

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ**

На правах рукопису

Пальчевська Оксана Леонідівна

УДК 575+576.52+577+616.1

**Особливості розвитку постнатального міокарда за умови
гетерозиготної делеції гена *β -катеніну***

03.00.22 – молекулярна генетика

Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Науковий керівник
Півень Оксана Олександрівна
кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник

КИЇВ - 2017

ЗМІСТ

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	6
ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	15
1.1. Загальна характеристика канонічного Wnt шляху	16
1.2. Ядерна локалізація β -катеніну	20
1.3. Роль β -катеніну в підтриманні структурної цілісності міокарда	23
1.4. Канонічний Wnt сигналінг як один із принципових регуляторів кардіогенезу	26
1.5. Канонічний Wnt/ β -катеніновий сигналінг в постнатальному серці	30
1.5.1. Патології серцево-судинної системи	30
1.5.2. Канонічний Wnt сигналінг у перебудовах дорослого міокарда та розвитку гіпертрофії	34
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	40
2.1. Опис біологічних та хімічних агентів, що використовувались у роботі	40
2.1.1. Біологічні матеріали	40
2.1.2. Хімічні агенти	41
2.1.3 Праймери	41
2.1.4 Обладнання	43
2.2. Генерація дослідних тварин	44
2.2.1. Генотипування	46
2.3. Дослідження сигнальної функції β -катеніну у постнатальному розвитку серця ссавців	48
2.3.1 Морфометричний аналіз дослідних тварин	48
2.3.2. Гістологічний аналіз тканини міокарда	49
2.3.3. Дослідження зміни експресії генів	51
2.3.3.1. Виділення тотальної РНК	51

2.3.3.2. Синтез кДНК	52
2.3.3.3. ПЛР в реальному часі	52
2.4. Дослідження сигнальної функції гена β -катеніну в неонатальних кардіоміоцитах <i>in vitro</i>	53
2.4.1. Морфологічний аналіз кардіоміоцитів <i>in vitro</i> після дії гіпертрофічного стимулу	54
2.4.2. Визначення фізіологічної активності первинних кардіоміоцитів	55
2.5. Вивчення сигнальної функції гена β -катеніну та канонічного Wnt сигналінгу при адаптації міокарда до хронічних фізичних навантажень	56
2.5.1. Дослідження зміни індексу співвідношення маси серця до маси тіла	56
2.5.2. Дослідження зміни експресії генів	57
2.5.3. Дослідження зміни експресії білків, залучених до MAPK та PI3-кіназного mTOR-залежного шляху	57
2.6. Мета-аналіз зв'язку розвитку гіпертрофії та сигнальної активності β -катеніну	60
2.7. Статистичні методи	62
Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	64
3.1. Сигнальна функція β -катеніну в постнатальному розвитку міокарда	65
3.1.1. Ембріональна кардіоспецифічна делеція однієї алелі гена β -катеніну спричиняє затримку розвитку постнатального серця	65
3.1.2. Дефіцит гена β -катеніну в постнатальному серці асоціюється із експресією гіпертрофічних генів	68
3.1.3. Гетерозиготна делеція гена β -катеніну в постнатальному серці призводить до зниження рівня активності канонічного Wnt сигнального шляху	71
3.2. Дослідження сигнальної функції β -катеніну у ізольованих	76

кардіоміоцитах за умови впливу гіпертрофічних стимулів

3.3. Дослідження сигнальної функції β -катеніну при адаптації міокарда до фізичних навантажень 83

3.4. Мета-аналіз зв'язку розвитку гіпертрофії та активності β -катеніну 92

Розділ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА АНАЛІЗ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ 96

ВИСНОВКИ 108

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ 109

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- АКТ (Akt) – protein kinase B (протеїнкіназа B (протеїнкіназа, споріднена до протеїнкіназ A та C))
- ANF – A-type natriuretic factor (синонім – ANP) (натрійуретичний фактор типу A)
- BNP – B-type natriuretic peptide (натрійуретичний пептид B)
- BW – body weight (маса тіла)
- Cx43 – connexin 43 (конексин 43)
- DMEM – Dulbecco's modified Eagle Medium (мінімальне середовище Ігла в модифікації Дюльбеко)
- Dvl – білок Dishelved
- EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid (етилендіамінтетраоцтова кислота)
- ERK1/2 – extracellular signal-regulated kinases (позаклітинна сигнал-регульована кіназа)
- FGF – fibroblast growth factor (фактор росту фібробластів)
- Fz – білок Frizzled
- GAPDH – glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа)
- GSK – glycogen-syntase-kinase (кіназа глікогенсинтази)
- HW – heart weight (маса серця)
- JNK – c-Jun N-terminal kinases (c-Jun N-термінальна кіназа)
- Lrp – low-density lipoprotein receptor-related protein (білки, споріднені з рецепторами до ліпопротеїнів низької щільності)
- МАРК – mitogen-activated protein kinases (протенкіназа, активована мітогеном)
- МТТ – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (3-(4,5-диметилтіазоліл)-2,5-дифенілтетразоліум бромід)
- РКС – protein kinase C (протеїн кіназа C)

sFRP – secreted frizzled-related protein (секреторні білки, споріднені з білками Frizzled)

TAC – transverse aortic constriction (перетискання аорти)

TCF/LEF – T-cell factor/ Lymphoid enhancer-binding factor

TCF4 – T-cell factor 4

UTR – untranslated region

Wt (wt) – wild type (дикий тип)

α -МНС – α -form of myosin heavy chains (ізоформа α важких ланцюгів міозину)

β -cat – β -catenin (β -катенін)

β -МНС – β -form of myosin heavy chains (ізоформа β важких ланцюгів міозину)

ВРХ – велика рогата худоба

МС/МТ – індекс співвідношення маси серця до маси тіла

ССЗ – серцево-судинні захворювання

ФСБ – фосфатний сольовий буфер

кДНК – комплементарна РНК-матриці ДНК, що отримана за допомогою зворотної транскрипції

ВСТУП

Актуальність теми. Захворювання серцево-судинної системи є однією з найважливіших проблем сучасності. Згідно звіту Європейської організації кардіологів [1] саме захворювання серцево-судинної системи стають причиною більш ніж 4 мільйонів смертей у країнах світу щороку. На жаль, смертність від хвороб серця та системи кровообігу в Україні у 2-4 рази вища, ніж у країнах ЄС та світу, причому в нашій країні вмирають від цих захворювань не тільки частіше, але й раніше.

Поширення серцево-судинних захворювань, їхня загроза здоров'ю та вагоме соціально-економічне навантаження обумовлюють і значний інтерес науковців до вирішення цієї проблеми. Останнім часом актуальними стають не лише дослідження нових методів діагностики і лікування серцево-судинних захворювань, а й з'ясування молекулярно-генетичних механізмів їхнього виникнення та перебігу. Сигнально-регуляторний канонічний Wnt шлях є одним з важливих сигнально-регуляторних каскадів, що може брати участь у перебудовах міокарда. Він залучений до контролю як ембріонального розвитку органів, включаючи і серце, так і функціонування дорослого організму [2].

Відомо, що β -катенін є важливим компонентом цього сигнально-регуляторного шляху. Участь Wnt/ β -катенінового сигнального шляху при розвитку патології дорослого серця активно вивчали протягом останніх кількох десятиліть. У низці експериментальних робіт показано, що кардіоспецифічна делеція гена *β -катеніну* в різних типах клітин на ранніх етапах кардіогенезу призводить до різноманітних порушень розвитку ембріонального серця і має летальні наслідки для всього організму [3, 4]. З іншого боку, умовний нокаут *β -катеніну* після закладання первинного та вторинного кардіального полів не мав таких драматичних наслідків [5].

Однак, тварини гинули у пізньому ембріогенезі, або одразу після народження без виражених морфологічних порушень серця та ембріона.

В умовно здоровому дорослому серці ссавців канонічний Wnt шлях пригнічується невдовзі після народження [4]. Однак, виявлено його реактивацію в дорослому серці при подоланні міокардом різних несприятливих станів (після інфаркту міокарда, при дії різних гіпертрофічних стимулів, при старінні тощо). Зокрема, роль канонічного Wnt шляху в розвитку гіпертрофії серця підтверджено з використанням умовного нокауту гена *β -катеніну* в клітинах серця [6].

Недостатність однієї алелі гена *β -катеніну* в кардіоміоцитах пригнічувала розвиток гіпертрофії при дії надлишкового тиску після операбельного перетискання аорти (ТАС) [3], в той час як в іншій експериментальній роботі, надлишкова експресія конститутивно активної форми *β -катеніну* спричиняла розвиток дилатаційної кардіоміопатії [7]. У роботі Хан та співав. така надлишкова експресія активної форми *β -катеніну* у серцях тварин призводила до розвитку спонтанної гіпертрофії в культурі кардіоміоцитів [8]. З іншого боку, показано, що зниження рівня сигнальної активності *β -катеніну* є необхідною умовою для розвитку адаптивних перебудов міокарда та гіпертрофії серця [9].

Отже, роль *β -катеніну* в перебудовах серця ще не можна назвати до кінця встановленою, зважаючи на суперечливі результати, отримані різними авторами. Існуючі дані щодо сигнальної ролі *β -катеніну* потребують детальнішого та поглибленого аналізу на молекулярному рівні. Розуміння сигнальної функції *β -катеніну* у регуляції адаптації серця до різних стресових факторів надзвичайно важливе не лише для розвитку фундаментальної біології, а й дає підґрунтя до розвитку як сучасніших методів терапії, так і діагностики серцевої патології.

Таким чином, дана робота присвячена вивченню і уточненню сигнальної функції *β -катеніну* у розвитку та функціонуванні серця. Саме ці

аспекти є не вивченими або дискусивними у сучасній науковій літературі. Робота цікава та оригінальна тим, що виконується із застосуванням сучасних методологічних підходів: використанням генетично модифікованих тварин із умовним нокаутом досліджуваного гена у тканині серця. Саме це дає змогу проаналізувати функцію окремого гена на рівні організму за умов його повної чи часткової втрати.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в рамках науково-дослідних проектів відділу генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, отриманих на конкурсних засадах: «Розробка фундаментальних основ клітинної терапії патологій серця» цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій» (номер державної реєстрації 7/2015, 2010-2014 рр.) та «Дослідження регуляторної функції β - та α -катеніну у вікових та патологічних перебудовах/реконструкціях дорослого міокарда для потреб персоналізованої медицини та розробки сучасних методів профілактики, діагностики захворювань та лікування хвороб серця людини» цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства» (номер державної реєстрації 40/2015, 2015-2019 рр.).

Також роботу виконували в рамках бюджетних тем відділу генетики людини «Особливості експресії гена репаративного ензиму Об-алкілгуанін-ДНК алкілтрансферази в умовно нормальних та пухлинних клітинах» (номер державної реєстрації 0108U008526, 2009-2013 рр.) та «Регуляції експресії гена репаративного ензиму MGMT під впливом деяких біологічно активних речовин (гормонів, цитокінів, лектинів та ін.) у клітинах ссавців» (номер державної реєстрації 0115U000355, 2014-2018 рр.).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було дослідити сигнальну функцію гена *β -катеніну* у розвитку постнатального міокарда та при адаптації дорослого серця до фізичних навантажень за умови кардіоспецифічної гетерозиготної делеції цього гена.

У відповідності зі сформульованою метою було поставлено такі завдання:

1. Згенерувати групи тварин із ембріональною кардіоспецифічною гетерозиготною делецією гена *β -катеніну*, сформувати дослідні групи тварин різного віку (1, 3, 6 та 9 місяців).

2. З'ясувати вплив ембріональної кардіоспецифічної гетерозиготної делеції гена *β -катеніну* на постнатальний розвиток міокарда у тварин різних вікових груп.

3. Проаналізувати сигнальну функцію гена *β -катеніну* у постнатальному розвитку серця тварин за умови гетерозиготної делеції досліджуваного гена.

4. Із використанням ізольованих кардіоміоцитів проаналізувати функцію *β -катеніну* у метаболізмі та гіпертрофічному рості кардіоміоцитів.

5. Дослідити значення канонічного Wnt сигналіngu та *β -катеніну* у адаптації дорослого міокарда до хронічних фізичних навантажень (гіпертрофії міокарда).

Об'єкт дослідження: розвиток постнатального міокарду, зміни рівня експресії фетальних генів, адаптація серця до фізичних навантажень, динаміка канонічного Wnt сигналіngu, гіпертрофічна відповідь.

Предмет дослідження: особливості розвитку постнатального міокарда та адаптації його до фізичних навантажень за умови ембріональної кардіоспецифічної гетерозиготної делеції гена *β -катеніну*.

Методи дослідження: молекулярно-генетичні (виділення ДНК та РНК, ПЛР, ПЛР в реальному часі), гістологічні (гематоксилін-еозинове забарвлення, Масон-трихромне забарвлення), методи клітинної біології

(виділення клітин у культуру, МТТ-тест), методи математичної статистики (дисперсійний аналіз даних).

Наукова новизна одержаних результатів. Показано участь канонічного Wnt сигналінгу та β -катеніну зокрема у розвитку та формуванні постнатального серця а також адаптації дорослого серця до тривалих фізичних навантажень. Отримані дані свідчать про залучення сигнальної функції β -катеніну у розвитку серця, а також про необхідність активації канонічного Wnt сигналінгу та β -катеніну при фізіологічній гіпертрофії серця. Вперше показано, що кардіоспецифічна гетерозигота делеція гена *β -катеніну* у ембріональному серці призводить до затримки розвитку дорослого серця; пригнічення сигнальної функції β -катеніну у неонатальному серці асоційоване із підвищенням експресії гіпертрофічних генів у дорослому міокарді; дефіцит гена *β -катеніну* винятково у тканині міокарда не спричиняє летальності чи зменшення тривалості життя тварин і не призводить до критичних морфологічних аномалій тканини міокарда; сигнальна функція β -катеніну необхідна для термінального диференціювання кардіоміоцитів та перемикання серця з фетальної на «дорослу» генетичну програму; сигнальна функції β -катеніну необхідна при адаптації серця до тривалих фізичних навантажень.

Практичне значення одержаних результатів. В результаті проведеної роботи було отримано низку фундаментальних даних, які значно доповнюють та розширюють попередні уявлення про молекулярні та молекулярно-генетичні механізми функціонування постнатального міокарда на молекулярно-біологічному та молекулярно-генетичному рівні. А саме, уточнено функцію β -катеніну у регуляції розвитку постнатального міокарда та його адаптації до навантажень.

Отримано дані про принципову роль β -катеніну у термінальній специфікації кардіоміоцитів, розвитку постнатального серця і адаптації міокарда до фізичних навантажень вказують на те, що β -катенін є

потенційною мішенню для таргетної терапії розвитку серцевої гіпертрофії. Дана робота, незважаючи на свою фундаментальність, може бути використана для розробки терапії та діагностики розвитку гіпертрофії серця.

Особистий внесок здобувача. Результати, викладені автором у дисертації, отримано ним особисто або за його безпосередньої участі. Автором безпосередньо було налагоджено і впроваджено необхідні методи досліджень (виділення РНК, синтез кДНК, кількісний ПЛР в реальному часі), виконано основну частину експериментальних досліджень.

Автором разом із науковим керівником проаналізовано та концептуалізовано дані літературних джерел, заплановано експериментальні дослідження, проаналізовано та узагальнено отримані результати.

Частину експериментальних та теоретичних досліджень (МТТ-тест, аналіз частоти розподілу двоядерних кардіоміоцитів) проведено спільно зі співробітниками відділу генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, які є співавторами опублікованих робіт.

Також автор висловлює щире подяку співробітникам лабораторії молекулярної медичної біохімії Інституту Експериментальної біології ім. Ненські ПАН та особисто керівнику лабораторії доктору Павлу Добжиню за сприяння в проведенні експериментів з дослідження рівнів експресії білків, залучених до канонічного Wnt шляху та інших сигнально-регуляторних систем.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи доповідалися на українських та міжнародних конференціях та школах: Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Одеса, Україна, 12-16 вересня, 2016), EMBO / FEBS Lecture Course «Chromatin and the Environment» (Spetses, Greece, August, 8-14, 2016), X Parnas Conference Young Scientist Forum «Molecules in the Living Cell and Innovative Medicine» (Wroclaw, Poland, July, 10-12, 2016), Conference

for Young Scientists CYS-2015 (Kyiv, Ukraine, September, 21-25, 2015), Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Чернівці, Україна, 14-18 вересня, 2015), 1st Congress of the Polish Biochemistry, Cell Biology, Biophysics and Bioinformatics «BIO 2014» (Warsaw, Poland, September, 9-12 вересня, 2014), Міжнародній науковій конференції «Механізми функціонування фізіологічних систем» (Львів, 15-17 жовтня 2014), Wnt Symposium 2013 (Heidelberg, Germany, July, 14-16, 2013), EMBO / EMBL Symposium Cardiac Biology: From Development to Regenerative Medicine (Heidelberg, Germany, June, 7-10, 2013), VI International Conference of Young Scientists: Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution. (Odesa, Ukraine, May, 13-17, 2013).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 15 наукових праць, з них 5 статей у фахових журналах та тез 10 доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, чотирьох розділів (огляд літератури, матеріали і методи досліджень, результати досліджень, узагальнення та аналіз отриманих результатів), висновків та списку літератури, який охоплює 176 посилань.

Робота викладена на 128 сторінках машинописного тексту (з них 108 сторінок припадає на основну частину) і містить 3 таблиці та 25 рисунків.

Автор висловлює подяку своєму науковому керівнику — к.б.н., ст.н.с. О.О. Півень, завідуючій відділом генетики людини, д.б.н., професору Л.Л. Лукаш, а також співробітникам відділу к.б.н. Л.Л. Мацевич, Т.П. Рубан, аспіранту відділу В.В. Балацькому та іншим.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Історія дослідження сигнального шляху Wnt бере початок в далекому 1987 році, коли було опубліковано роботу Rijsewijk та співавт., в якій повідомлялось про продукт гена *wingless* (*Wg*) *Drosophila melanogaster* [10]. Автори показали виняткове значення білку Wg в часово-просторовій регуляції процесів розвитку *D. melanogaster* на прикладі закладання імагінальних дисків при метаморфозі личинок. В подальших дослідженнях було ідентифіковано та клоновано аналоги цього білку у багатьох вищих організмах, зокрема, у людини та миші (*int-1*) [11, 12]. Зрештою цей білок було перейменовано в Wnt-1. З огляду на виняткову важливість Wnt-1 в ембріональному розвитку багатьох організмів та його високу консервативність [13], ці роботи започаткували цілу низку досліджень. Це дало змогу виявити ще 19 глікопротеїнів, які об'єднано в родину Wnt [13, 14]. Цікаво, що ранні дослідження виявили зв'язок між наслідками делетування гена *wingless* та спектром порушень розвитку *Drosophila*, які при цьому спостерігаються [15].

Було показано, що ці молекули відносяться до великої родини цистеїн-багатих секреторних глікопротеїнів [13, 16], які є ефекторними молекулами сигнального шляху Wnt, які хоч і характеризуються значною гомологією пептидних послідовностей, однак, залежно від умов, мають різну і часто антагоністичну дію [17]. Було виявлено кілька родин рецепторів, з якими взаємодіють ці регуляторні молекули, зокрема, рецептори родини Frizzled та білки, споріднені з ліпопротеїнами низької щільності, а також рецептори родини Ror та Ryk [14, 16, 18]. В подальшому було показано,

що центральним медіатором канонічного Wnt шляху є білок armadillo, відомий також як β -катенін [19]. Загалом, у результаті цілої низки робіт було виділено кілька гілок цього сигнального шляху: канонічний Wnt/ β -катеніновий та 3 неканонічних: 1) Ca^{2+} / PKC - залежний, 2) сигнальний шлях, що забезпечує зниження рівня цГМФ-специфічних фосфодієстераз та 3) Wnt шлях, що відповідає за планарну полярність клітин [16, 18, 20]. Вважається, що канонічний шлях регулюється лігандами Wnt 1, 3a, 8, неканонічний – 5a та 11 [18].

1.1. Загальна характеристика канонічного Wnt шляху

Сигнально-регуляторний шлях Wnt – еволюційно консервативний механізм контролю клітинної проліферації та диференціації. Завдяки цьому Wnt сигналінг має критичне значення не лише в канцерогенезі та ембріогенезі, зокрема, кардіогенезі, а й у функціонуванні та регенерації органів постнатального організму [21–27]. Молекулярні компоненти, організація та функціонування Wnt сигнально-регуляторного шляху активно та широко досліджуються багатьма групами вчених [24–26]. Нині накопичено цілу низку даних щодо того, як організований та як функціонує Wnt сигналінг в клітині. Зокрема, багато уваги приділяється одній з гілок цього сигнального шляху – канонічному Wnt сигналінгу (рис. 1.1). Важливим компонентом цієї гілки сигнального шляху є багатофункціональний білок β -катенін. Варто зауважити, що останній є не лише компонентом канонічного Wnt сигналінгу, а й має важливу структурну функцію [28].

Регуляція канонічного Wnt сигналінгу є складним і багаторівневим процесом. Загалом активність його перебуває під строгим контролем і конститутивна активація має місце лише в певних нішах постнатального

організму. Регуляція цього сигнального шляху опосередковується дією негативних та позитивних сигналів (Wnt-лігандів та sFRP) [29–31].

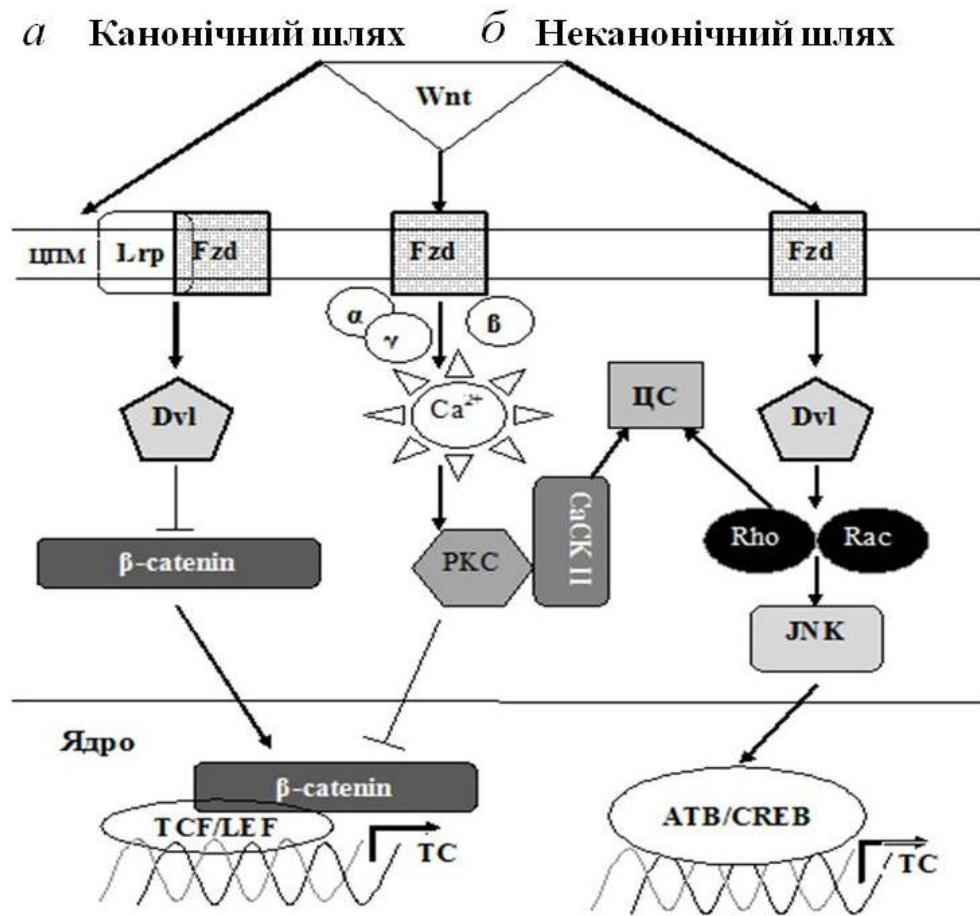


Рис.1.1. Схематичне зображення Wnt сигнального шляху: *а*- канонічний Wnt сигнальний шлях (I); *б* - неканонічний Wnt сигнальний шлях, що включає в себе принаймні дві гілки: Ca^{2+} / протеїнкіназа С - залежний (II) та RhoA/JNK-залежний шляхи (III). Wnt - секреторні Wnt-ліганди; ЦС – цитоскелет; ЦПМ – цитоплазматична мембрана; ТС – транскрипція; Fzd – білки, споріднені з білками Frizzled; Lrp – білки, споріднені з рецепторами до ліпопротеїнів низької щільності; Dvl – внутрішньоклітинний ефекторний білок dishevelled, активація останнього при взаємодії з комплексом Fzd / Lrp призводить до стабілізації β -катеніну; PKC – протеїнкіназа С; CaMKII – кальмодулін-залежна протеїнкіназа другого типу; Rho / Rac, JNK – кінази, які активуються в RhoA / JNK сигнальному шляху

Було постульовано, що реакція на зміни рівня сигнальної активності Wnt шляху є тканиноспецифічною.

Автори висунули цікаву гіпотезу, що, залежно від тканини, встановлюється певний (достатній) рівень активності цього сигнально-регуляторного шляху, який забезпечує нормальну роботу цієї тканини та підтримання кількості слабо диференційованих клітин в популяціях стовбурових клітин. Зокрема, строгий контроль рівня активності цього сигнального шляху критичний для процесів ембріогенезу (закладання осі ембріона), для злоякісних трансформацій певних тканин (особливо ШКТ та печінки) [32].

У ссавців було виявлено близько 19 глікопротеїнів родини Wnt [13, 17]. Ці білки умовно поділяють на 2 різні типи, а саме: Wnt-1, Wnt-3, Wnt-3a та Wnt-7a, які здатні індукувати трансформацію клітинної лінії C57MG, та Wnt-2, Wnt-4, Wnt-5a, Wnt-5b, Wnt-6, Wnt-7b та Wnt-11, у яких ця здатність слабо виражена або відсутня [13]. Завдяки особливостям свого складу (наявності вуглеводних залишків) ці білки характеризуються надзвичайно широким спектром біологічних властивостей [13, 17, 22, 33–39].

Біологічна функція цих секреторних молекул реалізується через взаємодію з рядом клітинних рецепторів, зокрема, Lrp5/6 та Frizzled (Fz) [13, 16, 40–43]. В міжклітинному просторі можуть міститись також інші секреторні білки, які регулюють активність канонічного Wnt сигналіngu, зокрема, антагоністи Wnt-лігандів родин sFRP та DKK [13, 16, 29, 30].

Було показано, що за відсутності Wnt-лігандів цитозольний β -катенін зв'язується із аксином та APC. Таким чином, формується аксиновий, або деградувальний комплекс [44–47]. Склад та динаміка останнього досліджувалися та ревізувалися протягом останніх років.

Нині відомо, що основними компонентами цього комплексу, крім аксину та білка adenomatous polyposis coli (APC), є й інші білки - GSK3, SK1 тощо [22]. Після формування комплексу β -катенін фосфорилується казеїн-

кіназою 1α (CK1 α) за амінокислотним залишком Ser45 та кіназою глікоген-синтази 3β (GSK3 β) за залишками Ser33, Ser37 та Thr41 (рис. 1.2) [46].

Фосфорильований β -катенін піддається деградації в протеосомах, що забезпечує підтримання цитозольного рівня цього білку на низькому (базальному) рівні. Таким чином у клітині регулюється рівень канонічного Wnt сигналіngu.

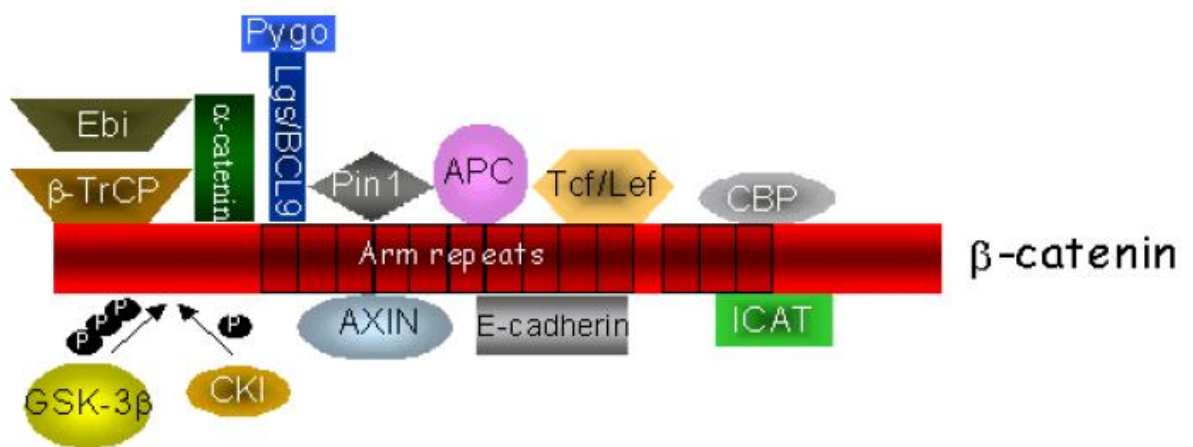


Рис. 1.2. Структура та білок-білкові взаємодії білка β -катеніну (адаптовано за [48]). β -TrCP - білок, що містить β -трансдуктивний повтор; Ebi - білок Ebi, що містить F-бокс-подібний / WD повтор; GSK3 β - кіназа глікоген-синтази-3, β -ізоформа; CK1 - казеїн-кіназа першого типу; APC - Adenomatosis polyposis coli; Tcf / Lef - білки родини факторів T-клітин/факторів стимуляції лімфоцитів, транскрипційні фактори; Lgs - білок Legless; Pygo - білок Pygopus; VCL-9 - В-клітинна CLL / лімфома 9; Pin1 - пептиди-проліл *cis-trans* ізомераза першого типу; CBP - білок, що зв'язується з CREB; ICAT – білок-інгібітор β -катеніну та TCF4

Однак, при активації канонічного Wnt сигналіngu, а саме за умови наявності Wnt-лігандів, відбувається їхня взаємодія з рецепторами на поверхні клітин. Варто зауважити, що рецептори Wnt-лігандів складаються з

корових білків Frizzled (Fz) та білків-корцепторів, споріднених з ліпопротеїнами низької щільності - 5/6 (LRP5/6), Ryk, Ror2 та інших [17, 22].

В результаті такої взаємодії формується Wnt сигналосома, яка взаємодіючи з деградувальним комплексом, призводить до вивільнення β -катеніну та його дефосфорилювання [13, 22, 26].

Власне, процес дефосфорилювання β -катеніну за залишками Ser33, Ser37 та Thr41 іще називають стабілізацією цього білка, а сам β -катенін після вивільнення з деградувального комплексу називається стабілізованим [46, 49]. Після цього відбувається накопичення β -катеніну в цитоплазмі та подальша транслокація його в ядро, хоча точний механізм цього процесу до кінця не з'ясовано [19, 36, 50–52].

1.2. Ядерна локалізація β -катеніну

Особливої уваги заслуговують події, що відбуваються в ядрі клітини після надходження туди β -катеніну. Це питання є комплексним і включає в себе стан хроматину на момент потрапляння β -катеніну, наявність та спектр його ко-регуляторів, тощо, оскільки все це впливає на активацію канонічної гілки Wnt сигналінгу.

Важливою умовою для активації генів-мішеней канонічного Wnt є стан, в якому клітина перебуває на момент стимулюючої дії, а саме стан інших сигнально-регуляторних систем та стан репресувального комплексу генів-мішеней в ядрі. Важливість ця обумовлена тим фактом, що β -катенін як основний медіатор канонічного Wnt шляху взаємодіє не безпосередньо з хроматином, а опосередковано через утворення комплексу із транскрипційними факторами родини TCF / LEF [26]. Зокрема, у ссавців було

виявлено 4 білки, що належать до цієї родини, які мають як активуючу, так і супресорну дію на гени-мішені. Відомо, що TCF1 та LEF1 експресуються в Т-клітинах та ранніх В-клітинах, а в експериментах із нокаутними тваринами було показано, що вони мають аналогічну дію. Крім того, було виявлено ряд інших білків, споріднених за патерном розпізнавання ДНК-послідовностей [19].

Послідовність (ССТТТGATS) було ідентифіковано *in vitro* як необхідну і достатню для активації транскрипції генів-мішеней Wnt шляху [19, 26]. Важливо, що у перших дослідженнях консенсусну послідовність ідентифікували для родини транскрипційних факторів родини TCF / LEF в культурах клітин пухлин людини. Однак, хоча в подальших дослідження її використовують для створення трансгенних тварин, було помічено, що ефективність взаємодії транскрипційних факторів з ДНК не залежить напряду від послідовності ДНК і не є строго консервативною. Тобто, при наявності кількох замін часто ефективність активації сигналіngu не міняється [26].

