

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum

Piotr Berkowicz

Badanie mechanizmów rozwoju niewydolności mięśnia sercowego u myszy

Tgaq*44

Praca doktorska

Promotor: Prof. dr hab. Stefan Chłopicki

Pracę wykonano w Jagiellońskim Centrum Rozwoju Leków (JCET)

Kierownik jednostki: Prof. dr hab. Stefan Chłopicki

Kraków, 2021

Spis treści

1. Wstęp.....	6
1.1 Starzenie, jako czynnik rozwoju chorób.....	6
1.2 Historia badań dotyczących procesu starzenia.....	7
1.3 Geroscience – nauka o procesach starzenia.....	8
1.4 Niewydolność mięśnia sercowego	9
1.5 Elementy patofizjologii rozwoju niewydolności serca, które mogą być przyspieszone przez starzenie.....	11
1.5.1 Zmiany funkcjonalne w sercu związane z procesem starzenia.....	12
1.5.2 Zmiany strukturalne w sercu związane z procesem starzenia.....	12
1.5.3 Zmiany na poziomie komórkowym w sercu związane z procesem starzenia.....	12
1.5.4 Zmiany na poziomie molekularnym w sercu związane z procesem starzenia.....	13
1.5.4.1 Mitochondria.....	13
1.5.4.2 Sygnalizacja β -adrenergiczna oraz gospodarka wapniowa.....	13
1.5.4.3 Szlak renina-angiotensyna-aldosteron.....	14
1.5.4.4 Stan zapalny.....	15
1.5.4.5 Telomery.....	15
1.5.4.6 Uszkodzenia materiału genetycznego.....	15
1.6 Udział zaburzeń czynności śródbłónka naczyń krwionośnych w rozwoju niewydolności serca towarzyszącej starzejącemu się sercu.....	16
1.7 Starzenie się organizmu a niewydolność mięśnia sercowego podsumowanie.....	17
2. Cel pracy.....	18
3. Materiały i metody.....	19
3.1 Zwierzęta.....	19
3.2 Obrazowanie funkcji serca metodą rezonansu magnetycznego (MRI).....	19
3.3 Badania makroskopowe serc myszy Tgaq*44 w toku rozwoju niewydolności serca - masa serc, komór serca i przedsionków.....	21
3.4 Badania mikroskopowe serc myszy Tgaq*44 w toku rozwoju niewydolności serca – zwłóknienie, macierz zewnątrzkomórkowa, gęstość kapilar, triangulacja, światło kapilar.....	21
3.5 Badania ultrastruktury mięśnia sercowego z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM)	22
3.6 Badania czynności krążenia wieńcowego z wykorzystaniem ultradźwiękowej sondy dopplerowskiej do pomiaru szybkość przepływu wieńcowego	23
3.7 Badanie czynności krążenia wieńcowego z wykorzystaniem modelu izolowanego perfundowanego serca myszy	24
3.7.1 Pomiar zmian przepływu wieńcowego w modelu perfuzji wg. Langendorff'a oraz w modelu pracującego serca	25
3.8 Pomiar stężenia NO_2^- i NO_3^- w efluencie z izolowanego perfundowanego serca myszy.....	25
3.9 Optymalizacja protokołu eksperymentalnego sposobu pobierania efluentów sercowych na pomiar stężenia NO_2^- i NO_3^-	26
3.9.1 Protokół A.....	26
3.9.2 Protokół B.....	27
3.9.3 Protokół C.....	28
3.9.4 Protokół D.....	30
3.9.5 Wnioski dotyczące optymalizacji protokołu eksperymentalnego sposobu pobierania efluentów sercowych na pomiar stężenia NO_2^- i NO_3^-	31

3.10 Pomiar aktywności enzymu ACE w mięśniu sercowym oraz w osoczu.....	31
3.11 Pomiar stężenia hormonów sterydowych w osoczu.....	31
3.12 Pomiar morfologii krwi	33
3.13 Badania transkryptomów serc myszy Tgaq*44 i FVB	33
3.13.1 Izolacja RNA i analiza RNA-Seq.....	33
3.13.2 Analizy transkryptomiczne.....	34
3.14 Analizy statystyczne.....	35
4. Wyniki.....	36
4.1 Charakterystyka procesu starzenia się serca myszy kontrolnych FVB, w porównaniu do zmian u myszy Tgaq*44	36
4.1.1 Zmiany w czynności hemodynamicznej serca u starzejących się myszy FVB.....	36
4.1.2 Zmiany w czynności hemodynamicznej serca na wczesnym i końcowym etapie niewydolności serca u myszy Tgaq*44	36
4.1.3 Porównanie zmian w czynności hemodynamicznej serca starzejących się myszy FVB oraz na wczesnym i końcowym etapie niewydolności serca u myszy Tgaq*44.....	37
4.1.4 Zmiany makroskopowe u starzejących się myszy FVB oraz na wczesnym i końcowym etapie niewydolności serca u myszy Tgaq*44.....	39
4.2 Zmiany mikroskopowe mięśnia sercowego u starzejących się myszy FVB oraz na wczesnym i końcowym etapie niewydolności serca u myszy Tgaq*44.....	41
4.2.1 Włóknienie serca.....	41
4.2.2 Macierz zewnątrzkomórkowa.....	42
4.2.3 Ultrastruktura mięśnia sercowego	44
4.2.3.1 Macierz zewnątrzkomórkowa – obrazy z mikroskopu elektronowego (TEM).....	44
4.2.3.2 Układ miofibryli, mitochondriów, kanalików T	45
4.2.3.3 Błazka podstawna naczyń wieńcowych.....	49
4.2.3.4 Budowa naczyń wieńcowych.....	50
4.2.3.5 Wstawki.....	51
4.2.3.6 Autofagosomy.....	52
4.2.4 Gęstość i układ kapilar	53
4.2.5 Odległości między kapilarami.....	55
4.2.6 Wielkość światła kapilar.....	56
4.3 Zmiany reaktywności naczyń wieńcowych u starzejących się myszy FVB oraz w toku rozwoju niewydolności serca u myszy Tgaq*44.....	57
4.3.1 Badania <i>in vivo</i> - ultrasonograficzna metoda dopplerowska.....	58
4.3.2 Badania <i>ex vivo</i> w modelu izolowanego serca.....	59
4.3.2.1 Zmiany przepływu wieńcowego w czasie podstawowego przepływu przez tkankę serca oraz w odpowiedzi na 30 sekundową okluzję naczyń wieńcowych	59
4.3.2.2 Porównanie zmian przepływu wieńcowego w odpowiedzi na 30 sekundową okluzję naczyń wieńcowych między dwoma protokołami eksperymentalnymi perfuzji izolowanego serca myszy	62
4.3.2.3 Zmiany w odpowiedzi wazodylatacyjnej naczyń wieńcowych na związki naczyniorozszerzające	63
4.3.2.3.1 Odpowiedź przepływu wieńcowego izolowanego serca na podanie bradykininy	63
4.3.2.3.2 Odpowiedź przepływu wieńcowego izolowanego serca na podanie adenozyyny	64

4.3.2.4 Zmiany w odpowiedzi wazodylatacyjnej naczyń wieńcowych na wzrastające obciążenie serca na końcowym etapie niewydolności serca u myszy Tgaq*44.....	64
4.4 Zmiany aktywności ogólnoustrojowych układów neurohormonalnych u starzejących się myszy FVB oraz w toku rozwoju niewydolności mięśnia sercowego u myszy Tgaq*44.....	65
4.4.1 Tkankowa i systemowa aktywność ACE.....	66
4.4.2 Systemowa aktywność hormonów steroidowych.....	67
4.4.3 Obraz morfologii krwi.....	70
4.5 Wprowadzenie do opisu wyników zmian transkryptomów serc starzejących się myszy FVB oraz transkryptomów serc myszy Tgaq*44 w toku rozwoju niewydolności mięśnia sercowego.....	73
4.5.1 Zmiany w transkrypcji serca myszy Tgaq*44 w toku rozwoju niewydolności serca w porównaniu do zmian w transkrypcji starzejącego się serca myszy FVB	77
4.5.2 Zmiany w ilości genów spełniających założone kryteria dla różnicowej ekspresji w analizach FVB vs. FVB, Tgaq*44 vs. Tgaq*44 oraz Tgaq*44 vs. FVB.....	78
4.5.3 Zmiany w ilości nadreprezentatywnych procesów biologicznych w analizach FVB vs. FVB, Tgaq*44 vs. Tgaq*44, Tgaq*44 vs. FVB.....	80
4.5.4 Porównanie procesu starzenia się serca w transkryptomach serc myszy FVB i Tgaq*44.....	85
4.5.5 Zmiany aktywacji genów w trakcie starzenia się serca myszy FVB.....	95
4.5.6 Zmiany aktywacji genów w toku rozwoju niewydolności serca myszy Tgaq*44 w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44.....	96
4.5.7 Zmiany aktywacji genów w toku rozwoju niewydolności serca myszy Tgaq*44 w analizie Tgaq*44 vs. FVB.....	97
4.5.8 „Geny starego serca”, „geny starzenia” się serca oraz „geny niewydolności serca” najsilniej różnicujące transkryptyomy serc myszy Tgaq*44 od FVB	98
4.5.9 Charakterystyczne geny w transkrypcji serc myszy Tgaq*44 na poszczególnych etapach rozwoju niewydolności serca	104
5. Dyskusja	107
5.1 Mysi model niewydolności serca - mysz Tgaq*44	110
5.2 Funkcja serca w procesie starzenia się myszy FVB oraz na wczesnym i końcowym etapie niewydolności serca u myszy Tgaq*44.....	111
5.3 Zmiany makroskopowe towarzyszące procesowi starzenia się myszy FVB oraz rozwojowi niewydolności serca myszy Tgaq*44.....	112
5.4 Zmiany mikroskopowe mięśnia sercowego u starzejących się myszy FVB oraz na wczesnym i końcowym etapie niewydolności serca u myszy Tgaq*44.....	113
5.4.1 Włóknienie i depozycja komponentów macierzy zewnątrzkomórkowej	113
5.4.2 Ultrastruktura mięśnia sercowego.....	115
5.5 Zmiany strukturalne i funkcjonalne naczyń wieńcowych u starzejących się myszy FVB oraz w toku rozwoju niewydolności serca u myszy Tgaq*44.....	116
5.5.1 Zmiany w kapilarach wieńcowych w procesie starzenia serca u myszy FVB i w toku rozwoju niewydolności serca u myszy Tgaq*44.....	116
5.5.2 Porównanie metod <i>in vivo</i> i <i>ex vivo</i> do pomiaru reaktywności naczyń wieńcowych.....	118
5.5.3 Zmiany czynnościowe mikrokążenia wieńcowego starzejącego się serca myszy FVB i rozwijającej się niewydolności serca myszy Tgaq*44	119

5.6	Udział szlaków hormonalnych w procesie starzenia myszy FVB oraz w toku rozwoju niewydolności serca myszy Tgaq*44.....	122
5.7	Zmiany morfologiczne krwi w procesie starzenia myszy FVB oraz w toku rozwoju niewydolności serca myszy Tgaq*44	123
5.8	Zmiany w transkrypcji serca w trakcie starzenia się serca myszy FVB i w toku rozwoju niewydolności serca myszy Tgaq*44.....	124
5.8.1	Przyspieszony proces starzenia się serca w transkryptomach serc myszy Tgaq*44	128
5.8.1.1	Globalne zmiany w transkrypcji serca myszy Tgaq*44....	128
5.8.1.2	Wpływ niewydolności serca na proces starzenia się serca myszy Tgaq*44.....	128
5.8.1.3	Udział „genów starego serca” i „genów starzenia” się serca w zmianach w transkrypcji serca myszy Tgaq*44 w trakcie rozwoju niewydolności serca.....	129
5.8.2	Zmiany wywołane w transkrypcji serca myszy Tgaq*44 wskutek rozwoju niewydolności serca.....	130
5.8.3	Geny i procesy związane z procesem starzenia się serca trwale różnicujące transkryptyomy serc myszy Tgaq*44 od FVB od wczesnego aż do końcowego etapu rozwoju niewydolności serca u myszy Tgaq*44.....	132
5.8.4	Geny silnie związane ze starzeniem się serca u myszy FVB i z rozwojem niewydolności serca u myszy Tgaq*44.....	134
5.8.4.1	Charakterystyczne geny na poszczególnych etapach rozwoju niewydolności serca myszy Tgaq*44.....	136
6.	Ograniczenia badań.....	137
7.	Wnioski.....	139
8.	Streszczenie.....	143
9.	Summary.....	146
10.	Referencje.....	149

1. Wstęp

1.1 Starzenie, jako czynnik rozwoju chorób

Jednym z największych wyzwań przyszłości jest starzejące się społeczeństwo. Przewiduje się, że do 2050 roku na świecie liczba osób powyżej 60 roku życia wzrośnie pięciokrotnie w porównaniu do 1950 roku i będzie dominującą grupą wiekową na świecie (1,2). Te zmiany demograficzne mogą wyrzucić głębokie implikacje społeczne i ekonomiczne. Mogą spowodować wzrost zapotrzebowania na świadczenia z usług służby zdrowia, wzrost kosztów opieki medycznej, obniżyć wzrost gospodarczy, spowodować spadek zdolności państw do finansowania programów pomocy społecznej, konieczność opieki medycznej nad starszymi ludźmi (1,3).

Starzenie nie jest chorobą, ale jest naturalnym procesem dotyczącym wszystkich żywych organizmów, w którym na skutek zależnych od czasu akumulacji czynników degeneracyjnych na poziomie molekularnym, komórkowym i ogólnoustrojowym dochodzi do upośledzenia funkcjonowania całego organizmu (4,5).

Czynniki degeneracyjne towarzyszące procesowi starzenia dzielą się na wewnętrzne i zewnętrzne. Reprezentujące czynniki wewnętrzne endogenne zmiany na poziomie molekularnym, przyczyniają się z czasem do widocznych zmian starczych na poziomie całego organizmu. Natomiast należące do czynników zewnętrznych, styl życia i środowisko bytowania, wpływają na funkcjonowanie całego organizmu, jak i na mechanizmy molekularne leżące u podłoża procesu starzenia. W związku z tym, pogłębienie wiedzy na temat interakcji między tymi dwoma rodzajami czynników procesu starzenia pozwoli na lepsze zrozumienie jego natury, jak i opracowanie prewencyjnych strategii terapeutycznych które mogły by hamować proces starzenia się organizmu (5).

Proces starzenia można rozpatrywać, jako starzenie chronologiczne lub biologiczne. W starzeniu chronologicznym akumulacja degeneracyjnych zmian w organizmach żywych wynika wyłącznie z upływu czasu życia jest jednakowa u wszystkich organizmów żywych. Z kolei, w starzeniu biologicznym stopień intensywności akumulacji zmian degeneracyjnych w organizmach żywych towarzyszących upływowi czasu życia (starzeniu chronologicznemu) zależy również od szeregu czynników wynikających ze stylu życia, oddziaływania środowiska czy rozwijających się chorób. W związku z tym starzenie biologiczne różni się pomiędzy gatunkami zwierząt, jednostkami wewnątrz gatunku i organami wewnątrz osobnika. Co istotne, starzenie biologiczne może podlegać modyfikacjom i być spowalniane, poprzez zmianę stylu życia (dietę, wysiłek fizyczny) i stosowane interwencje farmakologiczne (6–8).

Wiek jest głównym czynnikiem ryzyka rozwoju wielu chorób przewlekłych, odpowiedzialnych za skrócenie okresu zdrowia starzejących się ludzi i prowadzących do śmierci (9). Wśród chorób przewlekłych towarzyszących procesowi starzenia można wymienić choroby sercowo-naczyniowe, otyłość, cukrzycę typu 2, niealkoholowe stłuszczenie wątroby, niewydolność nerek, nowotwory, demencję, choroby Alzheimera i Parkinsona (10,11). Wykazano, że u ponad 90% ludzi powyżej 65 roku życia występuje co najmniej jedna przewlekła choroba towarzysząca starzeniu (12).

Pomimo tego, że na przestrzeni ostatnich lat rozwój nowych strategii leczenia chorób umożliwił wydłużenie długości życia ludzi, to nie uchronił on przed wzrastającą z wiekiem liczbą chorób współistniejących, które towarzyszą starzeniu, i wydłużają okres niepełnosprawności osób w podeszłym wieku (3).

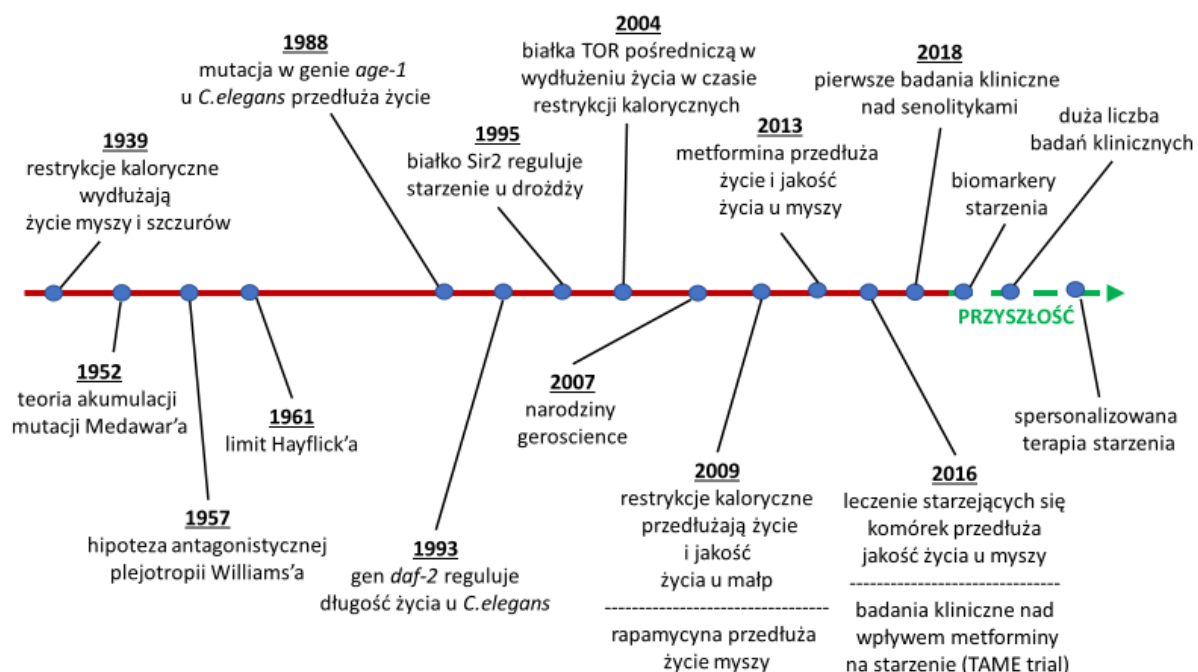
1.2 Historia badań dotyczących procesu starzenia

Na przestrzeni ostatnich stu lat dokonano znaczących postępów w zrozumieniu procesu starzenia. Odkryto, że za pomocą restrykcji kalorycznych można modulować proces starzenia (13) oraz hamować rozwój chorób towarzyszących starzeniu (14). Badania wykonane na muszkach owocowych dowiodły, że długość życia determinują geny (15). W 1988 roku odkryto, że mutacja w genie *age-1* spowodowała wydłużenie życia u *Caenorhabditis elegans* (16), a obecnie wiadomo, że w tym modelowym organizmie nicienia występuje ponad 800 genów modulujących długość życia¹.

Do tej pory udowodniono udział różnych ścieżek molekularnych zaangażowanych w proces starzenia, m.in. szlaku sygnalizacyjnego insuliny (17), szlaku zależnego od kinazy białkowej treoninowo-serynowej mTOR (*ang. mammalian target of rapamycin*)(18). Dowiedziono, że w proces starzenia zaangażowanych jest wiele procesów biologicznych takich jak; stres oksydacyjny (19), dysfunkcja mitochondriów (20), akumulacja starzejących się komórek (21), przewlekły stan zapalny (22), zaburzona homeostaza białek (23). Wykazano również, że białko Sir2 (*ang. silent information regulator 2*) oraz koenzym NAD⁺ są zaangażowane w wydłużenie długości życia związanego z restrykcjami kalorycznymi (24). Ponadto odkryto szereg związków, które mogą wpłynąć na wydłużenie długości życia jak: metformina (aktywator AMPK – *ang. adenosine monophosphate-activated protein kinase*)(25), rapamycyna (26) i jej analogi (inhibitory mTOR – *ang. mammalian target of rapamycin*), prekursorzy NAD⁺ (rybozyd nikotynamidu, mononukleotyd nikotynamidu), aktywatory sirtuiny

¹ <https://genomics.senescence.info/genes/search.php?organism=Caenorhabditis+elegans&show=4>

(np. resweratrol), oraz tzw. senolityki, tzn. związki o różnym mechanizmie działania, które selektywnie eliminują starzejące się komórki (27).



Ryc. 1 Kalendarium badań nad procesem starzenia. Na krzywej czasu przedstawiono najważniejsze odkrycia w dziedzinie badań nad procesem starzenia oraz perspektywy na przyszłość. Rycina na podstawie Campisi J., 2019 (27).

1.3 Geroscience – nauka o procesach starzenia

Na przestrzeni ostatnich 40 lat nastąpił postęp w medycynie dotyczący leczenia wielu chorób. Jednak, pomimo postępu medycyny, wiek nadal pozostaje ważnym czynnikiem ryzyka rozwoju wielu chorób, i współczesna medycyna ma ograniczone metody utrzymania „dobrostanu” zdrowotnego pacjenta w podeszłym wieku (27). Istnieje więc pilna potrzeba odnalezienia szlaków molekularnych łączących proces starzenia z rozwojem chorób przewlekłych oraz opracowanie strategii terapeutycznych mających na względzie leczenie jednocześnie kilku wzajemnie na siebie oddziałujących jednostek chorobowych towarzyszących procesowi starzenia, ostatecznie prowadząc do opóźnienia wpływu negatywnych skutków starzenia (9). Temu zadaniu próbuje sprostać nowy interdyscyplinarny dział nauki badający procesy starzenia się organizmu na styku normalnego starzenia się i chorób przewlekłych („geroscience”)(27), którego celem jest wydłużenie okresu zdrowia osób starszych oraz opóźnienie rozwoju chorób przewlekłych i osłabienia fizycznego ludzi starszych (*ang. frailty*)(28). Ważnym celem tej nowej dziedziny badań jest więc odnalezienie

mechanizmów i procesów biologicznych starzenia prowadzących do rozwoju wielu chorób przewlekłych wieku podeszłego i hamowanie ich, aby zapobiec powstawaniu kilku jednostek chorobowych jednocześnie w czasie starzenia (29).

Istotnym wyzwaniem dla współczesnej gerontologii jest również znalezienie biomarkerów starzenia biologicznego organizmu. Odkrycie takich biomarkerów mogło by umożliwić przewidywanie ryzyka rozwoju chorób przewlekłych towarzyszących starzeniu, jak i pozwoliło by monitorować skuteczność przeciwdziałania ich powstawaniu (27). Wyłonienie biomarkerów starzenia w dzisiejszych czasach jest ułatwione dzięki szybko rosnącej możliwości gromadzenia, przechowywania i analizy danych z zastosowaniem sztucznej inteligencji i technik uczenia maszynowego. Ostatnie odkrycia z wykorzystaniem wysokoprzepustowych badań proteomicznych, transkryptomicznych i epigenetycznych wskazują, że takie biomarkery istnieją (30).

1.4 Niewydolność mięśnia sercowego

Niewydolność mięśnia sercowego jest stanem klinicznym, w którym upośledzona praca serca uniemożliwia dostarczenie wystarczającej ilości krwi natlenowanej wraz ze składnikami odżywczymi do organizmu, by zaspokoić jego potrzeby w trakcie zwykłej codziennej aktywności fizycznej (31) oraz uniemożliwia odpowiedni powrót krwi żyłnej do serca (32). Rozwija się ona z powodu uszkodzenia mięśnia sercowego wywołanego różnymi czynnikami etiologicznymi, takimi jak choroba niedokrwienna serca, nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, wady zastawkowe serca, kardiomiopatie, infekcje, toksyny (32). W rozwój niewydolności serca może być zaangażowanych wiele patomechanizmów, m.in. przeciążenie hemodynamiczne serca, niedokrwienie mięśnia sercowego, nadmierna stymulacja neurohormonalna, przebudowa komórek serca, zaburzona gospodarka wapniowa w kardiomiocytach, nadmierna proliferacja macierzy zewnątrzkomórkowej, przyspieszona apoptoza oraz mutacje genetyczne (33).

Niewydolność serca przejawia się takimi objawami jak np. dusznościami, zmęczeniem, kołataniem serca, obrzękiem kończyn dolnych (32). Można ją sklasyfikować na podstawie czasu pojawienia się i trwania, jako ostrą lub przewlekłą, bądź na podstawie objętości frakcji wyrzutowej lewej komory, jako niewydolność serca ze zmniejszoną ($\leq 40\%$) lub zachowaną ($\geq 50\%$) frakcją wyrzutową (34). Niewydolność serca z zachowaną frakcją wyrzutową charakteryzuje się normalną objętością lewej komory, natomiast jej grubość jest powiększona, a współczynnik masy lewej komory do objętości końcowo-rozkurczowej jest zwiększony. Z kolei w niewydolności serca ze zmniejszoną frakcją wyrzutową lewa komora jest zwykle

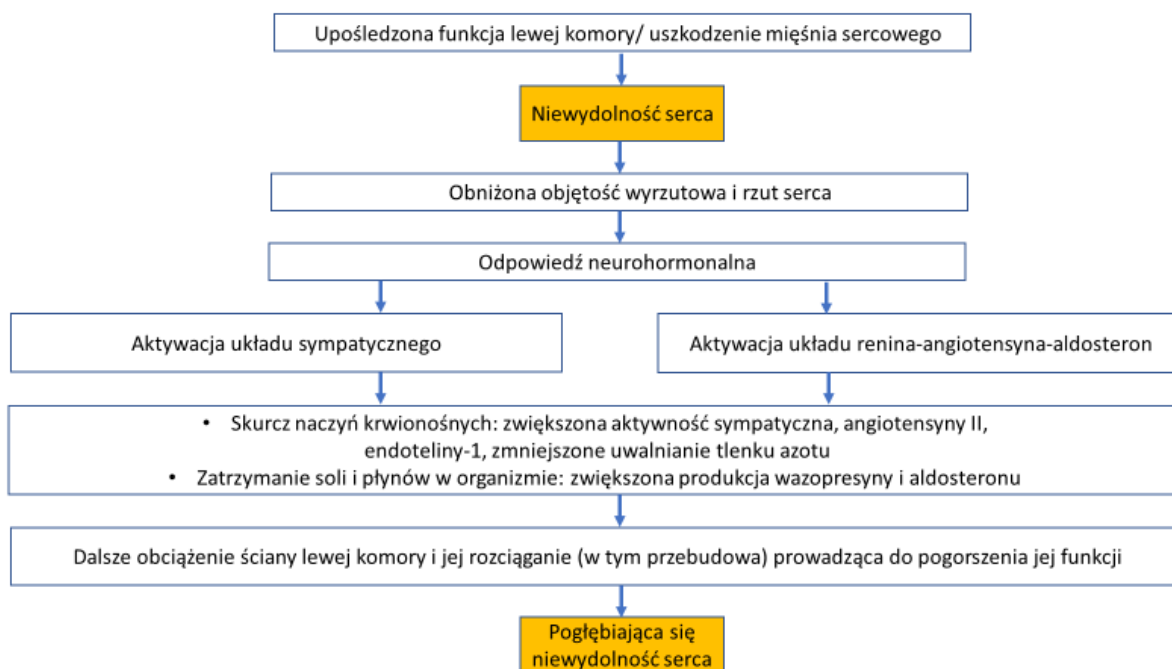
rociągnięta, natomiast współczynnik masy lewej komory do objętości końcowo-rozkurczowej jest normalny lub zmniejszony (33).

Obniżenie rzutu serca w niewydolności serca zarówno ze zmniejszoną i zachowaną frakcją wyrzutową prowadzi do aktywacji mechanizmów kompensacyjnych, które starają się utrzymać „prawidłową” funkcję serca, a z czasem przyczyniają się do pogłębienia niewydolności serca (35).

Mechanizm Frank-Sterling’a odgrywa ważną rolę na wczesnych etapach niewydolności serca (36). Umożliwia on zachowanie prawidłowej perfuzji tkanek poprzez wzrost rzutu serca w odpowiedzi na wzrost objętości końcowo-rozkurczowej lewej komory. Natomiast wraz z postępującą niewydolnością serca następuje zatrzymanie możliwości wzrostu objętości wyrzutowej lewej komory, pomimo dalszego możliwego wzrostu objętości końcowo-rozkurczowej lewej komory prowadząc do obniżenia rzutu serca i obrzęku płuc (32).

Na początkowych etapach niewydolności serca spadek rzutu serca prowadzi do odpowiedzi kompensacyjnej układu sympatycznego mającej na celu utrzymanie prawidłowej perfuzji tkanek (32) poprzez zwiększenie rytmu serca, zwiększenie kurczliwości serca, skurczu naczyń obwodowych (37). Z czasem jednak doprowadza do przerostu kardiomiocytów, procesów apoptotycznych i nekrotycznych w mięśniu sercowym (37), spadku frakcji wyrzutowej serca, arytmii i tachykardii oraz chronicznej aktywacji szlaku renina-angiotensyna-aldosteron (32).

Na początkowym etapie niewydolności serca aktywacja szlaku renina-angiotensyna-aldosteron wynikająca z obniżonego średniego ciśnienia tętniczego oraz aktywacji układu sympatycznego (32) prowadzi do wzrostu rzutu serca poprzez skurcz naczyń obwodowych, zwiększenie objętości krążącej krwi, zatrzymanie soli i wody w organizmie oraz stymulacji uwalniania noradrenaliny z zakończeń nerwowych układu sympatycznego (37). Natomiast wraz z postępującą niewydolnością serca, aktywacja tego szlaku prowadzi do przerostu i przebudowy mięśnia sercowego poprzez aktywację procesów włóknienia, aktywację apoptozy i uszkodzenie kardiomiocytów (38), skutkująca ostatecznie zwiększoną konsumpcją tlenu przez mięsień sercowy i upośledzoną jego wydajnością skurczową (34).



Ryc. 2 Mechanizmy neurohormonalne w rozwoju niewydolności serca. Rycina na podstawie Jackson G., 2000 (37).

1.5 Elementy patofizjologii rozwoju niewydolności serca, które mogą być przyspieszone przez starzenie

Wiek jest głównym czynnikiem ryzyka powstawania chorób sercowo-naczyniowych (39), dlatego szereg mechanizmów odpowiedzialnych za proces starzenia się serca jest wspólnych z patomechanizmami chorób układu krążenia (40). W szczególności do chorób sercowo-naczyniowych, w których istotną rolę odgrywa proces starzenia należy niewydolność serca (41). Dotychczasowo wykazano, że częstotliwość występowania niewydolności serca rośnie z wiekiem od około 1% w grupie wiekowej 40-59 lat, aż do około 12% w grupie wiekowej powyżej 80 lat (42), co stanowi obecnie łącznie ponad 64 miliony przypadków na świecie (43).

Zmiany towarzyszące starzejącemu się sercu, a zarazem będące wspólnymi z rozwojem niewydolności serca można sklasyfikować na czterech poziomach: funkcjonalnym, strukturalnym, komórkowym i molekularnym (40). Wiele spośród mechanizmów, które postulowano iż mają znaczenie w obydwu tych procesach było przedmiotem różnych badań farmakologicznych. Należały do nich: próby przywrócenia właściwego funkcjonowania mitochondriów, regulacja ilości starzejących się komórek (terapia senolityczna), regulacja procesów autofagii, proteostazy oraz skracania telomerów, hamowanie stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego, zwiększenie dostępności tlenu azotu (28).

W poniższych rozdziałach zostaną omówione kluczowe zmiany zachodzące w sercu w czasie starzenia, które mogą przyczyniać się do rozwoju niewydolności serca.

1.5.1 Zmiany funkcjonalne w sercu związane z procesem starzenia

Wzrastająca z wiekiem sztywność aorty przyczynia się do wzrostu obciążenia następczego serca (*afterload*), wzrostu ciśnienia skurczowego lewej komory oraz zaburzenia funkcji rozkurczowej lewej komory (39). Następuje zwiększenie aktywnego późno-rozkurczowego napełniania lewej komory ('A') przez skurcz lewego przedsionka (ulegającemu przerostowi) na rzecz pasywnego wczesno-rozkurczowego napełnienia lewej komory ('E'). Obydwa te parametry wskazują na wzrost udziału lewego przedsionka w całkowitej objętości końcowo-rozkurczowej lewej komory (44).

W trakcie starzenia się zdrowego serca, ogólna spoczynkowa funkcja skurczowa mięśnia sercowego nie zmienia się, natomiast rezerwa sercowa ulega zmniejszeniu w czasie wysiłku fizycznego. Pojawia się spadek kurczliwości mięśnia sercowego, spada maksymalna liczba uderzeń serca oraz maksymalna objętość frakcji wyrzutowej (40,44). Spowodowane są one obniżonymi właściwościami stymulacyjnymi i przewodzącymi węzła zatokowo-predsionkowego powstałymi na skutek przebudowy mięśnia sercowego (40) oraz zmniejszenia ilości prawidłowo funkcjonujących komórek stymulujących pracę serca (45) predysponując do powstania arytmii serca (40).

1.5.2 Zmiany strukturalne w sercu związane z procesem starzenia

W starzejącym się sercu następuje koncentryczny wzrost grubości mięśnia sercowego w lewej komorze powstały na skutek zwiększenia rozmiarów kardiomiocytów, natomiast wielkość jamy lewej komory się nie zmienia (46). Z kolei lewy przedsionek ulega hipertrofii oraz rozciągnięciu. Obydwa te parametry przebudowy serca są związane z głównymi zmianami patologicznymi starzejącego się serca obejmujące migotanie przedsionków oraz niewydolność serca z zachowaną frakcją wyrzutową (40).

1.5.3 Zmiany na poziomie komórkowym w sercu związane z procesem starzenia

Na poziomie komórkowym w czasie starzenia się serca dochodzi do utraty kardiomiocytów z powodu apoptozy na rzecz wzrostu ich rozmiarów (47). Równocześnie stopniowo spowalnia tempo odnawiania ludzkich kardiomiocytów od 0,8% do 0,3% nowych kardiomiocytów na rok między 20 a 75 rokiem życia. Taka dynamika wymiany

kardiomiocytów sprawia, że z wiekiem następuje akumulacja starszych kardiomiocytów na rzecz młodszych w mięśniu sercowym (48).

W starzejącym się sercu zwiększa się również odkładanie amyloidu (49), spada ilość komórek stymulujących pracę serca w węźle zatokowo-przedsionkowym (46) oraz zachodzą zmiany w budowie macierzy zewnątrzkomórkowej (50). Na skutek rozregulowania z wiekiem syntezy i degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej, w obrębie tkanki łącznej serca gromadzi się kolagen, glikoproteiny, proteoglikany, glikozaminoglikany, i zwiększa się również ekspresja integrzyn (51,52). Zachodzą również zmiany w ilości poszczególnych typów kolagenu. Wzrasta ilość kolagenu typu I (o wysokiej wytrzymałości), a spada kolagenu typu III (bardziej elastycznego) przyczyniając się do usztywnienia lewej komory serca i obniżenia funkcji biomechanicznej mięśnia sercowego (51,53).

1.5.4 Zmiany na poziomie molekularnym w sercu związane z procesem starzenia

1.5.4.1 Mitochondria

Mitochondria, uważane są za ważne organelle zaangażowane w proces starzenia ze względu na zwiększoną produkcję reaktywnych form tlenu z wiekiem (39,54), które przyczyniają się do akumulowania mutacji w mitochondrialnym DNA i spadku wierności jego replikacji (55). Równocześnie reaktywne formy tlenu poprzez utlenianie białek i lipidów w mitochondrium powodują obniżenie wydajności łańcucha oddechowego i zmniejszenie ich pojemności bioenergetycznej (55,56).

Starzeniu serca towarzyszą również zmiany w budowie mitochondriów (zwiększenie rozmiarów, utrata grzebieni mitochondrialnych) (57,58), jak i zaburzenia w procesach kontroli ich jakości – fuzji, fizji oraz mitofagii (55).

1.5.4.2 Sygnalizacja β -adrenergiczna oraz gospodarka wapniowa

Sygnalizacja β -adrenergiczna zaangażowana jest w kontrolę rytmu serca, kurczliwość mięśnia sercowego, jak i przemodelowanie strukturalne komórek pod wpływem katecholamin (40). Aktywacja receptorów β -adrenergicznych prowadzi do regulacji obrotu wapnia w komórce mięśnia sercowego poprzez kontrolę funkcji białek, takich jak kanały wapniowe typu L, fosfolamban oraz kinazy białkowej II zależnej od wapnia i kalmoduliny (CaMKII) (59).

Proces starzejącego się serca związany jest z zaburzeniem w sygnalizacji β -adrenergicznej (50). Sugerowano, że zwiększonemu z wiekiem stężeniu krążących w osoczu katecholamin, może towarzyszyć spadek gęstości receptorów β -adrenergicznych w sercu (60).

Efektem tego jest zmniejszenie wrażliwości receptorów β -adrenergicznych na katecholaminy i tym samym osłabienie odpowiedzi β -adrenergicznej (60) objawiającej się zaburzoną funkcją chronotropową serca oraz obniżoną rezerwą inotropową (61). Dodatkowo, redukcja wychwytu zwrotnego wapnia z wiekiem przez pompę sarko-endoplazmatyczną (SERCA2) (61) wywołaną obniżoną jej ekspresją (62) i aktywnością (63) skutkuje osłabieniem aktywnego rozkurczu kardiomiocytów, leżącej u podłoża zależnej od wieku dysfunkcji rozkurczowej serca (50).

1.5.4.3 Szlak renina-angiotensyna-aldosteron

Sugerowano również, że starzejące się serce wykazuje się zwiększoną aktywacją szlaku renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS – *ang. renin-angiotensin-aldosterone system*) (50). Wzrost obciążenia mechanicznego serca wskutek usztywnienia naczyń krwionośnych z wiekiem powoduje przebudowę mięśnia sercowego poprzez nasilenie rozciągania kardiomiocytów i fibroblastów doprowadzając do aktywacji sygnalizacji renina-angiotensyna-aldosteron (64). Wydzielona wówczas angiotensyna II z kardiomiocytów oddziałuje autokrynnie, jako początkowy mediator odpowiedzi hipertroficzej zależnej od rozciągania (65). Równocześnie łącząc się z receptorami angiotensynowymi (zwłaszcza AT_1) powoduje wzrost generacji wolnych rodników, promowanie dysfunkcji mitochondriów przyczyniających się do uszkodzenia serca (66). Angiotensyna II stymuluje również proliferację sercowych fibroblastów i zwiększa ich aktywność do syntezy kolagenu (67), oraz aktywuje apoptozę kardiomiocytów, wskutek wzrostu cytozolowego wapnia i stymulację zależnych od wapnia endonukleaz (68).

Angiotensyna II wpływa w sposób pośredni na aktywację TGF- $\beta 1$ (*ang. transforming growth factor $\beta 1$*) (69), który odgrywa kluczową rolę w przebudowie macierzy zewnątrzkomórkowej poprzez syntezę i sekrecję kolagenu z sercowych fibroblastów. Co istotne, w procesie starzenia następuje wzrost ekspresji kolagenu w przestrzeni śródmiąższowej i regionach okołonaczyniowych (70).

Kluczowa strategia leczenia niewydolności serca, polega na hamowaniu aktywności szlaku renina-angiotensyna-aldosteron i opiera się na stosowaniu inhibitorów ACE (*ang. angiotensin I converting enzyme*), antagonistów receptorów angiotensynowych (ARBs), antagonistów receptorów mineralokortykoidowych (MRAs), antagonistów receptorów angiotensynowych wraz z inhibitorami neprylizyny (ARNIs) (34).

1.5.4.4 Stan zapalny

Charakterystyczną cechą procesu starzenia jest przewlekły stan zapalny (22). Wzrost zapotrzebowania na tlen i energię przez hipertroficzne kardiomiocyty (71) generuje środowisko hipoksji, które pobudza kardiomiocyty do uwalniania pro-zapalnych cytokin i chemokin stymulujących odpowiedź immunologiczną do zwiększenia liczby makrofagów (źródła metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej MMPs – *ang. matrix metalloproteinases*) w lewej komorze serca (72,73). Wśród metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej, szczególną rolę pełni MMP-9, która jest odpowiedzialna za proteolityczne przetwarzanie komponentów macierzy zewnątrzkomórkowej (74), cytokin oraz czynników mitogennych, takich jak endotelina-1, interleukina (IL)-1 β , IL-6 (*ang. interleukin 6*), TNF- α (*ang. tumor necrosis factor α*), TGF- β (75,76). Sugeruje się, że zwiększona aktywacja MMP-9 i makrofagów w lewej komorze starego serca leżą u podstaw procesu zapalenia obserwowanego w starzejącym się sercu (72).

1.5.4.5 Telomery

Długość telomerów jest prawdopodobnie najlepiej znanym markerem komórkowym procesu starzenia (6). Telomery zbudowane z powtarzalnych sekwencji nukleotydowych (TTAGGG) zlokalizowanych na końcach chromosomów odpowiadają za ich stabilność poprzez zapobieganie nieprawidłowym zmianom wynikłym z replikacji DNA.

Skracanie telomerów jest nieodzownym procesem towarzyszącym podziałowi komórkowemu, jak i nieuniknioną fizjologiczną konsekwencją starzenia. Zbyt krótkie telomery sygnalizują komórce zatrzymanie procesu proliferacji komórki, starzenie komórkowe bądź proces apoptozy (77). Zmodyfikowane modele genetyczne zwierząt wykazały związek przyczynowo skutkowy między skróconymi telomerami, a skróconą długością życia (4) oraz fenotypem starzejącego się serca (78). Meta-analiza dotycząca zależności między długością telomerów w leukocytach (służących, jako marker długości telomerów w mniej dostępnych tkankach) a chorobą wieńcową serca wykazały, że im dłuższe telomery w leukocytach jest krótsza, tym wyższe jest ryzyko wystąpienia choroby niedokrwiennej serca (79).

1.5.4.6 Uszkodzenia materiału genetycznego

Akumulacja uszkodzeń w materiale genetycznym (również mitochondrialnym DNA) w trakcie życia dowodzi, iż są one istotnym czynnikiem zaangażowanym w proces starzenia (4).

Stabilność nici DNA nieustannie poddawana jest działaniu bodźców zarówno zewnętrznych (czynniki fizyczne, chemiczne, biologiczne) i wewnętrznych (błędy procesu replikacji, reaktywne formy tlenu) prowadzących z czasem do powstania różnych nieprawidłowości w materiale genetycznym m.in. wskutek błędów w naprawie DNA, mutacji punktowych, translokacji, utraty chromosomów (4). Wyniki badań pochodzących od ludzi z zespołem progerii Hutchinsona-Gilforda (objawiający się przedwczesnym starzeniem)(80) oraz badań prowadzonych z wykorzystaniem modeli zwierzęcych modyfikowanych genetycznie (81,82) wskazują na powiązanie zaburzeń w materiale genetycznym (m.in. mutacji punktowej genu *LMNA* - ang. *lamin A/C* lub zmienionej podjednostki katalitycznej PolgA - ang. *mitochondrial DNA polymerase γ catalytic subunit* w polimerazie mitochondrialnego DNA) z pojawieniem się zaburzeń sercowo-naczyniowych towarzyszących starzeniu się organizmu)(80,82).

1.6 Udział zaburzeń czynności śródbłonka naczyń krwionośnych w rozwoju niewydolności serca towarzyszącej starzejącemu się sercu

Dysfunkcja śródbłonka naczyń krwionośnych idzie w parze z procesem starzenia (83) i charakteryzuje się obniżonymi zdolnościami regeneracyjnymi komórek, zwiększeniem ilości starzejących się komórek i obniżoną aktywnością mechanizmów regulujących homeostazę naczyń krwionośnych (84). Między innymi z wiekiem dochodzi do obniżenia biodostępności tlenku azotu (NO) i jest to związane ze spadkiem ekspresji śródbłonkowej syntazy tlenku azotu (eNOS – ang. *endothelial nitric oxide synthase*)(85) oraz ze wzrostem generacji reaktywnych form tlenu (w tym $O_2^{\cdot-}$)(86), które łącząc się z NO powodują powstawanie reaktywnych form azotu (nadtlenoazotynu $ONOO^-$). Zarówno reaktywne formy tlenu jak i azotu przyczyniają się do rozprzęgania eNOS, czyli produkowania $O_2^{\cdot-}$ w miejsce NO, tym samym tworząc pętlę dodatniego sprzężenia zwrotnego do produkcji wolnych rodników i powstania stresu oksydacyjnego (87). Zaburzona produkcja reaktywnych form tlenu może przyczynić się do aktywacji jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF kappa B (NFkB) prowadzącego do ekspresji prozapalnych genów w śródbłonku (88).

Szereg zmian w śródbłonku naczyniowym występujących w zaawansowanym wieku doprowadza do wzrostu sztywności ścian naczyń wieńcowych (83), zmniejszenia gęstości kapilar (89), spadku przepływu wieńcowego (83) oraz spadku rezerwy przepływu krwi przez mięsień sercowy (83,90) i wszystkie te zmiany mogą przyczyniać się do rozwoju niewydolności serca (84).

1.7 Starzenie się organizmu a niewydolność mięśnia sercowego – podsumowanie

Podsumowując, z każdą dekadą życia powyżej 50 roku życia ryzyko wystąpienia niewydolności serca wzrasta dwukrotnie (91), dowodząc temu, że rozwój niewydolności serca jest w dużym stopniu determinowany przez proces starzenia. W związku z tym, mechanizmy związane z procesem biologicznego starzenia się serca, w tym krążenia wieńcowego mogą mieć istotne znaczenie w rozwoju niewydolności mięśnia sercowego. Lepsze poznanie zależności między tymi procesami (rozwojem niewydolności serca i procesem starzenia się serca) może umożliwić znalezienie nowych biomarkerów wczesnego starzenia się serca, jak i przyczynić się do wynalezienia skuteczniejszych metod terapeutycznych zapobiegania rozwojowi niewydolności serca w oparciu o terapeutyczne hamowanie mechanizmów starzejącego się serca.

Do tej pory, wiele badań dotyczących procesu starzenia i chorób mu towarzyszących było wykonywanych z wykorzystaniem mysich modeli, które nie odzwierciedlały złożoności ich powstawania w trakcie procesu starzenia u ludzi. Ponadto, skuteczność zastosowanych terapii u młodych, zmodyfikowanych genetycznie myszy może nie odzwierciedlać tej skuteczności u starszych osobników, jak i u ludzi. Istnieje więc potrzeba uwzględnienia efektu starzenia się organizmu w eksperymentach prowadzonych z wykorzystaniem modeli zwierzęcych chorób (9). W tym świetle, aby umożliwić zbadanie wzajemnych zależności między procesami uczestniczącymi w starzeniu się serca, a procesami prowadzącymi do rozwoju niewydolności mięśnia sercowego kluczowe jest aby wykorzystać modele zwierzęce, które długotrwale rozwijają niewydolność mięśnia sercowego.

W niniejszej pracy doktorskiej wykorzystano unikatowy mysi model niewydolności mięśnia sercowego rozwijającej się powoli, który naśladuje mechanizmy neurohormonalne rozwoju niewydolności mięśnia sercowego u ludzi, oraz podjęto próbę opisanie znaczenia procesu starzenia się serca w rozwoju niewydolności mięśnia sercowego.

2. Cel pracy

Głównym czynnikiem ryzyka chorób sercowo-naczyniowych, w tym niewydolności mięśnia sercowego jest wiek. Szereg mechanizmów zaangażowanych w proces starzenia się serca może przyczyniać się do rozwoju niewydolności serca.

Głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej było opisanie mechanizmów odpowiedzialnych za starzenie się serca w toku rozwoju niewydolności serca oraz opisanie wzajemnych zależności pomiędzy procesami starzenia się oraz rozwojem niewydolności mięśnia sercowego.

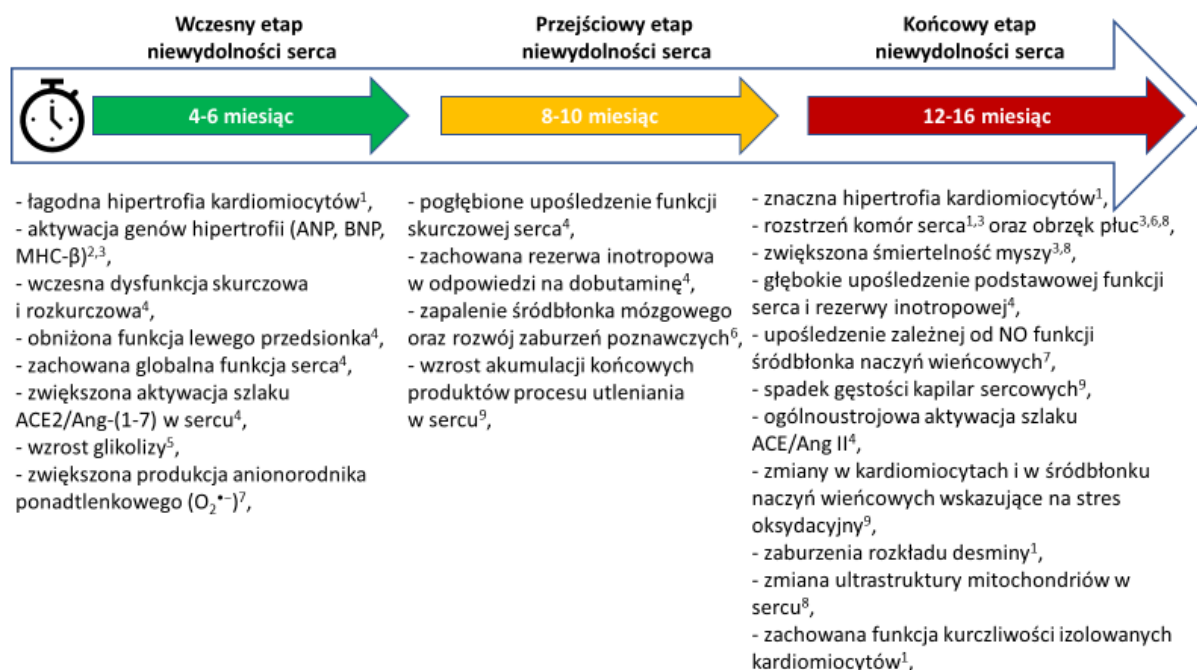
W pracy wykorzystano unikatowy myszy model niewydolności mięśnia sercowego (myszy Tgαq*44), w którym niewydolność serca rozwija się przez wiele miesięcy, co umożliwiło śledzenie zmian pojawiających się w wyniku postępującego procesu starzenia się serca oraz patologii serca wywołanej przez modyfikację genetyczną kardiomiocytów pierwotnie odpowiedzialną za rozwój niewydolności serca.

Zmiany związane z rozwojem niewydolności serca myszy Tgαq*44 analizowano na poziomie funkcjonalnym, morfologicznym, hormonalnym, transkryptomicznym, wykorzystując szereg metod badawczych obejmujących obrazowanie *in vivo* z wykorzystaniem rezonansu magnetycznego (MRI – *ang. magnetic resonance imaging*), pomiar przepływu wieńcowego *in vivo* z wykorzystaniem ultradźwiękowej sondy dopplerowskiej, perfuzję izolowanych serc *ex vivo*, metodą Langendorffa, barwienia histologiczne i immunohistochemiczne, obrazowanie ultrastruktury mięśnia sercowego za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM – *ang. transmission electron microscopy*), wysokociśnieniową chromatografię cieczową połączoną z tandemową spektrometrią mas (HPLC–MS/MS) oraz w końcu sekwencjonowanie nowej generacji (NGS – *ang. next generation sequencing*).

3. Materiały i metody

3.1 Zwierzęta

Do badań zostały wykorzystane myszy zmodyfikowane genetycznie (myszy Tgαq*44) ze stale aktywną podjednostką αq białka G prowadzącą do powolnego rozwoju przewlekłej niewydolności serca (92). Kontrolę stanowiły myszy dzikie FVB. W eksperymentach zostały wykorzystane samice myszy Tgαq*44 na różnych etapach rozwoju niewydolności serca od 4 do 17 miesiąca życia - reprezentujących wczesny (4-6 miesiąc), przejściowy (8-10 miesiąc) oraz końcowy (12-17 miesiąc) etap niewydolności serca w tym modelu (93, **ryc. 3**). Zwierzęta przechowywano w warunkach wolnych od patogenów, karmionych standardową dietą laboratoryjną z dostępem do wody *ad libitum*, w warunkach otoczenia (22 - 25°C, 45 – 65% wilgotności i 12 h jasny / ciemny cykl).



Ryc. 3 Charakterystyka rozwoju niewydolności serca w modelu Tgαq*44 (1 - Mackiewicz U., 2012; 2 - Mende U., 2001; 3 - Drelicharz Ł., 2009; 4 – Tyrankiewicz U., 2018; 5 - Czarnowska E., 2016; 6 - Adamski M., 2018; 7 - Drelicharz Ł., 2008; 8 - Elas M., 2008; 9 - Proniewski B., 2018).

3.2 Obrazowanie funkcji serca metodą rezonansu magnetycznego (MRI)

Obrazowanie czynności serca metodą rezonansu magnetycznego zostało wykonane u młodych (4-miesięcznych), jak i starych myszy Tgαq*44 (12-miesięcznych) i myszy FVB (16-miesięcznych) zgodnie z opracowaną metodologią przez zespół JCET, opisaną w opublikowanych wcześniej pracach (93–97).

Zbieranie danych: Wszystkie eksperymenty zostały przeprowadzone z wykorzystaniem skanera 9.4T MRI (Bruker BioSpin, Ettlingen, Niemcy) specjalnie dedykowanego do badań małych zwierząt, wyposażonego w 36 mm cewkę nadawczo-odbiorczą. Podczas trwania pomiarów zwierzęta były umieszczane w pozycji horyzontalnej w specjalnej kołysce i utrzymywane w anestezji wziewnej z izofluranem (1,7%) dostarczany przez stożek nosowy w mieszaninie tlenu z powietrzem w stosunku 1:2. Elektrokardiogram (EKG), rytm oddechu i temperatura ciała były monitorowane na bieżąco w trakcie eksperymentu (SA Instruments, New York, USA). Aby ocenić hemodynamikę lewej komory (LV – *ang. left ventricle*), wykorzystano sekwencję echa gradientowego FLASH z kompensacją przepływu, dostępną w oprogramowaniu dostarczonym przez producenta ParaVision 6.0.1 (Bruker BioSpin, Ettlingen, Niemcy). W tym celu obrazowano 6-7 sąsiadujących warstw obejmujących całą objętość lewej komory w osi krótkiej serca. Rejestrowany sygnał był bramkowany prospektywnie przy użyciu EKG i poduszki do oddechu. Użyto następujących parametrów obrazowania: Field-of-view (FOV) 30 x 30 mm², macierz akwizycji danych: 192 x 192, TE/TR = 2,3/5 ms, grubość warstwy = 1 mm, liczba uśrednień = 4, kąt wychylenia magnetyzacji = 11°. W zależności od rytmu serca zbierane były 22-24 następujące po sobie w cyklu serca obrazy. Szybkość napełniania i szybkość wyrzutowa lewej komory były uzyskiwane z warstwy umieszczonej na wysokości mięśnia brodawkowego, w osi krótkiej serca. W tym przypadku wykorzystano retrospektywne bramkowanie sygnału w sekwencji FLASH (IgFLASH). Sygnał nawigatora został zebrany w tej samej geometrii, co obrazowana warstwa. Zastosowano następujące parametry zbierania danych: FOV 30 x 30 mm², macierz akwizycji danych: 128 x 128, TE/TR = 1,3/4,2 ms, grubość warstwy = 1 mm, liczba uśrednień = 1200, kąt wychylenia magnetyzacji = 11°. Dane zostały zrekonstruowane do 60 klatek na cykl serca za pomocą skryptu makro dostarczonego przez producenta (ParaVision 6.0.1, Bruker BioSpin, Ettlingen, Niemcy). Do pomiaru odkształceń mięśnia lewej komory wykorzystano znakowanie magnetyzacji w sekwencji FLASH (parametry obrazowania: TE/TR 1,5/4,8 ms, kąt wychylenia magnetyzacji = 11°, FOV 30 x 30 mm², macierz 192 x 192, grubość warstwy = 1 mm, 16 powtórzeń, 20–25 klatek/cykl serca) przy użyciu modułu przestrzennej modulacji magnetyzacji (SPAMM – *ang. spatial modulation of magnetization*) do generacji znaczników (kwadratowe znaczniki: grubość linii 0,2 mm; zakres 0,6 mm). Sygnał był bramkowany prospektywnie przy użyciu EKG i poduszki do oddechu.

Analiza danych: Krzywa czas-objętość (TVC – *ang. time-volume curve*) została obliczona z objętości lewej komory (obejmującej mięśnie brodawkowate) i oszacowana przy wykorzystaniu krótko-osiowej, warstwa po warstwie w półautomatycznej segmentacji

(Segment; Medviso) (98). Objętość końcowo-skurczowa i objętość końcowo-rozkurczowa, objętość wyrzutowa, frakcja wyrzutowa, wyrzut serca, indeks sercowy [indeks sercowy x wyrzut serca/powierzchnia ciała (BSA); $BSA = 9,822 \times (\text{masa ciała})^{2/3}$] (99) zostały oszacowane z krzywej czas-objętość. Odcinkowa regresja liniowa implementowana w programie MatLAB (MathWorks) została użyta do uzyskania szybkości wyrzutowej, szybkości napełniania z nachyleniami segmentów dopasowanych przez odcinkową regresję liniową znormalizowana do poszczególnych objętości wyrzutowych, cyklu serca i R-R (odstęp czasowy pomiędzy dwoma kolejnymi załamkami R w zapisie EKG) (100,101). Czas trwania wyrzutu serca, relaksacji izowolumetrycznej, napełniania serca, faz skurczu izowolumicznego był brany z odcinkowej regresji liniowej i normalizowany do przedziału R-R. Analiza odkształceń mięśnia sercowego została wykonana przy użyciu skryptu napisanego w środowisku MatLAB i oparata o algorytm kombinacji faz harmoniczych (HARP – *ang. peak-combination harmonic phase*). Mapy odkształceń zostały użyte do obliczenia ortogonalnych do siebie współczynników naprężenia radialnego (Err) i obwodowego (Ecc) (szczytowo skurczowe - Es, końcowo-skurczowe - Ees, maksymalne poskurczowe – Epost) i współczynników szybkości odkształcenia (skurczowe - SRmax, wczesno-rozkurczowe - SRe, przedsionkowo-rozkurczowe - Sra oraz ich iloczynu SRe/a), rozciągnięcia skurczowego (SS), indeksu odkształcenia poskurczowego ($PSI = (E_{post} - E_{es})/E_{max}$) i wskaźnika odkształcenia szczytowego (time-to-peak strain index) ($T_{peakSI} = T_{peak}/RR$) (102–104). Odkształcenia oceniano w ośmiu segmentach otaczających przekroje mięśnia sercowego, a następnie uśredniano.

3.3 Badania makroskopowe serc myszy Tgaq*44 w toku rozwoju niewydolności serca - masa serc, komór serca i przedsionków

Masy serc były natychmiast mierzone po eksperymentach na perfundowanych, izolowanych sercach myszy. Następnie odcinano przedsionki i ważono komory serc. Masa przedsionków była ustalana na podstawie różnicy między masą całych serc, a masą komór.

3.4 Badania mikroskopowe serc myszy Tgaq*44 w toku rozwoju niewydolności serca – zwłóknienie, macierz zewnątrzkomórkowa, gęstość kapilar, triangulacja, światło kapilar

Serca myszy 4-, 6-, 8-, 10-, 12-, 14-miesięcznych Tgaq*44 i FVB zostały utrwalone w zbuforowanej 4% formalinie, a następnie zatopione w bloczkach parafinowych, które pokrojono seryjnie na skrawki grubości 5 μm . Skrawki sercowe zabezpieczono na różne barwienia histologiczne i immunohistochemiczne, w celu identyfikacji tych samych struktur na sąsiadujących skrawkach.

Barwienia: Do oceny topografii tkanki sercowej wykorzystano barwienie hematoksyliną-eozyną. W celu wykazania, scharakteryzowania i oceny ilościowej włóknienia preparaty barwiono Czerwinią Syriuszową (Picro Sirius Red). Charakterystyki przestrzennej konfiguracji sieci mikrokrażenia oraz ilościowej oceny mikrokrażenia dokonano na podstawie barwienia immunohistochemicznego glikokaliksu tych naczyń z wykorzystaniem lektyny z użyciem DAB-u jako chromogenu. Barwienie z użyciem lektyny (także z zastosowaniem DAB-u) wykonano powtórnie, ale z jednoczesnym barwieniem metodą paS (*ang. periodic acid Schiff*) w celu uwidocznienia paS-pozytywnych struktur macierzy zewnątrzkomórkowej (glikozaminoglikanów, tj. GAG-ów, glikoproteidów) i ich kolokalizacji z siecią kapilar.

Wizualizacja, dokumentacja i analiza obrazów histologicznych: Obrazy histologiczne zostały uzyskane przy użyciu standardowego mikroskopu świetlnego Olympus BX51 z wykorzystaniem oprogramowania VS-ASW 2.6 (Olympus, Tokyo, Japonia). Oceny jakościowej i ilościowej topografii serca dokonano przy powiększeniu 20, 100, 200 i 400x. Algorytm do oceny ilościowej komórkowości podścieliska opracowano z użyciem programu Ilastik dla skanów całych serc z pod powiększenia 20x. Do oceny charakteru włóknienia użyto obrazów o powiększeniu 200 i 400x. Do liczenia stopnia zwłóknienia wykorzystano skany całych przekrojów wykonane z pod 20-krotnego powiększenia. Algorytm opracowano w oparciu o program Ilastik. Dla oceny kapilaryzacji wykorzystano randomowe zdjęcia z poprzecznych przekrojów mięśni brodawkowatych (tylko obszary z poprzecznymi przekrojami przez włókna mięśniowe) z pod powiększenia 200x. Do obliczeń użyto systemu Columbus. Dla zobrazowania kompleksów macierzy z udziałem obojętnych cukrowców (GAG-i, glikoproteidy) wykonano zdjęcia z pod 400-krotnego powiększenia a następnie zastosowano technikę inwersji kolorów.

3.5 Badania ultrastruktury mięśnia sercowego z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM)

Fragmenty mięśnia sercowego z obszarów mięśni brodawkowatych (przekrój poprzeczny względem długiej osi włókna mięśniowego) oraz z wolnej ściany lewej komory (przekrój podłużny przez włókna mięśniowe) zostały w ciągu 5 minut od uśmiercenia myszy umieszczone w utrwalczu Karnowskiego (roztwór: 2% paraformaldehydu, 2,5% glutaraldehydu w 0,1M buforze kakodylanowym o pH 7,4) na 24 h w temp. +4°C, a następnie przepłukane 3x10 min. 0,1M buforem kakodylanowym. Kolejno, fragmenty tkanki sercowej poddano inkubacji w 1% roztworze czterotlenku osmu i przepłukano wodą po 3x10 min. Do odwodnienia tkanki użyto wzrastającego stężenia etanolu: 50% (10 min), 70% (40 min, roztwór

etanolu zawierał 2% octan uranylu), 90% (10 min), 96% (10 min) i 2×100% (20 min, każdy). Następnie inkubowano fragmenty mięśnia sercowego przez 10 min w mieszaninie 100% etanol : 100% tlenek propylenu w stosunku 1:1 oraz po 2×15 min w 100% tlenku propylenu. Zatapianie wykonano w żywicy Epoxy Embedding Medium przygotowanej zgodnie z dostarczonym przez producenta protokołem. W pierwszej kolejności tkankę sercową inkubowano przez 1 h w mieszaninie tlenek propylenu : żywica w stosunku 1:1, następnie przez 1 h w mieszaninie tlenek propylenu : żywica w stosunku 1:2 i ostatecznie w samej żywicy w dwu zmianach – 2h oraz przez całą noc. Kolejnego dnia tkankę w nowej porcji żywicy przenoszono do formy na bloczki i polimeryzowano przez 2 doby w temp. 60°C. Przy użyciu ultramikrotomu Leica Ultracut R krojono fragmenty mięśnia sercowego na skrawki o grubości 60 nm, zbierano na siatki TEM i kontrastowano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu. Obrazowanie ultrastruktury mięśnia sercowego w materiale pochodzącym od 4- i 14-miesięcznych myszy Tgaq*44 i FVB wykonano za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego JEM 1400 wyposażonego w cyfrową 11 megapikselową kamerę Morada G2 w Pracowni Mikroskopii Elektronowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie.

3.6 Badania czynności krążenia wieńcowego z wykorzystaniem ultradźwiękowej sondy dopplerowskiej do pomiaru szybkość przepływu wieńcowego

Myszy były poddawane szybkiej anestezji poprzez użycie mieszaniny izofluranu (Aerrane; Baxter Sp. z o. o., 2,0 vol%) z tlenem i powietrzem (w stosunku 1:2). Następnie myszy umieszczano w pozycji na wznak, na ciepłej płytce z kontrolą temperatury i monitoringiem EKG. Miernik temperatury umieszczany był doodbytniczo, by monitorować temperaturę myszy, która w trakcie całego eksperymentu była utrzymywana w okolicy 37°C. Myszy w trakcie pomiarów dopplerowskich były poddawane stałej anestezji izofluranem 1,5%. Za pomocą sondy dopplerowskiej o wartości 20-MHz przymocowanej do mikromanipulatora i skierowanej równolegle względem podłoża, wyszukiwano na powierzchni klatki piersiowej myszy, w okolicy serca charakterystyczną falę przepływu dla przepływu wieńcowego przez lewą główną tętnicę wieńcową. Zmiany przepływu wieńcowego monitorowano za pomocą Systemu do pomiaru prędkości przepływu z wykorzystaniem sondy dopplerowskiej (Indus Instruments, Scintica Instrumentation). Pomiaru szybkości przepływu wieńcowego wykonywano dla podstawowego przepływu wieńcowego podczas anestezji z wykorzystaniem izofluranu 1,5% oraz rezerwy przepływu wieńcowego po podaniu dożylnym (do żyły ogonowej) regadenosonu w postaci roztworu do wstrzykiwań (Rapiscan) lub roztworu

regadenosonu w 5% DMSO o końcowym stężeniu 0,1 µg/g masy ciała. Monitorowano maksymalny wzrost szybkości przepływu w odstępach 1 minutowych przez 10 minut po podaniu regadenosonu. Analizy obrazów przepływów wieńcowych zostały wykonane z użyciem programu do przetwarzania sygnału dopplerowskiego (version 1.625, Indus Instruments). Najwyższe wartości szybkości przepływu (PVF - *ang. peak velocity flow*) wieńcowego uzyskane w czasie 10 minutowego pomiaru po podaniu regadenosonu zostały przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej.

3.7 Badanie czynności krążenia wieńcowego z wykorzystaniem modelu izolowanego perfundowanego serca myszy

Myszy były usypiane poprzez dootrzewnowe wstrzyknięcie mieszaniny ketaminy (100 mg/kg masy ciała) z ksylazyną (10 mg/kg masy ciała). Po rozcięciu klatki piersiowej, serca były natychmiastowo wyciągane i umieszczane w zimnym buforze Krebs-Henseleit'a (o temp. 4°C) i do 2 minut podwieszane za aortę do kaniuli w aparacie do perfuzji izolowanych serc (IH-SR, Type 844, Hugo Sachs Electronics (HSE), Niemcy). Serca były perfundowane wstecznie przez aortę według metody Langendorff'a z wykorzystaniem dwóch różnych protokołów eksperymentalnych:

Protokół 1: ciśnienie perfuzyjne 90 mmHg; zmodyfikowany bufor Krebs-Henseleit'a o składzie (mM): NaCl 118,00; KCl 4,70; CaCl₂ 2,52; MgSO₄ 1,64; NaHCO₃ 24,88; KH₂PO₄ 1,18; glukoza 10,00; pirogronian sodu 2,00; EDTA 0,50; hepes 12,50 oraz 10 g% albuminy. Serca w trakcie eksperymentu nie były stymulowane elektryczną impulsacją.

Protokół 2: ciśnienie perfuzyjne 100 mmHg; zmodyfikowany bufor Krebs-Henseleit'a o składzie (mM): NaCl 118,00; KCl 4,70; CaCl₂ 2,52; MgSO₄ 1,64; NaHCO₃ 24,88; KH₂PO₄ 1,18; glukoza 10,00; pirogronian sodu 2,00; EDTA 0,50. Serca w trakcie eksperymentu były stymulowane elektryczną impulsacją pozwalającą uzyskać stabilne bicie serca o częstotliwości 450-600 uderzeń na minutę.

W przypadku metody „pracującego serca”: przez pierwsze minuty eksperymentu serca były perfundowane buforem Krebs-Henseleit'a (takim jak dla protokołu 1-go) wstecznie przez aortę według metody Langendorff'a z ciśnieniem perfuzyjnym 90 mmHg, następnie wprowadzano kaniulę do lewego przedsionka i zmieniano kierunek przepływu buforu z lewego przedsionka przez lewą komorę do aorty pod ciśnieniem perfuzyjnym 50 mmHg. Serca nie były stymulowane elektryczną impulsacją.

