

Ocena szlaku Wnt/ β -katenina w sercach szczurów w różnych modelach nadciśnienia tętniczego



Lek. Maryla Anna Młynarczyk

Rozprawa doktorska
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu

Dyscyplina: nauki medyczne

Promotor: Prof. dr hab. Irena Kasacka

Zakład Histologii i Cytofizjologii
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
Wydział Farmaceutyczny

Rozprawa doktorska została zrealizowana w ramach kształcenia w Szkole Doktorskiej
UMB

Białystok 2024

Evaluation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in the hearts of hypertensive rats of various etiologies



Maryla Anna Młynarczyk, M.D.

Field of medical and health sciences
Scientific discipline: medical sciences

Supervisor: Professor Irena Kasacka

Department of Histology and Cytophysiology
Medical University of Białystok
Division of Laboratory Medicine

The doctoral thesis was carried out as a part of education at the Doctoral School of
MUB

Białystok 2024

Spis treści

Rozdział 1. Życiorys	5
Rozdział 2. Zestawienie publikacji doktoranta	7
Rozdział 3. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską	11
Rozdział 4. Rozprawa Doktorska	12
4.1. Wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń	12
4.2. Wstęp	13
4.2.1. Definicja nadciśnienia tętniczego.....	13
4.2.2. Etiologia i patogenezą nadciśnienia tętniczego.....	14
4.2.3. Modele zwierzęce badania nadciśnienia tętniczego	15
4.2.4. Mięsień sercowy a nadciśnienie tętnicze	16
4.2.5. Odkrycie szlaku Wnt oraz jego funkcjonowanie w stanie fizjologii i patologii organizmu.....	17
4.2.6. Funkcjonowanie szlaku Wnt w mięśniu sercowym	18
4.2.7. Związek funkcjonowania szlaku Wnt z nadciśnieniem tętniczym.....	19
4.3. Omówienie prac składających się na rozprawę doktorską.....	21
4.3.1. Cel pracy	21
4.3.2. Materiał i metody	22
4.3.2.1. Zwierzęta doświadczalne	22
4.3.2.2. Pomiar ciśnienia krwi metodą pośrednią u szczura czuwającego	22
4.3.2.3. Badania histologiczne	23
4.3.2.4. Ocena stopnia intensywności reakcji immunohistochemicznej.....	25
4.3.2.5. Izolacja RNA	25
4.3.2.6. Analiza statystyczna wyników.....	26

4.3.3. Wyniki.....	27
4.3.3.1. Wyniki zastosowanych barwień immunohistochemicznych	27
4.3.3.2. Wyniki badań morfometrycznych	32
4.3.3.3. Ocena ekspresji genów metodą Real Time PCR	32
4.3.4. Wnioski	34
Rozdział 5. Publikacje stanowiące rozprawę doktorską.....	35
5.1. Publikacja I	35
5.2. Publikacja II	43
Rozdział 6. Streszczenie w języku polskim.....	54
Rozdział 7. Streszczenie w języku angielskim	57
Rozdział 8. Piśmiennictwo	59
Rozdział 9. Oświadczenia współautorów publikacji	64
Rozdział 10. Zgoda Komisji Bioetycznej	69

Rozdział 1. Życiorys

Dane osobowe:

Imię i nazwisko: Maryla Anna Młynarczyk

Data i miejsce urodzenia: 04.09.1994r., Biała Podlaska

Adres email: mromaniuk2121@gmail.com

Wykształcenie:

2021 do chwili obecnej – szkolenie specjalizacyjne z Okulistyki w Klinice Okulistyki, Uniwersytecki Szpital Kliniczny w Białymstoku

2020-2024 r. – nauka w Szkole Doktorskiej, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

2020-2021 r. – staż podyplomowy, Uniwersytecki Szpital Kliniczny w Białymstoku

2014-2020 r. – studia na Kierunku Lekarskim, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Doświadczenie i aktywność zawodowa:

- Kierownik projektów badawczych
 1. Ocena szlaku Wnt/ β -katenina w sercach szczurów w różnych modelach nadciśnienia tętniczego, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, nr projektu SUB/1/DN/22/001/2232; B.SUB.23.146
- 2019r. - Staż w Oddziale Okulistyki Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego w Białej Podlaskiej

Praca w kołach naukowych:

- 2016-2020 członek koła naukowego przy Zakładzie Histologii i Cytofizjologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
- 2018-2020 członek koła naukowego przy Klinice Okulistyki Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
- 2017-2020 członek koła naukowego przy Klinice Gastroenterologii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

- 2014-2019 członek koła naukowego przy Klinice Onkologii i Hematologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
- 2014-2015 członek koła naukowego przy Zakładzie Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Nagrody:

- 2018/19, 2019/20 - Stypendium Naukowe Rektora dla najlepszych studentów Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Dodatkowe aktywności:

- Członek jury sesji Case Reports VI podczas 16th BIMC, Białystok International Medical Congress for Young Scientists, Białystok, Poland, 6th-7th of May 2022.

Rozdział 2. Zestawienie publikacji doktoranta

Publikacje z pierwszym autorstwem:

- **Młynarczyk M**, Domian N, Kasacka I.: Evaluation of the canonical Wnt signaling pathway in the hearts of hypertensive rats of various etiologies. 2024, *International Journal of Molecular Sciences*, **IF=4.900 MEiN=140.000**
- **Młynarczyk M**, Kasacka I.: The role of the Wnt / β -catenin pathway and the functioning of the heart in arterial hypertension - a review. 2022, *Advances in Medical Sciences*, **IF=2.700 MEiN=100.000**
- **Młynarczyk M**, Falkowska M, Micun Z, Obuchowska I, Kochanowicz J, Socha K, Konopińska J.: Diet, oxidative stress, and blood serum nutrients in various types of glaucoma: a systematic review. 2022, *Nutrients*, **IF=5.900 MEiN=140.000**

Publikacje jako współautor:

- Smreczańska M, Domian N, **Młynarczyk M**, Pędzińska-Betiuk A, Kasacka I.: Evaluation of the expression and localization of the multifunctional protein CacyBP/SIP and elements of the MAPK signaling pathway in the adrenal glands of rats with primary and secondary hypertension. 2024, *International Journal of Molecular Sciences*, **IF=4.900 MEiN=140.000**
- Zawadzka I, **Młynarczyk M**, Falkowska M, Socha K, Konopińska J.: Dietary patterns; serum concentrations of selenium, copper, and zinc; copper/zinc ratio; and total antioxidant status in patients with glaucoma. 2024, *Plos ONE*, **IF=2.900 MEiN=100.000**
- Obuchowska I, Micun Z, **Młynarczyk M**, Dmuchowska , Konopińska J.: Pros and cons of immediate sequential bilateral cataract surgery from a patient perspective: a survey. 2023, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **MEiN=20.000**
- Falkowska M, **Młynarczyk M**, Micun Z, Konopińska J, Socha K.: Influence of diet, dietary products and vitamins on age-related cataract incidence: a systematic review. 2023, *Nutrients*, **IF=4.800 MEiN=140.000**
- Wasielica-Berger J, Gugnacki P, **Młynarczyk M**, Rogalski P, Świdnicka-Siergiejko A, Antonowicz S, Krzyżak M, Maślach D, Dąbrowski A, Daniluk J.: Comparative effectiveness of various eradication regimens for *Helicobacter*

pylori infection in the northeastern region of Poland. 2022, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **MEiN=20.000**

- Micun Z, Falkowska M, **Młynarczyk M**, Kochanowicz J, Socha K, Konopińska J.: Levels of trace elements in the lens, aqueous humour, and plasma of cataractous patients - a narrative review. 2022, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **MEiN=20.000**
- Konopińska J, **Młynarczyk M**, Dmuchowska D, Obuchowska I.: Posterior capsule opacification: a review of experimental studies. 2021, *Journal of Clinical Medicine*, **IF=4.964 MEiN=140.000**

Streszczenia zjazdowe:

- 2022r. – “Changes of Galectin-3 expression and immunoreactivity in hearts of the rats in various types of arterial hypertension”. **Młynarczyk M.**, Kasacka I. 16th BIMC, Białystok International Medical Congress for Young Scientists, Białystok, Poland, 6th-7th of May 2022.
- 2022r. – “Zaburzenia kanonicznego szlaku sygnałowego Wnt w nerkach szczórow w patogenezie nadciśnienia”. Kasacka I, Domian N, Acewicz M, **Młynarczyk M.** 54. Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików pt. Gdzie jesteśmy? Dokąd zmierzamy? Techniki histochemiczne i cytochemiczne w ujęciu ponadczasowym, Bydgoszcz.
- 2019r. - „Evaluation of immunoreactivity and expression of LMP7-20S proteasome subunit in BPH depending on prostate volume”. **Młynarczyk G, Romaniuk (Młynarczyk) M,** Niezgoda M, Kudelski J, Kasacka I, Darewicz B. 49TH Scientific Congress of the Polish Urological Association
- 2019r. – “The effectiveness of the 10 days treatment of Helicobacter pylori in Podlaskie Voivodship”. Makarewicz P, Tokarewicz A, **Romaniuk (Młynarczyk) M,** Gugnacki P, Daniluk J, Wasielica-Berger J. 57th Polish and 15th International edition of Juvenes Pro Medicina, Łódź, 24-25 May 2019
- 2019r. – „Ile wiemy o przeszczepach komórek macierzystych?”. **Romaniuk (Młynarczyk) M.** I Białostocka Studencka Konferencja Pediatryczna "Pediatryka po Studencku". Białystok 13.04.2019r.
- 2019r. – „Awareness of stem cell transplants and childhood cancers among students of medical faculties”. Wójciak A, Oleksiuk M, **Romaniuk**

(Młynarczyk) M, Sawicka-Żukowska M. OSSC: Oncological Student Scientific Conference. Gdańsk, Poland. 29-30 March 2019.

- 2019r. – “Changes of 20S proteasome subunit expression and immunoreactivity in patients with Benign prostatic hyperplasia”. **Romaniuk (Młynarczyk) M**, Niezgoda M, Kasacka I, Młynarczyk G. SU International Student Conference 2019. "Health and Social Sciences". Riga, Latvia. 4-5April 2019.
- 2019r. – “Comparison of the locally efficacy of 10-days bismuth quadruple therapy and triple therapy in eradication of helicobacter pylori”. Gugnacki P, **Romaniuk (Młynarczyk) M**, Tokarewicz , Makarewicz P. RSU International Student Conference 2019. "Health and Social Sciences". Riga, Latvia. 4-5April 2019.
- 2019r. – „Knowledge about childhood cancer and stem cell transplants among medicine and dentistry students”. Oleksiuk M, **Romaniuk (Młynarczyk) M**, Wójciak A, Sawicka-Żukowska M. RSU International Student Conference 2019. "Health and Social Sciences". Riga, Latvia. 4-5April 2019.
- 2019r. – “Rare myeloid neoplasm present as tumor of testis: case report”. Gugnacki P, **Romaniuk (Młynarczyk) M**, Młynarczyk G. RSU International Student Conference 2019. "Health and Social Sciences". Riga, Latvia. 4-5April 2019.
- 2018r. – „Assessment of the 10 days eradication of Helicobacter Pylori in Podlaskie Voivodeship”. **Romaniuk (Młynarczyk) M**, Gugnacki P, Makarewicz P, Tokarewicz A. 13th BIMC Bialystok International Medical Congress for Young Scientists, Bialystok, Poland, 17-19th May 2018.
- 2018r. – “Knowledge about childhood cancer and stem cell transplants among students of medical faculties”. Wójciak A, **Romaniuk (Młynarczyk) M**, Oleksiuk M. 13th BIMC Bialystok International Medical Congress for Young Scientists, Bialystok, Poland, 17-19th May 2018.
- 2018r. – “Rare urological neoplasm - testicular adult granulosa cell tumor - case report”. Gugnacki P, **Romaniuk (Młynarczyk) M**, Młynarczyk G. 5th Lublin International Medical Congress for Students and Young Doctors. Lublin 30thNovember - 1st December 2018.
- 2018r. – “Ocena immunoreaktywności i ekspresji podjednostek 20s proteasomu w łagodnym rozroście stercza”. **Romaniuk (Młynarczyk) M**, Niezgoda M,

Młynarczyk G, Kasacka I. 9 Konferencja "Postępy w Badaniach Biomedycznych", Warszawa, 01-02.12.2018.

- 2017r. – „The use of Erythropoietin in the treatment of anaemia in infants - experiences of the Department of Paediatric Oncology and Haematology in Białystok”. **Romaniuk (Młynarczyk) M**, Wójciak A, Oleksiuk M. 12th BIMC Białystok International Medical Congress for Young Scientists, Białystok, Poland, 20-22nd April 2017.
- 2015r. – “Histological structure of lungs in a European bison - preliminary study”. Gugnacki P, Zuzda K, **Romaniuk (Młynarczyk) M**. 10th BIMC Białystok International Medical Congress for Young Scientists, Białystok, May 14-16th 2015.

ZESTAWIENIE PUBLIKACJI

Rodzaj publikacji	Liczba	Impact Factor	Punktacja MEiN
Prace włączone do rozprawy doktorskiej	2	7,6	240
Prace niewłączone do rozprawy doktorskiej	8	23,464	720
Streszczenia zjazdowe	16	-	-
Razem	26	31,064	960

Rozdział 3. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską

Publikacja I – praca przeglądowa

Młynarczyk M, Kasacka I. The role of the Wnt/ β -catenin pathway and the functioning of the heart in arterial hypertension - A review. *Adv Med Sci.* 2022 Mar;67(1):87-94. doi: 10.1016/j.advms.2022.01.001. Epub 2022 Jan 28. PMID: 35101653. **IF=2.700**
MEiN=100.000

Publikacja II – praca oryginalna

Młynarczyk M, Domian N, Kasacka I. Evaluation of the canonical Wnt signaling pathway in the hearts of hypertensive rats of various etiologies. 2024, *International Journal of Molecular Sciences*, **IF=4.900** **MEiN=140.000**

Rozdział 4. Rozprawa Doktorska

4.1. Wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń

NT	Nadciśnienie tętnicze
PTNT	Polskie Towarzystwo Nadciśnienia Tętniczego
SBP	Ciśnienie skurczowe (<i>ang. Systolic blood pressure</i>)
DBP	Ciśnienie rozkurczowe (<i>ang. Diastolic blood pressure</i>)
mmHg	Milimetr słupa rtęci
SHR	Szczury ze spontanicznym nadciśnieniem (<i>ang. spontaneously hypertensive rats</i>)
DOCA	Octan deoksykortykosteronu
WKY	Szczury Wistar Kyoto, kontrola do SHR
UNX,	Szczury poddane jednostronnej nefrektomii (<i>ang. uninephrectomised rats</i>)
DMF	Dimetyloformamid (<i>ang. dimethylformamide</i>)
NaCl	Chlorek sodu (<i>ang. sodium chloride</i>)
NO	Tlenek azotu (<i>ang. nitric oxide</i>)
Wg	Wingless
TCF	T-cell factor
APC	Adenomatous polyposis coli
CK1	Casein kinase1
GSK-3 β	Glycogen synthase kinase 3 β
Fzd	Frizzled
LRP	Low density lipoprotein receptor related protein
Gro/TLE	Groucho/Transducing-Like Enhancer
PCR	Reakcja łańcuchowa polimerazy (<i>ang. polymerase chain reaction</i>)
GAPDH	Gen referencyjny - glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
RAA/RAAS	Układ renina-angiotensyna-aldosteron
VSMC	Vascular smooth muscle cell
LMP7	Large Multifunctional Protease 7
CacyBP/SIP	Calcyclin-Binding Protein and Siah-1 Interacting Protein
β -MHCs	Łańcuchy ciężkie β -miozyny (<i>ang. β-Myosin heavy chains</i>)
SE	Błąd standardowy (<i>ang. standard error</i>)

4.2. Wstęp

4.2.1. Definicja nadciśnienia tętniczego

Na przestrzeni lat rozwój cywilizacyjny oraz naukowy pozwolił na wyeliminowanie wielu groźnych schorzeń. Niestety, intensywne przemiany demograficzne i środowiskowe pociągają za sobą w konsekwencji rozprzestrzenianie na ogromną skalę wielu chorób cywilizacyjnych. Ich zasięg obejmuje ogólnoswiatową populację oraz szacuje się, że odpowiadają za około 80% zgonów na świecie. Te niezakaźne schorzenia, o charakterze przewlekłym, są jak dotąd niemożliwe do wyeliminowania. Pomimo starań niezliczonych zespołów badawczych oraz prowadzonych badań nad etiologią oraz potencjalnymi metodami leczenia, choroby cywilizacyjne oraz ich powikłania stanowią poważny problem obecnych czasów.

Nadciśnienie tętnicze (NT) jest jedną z najczęściej występujących chorób w populacji ogólnoswiatowej. Jest najistotniejszym modyfikowalnym czynnikiem ryzyka występowania chorób układu krążenia oraz główną przyczyną przedwczesnych zgonów na świecie. Choroba nadciśnieniowa rozwija się powoli i skrycie, przez długi czas nie dając odczuwalnych objawów, dlatego bywa nazywana „cichym zabójcą”. Powikłania długotrwałych efektów nieleczzonego nadciśnienia, jakimi są przede wszystkim incydenty sercowo-naczyniowe czy niewydolność narządowa, stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia i życia [1-4]. Nadciśnienie tętnicze jest skutkiem działania wielu czynników biologicznych. Najczęściej czynniki patogenne NT są pochodzenia nerkowego, nerwowego, humoralnego, a także biofizycznego [5]. Nadciśnienie tętnicze rozpoznaje się w sytuacji, kiedy w dwóch gabinetowych pomiarach ciśnienia tętniczego krwi, podczas dwóch oddzielnych wizyt uzyskuje się przekroczenie wartości prawidłowych. Według współczesnych wytycznych Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego (PTNT) leczenie hipotensyjne zaleca się, gdy średnie wartości ciśnienia tętniczego skurczowego (SBP, systolic blood pressure) są równe lub wyższe niż 140 mmHg (milimetry słupa rtęci) i/lub 90 mmHg dla ciśnienia rozkurczowego (DBP, diastolic blood pressure) [4]. Takie same wartości rozpoznania nadciśnienia tętniczego zalecają wytyczne amerykańskie i europejskie. Dane PTNT wskazują, że NT występuje u ok. 30% dorosłej populacji Polaków. Rozpowszechnienie nadciśnienia tętniczego na całym świecie oszacowano na 1,13 miliarda w 2015 roku, przy ponad 150 milionach

przypadków w Europie Środkowej i Wschodniej oraz prognozuje się dalszy wzrost liczby zachorowań [6].

4.2.2. Etiologia i patogeneza nadciśnienia tętniczego

Wciąż aktualna jest teoria mozaikowa nadciśnienia tętniczego sformułowana w 1949 roku przez Irvina Page'a, który jako pierwszy wskazał na wieloczynnikową, złożoną przyczynę tej jednostki chorobowej [7]. W połowie ubiegłego wieku odkryto wiele czynników wpływających na rozwój NT, takich jak peptydy natriuretyczne, angiotensyna, prostacyklina, tlenek azotu, endotelina i inne. Od tego czasu, dzięki osiągnięciom wielu dyscyplin klinicznych i nauk podstawowych dokonał się istotny postęp w zakresie wiedzy dotyczącej znaczenia genów, roli układu współczulnego, metabolizmu sodu czy procesów zapalnych w patogenezie nadciśnienia tętniczego [5].

Dynamiczne badania ostatnich dekad wskazały także na genetyczne podłoże NT, budowę ściany naczynia, aktywność biologiczną śródbłonna oraz udział wielu substancji i szlaków molekularnych, mających wpływ na rozwój nieprawidłowych wartości ciśnienia krwi [1-3]. Wykazano również wpływ czynników modyfikowalnych, wynikających z warunków środowiskowych i stylu życia, na przebieg choroby nadciśnieniowej [3]. Główne mechanizmy, uczestniczące w regulacji ciśnienia krwi to czynność skurczowo-rozkurczowa serca, które tłoczy krew do naczyń. Naczynia krwionośne, poprzez zmiany średnicy ich światła, wpływają na opór obwodowy. Intensywność filtracji kłębuszkowej zachodzącej w nerkach ma wpływ na objętość krążącej krwi, a tym samym na objętość minutową serca. Wiele substancji wytwarzanych w powyższych narządach, wpływa na regulację ciśnienia tętniczego, poprzez rozszerzanie lub skurcz naczyń. W stanie fizjologii związki te pozostają w równowadze.

U ponad 90% chorych, nadciśnienie tętnicze ma charakter pierwotny, którego bezpośrednia przyczyna pozostaje nieznana. Przyjmuje się, że rozwój tej postaci nadciśnienia tętniczego jest wynikiem nakładających się czynników dziedzicznych i środowiskowych, powodujących zaburzenie funkcjonowania układów regulujących ciśnienie krwi. Obciążenia genetyczne odgrywają decydującą rolę, natomiast pewne czynniki zewnętrzne mogą w znacznym stopniu przyczynić się do ujawnienia się choroby. Około 10% przypadków to nadciśnienie wtórne, towarzyszące różnym stanom chorobowym i zaburzeniom funkcjonowania organizmu, a jego przyczyna jest najczęściej odwracalna. Ma to miejsce w przebiegu takich chorób jak: zwężenie tętnicy nerkowej,

choroby nerek, pierwotny hiperaldosteronizm, zespół Cohna, zespół Cushinga i wiele innych [8].

4.2.3. Modele zwierzęce badania nadciśnienia tętniczego

Biorąc pod uwagę wieloczynnikową etiologię oraz różnorodność procesów zaangażowanych w rozwój nadciśnienia tętniczego i jego przebieg, w przeprowadzanych badaniach istotną rolę odgrywają zwierzęce modele eksperymentalne, w których czas uzyskania wyników jest relatywnie krótki, a warunki prowadzonych badań ściśle kontrolowane [9]. Z uwagi na całkowicie poznany genom oraz jego istotne podobieństwo z genomem ludzkim (około 99%), znaczna ilość badań eksperymentalnych prowadzona jest na szczurach [10].

Modelem odwzorowującym nadciśnienie pierwotne jest model SHR (spontaneously hypertensive rats) z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem systemowym [11]. Jest to najczęściej stosowany zwierzęcy model nadciśnienia samoistnego [12, 13]. Model SHR został stworzony poprzez skojarzenie szczura Wistar Kyoto o wysokim ciśnieniu tętniczym (>150 mmHg) z niespokrewnioną samicą o niepodwyższonym ciśnieniu. Następnie kojarzono męskie i żeńskie szczury z nadciśnieniem, pochodzące z jednego miotu, powtarzając proces do uzyskania szóstego pokolenia. W ten sposób wyselekcjonowano szczury SHR z wysokim ciśnieniem tętniczym [14]. Zwierzęta SHR są odpowiednim modelem do badań udziału określonych genów w chorobie nadciśnieniowej oraz związanych z nią powikłań. Identyfikacja genów odpowiedzialnych za nadciśnienie tętnicze u szczurów, może być wykorzystana do badania roli ludzkich genów ortologicznych, w złożonych chorobach sercowo-naczyniowych i metabolicznych oraz do identyfikacji nowych ścieżek i celów interwencji farmaceutycznych [15].

Model eksperymentalny nadciśnienia wtórnego, DOCA-salt (octan deoksykortykosteronu), polega na podaży 1% NaCl (chlorek sodu) w wodzie pitnej oraz podskórnym podaniu octanu deoksykortykosteronu, zwierzętom po jednostronnej nefrektomii. Mineralokortykoidy lub ich syntetyczne pochodne, w tym DOCA prowadzą do zatrzymania sodu i wody w organizmie [16]. W tym typie nadciśnienia wtórnego dochodzi do zwiększenia oporu naczyniowego, wzrostu napięcia ściany naczyniowej, zwężenia światła naczynia oraz hiperwolemii [17].

