

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О. О. БОГОМОЛЬЦЯ**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ХЕЦУРІАНИ МИХАЙЛО

УДК 577.213:616.12

**ДИСЕРТАЦІЯ
ЗМІНИ ЕКСПРЕСІЇ ДОВГИХ НЕКОДУЮЧИХ РНК,
ЗАЛУЧЕНИХ ДО ГІПОКСИЧНОЇ ПРОГРАМИ,
ПРИ ІШЕМІЧНОМУ УШКОДЖЕННІ СЕРЦЯ**

Спеціальність — 091 Біологія та біохімія

Галузь знань — 09 Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Хецуріані М. _____

Науковий керівник: **Шиш Анжела Михайлівна**,
кандидат біологічних наук

Київ-2024

АНОТАЦІЯ

Хецуріані М. Зміни експресії довгих некодуючих 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 некодуючих 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 некодуючих 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 некодуючої 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 некодуючих 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 α) 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 регулюються не фактором HIF-1 α , 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 α 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 α 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- α , 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 (I/P) 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 некодуючої 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 некодуючих РНК H19 (зниження у 2,42 рази) та MIAT (зростання у 2,66 рази). Кореляційний аналіз Пірсона між кардіогемодинамічними параметрами та експресією довгих некодуючих РНК показує кореляцію між експресією H19 із кінцево-систоличним тиском ($r=0,68$), ізоволюмічною константою розслаблення Тау 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 некодуючої 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 некодуючої 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 некодуючої РНК MIAT, рівень експресії якої при I/P зростає на 49,11%. Отримані дані свідчать про потенційну роль у патогенезі ішемічного ушкодження міокарда довгих некодуючих 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 некодуючих РНК H19, HIF1A-AS1, MIAT, LIPCAR та MHRT у пацієнтів з ішемічною хворобою серця, за умов віддаленого ішемічного прекодиціонування у пацієнтів, яким проводили операцію ізольованого аортокоронарного шунтування на працюючому серці. Також проаналізована експресія довгих некодуючих РНК у плазмі крові людей похилого віку, за якими вели спостереження протягом 14 років з метою встановлення кореляційного зв'язку між рівнем експресії довгих некодуючих 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 некодуєчих 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 некодуєчих 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 некодуєчі 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 некодуєчих 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 некодуєчих 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 некодуєчої H19 у плазмі крові пов'язане із підвищеним ризиком смерті. Регресійний аналіз за Коксом дозволив встановити, що рівень експресії довгої некодуєчої РНК вище порогових значень є незалежним (від інших факторів) предиктором смерті для людей похилого віку.

Ключові слова: довгі некодуєчі 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 α) 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 α 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 α 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 α 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- α 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 α , 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. **М. Khetsuriani**, V. Dosenko. Long non coding RNAs in regulation of hypoxic program in heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, Volume 120,

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. **М. 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.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	17
ВСТУП.....	19
РОЗДІЛ 1	27
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	27
1.1. Класифікація, властивості та функції довгих некодуєчих РНК	27
1.1.1. Класифікація довгих некодуєчих РНК.....	27
1.1.2. Властивості та функції довгих некодуєчих РНК.....	29
1.1.3. Інтерактом довгих некодуєчих РНК.....	32
1.2. Роль довгих некодуєчих РНК у фізіології серцево-судинної системи.....	34
1.2.1. Довга некодуєча РНК BVHT та ембріональний розвиток серця	36
1.2.2. Роль довгих некодуєчих РНК CARMEN та FENDRR у клітинній диференціації.....	37
1.3. Значення довгих некодуєчих РНК у патології серця та судин	37
1.3.1. Довгі некодуєчі РНК та ішемія міокарда.....	37
1.3.2. Участь довгих некодуєчих РНК у розвитку гіпертрофії серця.....	40
1.4. Участь довгих некодуєчих РНК у дисфункції клітин ендотелію і гладеньких м'язів судин.....	43
1.4.1. Довгі некодуєчі РНК MALAT1 і TGFB2-OT1 та дисфункція клітин ендотелію	43
1.4.2. Довга некодуєча РНК LincRNA-p21 в проліферації клітин гладеньких м'язів судин	44
1.5. Довгі некодуєчі РНК в діагностиці та терапії серцево-судинних захворювань.....	44
1.5.1. Довгі некодуєчі РНК як біомаркери серцево-судинних захворювань ..	44
1.5.2. Довгі некодуєчі РНК як мішені для терапії	46
II. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.....	49
2.1. Біоінформаційний пошук та бази даних	49
2.2. Первинна культура кардіоміоцитів неонатальних щурів.....	49
2.3. Додавання до культури клітин інгібітора NIF-пролілгідроксилази	50

2.4. Модель аноксії-реоксигенації культури кардіоміоцитів неонатальних щурів	50
2.5. Визначення некротичних та апоптотичних клітин	50
2.6. Групи тварин.....	51
2.7. Модель інфаркту міокарда.....	51
2.8. Модель ішемії-реперфузії міокарда	52
2.9. Реєстрація та аналіз кардіогемодинамічних показників <i>in vivo</i>	52
2.10. Фарбування гістологічних зрізів за Ван Гізоном.....	54
2.11. Пацієнти	55
2.12. Методика віддаленого ішемічного прекодиціонування.....	55
2.13. Взяття біологічного матеріалу пацієнтів.....	56
2.14. Оцінка гемодинамічних показників пацієнтів	56
2.15. Виділення РНК	56
2.16. Зворотна транскрипція	56
2.17. Полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі	57
2.18. Статистична обробка отриманих результатів	58
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	60
3.1. ЕКСПРЕСІЯ H19, TUG1, GAS5 ТА MIAT У ПЕРВИННІЙ КУЛЬТУРІ КАРДІОМІОЦИТІВ НЕОНАТАЛЬНИХ ЩУРІВ	60
3.1.1. Визначення експресії lncRNAs H19, TUG1, GAS5, MIAT, мРНК HIF-1 α та рівня виживаності клітин у первинній культурі кардіоміоцитів неонатальних щурів за умови аноксії/реоксигенації.....	60
3.1.2. Визначення експресії lncRNAs H19, TUG1, GAS5 та MIAT у первинній культурі кардіоміоцитів неонатальних щурів при додаванні інгібітора HIF-проліл гідроксилази.....	65
3.2. ЕКСПРЕСІЯ H19, TUG1, GAS5 ТА MIAT У ЩУРІВ ЛІНІЇ WISTAR ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ІНФАРКТУ МІОКАРДА	69
3.2.1. Кардіогемодинамічні та морфологічні зміни серця у щурів при моделюванні інфаркту міокарда.....	69
3.2.2. Зміни експресії lncRNAs H19, TUG1, GAS5 та MIAT у міокарді та плазмі крові щурів при моделюванні інфаркту міокарда	74

3.2.3. Кореляційний аналіз між експресією lncRNAs H19, TUG1, MIAT, GAS5 та гемодинамічними показниками	77
3.3. ЕКСПРЕСІЯ H19, TUG1, GAS5 ТА MIAT У ЩУРІВ ЛІНІЇ WISTAR ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ІШЕМІЇ/РЕПЕРФУЗІЇ МІОКАРДА	81
3.3.1. Кардіогемодинамічні зміни у щурів при моделюванні ішемії-реперфузії	81
3.3.2. Зміни експресії lncRNAs H19, TUG1, GAS5 та MIAT у міокарді та плазмі крові щурів при моделюванні ішемії-реперфузії міокарда	87
3.4. ЕКСПРЕСІЯ HIF-1 α ЗАЛЕЖНИХ ДОВГИХ НЕКОДУЮЧИХ РНК ТА ГЕНІВ У ПАЦІЄНТІВ ІЗ ІШЕМІЧНОЮ ХВОРОБОЮ СЕРЦЯ ТА ІНФАРКТОМ МІОКАРДА	91
3.4.1. Зміни гемодинамічних параметрів після ВІПК при ізольованому коронарному шунтуванні у пацієнтів з ішемічною хворобою серця	92
3.4.2. Експресія HIF-1 α , PDK1, GLUT1, BDNF та mTOR у міокарді та лейкоцитах після ВІПК при ізольованому коронарному шунтуванні у пацієнтів з ішемічною хворобою серця	95
3.4.3. Зміни експресії lncRNAs H19, HIF1A-AS1, MIAT, LIPCAR та MHRT у пацієнтів з ішемічною хворобою серця за умов віддаленого ішемічного прекондиціонування.....	97
3.4.4. LncRNA H19 як потенційний маркер підвищеного ризику смерті.....	100
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	105
ВИСНОВКИ	113
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	116
ДОДАТОК 1	138
ДОДАТОК 2	140

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- lncRNA — довга некодуєча РНК
- HIF — фактор, що індукується гіпоксією
- ORF — відкрита рамка зчитування
- eIncRNAs — енхансерні довгі некодуєчі РНК
- ceRNA — конкурентна ендогенна РНК
- MREs — елементи, що зв'язуються із мікроРНК
- SPHK1 — сфінгозинкіназа 1
- TLR4 — толл-подібний рецептор 4
- CaMKII δ — кальцій/кальмодулін залежна протеїнкіназа II δ
- HUVECs — ендотеліальні клітини пуповини людини
- RHD — HIF-пролілгідроксилаза
- ШВЛ — штучна вентиляція легень
- RVU — відносні одиниці об'єму
- ВІПК — віддалене ішемічне прекодиціонування
- ICG — імпедансна кардіографія
- УІ — ударний індекс
- СО — серцевий викид
- СІ — серцевий індекс
- ДАТ — діастолічний артеріальний тиск
- САТ — систолічний артеріальний тиск
- ІЗПСО — індекс загального периферичного судинного опору
- ЦВТ — центральний венозний тиск
- A/P — аноксія/реоксигенація
- ІМ — інфаркт міокарда
- ЧСС — частота серцевих скорочень
- КСО — кінцево-систолічний об'єм
- КДО — кінцево-діастолічний об'єм
- КСТ — кінцево-систолічний тиск

КДТ — кінцево-діастолічний тиск

УО — ударний об'єм

ФВ — фракція викиду

ХОК — хвилинний об'єм крові

УР — ударна робота

АЖ — артеріальна жорсткість

dP/dt_{max} – максимальна швидкість збільшення тиску у лівому шлуночку dP/dt_{min} – мінімальна швидкість розслаблення у лівому шлуночку

dV/dt_{max} – максимальна швидкість зміни об'єму

dV/dt_{min} – мінімальна швидкість зміни об'єму

Тау W — ізовольюмічна константа розслаблення

Рамр — максимальна потужність з урахуванням переднавантаження

I/P — ішемія/реперфузія

PDK1 — кіназа піруватдегідрогенази 1

GLUT1 — глюкозний транспортер 1

mTOR — мішень рапаміцину у ссавців

BDNF — нейротрофічний фактор мозку

ІХС — ішемічна хвороба серця

ВСТУП

Актуальність. Хвороби серця — одна з провідних причин смерті та інвалідності у всьому світі [Mc Namara, 2019]. Дослідження механізмів, що лежать в основі цих патологій, може допомогти у розробці нових терапевтичних та діагностичних підходів. Одним з ушкоджуючих факторів серцево-судинної системи, який сьогодні ретельно вивчається на молекулярно-генетичному рівні, є гіпоксія [Salva, 2018].

Значна роль у патогенезі гіпоксичного стану та ішемічних ушкоджень серцевого м'язу відводиться білковому фактору, що індукується гіпоксією (hypoxia-inducible factor, HIF) [Semenza, 2013]. Це гетеродимерний транскрипційний фактор, який активує транскрипцію декількох генів, що сприяють виживанню в умовах низької концентрації кисню. Одним з імовірних механізмів регуляції HIF-сигнального шляху є довгі некодуючі РНК [Barth, 2020]. Ці молекули представляють значну частину транскриптому, що не виступає в ролі матриці для синтезу протеїнів [Jargoux, 2017]. Натомість цей клас нуклеїнових кислот виконує численні регуляторні функції як на транскрипційному, так і посттранскрипційному рівнях.

Встановлено регуляторну роль довгих некодуючих РНК при численних патологічних та фізіологічних станах, зокрема і у серцево-судинній системі. Зокрема, ідентифіковано довгу некодуючу РНК HIF1A-AS1, яка є природнім антисенсом до мРНК альфа субодиниці фактору гіпоксії HIF-1 [Uchida, 2004]. Було показано, що рівень HIF1A-AS1 у плазмі крові помітно зростає за умов низької концентрації кисню [Mounier, 2009]. Встановлено, що РНК-інтерференція HIF1A-AS1 сприяє виживанню кардіоміоцитів *in vitro* [Acun, 2017]. Натомість порівняльної експресії фактору гіпоксії HIF-1 α та HIF1A-AS1 при серцево-судинних патологіях ще не було продемонстровано. Іншими довгими некодуючими РНК, що залучені до регуляції HIF-сигнального шляху є H19, TUG1, MIAT та інші [Son, 2021]. До прикладу, встановлено, що гени H19 та TUG1

у промоторній ділянці мають сайти зв'язування із фактором, що індукується гіпоксією HIF-1 α [Wu, 2017, Wang, 2022].

Ідентифікація та визначення ролі довгих некодуючих РНК, залучених до регуляції гіпоксії, може стати інструментом для ранньої діагностики серцево-судинних патологій, а також відкриває можливості для створення нових методів терапії. Зокрема, наші дослідження на тваринах спрямовані на пошук потенційних мішеней для РНК-інтерференції або надекспресії РНК *in vivo*. Дослідження клінічного матеріалу дозволять визначити потенційні біологічні маркери ішемічного ушкодження серця.

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.

Зв'язок роботи із науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в рамках відомчих тем НДР відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України: «Значення довгих некодуючих 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.), за цільовою програмою «Підтримка пріоритетних для держави наукових досліджень і науково-технічних (експериментальних) розробок відділення біохімії, фізіології і молекулярної біології НАН України (реєстраційний номер 0120U101281, 2021р.).

Мета роботи: 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.

Відповідно до мети поставлені наступні **завдання**:

1. Встановити рівень експресії довгих некодуючих РНК H19, TUG1, MIAT та GAS5 за умов аноксії-реоксигенації у первинній культурі кардіоміоцитів неонатальних щурів.
2. Визначити експресію довгих некодуючих РНК H19, TUG1, MIAT та GAS5 та кардіогемодинамічні показники при моделюванні інфаркту міокарда у щурів лінії Wistar. Провести кореляційний аналіз між кардіогемодинамічними показниками та експресією довгих некодуючих РНК H19, TUG1, MIAT та GAS5.
3. Визначити експресію довгих некодуючих РНК H19, TUG1, MIAT та GAS5 та кардіогемодинамічні показники при моделюванні ішемії-реперфузії міокарда у щурів лінії Wistar.
4. Дослідити експресію довгих некодуючих РНК H19, MIAT, HIF1A-AS1, LIPCAR та MHRT у плазмі крові людей із ішемічною хворобою серця.
5. Визначити гемодинамічні показники та експресію довгих некодуючих РНК H19, MIAT, HIF1A-AS1, LIPCAR, MHRT та HIF-1-alpha-залежних генів PDK1, GLUT1, BDNF та mTOR у міокарді, лейкоцитах та плазмі крові пацієнтів, яким було проведено операцію із аорто-коронарного шунтування за умов проведення віддаленого ішемічного прекодиціонування.
6. Визначити експресію довгих некодуючих РНК H19, MIAT, HIF1A-AS1, LIPCAR та MHRT у людей похилого віку та встановити кореляційний зв'язок між експресією конкретних довгих некодуючих РНК із ризиком смерті.

Об'єкт дослідження — ішемічне ушкодження культури кардіоміоцитів та міокарда щурів, ішемічна хвороба серця та віддалене ішемічне прекодиціонування у пацієнтів.

Предмет дослідження — експресія довгих некодуючих РНК, залучених до гіпоксичної програми, за ішемічного ушкодження культури кардіоміоцитів,

міокарда у щурів, ішемічної хвороби серця та віддаленого ішемічного прекондиціонування у пацієнтів.

Методи дослідження:

— *патофізіологічні* (аноксія-реоксигенація первинної культури кардіоміоцитів неонатальних щурів, модель інфаркту та ішемії-реперфузії міокарда у щурів);

— *фізіологічні* (визначення кардіогемодинамічних показників у щурів із використанням ультратонкого катетера Millar, визначення гемодинамічних параметрів у пацієнтів методом імпедансної кардіографії);

— *морфологічні* (світлова, флуоресцентна мікроскопія);

— *молекулярно-біологічні* (виділення тотальної РНК, зворотна транскрипція, полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі);

— *статистичні* (первинна обробка даних, однофакторний, двофакторний тест ANOVA, кореляційний аналіз Пірсона, тест Вілкоксона, оцінка виживаності за Капланом-Мейером, регресія із пропорційними ризиками Кокса).

Наукова новизна. У дисертаційній роботі вперше показана зміна експресії довгих некодуючих РНК H19, TUG1, MIAT та GAS5 у кардіоміоцитах неонатальних щурів за умов аноксії-реоксигенації, а також при моделюванні інфаркту міокарда та ішемії-реперфузії у щурів лінії Wistar. На культурі кардіоміоцитів неонатальних щурів встановлено, що рівень експресії зазначених довгих некодуючих РНК знижується при аноксії/реоксигенації. При додаванні у культуру клітин інгібітора HIF-проліл гідроксилази рівень експресії довгих некодуючих РНК H19 та TUG1 знижується, а MIAT — підвищується.

Виявлено, що при моделюванні інфаркту міокарда рівень експресії lncRNA H19 знижується, а TUG1 та MIAT — збільшується у міокарді та плазмі крові щурів. Вперше у дисертаційній роботі встановлені кореляційні зв'язки між

експресією довгих некодуючих РНК H19, TUG1, MIAT та GAS5 із низкою кардіогемодинамічних показників, таких як кінцево-сistolічний тиск, кінцево-діастолічний тиск, ізвольюмічна константа розслаблення Tau W, dP/dT_{max} та ударна робота серця.

У роботі досліджені особливості експресії довгих некодуючих РНК H19, MIAT, HIF1A-AS1, LIPCAR, MHRT у пацієнтів із ішемічною хворобою серця. Показано, як змінюється експресія зазначених довгих некодуючих РНК у міокарді, лейкоцитах та плазмі крові за умов віддаленого ішемічного прекондиціонування у пацієнтів, яким проводили операцію аортокоронарного шунтування. Вперше проведено дослідження експресії довгих некодуючих РНК H19, MIAT, HIF1A-AS1, LIPCAR, MHRT на великій вибірці здорових літніх пацієнтів. Показано, що довга некодуюча РНК H19 є незалежним предиктором смерті у осіб похилого віку.

Теоретичне та практичне значення отриманих результатів.

Отримані результати дисертаційної роботи мають як теоретичне, так і практичне значення. Визначення особливостей експресії довгих некодуючих РНК H19, TUG1, MIAT та GAS5 у щурів дає розуміння більш глибоких молекулярних механізмів, які лежать в основі ішемічного ушкодження міокарда. Отримані дані можуть бути використані для проведення подальших досліджень із інтерференцією або надекспресією зазначених довгих некодуючих РНК. Результати дисертаційної роботи можуть бути використані для написання методичної, освітньої літератури для навчальних закладів медичного та біологічного профілю. Крім того, результати роботи можуть бути використані для обґрунтування можливого застосування інформації про довгі некодуючі РНК у клінічній практиці.

Результати дослідження із визначення експресії довгих некодуючих РНК H19, MIAT, HIF1A-AS1, LIPCAR, MHRT у пацієнтів із ішемічною хворобою серця та у здорових пацієнтів похилого віку можуть бути використані для пошуку

нових маркерів для діагностики та лікування серцево-судинних захворювань. Відомості про lncRNA H19 як незалежного предиктора смерті у осіб похилого віку, можуть бути використані для визначення груп ризику серед літніх людей.

Особистий внесок здобувача. Головна ідея та завдання дисертаційного дослідження сформовані разом із попереднім науковим керівником д.м.н. Досенко Віктором Євгеновичем та науковим керівником к.б.н. Шиш Анжелою Михайлівною. Автором проведено аналіз літератури та баз даних для вибору низки довгих некодуючих РНК, експресія яких визначалася на експериментальних моделях та у добровольцях. Автором була проведена основна частина експериментальних досліджень — аноксія-реоксигенація культури кардіоміоцитів неонатальних щурів, моделювання гострого інфаркту міокарда, ішемії-реперфузії, визначення експресії довгих некодуючих РНК у відібраних зразках. Автором була проведена статистична обробка отриманих результатів та написані всі розділи дисертаційної роботи.

Автор висловлює подяку колегам із відділу загальної та молекулярної патофізіології, які допомагали у проведенні досліджень. Співучасть колег автора була відмічена у спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Основні результати та положення представлені на таких конференціях, симпозіумах та конгресах:

- 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.

- 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.

- Довгі некодуючі РНК як маркери серцево-судинних захворювань». 19-25 вересня, 2021, Львів, Україна.

- 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.

- 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.

- Довгі некодуючі РНК у кардіології: сподівання та реальність. Перспективи розвитку профілактичної та клінічної медицини, Київ, 19 квітня 2019 року. С2.

- Довгі некодуючі РНК при патології серця: ключові регулятори, біомаркери чи артефакти? *Kyiv Non-Coding Meeting* 2018, Kyiv, Ukraine.

- 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>

Публікації. За темою дисертації було опубліковано 15 робіт, з них 7 статей. Дві статті опубліковані в журналах, які за рейтингом Scimago віднесені до

першого та другого кuartилів (Q1, Q2). Чотири статті опубліковані в українських фахових виданнях, віднесених до науково-метричної бази Scopus (Q4).

Структура і об'єм дисертації. Дисертація написана на 141 сторінці друкованого тексту та містить такі розділи: перелік умовних скорочень, вступ, огляд літератури, матеріали і методи дослідження, результати дослідження та їх обговорення, аналіз і узагальнення результатів дослідження, висновки, список використаних джерел, що включає в себе 189 найменувань. Дисертаційна робота проілюстрована 22 рисунками.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Класифікація, властивості та функції довгих некодуючих РНК

1.1.1. Класифікація довгих некодуючих РНК

За даними проекту ENCODE, 80,4% геному людини представлені генами, що транскрибуються, з них зчитується інформація у вигляді рибонуклеїнової кислоти (РНК) [10]. При цьому переважна більшість транскриптому є некодуючою. На гени, що відповідають за кодування матричних РНК (мРНК) для синтезу поліпептидів припадає не більше 2% усього геному [11]. Дезоксирибонуклеїнову кислоту (ДНК), що не відповідає за кодування білків, довгий час вважали «смітцевою» [12]. Проте значні успіхи в царині секвенування та біоінформатики за останні десятки років спростовують це твердження [13].

Попри те, що більшість транскриптів є некодуючими, ці РНК виконують важливі функції [14]. Сьогодні некодуючі РНК прийнято ділити на дві великі групи: малі некодуючі та довгі некодуючі РНК. Довгими некодуючими РНК (lncRNAs — Long Non-Coding RNAs) прийнято вважати некодуючі рибонуклеїнові кислоти, розмір яких перевищує 200 нуклеотидів [15]. Біогенез lncRNAs подібний до такого у мРНК. Транскрипція lncRNAs, як і мРНК, забезпечується промоторними елементами, транскрипційними факторами, а також певними модифікаціями гістонових білків [16]. Як і мРНК, lncRNAs піддаються сплайсингу, 5'-кепуванню та 3'-поліаденілюванню для утворення зрілих форм молекул [17]. Більшість проведених досліджень показують, що lncRNAs, на відміну від мРНК, коротші та мають значно менше екзонів [18-20]. Так, близько 42% усіх lncRNAs мають у своєму складі лише 2 екзони [21]. Крім того, у lncRNAs, порівняно із мРНК, коротша відкрита рамка зчитування (ORF — Open Reading Frame) та нижчий рівень експресії [22-24].

Допоки невідомо, чи усі lncRNAs мають біологічні функції. Враховуючи це, загальноприйнятою є класифікація lncRNAs за їхньою геномною локалізацією lncRNAs (рис. 1.1.1.).

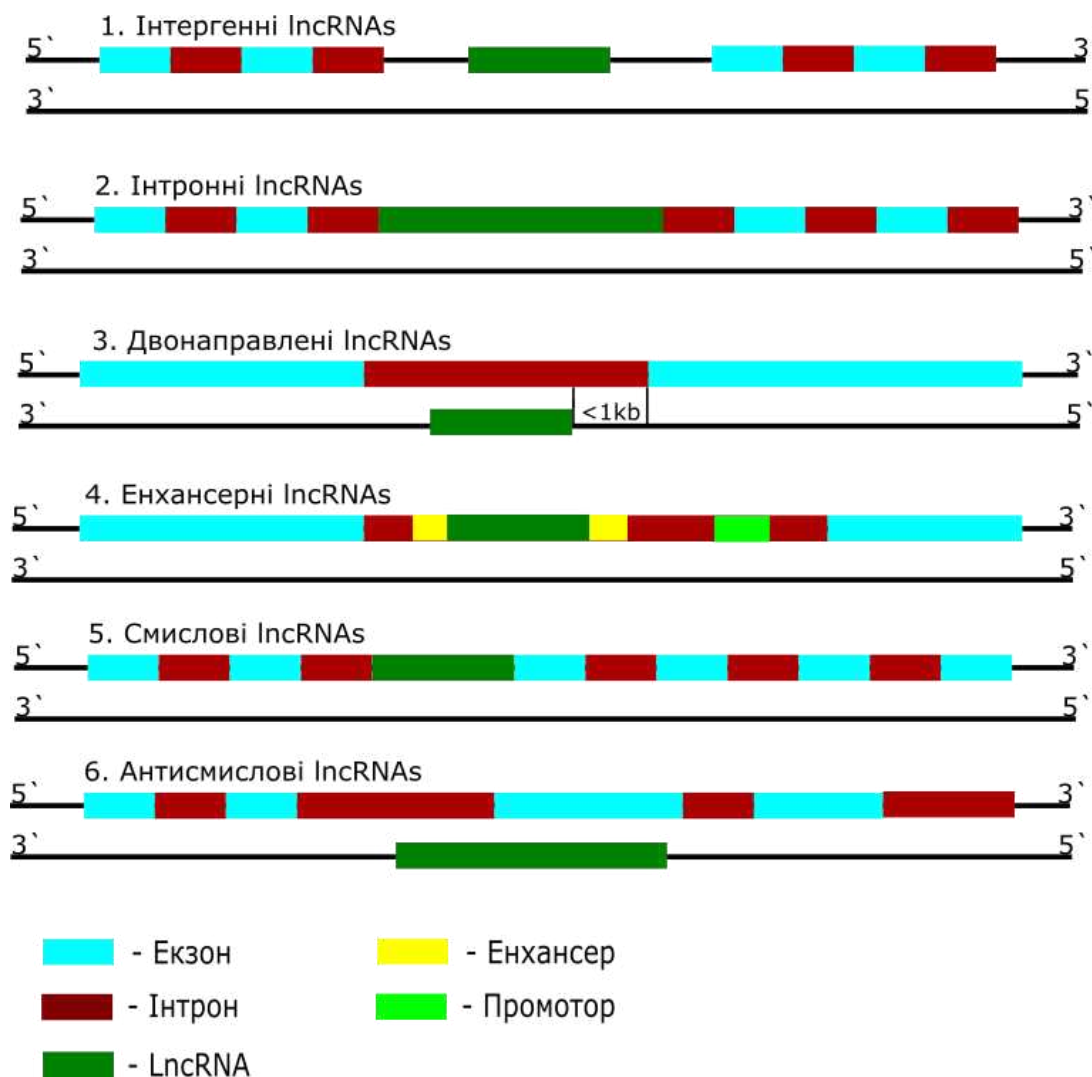


Рис. 1.1.1. Класифікація lncRNAs з огляду на їх геномну локалізацію.

1 – інтергенні lncRNAs; 2 – інтронні lncRNAs; 3 – двонаправлені lncRNAs; 4 – енхансерні lncRNAs; 5 – смыслові lncRNAs; 6 – антисмыслові lncRNAs.

Розглянемо основні види lncRNAs в залежності від їх геномної локалізації:

1. **Інтергенні lncRNAs** – розташовуються між двома білок-кодуєчими генами. Це найбільш розповсюджений вид довгих некодуєчих РНК [25].

2. **Інтронні lncRNAs** – розташовані всередині інтрона білок-кодуючих генів [26].
3. **Двонаправлені lncRNAs** – транскрибуються за участю двонаправленого промотора, розмір якого не перевищує 1 kb. Таким чином, двонаправлені lncRNAs транскрибуються у протилежному напрямку від білок-кодуючого транскрипту [27].
4. **Енхансерні lncRNAs** – транскрибуються з енхансерної ділянки геному [27].
5. **Смислові lncRNAs** - транскрибуються зі смислового ланцюга білок-кодуючих генів і можуть перекривати інтрони, частину або весь екзон [26, 27].
6. **Антисмислові lncRNAs** - транскрибуються з антисмислового ланцюга білок-кодуючих генів і можуть перекривати екзон гена в смисловому ланцюгу та/або інтрони [21, 26, 27].

За рівнем транскрипційної активності найбільше подібні до мРНК є інтергенні lncRNAs [28, 29]. Інтергенні lncRNAs проявляють більшу консервативність, ніж інтрони та антисмислові транскрипти [28, 29]. Крім того, їх експресія має більшу тканинну специфічність, порівняно із білок-кодуючими генами [21, 28, 30].

1.1.2. Властивості та функції довгих некодуючих РНК

На відміну від мРНК та мікроРНК, lncRNAs мають відносно низький рівень консервативності. На сьогодні відомо, що lncRNAs є важливими регуляторами багатьох біологічних процесів як у серці, судинах, так і в інших органах і тканинах [31]. В той час, як мікроРНК, як відомо, знижує експресію генів переважно шляхом індукування деградації мРНК, регуляція експресії генів довгими некодуючими РНК відбувається шляхом більш різноманітних механізмів. Розглянемо основні функції довгих некодуючих РНК.

lncRNAs як сигнальні молекули. Сигнальні lncRNAs регулюють транскрипцію генів у відповідь на різні зовнішні чинники та стимули [27].

Яскравим прикладом сигнальної lncRNA є довга некодуюча РНК KCNQ1OT1. Вона рекрутує метилтрансферазу G9a та комплекс PRC2, що призводить до метилювання лізинів H3K9 та H3K27 (Рис. 1.1.2.). Таким чином здійснюється сайленсинг генів, розташованих як в цис- так і транс-положенні [32, 33].

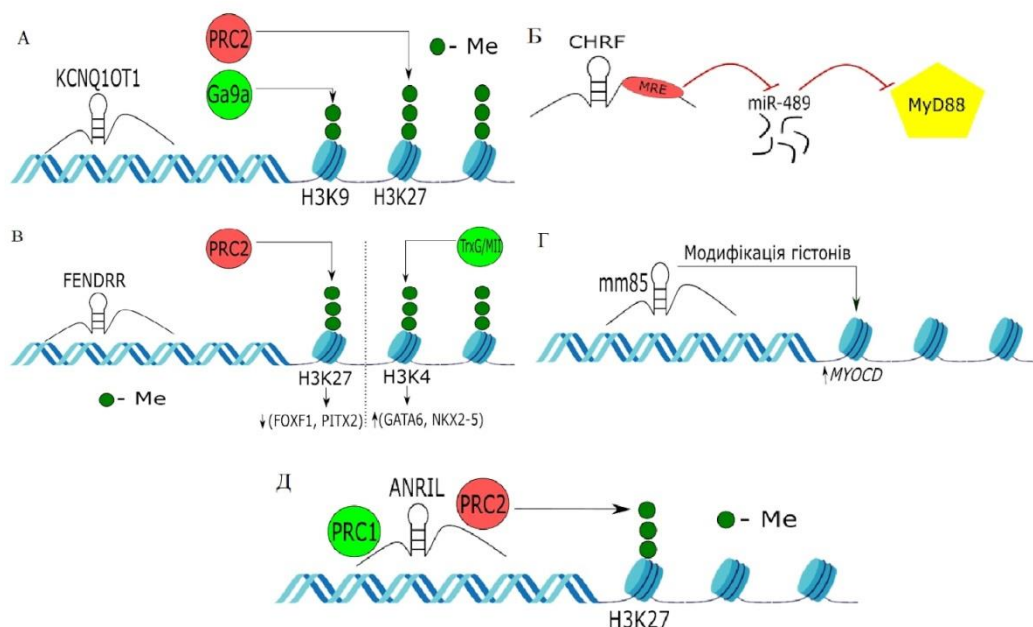


Рис. 1.1.2. Механізм дії lncRNAs. А. Сигнальні молекули. Б. Молекулярні пастки. В. Навігаційні молекули. Г. Енхансери. Д. Адапторні молекули.

LncRNAs як молекулярні пастки. Довгі некодуючі РНК можуть зв'язуватися з факторами транскрипції, ферментами, що залучені до модифікацій хроматину, а також з мікроРНК. Одним із яскравих таких прикладів є lncRNA MALAT1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1), яка може зв'язуватися з серин/аргініновими факторами сплайсингу в інтерхроматинових гранулах. Таким чином здійснюється контроль альтернативного сплайсингу [34]. Чимало lncRNAs, що функціонують як молекулярні пастки, представлені і в регуляції патологічних процесів у серцево-судинній системі. Наприклад, lncRNA CHRF (Cardiac Hypertrophy-Related Factor) виконує роль молекулярної губки для miR-489. Мішенню для miR-489 є ген адапторного білка MyD88, який задіяний до розвитку гіпертрофії серцевого м'яза (Рис. 1.1.2.) [35]. Таким чином, підвищена експресія

lncRNA CHRF призводить до секвестрації miR-489, на фоні чого запускається трансляція MyD88, що сприяє розвитку гіпертрофії.

