

УДК: 576.52

ВАЖЛИВІСТЬ СИГНАЛЬНОЇ ФУНКЦІЇ β -КАТЕНІНУ НА ПОЧАТКОВИХ СТАДІЯХ РОЗВИТКУ ПАТОЛОГІЧНОЇ ГІПЕРТРОФІЇ ДОРΟΣЛОГО СЕРЦЯ

О.О. ПІВЕНЬ

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150
e-mail: o.o.piven@imbg.org.ua

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 механізмів їхнього виникнення та перебігу. Метою нашої роботи було дослідити сигнальну функцію канонічного Wnt-сигналіngu та β -катеніну у розвитку патологічної гіпертрофії дорослого міокарда. Методи. Дослідження проводили із використанням трасгенних мишей лінії BATGAL та культури ізольованих кардіоміоцитів. Для індукції патологічної гіпертрофії застосовували хлорид літію та AngII. Зміни рівня експресії гіпертрофічних генів та генів залучених до канонічного Wnt-сигналіngu аналізували за допомогою зворотньо-полімеразної ПЛР у реальному часі та Вестерн-блот аналізу. Проводили морфологічні дослідження та X-gal забарвлення. Результати. Показано, що при дії гіпертрофічних стимулів відбувається активація сигнальної функції β -катеніну у ранні терміни спостережень, про що свідчать результати X-gal забарвлення та зміни рівня експресії генів мішеней цього сигналіngu (c-Fos, c-Myc, CyclinD1 та TCF-4). Також спостерігали підвищення вмісту активованого β -катеніну та фосфорильованого GSK3 β білків вже через добу після дії ангіотензину та хлориду літію у культурі ізольованих кардіоміоцитів. Висновки. При розвитку патологічної гіпертрофії внаслідок хронічного підвищення артеріального тиску відбувається активація багатьох сигнально-регуляторних механізмів кардіоміоцитів і один із них це канонічний Wnt-сигналінг. Однак активація канонічного Wnt-сигналіngu і β -катеніну зокрема, подія рання і вочевидь необхідна для запуску генетичної програми ембріоналізації міокарда.

Ключові слова: β -катенін, гіпертрофія, Wnt-сигналінг, експресія генів, міокард.

Вступ. Хвороби серцево-судинної системи (ССЗ) у сучасному світі та Україні називають проблемою № 1. На жаль, смертність від хвороб серця та системи кровообігу в Україні займає перше місце і 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. Щорічно вперше виявляється близько 2 млн хворих із цією патологією, з них кожний другий – працездатного віку. Кожного року у нашій країні від серцево-судинних захворювань помирає більш ніж 500 тисяч громадян [1]. Отже, ССЗ призводять до інвалідизації та смертності значної кількості населення як в Україні, так і у країнах Європи та світу, і становлять не лише медичну а й вагомий соціально-економічну проблему.

Одним із найпоширеніших захворювань серцево-судинної системи є гіпертрофія міокарда, і вона є одним із ключових факторів ризику розвитку серцевої недостатності. Патологічна гіпертрофія серця характеризується перш за все порушенням архітектури тканини серця, підвищенням фіброзу, елімінацією кардіоміоцитів та кардіальною дисфункцією [2]. Характерні зміни при розвитку гіпертрофії відбуваються і на молекулярно-генетичному рівні, а саме відбувається активація гіпертрофічних або фетальних генів (ANP, BNP, b-MHC). Варто зауважити, що гіпертрофія це адаптивна реакція серця перш за все на хронічне підвищення тиску, пошкодження серця, гормональні стреси, які у свою чергу призводять до активації внутрішньо-

© О.О. ПІВЕНЬ, 2016

клітинних сигнально-регуляторних шляхів. До таких відносять G-білок пов'язаний рецептор, кальцінеурін/NFAT, MAPK, PI3K/AKT/mTOR сигнальний шлях [3] та канонічний Wnt-сигналінг [4]. Важливо також, що усі наведені сигналінги залучені також і до контролю проліферації, диференціювання, виживання та міграції клітини, у тому числі і кардіоміоцитів, серцевих фіброblastів, ендотеліальних клітин та гладеньких м'язів судин. І якщо функція зазначених сигнальних шляхів у розвитку гіпертрофії більш менш зрозуміла, то участь канонічного Wnt-сигналінгу лишається досить дискусивною. Основним медіатором канонічного Wnt-сигнального шляху є білок β-катенін, стабілізована форма якого потрапляючи в ядро клітин, 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.) [5].

Низка експериментальних робіт із використанням як тваринних моделей, так і ізольованих кардіоміоцитів свідчить про те, що активація канонічного Wnt-сигналінгу та β-катеніну є необхідною умовою для розвитку гіпертрофії кардіоміоцитів [6–9]. Однак, на противагу згаданим роботам Baurand та співавтори [11] показали, що експериментальний нокаут гена β-катеніну у дорослому серці призводить до спонтанної гіпертрофії міокарда. Більше того, автори не спостерігали розвитку гіпертрофії дорослого серця у тварин із конститутивно стабілізованим β-катеніном у відповідь на дію ангіотензину II.

