

ВІДГУК

завідувачки відділу клінічної фізіології та генетики ДУ «Національний науковий центр «Інститут кардіології, клінічної та регенеративної медицини ім. академіка М.Д. Стражеска НАМН України», доктора медичних наук, професора

Талаєвої Тетяни Володимирівни

на дисертаційну роботу **Михайла ХЕЦУРІАНІ**

«Зміни експресії довгих некодуєчих РНК, залучених до регуляції гіпоксичної програми, при ішемічному ушкодженні серця»,

представлену на спеціалізовану вчену раду ID 6198 Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України для розгляду та проведення разового захисту дисертації на здобуття ступеня доктора філософії у галузі - 09 «Біологія» зі спеціальності - 091 «Біологія та біохімія»

Актуальність проведених досліджень

Ішемічна хвороба серця (ІХС) — одна з головних причин високої смертності та втрати працездатності населення в Україні та у багатьох індустріально розвинених країнах світу, що становить серйозну медико-економічну проблему. Успішне її вирішення залежить від розуміння механізмів розвитку захворювання, можливості прогнозування ускладнень та результатів, що визначає лікарську тактику, вибір і ефективність проведеної терапії. Широка розповсюдженість та тяжкі наслідки ІХС та атеросклерозу, що лежить в її основі, обумовлюють неослабну увагу до вивчення патогенетичних механізмів розвитку коронарної патології та, особливо, до її гострих клінічних проявів. Розробка та застосування новітніх технологій лікування хворих на ІХС, особливо спрямованих на корекцію ліпідних факторів атерогенезу, широке впровадження хірургічних методів відновлення кровопостачання міокарду дозволили суттєво підвищити ефективність лікування, знизити ризик розвитку гострих коронарних явищ та полегшити їх перебіг. Проте, незважаючи на високу значимість проблеми вдосконалення методів лікування хворих на ІХС, які перенесли інфаркт

міокарду, суттєвих результатів в її вирішенні ще немає ні у вітчизняній, ні у світовій кардіології.

За останні десятиріччя накопичені експериментальні й клінічні дані про механізми розвитку і прогресування атеросклерозу та коронарної недостатності, внаслідок чого розвивається ішемія міокарду. Виявлено важливу роль ендотелію в регуляції тонуусу вінцевих артерій, його взаємодії з форменими елементами крові, ліпідами та ліпопротеїнами, біологічно активними гуморальними факторами, участь у процесах прогресування і дестабілізації атеросклеротичної бляшки локального і системного запалення.

У розвитку серцево-судинних захворювань гіпоксія відіграє вирішальну роль. Індуковані гіпоксією фактори (HIFs) є ключовими факторами транскрипції для адаптивних гіпоксичних відповідей, що викликають транскрипцію численних генів, залучених до ангиогенезу, еритропоезу, клітинного метаболізму, запалення тощо. Гіпоксія-індукований фактор HIF- α , активність якого збільшується при зменшенні концентрації кисню у крові, відіграє ключову роль у клітинних реакціях на гіпоксію. Нещодавні дослідження показали безпосередню участь клітинно-специфічних HIF- α у патогенезі артеріальної гіпертензії, атеросклерозу, аневризм аорти, легеневої артеріальної гіпертензії, ішемічної хвороби серця та серцевої недостатності за допомогою тканинно-специфічних нокаутних або надекспресованих HIF на тваринних моделях.

За останнє десятиліття ідентифіковано чимало lncRNAs, що приймають участь у функціонуванні серця і судин та у патогенезі більшості серцево-судинних захворювань. Залучення їх до механізмів розвитку більшості серцево-судинних захворювань дає можливість використання lncRNAs в якості діагностичних маркерів цих захворювань, а також потенціальних мішеней для патогенетичної терапії. Було показано, що сотні lncRNA відіграють важливу роль у при гострому інфаркті міокарда. Гіпоксія міокарда під час інфаркту викликає значну втрату життєздатних

кардіоміоцитів шляхом як некрозу, так і апоптозу. Дослідження продемонстрували регуляторну участь lncRNA в апоптозі кардіоміоцитів внаслідок інфаркту міокарда. Так, в експериментальних дослідженнях було показано, що lncRNA (MIAT) була пов'язана з апоптозом, проліферацією клітин і фіброзним ремоделюванням при гострому інфаркті міокарда. Проте, отримані дані щодо залучення довгих некодуючих РНК при гіпоксії міокарда, особливо в умовах клініки, носять обмежений характер та інколи мають різнонаправлені результати.

