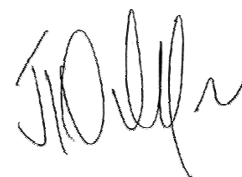


**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ**

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

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2017

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Науковий керівник: кандидат біологічних наук
Півень Оксана Олександрівна, старший науковий співробітник
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
старший науковий співробітник відділу генетики людини.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Досенко Віктор Євгенович,
Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України,
завідувач відділу загальної та молекулярної патофізіології;

доктор біологічних наук, член-кореспондент НАН України
Товкач Федір Іванович,
Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного
НАН України, завідувач відділу молекулярної генетики
бактеріофагів.

Захист дисертації відбудеться «28» березня 2017 р. о 10³⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150.

Автореферат розіслано __ ____ 2017 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук
старший науковий співробітник



І.В. Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Захворювання серцево-судинної системи є однією з найважливіших проблем сучасності. Згідно звіту Європейської організації кардіологів (Roger, 2012) 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 (Nadal-Ginard, 2012).

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 (Lickert, 2002; Huelsken, 2000). З іншого боку, умовний нокаут β -катеніну після закладання первинного та вторинного кардіального полів не мав таких драматичних наслідків (Piven, 2011). 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 (Huelsken, 2000). 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 (Chen, 2006).

Недостатність одного алеля гена β -катеніну в кардіоміоцитах пригнічувала розвиток гіпертрофії при дії надлишкового тиску після операбельного перетискання аорти (ТАС) (Qu, 2012), в той час як в іншій експериментальній роботі, надлишкова експресія конститутивно активної форми β -катеніну спричиняла розвиток дилатаційної кардіоміопатії (Hirschy, 2010). У роботі Хан та співав. така надлишкова експресія активної форми β -катеніну у серцях тварин призводила до розвитку спонтанної гіпертрофії в культурі кардіоміоцитів (Hahn *et al*, 2006). З іншого боку, показано, що зниження рівня сигнальної активності β -катеніну є

необхідною умовою для розвитку адаптивних перебудов міокарда та гіпертрофії серця (Baugrand, 2007).

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 дискусійними 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 сигналінгу та β -катеніну у адаптації дорослого міокарда до хронічних фізичних навантажень (гіпертрофії міокарда).

Об'єкт дослідження: розвиток постнатального міокарда, зміни рівня експресії фетальних генів, адаптація серця до фізичних навантажень, динаміка канонічного Wnt сигналінгу, 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, РТ-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.

Отримані 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 щирю 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 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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

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 дослідити сигнальну функцію β -катеніну у постнатальному серці та при адаптації серця до фізичних навантажень за умови делеції одного алеля досліджуваного гена. У роботі аналізували серця самців мишей 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 у трьох біологічних повторах. Усі експерименти з тваринами були погоджені з Етичним комітетом ІМБГ НАН України (протокол № 9 від 1 листопада 2016 р.).

Генотипування тварин проводили за стандартними протоколами (Maniatis, 1982) (рис. 1).

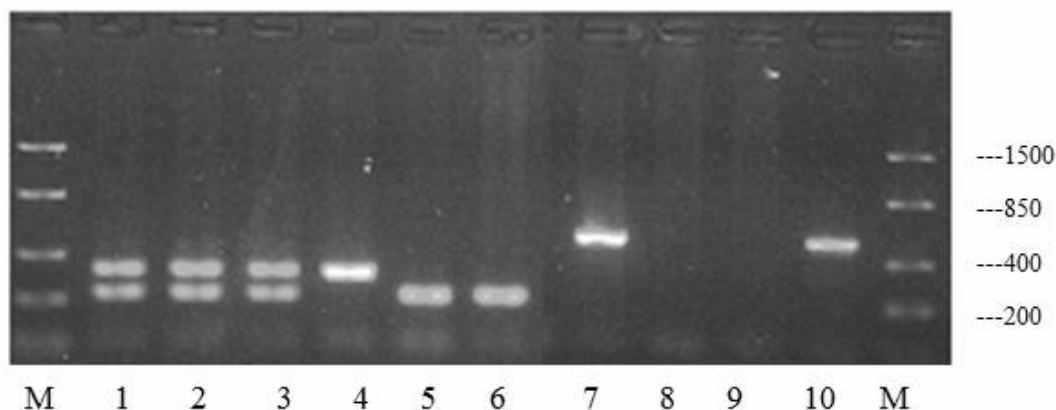


Рис. 1. Електрофореграма результатів генотипування: 1, 2, 3 – гетерозиготний нокаут гена β -катеніну; 4 – гомозиготна делеція гена β -катеніну; 5, 6 – дикотипний варіант гена β -катеніну; 7, 10 – генотипування гена Cre-рекомбінази (позитивний результат); 8 – негативний контроль (NTC, non-template control); 9 – генотипування гена Cre-рекомбінази (негативний результат); М – маркер молекулярної маси

Для оцінки розвитку міокарда та гіпертрофічної відповіді в роботі застосовували показник співвідношення маси серця до маси тіла МС/МТ.

Виділення тотальної РНК проводили з використанням реагентів фірми Jena-

Analytica (Німеччина). Синтез кДНК проводили з використанням комерційного набору реагентів (Thermo Scientific, Литва) згідно з рекомендаціями виробника. Рівень відносної експресії генів визначали методом кількісної ПЛР в реальному часі на приладах CFX96 (Bio-Rad, США) та IQ-5 (Bio-Rad, США). Результати обраховували за формулою для відносної кількісної ПЛР в реальному часі ($\Delta\Delta C_t$ -метод). Кожний зразок аналізували у триплетах, для кожної пари праймерів робили негативний контроль. У роботі використовували вже описані в літературі праймери (Li, 2011; Swore, 2012).

Гістологічний аналіз парафінових зрізів зразків тканини серця проводили за стандартними протоколами. У роботі використовували гематоксилін-еозинове забарвлення та Массон-трихромне забарвлення (комерційний набір реагентів HT15, Sigma-Aldrich). Мікроскопічний аналіз препаратів проводили з використанням мікроскопу PrimoStar (Carl Zeiss, Німеччина) та обробляли за допомогою програми AxioVision на збільшенні 10x і 40x.

Вестерн-блот аналіз проводили за стандартними протоколами. Лізати білків зразків міокарда в 5-кратному буфері Лемлі для нанесення розділяли в 10 % поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах. Потім проводили напівсухе перенесення розділених білків на PVDF мембрану (120 мА, 120 хв). Мембрану блокували в 5 % розчині знежиреного молока в буфері TBS протягом ночі та інкубували в розведеннях антитіл 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. Візуалізацію проводили з використанням ECL-системи на приладі ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad, США).

Первинні культури клітин кардіоміоцитів отримували методом холодної трипсинізації тканини серця миші. У роботі використовували середовище Ігла у модифікації Дюльбекко (DMEM, Sigma, США) із додаванням 10 % ембріональної сироватки великої рогатої худоби (Sigma, США) з 10-кратними розчинами антибіотиків для стерилізації тканини та 1-кратним розчином антибіотиків для культивування клітин. Отримані неонатальні кардіоміоцити культивували протягом 3-5 діб при температурі 37 °C 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 в буфері Версена (0,02 % EDTA). Оскільки виділення клітин у культуру проводили протягом першої доби після народження, то отримували клітини як гетерозиготні за делецією гена β -катеніну, так і з повним нокаутом гена β -катеніну.