4.2.4. Mięsień sercowy a nadciśnienie tętnicze

Prawidłowe wartości ciśnienia tętniczego zapewniają odpowiedni przepływ krwi przez narządy organizmu, warunkując ich prawidłowe odżywienie i funkcjonowanie [18]. Nadciśnienie tętnicze powoduje zaburzenia homeostazy wielu narządów, zarówno poprzez zmiany mikronaczyniowe, jak i makronaczyniowe [19, 20]. Około 40% zgonów z przyczyn sercowo-naczyniowych powoduje choroba nadciśnieniowa. Nadciśnienie tętnicze powoduje przebudowę układu krążenia, modyfikacje te widoczne są głównie w sercu. Aby sprostać wymaganiom zmieniającego się organizmu (zwiększenie oporu obwodowego i powrotu żylnego), serce ulega przerostowi. Dzieje się to na skutek zwiększenia masy głównie lewej komory i przerostu kardiomiocytów. Badania doświadczalne wskazują na przerost również prawej komory serca, a także pogrubienie ściany aorty. Zmiany morfologiczne i czynnościowe w układzie naczyniowo-sercowym (zmniejszenie średnicy światła i wzrost zmienności rytmu serca) mogą być korzystne w krótkim czasie, ale przyczyniają się do pogłębiania zmian oraz stanu, w którym powikłania nadciśnienia stają się nieodwracalne. Pacjenci chorujący na NT są wielokrotnie bardziej narażeni na niewydolność serca niż ci, którzy mają unormowane ciśnienie krwi [19, 21]. Ponadto, nadciśnienie tętnicze uznawane jest za odwracalną przyczynę migotania przedsionków [22]. Jednym z najczęstszych i najwcześniej rozwijających się powikłań jest przerost kardiomiocytów (wzrost pola powierzchni przekroju poprzecznego komórek) i upośledzenie czynności lewej komory serca [19]. Na skutek utrzymującego się podwyższonego ciśnienia krwi, dochodzi do przeciążenia hemodynamicznego lewej komory serca, a w konsekwencji jej kompensacyjnej przebudowy. Dochodzi do przerostu koncentrycznego kardiomiocytów, co prowadzi do wzrostu grubości ściany i masy lewej komory [23]. Zmiany te prowadzą do zaburzeń funkcjonowania mięśnia sercowego i jego niewydolności oraz zwiększają ryzyko zdarzeń sercowo – naczyniowych, a w konsekwencji śmiertelności [24]. W stanie podwyższonego ciśnienia tętniczego śródbłonek jest stale aktywowany do wydzielania czynników prozapalnych oraz prozakrzepowych. Zaburzone jest jednocześnie wydzielanie tlenku azotu (NO), który ma działanie wazodylatacyjne [19, 25]. Zwiększone wydzielanie aldosteronu i angiotensyny II w przebiegu nadciśnienia, sprzyja nasilonemu odkładaniu kolagenu w ścianie lewej komory oraz ścianie naczyń krwionośnych, co skutkuje ich włóknieniem. Zaburza to przepływ krwi przez zmienione patologicznie naczynia, co prowadzi do niedokrwienia narządów [26]. Dysfunkcja endotelium oraz nadmierne

wydzielanie angiotensyny II, przy niedoborze NO, powoduje aktywację płytek krwi, ich agregację, a w konsekwencji zwiększone ryzyko incydentów zakrzepowo – zatorowych [19].

4.2.5. Odkrycie szlaku Wnt oraz jego funkcjonowanie w stanie fizjologii i patologii organizmu

Szlak Wnt bierze udział w szerokim spektrum procesów fizjologicznych, jak i związanych ze stanami chorobowymi. Ścieżka sygnałowa Wnt opisana została po raz pierwszy na przełomie lat 70 i 80 ubiegłego wieku. Pierwszymi odkrytymi białkami szlaku Wnt były homologiczne cząstki Wg (wingless) oraz Int (MMTV integration site), od których pochodzi nazwa tego szlaku [27]. Ścieżka sygnałowa Wnt stanowi rozbudowany zbiór ligandów, receptorów oraz efektorów [28]. Białka Wnt w auto- i parakrynnym oddziaływaniu, wpływają na poziom aktywności czynników transkrypcyjnych oraz genów, odpowiedzialnych za metabolizm komórek, procesy adhezji czy różnicowania oraz ich wzrostu. Wyróżnia się dwie ścieżki sygnalizacyjne szlaku Wnt: klasyczną (kanoniczną), zależną od β -kateniny - regulującą ekspresję genów poprzez kompleks β -katenina/TCF (T-cell factor) oraz ścieżki nieklasyczne, działające niezależnie od β -kateniny oraz czynnika TCF – jak dotąd, słabiej poznane [27, 28]. Aktywacja klasycznego szlaku sygnałowego jest związana z poziomem β -kateniny zgromadzonej w cytoplazmie. Poziom cytoplazmatyczny β -kateniny jest fizjologicznie utrzymywany na niskim poziomie, poprzez ciągłą proteasomalną degradację zależną od ubikwityny [29]. Proces ten jest regulowany poprzez kompleks degradacyjny, do którego należą: białko gruczolakowatego polipa okrężnicy (APC, adenomatous polyposis coli), kinaza kazeinowa 1 (CK1, casein kinase1) oraz kinaza syntazy glikogenu 3β (GSK- 3β , glycogen synthase kinase 3β). β -katenina ulega fosforylacji przy udziale kinaz: GSK 3β i CK1, następnie zostaje zdegradowana przez kompleks 26S proteasomu [27]. Transdukcja sygnału rozpoczyna się od połączenia ligandów Wnt z receptorem Frizzled (Fzd), który współdziała z koreceptorem LRP (low density lipoprotein receptor related protein) odpowiedzialnym za auto- i parakrynnny mechanizm oddziaływania. Aktywacja receptora Fzd oraz przyłączenie koreceptora LRP hamuje, poprzez fosforylację, działanie kinazy 3β syntazy glikogenu (GSK 3β), co prowadzi do zahamowania aktywności kompleksu destrukcyjnego β -kateniny. Następuje wzrost poziomu β -kateniny w cytoplazmie komórki i jej translokacja do jądra komórkowego, gdzie poprzez

zwiększoną aktywność czynników transkrypcyjnych, indukuje ekspresję genów zależnych od Wnt [27]. Po wnikięciu do jądra komórkowego β -katenina zmienia rolę czynników TCF/LEF z represorów na aktywatory transkrypcji docelowych genów Wnt, poprzez odłączenie od nich korepresorów Gro/TLE (Groucho/Transducing-Like Enhancer). Następuje rekrutacja kompleksów przebudowy histonów i zmiany w strukturze chromatyny. Dzięki temu dochodzi do wzmożonej aktywności transkrypcyjnej w obszarach chromatyny [30]. Regulacja ujemnego sprzężenia zwrotnego pomiędzy składnikami szlaku Wnt/ β -katenina pozwala na utrzymanie ekspresji β -kateniny na odpowiednim poziomie [31]. Nieprawidłowości w sygnalizacji szlaku Wnt/ β -katenina, w tym zaburzenia ekspresji genów regulatorowych Wnt i ich mutacje wykrywane są w wielu chorobach organizmu. Niedobór czynników kompleksu degradacyjnego lub mutacje genów, kodujących β -kateninę, a w konsekwencji nadmierna aktywacja szlaku Wnt/ β -katenina, prowadzi do wzmożonej proliferacji komórek i rozwoju nowotworów [32]. Mutacje genów kodujących LPR5 (receptor lipoproteiny 5) i geny kodujące receptor Frizzled 4 są związane z występowaniem rodzinnej wtreoretinopatii wysiękowej, czy zmian naczyniowych w przebiegu retinopatii cukrzycowej [33, 34].

4.2.6. Funkcjonowanie szlaku Wnt w mięśniu sercowym

Wyniki badań ostatnich lat wskazują na udział szlaku Wnt/ β -katenina w embriogenezie oraz proliferacji komórek mięśnia sercowego. Stwierdzono pozytywną korelację między aktywacją szlaku, a procesem różnicowania komórek pluripotencjalnych w kierunku kardiomiocytów [35]. Szlak Wnt/ β -katenina jest zaangażowany w proces prawidłowego przebiegu miogenezy [36], jak również bierze udział w mechanizmach przebudowy kardiomiocytów w stanach patologii tego narządu [37]. Aktywacja szlaku Wnt, następująca po urazach serca, od ostrego niedokrwienia, do przewlekłego przeciążenia ciśnieniowego, może mieć związek z zapoczątkowaniem procesu przerostu komórek mięśnia sercowego. Hipertrofia kardiomiocytów i włóknienie mięśnia sercowego, mają związek z nadmierną syntezą β -kateniny oraz brakiem jej degradacji przez GSK-3 β . Jednocześnie zbyt duża aktywność kompleksu degradacyjnego, zaburza prawidłowy rozwój i wzrost kardiomiocytów [38]. Związana z nadmierną aktywacją szlaku klasycznego, zmiana morfologii kardiomiocytów, prowadzi do dysfunkcji skurczowej. Może być to bezpośrednią przyczyną zaburzeń

rytmu serca, w postaci migotania przedsionków [39]. Aktywność szlaku Wnt ulega zmianom wraz z wiekiem, co potwierdza badanie serc ludzkich, gdzie wykazano znaczny wzrost poziomu β -kateniny, CacyBP/SIP, galektyny-3 oraz LMP7 w sercach osób, powyżej 45 roku życia. Odnotowano również różnice w liczbie komórek mięśnia sercowego na 1 mm² oraz zwiększoną szerokość kardiomiocytów u osób powyżej 45 roku życia (Kasacka et al.) [40]. Udowodniono wpływ podwyższonego poziomu β -kateniny na przeżycie kardiomiocytów, ich apoptozę oraz proces włóknienia. Wysokiej ekspresji β -kateniny towarzyszy wzrost poziomu białek inicjujących apoptozę komórek oraz wzrost ekspresji markerów włóknienia, co zostało stwierdzone u szczurów z nadciśnieniem, przy jednoczesnym spadku ekspresji białek poprawiających przeżycie kardiomiocytów [41]. Związek poziomu jądrowej β -kateniny z hipertrofią kardiomiocytów w ludzkim sercu po zawale oraz szczurzych kardiomiocytach został wykazany w badaniach Lee et al., gdzie autorzy dowiedli, że wraz ze wzrostem poziomu jądrowego β -kateniny wzrasta poziom białek, biorących udział w procesie hipertrofii kardiomiocytów [42]. Wykazano również udział kanonicznej ścieżki sygnalizacyjnej Wnt w odbudowie serca po uszkodzeniu niedokrwienno-reperfuzyjnym. Zwiększona ekspresja Wnt1 i β -kateniny w epicardium i fibroblastach prowadzi do pobudzenia proliferacji fibroblastów w miejscu uszkodzenia. Autorzy udowodnili udział szlaku Wnt/ β -katenina w powyższych procesach, poprzez inhibicję β -kateniny, co spowodowało zahamowanie proliferacji fibroblastów w odpowiedzi na uszkodzenie [43].

4.2.7. Związek funkcjonowania szlaku Wnt z nadciśnieniem tętniczym

Przypuszcza się, że przerost mięśnia sercowego w stanach patologicznych jest wynikiem zaburzenia procesów adaptacyjnych i zwykle prowadzi do zmian w aparacie skurczowym. Przerostowi temu, często towarzyszy zwiększona ekspresja białek, niebiorących udziału w skurczu, co prowadzi do włóknienia mięśnia sercowego, a w konsekwencji do niewydolności serca [19].

W chorobie nadciśnieniowej wywołanej ogólnoustrojowym pobudzeniem układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS) potwierdzono indukcję ligandów Wnt i aktywację β -kateniny w kardiomiocytach i fibroblastach. β -katenina, poprzez indukcję hipertroficznym markerów łańcuchów ciężkich β -miozyny (β -MHC) i α -aktyniny, aktywuje czynniki transkrypcyjne c-Myc i Snail1 oraz stymuluje ekspresję białek, co ostatecznie prowadzi do przerostu kardiomiocytów i dysfunkcji serca [44].

U szczurów z nadciśnieniem pierwotnym SHR oraz nadciśnieniem indukowanym dietą wysokofruktozową, obserwowano obniżoną aktywność szlaku Wnt w stosunku do zwierząt normotensyjnych. Wykazano, że dokomorowy wlew Wnt3a do mózgu szczurów nadciśnieniowych powoduje hamowanie GSK-3 β , obniża ciśnienie tętnicze, zmniejsza tętno oraz zwiększa uwalnianie wazodylatacyjnego tlenu azotu [45]. Dysregulacja sygnalizacji szlaku Wnt może prowadzić do zaburzeń układu RAA, inicjując dysfunkcję nerek, a w konsekwencji prowadzić do zaburzeń ciśnienia tętniczego [46]. Wykazano, że infuzja angiotensyny II prowadzi do wzrostu ciśnienia skurczowego i zwiększenia ekspresji wielu genów szlaku Wnt. Natomiast zastosowanie inhibitora szlaku Wnt/ β -katenina powoduje obniżenie wartości ciśnienia tętniczego [47]. Badania z wykorzystaniem kardiomiocytów lewej komory, w zaawansowanym stadium jej włóknienia wykazały, obniżoną ekspresję β -kateniny we wstawkach hipertroficznym kardiomiocytów, szczurów z nadciśnieniem pierwotnym oraz zwiększoną akumulację β -kateniny, w jądrach tych komórek [48]. Z kolei w badaniach Kasacka et al. wykazano obniżenie ekspresji β -kateniny i zwiększoną ekspresję białka CacyBP/SIP oraz LMP7 (podjednostki proteasomu) w sercu szczurów z nadciśnieniem w porównaniu do zwierząt normotensyjnych. Białko CacyBP/SIP wpływa na proteasomalną degradację β -kateniny [49].

4.3. Omówienie prac składających się na rozprawę doktorską

4.3.1. Cel pracy

Nadciśnienie tętnicze jest złożoną jednostką chorobową, której etiologia nie została w pełni poznana. Utrzymanie homeostazy i prawidłowych wartości ciśnienia tętniczego ma wpływ na funkcjonowanie, nie tylko wybranych narządów, ale przede wszystkim organizmu jako całości. Głównym narządem, dotkniętym powikłaniami nadciśnienia tętniczego jest serce. Z przeprowadzonych dotychczas badań wynika, iż szlak sygnałowy Wnt/ β -katenina odgrywa kluczową rolę w rozwoju przerostu mięśnia sercowego, jego włóknienia oraz przebudowy komórek, a przez to niewydolności serca i innych procesów patofizjologicznych tego narządu. Nieprawidłowości w funkcjonowaniu narządów bezpośrednio odpowiedzialnych za regulację ciśnienia krwi mogą mieć związek z dysregulacją sygnalizacji szlaku Wnt/ β -katenina. Fenotypy nadciśnienia tętniczego u ludzi różnią się w zależności od typu nadciśnienia. W inny sposób rozwija się nadciśnienie genetycznie odziedziczone, w inny sposób neurogena nadciśnienia tętniczego związana, np. z dietą, lub wysoką zawartością soli.

Niewielu autorów porusza problematykę związku występowania nadciśnienia tętniczego z funkcjonowaniem szlaku sygnalizacyjnego Wnt/ β -katenina. Mając powyższe na uwadze, przeprowadzono badania, mające na celu ocenę głównych elementów szlaku Wnt/ β -katenina w sercu szczurów z nadciśnieniem o pierwotnej i wtórnej etiologii.

Cel pracy zrealizowano poprzez szczegółowe zadania badawcze:

1. Immunohistochemiczna detekcja receptora Fzd8, ligandu Wnt1, kinazy kompleksu degradacyjnego - GSK-3 β oraz β -kateniny w sercach szczurów z nadciśnieniem tętniczym pierwotnym (SHR) i wtórnym DOCA-salt, oraz odpowiadającym im grupom kontrolnym.
2. Ocena porównawcza immunoreaktywności Fzd8, Wnt1, GSK-3 β i β -kateniny w sercach zwierząt z nadciśnieniem pierwotnym i wtórnym oraz szczurów normotensyjnych.
3. Ocena ekspresji genów Fzd8, WNT1, GSK-3 β i CTNNB1 u szczurów z nadciśnieniem pierwotnym i wtórnym oraz kontrolnych zwierząt normotensyjnych.

4.3.2. Materiał i metody

Procedury przeprowadzone na zwierzętach eksperymentalnych zostały zatwierdzone przez Lokalną Komisję Etyczną ds. Badań na zwierzętach w Olsztynie. Materiał biologiczny stanowiła tkanka lewej komory serca, pobrana od szczurów pochodzących z Zakładu Fizjologii i Patofizjologii Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (Uchwała nr 73/2015).

4.3.2.1. Zwierzęta doświadczalne

6-tygodniowe zwierzęta, o masie początkowej 170-200g przebywały w warunkach stałej wilgotności ($60\pm 5\%$) oraz temperatury ($22 \pm 1^\circ\text{C}$). Utrzymywano cykl 12/12 godzin światło/ciemność. Szczury miały swobodny dostęp do standardowej granulowanej karmy i wody pitnej. Badania przeprowadzono na 24 samcach szczurzych: SHR – 7 szczurów z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem układowym, szczep wsoalny wyhodowany ze szczurów rasy Wistar wyselekcjonowanych pod kątem wysokiego ciśnienia krwi

WKY – 5 normotensyjnych szczurów Wistar Kyoto, jako kontrola dla szczurów SHR

DOCA-salt — 7 szczurów rasy Wistar, poddanych jednostronnej nefrektomii, z następnie indukowanym nadciśnieniem wtórnym

UNX – 5 szczurów Wistar poddanych jednostronnej nefrektomii, jest punktem odniesienia dla szczurów z nadciśnieniem DOCA

DOCA-salt – zwierzęta znieczulano przez dootrzewnowe wstrzyknięcie pentobarbitalu sodu ($300 \mu\text{mol}$ lub $\sim 70 \text{ mg/kg}$ masy ciała (m.c.)). Prawą nerkę usunięto przez prawe boczne nacięcie brzuszne. Po tygodniowym okresie rekonwalescencji nadciśnienie indukowano przez okres 4 tygodni przez s.c. iniekcje DOCA ($67 \mu\text{mol}$ lub $\sim 25 \text{ mg/kg}$ w $0,4 \text{ ml/kg}$ dimetyloformamidu; DMF) dwa razy w tygodniu i zastąpienie wody pitnej 1% roztworem chlorku sodu NaCl. Pięć szczurów kontrolnych (UNX) z prawidłowym ciśnieniem tętniczym, również pozbawiono nerki, i dwa razy w tygodniu otrzymywały nośnik (DMF, $0,4 \text{ ml/kg}$, podskórnie) piły wodą bieżącą.

4.3.2.2. Pomiar ciśnienia krwi metodą pośrednią u szczura czuwającego

Po 6 tygodniach hodowli dokonano pomiarów ciśnienia skurczowego metodą nieinwazyjną z użyciem mankietu na ogon (monitor ciśnienia krwi na ogonie szczura, Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Niemcy). Pomiar

uznano za miarodajne, jeżeli 3 kolejne próby nie różniły się o więcej niż 5 mmHg, następnie wyliczono średnią. Weryfikowano, czy u zwierząt SHR i DOCA-salt występuje nadciśnienie (wartości SBP równe lub wyższe niż 150 mmHg).

4.3.2.3. Badania histologiczne

Sposób pobierania i utrwalenie materiału do badań

Po sześciu tygodniach od wszystkich szczurów pobrano fragmenty tkanki mięśnia sercowego w głębokim znieczuleniu pentobarbitem (50 mg/kg masy ciała). Otrzymane tkanki serca natychmiast utrwalono w 4% buforowanej formalinie i rutynowo zatopiono w parafinie lub umieszczono w roztworze RNA-later (AM7024 Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) i przechowywano w temperaturze -80 °C. Przy użyciu mikrotomu saneczkowego, bloki parafinowe pocięto na skrawki o grubości 4 µm.

Stosowane barwienia immunohistochemiczne

Skrawki parafinowe poddano obróbce immunohistochemicznej w celu zbadania obecności antygenów Fzd8, Wnt1, GSK-3β i β-kateniny, przy użyciu odpowiednich przeciwciał:

- Fzd8 (1:400; ab155093, Abcam, Cambridge, UK)
- Wnt-1 (1:500; ab189001, Abcam, Cambridge, UK)
- GSK-3β (1:100; ab68476, Abcam, Cambridge, UK)
- β-katenina (1:2000; ab32572, Abcam, Cambridge, UK)

Równocześnie przeprowadzono reakcje kontrolne. Barwienia immunohistochemiczne przeprowadzone zostały według odpowiedniego protokołu (Kasacka et al., 2018) [49].

Procedura przeprowadzenia reakcji immunohistochemicznej

Skrawki parafinowe na szkiełkach adhezyjnych inkubowano przez 20 godzin w cieplarni, w temperaturze 37 °C oraz przez 1 godzinę w temperaturze 60°C. Tak przygotowane skrawki parafinowe poddano odparafinowaniu i uwodnieniu:

1. Ksylen I, II, III – po 10 minut
2. Alkohol etylowy 99,8% + Ksylen (1:1) – 5 minut
3. Alkohol etylowy 99,8% I i II - po 4 minuty
4. Alkohol etylowy 95% I i II – po 4 minuty
5. Alkohol etylowy 70% - 10 minut
6. Woda destylowana – 3 razy po 15 minut

W celu odsłonięcia antygenów w badanej tkance, materiał umieszczono w dedykowanym buforze, odpowiednio: TRS pH=9.0 (S 2367; Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, CA, USA) dla Fzd8, Wnt1, GSK-3 β oraz Target Retrieval Solution Citrate pH=6.0 (S 2369; Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, CA, USA) dla β -kateniny. Preparaty pozostawały w komorze ciśnieniowej Pascal. Po schłodzeniu roztworu do temperatury pokojowej, szkiełka osuszono. Następnie, skrawki obrysowano DakoPenem, tworzącym barierę dla wykorzystanych odczynników, co pozwala na utrzymanie odczynników bezpośrednio na tkance. W celu zablokowania endogennej peroksydazy, skrawki inkubowano przez 10 minut w roztworze Dako REAL Peroxidase-Blocking Solution (S 2023; Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, CA, USA), następnie płukano w wodzie destylowanej oraz buforze płuczącym Wash Buffer - 3 razy po 5 minut (S3006 Dako Denmark A/S, Produktionsvej 42, DK-2600, Glostrup, Denmark).

Otrzymane w ten sposób preparaty, inkubowano z rozcieńczonymi przeciwciałami pierwszorzędowymi przez 24 godziny w temperaturze +4°C, w wilgotnej komorze. Następnie, ponownie płukano w Wash Buffer. Skrawki inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym, polimerem znakowanym peroksydazą chrzanową (REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse detection kit (K5007; Agilent Technologies Denmark Ap/S, Produktionsvej 42, 2600 Glostrup, Denmark) oraz płukano w Wash Buffer. Tak przygotowane preparaty, inkubowano w roztworze chromogenu DAB Flex, celem wizualizacji związanych przeciwciał. Następnie płukano w wodzie destylowanej, by przerwać reakcję barwną. Kolejno, skrawki barwiono hematoksyliną QS (H-3404 Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) przy obserwacji w mikroskopie świetlnym i płukano w wodzie bieżącej oraz destylowanej.

Wykonano odwodnienie oraz prześwietlenie skrawków w roztworach alkoholi o wzrastających stężeniach oraz roztworach Ksylenu:

1. Alkohol etylowy 70% - 3 minuty
2. Alkohol etylowy 95% I i II- po 3 minuty
3. Alkohol etylowy 99,8% I i II – po 2 minuty
4. Alkohol etylowy 99,8% + Ksylen (1:1) – 5 minut
5. Ksylen I, II, III – po 10 minut

Przygotowane preparaty zamknięto szkiełkiem nakrywkowym z użyciem balsamu Entellan (Merek).

4.3.2.4. Ocena stopnia intensywności reakcji immunohistochemicznej

Dokumentacja fotograficzna oraz ocena wyników przeprowadzonych reakcji immunohistochemicznych, zostały wykonane przy użyciu mikroskopu świetlnego Olympus BX43, sprzężonego z kamerą cyfrową Olympus DP12. Porównywano intensywność reakcji przy użyciu programu komputerowego Nikon NIS-Elements Advanced Research. Mierzono średnią gęstość optyczną badanych preparatów. Pomiarów dokonano w skali szarości od 0 do 256, gdzie wartość 0 oznacza piksel całkowicie biały oraz 256 piksel całkowicie czarny.

4.3.2.5. Izolacja RNA

Próbki tkanki analizowano metodą PCR w czasie rzeczywistym w celu oceny ekspresji genów kodujących Fzd8, Wnt1, GSK-3 β i β -kateninę. Tkanki serca przechowywano w roztworze RNA-later (AM7024 Thermo Fischer 168 Third Avenue Waltham, MA USA 02451) i mrożono w temperaturze -80 °C. RNA całkowite izolowano w komorze z laminarnym przepływem powietrza, w odpowiedniej temperaturze i w wyznaczonym czasie, zgodnie z załączoną procedurą (NucleoSpin® RNA Isolation Kit (Machery-Nagel)). Przy użyciu sterylnych probówek eppendorf, eluowano RNA, w wodzie pozbawionej RNAaz. Stężenie wyizolowanego RNA sprawdzono, wykorzystując spektrofotometr NanoDrop 2000 (ThermoScientific). Oceniano absorbancje przy długości fali 260nm oraz 280nm. Próbę ślepą stanowiła woda dejonizowana, wolna od nukleotydów. Do dalszych etapów badania wyselekcjonowano próbki, których stosunek absorbancji przy długości fali 260nm do absorbancji przy długości fali 280nm (260/280Ratio) znajdował się w przedziale 1,8 – 2,1.

