“ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ТА КЛІНІЧНА ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ”
 “EXPERIMENTAL AND CLINICAL PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY”
 Науково-практичний журнал/Scientific-practical journal

Наукові статті / Research article
 ECPB 2018, 3(83): 33–39. <https://doi.org/>

УДК 576.52

Активність канонічного Wnt-сигналіngu при формуванні атлетичного міокарда

Л.І. БОРТНІЧУК¹, А.О. МИРОНОВА¹, Д.С. АВРАМЕЦЬ¹, В.В. БАЛАЦЬКИЙ²,
 Л.Л. МАЦЕВИЧ², О.О. ПІВЕНЬ²

¹ ННЦ «Інститут біології та медицини», Київський національний університет
 ім. Тараса Шевченка, Київ, Україна

² Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ, Україна
 E-mail: o.o.piven@imbg.org.ua

Серце ссавців – унікальний орган, що працює як єдиний синцитій упродовж усього життя, адаптуючись до цілої низки стресових чинників та вікових змін. Така адаптація зазвичай пов'язана з ростом кардіоміоцитів у довжину та ширину, заміною робочих клітин серця фібробластиами, змінами товщини стінок лівого шлуночка. Проте важливо розуміти, що зазначені зміни структури міокарда не лише негативно впливають на фізіологічні показники, а й насамперед викликаються певними змінами на молекулярно-генетичному та молекулярно-біологічному рівнях. Низка сигнально-регуляторних шляхів та сигнальних молекул залучені не лише до координації кардіогенезу, а й до роботи післянатального серця та його перебудов під дією тих чи інших чинників (гіпертензія, фізичні навантаження, гормональні впливи, вікові зміни) [1]. Одним із таких сигналінгів є канонічний Wnt-сигналінг (Wnt/ β -катеніновий сигналінг), що не лише має важливу функцію у формуванні мезодермальних прогеніторів і проліферації кардіогенної мезодерми під час кардіогенезу, а й залучений до регулювання перебудов дорослого серця [2]. Слід зауважити, що основний транскрипційний кофактор канонічного Wnt-сигналіngu β -катенін має не лише сигнальну функцію, а й структурну – бере участь у підтриманні міжклітинної адгезії у складі адгерінового комплексу [2]. Функцію β -катеніну в серці вивчали із використанням тварин та ізольованих кардіоміоцитів, проте його роль і досі недостатньо з'ясована.

Відомо, що активація Wnt/ β -катенінового сигнального шляху необхідна для регенерації міокарда після інфаркту [3–6], а також при адаптації дорослого серця до гемодинамічного стресу [7–11]. Однак не існує одностайної думки вчених щодо участі канонічного Wnt-сигнального шляху в зазначених процесах, оскільки дані, отримані різними колективами авторів, досить суперечливі. Так, показано, що для ефективної регенерації міокарда необхідною умовою є саме пригнічення сигнальної функції β -катеніну [3, 11]. Немає одностайності й щодо ролі сигнальної функції β -катеніну при адаптації міокарда до гіпертензивних чи фізичних навантажень або старіння. Експериментально показано, що саме інгібування цього сигналіngu спричиняє розвиток патології [12]. Раніше показано, що під дією гіпертрофічних стимулів, таких як ангіотензин II та LiCl, активація канонічного Wnt-сигналіngu відбувається на третю добу експерименту, проте на сьому добу рівень активованого β -катеніну був таким же, як і у контролі [13]. Метааналіз наявних експериментальних робіт виявив, що зміни рівня β -ка-

теніну та його транскрипційної активності є необхідною умовою розвитку гіпертрофії. Таким чином, механізм розвитку гіпертрофії є дуже консервативним і вимагає участі канонічного Wnt-сигналіngu [14]. Водночас особливості формування атлетичного міокарда, або фізіологічної гіпертрофії, при тривалих і короткочасних фізичних навантаженнях досліджені мало.

Отже, кінетика активності канонічного Wnt-сигналіngu, особливості його функціонування при різних стресових чинниках мають бути ретельно досліджені. Ми зосередилися на аналізі активності канонічного Wnt-сигналіngu при формуванні атлетичного міокарда за умови тривалого (1 місяць) й нетривалого (1 тиждень) фізичного навантаження.