Таким чином, дисертаційне дослідження Михайла Хецуріані, метою якого було встановити значення зміни експресії деяких довгих некодуючих РНК, які залучені до регуляції гіпоксичної програми, в експериментах на моделях тварин з ішемічним ушкодженням серця та у пацієнтів з ішемічною хворобою серця, безумовно свідчить про актуальність проведеного дослідження.

Наукова новизна отриманих результатів, їх теоретичне та практичне значення

У представленій дисертаційній визначені нові молекулярні механізми регуляції фізіологічних та патологічних процесів серцево-судинної системи, а саме - показана участь довгих некодуючих РНК H19, TUG1, MIAT та GAS5 у цих процесах на експериментальних моделях інфаркту міокарда, ішемії-реперфузії та у пацієнтів із ішемічною хворобою серця, інфарктом міокарда.

В умовах *in vitro* на кардіоміоцитах неонатальних щурів за умов аноксії-реоксигенації рівень експресії зазначених довгих некодуючих РНК знижується. Застосування в умовах нормоксії інгібітора HIF-проліл гідроксилази на ізольованих кардіоміоцитах супроводжувалось підвищенням рівня експресії довгих некодуючих РНК H19 та TUG1, а MIAT — зниженням, що дозволяє автору зробити висновок про можливу їх участь у реалізації

патологічних змін в міокарді, а також про регуляторну роль транскрипційного фактору, що індукується гіпоксією (HIF-1 α) у їх експресії.

Дисертаційну роботу характеризують унікальні дослідження визначення рівня експресії lncRNA на експериментальній моделі інфаркту міокарда. Автором встановлено, що в даних умовах відмічається зниження експресії lncRNA H19 та підвищення TUG1 та MIAT як у міокардітах і у плазмі крові щурів та вперше встановлені кореляційні зв'язки їх експресії та кардіогемодинамічними показниками.

Суттєву наукову новизну має клінічний фрагмент дисертації, в якому визначались особливості експресії довгих некодуючих РНК H19, MIAT, HIF1A-AS1, LIPCAR, MHRT у пацієнтів із хронічною ішемічною хворобою серця. Крім того, в роботі продемонстровано як змінюється експресія зазначених довгих некодуючих РНК у міокарді, лейкоцитах та плазмі крові після проведення віддаленого ішемічного прекодиціонування у пацієнтів, яким у подальшому проводили аортокоронарне шунтування.

Одним з найбільш значущих фрагментів роботи є вперше встановлене на основі масивного дослідження експресії довгих некодуючих РНК H19, MIAT, HIF1A-AS1, LIPCAR, MHRT на великій вибірці літніх пацієнтів без ознак серцево-судинних захворювань показано, що довга некодуюча РНК H19 є незалежним предиктором смерті у осіб похилого віку.

З огляду на отримані результати, дане дисертаційне дослідження більшою мірою носить фундаментальний характер, а саме розширяє та поглиблює уявлення про патогенетичні механізми розвитку ішемічного ушкодження міокарда як у експериментальних тварин на моделі інфаркту міокарда, так і у хворих на ХІХС шляхом визначення особливостей експресії деяких довгих некодуючих РНК. Дане дисертаційне дослідження містить дані щодо спрямованості практичного застосування отриманих результатів шляхом використання рівнів експресії довгих некодуючих РНК, що вивчались, з метою використання у якості біомаркерів для діагностики та

лікування серцево-судинних захворювань, що асоціюються з гіпоксією міокарду. Крім того, отримані в дисертаційному дослідженні дані про lncRNA H19, як незалежного предиктора смерті у осіб похилого віку, можуть бути використані для визначення груп ризику серед літніх людей.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків дисертаційної роботи

Дисертаційну роботу Михайла Хецуріані характеризує великий діапазон досліджень, що включає дослідження на кардіоміоцитах неонатальних щурів в умовах аноксії-реоксигенації та нормоксії при застосуванні інгібітора HIF-проліл гідроксилази для стабілізації HIF-1 α , так і на експериментальній моделі інфаркту міокарда. Аналіз сучасної літератури дозволив автору обрати унікальний дизайн експериментальної моделі з групою із удаваною операцією, групою з відтвореною операцією, також була група тварин з відтвореною моделлю ішемії-реперфузії та 8 тварин також із удаваною операцією. З метою оцінки впливу гіпоксії на міокард на різних експериментальних моделях автор проводив морфологічне дослідження наявності некротичних та апоптотичних кардіоміоцитів. Був проведений великий підготовчий об'єм роботи, в якому відповідні lncRNAs для експериментів підбирали шляхом опрацювання великої кількості літератури та аналізу інформації у низці баз даних для некодуючих РНК.