Тож метою нашої роботи було дослідити сигнальну функцію канонічного Wnt-сигналінгу та β-катеніну у розвитку гіпертрофії дорослого міокарда. Роботу виконували із використанням трансгенних тварин (BATGAL) та культури ізольованих кардіоміоцитів.

Матеріали і методи

Для дослідження сигнальної функції β-катеніну у розвитку гіпертрофії використали репортерних мишей BATGAL, які експресують бактеріальний ген β-галактозидази. Цей трансген був створений шляхом злиття TCF/LEF сайту зв'язування та 0,13 кб фрагмента, що містить мінімальний промотор

TATA-бокс гена *Siamois* [12]. Особливістю цієї лінії трансгенних мишей є те, що при активації канонічного Wnt-сигналінгу та зв'язування β-катеніну із транскрипційним фактором TCF/LEF відбувається не лише активація транскрипції генів-мішеней β-катеніну, а й гена бактеріальної β-галактозидази. Тварини були люб'язно надані у наше розпорядження др. Метью Веллі (Max-Planck-Institute for Heart and Lung Research, Німеччина).

Індукція гіпертрофії. Для індукції гіпертрофії самцям віком 3-х місяців підшкірно вживлювали мініосмотичні насоси виробництва ALZET модель 2002 (кат №10251-11, США). Обрана нами модель насосів давала змогу проводити інфузію гіпертрофічних стимулів тваринам протягом 14 днів із швидкістю закачування 0,5 мкл/годину. Підготовку міні осмотичних насосів проводили згідно рекомендаціям виробника, тварин перед операцією анестезували авертином. Як гіпертрофічні стимули в дослідах *in vitro* так і *in vivo* використовували хлорид літію та Ang II (Sigma, USA, A9525) у концентраціях 20мМ та 1мМ відповідно. Аналіз гіпертрофічної відповіді проводили із використанням індексу співвідношення маси серця до довжини гомілки.

X-gal забарвлення. Для ідентифікації клітин із активованим канонічним Wnt – сигналінгом проводили X-gal забарвлення ізольованих сердець дослідних та контрольних груп тварин згідно описаної методики [13]. Парафінові зрізи товщиною 8 мкм готували як описано нами раніше [14] та аналізували у мікроскопі Primo Star «Carl Zeiss» за допомогою програми Axio Vision.

Виділення кардіоміоцитів та індукція гіпертрофії *in vitro*. Для виділення кардіоміоцитів ізольовали серця дорослих самців мишей лінії C57BL6 віком 7 тижнів, серця промивались фізіологічним розчином, після чого проводили канюляризацію аорти та перфузію серця із швидкістю 7 мл/хв [15]. Спочатку серце промивали ФБС («Sigma», США), протягом 10 хв, після чого проводили ферментативну обробку тканини розчином ФБС із додаванням колагенази 2 (0,4 мг/мл) та трипсину (0,02 мг/мл) («Sigma», США) протягом 20 хв. Після чого серце механічно подрібнювали та обережно ресуспендували у середовищі DMEM/F12 («Sigma», США) у присутності трипсину (0,02 мг/мл) та DNase I (0,02 мг/мл) («Sigma», США). Клітини центрифугували, відбираючи осад. За допомогою преплейтин-

гу звільнялись від серцевих фіброblastів, а отримані кардіоміоцити висівали на чашки Петрі (d- 2 см) попередньо оброблені 2 % колагеном для підвищення адгезії клітин. Клітини культивували у середовищі DMEM/F12 із додаванням 10 % ембріональної сироватки ВРХ протягом тижня. Після чого у культуральне середовище додавали хлорид літію та Ang II у концентраціях 20мМ та 1мМ відповідно. У контролі клітини перебували у стандартних умовах без додавання гіпертрофічних стимулів.

Виділення білка та Вестерн-блот аналіз. Сумарний білок виділяли за методом [16] та розділяли за допомогою електрофорезу в 15 % поліакриламідному гелі у присутності 0,1 %-го додецилсульфату натрію за методом Лемлі [17]. Для оцінки активності канонічного Wnt-сигналіну аналізували зміни вмісту Phospho-GSK3 β (Ser9) фосфорильованого за серином 9 та активованого β -катеніну. Використовували комерційні специфічні поліклональні антитіла проти phospho-GSK3 β (#9336, Cell Signalling technology), моноклональні антитіла проти сумарного β -катеніну (#8480, Cell Signalling technology), моноклональні антитіла проти активованого β -катеніну (#8814, Cell Signalling technology), а як контроль рівномірності навантаження доріжок білком – моноклональні антитіла проти актину (#3700, Cell Signalling technology). Проведено три повтори кожного експерименту. Кількість досліджуваних білків представлено у відносних одиницях, які вираховували як відношення вмісту досліджуваного білка до вмісту контрольованого білка актина на тій самій доріжці гелю.