Матеріали й методи дослідження. Сигнальну функцію β -катеніну при формуванні атлетичного міокарда в ранні терміни тренувань досліджували з використанням дорослих самців мишей лінії C57BL/6J віком три місяці. Фізичне навантаження тварин моделювали із застосуванням плавального тесту за описаною та адаптованою методикою [15]. Розвиток гіпертрофії або формування «атлетичного міокарда» тварин оцінювали за допомогою індексу співвідношення маса серця/маса тіла (МС/МТ). Активність канонічного Wnt-сигналіngu при фізичному навантаженні міокарда досліджували через тиждень тренувань і порівнювали з активністю у тварин того ж віку контрольної групи, що не тренувались, та у тварин, що тренувались упродовж 1 місяця. Після завершення тренувань мишей забивали методом первікальної дислокації та проводили ізоляцію зразків для подальших молекулярно-генетичних досліджень. Усі дослідження на тваринах проводили згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження», а також схвалені Комісією з біоетики ІМБГ НАН України.

Морфологічний аналіз тканини серця здійснювали із застосуванням забарвлення парафінових зрізів гематоксилін-еозином (ГЕ) та за пікрофуксином за ван Гізоном.

Виділення тотальної РНК, синтез кДНК, полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі проводили за стандартними методами [16]. Для аналізу змін рівнів експресії генів із тканини ізолюваного міокарда без передсердь виділяли тотальну РНК із застосуванням UltraClean® Tissue & Cells RNA Isolation Kit (MO BIO, USA) згідно з рекомендаціями виробника. Тотальну РНК обробляли ДНКазою I та використовували для синтезу кДНК із застосуванням First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA) відповідно до рекомендацій виробника. Полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі проводили з використанням суміші Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR MasterMix (Thermo Scientific, USA) на приладі iCycler single-color real-time PCR detection system (IQ5, BioRad, USA). Аналізували зміни рівня експресії гіпертрофічних, або фетальних, генів *Anp* і *Vnp*; та генів, залучених до канонічного Wnt-сигналіngu: *Axin2* та *c-Myc* [17].

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

Сумарний білок виділяли за методикою [18] та розділяли за допомогою електрофорезу в 10 % поліакриламідному гелі за наявності 0,1 %-го додецилсульфату натрію за методом Лемлі [19]. Для оцінки активності канонічного Wnt-сигналіngu аналізували зміни вмісту фосфо-GSK3 β (фосфорильованої за серином 9 (Ser9)). Використовували комерційні специфічні поліклональні антитіла проти фосфорильованої форми GSK3 β (pGSK3; 1:1000, 8566, Cell Signaling, USA) та проти тотальної GSK3 β (GSK3; 1:1000, 5676, Cell Signaling, USA). Кількість досліджуваних білків представлено у відносних одиницях, які визначали як відношення вмісту фосфорильованого білка до сумарного білка на тій самій доріжці гелю.

Статистичний аналіз проводили за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) із post hoc тестом Холма – Сідака. Дані на рисунках представлені у вигляді середнього $\pm$ стандартне відхилення. Статистичний аналіз даних виконували за допомогою програми GraphPad Prism7.

Результати дослідження та їх обговорення. Адаптація серця до фізичних навантажень та хронічної гіпертензії відрізняються на молекулярному рівні. Відомо, що різні сигнально-регуляторні шляхи активуються при цих перебудовах [20]. Раніше показано, що у дослідних мишей при інфузії гіпертрофічних стимулів відбувається активація канонічного Wnt-сигналіngu, але у ранні терміни – на третю добу експерименту [13]. Ми зосередились на аналізі активності канонічного Wnt-сигналіngu при формуванні атлетичного міокарда, тобто при його адаптації до фізичних навантажень. Аналізували тварин, що тренувалися протягом 1 тижня та 1 місяця, і порівнювали їх із тими, що не тренувалися. Виявлено зростання індексу співвідношення маси серця і маси тіла (МС/МТ) у тварин як через 1 тиждень, так і через 1 місяць фізичних навантажень (рис. 1, а). Однак підвищення індексу МС/МТ було достовірним порівняно з контролем лише для тварин, що тренувалися 1 місяць (рис.1, а). Це свідчить про збільшення маси серця та його адаптацію до тренувань і формування так званого атлетичного міокарда.

Рис.1. Аналіз індексу співвідношення маси серця і маси тіла у контрольних тварин, що не тренувалися, тварин, що тренувалися 1 тиждень, і тварин, що тренувалися 1 місяць (кількість тварин у групах: контроль – 11; 1 тиждень – 4; 1 місяць – 12; * – $p < 0,05$) (а) та морфологічний аналіз зрізів тканини міокарда тварин, що отримували фізичне навантаження 1 тиждень і 1 місяць, порівняно з контрольними тваринами (забарвлення гематоксилін-еозином і пікрофуксином за ван Гізоном; контроль – тварини, що не тренувалися; 1 тиждень – тварини, що тренувалися 1 тиждень; 1 місяць – тварини, що тренувалися 1 місяць) (б).

