

РЕЦЕНЗІЯ

на дисертаційну роботу

Василя БІЛОУСА

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

яка подається на здобуття наукового ступеня

доктора філософії

у галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія

Аваскулярність рогівки, яка є ключовою для забезпечення прозорості та ефективності зору, підтримується завдяки динамічній рівновазі між факторами, що стимулюють та інгібують утворення нових кровоносних судин. Неоваскуляризація рогівки, яка може бути викликана різноманітними факторами, такими як травми, інфекції, хімічні опіки, або хронічні запалення, призводить до зниження зорової гостроти та може стати причиною серйозних ускладнень, включаючи відторгнення трансплантатів. Сучасна біомедицина активно шукає нові методи лікування та профілактики неоваскуляризації, включаючи розробку нових модуляторів ангіогенезу, які були б ефективними та безпечними для пацієнтів. З огляду на зростаючу кількість випадків захворювань, пов'язаних з неоваскуляризацією, це питання набуває особливої актуальності. В Україні, де військові конфлікти призводять до значного числа травм очей, включаючи проникні поранення рогівки, потреба в ефективних методах лікування та відновлення зору є надзвичайно високою. Розробка нових терапевтичних стратегій, які б зменшували ризик неоваскуляризації та покращували результати кератопластики, може мати значний вплив на якість життя пацієнтів, а також на зниження соціально-економічного навантаження, пов'язаного з очними захворюваннями. Тому важливо продовжувати дослідження в цій області, забезпечуючи не тільки розробку нових лікувальних методів, але й одержання нових даних стосовно молекулярних механізмів регуляції неоваскуляризації.

Сучасна фармакотерапія неоваскулярних захворювань рогівки використовує кортикостероїди, які дійсно мають свої обмеження, особливо через високий ризик побічних ефектів. Це спонукає науковців до пошуку нових

методів лікування, зокрема, використання ангіостатинів, які є продуктами обмеженого протеолізу плазміногену. Ангіостатини, включаючи поліпептиди K1-3, K1-4, K1-4,85, K1-5, K5, мають потенціал у пригніченні ангіогенезу, що є ключовим у лікуванні неоваскулярних захворювань. Їх здатність специфічно інгібувати проангіогенний сигналінг в ендотелійних клітинах може забезпечити більш цілеспрямоване та безпечне лікування, зменшуючи ризик побічних ефектів, які часто спостерігаються при використанні кортикостероїдів. Окрім того, ангіостатини мають протизапальні властивості, що може додатково сприяти зменшенню запалення та поліпшенню клінічних результатів. Отже, **метою роботи** було з'ясувати молекулярні механізми розвитку патологічних станів рогівки та розробити підходи до їх корекції. 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 евкаріотичних клітин, гістологічні методи, тест Ефрона (визначення ступеня неоваскуляризації рогівки), методи статистичного аналізу.

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

Дисертаційна робота відповідає пріоритетному напрямку розвитку науки в галузі біохімії людини та тварин і виконувалась згідно плану науково-дослідних робіт відділу хімії та біохімії ферментів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. 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.).

Дисертантом особисто проведено усі експериментальні дослідження, виконано статистичну обробку результатів, підбір та опрацювання літератури. Планування роботи та аналіз результатів досліджень проводились спільно з науковим керівником.

Основні результати дисертаційної роботи, їхня новизна та практичне значення. Відповідно до мети було сформульовано п'ять основних завдань, для виконання яких 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.

У представленій роботі вперше встановлено на експериментальних моделях лужного опіку рогівки щурів та кроликів, 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), ангіогенезом (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 ангіостатин 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 ангіостатинів щодо клітин сателітної глії в травмованій рогівці. Вперше показано, що ангіостатини регулюють рівень протеїну ACE2,

який слугує рецептором вірусу SARS-CoV-2, та знижують рівень рецептора за ушкодження рогівки. Вперше доведено відсутність цитотоксичних ефектів ангіостатинів на клітини пігментного епітелію сітківки за терапевтичного діапазону концентрацій (2–100 нМ), що показано у дослідях на культурі клітин RPE.

Вперше показано, що введення високої дози тіаміну (25 мг/кг маси тіла) щурам у моделі хронічного споживання етилового спирту чинить коригувальну дію, зменшуючи прояв токсичних ефектів інтоксикації етанолом у 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- κ B, τ -протейну та Neu-N), а також зменшенні рівня активації сателітної глії та експресії відповідного маркера GFAP.