Аналіз змін рівня експресії генів, залучених до канонічного Wnt-сигналіну. Виділення тотальної РНК, синтез кДНК, полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі проводили згідно зі стандартними протоколами [18]. Для аналізу експресії генів із тканини ізольованого міокарда без передсердь виділяли тотальну РНК за допомогою UltraClean[®] Tissue & Cells RNA Isolation Kit (MO BIO) згідно рекомендацій виробника. Отриману РНК обробляли ДНКазою I та використовували для синтезу кДНК. Синтез кДНК здійснювали за допомогою First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) згідно рекомендацій виробника. Реакцію ПЛР у реальному часі проводили із використанням суміші Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR MasterMix (Thermo Scientific) на приладі iCycler single-color real-time

PCR detection system (IQ5, BioRad). Аналізували зміни рівня експресії таких генів: BNP, β -МНС, TCF-4, Cyskin-D1, c-Мус, c-Fos [19].

Експресію генів представляли як ΔC_T , нормалізовану відносно референтного гена GAPDH. C_T кожного цільового гена вираховували з середнього значення ΔC_T контрольної групи. Різницю в кількості між дослідом і контролем розраховували використовуючи формулу $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

Статистичну обробку даних проводили з використанням пакету STATISTICA 8.0.

Результати та обговорення

Канонічний Wnt-сигналінг та β -катенін мають важливе значення у регуляції кардогенезу та формуванні ембріонального серця. Однак участь цього сигнально-регуляторного шляху у розвитку патологічної гіпертрофії лишається не з'ясованою. Тому у своїй роботі ми зосередились на з'ясуванні цього питання та індукували патологічну гіпертрофію міокарда у тварин віком 3 місяці за допомогою інфузії гіпертрофічних стимулів, а саме хлориду літію та AngII. Відомо, що ангіотензин – це пептидний гормон, що діє опосередковано через відповідні рецептори на клітинній мембрані і спричиняє звуження кровоносних судин та, як наслідок, підвищення тиску [20]. На відміну від AngII, хлорид літію діє безпосередньо на β -катенін, а саме, хлорид літію спричиняє фосфорильовання білка GSK3 β [21]. Останній, як відомо, є основним компонентом деградувального комплексу для β -катеніну і його деактивація призводить до вивільнення та реалізації сигнальної активності β -катеніну [22]. Таким чином, у дослідних тварин, що отримували AngII ми індукували хронічне підвищення кров'яного тиску, що є одним із факторів розвитку патологічної гіпертрофії. Очікувані результати порівнювали із групою тварин що отримували хлорид літію, де речовина спричиняла активацію канонічного Wnt-сигналіну. Як контроль використовували тварин, що отримували фізіологічний розчин. Інфузію гіпертрофічних стимулів та фізіологічного розчину проводили за допомогою мініосмотичних насосів ALZET модель 2002 (кат №10251-11, США). Насоси імплантували анестезованим авертином тваринам на 3, 7 та 14 днів спостережень. У своїй роботі ми досліджували сигнальну функцію β -катеніну у розвитку патологічної гіпертрофії із використанням BATGAL

трансгенних мишей, що експресують бактеріальну β -галактозидазу під контролем промотора TCF [12]. Використання таких мишей давало змогу реєструвати сигнальну активність β -катеніну за допомогою простого X-gal забарвлення.

У результаті експерименту, спостерігали підвищення індексу гіпертрофії та активацію сигнальної функції β -катеніну вже на третю добу ін'єкції тваринам AngII та хлориду літію (рис. 1 а, б). Звісно показники не були вищими від контрольних значень удвічі чи утричі, оскільки ми досліджували саме ранні терміни дії стимулів, а навіть 2 тижні – це не достатній строк для розвитку патології. Цікаво, що у більш пізні строки спостереження сигнальна активність β -катеніну, що корелює із позитивним X-gal забарвленням, зменшувалась та майже зникла на 14 добу досліджу. Варто також зауважити, що більш виражене підвищення індексу гіпертрофії спостерігали у групі тварин які інфузивно отримували хлорид літію, що на нашу думку є наслідком прямої дії агента, а саме активації сигнальної функції β -катеніну, на відміну від дії AngII.