LncRNAs як навігаційні молекули. Довгі некодуючі РНК можуть зв'язуватися з активаторами та репресорами експресії генів, рекрутуючи утворені рибонуклеопротеїнові комплекси до промоторів цільових генів. Наприклад, lncRNA FENDRR утворює комплекс із PRC2 (polycomb repressive complex 2), що зв'язується із промоторами генів FOXF1 та PITX2 та пригнічує експресію цих генів [36]. Цікаво, що lncRNA FENDRR може також зв'язуватися і з білками групи Trithorax, активуючі експресію генів (Рис. 1.1.2.) [36].

LncRNAs як енхансери. Деякі довгі некодуючі РНК беруть участь у взаємодіях енхансеру з промотором. Це енхансерні lncRNAs (elncRNAs), які досить широко представлені в регуляції роботи серцево-судинної системи [27]. Одним із таких прикладів є lncRNA mm85, яка, зв'язуючись з енхансером, посилює експресію мРНК міокардину (Рис. 2) [37]. Найчастіше elncRNAs безпосередньо взаємодіють із промоторними ділянками дволанцюгової ДНК, формуючи триплекси [15].

LncRNAs як адапторні молекули. Деякі lncRNAs можуть одночасно зв'язуватися з декількома молекулярними комплексами, що виступають в ролі як активаторів, так і репресорів транскрипції генів. Це так звані скаффолд lncRNAs, однією із яких є lncRNA ANRIL (CDKN2B-AS1). LncRNA ANRIL рекрутує комплекси PRC1 та PRC2, що призводить до сайленсингу локусу INK4b-ARF-INK4a (Рис. 1.1.2.) [38]. LncRNA ANRIL згадується в якості генетичного фактора ризику коронарної хвороби серця [39]. Встановлено, що збільшення експресії lncRNA ANRIL пов'язане із дисфункцією лівого шлуночка після гострого інфаркту міокарда [40].

Варто відзначити, що більшість довгих некодуючих РНК можуть проявляти різні типи функціональної активності, що в результаті спричинює пригнічення чи посилення експресії генів. Наприклад, lncRNA HOTAIR (HOX Transcript Antisense

RNA) за різних умов виступає в ролі як сигнальної молекули, молекулярної пастки, так і навігаційної РНК [41].

1.1.3. Інтерактом довгих некодуєчих РНК

Окрім взаємодій із мікроРНК та білками, довгі некодуєчі РНК також взаємодіють із іншими РНК (формуєючи дуплекси) та навіть із ДНК (формуєючи триплекси). Розглянемо більш детально особливості інтерактому lncRNAs (Рис. 1.1.3.).

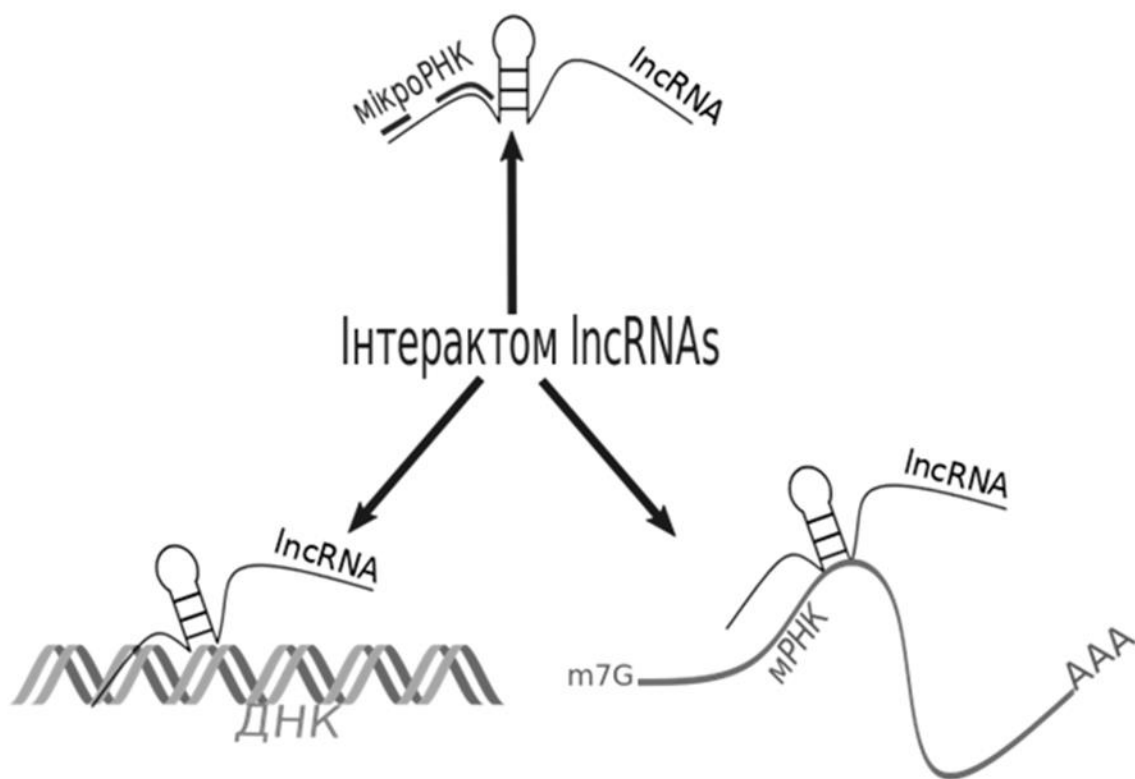


Рис. 1.1.3. Типи взаємодій lncRNAs з іншими нуклеїновими кислотами

Взаємодії із мікроРНК та теорія конкурентних ендогенних РНК. Як відомо, мікроРНК можуть взаємодіяти з матричними РНК шляхом приєднання до специфічних послідовностей мРНК, що зветься MRE (miRNA responsive element) [42]. У 2011 році була запропонована теорія конкурентних ендогенних РНК (ceRNA – competitive endogenous RNA) [43]. Суть цієї теорії полягає в тому, що

некодуючі РНК та мікроРНК впливають один на одного, формуючи величезну мережу, що регулює трансляцію матричних РНК. Згідно цієї теорії мРНК, lncRNAs, циркулярні РНК, транскрипти псевдогенів та інші РНК можуть конкурувати між собою за зв'язування з мікроРНК [44]. Пов'язано це із тим, що різні некодуючі РНК можуть мати однакові MREs. Таким чином, ендогенні конкурентні РНК, взаємодіючи із мікроРНК утворюють високоорганізовану регуляторну мережу у транскриптомі. Наявність однакових MREs у різних некодуючих РНК дозволяє змінювати активність мікроРНК, що в кінцевому рахунку призводить до змін у трансляції цільових мРНК [45].

Яскравим прикладом ceRNA є lncRNA H19. Екзон 1 гену H19 кодує мікроРНК-675-3p та мікроРНК-675-5p. Мішенями для останніх є мРНК білків Smad1, Smad5 та Cdc6, які регулюють диференціацію та регенерацію скелетних м'язів [43, 46]. З іншого боку H19 виступає і як ceRNA для β -катеніну (оскільки він також є мішенню для мікроРНК-675-3p та мікроРНК-675-5p), що активує Wnt/ β -катеніновий сигнальний шлях [43, 47].

Взаємодії із мРНК. Регуляція трансляції мРНК довгими некодуючими РНК здійснюється не тільки через взаємодії із мікроРНК, а і шляхом прямої взаємодії lncRNA-мРНК. LncRNAs можуть зв'язуватися із комплементарними ділянками мРНК, впливаючи як на стабільність мРНК, так і на сплайсинг, і процесинг мРНК [48].

Варто зазначити, що переважна більшість інформації про дуплекси lncRNA-мРНК надходить з результатів біоінформаційного аналізу і не підтверджена експериментальними дослідженнями. Припускається, що взаємодії довгих некодуючих РНК із пре-мРНК відіграють важливу роль у альтернативному сплайсингу. З огляду на те, що більше 90% генів у людей піддаються альтернативному сплайсингу, взаємодії lncRNA-мРНК можуть відігравати величезну роль у розвитку, фізіологічних і патологічних процесів [48]. Регуляція сплайсингу довгими некодуючими РНК здійснюється двома шляхами: lncRNA

безпосередньо зв'язується з мРНК, що блокує збірку сплайсоми, або ж lncRNA взаємодіє із факторами сплайсингу, як згадана вище MALAT1, яка є мішенню для серин/аргінінових факторів сплайсингу [49-52].

Формування триплексів lncRNA-ДНК. Довгі некодуєчі РНК можуть взаємодіяти не тільки із іншими РНК, а і з ДНК, формуючи триплекси lncRNA-ДНК. Такі структури формуються за рахунок утворення хугстінівських пар. Це альтернативний варіант зв'язування нуклеотидів не за канонічною, уотсон-криківською взаємодією. В залежності від орієнтації lncRNA до комплементарного ланцюга, триплекси lncRNA-ДНК можуть бути як паралельними, так і антипаралельними [53].

Згадана вище lncRNA FENDRR регулює експресію генів FOXF1 та PITX2 якраз за рахунок формування триплексу із промоторними ділянками цих генів, після чого FENDRR рекрутує комплекс PRC2. Яскравим прикладом некодуєчої РНК, що формує триплекси є кардіоспецифічна lncRNA Khps1. Вона взаємодіє із триплексоформуючим гомопуриновим ланцюгом промотору сфінгозинкінази 1 (SPHK1) та рекрутує гістонацетилтрансферазу p300/CBP. Ацетилювання лізинових залишків на гістонах ферментом p300/CBP призводить до зв'язування транскрипційного фактора E2F1, що і посилює експресію сфінгозинкінази SPHK1 [54].

1.2. Роль довгих некодуєчих РНК у фізіології серцево-судинної системи

Наразі вже ідентифіковано ряд кардіоспецифічних lncRNAs та описані молекулярні механізми їх функціонування. Процес пошуку некодуєчих РНК, що експресуються під час ембріогенезу серця та за розвитку певних захворювань продовжується, і вважається надзвичайно складним та масштабним проектом світової наукової спільноти.

Функціональне значення деяких кардіоспецифічних lncRNAs вже встановлене. Наразі більшість ідентифікованих кардіоспецифічних РНК описані

для мишей. Зокрема, глибокий аналіз послідовностей нуклеїнових кислот серця миші після гострого інфаркту міокарда дозволив визначити нові кардіоспецифічні lncRNAs, що переважно пов'язані з енансерами та специфічними особливостями стану хроматину [55].

Подальші дослідження дозволили виявити біологічні функції ідентифікованих lncRNAs. Наприклад, вдалося виявити зв'язок деяких lncRNAs з різними станами хроматину у кардіоміоцитах. Для ряду кардіоспецифічних lncRNAs вдалося охарактеризувати їх функціональну активність як на транскрипційному, посттранскрипційному, так і епігенетичному рівнях.

Та, незважаючи на популярність lncRNAs, як об'єкту досліджень впродовж останніх 10 років, функції lncRNAs в серцево-судинній діяльності все ще не вивчені. Кілька досліджень дозволили отримати опосередковані докази того, що lncRNAs регулюють метаболізм кардіоміоцитів, гіпертрофію, диференціювання та проліферацію [36]. В ендотелійних клітинах lncRNAs беруть участь у регулюванні міграції та диференціації [56]. У фібробластах lncRNAs контролюють структуру теломер, а також пов'язані з процесами старінням [57]. Наразі достеменно невідомо, чи беруть участь lncRNAs у регуляції запалення та фіброзу. Розглянемо детальніше роль окремих кардіоспецифічних lncRNAs у розвитку серця та патологічних процесів серцево-судинної системи (рис. 1.2.1.).

Численні дослідження ембріональних стовбурових клітин демонструють, що lncRNAs відіграють важливу роль у клітинній диференціації та кардіогенезі. Було виявлено більше 1000 lncRNAs, експресія яких суттєво змінилася під час клітинної диференціації [58]. Подальший аналіз транскриптому ембріональних та диференційованих клітин серця мишей дозволив ідентифікувати декілька lncRNAs, що залучені до процесу клітинної диференціації та розвитку серцевих

тканин[59].

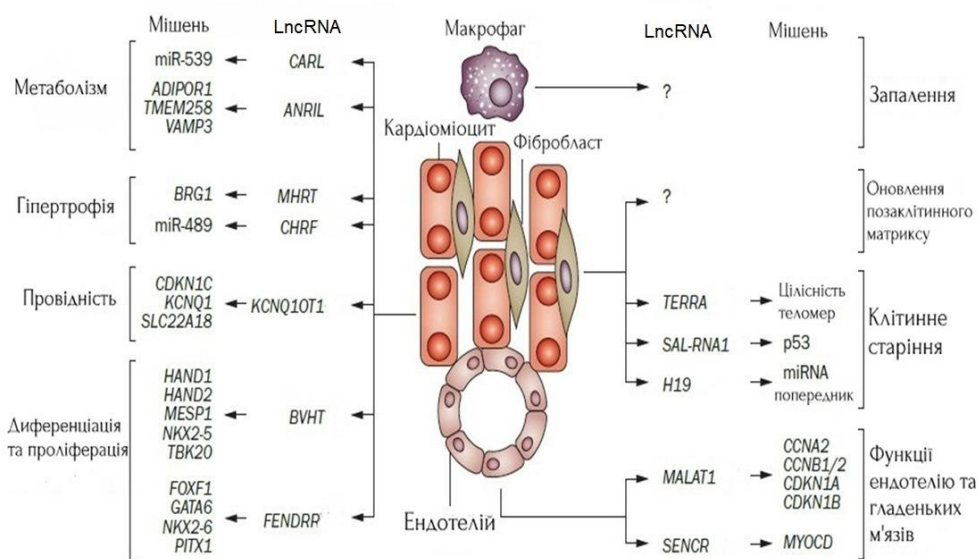


Рис. 1.2.1. Регуляція сигнальних шляхів деякими довгими некодуючими РНК у серцево-судинній системі. Адаптовано [27].

1.2.1. Довга некодуюча РНК BVHT та ембріональний розвиток серця

Довга некодуюча РНК Braveheart (BVHT) – перша з ідентифікованих lncRNAs, що приймає безпосередню участь у клітинній диференціації та розвитку серцевих тканин у мишей. Експресія lncRNA BVHT була досить великою під час ембріонального розвитку серця. Цікаво, що заглушення інтерферуючими РНК експресії цієї lncRNA спричинює уповільнення кардіоспецифічної диференціації — утворюється значно менше кардіоміоцитів, які здатні скорочуватися [60].

Для кардіоспецифічної диференціації вкрай важливим є експресія транскрипційного фактору *Mesp1*, який відіграє важливу роль у розвитку мезодерми серця [61]. Виявляється, що експресія гену *MESP* та ряду інших кардіоспецифічних генів відбувається саме за участі lncRNA BVHT [62]. Ця lncRNA діє як молекулярна пастка для комплексу білків PRC2, що призводить до інактивації останнього. У свою чергу інактивація PRC2 активує транскрипцію гену *MESP*, завдяки чому запускається нормальна диференціація стовбурових клітин у клітини з кардіоспецифічним фенотипом.

1.2.2. Роль довгих некодуючих РНК CARMEN та FENDRR у клітинній диференціації

Довга некодуюча РНК CARMEN (cardiac mesoderm enhancer-associated non-coding RNA) відіграє важливу роль як регулятора клітинної диференціації та спеціалізації. Рівень експресії CARMEN суттєво підвищений у клітинах-попередниках кардіоміоцитів людини під час їх диференціації [63, 64]. CARMEN транскрибується в безпосередній близькості від важливого для розвитку серця локусу мікроРНК miR-143 та miR-145. LncRNA CARMEN взаємодіє із субодиницями комплексу PRC2 – SUZ12 та EZH2, що вказує на можливість регуляції експресії цією некодуючою РНК. Встановлено, що нокдаун CARMEN пригнічує диференціацію клітин-попередників кардіоміоцитів незалежно від експресії miR-143 та miR-145 [63, 64].

Ще одна lncRNA, що задіяна до розвитку серцевих тканин – FENDRR. Ця некодуюча РНК цікава тим, що вона може взаємодіяти як репресорами (PRC2), так і активаторами експресії (білки групи Trithorax). LncRNA FENDRR експресується в тканинах латеральної мезодерми, де регулює активність генів, що відповідають за синтез транскрипційних факторів *Foxf1* та *Pitx2*, які є важливими для клітинної диференціації [36].

1.3. Значення довгих некодуючих РНК у патології серця та судин

1.3.1. Довгі некодуючі РНК та ішемія міокарда

Не дивлячись на той факт, що сучасні методики діагностики та лікування інфаркту міокарда дозволили суттєво покращити якість життя та виживання пацієнтів, ця хвороба все ще залишається однією з основних причин смертності у світі [65]. Вивчення механізмів розвитку ішемії та гострого інфаркту міокарда продовжується досі. Зокрема, ідентифіковано ряд довгих некодуючих РНК, експресія яких змінюється за умов ішемічної хвороби серця.

Довга некодуюча РНК ANRIL. За допомогою біоінформатичних методів дослідження вдалося встановити зв'язок між локусом INK4 та ризиком розвитку

коронарних захворювань серця, в тому числі і інфаркту міокарда. Цей локус відіграє важливу роль у регулюванні клітинного циклу та клітинного росту. У локусі INK4 розташовані гени-супресори пухлин CDKN2A та CDKN2B, а також lncRNA ANRIL (Antisense Noncoding RNA in the INK4 Locus) [66]. На сьогодні вдалося ідентифікувати декілька лінійних та циркулярних ізоформ lncRNA ANRIL, які специфічно експресуються у певних тканинах та за певних умов (зокрема, при хворобах серцево-судинної системи).

Встановлено, що lncRNA ANRIL є одним із регуляторів клітинної проліферації, хоча механізм такої регуляції допоки не встановлено [67]. LncRNA ANRIL – РНК, що циркулює у крові, і збільшення її концентрації у крові спостерігається при дисфункції лівого шлуночка серця [68]. У цьому ж дослідженні були описані і інші lncRNAs, концентрація яких у циркулюючій крові збільшується при інфаркті міокарда. Це lncRNAs MIAT (Myocardial Infarction–Associated Transcript) та MALAT1 [68]. Крім того, показано, що збільшення циркулюючої lncRNA ANRIL також спостерігається у пацієнтів зі стенокардією та ішемічно. хворобою серця [69, 70].

Довгі некодуючі РНК Mirt1 та Mirt2. Дослідження моделі гострого інфаркту міокарда на мишах дозволили виявити ряд довгих некодуючих РНК, рівень експресії яких змінюється за різних умов. Одними з найбільш цікавих в цьому ракурсі виявилися *Mirt1* та *Mirt2* (Myocardial infarction–associated transcript 1 та 2) [71-75]. Рівень експресії цих lncRNAs досягає свого піку через 24 години після інфаркту міокарда, але через 48 годин – повертається до базального рівня експресії. Такі коливання експресії *Mirt1* та *Mirt2* свідчать про їхнє залучення до патологічний процес. Показано, що рівень *Mirt1* та *Mirt2* корелює з рівнем експресії генів, які впливають на зворотне ремоделювання лівого шлуночка, що вказує на протективні властивості цих некодуючих РНК. Дослідження *Mirt1* та *Mirt2* показують можливість їх терапевтичного використання, але гомологів цих РНК у людей поки що не знайдено.

Довга некодуюча РНК ZFAS1. ZFAS1 (Zinc finger antisense 1) – кардіоспецифічна довга некодуюча РНК, концентрація якої у крові різко знижується у пацієнтів із інфарктом міокарда [76]. LncRNA ZFAS1 також експресується у щурів. Встановлено, що експресія ZFAS1 зростає у пошкодженому міокарді тварин протягом 48 годин після інфаркту. Потім експресія ZFAS1 різко знижується протягом 1-2 тижнів [77]. Встановлено, що ZFAS1 взаємодіє із miR-150 та виступає в якості молекулярної губки для останньої. Нокдаун ZFAS1 або надекспресія miR-150 уповільнювали зниження життєздатності кардіоміоцитів та зменшували пошкодження серцевого м'язу у щурів протягом тижня після інфаркту міокарда [78].

Довга некодуюча РНК APF. Дані щодо ролі аутофагії при ішемічному пошкодженні міокарда є суперечливими. Як відомо, певний рівень аутофагії при ішемії має кардіопротективний ефект [78], але з іншого боку накопичення аутофагосом у кардіоміоцитах збільшує вираженість клітинної смерті, зокрема при пост-ішемічній реперфузії [79]. Однією із lncRNAs, що виступає в якості регулятора аутофагії, є APF (autophagy-promoting factor), рівень якої зростає під час ішемії-реперфузії. APF є молекулярною губкою для miR-188-3p. Таким чином, збільшення експресії APF призводить до зниження рівня miR-188-3p та збільшення експресії гену ATG7 (ген-мішень для miR-188-3p), що є ініціатором аутофагії [80]. З огляду на роль APF та miR-188-3p, обидві ці РНК розглядаються в якості потенційних мішеней для терапії.

Довгі некодуючі РНК HIF1A-AS1 та HIF1A-AS2. HIF1A-AS1 та HIF1A-AS2 – антисенс-транскрипти для мРНК фактору, що індукується гіпоксією — HIF-1 α . Встановлено, що рівень експресії HIF1A-AS2 (також відома як *aHIF*) у плазмі крові збільшується при серцевій недостатності, а також при інфаркті міокарда [68]. Вірогідно, що і HIF1A-AS1 також має себе поводити аналогічно.

1.3.2. Участь довгих некодуєчих РНК у розвитку гіпертрофії серця

Гіпертрофія міокарда є спочатку адаптивною реакцією на навантаження або перевантаження органу задля підтримання серцевого викиду. Як будь-який компенсаторний механізм, гіпертрофія міокарда має певний діапазон адаптації і за постійного навантаження на серце спричинює погіршення мікроциркуляції, тканинну гіпоксію, загибель кардіоміоцитів та заміщення скоротливих елементів фіброзною тканиною із розвитком серцевої недостатності. З появою високоточних методів аналізу послідовності РНК було проведено ряд досліджень для вивчення ролі lncRNAs при гіпертрофії міокарда. Для деяких lncRNAs встановлені молекулярні механізми їх про- чи антигіпертрофічних властивостей.

Довга некодуєча РНК CHRF. CHRF (cardiac hypertrophy related factor) – довга некодуєча РНК, яка виступає в ролі молекулярної губки для miR-489. Показано, що збільшення експресії CHRF сприяє розвитку гіпертрофії міокарда, і молекулярний механізм такої відповіді пов'язаний зі спонжингом miR-489, для якої мішенню є ген цитозольного адапторного білка MyD88. Таким чином, надекспресія CHRF призводить до посилення експресії гена MyD88, який відіграє одну із ключових ролей у розвитку серцевої гіпертрофії [81].

Довга некодуєча РНК Chaer. Дослідження експресії різних некодуєчих РНК виявили більше 20 lncRNAs, профіль експресії яких зазнавав суттєвих змін в моделі гіпертрофії серця у миші [82]. Серед них Chaer – кардіальний, асоційований з гіпертрофією епігенетичний регулятор (Cardiac Hypertrophy-Associated Epigenetic Regulator), який може безпосередньо взаємодіяти з каталітичною субодиницею комплексу PRC2, тим самим інгібуючи метилювання лізину 27 гістону H3 у промоторних ділянках генів, що беруть участь у гіпертрофії серця, і, таким чином, сприяє розвитку цього патологічного процесу[82].

Поряд з іншими lncRNAs, що взаємодіють з PRC2, такі як Fendrr та Bvht, які, як було показано, є важливими в епігенетичній регуляції під час розвитку

серця, Chaer також є епігенетичною регуляторною lncRNA. Інактивація Chaer в може бути терапевтичною методикою при патологічному ремоделюванні, зумовленому гіпертрофічною кардіоміопатією [82].

Довга некодуюча РНК LncRNA Chast. Chast (Cardiac Hypertrophy-Associated Transcript) – довга некодуюча РНК, що асоційована з гіпертрофією серця. Ця РНК проявляє цис-регулюючу активність стосовно гену, що розташований на протилежному ланцюгу - Plekhh1 (Pleckstrin homology domain-containing protein family M member 1). В експерименті на мишах встановлено, що рівень експресії Chast збільшується на 4-13 тижні після операції із накладанням лігатури на аорту з піком експресії на 6 тижні [83]. Пікова експресія гомолога Chast у людини також спостерігається при гіпертрофії серця, що було показано на тканинах серця пацієнтів з аортальним стенозом [83].

Що стосується молекулярного механізму дії цієї РНК, то було показано, що Chast негативно регулює Plekhh1. Рівень експресії Plekhh1 був мінімальний саме на 6-ому тижні після операції звуження дуги аорти. Як відомо, Plekhh1 знижує рівень аутофагії, що в свою чергу призводить до інтенсифікації процесів ремоделювання міокарду [84].

Довга некодуюча РНК ROR. ROR – ще одна lncRNA, рівень експресії якої суттєво підвищується при моделі інфаркту та гіпертрофії міокарда у мишей, а також у культурі кардіоміоцитів з додаванням фенілефрину. Встановлено, що сайленсинг ROR знижує рівень гіпертрофії кардіоміоцитів, індукованої фенілефрином.

Молекулярний механізм дії ROR пов'язаний із тим, що ця lncRNA є молекулярною пасткою для miR-133 [85]. В одному з досліджень було продемонстровано, що для miR-133 існують дві мішені: RhoA – ГДФ-ГТФ обмінний білок, залучений до регуляції серцевої гіпертрофії; Cdc42, що виступає в ролі антигіпертрофічного молекулярного перемикача. Таким чином, збільшення експресії miR-133 призводить до зменшення розмірів кардіоміоцитів, а також до

зниження експресії генів, залучених до розвитку гіпертрофії. Зменшення експресії miR-33 (в тому числі, індуковане збільшенням експресії ROR) призводить до зворотного ефекту. Таким чином, ROR, виступаючи в ролі молекулярної губки для miR-133, проявляє прогіпертрофічні властивості [86].

Довга некодуюча РНК MIAT. На мишачій моделі та у клітинах H9c2 рівень експресії lncRNA MIAT (Myocardial Infarction–Associated Transcript) суттєво зростає за умов гіпертрофії, індукованої ангіотензином II. З іншого боку, пригнічення експресії MIAT зменшує рівень серцевої гіпертрофії викликаного AngII, а також експресію генів передсердного натрійуретичного гормону (ANP), натрійуретичного пептиду типу В (ANB) та гену важких ланцюгів β -міозину (β -MHC). Встановлено, що під час розвитку гіпертрофії MIAT діє як губка для miR-150. Надекспресія MIAT призводить до суттєвого зниження рівня miR-150 у клітинах H9c2. В свою чергу надекспресія miR-150 знижує рівень експресії маркерних генів серцевої гіпертрофії [87].

Показано, що MIAT виступає в якості молекулярної губки не тільки для miR-150, а й для miR-93, рівень експресії якої також зменшувався у культурі клітин з додаванням AngII. Мішенню для miR-93 виступає TLR4 (Toll-like receptor 4). Таким чином, MIAT збільшує експресію TLR4, що в свою чергу сприяє розвитку гіпертрофії. В одному з досліджень показано, що TLR4 сприяє розвитку гіпертрофії шляхом збільшення рівня факторів запалення та зменшення протизапальних цитокінів [88]. Крім того, показано, що до TLR4-опосередкованої гіпертрофії серця також залучений і PI3K/Akt/mTOR сигнальний шлях [89].

Довга некодуюча РНК H19. LncRNA H19 є однією із перших описаних довгих некодуючих РНК. H19 задіяна до регуляції багатьох фізіологічних та патологічних процесів у серцево-судинній системі, тому віднести її до якогось конкретного захворювання чи процесу неможливо.

Що стосується серцевої гіпертрофії, то встановлено, що H19 є прекурсором для miR-675, що пригнічує гіпертрофію кардіоміоцитів. Надекспресія H19 веде до

збільшення експресії і miR-675-3p, що призводить до зменшення розміру кардіоміоцитів та зменшення експресії мРНК генів, залучених до гіпертрофії серця. Дослідження із використанням люциферазного репортерного гену показало, що мішенню для miR-675-3p виступає мРНК CaMKII δ (кальцій/кальмодулін залежна протеїнкіназа II δ). Таким чином, сайленсинг miR-675-3p призводить до збільшення експресії CaMKII δ та, відповідно, збільшення рівня серцевої гіпертрофії [90].

1.4. Участь довгих некодуючих РНК у дисфункції клітин ендотелію і гладеньких м'язів судин

Васкулярне ремоделювання, що переважно характеризується дисфункцією судинних ендотеліальних клітин та проліферацією гладеньких м'язів судин, тісно пов'язане з численними патологічними процесами, такими як атеросклероз, атеротромбоз із розвитком гострого інфаркту міокарда. Як виявилось, lncRNA беруть участь у регуляції ремоделювання судин.

1.4.1. Довгі некодуючі РНК MALAT1 і TGFB2-OT1 та дисфункція клітин ендотелію

Встановлено, що експресія lncRNA MALAT1 (Metastasis-Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1) висока у клітинах ендотелію, та суттєво збільшується при гіпоксії. Пригнічення експресії MALAT1 за допомогою гапмерів призводить до інгібування проліферації ендотеліальних клітин. Гапмери - це антисмислові олігонуклеотиди, які ефективно гальмують специфічні ядерні мішені. Також продемонстровано, що фармакологічне пригнічення експресії MALAT1 за допомогою гапмерів зменшує відновлення кровотоку та щільність капілярів при ішемії задніх кінцівок. Інгібування MALAT1 також призводить і до зниження експресії ряду генів, залучених до регуляції клітинного циклу [91].

Показано, що lncRNA TGFB2-OT1 (TGFB2 Overlapping Transcript 1) залучена до процесів, пов'язаних з дисфункцією ендотеліальних клітин. TGFB2-OT1 в HUVECs (ендотеліальні клітини пуповини людини) може регулювати

рівень miR-3960, miR-4459 і miR-4488, а потім регулювати експресію мішеней цих мікроРНК, таких як CERS1, NAT8L та LARP1, з яких NAT8L і CERS1 можуть брати участь у аутофагії, регулюючи мітохондріальну функцію. Більше того, надмірна експресія TGFB2-OT1 може індукувати продукцію ІЛ-6 та ІЛ-8 у клітинах ендотелію, що вказує на те, що TGFB2-OT1 може викликати запалення [92].

1.4.2. Довга некодуєча РНК lincRNA-p21 в проліферації клітин гладеньких м'язів судин

Встановлено, що експресія lincRNA-p21 суттєво знижена в тваринній моделі атеросклерозу. Рівень lincRNA-p21 знижується в атеросклеротичних бляшках ApoE (-/-) мишей. Показано, що lincRNA-p21 може пригнічувати проліферацію клітин гладеньких м'язів судин та індукувати апоптоз *in vitro*.

Крім того, було підтверджено, що lincRNA-p21 є перспективною транскрипційною мішенню для p53. Показано, що інгібування lincRNA-p21 призводить до зміни експресії генів-мішеней p53. Експресія lincRNA-p21 була значно знижена в тканинах коронарної артерії пацієнтів із захворюванням коронарних артерій. Ці дані висвітлили важливу роль і відповідний механізм lincRNA-p21 в ангиогенезі [93].

1.5. Довгі некодуєчі РНК в діагностиці та терапії серцево-судинних захворювань

1.5.1. Довгі некодуєчі РНК як біомаркери серцево-судинних захворювань

Сьогодні жваво обговорюється ідея створення персоналізованої серцево-судинної медицини. Допоки доступні інструменти та методи все ще не дозволяють впровадити таку практику, і вивчення молекулярних механізмів виникнення серцево-судинних патологій може суттєво покращити якість не тільки терапії серцевих патологій, але й діагностики.

Циркулюючі біомаркери значно покращили діагностику ряду серцевих захворювань. Біохімічні і молекулярні показники прогресування захворювань

полегшують для лікаря процес прийняття рішень та дозволять індивідуально підходити до медичного обслуговування. Було виявлено декілька пептидних біомаркерів, які зараз використовуються для діагностики серцевих захворювань. Розроблені на основі РНК діагностичні аналізи, які спочатку базувались на профілі експресії мРНК, а згодом і циркулюючих мікроРНК, використовуються як біомаркери, що мають великий потенціал для персоналізованої медицини [94]. Специфічна експресія lncRNAs при певних патологічних станах наводить на думку, що ці молекули також можуть бути використані в якості біомаркерів для серцево-судинних захворювань.

Використання ізопротеренолу для створення мишачої експериментальної моделі серцевої недостатності демонструє, що експресія 32 lncRNAs змінюється при серцевій недостатності не тільки у тканинах серця, але і в зразках крові та плазми [95]. Це дослідження підтверджує думку про те, що кров є резервуаром для довгих некодуючих РНК, які можуть бути використані як біомаркери серцево-судинних захворювань, особливо з огляду на те, що lncRNAs присутні в екзосомах, отриманих з плазми.

Дослідження рівня MT-LIPCAR (мітохондріальної lncRNA, яка вказує на ремоделювання серця після інфаркту міокарда та смерті у хворих з систолічною серцевою недостатністю) у плазмі була першим доказом того, що lncRNAs в плазмі крові можуть бути використані як біомаркери прогнозу серцево-судинних захворювань [96].

Профілі експресії lncRNAs у клітинах крові також показали можливість використання їх у якості біомаркерів. Рівні HIF1A-AS2, KCNQ1OT1 та MALAT1 були підвищені, тоді як рівень експресії ANRIL був знижений у людей з інфарктом міокарду в порівнянні зі здоровими людьми. Крім того, ANRIL, KCNQ1OT1, MALAT1 та MIAT були передвісниками дисфункції лівого шлуночка після інфаркту міокарда. Важливо, що ANRIL та KCNQ1OT1 залишалися

стабільними маркерами дисфункції лівого шлуночка в багатовимірному аналізі та забезпечували додаткову прогностичну цінність [68].