Нині відомо, що понад 80 генів перебуває під безпосереднім контролем канонічного Wnt сигналіngu, серед яких гени, що контролюють клітинний цикл, проліферацію, диференціювання та багато інших процесів [26, 53, 54]. Для цих генів добре охарактеризованим є патерн взаємодії активувального комплексу, який включає в себе білки родини TCF / LEF, коактиватори (β -катенін), або корепресори (p300, CBP, Groucho) з енансерними послідовностями та послідовностями, що містяться в 5'-UTR зоні [53, 55]. Цікаво, що для цих генів добре охарактеризованими є мотиви взаємодії активувального комплексу з послідовностями, що містяться в 5'-UTR зоні, а також енансерними послідовностями. Ці дослідження проводились з використанням культур клітин різного видового та тканинного походження. Однак, вперше регуляторні послідовності було виявлено із

використанням культур клітин, отриманих із колоректального раку людини [56].

В подальшому було показано консервативність регуляторних послідовностей у інших видів ссавців, зокрема, у миші та щура [57–59]. Однак, в останні роки з розвитком технологій секвенування геному та аналізу отриманих даних було висунуто гіпотезу, що у випадку тканини серця ці регуляторні послідовності є низькоконсервативними та видоспецифічними [60]. На користь цього припущення свідчать масивні експериментальні дані з масштабного дослідження транскриптому різних типів клітин, де було показано, що лише близько 5% генів, які регулюються Wnt шляхом перекриваються у різних видів організмів [53]. Крім того, в літературі описана можливість активації таргетних генів Wnt шляху при взаємодії β -катеніну не лише з TCF / LEF, а й з іншими транскрипційними факторами та ядерними рецепторами [26]. Так, було встановлено, що сам TCF / LEF здатен регулювати такі ефектори, як MMP-7, c-Myc та VEGF (vascular endothelial growth factor), безпосередньо впливаючи на функціонування клітин.

Для загального розуміння варто також зауважити, що при дослідженні генів, які експресуються диференціально під контролем Wnt шляху, було виявлено, що 14 його таргетних генів самі залучені до контролю 36 генів інших сигнальних шляхів. Тобто, автори схильні вважати канонічний Wnt шлях не просто сигнально-регуляторним каскадом, який регулює деякі таргетні гени, прямо впливаючи на клітини, а швидше регулятором вищого порядку [53].

Крім класичних таргетних генів, було ідентифіковано цілу панель генів, зміни експресії яких вказують на активацію канонічного Wnt сигналінгу. Серед них в дослідженнях гіпертрофії найчастіше фігурують *ANP*, *c-fos*, *c-myc*, *конексин 43*, *циклін D1* та деякі інші [61].

Окрім того, в літературі висловлюються цікаві припущення стосовно Wnt-незалежної активації β -катеніну, а також стосовно реалізації активації Wnt шляху через транскрипційні фактори, інші, ніж класичні TCF / LEF, наприклад через Oct-3/4 [50].

Отже, канонічний Wnt шлях має досить складну регуляцію і реалізація його дії відбувається за участі різних білків залежно від стану клітин та її компонентів (особливо хроматину), наявних уже білкових комплексів, тощо.

1.3. Роль β -катеніну в підтриманні структурної цілісності міокарда

Білок β -катенін перебуває в клітинах, зокрема, в кардіоміоцитах, в двох пулах: відносно стабільний мембрано-асоційований пул та відносно динамічний цитозольний пул, який відіграє роль в Wnt сигналінгу (рис. 1.3) [18, 20, 63]. Структурна функція β -катеніну полягає у підтриманні міжклітинної адгезії завдяки чіткій та правильній організації адгеринових з'єднань. Останні у клітинах серця, разом із поровими з'єднаннями та десмосомами, утворюють інтеркалярні диски і складаються із трансмембранного білка N-кадгерину та його цитоплазматичних партнерів α - та β -катенінів [21, 34]. У своїй структурі β -катенін має зв'язувальні сайти для N-кадгерину та α -катеніну, завдяки чому він і підтримує зв'язок кадгерину з актиновими філаментами клітини [64, 65]. Було показано, що в кадгерин-катенінових з'єднаннях, незважаючи на відносно значну стабільність β -катеніну, можливе його заміщення новосинтезованими молекулами цього білку [18].

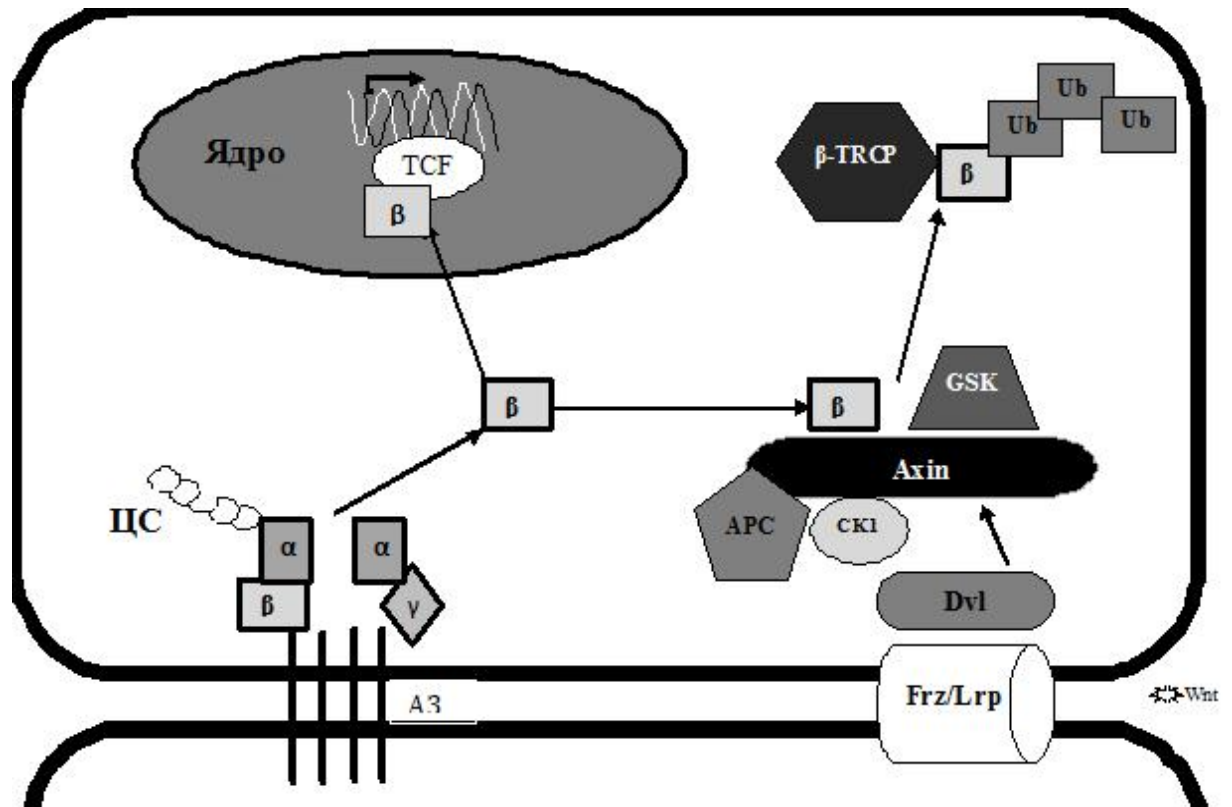


Рис 1.3. Подвійна функція β -катеніну в кардіоміоцитах. АЗ – адгеринові з'єднання; β – умовне позначення білка β -катеніну; γ – умовне позначення білка плакоглобіну; α – умовне позначення білка α -катеніну; GSK – кінза глікоген-синтази; APC – Adenomatosis polyposis coli; CK1 – казеїн-кінза першого типу; TCF – фактор Т клітин, транскрипційний фактор; Ub – убіквітин; β -TRCP – E3 убіквітин лігаза; Wnt – розчинні ліганди Wnt; Dvl – компонент Wnt сигналіну білок Dishevelled; Frz / LRP – рецептори Frizzled та LRP (low-density lipoprotein receptor-related protein), компоненти Wnt сигнального шляху; \curvearrowright – транскрипція таргетних генів

Структурна та функціональна цілісність кадгерин-катенінового комплексу регулюється фосфорилюванням його компонентів за залишками серину та треоніну [66]. Нині відомо, що фосфорилювання β -катеніну за залишками тирозину (зокрема, 654) призводить до втрати його взаємодії з кадгеринами [20, 28, 49, 66]. Саме це фосфорилювання призводить до

зростання цитозольного пулу β -катеніну та реалізації його сигнальної функції.

Варто зауважити, що нормальна організація та функціонування міжклітинних контактів — надзвичайно важливі умови як для нормального кардіогенезу, так і для функціонування постнатального серця [28, 63]. У ранньому ембріогенезі та кардіогенезі правильна динаміка адгеринових з'єднань важлива при міграції клітин, при формуванні полярності тканини, що закладається (просторової організації), а також при епітеліально-мезенхімальної (EMT) та мезенхімально-епітеліальній (MET) транзиціях [28, 63].

Із застосуванням умовнонокаутних тварин було показано, що кардіоспецифічна делеція гена β -катеніну у сформованому ембріональному серці не спричиняла порушень розвитку органа на відміну від його трансмембранного партнера — N-кадгерину [5].

Однак, повна втрата гена β -катеніну була асоційована із летальністю таких тварин у пізньому ембріогенезі та у ранні терміни після народження. Автори висувають припущення, що структурна функція β -катеніну у пізньому кардіогенезі не є критичною для утворення цілісної тканини, і втрата останнього компенсується іншим білком — членом родини катенінів — плакоглобіном або γ -катеніном [67, 68]. Варто зауважити, що γ -катенін, основний катенін десмосом, має високу ступінь гомології до β -катеніну і завдяки цьому здатен підтримувати і структуру адгеринових з'єднань [28].

Важливість β -катеніну у підтриманні структурної цілісності тканини міокарда вивчалась і у дорослому серці. Нокаут гена β -катеніну у дорослому серці мишей не призводив до летального ефекту, більше того, мутантні тварини не відрізнялись від нормальних ні за фізіологічними, ні за морфологічними ознаками [67, 68].

Імунологічні дослідження виявили, що за умов делеції гена β -катеніну відбувалось підвищення рівня експресії гена γ -катеніну [69]. Іншою групою

авторів було показано, що делеція гена *β -катеніну* у дорослих кардіоміоцитах не спричиняла порушень функції серця чи морфології [6]. Однак, у цій же роботі автори спостерігали активацію сигнальної функції *β -катеніну* при розвитку гіпертрофії. Цікаво також, що більш тривалі спостереження за тваринами із кардіоспецифічною делецією гена *β -катеніну* показали, що втрата останнього призводила до витончення стінок серця [68].

Аналізуючи існуючий масив даних, можемо зробити припущення, що для формування та підтримання цілісної тканини міокарда адгеринові з'єднання мають критичне значення і порушення їхньої організації досить часто має летальні наслідки. Однак, структурна функція саме *β -катеніну* у зазначених процесах не може бути принциповою, оскільки втрата останнього може бути компенсованою за рахунок *γ -катеніну*. Тож, порушення раннього кардіогенезу, чи летальність у пізньому ембріогенезі, чи розвиток гіпертрофії і погіршення функції дорослого серця у експериментальних тварин з нокаутом гена *β -катеніну* скоріш за все є наслідком порушення саме сигнальної функції останнього та канонічного Wnt сигналінгу.

1.4. Канонічний Wnt сигналінг як один із принципових регуляторів кардіогенезу

Розвиток і формування багатоклітинного організму — це надзвичайно складний і добре скоординований процес, керування яким забезпечується взаємодією еволюційно консервативних сигнальних шляхів, таких як Wnt, BMP, HH / SHH та інші. Їхня дія забезпечується вивільненням сигнальних молекул, що регулюють ці шляхи, різними популяціями клітин в точний час в певному місці [17].

Як відомо, серце є першим органом, який закладається у процесі ембріогенезу хребетних [40, 70–72]. Воно виникає з прогеніторних клітин, які є частиною популяції мезодермальних клітин ембріона. Ці клітини забезпечують закладання першого та другого серцевих полів. Також важливу роль у закладанні ембріонального серця відіграє популяція прогеніторних клітин, які походять з нервового валика і забезпечують розвиток «пейсмейкерних» нервових клітин. Розвиток серця хребетних тварин поділяють на різні фази, зокрема, специфікацію міо- та ендокардіальних клітин-попередниць, що забезпечує формування парних кардіальних полів в антеріо-латеральній мезодермі; формування трубчатого серця (серцевої трубки) шляхом злиття цих парних кардіальних полів перед стравоходом; формування вигину стравоходу; формування вигину серцевої трубки; закладання камер серця; септацію та формування клапанів (рис. 1.4) [43, 73].

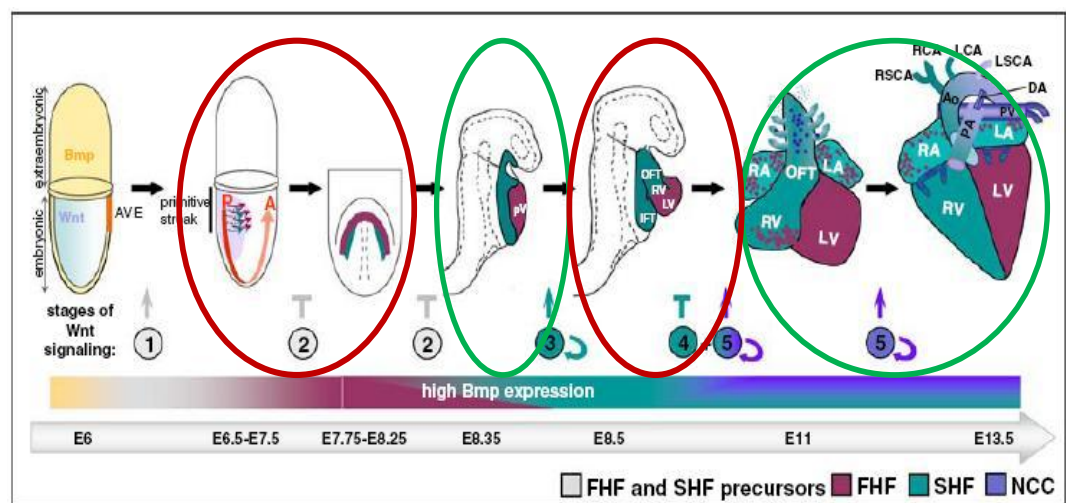


Рис. 1.4. Динаміка канонічного Wnt/β-катенінового сигналіну в кардіогенезі [24]. NCC – клітини нервового серпа, SHF – друге серцеве поле, FHF – перше серцеве поле, LV – лівий шлуночок, RV – правий шлуночок, LA – ліве передсердя, RA – праве передсердя, Ao – аорта

Загалом дослідженню кардіогенезу присвячено надзвичайно багато робіт [72], тому в даному розділі ми не будемо торкатися загальних питань ембріології серця, а детальніше зосередимося на дослідженнях сигнальної регуляції цього процесу як *in vivo*, так і *in vitro*.

Сигнальні молекули, які потрібні для індукції та / чи підтримання експресії генів ранніх кардіальних маркерів, належать до ростових факторів родин FGF, BMP та Wnt [72, 73]. Імовірно, відіграють певну роль в функціонуванні серця на ранніх етапах ембріогенезу і сигнально-регуляторні шляхи, важливі для функціонування дорослого (постнатального) міокарду, такі як MAPK-кіназний та PI3K-mTOR-залежний шляхи [34, 74, 75].

Wnt/ β -катеніновий сигналінг є критично важливим для розвитку ембріонального серця хребетних тварин. Була показана виняткова роль змін активності цього сигнального шляху в часі та просторі при кардіогенезі [76–78].

Значна частина відомих на сьогодні даних про структурну та сигнальну функцію β -катеніну під час ембріонального розвитку було отримано з використанням нокаутних та трансгенних мишей [24]. Варто зауважити, що створення та використання тварин із умовними мутаціями, що призводять до втрати або підвищення функції гена *β -катеніну* дали змогу детальніше дослідити розвиток та гомеостаз серця на рівні організму, а також значення Wnt/ β -катенінового сигналінгу у цих процесах.

У результаті таких робіт показано, що делеція гена *β -катеніну* на стадії зиготи призводила до серйозних дефектів гастрულляції, спричиняла порушення розвитку структур голови і серця ембріона, та призводила до смертності [24, 79]. Зниження рівня β -катеніну призводило до зниження рівня білку Dickkopf в ембріональній ендодермі під час закладання серця з ембріональної мезодерми [3].

Умовне видалення гена *β -катеніну* у ендодермі ембріона миші спричиняло перепрограмування клітин ендодерми у серцеву мезодерму,

внаслідок чого розвивались ембріони з кількома серцями [3]. На думку авторів, усі ці вади ембріогенезу спричинені не порушеннями міжклітинної адгезії, оскільки γ -катенін компенсував відсутність β -катеніну та був залучений до формування та підтримання адгеринових з'єднань, а порушеннями сигнальної регуляції проліферації та диференціювання клітини у ранній ендодермі.

Цікавою також є робота, в якій експериментально було змодельовано різні дози катеніну. Це дало змогу постулювати дозо залежний ефект дії β -катеніну в процесі гастрюляції [80]. Цілком імовірно, що такий ефект активності канонічного Wnt сигналіngu може мати і в постнатальний період. Загалом, така знахідка дала змогу висунути припущення про важливу функцію канонічного Wnt сигналіngu та, зокрема, β -катеніну, не лише у ембріогенезі, а й у функціонуванні постнатального серця ссавців.

З використанням тварин з умовним нокаутом гена *β -катеніну* в мезенхімальних клітинах, з яких в ембріогенезі закладаються первинне та вторинне кардіальні поля, було показано, що зниження рівня активності канонічного Wnt сигналіngu впливає лише на закладання клітин вторинного кардіального поля [81]. Це виражалось в порушеннях вигинання кардіальної трубки (absence of cardiac looping), зменшенні правого шлуночка та відсутності прогеніторних клітин, що експресують маркер *Isl1+* [81].

Отже, було показано виняткову роль канонічного Wnt сигналіngu для розвитку ембріона хребетних в цілому та для кардіогенезу зокрема. Активність цього сигналіngu чітко регулюється в часі та просторі, що забезпечує нормальне закладання серця (рис. 1.4).

Зокрема, було показано, що строгий контроль над процесами зростання та пригнічення активності канонічного Wnt шляху, які супроводжуються пригніченням та зростанням антагоніста цього шляху – BMP (відповідно), є критичними для нормального кардіогенезу.

1.5. Канонічний Wnt/ β -катеніновий сигналінг в постнатальному серці

У цій частині огляду ми перш за все зосередимось на питаннях функціонування дорослого серця у нормі та при розвитку патології, а також ролі канонічного Wnt сигналінгу у зазначених процесах. Як вже згадувалось вище, сигнальна функція канонічного Wnt сигналінгу та β -катеніну, зокрема, є критичною у регуляції кардіогенезу. Однак, його функція у дорослому серці є дещо дискусивною. Експериментально, ядерну локалізацію β -катеніну у кардіоміоцитах було виявлено лише у ранніх ембріональних клітинах серця та у лінії клітин кардіоміоцитів HL-1 [82]. У дорослому здоровому серці не спостерігали ядерної локалізації β -катеніну ані у дикотипних тварин, ані у тварин із генетично-модифікованою стабілізованою формою останнього. Тож у сучасній науці панує думка, що канонічний Wnt сигнальний шлях не відіграє або майже не відіграє суттєвої ролі у дорослому здоровому серці [7].

Однак, низка експериментальних даних свідчить про важливу функцію канонічного Wnt сигналінгу та β -катеніну при перебудовах дорослого міокарда асоційованих із патологією серцево-судинної системи, старінням та фізичним навантаженням [31, 32, 36, 54, 83–87].

1.5.1. Патологія серцево-судинної системи. Серед серцево-судинних захворювань (ССЗ) найбільш поширеними причинами смертності є інфаркт міокарда, фібриляція передсердь, серцева недостатність, однак такі ССЗ, як гіпертрофія, гіпертонія, тахікардія, ішемія міокарда та інші привертають не менше уваги, оскільки призводять до втрати працездатності і є надзвичайно поширеними в сучасному світі [1, 47, 88, 89].

Загалом ССЗ характеризуються порушеннями цілісності стінок серця та/або судин, порушенням його іннервації та кровопостачання, порушенням

кров'яного тиску і т.д. Зважаючи на те, що в результаті цих порушень серцево-судинна система (ССС) втрачає можливість виконувати свою функцію, особливу увагу дослідників привертає подолання цих станів. Серед механізмів, які допомагають серцю та судинам швидко відновити свою функцію є заміщення уражених тканин фіброзом, розвиток гіпертрофії решти скоротливої тканини з метою відновлення скоротливої функції, розвиток запалення та апоптоз пошкодженої тканини. Однак при тривалій дії цих механізмів «швидкої допомоги» може розвиватись дилатація, фіброзисне заміщення нормальної тканини тощо, що призводить до подальшої втрати нормальної функціональності ССС [47, 88, 90].

Загалом відомо, що серце людини і інших ссавців є термінально диференційованим органом, переважна більшість клітин якого втрачає здатність до поділу одразу після народження [91]. Тож, основним механізмом адаптації серця до навантажень, гіпертензії чи старіння є збільшення розміру кардіоміоцитів [18]. Цей процес називається гіпертрофією.

За характером росту нині у літературі виокремлюють концентричну (при дії надлишкового тиску) та ексцентричну (при дії надлишкового об'єму) гіпертрофії [92]. Окрім того, деякі автори розділяють гіпертрофію і за типом чинників, що спричиняють її розвиток, а саме виокремлюють фізіологічну та патологічну гіпертрофії (табл. 1.1). Ці автори відмічають, що фізіологічна гіпертрофія розвивається під час тренувань, при постійному фізичному навантаженні, під час вагітності, а також у підлітків в період активного росту організму [47, 93].

Цей стан є нормальним і навіть корисним, оскільки допомагає серцю подолати стресові умови без втрати його нормального функціонування. Крім фізіологічної, в літературі описується також патологічна гіпертрофія. Вважається, що на відміну від фізіологічної гіпертрофії, патологічна призводить до збільшення розмірів кардіоміоцитів, але без збереження нормальної функції міокарда [18, 93–95].

Таблиця 1.1

**Порівняльна характеристика патологічної та
фізіологічної гіпертрофій серця**

Ознаки	Фізіологічна (компенсаторна) гіпертрофія	Патологічна гіпертрофія
Фенотип	Збільшення лінійних розмірів клітин, потовщення стінок серця [96]	Збільшення ширини та/або довжини кардіоміоцитів, витончення стінок серця, фіброз, порушення метаболізму жирних кислот, погіршення функції серця, [96, 97]
Гіпертрофічні стимули	Вагітність, фізичні навантаження, фаза активного росту [47, 93, 98]	Дія надмірного тиску чи об'єму на камери серця, хімічні фактори, гормони [98–103]
Основні генетичні маркери	<i>ANP, BNP, β-MHC</i> [47, 98, 104]	<i>ANP, BNP, α-MHC, β-MHC, SERCA</i> [47, 98, 104]
Сигнальні шляхи	Src, JNK, p38, Akt [98, 105], MAPK [88]	Канонічний Wnt, Src, ERK1/2, JNK, p38, Akt, Cacleneurin, NFAT [50, 98, 107]
Подальший перебіг (прогноз)	Патологічна гіпертрофія (?)	Погіршення функції серця, серцева недостатність

При цьому спостерігається збільшення товщини стінок серця, оскільки кардіоміоцити збільшуються в товщину більше, ніж в довжину, а також розвивається фіброзис тканини міокарда. Показано, що майже завжди патологічна гіпертрофія супроводжується значними морфологічними перебудовами та зрештою призводить до відмови серця у випадку, якщо

патологічні стимули продовжують діяти на серцеву тканину тривалий час [18, 93–95].

Загалом при фізіологічній гіпертрофії спостерігається перехід на окиснення жирних кислот міокардом та біогенез мітохондрій, а при патологічній – ембріоналізація серця, розвиток запалення, апоптоз кардіоміоцитів та перехід на гліколіз для отримання енергії. Спільними для обох видів гіпертрофії є процеси підвищення рівня синтезу білків та зміни позаклітинного матриксу [93, 108]. Варто також зауважити, що фізіологічна гіпертрофія за певних умов може переходити у патологічну [93, 109, 110]. При розгляді класифікації цієї патології та дискусії навколо неї, нас перш за все цікавить молекулярно-генетична природа їх виникнення та різниця між ними.

Дійсно, гіпертрофія міокарда окрім морфологічних та функціональних змін характеризується і низкою молекулярно-генетичних процесів [111].

Незважаючи на суттєвий прогрес у розумінні змін на гістологічному і морфометричному рівнях, молекулярно-генетичні процеси, що лежать у основі цих перебудов залишаються не до кінця з'ясованими [47]. Так, автори зазначають, що молекулярні процеси при розвитку гіпертрофії, індукованої фізичними навантаженнями та вагітністю, різні [47].

Експериментально було встановлено і різні молекулярні профілі для гіпертрофії міокарду, що була стимульована фізичними тренуваннями та підвищеним артеріальним тиском [98, 112]. Загалом, автори показали, що при адаптації серця до фізичних навантажень, на відміну від гіпертензії, порушення експресії генів гіпертрофічної відповіді (*SERCA*, *ANP*, *BNP*, β -*MHC*) або взагалі не спостерігається, або спостерігається лише для деяких із них [98].

При цьому, загальна картина ще менш зрозуміла, якщо говорити про сигнально-регуляторні шляхи, які керують перебудовами міокарда при розвитку різних типів гіпертрофії. Загалом, було показано, що патологічна

гіпертрофія та гіпертрофія, що розвивається в результаті тренувань, залежать від Akt кіназної активності, а також Wnt сигнального шляху, що регулюється Akt кіназою [47, 50], на відміну від гіпертрофії, що розвивається при вагітності [106].

Однак, незважаючи на існуючу дискусію стосовно класифікації гіпертрофії, ми вважаємо, що залежно від типу чинників, наприклад, систематичні фізичні навантаження, вагітність, гормональні стреси, старіння, гіпертензія та інше, активуються різні сигнально-регуляторні механізми клітини, що врешті рещт призводить до патологічного фенотипу. І, незважаючи на окремі експериментальні дані про принципову важливість GSK та β -катеніну у розвитку гіпертрофії, значення канонічного Wnt сигналінгу у цих процесах, лишається нез'ясованим.

Отже, гіпертрофія міокарда — це захисна адаптивна реакція серця до дії як гормональних так і фізіологічних чинників, це складний багатоетапний процес, що регулюється низкою молекулярно-генетичних механізмів та сигнальних каскадів. Розуміння цих процесів має надзвичайне значення не лише для фундаментальної науки, а й для медицини.

1.5.2. Канонічний Wnt сигналінг у перебудовах дорослого міокарда та розвитку гіпертрофії. У сучасній літературі не існує однозначної думки стосовно ролі Wnt/ β -катенінового сигналінгу у розвитку гіпертрофії серця [73, 86, 107]. Відомо, що кардіоміоцити — це термінально диференційовані клітини, які здатні збільшуватись у процесі росту всього організму (еутрофія), а також у відповідь на дію відповідних стимулів (гіпертрофія). *In vivo* гіпертрофічний ріст кардіоміоцитів є важливим механізмом адаптації як до фізіологічних навантажень, так і до патологічних стимулів, таких як гіпертензія, інфаркт міокарда [86]. Безпосередніми причинами перебудов міокарда є тривалий гемодинамічний стрес (надлишок тиску та \ чи об'єму), біохімічний стрес та нейрогуморальний стрес [113]. При цьому

спостерігають повернення серця до фетальної програми експресії генів, що забезпечує пригнічення аеробного метаболізму та підвищення за рахунок цього ефективності роботи серця [114, 115]. Це можливо за рахунок реактивації в дорослому серці деяких сигнальних каскадів, які мають критичне значення і у розвитку ембріонального серця [113]. Було виявлено цілу низку генів, що змінюють свою експресію при розвитку гіпертрофії, зокрема, *c-fos*, *c-jun*, *c-myc*, *ANF* (відомий також як *ANP*), β -МНС, α -*skeletal actin*, α -МНС, *SERCA* та деякі інші [113].

Канонічний Wnt сигналінг є одним із принципових регуляторів кардіогенезу та, ймовірно, постнатального розвитку серця [35,84,25]. Така думка ґрунтується на експериментальних даних, що демонструють важливу роль цього сигнального каскаду у гіпертрофічному рості кардіоміоцитів та його асиметричну активацію в клітинах-попередниках кардіоміоцитів [77, 85, 107]. Окрім того, було показано градієнтне поширення активності Wnt в постнатальному серці [116], що позитивно впливає на проліферацію кардіоміоцитів, зокрема, через циклін D2. Прийнято вважати, що в постнатальному серці активність канонічного сигналінгу перебуває на базальному рівні [77, 80, 81]. Однак, не виключають реактивацію його активності при розвитку патології та перебудов [84, 96, 117].

Низка експериментальних робіт свідчить про критичне значення GSK3 β та β -катеніну у розвитку гіпертрофічної відповіді. Так, показано, що підвищення активності GSK3 β стримує розвиток гіпертрофії [118]. Експериментально показано, що фенилефрин, ендотелін 1 та хлорид літію — речовини, які спричиняють розвиток гіпертрофії, призводять до стабілізації β -катеніну опосередковано через інгібування GSK3 β [119]. Отримані результати свідчать не лише на користь думки про необхідність стабілізації β -катеніну при гіпертрофічній відповіді, а й про те, що активація сигнальної функції останнього може бути як Wnt-залежною, так і Wnt-незалежною.

Припущення про необхідність активації сигнальної функції β -катеніну у процесі розвитку гіпертрофії міокарда підтверджують і результати отримані іншими авторами. Так, із використанням трансгенних тварин, що надекспресують ген *Dvl-1* винятково у кардіоміоцитах показано, що активація Wnt сигналіngu спричиняє розвиток гіпертрофії та призводить до смертності тварин [107]. Цікаво, що автори спостерігали активацію обох гілок Wnt сигналіngu та реєстрували підвищення рівня експресії β -катеніну і деяких генів-мішеней сигнальної регуляції останнього – *циклін D1* та *c-тус*. Активацію неконічного Wnt сигналіngu реєстрували через 3 місяці після індукції гіпертрофії у тварин із розвиненою патологією. Отримані дані автори підтвердили і у дослідах *in vitro* із використанням культури кардіоміоцитів мишей [107]. Іншою групою дослідників також показано, що надекспресія конститутивно активної форми β -катеніну у культурі клітин спричиняє спонтанну гіпертрофію кардіоміоцитів *in vitro* [8]. Із використанням нокаутних тварин показано, що активація β -катеніну / TCF / LEF сигналіngu необхідна при розвитку стресіндукованої та фізіологічної гіпертрофії [6]. У результаті інших оригінальних досліджень, із використанням умовної кардіоспецифічної делеції гена *β -катеніну*, показано, що гетерозиготна делеція гена *β -катеніну* стримувала розвиток гіпертрофії у мутантних тварин після операбельного звуження аорти порівняно із контролем [120]. Тобто, гіпертрофія не розвивалась у тварин із дефіцитом β -катеніну у тканині міокарда за умов хронічного підвищеного кров'яного тиску, але вчені спостерігали підвищення експресії фетальних генів у таких тварин порівняно із контролем.

На противагу згаданим роботам іншими авторами показано, що делеція β -катеніну у тканині дорослого міокарда призводить до спонтанного розвитку гіпертрофії. Із використанням мишей із конститутивно стабілізованою формою β -катеніну автори спостерігали відсутність гіпертрофічної відповіді після ін'єкцій ангіотенсину II [9]. Варто зауважити,

що у своїх дослідженнях автори [9] аналізували лише розмір кардіоміоцитів та рівень експресії одного з генів маркерів гіпертрофії – *ANF*, в той час як інші автори використовували комплексніший підхід у дослідженнях: визначали індекс співвідношення маси серця до маси тіла, рівень експресії інших маркерних генів гіпертрофії (*BNF*, *α -MHC*, *β -MHC*) або генів мішеней β -катеніну (*циклін D1*, *c-myc*, *c-fos*).