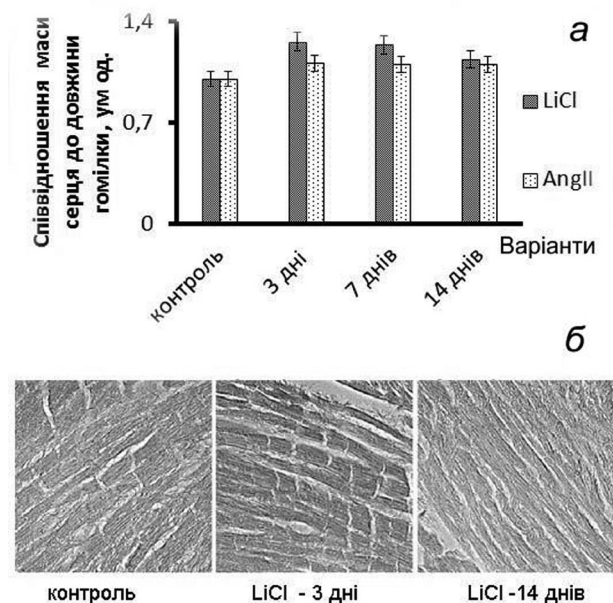


Рис. 1. Кінетика сигнальної активності β -катеніну під впливом гіпертрофічних стимулів: *а* – ін'єкція гіпертрофічних стимулів спричиняє підвищення індексу співвідношення маси серця до довжини гомілки вже на третю добу досліджень; *б* – ін'єкція гіпертрофічних стимулів спричиняє активацію сигнальної функції β -катеніну. X-gal забарвлення парафінових секцій тканин міокарду після інфузії LiCl, 150x. Кількість тварин у кожній групі $n \geq 4$

Аналіз змін рівня експресії гіпертрофічних генів, також підтвердив розвиток гіпертрофії у тварин що отримували хлорид літію та AngII порівняно із контролем (рис. 2). Із застосуванням зворотньо-транскриптазної ПЛР у реальному часі реєстрували підвищення рівня експресії міозину ембріонального серця (b-MHC) в усі строки спостережень. Варто зауважити, що підвищення експресії гена b-MHC є також показовим і для гіпертрофічного міокарда. Рівень експресії гена VNP, іншого гіпертрофічного маркера, був у двічі вищим ніж у контролі в останні терміни спостережень, а саме через 14 днів інфузії гіпертрофічних стимулів (рис. 2). Цікаво також, що підвищення експресії досліджуваних гіпертрофічних генів було вищим у випадку дії хлориду літію порівно із ангіотензином, що узгоджується із попередніми даними (рис. 1).

Рівень експресії генів мішеней β -катеніну (c-Fos, c-Myc, CyclinD1) та гена-компонента канонічного Wnt-сигналіну TCF-4 був вищим у тварин із ін'єкціями гіпертрофічних стимулів порівняно із контрольними тваринами навіть на пізніх термінах спостережень (рис. 3). Однак варто зауважити, що рівень експресії досліджуваних генів був вищим після впливу хлориду літію особливо на третю добу експерименту. Тоді як підвищення рівня експресії генів мішеней β -катеніну після дії ангіотензину підвищувалось на більш пізніх термінах дослідження – на 7 та 14 добу.

Ми припустили, що функція канонічного Wnt-сигналіну дійсно є критично важливою для розвитку гіпертрофічної відповіді, однак активація останнього є надзвичайно ранньою подією. Своє припущення ми перевірили із використанням ізольованих кадміоцитів. Клітини оброблялись гіпертрофічними стимулами (ангіотензином II та хлоридом літію) протягом 24 та 72 годин, контролем слугували клітини що перебували у стандартному культуральному середовищі DMEM/F12 із додаванням 10 % ембріональної сироватки ВРГ. Клітини знімали механічно, виділяли білок як описано [15] та проводили Вестерн-блот аналіз змін вмісту активованого та сумарного білка β -катеніну, а також фосфорильованого GSK3 β . У результаті проведеної роботи нами було показано, що вже через 24 год. досліджу відбувалось підвищення кількісного вмісту стабілізованого/активного β -катеніну та інактивованого GSK3 β у дослідних варіантах по-

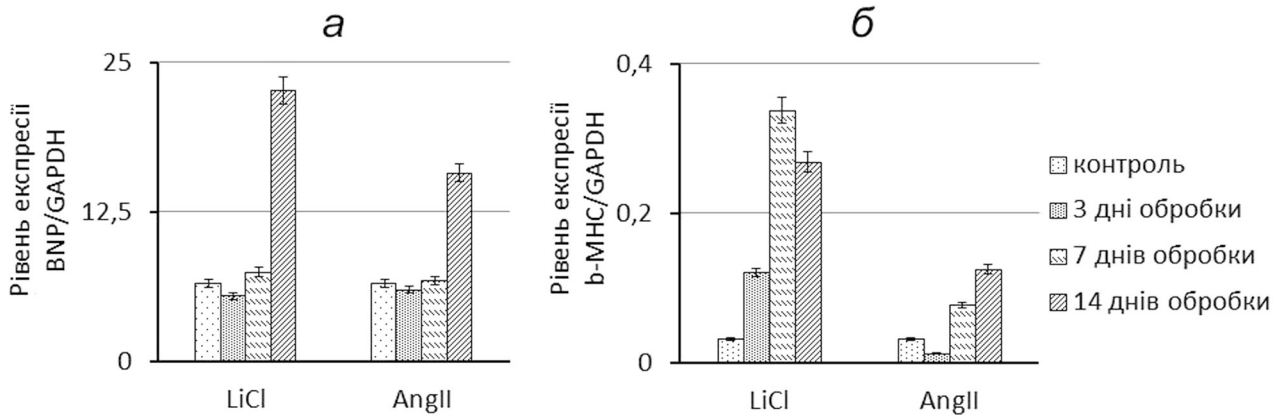


Рис. 2. Результати аналізу зміни рівня експресії гіпертрофічних генів BNP (а) та b-MHC (б) у серцях тварин після інфузії гіпертрофічних стимулів. Кількість тварин у кожній групі $n \geq 4$