Temperatura buforu Krebs-Henseleit'a wpływającego do serca była utrzymywana na poziomie 37°C, a jego pH było stabilizowane w okolicach 7,4 za pomocą intensywnego

gazowania karbogenem o składzie 95% O₂ i 5% CO₂ i perfundowaniu buforu przez oksygenator (Fiber Oxygenator Type D150, Harvard Apparatus). Zmiany przepływu wieńcowego były monitorowane przez cały czas trwania eksperymentu za pomocą ultrasonograficznego przepływomierza (Transit Time Flowmeter TTFM Type 700, HSE) i analizowane przez oprogramowanie ISOHEART (wersja: 1.1.1.202 (32)). Właściwy eksperyment rozpoczynano po ok. 15 minutach perfuzji od podwieszenia serca do aparatu, a całkowity czas trwania eksperymentu nie przekraczał 2 godzin. Aby uwzględnić w wynikach przepływu wieńcowego różnice w masie serc i komórek myszy, podstawowy przepływ wieńcowy oraz wzrosty przepływu wieńcowego (Δ CF) były normalizowane do masy serc i komórek poprzez podzielenie uzyskanego przepływu wieńcowego przez masę serca lub komórek i wyrażone w postaci ml/min/g.

3.7.1 Pomiar zmian przepływu wieńcowego w modelu perfuzji wg. Langendorff'a oraz w modelu pracującego serca

W modelu izolowanego serca perfundowanego metodą Langendorff'a zmiany w przepływie wieńcowym na różnym etapie życia myszy Tgαq*44 oraz FVB były mierzone w czasie podstawowego przepływu wieńcowego, w odpowiedzi na 30 sekundową okluzję przepływu wieńcowego (reaktywna hiperemia) oraz w odpowiedzi na następujące związki: adenozyne (10 nmol, Sigma-Aldrich), bradykininę (10 nmol, Sigma-Aldrich). Związki te były rozpuszczane w destylowanej wodzie i podawane na serce w postaci jednorazowych wstrzyknięć (bolusów) o objętości 10 μ l.

W modelu pracującego serca, zmiany w odpowiedzi przepływu wieńcowego na wzrastający *preload* (od 3 do 10 mmHg) były badane na różnym etapie życia myszy Tgαq*44 oraz FVB.

3.8 Pomiar stężenia NO₂⁻ i NO₃⁻ w efluencie z izolowanego perfundowanego serca myszy

Stężenia metabolitów tlenu azotu – azotynów (NO₂⁻) i azotanów (NO₃⁻) były oznaczane w efluentach sercowych za pomocą analizatora ENO-20-NO_x (Eicom, Kyoto, Japonia). Stanowi on połączenie techniki chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną. W analizatorze zastosowano metodę chromatografii cieczowej z derywatyzacją pokolumnową z użyciem odczynnika Griessa. NO₂⁻ i NO₃⁻ były separowane z próbki efluentu sercowego (10 μ L) na kolumnie NO-PAK (4,6 $\times$ 50 mm, Eicom Corp., Japonia) z zastosowaniem fazy ruchomej Carrier Solution[®], dostarczanej z szybkością przepływu 330

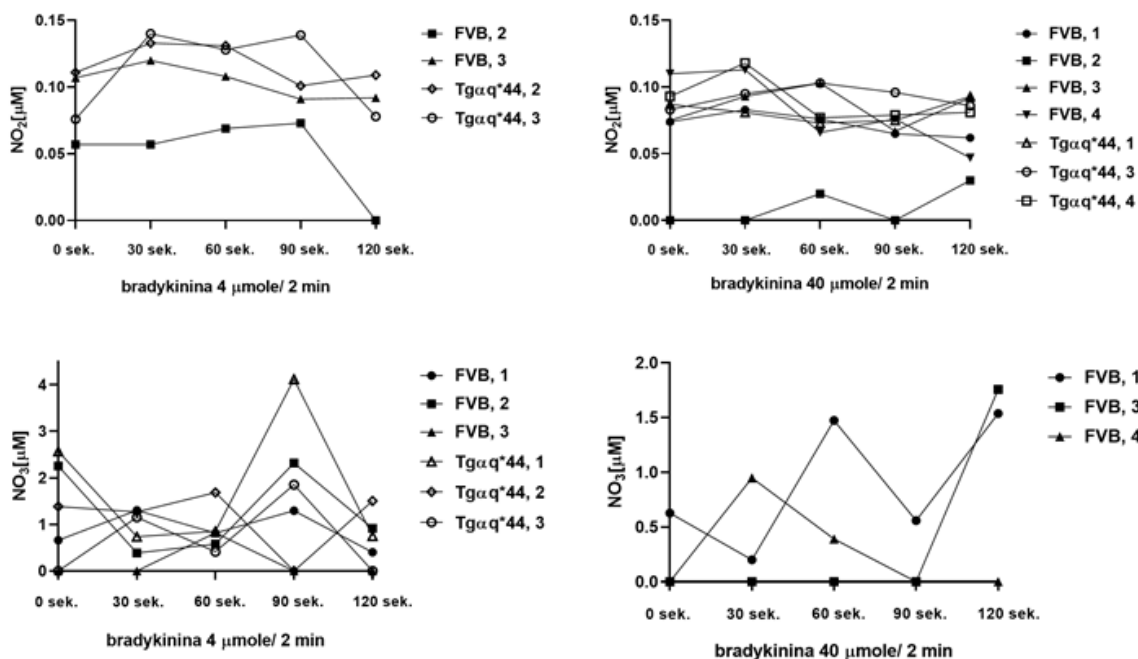
$\mu\text{L}/\text{min}$. Następnie NO_3^- było redukowane na kolumnie kadmowo-miedziowej (NO-RED, Eicom Corp., Japonia) do NO_2^- . Po tym etapie NO_2^- było mieszane z odczynnikiem Griessa dostarczanego z szybkością przepływu $110 \mu\text{L}/\text{min}$, aby utworzyć fioletowo barwne związki azowe. Absorbancję powstałych związków mierzono przy długości fali $\lambda = 540 \text{ nm}$. Analizę danych przeprowadzano z zastosowaniem dołączonego przez producenta oprogramowania Envision Chromatography Station.

3.9 Optymalizacja protokołu eksperymentalnego sposobu pobierania efluentów sercowych na pomiar stężenia NO_2^- i NO_3^-

Aby ustalić stabilną metodę pomiaru stężenia NO_2^- i NO_3^- w efluentach sercowych wypróbowano cztery różne protokoły eksperymentalne sposobu pobierania efluentów sercowych. Protokoły A, B, C obejmowały następujące parametry eksperymentalne perfuzji izolowanego serca mysiego: użycie buforu Krebsa z albuminą oraz Hepes, obciążenie następcze serca 80-90 mmHg, brak stymulacji serca. Protokół D obejmował parametry: użycie buforu Krebsa bez albuminy i bez Hepes, obciążenie następcze serca 100 mmHg, stymulacja serca 450-600 ud./min.

3.9.1 Protokół A

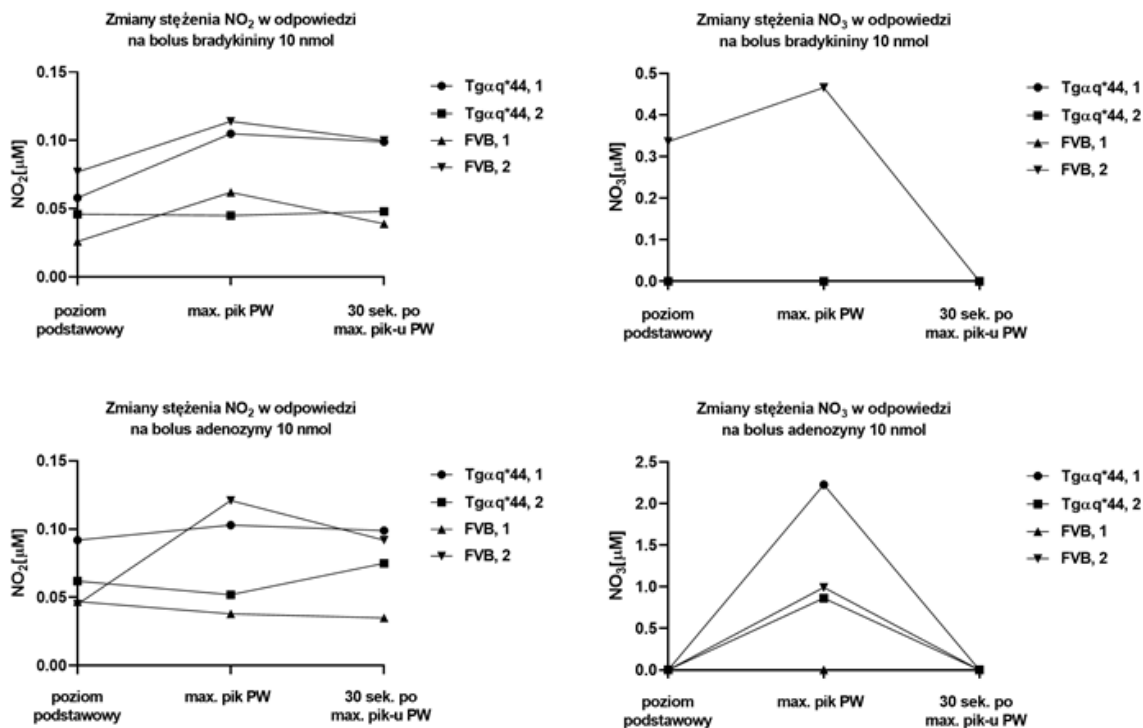
Efluenty sercowe były zbierane tuż przed podaniem związku na serce oraz w ilości 4 kropel w 30, 60, 90 i 120 sekundzie od rozpoczęcia podawania bradykininy w ciągłej wlewce na serce z szybkością $200 \mu\text{L}/\text{min}$ tak, aby w ciągu dwóch minut podać łącznie 4 i $40 \mu\text{moli}$ związku. Zebrane efluenty były natychmiastowo zamrażane w -80°C . W oznaczeniach stężeń NO_2^- i NO_3^- każdą próbkę efluentu mierzono jednokrotnie (**Ryc. 4**).



Ryc. 4 Zmiany stężenia NO_2^- i NO_3^- w efluentach sercowych w odpowiedzi na 2 minutową wlewkę bradykininy (4 i 40 μmole / 2 min) – protokół A (wsp. A. Zakrzewska).

3.9.2 Protokół B

Efluenty sercowe były zbierane w ilości 4 kropeł tuż przed podaniem związku na serce, w momencie uzyskania maksymalnego pikę zmiany przepływu wieńcowego w odpowiedzi na bolus bradykininy i adenozy (10 nmol) oraz w 30 sekundzie po maksymalnym pikę zmiany przepływu wieńcowego. Następnie efluenty sercowe natychmiastowo zamrażano w -80°C . W oznaczeniach stężeń NO_2^- i NO_3^- każdą próbkę efluentu mierzono jednokrotnie (Ryc. 5).

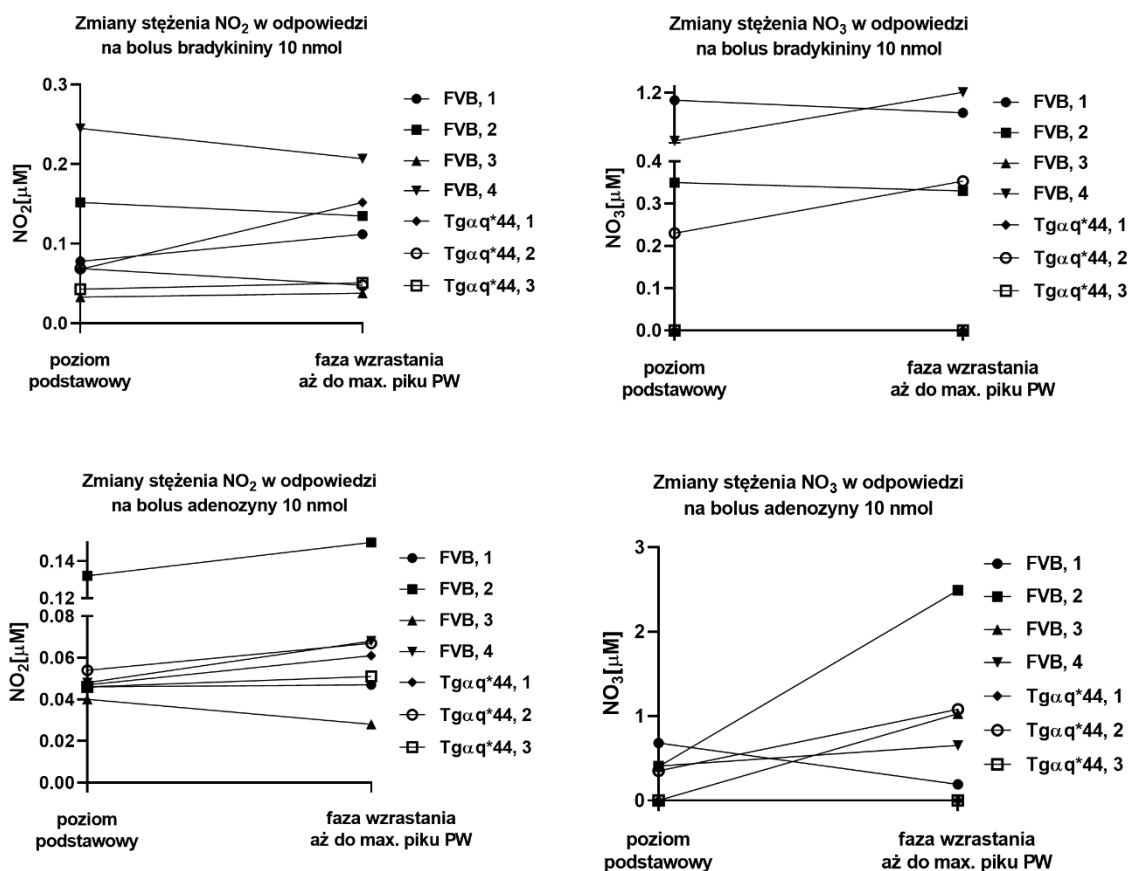


Ryc. 5 Zmiany stężenia NO_2^- i NO_3^- w efluentach sercowych w odpowiedzi na bolusy bradykininy i adenozyiny (10 nmol) - protokół B. Eksperymenty wykonano na myszach $\text{Tg}\alpha\text{q}^*44$ i FVB w wieku 10 miesięcy. PW – przepływ wieńcowy (wsp. A. Zakrzewska).

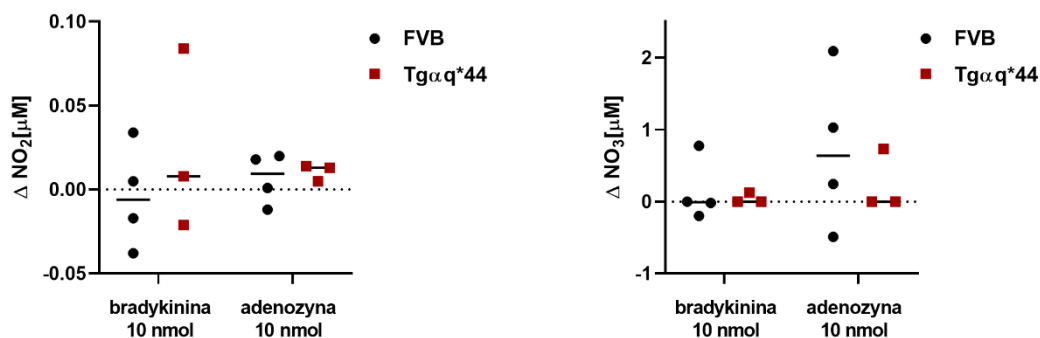
3.9.3 Protokół C

Efluenty sercowe były zbierane tuż przed podaniem związku na serce, w momencie wzrastania przepływu wieńcowego do uzyskania maksymalnego pik zmiany przepływu wieńcowego w odpowiedzi na bolus bradykininy i adenozyiny (10 nmol). Zebrane efluenty sercowe były następnie natychmiastowo zamrażane w -80°C . W oznaczeniach stężeń NO_2^- i NO_3^- każdą próbkę efluentu mierzono jednokrotnie (Ryc. 6).

A



B

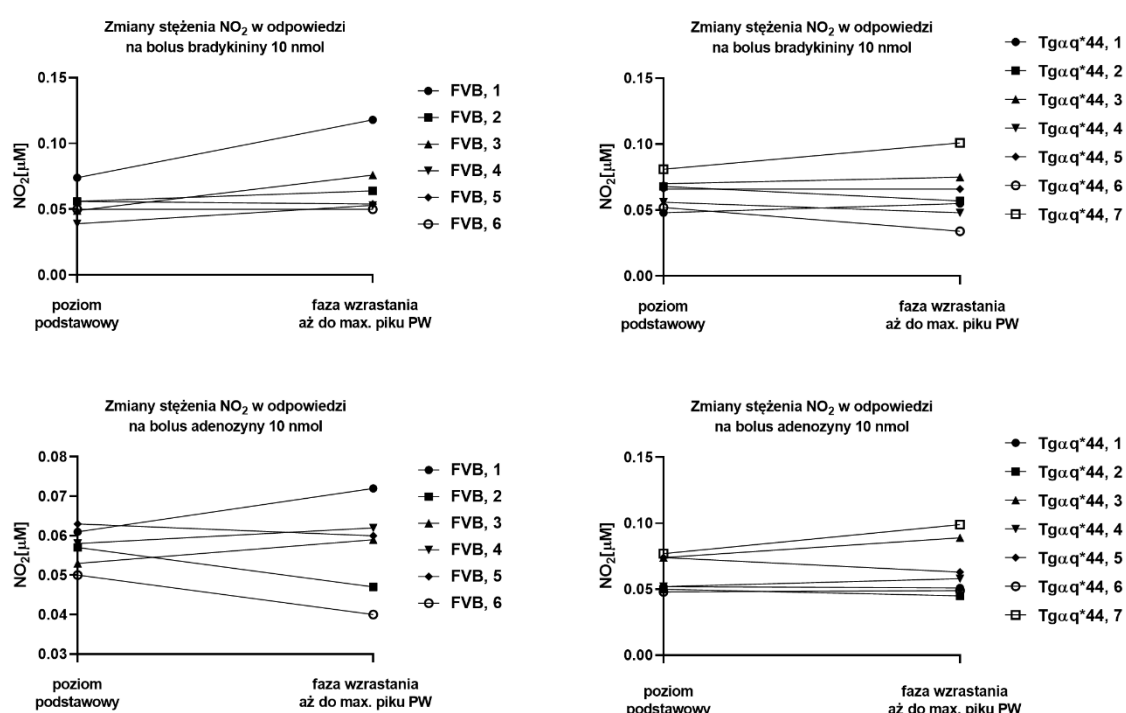


Ryc. 6 Zmiany stężenia NO_2^- i NO_3^- w efluentach sercowych w odpowiedzi na bolusy bradykininy i adenozyiny (10 nmol) - **protokół C (A)**. Wzrost stężenia NO_2^- i NO_3^- w efluencie sercowym wyrażonym, jako różnica stężenia NO_2^- i NO_3^- w efluencie sercowym przed podaniem związku na serce, a stężeniem NO_2^- i NO_3^- w efluencie sercowym po podaniu bradykininy lub adenozyiny (10 nmol)(**B**). Eksperymenty wykonano na myszach Tgαq*44 i FVB w wieku 10-12 miesięcy. PW – przepływ wieńcowy (wsp. A. Zakrzewska).

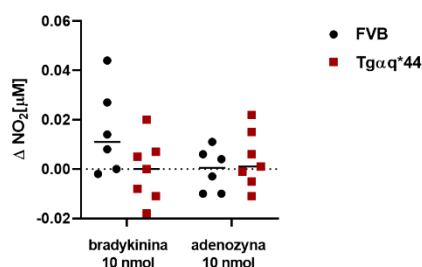
3.9.4 Protokół D

Efluenty sercowe były zbierane analogicznie, jak w protokole C z tym, że przed podaniem związku zbierano po 8 kropli efluentu sercowego. Zebrane efluenty sercowe były następnie natychmiastowo zamrażane w -80°C . Protokół D obejmował również zmianę w parametrach eksperymentalnych perfuzji izolowanego serca – użyto protokołu 2 perfuzji izolowanych serc (patrz metodyka) oraz zmianę w sposobie obliczania stężeń NO_2^- i NO_3^- . Nie były to, jak w protokołach A, B, C stężenia dla jednego pomiaru próbki lecz wartość średnia z 2-3 pomiarów próbki efluentu sercowego (Ryc. 7).

A



B



Ryc. 7 Zmiany stężenia NO_2^- w efluentach sercowych w odpowiedzi na bolusy bradykininy i adenozyiny (10 nmol) - protokół D (A). Wzrost stężenia NO_2^- w efluencie sercowym wyrażonym, jako różnica stężenia NO_2^- w efluencie sercowym przed podaniem związku na serce, a stężeniem NO_2^- w efluencie sercowym po podaniu bradykininy lub adenozyiny (10 nmol) (B). Eksperymenty wykonano na myszach Tgaq*44 i FVB w wieku 4-11 miesięcy. PW – przepływ wieńcowy (wsp. A. Zakrzewska).

3.9.5 Wnioski dotyczące optymalizacji protokołu eksperymentalnego sposobu pobierania efluentów sercowych na pomiar stężenia NO_2^- i NO_3^-

Żaden zastosowany sposób zbierania efluentów z izolowanego perfundowanego serca myszy (protokół A, B, C, D) nie pozwolił na powtarzalny pomiar produktów utleniania tlenu azotu (pomiar stężenia NO_2^- i NO_3^-). Najprawdopodobniej wynikało to z faktu, że większość uzyskanych wyników dotyczących zmian stężenia NO_2^- było na granicy detekcji analizatora ENO-20- NO_x (Eicom, Kyoto, Japonia) wynoszącej 10 nM. W związku z tym nie było możliwym w sposób „szybki” określenie udziału tlenu azotu w regulacji przepływu wieńcowego w izolowanych, perfundowanych mysich sercach na podstawie pomiaru stężeń NO_2^- i NO_3^- w efluentach sercowych.

3.10 Pomiar aktywności enzymu ACE w mięśniu sercowym oraz w osoczu

Aktywność enzymatyczna ACE została zmierzona w homogenatach mięśnia sercowego (105) oraz w osoczu (106) w toku rozwoju niewydolności serca u myszy Tgaq*44 w porównaniu do myszy FVB zgodnie z opracowaną metodyką przez Tamása Csípő, z zespołu Prof. Zoltána Pappa w czasie jego pobytu w JCET. W tym celu 6 μl osocza lub homogenatu sercowego o stężeniu białka 0,1 mg (w określonej objętości) było umieszczane w dołku płytki (Corning brand plate) i uzupełniane buforem oraz substratem dla ACE (substancja ACE FRK(Dnp)(N-terminus Abz), Synthesis by Peptide 2.0) do objętości 200 μl , tak aby uzyskać końcowe stężenie substratu rzędu 14,3 $\mu\text{mol/l}$. Aktywność ACE była mierzona na czytniku płytek (BioTek Plate Reader Synergy 4) przy następujących parametrach: długość fali wzbudzenia - 340 nm i emisji - 420 nm, źródło światła – lampa błyskowa ksenonowa (20 błysków/odczyt); detekcja i wzbudzenie – spód płytki. Aktywność ACE w osoczu została zaprezentowana jako przekształcony substrat ACE w U/l, a w homogenacie sercowym jako przekształcony substrat ACE w U/g.

3.11 Pomiar stężenia hormonów sterydowych w osoczu

Aldosteron razem z 16 innymi hormonami sterydowymi (androstendion, androsteron, kortykosteron, kortyzol, kortyzon, 11-deoksykortykosteron, 11-deoksykortyzol, dehydroepiandrosteron (DHEA), siarczan dehydroepiandrosteronu (DHEAS), 17-estradiol (E2), estron (E1), etiocholanolon, 17-hydroksyprogesteron (17OHP), progesteron, testosteron, dihydrotestosteron (DHT)) zostały zmierzone z wykorzystaniem kitu StereoIDQ[®] (Biocrates Life Sciences AG, Innsbruck, Austria)(107) w osoczu pochodzącym od myszy Tgaq*44 i FVB

w wieku 4, 8, 10, 12, 14 miesięcy zgodnie z opracowaną metodologią stosowaną w JCET opisaną w opublikowanej pracy przez Kuś K. i wsp. (108).

Przygotowanie próbek: Próbkę osocza, kalibratory oraz próbki ślepe były наносzone w ilości 250 µl do pojedynczych dołków o pojemności 2 ml na 96 dołkowej płytce. Kolejno do każdego dołka наносzono po 10 µl mieszaniny wewnętrznego standardu i po 400 µl oczyszczonej wody. Próbkę zostały przeniesione do wstępnie kondycjonowanej płytki SPE (kondycjonowanie płytki wykonano poprzez przemycie jej 1 ml metanolu, a następnie 1 ml oczyszczonej wody), a następnie umożliwiono próbkom przejście przez złożę materiału SPE. Złożę przemyto 500 µl oczyszczonej wody i wysuszono azotem. Elucja hormonów sterydowych została przeprowadzona w dwóch kolejnych krokach. Pierwszy ekstrakt ze złoża SPE otrzymano przez dwukrotną elucję dichlorometanem o objętości 500 µl, osuszeniem azotem, a w końcu odtworzeniem ekstraktu w 50 µl mieszaniny metanolu/oczyszczonej wody w stosunku 40/60 (v/v). Drugi ekstrakt został uzyskany poprzez elucję acetonitrylem (600 µl) i rozpuszczeniem w 400 µl oczyszczonej wody. Każde z dwóch uzyskanych płytek z ekstraktami zostały przykryte i umieszczone w autosamplerze do analiz HPLC–MS/MS. Pierwszy ekstrakt zawierał wszystkie 16 hormonów sterydowych z wyjątkiem DHEAS, który był obecny w drugim ekstrakcie. Rozdział chromatograficzny został przeprowadzony z wykorzystaniem stereo specyficznej kolumny HPLC (dostarczonej z kitem) i prekolumny. Do analiz HPLC został użyty system UFLC Nexera (Shimadzu, Kyoto, Japonia). 500 ml fazy ruchomej A (470 ml oczyszczonej wody plus zawartość dodatków z ampulek 1, 2, 3 - dostarczonych w kicie) i 1000 ml fazy ruchomej B (mieszanina acetonitrylu/metanolu/oczyszczonej wody w stosunku objętościowym 85/10/5) zostały użyte jako fazy ruchome. Do detekcji analitów został użyty potrójny kwadrupolowy spektrometr masowy QTrap 5500® (Sciex, Toronto, Kanada) wyposażony w źródło ESI-Turbo V działające w trybie dodatniej jonizacji i kontrolowany przez oprogramowanie Analyst 1.6.3 (Sciex, Toronto, Canada). Wielokrotne monitorowanie reakcji (MRM - *ang. multiple reaction monitoring*) zostało zastosowane do wysoce selektywnego i czułego wykrywania analitów i wewnętrznych standardów d7-aldosteronu (368,2/350,2), d3-androstendionu (290,2/100,1), d4-androsteronu (277,2/259,1), d8-kortykosteronu (355,2/337,1), d4-kortyzolu (367,2/121,1), d7-kortyzonu (368,2/169,1), d5-11-deoksykortyzolu (352,2/113,1), d5-DHEAS (276,2/258,2), d3-E2 (258,2/159,1), d4-E1 (275,2/257,2), d8-17OHP (339,2/113,1), d9-progesteronu (324,2/113,1), d5-testosteronu (294,2/100,1), d3-dihydrotestosteronu (294,1/258,2). Dwa rodzaje ekstraktów (ekstrakt dichlorometanu i acetonitrylu) były analizowane osobno. Czas pracy HPLC–MS/MS zawierający również ponowne przywrócenie pracy systemu do równowagi trwał łącznie 20 min

dla każdej próbki (czas przywrócenia pracy systemu do równowagi trwał dla ekstraktów dichlorometanu 13,5 min; dla ekstraktów acetonitrylu 6,5 min).

Lp.	Analit	Standard wewnętrzny	MRM dla analitu	Czas retencji [min]	Zakres kalibracji [ng/mL]
1	Aldosteron	d7-aldosteron	361.2/343.2	1.77	0.05-5
2	Androstendion	d3-androstendion	287.2/97.1	6.74	0.03-8
3	Androsteron	d4-androsteron	273.2/255.1	8.05	0.06-6
4	Kortykosteron	d8-kortykosteron	347.2/329.1	4.39	0.03-30
5	Kortyzol	d4-kortyzol	363.2/345.1	2.34	1-1000
6	Kortyzon	d7-kortyzon	361.2/163.1	2.37	0.10-100
7	11-Deoksykortykosteron	d8-17OHP	331.2/109.1	6.49	0.03-15
8	11-Deoksykortyzol	d5-11-deoksykortyzol	347.2/109.1	4.75	0.01-10
9	DHEA	d4-E1	271.2/253.2	6.75	0.12-30
10	DHEAS	d5-DHEAS	271.2/253.2	2.78	32-8000
11	E2	d3-E2	255.2/159.1	5.84	0.02-20
12	E1	d4-E1	271.2/253.2	6.62	0.03-15
13	Etiocholanolon	d4-androsteron	273.2/255.1	7.86	0.06-6
14	17OHP	d8-17OHP	331.2/109.1	6.96	0.05-50
15	Progesteron	d9-progesteron	315.2/109.1	8.46	0.06-15
16	Testosteron	d5-testosteron	289.2/97.0	6.19	0.01-10
17	Dihydrotestosteron	d3-dihydrotestosteron	291.1/255.2	7.56	0.012-3

Tabela 1. Parametry analityczne kitu SteroIDQ®: 17 analitów i odpowiadające im wewnętrzne standardy znakowane deuterem, wielokrotne monitorowanie reakcji (*ang. multiple reaction monitoring - MRM*), czasy retencji analitów, zakresy kalibracji.

3.12 Pomiar morfologii krwi

We krwi pobieranej z serca myszy na heparynę (20 j.m. w 20 µl soli fizjologicznej) został wykonany pomiar morfologiczny krwi przy wykorzystaniu aparatu Animal Blood Counter (ABC Vet, Horiba, Niemcy).

3.13 Badania transkryptomów serc myszy Tgaq*44 i FVB

3.13.1 Izolacja RNA i analiza RNA-Seq

Całkowite RNA zostało wyekstrahowane za pomocą kitu RNeasy Mini Kit (Qiagen) z homogenatów sercowych koniuszków serc pochodzących od myszy Tgaq*44 i FVB z 4, 8, 10, 12, 14 miesiąca życia. Jakość RNA została sprawdzona za pomocą aparatu TapeStation (Agilent). Następnie biblioteki mRNA zostały przygotowane zgodnie z protokołem dla kitu Sense mRNA-Seq Library prep Kit v2 (Lexogen). Pokrótce, po normalizacji 1000 ng RNA zostało zdenaturowane i wyselekcjonowane na podstawie odcinków polyA na kulkach magnetycznych, a następnie oczyszczone. Po odwrotnej transkrypcji synteza drugiej nici DNA została przeprowadzona. Kolejno powstałe cDNA zostało zamplifikowane i zindeksowane w

13 cyklach PCR. Zebrane biblioteki cDNA zostały zsekwencjonowane w aparacie NextSeq (Illumina) z wykorzystaniem kitu NextSeq 500/550 High Output Kit v2.0. 50 próbek sercowego RNA zostało zsekwencjonowanych w trzech seriach. Pomiar ekspresji transkryptów serc myszy za pomocą sekwencjonowania nowej generacji został wykonany we współpracy z ośrodkiem OMICRON (*Collegium Medicum UJ*).

3.13.2 Analizy transkryptomiczne

Dane z sekwencjonowania nowej generacji zostały użyte do profilowania transkryptomów serc myszy Tgaq*44 i FVB w wieku 4, 8, 10, 12, 14 miesięcy. Sekwencje adaptorowe, startery i ogony poli-A zostały usunięte (*ang. trimming*) z surowych odczytów sekwencjonowania przy wykorzystaniu programu Cutadapt (109), a następnie jakość surowych odczytów sprawdzono z użyciem programu FastQC². Kolejno, surowe odczyty zmapowano (*ang. mapping*) do referencyjnego genomu myszy za pomocą programu STAR (w przybliżeniu 78% surowych odczytów zostało zmapowanych unikalnie do referencyjnego genomu)(110). Odczyty, które zmapowano do kodujących genów (egzonów) zostały policzone z użyciem programu HTSeq (111). Następnie dane znormalizowano za pomocą metody TMM (*ang. trimmed mean of M-values*)(112). Spośród 54 532 genów referencyjnego genomu myszy, 16 367 genów (stanowiących 30,01% wszystkich genów) spełniło zastosowane kryteria filtrowania dla pokrycia genomu, jak cpm > 0.5 w więcej niż 3 próbkach na poszczególną grupę. Analizy różnicowej ekspresji genów (DEGs – *ang. differentially expressed genes*) zostały wykonane z wykorzystaniem oprogramowania Limma Voom (113). Do wykonania wykresów oraz przeprowadzenia analiz bioinformatycznych posłużono się środowiskiem R³.

W niniejszej pracy doktorskiej zostały zastosowane następujące kryteria filtrowania dla DEGs: wartość $|\log \text{fold change}| > 1$ oraz skorygowana wartość $p < 0,05$ dla skorygowanej metody Benjamini i Hochberg. Analiza różnicowej ekspresji genów została wykonana w grupie 16 367 genów. Porównano myszy Tgaq*44 i FVB w tym samym wieku 4, 8, 10, 12, 14 miesięcy (**analiza Tgaq*44 vs. FVB**); myszy FVB lub Tgaq*44 w ramach jednego szczepu w różnym wieku (8, 10, 12, 14 miesięcy) do 4-miesięcznych myszy (**analiza FVB vs. FVB**, **analiza Tgaq*44 vs. Tgaq*44**, odpowiednio). Kolejno, spośród wszystkich 16 367 genów, które spełniły zastosowane kryteria dla pokrycia genomu, tylko 13 778 zostało przyporządkowanych do odpowiednich procesów z bazy danych Gene Ontology (GO). Na tak

² <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

³ <https://www.r-project.org/>

wyselekcjonowanych procesach, została wykonana analiza statystyczna mająca na celu wyłonić nadreprezentatywne procesy z użyciem testu Fisher'a (*ang. Fisher's Exact Test*) dla policzonych danych. Dodatkowo została zastosowana metoda Benjamini i Hochberg dla korekty wartości p , aby zwiększyć rzetelność uzyskanych wyników testu Fisher'a dla nadreprezentatywnych procesów. Procesy z bazy GO były uważane za istotne statystycznie, wtedy gdy wartość skorygowanej wartości p wyniosła $< 0,05$ (testu Fisher'a). W niniejszej pracy przedstawiono procesy z bazy GO dla genów, które spełniły założone kryteria dla różnicowej ekspresji. Analizy bioinformatyczne zostały wykonane we współpracy z firmą Ardigen.

3.14 Analizy statystyczne

Analizy statystyczne wykonywano przy użyciu programu GraphPad Prism (wersja 8). Dane są zaprezentowane jako średnia arytmetyczna $\pm$ odchylenie standardowe od średniej. Rozkład normalności danych został oceniony za pomocą testu Shapiro–Wilka, z kolei homogeniczność wariancji za pomocą testu Fishera. Istotność statystyczna pomiędzy grupami myszy Tgaq*44 i FVB (w tym samym wieku) została zweryfikowana za pomocą testu t-Studenta lub testu Manna-Whitneya, natomiast różnice statystyczne między młodszymi (4-miesięcznymi myszami) a starszymi grupami myszy Tgaq*44 lub FVB zostały ocenione za pomocą testu jednoczynnikowa ANOVA z testem *post hoc* Tukeya lub za pomocą testu Kruskala-Wallisa z testem *post hoc* Dunna dla następujących parametrów: masy myszy, masy serca, komór i przedsionków, stosunku masy serca/średniej masy ciała, włóknienia serca, gęstości i przestrzennego układu kapilar, najmniejszych średnich odległości między kapilarami, wielkości światła kapilar, szybkości podstawowego przepływu wieńcowego, podstawowego przepływu wieńcowego, zmiany przepływu wieńcowego w odpowiedzi na 30 sekundową okluzję przepływu wieńcowego, aktywności enzymu ACE w sercu i osoczu, profilu hormonów steroidowych, morfologii krwi.

Jedynie dla parametrów hemodynamicznych serca, odkształceń radialnych i obwodowych serca, szybkości zmian przepływu wieńcowego w odpowiedzi na regadenoson, rezerwy wieńcowej w odpowiedzi na regadenoson, zmian przepływu wieńcowego w odpowiedzi na bolus bradykininy i adenozyiny oraz dla porównania zmian przepływu wieńcowego dla dwóch różnych protokołów eksperymentalnych perfuzji serca zostały wykonane tylko testy t-Studenta i Manna-Whitneya.

4. Wyniki

4.1 Charakterystyka procesu starzenia się serca myszy kontrolnych FVB, w porównaniu do zmian u myszy Tgaq*44

4.1.1 Zmiany w czynności hemodynamicznej serca u starzejących się myszy FVB

W celu określenia na jakim etapie życia myszy kontrolnych FVB pojawiają się zmiany czynnościowe pracy serca występujące w starzejącym się sercu wykonano pomiary czynności serca *in vivo* u młodych (4-miesięcznych) i starszych (16-miesięcznych) myszy FVB. Upośledzenie funkcji rozkurczowej serca charakterystyczne dla starzejącego się serca obserwowano w sercach 16-miesięcznych myszy FVB, a świadczył o tym obniżony wskaźnik E/A ($1,7 \pm 0,4$ vs. $2,2 \pm 0,3$ dla 16- vs. 4-miesięcznych myszy FVB, odpowiednio) oraz obniżona szybkość napełniania ($352,9 \pm 95,1$ vs. $472,9 \pm 73,0$ dla 16- vs. 4-miesięcznych myszy FVB, odpowiednio) (**Tabela 2**).

W przeciwieństwie do czynności rozkurczowej, funkcja skurczowa serca nie była zmieniona u myszy FVB w wieku 16 miesięcy. Istotnie, wartości objętości końcowo-skurczowej ($14,3 \pm 4,6$ vs. $15,1 \pm 5,6$ dla 16- vs. 4-miesięcznych myszy FVB, odpowiednio), objętości wyrzutowej ($38,7 \pm 4,4$ vs. $37,9 \pm 4,9$ dla 16- vs. 4-miesięcznych myszy FVB, odpowiednio), frakcji wyrzutowej ($73,4 \pm 5,1$ vs. $71,9 \pm 9,1$ dla 16- vs. 4-miesięcznych myszy FVB, odpowiednio), rzutu serca ($17,1 \pm 2,6$ vs. $18,3 \pm 1,7$ dla 16- vs. 4-miesięcznych myszy FVB, odpowiednio), szybkości wyrzutowej ($313,8 \pm 24,8$ vs. $317,2 \pm 38,6$ dla 16- vs. 4-miesięcznych myszy FVB, odpowiednio), czasu wyrzutu ($27,9 \pm 3,1$ vs. $28,8 \pm 5,2$ dla 16- vs. 4-miesięcznych myszy FVB, odpowiednio), czasu skurczu izowolumetrycznego ($10,0 \pm 3,1$ vs. $9,9 \pm 3,2$ dla 16- vs. 4-miesięcznych myszy FVB, odpowiednio) oraz parametry opisujące naprężenia radialne i obwodowe serca były wszystkie podobne dla myszy FVB w wieku 16 miesięcy w porównaniu do odpowiednich wartości u 4-miesięcznych myszy FVB (**Tabela 2**). Jedynie, wartość indeksu sercowego była niższa u 16-miesięcznych myszy FVB w porównaniu do 4-miesięcznych myszy FVB ($174,1 \pm 30,8$ vs. $212,3 \pm 19,0$, odpowiednio).

4.1.2 Zmiany w czynności hemodynamicznej serca na wczesnym i końcowym etapie niewydolności serca u myszy Tgaq*44

Podobnie, jak u myszy FVB wykonano pomiary funkcji serca *in vivo* u młodszych (4-miesięcznych) i starszych (12-miesięcznych) myszy Tgaq*44. W sercach 12-miesięcznych myszy Tgaq*44 globalna funkcja serca była znacznie gorsza niż u myszy Tgaq*44 w wieku 4 miesięcy, a świadczyły o tym niższe wartości następujących parametrów: objętości końcowo-

skurczowej ($23,4 \pm 8,0$ vs. $27,1 \pm 4,9$ dla 12- vs. 4-miesięcznych myszy Tgaq*44, odpowiednio), objętości końcowo-rozkurczowej ($41,7 \pm 10,6$ vs. $57,2 \pm 7,2$ dla 12- vs. 4-miesięcznych myszy Tgaq*44, odpowiednio), objętości wyrzutowej ($18,4 \pm 3,5$ vs. $30,1 \pm 3,0$ dla 12- vs. 4-miesięcznych myszy Tgaq*44, odpowiednio), frakcji wyrzutowej ($44,8 \pm 6,0$ vs. $54,3 \pm 2,4$ dla 12- vs. 4-miesięcznych myszy Tgaq*44, odpowiednio), rzutu serca ($6,9 \pm 1,5$ vs. $15,8 \pm 1,7$ dla 12- vs. 4-miesięcznych myszy Tgaq*44, odpowiednio), indeksu sercowego ($80,4 \pm 17,3$ vs. $182,6 \pm 12,8$ dla 12- vs. 4-miesięcznych myszy Tgaq*44, odpowiednio), czasu wyrzutu ($19,4 \pm 4,2$ vs. $34,0 \pm 2,9$ dla 12- vs. 4-miesięcznych myszy Tgaq*44, odpowiednio), rytmu serca (377 ± 33 vs. 524 ± 15 dla 12- vs. 4-miesięcznych myszy Tgaq*44, odpowiednio)(**Tabela 2**).

4.1.3 Porównanie zmian w czynności hemodynamicznej serca starzejących się myszy FVB oraz na wczesnym i końcowym etapie niewydolności serca u myszy Tgaq*44

Parametry funkcji serca takie, jak; objętość wyrzutowa, frakcja wyrzutowa, rzut serca, czas napełniania (**Tabela 2**), parametry E_s , E_{es} , E_{post} dla odkształceń radialnych i obwodowych, parametr S_{rmax} (**Tabela 3**) były niższe u 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 w porównaniu z wartościami uzyskanymi dla 4-, jak i 16-miesięcznych myszy FVB. Z kolei objętość końcowo-skurczowa, szybkość napełniania, czas skurczu izowolumetrycznego (**Tabela 2**), parametr T_{peak} dla odkształceń radialnych i obwodowych były wyższe (**Tabela 3**). Warto dodać, że wartość indeksu sercowego (rzut serca na powierzchnię ciała) u 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 była podobna do 16-miesięcznych kontroli, natomiast była niższa w porównaniu do 4-miesięcznych myszy FVB ($182,6 \pm 12,8$ vs. $212,3 \pm 19,0$, odpowiednio dla 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 i 4-miesięcznych myszy FVB, **Tabela 2**).

Podsumowując, proces starzenia serca u myszy FVB ujawnił się dopiero w 16 miesiącu życia, jako upośledzenie rozkurczowej czynności mięśnia sercowego, podczas gdy rozwój niewydolności serca u myszy Tgaq*44 był związany z rozwojem zarówno skurczowej, jak i rozkurczowej czynności mięśnia sercowego już w 4 miesiącu życia. Wydaje się, że zmiany w funkcji rozkurczowej lewej komory serca u 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 mogły być objawem wcześnie ujawniającego się fenotypu starego serca u myszy Tgaq*44. Tą hipotezę weryfikowano w dalszych badaniach.

	FVB - 4 miesiące N=7-8	FVB - 16 miesięcy N=9	Tgaq*44 - 4 miesiące N=6-8	Tgaq*44 - 12 miesięcy N=5
Rytm serca [ud./min]	487 ± 53	440 ± 46	524 ± 15.0	377 ± 33[#]
Masa lewej komory [mg]	71.0 ± 5.9	86.0 ± 10.1^{&}	79.4 ± 4.7[*]	71.6 ± 7.1[#]
Objętość końcowo-skurczowa[μl]	15.1 ± 5.6	14.3 ± 4.6	27.1 ± 4.9[*]	23.4 ± 8.0
Objętość końcowo-rozkurczowa[μl]	53.0 ± 5.1	53.0 ± 7.8	57.2 ± 7.2	41.7 ± 10.6[#]
Objętość wyrzutowa [μl]	37.9 ± 4.9	38.7 ± 4.4	30.1 ± 3.0[*]	18.4 ± 3.5[#]
Frakcja wyrzutowa [%]	71.9 ± 9.1	73.4 ± 5.1	54.3 ± 2.4[*]	44.8 ± 6.0[#]
Rzut serca [ml/min]	18.3 ± 1.7	17.1 ± 2.6	15.8 ± 1.7[*]	6.9 ± 1.5[#]
Indeks sercowy [μl/min/cm ²]	212.3 ± 19.0	174.1 ± 30.8^{&}	182.6 ± 12.8[*]	80.4 ± 17.3[#]
Szybkość wyrzutowa [LV/R-R]	317.2 ± 38.6	313.8 ± 24.8	290.0 ± 18.6	376.3 ± 81.2
Szybkość napełniania [LV/R-R]	472.9 ± 73.0	352.9 ± 95.1^{&}	573.8 ± 70.1[*]	668.1 ± 138.0
Czas wyrzutu [% R-R]	28.8 ± 5.2	27.9 ± 3.1	34.0 ± 2.9	19.4 ± 4.2[#]
Czas napełniania [% R-R]	33.2 ± 11.7	38.8 ± 6.0	18.9 ± 6.1[*]	20.0 ± 3.3
Czas relaksacji izowolumetrycznej [% R-R]	24.0 ± 4.8	23.4 ± 3.6	21.9 ± 2.1	19.7 ± 4.4
Czas skurczu izowolumetrycznego [% R-R]	9.9 ± 3.2	10.0 ± 3.1	25.7 ± 5.4[*]	33.9 ± 7.9
Wskaźnik E/A	2.2 ± 0.3	1.7 ± 0.4^{&}	/	/

Tabela 2. Zmiany hemodynamiki serca u starzejących się myszy FVB oraz na wczesnym i końcowym etapie niewydolności serca u myszy Tgaq*44. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe od średniej. [&]P<0.05 dla 4- vs. 16-miesięczne myszy FVB, ^{*}P<0.05 dla Tgaq*44 vs. FVB w wieku 4 miesięcy, [#]P<0.05 dla 4- vs. 16-miesięczne myszy Tgaq*44 (test t-Studenta lub Manna-Whitneya), n=5-9 (wsp. G. Kwiatkowski).

	Naprężenia radialne (Err)			Naprężenia obwodowe (Ecc)		
	FVB 4 miesiące N=5	FVB 16 miesięcy N=6	Tgaq*44 4 miesiące N=7	FVB 4 miesiące N=5	FVB 16 miesięcy N=6	Tgaq*44 4 miesiące N=7
Es [%]	20.1 ± 2.9	20.9 ± 1.5	14.4 ± 1.3[*]	-16.8 ± 1.7	-17.1 ± 1.6	-12.7 ± 1.4[*]
Ees [%]	20.1 ± 2.9	21.6 ± 1.7	16.0 ± 1.4[*]	-17.7 ± 2.0	-17.6 ± 1.6	-13.4 ± 1.2[*]
Epost [%]	19.4 ± 2.5	19.1 ± 4.6	15.0 ± 0.9[*]	-16.8 ± 2.0	-17.2 ± 1.7	-12.1 ± 1.3[*]
Tpeak	0.41 ± 0.04	0.40 ± 0.05	0.51 ± 0.04[*]	0.43 ± 0.06	0.41 ± 0.05	0.51 ± 0.03[*]
PSI	-0.037 ± 0.011	-0.088 ± 0.177	0.035 ± 0.033[*]	0.001 ± 0.038	0.002 ± 0.015	-0.039 ± 0.033
Srmax [%/R-R]	6.12 ± 1.06	6.24 ± 1.10	3.84 ± 0.55[*]	-3.50 ± 0.43	-3.12 ± 0.31	-2.03 ± 0.25[*]
Sre [%/R-R]	-5.59 ± 1.03	-6.82 ± 1.52	-5.50 ± 0.79	4.14 ± 0.87	3.80 ± 0.52	3.42 ± 0.61
SRa[%/R-R]	-3.00 ± 0.71	-3.35 ± 1.23	-2.70 ± 1.22	1.90 ± 0.63	1.86 ± 0.31	1.28 ± 0.63
SRe/a	1.95 ± 0.54	2.17 ± 0.61	2.42 ± 1.10	2.48 ± 1.16	2.11 ± 0.58	3.37 ± 1.84

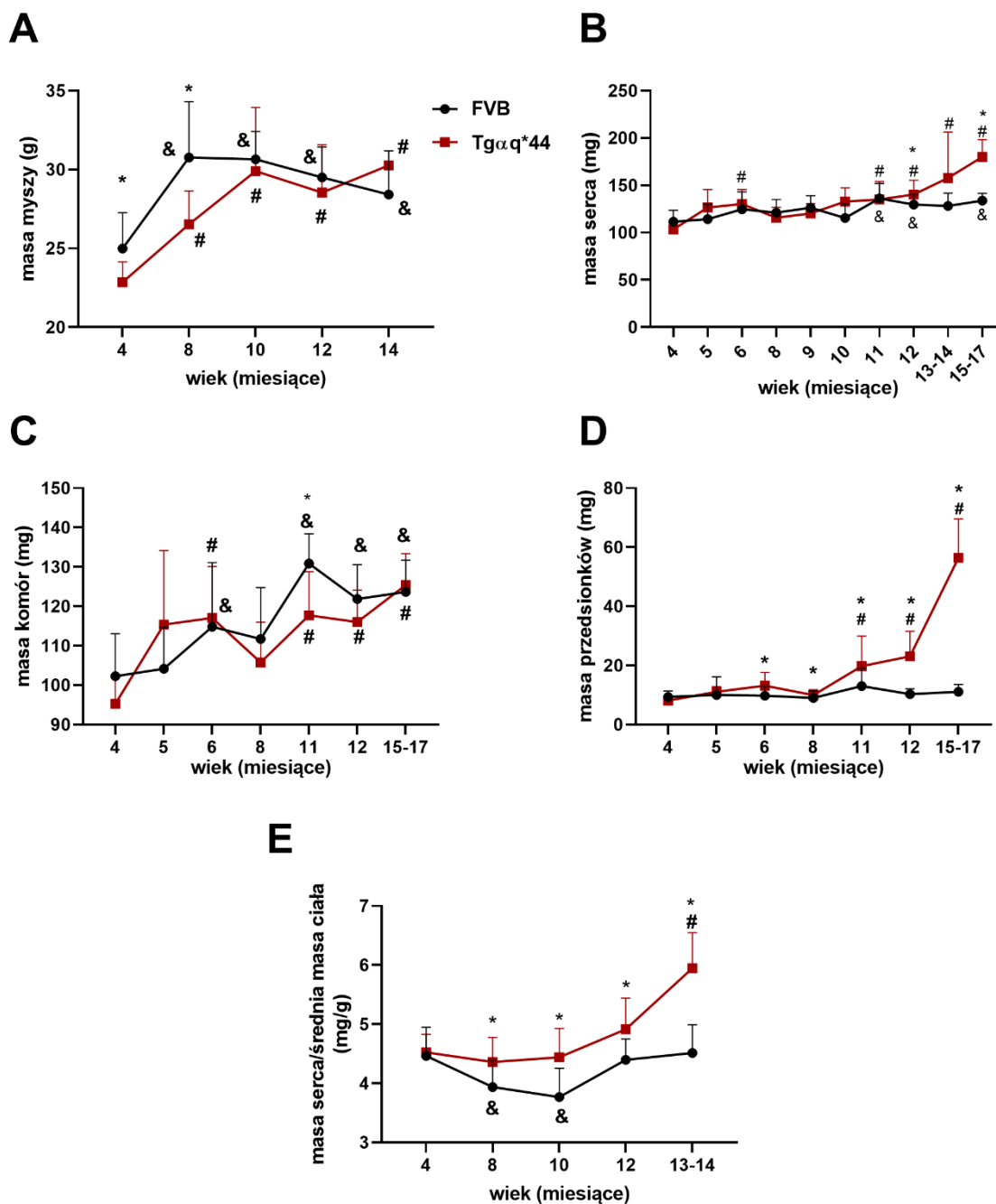
Tabela 3. Zmiany odkształceń radialnych i obwodowych serca u starzejących się myszy FVB oraz na wczesnym etapie niewydolności serca u myszy Tgaq*44 w porównaniu do 4-miesięcznych myszy FVB. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe od średniej. ^{*}P<0.05 dla Tgaq*44 vs. FVB w wieku 4 miesięcy (test t-Studenta lub Manna-Whitneya), n=5-7. Legenda: Es - odkształcenie szczytowo-skurczowe; Ees - odkształcenie końcowo-skurczowe; Epost – odkształcenie maksymalne poskurczowe; Tpeak - wskaźnik odkształcenia szczytowego; PSI - indeks odkształcenia poskurczowego; SRmax - współczynnik szybkości odkształcenia skurczowego; SRe - współczynnik szybkości odkształcenia wczesno-rozkurczowego; SRa - współczynnik szybkości odkształcenia przedsionkowo-rozkurczowego; SRe/a – iloczyn współczynników szybkości odkształcenia wczesno-rozkurczowego do szybkości odkształcenia przedsionkowo-rozkurczowego (wsp. G. Kwiatkowski).

4.1.4 Zmiany makroskopowe u starzejących się myszy FVB oraz na wczesnym i końcowym etapie niewydolności serca u myszy Tgaq*44

W celu opisanie zmian mięśnia sercowego na poziomie makroskopowym w trakcie starzenia się myszy FVB, jak i w toku rozwoju niewydolności serca myszy Tgaq*44, wykonano pomiary masy ciała (**Ryc. 8 A**), mięśnia sercowego (**Ryc. 8 B**)(dla mas komór (**Ryc. 8 C**), mas przedsionków (**Ryc. 8 D**)) oraz określono stosunek masy serca/średniej masy ciała (**Ryc. 8 E**).

U myszy FVB w wieku 13-14 miesięcy stosunek masy serca/średniej masy ciała nie zmienił się w porównaniu do 4-miesięcznych myszy FVB, natomiast w przypadku 13-14-miesięcznych myszy Tgaq*44 był wyższy w porównaniu do 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 (**Ryc. 8 E**). Z kolei, stosunek masy serca/średniej masy ciała był podobny dla myszy Tgaq*44 w wieku 4 miesięcy i myszy FVB w wieku 13-14 miesięcy oraz wyższy u 13-14-miesięcznych myszy Tgaq*44 w porównaniu do odpowiadających wiekiem myszy kontrolnych. Wyższa wartość stosunku masy serca/średniej masy ciała u 13-14-miesięcznych myszy Tgaq*44 względem 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 oraz 13-14-miesięcznych myszy FVB była spowodowana zwiększeniem masy przedsionków w 11 miesiącu życia u myszy Tgaq*44 w porównaniu do myszy Tgaq*44 w wieku 4 miesięcy oraz odpowiadających wiekiem myszy FVB (**Ryc. 8 D, E**).

Podsumowując, wydaje się, że proces starzenia serca u myszy FVB nie był związany z wyraźnymi zmianami makroskopowymi mięśnia sercowego, w przeciwieństwie do myszy Tgaq*44, u których zmiany makroskopowe mięśnia sercowego występowały na końcowym etapie niewydolności serca.



Ryc. 8 Masy myszy (A), serc (B), komór serc (C), przedsionków serc (D), stosunek masy serca/średnia masa ciała (E) u starzejących się myszy FVB oraz w toku rozwoju niewydolności serca u myszy Tg α q*44. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna $\pm$ odchylenie standardowe od średniej. * P <0.05 dla FVB vs. Tg α q*44 (test t-Studenta lub Manna-Whitneya), # P <0.05 dla myszy Tg α q*44 w określonym wieku vs. 4-miesięczne myszy Tg α q*44, & P <0.05 dla myszy FVB w określonym wieku vs. 4-miesięczne myszy FVB (jednoczynnikowa ANOVA lub test Kruskala-Wallis); n=3-37.

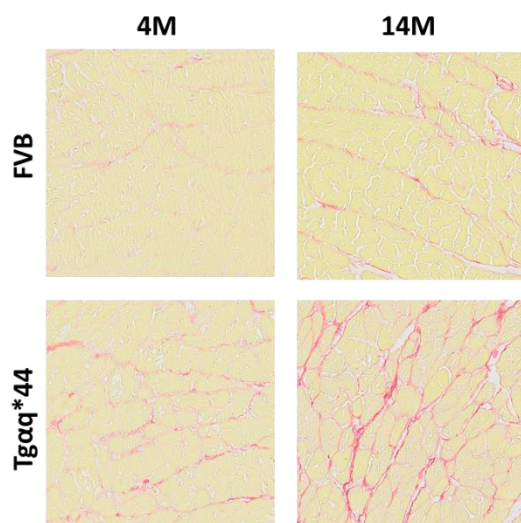
4.2 Zmiany mikroskopowe mięśnia sercowego u starzejących się myszy FVB oraz na wczesnym i końcowym etapie niewydolności serca u myszy Tgαq*44

Aby odpowiedzieć na pytanie, jakie są mikroskopowe wyznaczniki starzejącego się serca myszy FVB oraz czy mogą one występować w sercach młodych myszy Tgαq*44 wykonano oznaczenia histologiczne i immunohistochemiczne skrawków sercowych. W sercu myszy FVB w trakcie procesu starzenia się serca oraz w sercu myszy Tgαq*44 w toku rozwoju niewydolności serca oceniano zmiany we włóknieniu serca (**rozdział 4.2.1**), odkładaniu macierzy zewnątrzkomórkowej (**rozdział 4.2.2**), gęstości i układzie kapilar (**rozdział 4.2.4**), odległości między kapilarami (**rozdział 4.2.5**), wielkości światła kapilar (**rozdział 4.2.6**) przy wykorzystaniu mikroskopii optycznej. Ponadto, oceniono ultrastrukturę mięśnia sercowego (**rozdział 4.2.3**), w tym macierz zewnątrzkomórkową (**rozdział 4.2.3.1**), układ mitochondriów i miofibrili (**rozdział 4.2.3.2**), ultrastrukturę kanalików T (**rozdział 4.2.3.2**), budowę blaszki podstawnej naczyń wieńcowych (**rozdział 4.2.3.3**), budowę naczyń wieńcowych (**rozdział 4.2.3.4**), budowę wstawek (**rozdział 4.2.3.5**) i obecność autofagosomów (**rozdział 4.2.3.6**) z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej.

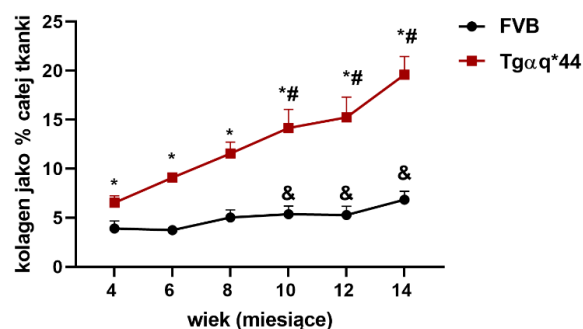
4.2.1 Włóknienie serca

W sercach myszy FVB widoczny był stopniowy wzrost włóknienia pomiędzy 4 a 14 miesiącem życia myszy FVB (od $3,91 \pm 0,78\%$ do $6,85 \pm 0,84\%$, odpowiednio dla 4- i 14-miesięcznych myszy FVB). U myszy Tgαq*44 włóknienie wyraźnie się nasilało z wiekiem osiągając wysoki poziom ($19,59 \pm 1,87\%$) u 14-miesięcznych myszy Tgαq*44 (**Ryc. 9**). Interesującą obserwacją było to, że już w sercach 4-miesięcznych myszy Tgαq*44 poziom włóknienia był podobny do poziomu zwłóknienia serc 14-miesięcznych myszy FVB ($6,54 \pm 0,70\%$ vs. $6,85 \pm 0,84\%$, odpowiednio dla 4-miesięcznych myszy Tgαq*44 i 14-miesięcznych myszy FVB, **ryc. 9**).

A



B



Ryc. 9 Włóknienie mysiego serca u starzejących się myszy FVB oraz w toku rozwoju niewydolności serca u myszy Tgaq*44. Reprezentatywne zdjęcia preparatów w mikroskopii optycznej (powiększenie 20x) przedstawiające przekroje poprzeczne przez tkankę sercową z zastosowaniem barwienia Czerwienią Syriusza (Picro Sirius Red). Legenda: włókna kolagenowe – czerwone, kardiomiocyty – żółte (A). Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna $\pm$ odchylenie standardowe od średniej. * $P < 0.05$ dla Tgaq*44 vs. FVB (test t-Studenta), # $P < 0.05$ dla myszy Tgaq*44 w określonym wieku vs. 4-miesięczne myszy Tgaq*44, & $P < 0.05$ dla myszy FVB w określonym wieku vs. 4-miesięczne myszy FVB (jednoczynnikowa ANOVA lub test Kruskala-Wallis). Analizy wykonano dla 20-krotnego powiększenia, $n=6$ (B)(wsp. A. Jasztal, Z. Kuryłowicz).

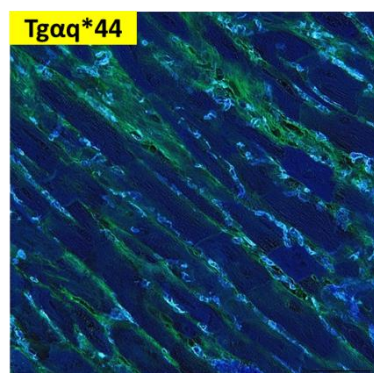
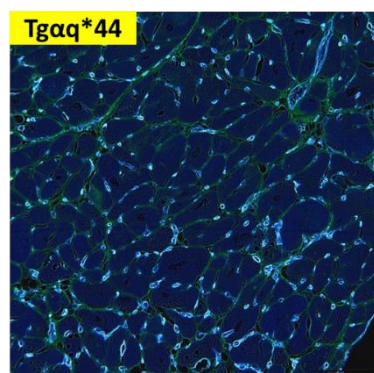
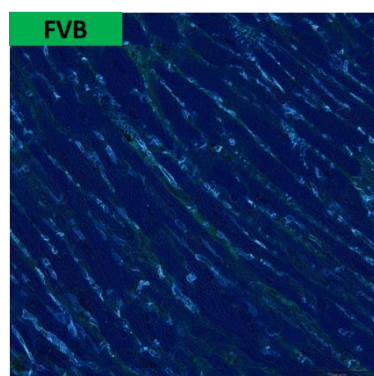
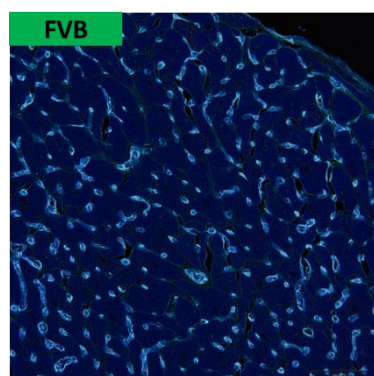
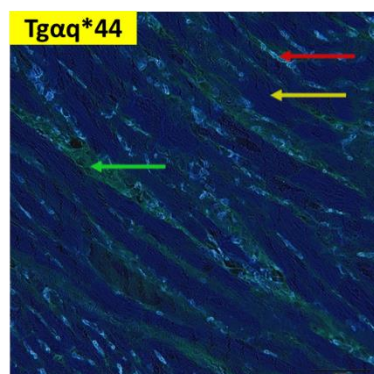
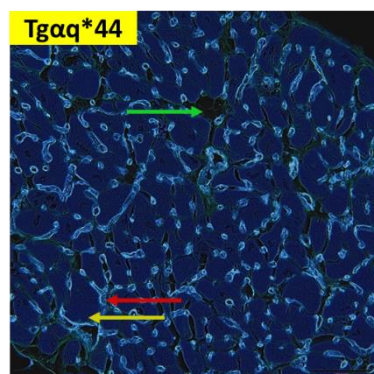
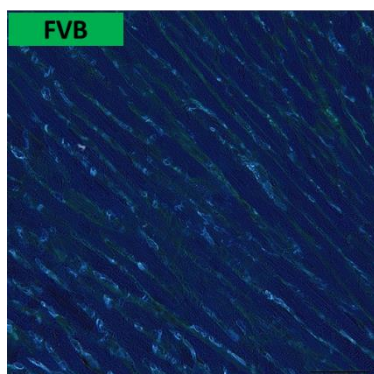
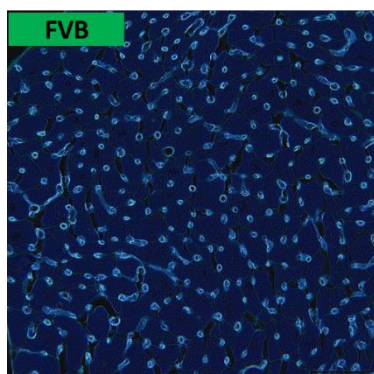
4.2.2 Macierz zewnątrzkomórkowa

Macierz zewnątrzkomórkowa była oceniana na podstawie barwienia paS. Zawartość komponentów macierzy zewnątrzkomórkowej w sercach 14-miesięcznych myszy FVB była nieznacznie wyższa w porównaniu do serc 4-miesięcznych myszy FVB (**Ryc. 10**). Natomiast, zawartość komponentów macierzy zewnątrzkomórkowej w sercach 14-miesięcznych myszy Tgaq*44 była znacznie wyższa w porównaniu do serc 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 (**Ryc. 10**).

Zarówno w sercach myszy Tgaq*44 i FVB akumulacja komponentów macierzy zewnątrzkomórkowej widoczna była wokół kardiomiocytów i naczyń oraz w przestrzeniach międzykomórkowych (zarówno na przekrojach poprzecznych i podłużnych), co skutkowało dystansowaniem od siebie wzajemnie kardiomiocytów i kapilar. Dodatkowo, zwiększone odkładanie się komponentów macierzy zewnątrzkomórkowej wokół kardiomiocytów w sercach myszy Tgaq*44 niż FVB powodowało zaburzony układ kardiomiocytów we włóknie mięśniowym niewydolnego serca.

A

B



4M

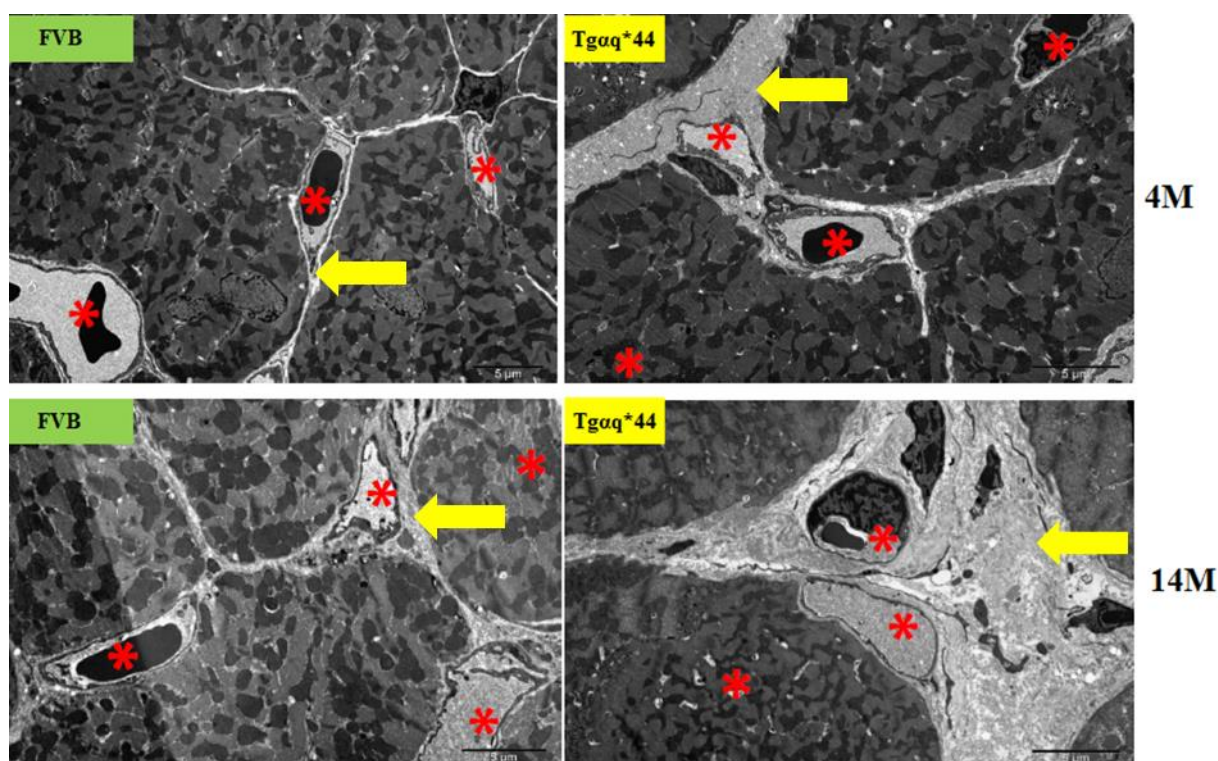
Ryc. 10 Kolokalizacja kapilar i macierzy zewnątrzkomórkowej (GAGów i glikoproteidów) w sercach starzejących się myszy FVB oraz w sercach myszy Tgaq*44 na wczesnym i końcowym etapie niewydolności serca. Reprezentatywne zdjęcia preparatów w mikroskopii optycznej (powiększenie 400x), z inwersją kolorów przedstawiające przekroje poprzeczne (A) i podłużne (B) przez tkankę sercową. Zastosowano połączenie barwień: na lektynę, barwienie Schiff'a (paS), barwienie kwasem pikrynowym. Legenda: kapliary – jasno niebieskie (strzałka czerwona), kardiomiocyty – granatowe (strzałka żółta), paS-pozytywne struktury (macierz zewnątrzkomórkowa) – zielone (strzałka zielona) (wsp. A. Jasztal i Z. Kuryłowicz).