Reakcja odwrotnej transkrypcji

Równowartość 1 μ g całkowitego RNA w reakcji odwrotnej transkrypcji przepisano na cDNA, używając iScript™ Advanced cDNA Synthesis Kit for RT qPCR (BIO-RAD), w całkowitej objętości 20 μ l, zgodnie z załączoną metodyką. Podczas przeprowadzania reakcji odwrotnej transkrypcji, mieszaninę inkubowano przez 20 minut w 46°C, a następnie przez 1 minutę w 95°C.

Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR)

Celem określenia ilości transkryptów badanych genów w odniesieniu do krzywej standardowej przeprowadzono reakcję qPCR. Wcześniej, utworzono niezależne dla każdego genu krzywe standardowe. W tym celu przygotowano mieszaninę matrycy cDNA. Zmieszano 1 μ l cDNA każdego ze szczurów, po czym wykonano serię rozcieńczeń. Na matrycy cDNA, przeprowadzono ilościowe reakcje PCR w czasie rzeczywistym, przy użyciu Stratagene Mx3005P (Aligent Technologies) z SsoAdvanced™ Universal SYBER® Green Supermix (BIO-RAD). Reakcję przeprowadzono w 20 μ l objętości reakcyjnej w dwóch powtórzeniach dla każdego szczura. Gen *GAPDH* (GAPDH) wykorzystano jako gen referencyjny do oceny ilościowej. Produkty PCR otrzymano poprzez amplifikację cDNA przy użyciu specyficznych primerów: *FZD8* (qRnoCED0054913, BIO-RAD), *WNT1* (qRnoCED0003949, BIO-RAD), *GSK3 β* (qRnoCID0001683, BIO-RAD), *CTNNB1* (qRnoCID0053256, BIO-RAD), i *GAPDH* (qRnoCID0057018, BIO-RAD). QRT-PCR przeprowadzono w dublecie w końcowej objętości 20 μ l w następujących warunkach: aktywacja polimerazy przez 2 minuty w temperaturze 95°C, denaturacja przez 5 sekund w temperaturze 95°C, hybrydyzacja przez 30 sekund w temperaturze 60°C przez 35 cykli. Sprawdzone reakcje PCR, oceniając wykres krzywej topnienia, aby upewnić się, że amplifikowano tylko jeden produkt (pojedynczy pik w specyficznej temperaturze). Względną ocenę ilościową ekspresji genów określono poprzez porównanie wartości Ct przy użyciu metody $\Delta\Delta$ Ct.

4.3.2.6. Analiza statystyczna wyników

Wszystkie dane przydzielono do dwóch grup kontrolnych (WKY, UNX) i dwóch grup badanych (SHR, DOCA-salt). Dla cech mierzalnych obliczono średnią arytmetyczną i błąd standardowy (SE). Następnie, korzystając z pakietu komputerowego STATISTICA 13.3, przeprowadzono analizę statystyczną za pomocą jednoczynnikowego testu ANOVA. Do przeprowadzenia analizy post-hoc wykorzystano test najmniejszych znaczących różnic Fishera. Za poziom istotności statystycznej przyjęto $p < 0,05$.

4.3.3. Wyniki

Nadciśnienie tętnicze skurczowe stwierdzono u wszystkich zwierząt grup badanych. W tabeli 1 przedstawiono średnie wartości ciśnienia tętniczego dla każdej grupy szczurów.

Tabela 1. Średnie wartości skurczowego ciśnienia krwi (mmHg) szczurów w grupach kontrolnych i z nadciśnieniem (średnia \pm SD).

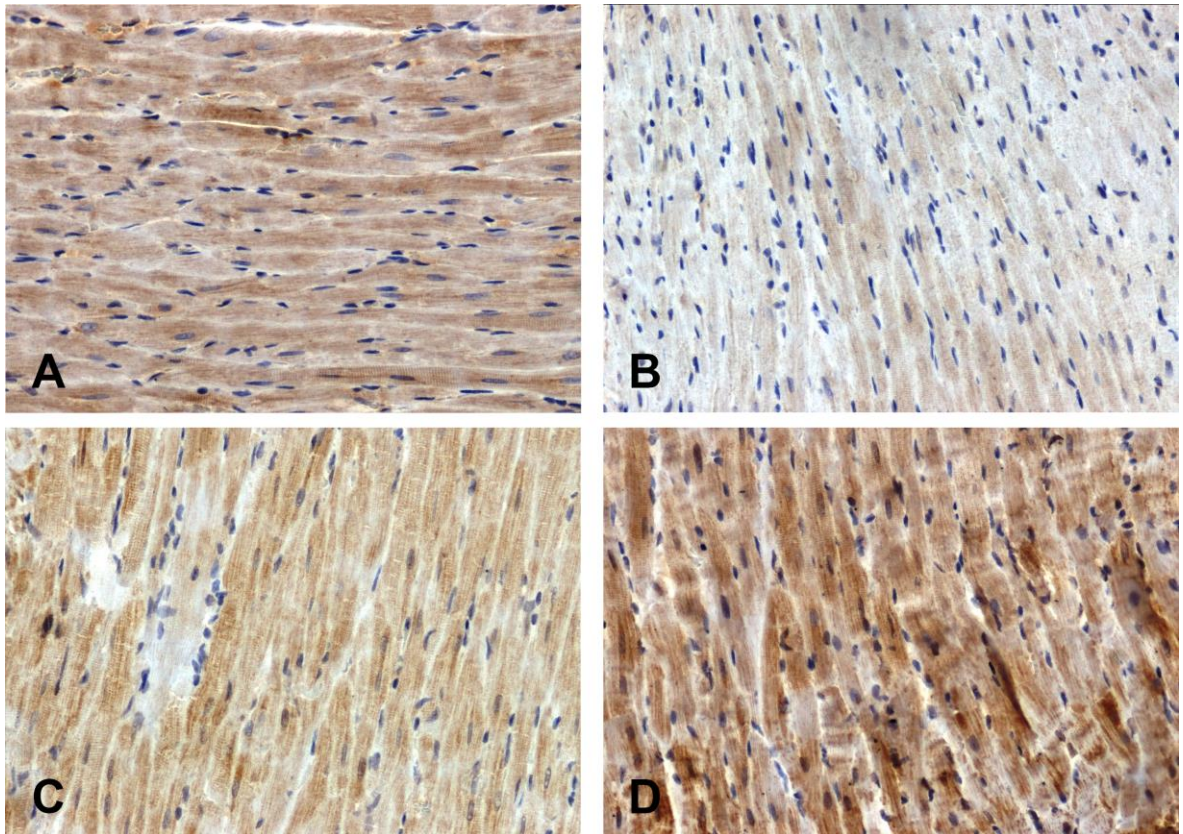
Model Nadciśnienia	Grupa kontrolna	Grupa badana
SHR	122.3 \pm 2.3	160.8 \pm 3.3*
DOCA-salt	126.0 \pm 4.0	180.0 \pm 13.0*

* $p < 0,05$ grupa kontrolna vs. grupa badana

SHR: model nadciśnienia pierwotnego; DOCA-salt: model nadciśnienia wtórnego

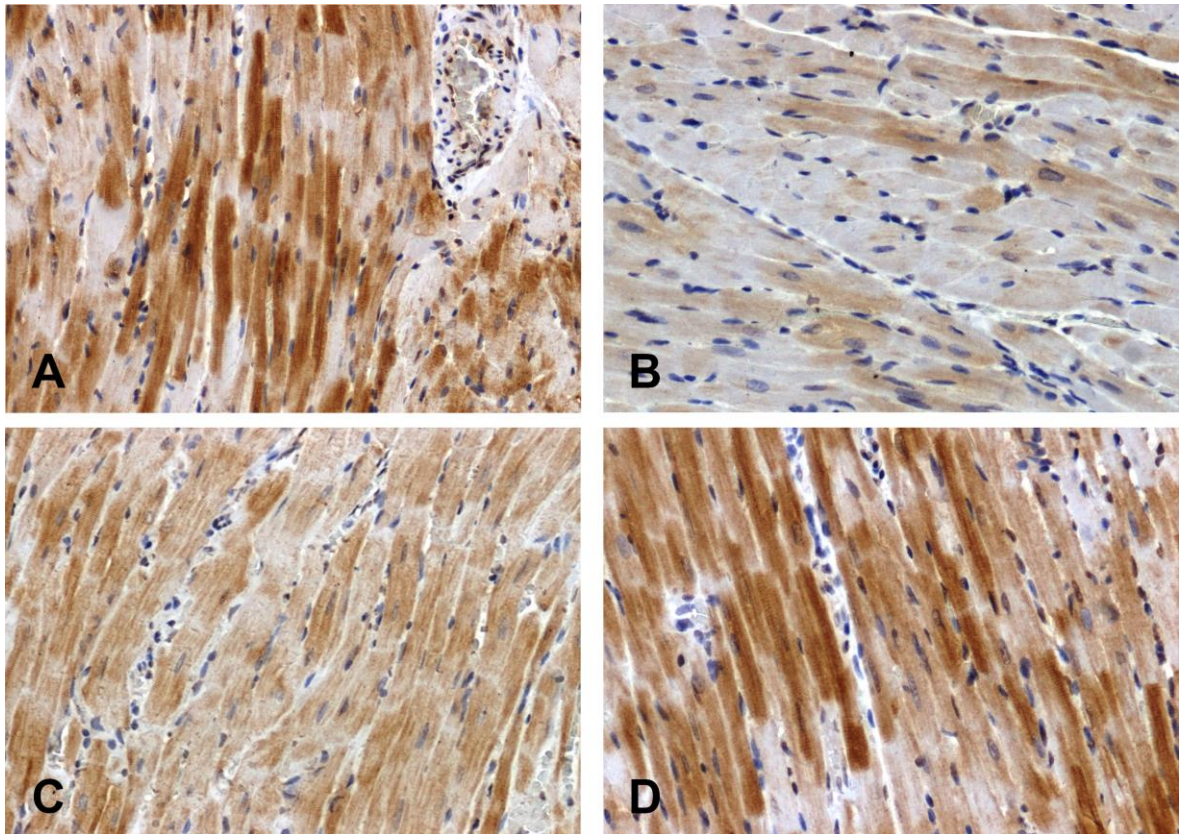
4.3.3.1. Wyniki zastosowanych barwień immunohistochemicznych

W sercach wszystkich badanych szczurów reakcje immunohistochemiczne z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko Fzd8, WNT1, GSK-3 β i β -kateniny dały pozytywny wynik, z różnym nasileniem reakcji u zwierząt kontrolnych i z nadciśnieniem.



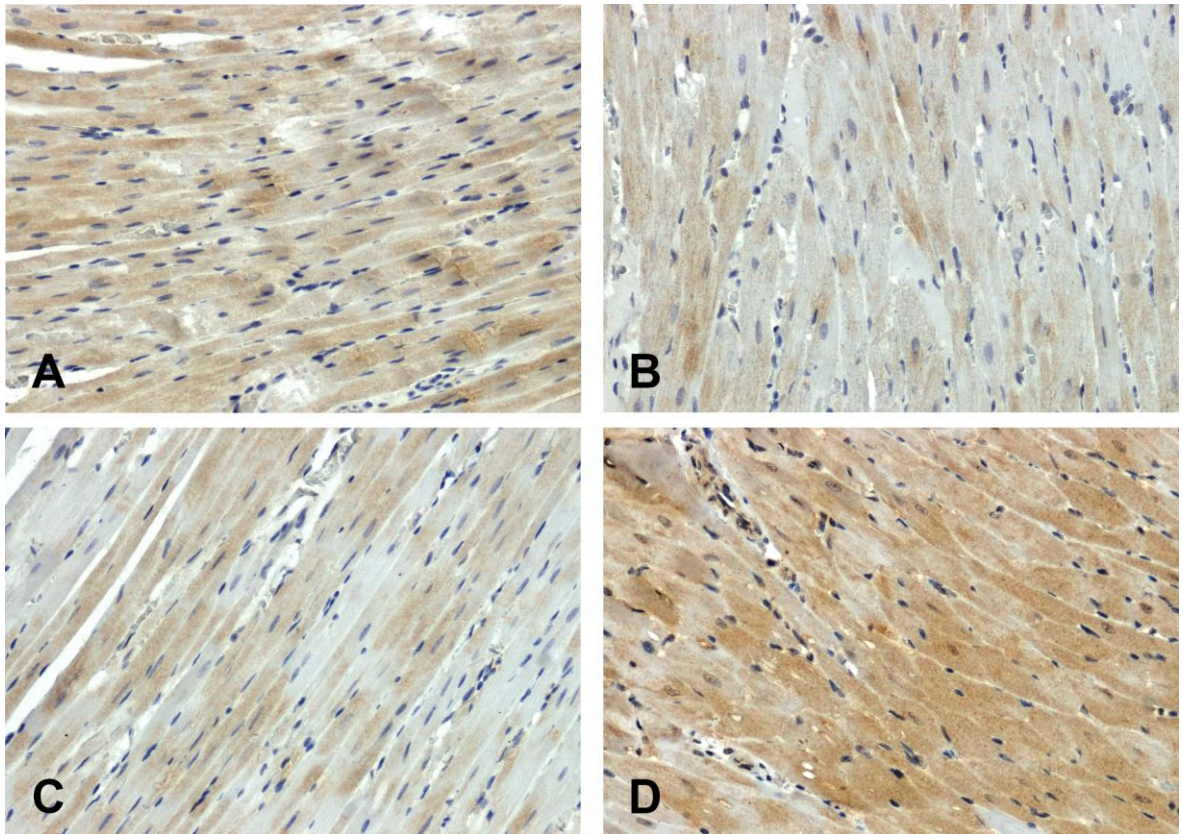
Rycina 1. Reakcja immunohistochemiczna wykazująca Fzd8 w sercu szczura: A – WKY, B – SHR, C – UNX, D – DOCA-salt

Intensywność reakcji immunohistochemicznej wykazującej Fzd8, w porównaniu do kontroli (ryc. 1A) była osłabiona w sercach szczurów z pierwotnym nadciśnieniem (ryc. 1B) i nasiloną u szczurów z nadciśnieniem wtórnym (ryc. 1D) w stosunku do zwierząt normotensyjnych (ryc. 1C).



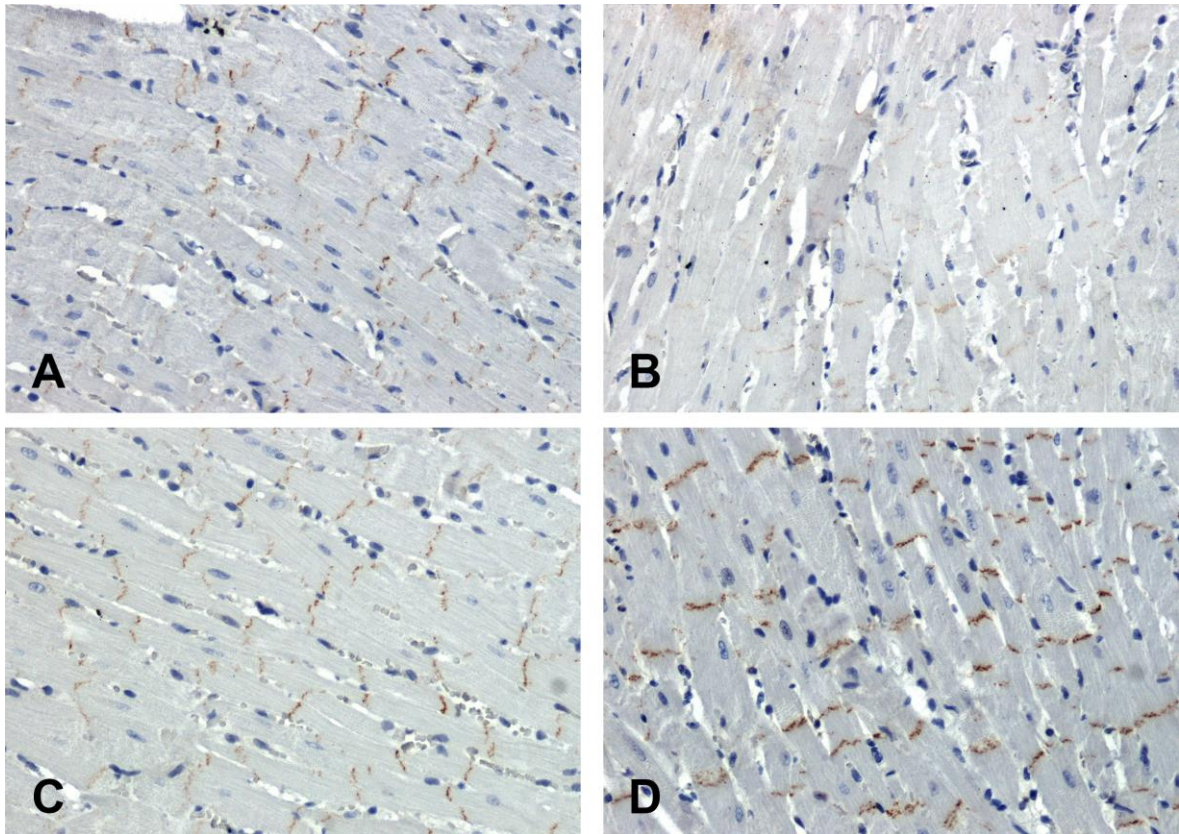
Rycina 2. Reakcja immunohistochemiczna wykazująca Wnt1 w sercu szczura:
A – WKY, B – SHR, C – UNX, D – DOCA-salt

Intensywność immunoreaktywności Wnt1 w sercach szczurów z prawidłowym ciśnieniem była silna (ryc. 2A) lub umiarkowana (ryc. 2C). W sercach szczurów z nadciśnieniem pierwotnym reakcja była osłabiona (ryc. 2B), a w grupie DOCA-salt uległa znacznemu nasileniu (ryc. 2D)



Rycina 3. Barwienie immunohistochemiczne wykazujące GSK-3 β w sercu szczura: A – WKY, B – SHR, C – UNX, D – DOCA-salt

Umiarkowana intensywność reakcji wykazującej GSK-3 β w sercach szczurów normotensyjnych WKY (ryc. 3A) i UNX (ryc. 3C), uległa osłabieniu w sercach SHR (ryc. 3B) i znacznemu nasileniu u szczurów z nadciśnieniem wtórnym (ryc. 3D).



Rycina 4. Detekcja β -kateniny w sercu szczura: A – WKY, B – SHR, C – UNX, D – DOCA-salt

W sercach wszystkich szczurów reakcja immunohistochemiczna z użyciem przeciwciała przeciwko β -kateninie jest dodatnia we wstawkach kardiomiocytów (ryc. 4). W sercach SHR immunoreaktywność β -kateniny była osłabiona (ryc. 4B) w porównaniu z WKY (ryc. 4A), natomiast w sercach szczurów z nadciśnieniem wtórnym (ryc. 4D) reakcja była intensywniejsza w porównaniu z UNX (ryc. 4C).

4.3.3.2. Wyniki badań morfometrycznych

W celu obiektywizacji oceny intensywności reakcji immunohistochemicznych, przeprowadzono analizę densytometryczną obrazów mikroskopowych serc szczurów kontrolnych oraz z nadciśnieniem pierwotnym i wtórnym. Badania morfometryczne wykazały spadek intensywności reakcji wykazujących Fzd8, Wnt1, Gsk3 β oraz β -kateninę w sercach szczurów z nadciśnieniem pierwotnym w stosunku do zwierząt kontrolnych WKY, oraz zwiększoną intensywność reakcji w sercach szczurów DOCA-salt w stosunku do zwierząt normotensyjnych UNX. Wyniki przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Intensywność reakcji immunohistochemicznej wykazującej Fzd8, Wnt1, Gsk3 β oraz β -kateninę w sercach szczurów kontrolnych i nadciśnieniowych (średnia \pm SE; $p < 0,05$)

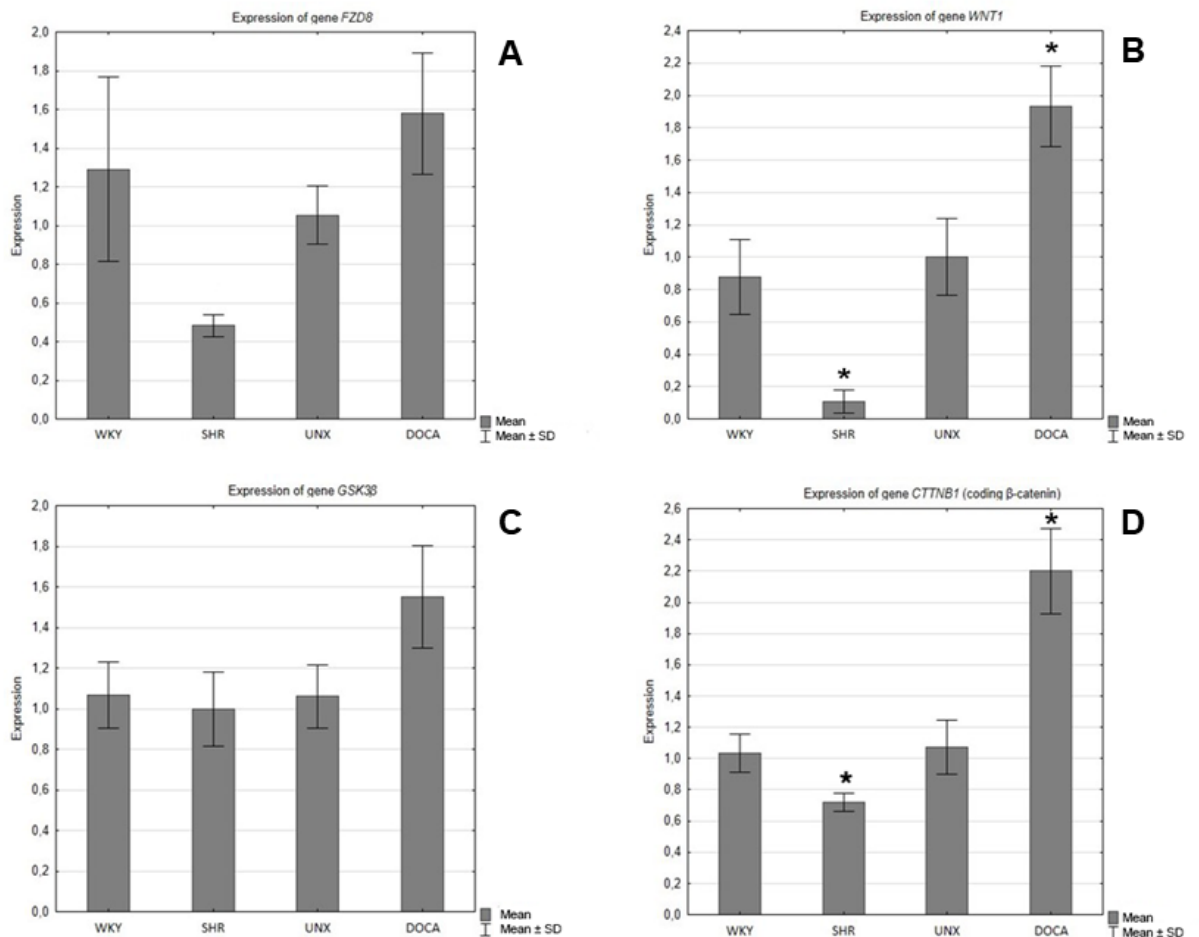
Grupa szczurów	Intensywność reakcji immunohistochemicznej w sercach			
	Skala od 0 (piksel biały) do 256 (piksel czarny)			
	Fzd8	WNT1	GSK-3 β	β -katenina
WKY	143.2 \pm 4.12	157.72 \pm 5.99	93.67 \pm 1.87	157.27 \pm 1.98
SHR	64.52 \pm 8.37 * \downarrow	72.79 \pm 7.35 * \downarrow	67.82 \pm 2.97 \downarrow	86.29 \pm 4.63 * \downarrow
UNX	110.67 \pm 4.51	116.84 \pm 2.61	75.08 \pm 5.23	162.88 \pm 1.75
DOCA-salt	174.67 \pm 5.58 * \uparrow	168.09 \pm 6.97 * \uparrow	136.65 \pm 6.45 * \uparrow	183.67 \pm 1.57 * \uparrow

* $p < 0,05$ nadciśnienie vs kontrola; \uparrow - nasilenie reakcji immunohistochemicznej;
 \downarrow - osłabienie reakcji immunohistochemicznej

4.3.3.3. Ocena ekspresji genów metodą Real Time PCR

Aby porównać profil ekspresji genów w sercach szczurów grup kontrolnych i nadciśnieniowych wykorzystano metodę RT-qPCR, która pozwala na analizę ilościową produktu w czasie rzeczywistym. Porównywano ekspresję genów: *FZD8*, *WNT1*, *GSK-3 β* oraz *CTNNB1*, kodujących odpowiednio Fzd8, Wnt1, GSK-3 β oraz β -kateninę. W sercach szczurów SHR zaobserwowano spadek ekspresji genów kodujących Fzd8, WNT1, GSK-3 β i β -kateninę w porównaniu z grupą kontrolną WKY (ryc. 5).