Морфологічний аналіз зразків тканини міокарда тварин дослідних і контрольної груп також не виявив патологічних змін (рис. 1, б). Так при аналізі парафінових зрізів тканин сердець, забарвлених гематоксилін-еозином та пікрофуксином за ван Гізоном, ми не виявили фіброзу чи інших порушень структури міокарда у тварин дослідних груп. Це спостереження також свідчить про відсутність патологічних перебудов тканини серця при тривалому фізичному навантаженні.

Аналіз експресії гіпертрофічних генів виявив зниження, а саме *Anp* та *Vnp*, вже через тиждень тренувань, однак лише зменшення експресії гена *Vnp* було статистично значимим порівняно з контролем (рис. 2). Через місяць тренувань цей показник не відрізнявся від показника у контрольних тварин (рис. 2). Це свідчить про відсутність патологічних змін у тварин після 1 місяця тренувань.

Рис. 2. Аналіз зміни рівня експресії гіпертрофічних генів (*Anp* та *Bnp*) у серцях контрольних тварин, що не тренувались, тварин, що тренувались 1 тиждень, і тварин, що тренувались 1 місяць. Дані експресії мРНК представлені як відносна зміна рівня порівняно з контролем. Кількість тварин у кожній групі $n \geq 4$; * – $p < 0,05$.

Далі ми проаналізували активність канонічного Wnt-сигналіngu в дослідних і контрольних мишей. Підвищення рівня експресії гену *Axin2* у тварин дослідної групи, що тренувались 1 тиждень, свідчить про активацію канонічного Wnt-сигналіngu, тоді як при тривалому фізичному навантаженні активації цього сигналіngu не спостерігали (рис. 3).

Рис. 3. Аналіз зміни рівня експресії генів-мішеней β -катеніну в серцях тварин, у серцях контрольних тварин, що не тренувались, тварин, що тренувались 1 тиждень, і тварин, що тренувались 1 місяць. Дані експресії мРНК представлені як відносна зміна рівня порівняно з контролем. Кількість тварин у кожній групі $n \geq 4$; * – $p < 0,05$.

Результати Western-blot-аналізу узгоджуються із даними ПЛР у реальному часі. Показано підвищення вмісту фосфорильованої GSK3 β саме в лізатах сердець тварин, що тренувались 1 тиждень (рис. 4). Відомо, що GSK3 β є одним із компонентів деградувального комплексу β -катеніну, і фосфорилування цієї кінази за серином 9 спричиняє вивільнення β -катеніну із деградувального комплексу із подальшою його ядерною транслокацією і транскрипційною активністю [20]. Тож наші дані свідчать про підвищення транскрипційної активності β -катеніну на початкових стадіях формування атлетичного міокарда, оскільки у лізатах сердець тварин, що тренувались 1 місяць, ми не спостерігали підвищення вмісту фосфорильованої форми GSK3 β (рис. 4).

Отримані дані узгоджуються із результатами попередніх досліджень, де при інфузії гіпертрофічних стимулів тваринам показано, що активація канонічного Wnt-сигналіngu при адаптації міокарда до хронічної гіпертензії є необхідною умовою, але відбувається вона на ранніх стадіях адаптації [21]. Вочевидь, при подальшому моделюванні атлетичного міокарда сигнальна функція β -катеніну репресується за участі негативного «фідбеку» чи інших сигнально-регуляторних механізмів, які контролюють або взаємодіють із Wnt-сигналіngом [22]. Справді, одним із генів-мішеней β -катеніну є ген

Axin 2, що є важливим компонентом деградувального комплексу останнього, і підвищення рівня експресії якого ми спостерігали (див. рис. 3). Із одного боку, це свідчить про існування внутрішньоклітинного контролю активності Wnt-сигналіngu, а з іншого – наші дані свідчать про критичне значення канонічного Wnt-сигналіngu та β -катеніну зокрема як при патологічній, так і при фізіологічній гіпертрофії (атлетичний міокард), що також узгоджується із даними проведеного раніше метааналізу [14].