Як індуктори гіпертрофії кардіоміоцитів використовували 50 мМ розчин хлориду літію та 20 мМ розчин пероксиду водню (Kwon, 2003; Chen, 2000; Deng, 2008). Дослідження фізіологічної активності кардіоміоцитів (МТТ-тест) проводили за стандартним протоколом (Twentyman, 1987). Для мікроскопічного дослідження клітинних популяцій кардіоміоцитів клітини фіксували парами 38 % формаліну та

фарбували гематоксилін-еозином. У роботі враховували довжину, ширину, площу та кількість ядер клітин. В обчисленнях використовували показники не менше ніж 100 клітин кожного варіанту дослідження.

Плавальний тест піддослідних тварин проводили у власній модифікації протоколу (Evangelista, 2003). Тривалість тренувань починали з 5 хв і щодня збільшували на 1,5 хв. Визначали індекс співвідношення маси серця до маси тіла, а також рівні експресії: а) гіпертрофічних генів, б) генів, залучених до канонічного Wnt шляху, в) таргетних генів при активації Wnt шляху.

Для систематичного огляду літератури із залученням статистичних методів (мета-аналізу) проведено пошук та аналіз джерел літератури в науково метричних базах PubMed, Medline та Google Scholar. До уваги брали всі англійськомовні джерела, незважаючи на дату публікації, які вдалося знайти за термінами «Wnt AND hypertrophy», «heart AND hypertrophy». Результати пошуку виявили 215 джерел. Для подальшого дослідження обрано статті, що відповідали таким умовам: статті, в яких були представлені чисельні дані (маркери канонічного Wnt сигналіну та гіпертрофії та/або морфологічні параметри); статті, в яких досліджували зв'язок β -катеніну та гіпертрофії; статті, в яких досліджували експресію β -катеніну на різних рівнях при перебудовах тканин. Підставою для виключення з аналізу були такі критерії: статті-огляди літератури; статті, які не містили чисельних даних або в яких не згадувались маркери гіпертрофії (рис. 2). Таким чином, після застосування наведених вище критеріїв відбору визначено 100 літературних джерел для подальшого мета-аналізу.

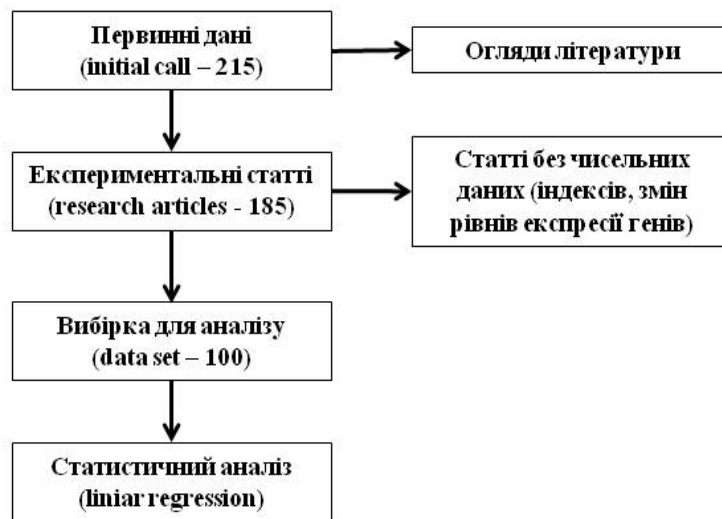


Рис. 2. Схема пошуку та відбору літературних джерел для мета-аналізу

На наступному етапі проведено збір даних для аналізу - вид тварин, що використовували у дослідженні, тип тканини, рівень розвитку гіпертрофії та спосіб її виміру: рівень експресії β -катеніну, співвідношення вмісту ДНК/білок, рівень експресії генів, що асоційовані з розвитком гіпертрофії міокарда. До таких генів належать *GSK3 β* , цикліну *D1*, *ANP*, *BNP*, β -*MHC*, α -*MHC*, *SERCA*, *Axin-2*, різні типи актину (*actin DIF*), *кадгерин*, *конексин-43*, *c-мус*, *TCF/Lef*, *c-fos*, *VEGFR*, *LRP*, *SFRP4*, *TGF β* , *mTOR*.

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

Статистичний аналіз. 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. Кількість тварин у 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 РТ-ПЛР в реальному часі проводили з використанням програмного забезпечення приладів IQ5 та CFX95 (Bio-Rad, США).

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

Для аналізу даних експериментів із дослідження адаптації дорослого міокарда до фізичних навантажень обраховували коефіцієнт варіації. Також проводили дисперсійний аналіз первинних даних (ANOVA), для оцінки Effect size враховували η^2 (сила впливу) (Levine, 2002; Richardson, 2011). Вірогідність показника η^2 враховували за Фішером.

Результати збору даних для мета-аналізу 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).

Результати досліджень та обговорення

Канонічний Wnt сигнальний шлях має важливу роль у кардіогенезі та формуванні фетального серця, однак вважається, що в умовно постнатальному серці його сигнальна активність пригнічується до базального рівня і залишається на цьому рівні (Klaus, 2012; Rao, 2010; Ye, 2015).

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. У даній 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 гетерозиготної делеції гена β -катеніну. Застосування моделі умовного нокауту гена дозволяє глибше проаналізувати функцію цього гена на рівні цілого організму.

Сигнальна функція β -катеніну в постнатальному розвитку міокарда. Перш за

все, проаналізували зміни індексу співвідношення маси серця до маси тіла (МС / МТ) у тварин усіх вікових груп.

У результаті роботи було виявлено, 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).

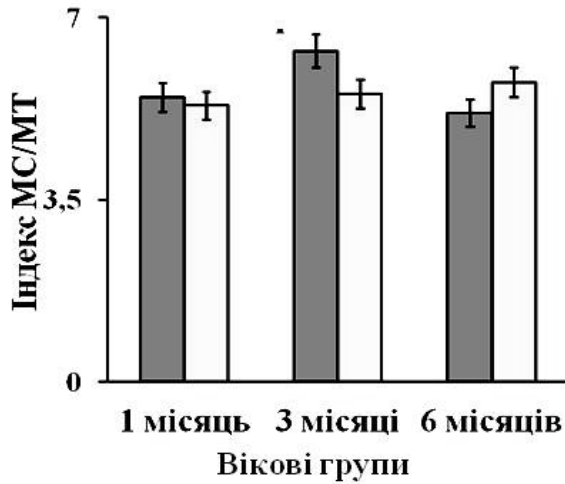


Рис. 3. Аналіз індексу співвідношення маси серця до маси тіла у тварин із гетерозиготною делецією гена β -катеніну у кардіоміоцитах та контрольних тварин різних вікових груп. Примітка: кожна група контролів містила не менше 30 тварин, кожна група мутантів містила не менше 15 тварин; ■ контроль □ мутант

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. Незважаючи на це, не виявлено ніяких морфологічних змін чи порушень архітектури міокарда мутантних тварин усіх досліджених вікових груп (рис. 4).