На сьогодні довгі некодуючі РНК вже розглядаються в якості важливих функціональних молекул в розвитку серцево-судинної системи та серцево-судинних захворювань, і, отже, є потенційними терапевтичними мішенями, але необхідні подальші дослідження, щоб продемонструвати їх використання в якості біомаркерів. Необхідно встановити, чи є циркулюючі довгі некодуючі РНК стабільними. Інкрементне значення довгих некодуючих РНК на додаток до наявних маркерів ще доведеться оцінити. Крім того, необхідно визначити локалізацію lncRNAs у плазматичних компартментах, незалежно від того, чи вони активно секретуються, чи можуть діяти як паракринні медіатори.

На нашу думку, цінність lncRNAs як діагностичних маркерів у високій інформативності цих молекул вже на початку патологічних змін, які не можуть бути визначеними за допомогою наявних лабораторних та інструментальних досліджень. З огляду на величезну кількість lncRNAs, широкий спектр їх функцій, а також основні положенням теорії “Світу РНК”, можна припустити, що зміни в експресії саме некодуючих РНК є першим адаптивним кроком, за яким вже йде ланцюжок інших перетворень.

1.5.2. Довгі некодуючі РНК як мішені для терапії

При розгляді терапевтичного потенціалу нової групи біологічних речовин, таких як довгі некодуючі РНК, необхідно вирішити деякі важливі питання. Яка точна біологічна роль цих днРНК у кожному серцевому або судинному захворюванні? Чи можна фармакологічно пригнічувати або імітувати їх функцію, і чи безпечно це робити? Які можуть бути несприятливі наслідки залежно від їх функції в інших органах? Яка найкраща модель *in vivo* чи *in vitro* для проведення доклінічних досліджень, та як ці дані можуть бути інтерпретовані та застосовані на людському організмі?

Щоб мати додаткову терапевтичну цінність при лікуванні серцево-судинних захворювань на додаток до існуючого гальмування нейрогуморальної активації, новий лікарський препарат на базі lncRNAs повинен бути спрямований на специфічні молекулярні процеси, такі як запалення, ангіогенез, фіброз чи клітинний ріст. Очевидно, що в цих процесах індивідуальні lncRNAs мають відмінні біологічні функції, і, отже, пригнічення їх функцій може підвести вчених до пошуку нових методів лікування серцево-судинних захворювань.

Інгібування lncRNAs може бути досягнуто з використанням гапмерів, які часто використовуються для блокування функції lncRNAs. Гетеродуплекси РНК-ДНК, утворені після послідовно-специфічного зв'язування антисмислових олігонуклеотидів з їхньою таргетною lncRNAs, розщеплюються ферментом РНКазою Н. Остання є ферментом, що зустрічається як у ядрі, так і в цитоплазмі всіх клітин, і гідролізує РНК РНК-ДНК гетеродуплексів. Таким чином, гапмери можна розглядати у якості потужних інгібіторів lncRNAs [97].

Перш ніж інгібування lncRNAs у терапевтичних цілях для людей може стати реальністю, необхідно відповісти на деякі питання. Яке поєднання гапмерів найкраще, щоб отримати достатній рівень їх проникності у тканини і клітини? Наскільки такі заходи є безпечними, і який період напіввиведення таких препаратів? Чи є альтернативи для гапмерів, такі як аптамери (одноланцюгові ДНК або молекули пептидів, які можуть зв'язуватися з молекулярними мішенями, такими як білки з високою селективністю та спорідненістю)? Які їх несприятливі наслідки? З іншого боку, якщо врахувати, що довгі некодуючі РНК, як мікроРНК, також можуть проявляти захисні властивості від розвитку захворювання, чи можливо досягти мімікрії функції lncRNAs? В даний час імітація функції некодуючих РНК *in vivo* залишається складною і недосягнутою метою в РНК-терапії.

Можливість використання lncRNAs в якості мішеней для терапії серцево-судинних захворювань вперше була представлена на тваринних моделях

ангіогенезу та клітинного росту. Зокрема, було встановлено, що сайленсинг *Malat1* знижує капілярний ріст не тільки при ішемії задніх кінцівок у мишей [91], але і у щурів при діабетичній ретинопатії [98].

Інгібування інтергенної *lncRNA-p21* сприяє утворенню неоінтими у мишей з нокаутованим *ApoE* геном при ушкодженні сонних артерій [93]. Репресія *Mhrt* у серці миші призводить до прогресування серцевої гіпертрофії та інфаркту міокарда, а відновлення експресії до нормального рівня запобігло розвиток кардіоміопатії [99]. Незважаючи на достовірні дані про участь вищезгаданих некодуючих РНК у фізіологічних і патологічних процесах, допоки дослідження на тваринах ще не виявили явного терапевтичного потенціалу довгих некодуючих РНК при серцево-судинних запальних процесах або при фіброзі.

Описані вище результати були отримані в моделях гризунів з кореляцією даних на рівень експресії у серці чи крові у людей, пов'язаних з прогресуванням захворювання. Враховуючи те, що довгі некодуючі РНК, на відміну від добре консервативних мікроРНК, слабо зберігають свою консервативність між різними видами, екстраполяція результатів на тваринних моделях до людини є надзвичайно складною. Використання відповідних клітинних ліній людини, 3D *ex vivo* культур різних серцевих клітин може допомогти подолати ці обмеження у вищезгаданих дослідженнях. Ідентифікація специфічних для людини *lncRNAs*, людських ортологів, знайдених у гризунів, або *lncRNAs*, що були експресовані під час диференціації ембріональних стовбурових клітин у кардіоміоцитах, є ключовим для подальшого пошуку терапевтичних препаратів на основі довгих некодуючих РНК у людей. Не дивлячись на те, що зв'язок між довгими некодуючими РНК та серцево-судинними захворюваннями вказує на те, що *lncRNAs* можуть бути новими терапевтичними мішенями, багато завдань та питань залишаються відкритими, перш ніж поставлену мету можна буде досягти.

II. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження, наведені у дисертаційній роботі, проводилися на первинній культурі кардіоміоцитів неонатальних щурів, щурах-самцях лінії Wistar віком 6 місяців, вагою 280-320 г. Усі експерименти на тваринах проводилися з урахуванням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист тварин, які використовуються для експериментальних цілей (Страсбург, 1986) та положеннями Комітету з біоетики Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України.

Взяття біологічного матеріалу пацієнтів не суперечить основним положенням GCP, Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицини, Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини і Закону України «Про лікарські засоби» та положенням Комісії з питань етики при ДУ «Національний інститут серцево-судинної хірургії імені М.М. Амосова» НАМН України».

2.1. Біоінформаційний пошук та бази даних

Відповідні lncRNAs для експериментів підбирали шляхом опрацювання літератури та аналізу інформації у низці баз даних для некодуючих РНК. Серед таких — NONCODE, DeepBase V2.0, DeepBase V3.0, DIANA-LncBase, LncRNADisease V.3.0 та HDncRNA [100-108].

2.2. Первинна культура кардіоміоцитів неонатальних щурів

Для виділення та культивування кардіоміоцитів використовували методику, описану в джерелах [109, 110]. Неонатальних щурів віком до 48 годин умертвляли шляхом цервікальної дислокації. Через поздовжній розріз грудної клітки видаляли серце та відокремлювали шлуночки. Шлуночки промивали у буферному розчині, що містив 20 ммоль/л HEPES, 5,4 ммоль/л KCl, 116,4 ммоль/л NaCl, 5,5 ммоль/л глюкози, 0,4 ммоль/л Na₂HPO₄ та 0,4 ммоль/л K₂HPO₄. Подрібнені шлуночки піддавали ферментативному розщепленню за методикою Reinecke et al [111] у

середовищі, яке містило 1,75 мг колагенази II типу та 3 мг панкреатину на 5 мл розчину. Клітини ресуспендували у середовищі для культивування, що складалося з DMEM, середовища 199 (співвідношення DMEM/199 — 4:1), 8% телячої сироватки, 4,2 ммоль/л Na₂CO₃, 15 ммоль/л HEPES та антибіотиків (100 мкг/мл стрептоміцину, 0,05 мг/мл гентаміцину, 100 ОД/мл пеніциліну). Після фарбування 0,2% розчином трипанового синього підраховували клітини за допомогою світлової мікроскопії. Культивування тривало протягом 24 годин при 37°C у газовій суміші з 5% CO₂ та 95% атмосферного повітря.

2.3. Додавання до культури клітин інгібітора NIF-пролілгідроксилази

Культивовані неонатальні кардіоміоцити щурів були оброблені інгібітором NIF-пролілгідроксилази (2,4-діетилпіридиндикарбоксилат, C₁₁H₁₃NO₄, Alexis Biochemicals, Швейцарія), розчиненим в етанолі, після 24 годин культивації у кінцевій концентрації 2,5 мкМ [112].

2.4. Модель аноксії-реоксигенації культури кардіоміоцитів неонатальних щурів

Аноксію-реоксигенацію моделювали у двох режимах: короткому та довгому. Для короткої аноксії клітини аерували безкисневою газовою сумішшю (5% CO₂ та 95% Ar) протягом 30 хвилин, після чого замінювали живильне середовище та культивували їх за вихідних умов протягом 60 хвилин для реоксигенації. Для довгої аноксії тривалість безкисневої аерації становила 60 хвилин, а реоксигенація – 24 години [113]. Було зібрано по 8 контрольних та експериментальних зразків для кожного режиму.

2.5. Визначення некротичних та апоптотичних клітин

Кількість живих, некротичних та апоптотичних клітин визначали за допомогою фарбування кардіоміоцитів біс-бензimidом (Hoechst 33342) та йодидом пропідіуму (концентрація 8,75 мкмоль/л) [114]. Підрахунок живих та мертвих клітин здійснювали за допомогою флуоресцентної мікроскопії (Nikon Eclipse E200, Японія).

2.6. Групи тварин

Для виконання експериментальних моделей було використано 35 щурів лінії Wistar віком 6 місяців та масою 280-320 г. Для моделювання інфаркту міокарда 9 щурів було залучено до групи із удаваною операцією, а 9 — до експериментальної. При моделюванні ішемії-реперфузії 9 щурів було залучено до експериментальної групи, а 8 — до групи із удаваною операцією. Тварин виводили із експерименту шляхом наркотизації уретаном із розрахунку 1,5 г/1 кг маси. Після цього вилучали фрагмент міокарду та плазму крові для подальших досліджень.

2.7. Модель інфаркту міокарда

Тварин наркотизували внутрішньоочеревним введенням кетаміну у дозі 8 мг/100 г. Штучну вентиляцію легень здійснювали через інтубацію трахеї після обробки гортані 2% розчином лідокаїну. ШВЛ проводили через трахеостому за допомогою апарату Harvard (Великобританія) при частоті 60 дихальних циклів за хвилину та дихальному об'ємі 3 мл/100 г маси тіла.

Доступ до серця отримували через четверте міжребер'я з діагональним розтином шкіри від мечоподібного відростка до середньої аксілярної лінії та розведенням грудних м'язів. Після розтину перикарду накладали лігатуру на стовбур лівої коронарної артерії (Рис. 2.7.1.) [115, 116]. Через 4 тижні знімали кардіогемодинамічні показники за допомогою Millar tip Catheter (USA) та брали біологічний матеріал.

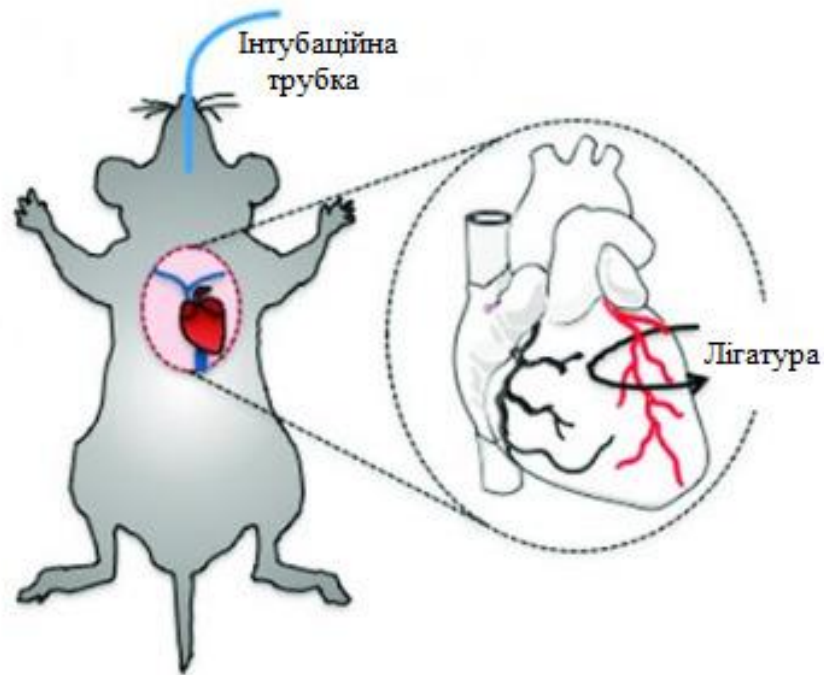


Рис. 2.7.1. Схематичне зображення експерименту із накладанням лігатури на ліву нисхідну коронарну артерію. Адаптовано [116].

2.8. Модель ішемії-реперфузії міокарда

Доступ до лівої низхідної коронарної артерії здійснювали аналогічно моделі інфаркту міокарда (Рис. 2.7.1.). Тварин наркотизували внутрішньоочеревним введенням уретану у дозі 1,5 г/кг. ШВЛ проводили через трахеостому за допомогою апарату Harvard (Великобританія) при частоті 60 дихальних циклів за хвилину та дихальному об'ємі 3 мл/100 г маси тіла.

Лігатуру накладали на стовбур лівої низхідної коронарної артерії на 40 хв (ішемія), потім знімали на 120 хв (реперфузія). Удавану операцію виконували накладанням шовного матеріалу без перетискання артерії на 40 хв та його видаленням на 120 хв.

2.9. Реєстрація та аналіз кардіогемодинамічних показників *in vivo*

Для реєстрації кардіогемодинамічних параметрів використовували стандартний 2F мікрокатетер SPR-838 (Millar Instruments, Houston, TX) для

вимірювання тиску та об'єму у лівому шлуночку. Катетер калібрували шляхом занурення у калібрувальну кювету P/N 910-1048, заповнену кров'ю щура.

Тварин наркотизували уретаном у дозі 1,5 г/кг. Катетер вводили ретроградно через праву сонну артерію у лівий шлуночок. Запис кардіогемодинамічних показників здійснювали за допомогою програми ChartTM v.5.4.2 (AD Instruments, Millar Instruments, Houston, TX).

Параметри аналізували за допомогою програмного забезпечення PVAN 3.6 (AD Instruments, Millar Instruments, Houston, TX). Конвертацію відносних одиниць об'єму (RVU) у абсолютні одиниці (мікролітри) проводили за формулою: $\text{slope } 19,82 * \text{RVU} - \text{intercept } 72,03$.

Система MPVS 400 та мікрокатетер SPR-838 дозволяють отримувати криві залежності тиску від об'єму лівого шлуночка у реальному часі (Рис. 2.9.1.), надаючи параметри максимального та мінімального тисків, частоту серцевих скорочень, об'єм лівого шлуночка та першу похідну тиску — dP/dt .

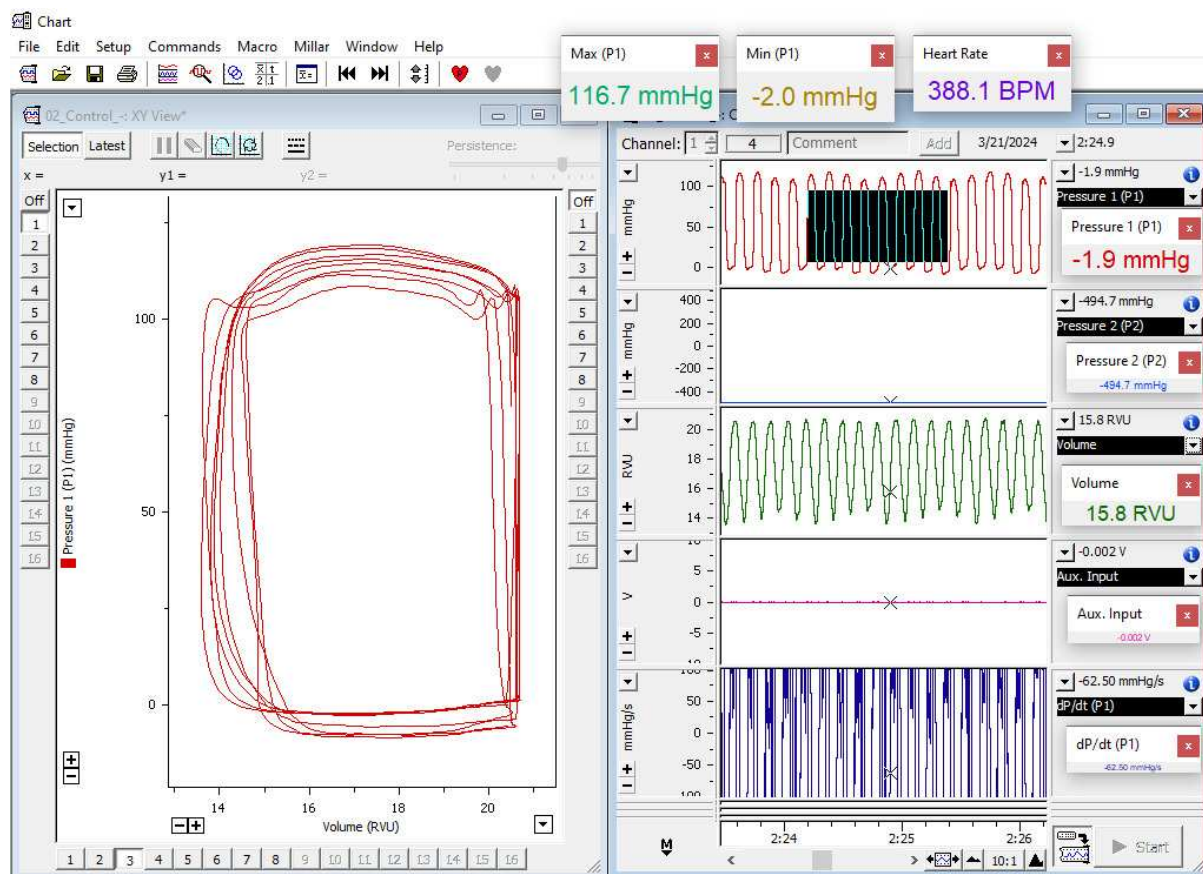


Рис. 2.9.1. Крива залежності тиску від об'єму (зліва), тиск, об'єм лівого шлуночка та dP/dt_{\max} (справа зверху вниз відповідно).

2.10. Фарбування гістологічних зрізів за Ван Гізоном

Для оцінки рівня фіброзу в міокарді використовували забарвлення за методом Ван Гісона [117]. Заморожені серця розрізали на 4 частини товщиною 3–4 мм (поперечні зрізи), з яких за допомогою мікротома отримували зрізи товщиною 10–12 мкм. Зрізи фіксували у 96% етанолі протягом 20 хвилин та інкубували в насиченому розчині пікринової кислоти протягом 1 години. Послідовно виконували інкубацію у 0,5% розчині льодяної оцтової кислоти протягом 10–30 секунд, інкубацію в суміші кислого фуксину та насиченого розчину пікринової кислоти (1:10) протягом 1–2 хвилин, промивання у дистильованій воді та фіксацію у 96% розчині етанолу. Забарвлені зрізи сканували та аналізували за допомогою спеціалізованого морфометричного

програмного забезпечення ImageJ («Національний інститут здоров'я», США) [118].

2.11. Пацієнти

У дослідженні взяли участь 42 пацієнти, з яких 31 було прооперовано у Національному інституті серцево-судинної хірургії ім. М. Амосова через ішемічну хворобу серця. Пацієнтам виконували ізольоване коронарне шунтування на працюючому серці.

Для оцінки гемодинаміки при віддаленому ішемічному прекондиціонуванні (ВІПК) були отримані дані від 31 прооперованого пацієнта. Група дослідження включала 14 пацієнтів, яким проводили процедуру ВІПК до початку операції. Контрольна група складалася з 17 пацієнтів без попереднього ВІПК.

Середній вік пацієнтів досліджуваної групи становив $61,3 \pm 4,7$ років, контрольної — $59,2 \pm 6,5$ років. За класифікацією NYHA пацієнти належали до II–III функціонального класу. Періопераційний ризик за шкалою EUROSCORE 2 становив $1,92 \pm 0,31\%$ та $1,83 \pm 0,56\%$ відповідно у досліджуваних та контрольних групах. Середня фракція викиду лівого шлуночка була $57,3 \pm 6,4\%$ та $60,1 \pm 5,3\%$. Середня кількість дистальних анастомозів становила $3,1 \pm 0,8$ та $3,0 \pm 0,6$.

Для заключної частини дослідження використовували плазму крові 361 пацієнта віком 75 років, залучених у популяційне дослідження Vienna Transdanube Aging Study (VITA) [119-122].

2.12. Методика віддаленого ішемічного прекондиціонування

Для проведення ВІПК пацієнтам досліджуваної групи на праве передпліччя накладали манжетку для вимірювання артеріального тиску. Тиск у манжетці підвищували до 200 мм рт. ст. та залишали на 5 хв. Наступним був етап реперфузії протягом 5 хв. Періоди ішемії та реперфузії продовжували по 5 хв, повторювали тричі [123]. Пацієнтам контрольної групи манжетку на праве передпліччя також накладали, але прекондиціонування не проводили.

2.13. Взяття біологічного матеріалу пацієнтів

Зразки крові пацієнтів відбирали через 20 хв після процедури ВІПК (у групі дослідження) або удаваної процедури. Кров центрифугували 15 хв на 1000 грт для розділення на фракції. Біоптати міокарду пацієнтів були відібрані протягом операції.

2.14. Оцінка гемодинамічних показників пацієнтів

Гемодинамічні параметри оцінювалися за допомогою методу імпедансної кардіографії (ICG). Використовувалися монітори пацієнта Life Score серії PVM-2700 із вбудованим модулем ICG від Nihon Kohden (Японія). Техніка ICG дозволяє визначити такі гемодинамічні параметри: індекс ударного об'єму (SVI), серцевий викид (CO), індекс серцевого викиду (COI), системний судинний опір (SVRI).

2.15. Виділення РНК

Тотальну РНК зі зразків (кардіоміоцити, тканини міокарда, плазма крові, лейкоцити) виділяли гуанідин ізотіоціанат-фенол-хлороформною екстракцією з використанням реагенту Trizol (Invitrogen, США). Отримані зразки РНК розводили у 50 мкл дистильованої води, після чого – вимірювали концентрацію РНК спектрофотометричним методом (NanoDrop ND1000, США).

2.16. Зворотна транскрипція

На наступному етапі були отримані комплементарні ДНК (кДНК) за допомогою реакції зворотної транскрипції, яку проводили у два етапи. На початку готували суміш із 1 мкл гексамерного праймера (Random Hexamer primer), 6 мкл тотальної РНК та 5 мкл очищеної від нуклеаз H_2O . Далі суміш інкубували при 70 °С впродовж 5 хв на ампліфікаторі Gene Amp® PCR System 2700, Applied Biosystems (США). На другому етапі до суміші додавали 2 мкл 10-кратного розчину нуклеотидів (dNTP), 4 мкл буфера (Buffer RT), 0,5 мкл інгібітора РНКаз (Ribo Lock RNase inhibitor) та 0,9 мкл зворотної транскриптази (RevertAid H

Minus Reverse Transcriptase). Отримані зразки залишали при 42°C протягом 60 хв, після чого інкубували при 70°C впродовж 10 хв.

Зворотну транскрипцію для РНК плазми робили з використанням специфічних петлевих праймерів для мікроРНК cel-miR-39 (miR Neasy Serum/Plasma Spike-In Control, Syn-celmiR-39 miRNA, Lot No. 227926630, США), яку додавали у зразки плазми крові перед екстракцією РНК. МікроРНК cel-miR-39 використовували як нормалізований контроль для визначення відносної експресії lncRNAs.

2.17. Полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі

Полімеразну ланцюгову реакцію у реальному часі проводили на термоциклері 7500 Fast Real Time PCR від Applied Biosystems (США). Для цього у 96-лунковий планшет вносили по 10 мкл суміші із 5 мкл універсальної суміші для кількісної ПЛР (SYBR™ Green PCR Master Mix або TaqMan™ Universal PCR Master Mix), 2 мкл кДНК, 0,08 мкл специфічних праймерів для lncRNAs, 0,2 мкл референсного барвника Rox (1:9) та 2,72 мкл H₂O. Денатурацію кДНК здійснювали при 95°C протягом 15 с. Відпал праймерів та елонгацію проводили при 60°C протягом 1 хв. Програма полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі складалася із 50 циклів.

Для проведення полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі були використані специфічні праймери та гідролізні зонди TaqMan, які наведені у таблиці 2.17.1.

Праймери та гідролізні зонди для визначення експресії lncRNAs

lncRNA	Прямий	Зворотний
<i>Rattus Norvegicus</i>		
H19	5`GCACAGGATGAAGCCAG-3`	5`TCTCCGAGACACCGATCAC-3`
TUG1	5`-ACAGTTTCCCTCTACCC-3`	5`-GCSTATGTCAAACCTTTGC-3`
MIAT	5`-CGGGTACTTGAACACCT-3	5`-ATCCTGTCCTCCCCAGTAC-3
GAS5	5`-TCTCACAGGCAGTTCTG-3	5`-ATCCATCCAGTCACCTCTG-3
β-актин	5`-CTTGCAGCTCCTCCGTC-3`	5`-CTTGCTCTGGGCCTCCTCG-3`
<i>Homo Sapiens</i>		
MIAT	5'-TGTCTCCATTTGCTCAGT-3'	5'-TCAGGATGGTGCACCTCTC-3'
LIPCAR	5'-AAAGGATGCGTAGGGA-3'	5'-TTCATGATCACGCCCTCAT-3'
HIF1A-AS1	5'-GGTTGTTTCATCTCGTCT-3'	5'-CTTCTGGTTGGGGTACTGG-3'
MHRT	5'-ACACGGCGTTCTTGAGT-3'	5'-AGTATGAGGAGTCGCAGT-3'
<i>Гідролізні зонди TaqMan (Homo Sapiens)</i>		
H19	Hs07287083_s1	
β-актин	Hs01060665_g1	

2.18. Статистична обробка отриманих результатів

Первинна обробка отриманих результатів дослідження здійснювалася шляхом однофакторного та двофакторного тесту ANOVA. Для оцінювання

результатів незалежних вибірок застосовували тест Вілкоксона. Кореляцію між кардіогемодинамічними параметрами та експресією довгих некодуючих РНК здійснювали шляхом кореляційного аналізу за Пірсоном із подальшою побудовою кореляційної матриці. Вживаність пацієнтів оцінювали за методом Каплана-Мейєра. Для визначення ступеня незалежності факторів ризику смерті застосовували модель регресії із пропорційними ризиками Кокса.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. ЕКСПРЕСІЯ H19, TUG1, GAS5 ТА MIAT У ПЕРВИННІЙ КУЛЬТУРІ КАРДІОМІОЦИТІВ НЕОНАТАЛЬНИХ ЩУРІВ

Першочерговим завданням проведення in-vitro експерименту було визначення рівня експресії lncRNAs H19, TUG1, GAS5 та MIAT у первинній культурі кардіоміоцитів неонатальних щурів за умов аноксії/реоксигенації. Для експерименту бралися неонатальні щури лінії Wistar віком 2 доби. Експресія lncRNAs, а також mRNA HIF-1 α визначалася у двох режимах аноксії/реоксигенації: короткому - 30 хв. аноксії/60 хв. реоксигенації та довгому - 60 хв. аноксії/24 години реоксигенації. Аноксія досягалася шляхом нагнітання у герметичну ємність із досліджуваною культурою клітин суміші із 5% CO₂ та 95% Ar, якою заміщувалося повітря. Для реоксигенації проводилася заміна поживного середовища та аерація повітрям.

Ушкоджуюча дія аноксії/реоксигенації визначалася шляхом підрахунку живих та мертвих (некротичних) клітин після фарбування 0,2% розчином трипанового синього. Візуалізація кількості живих, некротичних та апоптотичних клітин проводилася шляхом фарбування 8,75 μ M бісбензіміду (Хьокст 33342) та пропідіуму йодиду.

3.1.1. Визначення експресії lncRNAs H19, TUG1, GAS5, MIAT, мРНК HIF-1 α та рівня виживаності клітин у первинній культурі кардіоміоцитів неонатальних щурів за умови аноксії/реоксигенації

За результатами дослідження, рівень некротичних та апоптотичних клітин за умов нормоксії склав 6,72%. Після 30 хв. аноксії та 60 хв. реоксигенації цей показник склав 19,58%, а після 60 хв. аноксії та 24 годин реоксигенації — 27,86% (Рис. 3.1.1.).

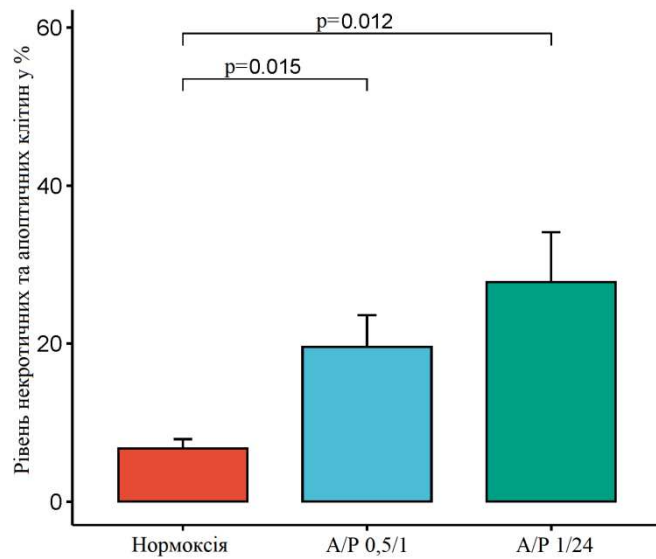


Рис.3.1.1. Рівень некротичних і апоптотичних клітин за умов нормоксії (n=8), «короткої» (A/P 0,5/1) (n=8) та «довгої» (A/P 1/24) (n=8) аноксії/реоксигенації.

Візуалізацію ушкоджуючого впливу аноксії/реоксигенації на культуру кардіоміоцитів здійснювалася за допомогою флуоресцентної мікроскопії (Рис. 3.1.2.).

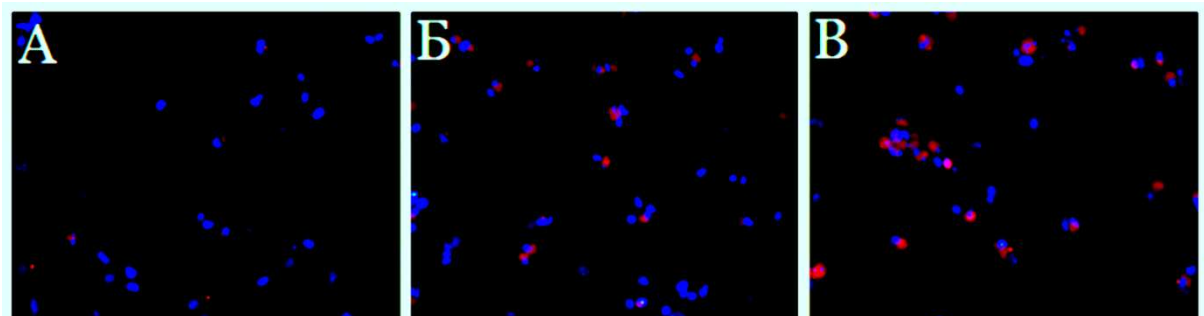


Рис.3.1.2. Флуоресцентна мікроскопія первинної культури кардіоміоцитів. А – контроль; Б – A/P 30/60; В – A/P 60/24. Фарбування - Hoechst 33342 та пропідіум йодид.

Як видно з рис. 3.1.2., застосування довгої аноксії/реоксигенації (А/Р 60/24) призводить до більшого ушкодження культури кардіоміоцитів неонатальних щурів, зокрема, збільшення некротичних та апоптотичних клітин.

Отримані дані свідчать про ушкоджуючий вплив аноксії/реоксигенації на кардіоміоцити. Дефіцит кисню під час аноксії призводить до зменшення вироблення АТФ та метаболічного стресу [124]. З іншого боку, реоксигенація призводить до збільшення реактивних форм кисню та оксидативного стресу. Ці стресові фактори ушкоджують клітинні мембрани, органели та ДНК, що сприяє некрозу та запуску апоптозу.

Визначення змін експресії окремих lncRNAs за фізіологічних та патологічних умов є одним із перших кроків для вивчення ролі цих молекул. Оскільки метою роботи є вивчення експресії lncRNAs, що залучені до гіпоксичної програми серця, то для експерименту були обрані lncRNAs, що пов'язані із фактором, що індукується гіпоксією 1 альфа - HIF-1 α . Аналіз даних літератури, а також баз даних DIANA LncBase та DeepBase V.3.0 дав змогу визначити ряд таких lncRNAs, з поміж яких було обрано 4 – H19, TUG1, GAS5 та MIAT [101-106].

На першому етапі нами була проаналізована експресія lncRNA H19, TUG1, GAS5 та MIAT, а також HIF-1 α у первинній культурі кардіоміоцитів неонатальних щурів за умов короткої та довгої аноксії/реоксигенації. Оскільки 2 з наведених lncRNAs (H19 та TUG1) є залежними від фактору, що індукується гіпоксією HIF-1 α , то також визначалася експресія mRNA HIF-1 α для порівняння з експресією H19 та TUG1.