14M

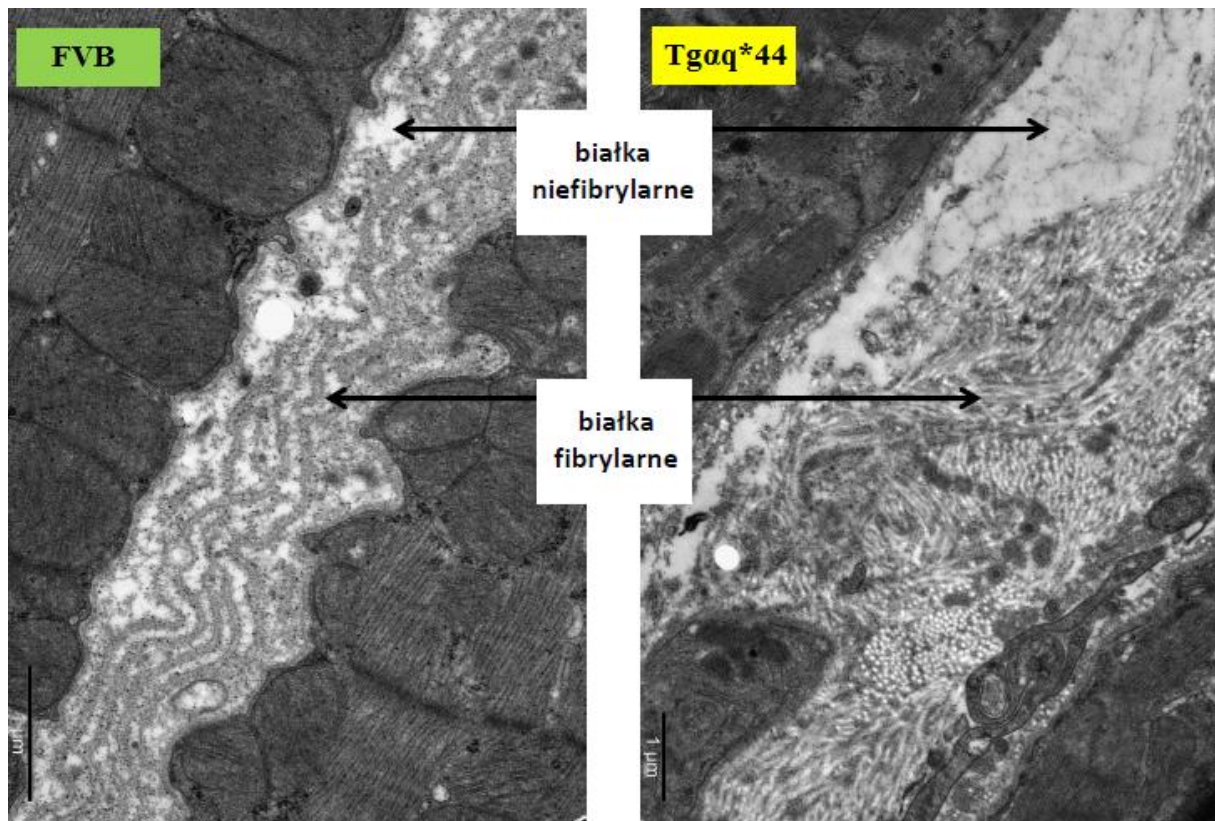
4.2.3 Ultrastruktura mięśnia sercowego

4.2.3.1 Macierz zewnątrzkomórkowa – obrazy z mikroskopu elektronowego (TEM)

Obrazy z mikroskopu elektronowego podobnie, jak w przypadku obrazów z mikroskopu optycznego wykazały nieznaczne zwiększenie zawartości macierzy zewnątrzkomórkowej w sercach myszy FVB w wieku 14 miesięcy w porównaniu do 4-miesięcznych myszy (**Ryc. 11**). Natomiast, zawartość macierzy zewnątrzkomórkowej u 14-miesięcznych myszy $Tgaq^{*44}$ była wyraźnie większa w porównaniu do serc myszy $Tgaq^{*44}$ w wieku 4 miesięcy. W sercach 4-miesięcznych myszy $Tgaq^{*44}$ zawartość macierzy zewnątrzkomórkowej odłożonej wokół kapilar była znacznie większa w porównaniu do serc 14-miesięcznych myszy FVB (**Ryc. 11**). Ponadto, obrazy z mikroskopu elektronowego potwierdziły znaczący udział białek niefibrylarnych we włóknieniu serca u myszy $Tgaq^{*44}$ (**Ryc. 12**).



Ryc. 11 Ultrastruktura mięśnia sercowego u 4- i 14-miesięcznych myszy FVB i $Tgaq^{*44}$ – przekroje poprzeczne przez kardiomiocyty i kapilary. Reprezentatywne zdjęcia ukazujące ilość macierzy zewnątrzkomórkowej towarzyszącej kapilarom. Obrazy z mikroskopu TEM tkanki sercowej pochodzącej z mięśni brodawkowatych. Legenda: * - naczynia kapilarne, niektóre z erytrocytami w świetle; żółte strzałki - macierz zewnątrzkomórkowa (wsp. Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego).



Ryc. 12 Ultrastruktura mięśnia sercowego u 14-miesięcznych myszy FVB i Tgaq*44 - skład macierzy zewnątrzkomórkowej (wsp. Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marclego Nenckiego).

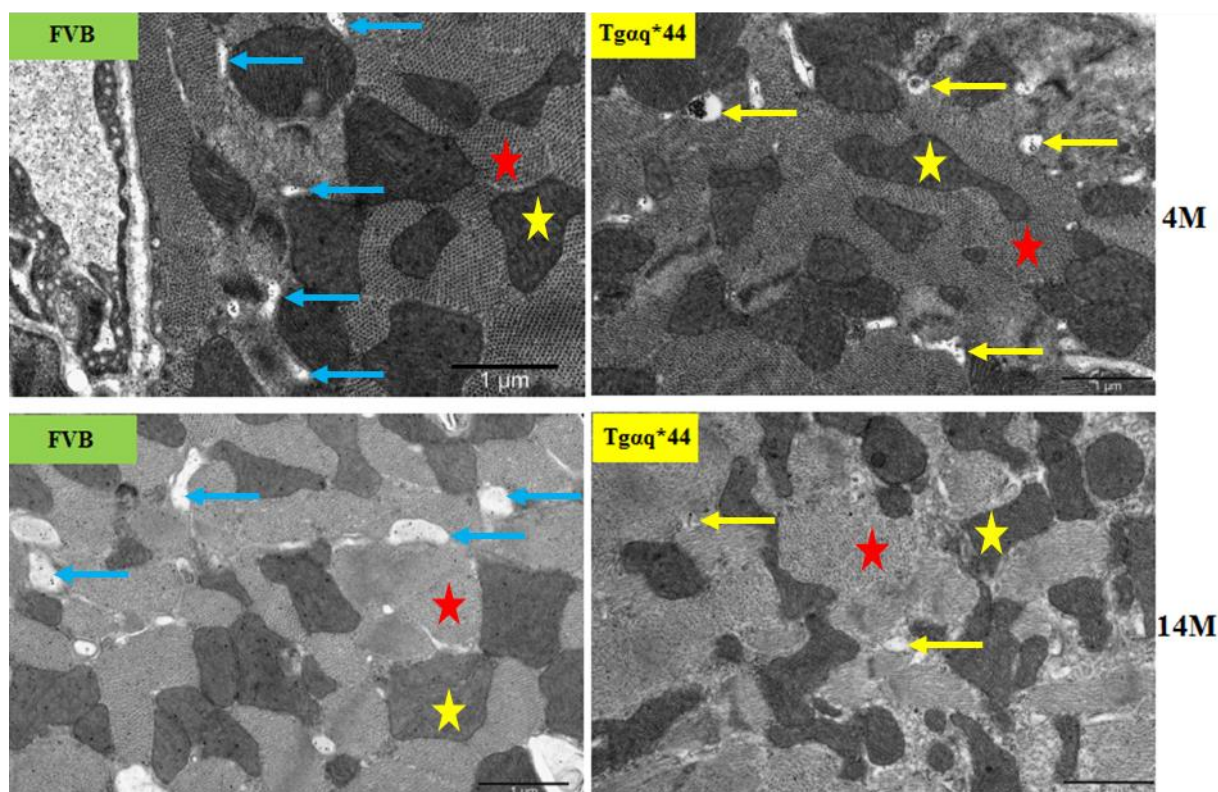
4.2.3.2 Układ miofibryli, mitochondriów, kanalików T

Już w sercach 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 w porównaniu do 14-miesięcznych myszy FVB zaobserwowano znaczną różnicę w ultrastrukturze kardiomiocytów (**Ryc. 13**). Nastąpiło powiększenie rozmiarów miofibryli, zmniejszenie ilości i kształtu mitochondriów, zmienienie układu przestrzennego mitochondriów i miofibryli oraz redukcja ilości kanalików T i ich wypełnienie gęsto elektronową macierzą.

W sercach 14-miesięcznych myszy FVB nie zaobserwowano większych zmian w ultrastrukturze mięśnia sercowego w porównaniu do serc 4-miesięcznych myszy FVB, z wyjątkiem mniej uporządkowanego układu miofilamentów. Przekroje poprzeczne przez mięsień sercowy wykazały nieznaczne zwiększenie powierzchni miofibryli w stosunku do powierzchni mitochondriów u 14-miesięcznych myszy FVB w porównaniu do 4-miesięcznych myszy FVB. Z kolei, liczba kanalików T w sercach 14- i 4-miesięcznych myszy FVB była podobna.

Zmiany w ultrastrukturze kardiomiocytów 14-miesięcznych myszy Tgaq*44 były znaczne w porównaniu do kardiomiocytów 4-miesięcznych myszy Tgaq*44. Zmienił się układ przestrzenny mitochondriów i miofibryli oraz zmniejszyła się ilość mitochondriów, skutkując

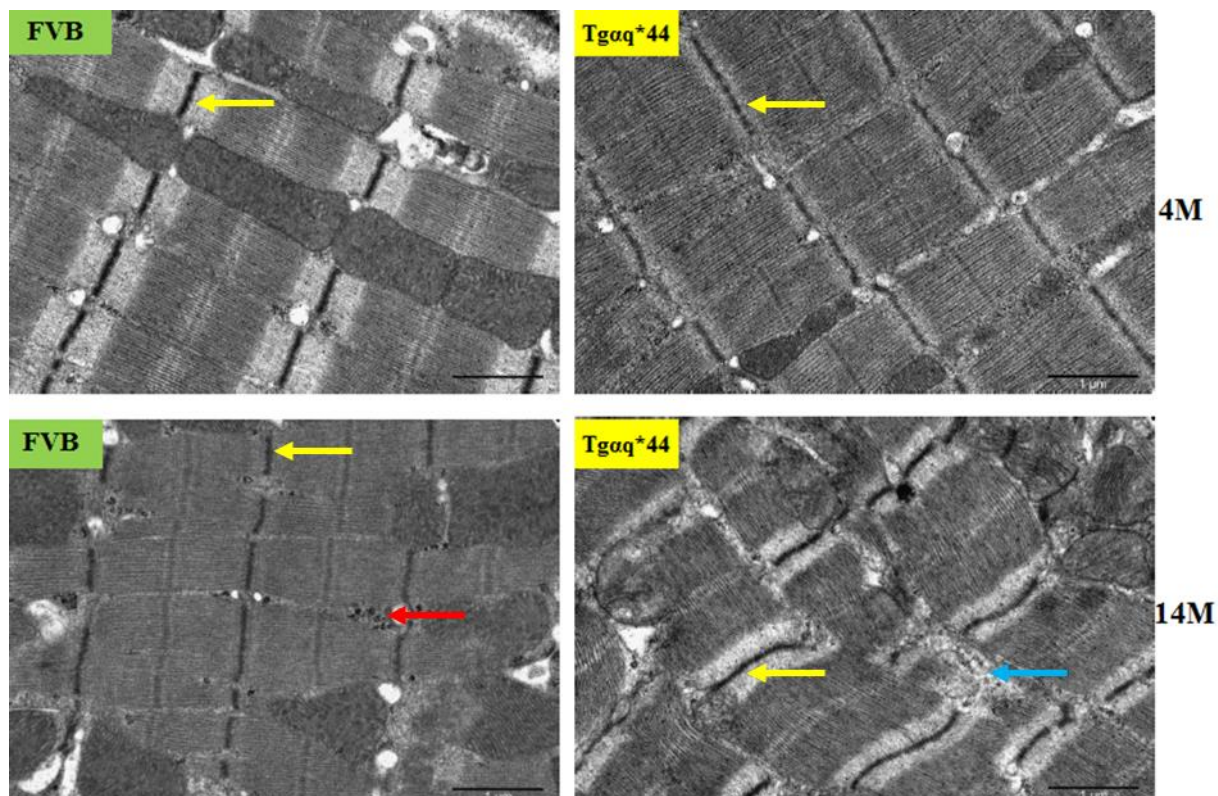
dużym skupieniem miofibryli pozbawionych kontaktu z mitochondriami. Ponadto, zwiększył się dystans między filamentami na terenie miofibryli prowadząc do pogrubienia i pęcznienia miofibryli oraz rozsuwania i odkształcania mitochondriów. Dodatkowo, nastąpiło znaczne zmniejszenie ilości kanalików T na końcowym etapie niewydolności serca u myszy $Tgaq^{*44}$ w porównaniu do wczesnego etapu niewydolności serca, a w zachowanych kanalikach widoczne były elektronowo gęste złoże.



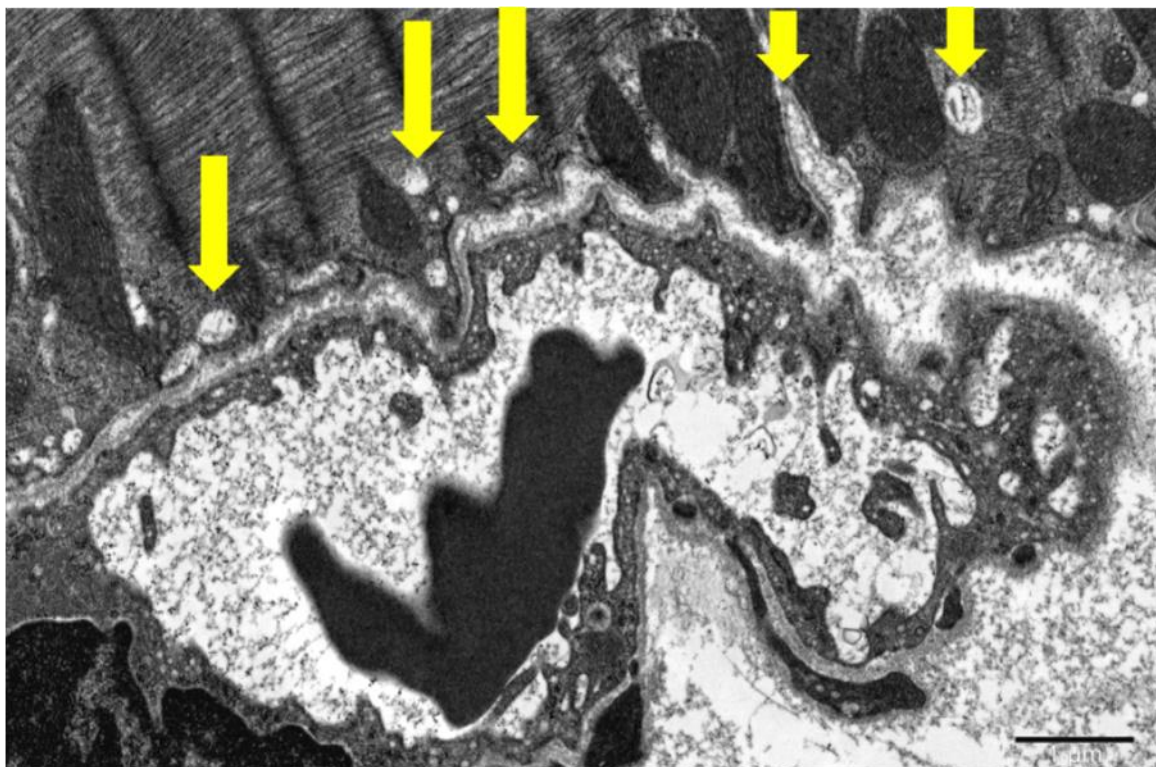
Ryc. 13 Ultrastruktura mięśnia sercowego u 4- i 14-miesięcznych myszy FVB i $Tgaq^{*44}$. Reprezentatywne zdjęcia fragmentów przekrojów przez kardiomiocyty ukazujące mitochondria, miofibryle i kanalik T. Obrazy z TEM tkanki sercowej pochodzącej z przekrojów poprzecznych przez mięśnie brodawkowate. Legenda: czerwone gwiazdki - miofibryle; żółte gwiazdki - mitochondria; niebieskie strzałki - drożne kanalik T; żółte strzałki - kanalik T z gęstą elektronowo treścią (wsp. Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marceliego Nenckiego).

Zmiany w organizacji aparatu kurczliwego kardiomiocytów uwidocznione zostały także na przekrojach podłużnych kardiomiocytów (**Ryc. 14**). O ile w sercach 14-miesięcznych myszy FVB nie zaobserwowano znaczących różnic w budowie sarkomerów w porównaniu do 4-miesięcznych myszy FVB (oprócz odkładania glikogenu w sąsiedztwie triad), to w sercach myszy $Tgaq^{*44}$ na wczesnym etapie, a tym bardziej na końcowym etapie niewydolności serca widoczny był nasilony proces dezorganizacji układu sarkomerów w porównaniu do serc myszy FVB. Charakteryzował się on zwiększonymi odległościami między filamentami, ich nierównoległym ułożeniem skutkującym pęcznieniem sarkomerów. Ponadto, nastąpiło

przesunięcie położenia sarkomerów poszczególnych miofibryli względem siebie powodując rozmijanie się prążków Z. Natomiast już w sercach 4-miesięcznych myszy *Tgaq*44* widoczne było wypełnienie ziarnistą treścią kanalików T (**Ryc. 15**).



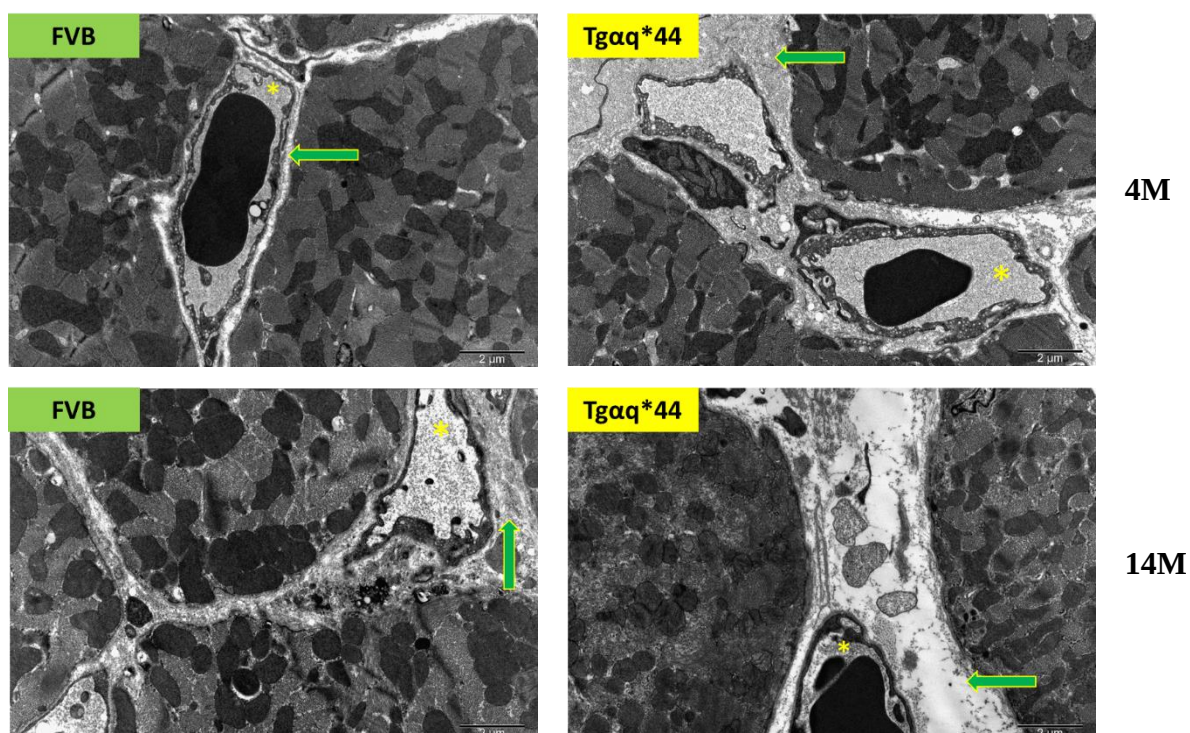
Ryc. 14 Ultrastruktura mięśnia sercowego u 4- i 14-miesięcznych myszy FVB i *Tgaq*44*. Reprezentatywne zdjęcia przedstawiające przekroje podłużne przez sarkomery na preparatach z TEM pochodzących z przekrojów podłużnych przez wolną ścianę lewej komory. Legenda: żółte strzałki - prążki Z; niebieska strzałka - kanalik T wypełniony ziarnistą treścią; czerwona strzałka - glikogen (wsp. Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego).



Ryc. 15 Ultrastruktura mięśnia sercowego u 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 – przekrój poprzeczny przez kanalik T. Reprezentatywne zdjęcie kanalika T w sąsiedztwie kardiomiocytu. Legenda: żółte strzałki - pofałdowana powierzchnia kardiomiocytu (wsp. Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego).

4.2.3.3 Blaszka podstawna naczyń wieńcowych

W sercach 14-miesięcznych myszy FVB nastąpiło pogrubienie blaszki podstawnej naczyń wieńcowych w porównaniu do serc 4-miesięcznych myszy FVB (**Ryc. 16**). Pogrubienie blaszki podstawnej naczyń wieńcowych u 14-miesięcznych myszy Tgaq*44 było wyraźnie większe w porównaniu do 4-miesięcznych myszy Tgaq*44. W sercach 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 pogrubienie blaszki podstawnej naczyń wieńcowych było znacznie większe w porównaniu do 14-miesięcznych myszy FVB (**Ryc. 16**).

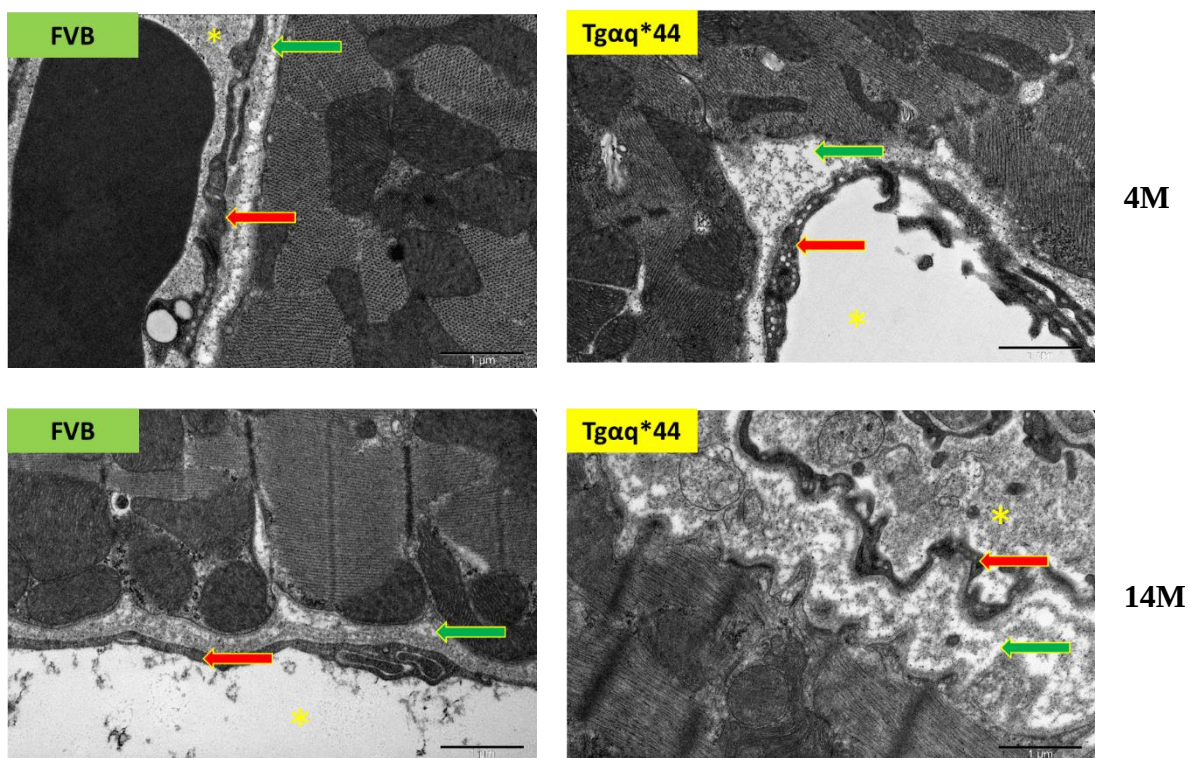


Ryc. 16 Budowa blaszki podstawnej naczyń wieńcowych u 4- i 14-miesięcznych myszy FVB i Tgaq*44. Zdjęcia fragmentów przekrojów przez tkankę mięśnia sercowego ukazujące budowę blaszki podstawnej naczyń wieńcowych. Obrazy z TEM tkanki sercowej pochodzącej z przekrojów poprzecznych przez mięśnie brodawkowate. Legenda: żółte gwiazdki – światło naczynia wieńcowego; zielone strzałki – blaszka podstawna (wsp. Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego).

4.2.3.4 Budowa naczyń wieńcowych

Naczynia wieńcowe ułożone był równoległe względem sąsiadujących kardiomiocytów w sercach 14-miesięcznych myszy FVB. Natomiast, naczynia wieńcowe 14-miesięcznych myszy Tgaq*44 był silnie pofałdowane i nie układały się równoległe względem sąsiadujących kardiomiocytów (**Ryc. 17**).

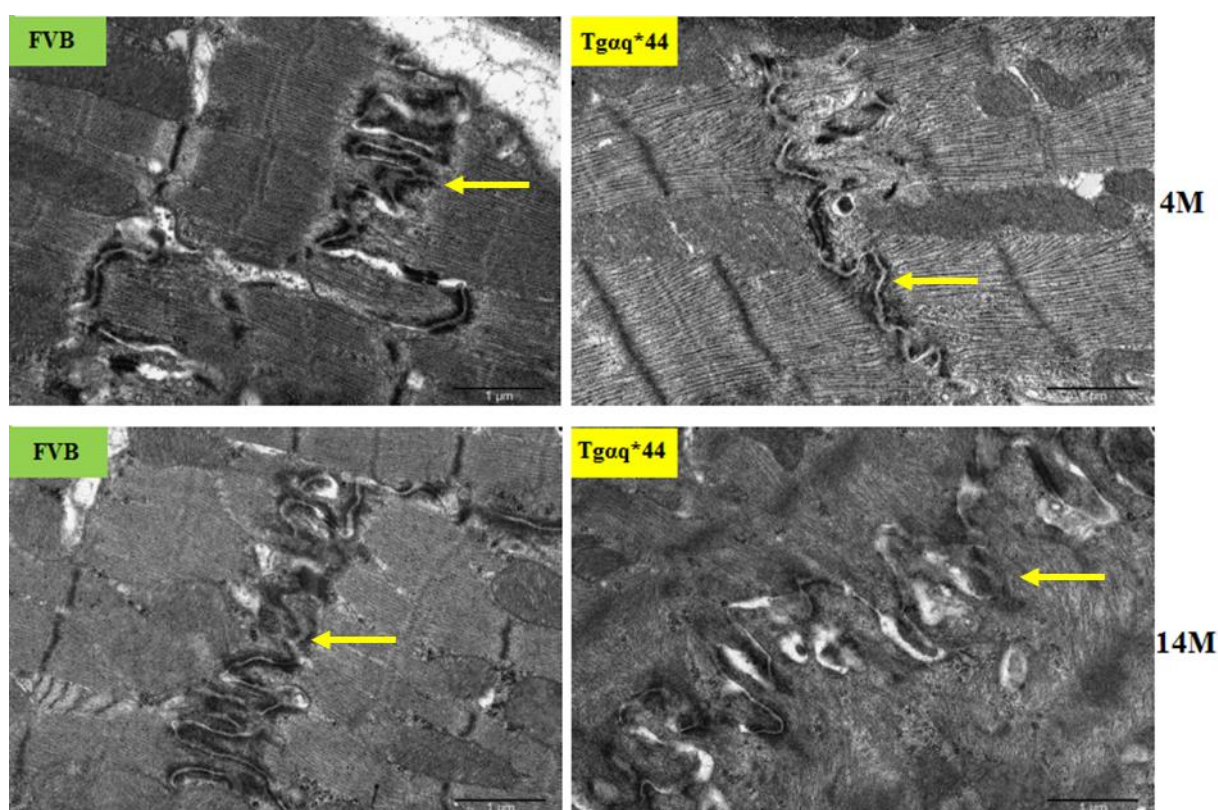
W sercach 14-miesięcznych myszy FVB nie nastąpiła zmiana w ultrastrukturze śródbłónka kapilar wieńcowych w porównaniu do serc 4-miesięcznych myszy FVB. U 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 w śródbłónku naczyń wieńcowych występowały liczne pęcherzyki wakuolarne. U 14-miesięcznych myszy Tgaq*44 widoczne były nieprawidłowości w ultrastrukturze śródbłónka kapilar wieńcowych (**Ryc. 17**).



Ryc. 17 Budowa naczyń wieńcowych u 4- i 14-miesięcznych myszy FVB i Tgaq*44. Zdjęcia fragmentów przekrojów przez tkankę mięśnia sercowego ukazujące budowę naczyń wieńcowych. Obrazy z TEM tkanki sercowej pochodzącej z: przekrojów poprzecznych przez mięśnie brodawkowate dla obrazów pochodzących od 4-miesięcznych myszy; przekrojów podłużnych przez wolną ścianę lewej komory dla obrazów pochodzących od 14-miesięcznych myszy. Legenda: żółte gwiazdki – światło naczynia wieńcowego; czerwone strzałki – śródbłonek naczyń wieńcowych; zielone strzałki - blaszka podstawna (wsp. Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego).

4.2.3.5 Wstawki

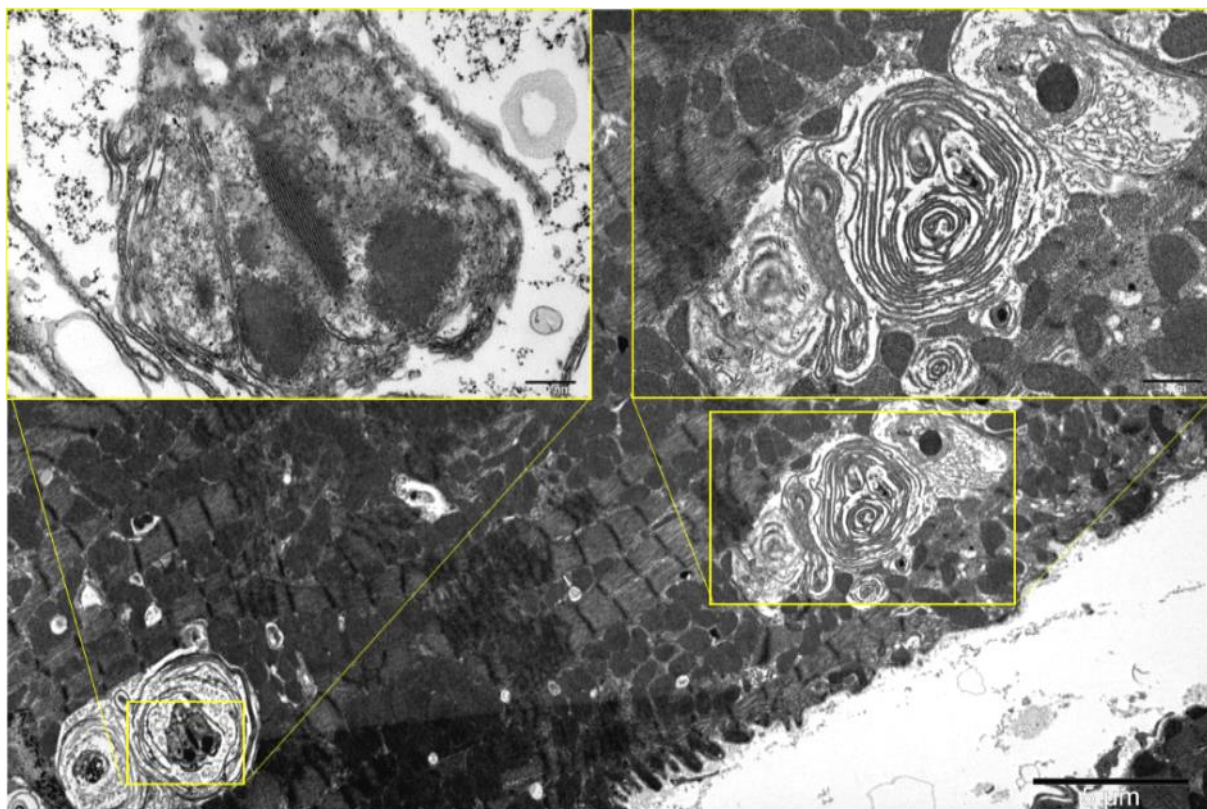
W sercach 14-miesięcznych myszy FVB nie nastąpiła zmiana w budowie i integralności wstawek w porównaniu do serc 4-miesięcznych myszy FVB (**Ryc. 18**). Natomiast u myszy $Tgaq^{*44}$ nieprawidłowości w budowie wstawek były widoczne już u 4-miesięcznych zwierząt i charakteryzowały się dezorganizacją i ubytkiem stref przylegania oraz desmosomów, jak również zaburzeniami w obszarze kotwiczenia miofilamentów do wstawek. Zmiany te uległy nasileniu na końcowym etapie niewydolności serca myszy $Tgaq^{*44}$.



Ryc. 18 Ultrastruktura mięśnia sercowego u 4- i 14-miesięcznych myszy FVB i $Tgaq^{*44}$. Reprezentatywne zdjęcia sąsiednich kardiomiocytów w obrębie włókna mięśniowego, w obszarze wstawek. Zdjęcia z TEM z preparatów pochodzących z przekrojów podłużnych przez wolną ścianę lewej komory. Legenda: żółte strzałki - wstawki (wsp. Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego).

4.2.3.6 Autofagosomy

Już u 4-miesięcznych myszy $Tg\alpha q^{*44}$ wykazano obecność autofagosomów (**Ryc. 19**). Z kolei w obrazach pochodzących z tkanki sercowej myszy FVB nie udało się wykazać ich obecności, co nie oznacza ich braku w sercach myszy FVB.



Ryc. 19 Ultrastruktura mięśnia sercowego u 4-miesięcznych myszy $Tg\alpha q^{*44}$ – przekrój poprzeczny przez kardiomiocyt i autofagosomy. Reprezentatywne zdjęcie autofagosomu w sąsiedztwie kardiomiocytu (wsp. Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego).

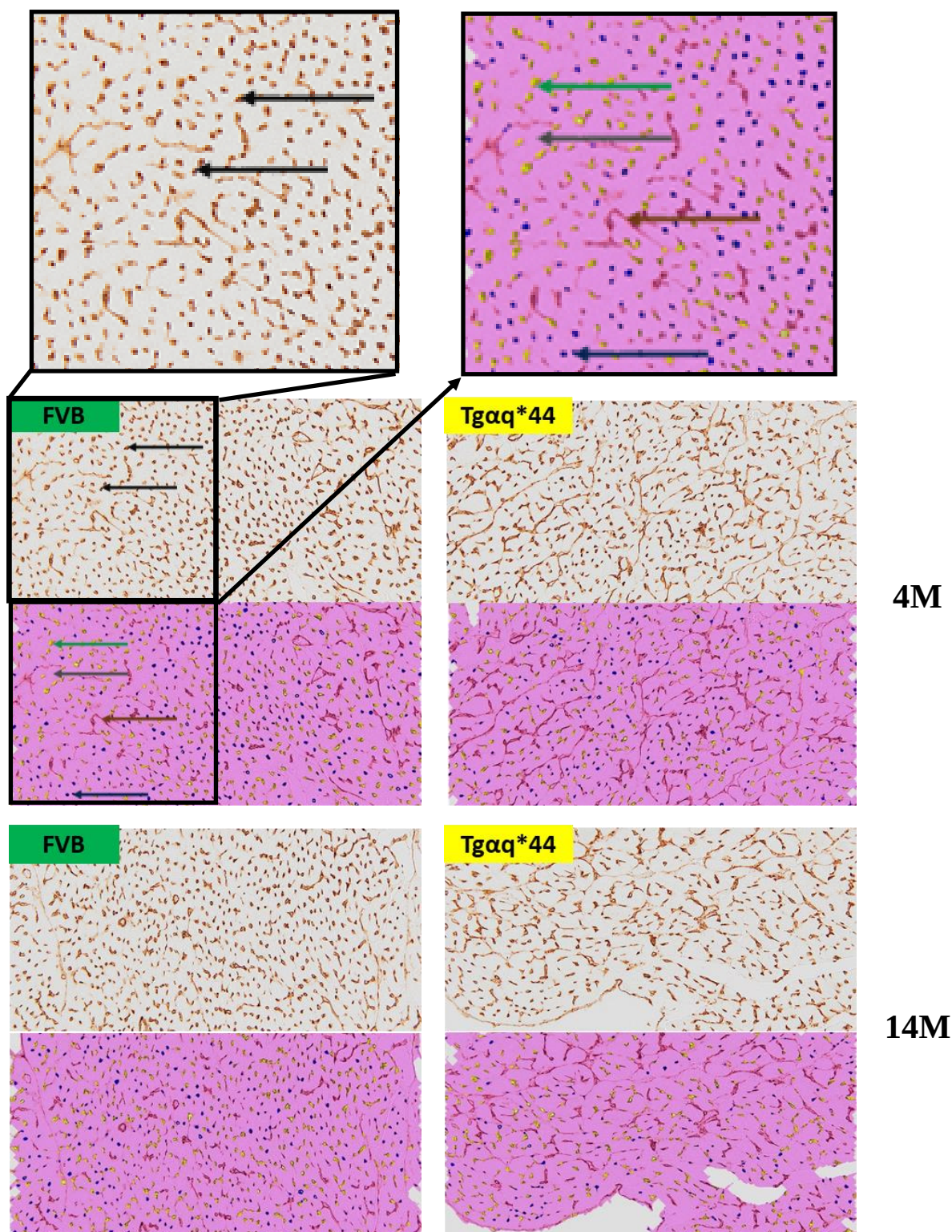
Podsumowując, wydaje się, że zarówno proces starzenia serca u myszy FVB, jak i rozwój niewydolności serca u myszy $Tg\alpha q^{*44}$ były związane ze zwiększonym włóknieniem oraz odkładaniem komponentów macierzy zewnątrzkomórkowej. Niemniej jednak, intensywność zmian w budowie macierzy zewnątrzkomórkowej serca u 4-miesięcznych myszy $Tg\alpha q^{*44}$ była większa niż u 14-miesięcznych myszy FVB. Zwiększenie odkładania się macierzy zewnątrzkomórkowej serca młodych myszy $Tg\alpha q^{*44}$, w szczególności widoczne wokół kapilarnych naczyń wieńcowych, w tym pogrubiona blaszka podstawna kapilar mogą być rozpatrywane, jako objaw fenotypu przedwczesnego starzenia się serca. Rozwojowi niewydolności serca myszy $Tg\alpha q^{*44}$ towarzyszyło również szereg innych zmian takich jak: zwiększenie rozmiarów miofibrili, zmniejszenie ilości mitochondriów i zmiana ich kształtu, zmienienie układu przestrzennego mitochondriów i miofibrili, zaburzenie układu sarkomerów

i wstawek, zmniejszenie ilości kanalików T, zaburzenie budowy kapilarnych naczyń wieńcowych.

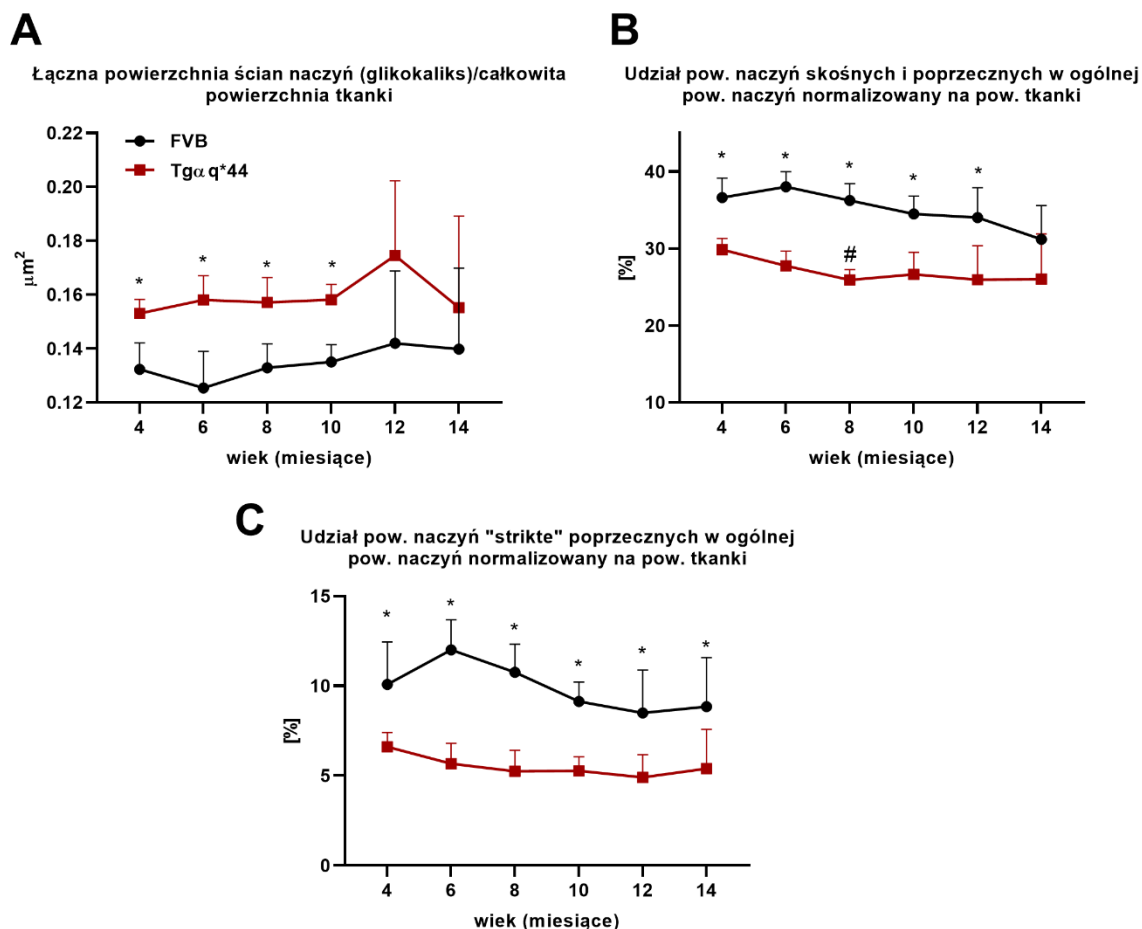
4.2.4 Gęstość i układ kapilar

Aby sprawdzić, czy zwiększone odkładanie kolagenu i akumulacja komponentów macierzy zewnątrzkomórkowej wokół kapilar wieńcowych w sercu myszy Tgαq*44 wywołuje zmiany w gęstości i układzie kapilar wykonano analizy ilościowe i jakościowe na skrawkach sercowych barwionych z użyciem lektyny, z równoczesnym zastosowaniem DAB-u jako chromogenu (**Ryc. 20, Ryc. 21**).

Już u 4-miesięcznych myszy Tgαq*44 łączna powierzchnia wszystkich typów ścian naczyń była większa w porównaniu do 4- i 14-miesięcznych myszy FVB (**Ryc. 21 A**), natomiast udział łącznej powierzchni naczyń skośnych i poprzecznych (**Ryc. 21 B**) oraz "strikte" poprzecznych (**Ryc. 21 C**) w ogólnej powierzchni naczyń normalizowany na powierzchnię tkanki serca (reprezentujących naczynia biegnące wzdłuż kardiomiocytów) był mniejszy. Zarówno u 14-miesięcznych myszy FVB w porównaniu z 4-miesięcznymi myszami FVB, jak i u 14-miesięcznych myszy Tgαq*44 w porównaniu z 4-miesięcznymi myszami Tgαq*44 łączna powierzchnia wszystkich typów ścian naczyń oraz udział łącznej powierzchni naczyń skośnych i poprzecznych oraz "strikte" poprzecznych w ogólnej powierzchni naczyń normalizowany na powierzchnię tkanki serca były na jednakowym poziomie (**Ryc. 21 A, B, C**). Wskazuje to na, to że istotna zmiana układu kapilar jest raczej elementem związanym z rozwojem niewydolności serca a nie starzeniem się serca.



Ryc. 20 Układ kapilar w sercach myszy FVB oraz myszy Tgaq*44. Reprezentatywne zdjęcia preparatów w mikroskopii optycznej (powiększenie 400x) przedstawiające przekroje poprzeczne przez tkankę sercową z zastosowaniem barwienia immunohistochemicznego na lektynę i DAB. Górny panel prezentuje zdjęcia barwień bez zastosowania algorytmu; dolny panel z zastosowaniem algorytmu. Legenda: barwienie bez zastosowania algorytmu: kapilary – brązowe (czarne strzałki); barwienie z zastosowaniem algorytmu: miokardium – różowy (strzałka szara); kapilary (glikokaliks): przekroje podłużne – brązowy (strzałka brązowa), przekroje skośne i poprzeczne – zielone (strzałka zielona), przekroje „strikte” poprzeczne – granatowe (strzałka granatowa)(wsp. A. Jasztal i Z. Kuryłowicz).

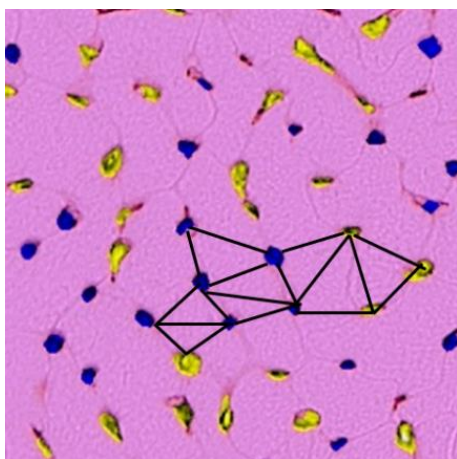
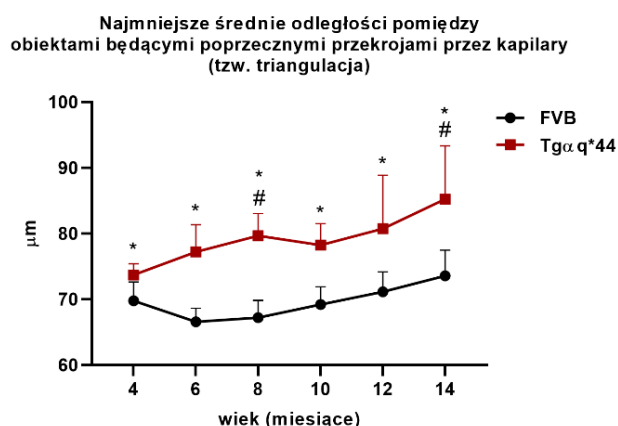


Ryc. 21 Gęstość i przestrzenny układ kapilar w sercach starzejących się myszy FVB oraz sercach myszy Tgaq*44 w toku rozwoju niewydolności serca. Łączna powierzchnia ścian naczyń (A), udział powierzchni poszczególnych typów naczyń: skośnych i poprzecznych (B), „strikte” poprzecznych (C) w ogólnej powierzchni naczyń. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna $\pm$ odchylenie standardowe od średniej. * $P < 0.05$ dla Tgaq*44 vs. FVB (test t-Studenta lub Manna-Whitneya), # $P < 0.05$ dla myszy Tgaq*44 w określonym wieku vs. 4-miesięczne myszy Tgaq*44 (test Kruskala-Wallis); $n = 5-6$ (wsp. A. Jasztal i Z. Kuryłowicz).

4.2.5 Odległości między kapilarami

Aby określić najmniejszą odległość między kapilarami układającymi się wzdłuż kardiomiocytów wykorzystano metodę triangulacji polegającą na obliczeniu najmniejszej średniej odległości między trzema najbliższymi ze sobą sąsiadującymi kapilarami (**Ryc. 22 A**).

Już u 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 odległość między kapilarami układającymi się wzdłuż kardiomiocytów była wyższa w porównaniu do 4-miesięcznych myszy FVB oraz podobna w porównaniu do 14-miesięcznych myszy FVB i zwiększała się dalej z wiekiem u myszy Tgaq*44 (**Ryc. 22 B**). U 14-miesięcznych myszy FVB w porównaniu do 4-miesięcznych myszy odległość między kapilarami układającymi się wzdłuż kardiomiocytów była podobna.

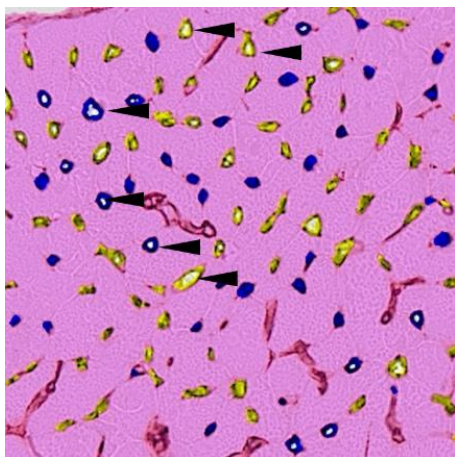
A**B**

Ryc. 22 Najmniejsze średnie odległości między kapilarami w starzejących się sercach myszy FVB oraz sercach myszy Tgaq*44 w toku rozwoju niewydolności serca. Zdjęcia preparatu w mikroskopii optycznej (powiększenie 400x) przedstawiające przekrój poprzeczny przez tkankę sercową z zastosowaniem barwienia immunohistochemicznego na lektynę i DAB, z wykorzystaniem algorytmu (A). Średnia najmniejsza odległość pomiędzy sąsiadującymi ze sobą bezpośrednio poprzecznymi i prawie poprzecznymi kapilarami w sercach myszy Tgaq*44 w toku rozwoju niewydolności serca (B). Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna $\pm$ odchylenie standardowe od średniej. * $P < 0.05$ dla Tgaq*44 vs. FVB (test t-Studenta lub Manna-Whitneya), # $P < 0.05$ dla myszy Tgaq*44 w określonym wieku vs. 4-miesięczne myszy Tgaq*44 (test Kruskala-Wallisa); $n = 5-6$. Legenda: miokardium – różowy; kapilary (glikokaliks): przekroje prawie poprzeczne – zielone, przekroje poprzeczne – granatowe; średnia, najmniejsza odległość między kapilarami, tzw. triangulacja (czarne kreski)(wsp. A. Jasztal i Z. Kuryłowicz).

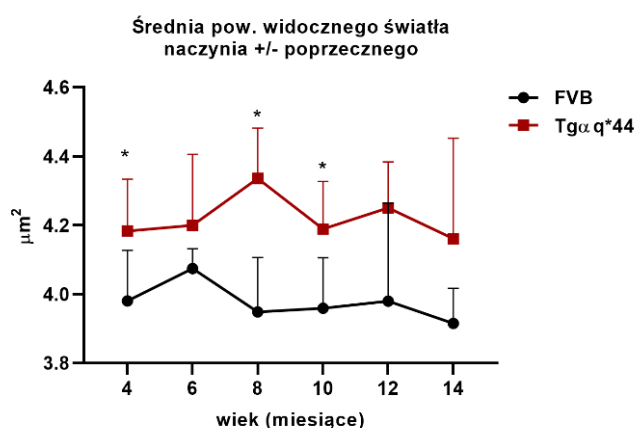
4.2.6 Wielkość światła kapilar

Już u 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 średnia wielkość światła kapilar była większa w porównaniu do 4-miesięcznych myszy FVB (Ryc. 23 A, B) i ta różnica utrzymała się u starszych myszy Tgaq*44 i FVB.

A



B



Ryc. 23 Wielkość światła kapilar w starzejących się sercach myszy FVB oraz sercach myszy Tgaq*44 w toku rozwoju niewydolności serca. Zdjęcia preparatu w mikroskopii optycznej (powiększenie 400x) przedstawiające przekrój poprzeczny przez tkankę sercową z zastosowaniem barwienia immunohistochemicznego na lektynę i DAB, z wykorzystaniem algorytmu (A). Średnia powierzchnia widocznego światła naczyń w przekrojach poprzecznych i prawie poprzecznych kapilar serc myszy Tgaq*44 w toku rozwoju niewydolności serca (B). Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna $\pm$ odchylenie standardowe od średniej. * $P < 0.05$ dla Tgaq*44 vs. FVB (test t-Studenta lub Manna-Whitneya), $n = 5-6$. Legenda: uwidocznione światła naczyń – białe (czarne strzałki), miokardium – różowy; kapilary (glikokaliks): przekroje skośne i podłużne – brązowy, przekroje prawie poprzeczne – zielone, przekroje poprzeczne – granatowe (wsp. A. Jasztal i Z. Kuryłowicz).

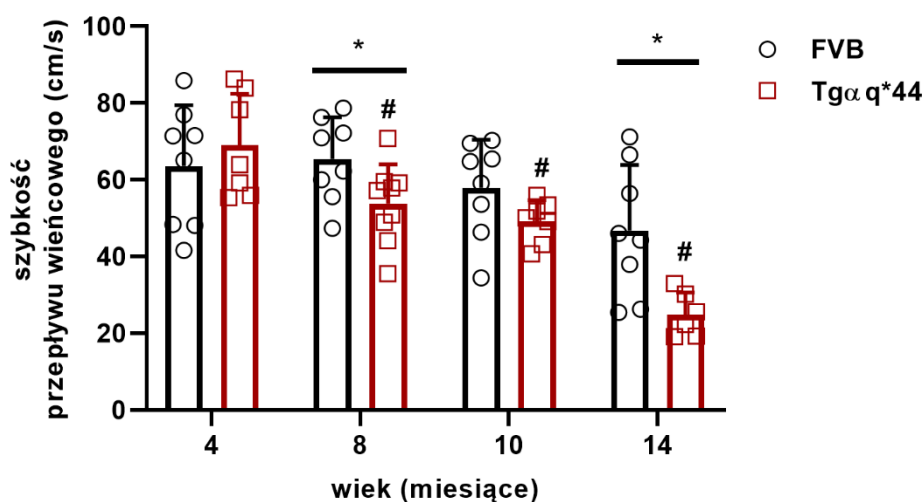
Podsumowując, wydaje się że proces starzenia się serca myszy FVB nie powodował zmian w budowie kapilar, ich średnicy, gęstości i ułożeniu w tkance sercowej. Niewydolność serca u myszy Tgaq*44 była związana z kompensacyjnym zwiększeniem światła kapilar, zwiększeniem gęstości kapilar wraz ze zmianą ich ułożenia w mięśniu sercowym, obejmując spadek udziału powierzchni kapilar biegnących wzdłuż kardiomiocytów w całkowitej powierzchni kapilar wieńcowych w sercu. Wraz z postępem niewydolności serca zwiększyła się stopniowo odległość pomiędzy kapilarami biegnącymi wzdłuż kardiomiocytów.

4.3 Zmiany reaktywności naczyń wieńcowych u starzejących się myszy FVB oraz w toku rozwoju niewydolności serca u myszy Tgaq*44

W celu zbadania czy zwiększone odkładanie komponentów macierzy zewnątrzkomórkowej oraz zmiany struktury i układu kapilar wieńcowych w niewydolnym sercu myszy Tgaq*44 wywołują zmiany w czynności kapilar, zbadano wieńcowy przepływ podstawowy oraz reaktywność naczyń wieńcowych *in vivo* z wykorzystaniem ultrasonograficznej metody dopplerowskiej oraz *ex vivo* z wykorzystaniem modelu izolowanego perfundowanego serca myszy.

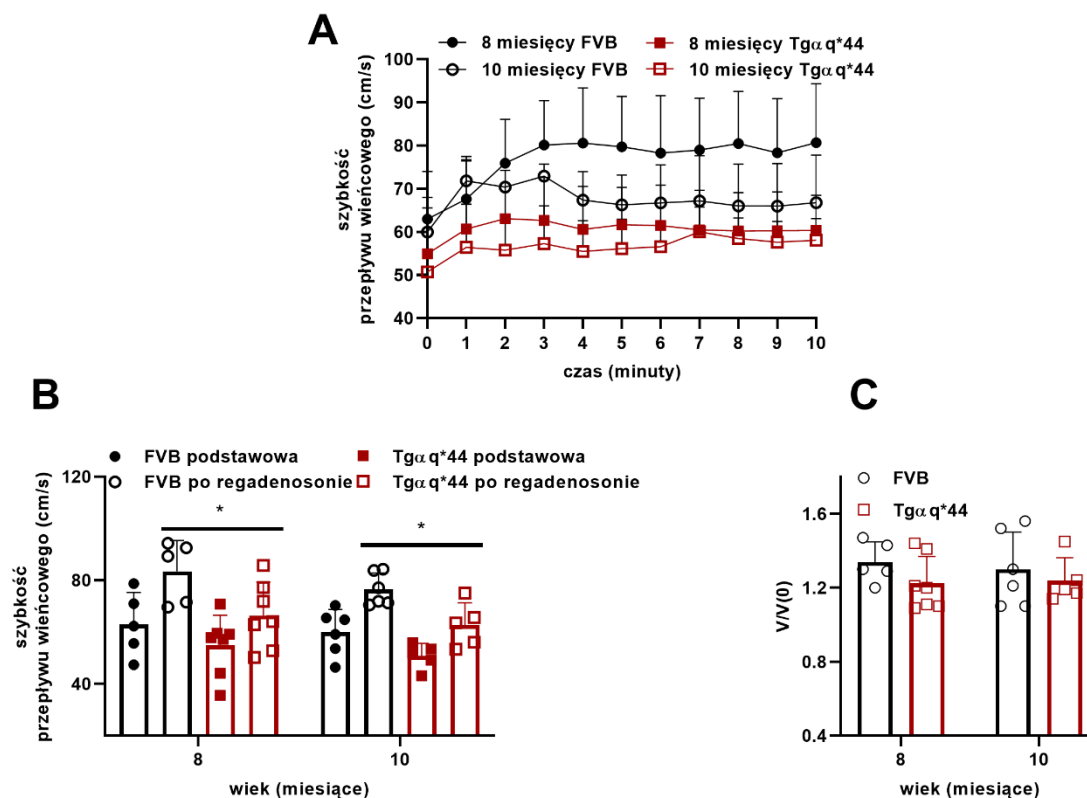
4.3.1 Badania *in vivo* - ultrasonograficzna metoda dopplerowska

U myszy FVB w wieku 14 miesięcy szybkość podstawowego przepływu wieńcowego, mierzona *in vivo* za pomocą ultrasonograficznej metody dopplerowskiej była zmniejszona w porównaniu do myszy FVB w wieku 4 miesięcy (jednak nie osiągnęła znamienności statystycznej). U myszy Tgaq*44 w wieku 8, 10, 14 miesięcy szybkość podstawowego przepływu wieńcowego była niższa niż u myszy Tgaq*44 w wieku 4 miesięcy. Szybkość podstawowego przepływu wieńcowego była niższa w sercach myszy Tgaq*44 w 8, 10 i 14 miesiącu życia w porównaniu do myszy kontrolnej, jednak ta zmiana uzyskiwała znamienność statystyczną u myszy 8- i 14-miesięcznych (**Ryc. 24**).



Ryc. 24 Szybkość podstawowego przepływu wieńcowego w starzejących się sercach myszy FVB oraz sercach myszy Tgaq*44 w toku rozwoju niewydolności serca. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna $\pm$ odchylenie standardowe od średniej. * $P < 0.05$ dla Tgaq*44 vs. FVB (test t-Studenta), # $P < 0.05$ dla myszy Tgaq*44 w określonym wieku vs. 4-miesięczne myszy Tgaq*44 (jednoczynnikowa ANOVA), $n = 6-9$, (wsp. G. Kwiatkowski).

Maksymalna szybkość przepływu wieńcowego w odpowiedzi na regadenoson ($1 \mu\text{g/g}$ masy ciała) była na jednakowym poziomie u myszy FVB w wieku 8 oraz 10 miesięcy (**Ryc. 25 B**). Również, maksymalna szybkość przepływu wieńcowego w odpowiedzi na regadenoson ($1 \mu\text{g/g}$ masy ciała) u myszy Tgaq*44 w wieku 8 i 10 miesięcy była podobna. Maksymalna szybkość przepływu wieńcowego uzyskana w odpowiedzi na regadenoson była wyższa u myszy FVB niż u myszy Tgaq*44, zarówno w 8 i 10 miesiącu życia (**Ryc. 25 B**). Jednak, rezerwa wieńcowa mierzona w odpowiedzi na regadenoson ($1 \mu\text{g/g}$ masy ciała) była podobna w 8 i 10 miesiącu życia zarówno u myszy FVB i Tgaq*44, i miała niewielką wartość - w przybliżeniu $V/V(0) = 1,2$ (**Ryc. 25 C**).



Ryc. 25 Zmiany w szybkości przepływu wieńcowego (A, B) oraz rezerwy wieńcowej (C) w odpowiedzi na regadenoson (0,1 µg/g masy ciała) u myszy FVB oraz myszy Tgaq*44. Krzywa zmian szybkości przepływu wieńcowego od czasu podania regadenosonu (A). Najwyższa zanotowana szybkość przepływu wieńcowego w ciągu 10 minut od podania regadenosonu w porównaniu do szybkości podstawowego przepływu wieńcowego (B). Najwyższa wartość rezerwy wieńcowej uzyskana w ciągu 10 minut od podania regadenosonu (C). Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe od średniej. *P<0.05 dla Tgaq*44 vs. FVB (test t-Studenta), n=5-7, (wsp. G. Kwiatkowski).

4.3.2 Badania *ex vivo* w modelu izolowanego serca

4.3.2.1 Zmiany przepływu wieńcowego w czasie podstawowego przepływu przez tkankę serca oraz w odpowiedzi na 30 sekundową okluzję naczyń wieńcowych

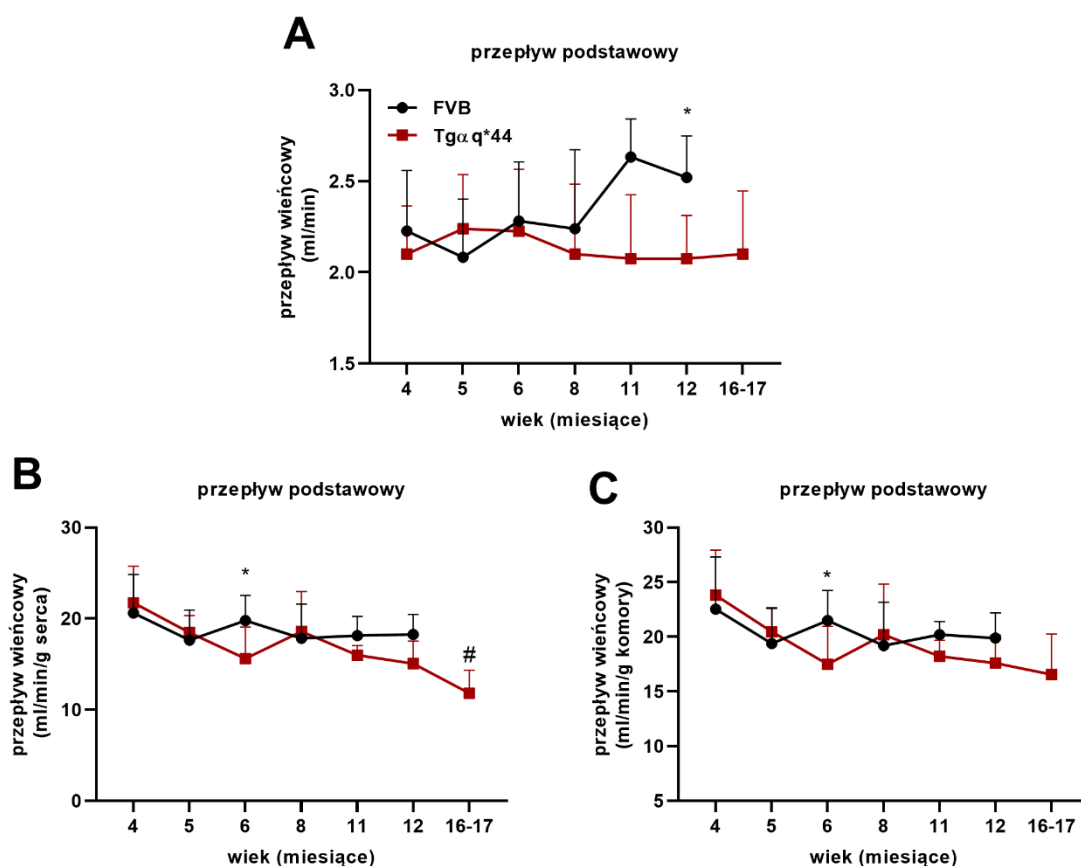
Porównano ze sobą trzy sposoby przedstawiania danych dla podstawowego przepływu wieńcowego oraz dla przepływu wieńcowego w odpowiedzi na 30 sekundową okluzję naczyń wieńcowych w trakcie procesu starzenia myszy FVB oraz w toku rozwoju niewydolności serca myszy Tgaq*44, aby wybrać najbardziej wiarygodny sposób przedstawiania wyników dla zmian przepływów wieńcowych zarówno w izolowanych sercach myszy FVB, jak i myszy Tgaq*44.

Trzy sposoby przedstawiania danych dla przepływów wieńcowych polegały na przedstawieniu wyników przepływów wyrażonych bezpośrednio w ml/min oraz przeliczonych na masę komór (ml/min/g komór) lub przeliczonych na masę serca (ml/min/g serca). Bez względu na sposób oceny, nie było istotnych różnic w przepływie wieńcowym u myszy FVB

w wieku 4-12 miesięcy w porównaniu do myszy $Tg\alpha q^{*44}$ dla podstawowego przepływu wieńcowego (z wyjątkiem 12 miesiąca życia dla przepływu wyrażonego w ml/min) (**Ryc. 26 A-C**) oraz przepływu wieńcowego w odpowiedzi na 30 sekundową okluzję naczyń wieńcowych (**Ryc. 27 A-C**).

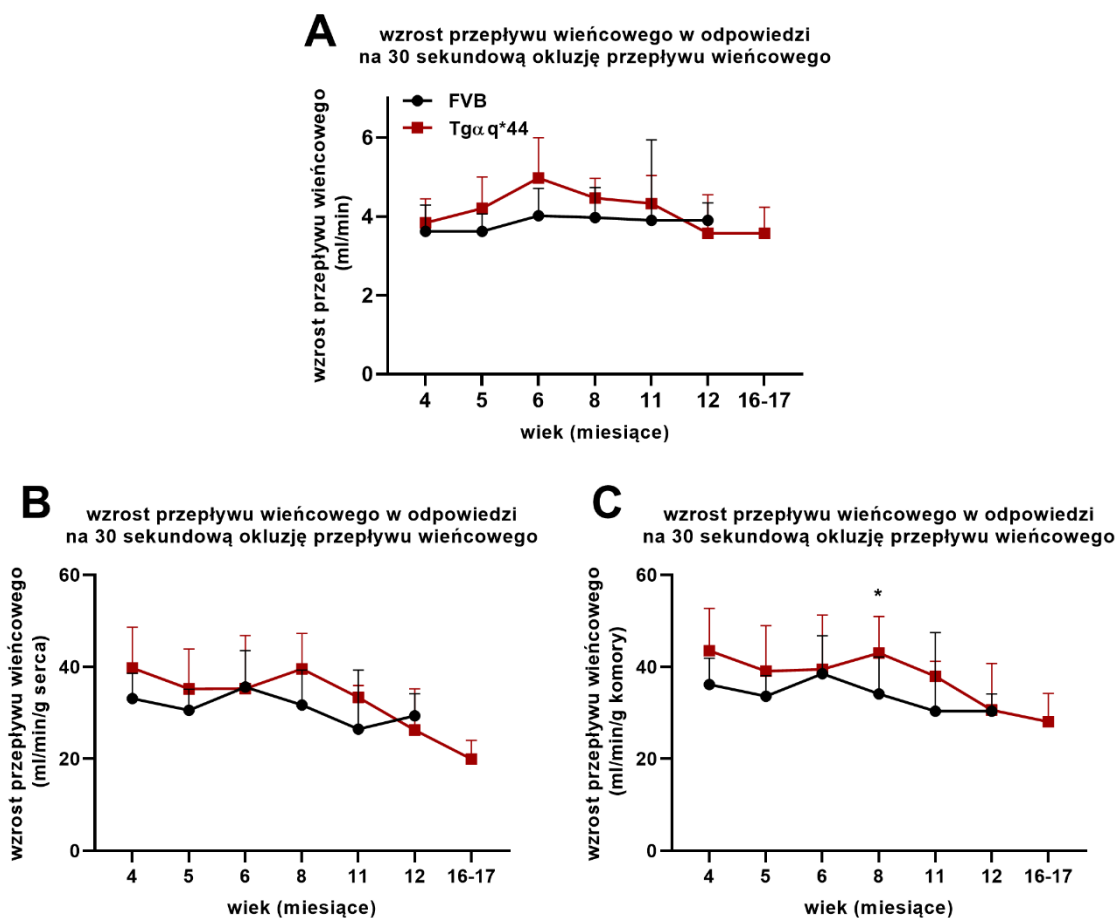
U myszy FVB w wieku 4-12 miesięcy w trzech wariantach przedstawiania danych dla przepływu wieńcowego, zarówno podstawowy przepływ wieńcowy oraz przepływ wieńcowy w odpowiedzi na 30 sekundową okluzję naczyń wieńcowych były na jednakowym poziomie (z wyjątkiem wyników dla podstawowego przepływu wieńcowego u myszy 11-12-miesięcznych FVB wyrażonych w ml/min)(**Ryc. 26 A-C, 27 A-C**).

