічення

надмірного росту капілярів під час загоєння ран та запалення рогівки (*Sack et al., 1999*). В літературі описано роль цистеїнових катепсинів, а також MMP, в утворенні AS у рогівці через розщеплення ендogenous плазміногену (*Coppini et al., 2015*). Тому в дисертаційному дослідженні з метою визначити рівень та протеолітичну активність MMP, було проведено імунохімічний ензиматичний аналіз зразків слізної рідини. За допомогою Вестерн-блот аналізу з використанням моноспецифічних антитіл проти MMP-9 було показано, що ця протеїназа міститься у сльозі контрольної групи у слідових кількостях (рис. 3.10 В). Значне підвищення рівня антигену MMP-9 було визначено у зразках слізної рідини пацієнтів з пошкодженням рогівки, яке за даними денситометричного аналізу перебільшувало контрольну величину в 105 разів ($P < 0,001$). Результати імунохімічної детекції MMP-9 цілком узгоджуються з результатами функціонального тесту на протеолітичну активність, проведеного за допомогою ензим-форезу, які наведено на рис. 3.22.

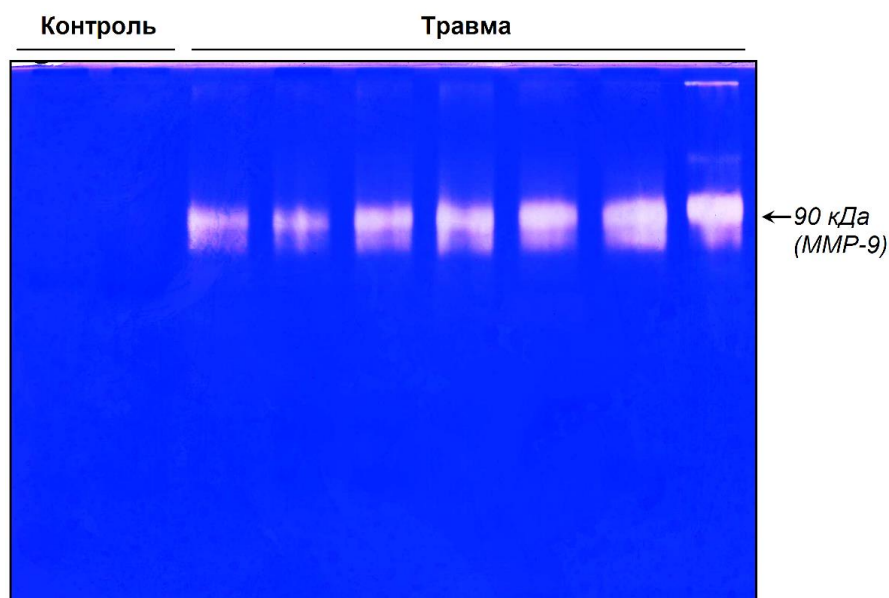


Рис. 3.22. Типова желатинова зимограма зразків слізної рідини здорових осіб (контроль) та пацієнтів з непроникною травмою рогівки.

Слід зазначити, що активність MMP у сльозі зі здорового ока знаходиться поза межею чутливості методу, що повністю збігається з результатами Вестерн-блот аналізу. Натомість, в усіх зразках слізної рідини

пацієнтів з ерозією рогівки виявлено протеолітичну активність, яка за міграцією основної зони (90 кДа) відповідає активній формі MMP-9.

Як відомо, транскрипційний фактор HIF-1 α регулює перебіг цілої низки процесів, які супроводжують патологічні та адаптативні зміни у пошкодженій рогівці за умов нестачі кисню, зокрема, запалення, ангиогенез та фібротичні зміни (*Pang et al., 2021*). Гіпоксія, яка розвивається в ушкодженій рогівці, впливає на різні аспекти функціонування цієї структури ока, включаючи порушення функції епітеліального бар'єру, набряк рогівки через ендотеліальну дисфункцію та зміни метаболізму стромы, а також витончення стромы рогівки. Результати численних досліджень доводять, що HIF-1 α задіяний до активації ангиогенезу як компенсаторної відповіді на дефіцит кисню в ушкоджених тканинах, перш за все, як регулятор експресії VEGF і MMP (*Hashimoto et al., 2015; Chen et al., 2012*). Показані результати дисертаційного дослідження свідчать на користь цих уявлень. Зокрема, той факт, що у зразках сльози контрольної групи не виявлено значної кількості протеїну MMP-9 та відсутня протеолітична активність цієї протеїнази, вказує на індукцію експресії MMP-9 у пошкодженій тканині рогівки. На це вказує істотне зростання як рівня протеїну MMP-9, так відповідно й колагенолітичної активності в слізній рідині пацієнтів з непроникними травмами ока. Протеолітичні ензими, перш за все протеїнази сімейства MMP, залучаються до ремоделювання епітелію пошкодженої базальної мембран. Крім того, MMP зменшують ступінь адгезії клітин та узгоджено з різними факторами росту та цитокінами, перш за все трансформувальним ростовим фактором β (TGF- β), сприяють міграції клітин (*Joo et al., 2008*). У нормальній рогівці MMP відповідають за компакту організацію колагенових фібрил у стромі, що є важливим для підтримання оптичної прозорості рогівки та належної гідратації стромы. Однак, надекспресія/надактивація MMP у тканині рогівки може призводити до неконтрольованого руйнування просторової організації колагенової

матриці стромы, що є одним з механізмів патогенезу дистрофічних змін цієї структури ока (*Kaya et al., 2021*) (рис. 3.23).

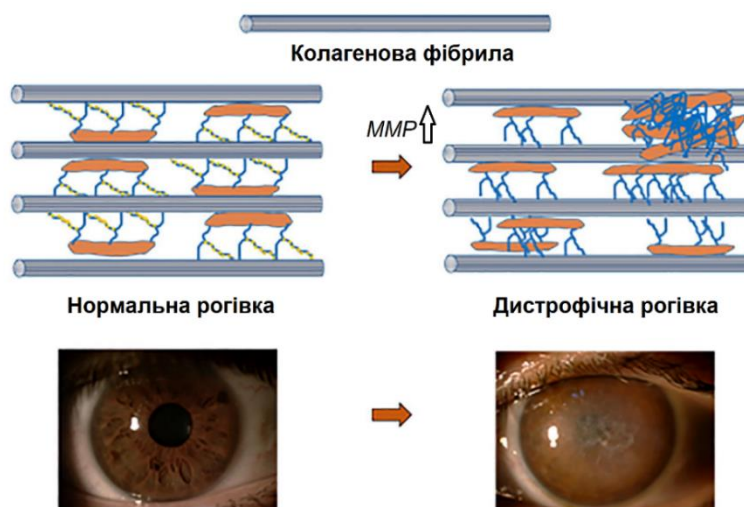


Рис. 3.23. Надактивація MMP призводить до руйнування зв'язків між колагеновими фібрилами, дезорганізації стромы та розвитку дистрофічних змін у рогівці (за *Kaya et al., 2021*).

Один з молекулярних механізмів залучення MMP до регулювання ангиогенезу в пошкодженій рогівці може реалізовуватися через утворення AS завдяки обмеженому протеолізу плазміногену. У свою чергу, AS відіграють важливу роль у підтриманні оптичної прозорості рогівки, пригнічуючи неоваскуляризацію рогівки та індукований ішемією васкулогенез, що можна розглядати як одну з ланок адекватного перебігу репаративних процесів (*Bilous, 2021*). *Sack et al. (1999)* довели ключову роль AS як нормальних компонентів слізної плівки, необхідних для запобігання неоваскуляризації рогівки у заплющеному оці під час нічного сну. Раніше було показано, що AS інгібують неоваскуляризацію рогівки, індуковану bFGF і VEGF (*Gabison et al., 2004*). Таким чином, AS можуть відігравати важливу роль у функціонуванні переднього відділу ока, пригнічуючи функціонально небажану неоваскуляризацію за умов вимушеної гіпоксії в закритому оці та аналогічним чином виконувати роль регулятора ангиогенезу за перебігу запальних процесів у пошкодженій рогівці. Однак, тривале підвищення активності MMP може призвести до неконтрольованого руйнування екстрацелюлярного матриксу та

перманентному порушенню балансу між регуляторами ангіогенезу (*Wolf et al., 2019*). Показано, що деякі члени сімейства металопротеїназ (MMP-3, -7, -19 і -9) здатні здійснювати процесінг молекули VEGF, розщеплюючи поліпептидний ланцюг у сайті 113 амінокислотного залишку, що сприяє вивільненню біологічно активної форми цитокіну з екстрацелюлярного матриксу (*Arroyo et al., 2010*). Збільшення кількісного співвідношення між активним (розчинним) VEGF та його формою, зв'язаною з матриксом, є тригерним фактором, який ініціює проростання нових судин, їх розгалуження та збільшення у розмірах, що спостерігається за активації ангіогенезу під час запальних процесів.

Оскільки розвиток різних патологічних станів рогівки (хронічні ерозії, епітелійні дефекти) перш за все асоційований з підсиленням проангіогенним сигналюванням та неоваскуляризацією, отримані у роботі дані мають велике прикладне значення. Зокрема, визначення рівнів цитокінів, регуляторів ангіогенезу та протеолітичної активності в слізній рідині пацієнтів може бути корисним підходом для прогнозування приживлення транспланту за процедури кератопластики. Таким чином, виявлені у дослідженні істотні зміни складу протеїнів сльози вказують на перебіг репаративних процесів у пошкодженій рогівці та можуть використовуватися як чутливі маркери стану тканини під час загоєння. Отримані дані створюють теоретичне підґрунтя для використання цих протеїнів-біомаркерів для оцінки ступеня деструктивних змін у рогівці за її травмування як основи неінвазивної діагностики з використанням слізної рідини.

Висновки до підрозділу 3.6.

1. Продемонстровано, що непроникна травма рогівки супроводжується зростанням у слізній рідині пацієнтів рівня/активності MMP-9, HIF-1 α та ангіостатинів, які можуть використовуватися як діагностично-прогностичні біомаркери ступеня пошкодження тканин рогівки.