На нашу думку, існуючі у літературі протиріччя можна пояснити різними підходами до проведення експериментів та різними строками спостережень. Вірогідно, сигнальна функція β -катеніну та Wnt/ β -катенінового сигналіну необхідна на початкових стадіях розвитку гіпертрофії, про що переконливо свідчать експериментальні роботи із використанням різних гіпертрофічних стимулів. Так, нещодавно із використанням *BATGAL* репортерних мишей було показано, що при дії гіпертрофічних стимулів відбувається активація сигнальної функції β -катеніну у серці тварин саме у ранні терміни спостережень [121]. Варто зауважити, що у більш пізні терміни спостережень (7 та 14 доба) автори не фіксували сигнальної активності β -катеніну у клітинах серця дослідних мишей. Автори висувають припущення, що при розвитку гіпертрофії внаслідок хронічного підвищення артеріального тиску відбувається активація канонічного Wnt сигналіну. Однак, активація сигнальної функції β -катеніну подія рання і є необхідною ланкою адаптації серця до гіпертрофічних стимулів та для запуску генетичної програми ембріоналізації міокарда. Така думка узгоджується і з результатами отриманими із використанням ізольованих кардіоміоцитів [121].

При подальшому перебігу патології сигнальна функція β -катеніну, можливо, репресується за участі негативного зворотнього зв'язку («фідбеку») чи інших сигнально-регуляторних механізмів, які контролюють або взаємодіють із Wnt сигналіном. Дійсно, одним із генів-мішеней β -катеніну є ген *Axin 2*, котрий, як згадувалось вище, є важливим компонентом

деградувального комплексу останнього. Описані й інші молекули, що взаємодіють або безпосередньо із стабілізованим β -катеніном, або з комплексом β -катенін / TCF / LEF та у такий спосіб здійснюють негативний фізіологічний «фідбек» Wnt/ β -катенінового сигналіngu [122].

Варто зауважити, що родина катенінів включає кілька білків, зокрема - β і γ . Перші два є дуже подібними за послідовністю. Було показано, що при делеції плакоглобіну в дорослому міокарді зростає рівень β -катеніну, однак таке заміщення не було повністю рівноцінним, оскільки як наслідок розвивалась дилатація міокарда та аритмії [67, 68].

Однак, всі ці дані стосуються значною мірою патологічної гіпертрофії. Стосовно ж адаптації серця до фізичних тренувань, вагітності даних значно менше. Деякі автори припускають, що канонічний сигналінг не бере участі в зазначених процесах [86, 123, 124].

Узагальнюючи огляд літератури, варто зауважити, що вивчення механізмів розвитку постнатального серця та адаптації його до фізичних навантажень має і фундаментальне і практичне значення. Надзвичайно важливим напрямком сучасної науки є пошук основних рушійних механізмів, залучених до перебудов дорослого міокарда та потенційних мішеней для розробки підходів таргетної терапії серцевої недостатності. Зважаючи на існуючий масив експериментальних даних, можемо припустити, що Wnt/ β -катеніновий сигналінг не лише принциповий регулятор кардіогенезу, а й має важливе значення у постнатальному розвитку міокарда та є потенційним медіатором адаптації серця до гіпертрофічних стимулів. Однак, участь канонічного Wnt сигналіngu та β -катеніну у формуванні дорослого серця та розвитку гіпертрофії не до кінця з'ясована і є дещо дискусивною.

Тож метою цієї дисертаційної роботи є дослідження сигнальної функції

канонічного Wnt сигналіngu у розвитку постнатального міокарда та при адаптації дорослого серця до фізичних навантажень за умови кардіоспецифічної гетерозиготної делеції гена *β -катеніну*.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Експериментальну частину досліджень проводили із використанням умовнонокаутних та трансгенних тварин (*Mus musculus*), а також первинних культур кардіоміоцитів. Використання CreLoxP технології дало змогу нам дослідити сигнальну функцію β -катеніну у постнатальному серці та при адаптації серця до фізичних навантажень за умови гетерозиготної делеції досліджуваного гена. У своїй роботі ми аналізували серця самців різних вікових груп, кожна з яких містила не менше 15 тварин для дослідження змін морфометричних індексів та 2-7 тварин для молекулярно-генетичних досліджень. Усі тварини утримувались у віварії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за стандартних умов. Всі експерименти проводились в трьох біологічних повторах.

2.1. Опис біологічних та хімічних агентів, що використовувались у роботі

2.1.1. Біологічні матеріали. В роботі використовували маркери для визначення молекулярної ваги ДНК для електрофорезу, мінімальне середовище Ігла в модифікації Дюльбеко (DMEM), ембріональна сироватка ВРХ.

Використовували також комерційні антитіла проти GSK (Cell Signaling, США), фосфо-GSK 3a/b (Ser21/9) (clone D17D2) (Cell Signaling, # 8566), β -

catenin (Santa Cruz, США), активного β -catenin (anti-ABC) (Ser37 or Thr41) (clone 8E7) (Milipore, # 05-665, Великобританія), ERK (clone L34F12) (Cell Signaling, # 4696, США), фосфо-ERK (Thr202/Tyr20) (clone 197G2) (Cell Signaling, # 4377, США), Akt (clone C20) (Santa Cruz, sc-1618, США), фосфо-Akt (Ser 473) (clone C-11) (Santa Cruz, sc-101629, США) згідно з рекомендаціями виробників.

2.1.2. Хімічні агенти. Перекис водню (вітчизняного виробництва), як агент, що здатен модулювати фізіологічну активність кардіоміоцитів, зокрема, спричиняє ураження кардіоміоцитів та апоптоз [125, 126]. Хлорид літію (вітчизняного виробництва) – індуктор гіпертрофії та активатор канонічного Wnt синалінгу. Відомо, що хлорид літію безпосередньо і специфічно взаємодіє із кіназою глікоген-синтази 3 GSK3, спричиняючи вивільнення β -катеніну із деградувального комплексу [127]. Це, у свою чергу, призводить до накопичення цитозольного β -катеніну та його транслокації в ядро і, як наслідок, взаємодії з транскрипційними факторами родини TCF / LEF.

Окрім того, використовували додецилсульфат натрію (ДСН), гідроксиметилметилен-амін (Tris), етилендіамінтетраамінооцтова кислота (EDTA), гематоксилін, еозин, фуксин кислий, 3-4,5-диметилгіазол-2,5-діфенілтетразоліум бромід (МТТ-реагент), пікринова кислота, набори для Масон-трихромного зафарбування тканини, набори для виділення РНК та синтезу кДНК, набори для ПЛР та ПЛР в реальному часі, Inusolve, хлороформ, ізопропанол, парафін, PBS, диметилсульфоксид, реактив для МТТ-тесту, агароза, етидію бромід, HCl, NaOH, рідкий азот.

Використовували також вітчизняні реактиви класифікації о.с.ч.

2.1.3 Праймери. Для генотипування тварин [5] використовували пари праймерів, наведені в табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Праймери, що використовувалися в генотипуванні

Назва гена	Праймери	Послідовність	Розмір фрагменту, пн
<i>β-catenin</i>	Прямий	5'-AGGTAGAGTGATGAAAGTTGTT-3'	221 та 324
	Зворотній	5'-CACCATGTCCTCTGTCTATTC-3'	
<i>(α-MHC)-Cre-рекомбіназа</i>	Прямий	5'-CAGAACCTGAAGATGTTTCGC-3'	430
	Зворотній	5'-TACACCTCGGTGCTA ACCAG-3'	

Для дослідження рівнів експресії генів гіпертрофічної відповіді та таргетних генів, а також генів, залучених до канонічного Wnt/β-катенінового сигнального шляху [67, 68], використовували пари праймерів, наведені в табл. 2.2.

Синтез праймерів проводили у відділі геноміки ІМБГ НАН України.

Таблиця 2.2

Праймери, що використовувалися в дослідженні рівнів експресії генів

Назва гена	Праймери	Послідовність	Розмір фрагменту, пн
<i>ANP</i>	Прямий	5'-CATCACCCCTGGGCTTCTTCCT-3'	405
	Зворотній	5'-TGGGCTCCAATCCTGTCAATC-3'	
<i>BNP</i>	Прямий	5'-GCGGCATGGATCTCCTGAAGG-3'	418
	Зворотній	5'-CCCAGGCAGAGTCAGAAACTG-3'	

Продовж. табл. 2.2

<i>β-МНС</i>	Прямий	5'-ATGTGCCGGACCTTGGAA-3'	170
	Зворотній	5'-CCTCGGGTTAGCTGAGAGATCA-3'	
<i>α-МНС</i>	Прямий	5'-GGCACAGAAACACCTGAAGA-3'	80
	Зворотній	5'-CATTGGCATGGACAGCATCATC-3'	
<i>TCF-4</i>	Прямий	5'-AACGGAACAGACAGTATAATGG-3'	147
	Зворотній	5'-ACAGGAGTTGAAGGATTAGG-3'	
<i>Axin2</i>	Прямий	5'-GAGTAGCGCCGTGTTAGTGACT-3'	296
	Зворотній	5'-CCGAAAGTCCGGAAGAGGTATG-3'	
<i>c-fos</i>	Прямий	5'-CCGACTCCTTCTCCAGCAT-3'	93
	Зворотній	5'-TCACCGTGGGGATAAAGTTG-3'	
<i>циклін D1</i>	Прямий	5'-CCACAGATGTGAAGTTCATTTCCA- 3'	161
	Зворотній	5'-GCAGTCCGGGTCACACTTG-3'	
<i>c-тус</i>	Прямий	5'-GCCCCTAGTGCTGCATGAG-3'	95
	Зворотній	5'-CCACAGACACCACATCAATTTCTT- 3'	
<i>Cx43</i>	Прямий	5'-TGGCCTGCTGAGAACCTACA-3'	101
	Зворотній	5'-CTCAGGCTGAACCCATAGATG-3'	
<i>GAPDH</i>	Прямий	5'-TGGCCTGCTGAGAACCTACA-3'	108
	Зворотній	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	

2.1.4 Обладнання. Джерело струму MP300-N (MS, США), центрифуга MiniSpin (Eppendorf, Німеччина), мікроскоп PrimoStar (Carl Zeiss Microscopy, Німеччина), центрифуга Marathon Micro A (Fisher Scientific, США), камера для горизонтального електрофорезу (Clever, США), шейкер (BIOSAN, Литва), CO₂-інкубатор Jouan IGO 150 Cell Life (Thermo

Fisher Scientific, США), фотометр для виміру оптичної густини ELx800 (BioTek, США), водяна баня (BIOSAN, Литва), термоциклер T-CY (Crea-Con, Нідерланди), ампліфікатор Real-Time CFX96 (Bio-Rad, США), автоматичні піпетки, штангенциркуль, термостат на 55°C, ваги, торсійні ваги, одноразові мікроцентрифужні пробірки об'ємом 1,5 мл та 0,2 мл, одноразові наконечники для автоматичних піпеток, пластикові планшети на 12 та 96 лунок.

Також використовували інше лабораторне обладнання вітчизняного виробництва.

2.2. Генерація дослідних тварин

Для проведення експериментальної роботи схрещували тварин, що містять у своєму геномі ген бактеріальної Cre-рекомбінази під контролем промотора гена важких ланцюгів міозину (скорочено α -МНС), та тварин, що містять у своєму геномі фланковані loxP-сайтами 1-6-й екзони гену β -катеніну (рис. 2.1). Отже, така модель дає змогу із застосуванням різних типів трансгенних тварин ініціювати делецію гена, що призводить до повної втрати його експресії на рівні білку та РНК.

Сайти loxP - це специфічні послідовності, що розпізнаються бактеріальною Cre-рекомбіназою, тож експресія останньої в ядрі клітини дає змогу проводити або повний, або частковий нокаут фланкованого гена. Варто зауважити, що промотор α -МНС і контрольований ним ген Cre-рекомбінази починає експресуватися у ембріональному серці після закладки першого та другого серцевих полів виключно у кардіоміоцитах [128, 129]. Тож використання такої системи делеції досліджуваного гена дає змогу вивчати

його функцію виключно у кардіоміоцитах, починаючи з 10 доби ембріонального розвитку.

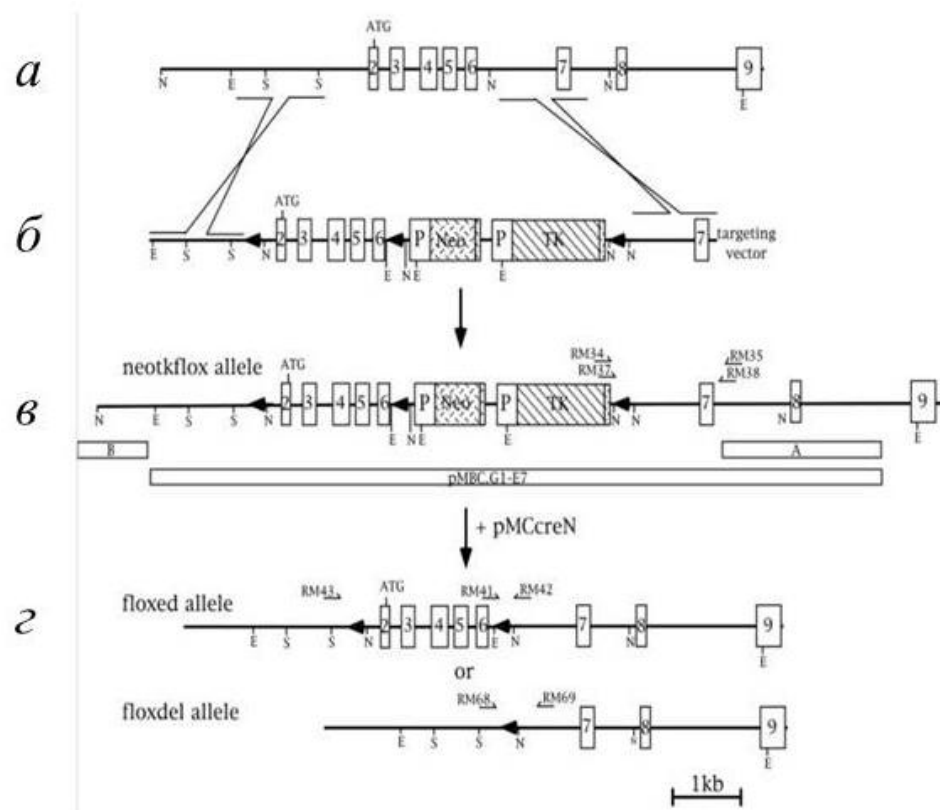


Рис. 2.1. Стратегія створення умовного нокауту гена β -катеніну [130]. Карта рестрикції локусу, що містить ген β -катеніну (а), рекомбінантна конструкція (б) та локус гена β -катеніну після гомологічної рекомбінації (в) та після делетування (г)

Раніше було показано, що повна делеція гена β -катеніну у ембріональному серці є летальною [3, 5], тож, у своїй роботі ми генерували тварин гетерозиготних за делецією гена β -катеніну (або тварин із дефіцитом β -катеніну) у ембріональних та постнатальних кардіоміоцитах. Для цього формували сім'ї наступним чином: у одну клітку поміщали самця з генотипом β -cat^{flox/wt}; (α МНС) - Cre⁺ та двох самок з генотипами β -cat^{flox/flox}; (α МНС) - Cre⁻. У результаті схрещування отримували потомство з

наступними генотипами: β -cat^{flox / wt}; (α МНС) - Cre-; β -cat^{flox / flox}; (α МНС) - Cre- та β -cat^{flox / wt}; (α МНС) - Cre+. Тварини генотипувались у віці 5 – 10 діб та залежно від генотипу формували дослідні і контрольні групи. У якості дослідної групи відбирали тварин із генотипом β -cat^{flox / wt}; (α МНС) - Cre+. Решта сибсів слугували у якості контролю. У своїй роботі ми використовували лише самців віком 1, 3 та 6 місяців.

Трансгенні тварини були створені доктором Міхаелем Шнайдером, Медичний коледж, Байлор, США. Тварини, гомозиготні за умовним нокаутом β -катеніну (β -catenin^{flox / flox}), були отримані із Джексон лабораторії (Jackson Laboratories, США). У наше розпорядження усі тварини були люб'язно передані доктором Гленном Редісом (Jefferson Medical College, США).

Тварини утримувались у віварії ІМБГ НАН України за стандартних умов: температура у віварії становила 22-24 ° С, тривалість дня контролювалась штучно та становила 10 годин.

2.2.1. Генотипування. Виділення ДНК для генотипування проводили згідно стандартного протоколу [131]. Зразки тканини дослідних тварин дезінтегрували в лізуючому буфері із розчином протеїнази К (10 мкг/мл) при температурі 55°C і постійному помішуванні протягом 8-12 год. Отриманий лізат центрифугували 10000 об/хв., 10 хв. при кімнатній температурі, після чого відбирали супернатант та додавали 0,5 мл ізопропанолу. Осаджену ДНК переносили в 200 мкл ТЕ-буферу (10мМ Tris-HCl (pH 7,5); 1мМ EDTA) і витримували при 55°C при постійному помішуванні до повного розчинення.

Для проведення ПЛР використовували суміш PCR Master Mix (2X) виробництва фірми ThermoScientific (США). Реакційну суміш готували згідно рекомендацій виробника з 0,3 рМ концентрацією кожного праймера і 10 нг ДНК.

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили за наступних умов:

94 ° С, 5 хв (1 цикл)

94 ° С, 40 с, 60 ° С, 40 с, 72 ° С, 1 хв (40 циклів)

72 ° С 10 хв (1 цикл)

з подальшим утримуванням при 4 ° С. Аналіз результатів ПЛР проводили методом горизонтального електрофорезу в 1,6 % агарозному гелі в присутності бромистого етидію в буфері ТАЕ (40 мМ Tris, 20 мМ оцтова кислота, 1 мМ ЕДТА) при 70 мА протягом 40 хв (рис. 2.2).

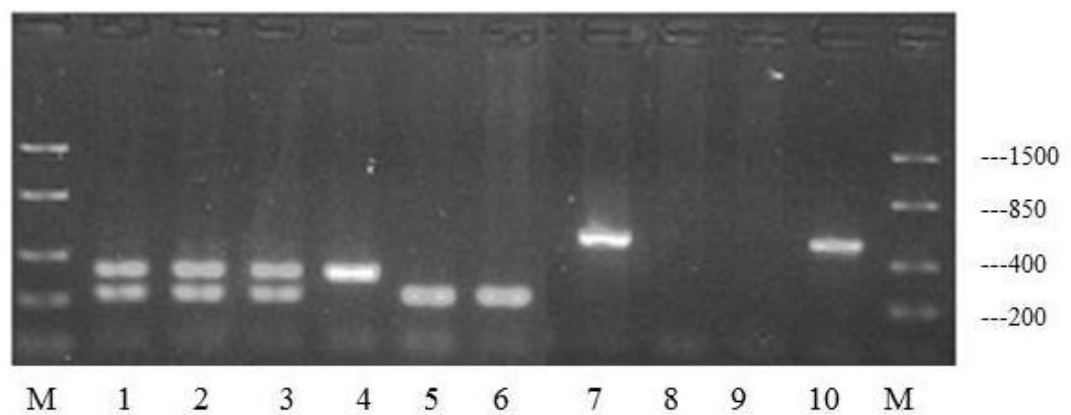


Рис. 2.2. Електрофореграма розділення фрагментів ПЛР-продукту генів β -катеніну та Cre-рекомбінази: 1, 2, 3 – гетерозиготний нокаут гена β -катеніну; 4 – гомозигота делеція гена β -катеніну; 5, 6 – дикотипний варіант гена β -катеніну; 7, 10 – генотипування гена Cre-рекомбінази (позитивний результат), 8 – негативний контроль, 9 - генотипування гена Cre-рекомбінази (негативний результат); М – маркер молекулярної маси

При аналізі ПЛР фрагментів використовували маркер молекулярної маси ДНК «ThermoScientific» (США) в діапазоні 50 - 1500 пн. Візуалізацію отриманих фрагментів ПЛР проводили із застосуванням приладу ChemiDoc XRS (Bio-Rad, США).

2.3. Дослідження сигнальної функції β -катеніну у постнатальному розвитку серця ссавців

При проведенні досліджень були генеровані тварини із ембріональною втратою однієї алелі гена β -катеніну у кардіоміоцитах як описано вище. Тварини генотипувались та залежно від генотипу формувались групи самців для подальших аналізів: група «контроль» - тварини із генотипами β -cat^{flox / wt}; (α МНС) - Cre-; β -^{flox / flox}; (α МНС) - Cre-; група «дослід» - тварини із генотипом β -cat^{flox / wt}; (α МНС) - Cre+. Таким чином, було сформовані групи тварин віком 1, 3 та 6 місяців і це дало змогу проаналізувати молекулярно-генетичні та морфологічні особливості розвитку постнатального міокарда у тварин за нормальних умов та тварин із дефіцитом гена β -катеніну у тканині міокарда.

Протягом експерименту усі тварини і контрольних і дослідних груп утримувались за стандартних умов і при досягненні необхідного віку тварин забивали методом цервікальної дислокації. Після цього проводили усі необхідні зважування, ізоляцію серця тощо. Для виділення РНК та білку серце без передсердь ділили на частини (приблизно по 20 мг) і заморожували у рідкому азоті. Для проведення морфологічних досліджень ціле серце промивали у розчині холодного ФСБ та фіксували у 4 % формаліні.

2.3.1. Морфометричний аналіз дослідних тварин. Для оцінки розвитку постнатального міокарда у тварин контрольної та дослідної груп різного віку проводили аналіз індексів співвідношення маси серця до маси тіла I (МС / МТ). Цей індекс відображає розвиток/ріст міокарда у тому числі і гіпертрофічний ріст серця. Тож ми проводили зважування тварин та їхніх ізольованих сердець.

Індекс співвідношення маси серця до маси тіла I отримували за формулою:

$$I = MC \text{ (мг)} / MT \text{ (г)}.$$

2.3.2. Гістологічний аналіз тканини міокарда. Для аналізу змін структури міокарда на морфологічному рівні ізольовані серця дослідних та контрольних тварин промивали у розчині холодного ФСБ та фіксували у розчині 4% параформальдегіду (ПФА). Після фіксації проводили дегідратацію дослідного матеріалу проводячи зразки через серію спиртів [1]:

- 70 % етанол (2 по 30 хв)
- 80 % етанол (2 по 30 хв)
- 90 % етанол (2 по 30 хв)
- 96 % етанол (2 по 30 хв)
- 100 % етанол (2 по 30 хв)
- етанол : ксилол (1 : 1) (2 по 30 хв)
- ксилол (2 по 30 хв)
- ксилол : парафін (1 : 1) (1 год. при 55 ° C),

після чого витримували тканину в парафініні (12 год при 55 ° C) та готували парафінові блоки згідно стандартної процедури. Отримані зразки, залиті в парафін, нарізали на мікротомі товщиною 9-10 мкм.

Зрізи депарафінізували за наступною схемою:

- ксилол (2 по 5хв)
- 96 % етанол (2 по 1хв)
- 80 % етанол (1хв) – 70 % етанол (30 с).

Після промивки зрізів водою проводили забарвлення гематоксилін-еозином або за методом Масон-трихромного забарвлення. Гематоксилін-еозинове забарвлення проводили за наступною схемою:

- гематоксилін (1 хв)

- дистильована вода (3 по 2 хв)
- еозин (15 с) - 90 % етанол (1 хв)
- 96 % етанол (1хв)
- ксилол (1 хв)

Для виявлення фіброзу тканини міокарда проводили Массон-трихромне забарвлення [132] набором комерційних реактивів HT15 (Sigma-Aldrich) згідно рекомендацій виробника. Депарафінізовані препарати проводили через серію розчинів:

- розчин Буена (15 хв на водяній бані при 56 ° C)
- дистильована вода (25 хв)
- гематоксилін (2 хв)
- дистильована вода
- фуксин (5 хв)
- дистильована вода (1 хв)
- фосфорновольфрамова кислота : фосфорномолібденова кислота : вода (1 : 1 : 2) (6 хв)
- анілін синій (15 хв)
- 1 % оцтова кислота (4 хв)
- дистильована вода (1 хв)

Після фарбування проводили дегідратацію зрізів за наступною схемою:

- 96 % спирт (2 по 5хв)
- 100 % спирт (2 по 5хв)
- ксилол (2 по 10хв)

Депарафінізовані зрізи заключали у канадський бальзам та покривали покривними скельцями після чого аналізували за допомогою PrimoStar

(Carl Zeiss, Німеччина) та обробляли за допомогою програми AxioVision на збільшенні 10 x і 40 x.

2.3.3. Дослідження зміни експресії генів. При вивченні сигнальної функції гена β -катеніну у постнатальному розвитку міокарда, ми проводили молекулярно-генетичний аналіз тканини міокарда за умови гетерозиготної делеції досліджуваного гена порівняно із контролем.

Для цього аналізували зміни рівня експресії генів гіпертрофічної відповіді (або фетальних генів) – α -MHC, β -MHC, ANP та BNP; генів залучених до реалізації канонічного Wnt сигналіngu – TCF4 та axin2; генів-мішеней β -катеніну – *c-myc*, *циклін D1*, *c-fos* та *cx43* із використанням методу зворотно-транскриптазної ПЛР в реальному часі.

2.3.3.1. Виділення тотальної РНК. Виділення тотальної РНК з дослідних зразків, розтертих в рідкому азоті, проводили із застосуванням фенол-хлороформного методу екстракції з використанням реагентів фірми Jena-Analytica (Німеччина), або набору колонок MOBio (США) згідно рекомендацій виробника.

Варто зауважити, що фенол-хлороформний метод екстракції РНК базується на використанні реагенту, що містить гуанідинізоціонат, який призначений для лізису клітин, солюбілізації клітинного дебрису, денатурації клітинних рибонуклеаз, а також білків.

Зразки тканини серця гомогенізували піпетуванням до повного розчинення, після чого їх витримували ще 5 хв при 4 ° C. На кожні 400 мкл реагенту Inusolve додавали 80 мкл хлороформу (Sigma, США), вортексували 18 с з подальшою інкубацією при 4 ° C протягом 15 хв. Після осаджування на центрифугі Eppendorf при 12000 g, 4 ° C, протягом 15 хв верхню фазу відбирали і додавали рівний об'єм ізопропанолу (Sigma, США). Знову осаджували центрифугуванням при 12 000 g, 4 ° C, протягом 10 хв.

Отриманий осад промивали холодним ізопропанолом або 75 % етанолом, висушували в термостаті при 37 ° С протягом 5-7 хв і розчиняли в 30-50 мкл високо очищеної води, вільної від ДНКаз та РНКаз (ThermoScientific, Литва).

Концентрацію виділеної РНК визначали за допомогою спектрофотометра NanoDrop (Bio-Rad, США). Отримані зразки РНК зберігали при – 80 ° С і використовували для синтезу кДНК.

2.3.3.2. Синтез кДНК. Синтез кДНК проводили за допомогою комерційного набору реагентів (Thermo Scientific, Литва) і праймерів олігодТ, які дають змогу отримати комплементарну ДНК до тотальної мРНК. Всі маніпуляції проводили за стандартним протоколом згідно рекомендацій виробника.

Отриману кДНК розводили до концентрації 3-5 нг / мкл і використовували як матрицю для стандартної ПЛР в реальному часі.

2.3.3.3. ПЛР в реальному часі. В роботі використовували стандартний метод ПЛР в реальному часі за наступних умов:

95 ° С, 10 хв (1 цикл)

95 ° С, 40 с, 62 ° С, 40 с, 72 ° С, 40 с (40 циклів)

72 ° С 15 хв (1 цикл)

з подальшим утримуванням при 4 ° С. Контролем слугував рівень експресії гена домашнього господарства гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа (*GAPDH*).

Обчислення результатів кількісної ПЛР в реальному часі проводили за стандартним методом ddCt та з використанням програмного забезпечення CFX96 (Bio-Rad, США) та IQ-5 (Bio-Rad, США).

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програми Origin 8.0.

2.4. Дослідження сигнальної функції гена β -катеніну в неонатальних кардіоміоцитах *in vitro*

Окрім експериментів *in vivo*, сигнальну функцію гена β -катеніну при розвитку гіпертрофії вивчали також з використанням культури ізольованих кардіоміоцитів. На першому етапі цієї частини експериментальної роботи ми генерували новонароджених тварин, використовуючи схему схрещувань описану у підрозділі 2.2. Новонароджених тварин віком 1 – 2 доби забивали як описано у підрозділі 2.2., брали зразки тканини для генотипування (пункт 2.2.1) та ізолювали серця для виділення кардіоміоцитів у культуру.

Первинні культури клітин отримували методом холодної трипсинізації тканини серця миші. Для цього ізольовані серця новонароджених дослідних тварин промивали 3 рази в середовищі DMEM з 10-кратними розчинами антибіотиків (пеніцилін (2 мг / мл), стрептоміцин (2 мг / мл) та тилозин (8 мкг / мл)), інкубували з вказаним розчином 20 хв, + 4 ° С. Після обробки зразків антибіотиками проводили ферментативну обробку тканини в 0,25 % розчині трипсину в буфері Версену (0,02 % ЕДТА) протягом ночі при + 4 ° С. Трипсинізовані зразки тканини дезінтегрували піпетуванням у середовищі DMEM з 10 % ФБС і розсівали на пластикові 12-лункових планшети. Отримані неонатальні кардіоміоцити культивували протягом 3 - 5 діб при температурі 37 ° С та при 5 % CO₂ у газовій суміші. Після цього отримані культури клітин використовували на першому пасажі для дослідження фізіологічної активності кардіоміоцитів та морфологічного аналізу клітин. Клітини пересівали із використанням розчину 0,25 % трипсину у буфері Версена.

Оскільки виділення клітин у культуру проводили на ранніх термінах після народження, то ми мали змогу отримувати клітини як гетерозиготні за делецією гена β -катеніну так і з повним нокаутом гена β -катеніну.

У роботі використовували мінімальне культуральне середовище Ігла у модифікації Дельбекко (DMEM, Sigma, США) із додаванням проінкубованої при 56 °С ембріональної сироватки великої рогатої худоби (ЕС, Sigma, США) у 0,5 та 10 % кінцевих концентраціях з додаванням пеніциліну (0,2 мг / мл) та стрептоміцину (0,2 мг / мл).

2.4.1. Морфологічний аналіз кардіоміоцитів *in vitro* після дії гіпертрофічного стимулу. Як було описано вище первинні кардіоміоцити культивувались протягом 3 – 5 діб і висівались на покривні скельця для проведення морфологічного аналізу. Клітини на першому пасажі культивувались протягом 3 діб в середовищі DMEM з 0,5 % ембріональної сироватки ВРХ за стандартних умов. Для вивчення сигнальної функції гена *β-катеніну* клітини піддавали обробці хлоридом літію та перекиснем водню у концентраціях 20 мМ та 50 мМ відповідно (опис агентів у пункті 2.1.2.) протягом усього часу культивування. Контролем у цьому експерименті слугували клітини, що культивувались у середовищі DMEM з 0,5 % концентрацією ембріональної сироватки ВРХ без додавання хлориду літію чи перекисню водню.

Через три доби, клітини фіксували в парах 37 % параформальдегіду протягом 10 хв за кімнатної температури. Фіксовані клітини забарвлювали гематоксиліном-еозином за наступною схемою:

- гематоксилін (1 хв)
- вода (3 по 1 хв)
- еозин (15 с)
- 90 % етанол (1 хв)
- 96 % етанол (1 хв)
- ксилол (1 хв)

Після цього препарати заключали у канадський бальзам. Морфологічний аналіз проводили за допомогою світлового мікроскопу PrimoStar (при збільшенні 40 x). При проведенні аналізу враховували кількість ядер у кардіоміоцитах, індекс співвідношення довжини до ширини клітини ($I_{l/w}$) та площу клітин. У кожному варіанті аналізували більше, ніж 100 клітин. Кожен дослід проводили тричі.

2.4.2. Визначення фізіологічної активності первинних кардіоміоцитів. Клітини на першому пасажі висівались також і у 96 лункові планшети для аналізу функції гена *β-катеніну* у регуляції фізіологічної активності неонатальних кардіоміоцитів. Для МТТ тесту висівали по 50 тис / лунку у кожному варіанті обробки та у кожній дослідній групі. Клітини із генотипами $\beta\text{-cat}^{\text{flo}/\text{wt}}$; (αMHC) - Cre-; $\beta\text{-cat}^{\text{flo}/\text{flo}}$; (αMHC) - Cre- становили контрольну групу, клітини із генотипом $\beta\text{-cat}^{\text{flo}/\text{wt}}$; (αMHC)-Cre+ - групу із дефіцитом гена *β-катеніну* і клітини із генотипом $\beta\text{-cat}^{\text{flo}/\text{flo}}$; (αMHC) - Cre+ - групу із повною втратою досліджуваного гена. Усі групи клітини піддавались обробці хлоридом літію та перекису водню у концентраціях 20 мМ та 50 мМ відповідно (опис агентів у пункті 2.1.2.) протягом трьох діб. Контролем у цьому експерименті слугували клітини, що культивувались у середовищі DMEM з 0,5 % концентрацією ембріональної сироватки ВРХ без обробки зазначеними агентами.