Аналіз отриманих результатів показав, що рівень експресії HIF-1 α при короткій аноксії/реоксигенації достовірно збільшується у 2,34 рази, порівняно із контрольним зразком ($p < 0,05$). Для довгої аноксії/реоксигенації показано збільшення рівня експресії в 2 рази ($p < 0,05$), порівняно із контролем. Після довгої аноксії/реоксигенації рівень експресії HIF-1 α зменшується на 15%, порівняно із коротким режимом, хоча ці зміни є недостовірними ($p > 0,05$) (Рис. 3.1.3.).

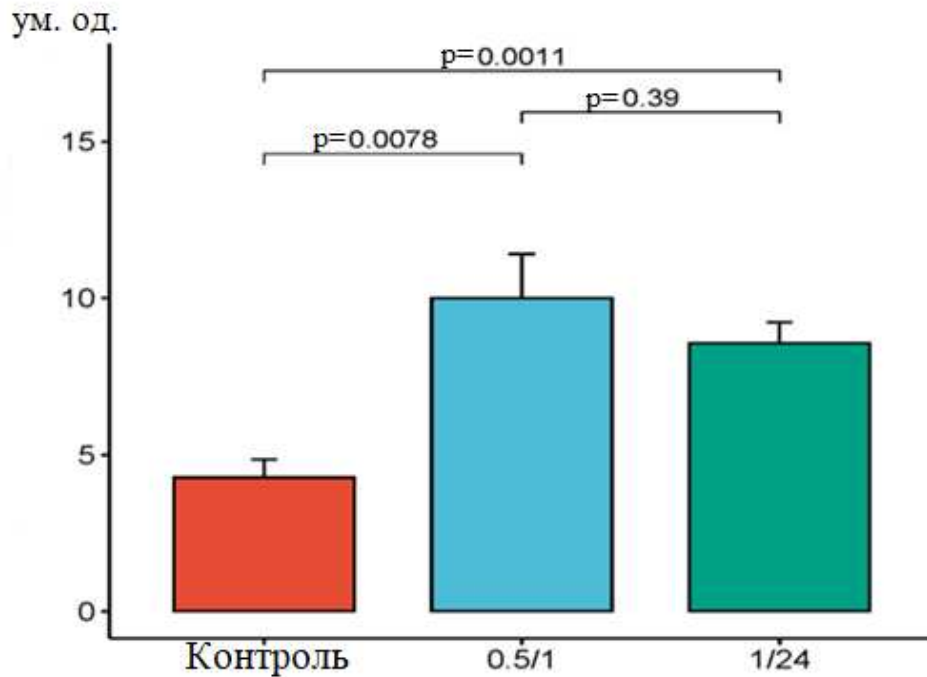


Рис. 3.1.3. Рівень експресії мРНК HIF-1 α в первинній культурі кардіоміоцитів неонатальних щурів за умови аноксії/реоксигенації. 0.5/1 – 30 хв. аноксії/60 хв. реоксигенації; 1/24 – 60 хв. аноксії/24 години реоксигенації. Достовірні відмінності між показниками при $p < 0,05$.

Для lncRNA H19 було показано істотне зниження експресії після А/Р 0.5/1 більше ніж у 84 рази, порівняно із контрольними зразками ($p < 0,05$). Для А/Р 1/24 спостерігається також суттєве зниження (у 4,3 рази) порівняно із контролем ($p > 0,05$). Різниця у експресії H19 між А/Р 05/1 та А/Р 1/24 є достовірною і сягає 19,4 рази ($p < 0,05$) (Рис. 3.1.4.).

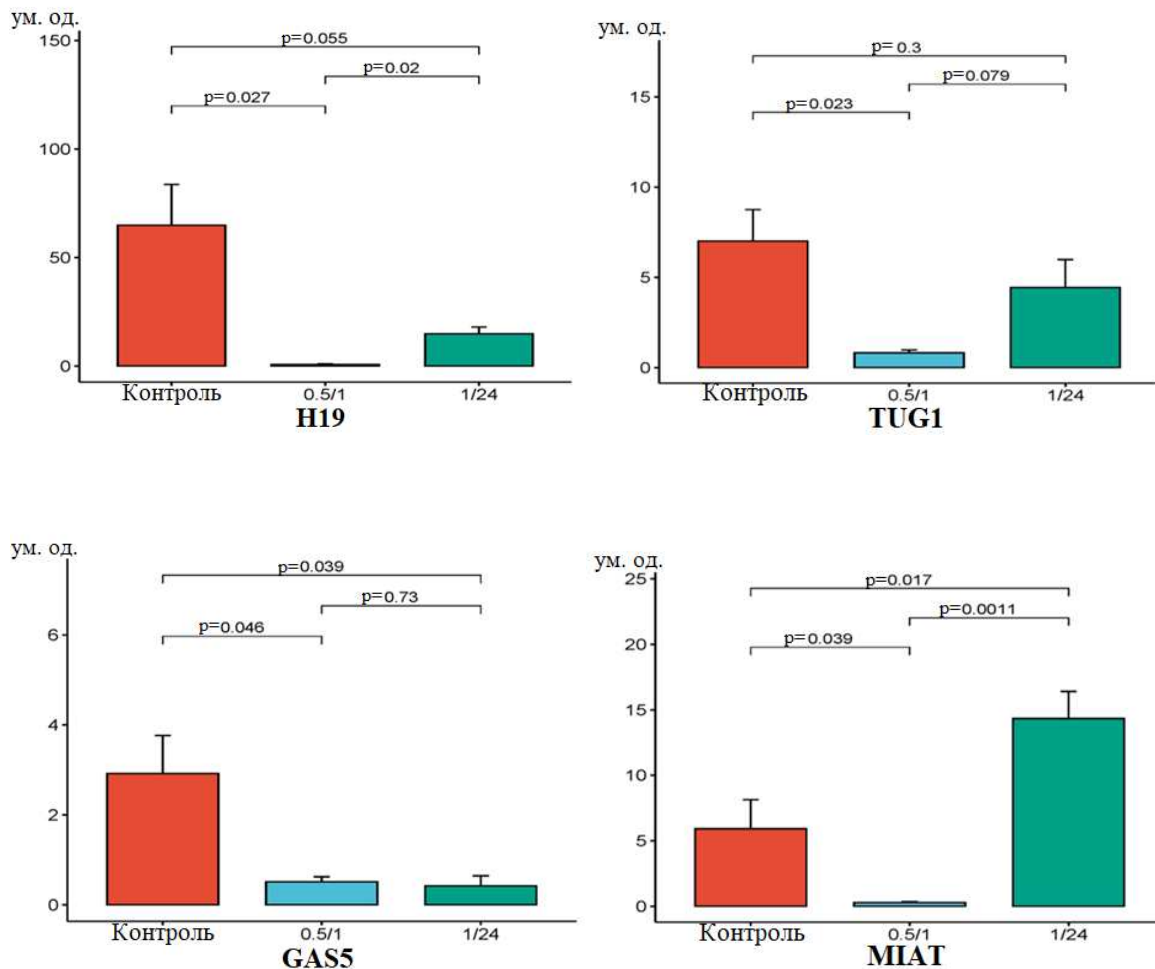


Рис. 3.1.4. Рівень експресії lncRNA H19, TUG1, GAS5 та MIAT в первинній культурі кардіоміоцитів неонатальних щурів за умови аноксії/реоксигенації. 0.5/1 – 30 хв. аноксії/60 хв. реоксигенації; 1/24 – 60 хв. аноксії/24 години реоксигенації. Достовірні відмінності між показниками при $p < 0,05$.

Подібний ефект спостерігали аналізуючи зміни рівню експресії lncRNA TUG1. За умови короткої А/Р рівень TUG1 достовірно знижується у 8,7 разів ($p < 0,05$). Хоча, після довгої А/Р рівень експресії lncRNA TUG1 є значно вищим ніж після короткої А/Р та відновлюється до 62% щодо контрольних величин, але це порівняння не є достовірним ($p > 0,05$). Статистично недостовірними також є порівняння рівня експресії lncRNA TUG1 між групами 0.5/1 та 1/24 у 5,44 рази ($p > 0,05$) (Рис. 3.1.4.).

Рівень експресії lncRNA GAS5 у культурі клітин достовірно знижується у більш ніж 8 разів за умов короткої А/Р ($p < 0,05$). Та на відміну від lncRNA H19 чи TUG1, при довгій А/Р рівень експресії не збільшується, а залишається на рівні короткої А/Р. Якщо за короткої А/Р рівень експресії lncRNA GAS5 був 0,51 умовних одиниць, то за довгої – 0,42 у.о. (Рис. 3.1.4.).

Аналізуючи рівень lncRNA MIAT у культурі кардіоміоцитів неонатальних щурів було встановлено значне зниження рівня її експресії за умов короткої А/Р (Рис. 3.1.4.). Експресія lncRNA MIAT знижується майже у 19 разів, порівняно із контрольними показниками ($p < 0,05$). Цікаво, що за довгої А/Р рівень експресії lncRNA MIAT достовірно підвищується більш, ніж у 3 рази, порівняно із контролем і відповідно у більш ніж 60 разів, порівняно із експресією при короткій А/Р ($p < 0,05$).

3.1.2. Визначення експресії lncRNAs H19, TUG1, GAS5 та MIAT у первинній культурі кардіоміоцитів неонатальних щурів при додаванні інгібітора HIF-проліл гідроксилази

Для встановлення імовірної ролі HIF-1 α у регулюванні експресії lncRNAs H19 та TUG1 було визначено експресію відповідних lncRNAs за умов додавання 2,4-діетил піридин дикарбоксилату, що є інгібітором ферменту HIF-проліл гідроксилази (Alexis Biochemicals, Швейцарія). Остання бере участь у процесах деградації HIF-1 α за умов нормоксії. За гіпоксичних/аноксичних умов активність HIF-проліл гідроксилази суттєво знижується, що і призводить до збільшення рівня HIF-1 α . Таким чином, нами було проаналізовано експресію мРНК HIF-1 α , lncRNAs H19, TUG1, а також і lncRNAs GAS5 та MIAT за умови нормоксії при додаванні у культуру клітин інгібітора HIF-проліл гідроксилази.

Для початку було визначено експресію мРНК HIF-1 α за умови додавання до культури клітин інгібітора HIF-проліл гідроксилази. Як видно на **Рис. 3.1.5.**, рівень експресії мРНК HIF-1 α у присутності інгібітора достовірно збільшується майже у 3 рази, що в цілому було очікувано ($p < 0,001$).

Що стосується HIF-1 α -залежних lncRNAs – H19 та TUG1, то рівень їх експресії у первинній культурі кардіоміоцитів неонатальних щурів також збільшується при нормоксії у присутності інгібітора HIF-проліл гідроксилази (PHD). Рівень експресії lncRNA H19 достовірно збільшується у 2,7 разів ($p < 0,01$) в експериментальних зразках, порівняно із контрольними (Рис. 3.1.6.). Рівень експресії lncRNA TUG1 також збільшується в 2,4 рази у присутності інгібітора HIF-проліл гідроксилази, проте таке збільшення не є достовірним ($p > 0,05$) (Рис. 3.1.6.).

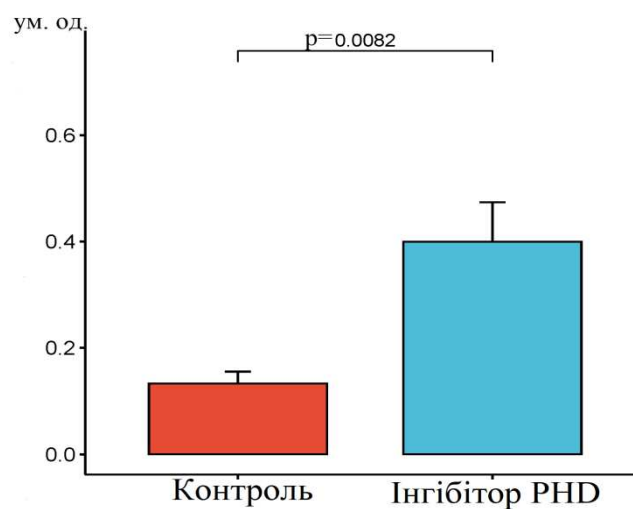


Рис. 3.1.5. Рівень експресії мРНК HIF-1 α в первинній культурі кардіоміоцитів неонатальних щурів за умови нормоксії при додаванні інгібітора HIF-проліл гідроксилази. Достовірні відмінності між показниками при $p < 0,05$.

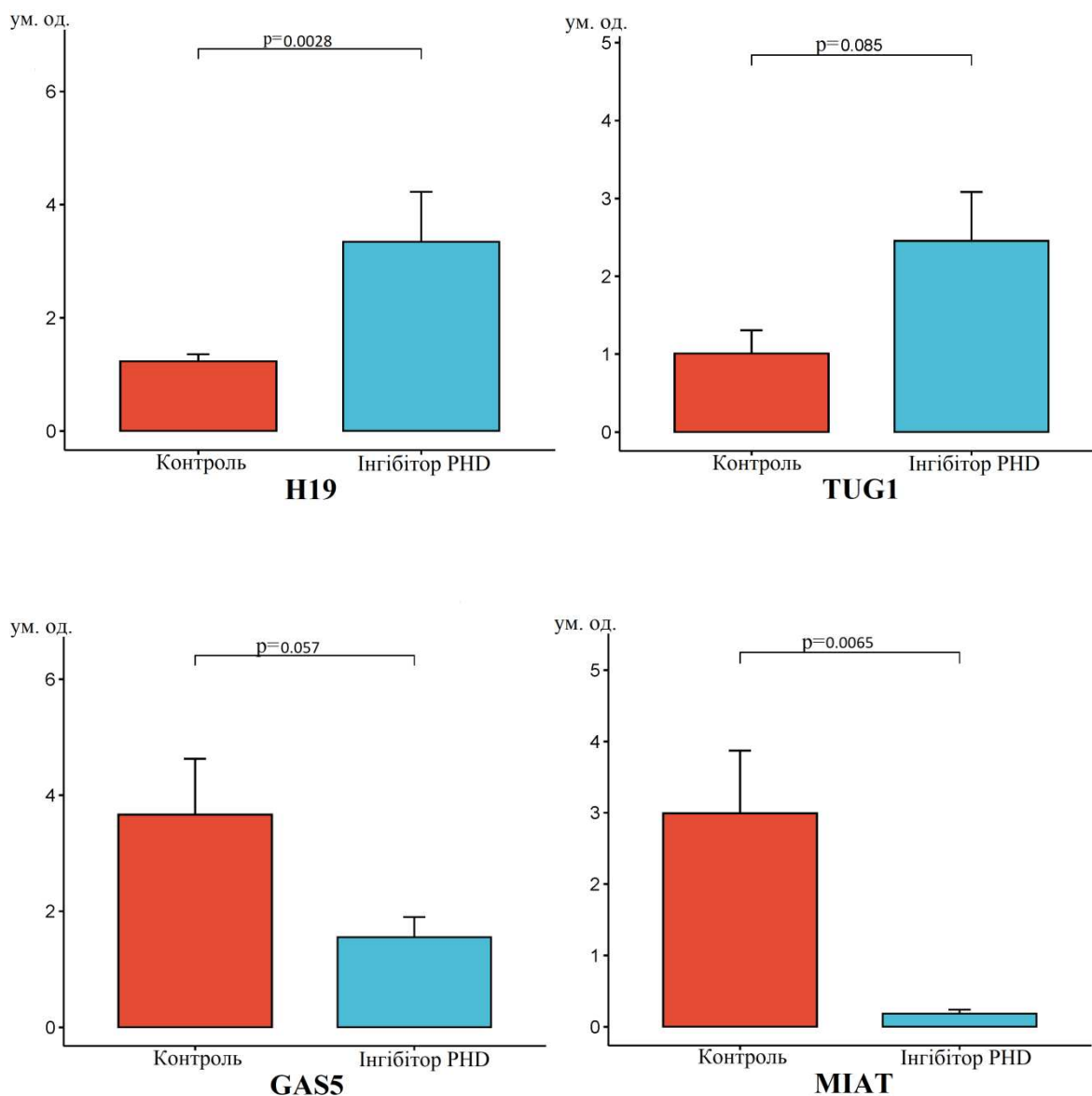


Рис. 3.1.6. Рівень експресії lncRNAs H19, TUG1, GAS5 та MIAT в первинній культурі кардіоміоцитів неонатальних щурів за умови нормоксії при додаванні інгібітора HIF-проліл гідроксилази. Достовірні відмінності між показниками при $p < 0,05$.

Нами також було проаналізовано експресію lncRNAs GAS5 та MIAT при нормоксії у присутності інгібітора HIF-проліл гідроксилази. Рівень експресії lncRNA GAS5 недостовірно знижується більше ніж у 2 рази, порівняно із контрольними показниками ($p > 0,05$) (Рис. 3.1.6.). А от рівень lncRNA MIAT

істотно знижується у зразку клітин із додаванням інгібітора HIF-проліл гідроксилази. Це достовірне зниження більше ніж у 16 разів ($p < 0,01$) (Рис. 3.1.6.).

Підсумовуючи вищезазначене, можна зробити висновок про те, що рівень експресії lncRNAs H19 та TUG1 імовірно регулюється HIF-1 α за умов нормоксії. При цьому за аноксії/реоксигенації ми цього не спостерігаємо. Очевидно, що lncRNAs H19 та TUG1 задіяні по патогенетичних механізмів, але регуляції їх експресії здійснюється через інші механізми.

Результати, представлені в цьому розділі, опубліковано у наукових працях автора:

1. **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.

3.2. ЕКСПРЕСІЯ H19, TUG1, GAS5 ТА MIAT У ЩУРІВ ЛІНІЇ WISTAR ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ІНФАРКТУ МІОКАРДА

У цьому розділі представлені результати дослідження кардіогемодинамічних, морфологічних змін, а також змін у експресії lncRNAs у міокарді та плазмі крові дорослих щурів лінії Wistar при моделюванні хронічного інфаркту міокарда. Як і у випадку з первинною культурою кардіоміоцитів неонатальних щурів, досліджували зміни у експресії lncRNAs H19, TUG1, GAS5 ТА MIAT.

3.2.1. Кардіогемодинамічні та морфологічні зміни серця у щурів при моделюванні інфаркту міокарда

Інфаркт міокарда моделювали шляхом накладання лігатури на нисхідну гілку лівої коронарної артерії протягом 4-х тижнів. Контрольній групі накладалася лігатура, але без перетискання артерії. Після 4-х тижнів знімали кардіогемодинамічні показники, а також бралися кров та серце тварин для проведення аналізу експресії lncRNAs.

Для підтвердження інфаркту міокарда у експериментальній групі було проведено фарбування зрізів серця за Ван Гізоном із визначенням площі фіброзу. За нашими даними, середній рівень фіброзу серця щурів експериментальної групи становив $13,2 \% \pm 1,28$. У групі з удаваною операцією це значення становило $3,4 \% \pm 0,31$. Таким чином, площа фіброзу в групі щурів з моделлю інфаркту міокарда була майже в чотири рази більшою, ніж у групі з удаваною операцією (Рис. 3.2.1.).

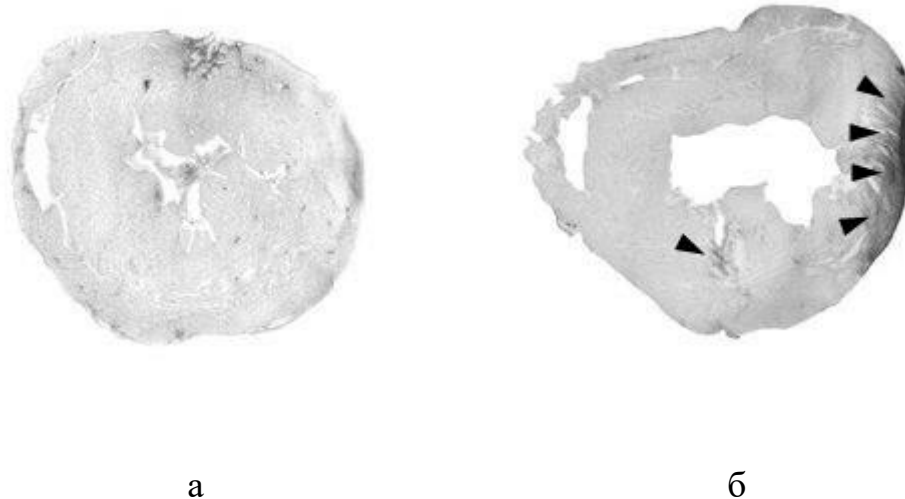


Рис. 3.2.1. Зрізи серцець щурів через 4 тижні після удаваної операції (а) та інфаркту міокарда (б). Темні ділянки — зона фіброзу; фарбування за Ван Гізоном.

Дослідження кардіогемодинамічних змін за умов інфаркту міокарда як у тварин, так і у людей представлені широко. Проте інформації щодо кореляційних зв'язків із експресією некодуючих РНК, чи механізмів впливу некодуючого транскриптому на гемодинаміку обмаль. Саме тому нами було вивчено гемодинаміку з метою подальшого встановлення кореляційних зв'язків із експресією вибраних lncRNAs.

Результати дослідження кардіогемодинамічних параметрів *in vivo* у щурів при моделюванні інфаркту міокарда наведені у таблиці 4.1.

Таблиця 3.2.1.

Кардіогемодинамічні показники у щурів лінії Wistar з моделлю інфаркту міокарда та удаваною операцією.

Показник	Група із удаваною операцією (n=9)	Група із інфарктом міокарда (n=9)
Частота серцевих скорочень, хв	322,89±39,6	323,33±22,62
Кінцево-систоличний об'єм, мкл	210,87±18,74	303,63±39,83*
Кінцево-діастолічний об'єм, мкл	377,96±47,98	448,9±22,63*
Кінцево-систоличний тиск, мм рт. ст.	88,22±8,52	94,88±5,97
Кінцево-діастолічний тиск, мм рт. ст.	2,07±2,17	8,13±1,51*
Ударний об'єм, мкл	166,47±12,4	141,02±23,91
Фракція викиду, %	44,04±3,73	31,29±3,24*
Хвилинний об'єм крові (серцевий викид), мкл/хв	53 751,21±4693,8	45 137,4±1682,54*
Ударна робота, мм рт. ст.*мкл	16187,33±2537,83	14589,44±3265,22
Артеріальна жорсткість (Ea), мм	0,47±0,06	0,56±0,09

рт. ст./мкл		
dP/dt_{max} , мм рт. ст./с	9556,56±1269,88	9582±1712,99
dP/dt_{min} , мм рт. ст./с	-7013,11±436,15	-6116±552,67
dV/dt_{max} , мкл/с	17312±2879,34	13239,89±2512,24*
dV/dt_{min} , мкл/с	-12490,7±1611,54	-11365,8±1470,14
Тау W, мс	7,04±1,04	10,49±0,56*
Максимальна потужність з урахуванням переднавантаження, мВт/мкл ² .	8,26±1,78	3,26±0,26*

* Достовірні відмінності між показниками при $p < 0,05$.

За допомогою наведених кардіогемодинамічних показників можна оцінювати насосну функцію серця. Порушення в цих параметрах є результатом не тільки серцево-судинних захворювань, а і ряду інших порушень в організмі.

Як видно з табл. 4.1., частота серцевих скорочень (ЧСС), у щурів з удаваною операцією та інфарктом міокарда є майже однаковою. У нашому експерименті 4-тижневе перетискання нисхідної гілки лівої коронарної артерії не вплинуло на рівень ЧСС. Цікаво, що суттєвих змін не зазнали і такі важливі показники функції серця як ударний об'єм (УО), ударна робота (УР) та артеріальна жорсткість (Еа). УО — це об'єм крові, що викидається шлуночком серця за один удар. УР — показник, що відображає роботу лівого шлуночка для викиду крові. ХОК — об'єм крові, який серце перекачує через кровоносну систему за одну хвилину. Варто

відзначити, що у щурів із моделлю ІМ ХОК був нижчим на 16,03%, а Фракція викиду (ФВ) — нижчою на 12,75% ($p < 0,05$).

Окрім вищезгаданих показників, систолічну функцію серця також аналізували за допомогою параметрів — кінцево-систолічний об'єм (КСО), кінцево-систолічний тиск (КСТ), dP/dt_{max} , а також показник максимальної потужності із урахуванням переднавантаження. Останній відображає здатність серця генерувати енергію з урахуванням переднавантаження (початкового розтягнення кардіоміоцитів).

Як видно з табл. 4.1., об'єм крові у лівому шлуночку у кінці систоли (КСО) у групі тварин із моделлю ІМ достовірно збільшується на 43,99%, порівняно із щурами з удаваною операцією. Значення КСТ недостовірно підвищується у групі щурів із ІМ на 7,55%. Ми також не помітили змін у значеннях показника dP/dt_{max} між групами — параметра, що відображає максимальну швидкість скорочення шлуночка. При цьому показник максимальної потужності із урахуванням переднавантаження зменшується у 2,53 рази у групі щурів із ІМ. Такий результат демонструє зниження здатності до скорочення, генерації енергії та порушення розслаблення серця після ІМ.

Діастолічну функцію оцінювали за показниками кінцево-діастолічного об'єму (КДО), кінцево-діастолічного тиску (КДТ), dP/dt_{min} , dV/dt_{max} , dV/dt_{min} , а також τW . КДО, що характеризує діастолічну функцію серця, у щурів із ІМ достовірно був підвищений на 18,77%, що може свідчити про порушення скоротливої функції серця та/або здатності шлуночків розслаблюватися. КДТ у щурів з ІМ достовірно збільшувався у 3,93 рази, порівняно із тваринами з удаваною операцією, що також свідчить про втрату здатності до скорочення, ремоделювання шлуночків та/або компенсаторні механізми.

Параметр dP/dt_{min} показує швидкість та ефективність розслаблення міокарду. У нашому експерименті цей показник знижується у групі з ІМ на 12,8%, але ця зміна є недостовірною ($p > 0,05$). Параметри dV/dt_{max} та dV/dt_{min} ,

відображають швидкість зміни об'єму, що пов'язана із фазами наповнення та вигнання крові. dV/dt_{\max} знижується на 23,52% у групі щурів із ІМ, що може бути пов'язано із пошкодженням міокарда, зміною внутрішньосерцевого тиску та/або ремоделюванням серця. Через згадані причини у групі із ІМ також знижується показник dV/dt_{\min} на 9%, хоча ця зміна є недостовірною.

Одним із найбільш достовірних показників діастолічного розслаблення є ізоволюмічна константа розслаблення Тау W (τ_w). Цей параметр у групі тварин з ІМ збільшується на 49%, з 7,04 до 10,49 мс. Такі зміни свідчать про значне погіршення діастолічної функції після ІМ.

3.2.2. Зміни експресії lncRNAs H19, TUG1, GAS5 та MIAT у міокарді та плазмі крові щурів при моделюванні інфаркту міокарда

Як і у випадку з моделюванням аноксії-реоксигенації на первинній культурі кардіоміоцитів неонатальних щурів, ми визначили рівень експресії lncRNAs H19, TUG1, GAS5 та MIAT при моделюванні інфаркту міокарда у дорослих щурів лінії Wistar. Аналіз проводився у тканинах міокарду та плазмі крові, що були взяті після 28 діб з моменту моделювання ІМ (накладання лігатури на ліву гілку нисхідної коронарної артерії).

У досліджуваній групі та у групі з удаваною операцією (УО), прокол ділянки міокарда навколо лівої гілки нисхідної артерії без її подальшого перетискання) було по 9 тварин. Результати аналізу експресії lncRNAs H19, TUG1, GAS5 та MIAT у міокарді щурів наведені на Рис. 3.2.2.

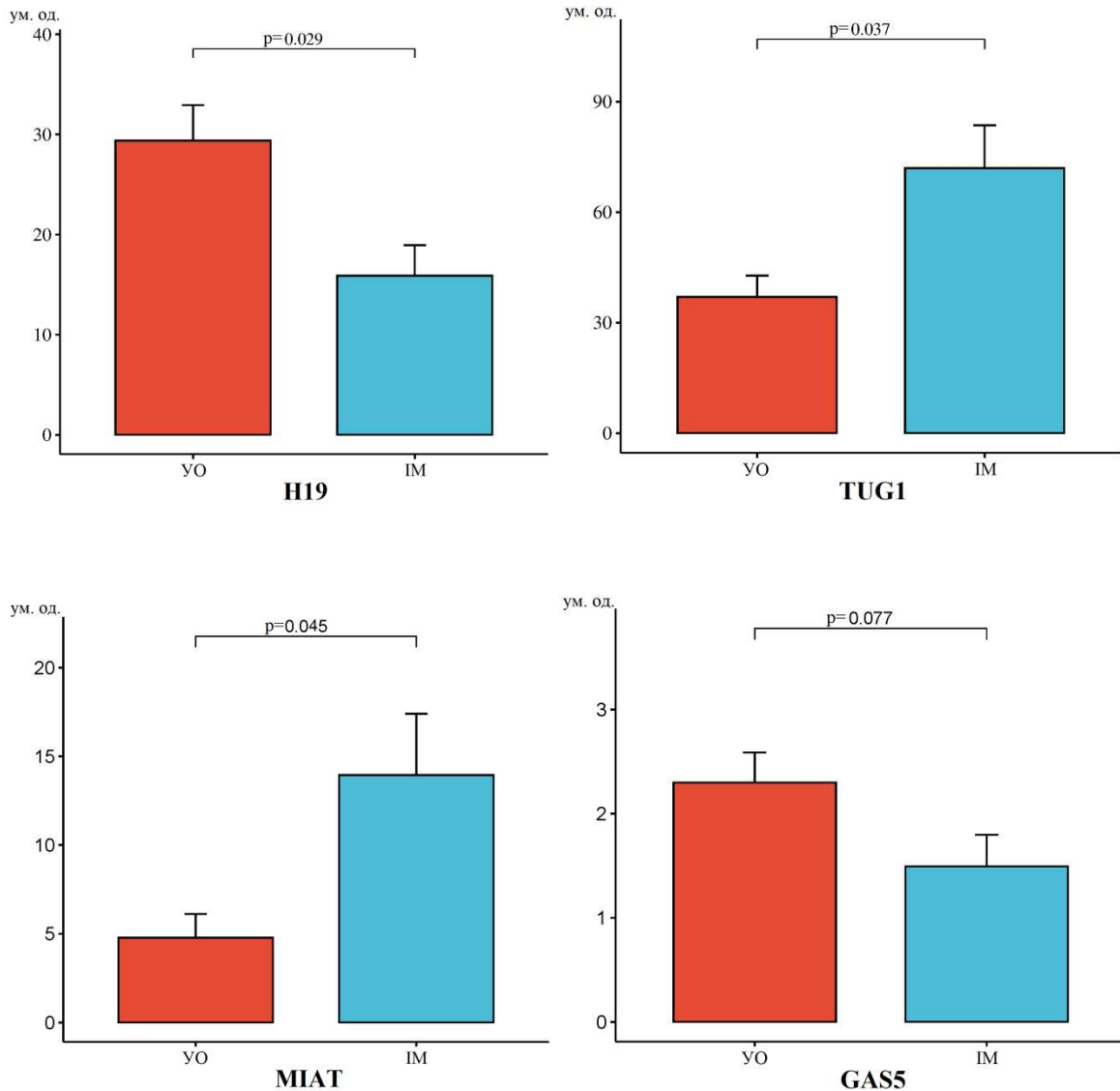


Рис. 3.2.2. Рівень відносної експресії lncRNAs H19, TUG1, MIAT та GAS5 у міокарді щурів лінії Wistar з удаваною операцією (YO) та інфарктом міокарда (IM). Достовірні відмінності між показниками при $p < 0,05$.

Як видно з рисунку, рівень експресії lncRNA H19 знижується майже в 2 рази у групі тварин із моделлю інфаркту міокарда. Протилежна картина спостерігається із lncRNA TUG1, рівень якої збільшується майже вдвічі у групі з IM. Аналіз експресії lncRNA MIAT у міокарді щурів показав, що за умов інфаркту вміст lncRNA MIAT достовірно збільшився майже втричі, з 4,78 у.о. до 13,95 у.о. Що стосується lncRNA GAS5, то рівень її експресії за умов інфаркту міокарда недостовірно зменшився на 35%, з 2,3 у.о. до 1,49 у.о. ($p > 0,05$). Результати

аналізу експресії lncRNAs H19, TUG1, GAS5 та MIAT у плазмі крові щурів наведені на Рис. 3.2.3. Цікаво, що динаміка змін експресії вказаних lncRNAs у плазмі майже така, як і у міокарді щурів. Так, рівень експресії lncRNA H19 знижується при ІМ у 2,42 раза ($p < 0,01$). При цьому експресія TUG1 у групі з ІМ зростає на 46,7%, проте ця зміна не є достовірною ($p > 0,05$). Як і у міокарді, рівень експресії lncRNA MIAT зростає у 2,66 раза у групі щурів із ІМ ($p < 0,01$). У той же час експресія lncRNA GAS5 у плазмі крові збільшується на 20,47% у групі тварин з інфарктом міокарда, проте це збільшення не є достовірним ($p > 0,05$).

