

## АНОТАЦІЯ

**Хещуріані М. Зміни експресії довгих некодуєчих РНК, залучених до гіпоксичної програми, при ішемічному ушкодженні серця. –**  
Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія та біохімія». - Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2024.

Дисертаційна робота присвячена вивченню зміни рівня експресії довгих некодуєчих РНК H19, TUG1, GAS5 та MIAT на експериментальних моделях тварин (аноксії/реоксигенації культури кардіоміоцитів неонатальних щурів, інфаркту міокарда, ішемії/реперфузії серця дорослих щурів) та довгих некодуєчих РНК H19, HIF1A-AS1, LIPCAR, MIAT та MHRT у клінічних зразках пацієнтів (міокарді, плазмі крові та лейкоцитах).

Аноксію/реоксигенацію моделювали на культурі кардіоміоцитів неонатальних щурів та проводили у двох режимах – короткому (30 хв. аноксії, 60 хв. реоксигенації) та довгому (60 хв. аноксії, 24 год. реоксигенації). Показано, що рівень експресії довгої некодуєчої РНК H19 знижується більше ніж у 84 рази після короткої А/Р та у 4,3 рази після довгої А/Р, порівняно із контролем. Для довгих некодуєчих РНК TUG1, GAS5 та MIAT спостерігали зниження експресії у 8,7, 8 та 19 разів відповідно після короткої аноксії/реоксигенації. Проте після довгої аноксії/реоксигенації рівень експресії lncRNA TUG1 є значно вищим ніж після короткої аноксії/реоксигенації та відновлюється до 62% щодо контрольних величин. Рівень GAS5 залишається майже на рівні короткої А/Р, тоді як рівень експресії MIAT достовірно підвищується більш ніж у 3 рази порівняно із контролем. Показано, що за умов як довгої, так і короткої аноксії/реоксигенації ми спостерігали підвищення експресії мРНК фактору, що індукується гіпоксією (HIF-1 $\alpha$ ) більше ніж у 2 рази, порівняно із

контрольним зразком. Такі результати вказують на те, що експресія довгих некодуючих РНК H19 та TUG1 у кардіоміоцитах за умов аноксії/реоксигенації регулюється не фактором HIF-1 $\alpha$ , а через інші сигнальні шляхи.

У присутності інгібітора HIF-проліл гідроксилази (PHD) за умов нормоксії у культурі кардіоміоцитів неонатальних щурів спостерігається збільшення експресії мРНК HIF-1 $\alpha$  майже у 3 рази. Рівень експресії довгої некодуючої РНК H19 достовірно збільшується у 2,7 разів, а TUG1 — у 2,4 рази. При цьому рівень експресії довгої некодуючої РНК MIAT знижується більше ніж у 16 разів. Такі результати вказують на те, що рівень експресії довгих некодуючих РНК H19 та TUG1 імовірно регулюється HIF-1 $\alpha$  за умов нормоксії, в той час як за аноксії/реоксигенації ми цього не спостерігаємо. Очевидно, що довгі некодуючі РНК H19 та TUG1 задіяні до патогенетичних механізмів, але регуляція їх експресії здійснюється через інші шляхи. Зниження рівня експресії MIAT ми спостерігали за умов нормоксії і короткої аноксії/реоксигенації на фоні збільшення експресії HIF1- $\alpha$ , що також може вказувати на протективний ефект останнього. Проте він нівелюється за умов довгої аноксії реоксигенації, за якої рівень експресії MIAT стрімко зростає.

Гострий інфаркт міокарда моделювали шляхом накладання лігатури на низхідну гілку лівої коронарної артерії та спостерігали за тваринами протягом 4-х тижнів. Групі тварин із удаваною операцією (УО) накладалася лігатура, але без перетискання артерії. Після 4-х тижнів реєстрували кардіогемодинамічні показники, а також відбирали зразки крові та серця тварин для проведення аналізу рівня експресії довгих некодуючих РНК. Ішемію/реперфузію (І/Р) моделювали шляхом накладання лігатури на стовбур лівої коронарної артерії на 40 хв (ішемія), після чого лігатуру знімали на 120 хв (реперфузія) та реєстрували кардіогемодинамічні показники. Удавану операцію здійснювали простим накладанням шовного матеріалу без перетискання артерії на 40 хв. та його видаленням на 120 хв.