Через 3 доби у кожному лунку додавали реагент МТТ у кількості 10 мг / мл та інкубували протягом 4 год для утворення кристалів. Після цього кристали формазану розчиняли у DMSO протягом 10 хв при 37 ° C і постійному помішуванні та вимірювали оптичне поглинання при 620 нм на приладі ELx800 (BioTek, США). Отримані таким чином показники аналізувались у програмі Excel, обраховували середні значення для кожного варіанту у досліді та репрезентували їх у вигляді графіків. Для

публікації та обговорення у дисертації обирали найбільш типові дані для 4 повторностей.

Оскільки щільність оптичного поглинання прямо корелює із фізіологічною активністю клітин, застосування МТТ-тесту дає змогу досить швидко та просто визначати якісні відмінності між дослідом і контролем за метаболічною активністю. Відомо, що кристали формазану здатні поглинати лише метаболічно активні клітини і ця здатність корелює із активністю метаболізму [133].

2.5. Вивчення сигнальної функції гена β -катеніну та канонічного Wnt сигналіngu при адаптації міокарда до тренувань

2.5.1. Дослідження зміни індексу співвідношення маси серця до маси тіла. Для проведення серії експериментів із вивчення сигнальної функції гена β -катеніну при розвитку фізіологічної гіпертрофії (або адаптації дорослого міокарда до хронічних фізичних навантажень) ми генерували тварин із дефіцитом досліджуваного гена як описано у підрозділі 2.2.

Самців віком 3 місяці формували у групи залежно від генотипу, а саме група «контроль» - тварини із генотипами β -cat^{flox / wt}; (α МНС) - Cre-; β -cat^{flox / flox}; (α МНС) - Cre-; група «дослід» - тварини із генотипом β -cat^{flox / wt}; (α МНС) - Cre+. Після чого кожна група рандомно ділилась на дві частини. Таким чином, були сформовані групи - «контроль 1»; «контроль 2»; «дослід 1» та «дослід 2». Тварини груп «контроль 1» та «дослід 1» слугували контролем до тварин у групах «контроль 2» та «дослід 2», що отримували хронічні фізичні навантаження. У своїй роботі ми застосували плавальний тест за описаною та адаптованою методикою [134]. Самці мишей у групах «контроль 2» та «дослід 2» отримували фізичні навантаження протягом 6

тижнів. Тривалість таких навантажень починалась із 5 хвилин плавання та поступово збільшувалась на 1,5 хвилини щоденно протягом 5 днів із перервою на два дні. Застосування такого методу дозволяло моделювати тривале фізичне навантаження, що призводило до розвитку фізіологічної гіпертрофії міокарда або атлетичного міокарда.

Для запобігання переохолодження тварин при щоденних тренуваннях температура води при плаванні становила 37 ° С, після тренування тварин висушували під лампою накаливання. Через 6 тижнів експерименту тварин усіх 4-ох груп забивали як описано у розділі 2.3, проводили зважування та ізоляцію зразків для подальших молекулярно-генетичних та морфологічних досліджень.

Розвиток гіпертрофії міокарда при навантаженні оцінювали із застосуванням індексу I (МС / МТ) як описано у пункті 2.3.1. Зразки для гістологічного аналізу та гематоксилін-езинового забарвлення готували як описано у розділі 2.3.2

2.5.2. Дослідження зміни експресії генів. Аналіз зміни експресії гіпертрофічних генів (α -MHC, β -MHC, ANP та BNP), генів залучених до реалізації сигнальної функції β -катеніну при адаптації серця до фізичних навантажень (TCF4 та *axin2*) та генів – мішеней Wnt / β -катенінового сигналіну (*c-myc*, *циклін D1*, *c-fos* та *cx43*) проводили як описано у пункті 2.3.3.

2.5.3. Дослідження зміни експресії білків ERK1/2 та Akt, залучених до MAPK та PI3-кіназного mTOR-залежного сигнально-регуляторних шляхів. При вивченні сигнальної функції гена β -катеніну у постнатальному розвитку серця та адаптації дорослого серця до фізичних навантажень досліджували також і зміни експресії білків, залучених до канонічного Wnt сигналіну (β -катеніну та GSK β). Для цього з ізольованих

сердець (як описано у розділі 2.3.) виділяли тотальний білок та проводили Вестерн-блот аналіз за наступною схемою.

Тотальний білок тканини міокарда виділяли у стандартному RIPA-буфері з додаванням коктейлю інгібіторів протеаз (Sigma, Сполучені Штати) та PMSF:

50 мМ Tris-HCl (pH 7,6)

150 мМ хлорид натрію

1 мМ EDTA (pH 8,0)

1 % NP-40

0,5 % деоксихолат натрію

0,1 % додецилсульфату натрію

Тканину гомогенізували методом перетиранням зі склом в фарфоровій ступці. Отриману суміш інкубували при 4 ° С протягом 30 хв і центрифугували при 16 000 g і 4 ° С протягом 20 хв. Супернатант переносили в чисту 1,5 мл пробірку. Отриманий таким чином лізат використовували для виміру концентрації білку за допомогою NanoDrop (Bio-Rad, Сполучені Штати) при 230 нм. Зразки зберігали при – 80 °С.

Виділені білкові лізати фракціонували в 12 % ПААГ в тріс-гліциновому буфері при 25 мА протягом 40-60 хв.

Склад тріс-гліцинового буферу:

25 мМ Tris

250 мМ гліцин

0,1 % додецилсульфат натрію

Перед нанесенням в гель зразки денатурували в 10-кратному буфері Лемлі для нанесення з подальшим кип'ятінням протягом 5 хв:

250 мМ Tris-HCl (pH 6,8)

10 % додецилсульфат натрію

10 % β -меркаптоетанол

0,5 % бромфеноловий синій

50 % гліцерин

Лізати наносили в гель з розрахунку 50-70 мг на лунку, у якості контролю молекулярної маси білків використовували комерційні маркери відомої ваги.

Перенос білків на PVDF мембрану проводили із застосуванням методу напівсухого переносу з використанням буферу такого складу:

50 мМ Tris (5,8 г / л)

40 мМ гліцин (2,9 г / л)

0,037 % додецилсульфату натрію (0,37 г / л)

20 % метанолу

Спочатку гелі промивали в буфері для напівсухого переносу 10 хв. Тим часом готували PVDF мембрану, активуючи її промиванням в метанолі (15 с) і відмиваючи в буфері для переносу (5 хв). Після чого складали «сандвіч» із мембрани, гелю та фільтрувального паперу, просякненого буфером для переносу. Напівсухий перенос проводили при 150 мА протягом 2 год на приладі Cleaver (Німеччина).

Для перевірки якості переносу білків, мембрану профарбовували Ponso (Sigma, Сполучені Штати), після чого промивали в TBS + 1 % Tween (тричі по 5 хв) і блокували у 5 % розчині знежиреного молока в TBS протягом ночі при 4 ° С і постійному помішуванні. Перед інкубацією із первинними антитілами мембрану промивали розчином TBS + 5 % Tween.

Інкубацію мембрани із первинними антитілами проти досліджуваних білків, а саме проти GSK (Cell Signaling, США), фосфо-GSK 3a/b (Ser21/9) (clone D17D2) (Cell Signaling, # 8566), β -catenin (Santa Cruz, США), активного β -catenin (anti-ABC) (Ser37 or Thr41) (clone 8E7) (Milipore, # 05-665, Великобританія), ERK (clone L34F12) (Cell Signaling, ## 4696, США), фосфо-ERK (Thr202/Tyr20) (clone 197G2) (Cell Signaling, # 4377, США), Akt(clone C20) (Santa Cruz, sc-1618, США), фосфо-Akt (Ser 473) (clone C-11) (Santa Cruz, sc-101629, США) проводили згідно

рекомендацій виробника протягом 2-3 годин, після чого відмивали розчином TBS + 5 % Твін-20 три рази протягом 10 хв при 4 ° С і постійному помішуванні з подальшим інкубуванням з вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому. Після цього залишки вторинних антитіл відмивали у розчині TBS + 5 % Твін-20 три рази протягом 10 хв при 4 ° С і постійному помішуванні.

Візуалізацію сигналу на мембрані проводили із застосуванням стандартної ELC – системи наступного складу:

100 мМ Tris-HCl (рН 8,5)

1,25 мМ люмінолу

0,45 мМ кумарової кислоти

0,015 % перекису водню

з використанням приладу ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad, США).

2.6. Мета-аналіз зв'язку розвитку гіпертрофії та сигнальної активності β -катеніну

Для систематичного огляду літератури з залученням статистичних методів нами було проведено пошук та аналіз джерел літератури в науково метричних базах PubMed, Medline та Google Scholar. До уваги брали всі англomовні джерела, не зважаючи на дату публікації, які вдалося знайти за термінами «Wnt AND hypertrophy», «heart AND hypertrophy». Результати пошуку виявили 215 джерел. Для подальшого дослідження було обрано статті, що відповідали наступним умовам: 1) статті, в яких були представлені чисельні дані (маркери канонічного Wnt сигналіngu та гіпертрофії та / або морфологічні параметри); 2) статті, в яких досліджувався зв'язок β -катеніну та гіпертрофії; 3) статті, в яких досліджувалася експресія гена *β -катеніну* на

різних рівнях при перебудовах тканин. Підставою для виключення з аналізу були наступні критерії: 1) статті-огляди літератури; 2) статті, які не містили чисельних даних, або в яких не згадувались маркери гіпертрофії (рис. 2.3).

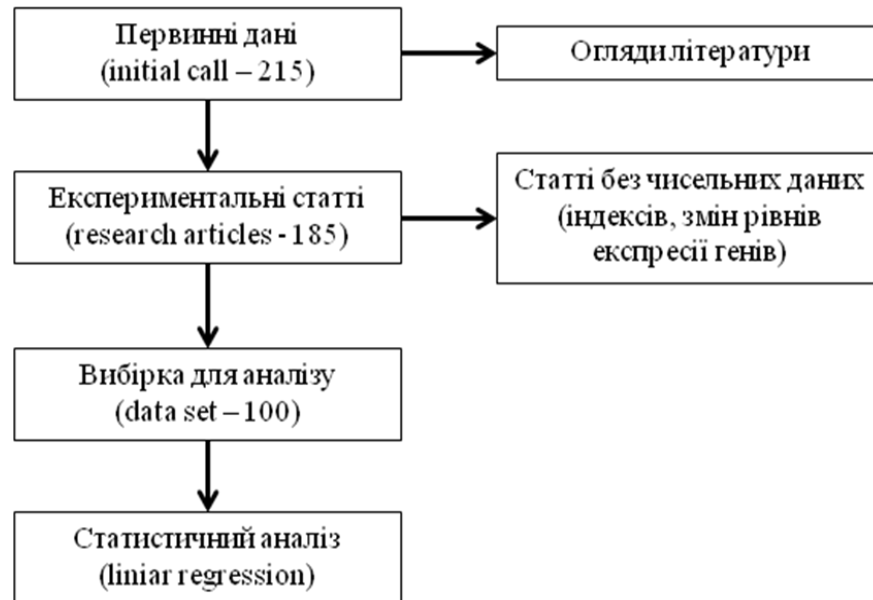


Рис. 2.3. Схема пошуку та відбору літературних джерел для мета-аналізу

Таким чином, після застосування наведених вище критеріїв відбору нами було визначено 100 літературних джерел для подальшого мета-аналізу. Більшість з них (95) були присвячені лабораторним експериментам, решта 5 - були присвячені аналізу зразків тканин пацієнтів.

На наступному етапі було проведено збір даних для аналізу (вид тварин, що використовувались в дослідженні, тип тканини, рівень розвитку гіпертрофії та спосіб її виміру: рівень експресії гена β -катеніну, співвідношення вмісту ДНК / білок, рівень експресії генів $GSK3\beta$, цикліну $D1$, ANP , BNP , β -MHC, α -MHC, $SERCA$, $axin2$, різні типи актину ($actin DIF$), кадгерин, конексин-43 ($cx43$), c -мус, TCF/Lef , c -fos, $VEGFR$ (Vascular

Endothelial Growth Factor Receptor), *LRP*, *SFRP4*, *TGF β* (Transforming Growth Factor- β), *mTOR* (mammalian target of rapamycine).

Після цього за допомогою статистичних методів аналізу (регресивний та дисперсійний аналізи) було проаналізовано участь канонічного Wnt сигналіngu та β -катеніну, зокрема, незалежно від типу тканини та виду модельного об'єкту.

2.7. Статистичні методи

Дані експериментів з дослідження рівнів експресії генів представлені у вигляді середнього арифметичного значення з урахуванням стандартного відхилення з довірчим інтервалом 95 %. Експерименти виконувались в 2 - 3 технічних повторах 3 рази. Кількість тварин в групах вказана під рисунками.

Дані, отримані при дослідженні експресії генів, наведено у вигляді відносного рівня експресії генів нормалізованого відносно рівня експресії гена GAPDH, вираженого в умовних одиницях. Обробку результатів ПЛР в реальному часі проводили з використанням програмного забезпечення приладів IQ5 та CFX95 (Bio-Rad, США).

Результати експериментів з дослідження популяцій первинних культур кардіоміоцитів представлені як розподіл частоти зустрічальності двоядерних клітин. При аналізі результатів цього експерименту також обраховували стандартне відхилення та проводили дисперсійний аналіз первинних даних.

Для аналізу даних експериментів з дослідження адаптації дорослого міокарда до фізичних навантажень обраховували коефіцієнт варіації. Проводили дисперсійний аналіз первинних даних (ANOVA), для оцінки Effect size (g) враховували η^2 (сила впливу) [135, 136]. Вірогідність показника η^2 вираховували за Фішером.

Результати збору даних для мета-аналізу було проаналізовано з використанням методу простої регресії. З огляду на відсутність у вибірці літературних джерел клінічних досліджень та відносно малі розміри вибірки, не було змоги застосувати підхід data weighting (зважування даних). Для статистичної оцінки даних застосовували дисперсійний аналіз.

Статистичний аналіз даних виконували за допомогою програми Origin 8.1 (OriginLab, США).

Розділ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Розвиток та формування постнатального серця, а також усі подальші адаптації дорослого організму до гормональних, нейрогуморальних фізичних чи інших стресів є динамічним та чітко контрольованим процесом. Нині виявлено низку сигнально-регуляторних каскадів, які залучені до регулювання згаданих процесів. Це і кальцінеурін / NFAT, MAPK, PI3K /Akt/ mTOR сигнальні шляхи [75], BMP, канонічний та неканонічний Wnt шляхи тощо [24]. Важливо також, що усі ці сигнально-регуляторні каскади залучені до контролю проліферації, диференціювання, виживаності та міграції клітини, у тому числі і кардіоміоцитів, серцевих фіброblastів, ендотеліальних клітин та гладеньких м'язів судин. І якщо функція зазначених сигнальних шляхів у постнатальному серці більш-менш зрозуміла, то участь канонічного Wnt сигналіngu лишається досить дискусивною.

Як було детально розглянуто у Огляді літератури, канонічний Wnt сигнальний шлях відіграє важливу роль у кардіогенезі та формуванні фетального серця, однак, згідно усталеній уяві, після народження його сигнальна активність пригнічується до базального рівня і залишається такою в умовно здоровому постнатальному серці [22, 116, 137]. Основним медіатором сигнального шляху Wnt є білок β -катенін, стабілізована форма якого, потрапляючи в ядро клітини, зв'язується з транскрипційними факторами TCF / LEF і активує гени-мішені. Серед генів-мішеней цього сигнального шляху є такі, які відіграють важливу роль у функціонуванні дорослого міокарда (гени гіпертрофічної відповіді, кадгерин, конексин 43, деякі протоонкогени та ін.) [19, 31, 53, 58].

В своїй роботі ми зосередились на вивченні сигнальної функції канонічного Wnt сигналіngu у розвитку постнатального міокарда та при адаптації дорослого серця до фізичних навантажень за умови кардіоспецифічної делеції гена *β -катеніну*. Застосування моделі умовного нокауту гена дозволяє глибше проаналізувати функцію цього гена на організменному рівні. Для цього ми генерували тварин із кардіоспецифічною гетерозиготною делецією гена *β -катеніну* у ембріональному серці як описано (розділ Матеріали та методи).

3.1. Сигнальна функція β -катеніну в постнатальному розвитку міокарда

3.1.1. Ембріональна кардіоспецифічна гетерозиготна делеція гена *β -катеніну* спричиняє затримку розвитку постнатального серця. Раніше у відділі було показано, що повна втрата гена *β -катеніну* у ембріональному серці призводить до загибелі новонароджених тварин, яка не супроводжується видимими морфологічними вадами як серця, так і цілого організму. З огляду на літературні данні ми висунули припущення, що сигнальна функція β -катеніну має важливе значення у розвитку постнатального серця. Для перевірки припущення згенерували тварин із кардіоспецифічною делецією однієї алелі гена і проаналізували тварин віком 1, 3 та 6 місяців. Варто зауважити, що обрані терміни спостереження відповідають підлітковому, статевозрілому та середньому віку людини [138].

Перш за все, проаналізували зміни індексу співвідношення маси серця до маси тіла (МС / МТ) у тварин усіх вікових груп. Варто зауважити, що індекс МС / МТ широко використовується для оцінки розвитку постнатального серця та гіпертрофічної відповіді [61]. У результаті роботи

було встановлено, що при дефіциті гена *β -катеніну* у тварин віком 1 та 3 місяці індекс співвідношення маси серця до маси тіла був нижчим порівняно із контролем (рис.3.1). Однак, лише у мутантних тварин віком 3 місяці індекс МС / МТ був достовірно нижчим порівняно з таким показником у контрольних тварин. Цікаво, що при аналізі тварин старшої групи, віком 6 місяців, індекс МС / МТ був вищим у мутантних тварин порівняно із контролем.

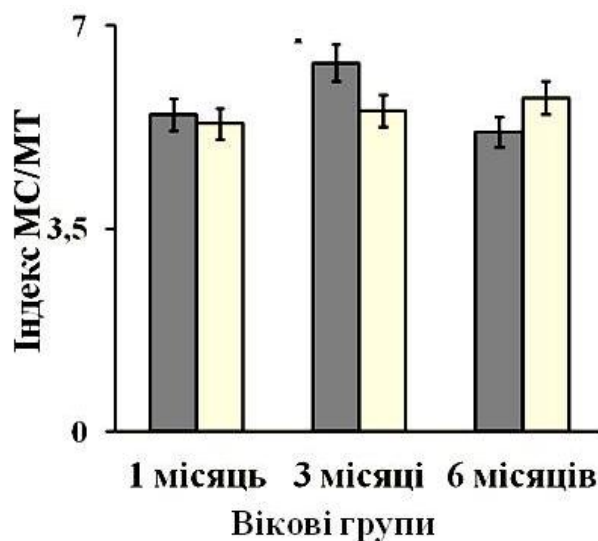


Рис. 3.1. Аналіз індексу співвідношення маси серця до маси тіла у тварин із гетерозиготною делецією гена *β -катеніну* у кардіоміоцитах та контрольних тварин різних вікових груп. Примітка: кожна група контролів містила не менше 30 тварин, кожна група мутантів містила не менше 15 тварин; ■ контроль □ мутант

Незважаючи на це, з використанням гематоксилін-еозинового забарвлення не було виявлено ніяких морфологічних змін чи порушень архітектури міокарда мутантних тварин всіх досліджених вікових груп (рис. 3.2).

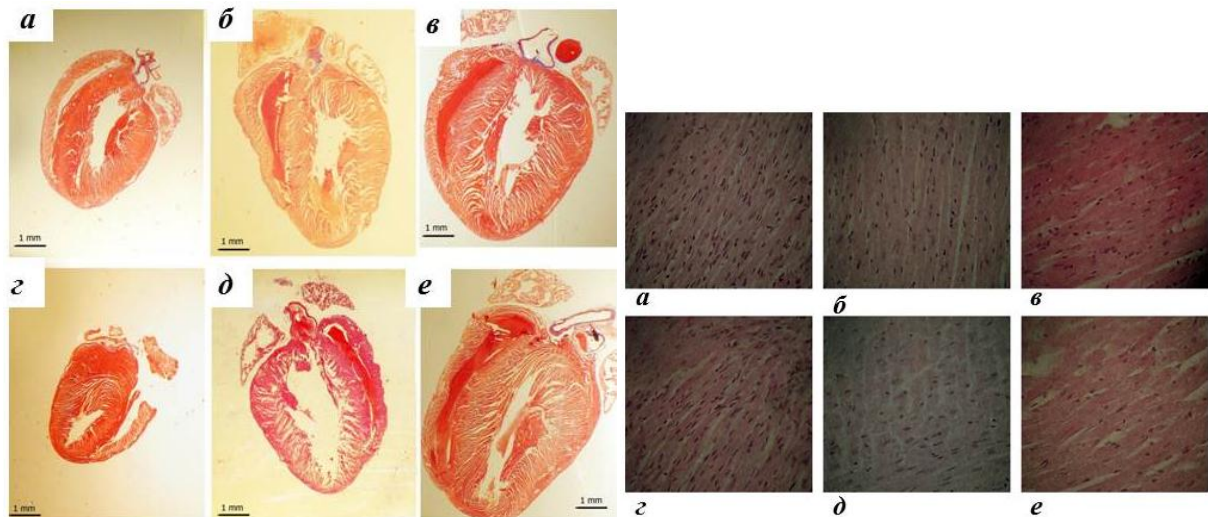


Рис. 3.2. Гістологічний аналіз тканини серця тварин із делецією однієї алелі гена β -катеніну та контрольних тварин різних вікових груп із застосуванням забарвлення гематоксиліном та еозином. На рисунку представлені типові зрізи тканини серця тварин віком 1 (а, с), 3 (б, д) та 6 місяців (в, е), контрольних (а, б, в) та мутантних (с, д, е) груп тварин. Збільшення 2,5 x (цілі серця) та 40 x (мікрофотографії зрізів тканини серця)

Було також застосовано Масон-трихромне забарвлення і не виявлено перебудов тканини серця чи фіброзного заміщення у тварин з дефіцитом гена β -катеніну (рис. 3.3).

Отримані дані узгоджуються із висунутим раніше припущенням, що структурна функція гена β -катеніну не є критичною для постнатального розвитку міокарду, як було також показано [5, 67, 68]. Автори пояснюють це тим, що у випадку делеції гена у дорослому серці адгеринові з'єднання формуються і підтримуються за участі γ -катеніну.

Натомість летальність новонароджених тварин із повною кардіоспецифічною втратою β -катеніну [5] є наслідком порушення його сигнальної функції саме у ранні терміни після народження.

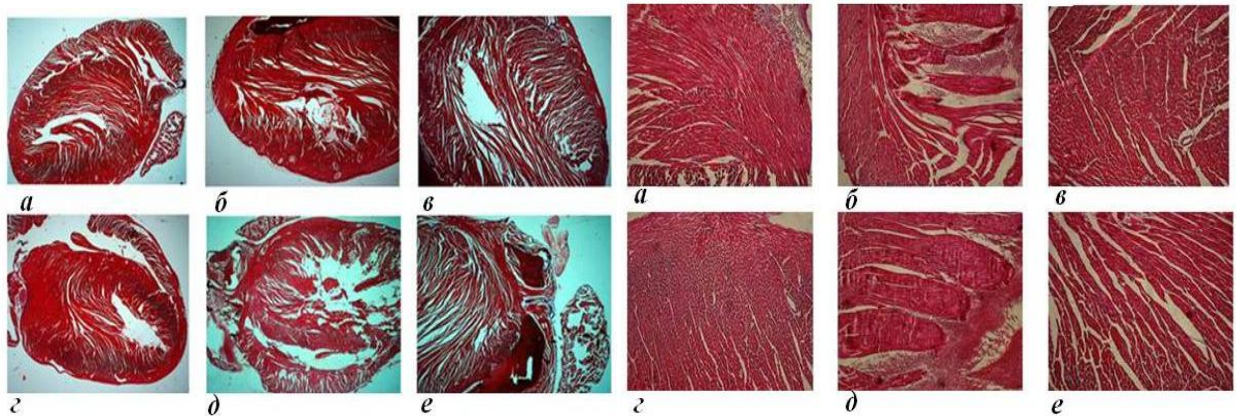


Рис. 3.3. Гістологічний аналіз тканини серця тварин із гетерозиготною делецією гена β -катеніну та контрольних тварин різних вікових груп із застосуванням Масон-трихромного забарвлення. На рисунку представлені типові зрізи тканини серця тварин віком 1 (а, з), 3 (б, д) та 6 місяців (в, е), контрольних (а, б, в) та мутантних (з, д, е) груп тварин. Збільшення 4 х, 40 х

Отримані дані свідчать про те, що дефіцит гена β -катеніну у кардіоміоцитах спричиняє затримку росту дорослого серця, однак асоціюється із гіпертрофічним ростом міокарда з віком.

Той факт, що ми не спостерігали порушень морфології тканини міокарда за умов дефіциту досліджуваного гена, свідчить про те, що гетерозиготна делеція гена β -катеніну не впливає на адгезію клітин серця.

3.1.2. Гетерозиготна делеція гена β -катеніну в постнатальному серці асоціюється із експресією гіпертрофічних генів. У роботі реєстрували затримку росту ювенільного та дорослого серця і тенденцію до розвитку гіпертрофії з віком у тварин з дефіцитом гена β -катеніну. Відомо, що і кардіогенез, і постнатальна специфікація кардіоміоцитів і, зрештою, перебудови серця супроводжуються і характерними змінами на молекулярно-

генетичному рівні. Так наприклад, при гіпертрофії відбувається реактивація фетальних, або гіпертрофічних генів: *ANP*, *BNP*, та пригнічення експресії міозину дорослого серця α -*MHC* [61, 120]. Тож у роботі проаналізували рівні експресії цієї групи генів у тварин усіх вікових груп за умов гетерозиготної делеції гена β -катеніну порівняно із контролем.

Із застосуванням ПЛР в реальному часі виявили зміни рівнів експресії гіпертрофічних генів у мутантних тварин віком 1, 3 та 6 місяців (рис. 3.4) порівняно з такими у контрольних тварин відповідних вікових груп.

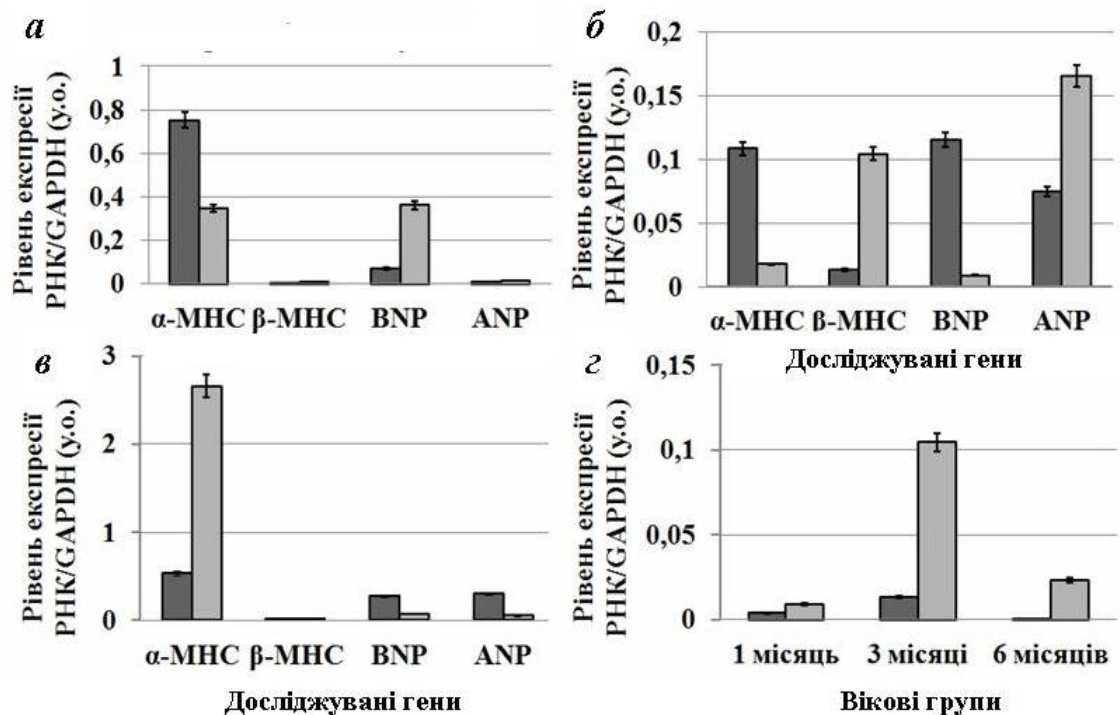


Рис. 3.4. Відносні рівні експресії генів гіпертрофічної відповіді в міокарді тварин із гетерозиготною делецією гена β -катеніну (мутант) та контрольних (контроль) тварин різних вікових груп: *а* – 1 місяць, *б* – 3 місяці, *в* – 6 місяців, *г* – відносний рівень експресії гена β -*MHC*. Примітка: кількість тварин в кожній групі – не менше 2; ■ контроль □ мутант

Цікаво, що у тварин віком 1 та 3 місяці із гетерозиготною делецією гена *β -катеніну* спостерігали підвищення експресії генів *ANP*, *BNP* та *β -МНС* і зниження рівня експресії гена *α -МНС* (рис. 3.4, *a*, *b* та *c*). Така реактивація експресії фетальних генів та пригнічення експресії міозину дорослого серця є типовими для гіпертрофії.

Однак, саме для цих вікових груп не спостерігали ні типового для гіпертрофії збільшення показника індексу МС / МТ, ні розвитку фіброзу. Варто зауважити, що підвищення експресії гіпертрофічних генів у дорослому серці, яке не супроводжується підвищенням гіпертрофічного індексу та фіброзом серця, спостерігали й інші автори [120].

Це може свідчити як про те, що згадані гени не є універсальними маркерами гіпертрофії, так і про те, що навіть підвищення їхньої експресії не є достатньою умовою для розвитку патології у тварин із дефіцитом гена *β -катеніну*.

При аналізі тварин старшої вікової групи, а саме віком 6 місяців, з дефіцитом гена *β -катеніну* не спостерігали підвищення рівня експресії генів натрійуретичних пептидів *ANP* та *BNP*, однак, рівень експресії міозину ембріонального серця - *β -МНС*, був вищим порівняно з таким у тварин контрольної групи (рис. 3.3, *b* та *c*). У цій же групі тварин відбувалось і підвищення рівня експресії міозину дорослого серця - *α -МНС*, порівняно із мутантними тваринами віком 1 та 3 місяці. Цікаво, що рівень експресії гена *α -МНС* у тварин із гетерозиготною делецією гена *β -катеніну* віком 6 місяців був вищим не лише порівняно із мутантними тваринами молодшого віку, а й порівняно із контрольними тваринами старшої вікової групи.

Отримані дані, з одного боку, можуть свідчити про те, що дефіцит досліджуваного гена у тканині міокарда призводить до реактивації гіпертрофічних генів у дорослому серці, а з іншого боку - це може означати про те, що дефіцит гена *β -катеніну* порушує специфікацію кардіоміоцитів та дозрівання новонародженого серця і як результат перемикання з фетальної

генетичної програми на дорослу. Вочевидь, і перший, і другий сценарій можуть бути результатом порушення сигнальної функції канонічного Wnt сигналінгу.

3.1.3. Гетерозиготна делеція гена β -катеніну в постнатальному серці призводить до зниження рівня активності канонічного Wnt сигнального шляху. За літературними даними Wnt/ β -катеніновий сигналінг є одним з основних регуляторів росту стовбурових клітин, їхньої диференціації та проліферації в нормі та при патологіях [23, 139–142]. Зважаючи на наші попередні дані, припустили, що гетерозиготна делеція основного медіатора канонічного Wnt сигналінгу може призводити до порушення активності цілого сигнального каскаду у ембріональних та неонатальних кардіоміоцитах. Тому наступним логічним кроком нашої роботи, було проаналізувати кінетику канонічного Wnt сигналінгу в зразках міокарда тварин з дефіцитом гена β -катеніну порівняно з контрольними мишами. Зокрема, проаналізували рівень експресії генів, залучених до реалізації транскрипційної активності β -катеніну - *TCF4* та *axin2* у тварин віком 1, 3 та 6 місяців (рис. 3.5).