W przypadku WNT1 (ryc. 5B) i β -kateniny (ryc. 5D) różnice były istotne statystycznie. Natomiast w sercach szczurów z nadciśnieniem wtórnym stwierdzono wzrost ekspresji genów wszystkich badanych białek w stosunku do grupy kontrolnej UNX. Istotność statystyczną stwierdzono w ekspresji genów kodujących Wnt1 (ryc. 5B) i β -kateninę (ryc. 5D).



Rycina 5. Ekspresja genów kodujących: A – FZD8; B – WNT1; C – GSK-3 β ; D – β -kateninę w sercu szczurów z normotensyjnych i z nadciśnieniem * $p < 0,05$

4.3.4. Wnioski

1. Poziom immunoreaktywności Fzd8, Wnt1, GSK-3 β oraz β -kateniny jest różny w sercach szczurów normotensyjnych i z nadciśnieniem.
2. Immunoreaktywność Fzd8, Wnt1, GSK-3 β oraz β -kateniny w sercach szczurów z nadciśnieniem pierwotnym spada w stosunku do zwierząt normotensyjnych oraz wzrasta w nadciśnieniu wtórnym.
3. Wzrost ekspresji genów kodujących Fzd8, Wnt1, GSK-3 β , β -kateninę w sercu szczurów DOCA-salt w stosunku do zwierząt normotensyjnych wskazuje na zasadniczą rolę szlaku Wnt zależnego od β -kateniny w przebiegu nadciśnienia tętniczego wtórnego.
4. Obniżenie immunoreaktywności i ekspresji genów kodujących Fzd8, Wnt1, GSK-3 β i β -kateniny w sercu szczurów SHR w stosunku do zwierząt kontrolnych wskazuje na inny rodzaj zaangażowania szlaku sygnalizacyjnego Wnt/ β -katenina w nadciśnieniu pierwotnym.
5. Wykazane zmiany immunoreaktywności oraz ekspresji genów badanych składowych kanonicznego szlaku Wnt mogą sugerować, iż zmiany jego aktywności w nadciśnieniu tętniczym mogą zachodzić na każdym poziomie tej ścieżki sygnałowej.

Wyniki przeprowadzonych badań dowodzą, że w nadciśnieniu dochodzi do zaburzeń funkcji serca oraz istotnych zmian (różnych w zależności od etiologii) w ekspresji poszczególnych elementów szlaku sygnalizacyjnego Wnt/ β -katenina. Niezbędne są dalsze badania, które mogą doprowadzić do szczegółowego wyjaśnienia mechanizmów prowadzących do zmian ekspresji elementów szlaku Wnt/ β -katenina w nadciśnieniu pierwotnym i wtórnym.

Rozdział 5. Publikacje stanowiące rozprawę doktorską

5.1. Publikacja I

Advances in Medical Sciences 67 (2022) 87–94



Contents lists available at ScienceDirect

Advances in Medical Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/advm



The role of the Wnt / β -catenin pathway and the functioning of the heart in arterial hypertension – A review



Maryla Miynarczyk, Irena Kasacka *

Department of Histology and Cytophysiology, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:
Wnt/ β -catenin
Heart
Arterial hypertension

ABSTRACT

Many factors and molecular pathways are involved in the pathogenesis of arterial hypertension. The increase in blood pressure may be determined by the properties of specific gene products and their associated action with environmental factors. In recent years, much attention has been paid to the Wnt/ β -catenin signaling pathway which is essential for organ damage repair and homeostasis. Deregulation of the activity of the Wnt/ β -catenin pathway may be directly or indirectly related to myocardial hypertrophy, as well as to cardiomyocyte remodeling and remodeling processes in pathological states of this organ. There are reports pointing to the role of the Wnt/ β -catenin pathway in the course and development of organ complications in conditions of arterial hypertension. This paper presents the current state of knowledge of the role of the Wnt/ β -catenin pathway in the regulation of arterial pressure and its impact on the physiology and the development of the complications of arterial hypertension in the heart.

1. Introduction

Arterial hypertension is a multifactorial, complex disease that affects over 25% of the adult population. This disease remains undetected in a significant part of the population because it develops slowly and secretly, and for a long time it does not cause any noticeable symptoms. On the contrary, complications of long-term effects of untreated hypertension, such as stroke or cardiovascular events, cause a serious threat to life [1–3]. The heart is most affected by the complications of arterial hypertension. Sustained high blood pressure leads to damage of this organ by fibrosis and hypertrophy, which in turn leads to heart failure [4,5]. The increase in blood pressure may be determined by the properties of specific gene products and their associated action with environmental factors. In recent years, much attention has been paid to the Wnt/ β -catenin signaling pathway which is essential for the repair of organ damage and the body's homeostasis [6–8]. The Wnt/ β -catenin pathway is involved in the normal development of myocardial cells [9]. Deregulated activity of the Wnt/ β -catenin pathway, especially increased level of β -catenin, may be directly or indirectly related to myocardial hypertrophy due to activation of cardiomyocyte proliferation and tissue fibrosis [6–8]. Despite numerous recent discoveries regarding the action of the

Wnt/ β -catenin pathway and its impact on individual organs of the body, its role in the heart damage in the course of arterial hypertension is not fully understood. Considering the complexity of the Wnt pathway and the variety of processes involved in the development of hypertension and its complications, this issue requires further research (see Fig. 4).

2. Review

2.1. Etiology of arterial hypertension

The etiology of arterial hypertension is multifactorial. It consists of genetic predisposition and modifiable factors resulting from environmental conditions and lifestyle, such as obesity, the use of stimulants or the lack of physical activity [3]. Many factors and molecular pathways are involved in the pathogenesis of hypertension and its complications [1,3]. In over 90% of patients, arterial hypertension is of primary nature and its cause remains unknown. In about 10%, it is secondary hypertension accompanying various diseases and disorders of the body's functioning. In recent years, enormous advances have been made in the understanding of the genetic basis and the properties of many compounds contributing to the development of arterial hypertension [10,11].

2.2. Complications of arterial hypertension

Normal blood pressure values ensure adequate blood flow through the body's organs, conditioning nutrition and proper functioning, especially of the heart, brain and kidneys [12]. Arterial hypertension disturbs

* Corresponding author. Department of Histology and Cytophysiology, Medical University of Białystok, Mickiewiczza 2C, 15-222, Białystok, Poland.

E-mail addresses: kasacka@umb.edu.pl, histologia.cytofizjologia@umb.edu.pl (I. Kasacka).

<https://doi.org/10.1016/j.advm.2022.01.001>

Received 2 September 2021; Received in revised form 29 October 2021; Accepted 12 January 2022

1896-1126/© 2022 Published by Elsevier B.V. on behalf of Medical University of Białystok.

the homeostasis of various organs of the body through both microvascular and macrovascular changes [4,13]. Hypertensive disease is recognized as the leading cause of stroke [14]. There is also a relationship between hypertension and the occurrence of changes in the structure of the white matter of the brain, which is associated with the loss of cognitive functions [15]. Prolonged elevated blood pressure results in renal parenchymal ischemia and insufficiency [16,17]. Damage of the retina and its vessels is not only a complication of arterial hypertension, but it has also a prognostic significance in relation to mortality due to cardiovascular diseases in the course of hypertension [18]. The heart is most affected by the complications of arterial hypertension. Arterial hypertension results in morphological changes in the cardiovascular system increasing the risk of coronary heart disease and myocardial infarction. The state of elevated pressure may cause impaired blood flow, unfavorable remodeling of cardiomyocytes, and left ventricular wall hypertrophy, leading to heart failure [4,5]. Additionally, arterial hypertension is recognized as a reversible cause of atrial fibrillation [19]. One of the most common and earliest complications is cardiomyocyte hypertrophy and impaired left ventricular function [4]. In consequence of persistently elevated blood pressure, the left ventricle is hemodynamically overloaded, which results in compensatory remodeling. Mainly, there is concentric hypertrophy of cardiomyocytes, resulting in an increase of left ventricular wall thickness and weight. There may also be eccentric hypertrophy when the wall thickness is not increased or the left ventricle is remodeled [20]. These changes lead to cardiac dysfunction and failure, and increase the risk of cardiovascular events and mortality [21,22]. The major cardiac complications of arterial hypertension are listed in Fig. 1. In the state of elevated blood pressure, the endothelium is constantly activated to secrete pro-inflammatory and prothrombotic factors. At the same time, the secretion of nitric oxide (NO), which has a vasodilating effect, is disturbed [4,16]. Increased secretion of aldosterone and angiotensin II (Ang II) in the course of hypertension promotes the increased deposition of collagen in the left ventricular wall and in the blood vessel wall, which results in their fibrosis and consequently in organ ischemia [17,23]. Endothelial dysfunction and excessive Ang II secretion, with NO deficiency, cause the activation and aggregation of platelets, and consequently an increased risk of thromboembolic events [4].

2.3. Experimental research

Due to the multifactorial etiology and the variety of processes involved in the development of hypertension and its course, an important

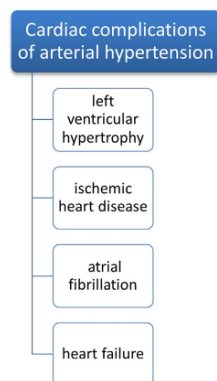


Fig. 1. Main cardiac complications of arterial hypertension, based on Nadar et al. [4].

role in the research methodology play animal experimental models in which the time to obtain results is relatively short and the conditions of the research are strictly controlled [24]. In Table 1, selected experimental models of arterial hypertension are presented.

The model representing primary hypertension is the spontaneously hypertensive rats (SHR) model with genetically conditioned systemic hypertension [25]. Studies of metabolic changes preceding left ventricular hypertrophy and heart failure in rats with essential hypertension (SHR) showed an increase in glucose uptake and oxidation by cardiomyocytes and the presence of abnormal metabolites, oxidative stress and inflammation [28]. Studies of hypertrophic hearts in SHR rats showed a decrease in the expression of Ang II receptors type 2 (AT2) involved in the processes inhibiting hypertrophy, and a simultaneous increase in the expression of Ang II receptors type 1 AT1 [29]. Secondary arterial hypertension is caused by comorbidities, including renal parenchymal disease, renal artery atherosclerosis, hyperaldosteronism, and renal failure [10]. Renovascular hypertension is the most common type of secondary arterial hypertension [30]. It most often arises as a result of a significant narrowing of the renal artery in the course of complex and long-lasting atherosclerotic processes or fibromuscular dysplasia, and leads to organ ischemia [4,10]. This results in an increase in the production of renin by the glomerular apparatus in the course of increased activation of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) [10,17]. This type of secondary arterial hypertension is represented by an experimental 2-kidney 1-clip (2K1C) model which involves the constriction of the renal artery [24]. The results of studies on the influence of renovascular hypertension on the regulation of tissue-specific epithelial, endothelial and mesenchymal markers in many organs – including the heart, showed an increase in the expression of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) – acting profibrotically, as well as in factors involved in the tissue repair processes. There was also an increased expression of markers leading to myocardial fibrosis [31].

Another experimental model of secondary hypertension, deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt rats is based on increased salt intake in animals after unilateral nephrectomy [26]. In this type of secondary hypertension, there is an increase in vascular resistance, an increase in the tone of the vascular wall, and hypervolemia [27]. Experimental studies have shown an increase in the enzymatic activity of profibrotically acting metalloproteinases and fibronectin, increased pro-inflammatory activity and an increase in the expression of adhesive molecules, which in turn led to an unfavorable remodeling of the myocardium in the DOCA-salt hypertensive rats. At the same time, it was found that these processes were weakened after the use of an endothelin antagonist (Eta) which proved its protective effect on the heart [32].

2.4. Wnt/ β -catenin pathway

The Wnt pathway is involved in a wide spectrum of physiological and disease-related processes. It is an extensive collection of ligands, receptors and effectors initiating the signal transduction cascade [6,33]. In their auto- and paracrine interactions, Wnt proteins regulate, for

Table 1
Selected experimental models of arterial hypertension.

References	Experimental model	Description
Leong et al. [24]	2K1C	Secondary hypertension due to clamping of the renal artery
Dornas et al. [25]	SHR	Genetically determined systemic hypertension
Basting et al. [26]	DOCA – salt	Unilateral nephrectomy and increased salt intake
Lee et al. [27]	DOCA – salt	Unilateral nephrectomy and increased salt intake

Abbreviations: SHR – spontaneously hypertensive rats; DOCA-salt – deoxycorticosterone acetate-salt; 2K1C – 2-kidney 1-clip.

example, the processes of adhesion, as well as cell differentiation and growth. There are two pathways of the Wnt pathway: classical (canonical), dependent on β -catenin - regulating gene expression through the β -catenin/TCF (T-cell factor) complex, and non-classical pathways, operating independently of β -catenin and TCF [7].

The activation of the classical signaling pathway is related to the level of β -catenin accumulated in the cytoplasm. The cytoplasmic level of β -catenin is physiologically kept low by continuous ubiquitin-dependent proteasomal degradation [34]. This process is regulated by a degradation complex which includes: adenomatous polyposis coli (APC) protein, casein kinase 1 (CK1), and glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β). β -catenin is phosphorylated by kinases: GSK3 β and CK1, then it is degraded by the 26S proteasome complex [7].

Signal transduction begins with the connection of Wnt ligands to the Frizzled (Fzd) receptor which interacts with the cytoplasmic protein Dishevelled (Dvl) and the low density lipoprotein receptor related protein (LRP) co-receptor responsible for the auto- and paracrine mechanism of interaction. The activation of the Fzd receptor and the attachment of the LRP co-receptor inhibit, through phosphorylation, the activity of GSK3 β , which leads to inhibition of the activity of the destructive complex of β -catenin. There is an increase in the level of β -catenin in the cytoplasm of the cell and its translocation to the nucleus where it induces the expression of Wnt-dependent genes through the increased activity of transcription factors [7,35].

After β -catenin enters the cell nucleus, it changes the role of T-cell factor/lymphoid enhancer factor (TCF/LEF) from repressors to transcription activators of Wnt target genes by detaching the Groucho/transducing-like enhancer (Gro/TLE) co-repressors from them. The recruitment of histone remodeling complexes and changes in the chromatin structure takes place, thanks to which there is an increased transcriptional activity in its areas [36].

The negative feedback regulation between the components of the Wnt/ β -catenin pathway allows the expression of β -catenin to be maintained at an appropriate level. During the activation of the Wnt/ β -catenin pathway, there is an increased expression of axis inhibition protein 2 (Axin-2), which is part of the β -catenin degradation complex, thanks to which the low level of β -catenin is maintained [37].

In addition, the increased activity of the Wnt pathway causes a decrease in the expression of genes encoding the Fzd receptor and the LRP co-receptor, which in turn also reduces the activity of the Wnt/ β -catenin pathway and maintains a low level of β -catenin [7,35]. The diagram of activation and inhibition of the canonical Wnt pathway is presented in Fig. 2. Wnt pathway proteins are glycoproteins involved in a number of processes in the body in both physiological and pathological states [38]. Abnormalities in signaling the Wnt/ β -catenin pathway, including disturbances in the expression of Wnt regulatory genes and their mutations, are detected in many diseases [7,35,39,40] (see Fig. 3).

Excessive activity of the Wnt/ β -catenin pathway leads to increased

cell proliferation and tumor development. The relationship between the occurrence of mutations in the Wnt/ β -catenin pathway genes and the development of neoplasms, including colon, pancreas, breast, hematopoietic cells, lungs, kidneys, as well as the presence of tumor metastases [41,41–43]. Wnt1 mutations occur in osteogenesis imperfecta, and disturbances in the activation and inhibition of β -catenin expression are a factor contributing to the onset of osteoporosis [44,45]. Excessive activity of GSK3 β , which reduces the level of β -catenin, has been reported in Alzheimer's disease [46]. Mutations of the lipoprotein receptor protein 5 (LPR5) and the Fzd4 receptor encoding genes are associated with the occurrence of familial exudative vitreoretinopathy [47]. Some congenital diseases are rooted in disturbances of Wnt/ β -catenin signaling, resulting in abnormal tissue development [35].

2.5. Wnt/ β -catenin pathway in the heart

Recent research results indicate the participation of the Wnt/ β -catenin pathway in embryogenesis and proliferation of myocardial cells. The studies on the Wnt/ β -catenin pathway in the heart are summarized in Table 2. It plays a role in the proper course of myogenesis [9,48–51], and participates in the processes of myocardial and cardiomyocyte remodeling in pathological states of this organ [6,52–55].

The activation of the Wnt pathway after various cardiac injuries, from acute ischemia to chronic pressure overload, may be associated with the initiation of the process of cardiac hypertrophy. Deregulated Wnt/ β -catenin signaling is associated with cardiomyocyte hypertrophy and myocardial fibrosis. Changes in the morphology and function of heart cells contribute to the occurrence of arrhythmias [75]. Zhao et al. [56] found significant hypertrophy of myofibroblasts in rats after 4 weeks of Ang II infusion. There was an increase in mRNA expression of selected Wnt ligands in the hearts of rats subjected to Ang II infusions. An increased expression of β -catenin has also been demonstrated in both cardiomyocytes and interstitial fibroblasts. These results suggest that Ang II-induced cardiac hypertrophy is associated with increased activity of the Wnt/ β -catenin pathway. At the next stage of the study, the expression of the β -myosin heavy chain (β -MHC) and α -actin in hearts after Ang II infusion was almost completely blocked by the use of ICG-001, a β -catenin inhibitor. After the treatment with a β -catenin inhibitor, the levels of both markers of hypertrophy were comparable with the control group. These results indicate a significant role of the canonical Wnt pathway in the mechanism of Ang II-induced cardiac hypertrophy. An analysis of the heart structure (using echocardiography) after 4 weeks of Ang II infusion showed geometric abnormalities in its structure. The use of ICG-001 proved to be crucial in alleviating these changes and prevented further damage to the heart. Moreover, the inhibition of signaling by ICG-001 significantly lowered the blood pressure. These results suggest that the Ang II-induced increase in the blood pressure may be dependent on the

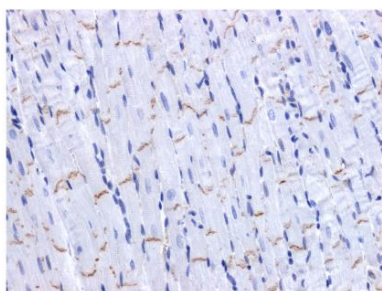


Fig. 2. Immunolocalization of β -catenin in the heart, x 200.

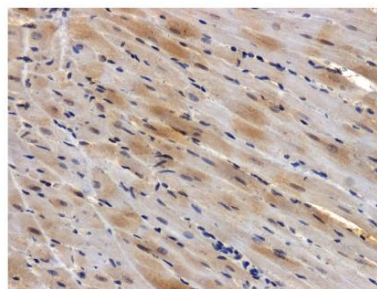


Fig. 3. Positive cytoplasmic immunohistochemistry response to GSK-3B in the heart, x 200.

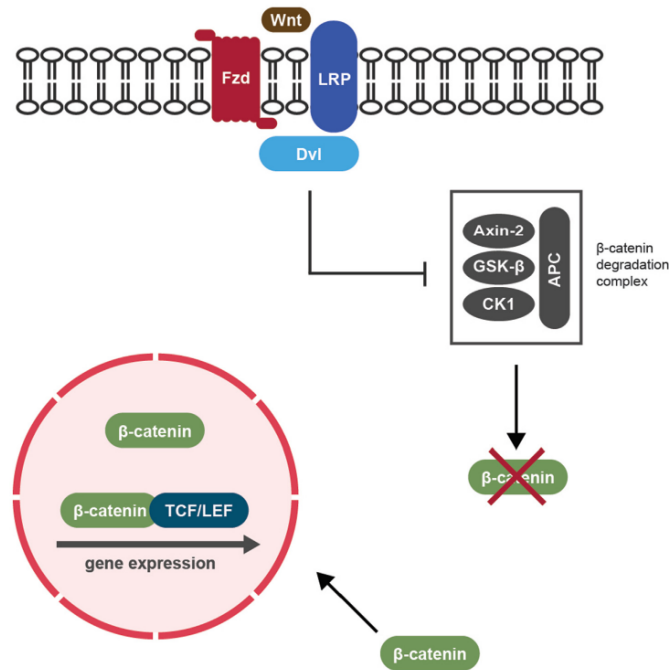


Fig. 4. The canonical pathway is activated while the Wnt ligand attaches to the Fzd receptor and LRP co-receptor. The Dvl protein inhibits the β -catenin destruction complex. β -catenin accumulates in the cytoplasm and finds its way into the nucleus, attaches to transcription factors (TCF/LEF) what results in gene expression. When the β -catenin destruction complex is not inhibited, it results in degradation of β -catenin. Abbreviations: Fzd – frizzled receptor; LRP – low-density lipoprotein receptor-related protein; Dvl – dishevelled protein; GSK- β – glycogen synthase kinase β ; CK1 – casein kinase 1; APC – adenomatous polyposis coli; TCF/LEF – T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor; Axin-2 – axis inhibition protein 2; SHR – spontaneously hypertensive rats.

activation of the Wnt/ β -catenin pathway. An analysis of the regulation of fibrogenesis in an *in vitro* model using primary cultures of heart fibroblasts isolated from rats and incubated in the presence or absence of Ang II showed that Ang II regulated the expression of Wnt ligands. The use of ICG-001 or losartan significantly inhibited the Ang II-induced β -catenin activation as well as the expression of α -smooth muscle actin (α -SMA), fibronectin and collagen I in cardiac fibroblasts. In turn, the incubation of fibroblasts with Wnt3a led to an increase in α -SMA and fibronectin expression, suggesting that Wnt ligands are capable of activating fibroblasts in the heart and overproducing extracellular matrix [56]. In a study of the hearts of people of different ages, a significant increase in the level of β -catenin, calcyclin binding protein/Siah-1 interacting protein (CacyBP/SIP), galectin-3 and Large Multifunctional Protease 7 (LMP7) in the hearts of adult patients over 45 years of age was shown. There were also differences in the number of myocardial cells per 1 mm² and increased cardiomyocyte width in patients over 45 years of age [57]. Furthermore, in the study by Fan et al. [58] the influence of the Wnt/ β -catenin pathway on the proliferation of mature myocardial cells isolated from the heart of a mouse as well as from human and mouse cardiomyocytes derived from mother embryonic stem (ES) cells was assessed. The authors, in order to increase the cytoplasmic level of β -catenin, used anti-N-cadherin antibodies and a GSK inhibitor, which resulted in the proliferation of mature myocardial cells. Research by Hirschy et al. [59] showed that the lack of β -catenin did not affect the structure of cardiomyocytes, while the persistent, stable peptide level, reflecting the activity of the Wnt/ β -catenin pathway, caused the development of dilated cardiomyopathy, and consequently, rapid death.

The influence of an increased level of β -catenin on cardiomyocyte survival, apoptosis and fibrosis process was investigated. A high

β -catenin expression was accompanied by an increase in the level of proteins initiating cell apoptosis and increased expression of fibrosis markers, which was found in hypertensive rats, with a simultaneous decrease in the expression of proteins that improve cardiomyocyte survival: insulin-like growth factor-1 (IGF-1), phosphorylated IGF-1 receptor (p-IGF-1R), phosphorylated phosphoinositide 3-kinase (pPI3K), and phosphorylated Akt (p-Akt) [60]. The relationship between the level of nuclear β -catenin and cardiomyocyte hypertrophy in the human heart after infarction and in rat cardiomyocytes was demonstrated by Lee et al. [61]. The authors proved that with an increase in the nuclear level of β -catenin, the level of proteins involved in the process of cardiomyocyte hypertrophy also increased.

Research by Wang et al. [62] showed overexpression of β -catenin in myocytes of the damaged carotid wall of rats. The authors proved that β -catenin stimulated the anti-apoptotic signaling path, which influenced the remodeling of the damaged blood vessel wall. In response to the action of TGF- β , in the model of myocarditis, the Wnt/ β -catenin pathway was stimulated and cardiac fibroblasts were activated, which led to fibrosis. The use of the ICG-001 inhibitor, inhibited the action of β -catenin and prevented the excessive accumulation of myofibroblasts [63].

In the examination of hearts after ischemia-reperfusion injury, the participation of the canonical Wnt pathway in the reconstruction processes was demonstrated. Increased expression of Wnt1 and β -catenin in epicardium and fibroblasts at the site of damage led to a stimulation of fibroblast proliferation. The authors proved the participation of the Wnt/ β -catenin pathway in the above processes by inhibiting β -catenin, which resulted in the inhibition of fibroblast proliferation in response to damage [64]. The results of research by Nakagawa et al. [65] showed that excessive activation of the Wnt/ β -catenin pathway in the endothelial

Table 2
Wnt/ β -catenin pathway in the heart.