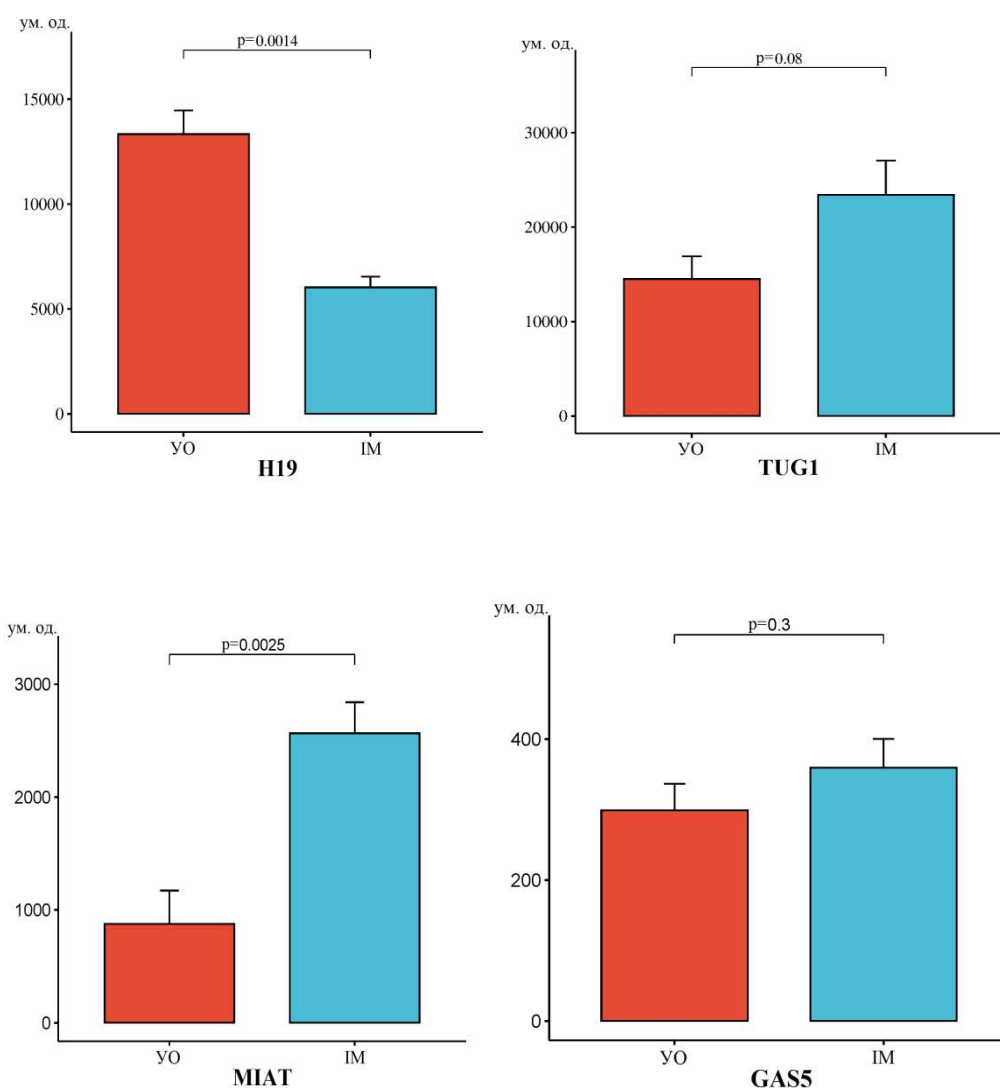


Рис. 3.2.3. Рівень відносної експресії lncRNAs H19, TUG1, MIAT та GAS5 у плазмі крові щурів лінії Wistar з удаваною операцією (YO) та інфарктом міокарда (ІМ). Достовірні відмінності між показниками при $p < 0,05$.

3.2.3. Кореляційний аналіз між експресією lncRNAs H19, TUG1, MIAT, GAS5 та гемодинамічними показниками

У цій роботі проведено дослідження зв'язку між гемодинамічними параметрами та експресією довгих некодуючих РНК із використанням кореляційного аналізу за Пірсоном. Дослідження гемодинамічних параметрів та їх взаємозв'язку з молекулярними маркерами на рівні lncRNAs дозволяє глибше зрозуміти механізми регуляції серцево-судинної системи та виявити потенційні біомаркери для діагностики та прогнозування серцево-судинних захворювань.

Кореляційний аналіз за Пірсоном дозволяє оцінити ступінь та напрямок лінійного зв'язку між двома кількісними змінними. Метод ґрунтується на розрахунку коефіцієнта кореляції Пірсона (r), який може набувати значень від -1 до +1. Значення +1 вказує на ідеальну позитивну лінійну кореляцію, значення -1 — на ідеальну негативну лінійну кореляцію, а значення 0 — відсутність лінійного зв'язку між змінними. Коефіцієнт кореляції Пірсона розраховується за такою формулою:

$$r = \frac{\sum(X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum(X_i - \bar{X})^2 \sum(Y_i - \bar{Y})^2}}$$

де X_i і Y_i — значення змінних X та Y для i -го спостереження, \bar{X} та \bar{Y} — середні значення цих змінних.

Важливо, що кореляція Пірсона ефективно застосовується для даних, розподіл яких близький до нормального, і передбачає лінійність взаємозв'язку між аналізованими змінними. Кореляційна матриця потенційних зв'язків між гемодинамічними параметрами та рівнем експресії lncRNA наведена на Рис. 3.2.4.

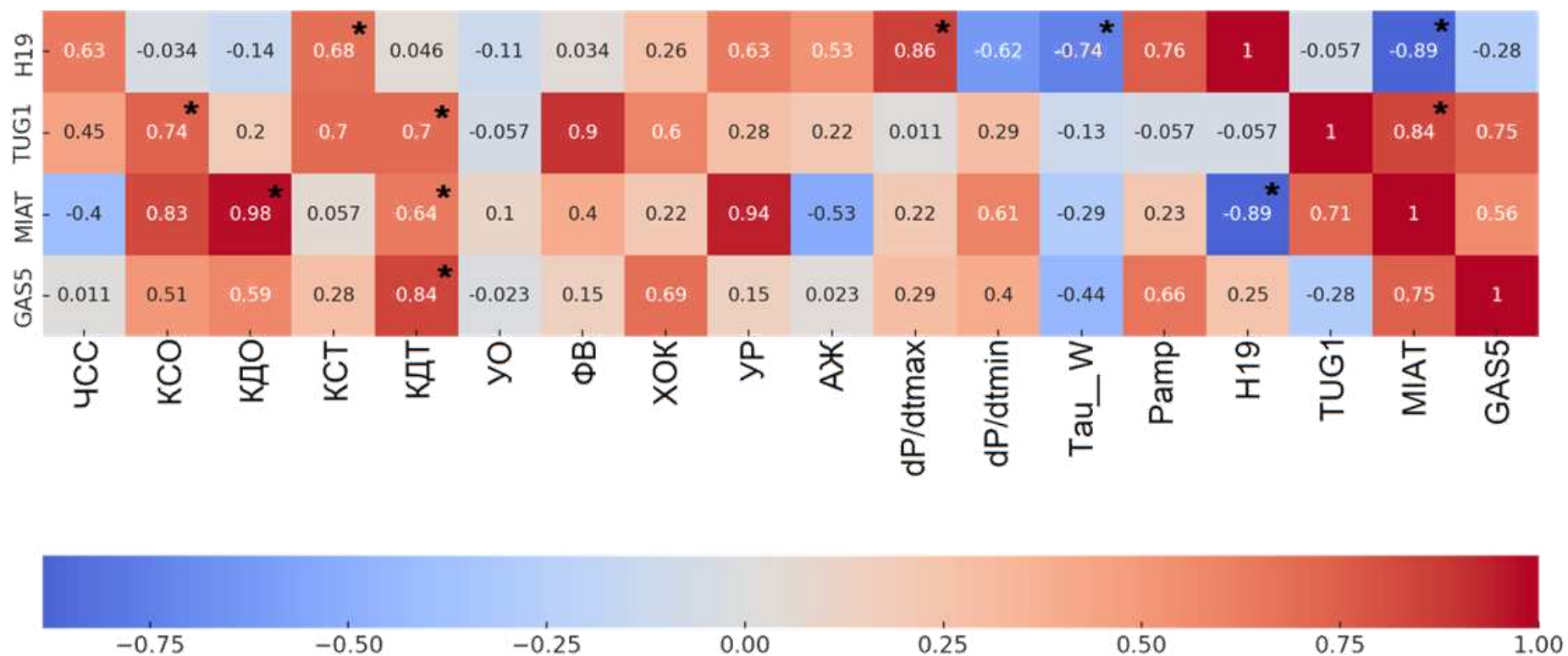


Рис. 3.2.4. Кореляційна матриця гемодинамічних параметрів та експресії lncRNAs H19, TUG1, MIAT та GAS5 у міокарді щурів лінії Wistar. * — достовірні показники кореляції при $p < 0,05$.

Силу кореляційного зв'язку між параметрами визначали за шкалою Чеддока, що наведена у таблиці 4.2.

Таблиця 3.2.2.

Сила зв'язків між змінними за Чеддоком

Значення	Інтерпретація
від 0 до 0,3; від - 0,3 до 0.	дуже слабка
від 0,3 до 0,5; від -0,5 до -0,3.	слабка
від 0,5 до 0,7; від -0,7 до -0,5.	середня
від 0,7 до 0,9; від -0,9 до -0,7.	висока
від 0,9 до 1; від -1 до -0,9.	дуже висока

Як видно з кореляційної матриці на Рис. 3.2.4., експресія lncRNA H19 має достовірну середню позитивну кореляцію із кінцево-систоличним тиском ($r=0,68$), високу позитивну кореляцію із показником dP/dT_{max} ($r=0,86$) та високу негативну кореляцію із ізоволюмічною константою розслаблення τW ($r= - 0,74$) Висока негативна кореляція у lncRNA H19 із експресією lncRNA MIAT ($r= - 0,89$).

Для lncRNA TUG1 показана висока позитивна кореляція із такими гемодинамічними показниками як кінцево-систоличний об'єм ($r=0,74$) та кінцево-діастолічний тиск ($r=0,7$).

Високий рівень позитивної кореляції показаний для lncRNA MIAT із кінцево-систоличним об'ємом ($r=0,98$). Середній рівень позитивної кореляції показаний між експресією lncRNA MIAT та кінцево-діастолічним тиском ($r=0,64$). Що стосується lncRNA GAS5, її експресія корелює тільки із кінцево-діастолічним тиском ($r=0,84$).

Результати, представлені в цьому розділі, опубліковано у наукових працях автора:

1. **M. 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.
2. **Хецуріані М.**, Древицька Т.І., Некрасова В.О., Досенко В.Є. Значення експресії довгої некодуючої РНК H19 при інфаркті міокарда. Матеріали III науково-практичної конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації». 12 травня, 2021, Харків, Україна.

3.3. ЕКСПРЕСІЯ H19, TUG1, GAS5 ТА MIAT У ЩУРІВ ЛІНІЇ WISTAR ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ІШЕМІЇ/РЕПЕРФУЗІЇ МІОКАРДА

У цьому розділі представлені результати дослідження кардіогемодинамічних змін, а також змін у експресії lncRNAs H19, TUG1, GAS5 ТА MIAT у міокарді та плазмі крові дорослих щурів лінії Wistar при ішемії-реперфузії міокарда.

3.3.1. Кардіогемодинамічні зміни у щурів при моделюванні ішемії-реперфузії

Модель ішемії-реперфузії міокарда проводили на щурах лінії Wistar віком 6 міс та масою 280–320 г. Всього у групі з удаваною операцією було 8 щурів, а в експериментальній — 9. Тварин наркотизували внутрішньоочеревинним введенням уретану у дозі 1,5 г/кг. ШВЛ здійснювали через трахеостому за допомогою апарату Harvard (Великобританія).

Доступ до серця виконували через четверте міжребер'я з попереднім діагональним розтином шкіри від мечоподібного відростка. Надалі розводили м'язи та накладали лігатуру на стовбур лівої коронарної артерії на 40 хв (ішемія), після чого лігатуру знімали на 120 хв (реперфузія). Удавану операцію здійснювали простим накладанням шовного матеріалу без перетискання артерії на 40 хв та його видаленням на 120 хв.

Як і у випадку з моделлю інфаркту міокарда, зняття кардіогемодинамічних показників лівого шлуночка проводили із використанням ультрамініатюрного катетера SPF-838 (Millar Instruments, США). Результати дослідження наведені у таблиці 3.3.1.

Кардіогемодинамічні показники у щурів лінії Wistar з моделлю ішемії-реперфузії міокарда та удаваною операцією (УО). * — достовірні відмінності між показниками.

Показник	0 хв		20 хв		40 хв		100 хв		160 хв	
	УО	Ішемія	УО	Ішемія	УО	Ішемія	УО	Реперфузія 60 хв	УО	Реперфузія 120 хв
Частота серцевих скорочень, хв	356.02±19.59	349.48±40.53	386.83±33.67	369.31±72.67	364.71±58.6	334.42±27.2	415.17±95.53	318.82±43.93	420±138.37	305.52±74.65
Кінцево-систоличний об'єм, мкл	112.34±26.82	114.1±43.41	139.16±42.51	197.16±32.27	160.09±21.86	180.36±32.5	130.82±25.59	142.38±12.34*	153.02±46.15	158.66±38.99
Кінцево-діастолічний об'єм, мкл	226.67±43.54	205.18±33.37	242.43±28.18	312.43±35.84	249±26.84	276.53±33.05	211.9±28.93	218.13±17.85	244.76±23.78	261.83±47.82
Кінцево-систоличний тиск, мм рт. ст.	76.46±11.17	60.01±5.74*	70.99±16.87	86.54±14.8	80.07±8.73	68.11±6.02*	92.47±22.94	70.38±8.84	86.52±13.98	63.83±14.17*
Кінцево-діастолічний тиск, мм рт. ст.	6.4±4.95	6.85±2.02	4.08±1.27	6.01±1.93	5.26±2.42	5.66±1.43	5.14±2.08	4.63±1.65	8.14±4.32	11.24±5.37
Ударний об'єм, мкл	114.92±18.32	100,94±13.45	107.43±12.02	115.32±12.74	89.02±18.34	92.33±22.08	84.32±19.69	76.22±13.03	91.02±21.22	103.03±14.85
Фракція викиду, %	50.34±6.21	48.2±5.72	44.84±9.62	37.85±8.93	39.63±7.85	35.37±8.28	40.74±7.21	35.61±8.3	39.08±7.15	38.92±9.02
Хвилиний об'єм крові (серцевий викид), мкл/хв	40584.92±	34948.86±	41302.64±	42553.08±	33127.28±	29728.35±	35007.13±	22693.96±	38220.73±	30372.15±
	14194.60	8491.3	12625.74	18674.82	2505.59	4206.13	7104.28	8392.39*	7403.39	2930.71*

Ударна робота, мм рт. ст.*мкл	6197.4±1285.96	4261±894.3*	6040.75±2277.42	3589.99±582.35*	5756.52±1587.41	2957.03±683.47*	5018.37±1204.08	2992.73±929.17*	3862.23±919.67	2646.52±792.82*
Артеріальна жорст. (Еа), мм рт. ст./мкл	1.11±0.54	1.02±0.28	1.34±0.75	1.74±0.61	1.16±0.8	1.97±0.21*	1.27±0.4	1.55±0.81	2.04±0.43	2.47±0.91
dP/dtmax, мм рт. ст./с	6897.46±2062.52	4142.75±1218.25	8792.489±2419.18	5086.27±1893.63	5085.11±1646.93	4650.47±1932.42	4798.55±1034.39	5154.15±1598.88	7883.06±2975.8	4953.98±1419.03*
dP/dtmin, мм рт. ст./с	- 4412.20±1312.03	- 3166.82±1009.49	- 4512.59±1591.14	- 4230.47±1766.4	- 4252.79±1920.22	- 3447.84±984.56*	- 4820.51±1674.24	- 3124.16±797.18	- 4892.21±1843.45	- 2767.74±1098.78
dV/dtmax, мкл/с	2545.36±177	3935.21±105	3157.72±1637.2	2372±983.29	2706.71±1287.1	2028.34±895.6	2523.34±1016.54	2360.91±659.48	2204.04±953.39	1907.68±920.23
dV/dtmin, мкл/с	- 3596.88±2486.66	- 3220.63±1352.5	- 3564.49±1897.76	- 3417.39±1256.35	- 3713.43±1221.52	- 2252.89±605.02*	- 2549.53±984.97	- 2346.58±929.15	- 3166.75±1480.62	- 2328.42±1010.54
Тau W, мс	8.55±5.32	11.62±3.91	9.56±0.94	13.12±2.91*	9.94±2.78	14.56±2.49*	10.46±2.63	14.08±3.57	9.62±3.01	12.04±3.67
Максимальна потужність урахуванням переднавантаження, мВт/мкл ² .	12.67±2.71	8.32±1.6*	11.72±3.34	8.14±2.07*	12.18±3.29	8.82±4.87	8.59±3.02	8.18±4.47	10.69±4.08	8.44±3.75

Як видно з табл. 3.3.1., зміни кардіогемодинамічних показників між групами УО та експериментальною групою були не такими суттєвими, як при моделі інфаркту міокарда. Проте відмінності у деяких параметрах є достовірними та вказують на погіршення систолічної та діастолічної функцій серця.

Частота серцевих скорочень в обох групах залишається відносно стабільною протягом усього експерименту. Збільшення чи зменшення цього показника впродовж усього експерименту не набуває достовірних відмінностей.

Достовірні зміни кінцево-систолічного об'єму спостерігали після 60 хв реперфузії, де у експериментальній групі показник був більшим на 9,23%. При цьому параметр постійно збільшувався під час ішемії, але почав спадати при реперфузії, що може вказувати на часткове відновлення скоротливої функції міокарда.

Істотне підвищення кінцево-діастолічного об'єму спостерігали у експериментальній групі на 20-ій хв ішемії. Цікаво, що істотних коливань цього показника у групі з УО не було впродовж усього експерименту. У той час як у щурів експериментальної групи спостерігається підвищення під час ішемії, але на етапі реперфузії кінцево-діастолічний об'єм знижується на 60-й хв, але потім підвищується на 120-й. . Подібні зміни можуть вказувати на часткове погіршення діастолічної функції міокарда.

Впродовж експерименту спостерігали достовірне зниження рівня кінцево-систолічного тиску у щурів експериментальної групи. Такі зміни фіксували на початку експерименту (зниження на 21,5% від показника в групі УО), на 40-й хв ішемії (зниження на 14,9%) та на 120-й хв реперфузії (зниження на 26,22%). Варто відзначити, що На етапі реперфузії показник КСТ почав зростати на 60-й хв, але на 120-й знову почав знижуватися і майже наблизився до вихідного рівня.

Що стосується кінцево-діастолічного тиску, то суттєвих змін цього параметру ми не спостерігали в жодній із груп впродовж усього експерименту. В

кінці експерименту, на 160-й хв фіксували деякі підвищення цього показника, порівняно із вихідними значеннями. Але порівняно високі показники стандартного відхилення при проведенні статистичної обробки результатів не дають змоги зробити остаточні висновки. Не зазнали істотних змін між групами також такі параметри як ударний об'єм та фракція викиду. При цьому варто зауважити, що фракція викиду лівого шлуночка з 50,34% та 48,2% у групах УО та ішемії-реперфузії відповідно знижується до 39,08% та 38,92%. Ми вважаємо, що подібні зміни пов'язані із погіршенням насосної функції серця впродовж дослідження як у групі з УО, так і у щурів експериментальної групи.

Достовірні відмінності показника хвилинного об'єму крові (або серцевого викиду) простежуються на етапі реперфузії. Як видно з табл. 5.1., на 60-й хв реперфузії ХОК зменшується на 35,18%, а на 120-й хв на 20,54% у щурів експериментальної групи. Якщо порівнювати значення ХОК впродовж усього експерименту, то видно, що у щурів контрольної групи він залишається стабільним, а тварин експериментальної групи — знижується.

Значення ударної роботи серця у щурів з І-Р була достовірно нижчою на всіх етапах експерименту, порівняно із тваринами з УО. При цьому варто відзначити, що у тварин з І-Р величина ударної роботи серця починає знижуватися після 20-ї хв ішемії. На 40-й хв ішемії, а також на 60-й та 120-й хв реперфузії вона залишається стабільною на рівні 2646.52-2992.73 мм. рт ст*мкл.

Достовірні відмінності артеріальної жорсткості між групами спостерігали після 40 хв ішемії. У групі щурів із ішемією цей показник виявився у 1,7 раза вищим. Варто відзначити, що впродовж експерименту спостерігається загальна тенденція до зростання показника артеріальної жорсткості в обох групах.

Показник dP/dt_{max} залишається без достовірних змін між групами щурів, окрім 120-ї хв реперфузії, за якої ми спостерігали зниження цього параметра на 37,16%, порівняно із групою з УО. Що стосується параметра dP/dt_{min} , то достовірні зміни між групами тварин ми спостерігали лише після 40 хв ішемії. У

щурів з індукованою ішемією абсолютний показник dP/dt_{\min} знизився на 18,93%. Варто зауважити, що після 60 та 120 хв реперфузії ми не спостерігали підвищення цього параметра у щурів із І-Р, що могло б свідчити про часткове покращення діастолічної функції серця.

Показники dV/dt_{\max} та dV/dt_{\min} , що відображають швидкість зміни об'єму, пов'язаної із фазами наповнення та вигнання крові, між групами залишаються без достовірних змін, окрім параметра dV/dt_{\min} , абсолютне значення якого знижується у експериментальній групі щурів на 39,33% після 40 хв ішемії. В цілому, ми спостерігали зменшення параметрів dV/dt_{\max} та dV/dt_{\min} у часі у групі з І-Р впродовж усього експерименту. Це свідчить як про сповільнення максимальної швидкості наповнення лівого шлуночка та мінімальної швидкості вигнання крові, а також знижену скоротливість.

Ізовольюмічна константа розслаблення Тау W (τ_w) достовірно зростає у щурів з ІР на 20-й та 40-й хв ішемії на 37,24% та 46,48% відповідно, що свідчить про погіршення діастолічної функції серця. Варто відзначити, що істотних змін величини Тау W у групі із УО не простежується від початку до кінця експерименту. При цьому у групі із І-Р цей показник зростає із 9,62 мс до 12,04 мс наприкінці досліда.

Параметр максимальної потужності з урахуванням переднавантаження у групі із І-Р був нижчим на 34,33% вже на початку експерименту (одразу після накладання лігатури на ліву гілку нисхідної коронарної артерії). Майже такі зміни ми спостерігали на 20-й хв ішемії, де у групи щурів із І-Р цей показник був нижчим на 30,55%, порівняно із групою тварин з УО. Цікаво, що після 60 хв реперфузії максимальна потужність із урахуванням переднавантаження зменшується у групі щурів із УО, порівняно із даними на початку експерименту та після 20 та 40 хв ішемії. При цьому у щурів із І-Р цей параметр залишається незмінним, тому після реперфузії достовірної різниці між групами ми не спостерігали.

Таким чином, можна констатувати, що гемодинамічні зміни за умов ішемії-реперфузії є не такими істотними, як у щурів із моделлю інфаркту міокарда. Ряд показників вказують на погіршення як систолічних, так і діастолічних функцій серця на етапі ішемії. Реперфузія дещо покращує показники КСО, КДО, ХОК, ударну роботу серця, хоча в цілому ми спостерігали загальне погіршення гемодинамічних показників у тварин із ІР, порівняно із вихідними даними.

3.3.2. Зміни експресії lncRNAs H19, TUG1, GAS5 та MIAT у міокарді та плазмі крові щурів при моделюванні ішемії-реперфузії міокарда

Ми визначили рівень експресії lncRNAs H19, TUG1, GAS5 та MIAT при моделюванні ішемії-реперфузії міокарда у дорослих щурів лінії Wistar. Аналіз проводився у тканинах міокарду та плазмі крові, що були взяті одразу після експерименту (після 120-ї хвилини реперфузії). У досліджуваній групі та у групі з удаваною операцією (УО, прокол ділянки міокарда навколо лівої гілки низхідної артерії без її подальшого перетискання) було 9 і 8 тварин відповідно. Результати аналізу експресії lncRNAs H19, TUG1, GAS5 та MIAT у міокарді щурів наведені на Рис. 3.3.1.

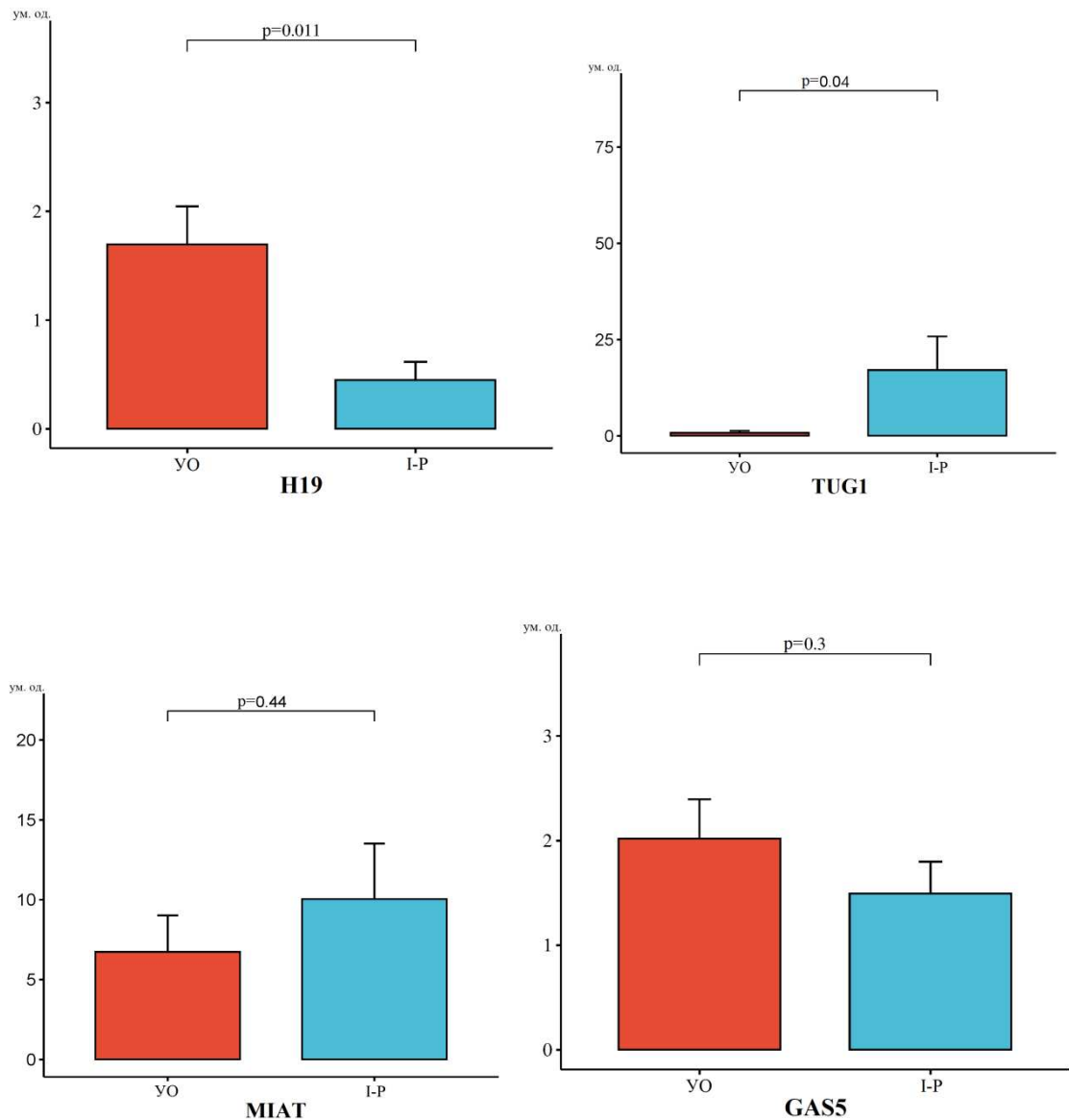


Рис. 3.3.1. Рівень відносної експресії lncRNAs H19, TUG1, MIAT та GAS5 у міокарді щурів лінії Wistar з удаваною операцією (YO) та ішемією-реперфузією міокарда (I-P). Достовірні відмінності між показниками при $p < 0,05$.

Як видно з Рис. 3.3.1. рівень відносної експресії lncRNA H19 достовірно знижується у 3,79 раза після ішемії-реперфузії. Рівень експресії lncRNA TUG1 достовірно збільшується більше ніж у 22 раза після ішемії-реперфузії. Зміни у експресії GAS5 та MIAT були недостовірними: спостерігали зниження lncRNA GAS5 на 26,24%, а MIAT — збільшення на 49,11%.

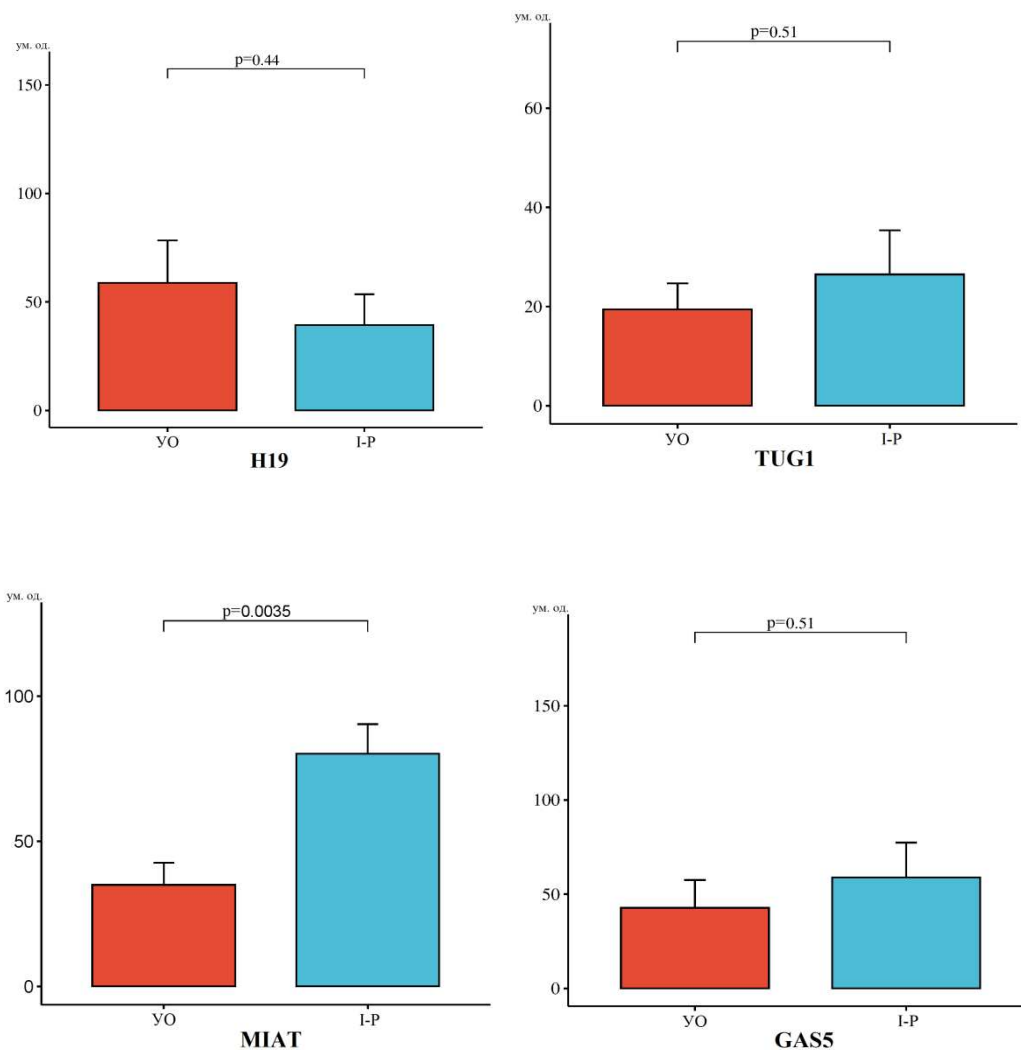


Рис. 3.3.2. Рівень відносної експресії lncRNAs H19, TUG1, MIAT та GAS5 у плазмі крові щурів лінії Wistar з удаваною операцією (YO) та ішемією-реперфузією міокарда (I-P). Достовірні відмінності між показниками при $p < 0,05$.

Дещо інакшу картину ми спостерігали при аналізі відносної експресії lncRNAs H19, TUG1, GAS5 та MIAT у плазмі крові щурів (Рис. 3.3.2.). Статистично значущими виявилися лише відмінності у експресії lncRNA MIAT. Після ішемії-реперфузії її рівень у плазмі крові збільшився у 2,3 раза. Експресія lncRNA H19 недостовірно знижується на 32,43%, TUG1 збільшується на 38,95%, а GAS5 — на 33,64%.

Варто відзначити, що як і у випадку із гемодинамічними параметрами, зміни експресії lncRNAs H19, TUG1, GAS5 та MIAT при ішемії-реперфузії також

виявилися не такими однозначними, особливо у плазмі крові, де достовірна різниця спостерігається лише для lncRNA MIAT. В той же у міокарді найбільш драматичної зміни зазнала lncRNA TUG1 саме при гострому експерименті.

Результати, представлені в цьому розділі, опубліковано у наукових працях автора:

1. **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.

3.4. ЕКСПРЕСІЯ HIF-1 α ЗАЛЕЖНИХ ДОВГИХ НЕКОДУЮЧИХ РНК ТА ГЕНІВ У ПАЦІЄНТІВ ІЗ ІШЕМІЧНОЮ ХВОРОБОЮ СЕРЦЯ ТА ІНФАРКТОМ МІОКАРДА

У заключній частині роботи була проаналізована експресія низки довгих некодуючих РНК у пацієнтів із ішемічною хворобою серця, інфарктом міокарда, а також у пацієнтів, яким робили процедуру віддаленого ішемічного прекондиціонування (ВІПК) перед проведенням операції ізольованого коронарного шунтування. Проведення такого дослідження дозволило нам відповісти на декілька важливих питань. Зокрема, чи спостерігається зміна експресії lncRNAs у пацієнтів із ішемічною хворобою серця? Які lncRNAs у плазмі крові є найбільш інформативними, та чи можна їх розглядати як потенційні біомаркери ішемічної хвороби серця? Як змінюється експресія обраних lncRNAs після процедури ВІПК?