При моделюванні інфаркту міокарда на щурах автор встановив, що експресія довгої некодуючої РНК H19 знижується, тоді як рівень експресії TUG1 та MIAT навпаки зростає. Аналогічні зміни відмічались і у плазмі крові піддослідних тварин, що дало можливість дисертанту зробити висновок про практичне застосування отриманих даних з метою впливу на рівень експресії довгих некодуючих РНК. Дисертант визначав кардіогемодинамічні показники у щурів при вітворенні експериментальних моделей інфаркту міокарда та ішемії-реперфузії та встановив кореляційний зв'язок між

експресією довгих некодуючих РНК та даними показниками.

Особливої уваги заслуговує клінічний фрагмент роботи, в якому у хворих на ХІХС визначались особливості експресії довгих некодуючих РНК H19, MIAT, HIF1A-AS1, LIPCAR, MHRT. Крім того, проведення віддаленого ішемічного прекодиціонування у пацієнтів, яким у подальшому проводили аортокоронарне шунтування, продемонстровано зміну експресії зазначених довгих некодуючих РНК у міокарді, лейкоцитах та плазмі крові після його проведення, що може свідчити про практичне застосування даного методу у хворих на ХІХС.

Великий об'єм дослідження ступеню експресії довгих некодуючих РНК H19, MIAT, HIF1A-AS1, LIPCAR, MHRT у плазмі крові літніх пацієнтів без ознак серцево-судинних захворювань дозволив дисертанту зробити висновок, що довга некодуюча РНК H19 є незалежним предиктором смерті у осіб похилого віку

Наукові положення дисертаційної роботи ґрунтовані на широкому та відповідному поставленим задачам застосуванні різних методичних підходів, що використовуються у найсучасніших фізіологічних, генетичних та медичних дослідженнях.

Для вирішення поставлених завдань автором був використаний комплекс найсучасніших методичних підходів, що дозволило детально та всебічно оцінити зміни експресії довгих некодуючих РНК при гіпоксії міокарда, встановленої як у хворих на ХІХС так і в умовах її моделювання .

На основі отриманих даних автором проведено адекватні порівняння та обґрунтовані висновки.

Достатній обсяг проведеного експериментального та клінічного дослідження, застосування сучасних стандартизованих методів, математичного статистичного аналізу отриманих даних свідчать про достовірність та обґрунтованість основних положень роботи. Висновки,

сформульовані автором, відповідають основним положенням дисертації і випливають із отриманих автором даних та їх аналізу.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота Михайла Хецуріані виконана в рамках відомчих науково-дослідних тем відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, а саме - «Значення довгих некодуєчих РНК в механізмах розвитку експериментальної та клінічної патології» (державний реєстраційний номер - 0118U007348) (2019-2023 рр.), «Дослідження механізмів ремоделювання міокарда в патогенезі розвитку серцевої недостатності та її корекції» (державний реєстраційний номер — 114U007233) (2015-2018 рр.), та цільової програми «Підтримка пріоритетних для держави наукових досліджень і науково-технічних (експериментальних) розробок відділення біохімії, фізіології і молекулярної біології НАН України (реєстраційний номер 0120U101281) (2021р.).

Структура і обсяг дисертації, оцінка її завершеності та відповідності встановленим вимогам

Дисертаційна робота Михайла Хецуріані написана за загальноприйнятою формою у відповідності до вимог МОН України. Робота викладена на 141 сторінці друкованого тексту і включає анотації українською та англійською мовами, вступ, розділ власних досліджень, розділ аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновки, список використаних джерел, 2 додатки. Текст дисертації містить 22 рисунки та таблиці. Список використаних джерел нараховує 189 позицій.

У вступі представлено актуальність проблеми, що вирішується у дисертаційному дослідженні. Основна увага прикута до патогенетичних механізмів гіпоксичного стану та ішемічних ушкоджень міокарду при серцево-судинних захворюваннях. Представлені дані сучасних досліджень про роль специфічного регуляторного білка, що індукується гіпоксією – HIF, а також

регуляторній ролі довгих некодуєчих РНК, що є одним із можливих механізмів регуляції HIF-сигнального шляху.