U myszy $Tg\alpha q^{*44}$ w wieku 16-17 miesięcy w porównaniu do 4-miesięcznych myszy $Tg\alpha q^{*44}$ nastąpił wyraźny spadek podstawowego przepływu wieńcowego oraz przepływu wieńcowego w odpowiedzi na 30 sekundową okluzję naczyń wieńcowych jedynie dla wyników przepływu wieńcowego przedstawionych jako ml/min/g serca (**Ryc. 26 B, 27 B**).



Ryc. 26 Trzy sposoby przedstawiania danych dla podstawowego przepływu wieńcowego. Porównanie wartości przepływów dla myszy $Tg\alpha q^{*44}$ i FVB. Wyniki przepływu wieńcowego przedstawiono w ml/min (**A**), ml/min/g serca (**B**), ml/min/g komór (**C**). Eksperymenty były wykonane na podstawie protokołu 2 perfuzji serca (opis w metodyce). Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna $\pm$ odchylenie standardowe od średniej.

* $P < 0.05$ dla $Tg\alpha q^{*44}$ vs. FVB (test t-Studenta lub Manna-Whitneya), # $P < 0.05$ dla myszy $Tg\alpha q^{*44}$ w określonym wieku vs. 4-miesięczne myszy $Tg\alpha q^{*44}$ (jednoczynnikowa ANOVA lub test Kruskala-Wallisa); $n=3-11$.



Ryc. 27 Trzy sposoby przedstawiania danych dla wzrostu przepływu wieńcowego w odpowiedzi na 30 sekundową okluzję przepływu wieńcowego. Porównanie wartości przepływów dla myszy $Tg\alpha q^{*44}$ i FVB. Wyniki wzrostu przepływu wieńcowego przedstawiono w ml/min (A), ml/min/g serca (B), ml/min/g komór (C). Eksperymenty były wykonane na podstawie protokołu 2 perfuzji serca (opis w metodyce). Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna $\pm$ odchylenie standardowe od średniej. * $P < 0.05$ dla $Tg\alpha q^{*44}$ vs. FVB (test t-Studenta lub Manna-Whitneya); $n=3-12$.

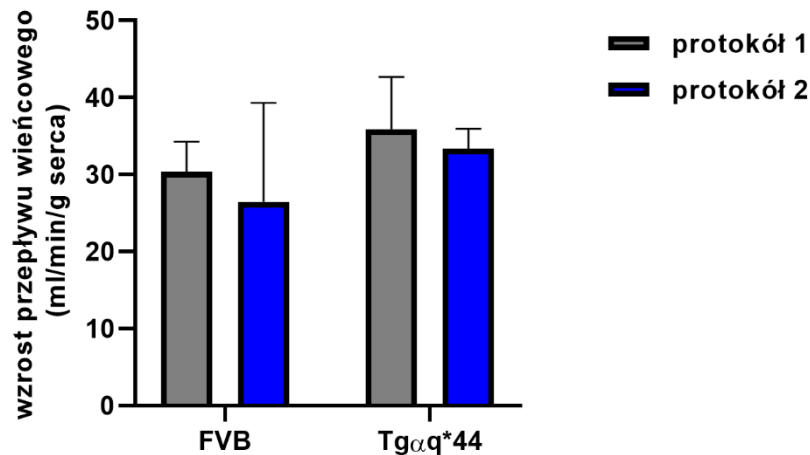
Podsumowując, wyniki dla przepływów wieńcowych przedstawione jako ml/min i ml/min/g komór nie odzwierciedlały prawdziwego przepływu wieńcowego przez tkankę sercową na końcowym etapie niewydolności serca myszy $Tg\alpha q^{*44}$. Biorąc ten aspekt pod uwagę w niniejszej pracy doktorskiej zdecydowano się na prezentację wyników przepływów wieńcowych w przeliczeniu na masę serca, która ma istotny wpływ na przepływ wieńcowy u 16-17-miesięcznych myszy $Tg\alpha q^{*44}$. Upośledzenie podstawowego przepływu wieńcowego, jak i przepływu wieńcowego w odpowiedzi na 30 sekundową okluzję naczyń wieńcowych było widoczne jedynie u 16-17-miesięcznych myszy $Tg\alpha q^{*44}$.

4.3.2.2 Porównanie zmian przepływu wieńcowego w odpowiedzi na 30 sekundową okluzję naczyń wieńcowych między dwoma protokołami eksperymentalnymi perfuzji izolowanego serca myszy

W celu porównania uzyskanych wyników wg. protokołu eksperymentalnego 1 (obciążenie następcze serca 90 mmHg, buforu Krebsa z albuminą, brak stymulacji serca) oraz wg. protokołu eksperymentalnego 2 (obciążenie następcze serca 100 mmHg, buforu Krebsa bez albuminy, stymulacja serca 450-600 ud./min) wykorzystano odpowiedzi wazodylatacyjne naczyń wieńcowych w odpowiedzi na 30 sekundową okluzję przepływu wieńcowego u 11-miesięcznych myszy FVB i Tgaq*44 (**Ryc. 28**).

Odpowiedzi przepływu wieńcowego były podobne dla myszy FVB dla protokołu eksperymentalnego 1 w porównaniu z protokołem eksperymentalnym 2. Podobnie, odpowiedzi przepływu wieńcowego były jednakowe dla myszy Tgaq*44 dla protokołu eksperymentalnego 1 w porównaniu z protokołem eksperymentalnym 2. Również, profil zmian przepływu wieńcowego został zachowany dla myszy FVB w porównaniu do myszy Tgaq*44 zarówno w protokole eksperymentalnym 1 i 2.

Podsumowując, interpretacja wyników dla zmian przepływu wieńcowego w odpowiedzi na 30 sekundową okluzję naczyń wieńcowych pochodzących z protokołu eksperymentalnego 1 i 2, różniących się między sobą zarówno wartościami obciążenia następczego serca, składem buforu perfuzyjnego oraz stymulacją serca pozwoliła wyciągnąć spójne wnioski, co do odpowiedzi naczyń wieńcowych dla myszy FVB i Tgaq*44. Oznacza to, że wyniki eksperymentów dla odpowiedzi naczyń wieńcowych prowadzonych według protokołu eksperymentalnego 1 i 2 nie generowały różnic wynikających z użytego protokołu eksperymentalnego. W związku z tym wyniki dla zmian reaktywności naczyń wieńcowych zaprezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej, a uzyskane przy użyciu któregośkolwiek z tych dwóch protokołów eksperymentalnych zostały uwzględnione w tej pracy, jednak przedstawiono je osobno.

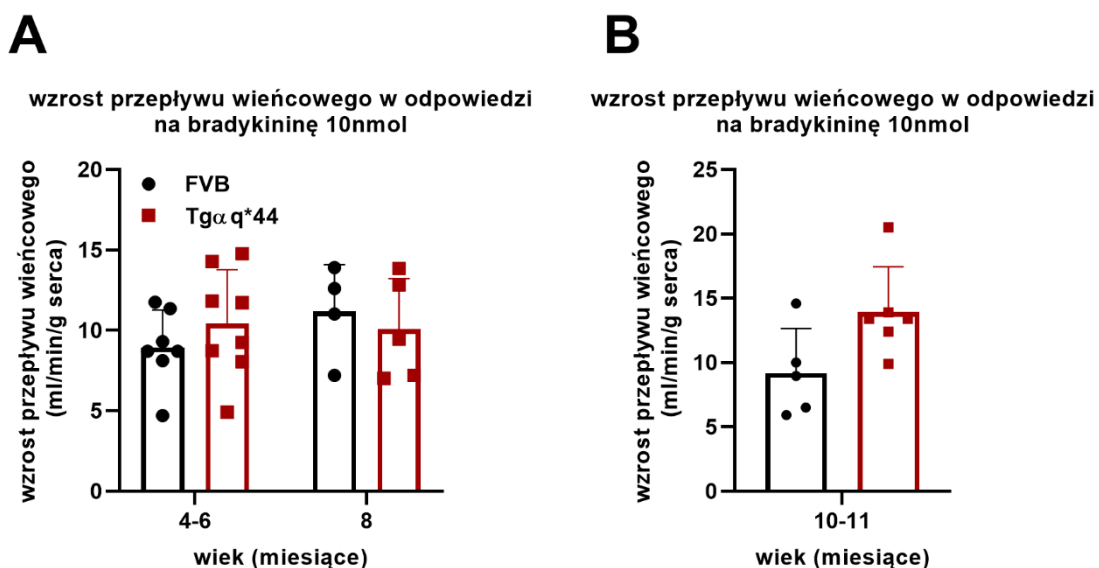


Ryc. 28 Porównanie przepływów wieńcowych w odpowiedzi na 30 sekundową okluzję przepływu wieńcowego u 11-miesięcznych myszy FVB i Tgαq*44 w izolowanych sercach perfundowanych według protokołu eksperymentalnego 1 i 2 (opis protokołów w metodyce). Dane są przedstawione jako średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe średniej. Wykonano analizy statystyczne testami t-Studenta lub Manna-Whitneya dla porównań: protokół 1 vs. protokół 2 dla myszy FVB i Tgαq*44, jak również Tgαq*44 vs. FVB w protokole 1 i 2; n=3-6.

4.3.2.3 Zmiany w odpowiedzi wazodylatacyjnej naczyń wieńcowych na związki naczyniorozszerzające

4.3.2.3.1 Odpowiedź przepływu wieńcowego izolowanego serca na podanie bradykininy

Odpowiedź wazodylatacyjna naczyń wieńcowych w odpowiedzi na podanie bradykininy (10 nmol), w izolowanych perfundowanych sercach myszy Tgαq*44 była podobna w porównaniu do serc myszy FVB (Ryc. 29 A, B).

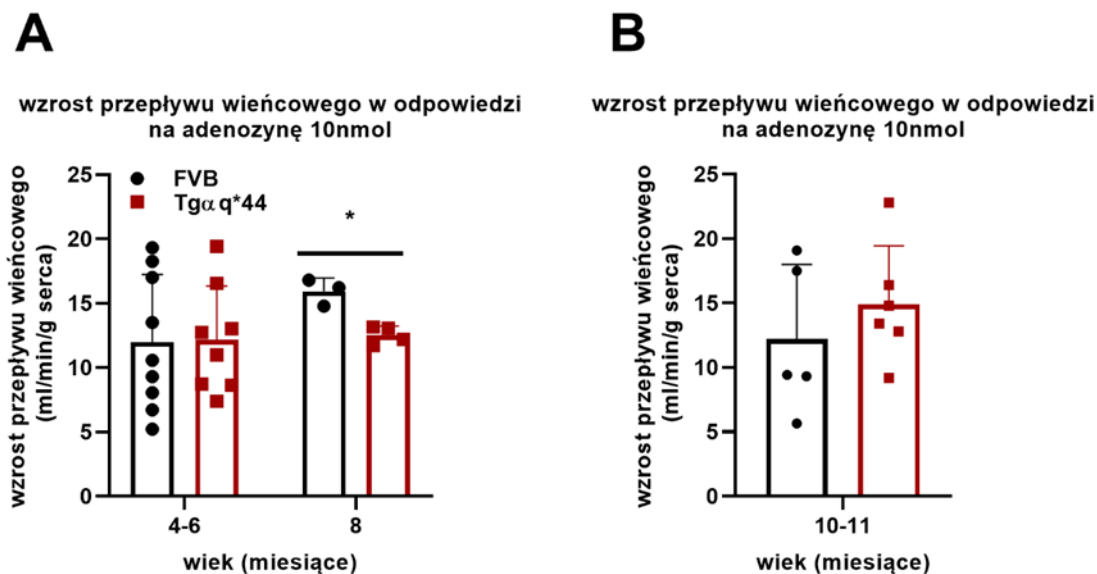


Ryc. 29 Odpowiedź wazodylatacyjna naczyń wieńcowych na bolus bradykininy (10 nmol) w izolowanych perfundowanych sercach myszy FVB i Tgαq*44. Przepływ wieńcowy od 4 do 11 miesiąca życia myszy

Tgaq*44 przedstawiono jako ml/min/g serca, przy obciążeniu następczym serca 100 mmHg (A), 90 mmHg (B). Eksperymenty były wykonane na podstawie protokołu 1-go (B) i 2-go (A) perfuzji serca (opis w metodyce). Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna $\pm$ odchylenie standardowe od średniej; test t-Studenta; n=4-8.

4.3.2.3.2 Odpowiedź przepływu wieńcowego izolowanego serca na podanie adenozyiny

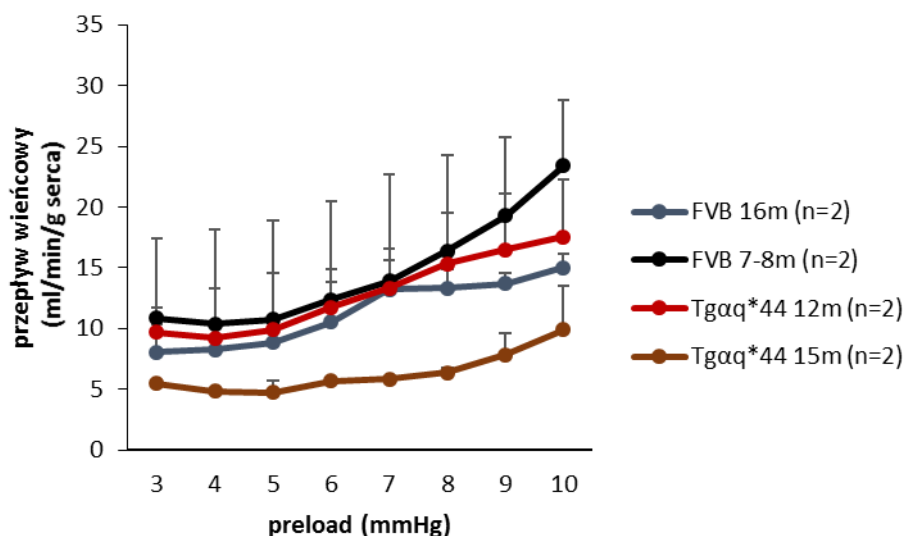
Odpowiedź wazodylatacyjna naczyń wieńcowych na podanie adenozyiny (10 nmol) w izolowanych perfundowanych sercach myszy Tgaq*44 była podobna do wartości uzyskanych dla serc myszy FVB (Ryc. 30 A, B).



Ryc. 30 Odpowiedź wazodylatacyjna naczyń wieńcowych na bolus adenozyiny 10 nmol w izolowanych perfundowanych sercach myszy FVB i Tgaq*44. Przepływ wieńcowy od 4 do 11 miesiąca życia myszy Tgaq*44 przedstawiono jako ml/min/g serca przy obciążeniu następczym serca 100 mmHg (A) i 90 mmHg (B). Eksperymenty były wykonane na podstawie protokołu 1-go (B) i 2-go (A) perfuzji serca (opis w metodyce). Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna $\pm$ odchylenie standardowe od średniej. * $P < 0.05$ dla Tgaq*44 vs. FVB (test t-Studenta); n=3-9.

4.3.2.4 Zmiany w odpowiedzi wazodylatacyjnej naczyń wieńcowych na wzrastające obciążenie serca na końcowym etapie niewydolności serca u myszy Tgaq*44

W modelu pracującego serca, odpowiedź przepływu wieńcowego na wzrastający *preload* była niższa u 16-miesięcznych myszy FVB w porównaniu do myszy FVB w wieku 7-8 miesięcy dopiero, gdy *preload* wyniósł 8 mmHg (Ryc. 31). Odpowiedź przepływu wieńcowego na wzrastający *preload* była niższa u 15-miesięcznych myszy Tgaq*44 w porównaniu do 12-miesięcznych myszy Tgaq*44. Odpowiedź przepływu wieńcowego na wzrastający *preload* była podobna dla 12-miesięcznych myszy Tgaq*44 i 16-miesięcznych myszy FVB (Ryc. 31).



Ryc. 31 Upośledzenie odpowiedzi wazodylatacyjnej naczyń wieńcowych na zwiększone obciążenie serca w modelu izolowanego pracującego serca u myszy FVB oraz na końcowym etapie niewydolności serca u myszy Tgaq*44. Zmiany w odpowiedzi wazodylatacyjnej naczyń wieńcowych na wzrastający *preload* w modelu pracującego serca. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna $\pm$ odchylenie standardowe od średniej; n=2.

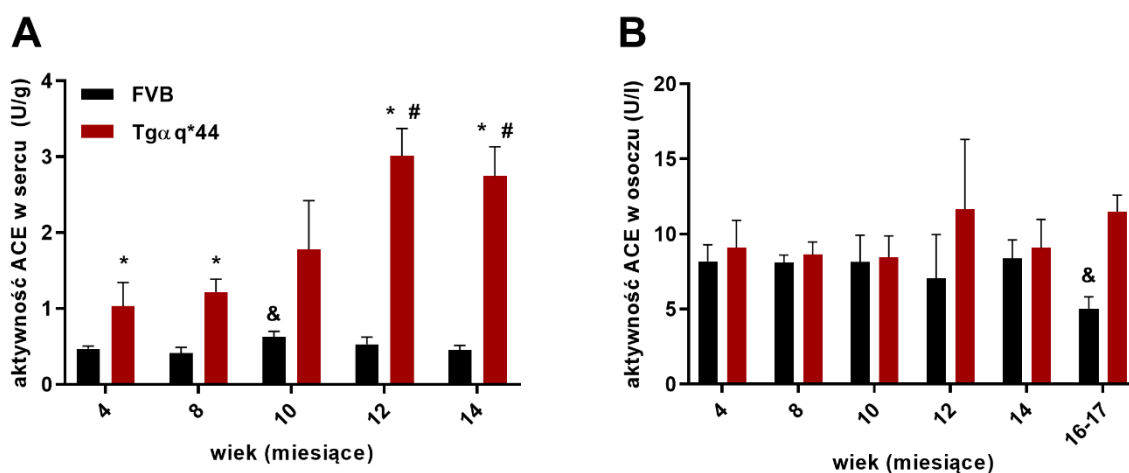
Podsumowując, w procesie starzenia się serca u 14-miesięcznych myszy FVB wykazano upośledzenie podstawowego przepływu wieńcowego *in vivo* oraz upośledzenie odpowiedzi przepływu wieńcowego na wzrastające obciążenie serca *ex vivo* w modelu pracującego izolowanego serca. W toku rozwoju niewydolności serca u myszy Tgaq*44 wykazano postępujące upośledzenie podstawowego przepływu wieńcowego *in vivo* oraz dramatyczne upośledzenie odpowiedzi przepływu wieńcowego na wzrastające obciążenie serca *ex vivo* w modelu pracującego izolowanego serca. Rezerwa wieńcowa wydawała się nie być upośledzona w warunkach *in vivo*, natomiast w badaniach *ex vivo* w modelu izolowanego serca perfundowanego wg. metody Langendorff'a wydawała się być nieznacznie upośledzona na końcowym etapie niewydolności serca.

4.4 Zmiany aktywności ogólnoustrojowych układów neurohormonalnych u starzejących się myszy FVB oraz w toku rozwoju niewydolności mięśnia sercowego u myszy Tgaq*44

Aby zrozumieć, czy okołonaczyniowe włóknienie, zwiększona akumulacja macierzy zewnątrzkomórkowej oraz upośledzony podstawowy przepływ wieńcowy są wynikiem zmian endogennych w sercu, czy systemowych zmian neurohormonalnych zbadano aktywność komponentów szlaku RAAS w sercu (**rozdział 4.4.1**) i w osoczu (**rozdział 4.4.1** oraz **4.4.2**) u starzejących się myszy FVB oraz w toku rozwoju niewydolności serca u myszy Tgaq*44. Ponadto, zbadano czy proces starzenia i rozwój niewydolności mięśnia sercowego związane są ze zmianami obrazu morfologii krwi (**rozdział 4.4.3**).

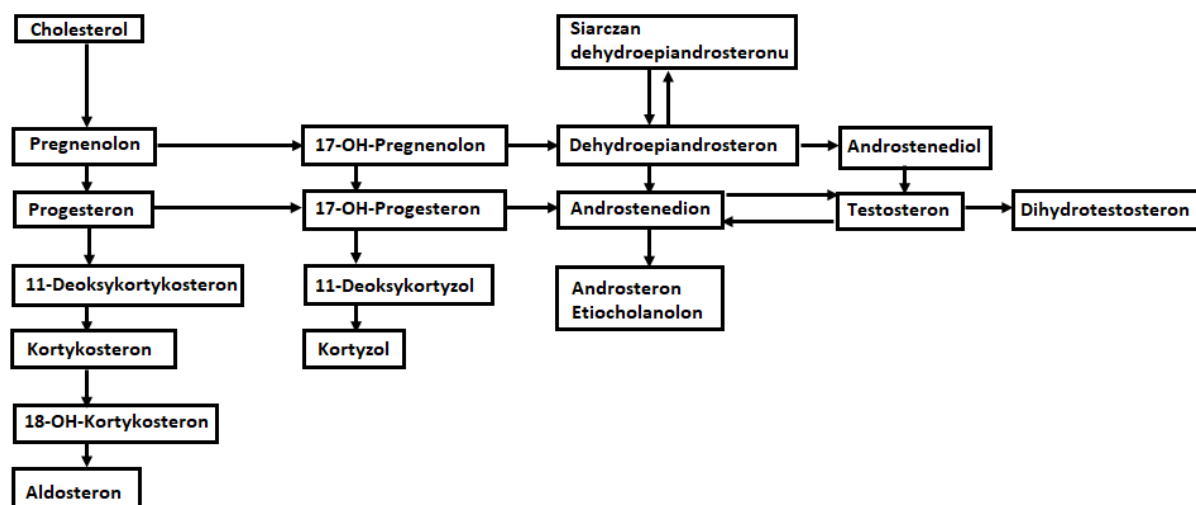
4.4.1 Tkankowa i systemowa aktywność ACE

Aktywność ACE w sercu (**Ryc. 32 A**), jak również w osoczu (**Ryc. 32 B**) była podobna u myszy FVB w wieku 4 i 14 miesięcy. Rozwój niewydolności serca u myszy $Tg\alpha q^{*44}$ spowodował stopniowy wzrost aktywności enzymu ACE w sercu widoczny już u myszy 4-miesięcznych i podwyższony kilkukrotnie u myszy $Tg\alpha q^{*44}$ w 14 miesiącu życia (**Ryc. 32 A**). Natomiast aktywność osoczkowego ACE pozostawała bez większych zmian u myszy $Tg\alpha q^{*44}$ w wieku 4-14 miesięcy (**Ryc. 32 B**).



Ryc. 32 Aktywność ACE w sercu (A) i osoczu (B) w trakcie starzenia się myszy FVB oraz w toku rozwoju niewydolności serca myszy $Tg\alpha q^{*44}$. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna $\pm$ odchylenie standardowe od średniej. * $P < 0.05$ dla $Tg\alpha q^{*44}$ vs. FVB (test t-Studenta lub Manna-Whitneya), # $P < 0.05$ dla myszy $Tg\alpha q^{*44}$ w określonym wieku vs. 4-miesięczne myszy $Tg\alpha q^{*44}$, & $P < 0.05$ dla myszy FVB w określonym wieku vs. 4-miesięczne myszy FVB (jednoczynnikowa ANOVA lub test Kruskala-Wallis); $n = 3-6$, (wsp. T. Csipő).

4.4.2 Systemowa aktywność hormonów steroidowych



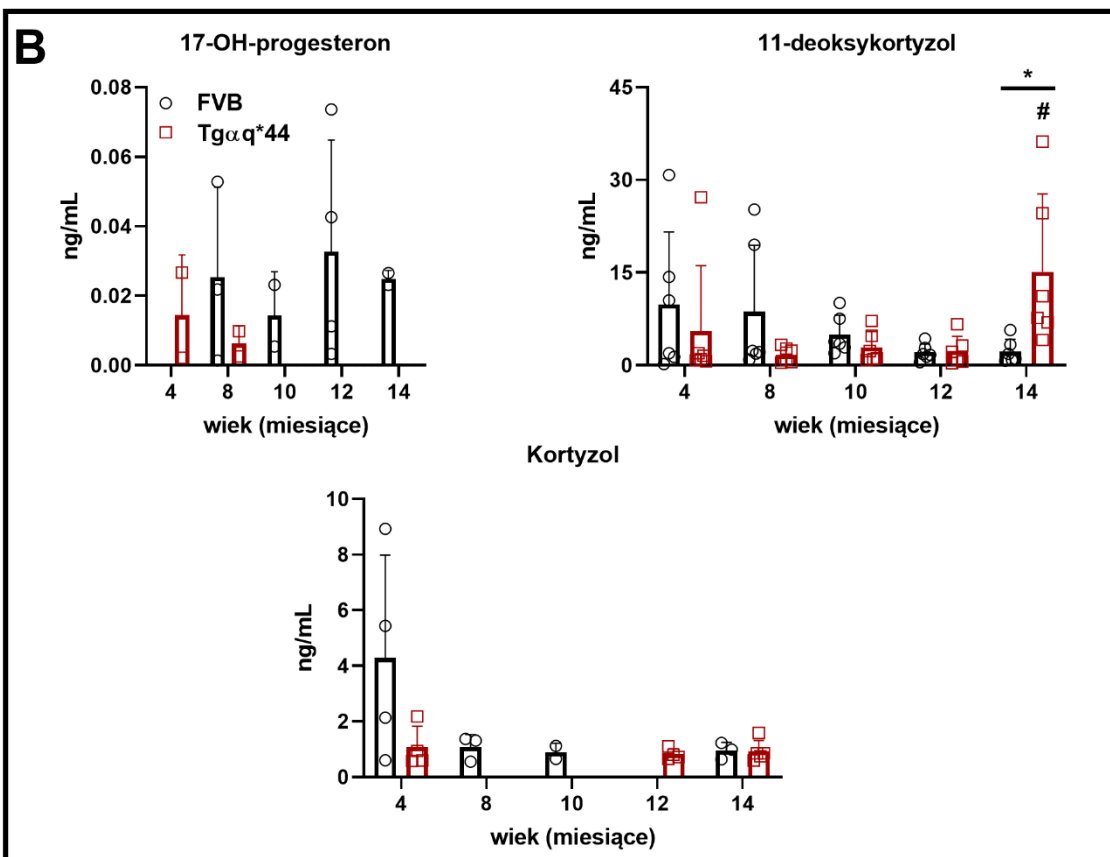
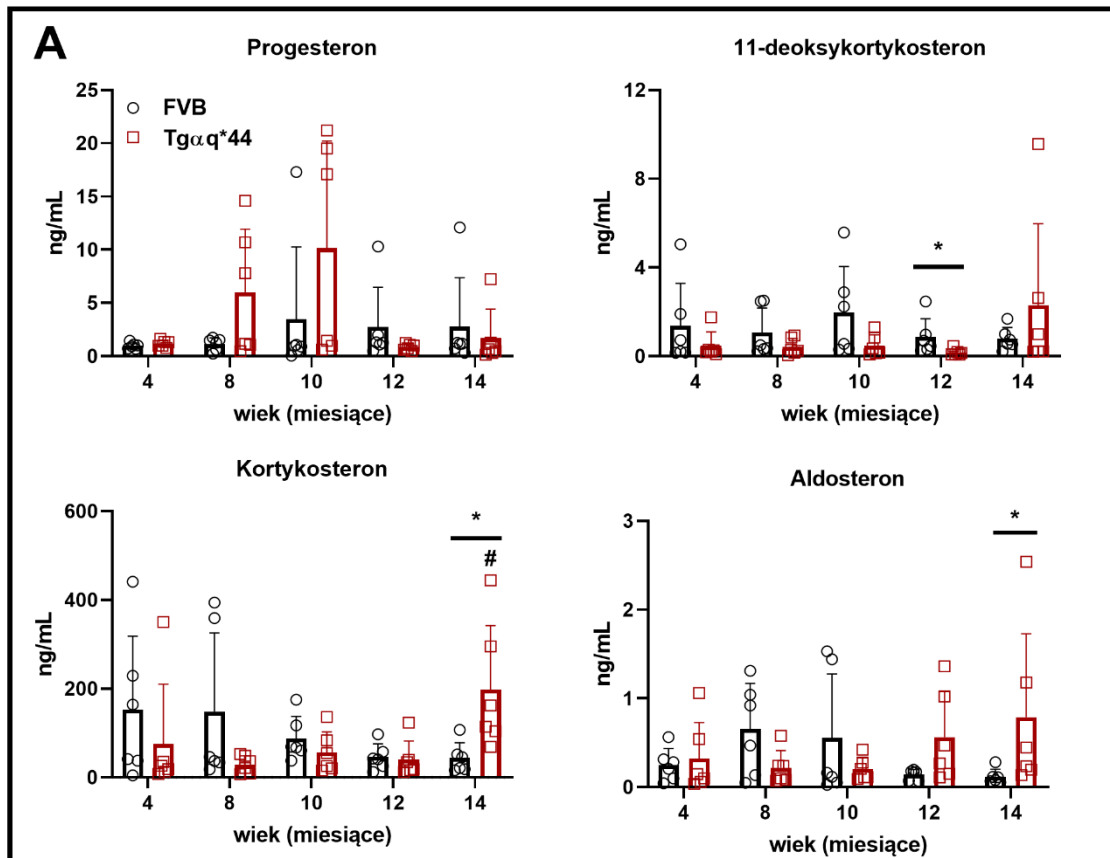
Ryc. 33 Szlak przemian hormonów steroidowych. Rycinę zmodyfikowano za Mohaupt MG., 2014 (114) oraz Greaves RF., 2014 (115).

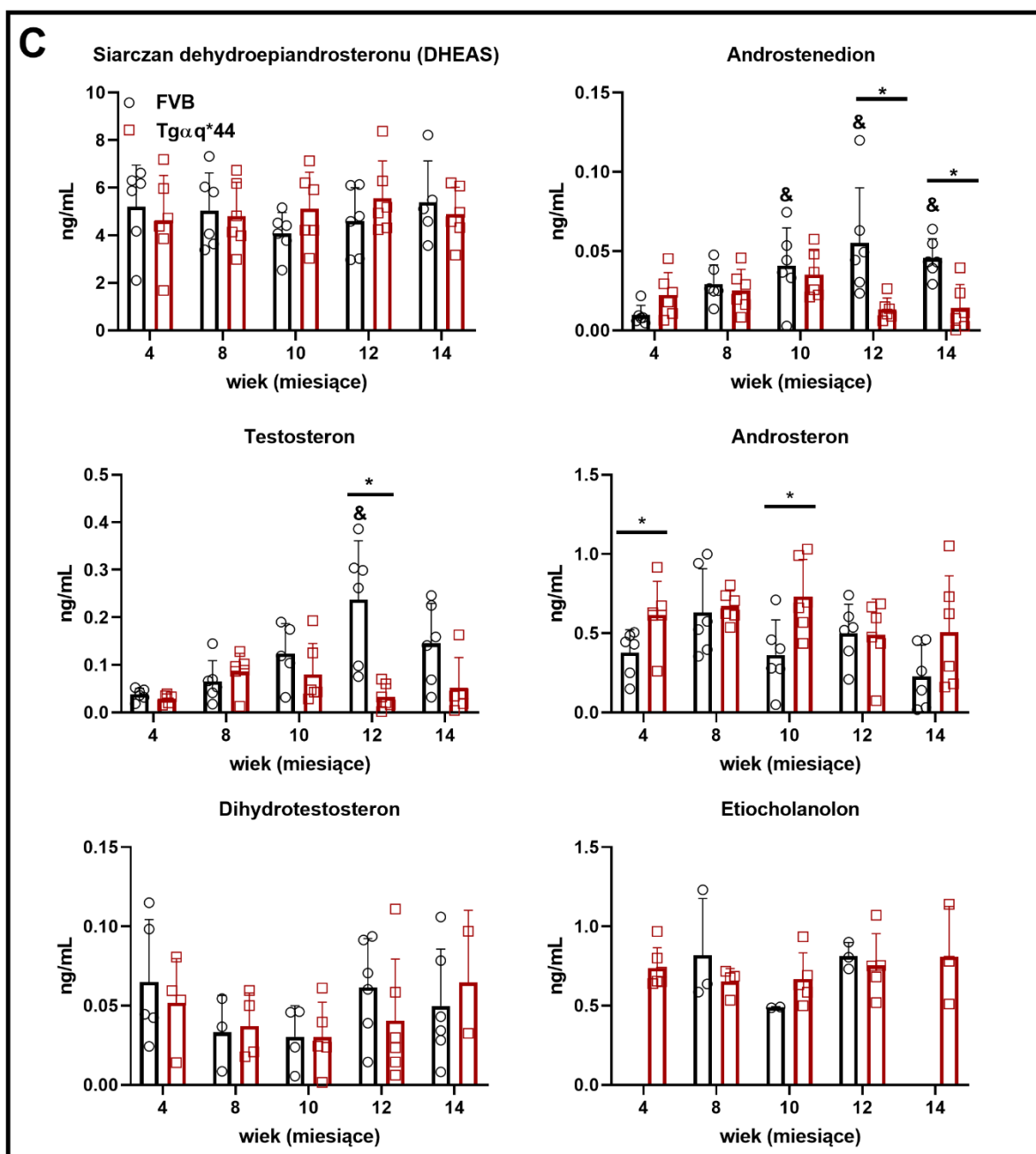
Stężenie mineralokortykosteroidów w osoczu, takich jak; progesteron, 11-deoksykortykosteron, aldosteron nie uległy zmianom u myszy FVB w wieku 4-14 miesięcy (**Ryc. 34 A**). W osoczu stężenia kortykosteronu oraz aldosteronu były wyższe u 14-miesięcznych myszy Tgaq*44 w porównaniu do 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 i 14-miesięcznych myszy FVB.

Poziom glikokortykosteroidów był na jednakowym poziomie w osoczu myszy FVB w wieku 8-14 miesięcy (**Ryc. 34 B**). Jedynie stężenie 11-deoksykortyzolu w osoczu było wyższe u 14-miesięcznych myszy Tgaq*44 w porównaniu do myszy Tgaq*44 w wieku 4 miesięcy oraz myszy FVB w wieku 14 miesięcy.

Wśród androgenów jedynie stężenie androstenedionu było wyższe u 14-miesięcznych myszy FVB w porównaniu do 4-miesięcznych myszy FVB, natomiast stężenia pozostałych hormonów należących do androgenów były na jednakowym poziomie u myszy FVB w wieku 4-14 miesięcy (**Ryc. 34 C**). Stężenia wszystkich androgenów u 14-miesięcznych myszy Tgaq*44 nie zmieniły się w porównaniu do 4-miesięcznych myszy Tgaq*44.

Proces starzenia u myszy FVB nie spowodował systemowych zmian w stężeniach mineralokortykoidów, glikokortykosteroidów, androgenów. Natomiast, końcowy etap niewydolności serca u myszy Tgaq*44 związany był ze wzrostem stężenia kortykosteronu, aldosteronu oraz 11-deoksykortyzolu w osoczu.





Ryc. 34 Profil hormonów steroidowych w osoczu w trakcie starzenia się myszy FVB oraz w toku rozwoju niewydolności serca myszy Tgaq*44. Poziom mineralokortykoidów (A), glikokortykosteroidów (B), androgenów (C) w osoczu u myszy Tgaq*44 i FVB. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna $\pm$ odchylenie standardowe od średniej. * $P < 0.05$ dla Tgaq*44 vs. FVB (test t-Studenta lub Manna-Whitneya), # $P < 0.05$ dla myszy Tgaq*44 w określonym wieku vs. 4-miesięczne myszy Tgaq*44, & $P < 0.05$ dla myszy FVB w określonym wieku vs. 4-miesięczne myszy FVB (jednoczynnikowa ANOVA lub test Kruskala-Wallis); $n = 2-6$, (wsp. K. Kuś).

Podsumowując, wydaje się, że proces starzenia się serca u myszy FVB nie jest związany z aktywacją szlaku renina-angiotensyna-aldosteron, nie zmieniała się bowiem aktywność enzymu ACE w sercu i osoczu oraz stężenie aldosteronu w osoczu u starzejących się myszy FVB. Natomiast rozwój niewydolności serca u myszy Tgaq*44 był związany od wczesnych

etapów rozwoju niewydolności serca z aktywacją ACE w sercu, oraz na końcowym etapie rozwoju niewydolności serca ze zwiększoną produkcją aldosteronu w osoczu.

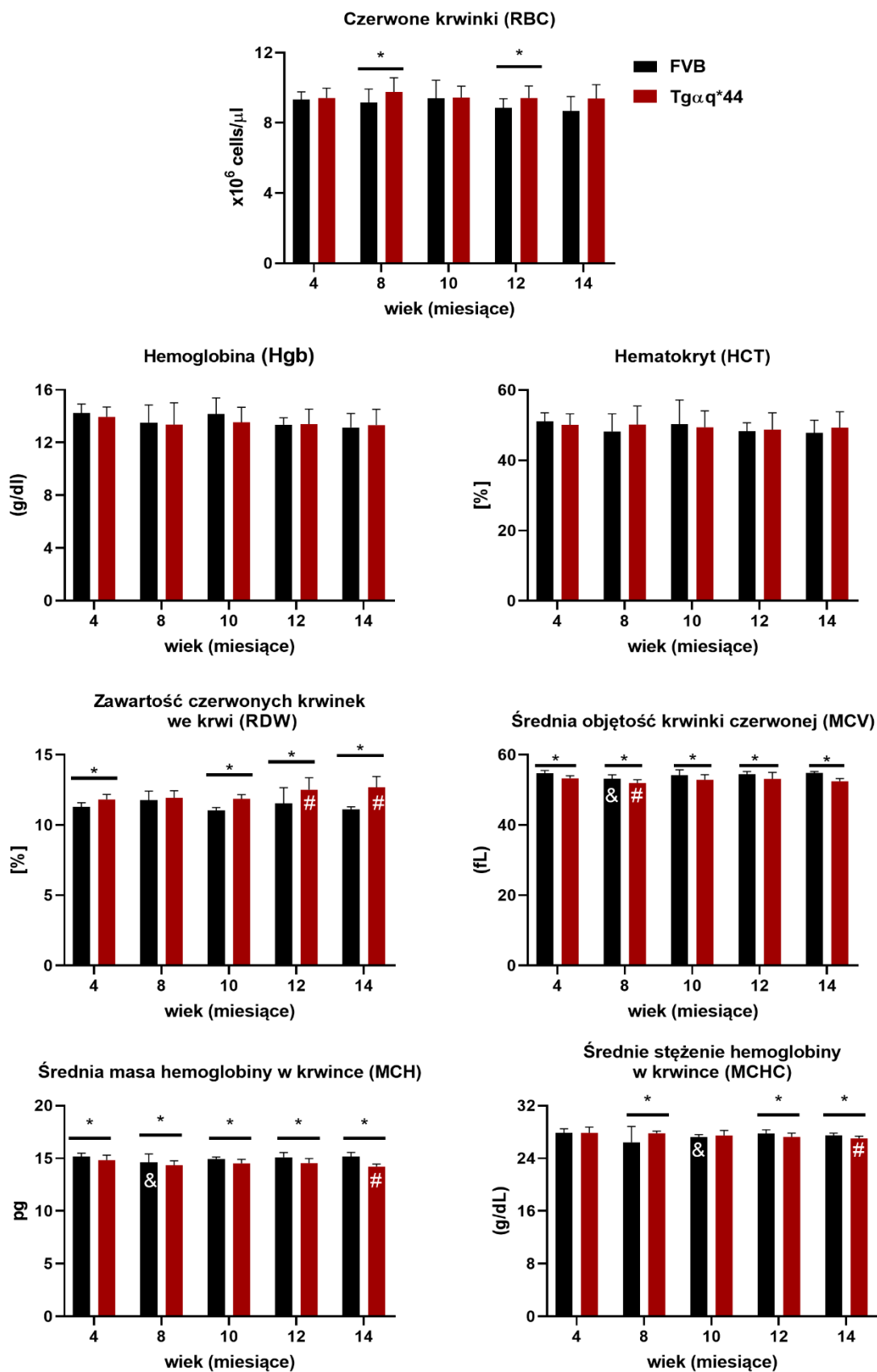
4.4.3 Obraz morfologii krwi

Aby sprawdzić czy w wyniku procesu starzenia serca myszy FVB oraz w wyniku rozwoju niewydolności serca myszy Tgαq*44 następują zmiany w obrazie krwi, wykonano serię pomiarów morfologicznych krwi w wieku 4-14 miesięcy.

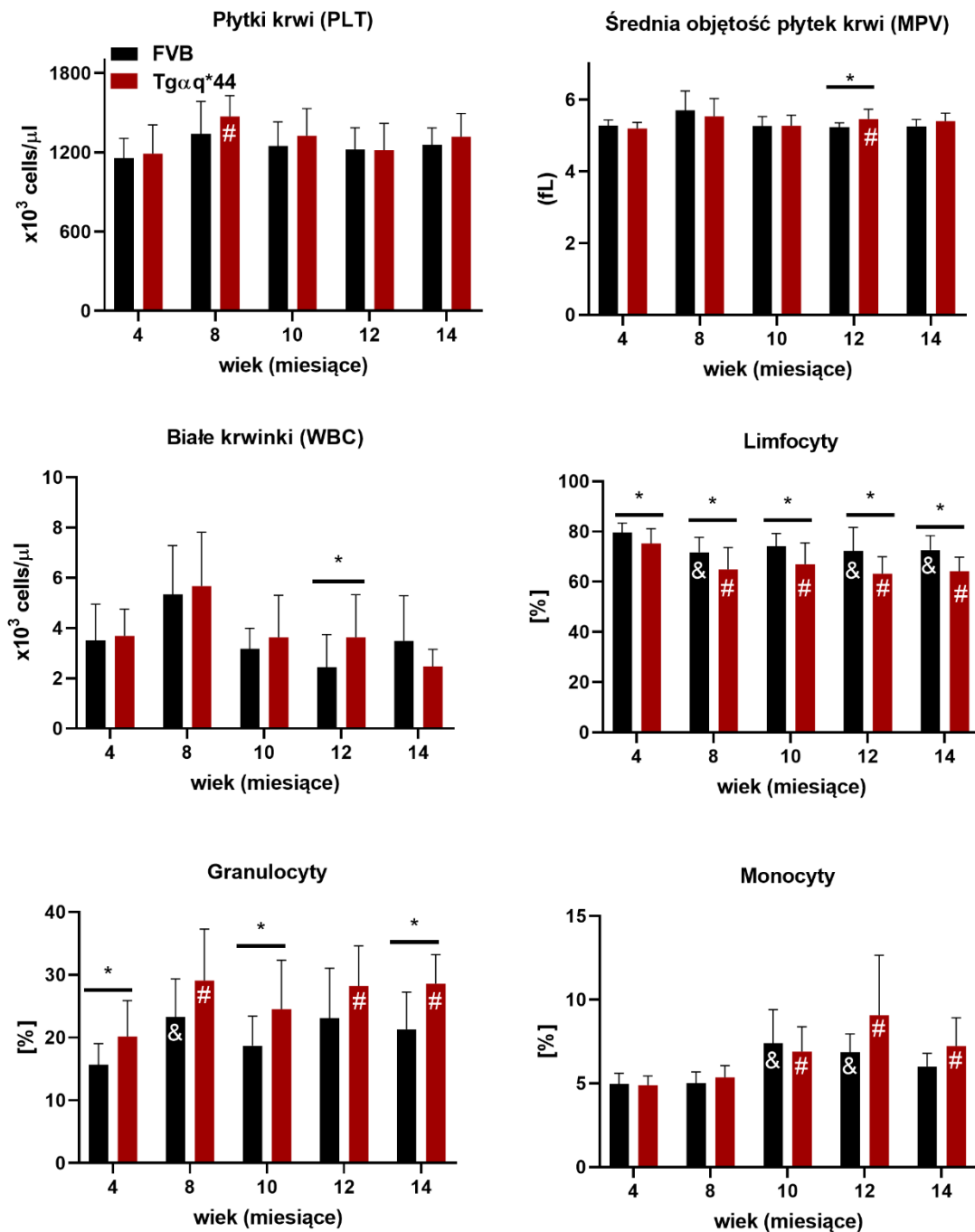
Większość parametrów morfotycznych krwi pozostała na podobnym poziomie u 14-miesięcznych myszy FVB w porównaniu do 4-miesięcznych myszy FVB. Jedynie liczba limfocytów (wyrażona jako % wszystkich leukocytów) u myszy FVB w wieku 14 miesięcy była niższa w porównaniu do myszy FVB w wieku 4 miesięcy (**Ryc. 35 a, 35 b**).

Większość parametrów morfotycznych krwi pozostała na podobnym poziomie u 14-miesięcznych myszy Tgαq*44 w porównaniu do 4-miesięcznych myszy Tgαq*44. Jedynie wartość RDW, liczba granulocytów (wyrażona jako % wszystkich leukocytów), liczba monocytów (wyrażona jako % wszystkich leukocytów) były wyższe, a MCH, MCHC, liczba limfocytów (wyrażona jako % wszystkich leukocytów) były niższe w osoczu u 14-miesięcznych myszy Tgαq*44 w porównaniu do myszy Tgαq*44 w wieku 4 miesięcy (**Ryc. 35 a, 35 b**).

Podsumowując, proces starzenia się serca myszy FVB spowodował jedynie spadek liczby limfocytów (wyrażony jako % wszystkich leukocytów) w osoczu, w wieku 14 miesięcy. Natomiast rozwój niewydolności serca u myszy Tgαq*44 spowodował zmianę wielu parametrów morfotycznych krwi takich jak: RDW, MCV, MCH, MCHC, liczbę limfocytów (wyrażonej jako % wszystkich leukocytów), liczbę granulocytów (wyrażonej jako % wszystkich leukocytów). Wydaje się, że liczba limfocytów (wyrażona jako % wszystkich leukocytów) w krwi myszy Tgαq*44 mogłyby być wczesną oznaką ogólnoustrojowych procesów starzenia się organizmu, gdyż względna liczba limfocytów u 4-miesięcznych myszy Tgαq*44 była obniżona i była na podobnym poziomie, jak u 14-miesięcznych myszy FVB.



Ryc. 35a Obraz morfologii krwi w trakcie starzenia się myszy FVB oraz w toku rozwoju niewydolności serca myszy Tg α q*44. Dalsza część ryciny oraz opis na następnej stronie.



Ryc. 35b Obraz morfologii krwi w trakcie starzenia się myszy FVB oraz w toku rozwoju niewydolności serca myszy Tg α q*44. Dane przedstawiono jako średnia arytmetyczna $\pm$ odchylenie standardowe od średniej. * $P < 0.05$ dla Tg α q*44 vs. FVB (test t-Studenta lub Manna-Whitneya), # $P < 0.05$ dla myszy Tg α q*44 w określonym wieku vs. 4-miesięczne myszy Tg α q*44, & $P < 0.05$ dla myszy FVB w określonym wieku vs. 4-miesięczne myszy FVB (jednoczynnikowa ANOVA lub test Kruskala-Wallis); n = 7-42.

4.5 Wprowadzenie do opisu wyników zmian transkryptomów serc starzejących się myszy FVB oraz transkryptomów serc myszy Tgaq*44 w toku rozwoju niewydolności mięśnia sercowego

W pierwszej części doktoratu poszukiwano wyznaczników starzejącego się serca u 14-miesięcznych myszy FVB, a następnie poszukiwano ich obecności w trakcie rozwoju niewydolności serca u myszy Tgaq*44. Na tej podstawie stwierdzono, że objawy starzenia myszy FVB prowadzą do upośledzenia rozkurczowej funkcji serca, która może być związana ze zwiększonym procesem włóknienia śródmiąższowego i okołokapilarnego, a mechanizmy tych procesów nie są związane ze znanymi mechanizmami progresji niewydolności serca takimi jak aktywacja ACE i produkcja aldosteronu.

Postawiono tezę, że u 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 może dochodzić do procesu przedwczesnego starzenia się serca, o czym mogą świadczyć zwiększone włóknienie śródmiąższowe i okołokapilarne. W poszukiwaniu lepszego zrozumienia procesów starzenia się serca i rozwoju niewydolności serca przeprowadzono analizę transkryptomiczną serc starzejących się myszy FVB oraz myszy Tgaq*44 na różnych etapach rozwoju niewydolności serca.

Aby odpowiedzieć na pytanie jaki wpływ na zmiany w transkryptomie serca ma proces starzenia, niewydolność serca oraz jak wygląda wpływ niewydolności serca na proces starzenia wykonano szereg różnych analiz bioinformatycznych wyników pochodzących z transkryptomów serc myszy FVB i Tgaq*44 w wieku 4, 8, 10, 12, 14 miesięcy.

Analiza PCA wariancji ekspresji 16 367 genów we wszystkich grupach wiekowych myszy FVB i Tgaq*44 umożliwiła całościowe zobrazowanie zmian zachodzących w transkryptomach serc myszy FVB w czasie starzenia się zdrowego serca oraz w transkryptomach serc myszy Tgaq*44 w czasie rozwoju niewydolności serca wraz z procesem starzenia. Zmiany w profilu ekspresji genów w transkryptomach serc myszy Tgaq*44 w porównaniu do myszy FVB w wieku 4-14 miesięcy pozwoliły zobrazować wpływ niewydolności serca na zmiany w transkryptomie serca myszy Tgaq*44 na poszczególnych etapach niewydolności serca (**Rozdz. 4.5.1**).

Wykonano analizę różnicową ekspresji wśród 16 367 genów, które zostały zmapowane do referencyjnego genomu myszy. Porównano transkryptomy serc myszy FVB lub Tgaq*44 w ramach jednego szczepu w różnym wieku (8, 10, 12, 14 miesięcy) do 4-miesięcznych myszy odpowiedniego szczepu (**analiza FVB vs. FVB, analiza Tgaq*44 vs. Tgaq*44**, odpowiednio) oraz porównano transkryptomy serc myszy Tgaq*44 do myszy FVB w tym samym wieku 4, 8, 10, 12 oraz 14 miesięcy (**analiza Tgaq*44 vs. FVB, rozdz. 4.5.2**).

Analiza FVB vs. FVB umożliwiła wyłonienie genów w transkryptomie serca zaangażowanych w proces starzenia się biologicznego serca myszy FVB.

Analiza Tgaq*44 vs. Tgaq*44 umożliwiła wyłonienie genów w transkryptomie serca, których ekspresja była silnie zmieniona w wyniku rozwoju niewydolności serca w trakcie procesu starzenia biologicznego myszy Tgaq*44.

Analiza Tgaq*44 vs. FVB umożliwiła wyłonienie genów w transkryptomie serca różnicujących te szczepy myszy, głównie z powodu rozwoju niewydolności serca, jak i wpływu niewydolności serca na proces starzenia biologicznego w sercach myszy Tgaq*44. Procesy starzenia chronologicznego zachodzą bowiem jednakowo u myszy Tgaq*44 i FVB.

Porównanie liczby genów spełniających założone kryteria dla różnicowej ekspresji w powyższych analizach umożliwiło określenie siły zachodzących zmian w transkryptomach serc myszy Tgaq*44 i FVB (**Rozdz. 4.5.2**). Aby zobrazować ilościowe zmiany w procesach biologicznych w analizach FVB vs. FVB, Tgaq*44 vs. Tgaq*44, Tgaq*44 vs. FVB, geny wyłonione w powyższych analizach, które spełniły założone kryteria dla różnicowej ekspresji zostały przyporządkowane do procesów biologicznych na podstawie bazy Gene Ontology (**Rozdz. 4.5.3**).

Wskazano geny, które spełniają założone kryteria dla różnicowej ekspresji zarówno w transkryptomach serc starzejących się 14-miesięcznych myszy FVB oraz w którejś ze wcześniejszych grup wiekowych myszy FVB (8-, 10-, 12-miesięcznych) w analizie FVB vs. FVB (nazwano je „*genami starzenia*” się serca - 481 geny, **rozdz. 4.5.4, ryc. 40 A**). Wskazano również geny, które spełniają założone kryteria dla różnicowej ekspresji dopiero w transkryptomach serc starzejących się 14-miesięcznych myszy FVB (nazwano je „*genami starego serca*” - 454 geny, **ryc. 40 A**). Były to geny, które spełniły założone kryteria dla różnicowej ekspresji w transkryptomach serc 14-miesięcznych myszy FVB w analizie FVB vs. FVB (**Ryc. 37 A**), ale nie zawierają „*genów starzenia*” się serca (**Ryc. 40 A**). Analogicznie w przypadku nadreprezentatywnych procesów biologicznych z bazy Gene Ontology, procesy które były uruchamiane w transkryptomach serc 14-miesięcznych myszy FVB oraz w którejś ze wcześniejszych grup wiekowych myszy FVB (8-, 10-, 12-miesięcznych) w analizie FVB vs. FVB nazwano „*procesami starzenia*” się serca (55 nadreprezentatywnych procesów biologicznych, **rozdz. 4.5.3, ryc. 39 A**), natomiast dopiero uruchamiane w transkryptomach serc 14-miesięcznych myszy FVB nazwano „*procesami starego serca*” (56 nadreprezentatywnych procesów biologicznych, **ryc. 39 A**).

W celu zobrazowania przebiegu procesu starzenia się serca u myszy FVB oraz starzenia się serca w toku rozwoju niewydolności serca u myszy Tgaq*44 wykonano analizę PCA

wariancji ekspresji genów w transkryptomach serc 4-, 8-, 10-, 12-, 14-miesięcznych myszy FVB i Tgaq*44 obejmującą wyłącznie 454 „*geny starego serca*” i 481 „*genów starzenia*” się serca (czyli łącznie 935 geny, **rozdz. 4.5.4, ryc. 40 B**). Zbadano ilościowy udział „*genów starego serca*” i „*genów starzenia*” się serca wśród wszystkich genów spełniających założone kryteria dla różnicowej ekspresji, w poszczególnych grupach wiekowych myszy w analizach FVB vs. FVB oraz Tgaq*44 vs. Tgaq*44 (**Ryc. 41 A**). Ta analiza miała na celu określenie wpływu genów zaangażowanych w proces starzenia się serca w obserwowane zmiany w transkryptomach serc myszy FVB i Tgaq*44 w przeprowadzonych analizach. Zbadano również ilościowy udział „*genów starego serca*” i „*genów starzenia*” się serca wśród wszystkich genów spełniających założone kryteria dla różnicowej ekspresji w poszczególnych grupach wiekowych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB (**Ryc. 41 B**). Ta analiza pozwoliła na wskazanie udziału genów związanych z procesem starzenia się serca oraz tych związanych z rozwojem niewydolności serca w różnicowanie transkryptomów serc myszy Tgaq*44 od myszy FVB.

Następnie, aby wskazać „*geny starego serca*” oraz „*geny starzenia*” się serca, których ekspresja była istotnie zmieniona w sercach myszy Tgaq*44 od wczesnego aż do końcowego etapu niewydolności serca, sprawdzono ile spośród tych genów spełniło założone kryteria dla różnicowej ekspresji we wszystkich grupach wiekowych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB (**Ryc. 42 B, C**). Wykonano analogiczną analizę dla nadreprezentatywnych procesów biologicznych na podstawie bazy Gene Ontology, aby wskazać które „*procesy starego serca*” i „*procesy starzenia*” się serca były uruchamiane w sercach myszy Tgaq*44 od wczesnego aż do końcowego etapu niewydolności serca (**Rozdz. 4.5.3, tabela 4**).

W każdej grupie wiekowej myszy w analizach FVB vs. FVB (**Rozdz. 4.5.5, tabela 7**), Tgaq*44 vs. Tgaq*44 (**Rozdz. 4.5.6, tabela 9**), Tgaq*44 vs. FVB (**Rozdz. 4.5.7, tabela 10**) wyselekcjonowano po 10 genów, których wartość różnicowej ekspresji była najwyższa i najniższa. Spośród tak wyselekcjonowanych genów wyłoniono te, które wystąpiły w przeprowadzonych porównaniach dla ≥ 2 grup wiekowych myszy i założono, że mają one znaczący udział w starzeniu się serca lub rozwoju niewydolności serca lub różnicowaniu transkryptomów serc myszy Tgaq*44 od FVB. Kolejno dla wyselekcjonowanych genów w wyżej wymieniony sposób w analizie Tgaq*44 vs. FVB (tj. 20 genów, **rozdz. 4.5.7, tabela 10**) sprawdzono w jakich grupach wiekowych myszy w analizach FVB vs. FVB, Tgaq*44 vs. Tgaq*44, Tgaq*44 vs. FVB te wyselekcjonowane geny spełniają założone kryteria dla różnicowej ekspresji (**Rozdz. 4.5.8, tabela 11**). Uznano, iż wśród tak wyselekcjonowanych genów geny, które:

1.) spełniły założone kryteria dla różnicowej ekspresji jednocześnie w trzech grupach wiekowych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB i w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44

oraz

2.) nie spełniły założonych kryteriów dla różnicowej ekspresji w żadnej grupie wiekowej myszy FVB lub spełniły tylko w jednej grupie wiekowej myszy FVB (z wykluczeniem 14-miesięcznych myszy) w analizie FVB vs. FVB

są ważnymi „*genami niewydolności serca*” (**Rozdz. 4.5.8, tabela 11**).

W kolejnym etapie analizy wskazano grupy genów charakterystyczne na danych etapach niewydolności serca myszy Tgaq*44 (**Rozdz. 4.5.9, tabela 13**). W tym celu w analizie Tgaq*44 vs. FVB wyselekcjonowano po 10 genów, których wartość różnicowej ekspresji w łącznej analizie była najwyższa lub najniższa w grupach wiekowych myszy: od wczesnego do końcowego etapu niewydolności serca (4-14-miesięczne myszy); od przejściowego do końcowego etapu niewydolności serca, ale nie na wczesnym etapie tej choroby (8-14-miesięczne myszy, ale nie 4-miesięczne myszy); jedynie w końcowych miesiącach życia myszy Tgaq*44 obejmujących głównie końcowy etap niewydolności serca (10-14-miesięczne myszy, ale nie 4- i 8-miesięczne myszy, **tabela 13**).

W celu wskazania potencjalnie nowych markerów genetycznych określonych etapów niewydolności serca, sprawdzono czy wśród genów charakterystycznych na danych etapach niewydolności serca myszy Tgaq*44 znajdują się wytypowane wcześniej „*geny niewydolności serca*” (**Tabela 13**).

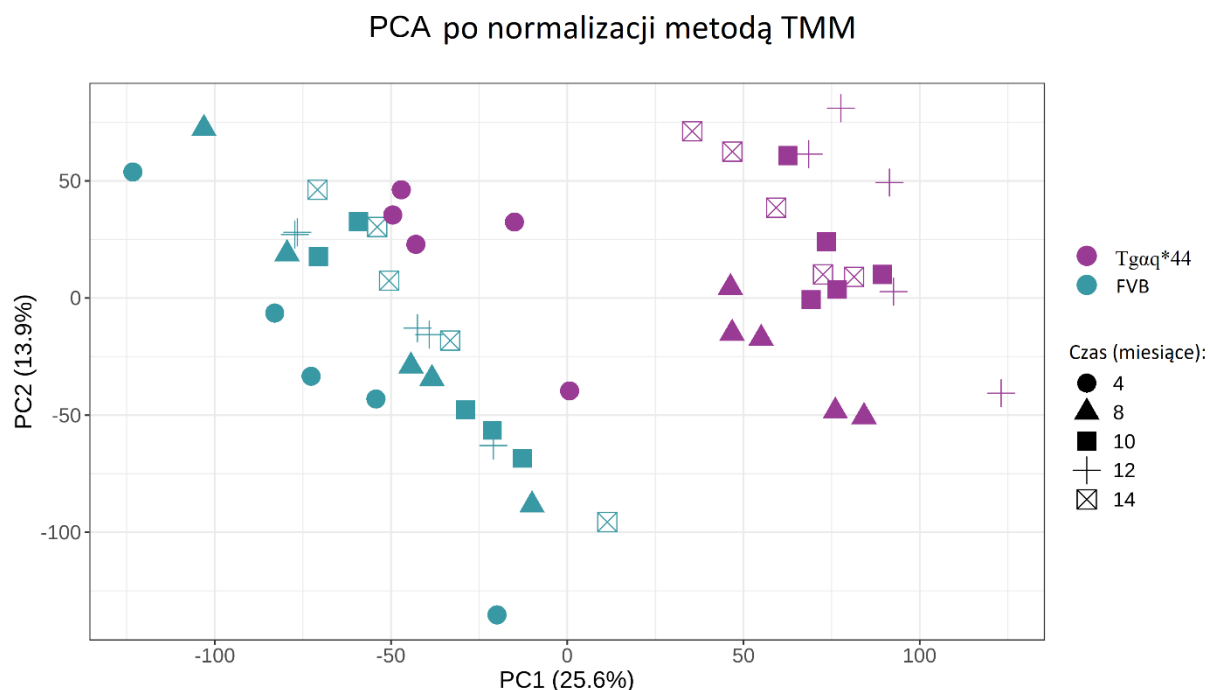
Podsumowując, szeroka analiza transkryptomów serc przeprowadzona w 3 typach porównań (FVB vs. FVB, Tgaq*44 vs. Tgaq*44, Tgaq*44 vs. FVB) pozwoliła na lepsze zrozumienie zachodzących zmian w sercach myszy Tgaq*44 i FVB, w tym na określenie udziału zidentyfikowanych genów, w procesie starzenia się serca i niewydolności serca oraz określenie wpływu niewydolności serca na proces starzenia się serca. Analiza ekspresji genów w toku starzenia się serca umożliwiła wyselekcjonować geny, które były zaangażowane w proces starzenia się serca oraz geny, które były charakterystyczne dla transkryptomu starego serca. Analiza ekspresji genów w toku rozwoju niewydolności serca umożliwiła wyselekcjonować geny, które były charakterystyczne dla poszczególnych etapów niewydolności serca, a nie tylko dla końcowego etapu niewydolności serca. Najważniejsze i oryginalne osiągnięcie tej pracy jest takie, że wykorzystanie tych różnych wyżej wymienionych analiz umożliwiło wskazanie „*genów starego serca*” i „*genów starzenia*” się serca istotnie zmienionych przez niewydolność serca (tj. w kierunku aktywacji lub supresji), w szczególności na wczesnym i na końcowym etapie jej rozwoju. W końcu, jednoczesne wykorzystanie

informacji płynących z 3 typów porównań (FVB vs. FVB, Tgaq*44 vs. Tgaq*44, Tgaq*44 vs. FVB) pozwoliło wskazać „*geny niewydolności serca*” oraz potencjalne markery genetyczne określonych etapów niewydolności serca.

4.5.1 Zmiany w transkryptomie serca myszy Tgaq*44 w toku rozwoju niewydolności serca w porównaniu do zmian w transkryptomie starzejącego się serca myszy FVB

Aby zobrazować globalne zmiany transkryptomu serca i porównać profil zmian ekspresji genów niewydolnego serca myszy Tgaq*44, i zdrowego starzejącego się serca myszy FVB wykonano analizę PCA wariancji ekspresji 16 367 genów, które spełniły kryteria dopasowania sekwencji do referencyjnego genomu myszy w wieku 4, 8, 10, 12, 14 miesięcy (**Ryc. 36**). Analiza PCA wykazała wyraźną różnicę w profilu ekspresji transkryptomu serc myszy Tgaq*44 w porównaniu do serc myszy FVB. Intrigujące jednak było, że profil ekspresji transkryptomu serc 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 był zbliżony do profilu ekspresji transkryptomu serc 14-miesięcznych myszy FVB. Zmiany w profilu ekspresji transkryptomu serc myszy w wieku 14 miesięcy w porównaniu do myszy 4-miesięcznych były większe w sercach myszy Tgaq*44 niż FVB. Szczególnie wyraźnie widać było postępujące zmiany z wiekiem od 4 do 10 miesiąca życia myszy Tgaq*44. Natomiast, profil ekspresji transkryptomu serc 10-, 12- i 14-miesięcznych myszy Tgaq*44 był bardzo zbliżony do siebie pomimo progresji niewydolności serca.

Podsumowując, zaskakującą obserwacją był zbliżony profil ekspresji transkryptomu serc 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 do profilu ekspresji transkryptomu serc 14-miesięcznych myszy FVB, co może świadczyć o tym, że serca 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 odzwierciedlają w pewnym zakresie transkryptom starzejącego się serca, tym samym wskazując na przyspieszony proces starzenia w sercach myszy Tgaq*44.



Ryc. 36 Profil wariancji ekspresji genów w transkryptomach serc myszy Tgaq*44 oraz FVB. Analiza PCA; każdy punkt reprezentuje uśrednioną wariancję ekspresji 16 367 genów dla pojedynczej myszy.

4.5.2 Zmiany w ilości genów spełniających założone kryteria dla różnicowej ekspresji w analizach FVB vs. FVB, Tgaq*44 vs. Tgaq*44 oraz Tgaq*44 vs. FVB

Dla lepszego zrozumienia zachodzących zmian w liczbie genów spełniających założone kryteria dla różnicowej ekspresji w transkryptomach serc myszy FVB i Tgaq*44 od 8 do 14 miesiąca życia porównano u tych szczepów myszy transkryptomy serc starszych myszy z transkryptomem serc 4-miesięcznych myszy odpowiedniego szczepu (**Ryc. 37 A, B**).

Najsilniejszy wzrost liczby DEGów (DEGs – *ang. differentially expressed genes*) nastąpił w transkryptomach serc 12-14-miesięcznych myszy FVB w analizie FVB vs. FVB (**Ryc. 37 A**). Liczba DEGów w transkryptomach serc u 14-miesięcznych myszy FVB wyniosła 935, a u 12-miesięcznych myszy FVB wyniosła 259 (wzrost o 676 DEGów, **ryc. 37 A**).

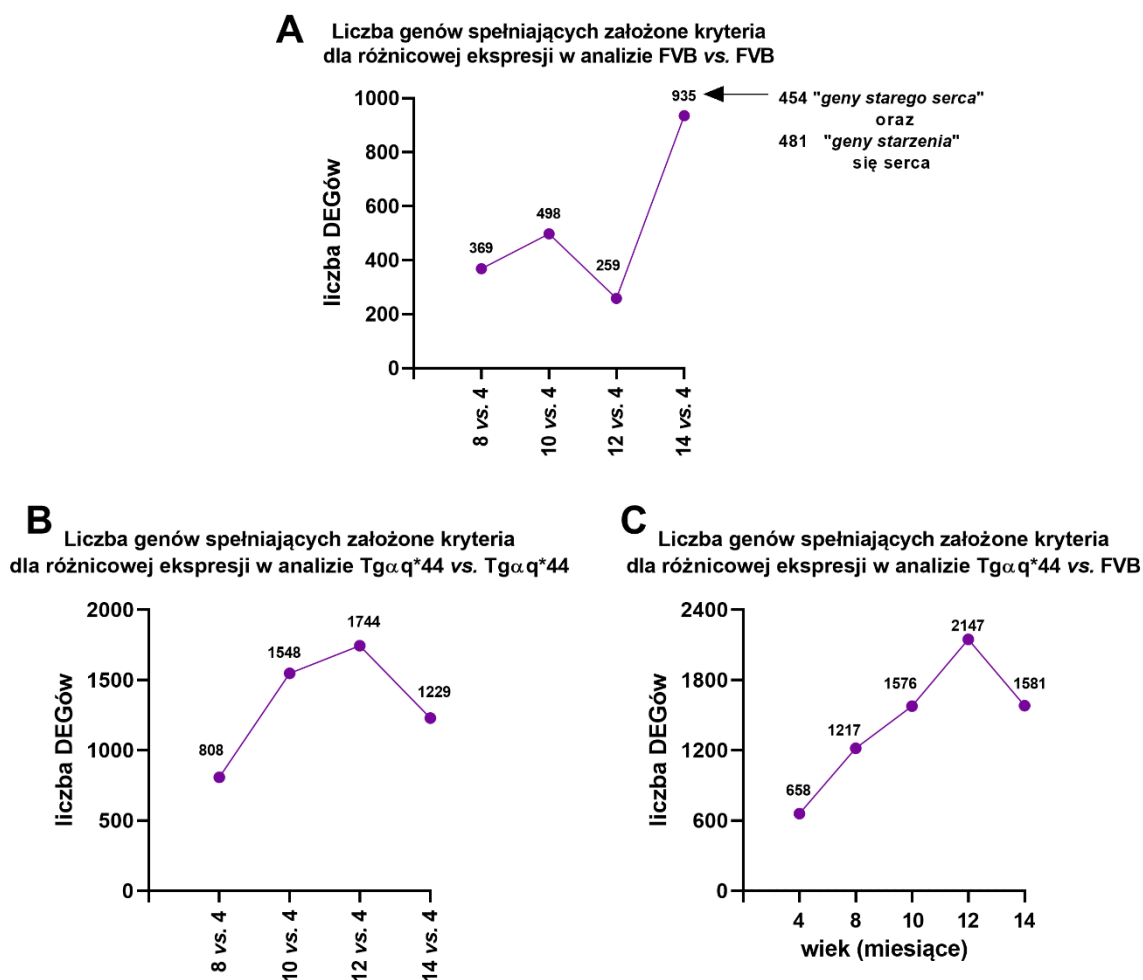
Najsilniejszy wzrost liczby DEGów nastąpił w transkryptomach serc 8-10-miesięcznych myszy Tgaq*44 w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44 (**Ryc. 37 B**). Liczba DEGów w transkryptomach serc u 10-miesięcznych myszy Tgaq*44 wyniosła 1548, a u 8-miesięcznych myszy Tgaq*44 wyniosła 808 (wzrost o 740 DEGów, **ryc. 37 B**). Jednak, największa liczba DEGów w transkryptomach serc wystąpiła u 12-miesięcznych myszy Tgaq*44 (1744 DEGów, **ryc. 37 B**) i była niższa u 14-miesięcznych myszy Tgaq*44 w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44 (1229 DEGów, **ryc. 37 B**).