Визначення експресії lncRNAs при ВІПК було проведено задля розуміння динамічності lncRNAs — як на експресію цих молекул вплине незначне ішемічне навантаження? ВІПК — явище, завдяки якому короткі періоди ішемії, що супроводжуються реперфузією тканин, забезпечують подальший захист міокарду від пошкодження, спричиненого ішемією. За більше ніж 30 років досліджень запропоновано чимало молекулярних механізмів, що лежать в основі ВІПК. Зокрема, ідентифіковано ряд молекулярних медіаторів гіпоксії, яка є центральним компонентом ішемії. Домінуючу роль у координації транскрипційної регуляції при гіпоксичних станах відіграє фактор, що індукуються гіпоксією — транскрипційний фактор HIF-1 α . При цьому про роль lncRNAs при ВІПК майже нічого невідомо. Саме тому було вирішено провести аналіз експресії низки lncRNAs, а також HIF-1 α залежних генів при ВІПК.

Для проведення цього експерименту нами були обрані lncRNAs, що пов'язані із HIF-1 α , зокрема це lncRNA H19, а також природній РНК-антисенс до мРНК HIF-1 α — HIF1A-AS1. Крім того, була проаналізована і експресія lncRNAs

MIAT, LIPCAR та MHRT як потенційних біомаркерів серцево-судинної системи. Варто відзначити, що перелік lncRNAs, який ми аналізували у щурів дещо відрізняється від такого у пацієнтів. Це пов'язано із порівняно низьким рівнем міжвидової консервативності lncRNAs. Саме тому, окрім lncRNAs H19 та MIAT (що були обрані для дослідження на експериментальних патологіях на тваринах та культурі клітин), нами було обрано додаткові lncRNAs — HIF1A-AS1, LIPCAR та MHRT.

Окрім lncRNAs, нами також була проаналізована експресія 4-х HIF-1 α залежних генів. Це гени-мішені HIF-1 α — кіназа піруватдегідрогенази 1 (PDK1), глюкозний транспортер 1 (GLUT1), а також гени, продукти яких впливають на експресію HIF-1 α — мішень рапаміцину у ссавців (mTOR) та нейротрофічний фактор мозку (BDNF). У низці робіт було показано, що mTOR та BDNF посилюють транскрипцію HIF-1 α . Інформація стосовно експресії мРНК цих генів допоможе у розумінні можливих молекулярних механізмів, залучених до ішемічного навантаження у пацієнтів.

3.4.1. Зміни гемодинамічних параметрів після ВІПК при ізольованому коронарному шунтуванні у пацієнтів з ішемічною хворобою серця

Для проведення ВІПК пацієнтам досліджуваної групи на праве передпліччя накладали манжетку для вимірювання артеріального тиску. Тиск у манжетці піднімали до 200 мм. рт. ст. та залишали на 5 хв. Після цього йшов етап реперфузії протягом 5 хвилин. Періоди ішемії та реперфузії по 5 хв. повторювали тричі. Пацієнтам контрольної групи манжетку на праве передпліччя накладали також, але без нагнітання повітря.

Операцію ізольованого коронарного шунтування на працюючому серці розподілили на декілька етапів. Перший етап — підготовка пацієнта до операції: налагодження моніторингу, катетеризація периферичної вени та артерії для вимірювання інвазивного артеріального тиску. Другий етап — індукція та інтубація. Третій етап — формування дистальних анастомозів. Четвертий етап

закінчення операції. Гемодинамічні показники знімали тричі — на етапі індукції, формування дистальних анастомозів та закінчення операції. Результати спостережень наведені у таблиці 3.4.1.

На етапі індукції гемодинамічні показники суттєво не відрізнялися в обох групах. Єдина відмінність полягала у показнику ІЗПСО (індекс загального периферичного судинного опору), який у досліджуваній групі склав $2163,4 \pm 121,4^*$, а у контрольній - $2385,4 \pm 163,5^*$ ($p < 0,05$). Суттєві зміни гемодинамічних параметрів були відмічені на етапі формування дистальних анастомозів. Як видно з таблиці 3.4.1, у пацієнтів досліджуваної групи СІ (серцевий індекс) був вищим на 19% у порівнянні із пацієнтами контрольної групи. Показники САТ (систоличний артеріальний тиск) та ДАТ (діастолічний артеріальний тиск) були достовірно вищими у пацієнтів 1 групи. Показник УІ (ударний індекс) у пацієнтів досліджуваної групи був вищим на 14%, а показник ІЗПСО (індекс загального судинного периферичного опору) був достовірно нижчим у 1 групі пацієнтів.

Виходячи із показників гемодинаміки можна зробити висновок, що пацієнти 1 групи були більш гемодинамічно стабільними на цьому етапі операції. На етапі закінчення операції достовірної різниці показників ЧСС (частота серцевих скорочень), САТ (систоличний артеріальний тиск), ДАТ (діастолічний артеріальний тиск), ЦВТ (центральний венозний тиск) не було відмічено у пацієнтів двох груп, проте показники СІ та УІ були достовірно вищими у 1 групі, а показник ІЗПСО у 1 групі був достовірно нижчим.

Таблиця 3.4.1.

Показники гемодинаміки на етапі індукції, формування дистальних анастомозів та закінчення операції у пацієнтів досліджуваної (група 1) та контрольної (група 2) груп. * - вірогідність відмінностей показників між групами $p < 0,05$.

Показник	Індукція		Формування дистальних анастомозів		Закінчення операції	
	Група 1 N = 14, M ± SD	Група 2 N = 17, M ± SD	Група 1 N = 14, M ± SD	Група 2 N = 17, M ± SD	Група 1 N = 14, M ± SD	Група 2 N = 17, M ± SD
ЧСС, за 1 хв	87,69 ± 2,17	91,69±3,42	82,31±3,17	84,25±5,45	76,42±4,63	81,36±5,32
САТ, мм рт. ст.	120,14 ± 3,17	118,14±8,17	98,54 ± 4,35*	91,65 ± 5,7*	125,42±5,10	121,14±3,70
ДАТ, мм, рт. ст.	68,3±5,34	62,3±5,34	58,15 ± 5,4*	52,15 ± 3,3*	62,3±5,16	59,3±5,16
ЦВТ, мм вод. ст.	52,3±7,4	48,1±6,2	62,1 ± 5,4	59,3 ± 9,8	63,1±4,8	59,2±3,5
СІ, л/хв/м ²	3,21±0,52	3,18±0,37	3,12±0,85*	2,42±1,12*	3,42±0,86*	3,05±0,95*
УІ, мл/м ²	48,15±2,15	46,23±3,21	43,34±2,26*	35,50±5,45*	46,24±3,26*	40,13±4,15*
ІЗПСО, дин*с*см ⁵ *м ²	2163,4±121,4*	2385,4±163,5*	2367,3±213,5*	2638,5±494,2*	2247,3±189,5*	2472,3±165,5*

3.4.2. Експресія HIF-1 α , PDK1, GLUT1, BDNF та mTOR у міокарді та лейкоцитах після ВІПК при ізольованому коронарному шунтуванні у пацієнтів з ішемічною хворобою серця

Нами була проаналізована експресія HIF-1 α у міокарді та лейкоцитах пацієнтів після ВІПК при ізольованому коронарному шунтуванні. Також для аналізу були обрані 2 гени-мішені HIF-1 α — PDK1 та GLUT1, а також 2 гени, продукти яких посилюють експресію HIF-1 α — mTOR та BDNF. Результати дослідження на Рис. 3.4.1.

Рівень експресії мРНК HIF-1 α у міокарді достовірно знижується більше ніж у 7,5 раза у пацієнтів після ВІПК, порівняно із групою з УО. Зниження експресії мРНК HIF-1 α на 48,34% також спостерігали у лейкоцитах пацієнтів із ВІПК. Як показано на Рис. 3.4.1. знижується і експресія мішеней HIF-1 α — генів PDK1 та GLUT1 як в міокарді, так і в лейкоцитах після проведення процедури ВІПК. У міокарді рівень мРНК PDK1 у групи з ВІПК достовірно знижується у 2,56 раза, а в лейкоцитах — в 1,8 раза, проте ця зміна не є достовірною ($p > 0,05$). Недостовірним також виявилось зниження експресії мРНК GLUT1 у міокарді та лейкоцитах пацієнтів після ВІПК у 1,91 та 2,13 раза відповідно.

Рівень експресії генів mTOR у міокарді пацієнтів групи із ВІПК знижується у 2,91 раза, проте ця зміна не є достовірною ($p > 0,05$). При цьому зниження рівня експресії mTOR у 10,46 раза у лейкоцитах було достовірним ($p < 0,05$). Що стосується експресії гену BDNF, то у міокарді вона недостовірно знижується майже у 7 разів ($p > 0,05$) у пацієнтів із ВІПК, а у лейкоцитах — недостовірно збільшується на 12,43% ($p > 0,05$).

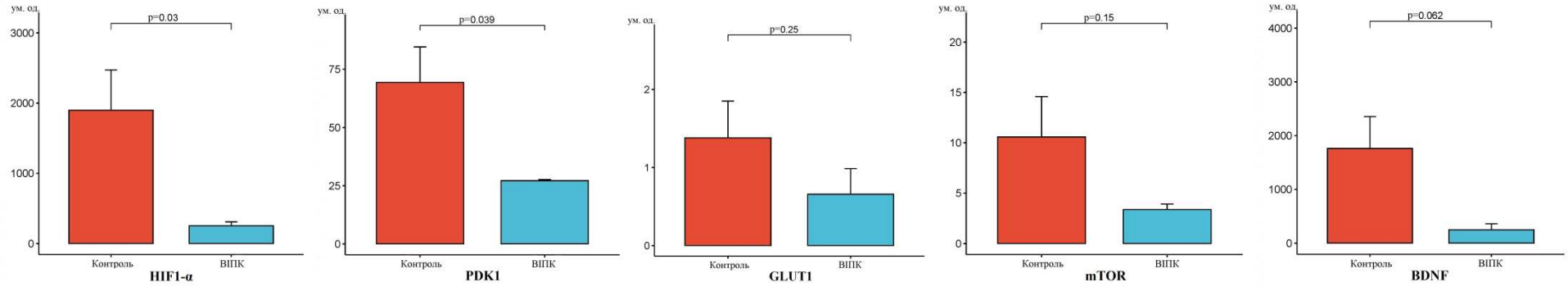
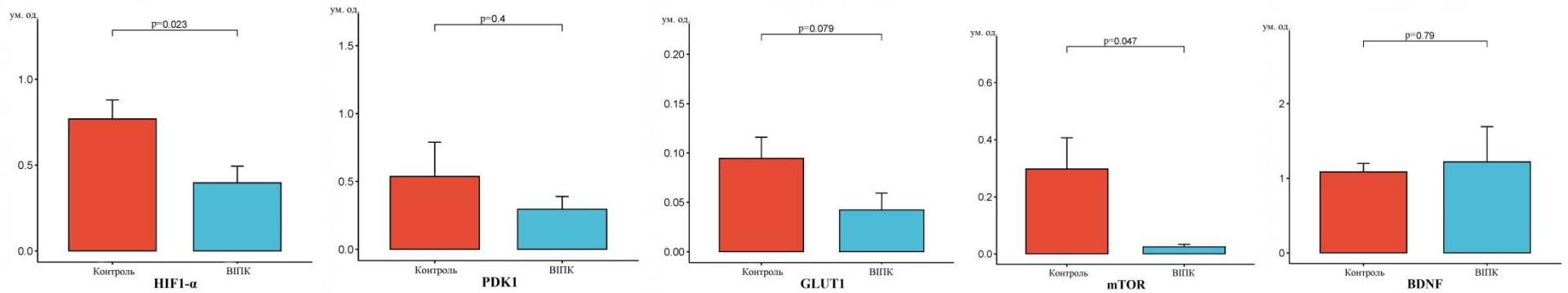
А**Б**

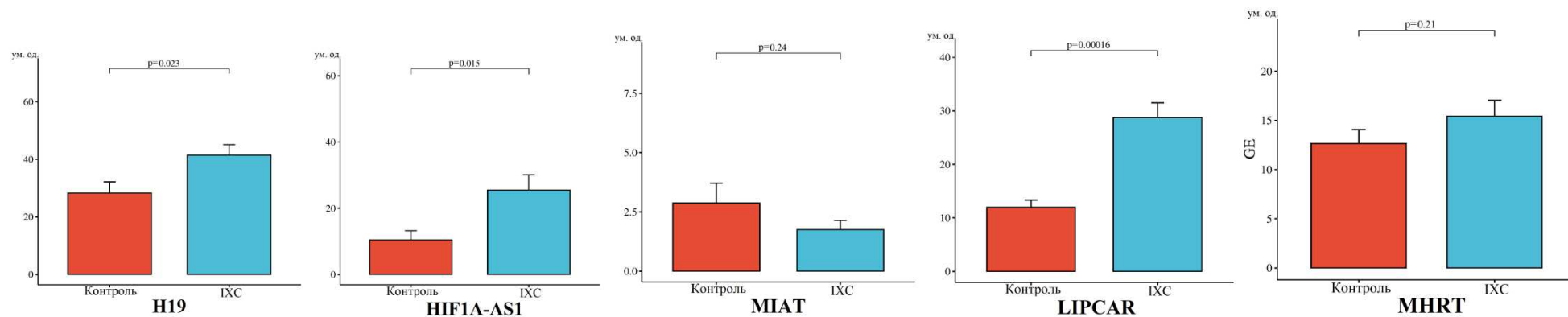
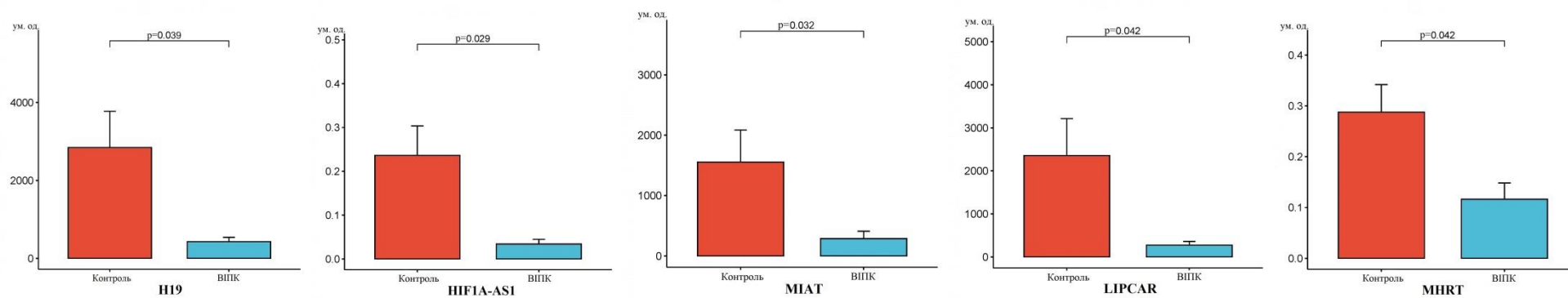
Рис. 3.4.1. Рівень відносної експресії HIF-1α, PDK1, GLUT1, mTOR та BDNF у міокарді (А) та лейкоцитах (Б) після ВІПК при ізольованому коронарному шунтуванні у пацієнтів з ішемічною хворобою серця. Достовірні відмінності між показниками при $p < 0,05$.

Зміна експресії генів мішеней HIF-1 α , PDK1 та GLUT1 у сторону зменшення, скоріше за все пов'язана із зниженням експресії HIF-1 α у пацієнтів, яким проводили процедуру ВІПК. Як показують результати, можливим механізмом цих змін можуть бути знижені експресії генів mTOR та BDNF, які в свою чергу посилюють експресію HIF-1 α .

3.4.3. Зміни експресії lncRNAs H19, HIF1A-AS1, MIAT, LIPCAR та MHRT у пацієнтів з ішемічною хворобою серця за умов віддаленого ішемічного прекондиціонування

Була проаналізована експресія lncRNAs H19, HIF1A-AS1, MIAT, LIPCAR та MHRT у плазмі пацієнтів із ішемічною хворобою серця, в анамнезі яких був інфаркт міокарда, та здорових людей (контрольна група). Крім того, визначена експресія lncRNAs H19, HIF1A-AS1, MIAT, LIPCAR та MHRT у міокарді, фракції лейкоцитів та плазмі пацієнтів із ішемічною хворобою серця у пацієнтів із ішемічною хворобою серця (ІХС), яким проводилася процедура ВІПК перед операцією ізольованого аортокоронарного шунтування на працюючому серці. Результати досліджень наведені на Рис. 3.4.2.

Як показують результати дослідження, у пацієнтів із ішемічною хворобою серця в плазмі крові достовірно вище рівень експресії lncRNAs H19, HIF1A-AS1 та LIPCAR. Рівень експресії lncRNA H19 у пацієнтів з ІХС зростає на 52,32%, а lncRNAs HIF1A-AS1 та LIPCAR — у 2,44 і 1,96 разів відповідно. Зміни рівнів експресії lncRNAs H19, HIF1A-AS1, MIAT, LIPCAR та MHRT у міокарді пацієнтів за умов ВІПК мають такий же напрямок, як і у плазмі. При цьому зворотна картина спостерігається в лейкоцитах. На відміну від міокарда та плазми крові, в лейкоцитах рівень експресії lncRNAs H19, HIF1A-AS1, MIAT, LIPCAR та MHRT збільшується у групі пацієнтів із ВІПК.

A**Б**

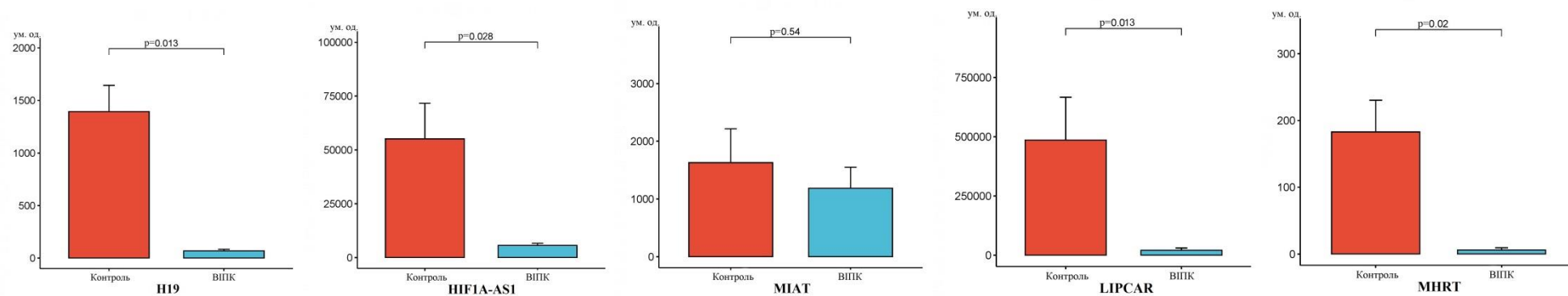
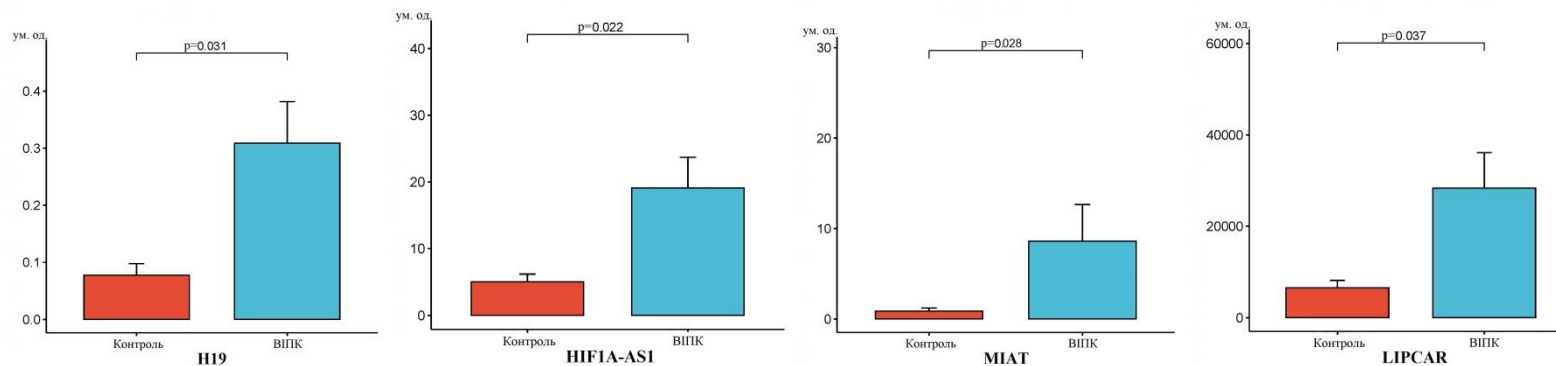
В**Г**

Рис. 3.4.2. Рівень відносної експресії lncRNAs H19, HIF1A-AS1, MIAT, LIPCAR та MHRT у плазмі пацієнтів із ішемічною хворобою серця та здорових людей (А), у міокарді (Б), плазмі (В) та лейкоцитах (Г) пацієнтів із ішемічною хворобою серця при ВІПК. Достовірні відмінності між показниками при $p < 0,05$.

Рівень експресії lncRNA H19 у міокарді за умови ВІПК достовірно зменшується у 6,7 разів, а у плазмі крові — в 20,5 разів ($p < 0,05$). В лейкоцитах експресія lncRNA H19 за ВІПК збільшується більше, ніж у 3 рази ($p < 0,05$). Експресія lncRNA HIF1A-AS1 за умови ВІПК у міокарді зменшується у 6,95 разів ($p < 0,05$), у плазмі крові — в 9,79 разів ($p < 0,05$), а в лейкоцитах за умов ВІПК збільшується у 3,8 разів ($p < 0,05$). Достовірне зменшення експресії у 5,42 разів за ВІПК у міокарді також спостерігали для lncRNA MIAT. За ВІПК рівень експресії lncRNA MIAT у плазмі крові знижується на 27,15%, проте така зміна не є достовірною ($p > 0,05$). Як і у випадку з lncRNAs H19, HIF1A-AS1, експресія lncRNA MIAT в лейкоцитах пацієнтів із групи ВІПК збільшується у 9,89 разів ($p < 0,05$). Рівень експресії мітохондріальної lncRNA LIPCAR за умови ВІПК у міокарді зменшується у 8,65 разів, ($p < 0,05$), у плазмі крові — в 23,61 разів ($p < 0,05$), а в лейкоцитах за умов ВІПК збільшується у 4,34 разів ($p < 0,05$). Експресія lncRNA MHRT у міокарді за умови ВІПК достовірно зменшується у 2,5 разів ($p < 0,05$). Зниження вмісту lncRNA MHRT у плазмі за умови ВІПК більш істотне і сягає більше, ніж у 15 разів ($p < 0,05$). В лейкоцитах експресію lncRNA MHRT не спостерігали.

3.4.4. LncRNA H19 як потенційний маркер підвищеного ризику смерті

Експресія lncRNAs 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. Це пацієнти, в анамнезі яких різні хронічні захворювання — артеріальна гіпертензія, ішемічна хвороба серця, епізоди інфаркту міокарда, захворювання периферичних артерій та гострі порушення мозкового кровообігу. За 14 років спостережень 193 пацієнта померло. Нами було визначено експресію lncRNAs H19, HIF1A-AS1, MIAT, LIPCAR та MHRT у плазмі крові пацієнтів, яка була відібрана на початку дослідження з метою встановити можливі кореляційні зв'язки між експресією конкретних lncRNAs та ризиком смерті.

Попередньо ампліфікацію здійснювали на 55 випадково відібраних зразках з метою обрати лише ті lncRNAs, рівень ампліфікації яких не перевищує 30 Ct мінімум у 40% зразків. Цим критерієм відповідала лише lncRNA H19, експресія якої далі була визначена в усіх зразках. У померлих пацієнтів (193 особи) експресія lncRNA H19 була вищою. Більше того, серед цієї групи пацієнтів частіше були чоловіки, а також пацієнти із ішемічною хворобою серця, інфарктом міокарда, цукровим діабетом та ішемічним ушкодженням мозку (за даними МРТ-досліджень). Базові (вихідні) характеристики усіх 361 пацієнта, включно із рівнем експресії lncRNA H19 наведені у таблиці 3.4.2.

Таблиця 3.4.2.

Базові характеристики залучених пацієнтів, які за 14 років досліджень досягли та не досягли кінцевого пункту дослідження (смерть з будь-якої причини).

Достовірні відмінності між показниками при $p < 0,05$.

Параметр	Живі пацієнти (n=168)	Померлі пацієнти (n=193)	p
Жіноча стать	114 (67,9%)	107 (55,4%)	0,017
Ішемічна хвороба серця	34 (20,7%)	65 (33,9%)	0,008
Інфаркт міокарда	8 (4,9%)	32 (16,7%)	<0,001
Цукровий діабет	21 (12,8%)	51 (26,6%)	0,001
Артеріальна гіпертензія	120 (73,6%)	127 (69,0%)	0,406
Хвороба периферичних артерій	14 (8,6%)	31 (16,2%)	0,037
Ішемічне ушкодження мозку	14 (8,5%)	25 (13,0%)	0,233
H19 ($\Delta\Delta Ct$)	$1,2 \times 10^{-4}$ у.о.	$1,5 \times 10^{-4}$ у.о.	0,028

Визначені порогові значення для експресії lncRNA H19 становили $1,3 \times 10^{-4}$ у.о. за індексом Юдена. Після розділення популяції за цим порогом, графік Каплана-Мейера показав, що пацієнти з вищим рівнем циркулюючої lncRNA H19 мали значно знижену виживаність (медіана виживання: 10,3 роки, міжквартильний розмах (IQR) [6,5–12,3] проти 11,7 років, IQR [8,9–12,9], Рис 3.4.3. Загалом, суб'єкти з вищим рівнем H19 мали на 36,3% збільшений ризик смерті протягом 14 років спостереження.

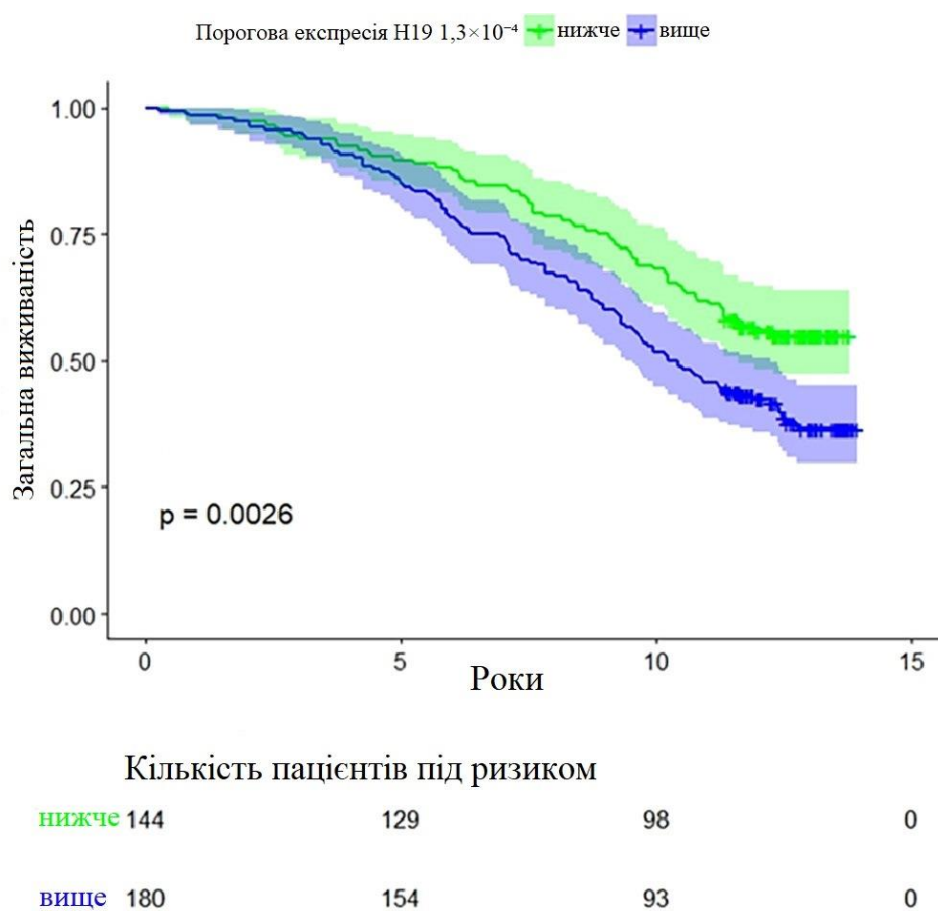


Рис. 3.4.3. Графік Каплана-Мейера. Суб'єкти класифіковані згідно з порогом H19, визначеним за індексом Юдена.

Модель регресії з пропорційними ризиками Кокса показала, що lncRNA H19 є незалежним предиктором смертності (Рис. 3.4.4.). Варто відзначити, що ця модель включала стать, ішемічну хворобу серця, цукровий діабет, скориговані (по відношенню до інших змінних) та не скориговані значення експресії lncRNA H19.

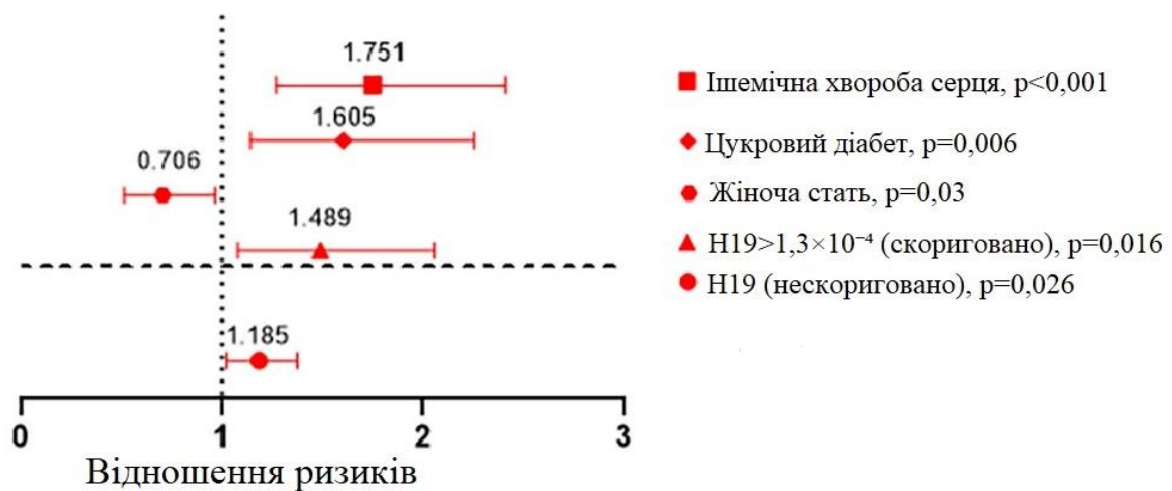


Рис. 3.4.4. Лісовий графік регресії з пропорційними ризиками Кокса. Значущі предиктори виділені червоними смугами.

Як видно на графіку, ризик смерті у осіб похилого віку зростає у 1,489 раза за умов експресії lncRNA H19 вище порогового значення.

Результати, представлені в цьому розділі, опубліковано у наукових працях автора:

1. **М. Khetsuriani**, N. O. Ioffe, T. I. Drevytska, V. O. Niekrasova, V. E. Dosenko. MHRТ expression during remote ischemic preconditioning in patients with coronary artery disease. *Biopolymers and Cell*, Volume 37, pp 270-277.
2. **Хецуріані, М.**, Іоффе, Н. О., Руденко, М. Л., Древицька, Т. І., & Досенко, В. Є. (2020). Вплив віддаленого ішемічного прекодиціонування на експресію довгої некодууючої РНК H19 та фактору, що індукується гіпоксією HIF-1α, при ізольованому коронарному шунтуванні у пацієнтів з ішемічною хворобою серця. *Український журнал серцево-судинної хірургії*, (3 (40), 49-54.

3. Lapikova-Bryhinska T, Ministrini S, Puspitasari YM, Kraler S, Mohamed SA, Costantino S, Paneni F, **Khetsuriani M**, Bengs S, Liberale L, Montecuccio 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.
4. 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.
5. **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.

РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Пошук нових молекулярних механізмів регуляції фізіологічних та патологічних процесів серцево-судинної системи — актуальне завдання сучасної науки. Численні дослідження, а також і наші експерименти показують, що чільне місце у цьому займають довгі некодуючі РНК [27]. Досліди на первинній культурі кардіоміоцитів неонатальних щурів демонструють, що аноксія-реоксигенація суттєво впливає на експресію вибраних lncRNAs H19, TUG1, MIAT та GAS5 [125]. Такі зміни (що подекуди сягають десятки разів) вказують на можливу їх участь у реалізації патологічних змін у міокарді. Було повідомлено кардіопротективну роль lncRNA H19, яка пригнічує гіпертрофію міокарда, утворюючи молекулярну пастку для miR-145 [126]. Gong та співавт. [127] показали, що lncRNA H19 захищає кардіоміоцити під час гіпоксичного ушкодження. Вони запропонували молекулярний механізм кардіопротекції через активацію lncRNA H19 сигнальних шляхів PI3K/AKT та ERK/p38, що мають важливе значення у захисті клітин міокарда від ішемічного ушкодження. Інші дослідники довели, що надекспресія H19 пригнічує апоптоз кардіоміоцитів неонатальних щурів [128]. Ці дані цілком узгоджуються із результатами, які були отримані нами, оскільки рівень експресії lncRNA H19 у нас знижувався при аноксії-реоксигенації.

