

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, професора закладу вищої освіти кафедри медичної біохімії Тернопільського національного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України Ольги ЯРЕМЧУК на дисертаційну роботу Василя БІЛОУСА «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.

1. Актуальність обраної теми.

Дисертація Василя БІЛОУСА присвячена дослідженню молекулярних механізмів розвитку патологічних станів рогівки, індукованих різними чинниками та розробці підходів, які можуть бути використані як наукове підґрунтя для діагностики та фармакотерапії патологічних станів рогівки.

Ушкодження рогівки вважається другою за частотою причиною сліпоти після катаракти. 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. Однак, лікарські засоби, які застосовуються, не завжди демонструють позитивний терапевтичний ефект та часто проявляють побічну дію, що не забезпечує повноцінного лікування. Таким чином, існує потреба у пошуку та розробці нових, більш ефективних засобів для лікування цієї групи офтальмологічних захворювань, для чого необхідним є знання молекулярних механізмів їхнього патогенезу

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

Представлена робота містить результати експериментальних досліджень, виконаних 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 плазмінотен/плазмінової системи за норми та патології» (№ державної реєстрації 0118U000377, 2018–2022 рр.); «Дослідження функціональної ролі протеїнів плазмінотен/плазмінової системи в регулюванні молекулярноклітинних взаємодій у фібринолізі та за репаративних процесів» (№ державної реєстрації 0123U100516, 2023–2027 рр.).

3. Ступінь обґрунтованості основних положень, висновків та практичних рекомендацій, сформульованих у дисертації.

На основі сформульованої мети роботи автором поставлена низка завдань для проведення досліджень, які було реалізовано в повному обсязі. Дисертаційна робота містить великий обсяг результатів експериментальних досліджень, які проводились використовуючи сучасні біохімічні, імунохімічні, гістологічні методи, а також методи культивування еукаріотичних клітин, імунізації тварин та отримання поліклональних антитіл. На підставі аналізу отриманих результатів досліджень були сформульовані основні наукові положення, висновки та практичні рекомендації, які є добре обґрунтованими як в теоретичному, так і в практичному аспекті.

4. Достовірність основних наукових положень, висновків, практичних рекомендацій та одержаних результатів.

Достовірність основних наукових положень, висновків, практичних рекомендацій та одержаних результатів не викликає сумнівів, оскільки робота виконана на високому науковому рівні та підтверджена статистичною обробкою, а основні наукові положення, висновки та практичні рекомендації були зроблені на основі статистично достовірних результатів.

5. Новизна основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій, а також проведених наукових досліджень і одержаних результатів.

Наукова новизна проведених наукових досліджень, одержаних результатів, а також основних наукових положень, висновків і практичних рекомендацій, зроблених Василем БІЛОУСОМ, полягає у встановленні плеїотропних протекторних ефектів ангіостатинів (K1-3 та K5), що обмежують надмірну неоваскуляризацію рогівки, спричинену лужним опіком. Вперше встановлено, що ангіостатини дозозалежним чином сприяють зменшенню рівнів протеїнів-маркерів основних ланок патологічного процесу асоційованих з гіпоксією (HIF-1 α), ангіогенезом (VEGF), ремоделюванням і фіброзом тканин (MMP-9), автофагією

(Bcl₂-1), а також стресом ендоплазматичного ретикулу (GRP-78). Вперше показано, що ангіостатини регулюють рівень протеїну ангіотензин-перетворюючого ензиму 2; протекторні ефекти ангіостатинів щодо клітин сателітної глії в травмованій рогівці та доведено відсутність цитотоксичних ефектів ангіостатинів на клітини пігментного епітелію сітківки за терапевтичного діапазону концентрацій (2–100 нМ).

У представленій роботі вперше встановлено антиапоптотичну та нейропротекторну дію тіаміну (25 мг/кг маси тіла) у тканині рогівки щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією етиловим спиртом, що проявляється зростанні співвідношення Bcl₂/Bax, нормалізації вмісту нейрональних маркерів (NF- κ B, протеїну та Neu-N), а також зменшенні рівня активації сателітної глії та експресії відповідного маркера GFAP.

6. Практичне значення одержаних результатів

Практичне значення одержаних Василем БІЛОУСОМ результатів полягає у встановленні антиангіогенної дії ангіостатинів та їхніх плейотропних ефектів у рогівці за її пошкодження, що можуть бути використані при створенні нових лікарських препаратів для терапії захворювань поверхні ока, асоційованих із запаленням та надмірною неоваскуляризацією та засобів для нормалізації стану тканини рогівки під час операцій з кератопластики, профілактики SARS-CoV-2.

Застосування отриманих автором поліклональних антитіл до лактоферину може бути основою для розробки нових неінвазивних діагностичних підходів, заснованих на імунохімічній детекції рівня лактоферину в слізній рідині.

Отримані результати, що доводять антиапоптотичні та нейропротекторні властивості тіаміну, можуть бути використані для розробки нових вітамінних препаратів як ефективних засобів корекції офтальмологічних проявів хронічної алкогольної інтоксикації.

7. Повнота викладу основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій в опублікованих працях.

Основні наукові положення, висновки та практичні рекомендації в повній мірі відображено у 14 публікаціях, з них 7 статей, з яких 4 представлені в базах Scopus і Web of Science, та 7 тез доповідей у збірниках матеріалів вітчизняних та міжнародних наукових конференцій та конгресів. Зміст опублікованих робіт повністю відображає основні положення дисертації та її суть.