РОЗДІЛ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ

Зважаючи на розповсюдженість неоваскулярних захворювань передньої камери ока, на сьогоднішній день існує нагальна потреба вирішення цієї групи патологічних станів рогівки. Існуючі наразі консервативні методи лікування не завжди забезпечують позитивний терапевтичний ефект, що часто пов'язано з порушеннями репаративно-регенеративних процесів в оці, вимагаючи пошуку альтернативних способів профілактики та лікування цієї групи офтальмологічних захворювань. Оскільки ключову роль у патогенезі неоваскулярних захворювань відіграють дисфункція ендотелію судин та функціонально не обґрунтована активація ангіогенезу, то аберантна неоваскуляризація ока становить релевантну мішень для засобів фармакокорекції.

До фізіологічних молекул-ангіостатиків відносяться продукти обмеженого протеолізу протеїну плазміногену, ангіостатини, які утворюються в організмі та є нетоксичними. Ці крингл-вмісні поліпептидні фрагменти (K1-3, K1-4, K1-4,85, K1-5, K5) з різною ефективністю пригнічують ангіогенез через специфічне індукування апоптозу ендотелійних клітин, інгібуючи їх проліферативну та міграційну активності. Тому основна ідея роботи полягала у дослідженні можливості використання цих протеїнів в офтальмологічній практиці як аваскулогенних агентів для профілактики та лікування захворювань ока, асоційованих з патологічною неоваскуляризацією сітківки та рогівки.

Ангіостатини – специфічні ендогенні інгібітори функціональної активності ендотелійних клітин, супресори утворення нових кровоносних судин, міграції прозапальних клітин та антизапальні регулятори. Через високу ефективність, відсутність побічних ефектів та біосумісність ангіостатини розглядаються як потенційні протизапальні фактори та інгібітори неоваскуляризації рогівки.

Хронічне запалення, ангіогенез та підсилене ремоделювання тканини рогівки є факторами, що негативно впливають на приживлення донорської

рогівки при кератопластиці. Крім того, запальні процеси в кон'юнктивальній тканині супроводжуються надекспресією певних рецепторних протеїнів, які зумовлюють її тропність до вірусу SARS-CoV-2, вірусу Зіка та вірусу простого герпесу першого типу (HSV-1) та ін., роблячи око шляхом проникнення вірусної інфекції до організму. Отже, розробка нових фармакотерапевтичних засобів плейотропної дії має велике медико-соціальне значення для профілактики та корекції патологічних станів рогівки. І, як було показано у проведених дослідженнях, ангіостатини проявляють коригувальні ефекти стосовно різних ланок патофізіологічного процесу, знімаючи ступінь запалення, що призводить до нормалізації функціонування передньої камери ока (рисунк 4.1).

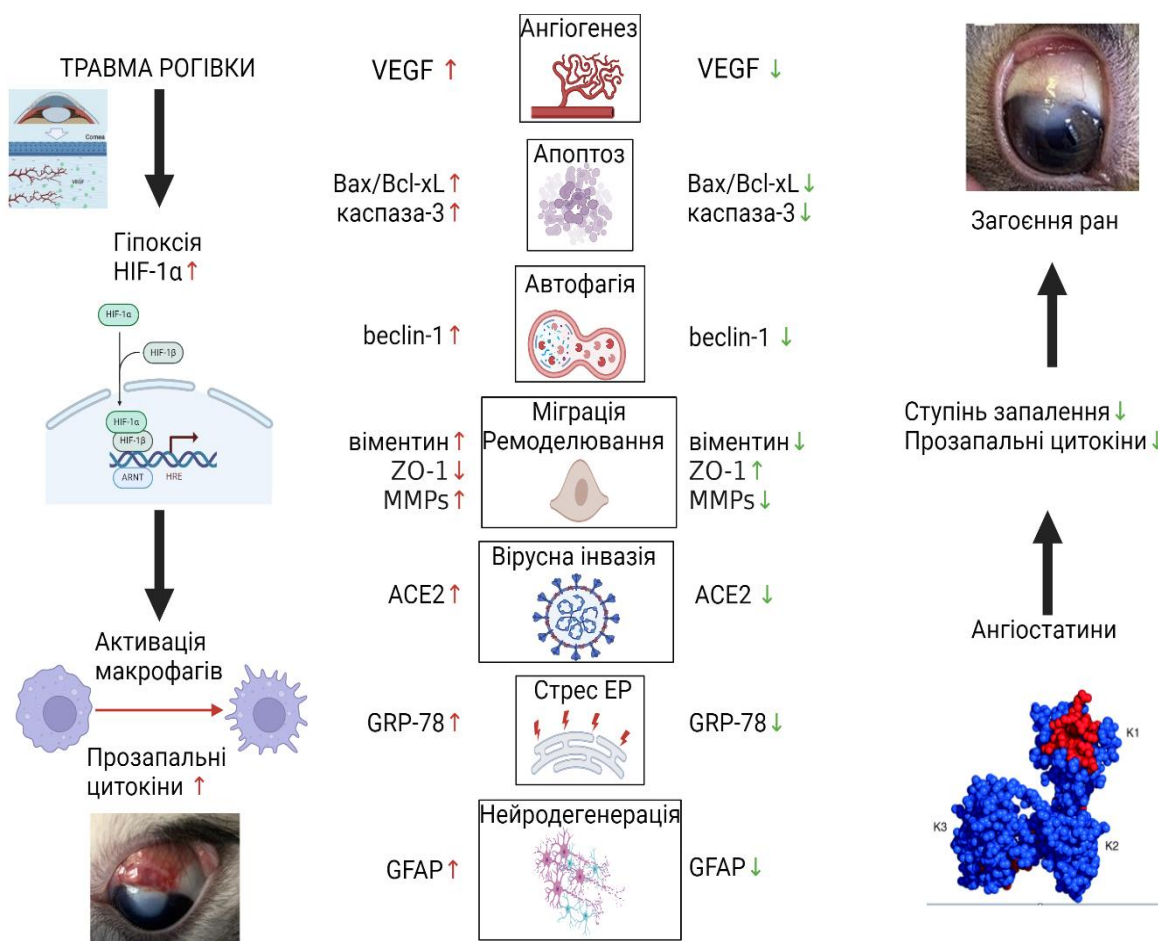


Рис. 4.1. Ефекти ангіостатинів, спрямовані на корекцію різних ланок патофізіологічного процесу за умов травматизації рогівки та розвитку запального процесу.

Крім хімічних та механічних пошкоджень рогівки, небезпеку для нормального функціонування передньої камери ока також становлять і метаболічні розлади. Хронічне споживання етанолу призводить до розвитку дефіциту тіаміну, що викликає стрімкий розвиток гіпоксичного стану, порушення метаболічного обміну між нейронами та астроцитами, індукує лактатацидоз і нейродегенеративні зміни у нервових закінченнях рогівки. Зважаючи на той факт, що рогівка є найбільш щільно іннервованою тканиною організму, важливим питанням є зменшення згубних наслідків хронічного алкоголізму на нерви рогівки. Індукція етанолом змін, що призводять до посилення транскрипційної регуляції проапоптотичної/запальної сигналізації сприяє загибелі клітин астроцитів під час дефіциту тіаміну. Було показано, що тіамін виконує протекторну роль щодо тканин рогівки за умов інтоксикації етанолом за різними параметрами, як наведено на рисунку 4.2.



Рис. 4.2. Протекторні ефекти тіаміну щодо корекції патофізіологічних змін за умов хронічного споживання етанолу.

ВИСНОВКИ

Досліджено молекулярні механізми розвитку патологічних станів рогівки, індукованих впливом чинників різної природи й асоційованих з гіпоксією та неоваскуляризацією. Показано плейотропні протекторні ефекти ангіостатинів, що обмежують надмірну неоваскуляризацію рогівки, спричинену лужним опіком. Встановлено антиапоптотичну та нейропротекторну активність тіаміну (вітаміну B₁) у тканині рогівки щурів в експериментальній моделі хронічної інтоксикації етиловим спиртом. Отримані дані становлять наукове підґрунтя для використання цих підходів для корекції патологічних станів рогівки, індукованих несприятливими чинниками різної природи. Проведено скринінговий аналіз протеїнів слізної рідини – потенційних біомаркерів ушкодження рогівки у пацієнтів з травмами ока.

1. Показано, що застосування ангіостатинів сприяє зменшенню рівня протеїнів-маркерів, асоційованих з гіпоксією (HIF-1 α), ангіогенезом (VEGF), ремоделюванням і фіброзом тканин (MMP-9), автофагією (beclin-1), а також стресом ендоплазматичного ретикулула (GRP-78), як основних ланок патологічного процесу за хімічного пошкодження рогівки. K1-3 сприяє зростанню рівня ZO-1, протеїну щільних контактів, що свідчить про активацію реепітелізації рогівки після хімічного опіку. Продемонстровано протекторні ефекти ангіостатинів щодо клітин сателітної глії в травмованій рогівці, а також показано, що ангіостатини регулюють рівень протеїну ACE2, який слугує рецептором вірусу SARS-CoV-2, та нормальзують рівень рецептора після ушкодження, знижуючи ризик інфікування через рогівку.

2. Доведено антиангіогенну активність отриманих фрагментів плазміногену, що полягає у пригніченні неоваскуляризації рогівки кролика за умов експериментальної моделі лужного опіка та інгібуванні активності макрофагів. В експериментах *in vitro* встановлено, що фрагменти плазміногену K1-3 та K5 у діапазоні концентрацій 2-100 нМ не чинять

цитотоксичних ефектів по відношенню до клітин пігментного епітелію сітківки (RPE).

3. Встановлено, що введення тіаміну (вітаміну B₁) щурам, що отримували етанол у хронічному режимі, сприяє репаративним процесам у тканині рогівки за рахунок зменшення інтенсивності проапоптотичного сигналювання та коригування патологічних процесів, асоційованих з гіпоксією, ангіогенезом та ремоделюванням тканини. Показано нейропротекторну активність тіаміну в рогівці щурів, що полягає у зменшенні ступеня нейродегенерації, аберантних змін цитоскелету нейрональних клітин та надактивації сателітної глії, індукованих тривалим впливом етанолу.

4. Отримано та охарактеризовано високоафінні поліклональні кролячі антитіла до лактоферину людини. Отримані антитіла були використані у пілотному скринінговому дослідженні для детекції вмісту лактоферину в слізній рідині пацієнтів з непроникною травмою рогівки. Встановлено, що зниження рівня лактоферину за умов травматизації може слугувати діагностично-прогностичним маркером пошкодження рогівки.