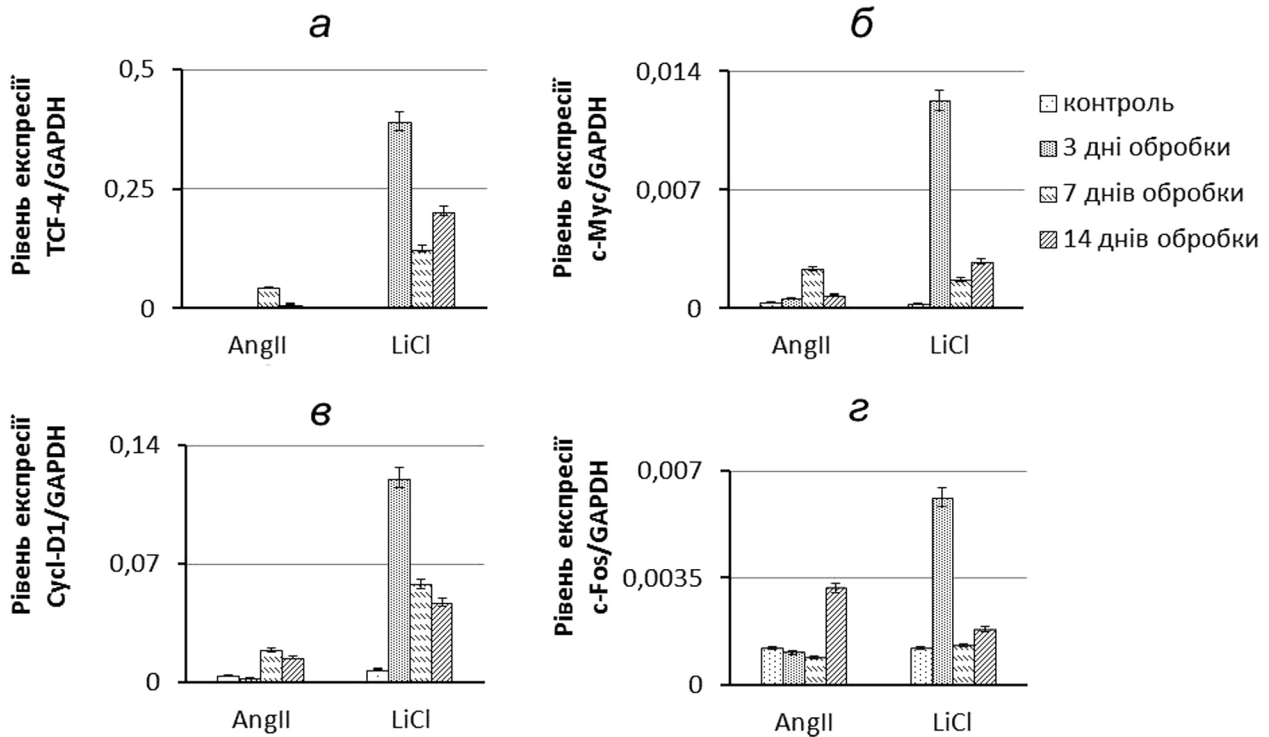


Рис. 3. Результати аналізу зміни рівня експресії генів-мішеней β -катеніну у серцях тварин після інфузії гіпертрофічних стимулів: а – TCF-4; б – c-Myc; в – Cycl-D1; г – c-Fos. Кількість тварин у кожній групі $n \geq 4$

рівняно із контролем (рис. 4). Це свідчить про руйнування деградувального комплексу β -катеніну та реалізацію сигнальної функції останнього саме у ранні терміни дії гіпертрофічних стимулів.

Ймовірно, при подальшому перебігу патології сигнальна функція β -катеніну, можливо, репресується за участі негативного «фідбеку» чи інших сиг-

нально-регуляторних механізмів, які контролюють або взаємодіють із Wnt-сигналінгом. Дійсно, одним із генів-мішеней β -катеніну є ген Axin 2, який, як згадувалось вище, є важливим компонентом деградувального комплексу останнього. Описані й інші молекули, що взаємодіють або безпосередньо із стабілізованим β -катеніном, або з комплексом