Рис. 4. Короткотривале плавання призводить до зростання вмісту фосфорильованої GSK3 β . *a* – Western-blot-аналіз вмісту фосфорильованої і тотальної GSK3 β у лізатах сердець контрольних тварин, що не тренувались, тварин, що тренувались 1 тиждень, і тварин, що тренувались 1 місяць; *б* – денситограма вмісту фосфорильованої GSK3 β у лізатах сердець контрольних тварин, що не тренувались, тварин, що тренувались 1 тиждень, і тварин, що тренувались 1 місяць нормалізована відносно тотальної GSK3 β . Кількість тварин у кожній групі $n \geq 4$; * – $p < 0,05$.

Висновки. При розвитку атлетичного міокарда відбувається активація канонічного Wnt-сигналіngu і β -катеніну зокрема, однак це подія рання і, вочевидь, необхідна лише на початкових стадіях.

Рекомендовано до друку комісією з біоетики

ПОСИЛАННЯ

1. Barry SP, Davidson SM, Townsend PA. Molecular regulation of cardiac hypertrophy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40(10): 2023-39.
2. Qu J, Zhou J, Yi XP, Dong B, Zheng H, Miller LM et al. Cardiac specific haploinsufficiency of beta-catenin attenuates cardiac hypertrophy but enhances fetal genes expression in response to aortic constriction. *Molecular Cell.* 2007; 43(3):319-26.
3. Baurand A, Zelarayan L, Betney R, Gehrke C, Dunger S, Noack C et al. β -catenin downregulation is required for adaptive cardiac remodeling anthonry. *Circulation Research.* 2007;100(9):1353-62.
4. Evangelista FS, Brum PC, Krieger JE. Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. *Braz J Med Biol Res.* 2003;36(12):1751-9.
5. Kontaridis MI, Geladari EV, Geladari CV. Pathways to Myocardial Hypertrophy. *Introduction to Translational Cardiovascular Research.* 2014;167-86.
6. Palchevska OL, Macewicz LL, Piven OO. A link between β -catenin and hypertrophy: evaluation and meta-analysis. *Biopolymers and Cell.* 2016;32(2):150-7.
7. Chen X, Shevtsov SP, Hsieh E, Cui L, Haq S, Aronovitz M et al. The β -catenin/t-cell factor/lymphocyte enhancer factor signaling pathway is required for normal and stress-induced cardiac hypertrophy. *Molecular and Cellular Biology.* 2006; 26(12):4462-73.
8. Duan J, Gherghe C, Liu D, Hamlett E, Srikantha L, Rodgers L et al. Wnt1/ β catenin injury response activates the epicardium and cardiac fibroblasts to promote cardiac repair. *EMBO Journal.* 2012;31(2):429-42.
9. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* M.: Mir; 1984. 425 p.
10. Sugden PH, Fuller SJ, Weiss SC, Clerk A. Glycogen synthase kinase 3 (gsk3) in the heart: a point of integration in hypertrophic signalling and a therapeutic

target, a critical analysis. *British Journal of Pharmacology*. 2008;1:137-53. **11.** Zelarayan LC, Noack C, Sekkali B, Kmecova J, Gehrke C, Renger A et al. β -Catenin downregulation attenuates ischemic cardiac remodeling through enhanced resident precursor cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(50):19762-7. **12.** Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacology & Therapeutics*. 2010; 128(1):191-227. **13.** Piven OO, Winata CL. The canonical way to make a heart: β -catenin and plakoglobin in heart development and remodeling. *Experimental Biology and Medicine*. 2017; 242(18):1735-45. **14.** Piven OO. Vazhlyvist syhnalnoi funktsii β -kateninu na pochatkovykh stadiakh rozvytku patolohichnoi hipertrofii dorosloho sertsia. *Visnyk Ukrainського Товариства Henetykiv i Seleksioneriv*. 2016; 14(1):44-51. **15.** 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. **16.** Oerlemans MI, Goumans J, van Middelaar B, Clevers H, Doevendans PA, Sluijter JP. Active wnt signaling in response to cardiac. *Basic Research in Cardiology*. 2010;105(5):631-41. **17.** Malekar P, Hagenmueller M, Anyanwu A, Buss S, Streit MR, Weiss CS et al. Wnt signaling is critical for maladaptive cardiac hypertrophy and accelerates myocardial remodeling. *Hypertension*. 2010;55(4):939-45. **18.** Barandon L, Couffignal T, Ezan J, Dufourcq P, Costet P, Alzieu P et al. Reduction of infarct size and prevention of cardiac rupture in transgenic mice overexpressing *frza*. *Circulation*. 2003;108(18):2282-9. **19.** Li J, Swope D, Raess N, Cheng L, Muller EJ, Radice GL. Cardiac tissue-restricted deletion of plakoglobin results in progressive cardiomyopathy and activation of β -catenin signaling. *Mol Cell Biol*. 2011;31(6):1134-44. **20.** Brade T, Manner J, Kuhl M. The role of Wnt signalling in cardiac development and tissue remodeling in the mature heart. *Cardiovasc. Res*. 2006;72(2):198-209. **21.** Filipovich A, Gehrke I, Poll-Wolbeck SJ, Kreuzer KA. Physiological inhibitors of wnt signaling. *European Journal of Haematology*. 2011;86(6):453-65. **22.** Hahn JY, Cho HJ, Bae JW, Yuk HS, Kim KI, Park KW et al. β -Catenin overexpression reduces myocardial infarct size through differential effects on cardiomyocytes and cardiac fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(41):30979-89.