5. Встановлено, що підвищення рівня MMP-9, HIF-1 α та ангіостатинів у слізній рідині пацієнтів з непроникними травмами рогівки можуть використовуватися як релевантні біомаркери ступеня пошкодження тканини та використовуватися для моніторингу репаративних процесів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Грабовий, О. М., Яременко, Л. М., Божко, О. Г., & Чайковський, Ю. Б. (2020). Компендіум зі спеціальної гістології та ембріології/ За ред. Член-кореспондента НАМН України, д.мед.н., професора Чайковського Ю. Б., Київ: Книга-Плюс, 344с.
2. Жупан, Б. Б., Лурін, І. А., Медведовська, Н. В., & Храмов, І. І. (2023). Перспективи прогнозування віддалених результатів лікування у пацієнтів з бойовою травмою органу зору. *Офтальмологічний журнал*, 512(3), 34–37.
3. Abhishek, K. J., Singh, D., Dubey, K., Maurya, R., Mittal, S., & Pandey, A. K. Models and Methods for *In Vitro* Toxicity Toxicology. Elsevier, 2018. 45–65.
4. Albin, A., Brigati, C., Ventura, A., Lorusso, G., Pinter, M., Morini, M., Mancino, A., Sica, A., & Noonan, D. M. (2009). Angiostatin anti-angiogenesis requires IL-12: the innate immune system as a key target. *Journal of Translational Medicine*, 7, 5. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-7-5>
5. Alegria-Schaffer, A. (2014). Western blotting using chemiluminescent substrates. *Methods in Enzymology*, 541, 251–259. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00019-7>
6. Alemanno, F., Ghisi, D., Westermann, B., Bettoni, A., Fanelli, A., La Colla, L., Danelli, G., & Cesana, B. M. (2016). The use of vitamin B1 as a perineural adjuvant to middle interscalene block for postoperative analgesia after shoulder surgery. *Acta bio-medica : Atenei Parmensis*, 87(1), 22–27.
7. Al-Fahdawi, S., Qahwaji, R., Al-Waisy, A., & Ipson, S. (2015). An automatic corneal subbasal nerve registration system using FFT and phase correlation techniques for an accurate DPN diagnosis. *2015 IEEE International Conference on Computer and Information Technology*, 1035-1041. <https://doi.org/10.1109/CIT/IUCC/DASC/PICOM.2015.157>
8. Alpogan, O., & Karakucuk, S. (2021). Lactoferrin: the natural protector of the eye against coronavirus-19. *Ocular Immunology and Inflammation*, 29(4), 751–752. <https://doi.org/10.1080/09273948.2021.1954202>
9. Ambati, B. K., Jousen, A. M., Ambati, J., Moromizato, Y., Guha, C., Javaherian, K., Gillies, S., O'Reilly, M. S., & Adamis, A. P. (2002). Angiostatin inhibits and regresses corneal neovascularization. *Archives of Ophthalmology*, 120(8), 1063–1068. <https://doi.org/10.1001/archopht.120.8.1063>
10. Ang, W. J., Boey, P. Y., Chua, J., Wong, T. T., Chan, C. M., Tong, L., & Tan, D. T. (2019). Evaluation of vascular endothelial growth factor levels in tears

- and serum among diabetic patients. *PLoS ONE*, *14*, e0221481. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221481>
11. Ao, J., Wood, J. P., Chidlow, G., Gillies, M. C., & Casson, R. J. (2018). Retinal pigment epithelium in the pathogenesis of age-related macular degeneration and photobiomodulation as a potential therapy? *Clinical and Experimental Ophthalmology*, *46*(6), 670–686. <https://doi.org/10.1111/ceo.13121>
 12. Arroyo, A. G., & Iruela-Arispe, M. L. (2010). Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. *Cardiovascular Research*, *86*(2), 226–235. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq049>
 13. Ayilam Ramachandran, R., Sanches, J. M., & Robertson, D. M. (2023). The roles of autophagy and mitophagy in corneal pathology: current knowledge and future perspectives. *Frontiers in Medicine*, *10*, 1064938. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1064938>
 14. Ayuningtyas, N. F., Chea, C., Ando, T., Saninggar, K. E., Tanimoto, K., Inubushi, T., Maishi, N., Hida, K., Shindoh, M., Miyauchi, M., & Takata, T. (2023). Bovine lactoferrin suppresses tumor angiogenesis through NF- κ B pathway inhibition by binding to TRAF6. *Pharmaceutics*, *15*(1), 165. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010165>
 15. Azevedo, F. A., Carvalho, L. R., Grinberg, L. T., Farfel, J. M., Ferretti, R. E., Leite, R. E., Lent, R., Herculano-Houzel, S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *Journal of Comparative Neurology*, *513*(5), 532–541. <https://doi.org/10.1002/cne.21974>
 16. Barbier, P., Zejneli, O., Martinho, M., Lasorsa, A., Belletti, G., Avila, J., & Rametti, A. (2019). Role of Tau as a microtubule-associated protein: Structural and functional aspects. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *11*, 204. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00204>
 17. Bargagna-Mohan, P., Schultz, G., Rheume, B., Trakhtenberg, E. F., Robson, P., Pal-Ghosh, S., Stepp, M. A., Given, K. S., Macklin, W. B., & Mohan, R. (2021). Corneal nonmyelinating Schwann cells illuminated by single-cell transcriptomics and visualized by protein biomarkers. *Journal of Neuroscience Research*, *99*(3), 731–749. <https://doi.org/10.1002/jnr.24757>
 18. Barrientez, B., Nicholas, S. E., Whelchel, A., Sharif, R., Hjortdal, J., & Karamichos, D. (2019). Corneal injury: Clinical and molecular aspects. *Experimental Eye Research*, *186*, 107709. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.107709>
 19. Benelli, R., Morini, M., Brigati, C., Noonan, D. M., & Albin, A. (2003). Angiostatin inhibits extracellular HIV-Tat-induced inflammatory angiogenesis. *International Journal of Oncology*, *22*(1), 87–91.
 20. Bielecka, M., Cichosz, G., & Czczot, H. (2022). Antioxidant, antimicrobial and anticarcinogenic activities of bovine milk proteins and their hydrolysates

- A review. *International Dairy Journal*, 127, 105208. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105208>
21. Bilous, V. L., Kapustianenko, L. G., & Tykhomyrov, A. O. (2021). Production and application of angiostatins for the treatment of ocular neovascular diseases. *Biotechnologia Acta*, 14(1), 5–24. <https://doi.org/10.15407/biotech14.01.005>
 22. Bilous, V. L., Kapustianenko, L. G., Yusova, O. I., Korsá, V. V., Nedzvetsky, V. S., Ağca, C. A., Ziablitsev, S. V., & Tykhomyrov, A. O. (2023). Angiostatins modulate ACE2 and GFAP levels in injured rat cornea and do not affect viability of retinal pigment epithelial cells. *Biopolymers and Cell*, 39(4), 299–310. <https://doi.org/10.7124/bc.000AA1>
 23. Blackburn, B. J., Jenkins, M. W., Rollins, A. M., & Dupps, W. J. A. (2019). Review of Structural and Biomechanical Changes in the Cornea in Aging, Disease, and Photochemical Crosslinking. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 66. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00066>
 24. Bruszel, B., Tóth-Molnár, E., Janáky, T., & Szabó, Z. (2024). Sources of variance in human tear proteomic samples: statistical evaluation, quality control, normalization, and biological insight. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(3), 1559. <https://doi.org/10.3390/ijms25031559>
 25. Caban, M., Owczarek, K., & Lewandowska, U. (2022). The role of metalloproteinases and their tissue inhibitors on ocular diseases: focusing on potential mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(8), 4256. <https://doi.org/10.3390/ijms23084256>
 26. Cannon, J. R., & Greenamyre, J. T. (2009). NeuN is not a reliable marker of dopamine neurons in rat substantia nigra. *Neuroscience Letters*, 464(1), 14–17. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.08.023>
 27. Cao, R., Wu, H. L., Veitonmäki, N., Linden, P., Farnebo, J., Shi, G. Y., & Cao, Y. (1999). Suppression of angiogenesis and tumor growth by the inhibitor K1-5 generated by plasmin-mediated proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(10), 5728–5733. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5728>
 28. Cao, Y., Chen, A., An, S. S. A., Ji, R.-W., Davidson, D., Cao, Y., & Llinas, M. (1997). Kringle 5 of plasminogen is a novel inhibitor of endothelial cell growth. *Journal of Biological Chemistry*, 272(36), 22924–22928. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.36.22924>
 29. Cao, Y., Ji, R., Davidson, D., Schaller, J., Marti, D., Sohndel, S., McCance, S., O'Reilly, M., Llinas, M., & Folkman, J. (1996). Kringle domains of human angiostatin. Characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 271(46), 29461–29467. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.46.29461>
 30. Carr, D. J., Ash, J., Al-Khatib, K., & Campbell, I. L. (2002). Unforeseen consequences of IL-12 expression in the eye of GFAP-інтерлейкін transgenic