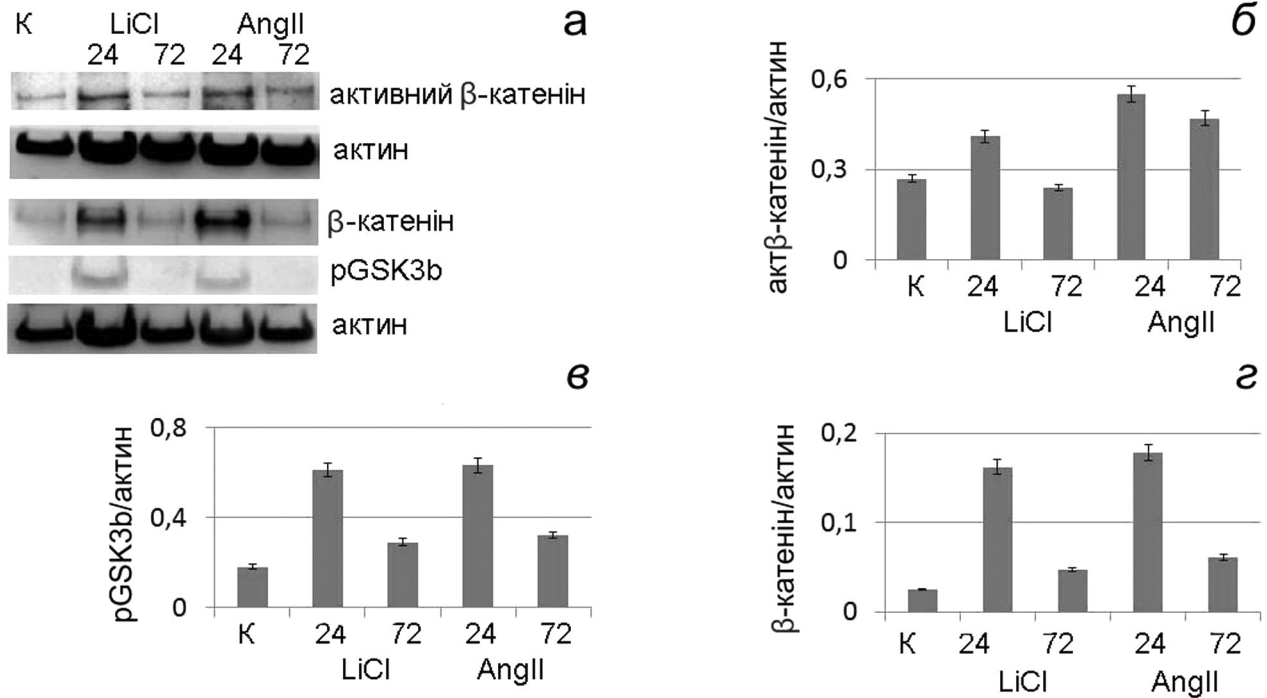


Рис. 4. Результати Вестерн-блот аналізу лізатів первинних кардіоміоцитів через 24 та 72 години обробки гіпертрофічними стимулами: а – електрофореграма; б – зміни вмісту активованого білка β -катеніну; в – зміни вмісту фосфорильованого білка GSK3b; з – зміни вмісту сумарного білка β -катеніну

β -катенін/TCF/LEF та у такий спосіб здійснюють негативний фізіологічний «фідбек» Wnt/ β -катенінового сигналіну [23]. Але, незважаючи на існування таких складних механізмів регуляції, активація канонічного Wnt-сигналіну призводить до активації експресії генів, що залучені до реалізації гіпертрофії міокарда. Отже, роль β -катеніну та Wnt/ β -катенінового сигналіну у розвитку гіпертрофії серця має набагато складніший характер та, можливо, залежить від стадії розвитку даної патології.

Зважаючи на літературні та власні данні ми припускаємо, що сигнальна функція β -катеніну має важливе значення при розвитку патологічної гіпертрофії саме на ранній стадії перебудови міокарда. Активація канонічного Wnt-сигналіну призводить і до активації експресії генів маркерів гіпертрофії – BNP та β -МНС, а також генів залучених до регуляції росту клітин – Cyskin-D1, c-Мус, c-Fos. Усе разом це призводить до формування фенотипу, а саме збільшення гіпертрофічного індексу, фіброзису, та, як наслідок, погіршенню функції дорослого серця.

Висновки

При розвитку патологічної гіпертрофії внаслідок хронічного підвищення артеріального тиску відбувається активація багатьох сигнально-регуляторних механізмів кардіоміоцитів і один із них – це канонічний Wnt-сигналінг. Однак активація канонічного Wnt-сигналіну і β -катеніну зокрема, подія рання і вочевидь необхідна для запуску генетичної програми ембріоналізації міокарда. Отже, β -катенін має важливе не лише структурне, а й сигнальне значення при передумовах дорослого серця і має великий потенціал як мішень при терапії фіброзу міокарда.

Роботу виконували за підтримки EMBO Post-Doctoral Short Term Fellowship ASTF 223.00-2011. Автор також висловлює подяку за допомогу при виконанні досліджень, критичні зауваження та обговорення результатів доктору Метью Веллі та професору Томасу Брауну (Max-Planck-Institute for Heart and Lung Research, Німеччина).