Porównano również ze sobą transkryptomy serc 4-14-miesięcznych myszy Tgaq*44 z transkryptomiami serc 4-14-miesięcznych myszy FVB, aby przedstawić liczbę genów różnicujących te szczepy myszy (**Ryc. 37 C**). W grupie 4-miesięcznych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB już 658 genów spełniło założone kryteria dla różnicowej ekspresji i liczba ta stopniowo wzrosła aż do 2147 DEGów w grupie 12-miesięcznych myszy (**Ryc. 37 C**). Zaskakująco, porównanie transkryptomów serc 14-miesięcznych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB wykazało spadek liczby DEGów do 1581 (**Ryc. 37 C**).

Pomimo tego, iż już 658 genów różnicowało transkryptomy serc 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 od FVB (**Ryc. 37 C**), to liczba genów spełniających założone kryteria dla różnicowej ekspresji w transkryptomach serc 8-14-miesięcznych myszy Tgaq*44 w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44 (**Ryc. 37 B**) była dalej większa niż w transkryptomach serc 8-14-miesięcznych myszy FVB w analizie FVB vs. FVB (**Ryc. 37 A**). Liczba genów spełniających założone kryteria dla różnicowej ekspresji w transkryptomach serc 8-miesięcznych myszy Tgaq*44 w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44 (808 DEGów, **ryc. 37 B**) była wyższa niż u 8-miesięcznych myszy FVB (369 DEGów, **ryc. 37 A**), ale zbliżona do transkryptomów serc 14-miesięcznych myszy FVB w analizie FVB vs. FVB (935 DEGów, **ryc. 37 A**).

Podsumowując, na podstawie przeprowadzonych analiz można sądzić, że najistotniejsze zmiany w transkrypcie serca wynikające z niewydolności serca dokonują się u 4-10-miesięcznych myszy Tgaq*44, natomiast najistotniejsze zmiany w transkrypcie serca wynikające ze starzenia się serca dokonują się u 12-14-miesięcznych myszy FVB.

Warto dodać, że transkryptomy serc 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 znacząco różniły się od transkryptomów serc 4-miesięcznych myszy FVB potwierdzając rozwój niewydolności serca u myszy Tgaq*44 już w wieku 4 miesięcy w wyniku modyfikacji genetycznej. Rozwijająca się z wiekiem progresja niewydolności serca u myszy Tgaq*44 spowodowała liczniejsze zmiany w transkrypcie serca myszy Tgaq*44, niż proces starzenia się zdrowego serca w transkrypcie serca myszy FVB. Co najważniejsze, uzyskane wyniki sugerują również wcześniejszą aktywację starzenia się serca w transkrypcie serca myszy Tgaq*44.



Ryc. 37 Zmiany w liczbie genów spełniających założone kryteria dla różnicowej ekspresji w poszczególnych grupach wiekowych myszy w analizach FVB vs. FVB (A), Tgaq*44 vs. Tgaq*44 (B), Tgaq*44 vs. FVB (C).

4.5.3 Zmiany w ilości nadreprezentatywnych procesów biologicznych w analizach FVB vs. FVB, Tgaq*44 vs. Tgaq*44, Tgaq*44 vs. FVB

Liczba nadreprezentatywnych procesów biologicznych w transkryptomach serc 8-miesięcznych myszy FVB wyniosła 60 i wzrosła do 111 u 14-miesięcznych myszy FVB w analizie FVB vs. FVB (**Ryc. 38 A**). Najsilniejszy wzrost nadreprezentatywnych procesów biologicznych nastąpił u 12-14-miesięcznych myszy FVB w analizie FVB vs. FVB. Liczba nadreprezentatywnych procesów biologicznych w transkryptomach serc u 14-miesięcznych myszy FVB wyniosła 111, a u 12-miesięcznych myszy FVB wyniosła 2 (wzrost o 99 procesów biologicznych, **Ryc. 38 A**).

Liczba nadreprezentatywnych procesów biologicznych w transkryptomach serc 8-miesięcznych myszy Tgaq*44 wyniosła 32 i wzrosła do 144 u 14-miesięcznych myszy Tgaq*44 w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44 (**ryc. 38 B**). Najsilniejszy wzrost liczby nadreprezentatywnych procesów biologicznych nastąpił u 8-10-miesięcznych myszy Tgaq*44

w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44. Liczba nadreprezentatywnych procesów biologicznych, w transkryptomach serc u 10-miesięcznych myszy Tgaq*44 wyniosła 96, a u 8-miesięcznych myszy Tgaq*44 wyniosła 32 (wzrost o 64 procesy biologiczne, **Ryc. 38 B**).

W grupie 4-miesięcznych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB wystąpiły już 134 nadreprezentatywne procesy biologiczne, a w grupie 8-miesięcznych myszy była ich największa liczba (197 nadreprezentatywne procesy biologiczne, **ryc. 38 C**).

Liczba nadreprezentatywnych procesów biologicznych w transkryptomach serc 8-14-miesięcznych myszy FVB w analizie FVB vs. FVB (**Ryc. 38 A**) była mniejsza niż w transkryptomach serc 8-14-miesięcznych myszy Tgaq*44 w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44 (**Ryc. 38 B**).

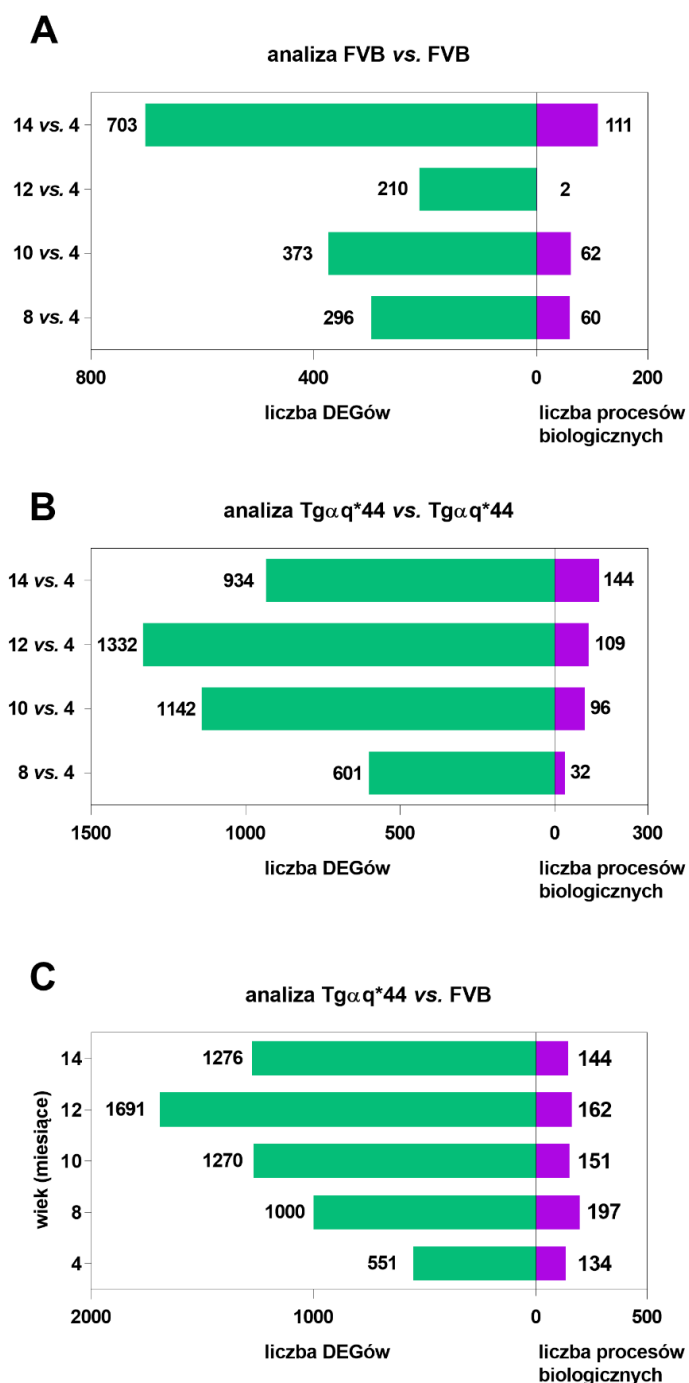
Profil liczby nadreprezentatywnych procesów biologicznych był podobny do profilu liczby genów spełniających założone kryteria dla różnicowej ekspresji w analizie FVB vs. FVB (**Ryc. 37 A, 38 A**). Natomiast różnił się w przypadku analizy Tgaq*44 vs. Tgaq*44 (**Ryc. 37 B, 38 B**) i Tgaq*44 vs. FVB (**Ryc. 37 C, 38 C**). Z kolei, profil liczby nadreprezentatywnych procesów biologicznych w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44 (**Ryc. 38 B**) różnił się w porównaniu do profilu liczby nadreprezentatywnych procesów biologicznych w analizie Tgaq*44 vs. FVB (**Ryc. 38 C**).

Spośród 111 nadreprezentatywnych procesów biologicznych w transkryptomach serc 14-miesięcznych myszy FVB w analizie FVB vs. FVB (składających się z 56 „procesów starego serca” oraz 55 „procesów starzenia” się serca, **ryc. 38 A, 39 A**) aż połowa, czyli 56 nadreprezentatywnych procesów biologicznych pojawiło się dopiero u 14-miesięcznych myszy FVB (stanowiących „procesy starego serca”, **ryc. 39 A**) i nie pojawiło się we wcześniejszych miesiącach życia myszy FVB.

Prawie dwie trzecie (90 nadreprezentatywnych procesów biologicznych, **ryc. 39 B**) spośród 144 nadreprezentatywnych procesów biologicznych w transkryptomach serc 14-miesięcznych myszy Tgaq*44 w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44 (**ryc. 38 B**) wystąpiło u 14-miesięcznych myszy Tgaq*44 oraz w co najmniej jednej z młodszych grup wiekowych myszy Tgaq*44. Natomiast 54 nadreprezentatywne procesy biologiczne wystąpiły dopiero w transkryptomach serc 14-miesięcznych myszy Tgaq*44 (**ryc. 39 B**).

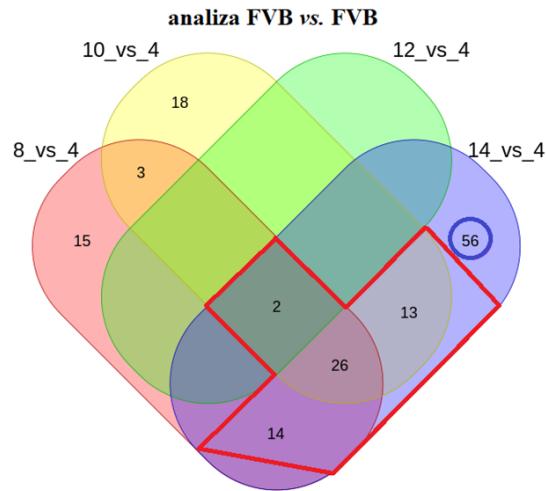
Wśród 26 nadreprezentatywnych procesów biologicznych występujących w transkryptomach serc w każdej grupie wiekowej 4-14-miesięcznych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB (**Ryc. 39 C**) znalazło się tylko 8 „procesów starzenia” się serca (tzn. nadreprezentatywnych procesów biologicznych występujących w transkryptomach serc 14-miesięcznych myszy FVB i w co najmniej w jednej z młodszych grup wiekowych myszy FVB,

tabela 4, ryc. 39 A), natomiast nie było wśród nich żadnego „procesu starego serca” (tzn. nadreprezentatywnych procesów biologicznych występujących dopiero w transkryptomach serc 14-miesięcznych myszy FVB, **ryc. 39 A**).

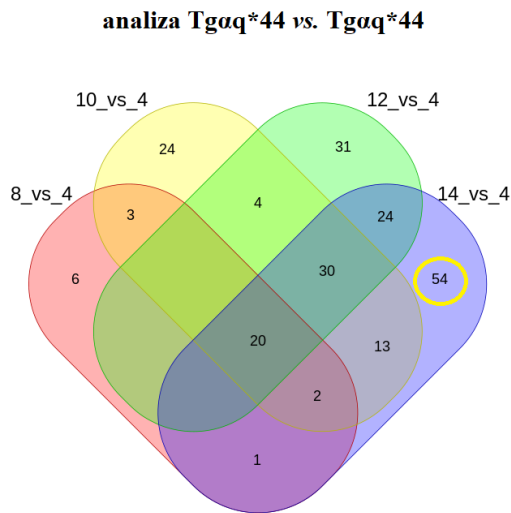


Ryc. 38 Zmiany ilości nadreprezentatywnych procesów biologicznych w poszczególnych grupach wiekowych myszy w analizach FVB vs. FVB, Tgαq*44 vs. Tgαq*44, Tgαq*44 vs. FVB. Liczba nadreprezentatywnych procesów biologicznych (wraz z przyporządkowaną do nich liczbą DEGów) w analizach FVB vs. FVB (**A**), Tgαq*44 vs. Tgαq*44 (**B**), Tgαq*44 vs. FVB (**C**).

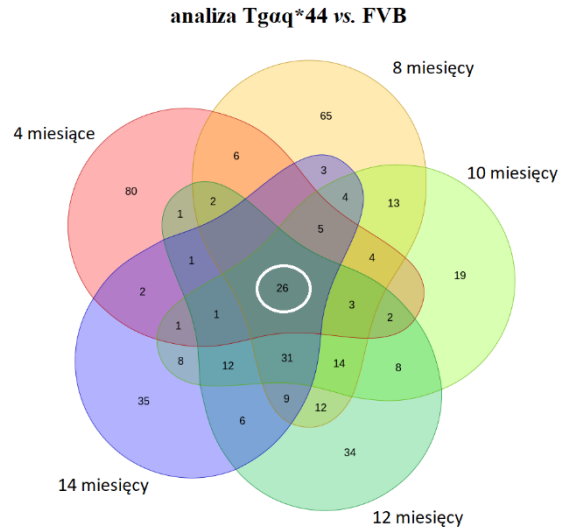
A



B



C



Ryc. 39 Liczba nadreprezentatywnych procesów biologicznych w poszczególnych grupach wiekowych myszy w analizach FVB vs. FVB, Tgaq*44 vs. Tgaq*44, Tgaq*44 vs. FVB. Venn diagramy przedstawiające liczbę nadreprezentatywnych procesów biologicznych w poszczególnych grupach wiekowych myszy w analizach: FVB vs. FVB (w granatowym okręgu przedstawiono 56 nadreprezentatywnych procesów biologicznych występujących dopiero w transkryptomach serc 14-miesięcznych myszy FVB – tzw. „*procesy starego serca*”; w czerwonym wielokącie przedstawiono 55 nadreprezentatywnych procesów biologicznych występujących w transkryptomach serc 14-miesięcznych myszy FVB oraz w którejs ze wcześniejszych grup wiekowych myszy FVB (8-, 10-, 12-miesięcznych) – tzw. „*procesy starzenia*” się serca)(A), Tgaq*44 vs. Tgaq*44 (w żółtym okręgu przedstawiono 54 nadreprezentatywne procesy biologiczne występujące dopiero w transkryptomie serc 14-miesięcznych myszy Tgaq*44)(B), Tgaq*44 vs. FVB (w białym okręgu przedstawiono 26 nadreprezentatywnych procesów biologicznych występujących w sercach myszy Tgaq*44 od wczesnego aż do końcowego etapu niewydolności serca, tzn. występujące procesy w każdej grupie wiekowej 4-14-miesięcznych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB)(C).

Podsumowując, dynamika zmian liczby nadreprezentatywnych procesów biologicznych wykazała, że proces starzenia się serca myszy FVB uległ gwałtownemu nasileniu w sercach 14-miesięcznych myszy FVB. Większa liczba nadreprezentatywnych procesów biologicznych, która była uruchomiona w transkryptomach serc 14-miesięcznych myszy Tgaq*44 była uruchomiona również we wcześniejszych miesiącach życia myszy Tgaq*44 w odróżnieniu do nadreprezentatywnych procesów biologicznych w transkryptomach serc myszy FVB, co świadczy o tym, że niewydolność serca spowodowała wcześniejsze uruchomienie szeregu procesów biologicznych, które występowały również w transkryptomach serc starszych myszy Tgaq*44. Niektóre z nich mogły być związane z przyspieszeniem procesu starzenia się serca myszy Tgaq*44. Ponadto, rozwój niewydolności serca u myszy Tgaq*44 spowodował uruchomienie większej ilości procesów biologicznych niż to miało miejsce w trakcie starzenia się serca u myszy FVB. Interesujący jest fakt, że pomimo większej liczby DEGów dopasowanych do procesów biologicznych na podstawie bazy Gene Ontology, liczba nadreprezentatywnych procesów biologicznych nie uległa znaczącemu wzrostowi w transkryptomach serc myszy Tgaq*44 w porównaniu do transkryptomów serc myszy FVB sugerując progresywny, coraz silniejszy udział uruchomionych procesów biologicznych angażujący coraz większą liczbę genów w rozwoju niewydolności serca.

Różnice między profilem zmian liczby DEGów, które zostały dopasowane do procesów biologicznych na podstawie bazy Gene Ontology, a profilem zmian liczby nadreprezentatywnych procesów biologicznych w analizach Tgaq*44 vs. Tgaq*44 oraz Tgaq*44 vs. FVB można przypisać temu, że poszczególne geny należą do różnej liczby procesów biologicznych. W związku z tym, wydaje się, że zmiany w liczbie genów spełniających założone kryteria dla różnicowej ekspresji lepiej odzwierciedlają zmiany w transkrypcji serca w trakcie rozwoju niewydolności serca i starzeniu się serca niż zmiany w liczbie nadreprezentatywnych procesów biologicznych.

Analiza nadreprezentatywnych procesów biologicznych różnicujących transkryptomy serc myszy Tgaq*44 od FVB w wieku 4-14 miesięcy potwierdziła, że rozwój niewydolności serca w sercach myszy Tgaq*44 jest związany z nadekspresją białka Gαq, gdyż procesy: „aktywność receptora sprzężonego z białkiem G” oraz „szlak sygnałowy receptora sprzężonego z białkiem G” były uruchomione od wczesnego aż do końcowego etapu niewydolności serca u myszy Tgaq*44. Ponadto, wcześnie aktywowany proces starzenia się serca w sercach myszy Tgaq*44 przez rozwój niewydolności serca był związany ze zmianami w macierzy zewnątrzkomórkowej widoczny na podstawie uruchomienia procesów: „region zewnątrzkomórkowy”, „przestrzeń zewnątrzkomórkowa”.

Uruchomione "procesy starzenia" się serca w grupie 4-14-miesięcznych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB
aktywność receptora sprzężonego z białkiem G
szlak sygnałowy receptora sprzężonego z białkiem G
regulacja aktywności receptorów sygnalizacyjnych
transdukcja sygnału
aktywność cytokin
region zewnątrzkomórkowy
przestrzeń zewnątrzkomórkowa
adhezja komórkowa

Tabela 4 Uruchomione „procesy starzenia” się serca w grupie 4-14-miesięcznych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB. W tabeli zaprezentowano 8 „procesów starzenia” się serca, które stanowiły nadreprezentatywne procesy biologiczne w każdej grupie wiekowej 4-14-miesięcznych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB.

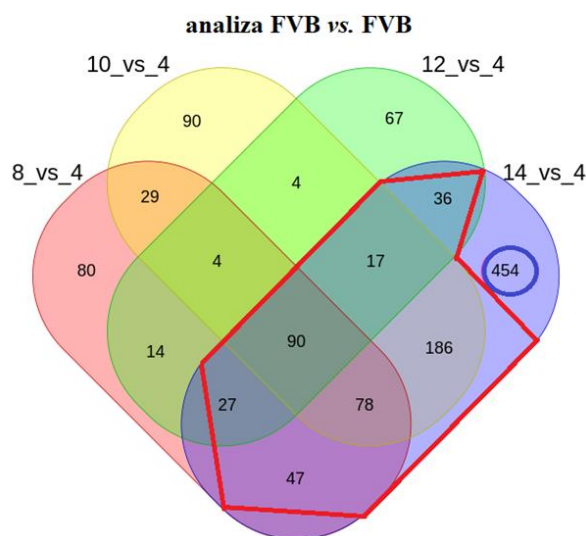
4.5.4 Porównanie procesu starzenia się serca w transkryptomach serc myszy FVB i Tgaq*44

W celu przedstawienia wpływu niewydolności serca na proces starzenia się serca u myszy Tgaq*44 zbadano profil wariancji ekspresji „genów starego serca” oraz „genów starzenia” się serca (935 genów, **ryc. 37 A, 40 B**) w transkryptomach serc 4-14-miesięcznych myszy FVB i Tgaq*44. Sprawdzono również ilościowy udział „genów starego serca” i „genów starzenia” się serca w całkowitej liczbie genów spełniających założone kryteria dla różnicowej ekspresji we wszystkich grupach wiekowych myszy w analizach FVB vs. FVB, Tgaq*44 vs. Tgaq*44, Tgaq*44 vs. FVB (**Ryc. 41 A, B**).

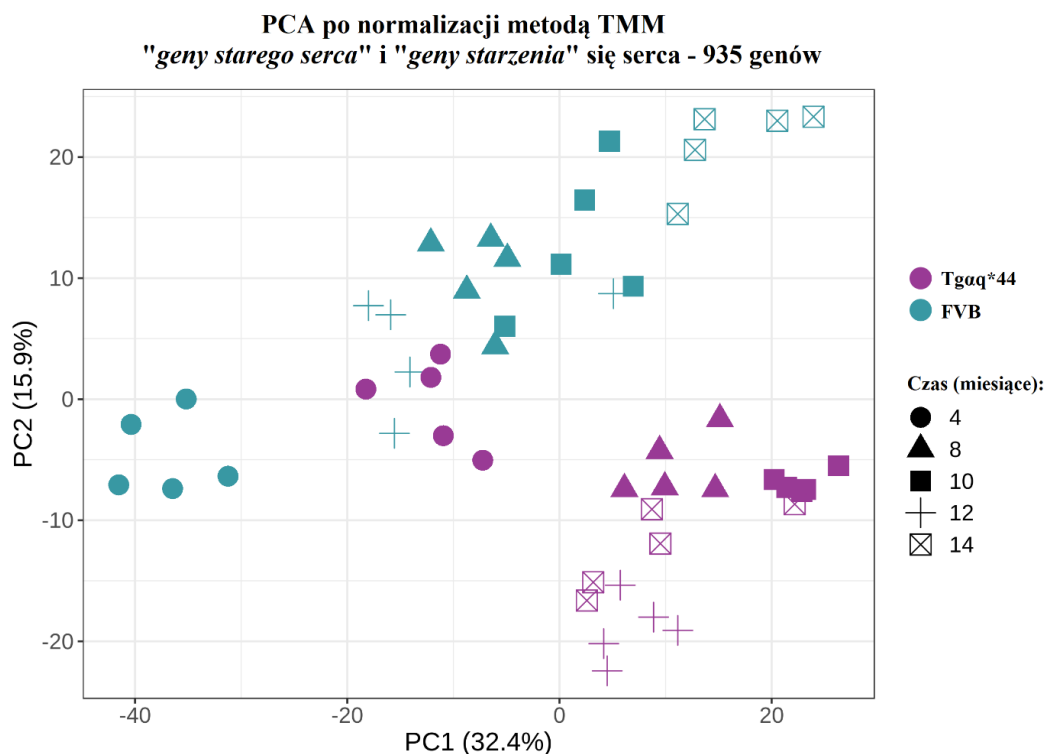
Liczba „genów starego serca” wyniosła 454 geny (**Ryc. 40 A**) i stanowiła prawie połowę genów spełniających założone kryteria dla różnicowej ekspresji w transkryptomach serc 14-miesięcznych myszy FVB w analizie FVB vs. FVB (**Ryc. 37 A**).

Zmiany profilu wariancji ekspresji „genów starego serca” i „genów starzenia” się serca w transkryptomach serc 4-14-miesięcznych myszy Tgaq*44 były mniejsze w porównaniu do zmian profilu wariancji ekspresji tych genów u 4-14-miesięcznych myszy FVB oraz układały się w innym kierunku (**Ryc. 40 B**). Wariancja ekspresji „genów starego serca” i „genów starzenia” się serca w transkryptomach serc 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 była podobna do wariancji ekspresji tych genów u 8-miesięcznych myszy FVB i była wyraźnie oddalona od wariancji ekspresji tych genów u 8-14-miesięcznych myszy Tgaq*44. Interesująco, wariancja ekspresji „genów starego serca” i „genów starzenia” się serca była wyraźnie zgrupowana dla transkryptomów serc 8-, 12-, 14-miesięcznych myszy Tgaq*44 (**Ryc. 40 B**).

A



B



Ryc. 40 Porównanie profilu wariancji ekspresji genów zaangażowanych w proces starzenia się serca w transkryptomach serc myszy FVB i Tgaq*44. Venn diagram przedstawiający liczbę genów spełniających założone kryteria dla różnicowej ekspresji w poszczególnych grupach wiekowych myszy FVB w analizie FVB vs. FVB (w granatowym okręgu - 454 „geny starego serca”; w czerwonym wielokącie – 481 „geny starzenia” się serca)(A). Analiza PCA dla wariancji ekspresji „genów starego serca” i „genów starzenia” się serca (łącznie 935 genów) w transkryptomach serc 4-14-miesięcznych myszy Tgaq*44 i FVB (B).

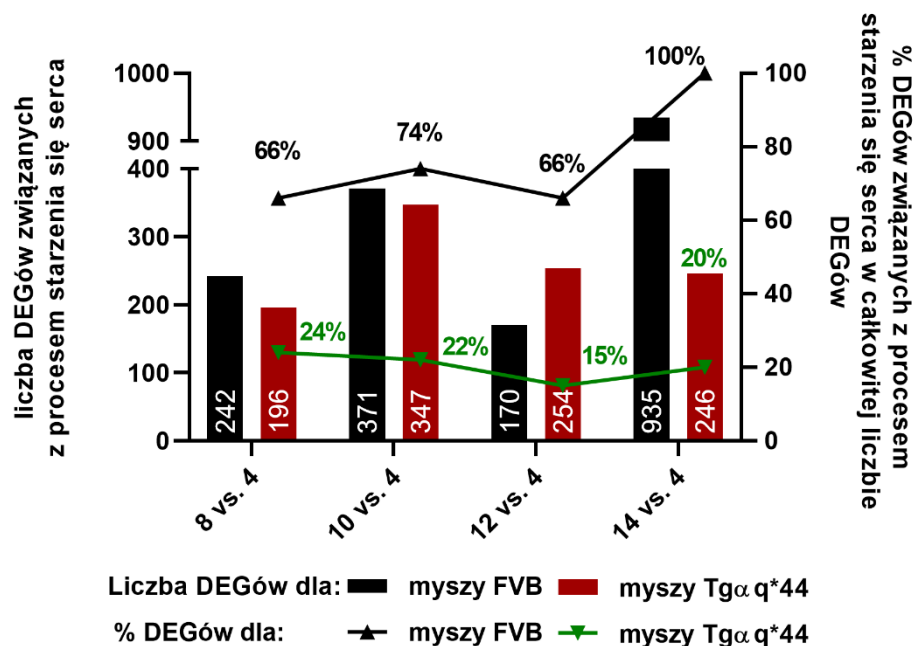
Liczba „genów starego serca” oraz „genów starzenia” się serca spełniających założone kryteria dla różnicowej ekspresji wyniosła 242 w sercach 8-miesięcznych myszy FVB, a 935 w sercach 14-miesięcznych myszy FVB w analizie FVB vs. FVB (**Ryc. 41 A**). Liczba „genów

starego serca” oraz „*genów starzenia*” się serca spełniających założone kryteria dla różnicowej ekspresji wyniosła 196 w sercach 8-miesięcznych myszy Tgaq*44, a 246 w sercach 14-miesięcznych myszy Tgaq*44 w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44 (**Ryc. 41 A**). „*Geny starego serca*” i „*geny starzenia*” się serca stanowiły 66-74% wszystkich genów spełniających założone kryteria dla różnicowej ekspresji w transkryptomach serc 8-12-miesięcznych myszy FVB w analizie FVB vs. FVB, natomiast 15-24% wszystkich genów spełniających założone kryteria dla różnicowej ekspresji w transkryptomach serc 8-14-miesięcznych myszy Tgaq*44 w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44 (**Ryc. 41 A**).

Liczba „*genów starego serca*” oraz „*genów starzenia*” się serca, która spełniła założone kryteria dla różnicowej ekspresji w transkryptomach serc 4-14-miesięcznych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB wyniosła 183-272 geny, co złożyło się na 35% wszystkich genów spełniających założone kryteria dla różnicowej ekspresji w transkryptomach serc 4-miesięcznych myszy i na 11-17% wszystkich genów u 8-14-miesięcznych myszy (**Ryc. 41 B**). Spośród 935 „*genów starego serca*” i „*genów starzenia*” się serca (**Ryc. 37 A**) większość genów nie spełniła założonych kryteriów dla różnicowej ekspresji w transkryptomach serc 4-14-miesięcznych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB, sugerując podobny profil ekspresji tych genów w procesie starzenia biologicznego serca u tych myszy (**Ryc. 41 B**). Natomiast 65% genów spośród wszystkich genów spełniających kryteria dla różnicowej ekspresji w transkrypcji serc 4-miesięcznych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB oraz 83-89% genów w pozostałych grupach wiekowych, stanowiły geny powiązane z rozwojem niewydolności serca i wpływem niewydolności serca na proces starzenia biologicznego serca u myszy Tgaq*44 (**Ryc. 41 B**).

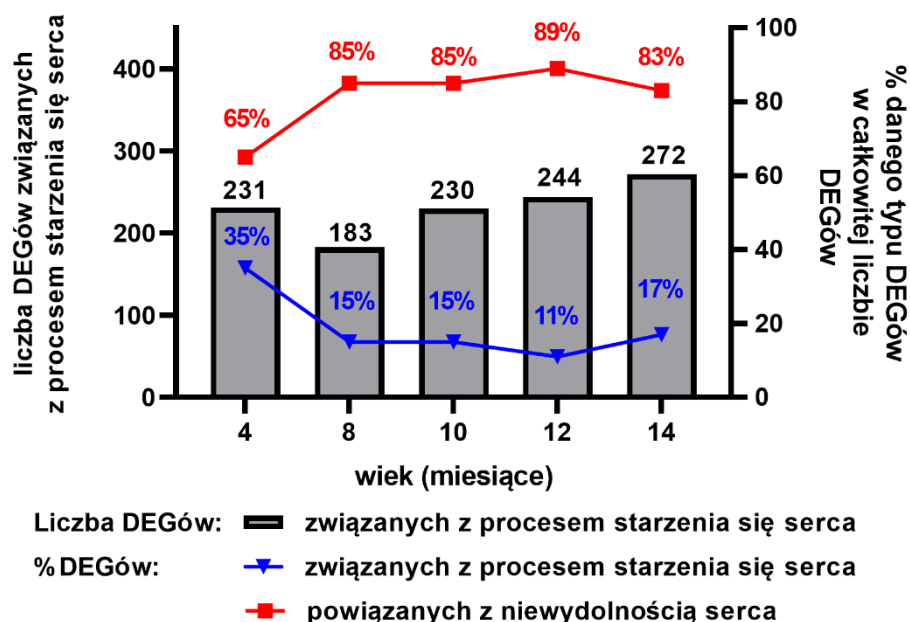
A

**Udział genów związanych ze starzeniem się serca
w analizie $Tg\alpha q^{*44}$ vs. $Tg\alpha q^{*44}$ oraz FVB vs. FVB**



B

**Udział genów związanych ze starzeniem się serca
w analizie $Tg\alpha q^{*44}$ vs. FVB**



Ryc. 41 Porównanie liczby i procentowego udziału DEGów związanych z procesem starzenia się serca wśród wszystkich genów spełniających kryteria dla różnicowej ekspresji w poszczególnych grupach wiekowych w analizach FVB vs. FVB, $Tg\alpha q^{*44}$ vs. $Tg\alpha q^{*44}$ (A), $Tg\alpha q^{*44}$ vs. FVB (B). **Komentarz:** Każda grupa wiekowa myszy w powyższych analizach była analizowana osobno. Geny związane z procesem starzenia się serca stanowiły większość genów różnicujących starsze myszy FVB (8-, 10-, 12-, 14-miesięczne) od 4-miesięcznych myszy FVB i liczyły 66-100% wszystkich DEGów. Geny związane z procesem starzenia się serca stanowiły mniejszość genów

różnicujących starsze myszy Tgaq*44 (8-, 10-, 12-, 14-miesięczne) od 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 i liczyły 15-24% wszystkich DEGów (A). Oznaczało to, iż zmiany w transkryptomach serc myszy FVB są związane głównie z procesem starzenia się, a w transkryptomach serc myszy Tgaq*44 z rozwojem niewydolności serca. Liczba genów związanych z procesem starzenia się serca różnicująca transkryptomy serc myszy Tgaq*44 od FVB w poszczególnych grupach wiekowych myszy wyniosła od 183 do 272, co stanowiło od 11 do 35% wszystkich DEGów (B). Oznaczało to, iż mniejsza, ale istotna część genów różnicujących transkryptomy serc myszy Tgaq*44 od FVB była związana z genami procesu starzenia się serca, a większość stanowiła geny pozwiązane z rozwojem niewydolności serca.

W celu wyselekcjonowania grupy „genów starego serca” i „genów starzenia” się serca, których ekspresja była zmieniona wskutek rozwoju niewydolności serca w transkryptomach serc 4-14-miesięcznych myszy Tgaq*44 sprawdzono, czy wśród genów spełniających założone kryteria dla różnicowej ekspresji w transkryptomach serc 4-14-miesięcznych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB znajdują się „geny starego serca” i „geny starzenia” się serca. Wśród 156 genów spełniających założone kryteria dla różnicowej ekspresji w transkryptomach serc 4-14-miesięcznych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB (Ryc. 42 A) znalazło się 8 „genów starego serca” (Ryc. 42 B, tabela 5) i 26 „genów starzenia” się serca (Ryc. 42 C, tabela 6a, b).

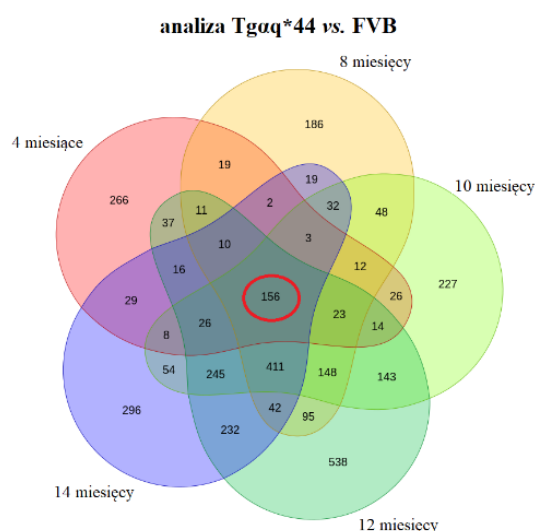
Podsumowując, analiza PCA wariancji ekspresji „genów starego serca” i „genów starzenia” się serca (obejmująca 454 „geny starego serca” i 481 „genów starzenia” się serca, stanowiąc łącznie 935 genów, ryc .37A, 40) wykazała, że rozwijająca się niewydolność serca w sercach myszy Tgaq*44 spowodowała zmianę profilu ekspresji genów związanych ze starzeniem się serca w porównaniu do tego, jak miało to miejsce w trakcie procesu starzenia się serca myszy FVB. Co najważniejsze, zmiany towarzyszące procesowi starzenia się serca widoczne na poziomie transkryptomu serca pojawiły się wcześniej u myszy Tgaq*44 (już u 4-miesięcznych myszy) niż u myszy FVB.

Liczba „genów starego serca” oraz „genów starzenia” się serca spełniających założone kryteria dla różnicowej ekspresji była na podobnym poziomie w transkryptomach serc 8- i 14-miesięcznych myszy Tgaq*44 w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44, natomiast zwiększyła się gwałtownie w transkryptomach serc 14-miesięcznych myszy FVB w analizie FVB vs. FVB i była również większa niż u 14-miesięcznych myszy Tgaq*44. Wyniki te wskazują, że proces starzenia się serca uległ gwałtownemu nasileniu dopiero w sercach 14-miesięcznych myszy FVB. Natomiast proces starzenia się serca był aktywowany już u 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 i nie uległ znacznemu nasileniu od 8 do 14 miesiąca życia w sercach myszy Tgaq*44.

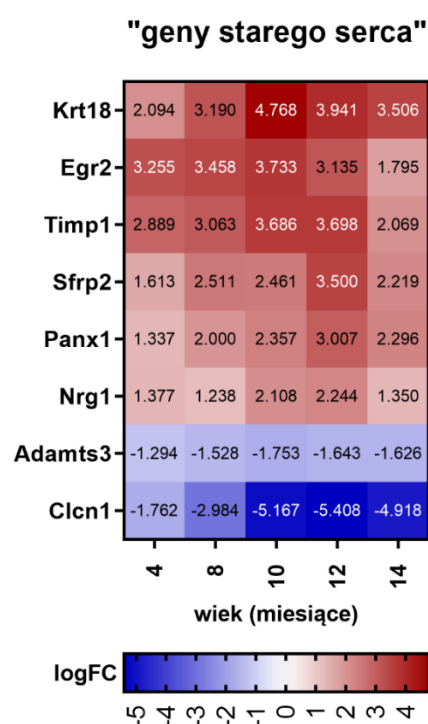
W sumie można stwierdzić, że większa część genów spełniających założone kryteria dla różnicowej ekspresji w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44 była związana z rozwojem niewydolności serca, natomiast w przypadku analizy FVB vs. FVB z procesem starzenia się serca.

Istotnie, większość genów spełniających założone kryteria dla różnicowej ekspresji w analizie Tgaq*44 vs. FVB była związana z rozwojem niewydolności serca u myszy Tgaq*44, gdyż geny związane z procesem starzenia się serca stanowiły jedynie 11-35% wszystkich DEGów w tej analizie (**Ryc. 41 B**). Stwierdzono nieznaczny wzrost liczby genów związanych z procesem starzenia się serca różnicujących transkryptomy serc myszy Tgaq*44 od FVB od 4 do 14 miesiąca życia, co wskazywało na to, że proces starzenia się serca myszy Tgaq*44 był już nasilony w 4 miesiącu życia (231 genów vs. 272 geny związane z procesem starzenia się serca u 4- i 14-miesięcznych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB, odpowiednio, **ryc. 41 B**). Większość „genów starego serca” i „genów starzenia” się serca w sercach myszy Tgaq*44 miała podobną ekspresję do ekspresji tych genów w sercach myszy FVB w każdej grupie wiekowej myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB, gdyż jedynie 183-272 geny spośród wszystkich 935 genów związanych z procesem starzenia się serca różnicowało transkryptomy serc myszy Tgaq*44 od FVB (**Ryc. 41 B**). Ważną obserwacją tej pracy było stwierdzenie, że rozwijająca się niewydolność serca w sercach myszy Tgaq*44 przyczyniła się do tego, że 8 „genów starego serca” i 26 „genów starzenia” się serca różnicowało transkryptomy serc myszy Tgaq*44 od FVB w każdej grupie wiekowej 4-14-miesięcznych myszy, tzn. niewydolność serca istotnie zmieniła ekspresję tych genów (**Ryc. 42 B, C**). Uznano, że geny te były istotnie zaangażowane w proces starzenia biologicznego serca u myszy Tgaq*44 od wczesnego aż do końcowego etapu niewydolności serca i postuluje się, że mogły przyczynić się one do progresji niewydolności serca.

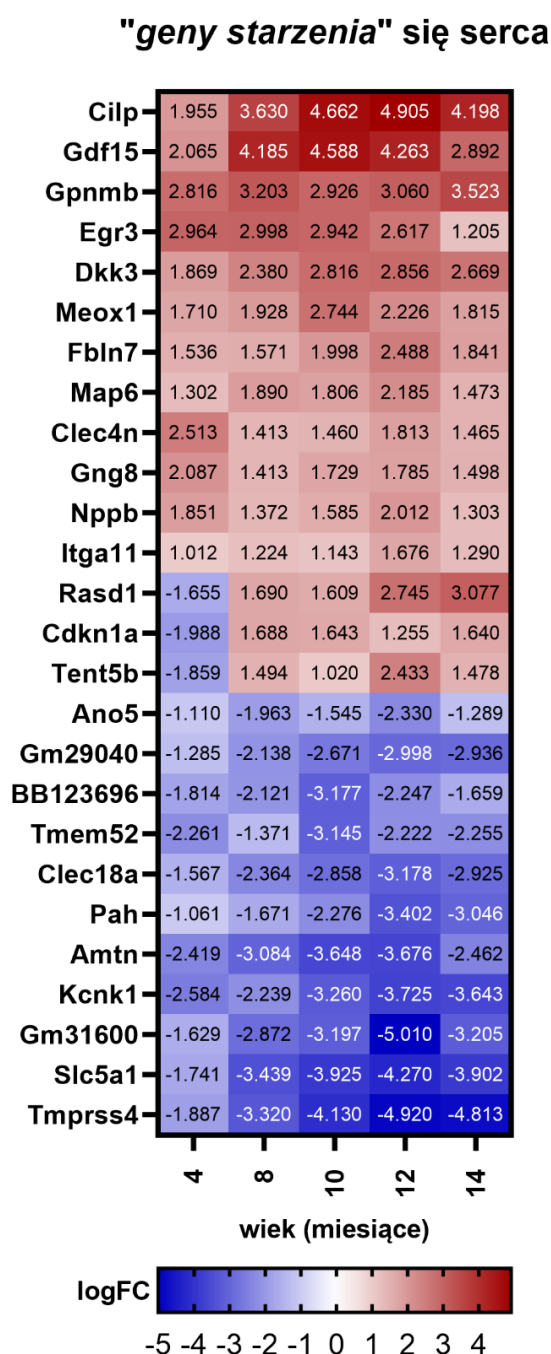
A



B



C



Ryc. 42 Geny związane z procesem starzenia się serca różnicujące transkryptomy serc myszy Tgaq*44 od FVB w każdej grupie wiekowej 4-14-miesięcznych myszy, tj. 8 „genów starego serca” i 26 „genów starzenia” się serca. Venn diagram przedstawiający liczbę wszystkich genów różnicujących transkryptomy serc myszy Tgaq*44 od FVB, tzn. genów spełniających założone kryteria dla różnicowej ekspresji we wszystkich grupach wiekowych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB (w czerwonym okręgu - 156 genów różnicujących transkryptomy serc myszy Tgaq*44 od FVB w każdej grupie wiekowej 4-14-miesięcznych myszy)(A). 8 „genów starego serca” (B) i 26 „genów starzenia” się serca (C) różnicujących transkryptomy serc myszy Tgaq*44 od FVB w każdej grupie wiekowej 4-14-miesięcznych myszy (analiza Tgaq*44 vs. FVB). **Komentarz:** Spośród wyselekcjonowanych 935 genów związanych z procesem starzenia się serca (tj. 454 „genów starego serca” i 481 „genów starzenia” się serca, ryc. 37 A, 40 A), w analizie Tgaq*44 vs. FVB kryteria dla różnicowej ekspresji spełniło od 183 do 272 genów dla każdej grupy wiekowej myszy analizowanej osobno (Ryc. 41 B). Spośród nich (183-272 genów związanych z procesem starzenia się serca) a równocześnie wśród 156 genów różnicujących

transkryptomy serc myszy Tgaq*44 od FVB w każdej grupie wiekowej 4-14-miesięcznych myszy (analiza Tgaq*44 vs. FVB, **ryc. 42 A**) znalazło się 8 „*genów starego serca*” i 26 „*genów starzenia*” się serca (**Ryc. 42 B, C**).

gen	nazwa	opis	funkcja	ref.
Krt18	keratyna 18 (ang. keratin 18)	białko specyficzne dla nabłonka filamentu pośredniego	czynnik kardioprotekcyjny wywołany stresem w niewydolnym sercu; zapewnia kardioprotekcję poprzez utrzymanie prawidłowej struktury wstawek; ekspresja Krt18 ulega zwiększeniu w niewydolności serca	A
Egr2	gen odpowiedzi wczesnego wzrostu 2 (ang. early growth response 2)	czynnik transkrypcyjny	czynnik transkrypcyjny indukowany przez Tgf-β, odgrywający ważną, niezbędną rolę w odpowiedzi profibrotycznej	B
Timp1	tkankowy inhibitor metaloproteinaz 1 (ang. tissue inhibitor of metalloproteinases 1)	inhibitor metaloproteinaz macierzy (MMPs)	promuje włóknienie tkanek poprzez hamowanie degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej przez metaloproteinazy macierzy (MMPs); marker włóknienia i dysfunkcji rozkurczowej lewej komory; ekspresja Timp1 ulega zwiększeniu w niewydolności serca	C, D, E
Sfrp2	białko Sfrp2 (ang. secreted frizzled related protein 2)	antagonista szlaku sygnalizacyjnego Wnt	szeroko zaangażowany w proliferację, apoptozę i różnicowanie komórek; odgrywa rolę we włóknieniu mięśnia sercowego, angiogenezie, regeneracji serca; chroni kardiomiocyty przed patologiczną hipertrofią	F
Panx1	panneksyna 1 (ang. pannexin 1)	tworzy kanał na powierzchni błony komórkowej uczestniczący w komunikacji między cytozolem poszczególnych komórek, a ich środowiskiem pozakomórkowym	kluczowy mediator zewnątrzkomórkowego uwalniania ATP; uwalnianie ATP przez kanały Panx1 w miocytach serca podczas niedokrwienia może być wczesnym czynnikiem parakrynnym prowadzącym do odpowiedzi profibrotycznej na niedokrwienne uszkodzenie serca; bierze udział w odpowiedzi zapalnej oraz śmierci komórkowej	G, H
Nrg1	neuregulina 1 (ang. neuregulin 1)	ligand receptorowych kinaz tyrozynowych z rodziny ErbB	odgrywa kluczową rolę w rozwoju serca i utrzymaniu czynności serca; sprzyja wzrostowi i przeżyciu kardiomiocytów	I
Adams3	dezintegrina i metaloproteinaza z motywami trombospondyny 3 (ang. a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 3)	prokolagenowa-N-proteinaza zaangażowana w usuwanie N-końcowych peptydów z prokolagenu w celu wytworzenia dojrzałego kolagenu	odgrywa ważną rolę w regulacji macierzy zewnątrzkomórkowej, stanu zapalnego i gojeniu ran	J, K
Clcn1	kanał 1 bramkowany napięciem chlorkowym (ang. chloride voltage-gated channel 1)	kanał 1 bramkowany napięciem chlorkowym	propagacja potencjału czynnościowego; ekspresja kanału zachodzi głównie w mięśniach szkieletowych; wspiera przewodnictwo chlorkowe sarkolemy	L

Tabela 5. Tabela przedstawia funkcje biologiczne dla każdego z 8 „*genów starego serca*”, które spełniły założone kryteria dla różnicowej ekspresji w transkryptomach serc 4-14-miesięcznych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB. Komentarz: Spośród wyselekcjonowanych 935 genów związanych z procesem starzenia się serca (tj. 454 „*genów starego serca*” i 481 „*genów starzenia*” się serca, **ryc. 37 A, 40 A), w analizie Tgaq*44 vs. FVB kryteria dla różnicowej ekspresji spełniło od 183 do 272 genów dla każdej grupy wiekowej myszy analizowanej osobno (**Ryc. 41 B**). Spośród nich (183-272 genów związanych z procesem starzenia się serca, **ryc. 41 B**) a równocześnie wśród 156 genów różnicujących transkryptomy serc myszy Tgaq*44 od FVB w każdej grupie wiekowej 4-14-miesięcznych myszy (analiza Tgaq*44 vs. FVB, **ryc. 42 A**) znalazło się 8 „*genów starego serca*” (**Ryc. 42 B**). Ponadto, pod wpływem rozwoju niewydolności serca u myszy Tgaq*44 ekspresja 8 „*genów starego serca*” uległa zmianie w porównaniu do ich ekspresji w sercach myszy FVB i przyczyniła się do różnicowania transkryptomów serc myszy Tgaq*44 od FVB w każdej grupie wiekowej 4-14-miesięcznych myszy, świadcząc o istotnym zaangażowaniu 8 „*genów starego serca*” w proces starzenia biologicznego serca myszy Tgaq*44. Referencje: A - (116), B - (117), C - (118), D - (119), E - (120), F - (121), G - (122), H - (123), I - (124), J - (125), K - (126), L - (127).**

gen	nazwa	opis	funkcja	ref.
Cilp	białko warstwy pośredniej chrząstki (<i>ang. cartilage intermediate layer protein</i>)	monomeryczna glikoproteina znajdująca się w macierzy pozakomórkowej występująca obficie w tkankach chrzęstnych	potencjalny biomarker włóknienia mięśnia sercowego, ważny w utrzymaniu budowy chrząstki	A, B
Gdf15	czynnik różnicowania wzrostu 15 (<i>ang. growth differentiation factor 15</i>)	cytokina odpowiedzi na stres, występująca w układzie sercowo-naczyniowym; należy do rodziny cytokin transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β)	biomarker zwłóknienia mięśnia sercowego i chorób układu krążenia; integruje informacje ze szlaków chorób serca i chorób pozasercowych, które są powiązane z występowaniem, progresją i rokowaniem niewydolności serca; odgrywa rolę w przeciwdziałaniu uszkodzeniom w gwałtownych urazach układu sercowo-naczyniowego	C, D
Gpnm	glikoproteina Nmb (<i>ang. glycoprotein Nmb</i>)	wysoko glikozyłowane białko transbłonowe typu I	szkodliwy czynnik w przebudowie serca	E
Egr3	gen odpowiedzi wczesnego wzrostu 3 (<i>ang. early growth response 3</i>)	czynnik transkrypcyjny	reguluje odpowiedzi fibrogeniczne, zaangażowana w rozwój nerwowo-mięśniowy i odporność	F
Dkk3	dickkopf inhibitor 3 szlaku sygnałowego WNT (<i>ang. dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 3</i>)	białko wydzielnicze w rodzinie Dickkopf	odgrywa ważną rolę w regulacji rozwoju tkanek, apoptozy, proliferacji i odporności, kardioprotekcyjny regulator patologicznego przerostu serca	G
Meox1	(<i>ang. mesenchyme homeobox 1</i>)	czynnik transkrypcyjny, należy do genów programu płodowego (<i>ang. fetal programme genes</i>)	rozwój zarodkowy, uczestniczy w procesie przerostu mięśnia sercowego	H
Fbln7	fibulina 7 (<i>ang. fibulin 7</i>)	białko macierzy zewnątrzkomórkowej (wydzielane również przez fibroblasty)	ulega ekspresji w połączeniach komórkowych, szczególnie w tkankach poddanych znacznemu obciążeniu mechanicznemu; reguluje kluczowe procesy podczas przebudowy mięśnia sercowego; zaangażowany w proces migracji fibroblastów w sercu	I
Map6	białko 6 związane z mikrotubulami (<i>ang. microtubule associated protein 6</i>)	białko związane z mikrotubulami	zaangażowany w szereg funkcji neuronalnych	J
Clec4n (synonim: dectn-2)	(<i>ang. C-type lectin domain family 4, member n</i>)	receptor lektyny typu C (Dektyna-2)	potęguje przebudowę serca po zawale serca poprzez modulację różnicowania limfocytów Th1	K, L
Gng8	podjednostka białka G gamma 8 (<i>ang. G protein subunit gamma 8</i>)	podjednostka białka G gamma 8	x	x
Nppb	peptyd natriuretyczny typu B (<i>ang. natriuretic peptide B</i>)	hormon sercowy wydzielany z przedsionków i komór serca w odpowiedzi na przeciążenie serca	biomarker niewydolności serca, powoduje natriurezę, diurezę, rozluźnienie mięśni gładkich, zapobiega zwłóknieniu mięśnia sercowego, uczestniczy w rozszerzaniu naczyń naczyniowych i oporowych w krążeniu wieńcowym, hamuje wydzielanie aldosteronu	M, N
Itga11	integryna alfa-11 (<i>ang. Integrin Subunit Alpha 11</i>)	główny receptor kolagenu na komórkach fibroblastycznych	pośredniczy w przyleganiu komórek, sygnalizacji adhezyjnej i przebudowie włókien kolagenowych; pośredniczy w progresji zwłóknienia; kontroluje różnicowanie miofibroblastów i może brać udział w reorganizacji kolagenu za pośrednictwem miofibroblastów	O, P

Tabela 6a. Tabela przedstawia funkcje biologiczne dla każdego z 26 „genów starzenia” się serca, które spełniły założone kryteria dla różnicowej ekspresji w transkryptomach serc 4-14-miesięcznych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB. **Komentarz:** Spośród wyselekcjonowanych 935 genów związanych z procesem starzenia się serca (tj. 454 „genów starego serca” i 481 „genów starzenia” się serca, ryc. 37 A, 40 A), w analizie

Tgaq*44 vs. FVB kryteria dla różnicowej ekspresji spełniło od 183 do 272 genów dla każdej grupy wiekowej myszy analizowanej osobno (**Ryc. 41 B**). Spośród nich (183-272 genów związanych z procesem starzenia się serca, **ryc. 41 B**) a równocześnie wśród 156 genów różnicujących transkryptomy serc myszy Tgaq*44 od FVB w każdej grupie wiekowej 4-14-miesięcznych myszy (analiza Tgaq*44 vs. FVB, **ryc. 42 A**) znalazło się 26 „**genów starzenia**” się serca (**Ryc. 42 C**). Ponadto, pod wpływem rozwoju niewydolności serca u myszy Tgaq*44 ekspresja 26 „**genów starzenia**” się serca uległa zmianie w porównaniu do ich ekspresji w sercach myszy FVB i przyczyniła się do różnicowania transkryptomów serc myszy Tgaq*44 od FVB w każdej grupie wiekowej 4-14-miesięcznych myszy, świadcząc o istotnym zaangażowaniu 26 „**genów starzenia**” się serca w proces starzenia biologicznego serca myszy Tgaq*44. **Referencje:** A - (128), B - (129), C - (130), D - (131), E - (132), F - (133), G - (134), H - (135), I - (136), J - (137), K - (138), L - (139), M - (140), N - (141), O - (142), P - (143).

gen	nazwa	opis	funkcja	ref.
Rasd1	(ang. <i>ras related dexamethasone induced 1</i>)	małe białko G Rasd1; posiada wszystkie konserwatywne domeny nadrodziny Ras wymagane do wiązania nukleotydów guaninowych, hydrolizy i interakcji efektorowych	selektywnie aktywuje szlak sygnałowy białka Gai/Gao i wydaje się działać jako czynnik wymiany nukleotydów guaninowych dla Gai; modulator funkcji endokrynnej serca w odpowiedzi na przeciążenie objętościowe serca; inhibitor sekrecji przedsionkowego czynnika natriuretycznego (ANF)	A, B
Cdkn1a	inhibitor 1A kinazy zależnej od cykliny (ang. <i>cyclin dependent kinase inhibitor 1A</i>)	koduje białko p21 (odpowiedzialne za zatrzymanie wzrostu komórek związane ze starzeniem się komórek)	zwiększona ekspresja w starzejących się komórkach	C
Tent5b	terminalna nukleotydylotransferaza 5B (ang. <i>terminal nucleotidyltransferase 5B</i>)	przypuszczalna poli (A) polimeraza	biologiczna funkcja pozostaje do wyjaśnienia	D, E
Ano5	anoktamina 5 (ang. <i>anoctamin 5</i>)	należy do rodziny białek anoktamin	pełni ważną rolę fizjologiczną w mięśniach; funkcja biochemiczna pozostaje do wyjaśnienia	F
Gm29040	przewidywany gen 29040	x	x	x
BB123696	x	x	x	x
Tmem52	białko transbłonowe 52 (ang. <i>transmembrane protein 52</i>)	białko transbłonowe	w dużej mierze modyfikowany przez metylację DNA	G
Clec18a	(ang. <i>C-Type lectin domain family 18 member A</i>)	lektyna 18 typu C	biologiczna funkcja jest wciąż nieznaną	H
Pah	hydroksylaza fenyloalaniny (ang. <i>phenylalanine hydroxylase</i>)	hydroksylaza fenyloalaniny	metabolizuje aromatyczne aminokwasy i bierze udział w usuwaniu krążącej fenyloalaniny we krwi i płynach ustrojowych	I
Amtn	amelotyna (ang. <i>amelotin</i>)	gen specyficzny dla ameloblastów	odgrywa kluczową rolę w tworzeniu szkliwa zębów	J
Kcnk1	(ang. <i>potassium two pore domain channel subfamily K member 1</i>)	gen koduje dwuporowy kanał potasowy (K ⁺) TWIK-1 (lub K2P1.1) przyczyniający się do przewodnictwa K ⁺ w różnych typach komórek	odgrywa rolę w pracy serca, w prawidłowym rytmie serca	K
Gm31600	przewidywany gen 31600	x	x	x
Slc5a1	rodzina nośników substancji rozpuszczonych 5, członek 1 (ang. <i>solute carrier family 5 member 1</i>)	gen kodujący kotransporter sodowo-glukozowy (SGLT1)	transportuje aktywnie glukozę do komórki przez kotransporter Na ⁺ /glukozowy	L
Tmprss4	(ang. <i>transmembrane serine protease 4</i>)	koduje transmembranową proteazę serynową 4	bierze udział w tranzytacji nabłonkowo-mezenchymalnej; może aktywować nabłonkowy kanał sodowy (ENaC)	M

Tabela 6b. Tabela przedstawia funkcje biologiczne dla każdego z 26 „**genów starzenia**” się serca, które spełniły założone kryteria dla różnicowej ekspresji w transkryptomach serc 4-14-miesięcznych myszy w

analizie Tgaq*44 vs. FVB. **Referencje:** A - (144), B - (145), C - (146), D - (147), E - (148), F - (149), G - (150), H - (151), I - (152), J - (153), K - (154), L - (155), M - (156).

4.5.5 Zmiany aktywacji genów w trakcie starzenia się serca myszy FVB

W celu wskazania genów, które były najbardziej aktywne w transkryptomach serc myszy FVB w trakcie procesu starzenia się serca, to w poszczególnych grupach wiekowych myszy FVB w analizie FVB vs. FVB wyselekcjonowano po 10 genów, których wartość różnicowej ekspresji była najwyższa i najniższa (**Tabela 7**). Spośród tak wyselekcjonowanych genów wyłoniono również te, które wystąpiły w przeprowadzonych porównaniach dla ≥ 2 grup wiekowych myszy (**Tabela 7**).

Transkryptom serca dla każdej grupy wiekowej myszy FVB w analizie FVB vs. FVB charakteryzował się odmienną pulą 10 genów, których wartość różnicowej ekspresji była najwyższa i najniższa (**Tabela 7**). Interesujące, że geny *Tnf*, *Hif3a* znalazły się we wszystkich grupach wiekowych myszy FVB w analizie FVB vs. FVB wśród 10 genów, których wartość różnicowej ekspresji była najwyższa lub najniższa (**Tabela 7, 8**).

		8 vs. 4 miesiąc	10 vs. 4 miesiąc	12 vs. 4 miesiąc	14 vs. 4 miesiąc	geny, które wystąpiły w ≥ 2 grupach wiekowych od 8 do 14 miesiąca
Top 10 DEGów w analizie FVB vs. FVB	DEGs, których ekspresja była w górę	Tnf , Spon2, Gm39317, Ccl7, Ccl2, Serpina3g, Prom2, Ccl12, Cdca7l, Cx3cr1	Gtpbp4-ps1, Vgl12, Tnf , Gm11382, AC168977.1, Prom2, Pdzk1ip1, Ccl7, Rims2, 4933407E24Rik	Spon2, Gtpbp4-ps1, AC168977.1, Vgl12, Tnf , Col8a2, Gm39317, Gm19972, Adamts4, Gm42679	Apol9a, Gm4841, BC023105, F830016B08Rik, Gm43752, Igba, AC168977.1, Gm12185, Tnf , Gtpbp4-ps1	Tnf , Gtpbp4-ps1, AC168977.1, Spon2, Gm39317, Ccl7, Prom2, Vgl12
	DEGs, których ekspresja była w dół	Gm20400, Gm4956, E230001N04Rik, Hif3a , Fkbp5, Ctxn3, Zbtb16, 9830144P21Rik, AC154912.5, Fam107a	Nt5c1a, 4632404M16Rik, Ica1l, Gm43963, Gm20400, Gm45838, AC154381.1, Gm18609, Hif3a , Gm11827	Gm4956, Hif3a , Fam107a, Rasd1, Gm11827, Per2, Map3k6, Slc12a3, Opn1sw, Ddit4	Gm4956, Nt5c1a, 4632404M16Rik, 1700007J10Rik, Hif3a , Gm45838, Ddc, Gm18609, Adam1b, Hipk2	Hif3a , Gm4956, Gm20400, Fam107a, Nt5c1a, 4632404M16Rik, Gm45838, Gm18609, Gm11827

Tabela 7 Tabela przedstawia geny, których wartość różnicowej ekspresji była najwyższa lub najniższa dla każdej grupy wiekowej myszy FVB w analizie FVB vs. FVB. W tabeli dla wszystkich grup wiekowych myszy FVB w analizie FVB vs. FVB przedstawiono po 10 genów, których wartość różnicowej ekspresji była najwyższa i najniższa (Top 10 DEGów). W tabeli przedstawiono również geny, które wystąpiły w przeprowadzonych porównaniach dla ≥ 2 grup wiekowych myszy FVB w analizie FVB vs. FVB.

gen	nazwa	opis	funkcja	ref.
Tnf	czynnik martwicy nowotworów (<i>ang. tumor necrosis factor</i>)	czynnik surowicy indukowany endotoksyną, który powoduje martwicę guzów	negatywny efekt inotropowy, przebudowa serca, wywołuje odpowiedź hipertroficzną kardiomiocytów, uczestniczy w powstawaniu kardiomiopatii rozstrzeniowej i niewydolności serca	A, B
Hif3a	czynnik indukowany hipoksją 3 alfa (<i>ang. hypoxia inducible factor 3 subunit alpha</i>)	czynnik transkrypcyjny Hif-3α	hamowanie aktywności Hif-1α i Hif-2α	C

Tabela 8 Tabela przedstawia funkcje biologiczne dla genów, które uznano za najbardziej znaczące w procesie starzenia się serca myszy FVB. Przedstawione geny znalazły się we wszystkich grupach wiekowych myszy FVB w analizie FVB vs. FVB wśród 10 genów, których wartość różnicowej ekspresji była najwyższa lub najniższa. **Referencje:** A - (157), B - (158), C - (159).

4.5.6 Zmiany aktywacji genów w toku rozwoju niewydolności serca myszy Tgaq*44 w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44

Analogicznie jak w analizie FVB vs. FVB, w celu wskazania genów, które były najbardziej aktywne w transkryptomach serc myszy Tgaq*44 w toku rozwoju niewydolności serca w trakcie procesu starzenia, w poszczególnych grupach wiekowych myszy Tgaq*44 w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44 wyselekcjonowano po 10 genów, których wartość różnicowej ekspresji była najwyższa i najniższa (**Tabela 9**). Spośród tak wyselekcjonowanych genów wyłoniono również te, które wystąpiły w przeprowadzonych porównaniach dla ≥ 2 grup wiekowych myszy (**Tabela 9**).

Transkryptom serca dla każdej grupy wiekowej myszy Tgaq*44 w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44 charakteryzował się odmienną pulą 10 genów, których wartość różnicowej ekspresji była najwyższa i najniższa (**Tabela 9**). Geny *Fgf23*, *VgII2*, *Kcnip1* znalazły się we wszystkich grupach wiekowych myszy Tgaq*44, natomiast geny *Gm31600*, *Slc5a1*, *Syt13*, *Adgra1*, *Rims2*, *Chodl*, *Clcn1*, *Ptchd3* znalazły się w trzech grupach wiekowych myszy Tgaq*44 w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44 wśród 10 genów, których wartość różnicowej ekspresji była najwyższa lub najniższa (**Tabela 9**).

		8 vs. 4 miesiąc	10 vs. 4 miesiąc	12 vs. 4 miesiąc	14 vs. 4 miesiąc	geny, które wystąpiły w ≥ 2 grupach wiekowych od 8 do 14 miesiąca
Top 10 DEGów w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44	DEGs, których ekspresja była w górę	4930438A08Rik, Osn, Fgf21, Fgf23, Ighg2c, Vgll2, Adm2, Acox2, Mgarp, Sh2d6	Fgf23, Syt13, Vgll2, Adgra1, Chodl, Fam184b, Cplx3, Gdf15, Psca, Rims2	Fgf23, Syt13, Chodl, Rims2, Cplx3, Tnmd, Adgra1, Pou3f1, Vgll2, Edn3	Fgf23, Chodl, Tnmd, Rims2, Adgra1, Vgll2, Fam184b, Syt13, Dlx6, Psca	Fgf23, Vgll2, Syt13, Adgra1, Rims2, Chodl, Fam184b, Cplx3, Psca, Tnmd
	DEGs, których ekspresja była w dół	4632404M16Rik Kcnip1, Hist2h4, Gm18609, Gm37121, Gm31600, Gm43256, Kctd19, Slc5a1, 4930590J08Rik	Kcnip1, Clcn1, 4632404M16Rik, Ptchd3, Nt5c1a, Gm19277, Aldob, Gm31600, Lgi1, Fbp2	Gm19277, Kcnip1, Lgi1, Clcn1, Retnla, Aldob, Gm28979, Ptchd3, Gm31600, Slc5a1	Clcn1, Ddc, Ptchd3, Kcnip1, Aqp4, Mmp12, Slc5a1, Gm29040, Scd4, Fbp2	Kcnip1, Gm31600, Slc5a1, Clcn1, Ptchd3, 4632404M16Rik, Gm19277, Aldob, Lgi1, Fbp2

Tabela 9 Tabela przedstawia geny, których wartość różnicowej ekspresji była najwyższa lub najniższa dla każdej grupy wiekowej myszy Tgaq*44 w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44. W tabeli dla wszystkich grup wiekowych myszy Tgaq*44 w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44 przedstawiono po 10 genów, których wartość różnicowej ekspresji była najwyższa i najniższa (Top 10 DEGów). W tabeli przedstawiono również geny, które wystąpiły w przeprowadzonych porównaniach dla ≥ 2 grup wiekowych myszy Tgaq*44 w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44.

4.5.7 Zmiany aktywacji genów w toku rozwoju niewydolności serca myszy Tgaq*44 w analizie Tgaq*44 vs. FVB

W analizie Tgaq*44 vs. FVB, która umożliwiła wyłonienie genów najsilniej różnicujących te szczepy myszy, głównie z powodu rozwoju niewydolności serca, jak i wpływu niewydolności serca na proces starzenia biologicznego w sercach myszy Tgaq*44 (**Ryc. 41 B**), wyselekcjonowano w każdej grupie wiekowej myszy po 10 genów, których wartość różnicowej ekspresji była najwyższa i najniższa (**Tabela 10**). Spośród tak wyselekcjonowanych genów wyłoniono również te, które wystąpiły w przeprowadzonych porównaniach dla ≥ 2 grup wiekowych myszy (**Tabela 10**).

Podobnie, jak w poprzednich analizach każda grupa wiekowa myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB charakteryzowała się odmienną pulą 10 genów, których wartość różnicowej ekspresji była najwyższa i najniższa (**Tabela 10**). Geny *Ptchd3*, *Kcnip1*, *Fgf23*, *Atp6v0a4*, *Fgf21*, *Adm2*, *Aldob*, *Sprrr1a*, *Acsm5*, *Chodl*, *Cyp2b10*, *Klk1b26*, *Mid1-ps1*, *4833412C05Rik*, *Nppa*, *Scd4*, *Gdf15*, *Clcn1*, *Tmprss4*, *F830016B08Rik* znalazły się w dwóch lub więcej grupach

wiekowych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB wśród 10 genów, których wartość różnicowej ekspresji była najwyższa lub najniższa (**Tabela 10**).