- mice following herpes simplex virus type 1 infection. *DNA and Cell Biology*, 21(5-6), 467–473. <https://doi.org/10.1089/10445490260099764>
31. Chang, R., Ng, T. B., & Sun, W. Z. (2020). Lactoferrin as potential preventative and adjunct treatment for COVID-19. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 56(3), 106118. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106118>
 32. Chatterton, B. J., Nunes, P. T., & Savage, L. M. (2020). The Effect of Chronic Ethanol Exposure and Thiamine Deficiency on Myelin-related Genes in the Cortex and the Cerebellum. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 44(12), 2481–2493. <https://doi.org/10.1111/acer.14484>
 33. Chavakis, T., Athanasopoulos, A., Rhee, J. S., Orlova, V., Schmidt-Wöll, T., Bierhaus, A., May, A. E., Celik, I., Nawroth, P. P., & Preissner, K. T. (2005). Angiostatin is a novel anti-inflammatory factor by inhibiting leukocyte recruitment. *Blood*, 105(3), 1036–1043. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0166>
 34. Chen, C., Zhang, B., Xue, J., Li, Z., Dou, S., Chen, H., Wang, Q., Qu, M., Wang, H., Zhang, Y., Wan, L., Zhou, Q., & Xie, L. (2022). Pathogenic role of endoplasmic reticulum stress in diabetic corneal endothelial dysfunction. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 63(3), 4. <https://doi.org/10.1167/iovs.63.3.4>
 35. Chen, K., Bai, H., Arzigian, M., Gao, Y. X., Bao, J., Wu, W. S., Shen, W. F., & Wu, L., Wang, Z. Z. (2010). Endothelial cells regulate cardiomyocyte development from embryonic stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 111(1), 29–39.
 36. Chen, P., Yin, H., Wang, Y., Wang, Y., & Xie, L. (2012). Inhibition of VEGF expression and corneal neovascularization by shRNA targeting HIF-1 α in a mouse model of closed eye contact lens wear. *Molecular Vision*, 18, 864–873.
 37. Chen, X., Shi, C., He, M., Xiong, S., & Xia, X. (2023). Endoplasmic reticulum stress: molecular mechanism and therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 352. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01234-7>
 38. Chen, Y. H., Wu, H. L., Chen, C. K., Huang, Y. H., Yang, B. C., & Wu, L. W. (2003). Angiostatin antagonizes the action of VEGF-A in human endothelial cells via two distinct pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 310(3), 804–810. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.09.065>
 39. Cheng, E. H., Wei, M. C., Weiler, S., Flavell, R. A., Mak, T. W., Lindsten, T., & Korsmeyer, S. J. (2001). BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Molecular cell*, 8(3), 705–711. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00320-3](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00320-3)

40. Chipurupalli, S., Samavedam, U., & Robinson, N. (2021). Crosstalk between ER stress, autophagy and inflammation. *Frontiers in Medicine (Lausanne)*, *8*, 758311. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.758311>
41. Choi, H. S., Kim, J. W., Cha, Y. N., & Kim, C. (2006). A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, *27*(1), 31–44. <https://doi.org/10.1080/15321810500505179>
42. Choudhary, D. S., Verma, G., Kumar, K., Choudhary, P., Kalal, B. S., & Chaudhary, A. (2023). Bowman's membrane lenticule tuck-in: A new approach for the management of neurotrophic ulcers. *Saudi Journal of Ophthalmology*, *37*(2), 120–124. https://doi.org/10.4103/sjopt.sjopt_56_22
43. Coppini, L. P., Visniauskas, B., Costa, E. F., Filho, M. N., Rodrigues, E. B., Chagas, J. R., Farah, M. E., Barros, N. M., & Carmona, A. K. (2015). Corneal angiogenesis modulation by cysteine cathepsins: In vitro and in vivo studies. *Experimental Eye Research*, *134*, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.03.006>
44. Cornelius, L. A., Nehring, L. C., Harding, E., Bolanowski, M., Welgus, H. G., Kobayashi, D. K., Pierce, R. A., & Shapiro, S. D. (1998). Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. *Journal of Immunology*, *161*(12), 6845–6852.
45. Das, S. K., Gupta, I., Cho, Y. K., Zhang, X., Uehara, H., Muddana, S. K., Bernhisel, A. A., Archer, B., & Ambati, B. K. (2014). Vimentin knockdown decreases corneal opacity. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *55*(7), 4030–4040. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-14428>
46. de Castro, M. S., Reis, B. S. A., Nogueira, D. A., de Carli, M. L., Hanemann, J. A. C., Pereira, A. A. C., Almeida, O. P., & Sperandio, F. F. (2017). Primary oral melanoma: A clinicopathologic review and case presentation. *Quintessence international (Berlin, Germany : 1985)*, *48*(10), 815–827. <https://doi.org/10.3290/j.qi.a39077>
47. de Freitas Santoro, D., de Sousa, L. B., Câmara, N. O. S., de Freitas, D., & de Oliveira, L. A. (2021). SARS-COV-2 and ocular surface: From physiology to pathology, a route to understand transmission and disease. *Frontiers in Physiology*, *12*, 612319. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.612319>
48. del Amo, E. M. (2022). Topical ophthalmic administration: can a drug instilled onto the ocular surface exert an effect at the back of the eye? *Frontiers in Drug Delivery*, *2*, 954771. <https://doi.org/10.3389/fddev.2022.954771>
49. Deshmukh, R., Murthy, S. I., Rapuano, C. J., & Vajpayee, R. B. (2023). Graft rejection in component keratoplasty. *Indian Journal of Ophthalmology*, *71*(3), 698–706. https://doi.org/10.4103/ijo.IJO_1964_22
50. Deutsch, D. G., & Mertz, E. T. (1970). Plasminogen: purification from human plasma by affinity chromatography. *Science*, *170*(3962), 1095–1096. <https://doi.org/10.1126/science.170.3962.1095>

51. Di Zazzo, A., Gaudenzi, D., Yin, J., Coassin, M., Fernandes, M., Dana, R., & Bonini, S. (2021). Corneal angiogenic privilege and its failure. *Experimental Eye Research*, 204, 108457. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2021.108457>
52. Di Zazzo, A., Lee, S. M., Sung, J., Niutta, M., Coassin, M., & Mashaghi, A. (2020). Variable Responses to Corneal Grafts: Insights from Immunology and Systems Biology. *Journal of Clinical Medicine*, 9(2), 586. <https://doi.org/10.3390/jcm9020586>
53. Droho, S., Thomson, B. R., Makinde, H. M., Cuda, C. M., Perlman, H., & Lavine, J. A. (2020). Ocular macrophage origin and heterogeneity during steady state and experimental choroidal neovascularization. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 341. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01977-4>
54. Dua, H. S., Faraj, L. A., Said, D. G., Gray, T., & Lowe, J. (2013). Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). *Ophthalmology*, 120(9), 1778–1785. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2013.01.018>
55. Efron, N. (2000). *Efron Grading Scales for Contact Lens Complications (Millennium Edition)*. Butterworth-Heinemann.
56. Eluard, B., Thieblemont, C., & Baud, V. (2020). NF-κB in the new era of Cancer therapy. *Trends in Cancer*, 6, 677–687. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.04.003>
57. Ergül, M., & Taşkıran, A. Ş. (2021). Thiamine Protects Glioblastoma Cells against Glutamate Toxicity by Suppressing Oxidative/Endoplasmic Reticulum Stress. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 69(9), 832–839. <https://doi.org/10.1248/cpb.c21-00169>
58. Feizi, S., Azari, A. A., & Safapour, S. (2017). Therapeutic approaches for corneal neovascularization. *Eye and Vision*, 4, 28. <https://doi.org/10.1186/s40662-017-0094-6>
59. Flanagan, J. L., & Willcox, M. D. (2009). Role of lactoferrin in the tear film. *Biochimie*, 91(1), 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.07.007>
60. Frost, L. S., Mitchell, C. H., & Boesze-Battaglia, K. (2014). Autophagy in the eye: Implications for ocular cell health. *Experimental Eye Research*, 124, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.04.010>
61. Fu, Y. C., & Xin, Z. M. (2019). Inhibited corneal neovascularization in rabbits following corneal alkali burn by double-target interference for VEGF and HIF-1α. *Bioscience Reports*, 39(1), BSR20180552. <https://doi.org/10.1042/BSR20180552>
62. Gabison, E., Chang, J. H., Hernández-Quintela, E., Javier, J., Lu, P. C., Ye, H., Kure, T., Kato, T., & Azar, D. T. (2004). Anti-angiogenic role of angiostatin during corneal wound healing. *Experimental eye research*, 78(3), 579–589. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2003.09.005>

63. Gavrylyak, I. V., Greben, N. K., Bilous, V. L., Korska, V. V., Zhaboiedov, D. G., Ağca, C. A., & Tykhomyrov, A. O. (2022). 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*, 27(4), 168–176. <https://doi.org/10.26641/2307-0404.2022.4.271217>
64. Gavrylyak, I., Zhaboiedov, D., Greben, N., & Tykhomyrov, A. (2024). Tear lactoferrin and ceruloplasmin levels in patients with traumatic and recurrent corneal erosions. *Journal of Ophthalmology (Ukraine)*, 1, 8–14. <https://doi.org/10.31288/oftalmolzh20241814>
65. Geiger, J. H., & Cnudde, S. E. (2004). What the structure of angiostatin may tell us about its mechanism of action. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2, 23–34. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2004.00544.x>
66. Ghosh, A. K., Cesna, R., Ziniauskaite, A., Neverauskas, D., Eby, J. M., Ragauskas, S., & Kaja, S. (2021). Effects of chronic alcohol administration on the cornea in preclinical models. *ARVO Annual Meeting Abstract*, 62, 1314.
67. Goldring, J. P. D. (2019). Measuring protein concentration with absorbance, Lowry, Bradford Coomassie Blue, or the Smith bicinchoninic acid assay before electrophoresis. *Methods in Molecular Biology*, 1855, 31–39. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8793-1_3
68. Gomułka, K., Liebhart, J., Gładysz, U., & Mędrała, W. (2019). VEGF serum concentration and irreversible bronchoconstriction in adult asthmatics. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 28, 759–763. <https://doi.org/10.17219/acem/92012>
69. Gratton, S. M., & Lam, B. L. (2014). Visual loss and optic nerve head swelling in thiamine deficiency without prolonged dietary deficiency. *Clinical Ophthalmology*, 8, 1021–1024. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S64228>
70. Guindolet, D., Woodward, A. M., Gabison, E. E., & Argüeso, P. (2022). Alleviation of Endoplasmic Reticulum Stress Enhances Human Corneal Epithelial Cell Viability under Hyperosmotic Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 4528. <https://doi.org/10.3390/ijms23094528>
71. Guo, T., Noble, W., & Hanger, D. P. (2017). Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathologica*, 133, 665–704. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1707-9>
72. Guzyk, M. M., Tykhomyrov, A. A., Nedzvetsky, V. S., Prischeпа, I. V., Yanitska, L. V., Grinenko, T. V., & Kuchmerovska, T. M. (2016). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors reduce reactive gliosis and improve angiostatin levels in retina of diabetic rats. *Neurochemical Research*, 41(10), 2526–2537. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-1964-3>
73. Hadrian, K., Willenborg, S., Bock, F., Cursiefen, C., Eming, S. A., & Hos, D. (2021). Macrophage-Mediated Tissue Vascularization: Similarities and