Отримані дані свідчать, що у міокарді тварин з інфарктом міокарда рівень експресії довгої некодуєчої РНК H19 знижується майже в 2 рази, а TUG1 та MIAT — збільшується майже у 2 та 3 рази відповідно. У плазмі крові достовірні зміни спостерігали для довгих некодуєчих РНК H19 (зниження у 2,42 рази) та MIAT (зростання у 2,66 рази). Кореляційний аналіз Пірсона між кардіогемодинамічними параметрами та експресією довгих некодуєчих РНК показує кореляцію між експресією H19 із кінцево-систоличним тиском ( $r=0,68$ ), ізвольюмічною константою розслаблення Tau W ( $r=-0,74$ ) та показником  $dP/dT_{max}$  ( $r=0,73$ ). Для TUG1 показана позитивна кореляція із кінцево-систоличним об'ємом ( $r=0,74$ ) та кінцево-діастолічним тиском ( $r=0,7$ ). Високий рівень позитивної кореляції показаний для довгої некодуєчої РНК MIAT із кінцево-діастолічним об'ємом ( $r=0,98$ ) та кінцево-діастолічним тиском ( $r=0,64$ ). За умов I/P у міокарді тварин рівень відносної експресії довгої некодуєчої РНК H19 достовірно знижується у 3,79 рази, а TUG1 — збільшується більше ніж у 33 рази. У плазмі крові достовірними зміни були лише для довгої некодуєчої РНК MIAT, рівень експресії якої при I/P зростає на 49,11%. Отримані дані свідчать про потенційну роль у патогенезі ішемічного ушкодження міокарда довгих некодуєчих РНК H19, TUG1 та MIAT. Наведені кореляційні зв'язки між експресією цих молекул зі змінами кардіогемодинамічних показників підтверджують отриманий результат.

В наступній частині дослідження нами була проаналізована експресія довгих некодуєчих РНК H19, HIF1A-AS1, MIAT, LIPCAR та MHRT у пацієнтів з ішемічною хворобою серця, за умов віддаленого ішемічного прекондиціонування у пацієнтів, яким проводили операцію ізольованого аортокоронарного шунтування на працюючому серці. Також проаналізована експресія довгих некодуєчих РНК у плазмі крові людей похилого віку, за якими вели спостереження протягом 14 років з метою встановлення кореляційного зв'язку між рівнем експресії довгих некодуєчих РНК та ризиком смерті

У пацієнтів із ішемічною хворобою серця у плазмі крові рівень експресії H19 зростає на 52,32%, а довгих некодуючих РНК HIF1A-AS1 та LIPCAR — у 2,44 і 1,96 разів відповідно. Рівень експресії H19 у міокарді за умов віддаленого ішемічного прекодиціонування достовірно зменшується у 6,7 рази, а у плазмі крові — в 20,5 разів. В лейкоцитах експресія H19 за умов віддаленого ішемічного прекодиціонування збільшується більше, ніж у 3 рази. Експресія довгих некодуючих РНК HIF1A-AS1, MIAT, LIPCAR та MHRT за умов віддаленого ішемічного прекодиціонування у міокарді зменшується у 6,95, 5,42, 8,65 та 2,5 рази відповідно. У плазмі крові також спостерігаємо зниження рівня експресії вказаних довгих некодуючих РНК за умови віддаленого ішемічного прекодиціонування: для HIF1A-AS1 — в 9,79 рази; MIAT — на 27,15%; LIPCAR — у 23,61 рази; MHRT — більше ніж у 15 разів. Слід зазначити, що в лейкоцитах спостерігається зворотна картина змін експресії. У пацієнтів із групи віддаленого ішемічного прекодиціонування рівень експресії HIF1A-AS1, MIAT та LIPCAR зростає у 3,8, 9,89 та 4,34 рази відповідно.