		4 miesiąc	8 miesiąc	10 miesiąc	12 miesiąc	14 miesiąc	geny, które wystąpiły w ≥ 2 grupach wiekowych od 4 do 14 miesiąca
Top 10 DEGów w analizie Tgaq*44 vs. FVB	DEGs, których ekspresja była w górę	Ccl2, Mmp12, Ccl7, Ccl8, Tnc, Tnf, Il1rn, Ccl12, Egr2, Gm42822	Fgf23, 4930438A08Rik, Vmn2r3, Fgf21, Sh2d6, Nppa, Adm2, 4833412C05Rik, Gdf15, Slc7a3	Fgf23, Fgf21, Mgam, Krt18, Adm2, Cilp, Gdf15, Atp6v0a4, Crf1, Sprr1a	Fgf23, Sprr1a, Nppa, Ereg, 4833412C05Rik, Syt13, Chodl, Cplx3, Atp6v0a4, Ckmt1	Fgf23, Chodl, 4833412C05Rik, Nppa, Pscs, Tnmd, Sprr1a, Atp6v0a4, Gnal, Col12a1	Fgf23, 4833412C05Rik, Atp6v0a4, Sprr1a, Nppa, Fgf21, Adm2, Gdf15, Chodl
	DEGs, których ekspresja była w dół	Mid1-ps1, E230001N04Rik, Klk1b26, Cyp2b10, Aldob, Hif3a, Timp4, Slc12a3, Gm11827, Pitx3	Cyp2b10, Aldob, Mid1-ps1, Klk1b26, Scd4, Slc5a1, Kctd19, Tmprss4, Kcnp1, 2410137M14Rik	Aldob, Cyp2b10, Clcn1, Acsm5, F830016B08Rik, Scd4, Vwc2, Klk1b26, Kcnp1, Tmprss4	Aldob, Klk1b26, Scd4, Clcn1, Lgi1, Gm31600, Tmprss4, Ptchd3, Acsm5, Helt	Gm4841, BC023105, Aldob, F830016B08Rik, Scd4, Gm12185, Ptchd3, Klk1b26, Clcn1, Tmprss4	Klk1b26, Aldob, Scd4, Tmprss4, Cyp2b10, Clcn1, Mid1-ps1, Kcnp1, Acsm5, F830016B08Rik, Ptchd3

Tabela 10 Tabela przedstawia geny, których wartość różnicowej ekspresji była najwyższa lub najniższa dla każdej grupy wiekowej myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB. W tabeli dla wszystkich grup wiekowych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB przedstawiono po 10 genów, których wartość różnicowej ekspresji była najwyższa i najniższa (Top 10 DEGów). W tabeli przedstawiono również geny, które wystąpiły w przeprowadzonych porównaniach dla ≥ 2 grup wiekowych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB i liczyły one 20 genów (Fgf23, 4833412C05Rik, Atp6v0a4, Sprr1a, Nppa, Fgf21, Adm2, Gdf15, Chodl, Klk1b26, Aldob, Scd4, Tmprss4, Cyp2b10, Clcn1, Mid1-ps1, Kcnp1, Acsm5, F830016B08Rik, Ptchd3).

4.5.8 „Geny starego serca”, „geny starzenia” się serca oraz „geny niewydolności serca” najsilniej różnicujące transkryptomy serc myszy Tgaq*44 od FVB

Wprowadzenie

Wyselekcjonowane w poprzedniej analizie 8 „genów starego serca” i 26 „genów starzenia” się serca różnicujących transkryptomy serc myszy Tgaq*44 od FVB w grupie wiekowej 4-14-miesięcznych myszy (**Ryc. 42 B, C**) mogły nie koniecznie stanowić genów najsilniej różnicujących te transkryptomy. Oznaczało to, że wyselekcjonowane geny związane z procesem starzenia się serca mogły nie być silnie zaangażowane w proces starzenia biologicznego serca myszy Tgaq*44 w toku rozwoju niewydolności serca. W związku z tym, w celu wskazania genów związanych z procesem starzenia się serca, które były silnie zaangażowane w proces starzenia biologicznego serca myszy Tgaq*44 przeprowadzono analizę bazującą na genach, które wystąpiły w ≥ 2 grupach wiekowych myszy w analizie

Tgaq*44 vs. FVB wśród 10 genów, których wartość różnicowej ekspresji była najwyższa lub najniższa (**Tabela 10, 11**). Ponadto, sprawdzono ile spośród tak wyselekcjonowanych genów należy do wcześniej wyselekcjonowanych 8 „genów starego serca” i 26 „genów starzenia” się serca (**Ryc. 42 B, C**).

Aby ten cel uzyskać to dla genów, które wystąpiły w ≥ 2 grupach wiekowych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB wśród 10 genów, których wartość różnicowej ekspresji była najwyższa lub najniższa, wskazano w jakich grupach wiekowych w analizach FVB vs. FVB, Tgaq*44 vs. Tgaq*44, Tgaq*44 vs. FVB spełniły założone kryteria dla różnicowej ekspresji (**Tabela 11**). Sprawdzono również, czy któryś z tych genów znalazł się w ≥ 2 grupach wiekowych myszy w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44 wśród 10 genów, których wartość różnicowej ekspresji była najwyższa lub najniższa, by wykazać ich silną aktywację w transkryptomach serc myszy Tgaq*44.

Analiza różnicowej ekspresji 20 wyżej wyselekcjonowanych genów (**Tabela 10, tabela 12a-c**) w trzech typach analiz: Tgaq*44 vs. FVB, Tgaq*44 vs. Tgaq*44, FVB vs. FVB (**Tabela 11**) umożliwiła wskazać całkowity udział tych genów w różnicowaniu transkryptomów serc myszy Tgaq*44 od FVB, w rozwoju niewydolności serca, starzeniu się serca oraz wskazać wśród nich geny, które należały do „genów starego serca”, „genów starzenia” się serca i „genów niewydolności serca”.

W przeciwieństwie do „genów starego serca” oraz „genów starzenia” się serca, zdefiniowanie „genów niewydolności serca” nie było takie proste. Jako „geny niewydolności serca” (**Tabela 11**) uznano takie, które spełniły następujące kryteria:

- 1.) wystąpiły w ≥ 2 grupach wiekowych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB wśród 10 genów, których wartość różnicowej ekspresji była najwyższa lub najniższa (**Tabela 10**),
- 2.) spełniły założone kryteria dla różnicowej ekspresji jednocześnie w trzech grupach wiekowych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB, analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44 (**Tabela 11**),
- 3.) nie spełniły założonych kryteriów dla różnicowej ekspresji w analizie FVB vs. FVB lub spełniły jedynie w jednej grupie wiekowej myszy FVB (z wykluczeniem 14-miesięcznych myszy) w analizie FVB vs. FVB (**Tabela 11**).

Należy podkreślić, że wśród 20 genów, które wystąpiły w ≥ 2 grupach wiekowych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB wśród 10 genów, których wartość różnicowej ekspresji była najwyższa lub najniższa (**Tabela 10, tabela 12a-c**), „genami starego serca” były geny *Clcn1*, *F830016B08Rik*, „genami starzenia” się serca były geny *Gdf15*, *Tmprss4*, „genami

niewydolności serca” były geny *Ptchd3*, *Kcnip1*, *Fgf23*, *Atp6v0a4*, *Fgf21*, *Adm2*, *Aldob*, *Sprrr1a*, *Acsm5*, *Chodl*, *4833412C05Rik*, *Nppa*, *Scd4* (**Tabela 11**).

Wśród 20 genów, które wystąpiły w ≥ 2 grupach wiekowych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB wśród 10 genów, których wartość różnicowej ekspresji była najwyższa lub najniższa (**Tabela 10, tabela 12a-c**) znalazły się 3 geny (*Clcn1*, *Gdf15*, *Tmprss4*) związane z procesem starzenia się serca (**Tabela 11**), które zidentyfikowano również we wcześniejszej analizie wśród 8 „genów starego serca” i 26 „genów starzenia” się serca różnicujących transkryptomy serc myszy Tgaq*44 od FVB w każdej grupie wiekowej 4-14-miesięcznych myszy (**Ryc. 42 B, C**). Związane to było z tym, że wyselekcjonowane 3 geny (*Clcn1*, *Gdf15*, *Tmprss4*) spełniły założone kryteria dla różnicowej ekspresji w każdej grupie wiekowej 4-14-miesięcznych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB. Natomiast gen *F830016B08Rik* nie znalazł się wśród 8 „genów starego serca” i 26 „genów starzenia” się serca (**Ryc. 42 B, C**), gdyż spełnił założone kryteria dla różnicowej ekspresji jedynie u 8-, 10- i 14-miesięcznych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB, co nie oznacza że nie był on „genem starego serca” (**Tabela 11**). Interesującym faktem jest to, że zmiana ekspresji genów *Gdf15* i *Clcn1* nastąpiła w każdej grupie wiekowej myszy Tgaq*44 w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44, natomiast nie zaobserwowano jej w żadnej grupie dla genu *Tmprss4*. Związane to było z tym, że ekspresja genów *Gdf15* i *Clcn1* nasiliła się jeszcze od 4 miesiąca życia w wyniku rozwoju niewydolności serca, a ekspresja genu *Tmprss4* mogła już silnie być zmieniona u 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 i nie nasiliła się dalej od 8 miesiąca życia w toku rozwoju niewydolności serca.

W wyżej wspomnianej analizie, wśród wyselekcjonowanych 20 genów (**Tabela 11, tabela 12a-c**) znalazło się również 6 genów (*Ptchd3*, *Kcnip1*, *Fgf23*, *Aldob*, *Chodl*, *Clcn1*), które wystąpiły w ≥ 2 grupach wiekowych myszy w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44 wśród 10 genów, których wartość różnicowej ekspresji była najwyższa lub najniższa. Wskazuje to na to, że ekspresja tych genów uległa bardzo silniej zmianie pod wpływem rozwoju niewydolności serca w trakcie starzenia się serca oraz miały one znaczący udział w zmianach ekspresji transkryptomu serc myszy Tgaq*44 w toku rozwoju niewydolności serca. Założono, że zmiana ekspresji genów *Ptchd3*, *Kcnip1*, *Fgf23*, *Aldob*, *Chodl* była bardziej związana z rozwojem niewydolności serca, gdyż nie zaobserwowano nasilenia ekspresji tych genów w analizie FVB vs. FVB. Natomiast uznano, że gen *Clcn1* jest „genem starego serca”, którego ekspresja przedwcześnie nasiliła się w dół pod wpływem rozwoju niewydolności serca w sercach myszy Tgaq*44 (**Tabela 11**).

gen	DEG w analizie Tgaq*44 vs. FVB (miesiące)	DEG w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44 (grupy wiekowe)	DEG w analizie FVB vs. FVB (grupy wiekowe)	typ genu	gen w Top 10 DEGach w ≥2 grupach wiekowych w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44
<i>Ptchd3</i>	4 do 14	14-, 12-, 10-, 8- vs. 4	x	NS	tak
<i>Kcnip1</i>	8 do 14	14-, 12-, 10-, 8- vs. 4	x	NS	tak
<i>Fgf23</i>	8 do 14	14-, 12-, 10-, 8- vs. 4	x	NS	tak
<i>Atp6v0a4</i>	8 do 14	14-, 12-, 10-, 8- vs. 4	x	NS	x
<i>Fgf21</i>	8 do 14	14-, 12-, 10-, 8- vs. 4	x	NS	x
<i>Adm2</i>	8 do 14	14-, 12-, 10-, 8- vs. 4	x	NS	x
<i>Aldob</i>	4 do 14	14-, 12-, 10- vs. 4	x	NS	tak
<i>Spr1a</i>	4 do 14	14-, 12-, 10- vs. 4	x	NS	x
<i>Acsm5</i>	4 do 14	14-, 12-, 10- vs. 4	x	NS	x
<i>Chodl</i>	10 do 14	14-, 12-, 10- vs. 4	x	NS	tak
<i>Cyp2b10</i>	4 do 14	10-, 8- vs. 4	x	x	x
<i>Klk1b26</i>	4 do 14	12 vs. 4	x	x	x
<i>Mid1-ps1</i>	4 do 14	x	x	x	x
<i>4833412C05Rik</i>	4 do 14	14-, 12-, 10-, 8- vs. 4	10 vs. 4	NS	x
<i>Nppa</i>	4 do 14	14-, 12-, 10-, 8- vs. 4	10 vs. 4	NS	x
<i>Scd4</i>	4 do 14	14-, 12-, 10- vs. 4	12 vs. 4	NS	x
<i>Gdf15</i>	4 do 14	14-, 12-, 10-, 8- vs. 4	14-, 10- vs. 4	GS-S	x
<i>Clcn1</i>	4 do 14	14-, 12-, 10-, 8- vs. 4	14 vs. 4	GS	tak
<i>Tmprss4</i>	4 do 14	x	14-, 12-, 10-, 8- vs. 4	GS-S	x
<i>F830016B08Rik</i>	8, 10, 14	x	14 vs. 4	GS	x

Tabela 11. Tabela przedstawia 20 wyselekcjonowanych genów, które silnie różnicowały transkryptomy serc myszy Tgaq*44 od transkryptomów serc myszy FVB. W tabeli przedstawiono 20 genów, które wystąpiły w ≥2 grupach wiekowych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB wśród 10 genów, których wartość różnicowej ekspresji była najwyższa lub najniższa. Dla 20 wyselekcjonowanych genów przedstawiono w jakich grupach wiekowych spełniają założone kryteria dla różnicowej ekspresji w analizach Tgaq*44 vs. FVB, Tgaq*44 vs. Tgaq*44, FVB vs. FVB. Przyporządkowano 20 wyselekcjonowanych genów odpowiednio do „genów starego serca”, „genów starzenia” się serca, „genów niewydolności serca”. Wskazano również, które z 20 wyselekcjonowanych genów wystąpiło w ≥2 grupach wiekowych myszy w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44 wśród 10 genów, których wartość różnicowej ekspresji była najwyższa lub najniższa. Legenda: czerwone pole – DEGs, których ekspresja była w górę; niebieskie pole – DEGs, których ekspresja była w dół; NS – „gen niewydolności serca”; GS – „gen starego serca”; GS-S – „gen starzenia” się serca.

gen	nazwa	opis	funkcja	ref.
Ptchd3	(ang. <i>patched domain containing 3</i>)	gen specyficzny dla męskiej komórki rozrodczej; przewiduje się, że będzie miał aktywność receptora Hedgehog	nieistotny gen w rozwoju myszy	A
Kcnp1	białko 1 oddziałujące z kanałem potasowym (ang. <i>potassium voltage-gated channel interacting protein 1</i>)	koduje białko KCHIP1 (małe cytozolowe białko wiążące wapń oraz podjednostka pomocnicza kompleksu białkowego Kv4.3 kanału potasowego w neuronach, która moduluje prąd neuronowy typu A Kv4.3 bramkowany napięciem; potwierdzono jego obecność w przedsionkach)	pośredniczy przez wapń w regulacji kanału potasowego	B
Fgf23	czynnik 23 wzrostu fibroblastów (ang. <i>fibroblast growth factor 23</i>)	hormon fosfaturowy wydzielany głównie przez osteocyty w celu utrzymania homeostazy fosforanowej i mineralnej; również syntetyzowany i wydzielany w sercu	promuje hipertrofię kardiomiocytów; jego poziom wzrasta w czasie przebudowy serca oraz niewydolności serca; stymuluje czynniki profibrotyczne w miocytach do indukcji szlaków związanych z włóknieniem w fibroblastach, a w konsekwencji prowadząc do zwłóknienia serca; przyczynia się do uszkodzenia serca; zwiększa wewnątrzkomórkowy poziom wapnia w kardiomiocytach i przyczynia się do ich kurczliwości; może wywołać dysfunkcję śródbłonna; wywołuje stan zapalny w sercu; zaangażowany w aktywację lokalną układu renina-angiotensyna-aldosteron	C
Atp6v0a4	(ang. <i>ATPase H⁺ transporting V0 subunit A4</i>)	H ⁺ -ATPaza typu wakuolarnego; główne białko wydzielające H ⁺ w dystalnej części nefronu	zaangażowany w wydzielanie H ⁺ (generowanie wodorowęglanów) lub reabsorpcję H ⁺ (wydzielanie wodorowęglanów); V-H ⁺ -ATPazy biorą udział w reabsorpcji HCO ₃ ⁻ w kanalikule proksymalnym i dystalnym	D
Fgf21	czynnik 21 wzrostu fibroblastów (ang. <i>fibroblast growth factor 21</i>)	białko wydzielnicze, które działa jako regulator metaboliczny i odgrywa rolę w kontroli homeostazy glukozy, wrażliwości na insulinę i ketogenezy; głównie produkowany w wątrobie, ale również w kardiomiocytach	zaangażowany w regulację czynności serca; chroni przed hipertrofią serca, zapaleniem serca i stresem oksydacyjnym; jego ekspresja wzrasta w odpowiedzi na hipertrofię serca i w niewydolnym sercu; hamuje apoptozę kardiomiocytów; zaangażowany w modulowanie metabolizmu lipidów w sercu; biomarker chorób serca; może chronić przed uszkodzeniem serca	E
Adm2	adrenomedulina 2 (ang. <i>adrenomedullin 2</i>)	krótki peptyd; należy do rodziny adrenomedullin i nadrodziny CGRP; również nazywany intermedyną	czynnik protekcyjny przeciwko chorobom kardiometabolicznym; odgrywa rolę w homeostazie sercowo-naczyniowej; reguluje hemodynamikę ogólnoustrojową; zwiększa rzut serca; posiada dodatni efekt inotropowy; działa wazodylatacyjnie; ma efekt pro-angiogeny; jego ekspresja zwiększona w czasie przerostu serca i niewydolności serca	F

Tabela 12a. Tabela przedstawia funkcje biologiczne dla każdego z 20 genów, które wystąpiły w ≥ 2 grupach wiekowych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB wśród 10 genów, których wartość różnicowej ekspresji była najwyższa lub najniższa. Referencje: A - (160), B - (161), C - (162), D - (163), E - (164), F - (165).

gen	nazwa	opis	funkcja	ref.
Aldob	aldolaza, fruktozo-bisfosforan B (ang. <i>aldolase, fructose-bisphosphate B</i>)	aldolaza B; kluczowy enzym szlaków glukoneogennych i glikolitycznych	katalizuje odwracalną konwersję fruktozo-1,6-bisfosforanu do aldehydu 3-fosfoglicerynowego i fosfodihydroksyacetonu;	A
Sprr1a	małe białko 1A bogate w prolinę (ang. <i>small proline rich protein 1A</i>)	koduje białko SPRR1A; indukowany stresem mediator cytokin gp130 w kardiomiocytach	działa kardioprotekcyjne przeciwko stresowi związanemu z niedokrwieniem serca	B
Acsn5	(ang. <i>acyl-CoA synthetase medium chain family member 5</i>)	syntetaza Acyl-CoA	metabolizm lipidów	C
Chodl	chondrolektyna (ang. <i>chondrolectin</i>)	koduje transbłonowe białko N-glikozylowane typu I zawierające pojedynczą domenę rozpoznającą węglowodany (CRD) dla lektyn typu C w regionie zewnątrzkomórkowym	rozpoznawanie komórek, aktywacja dopełniacza, rozwój embrionalny, regulacja immunologiczna; ulega wysokiej ekspresji w neuronach motorycznych	D
Cyp2b10	(ang. <i>cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 10</i>)	typowy enzym cytochromu P450	enzym odpowiedzialny za metabolizm i detoksykację ksenobiotyków/leków	E
Klk1b26	(ang. <i>kallikrein 1-related peptidase b26</i>)	enzym konwertujący proreninę, należy do rodziny genów kallikrein	uczestniczy w dojrzewaniu naskórkowego czynnika wzrostu (EGF) i reniny	F, G
Mid1-ps1	(ang. <i>midline 1, pseudogene 1</i>)	pseudogen	x	x
4833412C05Rik	x	długi niekodujący RNA, nazwany <i>Ahit - ang. Antihypertrophic interrelated transcript</i>	działanie przeciwhipertroficzne w sercu	H

Tabela 12b. Tabela przedstawia funkcje biologiczne dla każdego z 20 genów, które wystąpiły w ≥ 2 grupach wiekowych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB wśród 10 genów, których wartość różnicowej ekspresji była najwyższa lub najniższa. Referencje: A - (166), B - (167), C - (168), D - (169), E - (170), F - (171), G - (172), H - (173).

gen	nazwa	opis	funkcja	ref.
Nppa	przedsionkowy peptyd natriuretyczny (<i>ang. atrial natriuretic peptide</i>)	hormon sercowy, który reguluje równowagę wodno-mineralną i ciśnienie krwi, promując wydalanie sodu i wody przez nerki	stymuluje rozszerzenie naczyń krwionośnych; obniża ciśnienie krwi; działa przeciwko hipertrofii serca; reguluje funkcję serca; biomarker chorób serca; uczestniczy w regulacji przebudowy naczyń i regulacji metabolizmu energetycznego	A
Scd4	desaturaza 4 stearoilo-CoA (<i>ang. stearyl-coenzyme A desaturase 4</i>)	specyficzna dla serca izoforma desaturazy stearoilo-CoA	odgrywa istotną rolę w biosyntezie nienasyconych kwasów tłuszczowych	B, C
Gdf15	czynnik różnicowania wzrostu 15 (<i>ang. growth differentiation factor 15</i>)	cytokina odpowiedzi na stres, występująca w układzie sercowo-naczyniowym; należy do rodziny cytokin transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β)	biomarker zwłóknienia mięśnia sercowego i chorób układu krążenia; integruje informacje ze szlaków chorób serca i chorób pozasercowych, które są powiązane z występowaniem, progresją i rokowaniem niewydolności serca; odgrywa rolę w przeciwdziałaniu uszkodzeniom w gwałtownych urazach układu sercowo-naczyniowego	D, E
Cln1	kanal chlorkowy 1 bramkowany napięciem (<i>ang. chloride voltage-gated channel 1</i>)	koduje kanał chlorkowy w mięśniach szkieletowych ClC-1	odpowiada za około 80% przewodnictwa spoczynkowego błony w nieaktywnych włóknach mięśniowych; kontroluje pobudliwość pracujących mięśni	F, G
Tmprss4	transmembranowa proteaza serynowa 4 (<i>ang. transmembrane serine protease 4</i>)	koduje transmembranową proteazę serynową 4	bierze udział w tranzycji nabłonkowo-mezenchymalnej; może aktywować nabłonkowy kanał sodowy (ENaC)	H
F830016B08Rik (inna nazwa Ifgga4)	GTPazy związane z odpornością (<i>ang. immunity-related GTPases</i>)	członek rodziny GTPaz związanych z odpornością	chroni przed stłuszczeniem wątroby	I

Tabela 12c. Tabela przedstawia funkcje biologiczne dla każdego z 20 genów, które wystąpiły w ≥ 2 grupach wiekowych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB wśród 10 genów, których wartość różnicowej ekspresji była najwyższa lub najniższa. Referencje: A - (174), B - (175), C - (176), D - (130), E - (131), F - (177), G - (178), H - (156), I - (179).

4.5.9 Charakterystyczne geny w transkryptomie serc myszy Tgaq*44 na poszczególnych etapach rozwoju niewydolności serca

W celu zidentyfikowania charakterystycznych genów na poszczególnych etapach rozwoju niewydolności serca u myszy Tgaq*44 wyselekcjonowano w analizie Tgaq*44 vs. FVB po 10 genów, których wartość różnicowej ekspresji w łącznej analizie była najwyższa lub najniższa w grupach wiekowych myszy:

- 1.) od wczesnego do końcowego etapu niewydolności serca (4-14-miesięczne myszy),
- 2.) od przejściowego do końcowego etapu niewydolności serca, ale nie na wczesnym etapie (8-14-miesięczne myszy, ale nie 4-miesięczne myszy),

3.) jedynie w końcowych miesiącach życia myszy Tgaq*44 obejmujących głównie końcowy etap niewydolności serca (10-14-miesięczne myszy, ale nie 4-8-miesięczne myszy)(Tabela 13).

Sprawdzono również czy pośród tak wyselekcjonowanych genów znajdują się wcześniej zidentyfikowane „*geny niewydolności serca*” (Tabela 11, 13).

Wśród charakterystycznych genów na poszczególnych etapach rozwoju niewydolności serca myszy Tgaq*44 znalazło się aż 11 wcześniej zidentyfikowanych „*genów niewydolności serca*” (*Sprrr1a*, *Nppa*, *4833412C05Rik*, *Aldob*, *Acsm5*, *Fgf23*, *Fgf21*, *Adm2*, *Atp6v0a4*, *Kcnp1*, *Chodl*, tabela 13). Mogą one zostać uznane, jako potencjalnie nowe markery genetyczne wskazujące na pojawienie się wczesnego etapu niewydolności serca (*Sprrr1a*, *Nppa*, *4833412C05Rik*, *Aldob*, *Acsm5*), przejściowego etapu niewydolności serca (*Fgf23*, *Fgf21*, *Adm2*, *Atp6v0a4*, *Kcnp1*) oraz końcowego etapu niewydolności serca (*Chodl*).

Top 10 DEGów, które bardzo silnie różnicowały transkryptomy serc myszy Tgaq*44 od transkryptomów serc myszy FVB na określonych etapach niewydolności serca u myszy Tgaq*44					
wczesny, przejściowy i końcowy etap niewydolności serca u myszy Tgaq*44		przejściowy i końcowy etap niewydolności serca u myszy Tgaq*44, ale nie wczesny etap		jedynie końcowe miesiące życia myszy Tgaq*44 obejmujące głównie końcowy etap niewydolności serca	
wspólne DEGy dla 4, 8, 10, 12, 14 miesiąca		wspólne DEGy dla 8, 10, 12, 14 miesiąca, ale nie dla 4 miesiąca		wspólne DEGy dla 10, 12, 14 miesiąca, ale nie dla 4-8 miesiąca	
DEGs, których ekspresja była w górę	DEGs, których ekspresja była w dół	DEGs, których ekspresja była w górę	DEGs, których ekspresja była w dół	DEGs, których ekspresja była w górę	DEGs, których ekspresja była w dół
<i>Sprrr1a</i>	<i>Aldob</i>	<i>Fgf23</i>	<i>Spata20</i>	<i>Tnmd</i>	<i>Uts2r</i>
<i>Nppa</i>	<i>Cyp2b10</i>	<i>4930438A08Rik</i>	<i>Mettl116</i>	<i>Chodl</i>	<i>Zfp750</i>
<i>4833412C05Rik</i>	<i>Klk1b26</i>	<i>Sh2d6</i>	<i>Gm19277</i>	<i>Ptx4</i>	<i>Gm23312</i>
<i>Cilp</i>	<i>Mid1-ps1</i>	<i>Slc7a3</i>	<i>Ces1d</i>	<i>Dlx6</i>	<i>Uckl1os</i>
<i>Col12a1</i>	<i>Gm31600</i>	<i>Vmn2r3</i>	<i>Retnla</i>	<i>Rims2</i>	<i>Mir208b</i>
<i>Ltbp2</i>	<i>Lgi1</i>	<i>Fgf21</i>	<i>Kcnp1</i>	<i>Col22a1</i>	<i>Tuba3b</i>
<i>Egr2</i>	<i>Slc5a1</i>	<i>Pscs</i>	<i>Vwc2</i>	<i>Col11a1</i>	<i>Ky</i>
<i>Timp1</i>	<i>Pfkfb1</i>	<i>Adm2</i>	<i>Cib3</i>	<i>Myh8</i>	<i>Gm30382</i>
<i>Egr3</i>	<i>Helt</i>	<i>Atp6v0a4</i>	<i>2410137M14Rik</i>	<i>Lgi2</i>	<i>Bmp7</i>
<i>Tubb3</i>	<i>Acsm5</i>	<i>Crfl1</i>	<i>Irgm2</i>	<i>Ryr3</i>	<i>Gm10639</i>

Tabela 13 Tabela przedstawia geny, które silnie różnicowały transkryptomy serc myszy Tgaq*44 od transkryptomów serc myszy FVB na określonych etapach niewydolności serca u myszy Tgaq*44. Tabela prezentuje po 10 DEGów z analizy Tgaq*44 vs. FVB, których wartość różnicowej ekspresji w łącznej analizie była najwyższa lub najniższa w grupach wiekowych myszy od wczesnego do końcowego etapu niewydolności serca (4-14-miesięczne myszy), od przejściowego do końcowego etapu niewydolności serca, ale nie na wczesnym etapie (8-14-miesięczne myszy, ale nie 4-miesięczne myszy), jedynie w końcowych miesiącach życia myszy Tgaq*44 obejmujących głównie końcowy etap niewydolności serca (10-14-miesięczne myszy, ale nie 4-8-miesięczne myszy). Kolorem zielonym zaznaczono „*geny niewydolności serca*”.

Podsumowując, szeroka analiza danych transkryptomicznych obejmująca analizy różnicowej ekspresji genów w różnych grupach wiekowych myszy (analizowanych osobno i wspólnie) i w różnych typach analiz (FVB vs. FVB, Tgαq*44 vs. Tgαq*44, Tgαq*44 vs. FVB) pozwoliła wskazać istotne geny w procesie starzenia się serca, rozwoju niewydolności serca (również dla poszczególnych jego etapów). Takie podejście, tzn. biorące pod uwagę kilka etapów procesu starzenia się serca i rozwoju niewydolności serca pozwala z większym prawdopodobieństwem uniknąć błędu wskazania genów, które nie mają istotnego znaczenia w tych procesach, a które mogłyby się takimi okazać przy zawężonej analizie (młoda mysz vs. stara mysz oraz zdrowa mysz vs. chora mysz). Zidentyfikowano geny *Tnf* i *Hif3a* istotne w procesie starzenia się myszy FVB (**Tabela 8**). Dzięki zgromadzeniu informacji o określonych genach z analiz Tgαq*44 vs. FVB, FVB vs. FVB, Tgαq*44 vs. Tgαq*44 udało się zidentyfikować 13 „genów niewydolności serca” (*Ptchd3*, *Kcnip1*, *Fgf23*, *Atp6v0a4*, *Fgf21*, *Adm2*, *Aldob*, *Spr1a*, *Acsm5*, *Chodl*, *4833412C05Rik*, *Nppa*, *Scd4*, **tabela 11**), z których 11 stanowiło również geny charakterystyczne dla poszczególnych etapów niewydolności serca myszy Tgαq*44 (**Tabela 13**), potencjalnie czyniąc je genetycznymi markerami tych etapów rozwoju niewydolności serca. Wykorzystanie dwóch sposobów do wyselekcjonowania genów związanych z procesem starzenia się serca w analizie Tgαq*44 vs. FVB umożliwiło wskazać 8 „genów starego serca” i 26 „genów starzenia” się serca, które były istotnie zaangażowane w proces starzenia się serca myszy Tgαq*44 w toku rozwoju niewydolności serca od jego wczesnego aż do końcowego etapu (**Ryc. 42 B, C**) oraz 4 genów (*Clcn1*, *Gdf15*, *Tmprss4*, *F830016B08Rik*), które były bardzo silnie zaangażowane w proces starzenia się serca myszy Tgαq*44 (**Tabela 11**). Połączenie wyników z tych dwóch analiz umożliwiło wskazać 3 geny (*Clcn1*, *Gdf15* i *Tmprss4*), które były bardzo silnie zaangażowane w proces starzenia się serca myszy Tgαq*44 w toku rozwoju niewydolności serca.

5. Dyskusja

W niniejszej pracy doktorskiej podjęto próbę znalezienia wczesnych wyznaczników starzejącego się serca (na poziomie funkcjonalnym, morfologicznym, hormonalnym i transkryptomicznym) w rozwoju niewydolności serca oraz opisania wzajemnych zależności pomiędzy procesem starzenia się serca, a rozwojem niewydolności mięśnia sercowego. Poszukiwano więc charakterystycznych zmian w procesie starzenia się zdrowego serca myszy FVB i szukano później ich obecności w sercach myszy Tgaq*44 na wczesnym i końcowym etapie rozwoju niewydolności serca.

W pracy doktorskiej wykazano, że proces starzenia się serca stopniowo postępował u myszy FVB i doprowadził do pojawienia się w 16 miesiącu życia dysfunkcji rozkurczowej serca, która nie była związana ze zmianami w budowie aparatu kurczliwego serca, lecz mogła być wywołana zwiększonym włóknieniem mięśnia sercowego oraz zwiększonym odkładaniem macierzy zewnątrzkomórkowej wokół kapilar wieńcowych. Zwiększone z wiekiem włóknienie i przebudowa macierzy zewnątrzkomórkowej w sercu myszy FVB nie były związane z aktywnością szlaku renina-angiotensyna-aldosteron i nie wywołały zmian w budowie śródbłonna kapilar wieńcowych, ułożeniu kapilar wieńcowych względem kardiomiocytów, odległości kapilar względem siebie oraz wielkości światła kapilar. Natomiast, doprowadziły one do zaburzenia układu kardiomiocytów we włóknie mięśniowym, upośledzenia podstawowego przepływu wieńcowego, jak również do upośledzenia odpowiedzi naczyń wieńcowych na wzrastające obciążenie serca. Rezerwa wieńcowa i reaktywność naczyń wieńcowych na związki naczyniorozszerzające (bradykininę i adenozyne) były jednak zachowane do 12 miesiąca życia myszy FVB. Proces starzenia się serca u 14-miesięcznych myszy FVB doprowadził do zmniejszenia relatywnej liczby limfocytów w obrazie morfologicznym krwi, jak i gwałtownej aktywacji genów (nazwanych „*genami starego serca*”) oraz procesów biologicznych (nazwanych „*procesami starego serca*”) w sercu związanych ze starzeniem się serca. Wykazano również, że istotne znaczenie w procesie starzenia się serca myszy FVB mogą mieć geny *Tnf* i *Hif3a*.

Rozwój niewydolności serca u myszy Tgaq*44 spowodował już u 4-miesięcznych myszy upośledzenie czynności serca, która miała charakter zarówno skurczowej, jak i rozkurczowej niewydolności i uległa ona dalszemu pogłębieniu na końcowym etapie niewydolności serca. Na poziomie morfologicznym w sercach 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 zidentyfikowano intensywny proces włóknienia śródmiąższowego i okołokapilarnego, zwiększone odkładanie macierzy zewnątrzkomórkowej (w dużym stopniu złożonej z białek

niefibrylarnych), pogrubienie blaszki podstawnej, upośledzenie budowy aparatu kurczliwego serca (zwiększenie rozmiarów miofibryli, zmianę układu przestrzennego miofibryli, redukcję ilości kanalików T oraz nieprawidłową budową wstawek między kardiomiocytami). U 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 zwiększone włóknienie wywołało już zmiany w układzie kardiomiocytów we włóknie mięśniowym, w układzie kapilar względem kardiomiocytów (z równoległego względem kardiomiocytów na „oplatający” kardiomiocyty), w odległości kapilar względem siebie (ich dystansowaniem się) oraz doprowadziło do zwiększenia całkowitej powierzchni światła kapilar. Intensywny proces włóknienia serca myszy Tgaq*44 na wczesnym etapie rozwoju niewydolności serca mógł być związany ze zwiększoną aktywnością ACE w sercu widoczną już w sercach 4-miesięcznych myszy Tgaq*44, a na końcowym etapie niewydolności serca (u 14-miesięcznych myszy Tgaq*44) mógł być nasilony przez zwiększoną aktywność systemową układu RAAS (widoczną poprzez wzrost stężenia aldosteronu we krwi).

W toku rozwoju niewydolności serca myszy Tgaq*44 obecny był progresywny spadek podstawowego przepływu wieńcowego, a na końcowym etapie niewydolności towarzyszyły jej zmiany ultrastruktury śródbłonna, upośledzenie odpowiedzi naczyń wieńcowych na wzrastające obciążenie serca oraz upośledzenie rezerwy wieńcowej. Jednak na wcześniejszych etapach niewydolności serca (do 11 miesiąca życia myszy Tgaq*44) odpowiedzi na związki naczyniorozszerzające: bradykininę i adenozyne nie były upośledzone. Pogłębieniu upośledzenia czynności serca na końcowym etapie niewydolności serca u myszy Tgaq*44 towarzyszyła zaburzona budowa sarkomerów (zwiększona odległość między filamentami aktynowymi i miozynowymi), jak również zaburzone ułożenie sarkomerów względem siebie. Również na końcowym etapie niewydolności serca w obrazie morfologicznym krwi uległa zmniejszeniu relatywna liczba limfocytów.

Zmiany w transkryptomie serc myszy Tgaq*44 były w głównej mierze wywołane rozwojem niewydolności serca i tylko część z nich była związana z procesem starzenia się serca. Dzięki wykorzystaniu kilku analiz transkryptomicznych jednocześnie zidentyfikowano 13 „genów niewydolności serca” (*Fgf23*, *Atp6v0a4*, *Fgf21*, *Adm2*, *Sprr1a*, *Chodl*, *4833412C05Rik*, *Nppa*, *Ptchd3*, *Kcnip1*, *Aldob*, *Acsn5*, *Scd4*) i uznano, za najbardziej zmienione geny w wyniku rozwoju niewydolności serca myszy Tgaq*44. Część z nich odpowiadała za procesy adaptacyjne, a część za procesy maladaptacyjne niewydolności serca. Każdy etap niewydolności serca myszy Tgaq*44 charakteryzował się pojawieniem specyficznej puli genów, a „geny niewydolności serca” jak: *Sprr1a*, *Nppa*, *4833412C05Rik*, *Aldob*, *Acsn5* uznano za charakterystyczne dla wczesnego etapu niewydolności serca; geny

Fgf23, *Fgf21*, *Adm2*, *Atp6v0a4*, *Kcnip1* dla przejściowego etapu niewydolności serca; gen *Chodl* dla końcowego etapu niewydolności serca.

Charakterystycznymi cechami starego serca w niewydolności serca u myszy *Tgaq*44* było upośledzenie czynności rozkurczowej serca, u którego podłoża mogły leżeć zwiększone włóknienie śródmiąższowe i okołokapilarne, zwiększona akumulacja komponentów macierzy zewnątrzkomórkowej, pogrubienie blaszki podstawnej, upośledzenie podstawowego przepływu wieńcowego, upośledzenie reaktywności naczyń wieńcowych na wzrastające obciążenie serca. W obrazie morfologicznym krwi myszy *Tgaq*44* przedwcześnie aktywowany proces starzenia odznaczał się spadkiem relatywnej liczby limfocytów. Najważniejszym znaleziskiem tej pracy było wykazanie, że niewydolność serca powoduje przyspieszenie procesu starzenia się serca oraz uruchamia trwałą aktywację (ekspresji w górę lub dół) „genów starego serca” (*Sfrp2*, *Egr2*, *Panx1*, *Krt18*, *Timp1*, *Clcn1*, *Adamts3*, *Nrg1*) oraz „genów starzenia” się serca (*Pah*, *Amtn*, *Gdf15*, *Itga11*, *Map6*, *Cdkn1a*, *Gm31600*, *Tmem52*, *Meox1*, *Fbln7*, *Gng8*, *Gpnmb*, *BB123696*, *Rasd1*, *Tent5b*, *Nppb*, *Ano5*, *Dkk3*, *Tmprss4*, *Clec4n*, *Kcnk1*, *Gm29040*, *Slc5a1*, *Clec18a*, *Cilp*, *Egr3*) w transkryptomie serc 4-14-miesięcznych myszy *Tgaq*44*. Rozwój niewydolności serca u myszy *Tgaq*44* trwale uruchomił 8 „procesów starzenia” się serca („aktywność cytokin”, „adhezja komórkowa”, „transdukcja sygnału”, „regulacja aktywności receptorów sygnalizacyjnych”, „aktywność receptora sprzężonego z białkiem G”, „szlak sygnałowy receptora sprzężonego z białkiem G”, „przestrzeń zewnątrzkomórkowa”, „region zewnątrzkomórkowy”) w transkryptomie serc 4-14-miesięcznych myszy *Tgaq*44*. Uruchomienie przedwczesnych procesów starzenia się serca u młodych myszy *Tgaq*44* nie było związane z systemową aktywacją układów neurohormonalnych patofizjologii niewydolności serca, które pojawiły się u myszy *Tgaq*44* na końcowym etapie niewydolności serca, częściowo mogło jednak mieć związek z szlakami sygnalizacyjnymi uruchamianymi przez aktywne białka $\alpha q*44$.

W sumie wykazano, że zmiany w sercach myszy *Tgaq*44* na wczesnym etapie niewydolności serca były związane zarówno z modyfikacją genetyczną w kardiomiocycie, jak i przedwczesnym uruchomieniem procesów starzenia się serca. W dalszych częściach dyskusji omówiono szczegółowo zachodzące zmiany na poziomie funkcjonalnym (**rozdz. 5.2; 5.5**), morfologicznym (**rozdz. 5.3; 5.4; 5.7**), hormonalnym (**rozdz. 5.6**) i transkryptomycznym (**rozdz. 5.8**) w trakcie procesu starzenia się serca myszy FVB oraz w toku rozwoju niewydolności serca myszy *Tgaq*44*.

5.1 Mysi model niewydolności serca - mysz Tgαq*44

W niniejszej pracy doktorskiej wykorzystano model myszy Tgαq*44, rozwijający niewydolność serca wywołaną przez sercowo-specyficzną nadekspresję białka Gaq (HAαq*), prowadzącą do stałej aktywacji szlaków neurohormonalnych związanych z receptorami dla angiotensyny II (AT₁), endoteliny-1 (ET_A) i noradrenaliny (α₁) (92). Rozwój niewydolności serca w sercach myszy Tgαq*44 naśladuje rozwój niewydolności serca u ludzi na poziomie molekularnym, morfologicznym, fenotypowym i funkcjonalnym (89,92,184,185,93–96,180–183). Co najważniejsze, jednak długi okres rozwoju niewydolności serca z wyodrębnionym wczesnym (4-6 miesiąc życia), przejściowym (8-10 miesiąc życia) oraz końcowym etapem niewydolności serca (12-17 miesiąc życia) umożliwia śledzenie zmian towarzyszących kolejnym etapom rozwoju niewydolności serca na poziomie funkcjonalnym, morfologicznym, hormonalnym, transkryptomicznym.

Już w sercach 4-miesięcznych myszy Tgαq*44 następuje znaczące zwłóknienie mięśnia sercowego oraz hipertrofia miocytów z towarzyszącą aktywacją genów fenotypu płodowego (ANP, BNP i MHC-β)(92,94,184). Globalna funkcja serca jest relatywnie w niewielkim stopniu zmieniona do 6 miesiąca życia myszy Tgαq*44, a rezerwa sercowa jest w pełni zachowana. U myszy Tgαq*44 w wieku 6-10 miesięcy następuje stopniowe pogorszenie funkcji skurczowej serca z widocznym obniżeniem kurczliwości. Natomiast rezerwa sercowa, w odpowiedzi na dobutaminę jest ciągle niezmieniona. W 10-12 miesiącu życia myszy Tgαq*44 widoczne jest już głębokie upośledzenie globalnej funkcji serca, zarówno skurczowej jak i rozkurczowej oraz obniżenie rezerwy sercowej w odpowiedzi na dobutaminę (93).

U myszy Tgαq*44 aż do 10 miesiąca życia utrzymuje się zwiększona aktywność szlaku ACE-2/angiotensyna-(1-7) w osoczu, sercu, aorcie i ulega ona zmianie w 12 miesiącu życia na rzecz zwiększenia aktywności szlaku ACE/angiotensyna II (93). Od 10 miesiąca życia myszy Tgαq*44 widoczne są w kardiomiocytach i śródbłonku naczyń wieńcowych modyfikacje związane ze stresem oksydacyjnym (89). Na końcowym etapie rozwoju niewydolności serca myszy Tgαq*44 obecne są w sercu zaburzenia w układzie desminy (184), budowie mitochondriów (185), występuje obrzęk płuc (185) oraz upośledzona jest zależna od NO regulacja przepływu wieńcowego (181).

Dodatkowo, rozwojowi niewydolności serca myszy Tgαq*44 towarzyszy rozwój zaburzeń poznawczych widocznych już w 6 miesiącu życia, które wynikają z aktywacji zapalnej śródbłonka naczyń krwionośnych w mózgu, zwiększonej przepuszczalności bariery

kręgowców, aktywacji stresu oksydacyjnego, jak i gromadzenia się β -amyloidu w korze mózgowej (182).

Podsumowując, myszy Tgαq*44 stanowią dobry zwierzęcy model przewlekłej niewydolności serca, który naśladuje mechanizm progresji niewydolności serca u ludzi i umożliwia lepsze zrozumienie mechanizmów związanych ze starzejącym się sercem w niewydolności serca.

5.2 Funkcja serca w procesie starzenia się myszy FVB oraz na wczesnym i końcowym etapie niewydolności serca u myszy Tgαq*44

Dysfunkcja rozkurczowa będąca charakterystyczna dla fenotypu starego serca (50) uwidoczniła się w sercach 16-miesięcznych myszy FVB na podstawie spadku szybkości napełniania i wskaźnika E/A, pomimo nie zmienionych parametrów dla naprężeń radialnych i obwodowych. Z kolei, dotychczasowe badania czynności serca wykonane na myszach kontrolnych FVB nie wykazały żadnych zmian funkcji serca zależnych od wieku aż do 14 miesiąca życia (184).

Już w sercach 4-miesięcznych myszy Tgαq*44 wykazano upośledzoną globalną funkcję serca zarówno dla fazy skurczowej i rozkurczowej widoczną na podstawie zwiększonych wartości dla objętości końcowo-skurczowej, szybkości napełniania, czasu skurczu izowolumetrycznego oraz zmniejszonych wartości dla frakcji wyrzutowej, objętości wyrzutowej, rzutu serca, indeksu sercowego. Z kolei, w sercach 12-miesięcznych myszy Tgαq*44 nastąpiło dalsze upośledzenie globalnej funkcji serca, zarówno skurczowej (widocznej na podstawie spadku objętości wyrzutowej, frakcji wyrzutowej, rzutu serca, indeksu sercowego, wartości czasu wyrzutu), jak i rozkurczowej (widocznej na podstawie spadku objętości końcowo-rozkurczowej). Zaobserwowane zmiany w czynności serca u 4-miesięcznych myszy Tgαq*44 różniły się od dotychczasowo uzyskanych wyników funkcji hemodynamicznej serca myszy Tgαq*44 - wykazywały one stosunkowo większe upośledzenie niż we wcześniejszych analizach, natomiast u 12-miesięcznych myszy Tgαq*44 wyniki były podobne (93,184).

W niniejszej pracy funkcja rozkurczowa komór serca myszy Tgαq*44 nie mogła zostać określona na podstawie wskaźnika E/A, gdyż nie mógł on zostać obliczony z powodu upośledzonej funkcji przedsionków myszy Tgαq*44, która zaburzała obraz wypełnienia przedsionków podczas rozkurczu. Upośledzenie czynności rozkurczowej komór serca zostało jednak stwierdzone na podstawie wysokiej wartości szybkości napełniania komór u 4-

miesięcznych myszy Tgαq*44, które wskazywało na charakter restrykcyjnego upośledzenia rozkurczowego komór (186). Spadek wartości dla niektórych parametrów naprężeń radialnych i obwodowych w sercach 4-miesięcznych myszy Tgαq*44 w porównaniu do 4- i 16-miesięcznych myszy FVB sugerował występowanie hipertrofii i zwłóknienia lewej komory serca myszy Tgαq*44, gdyż spadek wartości odkształceń radialnych i obwodowych u pacjentów na wczesnym etapie kardiomiopatii przerostowej był powiązany ze zwiększoną hipertrofią i zwłóknieniem serca (187). Interesujący jest fakt, że niewydolność rozkurczowa lewej komory, charakterystyczna dla fenotypu starego serca pojawiła się wcześniej u myszy Tgαq*44 (w 4 miesiącu życia), niż w modelach zwierzęcych przyspieszonego starzenia: myszy SAMP8 (w 6 miesiącu życia)(188), myszy CBK (w 7 miesiącu życia)(189), sugerując iż model myszy Tgαq*44 jest dobrym modelem zwierzęcym do śledzenia wczesnych zmian starczych w toku rozwoju niewydolności serca.

5.3 Zmiany makroskopowe towarzyszące procesowi starzenia się myszy FVB oraz rozwojowi niewydolności serca myszy Tgαq*44

W procesie starzenia się serca myszy FVB nie nastąpiło zwiększenie masy przedsionków. U myszy Tgαq*44 rozwój niewydolności serca był związany ze wzrostem masy przedsionków, głównie lewego (widocznym makroskopowo, dane niezaprezentowane), którego przerost potwierdzono w rozwoju niewydolności serca w kilku mysich modelach eksperymentalnych niewydolności serca (190).

Stosunek masy serca do średniej masy ciała nie wzrósł w trakcie starzenia się serca myszy FVB, natomiast u myszy Tgαq*44 wzrósł w wyniku rozwoju niewydolności serca dopiero na jego końcowym etapie, co było zbieżne z wynikami uzyskanymi przez Czarnowską E. i wsp. (183). Pomimo tego, iż w niniejszej pracy stosunek masy serca do średniej masy ciała był wyższy u myszy Tgαq*44 od 8 miesiąca życia w porównaniu do myszy FVB, to jego wartość była dopiero od 12 miesiąca życia zdeterminowana zwiększoną masą serca u myszy Tgαq*44 (głównie ze względu na wzrost masy przedsionków).

Stosunek masy serca do masy ciała jest stosowany do scharakteryzowania stopnia hipertrofii mięśnia sercowego (191), co sugeruje na podstawie uzyskanych wyników brak hipertrofii mięśnia sercowego w trakcie procesu starzenia się serca myszy FVB aż do 14 miesiąca życia, natomiast jej udział w rozwoju niewydolności serca myszy Tgαq*44 na jej końcowym etapie. Niemniej jednak w niniejszej rozprawie wnioski, które można wyciągnąć ze stosunku masy serca do masy ciała należy interpretować z ostrożnością, gdyż parametr ten został wyrażony w stosunku do średniej masy ciała. Związane to było z tym, że zestawiono ze

sobą masy serc, które były rutynowo mierzone po każdym eksperymencie na izolowanych perfundowanych sercach z masą ciała myszy zmierzoną jednorazowo przy okazji innych eksperymentów. W związku z tym stosunek masy serca do średniej masy ciała oddaje jedynie w przybliżeniu prawdziwą wartość dla stosunku masy serca do masy ciała dla myszy FVB i Tgaq*44.

W niniejszej pracy doktorskiej obraz procesu hipertrofii w sercu został uzyskany również dzięki zestawieniu ze sobą mas komórek i najmniejszych odległości między kapilarami biegnącymi wzdłuż włókien mięśniowych. Masa komórek, jak i ich wzrost masy w trakcie starzenia chronologicznego myszy Tgaq*44 i FVB były na podobnym poziomie, przy towarzyszącym wzroście najmniejszych odległości między kapilarami biegnącymi wzdłuż włókien mięśniowych tylko w sercach myszy Tgaq*44, a jego braku w sercach myszy FVB. Świadczyło to o tym, że jedynie w sercach myszy Tgaq*44 przy zachowanej masie komórek, jak u odpowiadających wiekiem myszy FVB, rozwijająca się niewydolność serca spowodowała ubywanie kardiomiocytów (w skutek ich obumierania) z jednoczesną odpowiedzią kompensacyjną aktywacji procesu hipertrofii w żywotnych kardiomiocytach, co nie miało miejsca w trakcie procesu starzenia się serca myszy FVB. Wydaje się więc, że proces hipertrofii kardiomiocytów w sercu był już widoczny w sercach 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 i był związany z uruchomieniem fenotypu płodowego w tym modelu (92,94) oraz z rozwijającą się niewydolnością serca.

5.4 Zmiany mikroskopowe mięśnia sercowego u starzejących się myszy FVB oraz na wczesnym i końcowym etapie niewydolności serca u myszy Tgaq*44

5.4.1 Włóknienie i depozycja komponentów macierzy zewnątrzkomórkowej

W starzejącym się sercu 14-miesięcznych myszy FVB wykazano zwiększone gromadzenie kolagenu oraz odkładanie się paS-pozytywnych struktur (glikogenu, glikoprotein, proteoglikanów) – komponentów macierzy zewnątrzkomórkowej, jak również zwiększenie grubości blaszki podstawnej. Rozwój niewydolności serca w sercach myszy Tgaq*44 od 4 do 14 miesięcy życia spowodował znacznie większe zmiany włóknienia, rozbudowy macierzy zewnątrzkomórkowej, grubości blaszki podstawnej w porównaniu do starzejących się serc myszy FVB od 4 do 14 miesięcy życia. Poziom włóknienia serca u 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 był podobny, jak w sercach 14-miesięcznych myszy FVB, natomiast rozbudowa macierzy zewnątrzkomórkowej i grubość blaszki podstawnej była już znacznie większa. Włóknienie, rozbudowę macierzy zewnątrzkomórkowej, pogrubienie blaszki podstawnej w

sercach młodych, 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 uznano za wyznaczniki przedwczesnego starzenia się serca na wczesnym etapie niewydolności serca.

Uzyskane w niniejszej rozprawie wyniki dla procesu włóknienia serca u 4-12-miesięcznych myszy Tgaq*44 i FVB są podobne do wyników uzyskanych przez Mackiewicz U. i wsp. (184). Natomiast różnią się tym, że jedynie w niniejszej rozprawie wykazano wzrost włóknienia w czasie starzenia się serca u 14-miesięcznych myszy FVB, a tego typu zmian nie przywiązywano wagi w poprzednich pracach. W przedstawionej pracy zdefiniowano również lokalizację rozwijającego się włóknienia.

Zarówno gromadzenie kolagenu, jak i komponentów macierzy zewnątrzkomórkowej w sercach 14-miesięcznych myszy FVB i 4-14-miesięcznych myszy Tgaq*44 miało charakter śródmiąższowy i okołokapilarny. We wcześniejszych pracach wykazano, że tego typu włóknienie serca pojawia się zarówno w fenotypie starego serca (192) oraz w niewydolności serca (193,194). Włóknienie śródmiąższowe w sercach 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 mogło być w głównej mierze wywołane przez modyfikację genetyczną w kardiomiocytach naśladującą chroniczną aktywację szlaku renina-angiotensyna w sercu (92), która sprzyja procesowi włóknienia (195). Natomiast w trakcie rozwoju niewydolności serca u myszy Tgaq*44 do nasilenia włóknienia serca mogły przyczynić się dodatkowo obumierające kardiomyocyty, gdyż wysyłane przez nie sygnały stymulują proces włóknienia serca w celu uzupełnienia uszkodzonej tkanki (192), mogło więc mieć charakter włóknienia zastępczego.

Początkowy stan włóknienia śródmiąższowego i okołokapilarnego serca może być odpowiedzią adaptacyjną serca, by zachować odpowiedni rzut serca (192). Natomiast z czasem włóknienie okołokapilarne doprowadza do zwiększenia sztywności komór serca, zmniejszenia odkształcalności serca (196), które obserwowane było w sercach osób starszych (197) oraz w niewydolności serca (193). W związku z tym, wydaje się że upośledzenie funkcji rozkurczowej serca w szczególności u 16-miesięcznych myszy FVB, ale również u 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 były spowodowane procesem włóknienia. Wydaje się, również że do wczesnej niewydolności skurczowej serca u 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 mógł również przyczynić się zwiększony udział komponentów macierzy zewnątrzkomórkowej w masie serca, utrudniający pracę serca (198).

Zarówno u 14-miesięcznych myszy FVB, jak i 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 włóknienie śródmiąższowe i okołokapilarne spowodowało spadek przylegania kapilar sercowych do kardiomiocytów, dystansowanie od siebie kardiomiocytów oraz zaburzenie układu kardiomiocytów we włóknach mięśniowych. Prowadziło to do zwiększenia dystansu między światłem naczynia a kardiomiocytami, co skutkowało ostatecznie osłabieniem pracy

serca (199,200). Dodatkowo odkładanie kolagenu wokół kardiomiocytów mogło prowadzić do odseparowania ich od siebie, co mogło przyczynić się do zaburzeń ich przewodnictwa elektrycznego (201) prowadząc ostatecznie do zaburzeń kurczliwości mięśnia sercowego.

5.4.2 Ultrastruktura mięśnia sercowego

U myszy FVB w procesie starzenia się serca nie zaobserwowano znaczących zmian w budowie miofibrili, mitochondriów, układzie sarkomerów i wstawek, ilości kanalików T, budowie kapilarnych naczyń wieńcowych. Natomiast, wykazano że rozwój niewydolności serca w sercach 14-miesięcznych myszy Tgaq*44 spowodował zwiększenie rozmiarów miofibrili, zmniejszenie ilości oraz zmianę kształtu mitochondriów, zmianę układu przestrzennego mitochondriów i miofibrili, redukcję ilości kanalików T, dezorganizację układu sarkomerów, zaburzenie w budowie wstawek oraz kapilarnych naczyń wieńcowych.

Uzyskane w niniejszej pracy obrazy dla ultrastruktury kardiomiocytów u 14-miesięcznych myszy FVB były podobne do obrazów uzyskanych w poprzednich badaniach (183). Również, w mięśniu sercowym 14-miesięcznych myszy Tgaq*44 wykazano podobny obraz ultrastruktury kardiomiocytów, jak w badaniach Czarnowskiej E. i wsp., w których zaobserwowano u 14-miesięcznych myszy Tgaq*44 ubytek kanalików T, rozmycie pasm Z aparatu kurczliwego, spadek gęstości objętościowej mitochondriów w kardiomiocytach (183). Podobnie, jak w niniejszej pracy zaburzenia w budowie aparatu kurczliwego serca u 14-miesięcznych myszy Tgaq*44 były widoczne we wcześniejszych badaniach Mackiewicz U. i wsp., ale stwierdzono je na podstawie zaburzeń w rozkładzie desminy w kardiomiocytach (184).

Przeprowadzone badania obecnej pracy sugerują, że upośledzenie czynności rozkurczowej serca u 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 było wczesnym wyznacznikiem fenotypu starego serca w niewydolności serca, gdyż upośledzenie funkcji rozkurczowej serca pojawiło się w trakcie starzenia się serca dopiero u 16-miesięcznych myszy FVB. Wydaje się, że u podłoża rozkurczowej niewydolności serca zarówno u 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 i 16-miesięcznych myszy FVB leżał proces włóknienia (okołokapilarnego i śródmiąższowego), rozbudowa macierzy zewnątrzkomórkowej oraz pogrubienie blaszki podstawnej, gdyż były one wspólnym elementem dla wczesnej niewydolności serca myszy Tgaq*44 i starzejącego się serca myszy FVB. Stanowiły one więc, wyznaczniki fenotypu starego serca w niewydolności serca myszy Tgaq*44. Nie było wiadomym natomiast, w jakim stopniu upośledzenie funkcji rozkurczowej lewej komory u 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 było zależne od modyfikacji

genetycznej w kardiomiocycie (prowadzącej do rozwoju niewydolności serca), a w jakim stopniu od procesu starzenia.

W niniejszej pracy wykazano, że zaburzenie funkcji skurczowej serca było już obecne w sercach 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 lecz nie było widoczne u 16-miesięcznych myszy FVB. Zarówno u podłoża skurczowej i rozkurczowej niewydolności serca na wczesnym i końcowym etapie niewydolności serca myszy Tgaq*44 leżały zaburzenia w budowie aparatu kurczliwego serca oraz proces hipertrofii kardiomiocytów (któremu jak wiadomo towarzyszy wiele zmian molekularnych, biochemicznych i czynnościowych)(202). Wydawały się one być charakterystyczne dla rozwoju niewydolności serca w sercach myszy Tgaq*44, gdyż nie zaobserwowano ich znaczących zmian w trakcie starzenia się serca 14-miesięcznych myszy FVB.

Na poziomie makroskopowym nie znaleziono wyznaczników wczesnego starzenia w rozwoju niewydolności serca u młodych myszy Tgaq*44. Natomiast, rozwój niewydolności serca w sercach myszy Tgaq*44 charakteryzował się przerostem lewego przedsionka dopiero na końcowym etapie niewydolności serca, bowiem nie zaobserwowano wzrostu masy przedsionków nawet u starzejących się 15-17-miesięcznych myszy FVB.

5.5 Zmiany strukturalne i funkcjonalne naczyń wieńcowych u starzejących się myszy FVB oraz w toku rozwoju niewydolności serca u myszy Tgaq*44

5.5.1 Zmiany w kapilarach wieńcowych w procesie starzenia serca u myszy FVB i w toku rozwoju niewydolności serca u myszy Tgaq*44

W trakcie starzenia się serca myszy FVB nieznaczny wzrost odkładania kolagenu i akumulacji komponentów macierzy zewnątrzkomórkowej w przestrzeni międzykomórkowej nie przyczynił się do zmiany gęstości kapilar [ocenionej na podstawie stosunku łącznej powierzchni ścian naczyń (biegnących wzdłuż i w poprzek kardiomiocytów) do całkowitej powierzchni tkanki], ich przestrzennego ułożenia w sercu, zmiany odległości między kapilarami biegnącymi wzdłuż kardiomiocytów, jak i wielkości światła kapilar wieńcowych. Dominującym kierunkiem przebiegu kapilar w starzejącym się sercu myszy FVB był kierunek zgodny z długą osią włókien mięśniowych.

Z kolei, niewydolność serca w sercach 4-14-miesięcznych myszy Tgaq*44 w porównaniu do starzejących się serc myszy FVB spowodowała zwiększenie gęstości kapilar wieńcowych (łącznie ułożonych poprzecznie i podłużnie względem kardiomiocytów), zwiększenie odległości między kapilarami biegnącymi wzdłuż kardiomiocytów oraz zwiększenie światła kapilar wieńcowych w sercu. Zmiany te od wczesnego etapu

niewydolności serca u myszy Tgaq*44 były wywołane intensywnym gromadzeniem kolagenu i komponentów macierzy zewnątrzkomórkowej w tkance sercowej. Dominującym układem kapilar w niewydolnym sercu myszy Tgaq*44 był układ „oplatający” włókna mięśniowe, bowiem łączna powierzchnia kapilar wieńcowych biegnących wzdłuż włókna mięśniowego (widocznych, jako struktury okrągłe lub owalne na obrazach histologicznych przekrojów poprzecznych przez mięsień sercowy) była niższa niż kapilar biegnących w poprzek włókna (widocznych, jako rozgałęzione struktury liniowe na obrazach przekrojów poprzecznych przez tkankę serca).

Podobnie, jak w badaniach Proniewskiego i wsp. (89) proces starzenia się serca myszy FVB od 4 do 14 miesiąca życia nie spowodował zmniejszenia gęstości kapilar w sercu, w przeciwieństwie, jak było to widoczne w sercach myszy w wyniku procesu starzenia w pracy Rakusan K. i wsp. (203).

W niniejszej pracy wykazano, że niewydolność serca u 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 spowodowała zwiększenie odległości między kapilarami biegnącymi wzdłuż kardiomiocytów, co znacznie wyprzedziło zmiany zaobserwowane w badaniach Proniewskiego i wsp. dotyczące spadku gęstości kapilar wieńcowych u 10-miesięcznych myszy Tgaq*44. Niemniej jednak należy wspomnieć, że w tych poprzednich badaniach nie była sprawdzana gęstość kapilar w sercu u młodszych myszy Tgaq*44, tzn. w wieku 2-6 miesięcy i badania przeprowadzono mniej dokładną metodologią niż w obecnej pracy (89). Dystansowanie się od siebie kapilar w sercach myszy Tgaq*44 z powodu rozwijającej się niewydolności serca było spowodowane intensywnym procesem włóknienia śródmiąższowego i okołokapilarnego, jak i prawdopodobnie przerostem kardiomiocytów, widocznym już w sercach 4-miesięcznych myszy Tgaq*44, któremu towarzyszy aktywacja genów fenotypu płodowego: ANP, BNP i MHC- β (92,94). W niewydolności serca przerost kardiomiocytów jest początkowo mechanizmem kompensacyjnym (204). Jednak, badania Proniewskiego i wsp. nie wiążą spadku gęstości kapilar w sercach myszy Tgaq*44 z hipertrofią kardiomiocytów (89). Niemniej jednak, wzrost odległości między podłużnymi kapilarami w sercu myszy Tgaq*44 może przyczyniać się do spadku dostarczania tlenu i składników odżywczych do kardiomiocytów, ze względu na zwiększoną odległość dla ich dyfuzji między naczyniami włosowatymi a kardiomiocytami (205).

Wydaje się, że już w sercach 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 odpowiedzią kompensacyjną na wzrost odległości między kapilarami wieńcowymi biegnącymi wzdłuż kardiomiocytów było zwiększenie światła kapilar, jak również zmiana architektury kapilar

wieńcowych, które mogły by umożliwić lepszą perfuzję mięśnia sercowego, w celu utrzymania prawidłowej funkcji serca.

Wydaje się również, że zwiększona średnica kapilar już na wczesnym etapie niewydolności serca u myszy Tgαq*44 mogła być wywołana zwiększonym obciążeniem serca. Wykazano bowiem, że wzrost obciążenia serca w odpowiedzi na przeciążenie ciśnieniowe serca był związany z adaptacyjnym zwiększeniem powierzchni światła kapilar wieńcowych (141). Podobnie, jak w niniejszej pracy w modelu niedokrwiennej zastoinowej niewydolności serca u szczurów wykazano, że niewydolność serca była związana z zaburzeniem architektury kapilar wieńcowych (nieliniowym układem kapilar oraz kręconym kształtem kapilar) (206). Ponadto, w wyżej wymienionych badaniach zaobserwowano upośledzenie funkcji serca oraz wykazano, że niewydolność serca spowodowała zwiększenie objętości unaczynienia wieńcowego oraz kompensacyjny wzrost gęstości kapilar w obszarach mięśnia sercowego poza miejscem niedotlenienia.

5.5.2 Porównanie metod *in vivo* i *ex vivo* do pomiaru reaktywności naczyń wieńcowych

Reaktywność naczyń wieńcowych została zmierzona *in vivo* za pomocą ultrasonograficznej metody dopplerowskiej oraz *ex vivo* w izolowanych, perfundowanych sercach myszy wg. metody Langendorff'a. Pomiar szybkości przepływu wieńcowego za pomocą ultrasonograficznej metody dopplerowskiej był mierzony w warunkach fizjologicznych i na którego wartość miały wpływ czynniki takie jak: dostarczanie tlenu przez krew do tkanki mięśniowej serca, lepkość krwi, zastój krwi w mikrokrażeniu wieńcowym, opór łożyska naczyniowego (zmieniający się z wiekiem i funkcjonowaniem układu sercowo-naczyniowego (207)), pozanaczyniowe siły ściskające, odpowiedź miogenna naczyń, lokalny metabolizm, hormony, układ nerwowy (208).

W metodzie perfuzji izolowanego serca myszy wg. metody Langendorff'a perfuzja serca odbywała się w kierunku niefizjologicznym – „wstecznie” przez aortę, a przepływ przez naczynia wieńcowe wynikał z oporu stawianego buforowi przez zamkniętą zastawkę aortalną (209). Większość czynników fizjologicznych, które wystąpiły w czasie pomiarów *in vivo* sondą dopplerowską nie miało wpływu na wartość przepływu wieńcowego w metodzie Langendorff'a. Zależał on od sztucznie generowanego ciśnienia perfuzji oraz użytego do perfuzji izolowanych serc buforu Krebs-Henseleita. Ten ostatni przyczynił się do wywoływania niskiego ciśnienia onkotycznego w sercu oraz do zmniejszenia oporu łożyska naczyniowego, ze względu na jego słabe zdolności do przenoszenia tlenu generujące wyższe wartości przepływu wieńcowego niż spotykane fizjologicznie (209,210). Te uwarunkowania mogą

wytłumaczyć, dlaczego zmiany podstawowego przepływu wieńcowego były widoczne lepiej w warunkach *in vivo* niż *ex vivo*.

5.5.3 Zmiany czynnościowe mikrokrażenia wieńcowego starzejącego się serca myszy FVB i rozwijającej się niewydolności serca myszy Tgaq*44

W procesie starzenia się serca myszy FVB wykazano upośledzenie funkcji naczyń wieńcowych *in vivo* widoczne jako spadek podstawowego przepływu wieńcowego u 14-miesięcznych myszy FVB oraz *ex vivo* jako upośledzenie odpowiedzi naczyń wieńcowych na wzrastające obciążenie serca u 16-miesięcznych myszy FVB. Rezerwa wieńcowa w odpowiedzi na 30 sekundową okluzję przepływu wieńcowego oraz reaktywność naczyń wieńcowych w odpowiedzi na związki wazodylatacyjne (bradykininę i adenozyne) była zachowana w sercach myszy FVB aż do 11-12 miesiąca życia. U myszy Tgaq*44 w toku rozwoju niewydolności serca wykazano w badaniach *in vivo* postępujące upośledzenie podstawowego przepływu wieńcowego, w badaniach *ex vivo* upośledzenie odpowiedzi naczyń wieńcowych na wzrastające obciążenie serca było widoczne w 15 miesiącu życia, natomiast upośledzenie rezerwy wieńcowej było widoczne u 16-17-miesięcznych myszy Tgaq*44. Reaktywność naczyń wieńcowych w odpowiedzi na związki wazodylatacyjne (bradykininę i adenozyne) była zachowana w sercach 10-11-miesięcznych myszy Tgaq*44.