References	Event	Observation	β -catenin level
Zhao et al. [56]	Ang II supply	Increased hypertrophy	↑
Kasacka et al. [57]	ICG-001 supply	Inhibition of hypertrophy	↓
	Aging	Differences in the number of cardiomyocytes and their width	↑
Fan et al. [58]	Proliferation of mature cardiomyocytes	Increased proliferation	↑
Hirschy et al. [59]	Change in the structure of cardiomyocytes	Dilated cardiomyopathy	↑
		No changes	0
Lin et al. [60]	Fibrosis	Increased fibrosis	↑
	cardiomyocyte survival	Decreased survival of cardiomyocytes	↓
Lee et al. [61]	Hypertrophy	Increased hypertrophy	↑
Wang et al. [62]	Damage to the artery wall	Reconstruction of the artery wall	↑
Blyszczuk et al. [63]	Increased TGF- β	Increased fibrosis	↑
Duan et al. [64]	Damage response	Fibroblast proliferation	↑
Nakagawa et al. [65]	Suppression of cardioprotective factors	Heart failure	↑
Sasaki et al. [40]	Wnt inhibition	Inhibition of fibrosis after myocardial infarction	↓
Tsaousi et al. [66]	Proliferation of VSMC	Reconstruction of the vessel wall	↑
Ren et al. [67]	Polymorphism Wnt3a rs752107	↑ risk of heart failure	↑
Methatham et al. [68]	ICG-001 supply	↑ essential hypertension	↑
Zhang et al. [69]	In mice after TAC	Inhibition of hypertrophy	↓
	Captopril supply in mice after TAC	↓Wnt3a, improved cardiac function, decreased HBWR, inhibited cardiac apoptosis	↓
Wei et al. [70]	sFRP2 supply in mice with induced cardiac hypertrophy	Alleviated cardiomyocyte hypertrophy and interstitial fibrosis, decreased pressure overload induced cardiomyocyte apoptosis	↓
	The Wnt/ β -catenin agonist LiCl supply	Abolishment of the inhibitory effects of sFRP2 on cardiac hypertrophy and apoptosis	↑
Ye et al. [71]	Deletion of APC gene in mice cardiomyocytes	Ventricular hyperplasia, no effects on fetal survival	↑
	Deletion of cardiac β -catenin	Ventricular hypoplasia, fetal demise	↓
Hulin et al. [72]	Axin-2 expression in heart valves	Contribution in proper heart valve maturation	↓
	↓ Axin-2 expression in heart valves	Contribution in MVD	↑
Badimon et al. [73]	MI in LRP-/- mice	↑ GSK-3 β level in LRP-/- mice higher than GSK-3 β level in Wt mice	↓
	MI in Wt mice		↓
Kuipers et al. [74]	Arterial stiffness and Wnt genes expression	Association between <i>in vivo</i> expression of the Wnt genes: APC, TCF4 with arterial stiffness	↑

Abbreviations: Ang II – angiotensin II; TGF- β – transforming growth factor β ; VSMC – vascular smooth muscle cell; TAC – transverse aortic constriction; sFRP2 – secreted frizzled-related protein 2; MI – myocardial injury; APC – adenomatous polyposis coli; HBWR – heart-to-body weight ratios; LiCl – Lithium chloride; Axin-2 – axis inhibition protein 2; MVD – myxomatous valve disease; Wt – Wild type; TCF4 – transcription factor 4.
 ↑ – increased β -catenin level.
 ↓ – decreased β -catenin level.
 0 – no changes in β -catenin level.

cells of mice led to heart failure by suppressing cardioprotective factors. Research by Sasaki et al. [40] suggested that blocking the signaling of the Wnt/ β -catenin pathway by the use of ICG-001 in the hearts of rats after myocardial infarction had a beneficial effect on the organ, inhibiting the process of fibrosis and apoptosis. At the same time, the contractile function of cardiomyocytes was preserved, which reduced the risk of heart failure. The Wnt4-dependent role of β -catenin in the regulation of the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) in mice undergoing carotid ligation, which caused an increase in the thickness of the inner layer of the vessel wall and the vessel remodeling, was demonstrated by Tsaousi et al. [66]. Additionally, the use of an inhibitor of the Wnt/ β -catenin pathway inhibited the VSMC proliferation.

2.6. Wnt/ β -catenin pathway and arterial hypertension

It is presumed that pathological myocardial hypertrophy is a disorder of adaptation processes and usually leads to changes in the contractile apparatus. Such hypertrophy is often accompanied by increased expression of proteins not involved in contraction, leading to myocardial fibrosis with consequent heart failure [4,5]. Many signaling pathways are involved in this process. The results of the studies conducted so far have provided evidence suggesting a significant role of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in the process of myocardial hypertrophy and fibrosis in arterial hypertension [56,76–78].

Induction of Wnt ligands and, as a result, activation of β -catenin was confirmed in cardiomyocytes and fibroblasts in hypertensive heart disease induced by systemic renin-angiotensin-aldosterone (RAS) stimulation. β -catenin, by inducing the hypertrophic markers - β -MHC and α -actinin, activates the transcription factors c-Myc and Snail1 and stimulates protein expression, which ultimately leads to cardiomyocyte hypertrophy and cardiac dysfunction. On the contrary, myocardial fibrosis is caused by the activation of β -catenin in fibroblasts which are transformed into myofibroblasts, producing components of the interstitial matrix (collagen, fibronectin) [56]. Researchers have increasingly focused on understanding the correlation between the signaling of the Wnt pathway and the occurrence of arterial hypertension. Dysfunction in the course of the Wnt pathway leads to disturbances in the functioning of the organs directly responsible for the regulation of blood pressure. Excessive excitation of the Wnt-induced canonical path enhances the proliferation and the differentiation of VSMCs, leading to changes in vascular wall elasticity and disturbances in blood pressure regulation. Changes in the activity of the Wnt pathway may also cause unfavorable remodeling of the heart muscle and disrupt its function. Moreover, there are reports indicating disturbances in the central regulation of blood pressure in the brainstem related to the activity of the Wnt pathway. Dysregulation of Wnt signaling can lead to disturbances of the RAS system, initiating renal dysfunction and, consequently, leading to arterial pressure disturbances [77]. This was confirmed by Xiao et al. [78] who showed the activation of the Wnt/ β -catenin pathway by the RAS system in rats. The authors showed that the infusion of Ang II led to an increase in systolic blood pressure and an increase in the expression of many genes in the Wnt pathway. On the contrary, the use of an inhibitor of the Wnt/ β -catenin pathway reduced blood pressure. Research by Zhou et al. [79] suggested a relationship between activation of the RAS system and signaling of the Wnt/ β -catenin pathway. Due to the translocation of β -catenin to the cell nucleus, the transcription regulated by the TCF/LEF factors was activated. The use of the β -catenin inhibitor – ICG-001, abolished the expression of RAS genes, preventing its excessive activation and the organ complications related to it. There are documented correlations between the activity of the Wnt/ β -catenin pathway and other signaling pathways in the course of hypertension. In addition to the relationship of the RAS system with the activity of the Wnt/ β -catenin pathway, the correlation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ) – a member of the nuclear superfamily of

ligand-activated transcription factors with the above pathways is also described. RAAS and the Wnt/ β -catenin pathway activate each other in the course of arterial hypertension. Increased activation of the Wnt/ β -catenin pathway inhibits PPAR- γ , while PPAR- γ agonists inhibit the RAAS and Wnt/ β -catenin pathways, simultaneously lowering blood pressure, and have a vasodilating and anti-inflammatory effects [80]. The effect of polymorphism of genes encoding Wnt pathway proteins on the increased risk of primary arterial hypertension has been observed. The Wnt3a rs752107 variant involved in signaling the Wnt/ β -catenin pathway increases the risk of arterial hypertension and heart failure [67]. Studies using the cardiomyocytes of rats with essential hypertension (SHR) showed translocation and increased accumulation of β -catenin in the nuclei of hypertrophic myocardial cells [81]. In turn, the study by Kasacka et al. [82] demonstrated decreased expression of β -catenin and increased expression of CacyBP/SIP and LMP7 (proteasome subunit) in the heart of hypertensive rats compared to normotensive animals. The CacyBP/SIP protein influenced the proteasomal degradation of β -catenin.

The results of the study by Sumida et al. [83] indicated the activation of the classical Wnt pathway through the complement component C1q, released by the macrophages of the aortic wall in hypertensive mice in the process of its remodeling. Due to the increased expression of β -catenin, the VSMC proliferated and consequently changed its structure. At the same time, blocking C1q resulted in decreased signaling of the Wnt/ β -catenin pathway.

Xiang et al. [84] proved that cardiac fibroblasts lacking the expression of β -catenin did not produce collagen when the Wnt/ β -catenin pathway was activated in pressure overload conditions. In the transgenic mouse model, not only was there no fibrosis, but also no cardiomyocyte hypertrophy.

3. Conclusions

Previous reports allow for better understanding the role of the Wnt/ β -catenin pathway in the functioning of the heart, and provide new information on pathophysiological mechanisms leading to cardiac dysfunction and complications in the state of elevated blood pressure. It is necessary to conduct further studies that could contribute to the introduction into clinical practice of antihypertensive drugs whose mechanism of action would be based on silencing the Wnt pathway. Further research is needed to identify and verify inhibitors of the canonical Wnt pathway that maintain balance in the Wnt pathway in normal cells by binding Wnt ligands or blocking receptors, and by stimulating phosphorylation and degradation of β -catenin. Obtaining information on how different factors can alter signaling pathway activity, preventing a range of physiological and pathological tasks leading to human disease, could have important preventative implications.

Financial disclosure

The authors have no funding to disclose.

The author contribution

Study Design: Maryla Młynarczyk, Irena Kasacka.
Data Collection: Maryla Młynarczyk.
Statistical Analysis: n/a.
Data Interpretation: n/a.
Manuscript Preparation: Maryla Młynarczyk, Irena Kasacka.
Literature Search: Maryla Młynarczyk.
Funds Collection: n/a.

Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interests.

References

- [1] Oparil S, Acelajado MC, Bakris GL, Berlowitz DR, Cifková R, Dominiczak AF, et al. Hypertension. *Nat Rev Dis Prim* 2018;4(1):18014. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.14>.
- [2] Iqbal AM, Jamal SF. Essential hypertension. W: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021. Available on: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539859/>.
- [3] Rossier BC, Bochud M, Devuyst O. The hypertension pandemic: an evolutionary perspective. *Physiology* 2017;32(2):112–25. <https://doi.org/10.1152/physiol.00026.2016>.
- [4] Nadar SK, Lip GYH. The heart in hypertension. *J Hum Hypertens* 2021;35(5):383–6. <https://doi.org/10.1038/s41371-020-00427-x>.
- [5] Messerli FH, Rimoldi SF, Bangalore S. The transition from hypertension to heart failure. *JACC Heart Fail* 2017;5(8):543–51. <https://doi.org/10.1016/j.jchf.2017.04.012>.
- [6] Foulquier S, Daskalopoulos EP, Lhuri G, Hermans KCM, Deb A, Blanksteijn WM. WNT signaling in cardiac and vascular disease. *Pharmacol Rev* 2018;70(1):68–141. <https://doi.org/10.1124/pr.117.013896>.
- [7] Kozłowski K, Dobrzyński A. Wnt signaling pathway—its role in regulation of cell metabolism. *Postępy Hig Med Dosw (Online)* 2013;67:1098–108. <https://doi.org/10.5604/17322693.1077719>.
- [8] Arnold AC, Robertson D. Defective Wnt signaling: a potential contributor to cardiometabolic disease? *Diabetes* 2015;64(10):3342–4. <https://doi.org/10.2337/db15-0822>.
- [9] Gessert S, Kühl M. The multiple phases and faces of Wnt signaling during cardiac differentiation and development. *Circ Res* 2010;107(2):186–99. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.221531>.
- [10] Charles L, Triscott J, Dobbs B. Secondary hypertension: discovering the underlying cause. *Am Fam Physician* 2017;96(7):453–61.
- [11] Kasacka I, Piotrowska Z, Lewandowska A. Alterations of rat stomach endocrine cells under renovascular hypertension. *Adv Med Sci* 2014;59(2):190–5. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2014.01.004>.
- [12] Koeners MP, Lewis KE, Ford AP, Paton JF. Hypertension: a problem of organ blood flow supply–demand mismatch. *Future Cardiol* 2016;12(3):339–49. <https://doi.org/10.2217/fca.16.5>.
- [13] Prado AF, Batista RM, Tausus-Santos JE, Gerlach RF. Matrix metalloproteinases and arterial hypertension: role of oxidative stress and nitric oxide in vascular functional and structural alterations. *Biomolecules* 2021;11(4):585. <https://doi.org/10.3390/biom11040585>.
- [14] Schmieder RE. End organ damage in hypertension. *Dtsch Arztebl Int* 2010;107(49):866–73. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2010.0866>.
- [15] van der Veen PH, Geerlings MI, Visseren FLJ, Nathoe HM, Mali WPTM, van der Graaf Y, et al. Hypertensive target organ damage and longitudinal changes in brain structure and function: the second manifestations of arterial disease–magnetic resonance study. *Hypertension* 2015;66(6):1152–8. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06268>.
- [16] Cortese F, Cecere A, Maria Cortese A, Andriani A, Truncellito L, Valente F, et al. Vascular, cardiac and renal target organ damage associated to arterial hypertension: which noninvasive tools for detection? *J Hum Hypertens* 2020;34(6):420–31. <https://doi.org/10.1038/s41371-020-0307-7>.
- [17] Herrmann SM, Textor SC. Renovascular hypertension. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2019;48(4):765–78. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2019.08.007>.
- [18] Modi P, Arsiwalla T. Hypertensive retinopathy. W: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021. Available on: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK52980/>.
- [19] Shamloo AS, Dagnes N, Arya A, Hindricks G. Atrial fibrillation: a review of modifiable risk factors and preventive strategies. *Rom J Intern Med* 2019;57(2):99–109. <https://doi.org/10.2478/rjim-2018-0045>.
- [20] Drazner MH. The progression of hypertensive heart disease. *Circulation* 2011;123(3):327–34. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.845792>.
- [21] Lovic D, Erdine S, Catakoglu AB. How to estimate left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. *Anadolu Kardiyol Derg* 2014;14(4):389–95. <https://doi.org/10.5152/akd.2014.5115>.
- [22] Bang CN, Soliman EZ, Simpson LM, Davis BR, Devereux RB, Okin PM, et al. Electrocardiographic left ventricular hypertrophy predicts cardiovascular morbidity and mortality in hypertensive patients: the ALLHAT study. *Am J Hypertens* 2017;30(9):914–22. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpx067>.
- [23] Sopol MJ, Rosin NL, Lee TD, Légaré JF. Myocardial fibrosis in response to Angiotensin II is preceded by the recruitment of mesenchymal progenitor cells. *Lab Invest* 2011;91(4):565–78. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2010.190>.
- [24] Leong X-F, Ng C-Y, Jaarin K. Animal models in cardiovascular research: hypertension and atherosclerosis. *BioMed Res Int* 2015;2015:528757. <https://doi.org/10.1155/2015/528757>.
- [25] Dornas WC, Silva ME. Animal models for the study of arterial hypertension. *J Biosci* 2011;36(4):731–7. <https://doi.org/10.1007/s12038-011-9097-y>.
- [26] Basting T, Lazartigues E. DOCA-salt hypertension: an update. *Curr Hypertens Rep* 2017;19(4):32. <https://doi.org/10.1007/s11906-017-0731-4>.
- [27] Lee LK, Kim MY, Kim JH, Lee JU, Park BS, Yang SM, et al. A review of deoxycorticosterone acetate-salt hypertension and its relevance for cardiovascular physiotherapy research. *J Phys Ther Sci* 2015;27(1):303–7. <https://doi.org/10.1589/jpts.27.303>.
- [28] Li J, Kemp BA, Howell NL, Massey J, Mińczuk K, Huang Q, et al. Metabolic changes in spontaneously hypertensive rat hearts precede cardiac dysfunction and left

- ventricular hypertrophy. *J Am Heart Assoc* 2019;8(4):e010926. <https://doi.org/10.1161/JAHA.118.010926>.
- [29] Ozono R, Matsumoto T, Shingu T, Oshima T, Teranishi Y, Kambe M, et al. Expression and localization of angiotensin subtype receptor proteins in the hypertensive rat heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;278(3):R781–9. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.278.3.R781>.
- [30] Kasacka I. Quantitative distribution and localization of calcitonin gene-related peptide-like cells in the stomach of two kidney, one clip rats. *J Physiol Pharmacol* 2009;60(2):35–9.
- [31] Ferraz L, Moreira B, de Queiroz G, Formigari R, Esquiato M, Felonato M, et al. Tissue-specific transcriptional regulation of epithelial/endothelial and mesenchymal markers during renovascular hypertension. *Mol Med Res* 2019;20(5):4467–76. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10722>.
- [32] Ammarguella FZ, Gannon PO, Amiri F, Schiffrin EL. Fibrosis, matrix metalloproteinases, and inflammation in the heart of DOCA-salt hypertensive rats: role of ET_A receptors. *Hypertension* 2002;39(2 Pt 2):679–84. <https://doi.org/10.1161/hy0202.103481>.
- [33] Kasacka I, Piotrowska Z, Domian N, Acewicz M, Lewandowska A. Canonical Wnt signaling in the kidney in different hypertension models. *Hypertens Res* 2021;44(9):1054–66. <https://doi.org/10.1038/s41440-021-00689-z>.
- [34] Park FB, Kim JW, Baek KH. Regulation of Wnt signaling through ubiquitination and deubiquitination in cancers. *Int J Mol Sci* 2020;21(11):3904. <https://doi.org/10.3390/ijms21113904>.
- [35] MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/ β -Catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 2009;17(1):9–26. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016>.
- [36] Anthony CG, Robbins DJ, Ahmed Y, Lee E. Nuclear regulation of Wnt/ β -catenin signaling: it's a complex situation. *Genes* 2020;11(8):886. <https://doi.org/10.3390/genes11080886>.
- [37] Jho E, Zhang T, Domon C, Joo C-K, Freund J-N, Costantini F. Wnt/ β -Catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol Cell Biol* 2002;22(4):1172–83. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.4.1172-1183.2002>.
- [38] Steinhart Z, Angers S. Wnt signaling in development and tissue homeostasis. *Development* 2018;145(11):dev146589. <https://doi.org/10.1242/dev.146589>.
- [39] Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -Catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities. *Cell* 2017;169(6):985–99. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.016>.
- [40] Sasaki T, Hwang H, Nguyen C, Kloner RA, Kahn M. The small molecule Wnt signaling modulator ICC-001 improves contractile function in chronically infarcted rat myocardium. *Ramchandran R, editor. PLoS One* 2013;8(9):e75010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075010>.
- [41] Krishnamurthy N, Kurzrock R. Targeting the Wnt/ β -catenin pathway in cancer: update on effectors and inhibitors. *Cancer Treat Rev* 2018;62:50–60. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.11.002>.
- [42] Perry JM, Tao F, Roy A, Lin T, He XC, Chen S, et al. Overcoming Wnt- β -catenin dependent anticancer therapy resistance in leukaemia stem cells. *Nat Cell Biol* 2020;22(6):689–700. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0507-y>.
- [43] Z Piotrowska, Niegoda M, Młynarczyk G, Acewicz M, Kasacka I. Comparative assessment of the WNT/ β -Catenin pathway, CacyBP/SIP, and the immunoproteasome subunit LMP7 in various histological types of renal cell carcinoma. *Front Oncol* 2020;10:566637. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.566637>.
- [44] Fahiminiya S, Majewski J, Mort J, Moffatt P, Glorieux FH, Rauch F. Mutations in WNT1 are a cause of osteogenesis imperfecta. *J Med Genet* 2013;50(5):345–8. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-101567>.
- [45] Manolagas SC. Wnt signaling and osteoporosis. *Maturitas* 2014;78(3):233–7. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2014.04.013>.
- [46] Wan W, Xia S, Kalionis B, Liu L, Li Y. The role of Wnt signaling in the development of Alzheimer's disease: a potential therapeutic target? *BioMed Res Int* 2014;2014:1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/301575>.
- [47] Nikopoulos K, Venselaar H, Collin RWJ, Riveiro-Alvarez R, Boonstra FN, Hooymans JMM, et al. Overview of the mutation spectrum in familial exudative vitreoretinopathy and Norrie disease with identification of 21 novel variants in FZD4, LRP5, and NDP. *Hum Mutat* 2010;31(6):656–66. <https://doi.org/10.1002/humu.21250>.
- [48] Palmke A, Conant G, Huyer LD, Zhao Y, Feric N, Radstic M. The role of Wnt regulation in heart development, cardiac repair and disease: a tissue engineering perspective. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;473(3):698–703. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.11.060>.
- [49] Fu W, Wang WE, Zeng C. Wnt signaling pathways in myocardial infarction and the therapeutic effects of Wnt pathway inhibitors. *Acta Pharmacol Sin* 2019;40(1):9–12. <https://doi.org/10.1038/s41401-018-0060-4>.
- [50] Ruiz-Villalba A, Hoppler S, van den Hoff MJB. Wnt signaling in the heart fields: variations on a common theme: Wnt signaling in the heart fields. *Dev Dynam* 2016;245(3):294–306. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24372>.
- [51] Ozhan G, Weidinger G. Wnt/ β -catenin signaling in heart regeneration. *Cell Regen* 2015;4(1):3. <https://doi.org/10.1186/s13619-015-0017-8>.
- [52] Buikema J, Zwetsloot P-P, Doevendans P, Domian I, Sluiter J. Wnt/ β -Catenin signaling during cardiac development and repair. *J Cardiovasc Dev Dis* 2014;1(1):98–110. <https://doi.org/10.3390/jcdd1010098>.
- [53] Bergmann MW. WNT Signaling in adult cardiac hypertrophy and remodeling: lessons learned from cardiac development. *Circ Res* 2010;107(10):1198–208. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223768>.
- [54] Marinou K, Christodoulides C, Antoniadis C, Koutsilieris M. Wnt signaling in cardiovascular physiology. *Trends Endocrinol Metabol* 2012;23(12):628–36. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.06.001>.
- [55] Lorenzon A, Calore M, Poloni G, De Windt LJ, Braghetta P, Rampazzo A. Wnt/ β -catenin pathway in arrhythmogenic cardiomyopathy. *Oncotarget* 2017;8(36):60640–55. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17457>.
- [56] Zhao Y, Wang C, Wang C, Hong X, Miao J, Liao Y, et al. An essential role for Wnt/ β -catenin signaling in mediating hypertensive heart disease. *Sci Rep* 2018;8(1):8996. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27064-2>.
- [57] Kasacka I, Z Piotrowska, Niegoda M, Lewandowska A, Lebkowski W. Ageing-related changes in the levels of β -catenin, CacyBP/SIP, galectin-3 and immunoproteasome subunit LMP7 in the heart of men. *PLoS One* 2020;15(3):e0229462. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229462>.
- [58] Fan Y, Ho BX, Pang JKS, Pek NMQ, Hor JH, Ng S-Y, et al. Wnt/ β -catenin-mediated signaling re-activates proliferation of matured cardiomyocytes. *Stem Cell Res Ther* 2018;9(1):338. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-1086-8>.
- [59] Hirschy A, Croquelois A, Perriard E, Schoenauer R, Agarkova I, Hoerstrup SP, et al. Stabilised β -catenin in postnatal ventricular myocardium leads to dilated cardiomyopathy and premature death. *Basic Res Cardiol* 2010;105(5):597–608. <https://doi.org/10.1007/s00395-010-0101-8>.
- [60] Lin JC, Kuo WW, Baskaran R, Chen MC, Ho TJ, Chen RJ, et al. Enhancement of β -catenin in cardiomyocytes suppresses survival protein expression but promotes apoptosis and fibrosis. *Cardiol J* 2017;24(2):195–205. <https://doi.org/10.5603/CJ.a2016.0087>.
- [61] Lee CY, Kuo WW, Baskaran R, Day CH, Pai PY, Lai CH, et al. Increased β -catenin accumulation and nuclear translocation are associated with concentric hypertrophy in cardiomyocytes. *Cardiovasc Pathol* 2017;31:9–16. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2017.07.003>.
- [62] Wang X, Xiao Y, Mou Y, Zhao Y, Blankestejn WM, Hall JL. A role for the β -catenin/T-cell factor signaling cascade in vascular remodeling. *Circ Res* 2002;90(3):340–7. <https://doi.org/10.1161/hh0302.104466>.
- [63] Blyszczuk P, Müller-Edenborn B, Valenta T, Osto E, Stellato M, Behnke S, et al. Transforming growth factor- β -dependent Wnt secretion controls myofibroblast formation and myocardial fibrosis progression in experimental autoimmune myocarditis. *Eur Heart J* 2017;38(18):1413–25. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw116>.
- [64] 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: Wnt1/ β -catenin injury response regulates cardiac repair. *EMBO J* 2012;31(2):429–42. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.418>.
- [65] Nakagawa A, Naito AT, Sumida T, Nomura S, Shibamoto M, Higo T, et al. Activation of endothelial β -catenin signaling induces heart failure. *Sci Rep* 2016;6:25009. <https://doi.org/10.1038/srep25009>.
- [66] Tsaousi A, Williams H, Lyon CA, Taylor V, Swain A, Johnson JL, et al. Wnt4/ β -Catenin signaling induces VSMC proliferation and is associated with intimal thickening. *Circ Res* 2011;108(4):427–36. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.233999>.
- [67] Ren H, Luo J-Q, Ouyang F, Cheng L, Chen X-P, Zhou H-H, et al. WNT3A rs752107(C > T) polymorphism is associated with an increased risk of essential hypertension and related cardiovascular diseases. *Front Cardiovasc Med* 2021 Jul 12;8:675222. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.675222>.
- [68] Methatham T, Tomida S, Kimura N, Imai Y, Aizawa K. Inhibition of the canonical Wnt signaling pathway by a β -catenin/CBP inhibitor prevents heart failure by ameliorating cardiac hypertrophy and fibrosis. *Sci Rep* 2021;11(1):14886. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94169-6>.
- [69] Zhang Y, Zhang L, Fan X, Yang W, Yu B, Kou J, et al. Captopril attenuates TAC-induced heart failure via inhibiting Wnt3a/ β -catenin and Jak2/Stat3 pathways. *Biomed Pharmacother* 2019;113:108780. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108780>.
- [70] Wei W-Y, Zhao Q, Zhang W, Wang M, Li Y, Wang S, et al. Secreted frizzled-related protein 2 prevents pressure-overload-induced cardiac hypertrophy by targeting the Wnt/ β -catenin pathway. *Mol Cell Biochem* 2020;472(1–2):241–51. <https://doi.org/10.1007/s11010-020-03802-x>.
- [71] Ye B, Hou N, Xiao L, Xu Y, Boyer J, Xu H, et al. APC controls asymmetric Wnt/ β -catenin signaling and cardiomyocyte proliferation gradient in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 2015;89:287–96. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.10.018>.
- [72] Hulin A, Moore V, James JM, Yutzy KE. Loss of Axin2 results in impaired heart valve maturation and subsequent myxomatous valve disease. *Cardiovasc Res* 2017;113(1):40–51. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvw229>.
- [73] Badimon L, Casaní L, Camino-Lopez S, Juan-Babot O, Borrrell-Pages M. GSK3 β inhibition and canonical Wnt signaling in mice hearts after myocardial ischemic damage. In: Kato M, editor. *PLoS ONE*. 14; 2019. e0218098. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218098>.
- [74] Kuipers AL, Miljkovic I, Barinas-Mitchell E, Nesterode CS, Cvejkus RK, Wheeler VW, et al. Wnt pathway gene expression is associated with arterial stiffness. *JAMA [Internet]* 2020 Feb 4 [cited 2021 Oct 25];9(3). Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/JAHA.119.014170>.
- [75] Dawson K, Aflaki M, Nattel S. Role of the Wnt-Frizzled system in cardiac pathophysiology: a rapidly developing, poorly understood area with enormous potential: the Wnt-Frizzled system in cardiac pathophysiology. *J Physiol* 2013;591(6):1409–32. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.235382>.
- [76] ter Horst P, Smits JFM, Blankestejn WM. The Wnt/Frizzled pathway as a therapeutic target for cardiac hypertrophy: where do we stand? Wnt signalling in cardiac hypertrophy. *Acta Physiol (Oxf)* 2012;204(1):110–7. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2011.02309.x>.
- [77] Abou Ziki MD, Mani A. Wnt signaling, a novel pathway regulating blood pressure? State of the art review. *Atherosclerosis* 2017;262:171–8. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.05.001>.