- Differences Between Cornea and Skin. *Frontiers in Immunology*, 12, 667830. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.667830>
74. Han, J., Gao, L., Dong, J., Wang, Y., Zhang, M., & Zheng, J. (2017). Dopamine attenuates ethanol-induced neuroapoptosis in the developing rat retina via the cAMP/PKA pathway. *Molecular medicine reports*, 16(2), 1982–1990. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6823>
75. Hashimoto, T., & Shibasaki, F. (2015). Hypoxia-inducible factor as an angiogenic master switch. *Frontiers in Pediatrics*, 3, 33. <https://doi.org/10.3389/fped.2015.00033>
76. Hazell, A. S. (2009). Astrocytes are a major target in thiamine deficiency and Wernicke's encephalopathy. *Neurochemistry International*, 55(1/3), 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2009.02.020>
77. Hellinen, L., Hongisto, H., Ramsay, E., Kaarniranta, K., Vellonen, K. S., Skottman, H., & Ruponen, M. (2020). Drug flux across RPE cell models: the hunt for an appropriate outer blood-retinal barrier model for use in early drug discovery. *Pharmaceutics*, 12(2), 176. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020176>
78. Hoffman, J., & Foster, A. (2020). Viral diseases of the eye. *Community Eye Health*, 33(108), 65-67.
79. Hopp, T. P., Spiewak, K., Matthews, M. H., Athanasiou, Z., Blackmore, R. S., & Gelbfish, G. A. (2022). Characterization of proteolytic degradation products of vaginally administered bovine lactoferrin. *PloS one*, 17(5), e0268537. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0268537>
80. Hrubša, M., Siatka, T., Nejmanová, I., Vopršalová, M., Kujovská Krčmová, L., Matoušová, K., Javorská, L., Macáková, K., Micolini, L., Remião, F., Mátuš, M., Mladěnka, P., & On Behalf Of The Oeonom (2022). Biological Properties of Vitamins of the B-Complex, Part 1: Vitamins B₁, B₂, B₃, and B₅. *Nutrients*, 14(3), 484. <https://doi.org/10.3390/nu14030484>
81. Jiang, Q. W., Kaili, D., Freeman, J., Lei, C. Y., Geng, B. C., Tan, T., He, J. F., Shi, Z., Ma, J. J., Luo, Y. H., Chandler, H., & Zhu, H. (2019). Diabetes inhibits corneal epithelial cell migration and tight junction formation in mice and human via increasing ROS and impairing Akt signaling. *Acta pharmacologica Sinica*, 40(9), 1205–1211. <https://doi.org/10.1038/s41401-019-0223-y>
82. Jiang, Z., Zhang, H., Gao, J., Yu, H., Han, R., Zhu, L., Chen, X., Fan, Q., Hao, P., Wang, L., & Li, X. (2021). ACE2 Expression Is Upregulated in Inflammatory Corneal Epithelial Cells and Attenuated by Resveratrol. *Investigative ophthalmology & visual science*, 62(7), 25. <https://doi.org/10.1167/iovs.62.7.25>
83. Jiao, H., Downie, L. E., Huang, X., Wu, M., Oberrauch, S., Keenan, R. J., Jacobson, L. H., & Chinnery, H. R. (2020). Novel alterations in corneal neuroimmune phenotypes in mice with central nervous system tauopathy.

- Journal of neuroinflammation*, 17(1), 136. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01803-7>
84. Jonas, J. B., Nangia, V., Sinha, A., & Gupta, R. (2011). Corneal Refractive Power and Its Associations with Ocular and General Parameters: The Central India Eye and Medical Study. *Ophthalmology*, 118(9), 1805–1811. <https://doi.org/10.1016/j.optha.2011.02.001>
85. Jones, G., Lee, T. J., Glass, J., Rountree, G., Ulrich, L., Estes, A., Sezer, M., Zhi, W., Sharma, S., & Sharma, A. (2022). Comparison of Different Mass Spectrometry Workflows for the Proteomic Analysis of Tear Fluid. *International journal of molecular sciences*, 23(4), 2307. <https://doi.org/10.3390/ijms23042307>
86. Joo, C. K., & Seomun, Y. (2008). Matrix metalloproteinase (MMP) and TGF beta 1-stimulated cell migration in skin and cornea wound healing. *Cell Adhesion & Migration*, 2(4), 252–253. <https://doi.org/10.4161/cam.2.4.6772>
87. Jung, S., & Chin, H. S. (2022). Effect of Alcohol on Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Retinal Pigment Epithelium Cells and Angiogenesis. *Journal of Retina*, 7(1), 1–8. <https://doi.org/10.21561/jor.2022.7.1.1>
88. Kamrath Betancor, P., Hildebrand, A., Böhringer, D., Emmerich, F., Schlunck, G., Reinhard, T., & Lapp, T. (2018). Activation of human macrophages by human corneal allogeneic cells in vitro. *PLoS One*, 13(4), e0194855. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194855>
89. Kapoor, B., Singh, A., Gulati, M., Singh, S. K., Rani, P., Alzahrani, Q., Dua, K., Dureja, H., & Corrie, L. (2022). Orchestration of Obesolytic Activity of Microbiome: Metabiotics at Centre Stage. *Current drug metabolism*, 23(2), 90–98. <https://doi.org/10.2174/1389200223666220211095024>
90. Kapustianenko, L. G. (2017). Polyclonal antibodies against human plasminogen kringle 5. *Biotechnologia Acta*, 10(3), 41–49. <https://doi.org/10.15407/biotech10.03.041>
91. Karakus, S., Foster, J., Dai, X., Gonzales, A., Zhu, X., Eberhart, C., & Hsu, W. (2022). Prevalence of SARS-CoV-2 in conjunctival swab samples among patients presenting with conjunctivitis during the COVID-19 pandemic. *Clinical Ophthalmology*, 16, 127–133. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S343793>
92. Karimi, S., Arabi, A., & Shahraki, T. (2021). Alcohol and the Eye. *Journal of Ophthalmic & Vision Research*, 16(2), 260–270. <https://doi.org/10.18502/jovr.v16i2.9089>
93. Karmakar, R., Nooshabadi, S., Lohmeier, J., Terrin, S., & Eghrari, A. O. (2023). Alcohol Abuse Is Associated With Alterations in Corneal Endothelial Cell Morphology. *Cornea*, 42(4), 444–448. <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000003067>

94. Kaya, S. G., Inanc-Surer, S., Cakan-Akdogan, G., Oktay, G., Utine, C. A., & Kalyoncu, S. (2021). Roles of matrix metalloproteinases in the cornea: a special focus on macular corneal dystrophy. *Medicine in Drug Discovery*, *11*, 100095.
95. Ke, Q., & Costa, M. (2006). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Molecular Pharmacology*, *70*, 1469–1480. <https://doi.org/10.1124/mol.106.027029>
96. Kell, D. B., Heyden, E. L., & Pretorius, E. (2020). The biology of lactoferrin, an iron-binding protein that can help defend against viruses and bacteria. *Frontiers in Immunology*, *11*, 1221. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01221>
97. Kempuraj, D., & Mohan, R. R. (2022). Autophagy in Extracellular Matrix and Wound Healing Modulation in the Cornea. *Biomedicines*, *10*(2), 339. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020339>
98. Kim, H. B., Morris, J., Miyashiro, K., Lehto, T., Langel, Ü., Eberwine, J., & Sul, J. Y. (2021). Astrocytes promote ethanol-induced enhancement of intracellular Ca²⁺ signals through intercellular communication with neurons. *iScience*, *24*(5), 102436. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102436>
99. Kim, Y., Choi, H., Lee, W., Park, H., Kam, T. I., Hong, S. H., Nah, J., Jung, S., Shin, B., Lee, H., Choi, T. Y., Choo, H., Kim, K. K., Choi, S. Y., Kaye, R., & Jung, Y. K. (2016). Caspase-cleaved tau exhibits rapid memory impairment associated with tau oligomers in a transgenic mouse model. *Neurobiology of disease*, *87*, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.12.006>
100. Kowalczyk, P., Kaczyńska, K., Kleczkowska, P., Bukowska-Ośko, I., Kramkowski, K., & Sulejczak, D. (2022). The lactoferrin phenomenon - a miracle molecule. *Molecules*, *27*(9), 2941.
101. Kuo, M. T., Fang, P. C., Chao, T. L., Chen, A., Lai, Y. H., Huang, Y. T., & Tseng, C. Y. (2019). Tear proteomics approach to monitoring Sjögren syndrome or dry eye disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(8), 1932.
102. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
103. Lasagni Vitar, M., Rama, P., & Ferrari, G. (2022). The twofaced effects of nerves and neuropeptides in corneal diseases. *Progress in Retinal and Eye Research*, *86*, 100974. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2021.100974>
104. Lee, T. L., Yeh, J., Friedman, J., Yan, B., Yang, X., Yeh, N. T., Van Waes, C., & Chen, Z. (2008). A signal network involving coactivated NF-kappaB and STAT3 and altered p53 modulates BAX/BCL-XL expression and promotes cell survival of head and neck squamous cell carcinomas.

