

Голові спеціалізованої вченої ради  
при Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна  
НАН України  
доктору біологічних наук, професору,  
завідувачу відділу сигнальних  
механізмів клітини  
Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна  
НАН України  
Людмилі ДРОБОТ

## ВІДГУК

офіційного опонента, доктора біологічних наук, професора, в.о. завідувача кафедри біохімії та фізіології Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара МОН України УШАКОВОЇ Галини Олександрівни на дисертаційну роботу БІЛОУСА Василя Леонідовича «Молекулярні механізми розвитку патологічних станів рогівки та розробка підходів до їх корекції», подану на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – Біологія, за спеціальністю 091 – Біологія.

**Актуальність обраної теми.** Дисертація присвячена дослідженню молекулярних механізмів розвитку патологічних станів рогівки, індукованих різними чинниками, вплив яких асоційований з гіпоксією, запаленням та неоваскуляризацією. Рогівка є важливою складовою зорової сенсорної системи, від якої залежить сприйняття як зовнішніх факторів, формування організму в цілому та визначення індивідуальної поведінки. Але, ця структура надзвичайно чутлива до зовнішніх впливів, особливо інфекцій та токсикантів. Якість зору залежить від фізіологічного та біохімічного стану як самої рогівки, так і систем, що забезпечують її функціонал. На сьогодні відомі наслідки порушення рогівки і за умов вроджених вад, так і травм різної етіології, та хронічних системних хвороб (цукровий діабет), які вагомо знижують якість життя людини.

Проведення ґрунтовного дослідження спрямовано на вирішення практичних питань, як якісно надати фармакотерапевтичні заходи з як можна меншою побічно дією, оскільки на сьогодні в якості першочергових засобів фармакотерапії неоваскулярних захворювань рогівки широко використовуються протизапальні стероїдні та нестероїдні препарати місцевої дії, а також інгібітори проангіогенних факторів, однак, існуючі лікарські засоби не завжди демонструють позитивний терапевтичний ефект та часто проявляють побічну дію.

За головну мету було поставлено 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 ретикулуму в рогівці тварин в експериментальній моделі лужного опіку рогівки.

3. Дослідити антиапоптотичні та нейропротекторні ефекти вітаміну B1 (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.

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.

**Зв'язок теми дисертації 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.).

**Наукова новизна та достовірність одержаних результатів.** Викладені у дисертації наукові положення та узагальнені на їх підставі висновки зроблені на основі отриманих даних у відповідності з первинною документацією. Рівень обґрунтованості результатів проведених досліджень достатній, використані сучасні біохімічні, імунохімічні методи досліджень, результати статистично опрацьовані та отримані вірогідні дані. Кількість варіантів у вибірках відповідає критеріям варіаційної статистики і кореляційного аналізу, що дозволило зробити обґрунтовані висновки та практичні рекомендації.

Дисертантом 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 $\alpha$ ), 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 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 BclxL/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,  $\tau$ -протеїну та Neu-N), а також зменшенні рівня активації сателітної глії та експресії відповідного маркера GFAP.

**Практичне значення одержаних результатів.** Отримані результати стосовно антиангіогенної дії ангіостатинів та їхніх плеiotропних 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.

**Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій, які викладені у дисертаційній роботі.** Усі узагальнення та висновки, наведені у дисертаційній роботі, ґрунтуються на матеріалах власних досліджень і відображають закономірності, що виявлені шляхом аналізу отриманих авторських результатів. Робота виконана на високому методичному рівні із застосуванням сучасних методів досліджень, які є адекватними до поставленої мети та визначених завдань. Усі отримані результати опрацьовані статистично за допомогою відповідних методів математичної статистики. Ретельний аналіз отриманих результатів дав змогу дисертанту їх узагальнити та зробити висновки. Усі висновки відповідають змісту роботи.

**Аналіз дисертаційної роботи.** 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.

**Загальна характеристика роботи.** Дисертація містить усі розділи, передбачені вимогами до оформлення дисертації згідно з Наказом МОН України «Про затвердження вимог до оформлення дисертації» № 40 від 12.01.2017 року, а також у відповідності з Постановою Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 року.

У *анотації* детально викладені основні результати наукових досліджень, які отримані при виконанні дисертаційної роботи, а також подано власні публікації.

У *вступі* наведено актуальність обраної теми, мету, завдання роботи, наукову новизну, теоретичне та практичне значення одержаних результатів, особистий внесок здобувача у виконанні дисертаційної роботи, відображена апробація результатів роботи, основні положення дисертації та методи, які застосовані для вирішення поставлених завдань.

*Розділ 1 «Огляд літератури»* включає 3 підрозділи, що викладенні на 20 сторінках, де автор приводить і узагальнює дані іноземної та вітчизняної літератури за тематикою дисертаційної роботи, а саме:

1.1. Особливості будови та функції рогівки.

1.2. Молекулярно-клітинні зміни у рогівці за патологічних станів (метаболических порушень, травмування рогівки та неоваскуляризації, нейродегенеративних порушень).