- [78] Xiao L, Xu B, Zhou L, Tan RJ, Zhou D, Fu H, et al. Wnt/ β -catenin regulates blood pressure and kidney injury in rats. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Mol Basis Dis* 2019;1865(6):1313–22. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2019.01.027>.
- [79] Zhou L, Li Y, Hao S, Zhou D, Tan RJ, Nie J, et al. Multiple genes of the renin-angiotensin system Are novel targets of Wnt/ β -catenin signaling. *J Am Soc Nephrol* 2015;26(1):107–20. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014010085>.
- [80] Vallée A, Lévy BL, Blacher J. Interplay between the renin-angiotensin system, the canonical WNT/ β -catenin pathway and PPAR γ in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2018 Jul;20(7):62.
- [81] Zheng Q, Chen P, Xu Z, Li F, Yi XP. Expression and redistribution of β -catenin in the cardiac myocytes of left ventricle of spontaneously hypertensive rat. *J Mol Histol* 2013;44(5):565–73. <https://doi.org/10.1007/s10735-013-9507-6>.
- [82] Kasacka I, Ż Piotrowska, Weresa J, Filipiek A. Comparative evaluation of CacyBP/SIP protein, β -catenin, and immunoproteasome subunit LMP7 in the heart of rats with hypertension of different etiology. *Exp Biol Med (Maywood)* 2018; 243(15–16):1199–206. <https://doi.org/10.1177/1535370218815435>.
- [83] Sumida T, Naito AT, Nomura S, Nakagawa A, Higo T, Hashimoto A, et al. Complement C1q-induced activation of β -catenin signalling causes hypertensive arterial remodelling. *Nat Commun* 2015;6:6241. <https://doi.org/10.1038/ncomms7241>.
- [84] Xiang F-L, Fang M, Yutzey KE. Loss of β -catenin in resident cardiac fibroblasts attenuates fibrosis induced by pressure overload in mice. *Nat Commun* 2017;8(1): 712. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00840-w>.

5.2. Publikacja II



Article

Evaluation of the Canonical Wnt Signaling Pathway in the Hearts of Hypertensive Rats of Various Etiologies

Maryla Anna Mlynarczyk , Natalia Domian and Irena Kasacka *

Department of Histology and Cytophysiology, Medical University of Białystok, 15-222 Białystok, Poland; maryla.mlynarczyk@sd.umb.edu.pl (M.A.M.); natalia.domian@umb.edu.pl (N.D.)

* Correspondence: kasacka@umb.edu.pl or histologia.cytofizjologia@umb.edu.pl; Tel.: +48-85-748-5458

Abstract: Wnt/ β -catenin signaling dysregulation is associated with the pathogenesis of many human diseases, including hypertension and heart disease. The aim of this study was to immunohistochemically evaluate and compare the expression of the Fzd8, WNT1, GSK-3 β , and β -catenin genes in the hearts of rats with spontaneous hypertension (SHRs) and deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt-induced hypertension. The myocardial expression of Fzd8, WNT1, GSK-3 β , and β -catenin was detected by immunohistochemistry, and the gene expression was assessed with a real-time PCR method. In SHRs, the immunoreactivity of Fzd8, WNT1, GSK-3 β , and β -catenin was attenuated in comparison to that in normotensive animals. In DOCA-salt-induced hypertension, the immunoreactivity of Fzd8, WNT1, GSK-3 β , and β -catenin was enhanced. In SHRs, decreases in the expression of the genes encoding Fzd8, WNT1, GSK-3 β , and β -catenin were observed compared to the control group. Increased expression of the genes encoding Fzd8, WNT1, GSK-3 β , and β -catenin was demonstrated in the hearts of rats with DOCA-salt-induced hypertension. Wnt signaling may play an essential role in the pathogenesis of arterial hypertension and the accompanying heart damage. The obtained results may constitute the basis for further research aimed at better understanding the role of the Wnt/ β -catenin pathway in the functioning of the heart.

Keywords: Wnt/ β -catenin; arterial hypertension; essential hypertension; secondary hypertension; myocardium



Citation: Mlynarczyk, M.A.; Domian, N.; Kasacka, I. Evaluation of the Canonical Wnt Signaling Pathway in the Hearts of Hypertensive Rats of Various Etiologies. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 6428. <https://doi.org/10.3390/ijms25126428>

Academic Editor: Alexei Y. Bagrov

Received: 20 May 2024

Revised: 4 June 2024

Accepted: 9 June 2024

Published: 11 June 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Arterial hypertension is a complex disease that affects a large part of the world's population. In most cases, this disease develops slowly, over a long period of time, without noticeable symptoms. On the other hand, the complications of untreated hypertension can be life-threatening [1–3].

In 90% of cases, hypertension is primary and its cause is unknown. In 10%, arterial hypertension occurs secondary to other disorders of the body's functioning [4,5]. The heart is the organ most affected by the complications of hypertension, which can cause impaired blood flow, unfavorable cardiomyocyte remodeling, and hypertrophy of the left ventricular wall, leading to heart failure [6,7]. An increase in blood pressure may be genetically determined or associated with environmental factors.

In recent years, much attention has been paid to the Wnt/ β -catenin signaling pathway, which is important for maintaining the homeostasis of the body [8,9]. The Wnt pathway is involved in many physiological as well as disease-related processes. The most important mediator of signal transduction in the canonical pathway is β -catenin. An increase in its concentration in the cytoplasm is associated with the activation of this pathway. In the absence of stimulation, the concentration of β -catenin is kept at a low level by its degradation in proteasomes [10,11]. Inhibition of the degradation complex involves adenomatous polyposis coli protein (APC), casein kinase 1 (CK1), and glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β). Activating the Frizzled (Fzd) receptor leads to an increase in the level of β -catenin in the

cytoplasm of the cell and its translocation to the nucleus, where it induces the expression of Wnt-dependent genes [10,12,13].

The Wnt/ β -catenin signaling pathway participates in organogenesis and tissue homeostasis, and its dysregulation is associated with the pathogenesis of many human diseases, including hypertension and heart disease [12,14–19]. The studies conducted so far show that the Wnt/ β -catenin signaling pathway plays a key role in the development of myocardial hypertrophy, myocardial fibrosis, ventricular remodeling, heart failure, and other pathophysiological processes [20,21].

Abnormalities in the functioning of organs directly responsible for blood pressure regulation may be related to dysregulated Wnt/ β -catenin signaling [22,23].

Understanding the molecular mechanisms of structural and functional heart pathologies in hypertension and identifying physiological and exogenous factors that can modulate the course of this disease and influence a patient's further prognosis seem particularly important for the development of modern and effective therapeutic strategies.

Considering the above, we decided to conduct research aimed at evaluating the main elements of the Wnt/ β -catenin pathway in the hearts of hypertensive rats of various etiologies. The aim of this study was to immunohistochemically evaluate and compare the expression of the Fzd8, WNT1, GSK-3 β , and β -catenin genes in the hearts of rats with spontaneous hypertension (SHRs) and DOCA-salt-induced hypertension.

2. Results

In rats in the study groups, systolic hypertension was found (SHRs: 160.8 ± 3.3 (WKY: 122.3 ± 2.3), DOCA-salt: 180.0 ± 13.0 (UNX: 126.0 ± 4.0)).

2.1. Immunohistochemistry

Positive immunohistochemical reactions for Fzd8, WNT1, GSK-3 β , and β -catenin were observed in the hearts of all rats tested, although the severities of the reactions in the control and hypertensive rats were different.

The intensity of the immunohistochemical reaction showing Fzd8 was weaker in the hearts of the primary hypertensive rats (Figure 1B) and stronger in the secondary hypertensive rats (Figure 1D) compared to the control rats (Figure 1A,C).

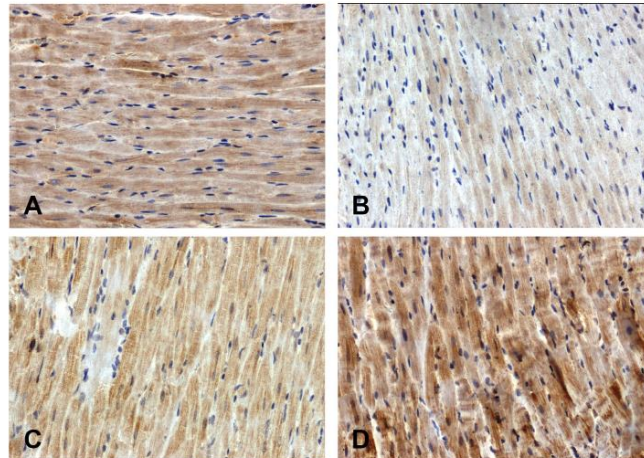


Figure 1. Immunohistochemical analysis of Fzd8 in the hearts of the rats: (A)—WKY, (B)—SHR, (C)—UNX, (D)—DOCA-salt.

The Wnt1 immunoreactivity in the hearts of the normotensive rats was strong (Figure 2A) or moderate (Figure 2C). The intensity of the reaction was attenuated in the hearts of the SHRs (Figure 2B) and enhanced in the DOCA-salt group (Figure 2D).

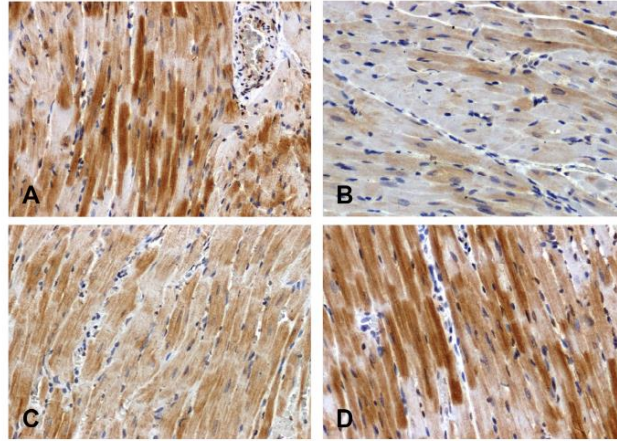


Figure 2. Immunohistochemical analysis of Wnt1 in the hearts of the rats: (A)—WKY, (B)—SHR, (C)—UNX, (D)—DOCA-salt.

The hearts of the WKY rats showed stronger GSK-3 β immunodetection (Figure 3A) compared to those observed in the SHR group (Figure 3B). The increase in secondary pressure (Figure 3D) led to an increase in GSK-3 β immunoreactivity compared to the normotensive UNX group (Figure 3C).

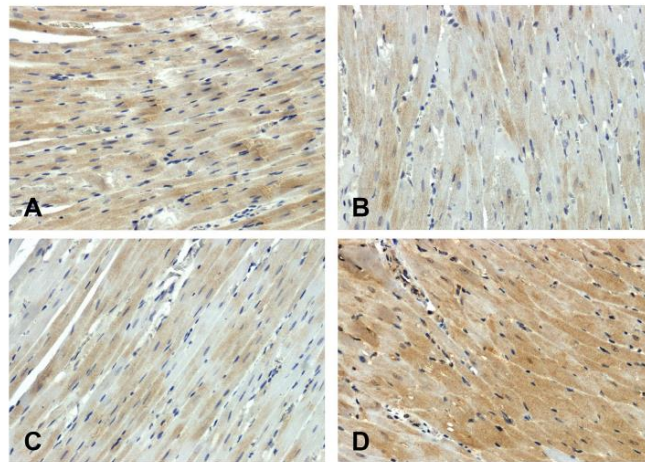


Figure 3. Immunohistochemical analysis of GSK-3 β in the hearts of the rats: (A)—WKY, (B)—SHR, (C)—UNX, (D)—DOCA-salt.

In the hearts of all rats, the immunohistochemical reaction using an antibody against β -catenin was positive in intercalated discs (Figure 4). In the SHR hearts, β -catenin immunoreactivity was attenuated (Figure 4B) in relation to the WKY group (Figure 4A), while in the hearts of the secondary hypertensive rats (Figure 4D), this reaction was enhanced compared to the UNX group (Figure 4C).

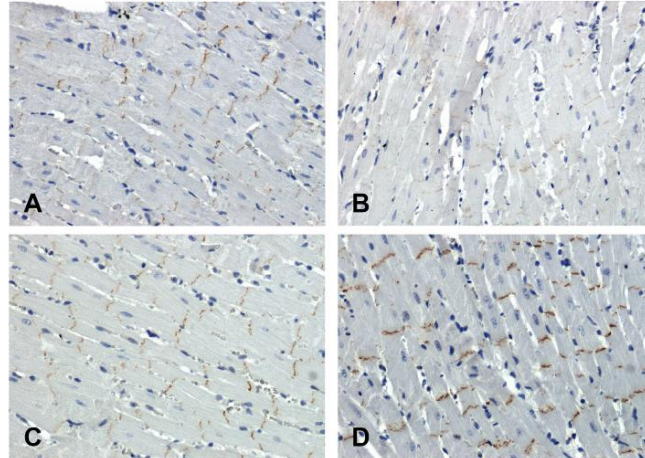


Figure 4. Immunohistochemical analysis of β -catenin in the hearts of the rats: (A)—WKY, (B)—SHR, (C)—UNX, (D)—DOCA-salt.

Morphometric image analysis results are presented in Table 1.

Table 1. Intensity of immunoreactions determining Fzd8, WNT1, GSK-3 β , and β -catenin in hearts of normotensive and hypertensive rats (means \pm SEs).

Groups of Rats	Intensity of Immunohistochemical Reaction in Heart Scale from 0 (White Pixel) to 255 (Black Pixel)			
	Fzd8	WNT1	GSK-3 β	β -Catenin
WKY	143.2 \pm 4.12	157.72 \pm 5.99	93.67 \pm 1.87	157.27 \pm 1.98
SHRs	64.52 \pm 8.37 * \downarrow	72.79 \pm 7.35 * \downarrow	67.82 \pm 2.97 \downarrow	86.29 \pm 4.63 * \downarrow
UNX	110.67 \pm 4.51	116.84 \pm 2.61	75.08 \pm 5.23	162.88 \pm 1.75
DOCA-salt	174.67 \pm 5.58 * \uparrow	168.09 \pm 6.97 * \uparrow	136.65 \pm 6.45 * \uparrow	183.67 \pm 1.57 * \uparrow

* $p < 0.05$ (hypertension vs. control); \uparrow —intensification of immunohistochemical reaction; \downarrow —weakening of immunohistochemical reaction.

2.2. Real-Time PCR

In the hearts of the SHRs, decreases in the expression of the genes encoding Fzd8, WNT1, GSK-3 β , and β -catenin were observed compared to the control group (WKY) (Figure 5), and the differences were statistically significant in the cases of WNT1 (Figure 5B) and β -catenin (Figure 5D). However, in the hearts of the rats with secondary hypertension, increases in the gene expression of all tested proteins were found in relation to the control group (UNX). The differences in the expression of the genes encoding Wnt1 (Figure 5B) and β -catenin (Figure 5D) were found to be statistically significant.

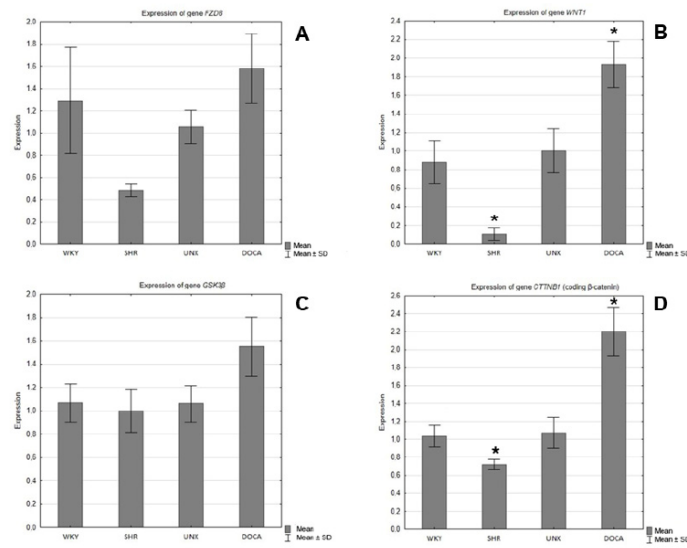


Figure 5. Expression of genes encoding (A) FZD8, (B) WNT1, (C) GSK-3 β , and (D) β -catenin in hearts of normotensive and hypertensive rats ($* p < 0.05$).

3. Discussion

Many factors and molecular pathways are involved in the pathogenesis of hypertension, the determination and explanation of which is an ongoing challenge for scientists and clinicians. Understanding the mechanisms of the multifactorial origin of hypertension and the various interactive regulations aimed at compensating for the action of vasoactive mediators is important in determining appropriate and effective treatments [1]. Untreated or ineffectively treated hypertension leads to damage to many organs. Important complications of hypertension include ischemic heart disease, cardiac arrhythmias, and heart failure, which pose serious risk of death [6].

In this study, we examined and compared the expression patterns of Fzd8, WNT1, GSK-3 β , and β -catenin in the hearts of hypertensive rats of different etiologies. The results indicated differences in the expression of elements of the canonical Wnt pathway depending on the type of hypertension. In SHR hearts, the expression of all examined parameters was reduced (statistical significance was found for Wnt1 and β -catenin), while secondary hypertension caused increases in the expression of the investigated elements of Wnt/ β -catenin signaling, which were especially significant for the Wnt1 ligand and β -catenin.

In addition to the proven involvement of the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway in the process of embryogenesis and the proliferation of cardiac muscle cells [15,16], it also plays an important role in the remodeling of the heart muscle and cardiomyocytes in pathological conditions of this organ [8,9,24]. In a study of the heart after ischemia–reperfusion injury, the involvement of the Wnt/ β -catenin pathway in the processes of cardiac tissue remodeling in response to injury was demonstrated. Wnt1 was upregulated in the region of the injury and induced cardiac fibroblasts to proliferate and express pro-fibrotic genes, which prevented ventricular dilatation [25].

Mutual activation or inhibition of various pathways may be associated with the occurrence of hypertension. In hypertension, impaired activation of the renin–angiotensin–aldosterone system (RAAS), which is a critical regulator of blood volume, is often observed. Dysregulation of the Wnt signaling pathway may lead to disorders of the RAAS, conse-

quently leading to disturbances in blood pressure homeostasis [26,27]. Research by Xiao et al. in an animal model showed an increase in the expression of Wnt pathway genes in rat kidneys in response to angiotensin II infusion. Moreover, the use of an inhibitor of the Wnt/ β -catenin pathway reduced blood pressure [28]. According to the literature, in spontaneous hypertensive rats the plasma activity of the RAAS is increased and decreased in the course of secondary hypertension (DOCA-salt) [29]. In our study, we observed decreased expression in the Wnt/ β -catenin pathway in the hearts of SHRs and observed intense activity in this pathway in DOCA-salt rats. Based on the obtained results, we expect additional mechanisms regulating the activity of the Wnt pathway in hypertensive rat hearts.

The decrease in β -catenin expression in the SHR hearts presented in the current publication is consistent with reports by Zheng et al., who also found reduced β -catenin immunoreactivity in the intercalated discs of cardiomyocytes in an SHR group [30]. Other studies conducted using an experimental model of heart failure also showed decreases in β -catenin levels in the heart tissues of guinea pigs and hamsters [31,32].

Hypertrophy of cardiomyocytes is one of the main consequences of arterial hypertension. There is a large amount of evidence for the involvement of the Wnt/ β -catenin pathway in cardiomyocyte remodeling processes. Research by Hirschy et al. showed that a persistent, stable peptide level, reflecting the activity of the Wnt/ β -catenin pathway, caused the development of dilated cardiomyopathy and premature death in mice [33]. Another study demonstrated that genetic depletion of β -catenin significantly enhanced left ventricular function and survival in mice experiencing myocardial infarction, whereas stabilization of β -catenin had the opposite effect [34]. Xiang et al. proved that cardiac fibroblasts without β -catenin expression did not produce collagen when the Wnt/ β -catenin pathway was activated under pressure-overload conditions. In a transgenic mouse model, this absence of β -catenin resulted in neither fibrosis nor cardiomyocyte hypertrophy [35]. Complications of primary hypertension in rat models, such as cardiomyocyte hypertrophy, may be observed due to the long-lasting state of elevated blood pressure, so the decreased activity of β -catenin could be considered an adaptive mechanism used to minimize hypertrophy. In this way, we could try to explain the decrease in the activity of the Wnt/ β -catenin system in our study in the hearts of rats with essential hypertension. It is probable that additional signaling pathways inhibiting the Wnt/ β -catenin cascade are also activated to provide protection against elevated blood pressure. There are reports indicating the role of Wnt/ β -catenin pathway inhibitors in the prevention of cardiovascular diseases and their complications. The emerin protein found in skeletal muscle cells and cardiomyocytes is responsible, among other things, for regulating gene expression, maintaining the proper structure of the nucleus, and cell signaling. It has been shown that emerin maintains β -catenin at the proper level in the cell. A study on mice whose cardiomyocytes were deprived of emerin under conditions of pressure overload showed excessive expression of β -catenin and unfavorable tissue remodeling [36]. In another study, in the hearts of hypertensive rats subjected to angiotensin II (Ang II) infusions, high expression of β -catenin was observed. The above results suggest that the cardiomyocyte hypertrophy induced by Ang II is associated with excessive activity of the Wnt/ β -catenin pathway. Simultaneously, the use of the β -catenin inhibitor ICG-001 blocks the expression of α -actin and myosin heavy chains (β -MHCs) in hypertrophic hearts [37].