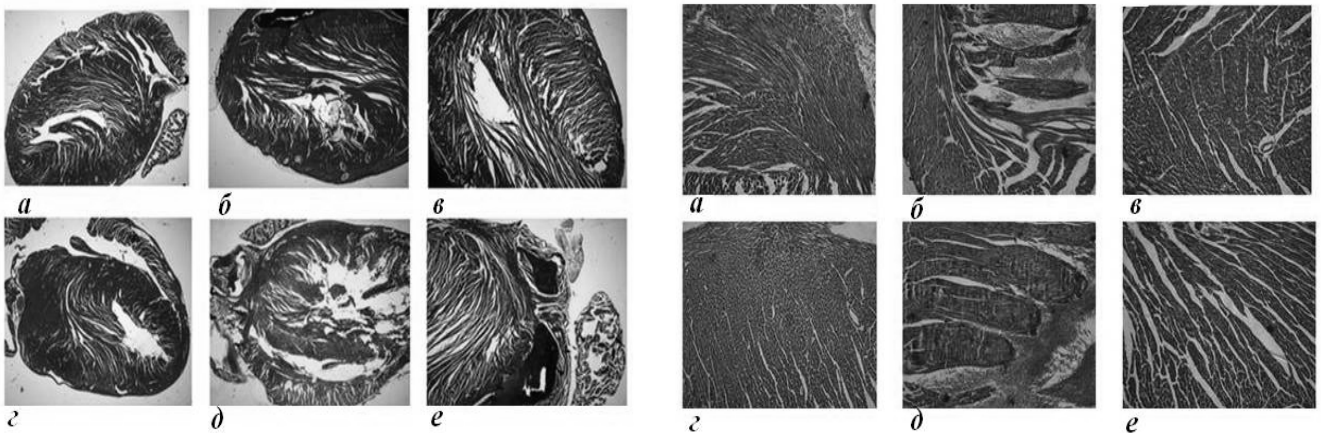


Рис. 4. Гістологічний аналіз міокарда і цілого серця тварин із гетерозиготною делецією гена β -катеніну та контрольних тварин різних вікових груп. Аналіз проводили із застосуванням Масон-трихромного забарвлення. На рисунку представлені типові зрізи тканини серця тварин віком 1 (а, з), 3 (б, д) та 6 місяців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

І гематоксилін-еозинове (дані не наведено), і Масон-трихромне забарвлення

не виявили перебудов міокарда і цілого серця чи фіброзного заміщення у тварин з дефіцитом гена β -катеніну.

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

У роботі реєстрували затримку росту ювенільного та дорослого серця і тенденцію до розвитку гіпертрофії з віком у мишей з дефіцитом гена β -катеніну. Відомо, що кардіогенез та постнатальна специфікація кардіоміоцитів, а зрештою, і перебудови серця супроводжуються характерними змінами на молекулярно-генетичному рівні. Так, наприклад, при гіпертрофії відбувається реактивація фетальних або ж гіпертрофічних генів (ANP , BNP , β - MHC) та пригнічення експресії міозину дорослого серця (Qu, 2008; Palchevska, 2016). Тому проаналізували рівні експресії цієї групи генів у тварин усіх вікових груп за умов дефіциту гена β -катеніну порівняно із контролем.

Цікаво, що у тварин віком 1 та 3 місяці із гетерозиготною делецією гена β -катеніну спостерігали підвищення експресії генів ANP , BNP та β - MHC і зниження рівня експресії гена α - MHC (рис. 5, а, б та г).

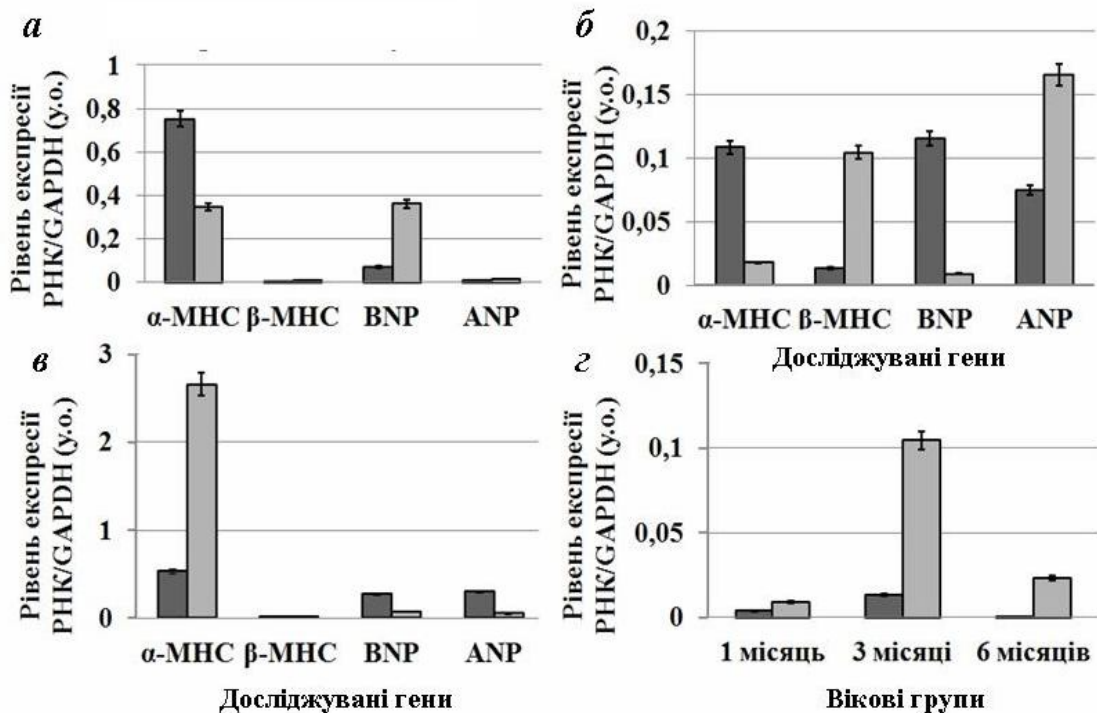


Рис. 5. Відносні рівні експресії генів гіпертрофічної відповіді в міокарді тварин із делецією однієї алелі гена β -катеніну (мутант) та контрольних тварин (контроль) різних вікових груп: а – 1 місяць, б – 3 місяці, в – 6 місяців, г – відносний рівень експресії гена β - MHC . Примітка: кількість тварин в кожній групі – не менше 2; ■ контроль □ мутант

Така реактивація фетальних генів та пригнічення міозину дорослого серця є типовою для гіпертрофії. Однак, у даній роботі, 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 (Qu, 2008).

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 -*MHC*, був вищим порівняно з таким у тварин контрольної групи (рис. 5, в та г). У цій же групі тварин відбувалось і підвищення рівня експресії міозину дорослого серця - α -*MHC*, порівняно із мутантними тваринами віком 1 та 3 місяці. Цікаво, що рівень експресії гена α -*MHC* 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, 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 сигналіngu.

Тож проаналізували рівень експресії генів залучених до реалізації транскрипційної активності β -катеніну - *TCF4* та *Axin2* у тварин віком 1, 3 та 6 місяців. Показано, що рівень експресії гена *TCF4* був суттєво нижчим у зразках тканин мутантних тварин порівняно з контрольними того ж віку (рис. 6, А).

Натомість рівень експресії гена *Axin2* був вищим в зразках тканин мутантних тварин в усіх вікових групах (рис. 6, А).

Окрім того, виявлено і певну динаміку активності сигнального шляху як у контрольних, так і мутантних групах тварин залежно від віку. Так, у тварин контрольної групи, згідно змін відносного рівня експресії гена *TCF4*, відбувалось зниження активності канонічного Wnt з віком (рис. 6, А).

Для детальнішого аналізу кінетики канонічного Wnt сигналіngu, проаналізували і 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 протоонкогенами (Dang, 1999; Armstrong, 2005), а циклін *D1* залучено до контролю синтезу ДНК та білка у клітині.

Виявлено, що у тварин із дефіцитом гена β -катеніну віком 1 місяць рівень експресії генів *c-fos* та цикліну *D1* достовірно не відрізнявся від таких у контрольних зразках, однак рівень експресії гена *c-myc* у цих тварин був вищим (рис. 6, Б).