Отримані результати стосовно антиангіогенної дії ангіостатинів 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.

Рисунки та таблиці, представлені у дисертації, є чіткими та ілюстративними. Висновки, наведені наприкінці рукопису дисертації, є лаконічними й адекватно відображають отримані результати.

Повнота викладу результатів дисертації в опублікованих працях

Результати дисертаційного дослідження Василя БІЛОУСА повністю висвітлено у 7 наукових статтях, що належить до міжнародних та фахових наукових видань України (з них 4 входять до наукометричної бази Scopus та Web of Science), що відповідає вимогам Постанови №44 Кабінету Міністрів України від 12.01.2022 р «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», а також апробовані на 7 вітчизняних та міжнародних наукових конференціях.

Ступінь обґрунтованості наукових положень

Результати та висновки, наведені у дисертації, базуються на значному науковому та експериментальному матеріалі. У роботі використовувалися сучасні та класичні методи дослідження, які дозволили досягти мети та завдань дослідження. Дисертантом було проведено статистичну обробку отриманих даних для підтвердження отриманих результатів, яка є адекватною і переконливою.

Структура дисертації. За формальними ознаками дисертаційна робота Василя БІЛОУСА відповідає усім вимогам: вона містить анотацію українською та англійською мовами, вступ, огляд літератури, матеріали і методи, опис отриманих результатів та їхнє обговорення, узагальнення, висновки та перелік

використаної літератури (216 першоджерел). Робота викладена на 168 сторінках машинописного тексту. В тексті використано 32 рисунки та 2 таблиці.

Зауваження та запитання.

1. Який із зазначених Вами чинників патологічного процесу у рогівці після хімічного опіку, а саме некроз, апоптоз, аутофагія, стрес ендоплазматичного ретикулуму, гіпоксія, запалення, ЕМТ, ремоделювання екстрацелюлярного матриксу, міжклітинні контакти чи активація металопротеїназ тощо, є, на вашу думку, пусковим механізмом в індукції неоваскуляризації? На яку з цих ланок найбільш спрямовано діють ангіостатини?
2. Стосовно неоваскуляризації рогівки після лужного опіку Ви справедливо зазначаєте, що «Таку фізіологічну відповідь організму можна розглядати як адаптаційний механізм, спрямований на захист тканин рогівки від впливу гіпоксичного стану». І також зазначаєте, що «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». Проте у Ваших експериментах за умов інгібування неоваскуляризації ангіостатинами «K1-3 протягом 14 днів, у ділянці тканинного дефекту спостерігається виражена регенерація сполучної тканини (рисунок 3.8.В)». Чим Ви це пояснюєте?
3. Чим Ви можете пояснити такий експериментальний факт, що фрагмент плазміногену K5 мав «найбільш виражений нейропротекторний ефект по відношенню до гліальної реактивності» в порівнянні з іншими досліджуваними чинниками?
4. Який ще вплив, крім пригнічення активності НАДФ-Н-оксидоредуктазної системи та міграційної активності, можуть, на Вашу думку, справляти ангіостатини на макрофаги?

5. Чим Ви пояснюєте достовірне збільшення експресії VEGF за сумісної дії етанолу та тіаміну? Чи не може це пояснювати антиапоптичну дію тіаміну?
6. На мою думку, треба додати «мету» в анотацію роботи.
7. В списку власних праць можна зазначити особистий внесок автора після кожного посилання.

Загальний висновок.

Дисертаційна робота Василя БІЛОУСА ««МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ ПАТОЛОГІЧНИХ СТАНІВ РОГІВКИ ТА РОЗРОБКА ПІДХОДІВ ДО ЇХ КОРЕКЦІЇ» є завершеним науковим дослідженням, яке за актуальністю, новизною та обґрунтованістю наукових результатів, що мають теоретичне та практичне значення і повноцінно відображені в наукових публікаціях, відповідає вимогам до наукової кваліфікації ступеня доктора філософії у галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія, встановлених Постановою КМУ № 44 «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» від 12.01.2022 р.

Дисертант Василь БІЛОУС може бути допущений до офіційного захисту на здобуття ступеня доктора філософії у галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія.

Рецензент

головний науковий співробітник Інституту біохімії
ім. О.В. Палладіна НАН України
доктор біологічних наук, професор

Денис КОЛИБО