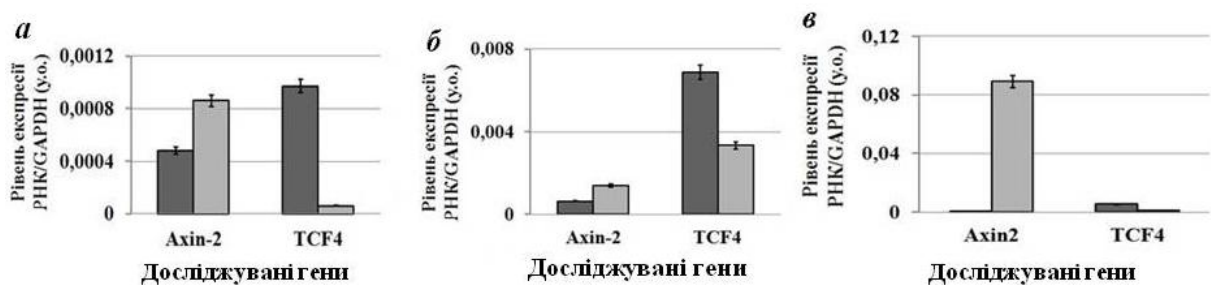


Рис. 3.5. Кінетика експресії генів, залучених до канонічного Wnt шляху, в міокарді в міокарді тварин із гетерозиготною делецією гена β -катеніну (мутант) та контрольних (контроль) тварин різних вікових груп: *а* – 1 місяць, *б* – 3 місяці, *в* – 6 місяців. Примітка: кількість тварин в кожній групі – не менше 2; ■ контроль □ мутант

Показали, що рівень експресії гена *TCF4* був суттєво нижчим в зразках тканин мутантних тварин порівняно з контрольними того ж віку. Натомість рівень експресії гена *axin2* був вищим в зразках тканин мутантних тварин в усіх вікових групах (рис. 3.5).

Варто зауважити, що Axin2 є білком-скефолдом деградувального комплексу [44, 45, 143] і він є негативним регулятором канонічного Wnt шляху [143]. Власне, Axin2 є одним із механізмів негативного фідбеку клітини і одним із механізмів контролю активності канонічного Wnt сигналіngu. Ці дані вказують на те, що втрата однієї алелі гена *β-катеніну* призводила до пригнічення активності сигналіngu у мутантних тварин всіх досліджених вікових груп.

Окрім того, було виявлено і певну динаміку активності сигнального шляху як у контрольних, так і мутантних групах тварин залежно від віку. Так, у тварин контрольної групи, згідно відносного рівня експресії гена *TCF4*, відбувалось зниження активності канонічного Wnt з віком (рис. 3.5). Тобто у тварин старших вікових груп транскрипційна активність *β-катеніну* була нижчою, ніж у тварин віком 1 місяць. І навпаки, у тварин із гетерозиготною делецією гена *β-катеніну* у тканині серця транскрипційна активність *β-катеніну* підвищувалась у тварин віком 3 та 6 місяців, причому у тварин середньої вікової групи (3 місяці) вона була найвищою (рис. 3.5). Однак, цей показник у мутантних зразках не перевищував такого у контрольних груп тварин відповідного віку.

Для більш детального аналізу кінетики канонічного Wnt сигналіngu проаналізували зміни рівня експресії деяких генів-мішеней *β-катеніну*, а саме: *c-myc*, *c-fos* та *цикліну D1*. Варто зауважити, що зазначені гени залучені до контролю клітинного циклу та росту клітин, так наприклад, *c-myc* та *c-fos* є транскрипційними факторами і протонкогенами [144, 145], а *циклін D1* залучений до контролю синтезу ДНК та білка у клітині.

У результаті виявили, що у тварин із дефіцитом гена β -катеніну віком 1 місяць рівень експресії генів *c-fos* та *цикліну D1* достовірно не відрізнявся від такого у контрольних зразках, однак рівень експресії гена *c-myc* у цих тварин був вищим (рис. 3.6).

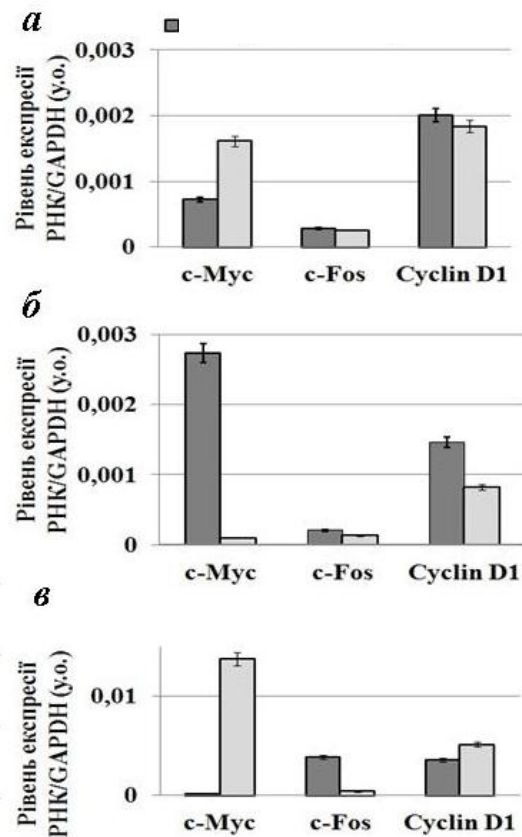


Рис. 3.6. Кінетика експресії генів, які відомі як мішені канонічного Wnt/ β -катенінового сигнального шляху в міокарді тварин із делецією однієї алелі гена β -катеніну (мутант) та контрольних (контроль) тварин різних вікових груп: *a* – 1 місяць, *b* – 3 місяці, *c* – 6 місяців. Примітка: кількість тварин в кожній групі – не менше 2; ■ контроль □ мутант

Варто зауважити, що *c-Myc* є важливим регулятором ембріонального розвитку та підтримки стовбуровості і відновлення пулу стовбурових клітин [146]. Підвищений рівень експресії цього гена у дослідних тварин, в цілому, узгоджується із припущенням про порушення специфікації новонароджених кардіоміоцитів за умов часткової втрати гена β -катеніну та

узгоджується із підвищеним рівнем експресії фетальних генів у цій віковій групі (пункт 3.1.3.).

При дослідженні тварин старшої вікової групи, а саме 3 місяці, виявили пригнічення експресії таргетних генів у тварин із дефіцитом β -катеніну порівняно із серцями контрольної групи тварин (рис. 3.6).

Як вже зазначили вище, гени *c-myc*, *c-fos* та *циклін D1* регулюють ріст та поділ клітин, синтез ДНК та білка, тож зниження рівня експресії цих генів свідчить про пригнічення синтезу білка та ДНК у клітинах, а відповідно і про зниження рівня проліферації та росту. Хочемо звернути увагу на те, що саме у тварин віком 3 місяці спостерігали зниження індексу співвідношення маси серця до маси тіла, тобто затримку росту серця. Ймовірно, це відбувається саме через зниження експресії генів *c-myc*, *c-fos* та *цикліну D1*, що у свою чергу є наслідком пригнічення транскрипційної активності β -катеніну.

Однак, при старінні у мутантних тварин віком 6 місяців спостерігали підвищення експресії генів *c-myc* та *цикліну D1* (рис. 3.6). Варто зауважити, що досліджувані гени перебувають під контролем не лише Wnt/ β -катенінового сигналіngu, а й інших регуляторних каскадів, таких як Hedgehog, Notch та JAK / STAT [147–150]. Тож активація експресії генів *c-myc* та *цикліну D1* у тварин із кардіоспецифічним дефіцитом β -катеніну та пригніченням активності канонічного Wnt може свідчити про активацію інших сигнальних каскадів у серцях мутантних тварин.

Ймовірно, така активація є наслідком адаптації міокарда до вікових змін та відповіддю на певні нейрогуморальні стимули за умов порушення експресії фетальних генів. З іншого боку зауважимо, що підвищення експресії генів, які залучені до контролю проліферації та синтезу білка і ДНК, узгоджується із даними аналізу співвідношення індексу МС / МТ для цієї вікової групи (рис. 3.1), а рівень експресії *c-myc* та *цикліну D1* і значення індексу МС / МТ зростають у дослідних тварин віком 6 місяців.

Висновки:

Отже, показано, що гетерозиготна делеція гена *β-катеніну* у ембріональному серці не призводить до летальності тварин чи морфологічних порушень організації тканини серця та фіброзу, однак спричиняє затримку розвитку дорослого серця. Дефіцит гена *β-катеніну* у кардіоміоцитах пов'язаний із підвищенням експресії фетальних генів та пригніченням активності канонічного Wnt сигналіngu у постнатальному серці. Усе це свідчить про важливість канонічного Wnt сигналіngu та *β-катеніну* у розвитку постнатального серця та перемикання новонародженого органу із фетальної на дорослу генетичну програму.

Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в працях:

1. Embryonically induced *β*-catenin haploinsufficiency attenuates postnatal heart development and causes violation of foetal genes program / O. L. Palchevska, V. V. Balatskii, A. O. Andrejeva, L. L. Macewicz, O.O. Piven, L.L. Lukash // *Biopolymers and Cell*. — 2013. — Vol. 29, No. 2. — P. 124–130.

2. Ембріональна кардіоспецифічна делеція одного алелю *β-катеніну* призводить до зміни сигнальної активності Wnt/*β-катеніну* у дорослому міокарді / В. В. Балацький, О. Л. Пальчевська, А. О. Андрєєва, Л.Л. Мацевич, О.О. Півень, Л.Л. Лукаш // VI International Conference of Young Scientists: Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution. May 13-17, 2013, Odessa, Ukraine, P. 158-159.

3. Signaling and structural role of beta-catenin in adult heart functioning under ageing and stress / O. L. Palchevska, V. V. Balatskyu, A. O. Andreeva, L. L. Macewicz, O.O. Piven, L.L. Lukash // *Wnt Symposium 2013*, July 14-16, 2013, Heidelberg, Germany, P. 77.

4. Embrionically induced cardiospecific beta-catenin haploinsufficiency

attenuated postnatal heart development and leads to violation of fetal program expression / O.O. Piven, O.L. Palchevska, L.L. Macewicz, L.L. Lukash. // EMBO / /EMBL Symposium Cardiac Biology: From Development to Regenerative Medicine, June 7-10, 2013, Heidelberg, Germany, P. 131.

5. Monitoring the postnatal heart development under the conditional knock-out of one allele of beta-catenin in cardiomyocytes / O. L. Palchevska, V. V. Balatskii, A. O. Andreeva, L. L. Macewicz, O.O. Piven, L.L. Lukash // ACTA Biochimica Polonica, Vol. 61 Suppl. 1, Abstracts of the BIO 2014 Congress, September 9-12, 2014, Warsaw, Poland, P. 174.

6. Порушення організації адгеринового комплексу у тканині міокарда як можливий молекулярний механізм розвитку деяких патологій серця / О.О. Півень, Н. Мачушинець, О.Л. Пальчевська, В.В. Балацький, Л.Л. Мацевич, Л.Л. Лукаш // Міжнародна наукова конференція "Механізми функціонування фізіологічних систем", приурочена до 70-ліття біологічного факультету та 230-ліття фізіології у Львівському університеті, 15-17 жовтня, 2014, Львів, Україна, ст. 70-71.

7. Дослідження активності канонічного Wnt – сигналіngu у тварин різного віку за умов ембріональної кардіоспецифічної делеції β -катеніну / О. Л. Пальчевська, В. В. Балацький, А. О. Андреева, Л.Л. Мацевич, О.О. Півень, Л.Л. Лукаш // Cytology and Genetics. — 2015. — Vol. 49, No. 1. — P. 10–17.

3.2. Дослідження сигнальної функції β -катеніну у ізольованих кардіоміоцитах за умови впливу гіпертрофічних стимулів

Зважаючи на літературні дані, канонічний Wnt сигналінг та його основний медіатор β -катенін мають важливе значення у регуляції не лише кардіогенезу, а й у перебудові дорослого серця. Таке припущення

підтверджується і нашими попередніми дослідженнями, де із використанням умовного нокауту однієї алелі гена *β-катеніну* виявили не лише затримку розвитку дорослого серця та активацію фетальних генів у мутантних тварин, а й пригнічення канонічного Wnt сигналіngu. Варто зауважити, що на морфологічному рівні серця тварин дикого типу та тварин з гетерозиготною делецією гена *β-катеніну* не відрізнялись [151, 152]. Тож для з'ясування ролі канонічного Wnt сигналіngu і *β-катеніну* у активності метаболізму та гіпертрофічному рості кардіоміоцитів ми вирішили зосередитись на дослідженні дії гіпертрофічних стимулів на ізольовані кардіоміоцити. Клітини міокарда дикого типу, з частковою та повною втратою гена *β-катеніну* отримували із сердець новонароджених тварин відповідних генотипів і стимулювали розчинами LiCl та H₂O₂ (Див. Матеріали та методи).

У результаті досліджень фізіологічної активності кардіоміоцитів з різними генотипами під впливом дії стимулів показано, що за відсутності впливу хімічних чинників гетерозиготна делеція гена *β-катеніну* не впливала на рівень фізіологічної активності клітин за умов експерименту (рис. 3.7, контроль).

Однак, клітини із повною втратою гена *β-катеніну* демонстрували суттєве зниження фізіологічної активності, що свідчить про важливу роль *β-катеніну* у рості та проліферації кардіоміоцитів (рис. 3.7, контроль).

При обробці клітин хлоридом літію спостерігали підвищення фізіологічної активності кардіоміоцитів дикого типу порівняно із контрольним варіантом без обробки. Це цілком логічно, оскільки LiCl активує сигнальну функцію *β-катеніну*, а останній регулює низку генів, залучених до контролю синтезу ДНК, білка та проліферації [153].

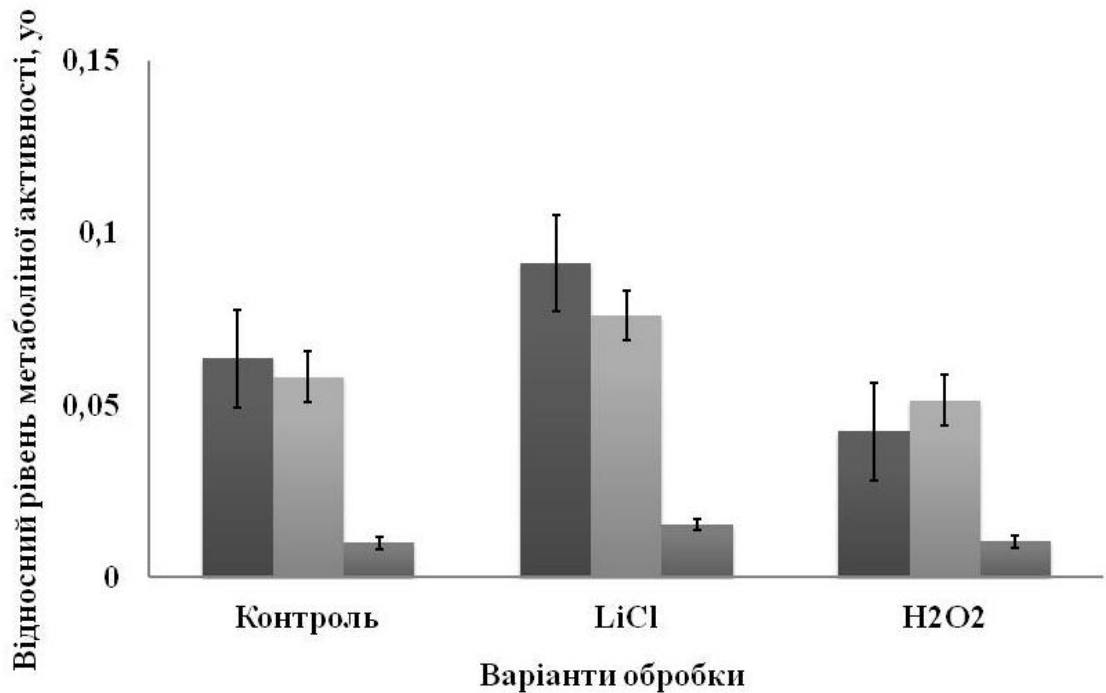


Рис. 3.7. Дослідження активності метаболізму культури первинних кардіоміоцитів за умови індукції гіпертрофії LiCl та H₂O₂: Контроль – клітини без обробки; LiCl – обробка хлоридом літію; H₂O₂ – обробка пероксидом водню; ■ контроль ■ гетерозиготний мутант ■ гомозиготний мутант

Результат, отриманий при обробці клітин з делецією однієї алелі гена β -катеніну, підтвердив висунуте припущення про залучення β -катеніну у регуляцію росту постнатального серця, оскільки за цих умов спостерігали зниження активності метаболізму клітин (рис. 3.7, LiCl). Варто зауважити, що LiCl здатен індукувати гіпертрофію клітин і одним із механізмів такої дії є фосфорилування головного компоненту деградувального комплексу – GSK3 β та вивільнення β -катеніну з подальшою транслокацією у ядро та активацією генів-мішеней останнього. Тож не дивно, що клітини із повною втратою β -катеніну не відповідали на стимули LiCl, що узгоджується із попередніми даними. Тобто, раніше показано, що повна втрата β -катеніну у ембріональному серці хоч і не призводила до виражених морфологічних

вад, однак спричиняла летальність у новонароджених тварин і в пізньому ембріогенезі [5].

Стимуляція клітин пероксидом водню знижувала рівень активності метаболізму культури кардіоміоцитів усіх досліджених генотипів порівняно з контролем за умов експерименту (рис. 3.7, H_2O_2). Як було зазначено вище, пероксид водню здатний модулювати активність метаболізму кардіоміоцитів залежно від концентрації агенту [125, 154]. Тож у даній роботі застосовано найнижчу порогову концентрацію агенту, що спричиняє апоптоз кардіоміоцитів. Експериментально показано, що H_2O_2 спричиняє апоптоз кардіоміоцитів, опосередковано активуючи JNK, кіназу p38, Akt та ERK1/2 [125]. Дійсно, спостерігали зменшення активності метаболізму кардіоміоцитів усіх досліджуваних генотипів при умові дії H_2O_2 . Цікаво, однак, що при умові делеції лише однієї алелі гена *β -катеніну* зменшення активності метаболізму клітин було меншим, ніж у дикотипних клітин під впливом H_2O_2 (рис. 3.7, H_2O_2). Двофакторний дисперсійний аналіз виявив статистично вірогідний ($p \leq 0,05$) вплив як генотипу ($\eta^2 = 0,59$), так і характеру експериментальної обробки клітин ($\eta^2 = 0,13$), а також і спільний вплив цих обох чинників ($\eta^2 = 0,08$) на активність метаболізму первинної культури кардіоміоцитів.

На наступному етапі роботи провели морфологічний аналіз клітин за контрольних умов та за умов стимуляції хлоридом літію. В популяції проаналізованих кардіоміоцитів зустрічались клітини різної морфології, однак ми зосередились на аналізі двоядерних кардіоміоцитів (рис. 3.8), оскільки відомо, що це кардіоміоцити, які досягли термінальної диференціації [155].

При проведенні морфологічного аналізу ізольованих кардіоміоцитів під впливом стимулів враховували зміни площі клітин як найбільш показовий критерій гіпертрофічної відповіді клітин за умов експерименту (рис. 3.9). У результаті аналізу всієї клітинної популяції не було виявлено жодних

статистично вірогідних закономірностей щодо впливу генотипу чи експериментальних чинників на морфологію клітин.

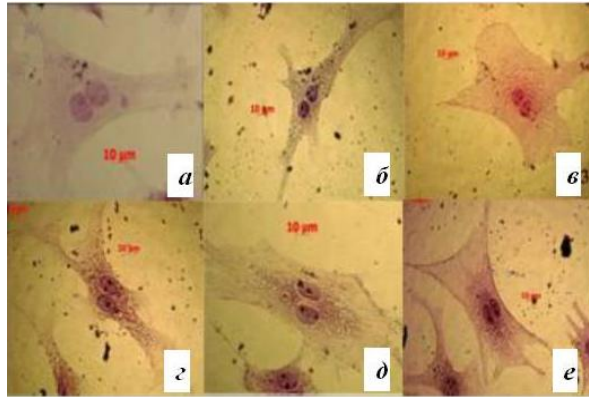


Рис. 3.8. Морфологія первинних кардіоміоцитів (перший пасаж). Гематоксилін - еозинове забарвлення кардіоміоцитів (40 х). *a, z* – кардіоміоцити дикотипних тварин; *б, д* – кардіоміоцити тварин з гетерозиготною делецією гена *β-катеніну*; *в, е* – кардіоміоцити тварин з повною делецією гена *β-катеніну*. Верхній ряд – варіант без обробки. Нижній ряд – після 3-денної обробки LiCl (10 х)

Однак, оскільки гетерогенність клітинної популяції була дуже значною, і це могло приховати певні існуючі закономірності, окремо було проаналізовано термінально диференційовані кардіоміоцити – двоядерні клітини.

Аналіз розподілу частоти зустрічальності клітин з двома ядрами, залежно від їхньої площі, проведений за допомогою дисперсійного аналізу, виявив деякі статистично вірогідні ($p \leq 0,05$) закономірності.

Так, показано тенденцію до зсуву піку кривої в залежності від генотипу ($\eta^2 = 0,53$) – якщо в дикотипних кардіоміоцитах максимум розподілу припадав на класи клітин з найменшою площею, то в кардіоміоцитах з

повним нокаутом гена β -катеніну максимум зміщувався вправо, до класів із середнім значенням цього параметру.

Цікаво, що розподіл кардіоміоцитів, гетерозиготних за нокаутним геном, мав проміжний характер.

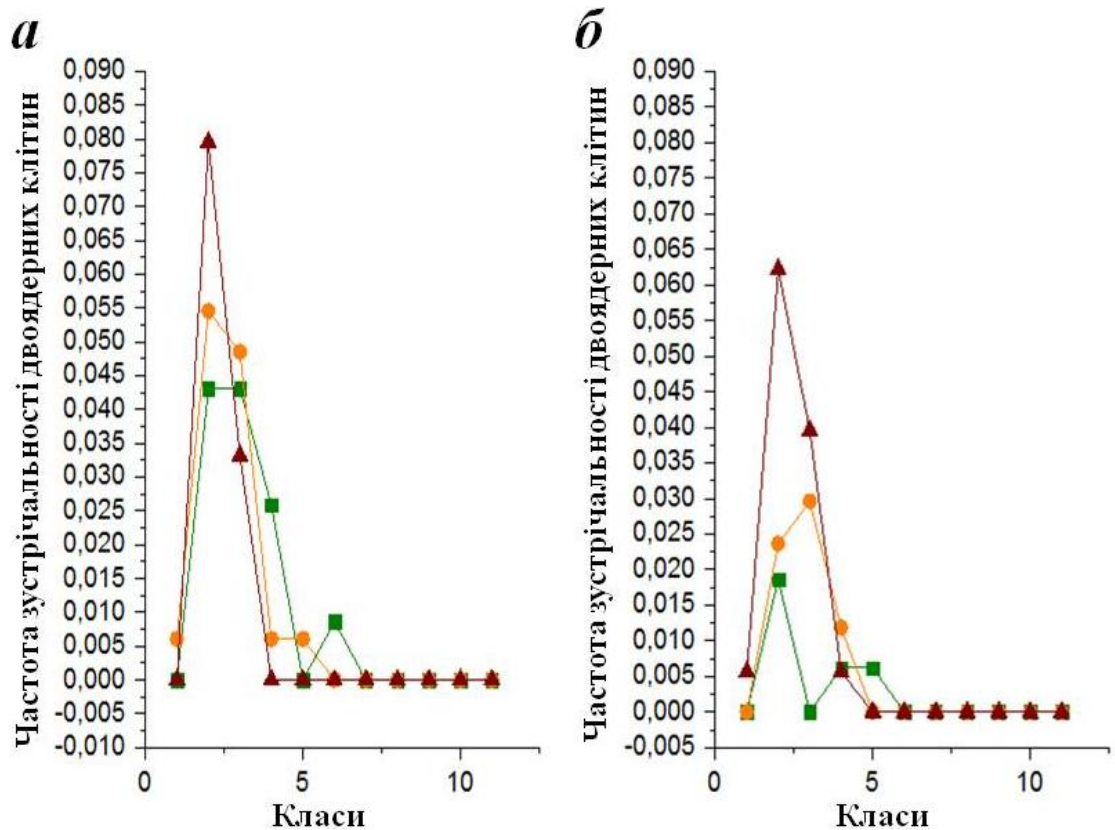


Рис. 3.9. Криві розподілу частоти зустрічальності двоядерних клітин залежно від їхньої площі. Вибірку розбито на класи, де «0» відповідає класу клітин з найменшою площею, а «10» – класу клітин з найбільшою площею: *а* – варіанти без обробки, *б* – варіанти, оброблені хлоридом літію (50 мМ, тривалість - 3 доби). Для кожного варіанту обраховували показники ≥ 100 клітин; ■ – контроль ● – гетерозиготний мутант ▲ – гомозиготний мутант

Однак, при дії хлориду літію характер розподілу змінювався: в клітинах з дефіцитом гена *β -катеніну*, максимальні частоти спостерігалися в класах клітин із середнім значенням площі, а у кардіоміоцитів дикого типу спостерігалось зникнення вираженого піку розподілу ($\eta^2 = 0,25$). Це може вказувати на те, що у клітинах, в яких рівень β -катеніну знижений, відбуваються затримка дозрівання кардіоміоцитів (формування двоядерних КМ) і це може бути наслідком порушення канонічного Wnt сигналіngu. Це спостереження, однак, вимагає подальших досліджень.

У результаті проведеної роботи показано, що повна втрата гена *β -катеніну* спричиняє максимальне зниження активності метаболізму культури кардіоміоцитів і летальності останніх у культурі. Морфологічний аналіз клітин виявив, що як повна, так і часткова втрата гена *β -катеніну* призводили до зміни характеру розподілу двоядерних кардіоміоцитів за площею клітини, що виражається, у збільшенні частки клітин з середнім значенням показника при одночасному зниженні частоти клітин з малою площею. Отже, дефіцит гена *β -катеніну* спричиняв затримки росту неонатальних клітин і менший відсоток двоядерних клітин у популяції, що узгоджується з попередніми даними, де спостерігали затримку росту серця у новонароджених і дорослих тварин віком 1 та 3 місяці. Також, це спостереження узгоджується із нашим припущенням про участь канонічного Wnt у термінальній диференціації кардіоміоцитів та формуванні новонародженого серця.

Висновки:

Отже, можемо зробити висновок, що сигнальна функція β -катеніну є принципово важливою не лише для ембріонального розвитку серця, а й для його постнатального росту, термінальної диференціації кардіоміоцитів. Дефіцит гена *β -катеніну* та пригнічення сигнальної функції канонічного Wnt

сигналіngu спричиняє затримку активності метаболізму культури кардіоміоцитів та розвитку гіпертрофічної відповіді клітин.

Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в працях:

1. Пальчевська О. Л. Сигнальна функція бета-катеніну при адаптації дорослого міокарда ссавців до фізичних навантажень / О. Л. Пальчевська, В. В. Балацький, Л. Л. Мацевич, О.О. Півень, Л.Л. Лукаш // Фактори експериментальної еволюції — 2015. — Том 16. — 225-229 ст.

2. The role of beta-catenin in cardiomyocyte hypertrophy development / O. Palchevska, V. Balatskyu, A. Hazeeva, L. Macewicz, O. Piven // X Parnas Conference Young Scientist Forum «Molecules in the Living Cell and Innovative Medicine», July 10-12, 2016, Wroclaw, Poland, P. 7.

3. Requirement of beta-catenin in postnatal heart development and remodeling / O. L. Palchevska, V. V. Balatskii, L. L. Macewicz, Gan Ana-Maria, Dobrzyn Pawel, O.O. Piven // EMBO / FEBS Lecture Course «Chromatin and the Environment», August, 8-14, 2016, Spetses, Greece, P. 70.

3.3. Дослідження сигнальної функції β -катеніну при адаптації міокарда до фізичних навантажень

Вже зазначалося, що реконструкції міокарда під час адаптації до фізичних навантажень, старіння та відновленні відбуваються загалом за рахунок активації внутрішньоклітинних сигнально-регуляторних шляхів, до яких відноситься і канонічний Wnt сигналіng [83, 96, 156–161].

Однак, як детально було розглянуто у Огляді літератури, роль канонічного Wnt сигнального шляху та β -катеніну у зазначених процесах

остаточно не з'ясована. Наші власні дані свідчать на користь припущення про принципове значення Wnt/ β -катенінового сигналіngu у формуванні постнатального серця та перемикання на «дорослу» генетичну програму. Тож, було висунуто припущення, що цей сигнальний каскад та β -катенін як основний його медіатор також можуть бути залучені і у розвиток гіпертрофії. Для дослідження сигнальної функції гена β -катеніну при адаптаціях дорослого міокарда до фізичних навантажень використали плавальний тест у власній модифікації [134]. Самці мишей контрольної та мутантної груп тварин отримували фізичні навантаження протягом 6 тижнів (розділ Матеріали та методи). Аналіз індексу співвідношення маси серця до маси тіла (МС / МТ) тварин контрольної та дослідної груп, що отримували тривале тренування та тварин, що не отримували фізичного навантаження, виявив тенденцію до збільшення індексу МС / МТ в обох групах тварин за умов фізичного тренування ($p = 0,07$) (рис. 3.10).

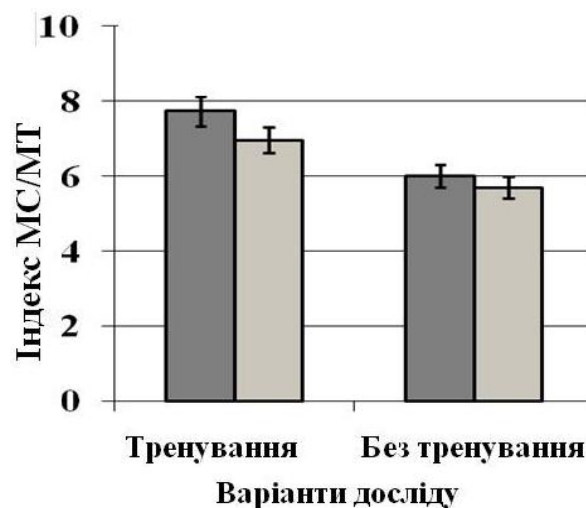


Рис. 3.10. Аналіз індексу співвідношення маси серця до маси тіла у тварин, що отримували тривале фізичне навантаження. Контроль – контрольні самці; Мутант – група тварин з гетерозиготною делецією гена β -катеніну. Кількість тварин в групах 7 – 18 тварин; ■ Контроль □ Мутант

Варто зауважити, що у тварин з дефіцитом гена β -катеніну значення цього індексу було нижчим, порівняно з тваринами контрольної групи, які також отримували тривале фізичне навантаження. Більш детальний аналіз індексу виявив, що коефіцієнт варіації був в 5-10 разів вищим в групі, яка отримувала фізичне навантаження. В той час як середнє значення показника індексу МС / МТ у тренуваних контрольних тварин та тварин з гетерозиготною делецією гена β -катеніну був 0,18 та 0,31 відповідно, у тварин, що не піддавались тривалому тренуванню цей показник складав 0,03 та 0,06, відповідно (рис. 3.11).