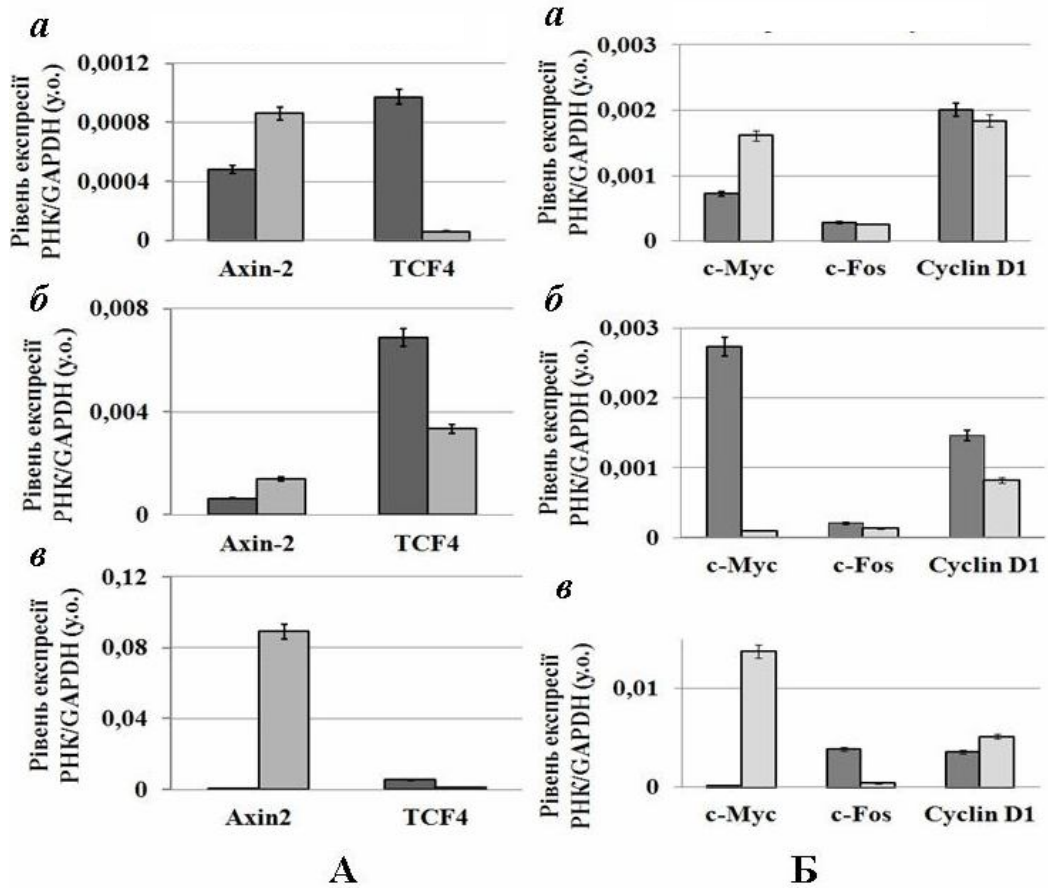


Рис. 6. Кінетика канонічного Wnt сигнального шляху в міокарді тварин із гетерозиготною делецією гена β -катеніну та контрольних тварин різних вікових груп: А – рівень експресії генів, залучених до канонічного Wnt шляху; Б – таргетні гени канонічного Wnt шляху; а – 1 місяць, б – 3 місяці, в – 6 місяців.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

Варто зауважити, що c-Мус є важливим регулятором ембріонального розвитку та підтримки стовбуровості і відновлення пулу стовбурових клітин (Varlakhanova, 2010). Підвищений рівень експресії цього гена у дослідних тварин, в цілому, узгоджується із нашим 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.

Отже, 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.

Дослідження сигнальної функції β -катеніну у ізолюваних кардіоміоцитах за умови впливу гіпертрофічних стимулів. Зважаючи на попередні дані, вирішили детальніше проаналізувати роль канонічного Wnt сигналіngu і β -катеніну у

метаболической активности та гипертрофическому росту неонатальных кардиомиоцитов *in vitro*. Клетки миокарда дикого типа, с частичной та полной потерей гена β -катенина получали из сердец новорожденных животных соответствующих генотипов и стимулировали растворами LiCl та H₂O₂. Результаты исследования метаболической активности клеток (МТТ-тест) приведены на рис. 7.

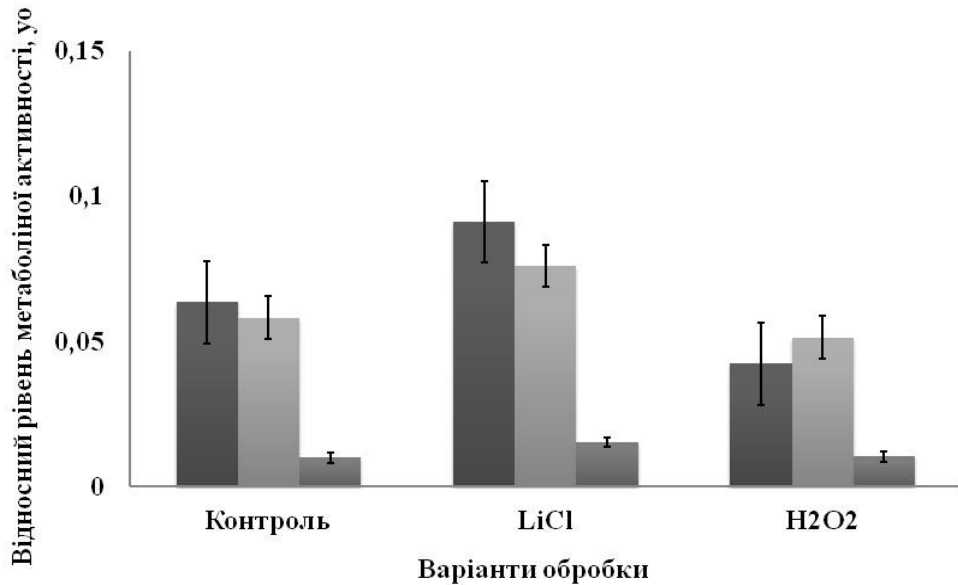


Рис. 7. Дослідження активності метаболізму культури первинних кардіоміоцитів за умови індукції гіпертрофії LiCl та H₂O₂: Контроль – клітини без обробки; LiCl – клітини, оброблені хлоридом літію; H₂O₂ – клітини, оброблені перексидом водню; ■ контроль ■ гетерозиготний мутант ■ гомозиготний мутант

Двофакторним дисперсійним аналізом виявлено 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 проведено морфологічний аналіз клітин за контрольних умов та за умов стимуляції хлоридом літію. У популяції проаналізованих кардіоміоцитів зустрічались клітини різної морфології, однак ми зосередились на аналізі двоядерних кардіоміоцитів (рис. 8), оскільки відомо, що це кардіоміоцити, які досягли термінальної диференціації (Pasumarthi, 2002).

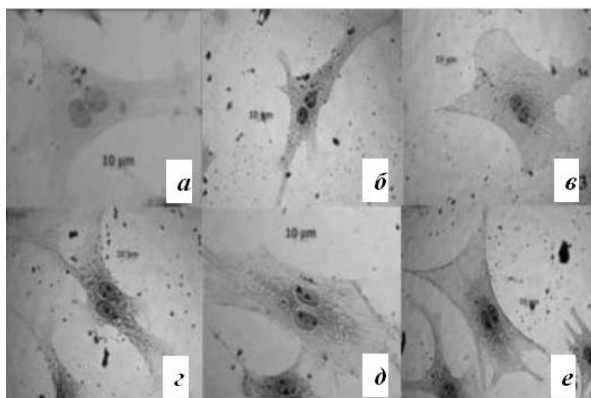


Рис. 8. Морфологія первинних кардіоміоцитів (перший пасаж). Гематоксилін - еозинове забарвлення кардіоміоцитів (40 х). а, с – кардіоміоцити дикотипних тварин; б, д – кардіоміоцити тварин з гетерозиготною делецією гена β -катенину; е, е – кардіоміоцити тварин з повною делецією гена β -катенину. Верхній ряд – варіант без обробки. Нижній ряд – після 3-денної обробки LiCl (10 х)

Аналізуючи розподіл частоти зустрічальності клітин із двома ядрами залежно від їхньої площі за допомогою дисперсійного аналізу, виявлено деякі статистично вірогідні ($p \leq 0,05$) закономірності.