Taking into account the limited number of reports indicating the relationship of the Wnt/ β -catenin pathway with arterial hypertension, it is important and justified to investigate its involvement in this disease. The present study showed different changes in the Wnt/ β -catenin signaling pathway in the hearts of rats with primary and secondary hypertension. This study was the first to evaluate components of the classical Wnt/ β -catenin signaling pathway in various types of hypertension using immunohistochemical and molecular methods. In our work, we demonstrated that changes in the activity of the Wnt/ β -catenin pathway in hypertension may occur at every level of this pathway. It should be noted that the intensity of the changes in the Wnt/ β -catenin pathway in the heart

depends on the etiology of the hypertension. The presented results may constitute the basis for further research aimed at better understanding the role of the Wnt/ β -catenin pathway in the functioning of the heart, as well as the pathophysiological mechanisms leading to its dysfunction and complications in the state of elevated blood pressure. It is imperative to conduct additional research that may facilitate the integration of antihypertensive medications into clinical practice. Their mechanism of action would be based on inhibiting the Wnt pathway. A more detailed understanding of the role of the WNT/ β -catenin pathway in hypertension-associated disturbances of heart functioning requires further investigation.

4. Materials and Methods

The research material came from the Department of Experimental Physiology and Pathophysiology, Medical University of Białystok, courtesy of Professor Barbara Malinowska. The procedures performed on experimental animals were approved by the Local Ethics Committee for Animal Research in Olsztyn. Six-week-old male animals with initial weights of 170–200 g were kept at a constant humidity ($60 \pm 5\%$) and temperature (22 ± 1 °C). A 12/12-h light/dark cycle was maintained. The rats had free access to standard pelleted food and drinking water.

The experimental animals were divided into four groups:

SHRs—seven male rats with genetically determined systemic hypertension from an inbred strain established from Wistar rats selected for high blood pressure.

WKY—five normotensive male Wistar Kyoto rats as a reference for the SHR group.

DOCA-salt—seven male Wistar rats that underwent unilateral nephrectomies and were then rendered hypertensive using a salt-rich diet and Deoxycorticosterone Acetate (DOCA) injections.

UNX—five normotensive male Wistar rats that were only uninephrectomized as a reference for the DOCA-salt-induced hypertensive rats.

4.1. DOCA-Salt Hypertension

The DOCA-salt animals were anesthetized by intraperitoneal injections of sodium pentobarbital (300 μ mol or ~ 70 mg/kg body weight (bw)). Their right kidneys were removed through right lateral abdominal incisions. After a 1-week recovery period, hypertension was induced for 4 weeks by s.c. DOCA injections (67 μ mol or ~ 25 mg/kg in 0.4 mL/kg dimethylformamide (DMF)) twice weekly and replacing their drinking water with a 1% sodium chloride (NaCl) solution. The normotensive control rats that received unilateral nephrectomies (UNX) also had their kidneys removed but received subcutaneous DMF (0.4 mL/kg) twice a week and drank tap water.

4.2. Indirect Blood Pressure Measurement

After 6 weeks, the systolic blood pressure was measured in all animals by a non-invasive tail cuff method (rat tail blood pressure monitor, Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Germany). The measurements were considered reliable if three consecutive measurements did not differ by more than 5 mmHg. Then, the average was taken. Hypertension (systolic blood pressure (SBP) values equal to or greater than 150 mmHg) was verified in the SHRs and DOCA-salt animals.

4.3. Collection and Fixation of Material

After 6 weeks, heart muscle fragments were collected from all rats under deep anesthesia with pentobarbital (50 mg/kg body weight). Cardiac tissue was immediately fixed in 4% buffered formalin and routinely embedded in paraffin or placed in an RNAlater solution (AM7024 Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) and stored at -80 °C. Paraffin blocks were cut into 4 μ m sections and stained with hematoxylin and eosin for general histological evaluation. Immunohistochemical reactions were performed to detect Fzd8, Wnt1, GSK-3 β , and β -catenin. The samples stored in the RNAlater solution were analyzed by real-time PCR to assess the expression of the genes encoding Fzd8, Wnt1, GSK-3 β , and β -catenin.

4.4. Immunohistochemistry

Immunostaining was carried out by the following protocol (Kasacka et al., 2018) [38]: Paraffin-embedded sections were deparaffinized and hydrated in pure alcohols. Sections of the left ventricles of the hearts were subjected to pretreatment in a pressure chamber and heated using appropriate Target Retrieval Solutions (Citrate (pH = 6.0) (S 2369; Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) (for β -catenin) and TRS (pH = 9.0) (S 2367; Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) (for Fzd8, Wnt1, and GSK-3 β)). After cooling to room temperature, the sections were incubated with Dako REAL Peroxidase-Blocking Solution (S 2023; Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, CA, USA). The sections were incubated with the primary antibodies for Fzd8 (1:400; ab155093, Abcam, Cambridge, UK), Wnt-1 (1:500; ab189001, Abcam, Cambridge, UK), GSK-3 β (1:100; ab68476, Abcam, Cambridge, UK), and β -catenin (1:2000; ab32572, Abcam, Cambridge, UK) for 24 h at +4 °C in a humidified chamber. This procedure was followed by incubation with the secondary antibody (REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse detection kit (K5007; Agilent Technologies Denmark Ap/S, Produktionsvej 42, 2600 Glostrup, Denmark)). The bound antibodies were visualized by incubation with DAB Flex chromogen. Finally, the left ventricles of the heart sections were counterstained with hematoxylin QS (H-3404 Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and observed under a light microscope. The sections were dehydrated, and the specificity of the antibodies was confirmed using a negative control, where the antibodies were replaced by Antibody Diluent (S3022; Agilent Technologies Denmark Ap/S, Produktionsvej 42, 2600 Glostrup, Denmark). The staining results were evaluated and documented using an Olympus BX43 light microscope (Olympus 114 Corp., Tokyo, Japan) with an Olympus DP12 digital camera (Olympus 114 Corp., Tokyo, Japan).

4.5. Real-Time PCR

Tissue fragments taken from the left ventricles of the rats' hearts were placed in an RNA-later solution. Total RNA was isolated using a NucleoSpin® RNA Isolation Kit (Machery-Nagel, Oensingen, Switzerland). The quantification and quality control of the total RNA were carried out using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (ThermoScientific, Waltham, MA, USA). A 1 μ g aliquot of total RNA was reverse-transcribed into cDNA using an iScript™ Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (BIO-RAD, Barkley, CA, USA). The synthesis of the cDNA was performed in a final volume of 20 μ L using a Thermal Cycler (SureCycler 8800, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). For reverse transcription, the mixtures were incubated at 46 °C for 20 min, heated to 95 °C for 1 min, and finally cooled quickly at 4 °C. Quantitative real-time PCR reactions were performed using Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies) with the SsoAdvanced™ Universal SYBER® Green Supermix (BIO-RAD). Specific primers for FZD8 (*FZD8*), Wnt1 (*WNT1*), Gsk3 β (*GSK3 β*), Ctnnb1 (*CTNNB1*), and GAPDH (*GAPDH*) were designed by BIO-RAD. The housekeeping gene GAPDH (*GAPDH*) was used as a reference gene for quantification. To determine the expression levels of the test genes, standard curves were constructed separately for each gene with serially diluted PCR products. The PCR products were obtained by cDNA amplification using the following specific primers: *FZD8* (qRnoCED0054913, BIO-RAD), *WNT1* (qRnoCED0003949, BIO-RAD), *GSK3 β* (qRnoCID0001683, BIO-RAD), *CTNNB1* (qRnoCID0053256, BIO-RAD), and *GAPDH* (qRnoCID0057018, BIO-RAD). qRT-PCR was carried out in a doublet in a final volume of 20 μ L under the following conditions: 2 min of polymerase activation at 95 °C, 5 s of denaturation at 95 °C, and 30 s of annealing at 60 °C for 35 cycles. The PCR reactions were checked, including no-RT controls, the omission of templates, and melting curves, to ensure that only one product was amplified. The relative quantification of gene expression was carried out by comparing the Ct values using the $\Delta\Delta$ Ct method. All results were normalized to *GAPDH*.

4.6. Measurement of the Intensity of the Immunohistochemical Reaction

Sections of the heart were taken from each animal for immunohistochemistry showing Fzd8, Wnt1, GSK-3 β , and β -catenin. Five randomly selected microscopic fields (each field measured 0.785 mm² at 200 \times magnification (20 \times lens and 10 \times eyepiece)) from each heart section were documented using an Olympus DP12 microscope camera. Nikon's NIS Elements Advanced Research microscopy image analysis software (version 3.10) was used to evaluate digital images of the heart samples. The average optical densities of the examined objects were measured to assess the intensities of the immunohistochemical reactions. The intensities of the immunohistochemical reactions for Fzd8, Wnt1, GSK-3 β , and β -catenin were measured in each image and quantified using a grayscale level of 0–256. A value of 0 meant a completely white pixel, i.e., minimum light saturation, while 256 meant a completely black pixel, i.e., maximum light saturation.

4.7. Statistical Analysis

All data collected for the individual rats were assigned to two control groups (WKY and UNX) and two treatment groups (SHRs and DOCA–salt). For measurable features, the arithmetic means and standard errors (SEs) were calculated. Then, using the STATISTICA 13.3 computer package, statistical analysis was performed using a one-way ANOVA test. Fisher's Least Significant Differences test was used to perform post hoc analysis. The level of statistical significance was assumed to be $p < 0.05$.

Author Contributions: Conceptualization, I.K.; methodology, I.K., M.A.M. and N.D.; validation, I.K., M.A.M. and N.D.; formal analysis, I.K.; investigation, I.K., M.A.M. and N.D.; resources, I.K.; data curation, I.K., M.A.M. and N.D.; writing—original draft preparation, M.A.M.; writing—review and editing, I.K.; visualization, I.K. and M.A.M.; supervision, I.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by the Medical University of Białystok (grants SUB/1/DN/22/001/2232 and B.SUB.23.146).

Institutional Review Board Statement: The procedures performed on experimental animals were approved by the Local Ethics Committee for Animal Research in Olsztyn.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Abbreviations

APC, adenomatous polyposis coli protein; CK1, casein kinase 1; GSK-3 β , glycogen synthase kinase 3 β ; FZD receptors, Frizzled receptors; SHR, spontaneously hypertensive rat; DOCA, Deoxycorticosterone Acetate; WKY rats, Wistar Kyoto rats; UNX, uninephrectomy/unilateral nephrectomy; DMF, Dimethylformamide; SBP, systolic blood pressure; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; PCR, polymerase chain reaction; RAAS, renin–angiotensin–aldosterone system; Ang II, angiotensin II; β -MHCs, β -Myosin heavy chains.

References

1. Oparil, S.; Acelajado, M.C.; Bakris, G.L.; Berlowitz, D.R.; Cifková, R.; Dominiczak, A.F.; Grassi, G.; Jordan, J.; Poulter, N.R.; Rodgers, A.; et al. Hypertension. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2018**, *4*, 18014. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Iqbal, A.M.; Jamal, S.F. Essential Hypertension. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2023.
3. Rossier, B.C.; Bochud, M.; Devuyst, O. The Hypertension Pandemic: An Evolutionary Perspective. *Physiology* **2017**, *32*, 112–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Charles, L.; Triscott, J.; Dobbs, B. Secondary Hypertension: Discovering the Underlying Cause. *Am. Fam. Physician* **2017**, *96*, 453–461. [[PubMed](#)]
5. Kasacka, I.; Piotrowska, Z.; Lewandowska, A. Alterations of rat stomach endocrine cells under renovascular hypertension. *Adv. Med. Sci.* **2014**, *59*, 190–195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Nadar, S.K.; Lip, G.Y.H. The heart in hypertension. *J. Hum. Hypertens.* **2021**, *35*, 383–386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Messerli, F.H.; Rimoldi, S.F.; Bangalore, S. The Transition From Hypertension to Heart Failure: Contemporary Update. *JACC Heart Fail.* **2017**, *5*, 543–551. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Foulquier, S.; Daskalopoulos, E.P.; Lluri, G.; Hermans, K.C.M.; Deb, A.; Blankesteyn, W.M. Wnt Signaling in Cardiac and Vascular Disease. *Pharmacol. Rev.* **2018**, *70*, 68–141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Arnold, A.C.; Robertson, D. Defective Wnt Signaling: A Potential Contributor to Cardiometabolic Disease? *Diabetes* **2015**, *64*, 3342–3344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Kozirski, K.; Dobrzyń, A. Szlak sygnałowy Wnt i jego rola w regulacji metabolizmu komórki. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **2013**, *11*, 67.
11. Park, H.B.; Kim, J.W.; Baek, K.H. Regulation of Wnt Signaling through Ubiquitination and Deubiquitination in Cancers. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 3904. [[CrossRef](#)]
12. MacDonald, B.T.; Tamai, K.; He, X. Wnt/ β -catenin signaling: Components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* **2009**, *17*, 9–26. [[CrossRef](#)]
13. Młynarczyk, M.; Kasacka, I. The role of the Wnt/ β -catenin pathway and the functioning of the heart in arterial hypertension—A review. *Adv. Med. Sci.* **2022**, *67*, 87–94. [[CrossRef](#)]
14. Nusse, R.; Clevers, H. Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* **2017**, *169*, 985–999. [[CrossRef](#)]
15. Gessert, S.; Kühl, M. The multiple phases and faces of wnt signaling during cardiac differentiation and development. *Circ. Res.* **2010**, *107*, 186–199. [[CrossRef](#)]
16. Pahnke, A.; Conant, G.; Huyer, L.D.; Zhao, Y.; Feric, N.; Radisic, M. The role of Wnt regulation in heart development, cardiac repair and disease: A tissue engineering perspective. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *473*, 698–703. [[CrossRef](#)]
17. Fu, W.B.; Wang, W.E.; Zeng, C.Y. Wnt signaling pathways in myocardial infarction and the therapeutic effects of Wnt pathway inhibitors. *Acta Pharmacol. Sin.* **2019**, *40*, 9–12. [[CrossRef](#)]
18. Ruiz-Villalba, A.; Hoppler, S.; Van den Hoff, M.J. Wnt signaling in the heart fields: Variations on a common theme. *Dev. Dyn.* **2016**, *245*, 294–306. [[CrossRef](#)]
19. Ozhan, G.; Weidinger, G. Wnt/ β -catenin signaling in heart regeneration. *Cell Regen.* **2015**, *4*, 3. [[CrossRef](#)]
20. Umbarkar, P.; Ejjantkar, S.; Tousif, S.; Lal, H. Mechanisms of Fibroblast Activation and Myocardial Fibrosis: Lessons Learned from FB-Specific Conditional Mouse Models. *Cells* **2021**, *10*, 2412. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Zheng, X.; Gao, Q.; Liang, S.; Zhu, G.; Wang, D.; Feng, Y. Cardioprotective Properties of Ginkgo Biloba Extract 80 via the Activation of AKT/GSK3 β / β -Catenin Signaling Pathway. *Front. Mol. Biosci.* **2021**, *8*, 771208. [[CrossRef](#)]
22. Kasacka, I.; Piotrowska, Z.; Niezgoda, M.; Lewandowska, A.; Lebkowski, W. Ageing-related changes in the levels of β -catenin, CacyBP/SIP, galectin-3 and immunoproteasome subunit LMP7 in the heart of men. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0229462. [[CrossRef](#)]
23. Lee, C.Y.; Kuo, W.W.; Baskaran, R.; Day, C.H.; Pai, P.Y.; Lai, C.H.; Chen, Y.-F.; Chen, R.-J.; Padma, V.V.; Huang, C.Y. Increased β -catenin accumulation and nuclear translocation are associated with concentric hypertrophy in cardiomyocytes. *Cardiovasc. Pathol.* **2017**, *31*, 9–16. [[CrossRef](#)]
24. Marinou, K.; Christodoulides, C.; Antoniadis, C.; Koutsilieris, M. Wnt signaling in cardiovascular physiology. *Trends Endocrinol. Metab.* **2012**, *23*, 628–636. [[CrossRef](#)]
25. Duan, J.; Gherghe, C.; Liu, D.; Hamlett, E.; Srikantha, L.; Rodgers, L.; Regan, J.N.; Rojas, M.; Willis, M.; Leask, A.; et al. Wnt1/ β catenin injury response activates the epicardium and cardiac fibroblasts to promote cardiac repair. *EMBO J.* **2012**, *31*, 429–442. [[CrossRef](#)]
26. Zhou, L.; Li, Y.; Hao, S.; Zhou, D.; Tan, R.J.; Nie, J.; Hou, F.F.; Kahn, M.; Liu, Y. Multiple genes of the renin-angiotensin system are novel targets of Wnt/ β -catenin signaling. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2015**, *26*, 107–120. [[CrossRef](#)]
27. Fountain, J.H.; Kaur, J.; Lappin, S.L. Physiology, Renin Angiotensin System. In *StatPearls [Internet]*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2023.
28. Xiao, L.; Xu, B.; Zhou, L.; Tan, R.J.; Zhou, D.; Fu, H.; Li, A.; Hou, F.F.; Liu, Y. Wnt/ β -catenin regulates blood pressure and kidney injury in rats. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2019**, *1865*, 1313–1322. [[CrossRef](#)]
29. Clozel, J.P.; Müller, R.K.; Roux, S.; Fischli, W.; Baumgartner, H.R. Influence of the status of the renin-angiotensin system on the effect of cilazapril on neointima formation after vascular injury in rats. *Circulation* **1993**, *88*, 1222–1227. [[CrossRef](#)]
30. Zheng, Q.; Chen, P.; Xu, Z.; Li, F.; Yi, X.P. Expression and redistribution of β -catenin in the cardiac myocytes of left ventricle of spontaneously hypertensive rat. *J. Mol. Histol.* **2013**, *44*, 565–573. [[CrossRef](#)]
31. Wang, X.; Gerdes, A.M. Chronic pressure overload cardiac hypertrophy and failure in guinea pigs: III. Intercalated disc remodeling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1999**, *31*, 333–343. [[CrossRef](#)]
32. Yoshida, M.; Ohkusa, T.; Nakashima, T.; Takanari, H.; Yano, M.; Takemura, G.; Honjo, H.; Kodama, I.; Mizukami, Y.; Matsuzaki, M. Alterations in adhesion junction precede gap junction remodelling during the development of heart failure in cardiomyopathic hamsters. *Cardiovasc. Res.* **2011**, *92*, 95–105. [[CrossRef](#)]

33. Hirschy, A.; Croquelois, A.; Perriard, E.; Schoenauer, R.; Agarkova, I.; Hoerstrup, S.P.; Taketo, M.M.; Pedrazzini, T.; Perriard, J.-C.; Ehler, E. Stabilised beta-catenin in postnatal ventricular myocardium leads to dilated cardiomyopathy and premature death. *Basic. Res. Cardiol.* **2010**, *105*, 597–608. [[CrossRef](#)]
34. Zelarayán, L.C.; Noack, C.; Sekkali, B.; Kmecova, J.; Gehrke, C.; Renger, A.; Zafiriou, M.-P.; van der Nagel, R.; Dietz, R.; De Windt, L.J.; et al. Beta-Catenin down-regulation attenuates ischemic cardiac remodeling through enhanced resident precursor cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 19762–19767. [[CrossRef](#)]
35. Xiang, F.L.; Fang, M.; Yutzey, K.E. Loss of β -catenin in resident cardiac fibroblasts attenuates fibrosis induced by pressure overload in mice. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 712. [[CrossRef](#)]
36. Stubenvoll, A.; Rice, M.; Wietelmann, A.; Wheeler, M.; Braun, T. Attenuation of Wnt/ β -catenin activity reverses enhanced generation of cardiomyocytes and cardiac defects caused by the loss of emerin. *Hum. Mol. Genet.* **2015**, *24*, 802–813. [[CrossRef](#)]
37. Zhao, Y.; Wang, C.; Wang, C.; Hong, X.; Miao, J.; Liao, Y. An essential role for Wnt/ β -catenin signaling in mediating hypertensive heart disease. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 8996. [[CrossRef](#)]
38. Kasacka, I.; Piotrowska, Ż.; Weresa, J.; Filipek, A. Comparative evaluation of CacyBP/SIP protein, β -catenin, and immunoproteasome subunit LMP7 in the heart of rats with hypertension of different etiology. *Exp. Biol. Med.* **2018**, *243*, 1199–1206. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Rozdział 6. Streszczenie w języku polskim

Nadciśnienie tętnicze jest najistotniejszym modyfikowalnym czynnikiem ryzyka występowania chorób układu krążenia oraz główną przyczyną przedwczesnych zgonów na świecie. Bez wątplenia, w globalnym i powszechnym wymiarze należy do chorób cywilizacyjnych. Zrozumienie wieloczynnikowej etiologii nadciśnienia oraz mechanizmów interakcji wazoaktywnych mediatorów regulujących, jest ważne w ustaleniu odpowiedniego i skutecznego leczenia. Nadciśnienie tętnicze jest podstępłą chorobą, przez długi czas może być niezdiagnozowane ze względu na utajony, bezobjawowy charakter, prowadząc do poważnych powikłań narządowych. Niestety, etiologia tego schorzenia jest na tyle złożona, że jej profilaktyka skupia się głównie na leczeniu objawowym, obniżaniu ciśnienia tętniczego oraz leczeniu powikłań. W 90% przypadków nadciśnienie ma charakter pierwotny, o nieznanym przyczynie, pozostałe przypadki są związane z innymi schorzeniami i dysfunkcjami organizmu, co nadaje mu wtórny charakter.

Jedne z najgroźniejszych powikłań narządowych nadciśnienia tętniczego dotyczą serca. Stan przewlekłe utrzymującego się wysokiego ciśnienia krwi prowadzi do zaburzeń perfuzji, niedokrwienia, a w konsekwencji kompensacyjnych zmian w budowie tego narządu. W wyniku przebudowy tkanki oraz remodelingu kardiomiocytów dochodzi do dysfunkcji skurczowej, zaburzeń rytmu serca, a w zaawansowanym stadium, jego niewydolności. Pociąga to za sobą dalsze konsekwencje w postaci dysfunkcji kolejnych narządów, poprzez niedostateczne utlenienie tkanek.

Wiele czynników oraz szlaków molekularnych zaangażowanych jest w procesy regulacji ciśnienia tętniczego krwi. Zaburzenia ich wzajemnych oddziaływań, równowagi czynników naczynioskurczowych i rozkurczowych, na korzyść tych pierwszych, biorą udział w patogenezie nadciśnienia.

Szlaki przekazywania sygnału między komórkami zaangażowane są we wszystkie procesy zachodzące w organizmie. Szlak Wnt/ β -katenina bierze udział w szerokim spektrum procesów zachodzących w organizmie. Obejmuje rodzinę białek, które odgrywają kluczową rolę w prawidłowym rozwoju i różnicowaniu komórek, w tym kardiomiocytów. Jednocześnie, zaburzenia sygnalizacji szlaku stwierdzone są w procesach remodelingu oraz włóknienia mięśnia sercowego, co przyczynia się do jego niewydolności.

Mając na uwadze wieloczynnikową etiologię nadciśnienia tętniczego oraz brak doniesień na temat roli szlaku Wnt/ β -katenina w tej jednostce chorobowej, w obecnym badaniu dokonano oceny immunohistochemicznej, morfometrycznej oraz ekspresji genów kodujących Fzd8, Wnt1, GSK-3 β oraz β -kateninę w sercach szczurów z nadciśnieniem tętniczym pierwotnym i wtórnym.

Badania przeprowadzono na sercach pobranych od 24 samców szczurzych: 7 szczurów z nadciśnieniem pierwotnym (SHR) oraz 5 kontrolnych zwierząt normotensyjnych (WKY), 7 szczurów z wywołanym nadciśnieniem wtórnym (DOCA-salt) oraz 5 kontrolnych, normotensyjnych szczurów po jednostronnej nefrektomii (UNX). Po utrwaleniu w zbuforowanej formalinie, materiał przeprowadzono do bloczków parafinowych w rutynowy sposób. W celu immunodetekcji Fzd8, Wnt1, GSK-3 β oraz β -kateniny, przeprowadzono reakcje z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciwko badanym białkom. Wyniki powyższych reakcji oceniano w mikroskopie sprzężonym z komputerem wyposażonym w program NIS-Elements Advanced Research firmy Nikon. Aby porównać profil ekspresji genów *FZD8*, *WNT1*, *GSK-3 β* oraz *CTNNB1* w sercach szczurów kontrolnych i nadciśnieniowych wykorzystano metodę real-time PCR. Genem referencyjnym był gen *GAPDH*.

Uzyskane dane poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem pakietu statystycznego STATISTICA 13.3. Dla cech mierzalnych obliczono średnią arytmetyczną i błąd standardowy (SE). Przeprowadzono analizę statystyczną za pomocą jednoczynnikowego testu ANOVA. Do przeprowadzenia analizy post-hoc wykorzystano test Fishera. Za poziom istotności statystycznej przyjęto $p < 0,05$.