Перелік літератури

1. *Сердечно-сосудистые* заболевания [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/ru/
2. Bianca C. Bernardo, Kate L. Weeks, Lynette Pretorius, Julie R. McMullen. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2010. – Vol. 128, No. 1. – P. 191–227.
3. Kontaridis M.I., Geladari E.V., Geladari C.V. Pathways to myocardial hypertrophy / Ed. Cokkinos D.V. Introduction to translational cardiovascular research. – Springer, 2014. – P. 167 – 186.
4. Grigoryan T., Wend P., Klaus A., Birchmeier W. Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of b-catenin in mice // *Genes Dev.* – 2008. – Vol. 22, No. 17. – P. 2308–2341.
5. Deb A. Cell-cell interaction in the heart via Wnt/ β -catenin pathway after cardiac injury // *Cardiovasc. Res.* – 2014. – Vol 102, No. 2. – P. 214–223.
6. Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling in development and disease // *Cell.* – 2006. – Vol. 127, No. 3. – P. 470 – 480.
7. Chen X., Shevtsov S.P., Hsich E. et al. The beta-catenin/T-cell factor/lymphocyte enhancer factor signaling pathway is required for normal and stress induced cardiac hypertrophy // *Mol. Cell. Biol.* – 2006. – Vol. 26, No. 12. – P. 4462–4473.
8. Qu J., Zhou J., Yi X.P., Dong B., Zheng H., Miller L.M., Wang X., Schneider M.D., Li F. Cardiac-specific haploinsufficiency of beta-catenin attenuates cardiac hypertrophy but enhances foetal gene expression in response to aortic constriction // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2007. – Vol. 43, No. 3. – P. 319–326.
9. Hahn J.Y., Cho H.J., Bae J.W., Yuk H.S., Kim K.I., Park K.W., Koo B.K., Chae I.H., Shin C.S., Oh B.H., Choi Y.S., Park Y.B., Kim H.S. β -Catenin overexpression reduces myocardial infarct size through differential effects on cardiomyocytes and cardiac fibroblasts // *J. Bio. Chem.* – 2006. – Vol. 281, No. 41. – P. 30979–30989.
10. Malekar P., Hagenmueller M., Anyanwu A., Buss S., Streit M.R., Weiss C.S., Wolf D., Riffel J., Bauer A., Katus H.A., Hardt S.E. Wnt signaling is critical for maladaptive cardiac hypertrophy and accelerates myocardial remodeling. // *Hypertension.* – 2010. – Vol. 55. – P. 939–945.
11. Baurand A., Zelarayan L., Betney R., Gehrke C., Dunger S., Noack C., Busjahn A., Huelksen J., Taketo M.M., Birchmeier W., Dietz R., Bergmann M.W. Beta-catenin downregulation is required for adaptive cardiac remodelling // *Circ. Res.* – 2007. – Vol. 100, No. 9. – P. 1353–1362.
12. Al Alam D, Green M, Tabatabai Irani R, Parsa S, Danopoulos S, Sala FG, Branch J, El Agha E, Tiozzo C, Voswinckel R, Jesudason EC, Warburton D, Bellusci S. Contrasting expression of canonical wnt signaling reporters topgal, batgal and axin2(lacZ) during murine lung development and repair // *PLoS one.* – 2011. – Vol 6, No. 8. – P. 23139.
13. Kostetskii I., Moore R., Kemler R., Radice G.L. Differential adhesion leads to segregation and exclusion of N-cadherin-deficient cells in chimeric embryos // *Dev. Biol.* – 2001. – Vol. 234, № 1. – P. 72–79.
14. Piven O., Kostetskii I., Macewicz L., Kolomijec Y., Radice G., Lukash L. Requirement for N-cadherin-catenin complex in heart development // *Exp. Biol. Med.* – 2011. – No. 6. – P. 1–7.
15. O'Connell T.D., Ni Y.G., Lin K.-M., Han H., Yan Zh. Isolation and culture of adult mouse cardiac myocytes for signaling studies. // *AfCS Research Reports.* – 2003. – Vol. 1, № 5. – P. 1 – 8.
16. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. – M.: Mir, 1984. – 425 p.
17. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. // *Nature.* – 1970. – Vol. 227, No. 5259. – P. 680–685.
18. Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten K., Behringer R. Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. – Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003. – 814 p.
19. Li J., Swope D., Raess N., Cheng L., Muller E.J., Radice G.L. Cardiac tissue-restricted deletion of plakoglobin results in progressive cardiomyopathy and activation of β -catenin signaling // *Mol. Cell. Biol.* – 2011. – Vol. 31, No. 6. – P. 134–144.
20. Watkins S.J., Borthwick G.M., Oakenfull R., Robson A., Arthur H.M. Angiotensin ii-induced cardiomyocyte hypertrophy *in vitro* is tak1-dependent and smad2/3-independent // *Hypertens Res.* – 2012. – Vol. 35. – P. 393–398.
21. Yamamoto F, Yamamoto H. Effect of inhibition of glycogen synthase kinase-3 on cardiac hypertrophy during acute pressure overload // *Gen. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2010. – Vol. 58, No. 6. – P. 263–264.
22. Archbold H.C., Yang Y.X., Chen L., Cadigan K.M. Wnt/ β -catenin pathway: regulation of transcription by the Wnt. How do they do? // *Acta Physiol.* – 2012. – Vol. 204, No. 1. – P.74–109.
23. Filipovich A., Gehrke I., Poll-Wolbeck S.J., Kreuzer K.A. Physiological inhibitors of Wnt signaling // *Eur. J. Haematol.* – 2011 – Vol. 86, No. 6. – P.453–465.