Так, показано тенденцію до зсуву піку кривої залежно від генотипу ($\eta^2=0,53$) – якщо в дикотипних кардіоміоцитах максимум розподілу припадав на класи клітин із найменшою площею (рис. 9), то в кардіоміоцитах з повним нокаутом гена β -катеніну максимум зміщувався вправо - до класів із середнім значенням цього параметру. Розподіл кардіоміоцитів, гетерозиготних за нокаутним геном, мав проміжний характер.

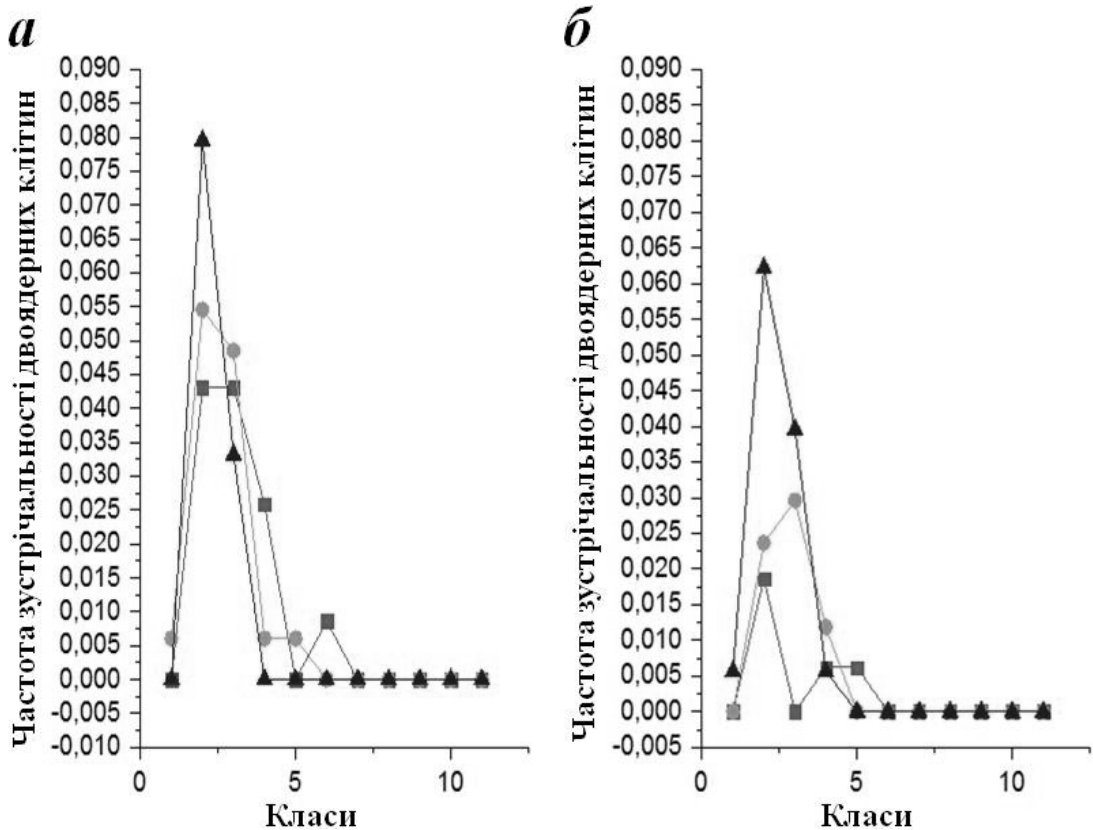


Рис. 9. Криві розподілу частоти зустрічальності двоядерних клітин залежно від їхньої площі. Вибірку розбито на класи, де «0» відповідає класу клітин з найменшою площею, а «10» – класу клітин з найбільшою площею: *а* – варіанти без обробки, *б* – варіанти, оброблені хлоридом літію (50 мМ, тривалість - 3 доби). Для кожного варіанту обраховували показники ≥ 100 клітин; ■ – контроль ● – гетерозиготний мутант ▲ – гомозиготний мутант

Однак, при дії хлориду літію характер розподілу змінювався: у клітинах із дефіцитом гена β -катеніну, максимальні частоти спостерігали у класах клітин із середнім значенням площі, а у кардіоміоцитів дикого типу спостерігали зникнення вираженого піку розподілу ($\eta^2 = 0,25$).

Це може вказувати на те, що у клітинах, у яких рівень β -катеніну знижений, відбувається затримка дозрівання кардіоміоцитів (формування двоядерних клітин)

і це може бути наслідком порушення канонічного Wnt сигналіngu. Це спостереження, однак, вимагає подальших досліджень.

Отже, можемо зробити висновок, що сигнальна функція β -катеніну є принципово важливою не лише для ембріонального розвитку серця, а й для його постнатального росту і 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.

Дослідження сигнальної функції β -катеніну при адаптації міокарда до фізичних навантажень. Для дослідження сигнальної функції гена β -катеніну при адаптаціях дорослого міокарда до фізичних навантажень використали плавальний тест у власній модифікації. 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 у обох груп мишей за умов фізичного тренування ($p = 0,07$) (рис. 10).

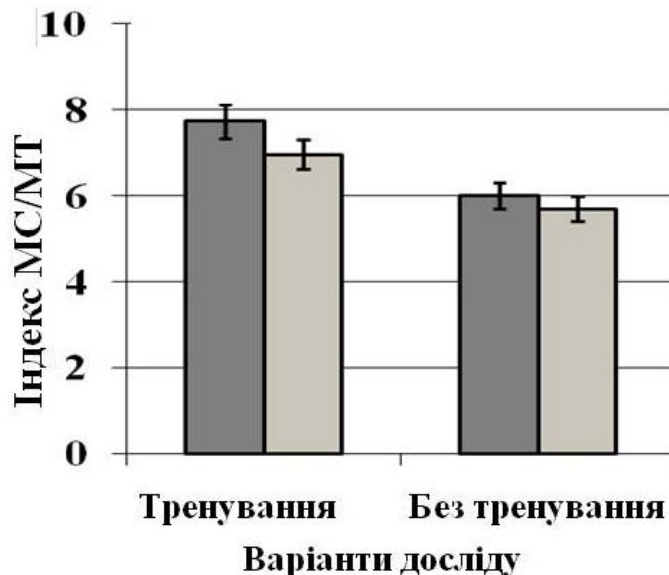


Рис. 10. Аналіз індексу співвідношення маси серця до маси тіла у тварин, що отримували тривале фізичне навантаження. Контроль – контрольні самці; Мутант – група тварин з гетерозиготною делецією гена β -катеніну. Кількість тварин в групах: 7 – 18 тварин; ■ Контроль □ Мутант

Детальніший аналіз індексу виявив, що коефіцієнт варіації був в 5-10 разів вищим у групі, яка отримувала фізичне навантаження. В той же час коефіцієнт у тренуваних контрольних тварин та тварин із гетерозиготною делецією гена β -катеніну був 0,18 та 0,31 відповідно, а у тварин, що не піддавались тривалому тренуванню цей показник складав 0,03 та 0,06 відповідно (рис. 11).

