

## 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

**Актуальність теми.** Рогівка є унікальною в анатомічному плані структурою ока, яка забезпечує ясність і чіткість зорового сприйняття. У зв'язку з тим що рогівка є частиною зовнішньої капсули ока, вона піддається впливу всіх несприятливих факторів зовнішнього середовища (вірусне інфікування, проникне та непроникне травмування ока, опіки, тощо), що зумовлює досить високий відсоток (25-30%) серед офтальмологічних захворювань, які припадають на рогівку. Зростання випадків травмування ока через бойові дії, спричинені війною на території України, обумовлює збільшення частоти розвитку патології рогівки. При цьому слід зазначити, що важливе медико-соціальне значення захворювань рогівки зумовлено ще й тривалістю лікування, частими рецидивами та зниженням гостроти зору. Саме захворювання рогівки є однією з основних причин слабкобачення та сліпоти. Завдяки анатомічній будові та особливостям обмінних процесів, уповільнення яких зумовлено аваскуляризацією, рогівка легко залучається до патологічного процесу та дуже повільно виходить з нього. Неконтрольовані запальні процеси, які відбуваються у тканині рогівки внаслідок гіпоксії, супроводжуються активацією неоваскуляризації, що є головною причиною порушення нормальних оптичних властивостей зовнішньої оболонки ока. Тому вкрай важливим є вивчення молекулярних механізмів неоваскуляризації рогівки для розуміння та розробки шляхів корекції й профілактики розвитку цього патологічного процесу. Особливий інтерес в цьому аспекті має виявлення маркерних протеїнів, так званих, біомаркерів, що задіяні в біохімічних

механізмах процесу неоваскуляризації, визначення вмісту яких в біологічних рідинах хворих може бути застосовано як з діагностичною метою так і для контролю ефективності терапевтичних підходів. Сьогодні, для корекції неоваскуляризації рогівки застосовують кортикостероїди місцевої дії та антиваскулярні препарати, переважно інгібітори VEGF, проте вони не завжди є ефективними, а також виявляють низку побічних ефектів. З огляду на це, дослідження молекулярних механізмів розвитку патологічних станів рогівки та розробка нових підходів до їх корекції та профілактики є надзвичайно важливою задачею. Саме вирішенню цих проблем присвячено дисертаційну роботу Василя Білоуса, *актуальність теми якої не викликає сумнівів*, а її потенційне науково-практичне значення важко переоцінити. Отже, **метою роботи** було з'ясувати молекулярні механізми розвитку патологічних станів рогівки та розробити підходи до їх корекції.

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. 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, які вирішували за допомогою сучасних біохімічних та імунохімічних методів (гель-електрофорез протеїнів, імуноблотинг, імуноензимний аналіз, афінна хроматографія, ензим-форез ), також, в дослідженнях були використані спектрофотометричні, гістологічні методи, імунізація тварин та отримання поліклональних антитіл, визначення ступеня неоваскуляризації за шкалою Ефрона, методи культивування евкаріотичних клітин та статистичної обробки результатів. Слід відзначити, що в дослідженні були використані як клітинні лінії, так й експериментальні моделі на тваринах

(лужного опіку рогівки в щурів та кролів та хронічної алкогольної інтоксикації в щурів), а також була проаналізована слізна рідина хворих з непроникною травмою ока. Застосування такого багаторівневого підходу значною мірою підвищує цінність отриманих результатів.

На експериментальній моделі лужного опіку в кролів автором була досліджена антиангіогенна активність ангіостатинів (AS). За результатами морфологічного тесту Ефрона та даними гістологічного аналізу було встановлено, що застосування AS сприяло істотному регресу новоутворених судин у рогівці за лужного опіку, зменшило ступінь дегенеративних змін, інфільтрації лейкоцитів та надмірне проростання судин в ушкодженій рогівці, а також сприяло регенерації епітелію. При цьому, вестерн-блот аналіз лізатів тканини рогівки показав нормалізацію вмісту проангіогенного цитокіну VEGF та зменшення рівнів маркерів апоптозу й автофагії (про-каспізи-3 та беклін-1) в ушкодженій тканині за умов застосування AS K1-3. З огляду на провідну роль надактивації макрофагів в розвитку процесу неоваскуляризації, автором також був досліджений вплив K1-3 на метаболічну активність фагоцитарних клітин. Було встановлено, що K1-3 інгібує активність клітинних дегідрогеназ макрофагів лінії J744.2. Таким чином, супресування активності резидентних макрофагів може бути одним з механізмів антиангіогенної та цитопротекторної дії AS у рогівці за умов лужного опіку.

Наступним завданням дисертаційної роботи було дослідити вплив двох AS (K1-3 і K5) на рівень маркерних протеїнів, які належать до ключових ланок патологічного процесу, що ініціюється лужним опіком рогівки щурів. Отримані результати показали, що застосування AS сприяло зменшенню рівнів протеїнів-маркерів, асоційованих з гіпоксією (HIF-1 $\alpha$ ), ангіогенезом (VEGF), ремоделюванням і фіброзом тканин (MMP-9), автофагією (beclin-1), стресом ендоплазматичного ретикулуму (GRP-78), а також активованої сателітної глії (GFAP), при цьому зростав рівень протеїну щільних контактів ZO-1, що свідчить про початок регенеративних процесів та реепітелізацію рогівки після лужного опіку.

Актуальними, у зв'язку із пандемією COVID-19, є результати щодо впливу AS на рівень рецептора SARS-CoV-2 - ангіотензинконвертувального протеїну-2 (ACE2) у тканині рогівки в експериментальній моделі лужного опіку: застосування AS K5 або K1-3 знижувало рівень експресії ACE2 в ушкодженій рогівці, що свідчить про потенційне зменшення ризиків інвазії SARS-CoV-2 через поверхню ока.