Зниження експресії lncRNA H19 ми також спостерігали при моделюваннях інфаркту та ішемії-реперфузії міокарду, причому це стосувалося як міокарду, так і плазми крові щурів [125, 129]. Експерименти з мишами показали, що H19 має кардіопротективну функцію під час інфаркту міокарда. Здійснюється це шляхом активації аутофагії через підвищення співвідношення LC3-II/I та експресії Beclin-1 і ATG-7 [130].

Слід зазначити, що кардіопротективні властивості H19 залишаються предметом обговорення. Ця довга некодуюча РНК може бути залучена у різні шляхи, і кожний конкретний випадок потребує глибокого вивчення. Наприклад, у

дослідженні Тао Н та ін., було запропоновано молекулярний механізм, за яким lncRNA H19 сприяє розвитку фіброзу в тканинах серця [131]. У дослідженні Choong OK та ін., було показано, що H19 може утворювати нуклеопротейновий комплекс з Y-бокс-зв'язуючим білком (YB-1) в умовах гіпоксії, що викликає фіброз і ремоделювання серця після інфаркту [132].

Цікаво, що зниження експресії lncRNA H19 у культурі кардіоміоцитів неонатальних щурів ми спостерігали, попри збільшення експресії мРНК HIF-1 α . Відомо, що HIF-1 α є транскрипційним фактором і для lncRNA H19, адже ген H19 у промоторній зоні містить ділянки, що зв'язуються із HIF-1 α — HREs (Hypoxia Responsive Elements) [133-136]. Така зміна експресії lncRNA H19 при аноксії може вказувати на те, що ця некодуєча РНК за умов нестачі кисню при нашій моделі регулюється через інші шляхи. Натомість за умов нормоксії, при додаванні до культури клітин інгібітора HIF-проліл гідроксилази ми спостерігали підвищення експресії як мРНК HIF-1 α , так і H19. Вважаємо, що така зміна експресії пов'язана зі стабілізацією фактора, що індукується гіпоксією, HIF-1 α [137, 138].

В оглядовій статті Reinier A. Boon та співавт. вказують на багатогранні функціональні можливості lncRNA H19 [139]. В залежності від умов зовнішнього середовища, а також молекулярного (а частіше транскриптомного) контексту, lncRNA H19 може бути залучена до реалізації різних сигнальних шляхів. Таким чином, автори вказують, що для серцево-судинної системи lncRNA H19 може бути як кардіопротективним, так і пропатологічним чинником [140-147]. Зважаючи на значне зниження рівня H19 у нашій моделі інфаркту міокарда, ми припускаємо, що надекспресія H19 (як варіант РНК-терапії) може покращити гемодинамічні показники тварин, а також знизити рівень постінфарктного фіброзу.

Для TUG1 показано, що ця lncRNA бере участь у реалізації ішемічного ушкодження міокарда через утворення молекулярної пастки для miR-132 [148]. У наших дослідженнях експресія lncRNA TUG1 достовірно збільшується більш ніж

у 2 рази у щурів з інфарктом міокарда та майже у 22 рази в міокарді після ішемії-реперфузії. Ми вважаємо, що до регуляції експресії TUG1 також може бути залучений транскрипційний фактор, що індукується гіпоксією (HIF-1 α). Це припущення вимагає подальших досліджень із встановлення такої ролі для HIF-1 α . Відомо, що він може зв'язуватися із промоторними ділянками гена lncRNA TUG1, посилюючи експресію останнього [149]. Показано, що TUG1 утворює нуклеопротейновий комплекс з білком FUS (fused in sarcoma), котрий залучений до регенерації серцевого м'яза після інфаркту міокарда [150]. Крім того, встановлено, що lncRNA TUG1 виступає як молекулярна пастка для мікроРНК 29-3р та miR-34a, що призводить до гіпертрофії серцевого м'яза [151, 152].

У нашому дослідженні достовірне збільшення експресії TUG1 показано тільки для міокарда після ішемії-реперфузії. При короткій аноксії-реоксигенації вона навпаки суттєво зменшується, але після довгої аноксії-реоксигенації — зростає. Така невідповідність між експресією lncRNA TUG1 у первинній культурі кардіоміоцитів та міокарді дорослих щурів імовірно спричинена декількома факторами. По-перше, це поліфункціональність lncRNAs. Одна й та сама lncRNA може бути задіяна до різних молекулярних механізмів, як-то молекулярні пастки для мікроРНК, утворення комплексів із білками, та навіть формування триплексів із промоторними ділянками ДНК [27, 31, 35, 42, 43]. Друга можлива причина полягає у різному профілі експресії кардіоміоцитів неонатальних та дорослих щурів [153].

Досить неоднозначні результати нами були отримані стосовно експресії lncRNA GAS5. Достовірне зниження відносної експресії ми спостерігали лише після короткої та довгої аноксії-реоксигенації. Стосовно ролі цієї lncRNA точаться дискусії, оскільки різні групи дослідників дійшли до діаметрально різних висновків. Наприклад, у праці Du та співавт. [154] показано, що пригнічення експресії GAS5 знижує рівень апоптозу та захищає кардіоміоцити від загибелі, спричиненою гіпоксією. Водночас дані Нао та співавт. вказують на зворотне — про зменшення апоптозу кардіоміоцитів [155]. Цікаво, що і перше, і друге

твердження можуть бути цілком правдивими, враховуючи згадану поліфункціональність, а також інтерактом lncRNAs. Цілком імовірно, що GAS5 може бути конкурентною ендегенною некодуючою РНК, яка залучена до регуляції трансляції мРНК. Імовірно, що залежно від різних умов (наприклад, ішемічне ушкодження), а також наявності інших РНК (з якими GAS5 може взаємодіяти або конкурувати за сайти зв'язування із мікроРНК) це призводить до різних (інколи і діаметрально протилежних) наслідків.

Наразі lncRNA MIAT розглядають як потенційний маркер серцево-судинних патологій, зокрема інфаркту міокарда [156-162]. У нашому дослідженні рівень її експресії знижується після короткої, але стрімко зростає після довгої аноксії-реоксигенації, хоча відмінності відносно експресії у нормоксичних кардіоміоцитів є недостовірними. Ми припускаємо, що інші режими аноксії-реоксигенації із більш ушкоджуючим впливом на кардіоміоцити могли б призвести до істотнішого зростання MIAT. Цікавим є той факт, що коротка аноксія-реоксигенація спричиняє зниження експресії MIAT, а зростання вже спостерігається при довгій аноксії-реоксигенації. Це спонукає нас до проведення наступних експериментів із визначенням рівня експресії MIAT у плазмі щурів на різних етапах реперфузії.

Визначення експресії lncRNAs у біологічному матеріалі пацієнтів дозволяють нам припустити, що деякі з цих молекул є потенційними маркерами не тільки серцево-судинних захворювань, але і підвищеного ризику смерті. Так, у плазмі крові людей із ішемічною хворобою серця спостерігається підвищення вмісту lncRNAs H19, LIPCAR та HIF1A-AS1. При цьому у пацієнтів із ІХС експресія цих lncRNAs, а також lncRNAs MIAT та MHRТ знижується при ВІПК як у міокарді, так і плазмі крові. Відзначимо, що ВІПК — явище, завдяки якому короткі періоди ішемії, що супроводжуються реперфузією тканин, забезпечують подальший захист міокарду від пошкодження, спричиненого ішемією [163-166]. За більше ніж 30 років досліджень запропоновано чимало молекулярних механізмів, що лежать в основі ВІПК. Зокрема, ідентифіковано ряд молекулярних медіаторів гіпоксії, яка є центральним компонентом ішемії. Домінуючу роль у

координації транскрипційної регуляції при гіпоксичних станах відіграють фактори, що індуюються гіпоксією (HIF - hypoxia inducible factors). Транскрипційний фактор HIF-1 є однією із центральних молекул, чутливої до кисню, яка чинить протективну дію у відповідь на гіпоксію [167, 168].

Варто відзначити, що після ВІПК ми спостерігали і зниження рівня HIF-1 α . Це було для нас неочікувано, адже ми розраховували, що таке навантаження, як ВІПК, призведе до збільшення експресії HIF-1 α . У більшості опублікованих робіт йдеться про протективний ефект ВІПК у пізню фазу, яка настає через 12 годин після процедури, і може тривати до 72 годин [167, 169, 170]. Збільшення експресії HIF-1 α також пов'язують саме з пізньою фазою ішемічного прекодиціонування, а не ранньою, як у нашому дослідженні (забір крові через 20 хв після ВІПК та взяття біоптату міокарда протягом оперативного втручання). Проте є декілька досліджень, які показують, що експресія HIF-1 α може збільшуватися одразу після ішемічного прекодиціонування [171, 172]. Зокрема, у роботі *Eckle et al.* було показано, що рівень HIF-1 α у тканинах серця мишей суттєво зростає впродовж 30 хвилин після ішемічного прекодиціонування [173]. Такі дослідження на людях ще не проводилися, тому ми припускаємо, що на ранній фазі ВІПК цілком можливе зниження рівня експресії мРНК HIF-1 α . Можливо це пов'язано зі стабілізацією білка HIF-1 α та тимчасовою реорганізацією транскрипційної активності клітин міокарду. Отримати відповіді на ці запитання ми плануємо в подальших дослідженнях на наших клінічних зразках.

У групі пацієнтів із ВІПК ми спостерігали зниження рівня експресії у міокарді усіх обраних нами lncRNAs — H19, HIF1A-AS1, MIAT, LIPCAR та MHRT. Цікаво, що на фоні покращення гемодинамічних показників знижується рівень експресії H19, чого ми не помічали у дослідженнях на культурі клітин та тваринах. Імовірно, що така картина експресії пов'язана зі згаданою багатогранними функціональними можливостями lncRNA H19 [139]. Ряд досліджень показують, що lncRNA H19 є потенційним маркером серцево-судинних захворювань у людей [174]. Наші дослідження показують, що

підвищена експресія lncRNA H19 може вказувати і на підвищений ризик смерті у людей похилого віку [175].

Деякі дослідження показують, що на роль біомаркера серцево-судинних захворювань претендує і lncRNA HIF1A-AS1. На культурах клітин кардіоміоцитів людей показано, що рівень HIF1A-AS1 збільшується за умов оксидативного стресу [8]. HIF1A-AS1 є молекулярною пасткою для мікроРНК-204. Встановлено, що збільшення експресії HIF1A-AS1 (та її взаємодія із мікроРНК-204) призводить до ремоделювання серцевих шлуночків при ішемії/реперфузії [176]. Крім того, показана проапоптотична та прозапальна роль HIF1A-AS1 у міокарді [177]. Тому зниження рівня її експресії у пацієнтів, яким проводили ВІПК, опосередковано вказує на протективну роль цієї процедури.

Потенційними маркерами серцево-судинних захворювань також вважаються lncRNAs LIPCAR та MIAT. До прикладу, встановлено, що збільшення експресії lncRNA LIPCAR корелює із розвитком серцевої недостатності та ремоделюванням міокарда [178-181]. LncRNA MIAT задіяна до низки сигнальних шляхів, що лежать в основі патологічних процесів у серцево-судинній системі [156-162]. Таким чином, зниження рівня експресії lncRNAs LIPCAR та MIAT у міокарді за умов ВІПК, як і у випадку з H19 та HIF1A-AS1, також опосередковано вказує на захисну роль ішемічного прекодиціонування для міокарда.

За умови ВІПК також ми спостерігали зниження експресії lncRNA MHRT. У низці досліджень повідомляють, що MHRT може бути біомаркером, пов'язаним із серцевою гіпертрофією та серцевою недостатністю [182, 183]. З іншого боку, Hang CT та співавт. показали, що розвиток серцевої гіпертрофії у мишей пов'язаний з активацією хроматинового репресорного комплексу Brg1-Hdac-Parp, який пригнічує експресію MHRT [184]. Наше дослідження показує, що рівень експресії MHRT у міокарді пацієнтів RIPC приблизно в 2,5 рази нижчий, ніж у групі з удаваною операцією. Це ще одне непряме підтвердження захисного ефекту RIPC. Ми припускаємо, що зниження експресії MHRT у пацієнтів RIPC може

бути пов'язане зі зниженням оксидативного стресу. Відомо, що RIPС захищає від оксидативного стресу [185]. Yildirim F та співавт. показали зниження рівня вільних кисневих радикалів у зразках крові пацієнтів, яким проводили процедуру ВІПК перед операцією коронарного шунтування [186]. Деякі дослідження на культурах клітин та тваринах показують, що збільшення експресії lncRNA MHRT відбувається на фоні оксидативного стресу, і що MHRT задіяна до захисних механізмів від вільних кисневих радикалів [187, 188]. Таким чином, ми вважаємо, що зниження рівня експресії lncRNA MHRT може бути пов'язане зі зниженням оксидативного стресу на фоні ВІПК.

Цікаво, що майже таку ж картину змін експресії lncRNAs H19, HIF1A-AS1, MIAT, LIPCAR та MHRT ми спостерігали в плазмі крові (окрім lncRNA MIAT, зміни експресії якої були недостовірні). Це може вказувати на те, що ці lncRNAs можуть розглядатися як потенційні біомаркери серцево-судинних захворювань. При цьому рівень експресії lncRNAs H19, HIF1A-AS1, MIAT та LIPCAR у лейкоцитах достовірно збільшується у пацієнтів із групи ВІПК. Імовірно, така зміна експресії пов'язана із тим, що для циркулюючих лейкоцитів процедура ВІПК є ушкоджуючим чинником (на відміну від міокарда), що і призводить до збільшення експресії вказаних lncRNAs.

Ще одна особливість дослідження у тому, що в міокарді зменшення рівня експресії lncRNAs не таке істотне, як у плазмі крові. Ми вважаємо, що це може бути пов'язане із транспортом lncRNAs в екзосомах. До прикладу, встановлено, що ВІПК пригнічує активність екзоцитозу [189]. До того ж, згідно із даними бази Deep Base V.3.0, високий рівень експресії lncRNAs H19, HIF1A-AS1 та MIAT показаний в екзосомах, виділених із плазми крові [101-103].

Узагальнена схема результатів дисертаційного дослідження наведена на рисунку 4.1.

ВИСНОВКИ

Дисертація присвячена вивченню рівня експресії довгих некодуючих РНК H19, TUG1, MIAT, GAS5, HIF1A-AS1, LIPCAR та MHRT при ішемічному ушкодженні серця. Рівень експресії згаданих молекул визначався у первинній культурі кардіоміоцитів неонатальних щурів за умов аноксії/реоксигенації, у міокарді та плазмі крові дорослих щурів при моделюванні інфаркту міокарда та ішемії/реперфузії серця. Також, визначали рівень експресії довгих некодуючих РНК у плазмі крові пацієнтів із ішемічною хворобою серця, та у міокарді, плазмі крові, лейкоцитах пацієнтів при проведенні віддаленого ішемічного прекондиціонування перед проведенням операції ізольованого коронарного шунтування, а також у плазмі крові осіб похилого віку. З огляду на поставлену мету, сформульовані завдання та отримані результати, дійшли наступних висновків:

1. Аноксія/реоксигенація культури кардіоміоцитів неонатальних щурів призводить до достовірного зниження рівня експресії довгих некодуючих РНК H19, TUG1 та GAS5. Виявлено суттєве зниження рівню експресії довгої некодуючої РНК MIAT за умов короткої аноксії/реоксигенації, тоді як за умов довгої аноксії/реоксигенації її рівень підвищується більше ніж у 3 рази, порівняно з контрольними зразками.
2. За умов нормоксії, при додаванні до культури кардіоміоцитів неонатальних щурів інгібітора HIF-проліл гідроксилази збільшується рівень експресії мРНК HIF-1 α . При цьому збільшується і експресія H19 та TUG1 — довгих некодуючих РНК, що містять сайти зв'язування із HIF-1 α у промоторних ділянках генів. Це вказує на імовірну регуляторну роль HIF-1 α за умов нормоксії, проте не за умов аноксії/реоксигенації.
3. При моделюванні інфаркту міокарда у дорослих щурів знижується експресія довгої некодуючої РНК H19, тоді як рівень експресії TUG1 та MIAT — збільшується у міокарді щурів. Також, виявлено і у плазмі крові

щурів при інфаркті міокарда зниження рівня експресії довгої некодуючої РНК H19 та підвищення рівня MIAT. Таким чином, 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.

4. Кореляційний аналіз між експресією довгих некодуючих РНК та кардіогемодинамічними показниками вказує на позитивну кореляцію між H19 та такими параметрами як dp/dT_{max} , кінцево-сistolічний тиск, ізоволюмічна константа розслаблення та максимальна потужність із урахуванням переднавантаження. Для TUG1 показана позитивна кореляція із кінцево-діастолічним об'ємом, ударною роботою, хвилинним об'ємом крові, кінцево-сistolічним об'ємом, кінцево-діастолічним тиском та ударним об'ємом. Довга некодуюча РНК MIAT корелює із кінцево-сistolічним об'ємом, кінцево-діастолічним об'ємом, а також ударною роботою. Що стосується довгої некодуючої РНК GAS5, її експресія корелює тільки із кінцево-діастолічним тиском.
5. За умов ішемії/реперфузії серця знижується рівень експресії довгої некодуючої РНК H19 у міокарді щурів, тоді як рівень експресії TUG1 – підвищується. У плазмі крові щурів за таких же умов, виявлено достовірне збільшення тільки рівню експресії довгої некодуючої РНК MIAT.
6. У пацієнтів з ішемічною хворобою серця виявлено підвищений рівень експресії довгих некодуючих РНК H19, HIF1A-AS1 та LIPCAR. Це дозволяє розглядати вказані молекули як потенційні біомаркери серцево-судинних захворювань.
7. Віддалене ішемічне прекодиціонування позитивно впливає на гемодинамічні показники пацієнтів із ішемічною хворобою серця під час проведення операції із ізольованого коронарного шунтування. Разом з тим у пацієнтів, яким проводили процедуру віддаленого ішемічного прекодиціонування спостерігається зниження експресії довгих некодуючих РНК H19, HIF1A-AS1, MIAT, LIPCAR та MHRT у міокарді та

плазмі крові. При цьому підвищується рівень експресії довгих некодуючих РНК H19, HIF1A-AS1, MIAT та LIPCAR у лейкоцитах.

8. Доведено, що у людей похилого віку збільшення рівня експресії довгої некодуючої РНК H19 пов'язане із підвищеним ризиком смерті.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Mc Namara K, Alzubaidi H, Jackson JK. Cardiovascular disease as a leading cause of death: how are pharmacists getting involved? *Integr Pharm Res Pract.* 2019 Feb 4;8:1-11.
2. Savla JJ, Levine BD, Sadek HA. The Effect of Hypoxia on Cardiovascular Disease: Friend or Foe? *High Alt Med Biol.* 2018 Jun;19(2):124-130.
3. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease. *Annu Rev Physiol.* 2014;76:39-56.
4. Barth DA, Prinz F, Teppan J, Jonas K, Klec C, Pichler M. Long-Noncoding RNA (lncRNA) in the Regulation of Hypoxia-Inducible Factor (HIF) in Cancer. *Noncoding RNA.* 2020 Jul 6;6(3):27.
5. Jarroux J, Morillon A, Pinskaya M. History, Discovery, and Classification of lncRNAs. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1008:1-46.
6. Uchida T, Rossignol F, Matthay MA, Mounier R, Couette S, Clottes E, Clerici C. Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1 α . *J Biol Chem.* 2004 Apr 9;279(15):14871-8.
7. Mounier R, Pialoux V, Schmitt L, Richalet JP, Robach P, Coudert J, Clottes E, Fellmann N. Effects of acute hypoxia tests on blood markers in high-level endurance athletes. *Eur J Appl Physiol.* 2009 Jul;106(5):713-20.
8. Acun A, Zorlutuna P. Engineered myocardium model to study the roles of HIF-1 α and HIF1A-AS1 in paracrine-only signaling under pathological level oxidative stress. *Acta Biomater.* 2017 Aug;58:323-336.
9. Son SW, Yun BD, Song MG, Lee JK, Choi SY, Kuh HJ, Park JK. The Hypoxia-Long Noncoding RNA Interaction in Solid Cancers. *Int J Mol Sci.* 2021 Jul 6;22(14):7261.
10. ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature.* 2012 Sep 6;489(7414):57-74. doi: 10.1038/nature11247. PMID: 22955616; PMCID: PMC3439153.

- 11.Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001 Feb 15;409(6822):860-921.
- 12.Comings DE. The structure and function of chromatin. *Adv Hum Genet*. 1972;3:237-431.
- 13.Oo JA, Brandes RP, Leisegang MS. Long non-coding RNAs: novel regulators of cellular physiology and function. *Pflugers Arch*. 2022 Feb;474(2):191-204. doi: 10.1007/s00424-021-02641-z. Epub 2021 Nov 18. PMID: 34791525; PMCID: PMC8766390.
- 14.Lee H, Zhang Z, Krause HM. Long noncoding RNAs and repetitive elements: junk or intimate evolutionary partners? *Trends Genet*. 2019;35:892–902. doi: 10.1016/j.tig.2019.09.006.
- 15.Statello L, Guo C-J, Chen L-L, Huarte M. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021;22:96–118. doi: 10.1038/s41580-020-00315-9.
- 16.Amort T, Soulière MF, Wille A, Jia XY, Fiegl H, Wörle H, et al. Long non-coding RNAs as targets for cytosine methylation. *RNA Biol*. 2013 Jun;10(6):1003-8.
- 17.Yoon JH, Abdelmohsen K, Gorospe M. Posttranscriptional gene regulation by long noncoding RNA. *J Mol Biol*. 2013 Oct 9;425(19):3723-30.
- 18.Gong Y, He J, Li B, Xiao Y, Zeng Q, Xu K, et al. Integrated analysis of lncRNA and mRNA in subcutaneous adipose tissue of Ningxiang pig. *Biology*. 2021;10:726. doi: 10.3390/biology10080726.
19. Song F, Wang L, Zhu W, Dong Z. Long noncoding RNA and mRNA expression profiles following igf3 knockdown in common carp, *Cyprinus carpio*. *Sci Data*. 2019;6:190024. doi: 10.1038/sdata.2019.24.
20. Jiang L, Yang Q, Yu J, Liu X, Cai Y, Niu L, et al. Identification and expression analysis of lncRNA in seven organs of *Rhinopithecus roxellana*. *Funct Integr Genom*. 2021;21:543–55. doi: 10.1007/s10142-021-00797-6.

21. Derrien T, Johnson R, Bussotti G, et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res.* 2012;22:1775–1789.
22. Guo CJ, Ma XK, Xing YH, Zheng CC, Xu YF, Shan L, et al. Distinct processing of lncRNAs contributes to non-conserved functions in stem cells. *Cell.* 2020;181:621–36.:E22. doi: 10.1016/j.cell.2020.03.006.
23. Quinn JJ, Zhang QC, Georgiev P, Ilik IA, Akhtar A, Chang HY. Rapid evolutionary turnover underlies conserved lncRNA–genome interactions. *Genes Dev.* 2016;30:191–207. doi: 10.1101/gad.272187.115.
24. Clark MB, Amaral PP, Schlesinger FJ, Dinger ME, Taft RJ, Rinn JL, et al. The reality of pervasive transcription. *PLOS Biol.* 2011;9:e1000625. doi: 10.1371/journal.pbio.1000625.
25. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. International Human Genome Sequencing Consortium Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001;409:860–921. doi: 10.1038/35057062.
26. Ma L, Bajic VB, Zhang Z. On the classification of long non-coding RNAs. *RNA Biol.* 2013 Jun;10(6):925-33. doi: 10.4161/rna.24604. Epub 2013 Apr 15. PMID: 23696037; PMCID: PMC4111732.
27. Devaux Y, Zangrando J, Schroen B, Creemers EE, Pedrazzini T, Chang CP, Dorn GW 2nd, Thum T, Heymans S; Cardioline network. Long noncoding RNAs in cardiac development and ageing. *Nat Rev Cardiol.* 2015 Jul;12(7):415-25. doi: 10.1038/nrcardio.2015.55. Epub 2015 Apr 7. PMID: 25855606.
28. Guttman M, Garber M, Levin JZ, Donaghey J, Robinson J, Adiconis X, et al. Ab initio reconstruction of cell type-specific transcriptomes in mouse reveals the conserved multi-exonic structure of lincRNAs. *Nat Biotechnol.* 2010;28:503–10. doi: 10.1038/nbt.1633.
29. Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin MF, Feldser D, et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature.* 2009;458:223–7. doi: 10.1038/nature07672.

30. Cabili MN, Trapnell C, Goff L, Koziol M, Tazon-Vega B, Regev A, et al. Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes Dev.* 2011;25:1915–27. doi: 10.1101/gad.17446611.
31. Pang KC, Frith MC, Mattick JS. Rapid evolution of noncoding RNAs: lack of conservation does not mean lack of function. *Trends Genet.* 2006 Jan;22(1):1-5.
32. Peters AH, Kubicek S, Mechtler K, O'Sullivan RJ, Derijck AA, Perez-Burgos L, et al. Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cell.* 2003 Dec;12(6):1577-89.
33. Czermin B, Melfi R, McCabe D, Seitz V, Imhof A, Pirrotta V. Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell.* 2002 Oct 18;111(2):185-96.
34. Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, Song DY, Pan Q, Watt AT, et al. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol Cell.* 2010 Sep 24;39(6):925-38.
35. Wang K, Liu F, Zhou LY, Long B, Yuan SM, Wang Y, et al. The long noncoding RNA CHRF regulates cardiac hypertrophy by targeting miR-489. *Circ Res.* 2014 Apr 25;114(9):1377-88.
36. Grote P, Wittler L, Hendrix D, Koch F, Währisch S, Beisaw A, et al. The tissue-specific lncRNA Fendrr is an essential regulator of heart and body wall development in the mouse. *Dev Cell.* 2013 Jan 28;24(2):206-14.
37. Li W, Notani D, Ma Q, Tanasa B, Nunez E, Chen AY, et al. Functional roles of enhancer RNAs for oestrogen-dependent transcriptional activation. *Nature.* 2013 Jun 27;498(7455):516-20.
38. Aguilo F, Zhou MM, Walsh MJ. Long noncoding RNA, polycomb, and the ghosts haunting INK4b-ARF-INK4a expression. *Cancer Res.* 2011 Aug 15;71(16):5365-9.
39. Deloukas P, Kanoni S, Willenborg C, Farrall M, Assimes TL, Thompson JR, et al. Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nat Genet.* 2013 Jan;45(1):25-33.

40. da Cunha Agostini L, Almeida TC, da Silva GN. ANRIL, H19 and TUG1: a review about critical long non-coding RNAs in cardiovascular diseases. *Mol Biol Rep*. 2023 Dec 28;51(1):31. doi: 10.1007/s11033-023-09007-x. PMID: 38155319.
41. Ounzain S, Micheletti R, Beckmann T, Schroen B, Alexanian M, Pezzuto I, et al. Genome-wide profiling of the cardiac transcriptome after myocardial infarction identifies novel heart-specific long non-coding RNAs. *Eur Heart J*. 2015 Feb 7;36(6):353-68a.
42. Zhang K, Zhang X, Cai Z, Zhou J, Cao R, Zhao Y, Chen Z, Wang D, Ruan W, Zhao Q, Liu G, Xue Y, Qin Y, Zhou B, Wu L, Nilsen T, Zhou Y, Fu XD. A novel class of microRNA-recognition elements that function only within open reading frames. *Nat Struct Mol Biol*. 2018 Nov;25(11):1019-1027. doi: 10.1038/s41594-018-0136-3. Epub 2018 Oct 8. PMID: 30297778; PMCID: PMC6219929.
43. Lin W, Liu H, Tang Y, Wei Y, Wei W, Zhang L, Chen J. The development and controversy of competitive endogenous RNA hypothesis in non-coding genes. *Mol Cell Biochem*. 2021 Jan;476(1):109-123. doi: 10.1007/s11010-020-03889-2. Epub 2020 Sep 25. PMID: 32975695.
44. Pu M, Chen J, Tao Z, Miao L, Qi X, Wang Y, et al. Regulatory network of miRNA on its target: coordination between transcriptional and post-transcriptional regulation of gene expression. *Cell Mol Life Sci*. 2019 Feb;76(3):441-51
45. Chan JJ, Tay Y. Noncoding RNA:RNA Regulatory Networks in Cancer. *Int J Mol Sci*. 2018 Apr 27;19(5):E1310.
46. Dey BK, Karl P, Anindya D (2014) The H19 long noncoding RNA gives rise to microRNAs miR-675-3p and miR-675-5p to promote skeletal muscle differentiation and regeneration. *Genes Dev* 28(5):491–501.
47. Liang WC, Fu WM, Wang YB, Sun YX, Xu LL, Wong CW, Chan KM, Li G, Waye MY, Zhang JF (2016) H19 activates Wnt signaling and promotes osteoblast differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. *Sci Rep* 6:20121.

48. Romero-Barrios N, Legascue MF, Benhamed M, Ariel F, Crespi M. Splicing regulation by long noncoding RNAs. *Nucleic Acids Res.* 2018 03 16;46(5):2169-84.
49. Yap K, Mukhina S, Zhang G, Tan JSC, Ong HS, Makeyev EV. A short tandem repeat-enriched RNA assembles a nuclear compartment to control alternative splicing and promote cell survival. *Mol Cell.* 2018;72:525–40.:E13. doi: 10.1016/j.molcel.2018.08.041.
50. Lee S, Kopp F, Chang TC, Sataluri A, Chen B, Sivakumar S, et al. Noncoding RNA NORAD regulates genomic stability by sequestering PUMILIO proteins. *Cell.* 2016;164:69–80. doi: 10.1016/j.cell.2015.12.017.
51. Tichon A, Perry RBT, Stojic L, Ulitsky I. SAM68 is required for regulation of Pumilio by the NORAD long noncoding RNA. *Genes Dev.* 2018;32:70–8. doi: 10.1101/gad.309138.117.
52. Amodio N, Raimondi L, Juli G, Stamato MA, Caracciolo D, Tagliaferri P, et al. MALAT1: a druggable long non-coding RNA for targeted anti-cancer approaches. *J Hematol Oncol.* 2018;11:63. doi: 10.1186/s13045-018-0606-4.
53. Bacolla A, Wang G, Vasquez KM. New Perspectives on DNA and RNA Triplexes As Effectors of Biological Activity. *PLoS Genet.* 2015 Dec;11(12):e1005696.
54. Nagano T, Mitchell JA, Sanz LA, Pauler FM, Ferguson-Smith AC, Feil R, et al. The Air noncoding RNA epigenetically silences transcription by targeting G9a to chromatin. *Science.* 2008 Dec 12;322(5908):1717-20.
55. Zhou X, Chen J, Tang W. The molecular mechanism of HOTAIR in tumorigenesis, metastasis, and drug resistance. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2014 Dec;46(12):1011-5.
56. Michalik KM, You X, Manavski Y, Doddaballapur A, Zörnig M, Braun T, et al. Long noncoding RNA MALAT1 regulates endothelial cell function and vessel growth. *Circ Res.* 2014 Apr 25;114(9):1389-97.

57. Porro A, Feuerhahn S, Delafontaine J, Riethman H, Rougemont J, Lingner J. Functional characterization of the TERRA transcriptome at damaged telomeres. *Nat Commun.* 2014 Oct 31;5:5379.
58. Guttman M, Donaghey J, Carey BW, Garber M, Grenier JK, Munson G, et al. lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. *Nature.* 2011 Aug 28;477(7364):295-300.
59. Werber M, Wittler L, Timmermann B, Grote P, Herrmann BG. The tissue-specific transcriptomic landscape of the mid-gestational mouse embryo. *Development.* 2014 Jun;141(11):2325-30.
60. Klattenhoff CA, Scheuermann JC, Surface LE, Bradley RK, Fields PA, Steinhauser ML, et al. Braveheart, a long noncoding RNA required for cardiovascular lineage commitment. *Cell.* 2013 Jan 31;152(3):570-83.
61. Chiapparo G, Lin X, Lescroart F. Mesp1 controls the speed, polarity, and directionality of cardiovascular progenitor migration. *J Cell Biol.* 2016;213(4):463-77.
62. Hou J, Long H, Zhou C, Zheng S, Wu H, Guo T, Wu Q, Zhong T, Wang T. Long noncoding RNA Braveheart promotes cardiogenic differentiation of mesenchymal stem cells in vitro. *Stem Cell Res Ther.* 2017 Jan 17;8(1):4. doi: 10.1186/s13287-016-0454-5. PMID: 28095922; PMCID: PMC5242041.
63. Ounzain S, Micheletti R, Arnan C, Plaisance I, Cecchi D, Schroen B, Reverter F, Alexanian M, Gonzales C, Ng SY, Bussotti G, Pezzuto I, Notredame C, Heymans S, Guigó R, Johnson R, Pedrazzini T. CARMEN, a human super enhancer-associated long noncoding RNA controlling cardiac specification, differentiation and homeostasis. *J Mol Cell Cardiol.* 2015 Dec;89(Pt A):98-112. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.09.016. Epub 2015 Sep 28. PMID: 26423156.
64. Ounzain S, Burdet F, Ibberson M, Pedrazzini T. Discovery and functional characterization of cardiovascular long noncoding RNAs. *J Mol Cell Cardiol.* 2015 Dec;89(Pt A):17-26.