Варто також зауважити, що не виявлено статистично достовірної різниці у інтенсивності тренувань 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 -*MHC*

експресувалися на вищому рівні як за умов навантажень, так і без них (дані не наведено). Ці дані узгоджуються із нашими попередніми результатами, де у тварин віком 3 місяці також спостерігали підвищення рівня експресії усіх досліджуваних генів-маркерів гіпертрофії.

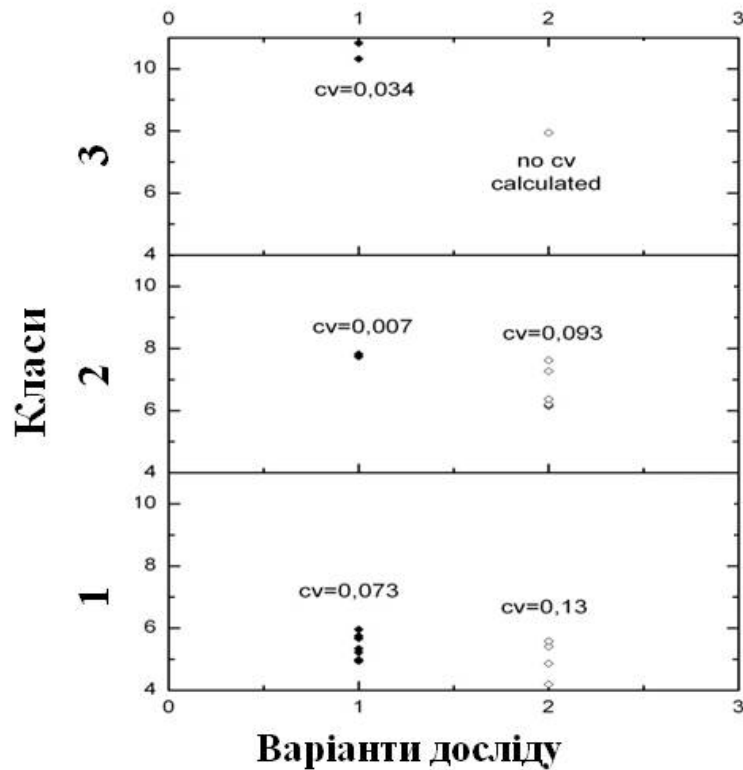


Рис. 11. Детальний аналіз індексу співвідношення маси серця до маси тіла у тварин, що отримували тривале фізичне навантаження: контроль – контрольні самці; мутант – група тварин з ембріональною кардіоспецифічною гетерозиготною делецією гена β -катеніну. Кількість тварин в групах: 7-18 тварин; ♦ контроль ◇ мутант

Цікаво, що за умов тривалого фізичного навантаження у контрольній групі мишей реєстрували підвищення рівня експресії лише гена *ANP*. Ймовірно, саме натрійуретичний пептид типу А залучений до адаптації серця при тривалих фізичних навантаженнях більшою мірою, ніж *BNP*.

Із застосування Вестерн-блот аналізу дослідили зміни рівня активованого β -катеніну та фосфорилованого GSK для оцінки канонічного Wnt сигналіngu у серцях тварин після навантаження. Реєстрували зміни рівня фосфорилованого GSK у дослідних тварин як за умов фізичного навантаження, так і за умов його відсутності порівняно з контрольною групою тварин (рис. 12). Це свідчить про активацію канонічного Wnt шляху у тварин з гетерозиготною делецією гена β -катеніну і узгоджується з результатами аналізу змін експресії генів-мішеней цього сигналіngu. Зауважимо, що підвищення сигнальної активності канонічного Wnt у тварин з дефіцитом гена β -катеніну все одно не сягало базального рівня контрольної групи.

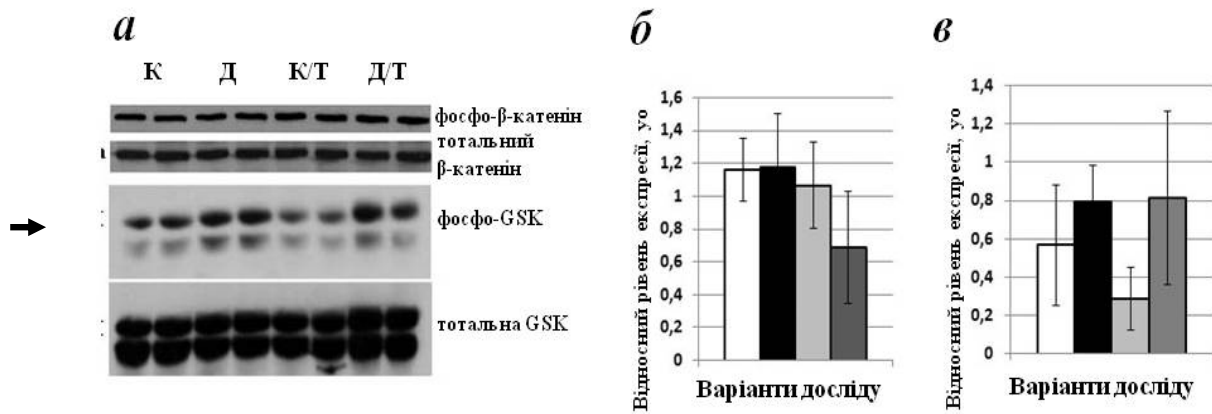


Рис. 12. Дослідження рівня фосфорилювання білків, залучених до канонічного Wnt сигналіngu: К – контрольні тварини, Д – дослідні тварини, К/Т – контрольні тварини, що піддавались тривалому фізичному навантаженню, Д/Т – дослідні тварини, що піддавались тривалому фізичному навантаженню: *а* – результати 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 GSK3β. Кількість тварин в групах 6-7; □К ■-Д □К/Т □Д/Т

Однак, у цих тварин відбувалось збільшення показника МС / МТ порівняно з тваринами, що не отримували фізичного навантаження. Ми припустили, що це може відбуватися також і за участі інших сигнально-регуляторних шляхів, що залучені до розвитку гіпертрофії, таких як PI3K-mTOR-залежний та MAPK-залежний сигнальні шляхи. Тому проаналізували зміни рівня фосфорилювання деяких ключових компонентів цих сигнально-регуляторних шляхів: ERK1/2 та Akt, фосфорилюваних за залишками Thr202/Tyr20 та Ser 473 відповідно. В результаті проведеного аналізу виявлено, що у тварин з гетерозиготною делецією гена *β-катеніну* відбувається підвищення рівня фосфорилювання ERK1/2 та Akt як за умови фізичного навантаження, так і без нього (рис. 13).

Варто зауважити, що при фізичному навантаженні активність білків ERK1/2 та Akt (активні, фосфорилювані форми яких досліджувались) була на вищому рівні і у мутантних і у контрольних тварин порівняно з тваринами дослідної групи без тренувань (рис. 13, *а*).

Окрім того спостерігали активацію ERK1/2 та Akt (фосфорилюваних за залишками Thr202/Tyr20 та Ser 473 відповідно) і у тварин контрольної групи при адаптації до фізичного навантаження, однак ця активність була вдвічі нижчою, ніж у тварин з дефіцитом гена *β-катеніну* (рис. 13, *б*).

Отже, встановлено, що наявність сигнальної активності β-катеніну (перебування його в фосфорилюваній формі за певними залишками) 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 та розвиток гіпертрофії можливі при переході

нефосфорилюваної форми β -катеніну в фосфорилювану форму та зміні рівня фосфорилювання ERK1/2 та Akt.