Отримані результати вказують, що циркулюючі довгі некодуючі РНК H19, HIF1A-AS1 та LIPCAR можуть розглядатися як потенційні біомаркери ішемічної хвороби серця. Оскільки віддалене ішемічне прекодиціонування має протективний ефект на міокард, то зниження експресії довгих некодуючих РНК H19, HIF1A-AS1, MIAT, LIPCAR та MHRT у міокарді за таких умов вказує на участь цих молекул у патогенезі ішемічного ушкодження серця.

Експресія довгих некодуючих РНК H19, HIF1A-AS1, MIAT, LIPCAR та MHRT була визначена у плазмі крові 361 пацієнта у віці 75 років, за якими вели спостереження протягом 14 років, з 2000 по 2013 роки. Вперше було встановлено, що підвищення експресії довгої некодуючої H19 у плазмі крові пов'язане із підвищеним ризиком смерті. Регресійний аналіз за Коксом дозволив встановити, що рівень експресії довгої некодуючої РНК вище

порогових значень є незалежним (від інших факторів) предиктором смерті для людей похилого віку.

**Ключові слова:** довгі некодуючі РНК, ішемія, міокард, гострий інфаркт міокарда, гіпертрофія міокарда, серце, lncRNA, ремоделювання серця, ішемічна хвороба серця, експресія генів, ремоделювання міокарда, серцево-судинні захворювання, РНК, ген, ДНК.

## SUMMARY

**Khetsuriani M. Changes in the expression of long non-coding RNAs involved in the hypoxic program during ischemic heart injury. – A Qualification Scientific Work in the Form of a Manuscript.**

Dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy in the Field of Knowledge 09 "Biology" under the Specialty 091 "Biology and Biochemistry". - O.O. Bohomolets Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2024.

The dissertation is devoted to studying the changes in the expression levels of long non-coding RNAs H19, TUG1, GAS5, and MIAT in experimental animal models (anoxia/reoxygenation in neonatal rat cardiomyocyte cultures, myocardial infarction, and ischemia/reperfusion in adult rats) and long non-coding RNAs H19, HIF1A-AS1, LIPCAR, MIAT, and MHRT in clinical samples from patients (myocardium, blood plasma, and leukocytes).

Anoxia/reoxygenation was modeled in neonatal rat cardiomyocyte cultures and conducted in two modes: short (30 minutes of anoxia, 60 minutes of reoxygenation) and long (60 minutes of anoxia, 24 hours of reoxygenation). The expression level of the long non-coding RNA H19 decreased more than 84-fold after short anoxia/reoxygenation and 4.3-fold after long anoxia/reoxygenation compared to the control. For long non-coding RNAs TUG1, GAS5, and MIAT, an 8.7-fold, 8-fold, and 19-fold decrease in expression was observed, respectively,

after short anoxia/reoxygenation. However, after long anoxia/reoxygenation, the expression level of long non-coding RNA TUG1 is significantly higher than after short anoxia/reoxygenation and recovers to 62% of control values. The GAS5 level remains almost at the short anoxia/reoxygenation level, while the MIAT expression level significantly increases more than 3-fold compared to the control. It is worth noting that in both long and short anoxia/reoxygenation, we observed an increase in the mRNA expression of the hypoxia-inducible factor (HIF-1 $\alpha$ ) more than 2-fold compared to the control sample. These results indicate that the regulation of the expression of long non-coding RNAs H19 and TUG1 in cardiomyocytes under anoxia/reoxygenation conditions is not mediated by HIF-1 $\alpha$  but through other signaling pathways.