- International journal of cancer*, 122(9), 1987–1998. <https://doi.org/10.1002/ijc.23324>
105. Lee, T. Y., Muschal, S., Pravda, E. A., Folkman, J., Abdollahi, A., & Javaherian, K. (2009). Angiostatin regulates the expression of antiangiogenic and proapoptotic pathways via targeted inhibition of mitochondrial proteins. *Blood*, 114(9), 1987–1998. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-211862>
 106. Leyns, C. E. G., & Holtzman, D. M. (2017). Glial contributions to neurodegeneration in tauopathies. *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0192-x>
 107. Li, Q., Liu, D., Pan, F., Ho, C. S. H., & Ho, R. C. M. (2019). Ethanol Exposure Induces Microglia Activation and Neuroinflammation through TLR4 Activation and SENP6 Modulation in the Adolescent Rat Hippocampus. *Neural plasticity*, 2019, 1648736. <https://doi.org/10.1155/2019/1648736>
 108. Liu, D., Ke, Z., & Luo, J. (2017). Thiamine deficiency and neurodegeneration: the interplay among oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and autophagy. *Molecular Neurobiology*, 54(7), 5440–5448. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0079-9>
 109. Liu, S., Wong, Y. L., & Walkden, A. (2022). Current Perspectives on Corneal Transplantation. *Clinical ophthalmology (Auckland, N.Z.)*, 16, 631–646. <https://doi.org/10.2147/OPTH.S289359>
 110. Liu, Z., Liu, G., Ha, D. P., Wang, J., Xiong, M., & Lee, A. S. (2023). ER chaperone GRP78/BiP translocates to the nucleus under stress and acts as a transcriptional regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 120(31), e2303448120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2303448120>
 111. Loi, J. K., Alexandre, Y. O., Senthil, K., Schienstock, D., Sandford, S., Devi, S., Christo, S. N., Mackay, L. K., Chinnery, H. R., Osborne, P. B., Downie, L. E., Sloan, E. K., & Mueller, S. N. (2022). Corneal tissue-resident memory T cells form a unique immune compartment at the ocular surface. *Cell reports*, 39(8), 110852. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110852>
 112. Lucas, R., Holmgren, L., Garcia, I., et al. (1998). Multiple forms of angiostatin induce apoptosis in endothelial cells. *Blood*, 92(12), 4730–4741.
 113. Lundgaard, T., Wang, W., Eberhardt, A., Muschal, S., Pravda, E. A., Folkman, J., Abdollahi, A., & Javaherian, K. (2018). Beneficial effects of low alcohol exposure, but adverse effects of high alcohol intake on glymphatic function. *Scientific Reports*, 8(1), 2246. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20424-y>
 114. Ma, J. Y. W., Sze, Y. H., Bian, J. F., & Lam, T. C. (2021). Critical role of mass spectrometry proteomics in tear biomarker discovery for multifactorial ocular diseases. *International Journal of Molecular Medicine*, 47(5), 83. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.4916>

115. Ma, P., Pan, X., Liu, R., Qu, Y., Xie, L., Xie, J., & Chen, Y. (2022). Ocular adverse events associated with anti-VEGF therapy: A pharmacovigilance study of the FDA adverse event reporting system (FAERS). *Frontiers in Pharmacology*, *13*, 1017889. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1017889>
116. Majeed, A., Marwick, B., Yu, H., Fadavi, H., & Tavakoli, M. (2021). Ophthalmic Biomarkers for Alzheimer's Disease: A Review. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *13*, 720167. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.720167>
117. Mallapaty, S. (2022). A surprise in the eye: long-lived T cells patrol the cornea. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/d41586-022-01578-2>
118. Marquez, A., Guernsey, L. S., Frizzi, K. E., Cundiff, M., Constantino, I., Muttalib, N., Arenas, F., Zhou, X., Lim, S. H., Ferdousi, M., Ponirakis, G., Silverdale, M., Kobylecki, C., Jones, M., Marshall, A., Malik, R. A., & Jolival, C. G. (2021). Tau associated peripheral and central neurodegeneration: Identification of an early imaging marker for tauopathy. *Neurobiology of disease*, *151*, 105273. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105273>
119. Massucci, M. T., Giansanti, F., Di Nino, G., Turacchio, M., Giardi, M. F., Botti, D., Ippoliti, R., De Giulio, B., Siciliano, R. A., Donnarumma, G., Valenti, P., Bocedi, A., Polticelli, F., & Ascenzi, P. (2004). Proteolytic activity of bovine lactoferrin. *Biometals*, *17*(3), 249–255. <https://doi.org/10.1023/b:biom.0000027700.90780.45>
120. Masuoka, T., Yamashita, Y., Nakano, K., Takechi, K., Niimura, T., Tawa, M., He, Q., Ishizawa, K., & Ishibashi, T. (2020). Chronic Tear Deficiency Sensitizes Transient Receptor Potential Vanilloid 1-Mediated Responses in Corneal Sensory Nerves. *Frontiers in cellular neuroscience*, *14*, 598678. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.598678>
121. Matsumura-Takeda, K., Ishida, T., Sogo, S., Isakari, Y., Taki, T., Sudo, T., & Kiwada, H. (2008). Lactoferrin inhibits platelet production from human megakaryocytes in vitro. *Biological & pharmaceutical bulletin*, *31*(4), 569–573. <https://doi.org/10.1248/bpb.31.569>
122. Medeiros, C. S., Marino, G. K., Santhiago, M. R., & Wilson, S. E. (2018). The Corneal Basement Membranes and Stromal Fibrosis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *59*(10), 4044–4053. <https://doi.org/10.1167/iovs.18-24428>
123. Mohlin, C., Taylor, L., Ghosh, F., & Johansson, K. (2014). Autophagy and ER-stress contribute to photoreceptor degeneration in cultured adult porcine retina. *Brain Research*, *1585*, 167–183. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.08.055>
124. Morris, N. L., & Yeligar, S. M. (2018). Role of HIF-1 α in Alcohol-Mediated Multiple Organ Dysfunction. *Biomolecules*, *8*(4), 170. <https://doi.org/10.3390/biom8040170>

125. Motevasseli, T., Mohammadi, S., Abdi, F., & Freeman, W. R. (2021). Side Effects of Brolucizumab. *Journal of Ophthalmic & Vision Research*, *16*(4), 670–675. <https://doi.org/10.18502/jovr.v16i4.9757>
126. Moulton, K. S., Vakili, K., Zurakowski, D., Soliman, M., Butterfield, C., Sylvin, E., Lo, K. M., Gillies, S., Javaherian, K., & Folkman, J. (2003). Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(8), 4736–4741. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730843100>
127. Mruk, D. D., & Cheng, C. Y. (2011). Enhanced chemiluminescence (ECL) for routine immunoblotting: an inexpensive alternative to commercially available kits. *Spermatogenesis*, *1*(2), 121–122. <https://doi.org/10.4161/spmg.1.2.15976>
128. Nebbioso, M., Rusciano, D., Pucci, B., Zicari, A. M., Grenga, R., & Pescocolido, N. (2013). Treatment of glaucomatous patients by means of food supplement to reduce the ocular discomfort: a double blind randomized trial. *European review for medical and pharmacological sciences*, *17*(8), 1117–1122.
129. Nicholas, M. P., & Mysore, N. (2021). Corneal neovascularization. *Experimental Eye Research*, *202*, 108363. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108363>
130. Nunes, P. T., Kipp, B. T., Reitz, N. L., & Savage, L. M. (2019). Aging with alcohol-related brain damage: Critical brain circuits associated with cognitive dysfunction. *International review of neurobiology*, *148*, 101–168. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2019.09.002>
131. Oh, J. Y., Yu, J. M., & Ko, J. H. (2013). Analysis of ethanol effects on corneal epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *54*(6), 3852–3856. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-11717>
132. Ohashi, Y., Ishida, R., Kojima, T., Goto, E., Matsumoto, Y., Watanabe, K., Ishida, N., Nakata, K., Takeuchi, T., & Tsubota, K. (2003). Abnormal protein profiles in tears with dry eye syndrome. *American Journal of Ophthalmology*, *136*(2), 291–299. [https://doi.org/10.1016/S0002-9394\(03\)00289-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9394(03)00289-9)
133. O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R. A., Moses, M., Lane, W. S., Cao, Y., Sage, E. H., & Folkman, J. (1994). Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, *79*(2), 315–328. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90200-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90200-3)
134. Pang, K., Lennikov, A., & Yang, M. (2021). Hypoxia adaptation in the cornea: Current animal models and underlying mechanisms. *Animal Model Experimental Medicine*, *4*(4), 300–310. <https://doi.org/10.1002/ame2.12190>

135. Park, G. W., Heo, J., Kang, J. Y., Yang, J. W., Kim, J. S., Kwon, K. D., Yu, B. C., & Lee, S. J. (2020). Topical cell-free conditioned media harvested from adipose tissue-derived stem cells promote recovery from corneal epithelial defects caused by chemical burns. *Scientific Reports*, *10*(1), 12448. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69325-0>
136. Parkhomenko, M., Pavlova, A. S., & Mezhenkaya, O. A. (2016). Mechanisms responsible for the high sensitivity of neural cells to vitamin B1 deficiency. *Neurophysiology*, *48*, 429–448. <https://doi.org/10.1007/s11062-017-9620-3>
137. Pavlova, O. S., Bilous, V. L., Korska, V. V., Stepanenko, S. P., Parkhomenko, Yu. M., & Tykhomyrov, A. O. (2022). 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*, *54*(1-2), 25–36. <https://doi.org/10.1007/s11062-023-09932-4>
138. Pavlova, O. S., Tykhomyrov, A. A., Mejenskaya, O. A., Stepanenko S. P., Chehivska L. I., & Parkhomenko Yu. M. (2019). High thiamine dose restores levels of specific astroglial proteins in rat brain astrocytes affected by chronic ethanol consumption. *Ukrainian Biochemical Journal*, *91*(4), 41–49. <https://doi.org/10.15407/ubj91.04.041>
139. Pawłowski, K., Rychlewski, L., Reed, J. C., & Godzik, A. (2000). From fold to function predictions: an apoptosis regulator protein BID. *Computers & chemistry*, *24*(3-4), 511–517. [https://doi.org/10.1016/s0097-8485\(99\)00081-9](https://doi.org/10.1016/s0097-8485(99)00081-9)
140. Peral, A., Mateo, J., Domínguez-Godínez, C. O., Carracedo, G., Gómez, J. A., Crooke, A., & Pintor, J. (2022). Therapeutic potential of topical administration of siRNAs against HIF-1 α for corneal neovascularization. *Experimental Eye Research*, *219*, 109036. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2021.109036>
141. Perri, S. R., Annabi, B., & Galipeau, J. (2007). Angiostatin inhibits monocyte/macrophage migration via disruption of actin cytoskeleton. *FASEB Journal*, *21*(14), 3928–3936. <https://doi.org/10.1096/fj.07-8879com>
142. Petrillo, F., Petrillo, A., Sasso, F. P., Schettino, A., Maione, A., & Galdiero, M. (2022). Viral Infection and Antiviral Treatments in Ocular Pathologies. *Microorganisms*, *10*(11), 2224. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112224>
143. Pflugfelder, S. C., & Stern, M. E. (2020). Biological functions of tear film. *Experimental Eye Research*, *197*, 108115. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108115>
144. Plastino, F., Pesce, N. A., & André, H. (2021). MicroRNAs and the HIF/VEGF axis in ocular neovascular diseases. *Acta Ophthalmologica*, *99*, e1255-e1262. <https://doi.org/10.1111/aos.14845>