Wydaje się, że progresywne upośledzenie podstawowego przepływu wieńcowego u myszy Tgaq*44 było związane ze zwiększonym włóknieniem okołokapilarnym oraz zmienioną strukturą kapilar z liniowej na krętą, pomimo kompensacyjnego poszerzenia światła kapilar wieńcowych. U pacjentów z niewydolnością serca o etiologii nie niedokrwiennej, włóknienie okołokapilarne było związane ze spadkiem przepływu wieńcowego, ale jedynie przez gałąź międzykomorową przednią (*ang. LAD, left anterior descending*) tętnicy wieńcowej (194). Badania Kagan HJ. i wsp. wykazały, że kręta struktura kapilar wieńcowych w zastoinowej niewydolności serca u szczurów spowodowała zwiększenie oporu przepływu krwi, jak i spadek przepływu oraz szybkości przepływu przez mięsień sercowy (211). Z kolei, kręta struktura kapilar wieńcowych u myszy Tgaq*44 mogła przyczynić się do pogłębienia niewydolności serca poprzez rozwój dysfunkcji śródbłónka wieńcowego, bowiem spadek przepływu krwi przez naczynia krwionośne w sercu pociąga za sobą spadek sił ścinających wpływających na spadek produkcji tlenu azotu ostatecznie prowadząc do upośledzenia czynności śródbłónka wieńcowego (212). W badaniach klinicznych wykazano wartość prognostyczną spadku spoczynkowego przepływu krwi przez mięsień sercowy na rozwój i progresję niewydolności serca. Parametr ten bardziej wskazywał na upośledzenie mikrokrażenia wieńcowego niż na

zaburzenia funkcji komórek serca (213). Stąd postępujący, znaczny spadek podstawowego przepływu wieńcowego u myszy Tgaq*44 wydaje się wskazywać na dysfunkcję mikrokążeń wieńcowych, które może w istotny sposób przyczyniać się do progresji niewydolności serca w tym modelu, tak jak przyczynia się do progresji niewydolności serca u ludzi (213).

Z kolei, w pomiarach *ex vivo* brak spadku podstawowego przepływu wieńcowego u 8-miesięcznych myszy Tgaq*44 mógł wynikać z tego, że wazodylatacja naczyń wieńcowych w trakcie podstawowego przepływu, w głównej mierze była zdeterminowana ustalonymi warunkami eksperymentalnymi, a nie zmianami patologicznymi w naczyniach wieńcowych. Niemniej jednak upośledzenie podstawowego przepływu wieńcowego uwidoczniło się w izolowanych perfundowanych sercach u 16-miesięcznych myszy Tgaq*44. Mimo tego, że tlenek azotu uczestniczy w regulacji podstawowego przepływu wieńcowego (214) to wydaje się, że mógł on nie mieć szczególnego udziału w upośledzeniu podstawowego przepływu wieńcowego na końcowym etapie niewydolności serca myszy Tgaq*44, gdyż badania Drelicharza Ł. i wsp. nie wykazały spadku podstawowego przepływu wieńcowego u myszy Tgaq*44 w czasie podawania inhibitora syntazy tlenu azotu (NOS) L-NAME (*ang. N-Nitroarginine methyl ester*)(181). Badania te jednak prowadzono *ex vivo* w izolowanym perfundowanym sercu, a nie *in vivo*.

Zarówno bradykinina (łącząc się z receptorami B₂ na śródbłonku)(157,158), jak i adenozyina (łącząc się z receptorami A_{2A} na śródbłonku)(159,160) powoduje wazodylatację naczyń wieńcowych zależną od uwalniania tlenu azotu. U 11-12-miesięcznych myszy Tgaq*44 zależna od tlenu azotu wazodylatacja naczyń wieńcowych była zachowana. Z kolei, dotychczasowe badania na izolowanych, perfundowanych sercach 14-16-miesięcznych myszy Tgaq*44 wykazały upośledzenie NO-zależnej odpowiedzi naczyń wieńcowych w odpowiedzi na bradykininę dopiero na końcowym etapie niewydolności serca (117).

Adenozyina łącząc się z receptorami A_{2A} powoduje również wazodylatację naczyń wieńcowych (159) poprzez otwarcie kanałów potasowych zależnych od ATP (K_{ATP}) w komórkach mięśni gładkich (161). Natomiast w niniejszej pracy doktorskiej nie określono w jakim stopniu odpowiedź wazodylatacyjna naczyń wieńcowych na adenozyinę była zależna od otwierania kanałów potasowych K_{ATP}, a na ile od uwalniania śródbłonkowego tlenu azotu.

Upośledzenie czynności naczynio-rozszerzającej zależnej od spadku produkcji śródbłonkowego tlenu azotu jest utożsamiane z dysfunkcją śródbłonka (162), dlatego uzyskane wyniki w niniejszej rozprawie doktorskiej wskazują, że zarówno NO-zależna funkcja śródbłonka, jak i funkcja mięśniówki gładkiej były w pełni zachowane aż do 10-11 miesiąca życia myszy Tgaq*44, pomimo już obecnej znacznej niewydolności serca i upośledzenia

podstawowego przepływu wieńcowego podkreślając istotne znaczenie patofizjologiczne zmian w podstawowym przepływie wieńcowym w toku rozwoju niewydolności serca, które pojawiają się wcześniej niż zaburzenia rezerwy wieńcowej.

Warto dodać, że bezpośrednie pomiary NO nie mogły zweryfikować zmian produkcji NO, bowiem opracowana metodologia pomiarów była za mało czuła, żeby wykryć zmiany w produkcji NO w krążeniu wieńcowym u myszy.

W niniejszej pracy, w badaniach *in vivo* również nie wykazano zmian w rezerwie wieńcowej u 10-miesięcznych myszy Tgαq*44. Niemniej jednak nie brano tych wyników pod uwagę, gdyż uzyskane wartości rezerwy wieńcowej były bardzo niskie w porównaniu do wartości rezerwy wieńcowej zazwyczaj uzyskiwanych w eksperymentach na myszach (215–217). Fakt ten mógł wynikać z tego, że być może do badania rezerwy wieńcowej wykorzystano zbyt niską dawkę regadenosonu - selektywnego agonisty receptora A_{2A} dla adenozyiny (218) uniemożliwiającego uzyskanie maksymalnej wazodylatacji naczyń wieńcowych. Z drugiej strony, to zbyt wysokie wartości podstawowego przepływu wieńcowego (przy izofluraniu 1,5%) mogły maskować zakres rezerwy wieńcowej w odpowiedzi na regadenoson. Wydaje się więc, że wysokie wartości podstawowego przepływu wieńcowego mogły wynikać albo ze zbyt wysokiego stężenia izofluranu albo być normalnymi specyficznymi gatunkowymi cechami fenotypowymi przepływu wieńcowego u myszy Tgαq*44 i FVB.

Zaburzona reaktywność naczyń wieńcowych ma wartość prognostyczną pojawienia się epizodów sercowo-naczyniowych (219,220). W tym upośledzenie rezerwy wieńcowej jest czynnikiem prognostycznym ryzyka powstania niewydolności serca (221) i może wskazywać na dysfunkcję mikrokrążenia wieńcowego u osób nie chorujących na miażdżycę tętnic wieńcowych (222). W związku z tym upośledzenie rezerwy wieńcowej u 16-miesięcznych myszy Tgαq*44 świadczyło o pogłębieniu się niewydolności serca oraz wskazywało na upośledzenie mikrokrążenia wieńcowego, jednak w porównaniu do upośledzenia podstawowego przepływu wieńcowego był to bardzo późny objaw zaburzeń mikrokrążenia w toku rozwoju niewydolności serca u myszy Tgαq*44.

Przeprowadzone badania budowy kapilar wieńcowych wykazały, że zwiększone włóknienie okołokapilarne i śródmiąższowe tkanki sercowej u myszy Tgαq*44 doprowadziło do zmiany budowy architektury kapilar wieńcowych już u 4-miesięcznych myszy polegające na wzroście odległości między kapilarami biegnącymi wzdłuż kardiomiocytów, opłatanu włókien mięśniowych przez kapilary wieńcowe oraz kompensacyjnym wzroście powierzchni światła kapilar. Zmiany te mogły przyczynić się do progresywnego spadku podstawowego przepływu wieńcowego u myszy Tgαq*44 oraz do upośledzenia budowy śródbłonna naczyń

wieńcowych u 14-miesięcznych myszy Tgaq*44. Zmiany w budowie kapilar wieńcowych myszy Tgaq*44 doprowadziły ostatecznie do upośledzenia reaktywności naczyń wieńcowych i rezerwy wieńcowej na końcowym etapie niewydolności serca. Natomiast, zwiększone włóknienie okołokapilarne i śródmiąższowe obecne dopiero u 14-miesięcznych myszy FVB mogło przyczynić się do spadku podstawowego przepływu wieńcowego i reaktywności naczyń wieńcowych u starzejących się 14-16-miesięcznych myszy FVB. Upośledzenie podstawowego przepływu wieńcowego widoczne u myszy Tgaq*44 (od 8 miesiąca życia) można uznać za wczesny wyznacznik fenotypu starego serca w niewydolności serca, gdyż upośledzenie podstawowego przepływu wieńcowego pojawiło się w trakcie starzenia się serca dopiero u 14-miesięcznych myszy FVB.

5.6 Udział szlaków hormonalnych w procesie starzenia myszy FVB oraz w toku rozwoju niewydolności serca myszy Tgaq*44

W procesie starzenia myszy FVB aż do 14 miesiąca życia nie wykazano zmian w aktywności enzymu ACE zarówno w sercu i osoczu oraz zmian w stężeniu aldosteronu w osoczu. Natomiast, już na wczesnym etapie niewydolności serca u 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 wykazano zwiększoną aktywność ACE w sercu, natomiast nie była ona zwiększona w osoczu nawet u 14-miesięcznych myszy Tgaq*44. Stężenie aldosteronu w osoczu zwiększyło się dopiero na końcowym etapie niewydolności serca u 14-miesięcznych myszy Tgaq*44.

Postępujący proces starzenia się sercach u myszy FVB nie wiązał się z aktywacją szlaku RAA w osoczu i sercu. Natomiast w trakcie rozwoju niewydolności serca u myszy Tgaq*44 aktywność ACE w sercu znacznie wzrosła na jej końcowym etapie, pomimo tego że w porównaniu do myszy kontrolnych była ona zwiększona już u 4-miesięcznych myszy Tgaq*44. Z kolei, w dotychczasowo opublikowanych badaniach (93) wykazano zwiększenie aktywności osi ACE/angiotensyna II w sercu myszy Tgaq*44 na przejściowym etapie niewydolności serca (8-10 miesiąc życia) na podstawie zwiększonego stężenia angiotensyny II.

Związane z wiekiem włóknienie serca oraz zaburzenie czynności serca u myszy FVB nie było więc związane z aktywacją szlaku renina-angiotensyna-aldosteron w przeciwieństwie do myszy Tgaq*44, u których zwiększona aktywność ACE w sercu była związana z rozwojem niewydolności serca. Podobnie, badania Hirsch AT. i wsp. (223) dowiodły zwiększoną aktywność ACE w sercu, w eksperymentalnym modelu niewydolności serca u szczurów. Enzym ACE odpowiadając za przemianę katalityczną angiotensyny I do angiotensyny II (224) pośrednio przyczynia się do procesu włóknienia. Wykazano bowiem, że zahamowanie

aktywności ACE powoduje spadek włóknienia mięśnia sercowego u szczurów wywołanego przeciążeniem ciśnieniowym serca (225). Z kolei badania na hodowlach komórkowych sercowych fibroblastów dowiodły zależny od stężenia angiotensyny II wzrost procesu włóknienia, który zależny był od aktywacji receptorów AT₁ (226).

Na podstawie przedstawionych wyników można stwierdzić, że aktywacja szlaku renina-angiotensyna-aldosteron (*ang. renin-angiotensin-aldosterone* - RAA) w sercu myszy Tgαq*44 na wczesnym etapie niewydolności serca była związana z modyfikacją genetyczną w kardiomiocytach i nie była wyznacznikiem przedwcześnie ujawniającego się fenotypu starzejącego się serca, gdyż aktywność szlaku RAA nie wzrastała w sercach myszy FVB w procesie starzenia się serca. Wydaje się więc, że wcześniej aktywowany proces włóknienia w sercu myszy Tgαq*44 mógł być wywołany zarówno przez modyfikację genetyczną w kardiomiocycie, naśladującą aktywację receptora AT₁ (92), jak również zwiększoną wtórną produkcją angiotensyny II (tkankową i systemową) w odpowiedzi na pogłębiającą się niewydolność serca (93), chociaż w niniejszej pracy nie badano stężenia angiotensyny II w sercu i osoczu. Natomiast proces włóknienia okołokapilarnego w sercach myszy FVB i rozwój rozkurczowej niewydolności serca musiał mieć mechanizm niezależny od ACE.

5.7 Zmiany morfologiczne krwi w procesie starzenia myszy FVB oraz w toku rozwoju niewydolności serca myszy Tgαq*44

Starzenie się myszy FVB związane było ze spadkiem relatywnej liczby limfocytów (wyrażonych jako % leukocytów), a w rozwoju niewydolności serca myszy Tgαq*44 dominowały zmiany w RDW. Dodatkowo, na końcowym etapie niewydolności serca u 14-miesięcznych myszy Tgαq*44 wykazano zmniejszenie relatywnej liczby limfocytów. Relatywna liczba limfocytów u 14-miesięcznych myszy FVB była na podobnym poziomie, jak u 4-miesięcznych myszy Tgαq*44, wskazując iż mogła ona być wyznacznikiem ogólnoustrojowym przedwczesnego starzenia się myszy Tgαq*44.

Podobnie, jak w przypadku spadku relatywnej liczby limfocytów u starzejących się 14-miesięcznych myszy FVB, badania Kain i wsp. (227) wykazały zależny głównie od wieku spadek relatywnej liczby limfocytów u starych myszy C57BL/6J. Co istotne, to morfologia krwi u młodych i starych myszy została wykonana dzień po wywołaniu ostrej niewydolności serca. Ponadto, w dotychczasowych badaniach dowiedziono, że zredukowanie względnej liczby limfocytów jest markerem odpowiedzi stresowej organizmu (228,229). Wydaje się, że spadek relatywnej liczby limfocytów we krwi już u 4-miesięcznych myszy Tgαq*44 mógł być związany z chroniczną aktywacją układu sympatycznego w tym modelu zwierzęcym (92).

Wykazano bowiem w badaniach Maisel i wsp., że chroniczna aktywacja układu sympatycznego (poprzez sygnalizację β -adrenergiczną) spowodowała zredukowanie relatywnej liczby krążących limfocytów (230). Ponadto, zaobserwowano w różnych stanach chorobowych układu sercowo-naczyniowego względny spadek relatywnej liczby limfocytów (231), a niska jego wartość u pacjentów z niewydolnością serca była związana z gorszymi rokowaniami, w tym zwiększoną śmiertelnością (232).

Wydaje się, że wyniki morfologii krwi myszy Tgaq*44 wskazują na zależność między obrazem krwi a niewydolnością serca. Zwiększenie wartości parametru RDW w toku rozwoju niewydolności serca u myszy Tgaq*44 mogło wskazywać na pogłębienie niewydolności serca. Wykazano bowiem w dotychczasowych badaniach, że każdy wzrost parametru RDW o 1% wiązał się ze zwiększeniem ryzyka wystąpienia niewydolności serca (173) oraz ostrego epizodu sercowo-naczyniowego (174), dlatego szacowanie parametru RDW może sugerować zarówno rozwój, jak i progresję niewydolności serca (175), ale nie starzenie się serca.

Przeprowadzone badania wskazują, że relatywna liczba limfocytów w krwi myszy Tgaq*44 może być wczesną oznaką ogólnoustrojowych procesów starzenia się organizmu. Natomiast zwiększona wartość parametru RDW w krwi myszy Tgaq*44 może sugerować postępującą patologię niewydolności serca.

5.8 Zmiany w transkryptomie serca w trakcie starzenia się serca myszy FVB i w toku rozwoju niewydolności serca myszy Tgaq*44

W niniejszej rozprawie doktorskiej, z wykorzystaniem sekwencjonowania nowej generacji (*ang. next generation sequencing* – NGS) i narzędzi bioinformatycznych przedstawiono zmiany w transkryptomach serc myszy FVB w trakcie starzenia się serca (analiza FVB vs. FVB), zmiany w transkryptomach serc myszy Tgaq*44 w toku rozwoju niewydolności serca w trakcie starzenia się serca (analiza Tgaq*44 vs. Tgaq*44) oraz zmiany między transkryptomami serc myszy Tgaq*44 i FVB w trakcie procesu starzenia chronologicznego (analiza Tgaq*44 vs. FVB). W szczególności wytypowano geny i procesy biologiczne związane ze starzeniem się serca myszy FVB („*geny starego serca*”, „*geny starzenia*” się serca, „*procesy starego serca*”, „*procesy starzenia*” się serca), opisano wpływ niewydolności serca na starzenie się serca, przedstawiono udział genów związanych ze starzeniem się serca w zmianach transkryptomów serc myszy Tgaq*44 i FVB w trakcie procesu starzenia chronologicznego, znaleziono aktywowane (w górę lub w dół) geny i uruchomione procesy biologiczne związane ze starzeniem się serca od wczesnego etapu niewydolności serca myszy Tgaq*44, znaleziono geny najbardziej aktywowane w transkryptomach serc myszy

Tgαq*44 i FVB w poszczególnych grupach wiekowych myszy, znaleziono geny najsilniej różnicujące transkryptomy serc myszy Tgαq*44 od FVB w poszczególnych grupach wiekowych myszy oraz znaleziono geny charakterystyczne na poszczególnych etapach niewydolności serca myszy Tgαq*44. W końcu wytypowano „*geny niewydolności serca*”.

W większości dotychczasowo przeprowadzonych badaniach transkryptomicznych dotyczących niewydolności serca u ludzi (233–237) i zwierząt (238,239) badano zmiany w transkryptomie serca towarzyszące niewydolności serca na podstawie porównania transkryptomów serc zdrowych ludzi z chorymi na niewydolność serca lub porównania transkryptomów serc zdrowych zwierząt z modelami zwierzęcymi niewydolności serca. Takie podejście metodologiczne pomijało wpływ procesu starzenia się serca, etapowość rozwoju niewydolności serca, długotrwały udział genów i procesów w rozwoju niewydolności serca. W przeciwieństwie do większości dotychczasowo przeprowadzonych badań transkryptomicznych niewydolności serca, atutem badań transkryptomicznych niniejszej pracy było nowatorskie podejście do analizy danych transkryptomicznych, które umożliwiło dogłębne zrozumienie zmian w transkryptomie serc myszy Tgαq*44, w toku rozwoju niewydolności serca z uwzględnieniem procesu starzenia się serca oraz kolejnych etapów progresji niewydolności serca w unikatowym modelu przewlekłej niewydolności serca, który opisano w **rozdziale 5.1**.

Aby ten cel uzyskać przeprowadzono różne analizy wyników ekspresji genów w transkryptomach serc myszy Tgαq*44 i FVB obejmujące: analizę PCA (dotyczącą zmian wariancji ekspresji genów), porównanie zmian w transkryptomach serc w obrębie szczepu myszy (analizy: FVB vs. FVB, Tgαq*44 vs. Tgαq*44) i pomiędzy szczepami myszy (analiza Tgαq*44 vs. FVB) w trakcie starzenia chronologicznego. Każda z wykorzystanych analiz miała swoje zalety i wady oraz dostarczała nieco innych informacji, dlatego jednocześnie wykorzystanie wyników i płynących wniosków z tych analiz umożliwiło lepsze zrozumienie zachodzących zmian w toku rozwoju niewydolności serca w transkryptomach serc myszy Tgαq*44 związanych z patologią serca i starzeniem się serca.

Analiza PCA wariancji ekspresji genów, które zostały zmapowane do referencyjnego genomu myszy dla myszy FVB i Tgαq*44 umożliwiła zobrazować globalne zmiany w transkryptomach serc myszy FVB i Tgαq*44 w trakcie procesu starzenia chronologicznego, przedstawić zmiany w sile ekspresji genów oraz uwidocznić wpływ niewydolności serca na zmiany w transkryptomach serc myszy Tgαq*44. Natomiast wadą analizy PCA był brak informacji dotyczącej jakie geny najmocniej przyczyniły się do zmian w transkryptomach serc i w jakim stopniu.

Zaletą analiz FVB vs. FVB, jak i Tgaq*44 vs. Tgaq*44 było porównywanie ekspresji genów starszych myszy do stałej wartości ekspresji genów u 4-miesięcznych myszy (w obrębie danego szczepu), co umożliwiło zobrazować ilościową aktywację genów w sercu (tj. genów, które spełniły założone kryteria dla różnicowej ekspresji) w trakcie starzenia się chronologicznego myszy danego szczepu. Niemniej jednak analizy te mogły pominąć istotne zmiany w ekspresji genów, które mogły zajść od momentu narodzin myszy aż do 4 miesiąca życia myszy. Natomiast porównywanie zmian różnicowej ekspresji genów w analizie FVB vs. FVB ze zmianami różnicowej ekspresji genów w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44 miało wadę, gdyż zależne od wieku zmiany różnicowej ekspresji genów były zależne od ekspresji genów w transkryptomach serc 4-miesięcznych myszy, które różniły się już znacząco między myszami Tgaq*44 i FVB.

Zaletą analizy Tgaq*44 vs. FVB było porównywanie zmian ekspresji genów w transkryptomach serc związanych z procesami rozwoju niewydolności serca i starzenia się serca u myszy Tgaq*44 w porównaniu do zachodzących zmian ekspresji genów w transkryptomach serc myszy FVB w trakcie starzenia się serca. Dzięki temu geny różnicujące transkryptomy serc myszy Tgaq*44 i FVB wydawały się być w większym stopniu związane z rozwojem niewydolności serca myszy Tgaq*44. Natomiast porównywanie siły różnicowej ekspresji zidentyfikowanych genów między różnymi grupami wiekowymi myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB miało wadę, gdyż zmiana różnicowej ekspresji była zawsze zdeterminowana ekspresją genów w określonym wieku myszy Tgaq*44 i FVB, która to ulegała zmianie w różnym stopniu z wiekiem.

W analizach FVB vs. FVB, Tgaq*44 vs. Tgaq*44, Tgaq*44 vs. FVB wyselekcjonowano po 10 genów, których wartość różnicowej ekspresji była najwyższa i najniższa w poszczególnych grupach wiekowych myszy. Zaletą tego podejścia było wyłonienie najbardziej zmienionych genów w poszczególnych grupach wiekowych myszy, a wadą że nie zawierało informacji o rzeczywistym udziale wyselekcjonowanych genów w różnicowanie transkryptomów serc w różnych grupach wiekowych w badanych analizach.

Dodatkowo w analizie Tgaq*44 vs. FVB wyselekcjonowano po 10 genów, których wartość różnicowej ekspresji w łącznej analizie była najwyższa lub najniższa w następujących grupach wiekowych myszy:

- 1.) od wczesnego do końcowego etapu niewydolności serca (4-14-miesięczne myszy),
- 2.) od przejściowego do końcowego etapu niewydolności serca, ale nie na wczesnym etapie (8-14-miesięczne myszy, ale nie 4-miesięczne myszy),

3.) jedynie w końcowych miesiącach życia myszy Tgαq*44 obejmujących głównie końcowy etap niewydolności serca (10-14-miesięczne myszy, ale nie 4-8-miesięczne myszy).

Zaletą tego podejścia było wyłonienie genów, które silnie i długotrwale różnicowały transkryptomy serc myszy Tgαq*44 od FVB. Natomiast wadą było to, że wyselekcjonowane geny mogły nie należeć do genów najsilniej różnicujących transkryptomy serc tych szczepów myszy w określonej grupie wiekowej.

Znalezienie tych samych genów w kilku grupach wiekowych myszy w analizach FVB vs. FVB, Tgαq*44 vs. Tgαq*44, Tgαq*44 vs. FVB wśród 10 genów, których wartość różnicowej ekspresji była najwyższa i najniższa świadczyło o wadze i znaczeniu wyselekcjonowanych genów w procesie starzenia się serca myszy FVB lub w rozwoju niewydolności serca myszy Tgαq*44, gdyż każda analizowana grupa wiekowa w tych analizach mogłaby być rozpatrywana, jako odrębny eksperyment NGS. W związku, z tym wyselekcjonowane geny stają się interesującym punktem do prowadzenia dalszych badań nad procesem starzenia się serca i rozwojem niewydolności serca, w tym na stosowanie precyzyjnych strategii leczenia niewydolności serca obejmujących nie tylko leczenie niewydolności serca, ale również hamowanie procesu starzenia się serca.

Przeprowadzone analizy FVB vs. FVB, Tgαq*44 vs. Tgαq*44, Tgαq*44 vs. FVB dowiodły, że porównywanie ze sobą jedynie dwóch odległych od siebie czasowo etapów życia myszy (młode myszy vs. stare myszy), jak i etapów niewydolności serca (wczesny etap vs. końcowy etap) mogło by prowadzić do uzyskania wyrywkowych wyników, pomijających istotne zmiany dla procesu starzenia się serca i rozwoju niewydolności serca. Natomiast, uwzględnienie kilku etapów starzenia się serca, jak i rozwoju niewydolności serca w analizach transkryptomów serc myszy Tgαq*44 i FVB pozwoliło zmniejszyć prawdopodobieństwo uzyskania wyrywkowych wyników. Mogło bowiem zdarzyć się tak, że wyselekcjonowane geny nie uczestniczyły w tych procesach lecz przypadkowo pojawiły się w odległych od siebie czasowo etapach analizy. Zatem, wzmocnienie badań transkryptomicznych zarówno dotyczących niewydolności serca, jak i procesu starzenia się serca o dodatkowe punkty czasowe analizy potwierdziły zaletę tego podejścia analitycznego, jak i wagę wyselekcjonowanych genów (które oprócz występowania w odległych od siebie czasowo etapach życia, mogły pojawić się na którymś z etapów pośrednich całego procesu).

W niniejszej pracy potwierdzono, że model myszy Tgαq*44 jest znakomitym modelem zwierzęcym do śledzenia zmian (na poziomie transkryptomu serca) związanych z wzajemnym oddziaływaniem niewydolności serca z procesem starzenia się serca, w tym do zidentyfikowania kluczowych genów sterujących procesem starzenia się serca już od

wczesnych etapów niewydolności serca oraz genów silnie związanych z rozwojem niewydolności serca.

5.8.1 Przyspieszony proces starzenia się serca w transkryptomach serc myszy Tgaq*44

5.8.1.1 Globalne zmiany w transkrypcji serca myszy Tgaq*44

Analiza PCA bazującą na porównaniu wariancji ekspresji 16 367 genów (spełniających kryteria dopasowania do referencyjnego genomu myszy dla 4-14-miesięcznych myszy Tgaq*44 i FVB) wykazała, że globalny profil ekspresji genów w transkryptomach serc 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 był podobny do profilu ekspresji 14-miesięcznych myszy FVB. Porównanie zmian w transkryptomach serc myszy w analizach Tgaq*44 vs. Tgaq*44 i FVB vs. FVB w trakcie starzenia chronologicznego wykazało, że największe zmiany w transkryptomach serc myszy Tgaq*44 występują wcześniej niż w transkryptomach serc myszy FVB. Wykazano bowiem, że największa liczba DEGów wystąpiła u 12-miesięcznych myszy Tgaq*44 w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44, a u 14-miesięcznych myszy FVB w analizie FVB vs. FVB. Natomiast największy przyrost liczby DEGów nastąpił od 4 do 10 miesiąca życia w transkryptomach serc myszy Tgaq*44 w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44, a od 12 do 14 miesiąca życia w transkryptomach serc myszy FVB w analizie FVB vs. FVB.

Podobnie, analiza nadreprezentatywnych procesów biologicznych wykazała największy przyrost uruchomionych procesów biologicznych od 8 do 10 miesiąca życia w transkryptomach serc myszy Tgaq*44 w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44, a od 12 do 14 miesiąca życia w transkryptomach serc myszy FVB w analizie FVB vs. FVB. Ponadto, aż dwie trzecie nadreprezentatywnych procesów biologicznych, które były uruchomione w transkryptomach serc 14-miesięcznych myszy Tgaq*44 w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44 było również uruchomionych, co najmniej w jednej z młodszych grup wiekowych myszy Tgaq*44. Natomiast, jedynie połowa nadreprezentatywnych procesów biologicznych, które były uruchomione w transkryptomach serc 14-miesięcznych myszy FVB w analizie FVB vs. FVB było również uruchomionych, co najmniej w jednej z młodszych grup wiekowych myszy FVB.

5.8.1.2 Wpływ niewydolności serca na proces starzenia się serca myszy Tgaq*44

Analiza PCA bazującą na porównaniu globalnych zmian w wariancji ekspresji genów w transkryptomach serc myszy Tgaq*44 i FVB maskowała zmiany ekspresji genów uczestniczących bezpośrednio w procesie starzenia się serca. W związku z tym w

transkryptomach serc 14-miesięcznych myszy FVB w analizie FVB vs. FVB zidentyfikowano „*geny starego serca*” (DEGs występujące wyłącznie dopiero u 14-miesięcznych myszy FVB) oraz „*geny starzenia*” się serca (DEGs występujące u 14-miesięcznych myszy FVB i w jednej z młodszych grup wiekowych myszy FVB) i przedstawiono zmiany ekspresji tych genów w transkryptomach serc 4-14-miesięcznych myszy Tgaq*44 i FVB. Celem tej analizy było określenie wpływu niewydolności serca na profil ekspresji genów uczestniczących w starzeniu się serca.

Dowiedziano, iż rozwój niewydolności serca u myszy Tgaq*44 spowodował przyspieszenie procesu starzenia się serca, gdyż wariancja ekspresji zidentyfikowanych wcześniej „*genów starego serca*” oraz „*genów starzenia*” się serca w transkryptomach serc 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 była podobna do zmian w transkryptomach serc 8-miesięcznych myszy FVB. Niewydolność serca myszy Tgaq*44 spowodowała również zmianę profilu wariancji ekspresji „*genów starego serca*” i „*genów starzenia*” się serca w porównaniu do ich profilu wariancji ekspresji w trakcie procesu starzenia się serca myszy FVB. Wydaje się, że głównie za te zmiany w transkryptomach serc 4-14-miesięcznych myszy Tgaq*44 i FVB było odpowiedzialnych odpowiednio 183-272 genów spośród 935 „*genów starego serca*” i „*genów starzenia*” się serca, gdyż różnicowały one transkryptomy serc 4-14-miesięcznych myszy Tgaq*44 od myszy FVB (analiza Tgaq*44 vs. FVB). Natomiast, większość pozostałych „*genów starego serca*” i „*genów starzenia*” się serca (około 650 genów) wydawała się ulegać podobnej ekspresji w procesie starzenia się serca myszy Tgaq*44 i FVB, gdyż nie różnicowały one transkryptomów serc 4-14-miesięcznych myszy Tgaq*44 od FVB, można więc sądzić, że nie miały udziału w przyspieszonym procesie starzenia się serca u myszy Tgaq*44.

5.8.1.3 Udział „*genów starego serca*” i „*genów starzenia*” się serca w zmianach w transkrypcji serca myszy Tgaq*44 w trakcie rozwoju niewydolności serca

Aby przedstawić udział genów zaangażowanych w proces starzenia się serca w poszczególnych miesiącach życia myszy FVB i Tgaq*44 znaleziono „*geny starego serca*” i „*geny starzenia*” się serca spełniające założone kryteria dla różnicowej ekspresji w poszczególnych grupach wiekowych myszy w analizach FVB vs. FVB i Tgaq*44 vs. Tgaq*44 oraz sprawdzono ich udział we wszystkich genach spełniających założone kryteria dla różnicowej ekspresji w badanych grupach wiekowych myszy w tych analizach.

Liczba „*genów starego serca*” i „*genów starzenia*” się serca spełniających założone kryteria dla różnicowej ekspresji nie zwiększyła się w transkryptomach serc 14-miesięcznych

myszy Tgaq*44 w porównaniu do 8-miesięcznych myszy Tgaq*44 w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44, a znacząco zwiększyła się w transkryptomach serc 14-miesięcznych myszy FVB w porównaniu do 8-miesięcznych myszy FVB w analizie FVB vs. FVB. Wyniki tych analiz pośrednio wskazują na to, że proces starzenia się serca był przyspieszony u myszy Tgaq*44 w porównaniu do myszy FVB, gdyż brak wzrostu liczby „genów starego serca” i „genów starzenia” się serca występujących jako DEGs u 14-miesięcznych myszy Tgaq*44 wynikał prawdopodobnie z już wysokiej ekspresji „genów starego serca” i „genów starzenia” się serca w transkryptomach serc 4-miesięcznych myszy Tgaq*44. Założenie to potwierdza również analiza PCA wariancji ekspresji genów dla 935 „genów starego serca” i „genów starzenia” się serca w transkryptomach serc myszy Tgaq*44 i FVB (**Ryc. 40 B**).

Udział „genów starego serca” i „genów starzenia” się serca spełniających założone kryteria dla różnicowej ekspresji w poszczególnych grupach wiekowych myszy w analizie FVB vs. FVB wyniósł 66-100% wszystkich DEGów, a w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44 wyniósł 15-24% wszystkich DEGów. Świadczyło to o tym, że większość genów spełniających założone kryteria dla różnicowej ekspresji w transkryptomach serc 8-14-miesięcznych myszy FVB w analizie FVB vs. FVB była związana z postępującym procesem starzenia się serca, natomiast w transkryptomach serc 8-14-miesięcznych myszy Tgaq*44 w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44 z rozwojem niewydolności serca, i tylko ilościowo niewielka ich część z procesem przyspieszonego starzenia się serca u myszy Tgaq*44.

Podsumowując, powyższe analizy transkryptomyczne bazujące na porównaniu zmian w transkryptomach serc myszy Tgaq*44 w trakcie rozwoju niewydolności serca ze zmianami w transkryptomach serc myszy FVB w trakcie procesu starzenia się serca wykazały, że proces starzenia się serca był przyspieszony w sercach myszy Tgaq*44 z powodu rozwijającej się niewydolności serca i z powodu sygnalizacji wewnątrzkomórkowej uruchomionej przez aktywne białka αq*44. Proces starzenia się serca stopniowo postępował u myszy FVB, z wyraźnym nasileniem w sercach 14-miesięcznych myszy FVB. Natomiast, proces starzenia się serca był już nasilony w sercach 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 i była to jedna z najważniejszych obserwacji niniejszej pracy doktorskiej.

5.8.2 Zmiany wywołane w transkryptomie serca myszy Tgaq*44 wskutek rozwoju niewydolności serca

Globalna analiza PCA wariancji ekspresji 16 367 genów wykazała, że zmiany w profilu ekspresji genów od 4 do 14 miesiąca życia w transkryptomach serc myszy Tgaq*44 były większe niż w transkryptomach serc myszy FVB. Potwierdziły to analizy liczby genów

spełniających założone kryteria dla różnicowej ekspresji oraz liczby nadreprezentatywnych procesów biologicznych w transkryptomach serc myszy Tgaq*44 i FVB w poszczególnych grupach wiekowych myszy. Liczba DEGów w transkryptomach serc 8-14-miesięcznych myszy Tgaq*44 w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44 była większa niż w transkryptomach serc 8-14-miesięcznych myszy FVB w analizie FVB vs. FVB. Z kolei, liczba nadreprezentatywnych procesów biologicznych była większa w transkryptomach serc 10-14-miesięcznych myszy Tgaq*44 w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44 niż w transkryptomach serc 10-14-miesięcznych myszy FVB w analizie FVB vs. FVB.

Największe zmiany w globalnym profilu ekspresji genów w transkryptomach serc myszy Tgaq*44 nastąpiły od 4 do 12 miesiąca życia. Potwierdziły to analizy liczby genów spełniających założone kryteria dla różnicowej ekspresji w analizach Tgaq*44 vs. Tgaq*44 i Tgaq*44 vs. FVB, gdyż największa liczba DEGów wystąpiła w obydwu tych analizach u 12-miesięcznych myszy Tgaq*44.

Interesujące, profil zmian liczby DEGów u 8-14-miesięcznych myszy Tgaq*44 w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44 pokrywał się z profilem zmian liczby DEGów u 8-14-miesięcznych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB sugerując, że większość genów różnicujących transkryptomy serc myszy Tgaq*44 od FVB była związana z rozwojem niewydolności serca. Potwierdziła to analiza udziału „genów starego serca” i „genów starzenia” się serca występujących, jako DEGs wśród wszystkich genów spełniających założone kryteria dla różnicowej ekspresji w poszczególnych grupach wiekowych w analizie Tgaq*44 vs. FVB (**Ryc. 41 B**). Wykazano bowiem, że 183-272 „genów starego serca” i „genów starzenia” się serca wystąpiło, jako DEGs w wieku 4-14 miesięcy w analizie Tgaq*44 vs. FVB, co złożyło się na 35% wszystkich DEGów w wieku 4 miesięcy i 11-17% w wieku 8-14 miesięcy. Oznaczało to, że większość genów spełniających założone kryteria dla różnicowej ekspresji w analizie Tgaq*44 vs. FVB było związanych z rozwojem niewydolności serca, a mniejszość z wpływem niewydolności serca na zmianę ekspresji genów związanych z procesem starzenia się serca. Interesujące, większość genów związanych z procesem starzenia się serca zachowywało się podobnie w transkryptomach serc myszy Tgaq*44 i FVB.

Podsumowując, rozwój niewydolności serca w sercach myszy Tgaq*44 w trakcie starzenia chronologicznego spowodował liczniejsze i silniejsze zmiany w transkrypcie serca niż w trakcie starzenia się biologicznego serca myszy FVB. Wyniki te dowiodły, że niewydolność serca przyczyniła się do nasilenia zmian ekspresji genów w transkryptomach serc myszy Tgaq*44. Od 4 do 14 miesiąca życia wśród genów różnicujących transkryptomy serc myszy Tgaq*44 od FVB dominowały geny powiązane w sposób bezpośredni lub pośredni z

rozwojem niewydolności serca myszy Tgaq*44. Niewydolność serca miała najsilniejszy wpływ na zmiany ekspresji genów w transkryptomie serc myszy Tgaq*44 na jej końcowym etapie, gdyż liczba DEGów była najliczniejsza w sercach 12-miesięcznych myszy Tgaq*44 zarówno w analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44 oraz Tgaq*44 vs. FVB.

5.8.3 Geny i procesy związane z procesem starzenia się serca trwale różnicujące transkryptomy serc myszy Tgaq*44 od FVB od wczesnego aż do końcowego etapu rozwoju niewydolności serca u myszy Tgaq*44

W transkryptomach serc 14-miesięcznych myszy FVB w analizie FVB vs. FVB zidentyfikowano „*geny starego serca*”, „*geny starzenia*” się serca, „*procesy starego serca*” oraz „*procesy starzenia*” się serca i sprawdzono ich udział w różnicowaniu transkryptomów serc 4-14-miesięcznych myszy Tgaq*44 od FVB. Celem tej analizy było znalezienie genów i procesów biologicznych związanych z procesem starzenia biologicznego serca, tzn. genów, których zmiana ekspresji oraz uruchomienie procesów biologicznych nastąpiło wskutek rozwijającej się niewydolności serca już u 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 i było trwałe aż do końcowego etapu niewydolności serca u 14-miesięcznych myszy Tgaq*44.

W tym celu sprawdzono ile spośród wyselekcjonowanych 935 genów związanych z procesem starzenia się serca (tj. 454 „*genów starego serca*” i 481 „*genów starzenia*” się serca, **ryc. 37 A, 40 A**) spełniło założone kryteria dla różnicowej ekspresji w każdej grupie wiekowej myszy osobno w analizie Tgaq*44 vs. FVB. Genów tych było od 183 do 272 (**Ryc. 41 B**). Następnie sprawdzono ile spośród nich (183-272 genów) znalazło się w grupie 156 genów spełniających założone kryteria dla różnicowej ekspresji różnicujących transkryptomy serc we wszystkich grupach wiekowych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB (**Ryc. 42 A**). Znalazło się wśród nich 8 „*genów starego serca*” (których ekspresja była regulowana w górę: *Krt18*, *Egr2*, *Timp1*, *Sfrp2*, *Panx1*, *Nrg1* i w dół: *Adamts3*, *Clcn1*, **ryc. 42 B**) i 26 „*genów starzenia*” się serca (których ekspresja była regulowana w górę: *Cilp*, *Gdf15*, *Gpnmb*, *Egr3*, *Dkk3*, *Meox1*, *Fbln7*, *Map6*, *Clec4n*, *Gng8*, *Nppb*, *Itga11*, *Rasd1*, *Cdkn1a*, *Tent5b* i w dół: *Ano5*, *Gm29040*, *BB123696*, *Tmem52*, *Clec18a*, *Pah*, *Amtn*, *Kcnk1*, *Gm31600*, *Slc5a1*, *Tmprss4*, **ryc. 42 C**).

Trzeba mieć na uwadze, że wyselekcjonowane 8 „*genów starego serca*” oraz 26 „*genów starzenia*” się serca nie reprezentowało najsilniej zmienionych genów starzenia się serca 14-miesięcznych myszy FVB w analizie FVB vs. FVB i mogły one nie odgrywać znaczącej roli w procesie starzenia biologicznego serca. Z drugiej strony, „*geny starego serca*” oraz „*geny starzenia*” się serca, których ekspresja uległa zmianie pod wpływem niewydolności serca w sercach 4-14-miesięcznych myszy Tgaq*44 (analiza Tgaq*44 vs. FVB, **ryc. 42 B, C**) mogły

nie odgrywać znaczącej roli w zmianach transkryptomów serc myszy Tgaq*44 towarzyszących rozwojowi niewydolności serca. W związku z tym trzeba z ostrożnością wysuwać wnioski na podstawie tych wyników. Należy również pamiętać, że w uruchomieniu procesów biologicznych bierze udział różna pula genów, dlatego istotna zmiana ekspresji pojedynczych genów związanymi z danymi procesami biologicznymi pozwala jedynie przypuszczać, że dany proces biologiczny został zainicjowany, ale nie wiadomo z jaką siłą.

W celu wskazania genów związanych ze starzeniem się serca, które mogą odgrywać znaczącą rolę w zmianach transkryptomów serc myszy Tgaq*44 towarzyszących rozwojowi niewydolności serca sprawdzono czy znajdują się one wśród 20 genów, które wystąpiły w ≥ 2 grupach wiekowych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB wśród 10 genów, których wartość różnicowej ekspresji była najwyższa lub najniższa (**Tabela 10, 11**). Znalazło się wśród nich 4 geny (*Clcn1*, *Gdf15*, *Tmprss4*, *F830016B08Rik*), z których 3 (*Clcn1*, *Gdf15*, *Tmprss4*) należały do wcześniej zidentyfikowanych 8 „genów starego serca” i 26 „genów starzenia” się serca różnicujących transkryptomy serc myszy Tgaq*44 od FVB w każdej grupie wiekowej 4-14-miesięcznych myszy (analiza Tgaq*44 vs. FVB, **ryc. 42 B, C**)

Przypuszczamy, że przedwczesny proces starzenia w sercach myszy Tgaq*44 był związany z aktywacją procesu włóknienia serca (geny *Egr2*, *Egr3*, *Timp1*, *Sfrp2*, *Panx1*, *Cilp*, *Itga11*, *Gdf15*, **tabela 5, 6a**)(117,118,121,123,128,131,133,142,143), aktywacją procesu zapalnego w sercu (gen *Panx1*, **tabela 5**)(122,123), nasileniem przebudowy serca (geny *Gpnmb*, *Meox1*, *Fbln7*, **tabela 6a**)(132,135,136), aktywacją starzenia komórkowego (*ang. cellular senescence*, gen *Cdkn1a*, **tabela 6b**)(146), aktywacją procesów kardioprotekcyjnych (geny *Krt18*, *Nrg1*, *Dkk3*, *Nppb*, **tabela 5, 6a**)(116,124,134,140), zaburzeniem rytmu serca (gen *Kcnk1*, **tabela 6b**)(154), spadkiem przewodnictwa potencjału czynnościowego (gen *Clcn1*, **tabela 5**)(127) oraz spadkiem transportu glukozy do komórki (gen *Slc5a1*, **tabela 6b**)(155). Interesujący jest fakt, że wśród wyselekcjonowanych genów przedwczesnego starzenia się serca myszy Tgaq*44 znalazły się geny kodujące białka, które uznane są za biomarkery: włóknienia serca (geny *Gdf15*, *Cilp*, *Timp1*, **tabela 5, 6a**)(118,128,131), niewydolności serca (geny *Timp1*, *Nppb*, **tabela 5, 6a**)(118,141).

Określono również, które procesy biologiczne zostały uruchomione przez szereg genów spełniających założone kryteria dla różnicowej ekspresji i reprezentowały one nadreprezentatywne procesy biologiczne w sercu, tzn. procesy, które miały znaczący wpływ na obraz fenotypu serca. Spośród 26 nadreprezentatywnych procesów biologicznych uruchamianych w każdej grupie wiekowej 4-14-miesięcznych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB znalazło się jedynie 8 „procesów starzenia” się serca (**Tabela 4**), do których należały

procesy: „aktywność cytokin”, „adhezja komórkowa”, „transdukcja sygnału”, „regulacja aktywności receptorów sygnalizacyjnych”, „aktywność receptora sprzężonego z białkiem G”, „szlak sygnałowy receptora sprzężonego z białkiem G”, „przestrzeń zewnątrzkomórkowa”, „region zewnątrzkomórkowy”. Wyniki te dowiodły, że niewydolność serca uruchamia już w sercach 4-miesięcznych myszy Tgaq*44 procesy związane ze starzeniem się serca, które były związane z przebudową macierzy zewnątrzkomórkowej (procesy: „przestrzeń zewnątrzkomórkowa”, „region zewnątrzkomórkowy”). Modyfikacja genetyczna w kardiomiocytach myszy Tgaq*44 umożliwiła uzyskanie przedwczesnych zmian starczych w transkryptomach serc myszy Tgaq*44, gdyż wykazano, że uruchomienie procesów związanych z białkiem G jest związane ze starzeniem biologicznym serca myszy FVB.

Podsumowując, jedynie dzięki wykorzystaniu różnych analiz transkryptomicznych jednocześnie udało się zidentyfikować geny i procesy biologiczne w transkryptomie serca myszy Tgaq*44, które były związane z procesem starzenia się serca i które były istotnie zaangażowane w proces starzenia się serca myszy Tgaq*44 już od wczesnego etapu rozwoju niewydolności serca. Do genów tych należało wyselekcjonowanych 8 „genów starego serca” i 26 „genów starzenia” się serca, z których wydaje się, że geny *Clcn1*, *Gdf15*, *Tmprss4* mogły najsilniej przyczynić się do zmian w transkryptomie serca myszy Tgaq*44 towarzyszących rozwojowi niewydolności serca i starzeniu się serca. Proces przedwczesnego starzenia w sercach myszy Tgaq*44 wydawał się być związany ze zmianami w macierzy zewnątrzkomórkowej, aktywacją procesów włóknienia, starzenia komórkowego, przebudowy serca, zaburzeniami rytmu serca. Wydaje się również, że proces przedwczesnego starzenia serca w sercu myszy Tgaq*44 był związany w dużej mierze z modyfikacją genetyczną w kardiomiocytach i szlakami sygnalizacyjnymi uruchamianymi przez białko α q*44.

5.8.4 Geny silnie związane ze starzeniem się serca u myszy FVB i z rozwojem niewydolności serca u myszy Tgaq*44

W każdej grupie wiekowej myszy FVB w analizie FVB vs. FVB wśród 10 genów, których wartość różnicowej ekspresji była najwyższa lub najniższa znalazły się geny *Tnf* (wzrost ekspresji) i *Hif3a* (spadek ekspresji), który koduje białko Hif-3 α (**Tabela 7, 8**). Założono, że są one silnie zaangażowane w proces starzenia biologicznego serca myszy FVB.

W dotychczasowo przeprowadzonych badaniach dowiedziono, że *Tnf* wykazuje negatywny efekt inotropowy, uczestniczy w przebudowie serca i rozwoju niewydolności serca (157,158). Z kolei Hif-3 α powoduje hamowanie aktywności Hif-1 α i Hif-2 α (159), dlatego obniżenie ekspresji *Hif3a* w trakcie starzenia się serca myszy FVB wydaje się pośrednio

wskazywać na zwiększenie aktywności Hif-1 α i Hif-2 α . Długotrwała aktywacja Hif-1 α i Hif-2 α powoduje ich wzajemnie antagonistyczne oddziaływanie na stres oksydacyjny, stan zapalny, włóknienie. Hif-1 α nasila te procesy, a Hif-2 α osłabia. Zaburzenie więc równowagi wzajemnego oddziaływania Hif-1 α i Hif-2 α może przyczynić się do progresji chronicznej niewydolności serca (240). Wykazano również, że aktywacja Hif-1 α przyczynia się do obniżenia wydolności serca (241). Tak więc chroniczna aktywacja genu *Tnf*, jak i chroniczne obniżenie ekspresji genu *Hif3a* w trakcie starzenia się serca myszy FVB wydają się stopniowo, z czasem przyczyniać do powstania fenotypu starczego serca u myszy FVB.

Założono, że geny, które wystąpiły w ≥ 2 grupach wiekowych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB wśród 10 genów, których wartość różnicowej ekspresji była najwyższa lub najniższa były najbardziej znaczącymi w różnicowaniu transkryptomów serc myszy Tgaq*44 od FVB (**Tabela 10**). Genami tymi były *Ptchd3*, *Kcnip1*, *Fgf23*, *Atp6v0a4*, *Fgf21*, *Adm2*, *Aldob*, *Sprrr1a*, *Acsm5*, *Chodl*, *Cyp2b10*, *Klk1b26*, *Mid1-ps1*, *4833412C05Rik*, *Nppa*, *Scd4*, *Gdf15*, *Clcn1*, *Tmprss4*, *F830016B08Rik*. Kolejno, sprawdzono w jakich grupach wiekowych myszy w analizach Tgaq*44 vs. FVB, Tgaq*44 vs. Tgaq*44 i FVB vs. FVB te geny spełniają założone kryteria dla różnicowej ekspresji (**Tabela 11**). Te z nich uznano za „geny niewydolności serca”, które:

- 1.) spełniły założone kryteria dla różnicowej ekspresji jednocześnie w trzech grupach wiekowych myszy w analizie Tgaq*44 vs. FVB i analizie Tgaq*44 vs. Tgaq*44 (**Tabela 11**),
- 2.) nie spełniły założonych kryteriów dla różnicowej ekspresji w analizie FVB vs. FVB lub spełniły jedynie w jednej grupie wiekowej myszy FVB (z wykluczeniem 14-miesięcznych myszy) w analizie FVB vs. FVB (**Tabela 11**).

Wykazano w ten sposób, że do „genów niewydolności serca” należały geny *Fgf23*, *Atp6v0a4*, *Fgf21*, *Adm2*, *Sprrr1a*, *Chodl*, *4833412C05Rik*, *Nppa*, których ekspresja była regulowana w górę oraz geny *Ptchd3*, *Kcnip1*, *Aldob*, *Acsm5*, *Scd4*, których ekspresja była regulowana w dół (**Tabela 11**).

Wśród wytypowanych „genów niewydolności serca” w sercach myszy Tgaq*44 znajdowały się geny kodujące biomarkery chorób serca – białka *Fgf21*, *Fgf23*, *Nppa* (**Tabela 12a, c**)(162,164,174). Białko *Fgf23* przyczynia się do hipertrofii, zwłóknienia, przebudowy, uszkodzenia serca oraz stanu zapalnego w sercu (162). Z kolei wyselekcjonowane „geny niewydolności serca” - *Fgf21*, *Nppa*, *Sprrr1a*, *Adm2* kodują odpowiednio białka *Fgf21*, *Nppa*, *Sprrr1a* i peptyd *Adm2*, które wywierają działanie kardioprotekcyjne (**Tabela 12a-c**) (164,165,167,174). Również białka *Fgf21*, *Nppa* oraz długi niekodujący RNA - *4833412C05Rik* mają działanie przeciwhipertroficzne, a białko *Fgf21* wykazuje działanie

przeciwpalne, chroni przed stresem oksydacyjnym oraz hamuje apoptozę kardiomiocytów (**Tabela 12a-c**)(164,173,174). Wydaje się, że do rozwoju niewydolności serca myszy Tgaq*44 przyczyniają się także zaburzenia w gospodarce potasowej (gen *Kcnip1*, **tabela 12a**) oraz zaburzenia metaboliczne w sercu (geny *Aldob*, *Acsm5*, **tabela 12b**)(161,166,168).

5.8.4.1 Charakterystyczne geny na poszczególnych etapach rozwoju niewydolności serca myszy Tgaq*44

W analizie Tgaq*44 vs. FVB wyselekcjonowano po 10 genów, których wartość różnicowej ekspresji w łącznej analizie była najwyższa lub najniższa: od wczesnego do końcowego etapu niewydolności serca (4-14-miesięczne myszy); od przejściowego do końcowego etapu niewydolności serca, ale nie na wczesnym etapie (8-14-miesięczne myszy, ale nie 4-miesięczne myszy); jedynie w końcowych miesiącach życia myszy Tgaq*44 obejmujących głównie końcowy etap niewydolności serca (10-14-miesięczne myszy, ale nie 4-8-miesięczne myszy). Założono, że wytypowane w ten sposób geny są charakterystyczne dla poszczególnych etapów niewydolności serca myszy Tgaq*44. Sprawdzono kolejno, czy znajdują się wśród nich „geny niewydolności serca”.

Wykazano, że od wczesnego aż do końcowego etapu niewydolności serca pojawiły się następujące „geny niewydolności serca” - *Sprr1a*, *Nppa*, *4833412C05Rik*, *Aldob*, *Acsm5*, od przejściowego do końcowego etapu niewydolności serca - *Fgf23*, *Fgf21*, *Adm2*, *Atp6v0a4*, *Kcnip1*, jedynie w końcowych miesiącach życia myszy Tgaq*44 obejmujących głównie końcowy etap niewydolności serca – *Chodl* (**Tabela 13**). Wydaje się, że te geny mogą stanowić potencjalne genetyczne markery poszczególnych etapów rozwoju niewydolności serca.

Podsumowując, szeroka analiza transkryptomyczna serc myszy FVB i Tgaq*44 umożliwiła wyselekcjonować geny, które mogą mieć istotne znaczenie w procesie starzenia się serca (geny *Tnf*, *Hif3a*), rozwoju niewydolności serca („geny niewydolności serca” - *Fgf23*, *Atp6v0a4*, *Fgf21*, *Adm2*, *Sprr1a*, *Chodl*, *4833412C05Rik*, *Nppa*, *Ptchd3*, *Kcnip1*, *Aldob*, *Acsm5*, *Scd4*). Większość spośród zidentyfikowanych „genów niewydolności serca” może być rozpatrywana, jako potencjalne markery genetyczne poszczególnych etapów rozwoju niewydolności serca myszy Tgaq*44. Aby to potwierdzić koniecznym jest w przyszłości zbadać udział wyselekcjonowanych genów w procesie starzenia się serca i rozwoju niewydolności serca poprzez wyciszenie odpowiednich genów w sercu myszy FVB i myszy Tgaq*44.

Przeprowadzone badania transkryptomiczne w sercach myszy FVB i Tgaq*44 nie pozwalają na wskazanie, czy źródłem przedwczesnego procesu starzenia się serca myszy

Tgαq*44 (charakteryzującym się m.in. zwłóknieniem okołokapilarnym) były wczesne zmiany starcze w naczyniach wieńcowych, gdyż badania transkryptomiczne wykonano w tkance sercowej składającej się z kilku typów komórek, m.in. z kardiomiocytów, fibroblastów, komórek śródbłónka naczyń. W związku z tym, koniecznym wydaje się w przyszłości wykonać analizę NGS jedynie w komórkach śródbłónka naczyń wieńcowych w procesie starzenia się serca myszy FVB i w toku rozwoju niewydolności serca myszy Tgαq*44.

6. Ograniczenia badań

Głównym ograniczeniem niniejszych badań jest wiek myszy kontrolnych FVB. Wiele badań wykorzystujących stare myszy definiowało je jako myszy w wieku około 24 miesięcy (242–244), dlatego 14-miesięczne myszy FVB, które wykorzystano w tej pracy mogły nie rozwinać typowych cech dla starszych osobników myszy (zarówno na poziomie genotypu i fenotypu). Wykorzystanie 14-miesięcznych myszy FVB (jako kontroli), w których mogły nie wystąpić cechy charakterystyczne dla starego serca, było zdeterminowane rozwojem patologii serca u myszy Tgαq*44, których śmiertelność gwałtownie wzrasta po 14 miesiącu życia (185). Niemniej jednak, nawet jeżeli u 14-miesięcznych myszy FVB pojawiły się wczesne zmiany charakterystyczne dla starczego serca (na poziomie genotypu i fenotypu), to część z nich była już widoczna u 4-miesięcznych myszy Tgαq*44, co bezspornie świadczy o przyspieszeniu procesu starzenia serca u myszy Tgαq*44. Z drugiej strony, jeżeli wykorzystano by w niniejszej pracy starsze myszy FVB - około 20-miesięczne, to mogłoby się okazać że u 4-miesięcznych myszy Tgαq*44 występuje więcej cech charakterystycznych dla starego serca. W tym świetle wydaje się, że można stwierdzić, iż wykryte cechy starczego serca u 4-miesięcznych myszy Tgαq*44 odnoszą się do początkowego etapu starzenia się serca zdrowych myszy.

Kolejnym ograniczeniem niniejszych badań była jednoczesna analiza transkryptomiczna wszystkich komórek składających się na tkankę sercową bez wskazania, który typ komórek był w głównej mierze odpowiedzialny za zaobserwowane zmiany w transkryptomie serca.

Zawarte w pracy doktorskiej wyniki zmian ekspresji genów w transkryptomach serc w trakcie rozwoju niewydolności serca i procesu starzenia się serca nie zostały potwierdzone bezpośrednimi pomiarami poziomu ekspresji genów techniką qRT-PCR ani poziomu ekspresji białka techniką Western blot, co mogłoby przyczynić się do wzmocnienia wniosków płynących z uzyskanych wyników.

W końcu nie udowodniono w sposób bezpośredni funkcji wyselekcjonowanych genów w przedwczesnym starzeniu się serca myszy Tgαq*44 w czasie rozwoju niewydolności serca, gdyż nie wyciszono ekspresji poszczególnych genów w modelu myszy Tgαq*44. Potencjalną funkcję wyselekcjonowanych genów w zmianach patofizjologicznych serca przedstawiono jedynie na podstawie dostępnej literatury.

Pomimo tych ograniczeń wyniki płynące z analiz sekwencjonowania nowej generacji serc myszy Tgαq*44 i FVB w połączeniu z wynikami czynnościowymi, morfologicznymi opisującymi fenotyp serc myszy Tgαq*44 i FVB pozwoliły na stwierdzenie, że elementem rozwoju niewydolności serca w sercach myszy Tgαq*44 jest proces przedwczesnego starzenia się serca obejmujący zmiany wokół kapilar wieńcowych i w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, który przyczynia się do rozwoju zaburzeń czynnościowych i strukturalnych mikrokążenia wieńcowego.

7. Wnioski

1. Wykazano że u myszy Tgaq*44 występują elementy patofizjologii niewydolności mięśnia sercowego, które mogą być związane z przedwczesnym uruchomieniem procesów starzenia się serca u myszy Tgaq*44, bowiem występują również u starzejących się 14-16-miesięcznych myszy FVB. Tego typu zmiany występują na poziomie funkcjonalnym (rozkurczowa niewydolność lewej komory, upośledzenie podstawowego przepływu wieńcowego), morfologicznym (włóknienie serca, w szczególności włóknienie okołokapilarne, akumulacja komponentów macierzy zewnątrzkomórkowej), i transkryptomicznym (przedwczesne starzenie, przedwczesna aktywacja „genów starego serca” i „genów starzenia” się serca u myszy Tgaq*44 w wieku 4-14 miesięcy).

2. Na poziomie funkcjonalnym starzenie się mięśnia sercowego u 16-miesięcznych myszy FVB ujawniło się, jako niewydolność rozkurczowa lewej komory serca. Niewydolność mięśnia sercowego u myszy Tgaq*44, widoczna była już u 4-miesięcznych myszy i miała charakter niewydolności skurczowej i rozkurczowej mięśnia sercowego. Nie można więc było oddzielić niewydolności serca wynikającej z procesów starzenia, i rozwijającej się z powodu nadekspresji stale aktywnej podjednostki α białka Gq w kardiomiocytach. Charakterystyczną cechą postępu niewydolności serca u myszy Tgaq*44 było upośledzenie podstawowego przepływu wieńcowego przy zachowanej rezerwie wieńcowej, które powiązano z postępującym włóknieniem okołokapilarnym i uznano za bardzo ważny element patofizjologii starzejącego się serca oraz postępującej niewydolności serca.

3. Na poziomie morfologicznym, charakterystyczną cechą starzenia się mięśnia sercowego u 14-miesięcznych myszy FVB, był proces włóknienia śródmiąższowego, a szczególnie włóknienie okołokapilarne (które występowało na podobnym poziomie u młodych, 4-miesięcznych myszy Tgaq*44) oraz akumulacja komponentów macierzy zewnątrzkomórkowej, którym towarzyszyła zmiana w blaszce podstawnej kapilar (która była na wyższym poziomie już u 4-miesięcznych myszy Tgaq*44). Związane z wiekiem włóknienie okołokapilarne u myszy FVB nie było związane ze zmianami w strukturze i układzie kapilar mięśnia sercowego, podczas gdy u myszy Tgaq*44 układ kapilar był znacznie zaburzony i obserwowano kompensacyjne zwiększenie światła kapilar. Zmiany strukturalne kapilar wieńcowych wydają się być istotną podstawą postępującego upośledzenia podstawowego przepływu wieńcowego starzejącego się serca oraz niewydolności serca.

4. Na poziomie transkryptomicznym, wykazano że rozwój niewydolności serca u myszy Tgaq*44 był związany z bardziej intensywnymi zmianami w transkrypcji serca niż u myszy

FVB w trakcie procesu starzenia się serca. Zmiany w transkryptomie serca myszy Tgaq*44 był związane w głównej mierze z rozwojem niewydolności serca, natomiast w transkryptomie serca myszy FVB z procesem starzenia. Ciekawe, że od poszczególnych etapów rozwoju niewydolności serca myszy Tgaq*44 występowała aktywacja specyficznej puli genów, co świadczy o tym, że proces rozwoju niewydolności serca jest procesem wieloetapowym.

5. Na poziomie transkryptomycznym, wykazano przedwcześnie zachodzący proces starzenia się serca w sercach myszy Tgaq*44 w wyniku rozwijającej się niewydolności serca. W transkryptomie serca myszy FVB zidentyfikowano 454 „*geny starego serca*” i 56 „*procesów starego serca*”, spełniających kryteria dla różnicowej ekspresji i nadreprezentatywności dopiero u 14-miesięcznych myszy FVB reprezentując zmiany transkryptomyczne charakterystyczne dla starego serca. Zidentyfikowano 481 „*genów starzenia*” się serca i 55 „*procesów starzenia*” się serca w transkryptomie serca myszy FVB, które były odpowiedzialne za stopniowo zachodzący proces starzenia się serca. Niewydolność serca u myszy Tgaq*44 spowodowała zmianę profilu ekspresji niektórych „*genów starego serca*” i „*genów starzenia*” się serca w innym kierunku, niż jak to miało miejsce w przypadku starzejącego się serca myszy FVB. Patofizjologiczne znaczenie tych zmian pozostaje do wyjaśnienia. Natomiast, ekspresja większości pozostałych „*genów starego serca*” i „*genów starzenia*” się serca ulegała podobnej zmianie w trakcie starzenia chronologicznego w transkryptomach serc myszy Tgaq*44 i FVB. Ekspresja niektórych z „*genów starego serca*” była silnie zmieniona u myszy Tgaq*44 w wieku 4-14 miesięcy pod wpływem niewydolności serca, co świadczy o przedwczesnym i istotnym uruchomieniu procesu starzenia się serca u myszy Tgaq*44 w wyniku rozwoju niewydolności serca. Wykazano, że ekspresja 8 „*genów starego serca*” (*Sfrp2, Egr2, Panx1, Krt18, Timp1, Clcn1, Adamts3, Nrg1*) oraz 26 „*genów starzenia*” się serca (*Pah, Amtn, Gdf15, Itga11, Map6, Cdkn1a, Gm31600, Tmem52, Meox1, Fbln7, Gng8, Gpnmb, BB123696, Rasd1, Tent5b, Nppb, Ano5, Dkk3, Tmprss4, Clec4n, Kcnk1, Gm29040, Slc5a1, Clec18a, Cilp, Egr3*) była zmieniona przez rozwijającą się niewydolność serca w transkryptomie serca myszy Tgaq*44 przez cały okres jego rozwoju. Wśród nich 3 geny (*Clcn1, Tmprss4, Gdf15*) wydawały się być bardzo silnie zaangażowane w zmiany w transkryptomach serca myszy Tgaq*44 w toku rozwoju niewydolności serca. Głównie te geny (8 „*genów starego serca*” i 26 „*genów starzenia*” się serca) odpowiadały za zmiany w macierzy zewnątrzkomórkowej, aktywację procesów włóknienia, starzenia komórkowego, przebudowę serca, zaburzenia pracy serca i wydawały się być odpowiedzialne za proces przedwczesnego starzenia w sercach myszy Tgaq*44. Wykazano również, że 8 „*procesów starzenia*” się serca było uruchomionych przez niewydolność serca w

transkryptomach serc myszy Tgaq*44 przez cały okres rozwoju niewydolności serca. Należały do nich:

- a.) procesy: „aktywność receptora sprzężonego z białkiem G”, „szlak sygnałowy receptora sprzężonego z białkiem G”, które potwierdziły, że modyfikacja genetyczna w kardiomiocytach myszy Tgaq*44 może uruchamiać przedwczesny proces starzenia się serca myszy Tgaq*44,
- b.) procesy: „przestrzeń zewnątrzkomórkowa”, „region zewnątrzkomórkowy”, które potwierdziły, że przedwczesny proces starzenia się serca u myszy Tgaq*44 był związany ze zmianami w macierzy zewnątrzkomórkowej mięśnia sercowego.

6. Zidentyfikowano 13 „genów niewydolności serca” (*Fgf23*, *Atp6v0a4*, *Fgf21*, *Adm2*, *Sprr1a*, *Chodl*, *4833412C05Rik*, *Nppa*, *Ptchd3*, *Kcnip1*, *Aldob*, *Acsm5*, *Scd4*). Część z nich wykazuje działanie kardioprotekcyjne (*Fgf21*, *Nppa*, *Adm2*, *Sprr1a*), a część przyczynia się do pogłębienia patologii serca (*Fgf23* - hipertrofia, zwłóknienie, przebudowa serca, stan zapalny w sercu; *Kcnip1* - zaburzenia w gospodarce potasowej; *Aldob*, *Acsm5* - zaburzenia metaboliczne w sercu). Tym samym dowiedziono, że na poziomie transkryptomycznym w trakcie rozwoju niewydolności serca myszy Tgaq*44 następuje silna aktywacja genów odpowiedzialnych zarówno za procesy adaptacyjne, jak i maladaptacyjne niewydolności serca. Wykazano również, że część z „genów niewydolności serca” może stanowić potencjalnie nowe markery genetyczne poszczególnych etapów niewydolności serca: wczesnego etapu (*Sprr1a*, *Nppa*, *4833412C05Rik*, *Aldob*, *Acsm5*), przejściowego etapu (*Fgf23*, *Fgf21*, *Adm2*, *Atp6v0a4*, *Kcnip1*) oraz końcowego etapu niewydolności serca (*Chodl*). Wykazano, że istotne znacznie w procesie starzenia się serca myszy FVB mogą mieć geny *Tnf* i *Hif3a*.

7. Udowodniono, że neurohormonalne elementy patofizjologii niewydolności mięśnia sercowego, takie jak: aktywacja ACE w sercu, aktywacja RAAS na obwodzie (zwiększone stężenie aldosteronu w osoczu) nie są związane z przedwczesnym uruchomieniem procesów starzenia się serca, są natomiast skutkiem rozwijającej się niewydolności serca uruchomionej w wyniku modyfikacji genetycznej serc myszy Tgaq*44.

Wniosek końcowy

W sumie, przeprowadzone badania na poziomie funkcjonalnym, morfologicznym, hormonalnym, transkryptomycznym wykazały, że w procesie rozwoju niewydolności mięśnia sercowego biorą udział mechanizmy patofizjologiczne zaangażowane w rozwój niewydolności serca oraz w proces starzenia się serca, te ostatnie uwidaczniają się w szczególności na wczesnym i końcowym etapie niewydolności serca. Funkcjonalne ich działanie skutkuje w upośledzeniu czynności mikrokrażenia wieńcowego, w szczególności

w postępującym upośledzeniu podstawowego przepływu wieńcowego, który może stać się istotnym funkcjonalnym celem terapeutycznym starzejącego się i niewydolnego mięśnia sercowego.

Farmakoterapia niewydolności serca powinna obejmować nie tylko zahamowanie nadmiernie aktywnych układów neurohormonalnych, która stanowi obecnie podstawę farmakoterapii niewydolności serca, ale również powinna obejmować zahamowanie procesów starzenia się serca, które wydają się nie zależeć od nadmiernej aktywacji układów neurohormonalnych, prowadzą natomiast do pogłębiającego się strukturalnego oraz funkcjonalnego upośledzenia mikrokrażenia wieńcowego w przewlekłej niewydolności serca rozwijającej się w starzejącym się organizmie.

8. Streszczenie

Wyzwaniem przyszłości jest starzejące się społeczeństwo i leczenie chorób wieku starczego, do których należy niewydolność serca. Istnieje więc, pilna potrzeba lepszego zrozumienia mechanizmów molekularnych leżących u podłoża procesów starzenia się serca w celu opracowania nowych strategii terapeutycznych spowalniania lub hamowania procesów patofizjologicznych starzenia się serca, które mogą mieć znaczenie w rozwoju niewydolności serca.

Celem niniejszej pracy było opisanie mechanizmów odpowiedzialnych za starzenie się serca w toku rozwoju niewydolności serca oraz opisanie wzajemnych zależności pomiędzy procesem starzenia się serca oraz rozwojem niewydolności mięśnia sercowego. W tym celu wykorzystano unikatowy mysi model niewydolności mięśnia sercowego (mysz Tgaq*44), w którym niewydolność serca rozwija się powoli, dzięki czemu umożliwia jednocześnie śledzenie towarzyszących zmian w wyniku postępującego procesu starzenia się serca oraz patologii serca wywołanej sercowo-specyficzną nadekspresją białka Gαq w kardiomiocytach.