65. Townsend N, Wilson L, Bhatnagar P, Wickramasinghe K, Rayner M, Nichols M. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *Eur Heart J*. 2016 11 7;37(42):3232-45.
66. Broadbent HM, Peden JF, Lorkowski S, Goel A, Ongen H, Green F, et al. Susceptibility to coronary artery disease and diabetes is encoded by distinct, tightly linked SNPs in the ANRIL locus on chromosome 9p. *Hum Mol Genet*. 2008 Mar 15;17(6):806-14.
67. Holdt LM, Hoffmann S, Sass K, Langenberger D, Scholz M, Krohn K, et al. Alu elements in ANRIL non-coding RNA at chromosome 9p21 modulate atherogenic cell functions through trans-regulation of gene networks. *PLoS Genet*. 2013;9(7):e1003588.
68. Vausort M, Wagner DR, Devaux Y. Long noncoding RNAs in patients with acute myocardial infarction. *Circ Res*. 2014 Sep 12;115(7):668-77.
69. Jiao Y, Meng F, Ma G, Lei H, Liu J. An increase in a long noncoding RNA ANRIL in peripheral plasma is an indicator of stable angina. *Clinics (Sao Paulo)*. 2023 Oct 16;78:100289. doi: 10.1016/j.clinsp.2023.100289. PMID: 37852142; PMCID: PMC10585623.
70. Liu ZF, Hu WW, Li R, Gao Y, Yan LL, Su N. Expression of lncRNA-ANRIL in patients with coronary heart disease before and after treatment and its short-term prognosis predictive value. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020 Jan;24(1):376-384. doi: 10.26355/eurrev_202001_19936. PMID: 31957852.
71. Zangrando J, Zhang L, Vausort M, Maskali F, Marie PY, Wagner DR, et al. Identification of candidate long non-coding RNAs in response to myocardial infarction. *BMC Genomics*. 2014 Jun 10;15:460.
72. Wang X, Li Z, Du Y, Xing Y, Guo Y, Zhang Y, Guo R, Gong W, Nie S, Wang X. lncRNA Mirt1: A Critical Regulatory Factor in Chronic Intermittent Hypoxia Exaggerated Post-MI Cardiac Remodeling. *Front Genet*. 2022 Feb 9;13:818823. doi: 10.3389/fgene.2022.818823. PMID: 35222538; PMCID: PMC8864109.
73. Li X, Zhou J, Huang K. Inhibition of the lncRNA Mirt1 Attenuates Acute Myocardial Infarction by Suppressing NF- κ B Activation. *Cell Physiol Biochem*.

- 2017;42(3):1153-1164. doi: 10.1159/000478870. Epub 2017 Jun 30. PMID: 28668956.
74. Zhu F, Li Q, Li J, Li B, Li D. Long noncoding Mirt2 reduces apoptosis to alleviate myocardial infarction through regulation of the miR-764/PDK1 axis. *Lab Invest.* 2021 Feb;101(2):165-176. doi: 10.1038/s41374-020-00504-2. Epub 2020 Nov 17. PMID: 33199822.
75. Xie L, Zhang Q, Mao J, Zhang J, Li L. The Roles of lncRNA in Myocardial Infarction: Molecular Mechanisms, Diagnosis Biomarkers, and Therapeutic Perspectives. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Sep 16;9:680713. doi: 10.3389/fcell.2021.680713. PMID: 34604208; PMCID: PMC8481623.
76. Zhang Y, Sun L, Xuan L, Pan Z, Li K, Liu S, et al. Reciprocal Changes of Circulating Long Non-Coding RNAs ZFAS1 and CDR1AS Predict Acute Myocardial Infarction. *Sci Rep.* 2016 Mar 1;6:22384.
77. Wu T, Wu D, Wu Q, Zou B, Huang X, Cheng X, et al. Knockdown of Long Non-Coding RNA-ZFAS1 Protects Cardiomyocytes Against Acute Myocardial Infarction Via Anti-Apoptosis by Regulating miR-150/CRP. *J Cell Biochem.* 2017 10;118(10):3281-9.
78. Gottlieb RA, Mentzer RM. Autophagy during cardiac stress: joys and frustrations of autophagy. *Annu Rev Physiol.* 2010;72:45-59.
79. Ma X, Liu H, Foyil SR, Godar RJ, Weinheimer CJ, Hill JA, et al. Impaired autophagosome clearance contributes to cardiomyocyte death in ischemia/reperfusion injury. *Circulation.* 2012 Jun 26;125(25):3170-81.
80. Wang K, Liu CY, Zhou LY, Wang JX, Wang M, Zhao B, et al. APF lncRNA regulates autophagy and myocardial infarction by targeting miR-188-3p. *Nat Commun.* 2015 Apr 10;6:6779.
81. Wang K, Liu F, Zhou LY, Long B, Yuan SM, Wang Y, et al. The long noncoding RNA CHRF regulates cardiac hypertrophy by targeting miR-489. *Circ Res.* 2014 Apr 25;114(9):1377-88.

82. Wang Z, Zhang XJ, Ji YX, Zhang P, Deng KQ, Gong J, et al. The long noncoding RNA Chaer defines an epigenetic checkpoint in cardiac hypertrophy. *Nat Med.* 2016 10;22(10):1131-9.
83. Viereck J, Kumarswamy R, Foinquinos A, Xiao K, Avramopoulos P, Kunz M, et al. Long noncoding RNA Chast promotes cardiac remodeling. *Sci Transl Med.* 2016 Feb 17;8(326):326ra22.
84. Taneike M, Yamaguchi O, Nakai A, Hikoso S, Takeda T, Mizote I, et al. Inhibition of autophagy in the heart induces age-related cardiomyopathy. *Autophagy.* 2010 Jul;6(5):600-6.
85. Jiang F, Zhou X, Huang J. Long Non-Coding RNA-ROR Mediates the Reprogramming in Cardiac Hypertrophy. *PLoS One.* 2016 Apr 15;11(4):e0152767. doi: 10.1371/journal.pone.0152767. PMID: 27082978; PMCID: PMC4833345.
86. Carè A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P, et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med.* 2007 May;13(5):613-8.
87. Zhu XH, Yuan YX, Rao SL, Wang P. LncRNA MIAT enhances cardiac hypertrophy partly through sponging miR-150. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016 09;20(17):3653-60.
88. Li Y, Wang J, Sun L, Zhu S. LncRNA myocardial infarction-associated transcript (MIAT) contributed to cardiac hypertrophy by regulating TLR4 via miR-93. *Eur J Pharmacol.* 2018 Jan 5;818:508-17.
89. Ha T, Li Y, Hua F, Ma J, Gao X, Kelley J, et al. Reduced cardiac hypertrophy in toll-like receptor 4-deficient mice following pressure overload. *Cardiovasc Res.* 2005 Nov 1;68(2):224-34.
90. Liu L, An X, Li Z, Song Y, Li L, Zuo S, et al. The H19 long noncoding RNA is a novel negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 2016 07 1;111(1):56-65.
91. Michalik KM, You X, Manavski Y, Doddaballapur A, Zörnig M, Braun T, et al. Long noncoding RNA MALAT1 regulates endothelial cell function and vessel growth. *Circ Res.* 2014 Apr 25;114(9):1389-97.

92. Huang S, Lu W, Ge D, Meng N, Li Y, Su L, et al. A new microRNA signal pathway regulated by long noncoding RNA TGFB2-OT1 in autophagy and inflammation of vascular endothelial cells. *Autophagy*. 2015;11(12):2172-83.
93. Wu G, Cai J, Han Y, Chen J, Huang ZP, Chen C, et al. LincRNA-p21 regulates neointima formation, vascular smooth muscle cell proliferation, apoptosis, and atherosclerosis by enhancing p53 activity. *Circulation*. 2014 Oct 21;130(17):1452-65.
94. Elashoff MR, Wingrove JA, Beineke P, Daniels SE, Tingley WG, Rosenberg S, et al. Development of a blood-based gene expression algorithm for assessment of obstructive coronary artery disease in non-diabetic patients. *BMC Med Genomics*. 2011 Mar 28;4:26.
95. Li D, Chen G, Yang J, Fan X, Gong Y, Xu G, et al. Transcriptome analysis reveals distinct patterns of long noncoding RNAs in heart and plasma of mice with heart failure. *PLoS ONE*. 2013;8(10):e77938.
96. Kumarswamy R, Bauters C, Volkman I, Maury F, Fetisch J, Holzmann A, et al. Circulating long noncoding RNA, LIPCAR, predicts survival in patients with heart failure. *Circ Res*. 2014 May 9;114(10):1569-75.
97. Lee JE, Bennett CF, Cooper TA. RNase H-mediated degradation of toxic RNA in myotonic dystrophy type 1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012 Mar 13;109(11):4221-6.
98. Liu JY, Yao J, Li XM, Song YC, Wang XQ, Li YJ, et al. Pathogenic role of lncRNA-MALAT1 in endothelial cell dysfunction in diabetes mellitus. *Cell Death Dis*. 2014 Oct 30;5:e1506.
99. Han P, Li W, Lin CH, Yang J, Shang C, Nuernberg ST, et al. A long noncoding RNA protects the heart from pathological hypertrophy. *Nature*. 2014 Oct 2;514(7520):102-6.
100. Liu C, Bai B, Skogerbø G, Cai L, Deng W, Zhang Y, Bu D, Zhao Y, Chen R. NONCODE: an integrated knowledge database of non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res*. 2005 Jan 1;33(Database issue):D112-5.

101. Yang JH, Qu LH. DeepBase: annotation and discovery of microRNAs and other noncoding RNAs from deep-sequencing data. *Methods Mol Biol.* 2012;822:233-48.
102. Zheng LL, Li JH, Wu J, Sun WJ, Liu S, Wang ZL, Zhou H, Yang JH, Qu LH. deepBase v2.0: identification, expression, evolution and function of small RNAs, LncRNAs and circular RNAs from deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jan 4;44(D1):D196-202.
103. Xie F, Liu S, Wang J, Xuan J, Zhang X, Qu L, Zheng L, Yang J. deepBase v3.0: expression atlas and interactive analysis of ncRNAs from thousands of deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2021 Jan 8;49(D1):D877-D883.
104. Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Kostoulas N, Reczko M, Maragkakis M, Dalamagas TM, Hatzigeorgiou AG. DIANA-LncBase: experimentally verified and computationally predicted microRNA targets on long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan;41(Database issue):D239-45.
105. Paraskevopoulou MD, Vlachos IS, Karagkouni D, Georgakilas G, Kanellos I, Vergoulis T, Zagganas K, Tsanakas P, Floros E, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG. DIANA-LncBase v2: indexing microRNA targets on non-coding transcripts. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jan 4;44(D1):D231-8.
106. Karagkouni D, Paraskevopoulou MD, Tastsoglou S, Skoufos G, Karavangeli A, Pierros V, Zacharopoulou E, Hatzigeorgiou AG. DIANA-LncBase v3: indexing experimentally supported miRNA targets on non-coding transcripts. *Nucleic Acids Res.* 2020 Jan 8;48(D1):D101-D110.
107. Lin X, Lu Y, Zhang C, Cui Q, Tang YD, Ji X, Cui C. LncRNADisease v3.0: an updated database of long non-coding RNA-associated diseases. *Nucleic Acids Res.* 2024 Jan 5;52(D1):D1365-D1369.
108. Wang WJ, Wang YM, Hu Y, Lin Q, Chen R, Liu H, Cao WZ, Zhu HF, Tong C, Li L, Peng LY. HDncRNA: a comprehensive database of non-coding RNAs associated with heart diseases. *Database (Oxford).* 2018 Jan 1;2018: bay067.

109. V. Nahibin, V. Dosenko, S. Pyvovar, O. Moïbenko And L. Iahupol's'kyĭ. Fluorine-Containing Analog of Diazoxide Prevented Apoptosis in Neonatal Cardiomyocytes During Anoxia-Reoxygenation. *Fiziol Zh* 50 (2004) 3-8.
110. Jiang XY, Zhang L, Yu C, Jiang H, Li J. [Research for a better method of neonatal rat cardiac myocytes, primary culture and purification]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2015 Mar;46(2):301-4. Chinese.
111. Reinecke H, Zhang M, Bartosek T, Murry CE. Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts. *Circulation*. 1999;100:193–202.
112. Juchaux F, Sellathurai T, Perrault V, Boirre F, Delannoy P, Bakkar K, Albaud J, Gueniche A, Cheniti A, Dal Belo S, Souverain L, Le Balch M, Commo S, Thibaut S, Michelet JF. A combination of pyridine-2, 4-dicarboxylic acid diethyl ester and resveratrol stabilizes hypoxia-inducible factor 1-alpha and improves hair density in female volunteers. *Int J Cosmet Sci*. 2020 Apr;42(2):167-173.
113. Dosenko VE, Gurianova VL, Surova OV, Stroy DA, Moibenko AA. Mature and immature microRNA ratios in cultured rat cardiomyocytes during anoxia-reoxygenation. *Exp Clin Cardiol*. 2012 Summer;17(2):84-7.
114. Ciancio G, Pollack A, Taupier MA, Block NL, Irvin GL 3rd. Measurement of cell-cycle phase-specific cell death using Hoechst 33342 and propidium iodide: preservation by ethanol fixation. *J Histochem Cytochem*. 1988 Sep;36(9):1147-52.
115. Lindsey, M.L.; Bolli, R.; Canty, J.M., Jr.; Du, X.J.; Frangogiannis, N.G.; Frantz, S.; Gourdie, R.G.; Holmes, J.W.; Jones, S.P.; Kloner, R.A.; et al. Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2018**, *314*, H812–H838.
116. Rusiecka OM, Montgomery J, Morel S, Batista-Almeida D, Van Campenhout R, Vinken M, Girao H, Kwak BR. Canonical and Non-Canonical Roles of Connexin43 in Cardioprotection. *Biomolecules*. 2020 Aug 23;10(9):1225.F

117. Prentø P. Van Gieson's picrofuchsin. The staining mechanisms for collagen and cytoplasm, and an examination of the dye diffusion rate model of differential staining. *Histochemistry*. 1993 Feb;99(2):163-74.
118. Hartig SM. Basic image analysis and manipulation in ImageJ. *Curr Protoc Mol Biol*. 2013;Chapter 14:Unit14.15.
119. Fischer P, Jungwirth S, Krampla W, Weissgram S, Kirchmeyr W, Schreiber W, et al. Vienna transdanube aging “VITA”: study design, recruitment strategies and level of participation. *J. Neural Transm. Suppl*. 2002:105–16.
120. Jungwirth S, Zehetmayer S, Bauer P, Weissgram S, Tragl KH, Fischer P. Screening for Alzheimer’s dementia at age 78 with short psychometric instruments. *Int. Psychogeriatr*. 2009;21:548–59.
121. Mostafaie N, Rossmannith W, Hombauer H, Dechat T, Raffelsberger T, Bauer K, et al. Mitochondrial genotype and risk for Alzheimer’s disease: cross-sectional data from the Vienna-Transdanube-Aging “VITA” study. *J. Neural Transm*. 2004;111:1155–65.
122. Wenzl FA, Mengozzi A, Mohammed SA, Pugliese NR, Mongelli A, Gorica E, et al. Circulating long noncoding RNA signatures associate with incident diabetes in older adults: a prospective analysis from the VITA cohort study. *Diabetes Care* 2023;46:1239–44.
123. Hoole SP, Heck PM, Sharples L, Khan SN, Duehmke R, Densem CG, Clarke SC, Shapiro LM, Schofield PM, O’Sullivan M, Dutka DP. Cardiac Remote Ischemic Preconditioning in Coronary Stenting (CRISP Stent) Study: a prospective, randomized control trial. *Circulation*. 2009; 119 (6):820–7.
124. Gruszczuk AV, Casey AM, James AM, Prag HA, Burger N, Bates GR, Hall AR, Allen FM, Krieg T, Saeb-Parsy K, Murphy MP. Mitochondrial metabolism and bioenergetic function in an anoxic isolated adult mouse cardiomyocyte model of in vivo cardiac ischemia-reperfusion injury. *Redox Biol*. 2022 Aug;54:102368.

125. 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.
126. 1. Wang H, Lian X, Gao W, Gu J, Shi H, Ma Y, Li Y, Fan Y, Wang Q, Wang L. Long noncoding RNA H19 suppresses cardiac hypertrophy through the MicroRNA-145-3p/SMAD4 axis. *Bioengineered*. 2022 Feb;13(2):3826-3839.
127. Gong LC, Xu HM, Guo GL, Zhang T, Shi JW, Chang C. Long Non-Coding RNA H19 Protects H9c2 Cells against Hypoxia-Induced Injury by Targeting MicroRNA-139. *Cell Physiol Biochem*. 2017;44(3):857-869.
128. 1. Zhang L, Liu T, Wang P, Shen Y, Huang T. Overexpression of Long Noncoding RNA H19 Inhibits Cardiomyocyte Apoptosis in Neonatal Rats with Hypoxic-Ischemic Brain Damage Through the miR-149-5p/LIF/PI3K/Akt Axis. *Biopreserv Biobank*. 2021 Oct;19(5):376-385.
129. Alterations in lncRNAs H19 and TUG1 expression and their correlation with hemodynamics in myocardial infarction. M. Khetsuriani, T. I. Drevytska, L. V. Tumanovska, G. V. Pirtnichenko, Y. Hegel-Valentych, V. O. Niekrasova, A. M. Shysh, V. E. Dosenko. Published: August 2023 by Institute of Molecular Biology and Genetics (NAS Ukraine) in *Biopolymers and Cell*. *Biopolymers and Cell*, Volume 39, pp 231-241
130. 1. Zhou M, Zou YG, Xue YZ, Wang XH, Gao H, Dong HW, Zhang Q. Long non-coding RNA H19 protects acute myocardial infarction through activating autophagy in mice. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018 Sep;22(17):5647-5651.
131. 1. Tao H, Cao W, Yang JJ, Shi KH, Zhou X, Liu LP, Li J. Long noncoding RNA H19 controls DUSP5/ERK1/2 axis in cardiac fibroblast proliferation and fibrosis. *Cardiovasc Pathol*. 2016 Sep-Oct;25(5):381-9.
132. Choong OK, Chen CY, Zhang J, Lin JH, Lin PJ, Ruan SC, Kamp TJ, Hsieh PCH. Hypoxia-induced H19/YB-1 cascade modulates cardiac remodeling after infarction. *Theranostics*. 2019 Aug 21;9(22):6550-6567.

133. Wenger RH, Stiehl DP, Camenisch G. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE*. 2005 Oct 18;2005(306):re12.
134. Wu W, Hu Q, Nie E, Yu T, Wu Y, Zhi T, Jiang K, Shen F, Wang Y, Zhang J, You Y. Hypoxia induces H19 expression through direct and indirect Hif-1 α activity, promoting oncogenic effects in glioblastoma. *Sci Rep*. 2017 Mar 22;7:45029.
135. Vengellur A, Woods BG, Ryan HE, Johnson RS, LaPres JJ. Gene expression profiling of the hypoxia signaling pathway in hypoxia-inducible factor 1alpha null mouse embryonic fibroblasts. *Gene Expr*. 2003;11(3-4):181-97.
136. Choudhry H, Harris AL. Advances in Hypoxia-Inducible Factor Biology. *Cell Metab*. 2018 Feb 6;27(2):281-298.
137. Singh A, Wilson JW, Schofield CJ, Chen R. Hypoxia-inducible factor (HIF) prolyl hydroxylase inhibitors induce autophagy and have a protective effect in an in-vitro ischaemia model. *Sci Rep*. 2020 Jan 31;10(1):1597.
138. Hirota K. HIF- α Prolyl Hydroxylase Inhibitors and Their Implications for Biomedicine: A Comprehensive Review. *Biomedicines*. 2021 Apr 24;9(5):468.
139. Busscher D, Boon RA, Juni RP. The multifaceted actions of the lncRNA H19 in cardiovascular biology and diseases. *Clin Sci (Lond)*. 2022 Aug 12;136(15):1157-1178.
140. Huang Y, Wang L, Mao Y, Nan G. Long Noncoding RNA-H19 Contributes to Atherosclerosis and Induces Ischemic Stroke via the Upregulation of Acid Phosphatase 5. *Front Neurol*. 2019 Feb 4;10:32.
141. Lu G, Chu Y, Tian P. Knockdown of H19 Attenuates Ox-LDL-induced Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation, Migration, and Invasion by Regulating miR-599/PAPPA Axis. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2021 Mar 1;77(3):386-396.
142. Zhang L, Cheng H, Yue Y, Li S, Zhang D, He R. H19 knockdown suppresses proliferation and induces apoptosis by regulating miR-148b/WNT/ β -catenin in ox-LDL -stimulated vascular smooth muscle cells. *J Biomed Sci*. 2018 Feb 7;25(1):11.

143. Pan JX. LncRNA H19 promotes atherosclerosis by regulating MAPK and NF- κ B signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017 Jan;21(2):322-328.
144. Li ZF, Shu XJ, Chang YW, Liu SY, Wang WH. Effect of lncRNA H19 on the apoptosis of vascular endothelial cells in arteriosclerosis obliterans via the NF- κ B pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019 May;23(10):4491-4497.
145. Han DK, Khaing ZZ, Pollock RA, Haudenschild CC, Liao G. H19, a marker of developmental transition, is reexpressed in human atherosclerotic plaques and is regulated by the insulin family of growth factors in cultured rabbit smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 1996 Mar 1;97(5):1276-85.
146. Huang SF, Zhao G, Peng XF, Ye WC. The Pathogenic Role of Long Non-coding RNA H19 in Atherosclerosis *via* the miR-146a-5p/ANGPTL4 Pathway. *Front Cardiovasc Med*. 2021 Nov 8;8:770163.
147. Hofmann P, Sommer J, Theodorou K, Kirchhof L, Fischer A, Li Y, Perisic L, Hedin U, Maegdefessel L, Dimmeler S, Boon RA. Long non-coding RNA H19 regulates endothelial cell aging via inhibition of STAT3 signalling. *Cardiovasc Res*. 2019 Jan 1;115(1):230-242.
148. Su Q, Liu Y, Lv XW, Dai RX, Yang XH, Kong BH. LncRNA TUG1 mediates ischemic myocardial injury by targeting miR-132-3p/HDAC3 axis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2020 Feb 1;318(2):H332-H344.
149. Wang YW, Dong HZ, Tan YX, Bao X, Su YM, Li X, Jiang F, Liang J, Huang ZC, Ren YL, Xu YL, Su Q. HIF-1 α -regulated lncRNA-TUG1 promotes mitochondrial dysfunction and pyroptosis by directly binding to FUS in myocardial infarction. *Cell Death Discov*. 2022 Apr 8;8(1):178.
150. Fu D, Gao T, Liu M, Li C, Li H, Jiang H, Fu X. LncRNA TUG1 aggravates cardiomyocyte apoptosis and myocardial ischemia/reperfusion injury. *Histol Histopathol*. 2021 Dec;36(12):1261-1272.
151. Zou X, Wang J, Tang L, Wen Q. LncRNA TUG1 contributes to cardiac hypertrophy via regulating miR-29b-3p. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2019 Aug;55(7):482-490.

152. Fang Q, Liu T, Yu C, Yang X, Shao Y, Shi J, Ye X, Zheng X, Yan J, Xu D, Zou X. LncRNA TUG1 alleviates cardiac hypertrophy by targeting miR-34a/DKK1/Wnt- β -catenin signalling. *J Cell Mol Med*. 2020 Mar;24(6):3678-3691.
153. Talman V, Teppo J, Pöhö P, Movahedi P, Vaikkinen A, Karhu ST, Trošt K, Suvitaival T, Heikkonen J, Pahikkala T, Kotiaho T, Kostainen R, Varjosalo M, Ruskoaho H. Molecular Atlas of Postnatal Mouse Heart Development. *J Am Heart Assoc*. 2018 Oct 16;7(20):e010378.
154. Du J, Yang ST, Liu J, Zhang KX, Leng JY. Silence of LncRNA GAS5 Protects Cardiomyocytes H9c2 against Hypoxic Injury via Sponging *miR-142-5p*. *Mol Cells*. 2019 May 31;42(5):397-405.
155. Hao S, Liu X, Sui X, Pei Y, Liang Z, Zhou N. Long non-coding RNA GAS5 reduces cardiomyocyte apoptosis induced by MI through sema3a. *Int J Biol Macromol*. 2018 Dec;120(Pt A):371-377.
156. Liao J, He Q, Li M, Chen Y, Liu Y, Wang J. LncRNA MIAT: Myocardial infarction associated and more. *Gene*. 2016 Mar 10;578(2):158-61.
157. Ghafouri-Fard S, Azimi T, Taheri M. Myocardial Infarction Associated Transcript (MIAT): Review of its impact in the tumorigenesis. *Biomed Pharmacother*. 2021 Jan;133:111040.
158. Azat M, Huojiahemaiti X, Gao R, Peng P. Long noncoding RNA MIAT: A potential role in the diagnosis and mediation of acute myocardial infarction. *Mol Med Rep*. 2019 Dec;20(6):5216-5222.
159. Qu X, Du Y, Shu Y, Gao M, Sun F, Luo S, Yang T, Zhan L, Yuan Y, Chu W, Pan Z, Wang Z, Yang B, Lu Y. MIAT Is a Pro-fibrotic Long Non-coding RNA Governing Cardiac Fibrosis in Post-infarct Myocardium. *Sci Rep*. 2017 Feb 15;7:42657.
160. Yang C, Zhang Y, Yang B. MIAT, a potent CVD-promoting lncRNA. *Cell Mol Life Sci*. 2021 Dec 18;79(1):43.

161. Wang R, Zhao L, Ji L, Bai L, Wen Q. Myocardial infarction associated transcript (MIAT) promotes papillary thyroid cancer progression via sponging miR-212. *Biomed Pharmacother.* 2019 Oct;118:109298.
162. Cao X, Ma Q, Wang B, Qian Q, Liu N, Liu T, Dong X. Silencing long non-coding RNA MIAT ameliorates myocardial dysfunction induced by myocardial infarction *via* MIAT/miR-10a-5p/EGR2 axis. *Aging (Albany NY).* 2021 Mar 26;13(8):11188-11206.
163. McClanahan T, Nao B, Wolke L, Martin B, Metz T, Gallagher K. Brief renal occlusion and reperfusion reduces myocardial infarct size in rabbits. *FASEB J.* 1993;7:A118. (abstract).
164. Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA, Kristiansen SB, Schmidt MR, Hoschtitzky JA, Vogel M, Sorensen K, Redington AN, MacAllister R. Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation.* 2002 Dec 3;106(23):2881-3.
165. Kakimoto M, Kawaguchi M, Sakamoto T, Inoue S, Furuya H, Nakamura M, Konishi N. Evaluation of rapid ischemic preconditioning in a rabbit model of spinal cord ischemia. *Anesthesiology.* 2003 Nov;99(5):1112-7.
166. Dave KR, Saul I, Prado R, Busto R, Perez-Pinzon MA. Remote organ ischemic preconditioning protect brain from ischemic damage following asphyxial cardiac arrest. *Neurosci Lett.* 2006 Aug 14;404(1-2):170-5.
167. Ong SG, Hausenloy DJ. Hypoxia-inducible factor as a therapeutic target for cardioprotection. *Pharmacol Ther* 2012;136:69–81.
168. 1. Prabhakar NR, Semenza GL. Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. *Physiol Rev* 2012;92:967–1003.
169. Cai Z, Manalo DJ, Wei G, Rodriguez ER, Fox-Talbot K, Lu H, et al. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia–reperfusion injury. *Circulation* 2003;108:79–85.

170. Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, Fuji H, Oe H, Hori M, et al. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res* 1993;72:1293–9.
171. Heusch G. HIF-1alpha and paradoxical phenomena in cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2012;96:214–5.
172. Loor G, Schumacker PT. Role of hypoxia-inducible factor in cell survival during myocardial ischemia–reperfusion. *Cell Death Differ* 2008;15:686–90.
173. Eckle T, Kohler D, Lehmann R, El Kasmi K, Eltzschig HK. Hypoxia-inducible factor-1 is central to cardioprotection: a new paradigm for ischemic preconditioning. *Circulation* 2008;118:166–75.
174. Li X, Zhang Y, Ding Z, Chen Y, Wang W. LncRNA H19: A Novel Biomarker in Cardiovascular Disease. *Acta Cardiol Sin.* 2024 Mar;40(2):172-181.
175. 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.* 2024 May;123:94-101.
176. Xue X, Luo L. LncRNA HIF1A-AS1 contributes to ventricular remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury by adsorption of microRNA-204 to regulating SOCS2 expression. *Cell Cycle.* 2019 Oct;18(19):2465-2480.
177. Cao H, Yang B, Zhao Y, Deng X, Shen X. The pro-apoptosis and pro-inflammation role of LncRNA HIF1A-AS1 in Cocksackievirus B3-induced myocarditis via targeting miR-138. *Cardiovasc Diagn Ther.* 2020 Oct;10(5):1245-1255.
178. Turkieh A, Beseme O, Saura O, Charrier H, Michel JB, Amouyel P, Thum T, Bauters C, Pinet F. LIPCAR levels in plasma-derived extracellular vesicles is associated with left ventricle remodeling post-myocardial infarction. *J Transl Med.* 2024 Jan 6;22(1):31.

179. Barbalata T, Niculescu LS, Stancu CS, Pinet F, Sima AV. Elevated Levels of Circulating lncRNAs LIPCAR and MALAT1 Predict an Unfavorable Outcome in Acute Coronary Syndrome Patients. *Int J Mol Sci*. 2023 Jul 28;24(15):12076.
180. Yan L, Zhang Y, Wang M, Wang L, Zhang W, Ge ZR. Circulating LIPCAR is a potential biomarker of heart failure in patients post-acute myocardial infarction. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2021 Dec;246(24):2589-2594.
181. Zhang Z, Gao W, Long QQ, Zhang J, Li YF, Liu DC, Yan JJ, Yang ZJ, Wang LS. Increased plasma levels of lncRNA H19 and LIPCAR are associated with increased risk of coronary artery disease in a Chinese population. *Sci Rep*. 2017 Aug 8;7(1):7491.
182. Kontaraki JE, Marketou ME, Kochiadakis GE, Maragkoudakis S, Konstantinou J, Vardas PE, Parthenakis FI. The long non-coding RNAs MHRT, FENDRR and CARMEN, their expression levels in peripheral blood mononuclear cells in patients with essential hypertension and their relation to heart hypertrophy. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2018 Nov;45(11):1213-1217.
183. Xuan L, Sun L, Zhang Y, Huang Y, Hou Y, Li Q, Guo Y, Feng B, Cui L, Wang X, Wang Z, Tian Y, Yu B, Wang S, Xu C, Zhang M, Du Z, Lu Y, Yang BF. Circulating long non-coding RNAs NRON and MHRT as novel predictive biomarkers of heart failure. *J Cell Mol Med*. 2017 Sep;21(9):1803-1814.
184. Hang CT, Yang J, Han P, Cheng HL, Shang C, Ashley E, Zhou B, Chang CP. Chromatin regulation by Brg1 underlies heart muscle development and disease. *Nature*. 2010 Jul 1;466(7302):62-7.
185. Motomura A, Shimizu M, Kato A, Motomura K, Yamamichi A, Koyama H, Ohka F, Nishikawa T, Nishimura Y, Hara M, Fukuda T, Bando Y, Nishimura T, Wakabayashi T, Natsume A. Remote ischemic preconditioning protects human neural stem cells from oxidative stress. *Apoptosis*. 2017 Nov;22(11):1353-1361.
186. 1. Yildirim F, Iskesen I, Kurdal AT, Ozturk T, Taneli F, Gozukara C, Ozbakkaloglu A. Is "Attenuation of Oxidative Stress" Helpful to Understand the Mechanism of Remote Ischemic Preconditioning in Cardiac Surgery? *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2016 Jan;30(1):134-40.

187. Zhang J, Gao C, Meng M, Tang H. Long Noncoding RNA MHRT Protects Cardiomyocytes against H₂O₂-Induced Apoptosis. *Biomol Ther (Seoul)*. 2016 Jan;24(1):19-24.
188. Liu P, Dong X, Dong C, Hou G, Liu W, Jiang X, Xin Y. LncRNA MHRT Prevents Angiotensin II-Induced Myocardial Oxidative Stress and NLRP3 Inflammasome via Nrf2 Activation. *Antioxidants (Basel)*. 2023 Mar 9;12(3):672.
189. Konstantinov IE, Arab S, Kharbanda RK, Li J, Cheung MM, Cherepanov V, Downey GP, Liu PP, Cukerman E, Coles JG, Redington AN. The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans. *Physiol Genomics*. 2004 Sep 16;19(1):143-50.

ДОДАТОК 1

НАУКОВІ ПРАЦІ, В ЯКИХ ОПУБЛІКОВАНІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **М. Хецуріані**, В. Є. Досенко. Довгі некодуєчі 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 некодуєчої РНК H19 та фактору, що індукується гіпоксією HIF-1 α , 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 некодуєчих 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).*

ДОДАТОК 2
НАУКОВІ ПРАЦІ, ЯКІ ЗАСВІДЧУЮТЬ АПРОБАЦІЮ
РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

8. **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>
9. **Хецуріані М.** Довгі некодуєчі РНК при патології серця: ключові регулятори, біомаркери чи артефакти? *Kyiv Non-Coding Meeting 2018*, Kyiv, Ukraine.
10. **Хецуріані М.** Довгі некодуєчі РНК у кардіології: сподівання та реальність. Перспективи розвитку профілактичної та клінічної медицини, Київ, 19 квітня 2019 року (С2).
11. **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.
12. **Хецуріані М.** Довгі некодуєчі РНК як маркери серцево-судинних захворювань». 19-25 вересня, 2021, Львів, Україна.
13. **Хецуріані М., Древицька Т.І., Некрасова В.О., Досенко В.Є.** Значення експресії довгої некодуєчої 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.
14. **Некрасова В. О. Хецуріані М., Древицька Т. І. Досенко В. Є.** Вплив куркуміну на експресію довгих некодуєчих 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.

15. **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.