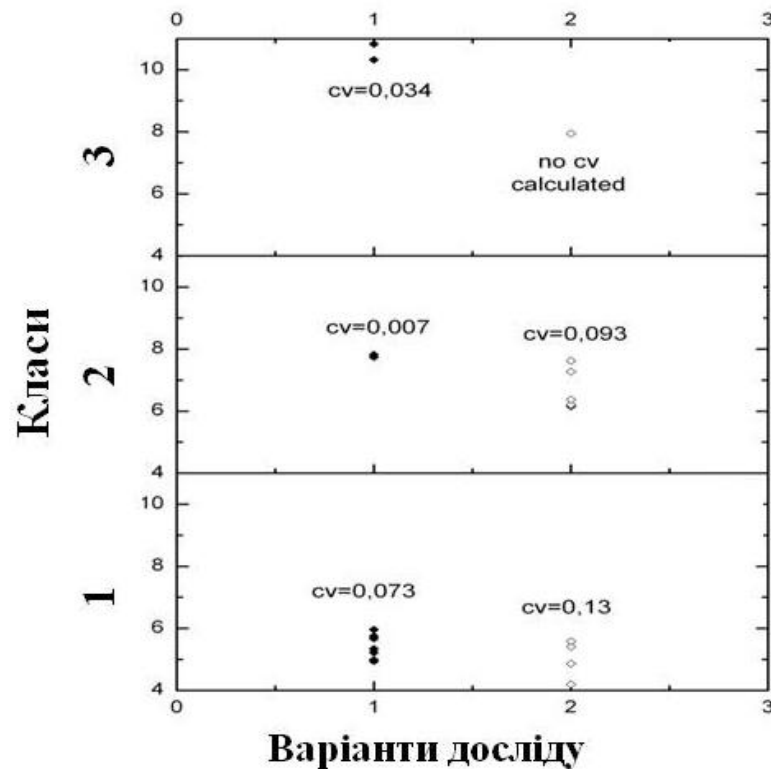


Рис. 3.11. Детальний аналіз індексу співвідношення маси серця до маси тіла у тварин, що отримували тривале фізичне навантаження: контроль – контрольні самці; мутант – група тварин з ембріональною кардіоспецифічною гетерозиготною делецією гена β -катеніну. Кількість тварин в групах: 7-18 тварин; ◆ контроль ◇ мутант

Варто також зауважити, що оскільки серед параметрів експерименту було враховано також такий показник, як інтенсивність тренувань, то було проаналізовано і його. В результаті аналізу не було виявлено статистично вірогідної різниці залежно від генотипу тварин.

Аналіз зміни рівня експресії генів - маркерів гіпертрофії показав, що у тварин із дефіцитом гена β -катеніну у тканині міокарда гени *ANP*, *BNP* та β -МНС експресувалися на вищому рівні як за умов навантажень, так і без них (рис. 3.12).

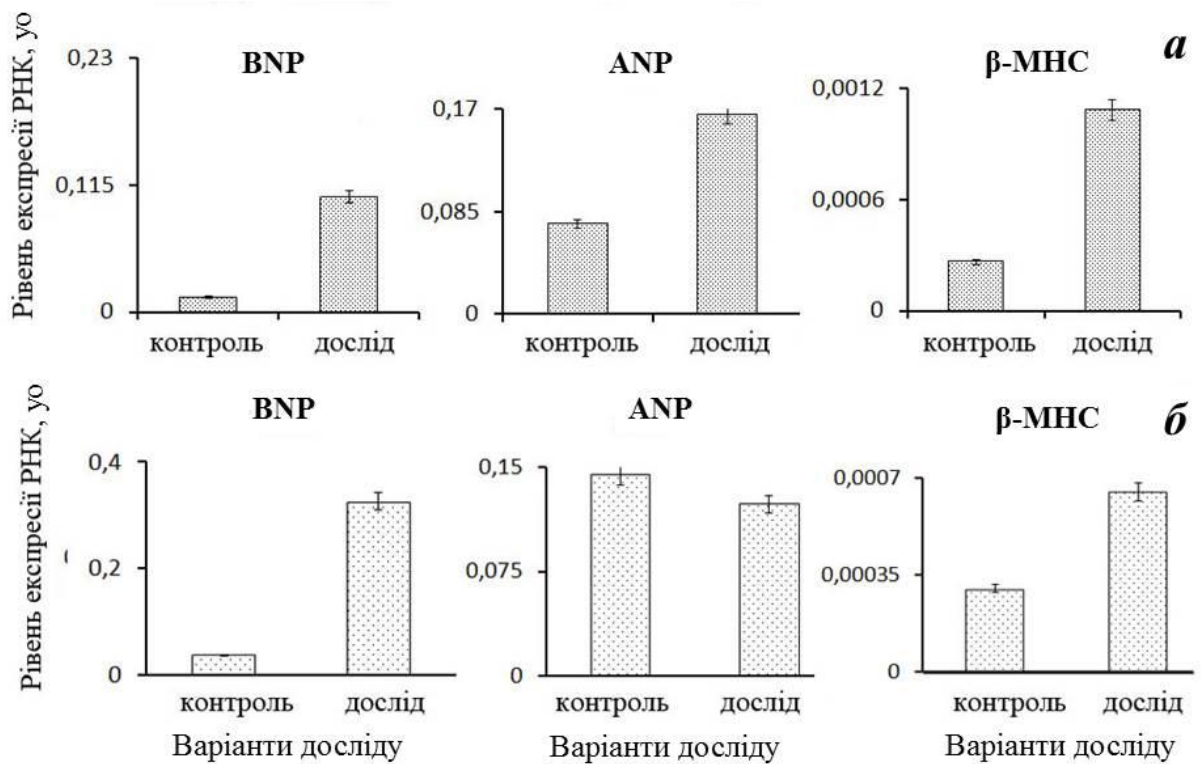


Рис. 3.12. Дослідження рівня експресії генів гіпертрофічної відповіді при тривалому фізичному навантаженні: *а* – група тварин, що не отримували фізичного навантаження, *б* - група тварин, що отримували тривале фізичне навантаження; контроль – контрольні самці; дослід – група тварин з ембріональною кардіоспецифічною гетерозиготною делецією гена β -катеніну. Кількість тварин в групах 2 – 3 тварини

Ці данні узгоджуються із попередніми результатами, коли у тварин віком 3 місяці також спостерігали підвищення рівня експресії усіх досліджуваних генів-маркерів гіпертрофії. Цікаво, що за умов тривалого фізичного навантаження у контрольній групі мишей реєстрували підвищення рівня експресії лише гена *ANP* (рис. 3.12, б).

Ймовірно, саме натрійуретичний пептид типу А залучений до адаптації серця до тривалих фізичних навантажень більшою мірою, ніж *BNP*.

Для з'ясування участі канонічного Wnt сигналінду та β -катеніну у адаптації дорослого міокарда до фізичних навантажень проаналізували зміни рівня експресії гена *TCF4* - транскрипційного ко-активатора канонічного Wnt сигналінду та одного із генів-мішеней β -катеніну – *c-мус* (рис. 3.13).

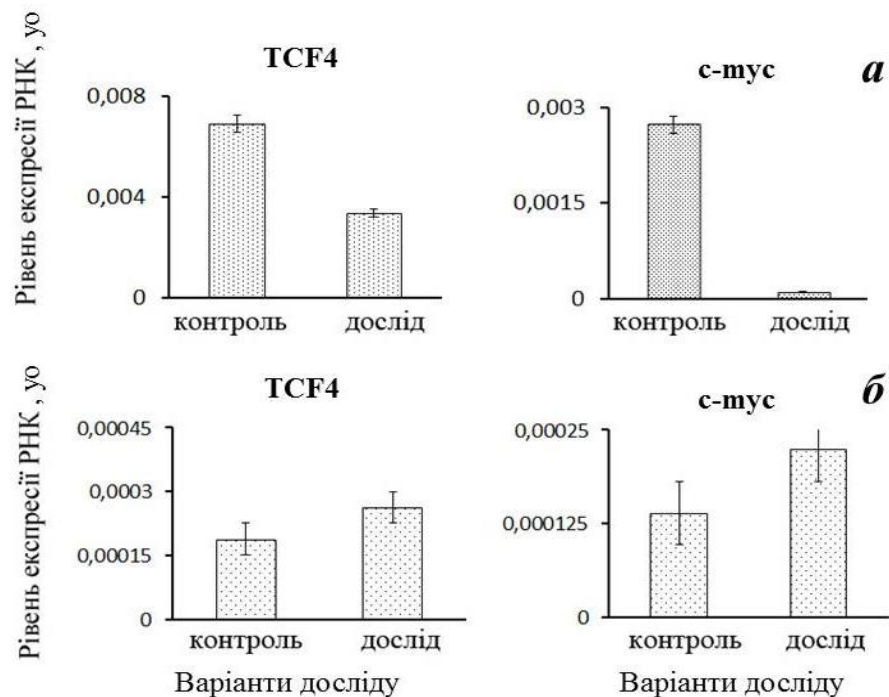


Рис. 3.13. Дослідження рівня активності канонічного Wnt сигналінду при тривалому фізичному навантаженні: *а* – група тварин, що не отримували фізичного навантаження, *б* - група тварин, що отримували тривале фізичне навантаження; контроль – контрольні самці; дослід – група тварин з ембріональною кардіоспецифічною делецією однієї алелі гена β -катеніну. Кількість тварин в групах 2-3 тварини

Перш за все, в результаті аналізу знову зареєстрували зниження сигнальної активності у мутантних тварин віком 4,5 місяців, що узгоджується із попередніми даними. При тривалому фізичному навантаженні у дослідних тварин спостерігали підвищення рівня експресії генів *TCF4* та *c-myc* у тканині міокарда. Отримані дані можуть свідчити про те, що сигнальна активність β -катеніну навіть на базальному рівні є необхідною умовою для адаптації серця. За умов пригнічення активності канонічного Wnt гіпертрофічний ріст серця також відбувається, однак супроводжується активацією транскрипційної функції β -катеніну.

Із застосування Вестерн-блот аналізу також дослідили зміни вмісту активованого β -катеніну та фосфорилюваного GSK3 β для оцінки канонічного Wnt сигналіngu у серцях тварин після навантаження (рис. 3.14).

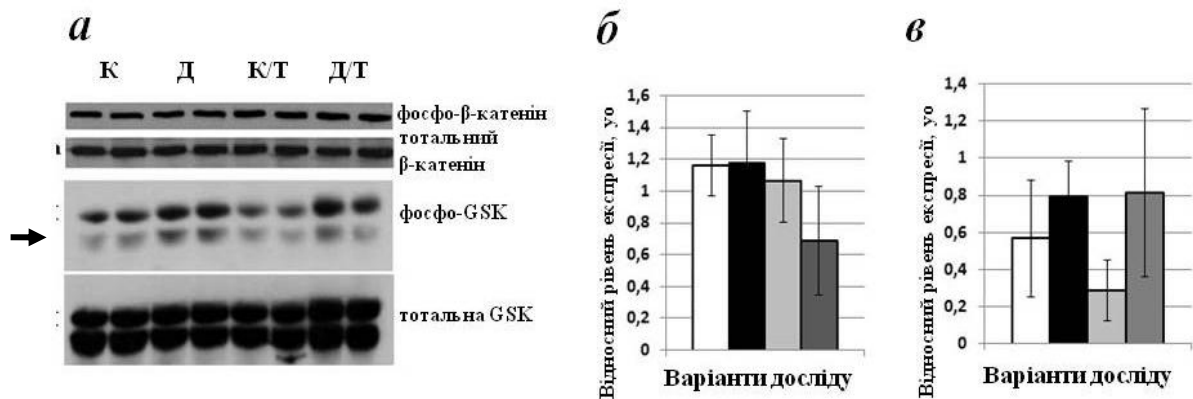


Рис. 3.14. Дослідження рівня фосфорилювання білків, залучених до канонічного Wnt сигналіngu: К – контрольні тварини, Д – дослідні тварини, К/Т – контрольні тварини, що піддавались тривалому фізичному навантаженню, Д/Т – дослідні тварини, що піддавались тривалому фізичному навантаженню: а – результати Вестерн-блоту; б – денситограма рівня експресії фосфорилюваної форми β -катеніну (фосфо- β -катенін) до рівня експресії тотального β -катеніну (тотальний β -катенін); в – денситограма рівня експресії фосфорилюваної форми GSK (фосфо-GSK) до рівня експресії тотальної GSK (тотальний GSK), стрілкою позначено GSK3 β . Кількість тварин в групах: 6-7; \square К \blacksquare Д \square К/Т \square Д/Т

Отримані дані в цілому узгоджуються з результатами аналізу змін експресії генів. Незважаючи на те, що не спостерігали статистично достовірної зміни рівня активованого β -катеніну як у тварин дослідної, так і контрольної групи при тривалому фізичному навантаженні, реєстрували зміни рівня фосфорилованого GSK3 β .

Вестерн-блот аналіз вмісту активного GSK3 β демонструє підвищення останнього у дослідних тварин як за умов фізичного навантаження, так і за умов його відсутності порівняно з контрольною групою тварин.

Однак варто зауважити, що лише у випадку тварин з дефіцитом гена *β -катеніну* це підвищення було статистично вірогідним порівняно з контролем. Це також свідчить про підвищення транскрипційної активності гена *β -катеніну* при адаптації серця до тривалого фізичного навантаження і узгоджується з попередніми даними (рис. 3.13).

Окрім того, було показано, що недостатність однієї алелі гена *β -катеніну* в міокарді тварин при фізичному навантаженні асоційована з активацією не лише канонічного Wnt шляху, а й інших сигнально-регуляторних шляхів (зокрема, MAPK, PI3-кіназного-mTOR-залежного шляхів) (рис. 3.15).

Одразу зазначимо, що підвищення сигнальної активності канонічного Wnt у тварин з дефіцитом гена *β -катеніну* все одно не сягало базального рівня контрольної групи. Однак, у цих тварин відбувалось збільшення показника МС / МТ порівняно з тваринами, що не отримували фізичного навантаження. Припускаємо, що це може відбуватися також і за участі інших сигнально-регуляторних шляхів, що залучені до розвитку гіпертрофії. З огляду на припущення, проаналізовано зміни рівня фосфорилуваних ERK та АКТ, які є компонентами згаданих вище MAPK та PI3-кіназного-mTOR-залежного шляхів відповідно (рис. 3.15).

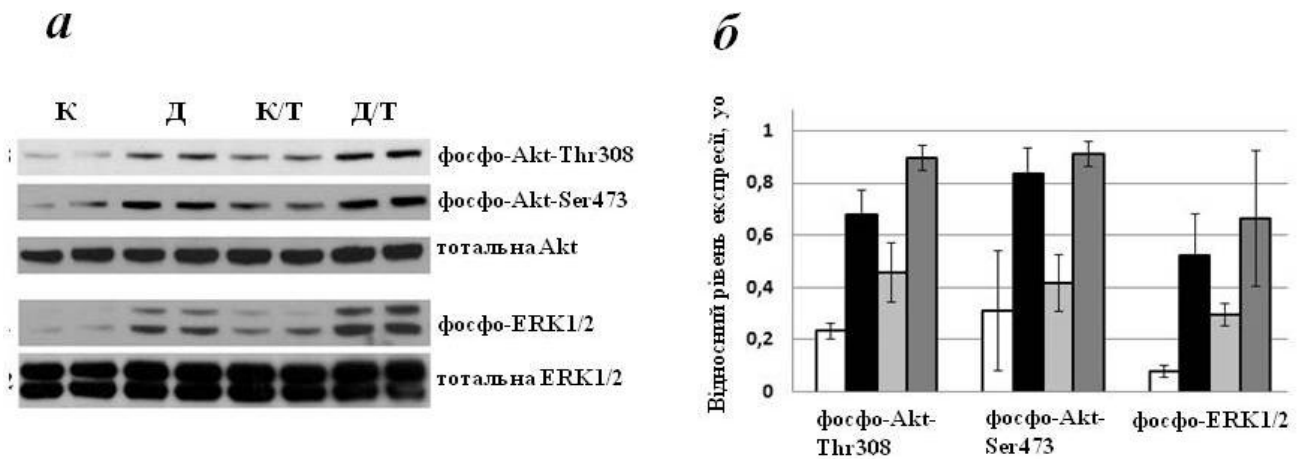


Рис. 3.15. Дослідження рівня фосфорилювання Akt та ERK1/2. К – контрольні тварини, Д – дослідні тварини, К/Т - контрольні тварини, що піддавались тривалому фізичному навантаженню, Д/Т - дослідні тварини, що піддавались тривалому фізичному навантаженню: *a* – результати Вестерн-блоту; *б* – денситограма рівнів експресії фосфорилованих форми Akt (фосфо-Akt-Thr308, фосфо-Akt-Ser473) та ERK1/2 (фосфо-ERK1/2, Thr202/Tyr20) до рівнів експресії їхніх тотальних форм Akt та ERK1/2, відповідно). Кількість тварин в групах: 6-7; □К ■Д □К/Т □Д/Т

В результаті проведеного аналізу було виявлено у тварин з гетерозиготною делецією гена *β-катеніну* підвищення рівня фосфорилювання ERK та AKT як за умови фізичного навантаження, так і без нього. Варто зауважити, що при фізичному навантаженні рівні фосфорилювання цих білків були вищими, ніж у тварин дослідної групи без тренувань (рис. 3.15).

Окрім того, спостерігали підвищення рівня фосфорилювання ERK та AKT і у тварин контрольної групи при адаптації до фізичного навантаження. Однак, це підвищення було вдвічі нижчим, ніж у тварин з дефіцитом гена *β-катеніну* (рис. 3.15). Результати Вестерн-блот аналізу узгоджуються з припущенням про важливість канонічного Wnt сигналіngu навіть на базальному рівні для ефективної адаптації міокарда до фізичних

навантажень. За умови пригнічення транскрипційної активності β -катеніну гіпертрофія розвивається, однак для цього активуються не лише канонічний Wnt сигналінг, а й імовірно інші сигнально-регуляторні шляхи, такі зокрема, як MAPK та PI3 - кіназний - mTOR - залежний сигналінги.

Очевидно, певну роль відіграє і той факт, що окремі компоненти зазначених шляхів фосфорилуються навіть більшою мірою, ніж у контрольної групи тварин за умов експерименту. Це, певною мірою, вказує на компенсаторну функцію цих сигнально-регуляторних шляхів при розвитку гіпертрофії за умов пригнічення канонічного Wnt. З іншого боку, це свідчить про те, що навіть активація цих сигналінгів за умови зниженої транскрипційної активності β -катеніну не є достатньою умовою для ефективної адаптації дорослого міокарда до фізичних тренувань.

Висновки:

Отже, встановлено, що наявність сигнальної активності β -катеніну, навіть на базальному рівні, є необхідною умовою для ефективної адаптації дорослого серця до тривалих фізичних навантажень. За умови пригнічення сигнальної активності β -катеніну адаптація серця можлива лише при активації інших сигналінгів, залучених до розвитку гіпертрофії.

Ймовірно, існує компенсаторний ефект за рахунок підвищення рівня фосфорилуваних форм ERK та Akt при розвитку гіпертрофії за умов пригнічення канонічного Wnt.

Основні результати підрозділу опубліковано в працях:

1. Вплив делеції гена β -катеніну на морфологію та фізіологію кардіоміоцитів за умов дії стимуляторів гіпертрофії / О.Л. Пальчевська, А.А. Хазєєва, Н.В. Мачушинець, Т.П. Рубан, Л.Л. Мацевич, О.О. Півень //

Фактори експериментальної еволюції організмів. — 2016. — Том 18. — Р. 242–248.

2. The requirement of beta-catenin in heart maturation and stress adaptation / O.L. Palchevska, V.V. Balatskyu, L.L. Macewicz, O.O. Piven // Conference for Young Scientists CYS-2015, September 21-25, 2015, Kyiv, Ukraine, P. 74.

3. The role of beta-catenin in cardiomyocyte hypertrophy development / O. Palchevska, V. Balatskyu, A. Hazeeva, L. Macewicz, O. Piven // X Parnas Conference Young Scientist Forum «Molecules in the Living Cell and Innovative Medicine», July 10-12, 2016, Wroclaw, Poland, P. 7.

4. Requirement of beta-catenin in postnatal heart development and remodeling / O. L. Palchevska, V. V. Balatskii, L. L. Macewicz, Gan Ana-Maria, Dobrzyn Pawel, O.O. Piven // EMBO / FEBS Lecture Course «Chromatin and the Environment», August, 8-14, 2016, Spetses, Greece, P. 70.

3.4. Мета-аналіз зв'язку розвитку гіпертрофії та активності β-катеніну

Нині для оцінки стану міокарда застосовують цілу панель маркерів. Однак, вона не є універсальною, або стандартизованою і різні автори у своїх дослідженнях схиляються до вибору різних комбінацій цих маркерів. Проте, наші дані, а також дані літератури вказують на те, що не всі ці маркери є однаково показовими.

Аналізуючи весь масив експериментальних робіт, можемо сказати, що частіше за все для оцінки розвитку гіпертрофії використовують співвідношення вмісту ДНК / білок, рівень експресії генів *GSK3β*, *цикліну D1*, *ANP*, *BNP*, *β-МНС*, *α-МНС*, *SERCA*, *Axin2*, різних типів актину (actin DIF),

кадгерину, конексину-43 (*cx43*), *c-myc*, *TCF/Lef*, *c-fos*, *VEGFR* (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*), *LRP*, *SFRP4*, *TGF β* (*Transforming Growth Factor- β*), *mTOR* (*mammalian target of rapamycine*) тощо. Важливу увагу автори приділяють і експресії цих маркерів на рівні білку.

Для більш детального дослідження відтворюваності таких маркерів було проведено аналіз даних літератури з застосуванням методів статистики (регресійний та дисперсійний аналіз).

Стратегію проведення аналізу наведено у розділі Матеріали та методи (п. 2.7).

Застосування методу дисперсійного аналізу дало змогу виявити достовірний вплив рівня експресії генів *c-myc* ($\eta^2 = 0,38$, $g = 0,096$) та *ANP* ($\eta^2 = 0,095$, $g = 0,17$) на рівень розвитку гіпертрофії, а також зв'язок експресії *c-myc* і β -катеніну ($\eta^2 = 0,38$, $g = 0,095$) (рис. 3.16, *a* і *б* відповідно).

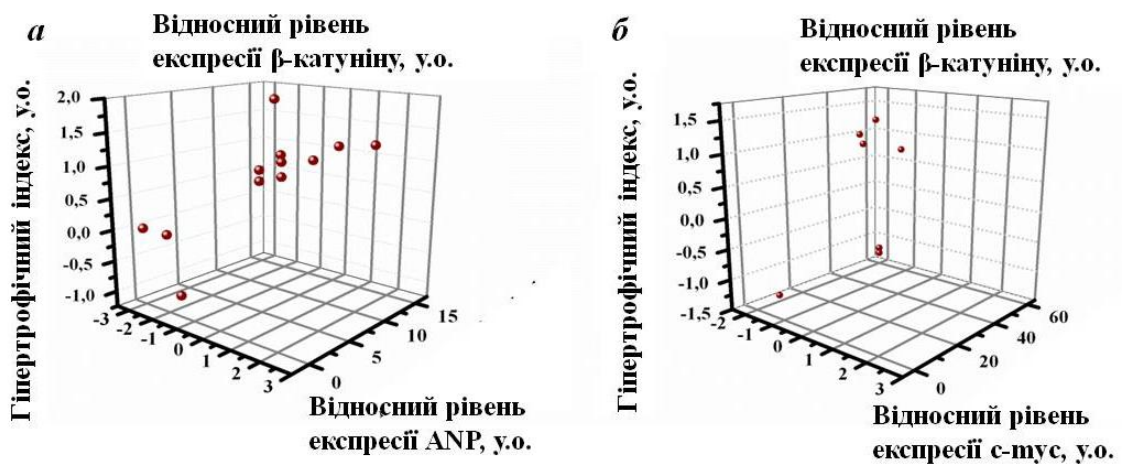


Рис. 3.16. Зв'язок відносного рівня експресії ANP (*a*) та *c-myc* (*б*) з гіпертрофічними індексами та відносним рівнем експресії β -катеніну

Цікаво, що саме ці гени були найпоказовішими при дослідженні розвитку гіпертрофії в різних експериментах даної роботи. Тобто,

експериментальні дані, отримані в ході виконання роботи, узгоджуються з даними мета-аналізу і підтверджують попереднє припущення про необхідність адекватного вибору панелі генів при дослідженні гіпертрофії.

Ці дані вказують на те, що саме сигнальна функція β -катеніну відіграє важливу роль в розвитку гіпертрофії міокарда, оскільки *c-myc* є відомим таргетним геном канонічного Wnt сигналіngu [45, 145, 162].

Також, з використанням методу регресії виявили достовірний зв'язок між рівнем розвитку гіпертрофії та експресією *SERCA* ($r = 0.86$, $p \leq 0,05$), різних форм актину (*actin DIF*) ($r = 0.71$, $p \leq 0,05$) та *Axin2*, який залучений до негативного «фідбеку» канонічного Wnt сигналіngu ($r = 0,83$, $p \leq 0,05$) (рис. 3.17).

Результати регресійного аналізу свідчать про те, що для розвитку гіпертрофії міокарда рівень експресії гена *Axin2* має бути пригніченим. Зважаючи на важливу роль білку *Axin2* у регуляції транскрипційної активності гена β -катеніну, ці данні узгоджуються із попередніми припущеннями та результатами експериментів. Так, пригнічення експресії *Axin2* призводить до послаблення контролю рівня цитозольного білка β -катеніну та активації його сигнальної функції.

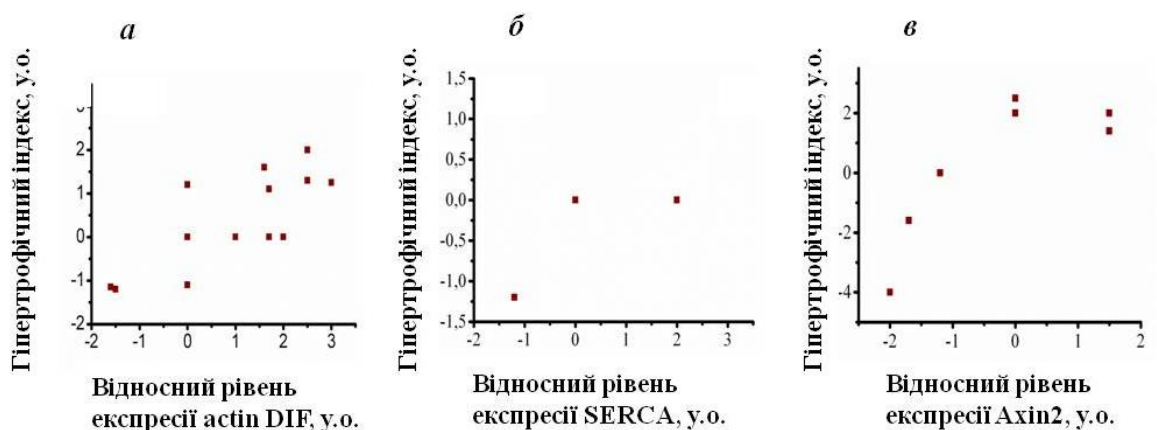


Рис. 3.17. Залежність показника гіпертрофічного індексу від відносного рівня експресії: *a* - різних форм актину (*actin DIF*), *б* – *SERCA*, *в* - *Axin2*

Отже, незважаючи на широке використання цілої панелі маркерів стану міокарда, нам вдалось встановити достовірний вплив лише деяких з них (зокрема, SERCA, actin DIF, Axin2, c-мус, ANP) на зміни індексів гіпертрофії. Також показано, що експресія цих генів достовірно пов'язана з експресією β -катеніну.

Висновки:

В результаті проведеного мета-аналізу було показано, що зміни рівня β -катеніну та його транскрипційної активності є необхідною умовою розвитку гіпертрофії незалежно від видової та тканинної специфічності. Наведені дані свідчать про високу консервативність механізму розвитку гіпертрофії та важливе значення канонічного Wnt у ньому. Окрім того, було встановлено універсальні маркери з найвищим рівнем відтворюваності для аналізу гіпертрофії.

Основні результати опубліковано в роботах:

1. Palchevska O. L. A link between β -catenin and hypertrophy: evaluation and meta-analysis / O. L. Palchevska, L. L. Macewicz, O. O. Piven // *Biopolymers and Cell*. — 2016. — Vol. 32, No. 2. — P. 150–157.

Розділ 4

УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА АНАЛІЗ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

У результаті проведених досліджень показано, що β -катенін має принципово важливу сигнальну функцію у постнатальному розвитку серця. Встановлено, що втрата лише однієї алелі досліджуваного гена в ембріональному серці призводить до затримки росту дорослого міокарда та пригнічення активності канонічного Wnt сигналінгу. Той факт, що у роботі не спостерігали порушень архітектури тканин серця, свідчить про те що, для постнатального розвитку є важливою саме сигнальна функція гена. Це узгоджується і із попередніми результатами отриманими у нашому відділі [5]. Так, було показано, що кардіоспецифічна делеція гена *β -катеніну* на ранніх стадіях розвитку ембріону призводить до летальності, яка, однак, не супроводжувалась морфологічними вадами серця чи ембріону. Також було показано, що низький рівень експресії білка β -катеніну достатній для підтримання нормальної адгезії клітин [80]. Тобто, зниження рівня експресії гена *β -катеніну* не призводить до драматичних порушень архітектури міокарда, однак, може призводити до зміни рівня активності канонічного Wnt сигналінгу [163].

Зважаючи на низку експериментальних робіт та власні дані [61, 164], все ж таки схилиємося до думки, що саме пригнічення канонічного Wnt сигналінгу є причиною затримки росту дорослого серця за умов нашого експерименту. На користь цієї думки свідчать і результати аналізу змін рівня експресії генів-мішеней β -катеніну, і генів залучених до регуляції активності канонічного Wnt.

Як вже зазначалося вище, у роботі спостерігали зниження транскрипційної активності β -катеніну, про що свідчить рівень експресії гена *TCF4* у всіх проаналізованих вікових групах мишей. Це свідчить про пригнічення активності канонічного Wnt та узгоджується із іншими експериментальними роботами, де авторами було показано, що низький рівень експресії гена β -катеніну призводить до зміни активності Wnt/ β -катенінового сигнального шляху [163, 165]. Окрім того, було показано, що усі три досліджені гени-мішені сигнального шляху Wnt: *c-myc*, *c-fos* та *циклін D1*, експресувались на нижчому рівні у тварин із гетерозиготною делецією гена β -катеніну порівняно із контрольною групою дорослих тварин (віком 3 місяці).

Вочевидь, пригнічення канонічного Wnt сигналіngu спричиняє і пригнічення експресії генів *c-myc*, *c-fos* та *циклін D1*, які у свою чергу залучені до контролю регулювання поділу та росту клітин [144, 145]. Зниження експресії цих генів призводить до затримки синтезу білка, ДНК, а отже, росту та проліферації клітин, що врешті-решт реалізується у затримці росту дорослого серця. Порівняно із дорослим серцем у ювенільному міокарді (тварини віком 1 місяць) не спостерігали зниження експресії зазначених генів, хоча активність канонічного Wnt сигналіngu також була пригніченою порівняно із контрольною групою тварин того ж віку. Натомість, спостерігали підвищення рівня експресії гена *c-myc*. Як вже зазначалося, цей ген не лише є протонкогеном та транскрипційним фактором, а й важливим регулятором ембріонального розвитку. На нашу думку підвищений рівень експресії цього гена у тварин віком 1 місяць може бути наслідком активації інших сигнальних систем клітини, або порушенням перемикання новонародженого серця на дорослу генетичну програму за умов зниження транскрипційної активності β -катеніну.

Так дійсно, у тварин ювенільної та дорослої вікових груп (1 та 3 місяці) також спостерігали підвищення експресії гіпертрофічних або

фетальних генів. Загально відомо, що реактивація фетальних генів (*ANP*, *BNP* та β -*MHC*) та пригнічення міозину дорослого серця (α -*MHC*) є типовими для гіпертрофії. Однак, у роботі саме для цих вікових груп не спостерігали ні типового для гіпертрофії збільшення показника індексу МС / МТ, ні розвитку фіброзу. Варто зауважити, що отримані дані узгоджуються із результатами інших досліджень, де автори спостерігали підвищення експресії гіпертрофічних генів у дорослому серці після ТАС, однак без розвитку гіпертрофії, тобто фіброзу та підвищення індексу МС / МТ [120]. Цікаво також, що автори у цій роботі використовували тварин з гетерозиготною делецією гена β -катеніну у серці, тобто модель подібну до використаної в роботі. Така знахідка може свідчити про те, що згадані гени не є універсальними маркерами гіпертрофії. Однак, з іншого боку це може свідчити про те, що навіть підвищення їхньої експресії не є достатньою умовою для розвитку патології у тварин із дефіцитом гена β -катеніну. Окрім того, це може вказувати і на те, що пригнічення канонічного Wnt сигналіngu у новонародженому серці спричиняє порушення його формування: термінального диференціювання кардіоміоцитів та активації «дорослої» генетичної програми. Тобто, сигнальна активність канонічного Wnt, яку до речі, спостерігали у серцях тварин контрольної групи віком 1 місяць, необхідна для росту новонародженого серця та пригнічення фетальних генів: *ANP*, *BNP* та β -*MHC* і активації міозину дорослого серця [153, 154]. Саме таке перемикання з однієї генетичної програми на іншу є необхідною умовою дозрівання міокарда та його функціонування як дорослого органу [166, 167].