Obserwacja i analiza densymetryczna wykazały spadek intensywności reakcji immunohistochemicznej dla Fzd8, Wnt1, GSK-3 β oraz β -kateniny w sercach szczurów z nadciśnieniem pierwotnym (SHR) i wzrost tych parametrów w kardiomiocytach szczurów z nadciśnieniem wtórnym (DOCA-salt) w stosunku do normotensyjnych zwierząt kontrolnych WKY i UNX.

Podobnie, badania PCR wykazały spadek ekspresji genów *FZD8*, *WNT1*, *GSK-3 β* oraz *CTNNB1* w sercach zwierząt SHR w porównaniu do kontroli, szczególnie znamienne w przypadku *WNT1* i *CTNNB1*. Natomiast w przypadku szczurów DOCA-salt odnotowano wzrost ekspresji powyższych genów, istotny statystycznie w przypadku *WNT1* i *CTNNB1*, w porównaniu do szczurów normotensyjnych UNX.

Otrzymane wyniki badań ujawniły zmiany w immunoreaktywności i ekspresji genów kodujących Fzd8, Wnt1, GSK-3 β oraz β -kateninę w sercach szczurów

z nadciśnieniem pierwotnym i wtórnym. Spadek aktywności szlaku Wnt/ β -katenina w sercach szczurów z nadciśnieniem pierwotnym oraz wzrost jego aktywności w nadciśnieniu wtórnym wskazują na inny rodzaj zaangażowania tej ścieżki sygnałowej w zależności od etiologii nadciśnienia tętniczego. Wyniki przeprowadzonych badań mogą przyczynić się do lepszego poznania etiologii nadciśnienia oraz stanowić podstawę do dalszych badań tej jednostki chorobowej.

Rozdział 7. Streszczenie w języku angielskim

Hypertension is the most significant modifiable risk factor for cardiovascular diseases and the leading cause of premature death worldwide. Undoubtedly, on a global and widespread scale, it is considered a civilization disease. Understanding the multifactorial etiology of hypertension and the mechanisms of interaction of vasoactive regulatory mediators is crucial in establishing appropriate and effective treatment. Arterial hypertension is an insidious disease which, due to its latent, asymptomatic nature, may remain undiagnosed for a long time and lead to serious organ complications. Unfortunately, the etiology of this condition is so complex that its prevention mainly focuses on symptomatic treatment, lowering blood pressure, and treating complications. In 90% of cases, hypertension is primary of unknown cause, in the remaining cases, hypertension is secondary, related to other diseases and body dysfunctions.

One of the most severe organ complications of hypertension affects the heart. Chronic high blood pressure leads to perfusion disturbances, ischemia, and compensatory structural changes in this organ. As a result of tissue reconstruction and cardiomyocyte remodeling, systolic dysfunction, cardiac arrhythmias and in advanced stages, heart failure occurs. This leads to further consequences in the form of dysfunction of other organs due to insufficient tissue oxygenation.

Many factors and molecular pathways are involved in the regulation of blood pressure. Disruptions in their interactions and the balance of vasoconstrictive and vasodilatory factors, favoring the former, contribute to the pathogenesis of hypertension. Signal transmission pathways between cells are involved in all processes occurring in the body. The Wnt/ β -catenin pathway participates in a wide spectrum of processes, including the proper development and differentiation of cells, such as cardiomyocytes. At the same time, disturbances in this signaling pathway are observed in the case of myocardial remodeling and fibrosis, which contribute to heart failure.

Considering the multifactorial etiology of hypertension and the lack of reports on the role of the Wnt/ β -catenin pathway in this condition, the current study evaluated the immunohistochemical, morphometric, and gene expression profiles of Fzd8, Wnt1, GSK-3 β , and β -catenin in the hearts of rats with primary and secondary hypertension.

The study was conducted on hearts collected from 24 male rats: 7 with primary hypertension (SHR) and 5 normotensive control animals (WKY), 7 with induced secondary hypertension (DOCA-salt), and 5 normotensive control rats post-unilateral

nephrectomy (UNX). After fixation in buffered formalin, the material was routinely processed into paraffin blocks. For the immunodetection of Fzd8, Wnt1, GSK-3 β , and β -catenin, reactions were performed using antibodies against the studied proteins. The results of above reactions were assessed under a microscope connected to a computer equipped with Nikon's NIS-Elements Advanced Research software. Real-time PCR was used to compare the expression profile of *FZD8*, *WNT1*, *GSK-3 β* and *CTNNB1* genes in the hearts of control and hypertensive rats. The reference gene was the GAPDH gene.

The obtained data were subjected to statistical analysis using the STATISTICA 13.3 software package. For measurable features, the arithmetic mean and standard error (SE) were calculated. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA. Fisher's test was used for post-hoc analysis, with a significance level of $p < 0.05$.

Observation and densitometric analysis showed a decrease in the intensity of the immunohistochemical reaction for Fzd8, Wnt1, GSK-3 β and β -catenin in the hearts of rats with essential hypertension (SHR) and an increase in these parameters in cardiomyocytes of rats with secondary hypertension (DOCA-salt) compared to normotensive animals WKY and UNX.

PCR results demonstrated a decrease in the expression of *FZD8*, *WNT1*, *GSK-3 β* , and *CTNNB1* genes in the hearts of SHR animals compared to controls, particularly significant for *WNT1* and *CTNNB1*. However, an increase in the expression of these genes, statistically significant for *WNT1* and *CTNNB1*, was observed in DOCA-salt rats, compared to normotensive UNX rats.

The obtained results revealed changes in immunoreactivity and expression of genes encoding Fzd8, Wnt1, GSK-3 β , and β -catenin in the hearts of rats with primary and secondary arterial hypertension. The decrease in the activity of Wnt/ β -catenin pathway in the hearts of rats with essential hypertension and its increase in secondary hypertension suggest a different type of involvement of this signaling pathway depending on the etiology of hypertension. These results may contribute to a better understanding of the etiology of hypertension and constitute a basis for further research on this condition.

Rozdział 8. Piśmiennictwo

1. Oparil, S., Acelajado, M.C., Bakris, G.L., Berlowitz, D.R., Cífková, R., Dominiczak, A.F., Grassi, G. et al. Hypertension. *Nat Rev Dis Primers* 4, 18014 (2018).
2. Iqbal, A.M. & Jamal, S.F. Essential Hypertension. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2021).
3. Rossier, B.C., Bochud, M., Devuyst, O. The Hypertension Pandemic: An Evolutionary Perspective. *Physiology* 32, 112–125 (2017).
4. Tykarski, A., Filipiak, K.J., Januszewicz, A., Litwin, M., Narkiewicz K., Prejbisz, A., Ostalska-Nowicka, D., Widecka, K., Kostka-Jeziorny K.. Nadciśnienie Tętnicze w Praktyce 2019;5(1):1-86.
5. Harrison, D.G., Coffman, T.M., Wilcox, C.S. Pathophysiology of Hypertension: The Mosaic Theory and Beyond. *Circ Res.* 2021 Apr 2;128(7):847-863. Epub 2021 Apr 1.
6. Williams, B., Mancia, G., Spiering, W., Rosei, E.A., Azizi, M., Burnier, M., Clement, D.L. et. al, ESC Scientific Document Group, 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Hypertension (ESH), *European Heart Journal*, Volume 39, Issue 33, 01 September 2018, Pages 3021–3104
7. Page, I.H. Pathogenesis of arterial hypertension. *J Am Med Assoc.* 1949 Jun 4;140(5):451-8
8. Charles, L., Triscott, J., Dobbs, B. Secondary Hypertension: Discovering the Underlying Cause. *Am Fam Physician.* 2017 Oct 1;96(7):453-461.
9. Leong, X.-F., Ng, C.-Y. & Jaarin, K. Animal Models in Cardiovascular Research: Hypertension and Atherosclerosis. *BioMed Research International* 2015, 1–11 (2015)
10. Shimoyama, M., Laulederkind, S.J., De Pons, J., Nigam, R., Smith, J.R., Tutaj, M., Petri, V. et al. Exploring human disease using the Rat Genome Database. *Dis Model Mech.* 2016 Oct 1;9(10):1089-1095.
11. Dornas, W.C. & Silva, M.E. Animal models for the study of arterial hypertension. *J Biosci* 36, 731–737 (2011).

12. Pravenec, M., Kurtz, T.W. Recent advances in genetics of the spontaneously hypertensive rat. *Curr Hypertens Rep.* 2010 Feb;12(1):5-9.
13. Doris, P.A. Genetics of hypertension: an assessment of progress in the spontaneously hypertensive rat. *Physiol Genomics.* 2017 Nov 1;49(11):601-617.
14. Okamoto, K., Aoki, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J.* 1963; 27: 282-293.
15. Pravenec, M., Kurtz, T.W. Molecular genetics of experimental hypertension and the metabolic syndrome: from gene pathways to new therapies. *Hypertension.* 2007;49:941–952.
16. Basting, T. & Lazartigues, E. DOCA-Salt Hypertension: an Update. *Curr Hypertens Rep* 19, 32 (2017).
17. Lee, L.K., Kim, M.Y., Kim, J.H., Lee, J.U., Park, B.S., Yang, S.M., Jeon, H.J., et al. A review of deoxycorticosterone acetate-salt hypertension and its relevance for cardiovascular physiotherapy research. *J Phys Ther Sci.* 2015 Jan;27(1):303-7.
18. Koeners, M.P., Lewis, K.E., Ford, A.P., Paton, J.F. Hypertension: a problem of organ blood flow supply–demand mismatch. *Future Cardiology* 12, 339–349 (2016).
19. Nadar, S.K. & Lip, G.Y.H. The heart in hypertension. *J Hum Hypertens* s41371-020-00427–x (2020)
20. Prado, A.F., Batista, R.I.M., Tanus-Santos, J.E. & Gerlach, R. F. Matrix Metalloproteinases and Arterial Hypertension: Role of Oxidative Stress and Nitric Oxide in Vascular Functional and Structural Alterations. *Biomolecules* 11, 585 (2021).
21. Messerli, F.H., Rimoldi, S.F. & Bangalore, S. The Transition From Hypertension to Heart Failure. *JACC: Heart Failure* 5, 543–551 (2017).
22. Shamloo, A.S., Dagres, N., Arya, A., Hindricks, G. Atrial fibrillation: A review of modifiable risk factors and preventive strategies. *Romanian Journal of Internal Medicine* 57, 99–109 (2019).
23. Drazner, M.H. The Progression of Hypertensive Heart Disease. *Circulation* 123, 327–334 (2011).
24. Lovic, D., Erdine, S., Burak Catakoglu, A. How to estimate left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. *Anadolu Kardiyol Derg* 14, 389–395 (2014).

25. Cortese, F. et al. Vascular, cardiac and renal target organ damage associated to arterial hypertension: which noninvasive tools for detection? *J Hum Hypertens* 34, 420–431 (2020).
26. Herrmann, S.M., Textor, S.C. Renovascular Hypertension. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 48, 765–778 (2019).
27. Koziński, K. & Dobrzyń, A. Szlak sygnałowy Wnt i jego rola w regulacji metabolizmu komórki. *Postepy Hig Med Dosw* 11.
28. Foulquier, S. Daskalopoulos, E.P., Lluri, G., Hermans, K.C.M., Deb, A., Blankesteyn, W.M. WNT Signaling in Cardiac and Vascular Disease. *Pharmacol Rev* 70, 68–141 (2018).
29. Park, H.B., Kim, J.W., Baek, K.H. Regulation of Wnt Signaling through Ubiquitination and Deubiquitination in Cancers. *IJMS* 21, 3904 (2020).
30. Anthony, C.C., Robbins, D.J., Ahmed, Y., Lee, E. Nuclear Regulation of Wnt/ β -Catenin Signaling: It's a Complex Situation. *Genes*. 2020 Aug 4;11(8):886.
31. Jho, E., Zhang, T., Domon, C., Joo, C.K., Freund, J.N., Costantini, F. Wnt/ β -Catenin/Tcf Signaling Induces the Transcription of Axin2, a Negative Regulator of the Signaling Pathway. *Mol Cell Biol*. 2002 Feb 15;22(4):1172–83
32. Krishnamurthy, N., Kurzrock, R. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors. *Cancer Treatment Reviews*. 2018 Jan;62:50–60.
33. Nikopoulos, K., Venselaar, H., Collin, R.W.J., Riveiro-Alvarez, R., Boonstra, F.N., Hooymans, J.M.M., et al. Overview of the mutation spectrum in familial exudative vitreoretinopathy and Norrie disease with identification of 21 novel variants in FZD4, LRP5, and NDP. *Hum Mutat*. 2010 Mar 25;31(6):656–66.
34. Chen, Q., Ma, J.X. Canonical Wnt signaling in diabetic retinopathy. *Vision Res*. 2017 Oct;139:47-58.
35. Nakamura, T., Sano, M., Songyang, Z., Schneider, M.D. A Wnt- and beta -catenin-dependent pathway for mammalian cardiac myogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 13;100(10):5834-9.
36. Gessert, S. & Kühl, M. The Multiple Phases and Faces of Wnt Signaling During Cardiac Differentiation and Development. *Circulation Research* 107, 186–199 (2010).
37. Pahnke, A., Conant, G., Huyer, L.D., Zhao, Y., Feric, N., Radisic, M.. The role of Wnt regulation in heart development, cardiac repair and disease: A tissue

- engineering perspective. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 473, 698–703 (2016).
38. Dawson, K., Aflaki, M., Nattel, S. Role of the Wnt-Frizzled system in cardiac pathophysiology: a rapidly developing, poorly understood area with enormous potential: The Wnt-Frizzled system in cardiac pathophysiology. *The Journal of Physiology* 591, 1409–1432 (2013).
 39. Wolke, C., Antileo, E., Lendeckel, U. WNT signaling in atrial fibrillation. *Exp Biol Med* (Maywood). 2021 May;246(9):1112-1120.
 40. Kasacka, I., Piotrowska, Ż., Niezgodna, M., Lewandowska, A. & Ĺebkowski, W. Ageing-related changes in the levels of β -catenin, CacyBP/SIP, galectin-3 and immunoproteasome subunit LMP7 in the heart of men. *PLoS ONE* 15, e0229462 (2020).
 41. Lin, J.C., Kuo, W.W., Baskaran, R., Chen, M.C., Ho, T.J., Chen, R.J., Chen, Y.F. et al. Enhancement of beta-catenin in cardiomyocytes suppresses survival protein expression but. *Cardiology Journal* 24, 11 (2017).
 42. Lee, C.Y., Kuo, W.W., Baskaran, R., Day, C.H., Pai, P.Y., Lai, C.H., Chen, Y.F. et al. Increased β -catenin accumulation and nuclear translocation are associated with concentric hypertrophy in cardiomyocytes. *Cardiovascular Pathology* 31, 9–16 (2017).
 43. Duan, J., Gherghe, C., Liu, D., Hamlett, E., Srikantha, L., Rodgers, L., Regan, J.N. et al. Wnt1/ β catenin injury response activates the epicardium and cardiac fibroblasts to promote cardiac repair: Wnt1/ β catenin injury response regulates cardiac repair. *The EMBO Journal* 31, 429–442 (2012).
 44. Zhao, Y., Wang, C., Wang, C., Hong, X., Miao, J., Liao, Y., Zhou, L., Liu, Y. An essential role for Wnt/ β -catenin signaling in mediating hypertensive heart disease. *Sci Rep* 8, 8996 (2018).
 45. Cheng, P.W., Chen, Y.Y., Cheng, W.H., Lu, P.J., Chen, H.H., Chen, B.R., Yeh, T.C., et al. Wnt Signaling Regulates Blood Pressure by Downregulating a GSK-3 β -Mediated Pathway to Enhance Insulin Signaling in the Central Nervous System. *Diabetes*. 2015 Oct;64(10):3413-24.
 46. Abou Ziki, M.D., Mani, A. Wnt signaling, a novel pathway regulating blood pressure? State of the art review. *Atherosclerosis* 262, 171–178 (2017).

47. Xiao, L., Xu, B., Zhou, L., Tan, R.J., Zhou, D., Fu, H., Li, A. et al. Wnt/ β -catenin regulates blood pressure and kidney injury in rats. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1865, 1313–1322 (2019).
48. Zheng, Q., Chen, P., Xu, Z., Li, F., Yi, X.P. Expression and redistribution of β -catenin in the cardiac myocytes of left ventricle of spontaneously hypertensive rat. *J Mol Hist.* 2013 Oct;44(5):565–73.
49. Kasacka, I., Piotrowska, Ż., Weresa, J., Filipek, A. Comparative evaluation of CacyBP/SIP protein, β -catenin, and immunoproteasome subunit LMP7 in the heart of rats with hypertension of different etiology. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2018 Nov;243(15–16):1199–206.

Rozdział 9. Oświadczenia współautorów publikacji

Informacja o charakterze udziału współautorów w publikacji:

„The role of the Wnt/ β -catenin pathway and the functioning of the heart in arterial hypertension - a review” autorów: Maryla Anna Młynarczyk, Irena Kasacka, opublikowanej w *Advances in Medical Sciences*, Adv Med Sci. 2022 Mar;67(1):87-94. doi: 10.1016/j.advms.2022.01.001. Epub 2022 Jan 28. PMID: 35101653

Imię i nazwisko współautora	Charakter udziału	Udział (%)
kandydat - lek. Maryla Anna Młynarczyk	opracowanie koncepcji pracy, tworzenie manuskryptu, zebranie piśmiennictwa, zarządzanie projektem	70
Prof. dr hab. Irena Kasacka	opracowanie koncepcji pracy, ocena merytoryczna oraz korekta manuskryptu.	30

Oświadczam, że wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w pracy doktorskiej lek. Maryli Anny Młynarczyk

Podpis kandydata



Potwierdzam opisany powyżej merytoryczny wkład kandydata w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej.

Podpis promotora

KIEROWNIK
Zakładu Histologii i Cytofizjologii

prof. dr hab. Irena Kasacka

prof. dr hab. Irena Kasacka
imię i nazwisko współautora

Białystok, 14.06.2024r.
miejsowość, data

Zakład Histologii i Cytofizjologii UMB
nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„The role of the Wnt/ β -catenin pathway and the functioning of the heart in arterial hypertension - a review” autorów: Maryla Anna Młynarczyk, Irena Kasacka, opublikowanej w *Advances in Medical Sciences*, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej *Ocena szlaku Wnt/ β -katenina w sercach szczurów w różnych modelach nadciśnienia tętniczego*, wynoszący 30% polegał na opracowaniu koncepcji pracy, ocenie merytorycznej oraz korekcie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez doktorantkę Marylę Annę Młynarczyk publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]

KIERÓWNIK
Zakładu Histologii i Cytofizjologii
[Podpis]
prof. dr hab. Irena Kasacka

Informacja o charakterze udziału współautorów w publikacji:

„ Evaluation of the canonical Wnt signaling pathway in the hearts of hypertensive rats of various etiology” autorów: Maryla Anna Młynarczyk, Natalia Domian, Irena Kasacka, opublikowanej w *International Journal of Molecular Sciences*, 2024;

Imię i nazwisko współautora	Charakter udziału	Udział (%)
kandydat - lek. Maryla Anna Młynarczyk	opracowanie koncepcji pracy, tworzenie manuskryptu, przeprowadzenie oznaczeń, analiza otrzymanych wyników, zebranie piśmiennictwa, zarządzanie projektem	50
Dr Natalia Domian	przeprowadzenie badań RT-PCR i opracowanie wyników	10
Prof. dr hab. Irena Kasacka	pomoc przy planowaniu badania, opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu dokumentacji, ocena merytoryczna oraz korekta manuskryptu.	40

Oświadczam, że wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w pracy doktorskiej lek. Maryli Anny Młynarczyk

Podpis kandydata



Potwierdzam opisany powyżej merytoryczny wkład kandydata w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej.

Podpis promotora

KIEROWNIK
Zakładu Histologii i Cytofizjologii

prof. dr hab. Irena Kasacka

prof. dr hab. Irena Kasacka
imię i nazwisko współautora

Białystok, 14.06.2024r.
miejsowość, data

Zakład Histologii i Cytofizjologii UMB
nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„Evaluation of the canonical Wnt signaling pathway in the hearts of hypertensive rats of various etiology” autorów: Maryla Anna Młynarczyk, Natalia Domian, Irena Kasacka, opublikowanej w International Journal of Molecular Sciences, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Ocena szlaku Wnt/ β -katenina w sercach szczurów w różnych modelach nadciśnienia tętniczego”, wynoszący 40% polegał na opracowaniu koncepcji pracy, ocenie merytorycznej oraz korekcie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez doktorantkę Marylę Annę Młynarczyk publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

KIERÓWNIK
Zakładu Histologii i Cytofizjologii [podpis]
prof. dr hab. Irena Kasacka

Dr Natalia Domian
imię i nazwisko współautora

Białystok, 14.06.2024r.
miejsowość, data

Zakład Histologii i Cytofizjologii UMB
nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Kilińskiego 1
15-089 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„Evaluation of the canonical Wnt signaling pathway in the hearts of hypertensive rats of various etiology” autorów: Maryla Anna Młynarczyk, Natalia Domian, Irena Kasacka, opublikowanej w International Journal of Molecular Sciences, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Ocena szlaku Wnt/ β -katenina w sercach szczurów w różnych modelach nadciśnienia tętniczego”, wynoszący 10% polegał na wykonaniu badań RT-PCR i opracowaniu wyników.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez doktorantkę Marylę Annę Młynarczyk publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

[Podpis]

Natalia Domian

Rozdział 10. Zgoda Komisji Bioetycznej

UCHWAŁA NR 73 /2015 w sprawie wniosku nr 2015/95 z dnia 9.06.2015 r.

Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Białymstoku

§ 1

Na podstawie art. 30 ust. 1 pkt 1 ustawy z dnia 21 stycznia 2005r. o doświadczeniach na zwierzętach (Dz. U. Nr 33, poz. 289) i § 14 ust. 3 rozporządzenia Ministra Nauki i Informatyzacji z dnia 29 lipca 2005r. w sprawie Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach oraz lokalnych komisji etycznych do spraw doświadczeń na zwierzętach (Dz. U. Nr 153, poz. 1275), po rozpatrzeniu wniosku, pt.:

Ocena komórek neuroendokrynych w różnych narządach szczura z nadciśnieniem samoistnym i naczyniowo-nerkowym.

z dnia 21.05.2015 r. złożonego przez prof. dr hab. Irenę Kasacką z Zakładu Histologii i Cytofizjologii UMB, lokalna komisja etyczna,

WYRAŻA ZGODĘ / NIE WYRAŻA ZGODY

na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

§ 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku, o którym mowa w § 1, lokalna komisja etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy zaliczyć do kategorii:

Doświadczenia na tkankach, narządach odzwierzęcych

2. Najwyższy stopień inwazyjności proponowanych procedur nie przekracza wartości: nie dotyczy
3. Doświadczenia będą przeprowadzone na zwierzętach: nie dotyczy.
4. Doświadczenia będą przeprowadzone przez: nie dotyczy
5. Doświadczenia będą przeprowadzane na tkankach i narządach uzyskanych od zwierząt w ramach projektu „Rola endokannabinoidów w regulacji układu krążenia, stresu oksydacyjnego i metabolizmu serca w modelu nadciśnienia pierwotnego i wtórnego.” na który uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Białymstoku w dniu 25.01.2012, Uchwała nr 4/2012.

§ 3

Integralną część niniejszej uchwały stanowi uzasadnienie i kopia wniosku, o którym mowa w § 1.

Podpisy członków lokalnej komisji etycznej
biorących udział w głosowaniu:

[Pieczęć lokalnej komisji etycznej]

UNIWERSYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU
LOKALNA KOMISJA ETYCZNA
do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Białymstoku
ZAKŁAD FIZJOLOGII DOŚWIADCZALNEJ
15-222 Białystok, ul. A. Mickiewicza 2A
tel./fax 0-85 748 56 99

1. *[Podpis]*
Przewodnicząca LKE w Białymstoku
2. *[Podpis]*
3. *[Podpis]*
4. *[Podpis]*
5. *[Podpis]*
6. *[Podpis]*
7. *[Podpis]*
8. *[Podpis]*
9. *[Podpis]*

Oczymais:
1. Wnioskodawca,
2. Prezyktor ds. Nauki UMwB
3. aia

Pouczenie

Strona niezadowolona z niniejszej uchwały może wnieść odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 14 dni od dnia otrzymania uchwały.
Odwołanie składa się za pośrednictwem lokalnej komisji etycznej, która wydała uchwałę zgodnie z § 20 rozporządzenia Ministra Nauki i Informatyzacji z dnia 29 lipca 2005r. w sprawie Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach oraz lokalnych komisji etycznych do spraw doświadczeń na zwierzętach (Dz. U. Nr 153 poz. 1275).