Стаття надійшла до редколегії 28.08.2018

RESEARCH ARTICLE

Canonical Wnt-Signaling Activity During the Athletic Heart Formation

L.I. BORTNICHUK ¹, A.O. MYRONOVA ¹, D.S. AVRAMEYS ¹ V.V. BALATSKYI ²,
L.L. MACEWICZ ², O.O. PIVEN ²

¹ ESC "Institute of Biology and Medicine", Taras Shevchenko Kyiv National University, Kyiv, Ukraine

² Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

E-mail: o.o.piven@imbg.org.ua

Introduction. The heart is the organ which is formed in embryogenesis and has been working for all life. Widely known, that myocardium is able to adapt to many types of stress factors (physical and biological), these adaptations are supported by changes at the morphological, biochemical and molecular genetic levels. Heart remodeling is driven by many of signaling pathways and molecules. To understand the signaling pathway involvement in the regulation of adult heart remodeling is crucial for the heart biological development as well as for clinicians. One of such signaling mechanism is canonical Wnt or Wnt/ β -catenin signaling which is involved in cardiogenesis and adult heart remodeling. The requirements for canonical Wnt and β -catenin for heart hypertrophy are not fully understood and controversial. Many transgenic and knockout mice models were used for studying the canonical Wnt role in adult heart remodeling. Some authors suggested that canonical Wnt and β -catenin are not essential for the hypertrophic response; but others showed involvement of this signaling pathway in the heart hypertrophy. The function of canonical Wnt in the athletic heart formation is not clear and has not been analyzed yet.

Purpose. Here we have focused on the analysis of canonical Wnt signaling during adult heart adaptation to physical training. With mice model and molecular genetic methods (qPCR), we have analyzed heart adaptation (*Anp* and *Bnp* genes expression level).

Materials and methods. The activity of canonical Wnt was studied after 1 week and 1 month of training: *Axin2* and *c-Myc* genes expression as well as the level of phosphorylated GSK3 β protein were analyzed (with Western-blot using). In this work we have used a standard

swimming test for hypertrophic response induction. As a result of our experiment, we have registered the higher level of *Anp* and *Bnp* genes expression in mice hearts after 1 month of experiment that is remarkable for the heart hypertrophy.

Results. It is interesting that hypertrophic genes were expressed at the lower level after 1 week of training as compared with the control group and 1 month of exercises. The analysis of HW/BW index in the connection with these data has supported the hypertrophy response in trained mice after one month. Thus, the obtained data have clearly indicated the heart hypertrophy development in mice after 1 month of swimming. On the other hand, the histological analysis (hematoxylin-eosin and Van Gison staining) of paraffin embedded transversional heart sections has not revealed any morphological malformations or/and heart tissue fibrosis in the trained heart after 1 week as well as 1 month of experiment. Thus, we can assume that in our model we have developed the physiological hypertrophy in mice. For recovering of canonical Wnt involvement in the heart adaptation we have analyzed the level of β -catenin target genes expression with qPCR usage. Also we have checked the level of total and phosphorylated GSK3 β protein - the main component of β -catenin degradation complex. We have found out the increase of *Axin2* gene expression after 1 week and the decrease after 1 month of training. The higher level of phosphorylated GSK3 β protein after 1 week of experiment also suggested the canonical Wnt signaling activation in hearts after 1 week of exercises and the downregulation after 1 month of training. It is known that higher level of phosphorylated GSK3 β is correlated with the activated β -catenin level.

Conclusions. Thus, our data demonstrated that canonical Wnt is required on early stages of heart remodeling. We can suppose that canonical Wnt signaling was downregulated later, after hypertrophic genetic program activation via negative feedback signaling in cells.

Key words: β -catenin, hypertrophy, Wnt signaling, athletic myocardium adaptation.