Відомо, що β -катенін є одним з принципових регуляторів кардіогенезу, пригнічення його транскрипційної активності є необхідною умовою для диференціювання стовбурових клітин, а активація – для експансії прогеніторних кардіальних клітин у сформовані первинне та вторинне серцеві поля [24, 81, 137, 168]. Вочевидь, активація канонічного Wnt залучена і у регуляцію постнатального росту серця, та, як вказують

представлені дані, на його визрівання. Із застосуванням ізольованих кардіоміоцитів вдалось показати, що повна втрата гена *β-катеніну* спричиняє максимальне зниження активності метаболізму кардіоміоцитів і летальність останніх у культурі. Клітини із гетерозиготною делецією гена *β-катеніну* не гинули у культурі, однак мали проміжний рівень метаболізму між кардіоміоцитами із повною втратою гена та дикотипними клітинами. Окрім того, виявили, що як повна так і часткова втрата гена *β-катеніну* призводили до зміни характеру розподілу двоядерних кардіоміоцитів за площею клітини.

Простіше кажучи, за умови втрати гена *β-катеніну* двоядерні кардіоміоцити зустрічалися із меншою частотою, ніж у контролі, і такі клітини мали слабшу відповідь на дію гіпертрофічних стимулів. Отримані дані узгоджуються із попередніми результатами, коли спостерігали затримку росту серця у новонароджених і дорослих тварин віком 1 та 3 місяці. Це узгоджується з припущенням про участь канонічного Wnt у термінальному диференціюванні кардіоміоцитів та формуванні новонародженого серця. Також ці дані узгоджуються з результатами, отриманими у відділі раніше, де було показано, що повна втрата гена *β-катеніну* є летальною для новонароджених тварин. Тобто, за умови повної делеції гена у новонародженому серці не відбувається специфікація клітин і таке «ембріональне» серце є несумісним із виконанням функції дорослого органу.

Відомо, що у ссавців кардіоміоцити після народження проходять перший поділ (у мишей - без цитокінезу), що призводить до утворення двоядерних клітин [138]. Саме ця подія є ключовою у термінальному диференціюванні клітин серця, визріванні серця та його переході на дорослу генетичну програму. Сукупність представлених експериментальних даних показує, що для ефективного перемикавання серця на дорослу генетичну програму та специфікації кардіоміоцитів сигнальна функція *β-катеніну* є необхідною умовою.

Деякі автори припускають, що канонічний Wnt шлях не відіграє жодної ролі в постнатальному здоровому міокарді і перебуває на базальному рівні [77]. Результати представленої свідчать про те, що навіть базальний рівень активності Wnt – принципово важливий для розвитку серця. Хронічне пригнічення його активності, що було змодельовано у нашому експерименті у новонародженому та дорослому серці (тварини віком 1 та 3 місяці), спричиняє гіпертрофічний ріст серця у тварин віком 6 місяців. Окрім того, у цих тварин спостерігалось зниження експресії натрійуретичних пептидів та підвищений рівень експресії обох міозинів – дорослого та ембріонального. При аналізові цієї вікової групи також спостерігали пригнічення активності канонічного Wnt сигналіngu.

Однак, при старінні у мутантних тварин віком 6 місяців відбувалось підвищення експресії генів *c-myc* та *циклін D1*. Зауважимо, що підвищення експресії генів, які залучені до контролю проліферації та синтезу білка і ДНК, узгоджується із даними аналізу співвідношення індексу MC / MT для цієї вікової групи. І рівень експресії *c-myc* та *циклін D1*, і значення індексу MC / MT зростають у дослідних тварин віком 6 місяців. На перший погляд, дані експресії генів-мішеней β -катеніну, фетальних генів та активність самого сигналіngu дещо не узгоджуються. Однак, якщо взяти до уваги той факт, що досліджувані гени перебувають під контролем не лише Wnt/ β -катенінового сигналіngu, а й інших регуляторних каскадів (таких, як Hedgehog, Notch, та JAK / STAT [38, 150, 169–171]), стає очевидним, що відбувається активація інших сигнальних каскадів у серцях мутантних тварин. Таке припущення узгоджується із результатами аналізу вмісту фосфорилуваних форм ERK1/2 та Akt у тварин контрольної групи та тварин із гетерозиготною делецією гена *β -катеніну* віком 4,5 місяців.

Дійсно, спостерігали підвищення вмісту цих білків, основних медіаторів MAPK-ERK1/2 та PI3K/Akt/mTOR залежного сигнальних шляхів, у серцях тварин з дефіцитом гена *β -катеніну* навіть за умов відсутності

впливу стресових чинників. Висловлюється припущення, беручи до уваги дані літератури, що між канонічним Wnt та зазначеними сигнальними каскадами існують певні компенсаторні механізми і пригнічення, або порушення активності одного із них буде компенсуватися іншими для підтримання гомеостазу та функціонування органу (рис. 4.1).

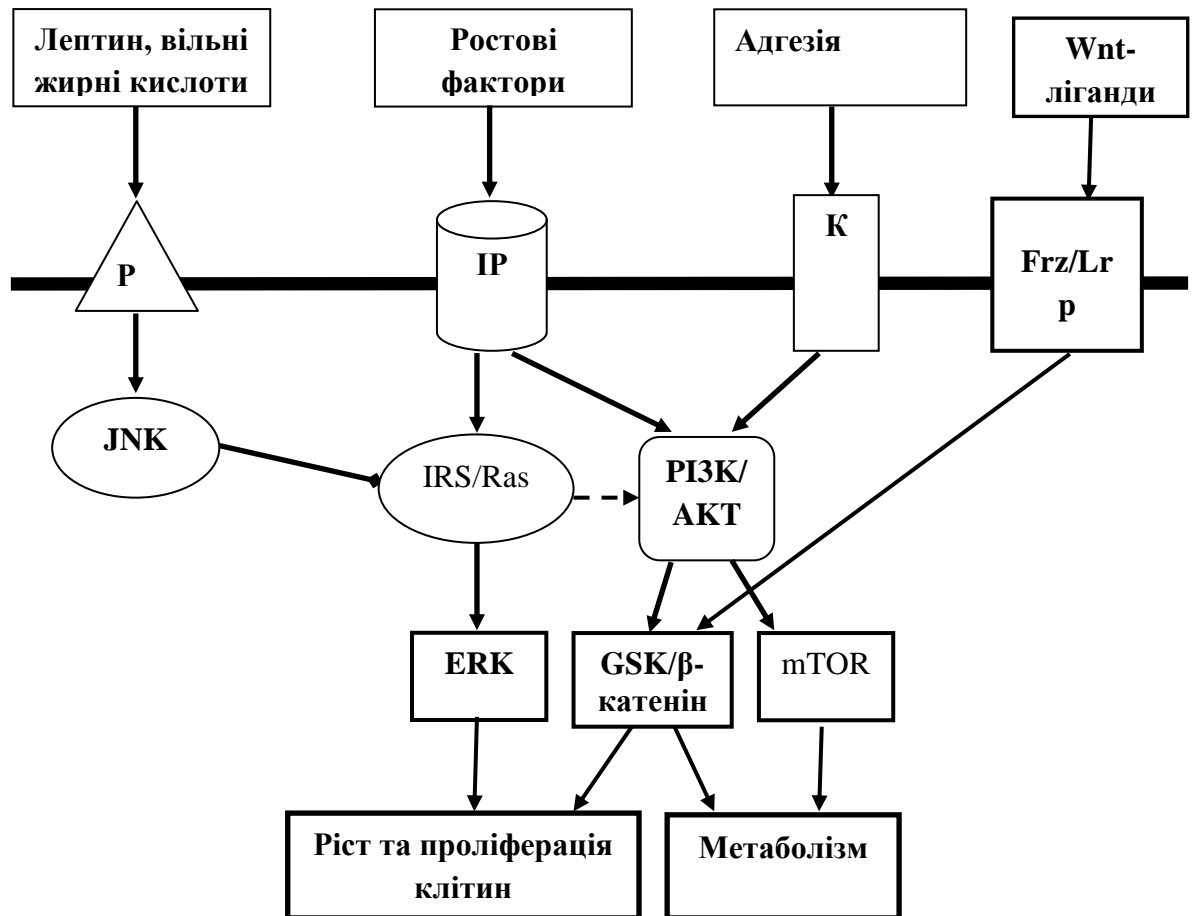


Рис. 4.1. Схематичне зображення взаємодії різних сигнальних шляхів в клітині. P – рецептори, IP – інтегринові рецептори, К – кадгерини, JNK – Janus-like kinase, IRS – insulin receptor substrate, PI3K – phosphoinositide-3-kinase, AKT – protein kinase B, ERK - extracellular signal-regulated kinase, GSK – glycogen synthase kinase, mTOR – mammalian target of rapamycin

Відомо, що канонічний Wnt сигналінг та PI3-кіназний-mTOR-залежний сигнальний каскад мають спільну мішень – негативний медіатор у клітині, а

саме GSK3 [106, 119, 172, 173]. Фосфорилування останнього є результатом дії Akt та спричиняє підвищення вмісту стабілізованого β -катеніну. Ймовірно, Akt у відповідь на дію ростових факторів, гормонів деактивує GSK3 у клітині, однак за умови дефіциту гена *β -катеніну* активація канонічного Wnt сигналінгу не відбувається, або є недостатньою для розвитку серця. Однак, такий пролонгований дисбаланс між сигнальними системами кардіоміоцитів може бути причиною розвитку гіпертрофії з віком. Тим більше, що і MAPK, і PI3-кіназний-mTOR-залежний сигнальні каскади активують ріст та проліферацію клітин і навіть залучені до розвитку гіпертрофії [75, 106, 172, 174–176]. Таке припущення є досить цікавим, проте потребує більш детального аналізу.

Зважаючи на літературні дані та власні спостереження, припускаємо, що пригнічення канонічного Wnt сигналінгу у новонародженому і дорослому серці призводить, з одного боку, до порушення перемикання новонародженого міокарда на дорослу генетичну програму, а з іншого боку - спричиняє порушення тонкого балансу між рештою сигнально-регуляторних систем. Тож активація експресії генів *c-myc* та *циклін D1* у тварин із кардіоспецифічним дефіцитом β -катеніну та пригніченням активності канонічного Wnt може бути наслідком активації інших сигнальних каскадів. Ймовірно, така активація є наслідком адаптації міокарда до вікових змін та відповіддю на певні нейрогуморальні стимули за умови порушення експресії фетальних генів. Таке припущення узгоджується із результатами Chen і співав. [6].

Авторами було показано, що β -катеніновий сигналінг має важливе значення для ефективної адаптації серця до фізичних вантажень. Так, після спрямованої делеції гена *β -катеніну* у дорослому міокарді вчені не спостерігали летальності, або виражених вад серцевої функції. Загалом такі тварини мали нормальний фенотип, і лише у більш тривалі терміни спостережень, а саме через 32 тижні, автори зареєстрували морфологічні

зміни тканини міокарда: витончення стінок серця, розвиток кардіоміопатії. Вочевидь, за умов пригнічення канонічного Wnt сигналінгу тварини гірше пристосовувались до вікових змін.

Доросле серце - це динамічний орган і протягом життя воно зазнає безлічі впливів різних стресових чинників гормональної, нейрогуморальної природи та ін. Серце постійно адаптується до тих чи інших навантажень, і така адаптація, перш за все, відбувається на молекулярно-генетичному рівні, що у свою чергу є наслідком активації внутрішньоклітинних сигнально-регуляторних шляхів [97, 106, 112, 159]. Розуміння, які саме сигнально-регуляторні каскади активуються у кардіоміоцитах під час навантаження, які основні рушійні сили розвитку тієї чи іншої патології, а також як ті чи інші сигнальні каскади взаємодіють один із одним для підтримання стабільності та робочого стану серця, є надзвичайно важливими не лише з точки зору фундаментальної науки, а й з точки зору медицини. Як вже зазначалося в огляді, що сигнальна функція канонічного Wnt при гіпертрофії чи регенерації міокарда досить активно вивчається, однак, нині не існує одностайної думки стосовно цього питання. З іншого боку, відомо, що при гіпертрофії відбувається ембріоналізація дорослого серця, то ж логічно припустити, що відправною точкою при гіпертрофічній відповіді буде і активація сигнальних каскадів, які залучені до контролю ембріогенезу, диференціювання клітини та контролю стовбуровості.

Експериментально було встановлено, що активація канонічного Wnt шляху викликає розвиток гіпертрофії *in vitro* та *in vivo* і спричиняє летальність [107]. Також було встановлено, що експресія конститутивно активної форми β -катеніна у культурі кардіоміоцитів спричиняє спонтанну гіпертрофію [8]. Іншою групою дослідників, було показано що делеція однієї алелі гена *β -катеніну* виключно у тканині серця призводила до меншої гіпертрофічної відповіді у мишей порівняно із контрольними тваринам [120]. Це може означати, що гіпертрофія не розвивалася у тварин з дефіцитом β -

катеніну в міокарді за умов хронічного підвищеного кров'яного тиску, однак, вчені спостерігали підвищення експресії ембріональних або гіпертрофічних генів у таких тварин в порівнянні з контрольною групою. Такі дані узгоджуються із спостереженнями, зробленими в ході виконання роботи, де із застосуванням іншої моделі індукції гіпертрофії, також не спостерігали вираженої гіпертрофічної відповіді у тварин із делецією однієї алелі гена β -катеніну. Окрім того, спостерігали підвищення експресії фетальних генів, однак варто зауважити, що у тварин із гетерозиготною делецією гена β -катеніну навіть за умов відсутності тривалих фізичних навантажень гіпертрофічні гени експресувалися на вищому рівні порівняно із контролем. На відміну від згаданої вище роботи Qi та співавторів [120], у роботі індукували гіпертрофію, як адаптацію до тривалого фізичного навантаження, у тварин з серцем, що не зазнало визрівання та перемикання на дорослу генетичну програму. І в даній роботі спостерігали активацію канонічного Wnt у тварин із гетерозиготною делецією гена β -катеніну після 6 тижнів фізичних тренувань. Ймовірно, якби продовжити тренування до 8 або 10 тижнів, можна було б зареєструвати і достовірне підвищення індексу гіпертрофії.

Тож, можемо узагальнити, що пригнічення активності канонічного Wnt стримує адаптацію дорослого серця до впливу гіпертрофічних стимулів. Гіпотезу про принципову важливість канонічного Wnt сигналіngu, навіть його базального рівня для адаптації серця до фізичних навантажень підтверджують і результати експерименту з індукції гіпертрофії. У роботі показано, що пригнічення активності канонічного Wnt сигналіngu спричиняє і підвищення активних форм ERK та Akt, що дає змогу говорити про активацію MAPK-ERK1/2 і PI3-кіназного-mTOR-залежного сигнальних каскадів у серцях тварин із дефіцитом гена β -катеніну. Тобто, навіть тварини з недостатністю сигнальної функції β -катеніну, що не піддавались дії хронічних фізичних навантажень, мали активовані ERK та Akt. У випадку

фізичних навантажень ми спостерігали підвищення місту фосфорилуваних форм ERK та Akt у тварин контрольної групи мишей, що є цілком логічно, оскільки для цих сигнальних систем показана їхня важлива роль у розвитку гіпертрофії, рості клітин у тому числі і кардіоміоцитів [125, 173, 177].

Однак, тут є два важливі та цікаві моменти. По-перше, при тренуванні тварин з гетерозиготною делецією гена *β-катеніна* також відбувалось статистично вірогідне підвищення зазначених ключових медіаторів MAPK-ERK1/2 і PI3K/Akt/mTOR залежних сигнальних каскадів, однак гіпертрофічна відповідь у таких тварин була меншою порівняно із тваринами дикого типу. По-друге, навіть суттєво вищий рівень вмісту фосфорилуваних ERK та Akt у серцях тварин із недостатністю *β-катеніну* порівняно із контрольними тваринами не є достатньою умовою для адаптації серця до фізичних навантажень. Як вже зазначалося вище, існують певні компенсаторні механізми і взаємодії між канонічним Wnt, MAPK-ERK1/2 та PI3K/Akt/mTOR-залежними сигнальними каскадами (рис. 4.1). Однак, для розвитку постнатального серця та його ефективної адаптації необхідною умовою є базальний рівень канонічного Wnt сигналіngu. І хоча у даній роботі спостерігали зниження вмісту фосфорилуваного GSK3 у тварин контрольної групи при фізичному навантаженні, це не суперечить уявленню про важливість канонічного Wnt для розвитку гіпертрофічної відповіді. Вважаємо, що в моделі, яку аналізували в даній роботі, стан канонічного Wnt у більш пізні терміни спостережень міг бути більш пригнічений за рахунок численних негативних «фідбеків» клітини. І як було показано, активація канонічного Wnt сигналіngu та *β-катеніну* є досить ранньою подією у часі, однак необхідною для активації фетальної або гіпертрофічної програми генів [121].

У огляді літератури згадувалося про існуючі протиріччя у літературі стосовно ролі *β-катеніну* у гіпертрофії. Так, група Baugand показано, що для ефективної адаптації серця до гіпертрофії необхідною умовою є пригнічення

активності канонічного Wnt сигналіngu [9] Варто зауважити, що в даному дослідженні автори аналізують тільки зміни розмірів кардіоміоцитів і зміни рівня експресії лише одного гіпертрофічного маркера - гена *ANP*. Проте, інші автори використовували більш комплексний підхід, тобто аналізували зміни більшої низки параметрів та маркерів: індекс співвідношення маси серця до ваги тіла, рівень експресії інших генів маркерів гіпертрофії (*BNP*, β -*MHC*, α -*MHC*) і / або генів-мішеней β -катеніну (*циклін D1*, *c-myc*, *c-fos*).

Імовірно, протиріччя у існуючих та опублікованих даних стосовно ролі канонічного Wnt сигналіngu та β -катеніну можна пояснити різними методичними підходами. Таке припущення підтверджується результатами проведеного мета-аналізу. Із застосуванням регресійного та дисперсійного аналізів вдалось показати, що розвиток гіпертрофії завжди асоціюється із підвищенням рівня β -катеніну. Це свідчить про універсальний та консервативний механізм розвитку гіпертрофії взагалі для різних типів тканини, оскільки були проаналізовані експериментальні дослідження гіпертрофії і серця, і печінки, і хрящової тканини та інше. Тобто, підвищення рівня білка / мРНК β -катеніну є необхідною умовою розвитку гіпертрофії в усіх модельних об'єктах. Окрім того, ідентифіковано набір маркерів, які є відтворюваними при дослідженні гіпертрофії: *SERCA*, різні форми актину (*actin DIF*), *axin2*, *c-myc*, *циклін D1*, *BNP*, *ANP* та індекс співвідношення тотального білка / ДНК. По-перше, застосування саме такої лінійки маркерів дозволить дещо стандартизувати дослідження гіпертрофії серця, що буде сприяти зменшенню протиріч та дискусивних моментів і стосовно класифікації гіпертрофії і молекулярних механізмів її розвитку та виникнення. По-друге, виявлений зв'язок між рівнем β -катеніну та зазначеними маркерами при розвитку гіпертрофії вказує на те, що існує значима взаємодія між β -катеніном та індексом гіпертрофії (МС / МТ), а також рівнями гіпертрофічних маркерів.

Усе разом, це узгоджується із експериментальними даними і свідчить на користь припущення про критичне значення β -катеніну не лише у постнатальному розвитку серця, а й при його адаптації до гіпертрофічних стимулів, а також пояснює існуючі протиріччя у літературі, що згадувались вище.

Окрім того, не варто забувати і про особливості кінетики Wnt/ β -катенінового сигналіngu та виду гіпертрофічного стимулу. Цілком ймовірно, що при дії гормональних чинників кінетика активності Wnt/ β -катенінового сигналіngu може мати кілька піків. Можливо, регуляторна функція Wnt відіграє важливу роль на ранніх стадіях розвитку гіпертрофії. Багато експериментальних робіт із застосуванням цілої низки гіпертрофічних стимулів свідчать на користь такого припущення. Коли ж патологія розвивається, сигнальна функція β -катеніну, ймовірно, пригнічується в клітині завдяки негативному «зворотньому зв'язку», або завдяки участі інших сигнальних механізмів клітини, які здатні взаємодіяти і регулювати канонічний Wnt сигналінг.

Тож, узагальнюючи власні та літературні дані, зроблено висновок, що канонічний Wnt сигналінг та β -катенін беруть участь не лише в регуляції раннього кардіогенезу, а й залучені на більш пізніх етапах формування органу. Базальний рівень активності канонічного Wnt сигналіngu є необхідною та критичною умовою для перемикання новонародженого серця на «дорослу» генетичну програму. Окрім того, навіть базальний рівень канонічного Wnt сигналіngu є достатнім для адаптації дорослого міокарда до навантажень та стресів.

ВИСНОВКИ

Сигнальна функція гена β -катеніну важлива для розвитку постнатального серця та адаптації дорослого міокарда до тривалих фізичних навантажень. Гетерозиготна делеція гена β -катеніну спричиняє пригнічення активності канонічного Wnt шляху у тканині міокарда і, як наслідок, порушення термінального диференціювання кардіоміоцитів та формування постнатального серця.

1. Гетерозиготна делеція гена β -катеніну у ембріональному серці не спричиняє летальності дорослих тварин та виражених морфологічних вад структури міокарда.

2. Ембріональна кардіоспецифічна гетерозиготна делеція гена β -катеніну призводить до затримки розвитку дорослого серця та асоційована із підвищеною експресією фетальних генів в два і більше разів (*ANP*, *BNP* та β -*MHC*).

3. Гетерозиготна і повна делеція гена β -катеніну призводять до пригнічення метаболізму і гіпертрофічного росту клітин, а також зниження частоти виявлення двоядерних кардіоміоцитів, що є ознакою порушення термінального диференціювання в умовах *in vitro*.

4. Ембріональна кардіоспецифічна гетерозиготна делеція гена β -катеніну спричиняє пригнічення експресії гена *TCF4* у два рази та активацію канонічного Wnt сигналінгу (експресії генів-мішеней *c-myc*, *циклін D1* та *c-fos*) у серцях новонароджених та дорослих тварин.

5. Сигнальна функція β -катеніну є необхідною умовою адаптації дорослого серця до фізичних навантажень. За умови гетерозиготної делеції гена β -катеніну адаптація може відбуватись за рахунок активування кіназ ERK1/2 та Akt.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Roger V. L. Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the american heart association / V. L. Roger, A. S. Go, D. M. Lloyd-Jones[et al.] // *Circulation*. — 2012. — Vol. 125, No. 1. — P. e2–e220.
2. Nadal-Ginard B. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure / B. Nadal-Ginard // *Circulation Research*. — 2003. — Vol. 92, No. 2. — P. 139–150.
3. Lickert H. Formation of multiple hearts in mice following deletion of beta-catenin in the embryonic endoderm / H. Lickert, S. Kutsch, B. Kanzler[et al.] // *Developmental cell*. — 2002. — Vol. 3, No. 2. — P. 171–181.
4. Huelsken J. Requirement for β -catenin in anterior-posterior axis formation in mice / J. Huelsken, R. Vogel, V. Brinkmann[et al.] // *The Journal of Cell biology*. — 2000. — Vol. 148, No. 3. — P. 567–578.
5. Piven O. O. Requirement for N-cadherin-catenin complex in heart development / O. O. Piven, I. E. Kostetskii, L. L. Macewicz[et al.] // *Experimental Biology and Medicine*. — 2011. — Vol. 236, No. 7. — P. 816–822.
6. Chen X. The β -catenin/T-cell factor/lymphocyte enhancer factor signaling pathway is required for normal and stress-induced cardiac hypertrophy / X. Chen, S. P. Shevtsov, E. Hsich[et al.] // *Molecular and Cellular Biology*. — 2006. — Vol. 26, No. 12. — P. 4462–4473.
7. Hirschy A. Stabilised β -catenin in postnatal ventricular myocardium leads to dilated cardiomyopathy and premature death / A. Hirschy, A. Croquelois, E. Perriard[et al.] // *Basic Research in Cardiology*. — 2010. — Vol. 105, No. 5. — P. 597–608.
8. Hahn J.-Y. B-catenin overexpression reduces myocardial infarct size through differential effects on cardiomyocytes and cardiac fibroblasts / J.-Y. Hahn, H.-J. Cho, J.-W. Bae[et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. — 2006. — Vol.

- 281, No. 41. — P. 30979–30989.
9. Baurand A. B-catenin downregulation is required for adaptive cardiac remodeling / A. Baurand, L. Zelarayan, R. Betney[et al.] // *Circulation Research*. — 2007. — Vol. 100, No. 9. — P. 1353–1362.
 10. Rijsewijk F. The drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless / F. Rijsewijk, M. Schuermann, E. Wagenaar[et al.] // *Cell*. — 1987. — Vol. 50, No. 4. — P. 649–657.
 11. Fung Y. K. Nucleotide sequence and expression in vitro of cDNA derived from mRNA of int-1, a provirally activated mouse mammary oncogene / Y. K. Fung, G. M. Shackelford, A. M. Brown[et al.] // *Mol Cell Biol*. — 1985. — Vol. 5, No. 12. — P. 3337–3344.
 12. Cabrera C. V. Phenocopies induced with antisense RNA identify the wingless gene / C. V. Cabrera, M. C. Alonso, P. Johnston[et al.] // *Cell*. — 1987. — Vol. 50, No. 4. — P. 659–663.
 13. Kikuchi A. Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors / A. Kikuchi, H. Yamamoto, S. Kishida // *Cellular Signalling*. — 2007. — Vol. 19, No. 4. — P. 659–671.
 14. Schans V. A. M. van de The Wnt/Frizzled pathway in cardiovascular development and disease: friend or foe? / V. A. M. van de Schans, J. F. M. Smits, W. M. Blankesteyn // *European Journal of Pharmacology*. — 2008. — Vol. 585, No. 2-3. — P. 338–345.
 15. Riggleman B. Molecular analysis of the armadillo locus: uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a drosophila segment polarity gene / B. Riggleman // *Genes and Development*. — 1989. — Vol. 3, No. 1. — P. 96–113.
 16. Cadigan, K. M., Liu Y. I. Wnt signaling: complexity at the surface / Y. I. Cadigan, K. M., Liu // *Journal of Cell Science*. — 2006. — Vol. 119, No. 3. — P. 395–402.
 17. Mikels A. J. Wnts as ligands: processing, secretion and reception / A. J.

- Mikels, R. Nusse // *Oncogene*. — 2006. — Vol. 25, No. 57. — P. 7461–7468.
18. Shevtsov S. P. Activation of β -catenin signaling pathways by classical g-protein-coupled receptors / S. P. Shevtsov, S. Haq, T. Force // *Cell cycle*. — 2006. — Vol. 5, No. 20. — P. 2295–2300.
 19. Clevers H. Tcf/lef factors earn their wings / H. Clevers, M. Van de Wetering // *Trends in Genetics*. — 1997. — Vol. 13, No. 12. — P. 485–489.
 20. Nusse, R., Nelson W. J. Convergence of Wnt, β -catenin, and cadherin pathways / W. J. Nusse, R., Nelson // *Science*. — 2004. — Vol. 303, No. 5663. — P. 1483–1488.
 21. Holstein T. W. The evolution of the Wnt pathway the evolution of the Wnt pathway / T. W. Holstein // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* — 2012. — Vol. 4, No. 7. — P. a007922.
 22. Rao T. P. An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more / T. P. Rao, M. Kuhl // *Circulation Research*. — 2010. — Vol. 106, No. 12. — P. 1798–1806.
 23. Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling in development and disease / H. Clevers // *Cell*. — 2006. — Vol. 127, No. 3. — P. 469–480.
 24. Grigoryan T. Deciphering the function of canonical wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice / T. Grigoryan, P. Wend, A. Klaus, W. Birchmeier // *Genes & development*. — 2008. — Vol. 22, No. 17. — P. 2308–2341.
 25. Gordon M. D. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors / M. D. Gordon, R. Nusse // *Journal of Biological Chemistry*. — 2006. — Vol. 281, No. 32. — P. 22429–22433.
 26. Archbold H. C. How do they do wnt they do?: regulation of transcription by the Wnt/ β -catenin pathway / H. C. Archbold, Y. X. Yang, L. Chen, K. M. Cadigan // *Acta Physiologica*. — 2012. — Vol. 204, No. 1. — P. 74–109.
 27. Abo A. Modulating Wnt receptor turnover for tissue repair / A. Abo, H. Clevers // *Nature Biotechnology*. — 2012. — Vol. 30, No. 9. — P. 835–836.

28. Stepniak E. Adhesive and signaling functions of cadherins and catenins in vertebrate development. / E. Stepniak, G. L. Radice, V. Vasioukhin // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. — 2009. — Vol. 1, No. 5. — P. a002949.
29. Ozhan G. Wnt/ β -catenin signaling in heart regeneration / G. Ozhan, G. Weidinger // *Cell regeneration (London, England)*. — 2015. — Vol. 4, No. 3. — P. 1–12.
30. Askevold E. T. The cardiokine secreted Frizzled-related protein 3, a modulator of Wnt signalling, in clinical and experimental heart failure / E. T. Askevold, P. Aukrust, S. H. Nymo[et al.] // *Journal of Internal Medicine*. — 2014. — Vol. 275, No. 6. — P. 621–630.
31. Sklepkiwicz P. Loss of secreted Frizzled-related protein-1 leads to deterioration of cardiac function in mice and plays a role in human cardiomyopathy / P. Sklepkiwicz, T. Shiomi, R. Kaur[et al.] // *Circulation: Heart Failure*. — 2015. — Vol. 8, No. 2. — P. 362–372.
32. Buchert M. Genetic dissection of differential signaling threshold requirements for the Wnt/ β -catenin pathway in vivo / M. Buchert, D. Athineos, H. E. Abud[et al.] // *PLoS Genetics*. — 2010. — Vol. 6, No. 1. — P. e1000816.
33. Ross S. E. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling / S. E. Ross, N. Hemati, K. A. Longo[et al.] // *Science*. — 2000. — Vol. 289, No. 5481. — P. 950–953.
34. Yousef H. Mechanisms of action of hESC-secreted proteins that enhance human and mouse myogenesis / H. Yousef, M. J. Conboy, H. Mamiya[et al.] // *Aging*. — 2014. — Vol. 6, No. 8. — P. 1–19.
35. Mikels A. J. Purified Wnt5a protein activates or inhibits β -catenin-TCF signaling depending on receptor context / A. J. Mikels, R. Nusse // *PLoS biology*. — 2006. — Vol. 4, No. 4. — P. e115.
36. Dawson K. Role of the Wnt-Frizzled system in cardiac pathophysiology: a rapidly developing, poorly understood area with enormous potential / K. Dawson, M. Aflaki, S. Nattel // *The Journal of physiology*. — 2013. — Vol.