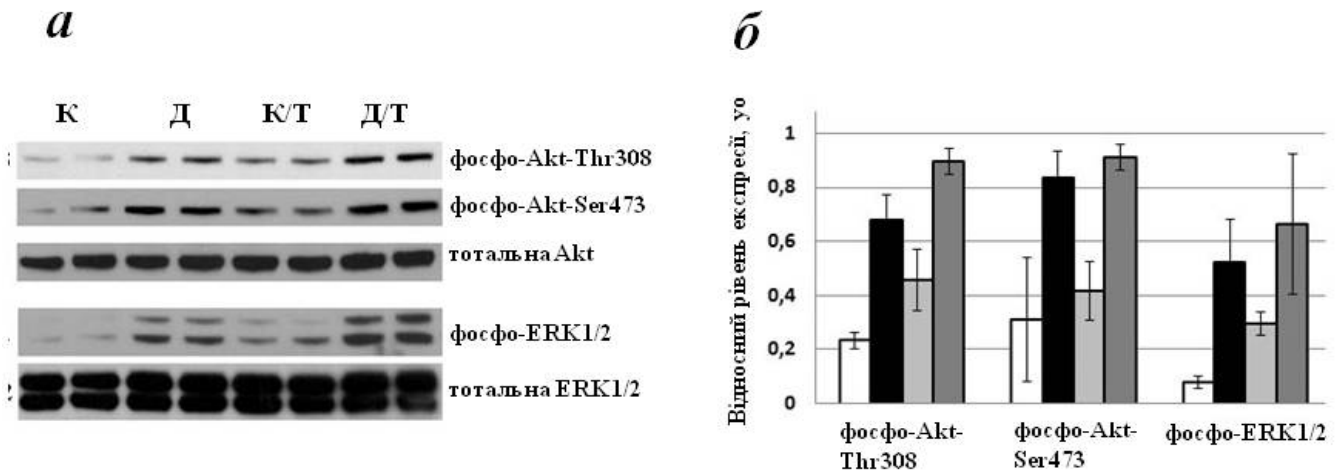


Рис. 13. Дослідження рівня фосфорилювання Akt та ERK1/2. К – контрольні тварини, Д – дослідні тварини, К/Т - контрольні тварини, що піддавались тривалому фізичному навантаженню, Д/Т - дослідні тварини, що піддавались тривалому фізичному навантаженню: *а* – результати Вестерн-блоту; *б* – денситограма рівнів експресії фосфорилюваних 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

Ймовірно існує компенсаторний ефект між ERK1/2 та Akt при розвитку гіпертрофії за умов зниження рівня β -катеніну та пригнічення канонічного Wnt шляху.

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 сигналіngu (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.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Вплив делеції гена β -катеніну на морфологію та фізіологію кардіоміоцитів за умов дії стимуляторів гіпертрофії / О.Л. Пальчевська, А.А. Хазеєва, Н.В. Мачушинець, Т.П. Рубан, Л.Л. Мацевич, О.О. Півень // Фактори експериментальної еволюції організмів. — 2016. — Vol. 18. — Р. 242–248. (*Особистий внесок здобувача: за безпосередньої участі здобувача було отримано первинні культури кардіоміоцитів, проведено МТТ-тест, забарвлення клітин та вимірювання морфологічних параметрів клітин (довжина, ширина, площа, кількість ядер)*)

2. 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. — Р. 150–157. (*Особистий внесок здобувача: створення бази даних літератури, відбір даних для аналізу*)

3. 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. — 225-229 р. (*Особистий внесок здобувача: за безпосередньої участі здобувача було проведено плавальний тест, здобувачем було виділено РНК, синтезовано кДНК та проведено аналіз змін рівня експресії гіпертрофічних (фетальних) генів – ANP, BNP, α -MHC, β -MHC, а також таргетних генів - TCF4 та c-fos*)

4. Дослідження активності канонічного Wnt – сигналіngu у тварин різного віку за умов ембріональної кардіоспецифічної делеції β -катеніну / О. Л. Пальчевська, В. В. Балацький, А. О. Андреєва, Л.Л. Мацевич, О.О. Півень, Л.Л. Лукаш // Cytology and Genetics. — 2015. — Vol. 49, No. 1. — Р. 10–17. (*Особистий внесок здобувача: здобувачем проведено збір зразків тканини для гістологічного аналізу тварин віком 1, 3 та 6 місяців, виділено РНК та синтезовано кДНК, проведено аналіз змін рівнів експресії фетальних (гіпертрофічних) генів - ANP, BNP, α -MHC, β -MHC, а також генів, залучених до реалізації канонічного Wnt сигналіngu – c-myc, c-fos, *циклін D1*)*

5. 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. (*Особистий внесок здобувача: здобувачем проведено збір зразків тканини для гістологічного аналізу тварин віком 1, 3 та 6 місяців, виділено РНК та синтезовано кДНК, проведено аналіз змін рівнів експресії фетальних (гіпертрофічних) генів - ANP, BNP, α -MHC, β -MHC*)

6. 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. (*Особистий внесок здобувача: за безпосередньої участі здобувача було проведено плавальний тест, здобувачем було виділено РНК, синтезовано кДНК та проведено аналіз змін рівня експресії гіпертрофічних (фетальних) генів, зібрано зразки тканин для виділення білку, отримано первинні культури кардіоміоцитів, проведено МТТ-тест та оцінено морфологічні параметри клітин*)

7. 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. (*Особистий внесок здобувача: за безпосередньої участі здобувача було отримано первинні культури кардіоміоцитів, проведено МТТ-тест, забарвлення клітин та вимір морфологічних параметрів клітин (довжина, ширина, площа, кількість ядер)*)

8. 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. (*Особистий внесок здобувача: здобувачем проведено збір зразків тканини для аналізу тварин різного віку, виділено РНК та синтезовано кДНК, проведено аналіз змін рівнів експресії фетальних (гіпертрофічних) генів - ANP, BNP, α -MHC, β -MHC та генів, залучених до функціонування канонічного Wnt шляху*)

9. The signaling function of beta-catenin during myocardial adaptation to training / O.L. Palchevska, V.V. Balatskyu, L.L. Macewicz, O.O. Piven, L.L. Lukash // 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. 100. (*Особистий внесок здобувача: здобувачем проведено збір зразків тканин тварин, що піддавались тривалому тренуванню, та контрольних тварин, виділено РНК та синтезовано кДНК, проведено аналіз змін рівнів експресії фетальних (гіпертрофічних) генів - ANP, BNP, α -MHC, β -MHC*)

10. 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. (*Особистий внесок здобувача: за безпосередньої участі здобувача було проведено плавальний тест, здобувачем було виділено РНК зі зразків контрольних та дослідних груп, синтезовано кДНК та проведено аналіз змін рівня експресії*

гіпертрофічних (фетальних) генів - ANP, BNP, α -MHC, β -MHC, а також генів, залучених до канонічного Wnt сигналінгу – c-myc, c-fos, циклін D1)

11. 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. *(Особистий внесок здобувача: здобувачем проведено збір зразків тканини для гістологічного аналізу тварин віком 1, 3, 6 та 9 місяців, виділено РНК та синтезовано кДНК, проведено аналіз змін рівнів експресії фетальних (гіпертрофічних) генів)*

12. 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. *(Особистий внесок здобувача: здобувачем проведено збір зразків тканини для гістологічного аналізу тварин віком 1, 3 та 6 місяців, виділено РНК та синтезовано кДНК, проведено аналіз змін рівнів експресії фетальних (гіпертрофічних) генів - ANP, BNP, α -MHC, β -MHC, а також генів, залучених до реалізації канонічного Wnt сигналінгу – c-myc, c-fos, циклін D1)*