Оскільки пошкодження рогівки можуть бути спричинені не тільки зовнішніми факторами, а бути результатом порушення обмінних процесів в організмі, автором була використана модель хронічної інтоксикації етанолом в щурів. Добре відомо, що тривала інтоксикація етанолом спричинює в організмі В-дефіцитний стан, отже, наступним завданням роботи була оцінка можливості протекторного впливу тіаміну на тканину рогівки за умов хронічного введення етанолу. Було показано, що введення тіаміну щурам з хронічною алкогольною інтоксикацією зменшило рівень HIF-1 $\alpha$ , а також сприяло нормалізації рівнів VEGF, MMP та ZO-1. Крім того застосування 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. Таким чином, отримані результати переконливо свідчать про протекторний вплив вітаміну В<sub>1</sub> на рогівку ока за умов хронічної інтоксикації етанолу.

В останньому розділі дисертаційної роботи здобувачем проведено отримання поліклональних антитіл до лактоферину (Lf) людини – протеїну з високою антимікробною та імуномодуляторною активністю, з метою їх використання для визначення вмісту Lf в слізній рідині пацієнтів з непроникною травмою рогівки. Було встановлено, що рівень Lf в слюзі цих пацієнтів був у 3,2 рази нижчим за цей показник у нормі, при цьому, зміни вмісту Lf обернено корелювали з підвищенням рівня HIF-1 $\alpha$ , MMP-9 та AS у слізній рідині пацієнтів, що додатково підтверджують розвиток запальних процесів, асоційованих з гіпоксією в ушкодженій тканині. Отже, отримані

результати свідчать, що вміст Lf може слугувати прогностичним біомаркером перебігу ранового процесу в оці, зокрема, за непроникних травм рогівки, що може вподальшому бути використано для створення сучасних тест-систем для діагностування захворювань ока, що супроводжуються ушкодженням рогівки.

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

**Структура дисертації та апробація результатів.** За формальними ознаками дисертаційна робота Василя Білоуса відповідає усім вимогам: вона містить анотацію українською та англійською мовами, вступ, огляд літератури, методичну частину, опис власних результатів та їхнє обговорення (5 розділів), узагальнення, висновків та переліку використаної літератури (216 першоджерел). Робота викладена на 168 сторінках машинописного тексту, з них 142 сторінки припадає на основну частину. Огляд літератури містить відомості щодо особливості будови рогівки, молекулярно-клітинних змін у рогівці за розвитку патологічних станів, метаболічних порушень, травмування, аналіз сучасних даних щодо протеому слізної рідини та сучасних фармакологічних підходів в корекції патологічних станів рогівки. Текст супроводжується 32 рисунками і 2 таблицями.

Результати дисертаційного дослідження достатньо повно висвітлено у 7 статтях у фахових вітчизняних та міжнародних наукових виданнях, 4 з яких - журналах з високим індексом цитування у наукометричних базах Scopus і 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 та конгресах.

**Зауваження та питання.** Після ознайомлення з дисертаційною роботою Василя Білоуса виникає певна кількість запитань та зауважень, які

автор має взяти до уваги при підготовці остаточного варіанту дисертаційної роботи:

1. В назві роботи задекларовані молекулярні механізми розвитку патологічних станів рогівки, отже, ці механізми мають бути зазначені у висновках та науковій новизні дисертаційного дослідження.

2. В методичній частині роботи слід навести критерії за якими оцінювали розвиток алкогольної залежності.

3. В огляді літератури, автор наводить дані що ангіостатини спричиняють зростання рівнів інтерлейкіну 12. Як це узгоджується із відомою антизапальною дією цих сполук?

4. Чи можна, на думку автора, назвати протеїн NeuN – маркером нейрональної активності, як зазначено в тексті роботи?

5. Як автор може оцінити можливі побічні ефекти від застосування препаратів на основі ангіостатинів, зокрема чи можливе інгібування активації плазміногену?

6. Текст дисертації потребує доопрацювання (зустрічаються слова-кальки з інших мов, стилістично невдалі вирази. тощо ). Слід також звернути увагу на підписи до рисунків, які ілюструють результати досліджень, вони мають починатися із назви об'єктів, що на них зображені.

Проте, наведені зауваження не знижують науково-практичної цінності представленого дисертаційного дослідження. Отже, результати проведеної роботи істотно розширюють існуючі уявлення про молекулярні механізми патогенезу захворювань рогівки, а саме вказують на залучення до нього низки досліджуваних автором протеїнів. Цінність представленої дисертації полягає у виявленні маркерних протеїнів, що залучені до патогенетичних механізмів розвитку захворювань рогівки та розробці засобів їх корекції на основі ангіостатинів, а також у застосуванні визначення вмісту лактоферину в слізній рідині людини за допомогою поліклональних антитіл для діагностування захворювань ока, пов'язаних із ушкодженням рогівки, що свідчить про високий фаховий рівень підготовки здобувача та його спрямування на

практичну реалізацію результатів власних досліджень. Наукове і прикладне значення результатів дисертаційної роботи не викликає сумнівів.

**Висновок.** Вважаю, що дисертаційна робота Василя БІЛОУСА «Молекулярні механізми розвитку патологічних станів рогівки та розробка підходів до їх корекції» за актуальністю, методичним рівнем, об'ємом та новизною отриманих експериментальних результатів, особистим внеском здобувача, високим науково-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) та може бути представлена до офіційного захисту на здобуття наукового ступеня доктора філософії у галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія.

Кандидат біологічних наук,  
завідувачка відділу біохімії ліпідів  
Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна  
Національної академії наук України



Галина КОСЯКОВА