145. Ponzini, E., Scotti, L., Grandori, R., Tavazzi, S., & Zambon, A. (2020). Lactoferrin concentration in human tears and ocular diseases: A meta-analysis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *61*(12), 9. <https://doi.org/10.1167/iovs.61.12.9>
146. Puzer, L., Barros, N. M., Paschoalin, T., Hirata, I. Y., Tanaka, A. S., Oliveira, M. C., Brömme, D., & Carmona, A. K. (2008). Cathepsin V, but not cathepsins L, B and K, may release angiostatin-like fragments from plasminogen. *Biological chemistry*, *389*(2), 195–200. <https://doi.org/10.1515/BC.2008.020>
147. Qazi, Y., Wong, G., Monson, B., Stringham, J., & Ambati, B. K. (2010). Corneal transparency: genesis, maintenance and dysfunction. *Brain research bulletin*, *81*(2-3), 198–210. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.05.019>
148. Ramakrishnan, S., Anand, V., & Roy, S. (2014). Vascular endothelial growth factor signaling in hypoxia and inflammation. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, *9*(2), 142–160. <https://doi.org/10.1007/s11481-014-9531-7>
149. Regueiro, U., López-López, M., Varela-Fernández, R., Otero-Espinar, F. J., & Lema, I. (2023). Biomedical applications of lactoferrin on the ocular surface. *Pharmaceutics*, *15*(3), 865. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030865>
150. Ren, X., Chou, Y., Jiang, X., Hao, R., Wang, Y., Chen, Y., & Li, X. (2020). Effects of Oral Vitamin B1 and Mecobalamin on Dry Eye Disease. *Journal of Ophthalmology*, *2020*, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2020/9539674>
151. Ren, X., Chou, Y., Wang, Y., Jing, D., Chen, Y., & Li, X. (2022). The Utility of Oral Vitamin B1 and Mecobalamin to Improve Corneal Nerves in Dry Eye Disease: An In Vivo Confocal Microscopy Study. *Nutrients*, *14*(18), 3750. <https://doi.org/10.3390/nu14183750>
152. Roehrich, H., Yuan, C., & Hou, J. H. (2020). Immunohistochemical study of SARS-CoV-2 viral entry factors in the cornea and ocular surface. *Cornea*, *39*(12), 1556–1562. <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000002511>
153. Rosa, L., Cutone, A., Lepanto, M. S., Paesano, R., & Valenti, P. (2017). Lactoferrin: A Natural Glycoprotein Involved in Iron and Inflammatory Homeostasis. *International journal of molecular sciences*, *18*(9), 1985. <https://doi.org/10.3390/ijms18091985>
154. Roszkowska, A. M., Licitra, C., Tumminello, G., Postorino, E. I., Colonna, M. R., & Aragona, P. (2021). Corneal nerves in diabetes - The role of the in vivo corneal confocal microscopy of the subbasal nerve plexus in the assessment of peripheral small fiber neuropathy. *Survey of Ophthalmology*, *66*(3), 493–513. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2020.09.003>
155. Sabatucci, A., Vachette, P., Vasilyev, V. B., Beltramini, M., Sokolov, A., Pulina, M., Salvato, B., Angelucci, C. B., Maccarrone, M., & Cozzani, I.

- (2007). Structural characterization of the ceruloplasmin: lactoferrin complex in solution. *Journal of Molecular Biology*, 371(4), 1038–1046. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.089>
156. Sack, R. A., Beaton, A. R., & Sathe, S. (1999). Diurnal variations in angiostatin in human tear fluid: A possible role in prevention of corneal neovascularization. *Current Eye Research*, 18(3), 186–193. <https://doi.org/10.1076/ceyr.18.3.186.5367>
157. Saunders, D. E., DiCerbo, J. A., Williams, J. R., & Hannigan, J. H. (1997). Alcohol reduces neurofilament protein levels in primary cultured hippocampal neurons. *Alcohol*, 14(5), 519–526. [https://doi.org/10.1016/s0741-8329\(97\)00043-8](https://doi.org/10.1016/s0741-8329(97)00043-8)
158. Schnichels, S., Rohrbach, J. M., Bayyoud, T., Thaler, S., Ziemssen, F., & Hurst, J. (2021). Can SARS-CoV-2 infect the eye? An overview of the receptor status in ocular tissue. *Der Ophthalmologe*, 118(1), 81–84. <https://doi.org/10.1007/s00347-020-01281-5>
159. Sechi, G., & Serra, A. (2007). Wernicke's encephalopathy: New clinical settings and recent advances in diagnosis and management. *The Lancet. Neurology*, 6(5), 442–455. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(07\)70104-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70104-7)
160. Sharif, Z., & Sharif, W. (2019). Corneal neovascularization: Updates on pathophysiology, investigations & management. *Romanian Journal of Ophthalmology*, 63(1), 15–22.
161. Simões, A. L. B., Giorgetto, C., Carmo, E. C., Machado, N. B., Sanada, L. S., & Fazan, V. P. S. (2016). An immunohistochemistry protocol to identify satellite glial cells positive for GFAP in the dorsal root ganglion of rats in different ages. *Experimental Biology*, 30(S1), 564.2–564.2. https://doi.org/10.1096/fasebj.30.1_supplement.564.2
162. Slegers, T. P., Torres, P. F., Broersma, L., van Rooijen, N., van Rij, G., & van der Gaag, R. (2000). Effect of macrophage depletion on immune effector mechanisms during corneal allograft rejection in rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41(8), 2239–2247. [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(00\)00539-4](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(00)00539-4)
163. Snoek-van Beurden, P. A., & Von den Hoff, J. W. (2005). Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques*, 38(1), 73–83. <https://doi.org/10.2144/05381bm08>
164. Song, B. J., Akbar, M., Abdelmegeed, M. A., Byun, K., Lee, B., Yoon, S. K., & Hardwick, J. P. (2014). Mitochondrial dysfunction and tissue injury by alcohol, high fat, nonalcoholic substances and pathological conditions through post-translational protein modifications. *Redox biology*, 3, 109–123. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.10.004>
165. Sottrup-Jensen, L., Claeys, H., Zajdel, M., Petersen, T. E., & Magnusson, S. (1978). The primary structure of human plasminogen: isolation of two

- lysine-binding fragments and one ‘mini-’ plasminogen (MW 38,000) by elastase-catalyzed-specific limited proteolysis. *Progress in chemical fibrinolysis and thrombolysis*, 3., 191–209.
166. Sparrow, J. R., Wu, Y., Kim, C. Y., & Zhou, J. (2010). Phospholipid meets all-trans-retinal: the making of RPE bisretinoids. *Journal of lipid research*, 51(2), 247–261. <https://doi.org/10.1194/jlr.R000687>
 167. Sprogyte, L., Park, M., & Di Girolamo, N. (2023). Pathogenesis of Alkali Injury-Induced Limbal Stem Cell Deficiency: A Literature Survey of Animal Models. *Cells*, 12(9), 1294. <https://doi.org/10.3390/cells12091294>
 168. Sridhar, M. S. (2018). Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian Journal of Ophthalmology*, 66(2), 190–194. https://doi.org/10.4103/ijo.IJO_646_17
 169. Stephenson, J. L., & Byers, M. R. (1995). GFAP immunoreactivity in trigeminal ganglion satellite cells after tooth injury in rats. *Experimental Neurology*, 131(1), 11–22. <https://doi.org/10.1006/exnr.1995.1083>
 170. Stepp, M. A., Tadvalkar, G., Hakh, R., & Pal-Ghosh, S. (2017). Corneal epithelial cells function as surrogate Schwann cells for their sensory nerves. *Glia*, 65(6), 851–863. <https://doi.org/10.1002/glia.23102>
 171. Stoscheck C. M. (1990). Quantitation of protein. *Methods in enzymology*, 182, 50–68. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)82008-p](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)82008-p)
 172. Syed, Z. A., Meghpara, B. B., Hammersmith, K. M., & Rapuano, C. J. (2021). Corneal Manifestations of Metabolic Disease. In D. Albert, J. Miller, D. Azar, & L. H. Young (Eds.), *Albert and Jakobiec's Principles and Practice of Ophthalmology*. Springer. 1–38. https://doi.org/10.1007/978-3-319-90495-5_207-1
 173. Thompson, E. M., Halvorson, K., & McLendon, R. (2018). Sulfonylurea receptor 1 expression is variable in adult and pediatric brain tumors. *Clinical Neuropathology*, 37(5), 221–227. <https://doi.org/10.5414/NP301102>
 174. Tidke, S. C., & Tidke, P. (2022). A Review of corneal blindness: causes and management. *Cureus*, 14(10), e30097. <https://doi.org/10.7759/cureus.30097>
 175. Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4350–4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>
 176. Tran, S., Fairlie, W. D., & Lee, E. F. (2021). BECLIN1: Protein Structure, Function and Regulation. *Cells*, 10(6), 1522. <https://doi.org/10.3390/cells10061522>