- 591, No. 6. — P. 1409–1432.
37. Uysal-Onganer P. Wnt-11 promotes neuroendocrine-like differentiation, survival and migration of prostate cancer cells / P. Uysal-Onganer, Y. Kawano, M. Caro[et al.] // *Molecular cancer*. — 2010. — Vol. 9, No. 55. — P. 1–11.
38. Yu J. Updating the Wnt pathways / J. Yu, D. M. Virshup // *Bioscience reports*. — 2014. — Vol. 34, No. 5. — P. 593–607.
39. Maltzahn J. von Wnt7a treatment ameliorates muscular dystrophy / J. von Maltzahn, J.-M. Renaud, G. Parise, M. a Rudnicki // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2012. — Vol. 109, No. 50. — P. 20614–20619.
40. Katoh M. Cross-talk of Wnt and FGF signaling pathways at GSK3beta to regulate β -catenin and snail signaling cascades / M. Katoh, M. Katoh // *Cancer biology & therapy*. — 2006. — Vol. 5, No. 9. — P. 1059–1064.
41. Frey J. L. Wnt-LRP5 signaling regulates fatty acid metabolism in the osteoblast / J. L. Frey, Z. Li, J. M. Ellis[et al.] // *Molecular and Cellular Biology*. — 2015. — Vol. 35, No. 11. — P. 1979–1991.
42. Alapati D. Inhibition of LRP5/6-mediated Wnt/ β -catenin signaling by MesD attenuates hyperoxia-induced pulmonary hypertension in neonatal rats / D. Alapati, M. Rong, S. Chen[et al.] // *Pediatric research*. — 2013. — Vol. 73, No. 6. — P. 719–725.
43. Schneider V. A. Wnt antagonism initiates cardiogenesis in *Xenopus laevis* / V. A. Schneider, M. Mercola // *Genes and Development*. — 2001. — Vol. 15, No. 3. — P. 304–315.
44. Ikeda S. Axin, a negative regulator of the wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 β and β -catenin and promotes GSK-3 β -dependent phosphorylation of β -catenin / S. Ikeda, S. Kishida, H. Yamamoto[et al.] // *The EMBO journal*. — 1998. — Vol. 17, No. 5. — P. 1371–1384.
45. Kikuchi A. Roles of axin in the Wnt signalling pathway / A. Kikuchi // *Cellular*

- signalling. — 1999. — Vol. 11, No. 11. — P. 777–788.
46. Liu C. Control of β -catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism / C. Liu, Y. Li, M. Semenov[et al.] // *Cell*. — 2002. — Vol. 108, No. 6. — P. 837–847.
47. Li J. New frontiers in heart hypertrophy during pregnancy / J. Li, S. Umar, M. Amjadi[et al.] // *American Journal of Cardiovascular Disease*. — 2012. — Vol. 2, No. 3. — P. 192–207.
48. Thorstensen L. The Wnt signaling pathway and its role in human solid tumors / L. Thorstensen, R. Lothe // *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. — 2011. — Vol. 7, No. 2. — P. 146–161.
49. Daugherty R. L. Phospho-regulation of β -catenin adhesion and signaling functions / R. L. Daugherty, C. J. Gottardi // *Physiology (Bethesda, Md.)*. — 2007. — Vol. 22, No. 14. — P. 303–9.
50. Antos C. L. Activated glycogen synthase-3 beta suppresses cardiac hypertrophy in vivo / C. L. Antos, T. A. McKinsey, N. Frey[et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2002. — Vol. 99, No. 2. — P. 907–912.
51. Kuhl M. Wnt signaling goes nuclear / M. Kuhl, D. Wedlich // *BioEssays*. — 1997. — Vol. 19, No. 2. — P. 101–104.
52. Garcia-Gras E. Suppression of canonical Wnt/ β -catenin signaling by nuclear plakoglobin recapitulates phenotype of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy / E. Garcia-Gras, R. Lombardi, M. J. Giocondo[et al.] // *Journal of Clinical Investigation*. — 2006. — Vol. 116, No. 7. — P. 2012–2021.
53. Vlad A. The first five years of the Wnt targetome / A. Vlad, S. Röhrs, L. Klein-Hitpass, O. Müller // *Cellular Signalling*. — 2008. — Vol. 20, No. 5. — P. 795–802.
54. Marinou K. Wnt signaling in cardiovascular physiology / K. Marinou, C. Christodoulides, C. Antoniadis, M. Koutsilieris // *Trends in endocrinology and*

- metabolism: TEM. — 2012. — Vol. 23, No. 12. — P. 628–36.
55. Sethi J. K. Wnt signalling and the control of cellular metabolism / J. K. Sethi, A. Vidal-Puig // *Biochemical Journal*. — 2010. — Vol. 427, No. 1. — P. 1–17.
56. García E. B. G. Gardner's syndrome (familial adenomatous polyposis): a cilia-related disorder / E. B. G. García, N. V. Knoers // *The Lancet Oncology*. — 2009. — Vol. 10, No. 7. — P. 727–735.
57. Mao C. D. Cell-context dependent TCF/LEF expression and function: alternative tales of repression, de-repression and activation potentials / C. D. Mao, S. W. Byers // *Critical reviews in eukaryotic gene expression*. — 2011. — Vol. 21, No. 3. — P. 207–36.
58. Heyden M. a van der Identification of Connexin43 as a functional target for Wnt signalling / M. a van der Heyden, M. B. Rook, M. M. Hermans[et al.] // *Journal of cell science*. — 1998. — Vol. 111, No. 12. — P. 1741–1749.
59. Harada N. Lack of tumorigenesis in the mouse liver after adenovirus-mediated expression of a dominant stable mutant of β -catenin / N. Harada, H. Miyoshi, N. Murai[et al.] // *Cancer Research*. — 2002. — Vol. 62, No. 7. — P. 1971–1977.
60. Blow M. J. CHIP-seq identification of weakly conserved heart enhancers / M. J. Blow, D. J. Mcculley, Z. Li[et al.] // *Nat Genet*. — 2010. — Vol. 42, No. 9. — P. 806–810.
61. Palchevska O. L. A link between β -catenin and hypertrophy : evaluation and meta-analysis / O. L. Palchevska, L. L. Macewicz, O. O. Piven // *Biopolymers and Cell*. — 2016. — Vol. 32, No. 2. — P. 150–157.
62. Anton R. B-catenin signaling contributes to stemness and regulates early differentiation in murine embryonic stem cells / R. Anton, H. Kestler, M. Kühl // *FEBS Letters*. — 2007. — Vol. 581, No. 27. — P. 5247–5254.
63. Cavey M. Molecular bases of cell – cell junctions stability and dynamics / M. Cavey, T. Lecuit // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. — 2009. — Vol. 1, No. 5. — P. 1–19.

64. Hinck L. Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly / L. Hinck, I. S. Näthke, J. Papkoff, W. J. Nelson // *J Cell Biol.* — 1994. — Vol. 125, No. 6. — P. 1327–1340.
65. Näthke I. S. Defining interactions and distributions of cadherin and catenin complexes in polarized epithelial cells / I. S. Näthke, L. Hinck, J. R. Swedlow[et al.] // *J Cell Biol.* — 1994. — Vol. 125, No. 6. — P. 1341–1352.
66. Lilien J. Turn-off, drop-out: functional state switching of cadherins / J. Lilien, J. Balsamo, C. Arregui, G. Xu // *Developmental Dynamics.* — 2002. — Vol. 224, No. 1. — P. 18–29.
67. Li J. Cardiac tissue-restricted deletion of plakoglobin results in progressive cardiomyopathy and activation of β -catenin signaling / J. Li, D. Swope, N. Raess[et al.] // *Molecular and Cellular Biology.* — 2011. — Vol. 31, No. 6. — P. 1134–1144.
68. Swope D. Loss of cadherin-binding proteins β -catenin and plakoglobin in the heart leads to gap junction remodeling and arrhythmogenesis / D. Swope, L. Cheng, E. Gao[et al.] // *Molecular and Cellular Biology.* — 2012. — Vol. 32, No. 6. — P. 1056–1067.
69. Zhou J. Upregulation of gamma-catenin compensates for the loss of beta-catenin in adult cardiomyocytes / J. Zhou, J. Qu, X. P. Yi[et al.] // *AJP: Heart and Circulatory Physiology.* — 2006. — Vol. 292, No. 1. — P. H270–H276.
70. Ruiz i Altaba A. Pattern formation in the vertebrae neural plate / A. Ruiz i Altaba // *Trends Neurosci.* — 1994. — Vol. 17, No. 6. — P. 233–243.
71. Eisenberg L. M. Wnt signal transduction and the formation of the myocardium / L. M. Eisenberg, C. A. Eisenberg // *Developmental Biology.* — 2006. — Vol. 293, No. 2. — P. 305–315.
72. Klaus A. Developmental signaling in myocardial progenitor cells: a comprehensive view of BMP- and Wnt/ β -catenin signaling / A. Klaus, W. Birchmeier // *Pediatric cardiology.* — 2009. — Vol. 30, No. 5. — P. 609–616.

73. Brade T. The role of Wnt signalling in cardiac development and tissue remodelling in the mature heart / T. Brade, J. Manner, M. Kuhl // Cardiovascular Research. — 2006. — Vol. 72, No. 2. — P. 198–209.
74. Palchevska O. L. Signaling function of beta-catenin during adult myocardium adaptation to physical training / O. L. Palchevska, V. V. Balatsky, L. L. Macewicz[et al.] // Factors of experimental evolution. — 2015. — Vol. 16. — P. 225–229.
75. Kontaridis M. I. Pathways to myocardial hypertrophy / M. I. Kontaridis, E. V. Geladari, C. V. Geladari // Introduction to Translational Cardiovascular Research. — 2015. — P. 167–187.
76. Ueno S. Biphasic role for Wnt/ β -catenin signaling in cardiac specification in zebrafish and embryonic stem cells / S. Ueno, G. Weidinger, T. Osugi[et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2007. — Vol. 104, No. 23. — P. 9685–9690.
77. Gessert S. The multiple phases and faces of Wnt signaling during cardiac differentiation and development / S. Gessert, M. Kühl // Circulation Research. — 2010. — Vol. 107, No. 2. — P. 186–199.
78. Solloway M. J. Molecular pathways in myocardial development: a stem cell perspective / M. J. Solloway, R. P. Harvey // Cardiovascular Research. — 2003. — Vol. 58, No. 2. — P. 264–277.
79. Haegel H. Lack of β -catenin affects mouse development at gastrulation / H. Haegel, L. Larue, M. Ohsugi[et al.] // Development. — 1995. — Vol. 121, No. 11. — P. 3529–3537.
80. Rudloff S. Differential requirements for β -catenin during mouse development / S. Rudloff, R. Kemler // Development and Stem Cells. — 2012. — Vol. 139, No. 20. — P. 3711–3721.
81. Klaus A. Distinct roles of wnt/ β -catenin and bmp signaling during early cardiogenesis / A. Klaus, Y. Saga, M. M. Taketo[et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2007. —

- Vol. 104, No. 47. — P. 18531–18536.
82. Hirschy A. Establishment of cardiac cytoarchitecture in the developing mouse heart / A. Hirschy, F. Schatzmann, E. Ehler, J.-C. Perriard // *Developmental Biology*. — 2006. — Vol. 289, No. 2. — P. 430–441.
83. Naito A. T. Wnt signaling and aging-related heart disorders / A. T. Naito, I. Shiojima, I. Komuro // *Circulation Research*. — 2010. — Vol. 107, No. 11. — P. 1295–1303.
84. Xi X.-H. Activation of Wnt/ β -catenin/GSK3 β signaling during the development of diabetic cardiomyopathy / X.-H. Xi, Y. Wang, J. Li[et al.] // *Cardiovascular Pathology*. — 2015. — Vol. 24, No. 3. — P. 179–186.
85. Schans V. A. M. van de Interruption of Wnt signaling attenuates the onset of pressure overload-induced cardiac hypertrophy / V. A. M. van de Schans, S. W. M. van den Borne, A. E. Strzelecka[et al.] // *Hypertension*. — 2007. — Vol. 49, No. 3. — P. 473–480.
86. Bergmann M. W. Wnt signaling in adult cardiac hypertrophy and remodeling: lessons learned from cardiac development / M. W. Bergmann // *Circulation Research*. — 2010. — Vol. 107, No. 10. — P. 1198–1208.
87. Wang Q. Xin proteins and intercalated disc maturation, signaling and diseases. / Q. Wang, J. L.-C. Lin, K.-H. Wu[et al.] // *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*. — 2012. — Vol. 17, No. 1. — P. 2566–2593.
88. Іпатів А. В. Хвороби системи кровообігу : провідні тенденції динаміки інвалідності / А. В. Іпатів, Ю. І. Коробкін, І. В. Дроздова[et al.] // *Український кардіологічний журнал*. — 2012. — No. 1. — P. 36–41.
89. Гандзюк В. А. Аналіз захворюваності на ішемічну хворобу серця в Україні / В. А. Гандзюк // *Український кардіологічний журнал*. — 2014. — No. 3. — P. 45–53.
90. Коваленко В. М. Стрес і серцево-судинні захворювання : сучасний стан проблеми / В. М. Коваленко // *Український кардіологічний журнал*. — 2015. — No. 1 (додаток). — P. 4–10.

91. Barnett P. Cardiac regeneration: different cells same goal / P. Barnett, M. J. B. van den Hoff // *Medical and Biological Engineering and Computing*. — 2011. — Vol. 49, No. 7. — P. 723–732.
92. Blankesteyjn W. The Wnt/Frizzled/GSK-3 β pathway: a novel therapeutic target for cardiac hypertrophy / W. Blankesteyjn, V. Vandeschans, P. Terhorst, J. Smits // *Trends in Pharmacological Sciences*. — 2008. — Vol. 29, No. 4. — P. 175–180.
93. Dorn G. W. The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy / G. W. Dorn // *Hypertension*. — 2007. — Vol. 49, No. 5. — P. 962–970.
94. Epstein J. a. Cardiac development and implications for heart disease / J. a. Epstein // *New England Journal of Medicine*. — 2010. — Vol. 363, No. 17. — P. 1638–1647.
95. Prinz C. The diagnosis and treatment of hypertrophic cardiomyopathy / C. Prinz, M. Farr, D. Hering[et al.] // *Deutsches Arzteblatt*. — 2011. — Vol. 108, No. 13. — P. 209–215.
96. Oláh A. Physiological and pathological left ventricular hypertrophy of comparable degree is associated with characteristic differences of *in vivo* hemodynamics / A. Oláh, B. T. Németh, C. Mátyás[et al.] // *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. — 2015. — Vol. 310, No. 5. — P. 587–597.
97. Chung E. Pregnancy as a cardiac stress model / E. Chung, L. A. Leinwand // *Cardiovascular Research*. — 2014. — Vol. 101, No. 4. — P. 561–570.
98. Eghbali M. Heart hypertrophy during pregnancy: a better functioning heart? / M. Eghbali, Y. Wang, L. Toro, E. Stefani // *Trends in Cardiovascular Medicine*. — 2006. — Vol. 16, No. 8. — P. 285–291.
99. Wang Q. Lithium, an anti-psychotic drug, greatly enhances the generation of induced pluripotent stem cells / Q. Wang, X. Xu, J. Li[et al.] // *Cell Research*. — 2011. — Vol. 21, No. 10. — P. 1424–1435.
100. Chen R. H. Wnt signaling to β -catenin involves two interactive components.

- glycogen synthase kinase-3 β inhibition and activation of Protein kinase C / R. H. Chen, W. V. Ding, F. McCormick // *Journal of Biological Chemistry*. — 2000. — Vol. 275, No. 23. — P. 17894–17899.
101. Chen J.-X. Overexpression of angiotensin-2 impairs myocardial angiogenesis and exacerbates cardiac fibrosis in the diabetic db/db mouse model / J.-X. Chen, H. Zeng, J. Reese[et al.] // *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory physiology*. — 2012. — Vol. 302, No. 4. — P. 1003–1012.
102. Cheng T.-H. Inhibitory effect of resveratrol on angiotensin ii-induced cardiomyocyte hypertrophy / T.-H. Cheng, J.-C. Liu, H. Lin[et al.] // *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. — 2004. — Vol. 369, No. 2. — P. 239–244.
103. Haq S. Stabilization of β -catenin by a Wnt-independent mechanism regulates cardiomyocyte growth. / S. Haq, A. Michael, M. Andreucci[et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2003. — Vol. 100, No. 8. — P. 4610–4615.
104. Kong S. W. Genetic expression profiles during physiological and pathological cardiac hypertrophy and heart failure in rats / S. W. Kong, N. Bodyak, P. Yue[et al.] // *Physiological genomics*. — 2005. — Vol. 21, No. 1. — P. 34–42.
105. Maillet M. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players / M. Maillet, J. H. van Berlo, J. D. Molkentin // *Nat Rev Mol Cell Biol*. — 2013. — Vol. 14, No. 1. — P. 38–48.
106. Chung E. Akt and MAPK signaling mediate pregnancy-induced cardiac adaptation / E. Chung, F. Yeung, L. a Leinwand // *Journal of applied physiology*. — 2012. — Vol. 112, No. 9. — P. 1564–1575.
107. Malekar P. Wnt signaling is critical for maladaptive cardiac hypertrophy and accelerates myocardial remodeling / P. Malekar, M. Hagenmueller, A. Anyanwu[et al.] // *Hypertension*. — 2010. — Vol. 55, No. 4. — P. 939–945.
108. Sambandam N. Energy metabolism in the hypertrophied heart / N.

- Sambandam, G. D. Lopaschuk, R. W. Brownsey, M. F. Allard // Heart failure reviews. — 2002. — Vol. 7, No. 2. — P. 161–173.
109. McMullen J. R. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure / J. R. McMullen, G. L. J. Baker // Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. — 2007. — Vol. 34, No. 4. — P. 255–262.
110. Lazzeroni D. From left ventricular hypertrophy to dysfunction and failure / D. Lazzeroni, O. Rimoldi, P. G. Camici // Circulation Journal. — 2016. — Vol. 80, No. 3. — P. 555–564.
111. Busk P. K. Involvement of cyclin d activity in left ventricle hypertrophy *in vivo* and *in vitro* / P. K. Busk, J. Bartkova, C. C. Strøm[et al.] // Cardiovascular Research. — 2002. — Vol. 56, No. 1. — P. 64–75.
112. Chung E. Distinct cardiac transcriptional profiles defining pregnancy and exercise / E. Chung, J. Heimiller, L. A. Leinwand // PLoS ONE. — 2012. — Vol. 7, No. 7. — P. e42297.
113. Balakumar P. Multifarious molecular signaling cascades of cardiac hypertrophy: can the muddy waters be cleared? / P. Balakumar, G. Jagadeesh // Pharmacological Research. — 2010. — Vol. 62, No. 5. — P. 365–383.
114. Rajabi M. Return to the fetal gene program protects the stressed heart: a strong hypothesis / M. Rajabi, C. Kassiotis, P. Razeghi, H. Taegtmeier // Heart Failure Reviews. — 2007. — Vol. 12, No. 3-4. — P. 331–343.
115. Barth A. S. Reciprocal transcriptional regulation of metabolic and signaling pathways correlates with disease severity in heart failure / A. S. Barth, A. Kumordzie, C. Frangakis[et al.] // Circulation: Cardiovascular Genetics. — 2011. — Vol. 4, No. 5. — P. 475–483.
116. Ye B. APC controls asymmetric Wnt/ β -catenin signaling and cardiomyocyte proliferation gradient in the heart / B. Ye, N. Hou, L. Xiao[et al.] // Journal of Molecular and Cellular Cardiology. — 2015. — Vol. 89, No. B. — P. 287–296.

117. Freire A. G. Building and repairing the heart: what can we learn from embryonic development? / A. G. Freire, T. P. Resende, P. Pinto-do-Ó // *BioMed Research International*. — 2014. — Vol. 2014. — P. 1–8.
118. Hardt, S. E., Sadoshima J. Glycogen synthase kinase-3 β : a novel regulator of cardiac hypertrophy and development / J. Hardt, S. E., Sadoshima // *Circulation Research*. — 2002. — Vol. 90, No. 10. — P. 1055–1063.
119. Sugden P. H. Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) in the heart: a point of integration in hypertrophic signalling and a therapeutic target? a critical analysis / P. H. Sugden, S. J. Fuller, S. C. Weiss, A. Clerk // *British Journal of Pharmacology*. — 2009. — Vol. 153, No. S1. — P. S137–S153.
120. Qu J. Cardiac specific haploinsufficiency of β -catenin attenuates cardiac hypertrophy but enhances fetal gene expression in response to aortic constriction / J. Qu, J. Zhou, X. P. Yi[et al.] // *Molecular Cell*. — 2008. — Vol. 43, No. 3. — P. 319–326.
121. Півень О. О. Важливість сигнальної функції β -катеніну на початкових стадіях розвитку патологічної гіпертрофії дорослого серця / О. О. Півень // *Вісник українського товариства генетиків та селекціонерів*. — 2016. — Vol. 13, No. 1. — P. 44–51.
122. Filipovich A. Physiological inhibitors of Wnt signaling / A. Filipovich, I. Gehrke, S. J. Poll-Wolbeck, K.-A. Kreuzer // *European Journal of Haematology*. — 2011. — Vol. 86, No. 6. — P. 453–465.
123. Foryst-Ludwig A. Sex differences in exercise-induced cardiac hypertrophy / A. Foryst-Ludwig, U. Kintscher // *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*. — 2013. — Vol. 465, No. 5. — P. 731–737.
124. Mone S. M. Control mechanisms for physiological hypertrophy of pregnancy / S. M. Mone, S. P. Sanders, S. D. Colan // *Circulation*. — 1996. — Vol. 94, No. 4. — P. 667–672.
125. Kwon S. H. H₂O₂ regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways / S. H. Kwon, D. R. Pimentel,

- A. Remondino[et al.] // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. — 2003. — Vol. 35, No. 6. — P. 615–621.
126. Chen Q. M. Hydrogen peroxide dose dependent induction of cell death or hypertrophy in cardiomyocytes / Q. M. Chen, V. C. Tu, Y. Wu, J. J. Bahl // *Archives of biochemistry and biophysics*. — 2000. — Vol. 373, No. 1. — P. 242–248.
127. Deng H. Inhibition of Glycogen synthase kinase-3 β is sufficient for airway smooth muscle hypertrophy / H. Deng, G. A. Dokshin, J. Lei[et al.] // *J Biol Chem*. — 2008. — Vol. 283, No. 15. — P. 10198–10207.
128. Agah R. Gene recombination in postmitotic cells / R. Agah, P. a Frenkel, B. a French[et al.] // *Journal of Clinical Investigation*. — 1997. — Vol. 100, No. 1. — P. 169–179.
129. Lyons G. E. Developmental regulation of myosin gene expression in mouse cardiac muscle / G. E. Lyons, S. Schiaffino, D. Sassoon[et al.] // *JCB*. — 1990. — Vol. 111, No. 6. — P. 2427–2436.
130. Brault V. Inactivation of the beta-catenin gene by Wnt1-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development / V. Brault, R. Moore, S. Kutsch[et al.] // *Development* (Cambridge, England). — 2001. — Vol. 128, No. 8. — P. 1253–1264.
131. Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual* / T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook. — Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. — 545 p.
132. Kaufman M. H. *The atlas of mouse development* / M. H. Kaufman. — Academic Press, 1992. — 512 p.
133. Twentyman P. R. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity / P. R. Twentyman, M. Luscombe // *British journal of cancer*. — 1987. — Vol. 56, No. 3. — P. 279–285.
134. Evangelista F. S. Duration-controlled swimming exercise training induces

- cardiac hypertrophy in mice / F. S. Evangelista, P. C. Brum, J. E. Krieger // *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. — 2003. — Vol. 36, No. 12. — P. 1751–1759.
135. Levine T. R. Eta squared, partial eta squared, and misreporting of effect size in communication research / T. R. Levine, C. R. Hullett // *Human Communication Research*. — 2002. — Vol. 28, No. 4. — P. 612–625.
136. Richardson J. T. E. Eta squared and partial eta squared as measures of effect size in educational research / J. T. E. Richardson // *Educational Research Review*. — 2011. — Vol. 6, No. 2. — P. 135–147.
137. Klaus a. Wnt/ β -catenin and bmp signals control distinct sets of transcription factors in cardiac progenitor cells / a. Klaus, M. Muller, H. Schulz[et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2012. — Vol. 109, No. 27. — P. 10921–10926.
138. Mollova M. Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans / M. Mollova, K. Bersell, S. Walsh[et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2013. — Vol. 110, No. 4. — P. 1446–51.
139. Dravid G. Defining the role of Wnt/ β -catenin signaling in the survival, proliferation, and self-renewal of human embryonic stem cells / G. Dravid, Z. Ye, H. Hammond[et al.] // *Stem cells*. — 2005. — Vol. 23, No. 10. — P. 1489–1501.
140. Ling L. Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells / L. Ling, V. Nurcombe, S. M. Cool // *Gene*. — 2009. — Vol. 433, No. 1-2. — P. 1–7.
141. Czyz J. Embryonic stem cell differentiation: the role of extracellular factors / J. Czyz, A. Wobus // *Differentiation; research in biological diversity*. — 2001. — Vol. 68, No. 4-5. — P. 167–174.
142. Tanaka S. S. Impact of Wnt signaling on tissue lineage differentiation in the early mouse embryo / S. S. Tanaka, Y. Kojima, Y. L. Yamaguchi[et al.] // *Development Growth and Differentiation*. — 2011. — Vol. 53, No. 7. — P.

- 843–856.
143. Jho E. H. Wnt/beta-catenin/TCF signaling induces the transcription of axin2, a negative regulator of the signaling pathway / E. H. Jho, T. Zhang, C. Domon[et al.] // *Mol. Cell Biol.* — 2002. — Vol. 22, No. 4. — P. 1172–1183.
144. Dang C. V. Function of the c-myc oncogenic transcription factor / C. V. Dang, L. M. Resar, E. Emison[et al.] // *Experimental cell research.* — 1999. — Vol. 253, No. 1. — P. 63–77.
145. Armstrong D. D. Wnt/ β -catenin signaling activates growth-control genes during overload-induced skeletal muscle hypertrophy / D. D. Armstrong, K. a Esser // *American journal of physiology. Cell physiology.* — 2005. — Vol. 289. — P. C853–C859.
146. Varlakhanova N. Myc maintains embryonic stem cell pluripotency and self-renewal / N. Varlakhanova, R. Cotterman, W. de Vries[et al.] // *Differentiation.* — 2010. — Vol. 80, No. 1. — P. 9–19.
147. Chiang M. High selective pressure for Notch1 mutations that induce myc in t cell acute lymphoblastic leukemia / M. Chiang, Q. Wang, A. Gormley[et al.] // *Blood.* — 2016. — Vol. 28, No. 18. — P. 2229–2240.
148. Tsai J. S. Cadmium activates multiple signaling pathways that coordinately stimulate akt activity to enhance c-myc mRNA stability / J. S. Tsai, C. H. Chao, L. Y. Lin // *PLoS ONE.* — 2016. — Vol. 11, No. 1. — P. 1–22.
149. Katoh Y. Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation / Y. Katoh, M. Katoh // *Curr Mol Med.* — 2009. — Vol. 9, No. 7. — P. 873–886.
150. Alvarez-Medina R. Hedgehog activation is required upstream of Wnt signalling to control neural progenitor proliferation / R. Alvarez-Medina, G. Le Dreau, M. Ros, E. Martí // *Development (Cambridge, England).* — 2009. — Vol. 136, No. 19. — P. 3301–3309.
151. Palchevska O. L. Embryonically induced β -catenin haploinsufficiency attenuates postnatal heart development and causes violation of foetal genes

- program / O. L. Palchevska, V. V. Balatskii, A. O. Andrejeva[et al.] // *Biopolymers and Cell*. — 2013. — Vol. 29, No. 2. — P. 124–130.
152. Пальчевська О. Л. Дослідження активності канонічного wnt-сигналіngu у тварин різного віку за умов ембріональної кардіоспецифічної делеції β -катеніну / О. Л. Пальчевська, В. В. Балацький, А. О. Андреева[et al.] // *Cytology and Genetics*. — 2015. — Vol. 49, No. 1. — P. 10–17.
153. Yamamoto F. Effect of inhibition of glycogen synthase kinase-3 on cardiac hypertrophy during acute pressure overload / F. Yamamoto, H. Yamamoto // *General Thoracic and Cardiovascular Surgery*. — 2010. — Vol. 58, No. 6. — P. 263–264.
154. Xie H.J., Zhou X., Hu X. H₂O₂ evokes injury of cardiomyocytes through upregulating HMGB1 / Xie H.J., Zhou X., Hu X. // *Hellenic J Cardiol*. — 2013. — Vol. 54. — P. 101–106.
155. Pasumarthi K. B. S. Cardiomyocyte cell cycle regulation / K. B. S. Pasumarthi, L. J. // *Circulation Research*. — 2002. — Vol. 90, No. 10. — P. 1044–1054.
156. Bavarva J. H. The dynamic exome: acquired variants as individuals age. / J. H. Bavarva, H. Tae, L. McIver[et al.] // *Aging*. — 2014. — Vol. 6, No. 6. — P. 511–21.
157. Haubner B. J. Complete cardiac regeneration in a mouse model of myocardial infarction / B. J. Haubner, M. A. Brice, S. Khadayate[et al.] // *Aging*. — 2012. — Vol. 4, No. 12. — P. 966–977.
158. Liu X. Overstimulation can create health problems due to increases in PI3K / Akt / GSK3 insensitivity and GSK3 activity / X. Liu // *SpringerPlus*. — 2014. — Vol. 3. — P. 356.
159. Poh K.-K. Myocardial adaptation and efficiency in response to intensive physical training in elite speedskaters / K.-K. Poh, T.-T. Ton-Nu, T. G. Neilan[et al.] // *International Journal of Cardiology*. — 2008. — Vol. 126, No. 3. — P. 346–351.

160. Kirchhof P. Age- and training-dependent development of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in heterozygous plakoglobin-deficient mice / P. Kirchhof, L. Fabritz, M. Zwiener[et al.] // *Circulation*. — 2006. — Vol. 114, No. 17. — P. 1799–1806.
161. Ferreira R. Unraveling the exercise-related proteome signature in heart / R. Ferreira, D. Moreira-Gonçalves, A. L. úcia Azevedo[et al.] // *Basic research in cardiology*. — 2015. — Vol. 110, No. 1. — P. 454.
162. He N.-C., Sparks A. B. R. C. Identification of c-myc as a target of the APC pathway / R. C. He N.-C., Sparks A. B., K. K. W. Hermeking H., Zawel L., da Costa L.T., Morin P. J., Vogelstein B. // *Science*. — 1998. — Vol. 281, No. 5382. — P. 1509–1512.
163. Goentoro L. Evidence that fold-change, and not absolute level, of β -catenin dictates Wnt signaling / L. Goentoro, M. W. Kirschner // *Molecular Cell*. — 2009. — Vol. 36, No. 5. — P. 872–884.
164. Півень О. О. Значення Wnt/ β -катенінового сигналінгу в ембріональному кардіогенезі, післянатальному формуванні та реконструкції міокарда / О. О. Півень, О. Л. Пальчевська, Л. Л. Лукаш // *Цитологія і генетика*. — 2014. — Vol. 48, No. 5. — P. 8–10.
165. Chen J. Computational modeling of the interplay between cadherin-mediated cell adhesion and Wnt signaling pathway / J. Chen, Z.-R. Xie, Y. Wu // *PloS one*. — 2014. — Vol. 9, No. 6. — P. e100702.
166. Buja L. M. Cardiomyocyte death and renewal in the normal and diseased heart / L. M. Buja, D. Vela // *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*. — 2008. — Vol. 17, No. 6. — P. 349–74.
167. Li F. Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development / F. Li, X. Wang, J. M. Capasso, M. Gerdes // *Journal of molecular and cellular cardiology*. — 1996. — Vol. 28, No. 8. — P. 1737–1746.

168. Klaus A. Developmental signaling in myocardial progenitor cells: a comprehensive view of BMP- and Wnt/ β -catenin signaling / A. Klaus, W. Birchmeier // *Pediatric Cardiology*. — 2009. — Vol. 30, No. 5. — P. 609–616.
169. Studer D. Molecular and biophysical mechanisms regulating hypertrophic differentiation in chondrocytes and mesenchymal stem cells / D. Studer, C. Millan, E. Öztürk[et al.] // *European Cells and Materials*. — 2012. — Vol. 24. — P. 118–135.
170. Xiao L. Activin a maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells / L. Xiao, X. Yuan, S. J. Sharkis // *Stem cells*. — 2006. — Vol. 24, No. 6. — P. 1476–1486.
171. Miyamoto T. Activation of distinct signal transduction pathways in hypertrophied hearts by pressure and volume overload / T. Miyamoto, Y. Takeishi, H. Takahashi[et al.] // *Basic Research in Cardiology*. — 2004. — Vol. 99, No. 5. — P. 328–337.
172. Ha T. Attenuation of cardiac hypertrophy by inhibiting both mtor and NF κ b activation *in vivo* / T. Ha, Y. Li, X. Gao[et al.] // *Free Radical Biology and Medicine*. — 2005. — Vol. 39, No. 12. — P. 1570–1580.
173. Zhou Y. Exendin-4 attenuates cardiac hypertrophy via AMPK/mTOR signaling pathway activation / Y. Zhou, X. He, Y. Chen[et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 2015. — Vol. 468, No. 1-2. — P. 394–399.
174. Hagenmueller M. Depletion of mammalian target of rapamycin (mTOR) via sirna mediated knockdown leads to stabilization of β -catenin and elicits distinct features of cardiomyocyte hypertrophy / M. Hagenmueller, P. Malekar, C. Fieger[et al.] // *FEBS Letters*. — 2010. — Vol. 584, No. 1. — P. 74–80.
175. Rosner M. The mTOR pathway and its role in human genetic diseases / M. Rosner, M. Hanneder, N. Siegel[et al.] // *Mutation Research*. — 2008. — Vol.

659, No. 3. — P. 284–292.

176. Inoki K. TSC2 integrates wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth / K. Inoki, H. Ouyang, T. Zhu[et al.] // *Cell*. — 2006. — Vol. 126, No. 5. — P. 955–968.
177. Lee K.-S. Ppardelta activation inhibits angiotensin II induced cardiomyocyte hypertrophy by suppressing intracellular Ca²⁺ signaling pathway / K.-S. Lee, J.-H. Park, S. Lee[et al.] // *Journal of cellular biochemistry*. — 2009. — Vol. 106, No. 5. — P. 823–834.