Обґрунтовано актуальність дисертаційної роботи, визначено мету та завдання дослідження, відзначено зв'язок роботи з основним планом наукової тематики відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, де виконувалася дисертаційна робота Михайла Хецуріані. Визначена наукова новизна, теоретична та практична значимість проведеного дослідження, представлено особистий внесок здобувача, публікації за темою дисертаційної роботи та апробацію матеріалів дослідження.

У розділі 1 (Огляд літератури) автором детально описані класифікація, властивості та функції довгих некодуєчих РНК. Представлені сучасні дані щодо участі довгих некодуєчих РНК у фізіології серцево-судинної системи та у патогенезі серцево-судинних захворювань. Автором на основі сучасних літературних даних представлена роль довгих некодуєчих РНК у розвитку ішемії міокарда при ІХС та її гострих формах – гострому інфаркті міокарда, у ремоделюванні міокарда та судин. Дисертантом наведені дані літератури щодо можливості застосування довгих некодуєчих РНК у якості біомаркерів серцево-судинних захворювань та їх наслідків. Автором представлені також сучасні дані літератури щодо можливості використання довгих некодуєчих РНК у якості терапевтичних мішеней при лікуванні хворих з серцево-судинними захворюваннями.

Наведені в дисертації літературні дані повністю відповідають меті та завданням дисертаційної роботи.

У розділі 2 (Матеріали та методи) надана детальна характеристика досліджуваних тварин, первинній культурі кардіоміоцитів неонатальних щурів, детально описана модель аноксії-реоксигенації на первинній культурі кардіоміоцитів неонатальних щурів, представлена методика визначення некротичних та апоптотичних клітин у даній моделі, виділення та визначення РНК.

Чітко описана методика відтворення моделі гострого інфаркту міокарда та ішемії-реперфузії на експериментальних тваринах із визначенням кардіогемодинамічних показників та подальшим ультраструктурним морфологічним дослідженням серця.

Детально описано методику віддаленого ішемічного прекодиціонування у пацієнтів з ХІХС, яким у подальшому виконувалась операція шунтування коронарних судин.

Автором ґрунтовно описані всі методи, а також методи статистичного аналізу, що дає підстави вважати використані в дисертаційній роботі методи сучасними і високоінформативними.

У розділі 3 (Результати досліджень та їх обговорення), що містить 4 підрозділи, представлені основні результати досліджень. В підрозділі 1 проаналізовано рівні експресії lncRNAs H19, TUG1, GAS5, MIAT та ступінь виживаності клітин у первинній культурі кардіоміоцитів неонатальних щурів за умов аноксії/реоксигенації. Встановлено імовірну роль HIF-1 α у регулюванні експресії lncRNAs H19 та TUG1 за умов додавання інгібітора ферменту HIF-проліл гідроксилази. У підрозділі 2 представлені результати дослідження змін кардіогемодинаміки, морфологічних змін, а також змін у експресії lncRNAs (lncRNAs H19, TUG1, GAS5 та MIAT) у міокарді та плазмі крові щурів при моделюванні хронічного інфаркту міокарда. У підрозділі 3 досліджено зміни кардіогемодинаміки та експресії lncRNAs H19, TUG1, GAS5 та MIAT у міокарді та плазмі крові щурів при відтворенні моделі ішемії-реперфузії міокарда. У підрозділі 4 проведено оцінку рівня експресії lncRNAs у пацієнтів із ішемічною хворобою серця, інфарктом міокарда, а також їх зміни після проведення процедури віддаленого ішемічного прекодиціонування (ВІПК) перед проведенням операції ізольованого коронарного шунтування.

У розділі 4 (Аналіз і узагальнення результатів дослідження) представлений аналіз та узагальнення отриманих результатів дослідження, в якому дисертант логічно підводить підсумок проведених досліджень, а також ок-

реслює ще не вирішені проблеми та можливі перспективи їх подальшого вирішення.

Завершують роботу висновки й практичні рекомендації, які в повній мірі відповідають поставленій меті і завданням роботи та логічно випливають з проведеного дослідження.

Викладення матеріалу дисертації в наукових публікаціях.