In the presence of a HIF-prolyl hydroxylase (PHD) inhibitor under normoxia conditions, a nearly 3-fold increase in HIF-1 $\alpha$  mRNA expression is observed. The expression level of long non-coding RNA H19 significantly increases 2.7-fold, and TUG1 increases 2.4-fold. At the same time, the expression level of long non-coding RNA MIAT decreases more than 16-fold. These results indicate that the expression levels of long non-coding RNAs H19 and TUG1 are likely regulated by HIF-1 $\alpha$  under normoxia conditions, while under anoxia/reoxygenation, we do not observe this. It is evident that long non-coding RNAs H19 and TUG1 are involved in pathogenic mechanisms, but their expression regulation is carried out through other mechanisms. Interestingly, a decrease in MIAT expression was observed under normoxia and short anoxia/reoxygenation, accompanied by an increase in HIF1- $\alpha$  expression, which may also indicate the protective effect of the latter. However, this effect is negated under long anoxia/reoxygenation conditions, where the MIAT expression level increases sharply.

Myocardial infarction was modeled by ligating the descending branch of the left coronary artery and observing the animals for four weeks. In the sham-operated group, a ligature was applied without clamping the artery. After four weeks, hemodynamic parameters were recorded, and blood and heart samples were

taken from the animals for long non-coding RNA expression analysis. Ischemia/reperfusion was modeled by ligating the left coronary artery trunk for 40 minutes (ischemia), followed by removing the ligature for 120 minutes (reperfusion) and recording hemodynamic parameters. Sham operations were performed by simply applying suture material without clamping the artery for 40 minutes and removing it for 120 minutes. The data obtained show that in the myocardium of animals with myocardial infarction, the expression level of long non-coding RNA H19 decreases almost 2-fold, while TUG1 and MIAT increase nearly 2-fold and 3-fold, respectively. In blood plasma, significant changes were observed for long non-coding RNAs H19 (2.42-fold decrease in myocardial infarction) and MIAT (2.66-fold increase in myocardial infarction animals). Pearson correlation analysis between hemodynamic parameters and long non-coding RNA expression shows a correlation between H19 expression and end-systolic pressure ( $r=0.68$ ), isovolumetric relaxation constant Tau W ( $r=-0.74$ ), and  $dP/dT_{max}$  ( $r=0.73$ ). For TUG1, a positive correlation was shown with end-systolic volume ( $r=0.74$ ) and end-diastolic pressure ( $r=0.7$ ). A high level of positive correlation was shown for long non-coding RNA MIAT with end-diastolic volume ( $r=0.98$ ) and end-diastolic pressure ( $r=0.64$ ). Under ischemia/reperfusion conditions in animal myocardium, the relative expression level of long non-coding RNA H19 significantly decreases 3.79-fold, while TUG1 increases more than 33-fold. In blood plasma, significant changes were observed only for long non-coding RNA MIAT, whose expression level increases by 49.11% under ischemia/reperfusion conditions. The data obtained indicate a potential role in the pathogenesis of ischemic myocardial injury for long non-coding RNAs H19, TUG1, and MIAT. The presented correlations between the expression of these molecules with changes in hemodynamic parameters only confirm this assumption.

In the next part of the study, we analyzed the expression of long non-coding RNAs H19, HIF1A-AS1, MIAT, LIPCAR, and MHRT in patients with ischemic heart disease, under remote ischemic preconditioning in patients undergoing isolated coronary artery bypass grafting on a beating heart, as well as in the blood

plasma of elderly people monitored for 14 years (to establish a correlation between long non-coding RNA expression levels and mortality risk).

In patients with ischemic heart disease, the blood plasma expression level of H19 increases by 52.32%, and long non-coding RNAs HIF1A-AS1 and LIPCAR increase 2.44-fold and 1.96-fold, respectively. The expression level of H19 in the myocardium under remote ischemic preconditioning significantly decreases 6.7-fold, and in blood plasma - 20.5-fold. In leukocytes, H19 expression increases more than 3-fold under remote ischemic preconditioning. The expression of long non-coding RNAs HIF1A-AS1, MIAT, LIPCAR, and MHRT under remote ischemic preconditioning in the myocardium decreases 6.95-fold, 5.42-fold, 8.65-fold, and 2.5-fold, respectively. In blood plasma, we also observe a decrease in the expression levels of these long non-coding RNAs under remote ischemic preconditioning: for HIF1A-AS1 - 9.79-fold; MIAT - 27.15%; LIPCAR - 23.61-fold; MHRT - more than 15-fold. It should be noted that in leukocytes, we observe the opposite pattern of expression changes. In patients in the remote ischemic preconditioning group, the expression levels of HIF1A-AS1, MIAT, and LIPCAR increase 3.8-fold, 9.89-fold, and 4.34-fold, respectively.