1.3. Фармакологічні підходи в корекції патологічних станів рогівки (Вітаміни в лікуванні захворювань передньої камери ока та Ангіостатини як перспективні засоби корекції неоваскулярних захворювань рогівки)

*Розділ 2 «Матеріали і методи дослідження»* характеризує етапи досліджень, об'єкти та передумови, напрями, матеріал (експериментальний та клінічний), обладнання та методи досліджень. Дослідження проведені на достатній кількості експериментального матеріалу (модельні експерименти на кролях та щурах, культура клітин та клінічний матеріал). Використані методи досліджень проводились на сучасному обладнанні, мають високий науковий та методичний рівень, відповідають меті та завданням роботи. Статистична обробка матеріалів проводилась з використанням сучасного програмного забезпечення, зроблена коректно і доказово. Дисертаційна робота була проведена з дотриманням вимог норм біоетики, біологічної безпеки та правил роботи з експериментальними тваринами.

У розділі 3 *«Результати дослідження та їх обговорення»*, що складається з 6-ти підрозділів, дисертант детально представив та проаналізував отримані експериментальні та клінічні результати.

Зокрема, у підрозділі 3.1 наведено результати про тестування біологічної активності ангіостатинів. Встановлено, що ангіостатин K1-3 інгібує неоваскуляризацію рогівки, індуковану лужним опіком. Доведено, що ангіостатини K1-3 та K5 не впливають на життєздатність клітин пігментного епітелію сітківки (RPE).

У підрозділі 3.2 наведено результати впливу ангіостатинів на рівень ключових протеїнів-маркерів патофізіологічних процесів у рогівці за умов лужного опіку.

Підрозділ 3.3. демонструє коригувальну дію вітаміну B1 на тканини рогівки щурів у моделі хронічного споживання етанолу

У підрозділі 3.4. презентовані нейропротекторні ефекти вітаміну B1 у рогівці щурів за умов хронічної алкоголізації.

Підрозділ 3.5 присвячений характеристиці та використанню поліклональних антитіл до лактоферину.

У підрозділі 3.6. наданий аналіз протеїнів слізної рідини за травматизації ока.

У розділі 4 *«Аналіз та узагальнення результатів дослідження»* проведено стислий аналіз результатів власних досліджень. Цей розділ написаний професійно, лаконічно презентовані узагальнюючі схеми, та характеризує дисертанта як висококваліфікованого самостійного науковця.

*Висновки* дисертації ґрунтуються на результатах власних експериментальних досліджень, всього сформульовано 5 ключових висновків, які мають практичне спрямування.

**Відсутність порушень академічного плагіату.** За результатами перевірки та аналізу матеріалів дисертаційної роботи Білоуса Василя Леонідовича «Молекулярні механізми розвитку патологічних станів рогівки та розробка підходів до їх корекції», не виявлено ознак академічного плагіату, самоплагіату, фабрикації та фальсифікації.

**Відповідність дисертації встановленим вимогам.** Робота виконана на належному методичному рівні та відповідає вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 року та Наказу МОН України «Про затвердження вимог до оформлення дисертації» № 40 від 12.01.2017 року.

**Повнота викладу основних положень дисертації в опублікованих працях.** 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.

**Зауваження та запитання, які виникли при аналізі дисертаційної роботи.**

1. Бажано у дисертації презентувати схеми українською (Рис. 2.1. Схема отримання крингл-вмісних фрагментів плазміногену (ангіостатинів) та ін.).
2. Який зв'язок між розвитком запального процесу та неоваскуляризацією за розвитку патологічних станів, зумовлених різними факторами?
3. Продемонстровані результати вказують на те, що ангіостатини впливають на експресію ACE2. Чи мають протеолітичні фрагменти плазміногену інші ефекти щодо захисту організму від вірусів, окрім безпосереднього впливу на рецептор SARS-CoV-2?
4. Чим обумовлене зростання рівня GFAP у рогівці за умов травматизації? Які клітини відповідають за продукцію цього маркера безпосередньо у рогівці?
5. Як відомо, тіамін є стимулятором ангіогенезу через індукцію проліферації ендотелійних клітин та пригнічення апоптозу. Чим Ви можете пояснити нормалізацію процесів у рогівці, зниження ступеня неоваскуляризації, зважаючи на те, що рівень проангіогенного маркера VEGF зростає за використання тіаміну?
6. Чим можна пояснити наявність у слізній рідині наявність більше ніж 3500 протеїнів? Яке їх походження і діагностичне значення?

7. Чи визначали Ви рівень ангіостатинів у рогівці тварин до та після лікування лужного опіку?
8. Чи запатентовані отримані оригінальні нові результати ваших досліджень?

Висловлені зауваження та запитання жодним чином не знижують позитивне загальне враження про дисертаційну роботу, її новизну та науково-прикладне значення.

#### **Висновок.**

Дисертаційна робота Білоуса Василя Леонідовича «Молекулярні механізми розвитку патологічних станів рогівки та розробка підходів до їх корекції» є завершеною науковою працею, результати даної роботи широко презентовані у відкритому науковому просторі, обговорені на профільних наукових конференціях, не містять плагіату, не містять порушення авторського права та основ біоетики.

Вважаю, що дисертація Білоуса Василя Леонідовича містить авторське нове вирішення наукового завдання. Дисертаційна робота за своєю актуальністю, об'ємом отриманих результатів, новизною та науково-практичною значимістю отриманих результатів відповідає вимогам передбаченим «Порядком присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 року № 44, а її автор заслуговує на присвоєння наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент:

в.о.завідувача кафедри біохімії та фізіології  
Дніпровського національного університету  
імені Олеся Гончара МОН України  
д-р біол. наук, професорка

Галина УШАКОВА