177. Triolo, D., Dina, G., Lorenzetti, I., Malaguti, M., Morana, P., Del Carro, U., Comi, G., Messing, A., Quattrini, A., & Previtali, S. C. (2006). Loss of glial fibrillary acidic protein (GFAP) impairs Schwann cell proliferation and delays nerve regeneration after damage. *Journal of cell science*, *119*(Pt 19), 3981–3993. <https://doi.org/10.1242/jcs.03168>
178. Tual-Chalot, S., Garcia-Collado, M., Redgrave, R. E., Singh, E., Davison, B., Park, C., Lin, H., Luli, S., Jin, Y., Wang, Y., Lawrie, A., Jakobsson, L., & Arthur, H. M. (2020). Loss of Endothelial Endoglin Promotes High-Output Heart Failure Through Peripheral Arteriovenous Shunting Driven by VEGF Signaling. *Circulation research*, *126*(2), 243–257. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.315974>
179. Tykhomyrov, A. A., Nedzvetsky, V. S., Ağca, C. A., Korsá, V. V., & Grinenko, T. V. (2017). Plasminogen and its fragments in rat brain: a plausible role for astrocytes in angiostatin generation. *Ukrainian Biochemical Journal*, *89*(2), 43–54. <https://doi.org/10.15407/ubj89.02.043>
180. Tykhomyrov, A. A., Yusova, E. I., Diordieva, S. I., Corsa, V. V., & Grinenko, T. V. (2013). Production and characteristics of antibodies against K1-3 fragment of human plasminogen. *Biotechnologia Acta*, *6*(1), 87–97. <https://doi.org/10.15407/biotech6.01.086>
181. Tykhomyrov, A., Yusova, O., Kapustianenko, L., Bilous, V., Drobotko, T., Gavryliak, I., Greben, N., & Ağca, C. A. (2022). Production of anti-lactoferrin antibodies and their application in analysis of the tear fluid in health and corneal injuries. *Biotechnologia Acta*, *15*(5), 31–40. <https://doi.org/10.15407/biotech15.05.031>
182. Ucak, T., Karakurt, Y., Tasli, G., Cimen, F. K., Icel, E., Kurt, N., Ahiskali, I., & Süleyman, H. (2019). The effects of thiamine pyrophosphate on ethanol induced optic nerve damage. *BMC Pharmacology and Toxicology*, *20*(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s40360-019-0319-5>
183. Unal-Cevik, I., Kiliñ, M., Gürsoy-Ozdemir, Y., Gurer, G., & Dalkara, T. (2004). Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note. *Brain Research*, *1015*, 169–174. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.04.032>
184. Vadlapatla, R. K., Vadlapudi, A. D., & Mitra, A. K. (2013). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a potential target for intervention in ocular neovascular diseases. *Current Drug Targets*, *14*(8), 919–935. <https://doi.org/10.2174/13894501113149990015>
185. Vagge, A., Senni, C., Bernabei, F., Pellegrini, M., Scorcía, V., Traverso, C. E., & Giannaccare, G. (2020). Therapeutic Effects of Lactoferrin in Ocular Diseases: From Dry Eye Disease to Infections. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(18), 6668. <https://doi.org/10.3390/ijms21186668>

186. Valenti, P., & Antonini, G. (2005). Lactoferrin: an important host defense against microbial and viral attack. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *62*(22), 2576–2587. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5372-0>
187. Valle, M. L., Anderson, Y. T., Grimsey, N., & Zastre, J. (2022). Thiamine insufficiency induces Hypoxia Inducible Factor-1 α as an upstream mediator for neurotoxicity and AD-like pathology. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *123*, 103785. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2022.103785>
188. Van Uden, P., Kenneth, N. S., & Rocha, S. (2008). Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by NF- κ B. *Biochemical Journal*, *412*, 477–484. <https://doi.org/10.1042/BJ20080476>
189. Vézina, M. (2012). Comparative Ocular Anatomy in Commonly Used Laboratory Animals. In: Weir, A., Collins, M. (eds) *Assessing Ocular Toxicology in Laboratory Animals. Molecular and Integrative Toxicology*. Humana Press, Totowa, NJ, 1-21. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-164-6_1
190. Villabona-Martinez, V., Sampaio, L. P., Shiju, T. M., & Wilson, S. E. (2023). Standardization of corneal alkali burn methodology in rabbits. *Experimental Eye Research*, *230*, 109443. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2023.109443>
191. Vizuete, A. F. K., Mussulini, B. H., Zenki, K. C., Baggio, S., Pasqualotto, A., Rosemberg, D. B., Bogo, M. R., de Oliveira, D. L., & Rico, E. P. (2022). Prolonged ethanol exposure alters glutamate uptake leading to astrogliosis and neuroinflammation in adult zebrafish brain. *Neurotoxicology*, *88*, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2021.10.014>
192. Vogten, J. M., Reijerkerk, A., Meijers, J. C., Voest, E. E., Borel Rinkes, I. H., & Gebbink, M. F. (2003). The role of the fibrinolytic system in corneal angiogenesis. *Angiogenesis*, *6*(4), 311-316. <https://doi.org/10.1023/B:0000029414.24060.fe>
193. Wahl, M. L., Kenan, D. J., Gonzalez-Gronow, M., & Pizzo, S. V. (2005). Angiostatin's molecular mechanism: aspects of specificity and regulation elucidated. *Journal of Cellular Biochemistry*, *96*(2), 242-261. <https://doi.org/10.1002/jcb.20618>
194. Wakabayashi, H., Oda, H., & Yamauchi, K., & Abe, F. (2014). Lactoferrin for prevention of common viral infections. *Journal of Infection and Chemotherapy*, *20*(11), 666–671. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2014.07.004>
195. Wang, W., Deng, M., Li, M., Liu, L., Zou, J., & Qian, Y. (2024). Exploring Corneal Neovascularization: An Integrated Approach Using Transcriptomics and Proteomics in an Alkali Burn Mouse Model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *65*(1), 21. <https://doi.org/10.1167/iovs.65.1.21>
196. Wells, J. M., Gaggar, A., & Blalock, J. E. (2015). MMP generated matrikines. *Matrix Biology*, *44-46*, 122-129. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.01.016>

197. Wier, E. M., Fu, K., Hodgson, A., Sun, X., & Wan, F. (2015). Caspase-3 cleaved p65 fragment dampens NF- κ B-mediated anti-apoptotic transcription by interfering with the p65/RPS3 interaction. *FEBS Letters*, *589*(23), 3581-7. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.10.019>
198. Wilkerson, J. L., Basu, S. K., & Mandal, N. A. (2023). Angiogenesis Model of Cornea to Understand the Role of Sphingosine 1-Phosphate. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *2625*, 231–240. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2966-6_20
199. Willmann, D., Fu, L., & Melanson, S. W. (2023). Corneal Injury. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
200. Wolf, M., Clay, S. M., Oldenburg, C. E., Rose-Nussbaumer, J., Hwang, D. G., & Chan, M. F. (2019). Overexpression of MMPs in corneas requiring penetrating and deep anterior lamellar keratoplasty. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *60*(5), 1734-1747. <https://doi.org/10.1167/iovs.18-26047>
201. Wotring, J. W., Fursmidt, R., Ward, L., & Sexton, J. Z. (2022). Evaluating the in vitro efficacy of bovine lactoferrin products against SARS-CoV-2 variants of concern. *Journal of Dairy Science*, *105*(4), 2791–2802. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21644>
202. Yahalomi, T., Achiron, A., Arnon, R., Stanescu, N., & Pikkal, J. (2023). Dry Eye Disease following LASIK, PRK, and LASEK: An Observational Cross-Sectional Study. *Journal of Clinical Medicine*, *12*(11), 3761. <https://doi.org/10.3390/jcm12113761>
203. Yanai, R., Ko, J. A., Nomi, N., Morishige, N., Chikama, T., Hattori, A., Hozumi, K., Nomizu, M., & Nishida, T. (2009). Upregulation of ZO-1 in cultured human corneal epithelial cells by a peptide (PHSRN) corresponding to the second cell-binding site of fibronectin. *Investigative ophthalmology & visual science*, *50*(6), 2757–2764. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-2341>
204. Yang, AY., Chow, J., & Liu, J. (2018). Corneal innervation and sensation: the eye and beyond. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, *91*(1), 13-21. <https://doi.org/10.3324/yjbm.91.1.13>
205. Yang, S., Zhou, J., & Li, D. (2021). Functions and diseases of the retinal pigment epithelium. *Frontiers in Pharmacology*, *12*, 727870. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.727870>
206. Yang, Wang KK. (2015). Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends in Neurosciences*, *38*(6), 364–374. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.04.003>
207. Yin, L. T., Xie, X. Y., Xue, L. Y., Yang, X. R., Jia, J., Zhang, Y., & Zhang, C. (2020). Matrix Metalloproteinase-9 Overexpression Regulates Hippocampal Synaptic Plasticity and Decreases Alcohol Consumption and Preference in Mice. *Neurochemical research*, *45*(8), 1902–1912. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03053-8>

208. Yuan, A., Rao, MV., Veeranna, Nixon RA. (2017). Neurofilaments and neurofilament proteins in health and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(4), a018309. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018309>
209. Zhang, H., Ma, Y., Wang, H., Xu, L., & Yu, Y. (2018). MMP-2 expression and correlation with pathology and MRI of glioma. *Oncology Letters*, 17(2), 1826–1832. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9806>
210. Zhang, S., Wu, M., Peng, C., Zhao, G., & Gu, R. (2017). GFAP expression in injured astrocytes in rats. *Experimental and therapeutic medicine*, 14(3), 1905–1908. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4760>
211. Zhang, S.X., Sima, J., Shao, C., Fant, J., Chen, Y., Rohrer, B., Gao, G., & Ma, J.X. (2004). Plasminogen kringle 5 reduces vascular leakage in the retina in rat models of oxygen-induced retinopathy and diabetes. *Diabetologia*, 47(1), 124–131. <https://doi.org/10.1007/s00125-003-1276-4>
212. Zhang, X., Wang, L. P., Ziober, A., Zhang, P. J., & Bagg, A. (2021). Ionized Calcium Binding Adaptor Molecule 1 (IBA1). *American journal of clinical pathology*, 156(1), 86–99. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa209>
213. Zhang, Y., Lu, C., & Zhang, J. (2021b). Lactoferrin and its detection methods: a review. *Nutrients*, 13(8), 2492. <https://doi.org/10.3390/nu13082492>
214. Zhang, Y., Yan, P., Tang, H., & Zhang, J. (2023). Rapid detection of tear lactoferrin for diagnosis of dry eyes by using fluorescence polarization-based aptasensor. *Scientific Reports*, 13(1), 15179. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-42484-5>
215. Zhou, X., Backman, LJ., & Danielson, P. (2021). Activation of NF- κ B signaling via cytosolic mitochondrial RNA sensing in Keratocytes with mitochondrial DNA common deletion. *Scientific Reports*, 11, 7360. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86522-6>
216. Zwirzitz, A., Reiter, M., Skrabana, R., Ohradanova-Repic, A., Majdic, O., Gutekova, M., Cehlar, O., Petrovčíková, E., Kutejova, E., Stanek, G., Stockinger, H., & Leksa, V. (2018). Lactoferrin is a natural inhibitor of plasminogen activation. *Journal of Biological Chemistry*, 293(22), 8600–8613. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003145>

Список публікацій здобувача за темою дисертації та відомості про апробацію результатів 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, 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>

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;

Аğca 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, 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>

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. Korsa, 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. Korsa, 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;

Зяблицев 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. Aḡsa. 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. Korska, 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., Korska 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., Korska V. V., Tykhomyrov A. A. Effects of exogenous angiotatins 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/>