8. Структура 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 рисунки та 2 таблиці.

В анотації автор стисло виклав основні положення та результати досліджень дисертаційної роботи.

У вступі обґрунтовано актуальність дисертаційного дослідження, сформульовано мету і завдання, вказано методи досліджень, наукову новизну отриманих результатів і їх практичне значення, особистий внесок здобувача, зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами, наведено дані про апробацію результатів та публікації по темі дисертаційної роботи.

Огляд літератури зосереджено на висвітленні інформації з наявних наукових джерел за темою дисертаційного дослідження. Описано основні молекулярно-клітинні зміни у рогівці за патологічних станів, зроблено акцент на висвітленні сучасної інформації, щодо фармакологічних підходів в корекції неоваскулярних захворювань, які не завжди забезпечують позитивний терапевтичний ефект, що часто пов'язано з порушеннями репаративно-регенеративних процесів в оці, що свідчить про актуальність пошуку альтернативних способів профілактики та лікування цієї групи офтальмологічних захворювань.

У розділі 2 «Матеріали та методи дослідження» автор детально описує перелік лабораторного обладнання, реактивів та комерційних антитіл, що використовували у роботі. Детально описано методи та експериментальні моделі, які використовувались у дисертаційній роботі. Вказано, що усі дослідження проводили з дотриманням норм біоетики. Слід зазначити, що всі застосовані методи дослідження підібрані раціонально відповідно до поставленої мети та завдань дослідження, є інформативними та сучасними. Розділ написаний чітко та логічно.

У третьому розділі наведено дані власних досліджень, які свідчать про те, що фрагмент плазміногену ангіостатин K1-3 володіє вираженою антиангіогенною активністю, ефективно пригнічуючи неоваскуляризацію рогівки кроля за умов експериментальної моделі лужного опіку. Охарактеризовано нейропротекторні властивості ангіостатинів K1-3 та K5 та показано, що застосування ангіостатинів чинить інгібуючу дію на експресію ангіотензин конвертуючого ензиму 2, відомого як рецептор вірусу SARS-CoV-2, за опікового ушкодження рогівки. Наведено власні результати досліджень впливу тіаміну на процеси розвитку апоптозу у рогівці щурів за хронічного споживання етилового спирту та показано, що тіамін виявляє антиапоптичні властивості, сприяючи зростанню рівня антиапоптичного регулятора Bcl-xL та зменшенню вмісту проапоптотичного фактора Bax. У даному розділі представлено результати визначення рівня протеїнів за допомогою вестерн-блот аналізу, які є маркерами найголовніших патогенетичних патернів ранового процесу в рогівці: гіпоксії (HIF-1 α), ремоделювання тканин/фіброзу (MMP-9) та ангіогенезу. 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. Представлено результати гістологічного дослідження тканин рогівки експериментальних тварин. Продемонстровано розроблений протокол отримання поліклональних антитіл проти лактоферину 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.

В розділі 4 узагальнено отримані результати, представлено схему впливу ангіостатинів, дія яких спрямована на корекцію різних ланок патофізіологічного процесу за умов травматизації рогівки та розвитку запального процесу, а також протекторні ефекти тіаміну при корекції патофізіологічних змін рогівки за умов хронічного споживання етанолу.

На основі проведених досліджень сформульовано 5 висновків, які у повній відповідності до мети та завдань дослідження відображають результати роботи.

9. Недоліки дисертації щодо їх змісту та оформлення.

В цілому, робота написана й оформлена досить кваліфіковано. Разом з тим, трапляються незначні орфографічні, стилістичні помилки, невдалі вирази (наприклад, «дизайн нових лікарських препаратів» (с.30)).

В анотації вказано: «За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я у всьому світі кількість пацієнтів з очними хворобами, пов'язаними з розвитком неоваскуляризації рогівки, щорічно збільшується на 1,4 млн. з тенденцією до зростання», проте у вступі: «За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я у світі, у середньому, 1,4 млн. людей страждають на захворювання рогівки різної етіології...» з посиланням на джерело (Tidke et al., 2022) у якому вказано, що 1,4 млн. дітей є сліпими.

Незначні похибки в оформленні не зменшують важливість виконаного наукового дослідження. Однак, незважаючи на загальну позитивну оцінку дисертаційної роботи в контексті дискусії до роботи Василя БІЛОУСА є запитання:

1. Як Ви оцінюєте перспективи дослідження рівнів нейроспецифічних протеїнів у рогівці у діагностиці нейродегенеративних захворювань?

2. Чи розглядали Ви ефекти тіаміну на утворення ендогенних ангіостатинів як супресорів судиноутворення за умов хронічної алкогольної інтоксикації етиловим спиртом?

3. Що може бути причиною більш виражених позитивних ефектів ангіостатинів у порівнянні з референтним препаратом – лактоферином?

Висновок.

Дисертаційна робота Василя БІЛОУСА «Молекулярні механізми розвитку патологічних станів рогівки та розробка підходів до їх корекції» за актуальністю, науково-теоретичним рівнем, новизною і практичним значенням відповідає вимогам Постанови Кабінету Міністрів України «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» від 12 січня 2022 р. № 44, а здобувач заслуговує на присудження ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – Біологія, за спеціальністю 091 – Біологія.

Офіційний опонент:

доктор біологічних наук, професор,
професор закладу вищої освіти кафедри медичної біохімії
Тернопільського національного медичного
університету ім. І. Я. Горбачевського
МОЗ України

Ольга ЯРЕМЧУК