Основні положення дисертаційної роботи в достатній мірі відображені у 5 статтях у фахових наукових виданнях України категорії А та Б, що включені до науково-метричної бази Scopus, 2 – у зарубіжних виданнях (Q1 та Q2) науково-метричної бази Scopus та у 4 тезах. Результати дисертаційної роботи доповідалися на 8 наукових форумах (у тому числі з міжнародною участю).

Запитання до дисертанта.

1. Враховуючи зміни експресії довгих некодуючих РНК H19, TUG1 та MIAT в умовах аноксії-реоксигенації на кардіоміоцитах неонатальних щурів та в умовах нормоксії при застосуванні інгібітора HIF-проліл гідроксилази, яку роль відіграє довга некодуюча РНК H19 в міокарді при гіпоксії? Чи залучений до регуляції експресії довгої некодуючої РНК MIAT транскрипційний фактор, що індукується гіпоксією (HIF-1 α)?
2. Автор робить висновок на основі вираженості експресії довгих некодуючих РНК в умовах моделювання інфаркту міокарда у дорослих щурів, що довгі некодуючі РНК TUG1 та MIAT є потенційними мішенями для РНК-інтерференції, а H19 — для надекспресії у терапевтичних цілях при моделюванні інфаркту міокарда у тварин. В той же час, на основі досліджень у людей похилого віку збільшення рівня експресії довгої некодуючої РНК H19 пов'язане із підвищеним ризиком смерті. Яким чином це узгоджується?

3. Причини смерті у людей похилого віку можуть бути внаслідок різних причин. Чи асоціюється збільшення рівня експресії довгої некодуєчої РНК H19 із підвищеним ризиком смерті з кардіальних причин? Яка можлива роль в даних процесах довгої некодуєчої РНК H19?
4. Чи можливо віднести пацієнтів віком 75 років до практично здорових? Зазвичай в таких випадках використовують термін: «без клінічних ознак наявності серцево-судинних або інших захворювань».
5. Метод віддаленого прекондиціонування, що використовував дисертант, на сьогодні у клініці лежить в основі визначення потік-залежної вазодилатації. За рахунок яких механізмів відбувається прекондиціонування міокарду?

Зауваження до дисертації.

1. Автор застосовує різні назви ендотеліальних клітин: ендотелійні, ендотеліальні. Необхідно уніфікувати терміни.
2. Дисертант робить висновок, що у пацієнтів з ішемічною хворобою серця виявлено підвищений рівень експресії довгих некодуєчих РНК H19, HIF1A-AS1 та LIPCAR. Це дозволяє розглядати вказані молекули як потенційні біомаркери серцево-судинних захворювань. Це досить широке заключення. Необхідно більш чітко вказати яких процесів вказані молекули можуть використовуватись як біомаркери.

Проте ці питання та зауваження в значній мірі є дискусійними, свідчать про надзвичайну складність проблеми, яка вирішувалась дисертантом, її новизну і абсолютно не знижують позитивної оцінки проведеного дослідження, його надзвичайної наукової та практичної значимості.

Загальний висновок.

Дисертаційна робота Хецурані Михайла «Зміни експресії довгих некодуючих РНК, залучених до гіпоксичної програми, при ішемічному ушкодженні серця», яка подана на здобуття ступеня доктора філософії, за своїм науковим рівнем та практичною цінністю, змістом та оформленням повністю 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 від 12 січня 2022 р. № 44, вимогам до опублікування результатів дисертацій на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата наук, затверджених наказом Міністерства освіти і науки України № 1220 від 23 вересня 2019 року, вимогам щодо оформлення дисертації, затвердженими наказом МОН України № 40 від 12.01.2017 р. та відповідає напряму наукових досліджень третього освітньо-наукового рівня вищої освіти Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України у галузі 09 «Біологія» зі спеціальності 091 «Біологія та біохімія».

Опонент

Завідувачка відділу клінічної фізіології та генетики ДУ «Національний науковий центр «Інститут кардіології, клінічної та регенеративної медицини ім. академіка М.Д. Стражеска НАМН України», доктор медичних наук, професор

Тетяна ТАЛАСВА

Підпис Т.Талаєвої засвідчую:
зав. відділом кадрів
ДУ «ННЦ «Інститут кардіології,
клінічної та регенеративної медицини
ім. академіка М.Д.Стражеска
НАМН України»

Наталя АСТАШКІНА

06.08.2024