The results obtained indicate that circulating long non-coding RNAs H19, HIF1A-AS1, and LIPCAR can be considered potential biomarkers of ischemic heart disease. Since remote ischemic preconditioning has a protective effect on the myocardium, the decrease in the expression of long non-coding RNAs H19, HIF1A-AS1, MIAT, LIPCAR, and MHRT in the myocardium during this procedure indicates the involvement of these molecules in the pathogenesis of ischemic heart injury.

The expression of long non-coding RNAs H19, HIF1A-AS1, MIAT, LIPCAR, and MHRT was determined in the blood plasma of 361 patients aged 75 years, who were monitored for 14 years, from 2000 to 2013. It was first established that an increase in the expression of long non-coding RNA H19 in blood plasma is associated with an increased risk of death. Cox regression analysis showed that the



expression level of long non-coding RNA above threshold values is an independent (from other factors) predictor of mortality for the elderly.

**Keywords:** long non-coding RNA, ischemia, myocardium, acute myocardial infarction, myocardial hypertrophy, heart, lncRNA, cardiac remodeling, coronary heart disease, gene expression, myocardial remodeling, cardiovascular disease, RNA, gene, DNA.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

### Публікації, у яких надруковані основні результати дисертації

1. **М. Хецуріані**, В. Є. Досенко. Довгі некодуючі РНК як регулятори фізіологічних та патологічних процесів серцево-судинної системи. *Фізіол. журн.*, 2020, Т. 66, № 4. <https://doi.org/10.15407/fz66.04.072> Фахове видання, категорія Б. *(особистий внесок здобувача: пошук та систематизація інформації, написання статті).*
2. **Хецуріані, М.**, Іоффе, Н. О., Руденко, М. Л., Древицька, Т. І., & Досенко, В. Є. (2020). Вплив віддаленого ішемічного прекодиціонування на експресію довгої некодуючої РНК H19 та фактору, що індукується гіпоксією HIF-1 $\alpha$ , при ізольованому коронарному шунтуванні у пацієнтів з ішемічною хворобою серця. *Український журнал серцево-судинної хірургії*, (3 (40)), 49-54. <https://doi.org/10.30702/ujcvs/20.4009/040049-054/089> Scopus, Q4. *(особистий внесок здобувача: проведення молекулярно-біологічних досліджень, статистична обробка результатів, написання статті).*
3. **М. Khetsuriani**, N. O. Ioffe, T. I. Drevytska, V. O. Niekrasova, V. E. Dosenko. MHRT expression during remote ischemic preconditioning in patients with coronary artery disease. *Biopolymers and Cell*, Volume 37, pp 270-277; <https://doi.org/10.7124/bc.000a59> Scopus, Q4; фахове видання, категорія А. *(особистий внесок здобувача: проведення молекулярно-біологічних досліджень, статистична обробка результатів, написання статті).*
4. **М. Khetsuriani**, T. I. Drevytska, L. V. Tumanovska, G. V. Pirtnichenko, Y. Hegel-Valentych, V. O. Niekrasova, A. M. Shysh, V. E. Dosenko. Alterations in lncRNAs H19 and TUG1 expression and their correlation with hemodynamics in myocardial infarction. *Biopolymers and Cell*, Volume 39, pp 231-241; <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A9B> Scopus, Q4; фахове