13. Embryonically 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. *(Особистий внесок здобувача: здобувачем проведено збір зразків тканини для гістологічного аналізу тварин віком 1, 3 та 6 місяців, виділено РНК та синтезовано кДНК, проведено аналіз змін рівнів експресії фетальних (гіпертрофічних) генів - ANP, BNP, α -MHC, β -MHC)*

14. 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. *(Особистий внесок здобувача: здобувачем виділено РНК зі зразків тканин тварин різних вікових груп (1 та 3 місяці), синтезовано кДНК, досліджено зміни рівнів експресії таргетних генів канонічного Wnt шляху – c-myc, c-fos, циклін D1 та Axin2 та TCF4)*

15. Embryonically induced β -catenin haploinsufficiency in heart inhibits adult myocardium development and leads to fetal genes expression upregulation / O. Palchevska, V. Balatskyu, A. Andreeva, L. L. Macewicz, O.O. Piven, L.L. Lukash // VII Конференція молодих вчених інституту молекулярної біології і генетики НАН України, присвячена 175-річчю з Дня народження Данилевського Олександра Яковича, 28-29 травня, 2013, Київ, Україна, ст. 17. *(Особистий внесок здобувача: здобувачем проведено збір зразків тканини для гістологічного аналізу тварин віком 1, 3 та 6 місяців, виділено РНК та синтезовано кДНК, проведено аналіз змін рівнів експресії фетальних (гіпертрофічних) генів - ANP, BNP, α -MHC, β -MHC)*

АНОТАЦІЯ

Пальчевська О.Л. Особливості розвитку постнатального міокарда за умови гетерозиготної делеції гена β -катеніну. – Рукопис.

Робота присвячена вивченню розвитку постнатального міокарда, адаптації дорослого серця до тривалих фізичних навантажень та розвитку гіпертрофії за умов гетерозиготної делеції гена β -катеніну. З використанням моделі умовно-нокаутних тварин було показано, що дефіцит гена β -катеніну у кардіоміоцитах спричиняє затримку росту дорослого серця, однак асоціюється з гіпертрофічним ростом міокарда з віком. Було встановлено зниження рівня активності канонічного Wnt шляху у тварин усіх вікових груп порівняно з контролями. Пригнічення сигнальної функції канонічного Wnt сигналіngu спричиняє затримку активності метаболізму культури кардіоміоцитів та розвитку гіпертрофічної відповіді клітин, порушення термінального диференціювання кардіоміоцитів. Дослідження здатності міокарда адаптуватись до тривалих фізичних навантажень за умови гетерозиготної делеції гена β -катеніну виявило, що наявність сигнальної активності β -катеніну навіть на базальному рівні є необхідною умовою для ефективної адаптації дорослого серця до тривалих фізичних навантажень.

Ключові слова: β -катенін, канонічний Wnt сигнально-регуляторний шлях, гіпертрофія міокарду.

АННОТАЦИЯ

Пальчевская О.Л. Особенности развития постнатального миокарда при гетерозиготной делеции гена β -катенина. – Рукопись.

Работа посвящена изучению развития постнатального миокарда, адаптации взрослого сердца к длительным физическим нагрузкам и развитию гипертрофии при условии гетерозиготной делеции гена β -катенина. Используя животных с условным нокаутом гена β -катенина, показали, что дефицит гена в кардиомиоцитах хоть и вызывает задержку развития гипертрофии, но впоследствии ассоциируется с гипертрофическим ростом миокарда с возрастом. Было показано, что снижение активности канонического Wnt сигналинга приводит к пониженному уровню метаболизма в кардиомиоцитах, слабому гипертрофическому ответу и нарушению терминальной дифференциации клеток. Исследование адаптации сердца к длительным физическим нагрузкам позволило установить, что наличие сигнальной активности β -катенина даже на базальном уровне есть необходимым условием развития гипертрофии.

Ключевые слова: β -катенин, канонический Wnt путь, гипертрофия миокарда.

SUMMARY

Palchevska O.L. The peculiarities of postnatal myocardium development with β -catenin gene heterozygous deletion. – Manuscript.

The study presented in this thesis is devoted to the research of the influence of β -catenin gene haploinsufficiency on the postnatal heart maturation and development as well

as heart adaptation to prolonged physical training and hypertrophy. The β -catenin protein is well known as a main mediator of canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway on one hand and as a component of adherent junction on the other. The experimental evidence suggests the level of this protein to be critically important for the heart embryogenesis and development. So literature data concerning Wnt pathway role for postnatal heart function are quite controversial.

The conditional knock-out animals were used. The gene expression experiments were performed using qPCR. The active protein forms expression was determined using Western blotting. The paraffin sections were stained with H&E and Masson's trichrome staining. The swimming test was adapted to model physical training. The primary cultures of cardiomyocytes isolated from transgenic animals were used for physiological activity measurements (MTT-test) and for cytological analysis. The primary cell cultures were stained with H&E staining. The statistical analysis of literature data (meta-analysis) was performed using linear regression and ANOVA. The effect size (g) was estimated using Eta squared (η^2). The experimental data statistical significance was also estimated using ANOVA.

Using the transgenic *β -catenin* conditional knock-out animals the gene deficit was shown to provoke the adult heart maturation delay though at the same time the upregulation of hypertrophic genes was registered. The hypertrophic genes (known also as fetal) are associated with heart growth. The upregulation of fetal genes expression (*ANP*, *BNP* and *β -MHC*) was registered in the *β -catenin* haploinsufficient animal myocardium at the age of 1 and 3 months comparing to control animals.

The downregulation of fetal genes *ANP* and *BNP* was also revealed in the myocardium with heterozygous deletion of *β -catenin* gene in animals at the age of 6 months comparing to the control ones, though the expression of *β -MHC* gene was still higher in mutants myocardium. The expression of *TCF4* gene was shown to be higher in the myocardium of *β -catenin* haploinsufficient animals at all studied age points comparing to corresponding control. These observations point to the downregulation of canonical Wnt pathway in heart muscle under the condition studied. Also the *c-fos*, *c-myc* and *cyclin D1* genes (known target genes of expression canonical Wnt pathway) expression supported of canonical Wnt pathway activation determined in previous experiment.

The *β -catenin* gene haploinsufficiency condition and canonical Wnt signaling downregulation were shown to lead to primary cardiomyocytes metabolic activity decline and cell hypertrophy delay. The results presented in the thesis point to the important influence canonical Wnt pathway and *β -catenin* specifically have on the heart postnatal maturation and shift from fetal to adult genetic program.

The canonical Wnt pathway downregulation causes perturbation in the both terminal differentiation and postnatal heart formation. The experiments with the myocardium adaptation to physical training under the condition of *β -catenin* gene heterozygous deletion revealed that signaling activity of β -catenin at least at basal level is necessary for normal adult myocardium adaptation.

The downregulation of β -catenin signaling activity permits the heart adaptation only under the condition of canonical Wnt activation as well as increased phosphorylation of ERK1/2 and Akt that are components of MAPK and PI3K-mTOR-dependent signaling pathways.

We suggest the compensatory effect between Wnt and other signaling pathways involved to hypertrophy development potentially supports the hypertrophy development when the canonical Wnt pathway activity is downregulated.

The meta-analysis of literature data defined the panel of factors (namely, SERCA, different forms of actin, Axin2, c-myc, ANP and hypertrophic indices) as the most appropriate and statistically significant for hypertrophy development estimation.

The results presented in the thesis expend current conception of *β -catenin* gene and canonical Wnt signaling pathway function in the formation, maturation and functioning of postnatal myocardium. The β -catenin signaling was shown to be critically important for postnatal heart development and for adult myocardium adaptation to physical training.

Keywords: canonical Wnt signaling, β -catenin, heart hypertrophy.