Представлено В.Е. Досенком
Надійшла 11.01.2016

СИГНАЛЬНАЯ ФУНКЦИЯ β -КАТЕНИНА ВАЖНА НА НАЧАЛЬНОЙ СТАДИИ РАЗВИТИЯ ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ ГИПЕРТРОФИИ ВЗРОСЛОГО СЕРДЦА

O.A. Пивень

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Украина, 03680, г. Киев, ул. Академика Заболотного, 150
e-mail: o.o.piven@imb.org.ua

Распространение сердечно-сосудистых заболеваний, их угроза здоровью и весомая социально-экономическая нагрузка обуславливают значительный интерес ученых к решению этой проблемы. В последнее время актуальными становятся не только исследования новых методов диагностики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний, но и выяснение механизмов их возникновения. **Целью** нашей работы было исследовать сигнальную функцию канонического Wnt-сигналинга и β -катенина в развитии патологической гипертрофии взрослого миокарда. **Методы.** Исследования проводились с использованием трансгенных мышей линии BATGAL и культуры изолированных кардиомиоцитов. Для индукции патологической гипертрофии применяли хлорид лития и AngII. Изменения уровня экспрессии гипертрофических генов и генов вовлеченных в канонический Wnt-сигналинг анализировали с помощью обратной полимеразной ПЦР в реальном времени и Western-blot анализа. Проводили морфологические исследования и X-gal окраску. **Результаты.** Нами было показано, что при действии гипертрофических стимулов происходит активация сигнальной функции β -катенина в ранние сроки

наблюдений, о чем свидетельствуют результаты X-gal окраска и изменения уровня экспрессии генов мишеней этого сигналинга (c-Fos, c-Myc, CyclinD1 и TCF-4). Также наблюдалось повышение содержания активированного β-катенина и фосфорилированного GSK3β белков уже через сутки после действия ангиотензина и хлорида лития в культуре изолированных кардиомиоцитов. **Выводы.** При развитии патологической гипертрофии вследствие хронического повышения артериального давления происходит активация многих сигнально-регуляторных механизмов кардиомиоцитов и один из них это канонический Wnt-сигналинг. Однако активация канонического Wnt-сигналинга и β-катенина в частности, событие раннее и явно необходимо для запуска генетической программы эмбрионизации миокарда

Ключевые слова: β-катенин, гипертрофия, Wnt-сигналинг, экспрессия генов, миокард.

SIGNALLING FUNCTION OF β-CATENIN IS IMPORTANT AT EARLY STAGES OF ADULT HEART PATHOLOGICAL HYPERTROPHY

O.O. Piven

Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of Ukraine
Ukraine, 03680, Kyiv, Akademika Zabolotnoho str., 150
e-mail: o.o.piven@imbg.org.ua

The spread of cardiovascular diseases, their significant threat to health and socio-economic burden result in considerable interest of scientists to this problem solution. Lately, not only investigations into new methods of diagnosis and

treatment of cardiovascular disease, but also elucidation of the mechanisms underlying their occurrence and course become topical. The **aim** of our study was to investigate the signaling function of the canonical Wnt-signaling and β-catenin function in the development of pathological hypertrophy of the adult myocardium. **Methods.** Studies were conducted using transgenic mice BATGIRL and cultures of isolated cardiomyocytes. To induce pathological hypertrophy, lithium chloride and AngII were used. Changes in the expression of hypertrophic genes and genes involved in the canonical Wnt-signaling were analyzed by real-time PCR and Western-blot analysis. Morphological studies and X-gal staining were performed. **Results.** Upon the action of hypertrophic stimuli the activation of β-catenin signaling function is shown to occur in the early stages of observation, as evidenced by X-gal staining and changes in gene-targets expression of this signaling (c-Fos, c-Myc, CyclinD1 and TCF-4). There was also observed an increase in the content of activated β-catenin and phosphorylated GSK3β proteins within a day after the action of angiotensin and lithium chloride in the culture of isolated cardiomyocytes. **Conclusions.** With the development of pathological hypertrophy due to chronic high blood pressure, there occurs the activation of many signal-regulatory mechanisms of cardiomyocytes and one of them is the canonical Wnt-signaling. However, the activation of the canonical Wnt-signaling and β-catenin, in particular, is the early event and obviously essential to run the genetic program of myocardium remodeling.

Keywords: β-catenin, hypertrophy, Wnt-signaling, gene expression, myocardium.