- видання, категорія А. *(особистий внесок здобувача: проведення експериментів, статистична обробка результатів та графічне оформлення, написання статті).*
5. **М. Хецуріані**, Т. І. Древицька, А. М. Шиш. Зміни експресії довгих некодуючих РНК H19, TUG1, GAS5, MIAT при ішемії-реперфузії міокарда. Фізіол. журн., 2024, Т. 70, № 1. <https://doi.org/10.15407/fz70.01.052> Scopus, Q4; фахове видання, категорія А. *(особистий внесок здобувача: проведення експериментів, статистична обробка результатів та графічне оформлення, написання статті).*
  6. Serebrovska ZO, Xi L, Tumanovska LV, Shysh AM, Goncharov SV, **Khetsuriani M**, Kozak TO, Pashevin DA, Dosenko VE, Virko SV, et al. Response of Circulating Inflammatory Markers to Intermittent Hypoxia-Hyperoxia Training in Healthy Elderly People and Patients with Mild Cognitive Impairment. *Life*. 2022; 12(3):432. <https://doi.org/10.3390/life12030432> Scopus, Q2. *(особистий внесок здобувача: проведення молекулярно-біологічних досліджень із визначення експресії довгих некодуючих РНК у плазмі крові пацієнтів, статистична обробка результатів, написання частини статті).*
  7. Lapikova-Bryhinska T, Ministrini S, Puspitasari YM, Kraler S, Mohamed SA, Costantino S, Paneni F, **Khetsuriani M**, Bengs S, Liberale L, Montecucco F, Krampla W, Riederer P, Hinterberger M, Fischer P, Lüscher TF, Grünblatt E, Akhmedov A, Camici GG. Long non-coding RNAs H19 and NKILA are associated with the risk of death and lacunar stroke in the elderly population. *Eur J Intern Med*. 2023 Nov 17:S0953-6205(23)00411-9. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2023.11.013> Scopus, Q1. *(особистий внесок здобувача: проведення біонформаційного пошуку, проведення молекулярно-біологічних досліджень, статистична обробка результатів, написання частини статті).*

**Які засвідчують апробацію матеріалів дисертації**

1. **M. Khetsuriani**, V. Dosenko. Long non coding RNAs in regulation of hypoxic program in heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, Volume 120, Supplement, 2018, Page 45, ISSN 0022-2828, <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.05.135>
2. **Хецуріані М.** Довгі некодуючі РНК при патології серця: ключові регулятори, біомаркери чи артефакти? *Kyiv Non-Coding Meeting 2018*, Kyiv, Ukraine.
3. **Хецуріані М.** Довгі некодуючі РНК у кардіології: сподівання та реальність. Перспективи розвитку профілактичної та клінічної медицини, Київ, 19 квітня 2019 року. С2.
4. **M. Khetsuriani**. Expression of long non-coding RNAs HIF1A-AS1, LIPCAR, and MIAT under remote ischemic preconditioning in patients with decompensated heart failure. *Frontiers in CardioVascular Biomedicine 2020*, Budapest.
5. **Хецуріані М.** Довгі некодуючі РНК як маркери серцево-судинних захворювань». 19-25 вересня, 2021, Львів, Україна.
6. **Хецуріані М.,** Древицька Т.І., Некрасова В.О., Досенко В.Є. Значення експресії довгої некодуючої РНК H19 при інфаркті міокарда. Збірник матеріалів III науково-практичної конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини та фармації». 12 травня, 2021, Харків, Україна. с. 170-172.
7. Некрасова В. О. **Хецуріані М.,** Древицька Т. І. Досенко В. Є. Вплив куркуміну на експресію довгих некодуючих РНК H19, MIAT, MALAT1, HOTAIR за впливу аноксії/реоксигенації. XIX міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених "Шевченківська весна: досягнення біологічної науки«. Збірник тез. Київ, 12-13 травня, 2021. С. 158-161.
8. **Khetsuriani M,** Ioffe NO, Drevytska TI, Niekrasova VN, Dosenko VE. Expression of long non-coding RNAs HIF1A-AS1, LIPCAR, and MIAT

under remote ischemic preconditioning in patients with coronary artery disease. XV IMBG all-Ukrainian Conference of Young Scientists with international participation. Biopolymers and Cell. 2021. Vol. 37. N 3. – P. 199. Kyiv 2021.