Zmiany towarzyszące postępującemu procesowi starzenia się serca i rozwojowi niewydolności serca badano na poziomie funkcjonalnym, morfologicznym, hormonalnym, transkryptomicznym. Wykorzystano do tego szereg metod eksperymentalnych: obrazowanie rezonansem magnetycznym i transmisyjnym mikroskopem elektronowym, ultrasonografię dopplerowską, wysokociśnieniową chromatografię cieczową połączoną z tandemową spektrometrią mas (HPLC–MS/MS), sekwencjonowanie nowej generacji, perfuzję izolowanych serc *ex vivo*, barwienia histologiczne i immunohistochemiczne.

Proces starzenia się serca nasilił się gwałtownie w sercach 14-16-miesięcznych myszy FVB i charakteryzował się upośledzoną funkcją rozkurczową serca, zwłóknieniem, rozbudową macierzy zewnątrzkomórkowej, spadkiem podstawowego przepływu wieńcowego, upośledzeniem reaktywności naczyń wieńcowych na wzrastający *preload*, spadkiem względnej liczby limfocytów oraz gwałtowną aktywacją genów i uruchomieniem procesów biologicznych uczestniczących w procesie starzenia się serca (454 „genów starego serca”, 481 „genów starzenia” się serca, 56 „procesów starego serca”, 55 „procesów starzenia” się serca). Proces starzenia się serca myszy FVB nie był związany z aktywacją systemu renina-angiotensyna-aldosteron, gdyż aktywacja tego szlaku nie nastąpiła w sercu ani na obwodzie u 14-miesięcznych myszy FVB.

Wczesna niewydolność serca u 4-8-miesięcznych myszy Tgαq*44 charakteryzowała się upośledzeniem funkcji skurczowej i rozkurczowej serca, zwiększonym włóknieniem śródmiąższowym i okołokapilarnym, przebudową macierzy zewnątrzkomórkowej, upośledzeniem budowy aparatu kurczliwego serca, zmianą struktury kapilar, dystansowaniem się kapilar od siebie, zmianą układu kapilar wieńcowych względem kardiomyocytów z równoległego na „oplatający”, spadkiem podstawowego przepływu wieńcowego, aktywacją szlaku renina-angiotensyna w sercu. Natomiast końcowy etap niewydolności serca mysz Tgαq*44 charakteryzował się wzrostem masy przedsionków, aktywacją szlaku renina-angiotensyna-aldosteron w osoczu, upośledzeniem ultrastruktury śródbłonna wieńcowego, upośledzeniem rezerwy wieńcowej oraz reaktywności naczyń wieńcowych na wzrastający *preload*.

Niewydolność serca spowodowała silniejsze zmiany w transkryptomach serc myszy Tgαq*44 niż proces starzenia w transkryptomach serc myszy kontrolnych FVB. Niewydolność serca u myszy Tgαq*44 przyczyniła się do przyspieszenia procesu starzenia się serca. W transkryptomach serc myszy Tgαq*44 znaleziono 8 „*genów starego serca*”, 26 „*genów starzenia się*” serca oraz 8 „*procesów starzenia*” się serca, które były trwale zaangażowane w proces starzenia biologicznego serca u myszy Tgαq*44 od wczesnego aż do końcowego etapu niewydolności serca. Część z nich była związana z procesem włóknienia i zmianami w macierzy zewnątrzkomórkowej. W transkryptomach serc myszy Tgαq*44 zidentyfikowano 13 „*genów niewydolności serca*”, wśród których znalazły się geny mogące stać się potencjalnie nowymi markerami genetycznymi określonych etapów niewydolności serca.

Wykazano, że u myszy Tgαq*44 występują elementy patofizjologii niewydolności mięśnia sercowego, które mogą być związane z przedwczesnym uruchomieniem procesów starzenia się serca u myszy Tgαq*44, bowiem występowały również u starzejących się 14-16-miesięcznych myszy FVB. Tego typu zmiany występowały na poziomie funkcjonalnym (rozkurczowa niewydolność lewej komory, upośledzenie podstawowego przepływu wieńcowego), morfologicznym (włóknienie serca, w szczególności włóknienie okołokapilarne, akumulacja komponentów macierzy zewnątrzkomórkowej), i transkryptycznym (przedwczesne starzenie, przedwczesna aktywacja „*genów starego serca*” i „*genów starzenia*” się serca u myszy Tgαq*44 w wieku 4-14 miesięcy). Udowodniono, że neurohormonalne elementy patofizjologii niewydolności mięśnia sercowego towarzyszą rozwijającej się niewydolności serca w wyniku modyfikacji genetycznej w sercach myszy Tgαq*44, ale nie towarzyszą procesowi starzenia się serca myszy FVB.

W sumie, przeprowadzone badania na poziomie funkcjonalnym, morfologicznym, hormonalnym, transkryptomicznym wykazały, że w procesie rozwoju niewydolności mięśnia sercowego biorą udział mechanizmy patofizjologiczne zaangażowane w rozwój niewydolności serca oraz w proces starzenia się serca, te ostatnie uwidaczniają się w szczególności na wczesnym i końcowym etapie niewydolności serca. Funkcjonalne ich działanie skutkuje m.in. upośledzeniem czynności mikrokążenia wieńcowego.

Farmakoterapia niewydolności serca powinna więc obejmować nie tylko zahamowanie nadmiernie aktywnych układów neurohormonalnych, która stanowi obecnie podstawę farmakoterapii niewydolności serca, ale również powinna obejmować zahamowanie procesów starzenia się serca, które wydają się nie zależeć od nadmiernej aktywacji układów neurohormonalnych, prowadzą natomiast do strukturalnego oraz funkcjonalnego upośledzenia mikrokążenia wieńcowego.

9. Summary

An aging society and treatment of diseases, which affect aged people (*e.g.* heart failure) are challenges of the future. In order to develop new therapeutic strategies of inhibiting pathophysiological mechanisms of cardiac aging process that may be also involved in heart failure development, there is an urgent need to better understand the molecular mechanisms underlying the cardiac aging processes.

The aim of this study was to identify mechanisms responsible for cardiac aging process in the course of heart failure development as well as to characterize interrelationship between cardiac aging process and heart failure development. For that purposes a unique mouse model of heart failure (Tg α q*44 mice) was used. Slow development of heart failure in Tg α q*44 mice due to overexpression of a cardiomyocyte-specific activated G α q protein enable to simultaneously monitor changes associated with cardiac aging process and heart failure development.

The changes associated with cardiac aging process as well as with heart failure development were investigated on functional, morphological, hormonal, transcriptomic level. In this study multiple experimental methods were used as: magnetic resonans imaging, transmission electron microscope imaging, Doppler ultrasound imaging, high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric (HPLC–MS/MS) measurements, next generation sequencing, *ex vivo* coronary flow measurements in isolated perfused hearts, histological and immunohistological stainings.

Cardiac aging process was rapidly intensified in 14-16-month-old FVB mice and was characterized by impaired diastolic function, increased fibrosis, increased remodeling of extracellular matrix, decreased basal coronary flow, impaired reactivity of coronary arteries in response to increased *preload*, decreased relative number of lymphocytes and intense activation of genes and biological processes involved in cardiac aging process (which involved: 454 „genes of aged heart”, 481 „genes of aging heart”, 56 „processes of aged heart”, 55 „processes of aging heart”). Cardiac aging process was not associated with cardiac and systemic activation of renin-angiotensin-aldosterone system even in aged hearts of 14-month-old FVB mice.

Early stage of heart failure in 4-8-month-old Tg α q*44 mice was characterized by impaired systolic and diastolic function, increased perivascular and interstitial fibrosis, increased remodeling of extracellular matrix, structure disturbances in the capillaries and

cardiac contractile apparatus, increased distance between capillaries, changes in coronary capillaries arrangement, decreased basal coronary flow, activation of cardiac renin-angiotensin pathway. End-stage heart failure in Tgαq*44 mice was characterized by increased atrial mass, peripheral activation of renin-angiotensin-aldosterone pathway, ultrastructure disturbance in coronary endothelium, impaired coronary reserve as well as impaired reactivity of coronary arteries in response to increased *preload*.

Heart failure induced more intensive changes in the cardiac transcriptome of Tgαq*44 mice than aging process in the cardiac transcriptome of control FVB mice. Heart failure in Tgαq*44 mice accelerated cardiac aging process. In cardiac transcriptome of Tgαq*44 mice, there were 8 „*genes of aged heart*”, 26 „*genes of aging heart*”, 8 „*processes of aging heart*”, which were permanently engaged in biological aging process in the hearts of Tgαq*44 mice along entire course of heart failure development. Some of these genes and processes were associated with fibrosis and changes in extracellular matrix. In the cardiac transcriptome of Tgαq*44 mice 13 „*genes of heart failure*” were identified. Some of them may represent new genetic markers of defined stages of heart failure development.

In Tgαq*44 mice, there are elements of heart failure pathophysiology that may be associated with premature activation of cardiac aging processes in the hearts of Tgαq*44 mice, because these elements occurred in the aged hearts of 14-16-month-old FVB mice. These cardiac pathophysiology elements occurred on functional (diastolic dysfunction, impairment of basal coronary flow), morphological (increased fibrosis, in particular perivascular fibrosis, increased accumulation of extracellular matrix components) and transcriptomic level (premature cardiac aging, premature activation of „*genes of aged heart*” and „*genes of aging heart*” in the hearts of 4-14-month-old Tgαq*44 mice). These studies have proven that neurohormonal elements of heart failure pathophysiology were associated with heart failure development in Tgαq*44 mice but not with cardiac aging process in FVB mice.

In conclusion, studies performed on functional, morphological, hormonal, transcriptomic level show that in the course of heart failure development the pathophysiological mechanisms of heart failure as well as of cardiac aging process are involved. The latter mechanisms occur particularly in the early and end-stage of heart failure in Tgαq*44 mice and functionally are related to impairment of coronary microcirculation.

The pharmacotherapy of heart failure should involve not only the inhibition of overactivated neurohormonal pathways, which represents currently the mainstay of

pharmacotherapy of heart failure, but should also involve the inhibition of cardiac aging processes, which seem not to be related to overactivated neurohormonal pathways. Finally, cardiac aging processes seem to be associated with structural and functional disturbances in coronary microcirculation.

10. Referencje

1. Harper S. Economic and social implications of aging societies. *Science*. 2014 Oct 31;346(6209):587-91.
2. Fontana L, Kennedy BK, Longo VD, Seals D, Melov S. Medical research: treat ageing. *Nature*. 2014 Jul 24;511(7510):405-7.
3. Kaeberlein M, Rabinovitch PS, Martin GM. Healthy aging: The ultimate preventative medicine. *Science*. 2015 Dec 4;350(6265):1191-3.
4. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013 Jun 6;153(6):1194-217.
5. Gude NA, Broughton KM, Firouzi F, Sussman MA. Cardiac ageing: extrinsic and intrinsic factors in cellular renewal and senescence. *Nat Rev Cardiol*. 2018 Sep;15(9):523-42.
6. Li H, Hastings MH, Rhee J, Trager LE, Roh JD, Rosenzweig A. Targeting age-related pathways in heart failure. *Circ Res*. 2020 Feb 14;126(4):533-51.
7. Belsky DW, Huffman KM, Pieper CF, Shalev I, Kraus WE. Change in the rate of biological aging in response to caloric restriction: Calerie Biobank analysis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2017 Dec 12;73(1):4-10.
8. Hamczyk MR, Nevado RM, Barettino A, Fuster V, Andrés V. Biological Versus Chronological Aging: JACC Focus Seminar. *J Am Coll Cardiol*. 2020 Mar 3;75(8):919-30.
9. Kennedy BK, Berger SL, Brunet A, Campisi J, Cuervo AM, Epel ES, Franceschi C, Lithgow GJ, Morimoto RI, Pessin JE, Rando TA, Richardson A, Schadt EE, Wyss-Coray T, Sierra F. Geroscience: linking aging to chronic disease. *Cell*. 2014 Nov 6;159(4):709-13.
10. Tarry-Adkins JL, Ozanne SE. Nutrition in early life and age-associated diseases. *Ageing Res Rev*. 2017 Oct;39:96-105.
11. Prasad S, Sung B, Aggarwal BB. Age-associated chronic diseases require age-old medicine: Role of chronic inflammation. *Prev Med*. 2012 May;54 Suppl(Suppl):S29-37.
12. Hung WW, Ross JS, Boockvar KS, Siu AL. Recent trends in chronic disease, impairment and disability among older adults in the United States. *BMC Geriatr*. 2011 Aug 18;11:47.
13. McCay CM, Maynard LA, Sperling G, Barnes LL. The Journal of Nutrition. Volume 18 July-December, 1939. Pages 1-13. Retarded growth, life span, ultimate body size and age changes in the albino rat after feeding diet restricted in calories. *Nutr Rev*. 1975

- Aug;33(8):241-3.
14. Omodei D, Fontana L. Calorie restriction and prevention of age-associated chronic disease. *FEBS Lett.* 2011 Jun 6;585(11):1537-42.
 15. Rose M, Charlesworth B. A test of evolutionary theories of senescence. *Nature.* 1980 Sep 11;287(5778):141-2.
 16. Friedman DB, Johnson TE. A mutation in the age-1 gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. *Genetics.* 1988 Jan;118(1):75–86.
 17. Bartke A. Impact of reduced insulin-like growth factor-1/insulin signaling on aging in mammals: Novel findings. *Aging Cell.* 2008 Jun;7(3):285–90.
 18. Kapahi P, Zid BM, Harper T, Koslover D, Sapin V, Benzer S. Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Curr Biol.* 2004 May;14(10):885–90.
 19. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Bonaduce D, Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging.* 2018 Apr 26;13:757-72.
 20. Haas RH. Mitochondrial dysfunction in aging and diseases of aging. *Biology (Basel).* 2019 Jun 17;8(2):48.
 21. Childs BG, Gluscevic M, Baker DJ, Laberge RM, Marquess D, Dananberg J, van Deursen JM. Senescent cells: An emerging target for diseases of ageing. *Nat Rev Drug Discov.* 2017 Oct;16(10):718-35.
 22. Sanada F, Taniyama Y, Muratsu J, Otsu R, Shimizu H, Rakugi H, Morishita R. Source of Chronic Inflammation in Aging. *Front Cardiovasc Med.* 2018 Feb 22;5:12.
 23. Kaushik S, Cuervo AM. Proteostasis and aging. *Nat Med.* 2015 Dec;21(12):1406-15.
 24. Lin SJ, Defossez PA, Guarente L. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *saccharomyces cerevisiae*. *Science.* 2000 Sep 22;289(5487):2126–8.
 25. Martin-Montalvo A, Mercken EM, Mitchell SJ, Palacios HH, Mote PL, Scheibye-Knudsen M, Gomes AP, Ward TM, Minor RK, Blouin MJ, Schwab M, Pollak M, Zhang Y, Yu Y, Becker KG, Bohr VA, Ingram DK, Sinclair DA, Wolf NS, Spindler SR, Bernier M, de Cabo R. Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nat Commun.* 2013;4:2192.
 26. Wilkinson JE, Burmeister L, Brooks S V., Chan CC, Friedline S, Harrison DE, Hejtmancik JF, Nadon N, Strong R, Wood LK, Woodward MA, Miller RA. Rapamycin slows aging in mice. *Aging Cell.* 2012 Aug;11(4):675–82.

27. Campisi J, Kapahi P, Lithgow GJ, Melov S, Newman JC, Verdin E. From discoveries in ageing research to therapeutics for healthy ageing. *Nature*. 2019 Jul;571(7764):183-92.
28. Seals DR, Justice JN, LaRocca TJ. Physiological geroscience: Targeting function to increase healthspan and achieve optimal longevity. *J Physiol*. 2016 Apr 15;594(8):2001-24.
29. Seals DR, Melov S. Translational Geroscience: Emphasizing function to achieve optimal longevity. *Aging (Albany NY)*. 2014 Sep;6(9):718–30.
30. Xia X, Chen W, McDermott J, Han JJ. Molecular and phenotypic biomarkers of aging. *F1000Res*. 2017 Jun 9;6:860.
31. Braunwald E, Ross Jr J, Sonnenblick EH. Mechanisms of Contraction of the Normal and Failing Heart. *N Engl J Med*. 1967 Nov 2;277(18):962–71 cond.
32. Kemp CD, Conte JV. The pathophysiology of heart failure. *Cardiovasc Pathol*. 2012 Sep-Oct;21(5):365-71.
33. Braunwald E. Heart Failure. *JACC Hear Fail*. 2013 Feb;1(1):1–20.
34. Metra M, Teerlink JR. Heart failure. *Lancet*. 2017 Oct 28;390(10106):1981–95.
35. Wright P, Thomas M. Pathophysiology and management of heart failure. *Clin Pharm*. 2018 Dec 6;10(12):DOI:10.1211/PJ.2018.20205742.
36. Westerhof N, O'Rourke MF. Haemodynamic basis for the development of left ventricular failure in systolic hypertension and for its logical therapy. *J Hypertens*. 1995 Sep;13(9):943-52.
37. Jackson G, Gibbs CR, Davies MK, Lip GY. ABC of heart failure. Pathophysiology. *BMJ*. 2000 Jan 15;320(7228):167—70.
38. Ames MK, Atkins CE, Pitt B. The renin-angiotensin-aldosterone system and its suppression. *J Vet Intern Med*. 2019 Mar;33(2):363-82.
39. Triposkiadis F, Xanthopoulos A, Butler J. Cardiovascular Aging and Heart Failure: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol*. 2019 Aug 13;74(6):804-13.
40. Steenman M, Lande G. Cardiac aging and heart disease in humans. *Biophys Rev*. 2017 Apr;9(2):131-7.
41. Dassanayaka S, Jones SP. Recent Developments in Heart Failure. *Circ Res*. 2015 Sep 11;117(7):e58-63.
42. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, Das SR, Delling FN, Djousse L, Elkind MSV, Ferguson JF, Fornage M, Jordan LC, Khan SS, Kissela BM, Knutson KL, Kwan TW, Lackland DT, Lewis TT, Lichtman JH, Longenecker CT, Loop MS, Lutsey PL, Martin

- SS, Matsushita K, Moran AE, Mussolino ME, O'Flaherty M, Pandey A, Perak AM, Rosamond WD, Roth GA, Sampson UKA, Satou GM, Schroeder EB, Shah SH, Spartano NL, Stokes A, Tirschwell DL, Tsao CW, Turakhia MP, VanWagner LB, Wilkins JT, Wong SS, Virani SS; American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2019 Mar 5;139(10):e56–528.
43. Lippi G, Sanchis-Gomar F. Global epidemiology and future trends of heart failure. *AME Med J*. 2020 Jun;5:15.
 44. Strait JB, Lakatta EG. Aging-Associated Cardiovascular Changes and Their Relationship to Heart Failure. *Heart Fail Clin*. 2012 Jan;8(1):143-64.
 45. Keller KM, Howlett SE. Sex Differences in the Biology and Pathology of the Aging Heart. *Can J Cardiol*. 2016 Sep;32(9):1065-73.
 46. Fleg JL, Strait J. Age-associated changes in cardiovascular structure and function: a fertile milieu for future disease. *Heart Fail Rev*. 2012 Sep;17(4-5):545–54.
 47. Olivetti G, Giordano G, Corradi D, Melissari M, Lagrasta C, Gambert SR, Anversa P. Gender differences and aging: Effects on the human heart. *J Am Coll Cardiol*. 1995 Oct;26(4):1068–79.
 48. Bergmann O, Zdunek S, Felker A, Salehpour M, Alkass K, Bernard S, Sjostrom SL, Szewczykowska M, Jackowska T, Dos Remedios C, Malm T, Andrä M, Jashari R, Nyengaard JR, Possnert G, Jovinge S, Druid H, Frisén J. Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart. *Cell*. 2015 Jun 18;161(7):1566–75.
 49. Tanskanen M, Peuralinna T, Polvikoski T, Notkola IL, Sulkava R, Hardy J, Singleton A, Kiuru-Enari S, Paetau A, Tienari PJ, Myllykangas L. Senile systemic amyloidosis affects 25% of the very aged and associates with genetic variation in alpha2-macroglobulin and tau: A population-based autopsy study. *Ann Med*. 2008;40(3):232–9.
 50. Chiao YA, Rabinovitch PS. The aging heart. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015 Sep 1;5(9):a025148.
 51. Nguyen NT, Yabluchanskiy A, de Castro Brás LE, Jin Y-F, Lindsey ML. Aging-Related Changes in Extracellular Matrix: Implications for Ventricular Remodeling Following Myocardial Infarction. In: Jugdutt BI, editor. *Aging and Heart Failure*. Springer New York; 2014. p. 377–89.
 52. Burgess ML, McCrea JC, Hedrick HL. Age-associated changes in cardiac matrix and integrins. *Mech Ageing Dev*. 2001 Oct;122(15):1739–56.

53. Mendes ABL, Ferro M, Rodrigues B, Souza MR, Araujo RC, Souza RR. Quantification of left ventricular myocardial collagen system in children, young adults, and the elderly. *Medicina (B Aires)*. 2012;72(3):216–20.
54. Judge S, Leeuwenburgh C. Cardiac mitochondrial bioenergetics, oxidative stress, and aging. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007 Jun;292(6):C1983–92.
55. Tocchi A, Quarles EK, Basisty N, Gitari L, Rabinovitch PS. Mitochondrial dysfunction in cardiac aging. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Nov;1847(11):1424–33.
56. Tatarková Z, Kuka S, Račay P, Lehotský J, Dobrota D, Mištuna D, Kaplán P. Effects of aging on activities of mitochondrial electron transport chain complexes and oxidative damage in rat heart. *Physiol Res*. 2011;60(2):281–9.
57. Sachs HG, Colgan JA, Lazarus ML. Ultrastructure of the aging myocardium: A morphometric approach. *Am J Anat*. 1977 Sep;150(1):63–71.
58. Tate EL, Herbener GH. A morphometric study of the density of mitochondrial cristae in heart and liver of aging mice. *J Gerontol*. 1976 Mar;31(2):129–34.
59. Johnson DM, Antoons G. Arrhythmogenic Mechanisms in Heart Failure: Linking β -Adrenergic Stimulation, Stretch, and Calcium. *Front Physiol*. 2018 Oct 16;9:1453.
60. Ferrara N, Komici K, Corbi G, Pagano G, Furgi G, Rengo C, Femminella GD, Leosco D, Bonaduce D. β -adrenergic receptor responsiveness in aging heart and clinical implications. *Front Physiol*. 2014 Jan 9;4:396.
61. Paneni F, Diaz Cañestro C, Libby P, Lüscher TF, Camici GG. The Aging Cardiovascular System: Understanding It at the Cellular and Clinical Levels. *J Am Coll Cardiol*. 2017 Apr 18;69(15):1952–67.
62. Dai DF, Santana LF, Vermulst M, Tomazela DM, Emond MJ, MacCoss MJ, Gollahon K, Martin GM, Loeb LA, Ladiges WC, Rabinovitch PS. Overexpression of catalase targeted to mitochondria attenuates murine cardiac aging. *Circulation*. 2009 Jun 2;119(21):2789–97.
63. Janczewski AM, Lakatta EG. Modulation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} cycling in systolic and diastolic heart failure associated with aging. *Heart Fail Rev*. 2010 Sep;15(5):431–45.
64. Lakatta EG. Cardiovascular aging research: The next horizons. *J Am Geriatr Soc*. 1999 May;47(5):613–25.
65. Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, Izumo S. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):977–84.

66. Benigni A, Cassis P, Remuzzi G. Angiotensin II revisited: New roles in inflammation, immunology and aging. *EMBO Mol Med*. 2010 Jul;2(7):247-57.
67. Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci*. 2014 Feb;71(4):549-74.
68. Cigola E, Kajstura J, Li B, Meggs LG, Anversa P. Angiotensin II activates programmed myocyte cell death in Vitro. *Exp Cell Res*. 1997 Mar 15;231(2):363–71.
69. Wang M, Zhang J, Spinetti G, Jiang LQ, Monticone R, Zhao D, Cheng L, Krawczyk M, Talan M, Pintus G, Lakatta EG. Angiotensin II activates matrix metalloproteinase type II and mimics age-associated carotid arterial remodeling in young rats. *Am J Pathol*. 2005 Nov;167(5):1429–42.
70. Wang M, Shah AM. Age-associated pro-inflammatory remodeling and functional phenotype in the heart and large arteries. *J Mol Cell Cardiol*. 2015 Jun;83:101-11.
71. Sansbury BE, Riggs DW, Brainard RE, Salabei JK, Jones SP, Hill BG. Responses of hypertrophied myocytes to reactive species: Implications for glycolysis and electrophile metabolism. *Biochem J*. 2011 Apr 15;435(2):519–28.
72. Chiao YA, Dai Q, Zhang J, Lin J, Lopez EF, Ahuja SS, Chou YM, Lindsey ML, Jin YF. Multi-analyte profiling reveals matrix metalloproteinase-9 and monocyte chemotactic protein-1 as plasma biomarkers of cardiac aging. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011 Aug 1;4(4):455–62.
73. Yabluchanskiy A, Ma Y, Iyer RP, Hall ME, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. *Physiology (Bethesda)*. 2013 Nov;28(6):391-403.
74. Meschiari CA, Ero OK, Pan H, Finkel T, Lindsey ML. The impact of aging on cardiac extracellular matrix. *Geroscience*. 2017 Feb;39(1):7-18.
75. Cauwe B, Van den Steen PE, Opdenakker G. The Biochemical, Biological, and Pathological Kaleidoscope of Cell Surface Substrates Processed by Matrix Metalloproteinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2007 May-Jun;42(3):113–85.
76. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2002 Mar;2(3):161-74.
77. Calado RT, Young NS. Telomere Diseases. *N Engl J Med*. 2009 Dec 10;361(24):2353–65.
78. Matsumoto C, Jiang Y, Emathinger J, Quijada P, Nguyen N, De La Torre A, Moshref M, Nguyen J, Levinson AB, Shin M, Sussman MA, Hariharan N. Short Telomeres Induce p53 and Autophagy and Modulate Age-Associated Changes in Cardiac

- Progenitor Cell Fate. *Stem Cells*. 2018 Jun;36(6):868–80.
79. Haycock PC, Heydon EE, Kaptoge S, Butterworth AS, Thompson A, Willeit P. Leucocyte telomere length and risk of cardiovascular disease: Systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2014 Jul 8;349:g4227.
 80. Capell BC, Collins FS, Nabel EG. Mechanisms of cardiovascular disease in accelerated aging syndromes. *Circ Res*. 2007 Jul 6;101(1):13-26.
 81. Durik M, Kavousi M, Van Der Pluijm I, Isaacs A, Cheng C, Verdonk K, Loot AE, Oeseburg H, Bhaggoe UM, Leijten F, van Veghel R, de Vries R, Rudez G, Brandt R, Ridwan YR, van Deel ED, de Boer M, Tempel D, Fleming I, Mitchell GF, Verwoert GC, Tarasov KV, Uitterlinden AG, Hofman A, Duckers HJ, van Duijn CM, Oostra BA, Witteman JC, Duncker DJ, Danser AH, Hoeijmakers JH, Roks AJ. Nucleotide excision DNA repair is associated with age-related vascular dysfunction. *Circulation*. 2012 Jul 24;126(4):468–78.
 82. Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, Bohlooly-Y M, Gidlöf S, Oldfors A, Wibom R, Törnell J, Jacobs HT, Larsson NG. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*. 2004 May 27;429(6990):417–23.
 83. Hachamovitch R, Wicker P, Capasso JM, Anversa P. Alterations of coronary blood flow and reserve with aging in Fischer 344 rats. *Am J Physiol*. 1989 Jan;256(1 Pt 2):H66-73.
 84. Ghebre YT, Yakubov E, Wong WT, Krishnamurthy P, Sayed N, Sikora AG, Bonnen MD. Vascular Aging: Implications for Cardiovascular Disease and Therapy. *Transl Med (Sunnyvale)*. 2016 Dec;6(4):183.
 85. Brandes RP, Fleming I, Busse R. Endothelial aging. *Cardiovasc Res*. 2005 May 1;66(2):286-94.
 86. Herrera MD, Mingorance C, Rodríguez-Rodríguez R, Alvarez de Sotomayor M. Endothelial dysfunction and aging: An update. *Ageing Res Rev*. 2010 Apr;9(2):142-52.
 87. Zweier JL, Chen CA, Druhan LJ. S-glutathionylation reshapes our understanding of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and nitric oxide/reactive oxygen species-mediated signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2011 May 15;14(10):1769-75.
 88. Donato AJ, Eskurza I, Silver AE, Levy AS, Pierce GL, Gates PE, Seals DR. Direct Evidence of Endothelial Oxidative Stress With Aging in Humans. *Circ Res*. 2007 Jun 8;100(11):1659–66.
 89. Proniewski B, Czarny J, Khomich TI, Kus K, Zakrzewska A, Chlopicki S. Immuno-Spin Trapping-Based Detection of Oxidative Modifications in Cardiomyocytes and Coronary

- Endothelium in the Progression of Heart Failure in Tg α *44 Mice. *Front Immunol*. 2018 May 7;9:938.
90. Czernin J, Müller P, Chan S, Brunken RC, Porenta G, Krivokapich J, Chen K, Chan A, Phelps ME, Schelbert HR. Influence of age and hemodynamics on myocardial blood flow and flow reserve. *Circulation*. 1993 Jul;88(1):62–9.
 91. Mosterd A, Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart*. 2007 Sep;93(9):1137–46.
 92. Mende U, Semsarian C, Martins DC, Kagen A, Duffy C, Schoen FJ, Neer EJ. Dilated cardiomyopathy in two transgenic mouse lines expressing activated G protein α (q): lack of correlation between phospholipase C activation and the phenotype. *J Mol Cell Cardiol*. 2001 Aug;33(8):1477–91.
 93. Tyrankiewicz U, Olkowicz M, Skorka T, Jablonska M, Orzylowska A, Bar A, Gonet M, Berkowicz P, Jasinski K, Zoladz JA, Smolenski RT, Chlopicki S. Activation pattern of ACE2/Ang-(1–7) and ACE/Ang II pathway in course of heart failure assessed by multiparametric MRI in vivo in Tg α *44 mice. *J Appl Physiol* (1985). 2018 Jan 1;124(1):52–65.
 94. Drelicharz L, Wozniak M, Skorka T, Tyrankiewicz U, Heinze-Paluchowska S, Jablonska M, Gebska A, Chlopicki S. Application of magnetic resonance imaging in vivo for the assesment of the progression of systolic and diastolic dysfunction in a mouse model of dilated cardiomyopathy. *Kardiol Pol*. 2009 Apr;67(4):386–95.
 95. Wozniak M, Tyrankiewicz U, Drelicharz L, Skorka T, Jablonska M, Heinze-Paluchowska S, Chlopicki S. The effect of the renin-angiotensin-aldosterone system inhibition on myocardial function in early and late phases of dilated cardiomyopathy in Tg α 44 mice. *Kardiol Pol*. 2013;71(7):730–7.
 96. Tyrankiewicz U, Skorka T, Jablonska M, Petkow-Dimitrow P, Chlopicki S. Characterization of the cardiac response to a low and high dose of dobutamine in the mouse model of dilated cardiomyopathy by MRI in vivo. *J Magn Reson Imaging*. 2013 Mar;37(3):669–77.
 97. Kwiatkowski G, Chlopicki S. MRI-based in vivo detection of coronary microvascular dysfunction before alterations in cardiac function induced by short-term high-fat diet in mice. *Sci Rep*. 2021 (in review)
 98. Heiberg E, Sjögren J, Ugander M, Carlsson M, Engblom H, Arheden H. Design and validation of Segment - freely available software for cardiovascular image analysis. *BMC Med Imaging*. 2010 Jan 11;10:1.

99. Cheung MC, Spalding PB, Gutierrez JC, Balkan W, Namias N, Koniaris LG, Zimmers TA. Body surface area prediction in normal, hypermuscular, and obese mice. *J Surg Res.* 2009 May 15;153(2):326–31.
100. Jablonska M, Tyrankiewicz U, Osiak A, Figiel H, Skorka T. Cardiac time-area curve modelling using piecewise linear regression in mice with heart failure. In: *2012 Computing in Cardiology.* 2012. p. 557–60.
101. Tyrankiewicz U, Skorka T, Orzylowska A, Jablonska M, Jasinski K, Jaształ A, Bar A, Kostogrys R, Chlopicki S. Comprehensive MRI for the detection of subtle alterations in diastolic cardiac function in apoE/LDLR^{-/-} mice with advanced atherosclerosis. *NMR Biomed.* 2016 Jun;29(6):833–40.
102. Asanuma T, Fukuta Y, Masuda K, Hioki A, Iwasaki M, Nakatani S. Assessment of myocardial ischemic memory using speckle tracking echocardiography. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2012 Jan;5(1):1–11.
103. Osman NF, McVeigh ER, Prince JL. Imaging heart motion using harmonic phase MRI. *IEEE Trans Med Imaging.* 2000 Mar;19(3):186–202.
104. Ryf S, Rutz AK, Boesiger P, Schwitter J. Is Post-Systolic Shortening a Reliable Indicator of Myocardial Viability? An MR Tagging and Late-Enhancement Study. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2006;8(3):445–51.
105. Kovács Á, Fülöp G, Kovács A, Csípő T, Bódi B, Priksz D, Juhász B, Beke L, Hendrik Z, Méhes G, Granzier HL, Édes I, Fagyas M, Papp Z, Barta J, Tóth A. Renin overexpression leads to increased titin-based stiffness contributing to diastolic dysfunction in hypertensive mRen2 rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2016 Apr 8;310(11):H1671–82.
106. Csongrádi A, Enyedi A, Takács I, Végh T, Mányiné IS, Pólik Z, Altorjay IT, Balla J, Balla G, Édes I, Kappelmayer J, Tóth A, Papp Z, Fagyas M. Optimized angiotensin-converting enzyme activity assay for the accurate diagnosis of sarcoidosis. *Clin Chem Lab Med.* 2018 Jun 27;56(7):1117–25.
107. Koal T, Schmiederer D, Pham-Tuan H, Röhring C, Rauh M. Standardized LC-MS/MS based steroid hormone profile-analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2012 Apr;129(3–5):129–38.
108. Kus K, Kij A, Zakrzewska A, Jaształ A, Stojak M, Walczak M, Chlopicki S. Alterations in arginine and energy metabolism, structural and signalling lipids in metastatic breast cancer in mice detected in plasma by targeted metabolomics and lipidomics. *Breast Cancer Res.* 2018 Dec 4;20(1):148.

109. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*. 2011 May;17(1):10–2.
110. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013 Jan 1;29(1):15–21.
111. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. 2015 Jan 15;31(2):166–9.
112. Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol*. 2010;11(3):R25.
113. Law CW, Chen Y, Shi W, Smyth GK. Voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biol*. 2014 Feb 3;15(2):R29.
114. Mohaupt MG, Dick B. Urinary Hormone Analysis in Acne. In: Zouboulis CC, Katsambas AD, Kligman AM, editors. *Pathogenesis and Treatment of Acne and Rosacea*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 363–8.
115. Greaves RF, Jevalikar G, Hewitt JK, Zacharin MR. A guide to understanding the steroid pathway: New insights and diagnostic implications. *Clin Biochem*. 2014 Oct;47(15):5–15.
116. Papathanasiou S, Rickelt S, Soriano ME, Schips TG, Maier HJ, Davos CH, Varela A, Kaklamanis L, Mann DL, Capetanaki Y. Tumor necrosis factor- α confers cardioprotection through ectopic expression of keratins K8 and K18. *Nat Med*. 2015 Sep;21(9):1076–84.
117. Fang F, Ooka K, Bhattachyya S, Wei J, Wu M, Du P, Lin S, Del Galdo F, Feghali-Bostwick CA, Varga J. The early growth response gene *Egr2* (alias *Krox20*) is a novel transcriptional target of transforming growth factor- β that is up-regulated in systemic sclerosis and mediates profibrotic responses. *Am J Pathol*. 2011 May;178(5):2077–90.
118. Lindsay MM, Maxwell P, Dunn FG. TIMP-1: A marker of left ventricular diastolic dysfunction and fibrosis in hypertension. *Hypertension*. 2002 Aug;40(2):136–41.
119. Takawale A, Zhang P, Patel VB, Wang X, Oudit G, Kassiri Z. Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-1 Promotes Myocardial Fibrosis by Mediating CD63-Integrin β 1 Interaction. *Hypertension*. 2017 Jun;69(6):1092–103.
120. Barton PJR, Birks EJ, Felkin LE, Cullen ME, Koban MU, Yacoub MH. Increased expression of extracellular matrix regulators TIMP1 and MMP1 in deteriorating heart failure. *J Heart Lung Transplant*. 2003 Jul;22(7):738–44.
121. Wu Y, Liu X, Zheng H, Zhu H, Mai W, Huang X, Huang Y. Multiple roles of sFRP2 in

- cardiac development and cardiovascular disease. *Int J Biol Sci.* 2020 Jan 14;16(5):730–8.
122. Crespo Yanguas S, Willebrords J, Johnstone SR, Maes M, Decrock E, De Bock M, Leybaert L, Cogliati B, Vinken M. Pannexin1 as mediator of inflammation and cell death. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2017 Jan;1864(1):51-61.
 123. Dolmatova E, Spagnol G, Boassa D, Baum JR, Keith K, Ambrosi C, Kontaridis MI, Sorgen PL, Sosinsky GE, Duffy HS. Cardiomyocyte ATP release through pannexin 1 aids in early fibroblast activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012 Nov 15;303(10):H1208–18.
 124. Jiang Z, Zhou M. Neuregulin signaling and heart failure. *Curr Heart Fail Rep.* 2010 Mar;7(1):42-7.
 125. Lee CW, Hwang I, Park CS, Lee H, Park DW, Kang SJ, Lee SW, Kim YH, Park SW, Park SJ. Expression of ADAMTS-2, -3, -13, and -14 in culprit coronary lesions in patients with acute myocardial infarction or stable angina. *J Thromb Thrombolysis.* 2012 May;33(4):362–70.
 126. Bekhouche M, Leduc C, Dupont L, Janssen L, Delolme F, Vadon-Le Goff S, Smargiasso N, Baiwir D, Mazzucchelli G, Zanella-Cleon I, Dubail J, De Pauw E, Nusgens B, Hulmes DJ, Moali C, Colige A. Determination of the substrate repertoire of ADAMTS2, 3, and 14 significantly broadens their functions and identifies extracellular matrix organization and TGF- β signaling as primary targets. *FASEB J.* 2016 May;30(5):1741–56.
 127. Imbrici P, Altamura C, Pessia M, Mantegazza R, Desaphy JF, Camerino DC. CIC-1 chloride channels: State-of-the-art research and future challenges. *Front Cell Neurosci.* 2015 Apr 27;9:156.
 128. Park S, Ranjbarvaziri S, Zhao P, Ardehali R. Cardiac Fibrosis Is Associated With Decreased Circulating Levels of Full-Length CILP in Heart Failure. *JACC Basic Transl Sci.* 2020 Apr 15;5(5):432–43.
 129. Mori M, Nakajima M, Mikami Y, Seki S, Takigawa M, Kubo T, Ikegawa S. Transcriptional regulation of the cartilage intermediate layer protein (CILP) gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Mar 3;341(1):121–7.
 130. Wollert KC, Kempf T. Growth differentiation factor 15 in heart failure: An update. *Curr Heart Fail Rep.* 2012 Dec;9(4):337–45.
 131. Zhou YM, Li MJ, Zhou YL, Ma L Le, Yi X. Growth differentiation factor-15 (GDF-15), novel biomarker for assessing atrial fibrosis in patients with atrial fibrillation and rheumatic heart disease. *Int J Clin Exp Med.* 2015 Nov 15;8(11):21201–7.

132. Järve A, Mühlstedt S, Qadri F, Nickl B, Schulz H, Hübner N, Özcelik C, Bader M. Adverse left ventricular remodeling by glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B in myocardial infarction. *FASEB J*. 2017 Feb;31(2):556–68.
133. Fang F, Shangguan AJ, Kelly K, Wei J, Gruner K, Ye B, Wang W, Bhattacharyya S, Hinchcliff ME, Tourtellotte WG, Varga J. Early growth response 3 (Egr-3) is induced by transforming growth factor- β and regulates fibrogenic responses. *Am J Pathol*. 2013 Oct;183(4):1197–208.
134. Zhang Y, Liu Y, Zhu XH, Zhang XD, Jiang DS, Bian ZY, Zhang XF, Chen K, Wei X, Gao L, Zhu LH, Yang Q, Fan GC, Lau WB, Ma X, Li H. Dickkopf-3 attenuates pressure overload-induced cardiac remodelling. *Cardiovasc Res*. 2014 Apr 1;102(1):35–45.
135. Lu D, Wang J, Li J, Guan F, Zhang X, Dong W, Liu N, Gao S, Zhang L. Meox1 accelerates myocardial hypertrophic decompensation through Gata4. *Cardiovasc Res*. 2018 Feb 1;114(2):300–11.
136. Chowdhury A, Herzog C, Hasselbach L, Khouzani HL, Zhang J, Hammerschmidt M, Rudat C, Kispert A, Gaestel M, Menon MB, Tudorache I, Hilfiker-Kleiner D, Mühlfeld C, Schmitto JD, Müller M, Theilmeier G. Expression of fibulin-6 in failing hearts and its role for cardiac fibroblast migration. *Cardiovasc Res*. 2014 Sep 1;103(4):509–20.
137. Lefèvre J, Savarin P, Gans P, Hamon L, Clément MJ, David MO, Bosc C, Andrieux A, Curmi PA. Structural basis for the association of MAP6 protein with microtubules and its regulation by calmodulin. *J Biol Chem*. 2013 Aug 23;288(34):24910–22.
138. Yonekawa A, Saijo S, Hoshino Y, Miyake Y, Ishikawa E, Suzukawa M, Inoue H, Tanaka M, Yoneyama M, Oh-Hora M, Akashi K, Yamasaki S. Dectin-2 is a direct receptor for mannose-capped lipoarabinomannan of mycobacteria. *Immunity*. 2014 Sep 18;41(3):402–13.
139. Yan X, Zhang H, Fan Q, Hu J, Tao R, Chen Q, Iwakura Y, Shen W, Lu L, Zhang Q, Zhang R. Dectin-2 deficiency modulates th1 differentiation and improves wound healing after myocardial infarction. *Circ Res*. 2017 Mar 31;120(7):1116–29.
140. Cowie MR, Mendez GF. BNP and congestive heart failure. *Prog Cardiovasc Dis*. 2002 Jan-Feb;44(4):293–321.
141. Zhang X, Sha M, Yao Y, Da J, Jing D. Increased B-type-natriuretic peptide promotes myocardial cell apoptosis via the B-type-natriuretic peptide/long non-coding RNA LSINCT5/caspase-1/interleukin 1 β signaling pathway. *Mol Med Rep*. 2015 Nov;12(5):6761–7.
142. Talior-Volodarsky I, Connelly KA, Arora PD, Gullberg D, McCulloch CA. α 11 integrin

- stimulates myofibroblast differentiation in diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*. 2012 Nov 1;96(2):265–75.
143. Civitarese RA, Talior-Volodarsky I, Desjardins JF, Kabir G, Switzer J, Mitchell M, Kapus A, McCulloch CA, Gullberg D, Connelly KA. The $\alpha 11$ integrin mediates fibroblast–extracellular matrix–cardiomyocyte interactions in health and disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016 Jul 1;311(1):H96–106.
 144. McGrath MF, Ogawa T, de Bold AJ. Ras dexamethasone-induced protein 1 is a modulator of hormone secretion in the volume overloaded heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012 May 1;302(9):H1826–37.
 145. Wie J, Kim BJ, Myeong J, Ha K, Jeong SJ, Yang D, Kim E, Jeon JH, So I. The roles of RASD1 small G proteins and leptin in the activation of TRPC4 transient receptor potential channels. *Channels (Austin)*. 2015;9(4):186-95.
 146. López-Domínguez JA, Rodríguez-López S, Ahumada-Castro U, Desprez PY, Konovalenko M, Laberge RM, Cárdenas C, Villalba JM, Campisi J. Cdkn1a Transcript Variant 2 is a Marker of Aging and Cellular Senescence. *Aging (Albany NY)*. 2021 May 25;13(10):13380–92.
 147. Warkocki Z, Liudkovska V, Gewartowska O, Mroczek S, Dziembowski A. Terminal nucleotidyl transferases (TENTs) in mammalian RNA metabolism. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2018 Nov 5;373(1762):20180162.
 148. Boschen KE, Ptacek TS, Berginski ME, Simon JM, Parnell SE. Transcriptomic analyses of gastrulation-stage mouse embryos with differential susceptibility to alcohol. *Dis Model Mech*. 2021 Jun 1;14(6):dmm049012.
 149. Xu J, Xu L, Lau YS, Gao Y, Moore SA, Han R. A novel ANO5 splicing variant in a LGMD2L patient leads to production of a truncated aggregation-prone Ano5 peptide. *J Pathol Clin Res*. 2018 Apr;4(2):135–45.
 150. Wang Z, Gao L, Guo X, Lian W, Deng K, Xing B. Development and Validation of a Novel DNA Methylation-Driven Gene Based Molecular Classification and Predictive Model for Overall Survival and Immunotherapy Response in Patients With Glioblastoma: A Multiomic Analysis. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Sep 3;8:576996.
 151. Huang YL, Huang MT, Sung PS, Chou TY, Yang RB, Yang AS, Yu CM, Hsu YW, Chang WC, Hsieh SL. Endosomal TLR3 co-receptor CLEC18A enhances host immune response to viral infection. *Commun Biol*. 2021 Feb 18;4(1):229.
 152. Park SK, Kim K, Page GP, Allison DB, Weindruch R, Prolla TA. Gene expression profiling of aging in multiple mouse strains: Identification of aging biomarkers and

- impact of dietary antioxidants. *Aging Cell*. 2009 Aug;8(4):484–95.
153. Iwasaki K, Bajenova E, Somogyi-Ganss E, Miller M, Nguyen V, Nourkeyhani H, Gao Y, Wendel M, Ganss B. Amelotin - a novel secreted, ameloblast-specific protein. *J Dent Res*. 2005 Dec;84(12):1127–32.
 154. Christensen AH, Chatelain FC, Huttner IG, Olesen MS, Soka M, Feliciangeli S, Horvat C, Santiago CF, Vandenberg JI, Schmitt N, Olesen SP, Lesage F, Fatkin D. The two-pore domain potassium channel, TWIK-1, has a role in the regulation of heart rate and atrial size. *J Mol Cell Cardiol*. 2016 Aug;97:24–35.
 155. Szablewski L. Glucose transporters in healthy heart and in cardiac disease. *Int J Cardiol*. 2017 Mar 1;230:70-5.
 156. Kim S, Lee JW. Membrane Proteins Involved in Epithelial-Mesenchymal Transition and Tumor Invasion: Studies on TMPRSS4 and TM4SF5. *Genomics Inform*. 2014 Mar;12(1):12–20.
 157. Bradham WS, Bozkurt B, Gunasinghe H, Mann D, Spinale FG. Tumor necrosis factor- α and myocardial remodeling in progression of heart failure: A current perspective. *Cardiovasc Res*. 2002 Mar;53(4):822–30.
 158. Feldman AM, Combes A, Wagner D, Kadakomi T, Kubota T, Li YY, McTiernan C. The role of tumor necrosis factor in the pathophysiology of heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2000 Mar 1;35(3):537–44.
 159. Yang SL, Wu C, Xiong ZF, Fang X. Progress on hypoxia-inducible factor-3: Its structure, gene regulation and biological function (Review). *Mol Med Rep*. 2015 Aug;12(2):2411-6.
 160. González Morales SR, Liu C, Blankenship H, Zhu GZ. Mouse Ptchd3 is a non-essential gene. *Gene X*. 2020 Mar 13;5:100032.
 161. Tsai CT, Hsieh CS, Chang SN, Chuang EY, Ueng KC, Tsai CF, Lin TH, Wu CK, Lee JK, Lin LY, Wang YC, Yu CC, Lai LP, Tseng CD, Hwang JJ, Chiang FT, Lin JL. Genome-wide screening identifies a KCNIP1 copy number variant as a genetic predictor for atrial fibrillation. *Nat Commun*. 2016 Feb 2;7:10190.
 162. Leifheit-Nestler M, Haffner D. Paracrine effects of FGF23 on the heart. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018 May 28;9:278.
 163. Stehberger PA, Schulz N, Finberg KE, Karet FE, Giebisch G, Lifton RP, Geibel JP, Wagner CA. Localization and regulation of the ATP6V0A4 (a4) vacuolar H⁺-ATPase subunit defective in an inherited form of distal renal tubular acidosis. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Dec;14(12):3027–38.

164. Planavila A, Redondo-Angulo I, Villarroya F. FGF21 and Cardiac Physiopathology. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015 Aug 31;6:133.
165. Zhang SY, Xu MJ, Wang X. Adrenomedullin 2/intermedin: a putative drug candidate for treatment of cardiometabolic diseases. *Br J Pharmacol*. 2018 Apr;175(8):1230–40.
166. Sáez DE, Slebe JC. Subcellular localization of aldolase B. *J Cell Biochem*. 2000 Apr;78(1):62–72.
167. Pradervand S, Yasukawa H, Muller OG, Kjekshus H, Nakamura T, St Amand TR, Yajima T, Matsumura K, Duplain H, Iwatate M, Woodard S, Pedrazzini T, Ross J, Firsov D, Rossier BC, Hoshijima M, Chien KR. Small proline-rich protein 1A is a gp130 pathway- and stress-inducible cardioprotective protein. *EMBO J*. 2004 Nov 10;23(22):4517–25.
168. Revilla M, Puig-Oliveras A, Crespo-Piazuelo D, Criado-Mesas L, Castelló A, Fernández AI, Ballester M, Folch JM. Expression analysis of candidate genes for fatty acid composition in adipose tissue and identification of regulatory regions. *Sci Rep*. 2018 Feb 1;8(1):2045.
169. Huang Z, Zhang N, Li W, Cao J, Zhang L, Chen Y. Expression of CHODL in hepatocellular carcinoma affects invasion and migration of liver cancer cells. *Oncol Lett*. 2017 Feb;13(2):715–21.
170. Zhao M, Zhao H, Lin L, Wang Y, Chen M, Wu B. Nuclear receptor co-repressor RIP140 regulates diurnal expression of cytochrome P450 2b10 in mouse liver. *Xenobiotica*. 2020 Oct;50(10):1139–48.
171. Kurihara K, Nakanishi N, Tomomura A. Interference of kallikrein 1b26 (klk1b26) translation by microRNA specifically expressed in female mouse submandibular glands: An additional mechanism for sexual dimorphism of klk1b26 protein in the glands. *Biol Sex Differ*. 2011 Nov 16;2:13.
172. Dasgupta T, Coram RJ, Stillwagon SJ, Ladd AN. Gene expression analyses during spontaneous reversal of cardiomyopathy in mice with repressed nuclear CUG-BP, Elav-like family (CELF) activity in heart muscle. *PLoS One*. 2015 Apr 20;10(4):e0124462.
173. Yu J, Yang Y, Xu Z, Lan C, Chen C, Li C, Chen Z, Yu C, Xia X, Liao Q, Jose PA, Zeng C, Wu G. Long Noncoding RNA Ahit Protects against Cardiac Hypertrophy through SUZ12 (Suppressor of Zeste 12 Protein Homolog)-Mediated Downregulation of MEF2A (Myocyte Enhancer Factor 2A). *Circ Heart Fail*. 2020 Jan;13(1):e006525.
174. Song W, Wang H, Wu Q. Atrial natriuretic peptide in cardiovascular biology and disease (NPPA). *Gene*. 2015 Sep 10;569(1):1-6.

175. Sun H, Wang J, Que J, Peng Y, Yu Y, Wang L, Ye H, Huang K, Xue Y, Zhou Y, Ji K. RNA sequencing revealing the role of AMP-activated protein kinase signaling in mice myocardial ischemia reperfusion injury. *Gene*. 2019 Jun 30;703:91–101.
176. Miyazaki M, Jacobson MJ, Man WC, Cohen P, Asilmaz E, Friedman JM, Ntambi JM. Identification and Characterization of Murine SCD4, a Novel Heart-specific Stearoyl-CoA Desaturase Isoform Regulated by Leptin and Dietary Factors. *J Biol Chem*. 2003 Sep 5;278(36):33904–11.
177. Tsujino A, Kaibara M, Hayashi H, Eguchi H, Nakayama S, Sato K, Fukuda T, Tateishi Y, Shirabe S, Taniyama K, Kawakami A. A CLCN1 mutation in dominant myotonia congenita impairs the increment of chloride conductance during repetitive depolarization. *Neurosci Lett*. 2011 Apr 25;494(2):155–60.
178. Pedersen TH, Riisager A, de Paoli FV, Chen TY, Nielsen OB. Role of physiological ClC-1 Cl⁻ ion channel regulation for the excitability and function of working skeletal muscle. *J Gen Physiol*. 2016 Apr;147(4):291–308.
179. Schwerbel K, Kamitz A, Krahmer N, Hallahan N, Jähnert M, Gottmann P, Lebek S, Schallschmidt T, Arends D, Schumacher F, Kleuser B, Haltenhof T, Heyd F, Gancheva S, Broman KW, Roden M, Joost HG, Chadt A, Al-Hasani H, Vogel H, Jonas W, Schürmann A. Immunity-related GTPase induces lipophagy to prevent excess hepatic lipid accumulation. *J Hepatol*. 2020 Oct;73(4):771–82.
180. Grassi B, Majerczak J, Bardi E, Buso A, Comelli M, Chlopicki S, Guzik M, Mavelli I, Nieckarz Z, Salvadego D, Tyrankiewicz U, Skorka T, Bottinelli R, Zoladz JA, Pellegrino MA. Exercise training in Tgαq*44 mice during the progression of chronic heart failure: Cardiac vs. peripheral (soleus muscle) impairments to oxidative metabolism. *J Appl Physiol* (1985). 2017 Aug 1;123(2):326–36.
181. Drelicharz L, Kozlovski V, Skorka T, Heinze-Paluchowska S, Jasinski A, Gebcka A, Guzik T, Olszanecki R, Wojnar L, Mende U, Csanyi G, Chlopicki S. NO and PGI₂ in coronary endothelial dysfunction in transgenic mice with dilated cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol*. 2008 Sep;103(5):417–30.
182. Adamski MG, Sternak M, Mohaissen T, Kaczor D, Wieronska JM, Malinowska M, Czaban I, Byk K, Lyngsø KS, Przyborowski K, Hansen PBL, Wilczynski G, Chlopicki S. Vascular cognitive impairment linked to brain endothelium inflammation in early stages of heart failure in mice. *J Am Heart Assoc*. 2018 Mar 26;7(7):e007694.
183. Czarnowska E, Bierla JB, Toczek M, Tyrankiewicz U, Pajak B, Domal-Kwiatkowska D, Ratajska A, Smolenski RT, Mende U, Chlopicki S. Narrow time window of metabolic

- changes associated with transition to overt heart failure in Tgaq*44 mice. *Pharmacol Reports*. 2016 Aug;68(4):707–14.
184. Mackiewicz U, Czarnowska E, Brudek M, Pajak B, Duda M, Emanuel K, Csanyi G, Fedorowicz A, Grochal E, Tyrankiewicz U, Skorka T, Mende U, Lewartowski B, Chlopicki S. Preserved cardiomyocyte function and altered desmin pattern in transgenic mouse model of dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*. 2012 May;52(5):978–87.
 185. Elas M, Bielanska J, Pustelny K, Plonka PM, Drelicharz L, Skorka T, Tyrankiewicz U, Wozniak M, Heinze-Paluchowska S, Walski M, Wojnar L, Fortin D, Ventura-Clapier R, Chlopicki S. Detection of mitochondrial dysfunction by EPR technique in mouse model of dilated cardiomyopathy. *Free Radic Biol Med*. 2008 Aug 1;45(3):321–8.
 186. Mendoza DD, Codella N, Wang Y, Prince M, Sethi S, Manoushagian S, Kawaji K, Min JK, LaBounty TM, Devereux RB, Weinsaft JW. Impact of diastolic dysfunction severity on global left ventricular volumetric filling - Assessment by automated segmentation of routine cine cardiovascular magnetic resonance. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2010 Jul 31;12(1):46.
 187. Xu HY, Chen J, Yang ZG, Li R, Shi K, Zhang Q, Liu X, Xie LJ, Jiang L, Guo YK. Early marker of regional left ventricular deformation in patients with hypertrophic cardiomyopathy evaluated by MRI tissue tracking: The effects of myocardial hypertrophy and fibrosis. *J Magn Reson Imaging*. 2017 Nov;46(5):1368–76.
 188. Reed AL, Tanaka A, Sorescu D, Liu H, Jeong EM, Sturdy M, Walp ER, Dudley SC Jr, Sutliff RL. Diastolic dysfunction is associated with cardiac fibrosis in the senescence-accelerated mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011 Sep;301(3):H824–31.
 189. Ingle KA, Kain V, Goel M, Prabhu SD, Young ME, Halade GV. Cardiomyocyte-specific Bmal1 deletion in mice triggers diastolic dysfunction, extracellular matrix response, and impaired resolution of inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015 Dec 1;309(11):H1827–36.
 190. Cioffi G, Gerdts E, Cramariuc D, Tarantini L, Di Lenarda A, Pulignano G, Sindaco DD, Stefanelli C, de Simone G. Left atrial size and force in patients with systolic chronic heart failure: Comparison with healthy controls and different cardiac diseases. *Exp Clin Cardiol*. 2010;15(3):e45–51.
 191. Cunha DF, Cunha SF, Reis MA, Teixeira Vde P. Heart weight and heart weight/body weight coefficient in malnourished adults. *Arq Bras Cardiol*. 2002 Apr;78(4):382–7.
 192. Biernacka A, Frangogiannis NG. Aging and cardiac fibrosis. *Aging Dis*. 2011 Apr;2(2):158–73.

193. Sweeney M, Corden B, Cook SA. Targeting cardiac fibrosis in heart failure with preserved ejection fraction: mirage or miracle? *EMBO Mol Med.* 2020 Oct 7;12(10):e10865.
194. Dai Z, Aoki T, Fukumoto Y, Shimokawa H. Coronary perivascular fibrosis is associated with impairment of coronary blood flow in patients with non-ischemic heart failure. *J Cardiol.* 2012 Nov;60(5):416–21.
195. Brilla CG. Renin-angiotensin-aldosterone system and myocardial fibrosis. *Cardiovasc Res.* 2000 Jul;47(1):1-3.
196. Doering CW, Jalil JE, Janicki JS, Pick R, Aghili S, Abrahams C, Weber KT. Collagen network remodelling and diastolic stiffness of the rat left ventricle with pressure overload hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 1988 Oct;22(10):686-95.
197. Upadhye B, Kitzman DW. Heart Failure with Preserved Ejection Fraction in Older Adults. *Heart Fail Clin.* 2017 Jul;13(3):485-502.
198. Schnee JM, Hsueh WA. Angiotensin II, adhesion, and cardiac fibrosis. *Cardiovasc Res.* 2000 May;46(2):264-8.
199. Piek A, de Boer RA, Silljé HH. The fibrosis-cell death axis in heart failure. *Heart Fail Rev.* 2016 Mar;21(2):199–211.
200. Sabbah HN, Sharov VG, Lesch M, Goldstein S. Progression of heart failure: A role for interstitial fibrosis. *Mol Cell Biochem.* 1995 Jun 7-21;147(1–2):29–34.
201. Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium: Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation.* 1991 Jun;83(6):1849-65.
202. Tham YK, Bernardo BC, Ooi JYY, Weeks KL, McMullen JR. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. *Arch Toxicol.* 2015 Sep;89(9):1401–38.
203. Rakusan K, Nagai J. Morphometry of arterioles and capillaries in hearts of senescent mice. *Cardiovasc Res.* 1994 Jul;28(7):969–72.
204. Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res.* 2003 Feb 7;92(2):139-50.
205. Friebs I, del Nido PJ. Increased susceptibility of hypertrophied hearts to ischemic injury. *Ann Thorac Surg.* 2003 Feb;75(2):S678–84.
206. Chen J, Yaniz-Galende E, Kagan HJ, Liang L, Hekmaty S, Giannarelli C, Hajjar R. Abnormalities of capillary microarchitecture in a rat model of coronary ischemic congestive heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015 Apr 15;308(8):H830–40.

207. Donato AJ, Machin DR, Lesniewski LA. Mechanisms of dysfunction in the aging vasculature and role in age-related disease. *Circ Res*. 2018 Sep 14;123(7):825–48.
208. Goodwill AG, Dick GM, Kiel AM, Tune JD. Regulation of coronary blood flow. *Compr Physiol*. 2017 Mar 16;7(2):321–82.
209. Liao R, Podesser BK, Lim CC. The continuing evolution of the Langendorff and ejecting murine heart: New advances in cardiac phenotyping. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012 Jul 15;303(2):H156-67.
210. Bratkovsky S, Aasum E, Birkeland CH, Riemersma RA, Myhre ESP, Larsen TS. Measurement of coronary flow reserve in isolated hearts from mice. *Acta Physiol Scand*. 2004 Jun;181(2):167–72.
211. Kagan HJ, Belekdanian VD, Chen J, Backeris P, Hammoudi N, Turnbull IC, Costa KD, Hajjar RJ. Coronary capillary blood flow in a rat model of congestive heart failure. *J Appl Physiol* (1985). 2018 Mar 1;124(3):632–40.
212. Chiu JJ, Chien S. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: Pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol Rev*. 2011 Jan;91(1):327-87.
213. Neglia D, Michelassi C, Giovanna Trivieri M, Sambuceti G, Giorgetti A, Pratali L, Gallopin M, Salvadori P, Sorace O, Carpeggiani C, Poddighe R, L'Abbate A, Parodi O. Prognostic role of myocardial blood flow impairment in idiopathic left ventricular dysfunction. *Circulation*. 2002 Jan 15;105(2):186–93.
214. Kelm M, Schrader J. Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circ Res*. 1990 Jun;66(6):1561–75.
215. Su H, Zeng H, He X, Zhu SH, Chen JX. Histone acetyltransferase p300 inhibitor improves coronary flow reserve in sirt3 (Sirtuin 3) knockout mice. *J Am Heart Assoc*. 2020 Sep 15;9(18):e017176.
216. Teng B, Tilley SL, Ledent C, Mustafa SJ. In vivo assessment of coronary flow and cardiac function after bolus adenosine injection in adenosine receptor knockout mice. *Physiol Rep*. 2016 Jun;4(11):e12818.
217. Hozumi T, Yoshida K, Akasaka T, Asami Y, Ogata Y, Takagi T, Kaji S, Kawamoto T, Ueda Y, Morioka S. Noninvasive assessment of coronary flow velocity and coronary flow velocity reserve in the left anterior descending coronary artery by Doppler echocardiography: Comparison with invasive technique. *J Am Coll Cardiol*. 1998 Nov;32(5):1251–9.
218. Al Jaroudi W, Iskandrian AE. Regadenoson: A New Myocardial Stress Agent. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Sep 22;54(13):1123-30.

219. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR, Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation*. 2000 Mar 7;101(9):948–54.
220. Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long- term outcome of coronary heart disease. *Circulation*. 2000 Apr 25;101(16):1899–906.
221. Nakanish K, Fukuda S, Shimada K, Miyazaki C, Otsuka K, Maeda K, Miyahana R, Kawarabayashi T, Watanabe H, Yoshikawa J, Yoshiyama M. Impaired coronary flow reserve as a marker of microvascular dysfunction to predict long-term cardiovascular outcomes, acute coronary syndrome and the development of heart failure. *Circ J*. 2012;76(8):1958–64.
222. Kaufmann PA, Camici PG. Myocardial blood flow measurement by PET: Technical aspects and clinical applications. *J Nucl Med*. 2005 Jan;46(1):75-88.
223. Hirsch AT, Talsness CE, Schunkert H, Paul M, Dzau VJ. Tissue-specific activation of cardiac angiotensin converting enzyme in experimental heart failure. *Circ Res*. 1991 Aug;69(2):475–82.
224. Atlas SA. The renin-angiotensin aldosterone system: Pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm*. 2007 Oct;13(8 Suppl B):9-20.
225. Kurosawa Y, Katoh M, Doi H, Narita H. Tissue angiotensin-converting enzyme activity plays an important role in pressure overload-induced cardiac fibrosis in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002 Apr;39(4):600–9.
226. Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. Induction of cardiac fibrosis by angiotensin II. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2000 Dec;22(10):709–23.
227. Kain V, Van Der Pol W, Mariappan N, Ahmad A, Eipers P, Gibson DL, Gladine C, Vigor C, Durand T, Morrow C, Halade GV. Obesogenic diet in aging mice disrupts gut microbe composition and alters neutrophil:lymphocyte ratio, leading to inflamed milieu in acute heart failure. *FASEB J*. 2019 May;33(5):6456–69.
228. Nelson DH, Sandberg AA, Palmer JG, Tyler FH. Blood levels of 17-hydroxycorticosteroids following the administration of adrenal steroids and their relation to levels of circulating leukocytes. *J Clin Invest*. 1952 May;31(9):843–9.
229. Thomson SP, McMahon LJ, Nugent CA. Endogenous cortisol: A regulator of the number of lymphocytes in peripheral blood. *Clin Immunol Immunopathol*. 1980 Dec;17(4):506–14.
230. Maisel AS, Knowlton KU, Fowler P, Rearden A, Ziegler MG, Motulsky HJ, Insel PA,

- Michel MC. Adrenergic control of circulating lymphocyte subpopulations: Effects of congestive heart failure, dynamic exercise, and terbutaline treatment. *J Clin Invest*. 1990 Feb;85(2):462–7.
231. Rudiger A, Burckhardt OA, Harpes P, Müller SA, Follath F. The relative lymphocyte count on hospital admission is a risk factor for long-term mortality in patients with acute heart failure. *Am J Emerg Med*. 2006 Jul;24(4):451–4.
 232. Vaduganathan M, Greene SJ, Butler J, Sabbah HN, Shantsila E, Lip GY, Gheorghiade M. The immunological axis in heart failure: Importance of the leukocyte differential. *Heart Fail Rev*. 2013 Nov;18(6):835–45.
 233. Chair SY, Chan JYW, Waye MMY, Liu T, Law BMH, Chien WT. Exploration of Potential Genetic Biomarkers for Heart Failure: A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2021 May 31;18(11):5904.
 234. Das S, Frisk C, Eriksson MJ, Walentinsson A, Corbascio M, Hage C, Kumar C, Asp M, Lundeberg J, Maret E, Persson H, Linde C, Persson B. Transcriptomics of cardiac biopsies reveals differences in patients with or without diagnostic parameters for heart failure with preserved ejection fraction. *Sci Rep*. 2019 Feb 28;9(1):3179.
 235. Schiano C, Costa V, Aprile M, Grimaldi V, Maiello C, Esposito R, Soricelli A, Colantuoni V, Donatelli F, Ciccodicola A, Napoli C. Heart failure: Pilot transcriptomic analysis of cardiac tissue by RNA-sequencing. *Cardiol J*. 2017 May 12;24(5):539–53.
 236. Alimadadi A, Munroe PB, Joe B, Cheng X. Meta-analysis of dilated cardiomyopathy using cardiac rna-seq transcriptomic datasets. *Genes (Basel)*. 2020 Jan 4;11(1):60.
 237. Ramirez Flores RO, Lanzer JD, Holland CH, Leuschner F, Most P, Schultz JH, Levinson RT, Saez-Rodriguez J. Consensus transcriptional landscape of human end-stage heart failure. *J Am Heart Assoc*. 2021 Apr 6;10(7):e019667.
 238. Kesharwani V, Shahshahan HR, Mishra PK. Cardiac transcriptome profiling of diabetic Akita mice using microarray and next generation sequencing. *PLoS One*. 2017 Aug 24;12(8):e0182828.
 239. Zhang Z, Tian S, Wu C, Yan L, Wan J, Zhang J, Liu X, Zhang W. Comprehensive bioinformatics analysis reveals kinase activity profiling associated with heart failure. *J Cell Biochem*. 2021 Apr 25. doi: 10.1002/jcb.29935. Epub ahead of print.
 240. Packer M. Mutual Antagonism of Hypoxia-Inducible Factor Isoforms in Cardiac, Vascular, and Renal Disorders. *JACC Basic Transl Sci*. 2020 Sep 28;5(9):961-8.
 241. Hölscher M, Schäfer K, Krull S, Farhat K, Hesse A, Silter M, Lin Y, Pichler BJ, Thistlethwaite P, El-Armouche A, Maier LS, Katschinski DM, Ziesenis A.

- Unfavourable consequences of chronic cardiac HIF-1 α stabilization. *Cardiovasc Res*. 2012 Apr 1;94(1):77–86.
242. Greenig M, Melville A, Huntley D, Isalan M, Mielcarek M. Cross-Sectional Transcriptional Analysis of the Aging Murine Heart. *Front Mol Biosci*. 2020 Sep 25;7:565530.
243. Southworth LK, Owen AB, Kim SK. Aging mice show a decreasing correlation of gene expression within genetic modules. *PLoS Genet*. 2009 Dec;5(12):e1000776.
244. Bahar R, Hartmann CH, Rodriguez KA, Denny AD, Busuttil RA, Dollé ME, Calder RB, Chisholm GB, Pollock BH, Klein CA, Vijg J. Increased cell-to-cell variation in gene expression in ageing mouse heart. *Nature*. 2006 Jun 22;441(7096):1011–4.