

Uniwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum  
Wydział Lekarski

Urszula Tyrankiewicz

**Badanie czynności mięśnia sercowego *in vivo* za pomocą  
tomografii magnetyczno-rezonansowej u myszy  
z niewydolnością krążenia w przebiegu kardiomiopatii  
rozstrzeniowej (Tgaq\*44)  
i w przebiegu miażdżycy (apoE/LDLR<sup>-/-</sup>)**

*Praca doktorska*

Promotor: prof. dr hab. Stefan Chłopicki  
Promotor pomocniczy: dr Tomasz Skórka

Pracę wykonano w Instytucie Fizyki Jądrowej  
im. H. Niewodniczańskiego PAN

Kierownik jednostki: prof. dr hab. Marek Jeżabek

*Praca współfinansowana ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (POIG.01.01.02-00-069/09, projekt koordynowany przez Jagiellońskie Centrum Rozwoju Leków – Jagiellonian Center for Experimental Therapeutics JCET).*

Kraków, 2013



Składam szczególne podziękowania Profesorowi Stefanowi Chłopickiemu za nieprzerwaną zachętę do pracy, entuzjazm i pomoc w realizacji badań, doktorowi Tomaszowi Skórcie za poświęcony czas i cenne uwagi oraz mgr Magdalenie Jabłońskiej za wszechstronną pomoc. Dziękuję także dr Annie Kowalczyk (z IMDIK w Warszawie), mgr Sylwii Luzar-Piotrowicz (ze Zwierzętarni Instytutu Pediatrii w Krakowie), dr hab. Renacie Kostogryś oraz inż. Antoniemu Borgiaszowi (z Katedry Żywności UR w Krakowie) za hodowlę i opiekę nad myszami wykorzystanymi w badaniach niniejszej rozprawy doktorskiej.



# Spis treści

<b>Wykaz najczęściej stosowanych skrótów</b>	<b>4</b>
<b>1. Wstęp</b>	<b>5</b>
1.1. Mechanizmy prowadzące do rozwoju niewydolności serca.....	5
1.2. Modele zwierzęce w badaniach niewydolności serca; myszy $Tg\alpha q^{*44}$ , myszy $apoE/LDLR^{-/-}$ .....	7
1.3. Metody oceny czynności mięśnia sercowego.....	9
<b>2. Cel pracy</b>	<b>13</b>
<b>3. Metody</b>	<b>14</b>
3.1. Zwierzęta .....	14
3.2. Obrazowanie czynności serca myszy za pomocą tomografii magnetyczno- rezonansowej .....	14
3.3. Analiza obrazów .....	16
3.4. Opracowanie metodyki badania rezerwy czynnościowej mięśnia sercowego u myszy <i>in vivo</i> z użyciem stymulacji $\beta$ -adrenergicznej .....	18
3.5. Metodyka badania rezerwy czynności lewej komory w oparciu o odpowiedź na niską oraz wysoką dawkę dobutaminy .....	20
3.6. Analiza statystyczna .....	20
<b>4. Wyniki</b>	<b>22</b>
4.1. Opracowanie metodyki badania MR <i>in vivo</i> czynności mięśnia sercowego myszy z wykorzystaniem stymulacji niską oraz wysoką dawką dobutaminy .....	22
4.2. Analiza zmian podstawowej czynności i rezerwy mięśnia sercowego u myszy FVB w różnym wieku .....	31
4.3. Analiza zmian podstawowej czynności oraz rezerwy mięśnia sercowego u myszy z kardiomiopatią rozstrzeniową (myszy $Tg\alpha q^{*44}$ ) na różnych etapach rozwoju niewydolności serca.....	37
4.4. Porównanie czynności podstawowej i rezerwy mięśnia sercowego u myszy FVB oraz $Tg\alpha q^{*44}$ na wczesnym oraz późnym etapie rozwoju niewydolności serca (w wieku 4 oraz 15 miesięcy) – podsumowanie.....	46

4.5. Analiza zmian podstawowej czynności lewej komory oraz rezerwy czynności mięśnia sercowego u myszy z miażdżycą tętnic wieńcowych (myszy apoE/LDLR <sup>-/-</sup> ) .....	48
<b>5. Dyskusja</b>	<b>54</b>
5.1. Opracowanie metodyki stymulacji $\beta$ -adrenergicznej do badania czynności mięśnia sercowego myszy <i>in vivo</i> techniką obrazowania MR .....	55
5.2. Zmiany czynności mięśnia sercowego w grupie kontrolnej FVB w zależności od wieku .....	57
5.3. Zmiany czynności lewej komory w toku rozwoju niewydolności serca w mysim modelu kardiomiopatii rozstrzeniowej (myszy Tgaq*44) .....	59
5.4. Porównanie czynności mięśnia sercowego w analizie pojedynczej warstwy oraz w analizie sumy warstw tworzących całą komorę .....	63
5.5. Zmiany czynności mięśnia sercowego w mysim modelu miażdżycy (myszy apoE/LDLR <sup>-/-</sup> ) .....	65
<b>6. Wnioski</b>	<b>70</b>
<b>7. Streszczenie</b>	<b>72</b>
<b>8. Spis ilustracji</b>	<b>77</b>
<b>9. Spis tabel</b>	<b>80</b>
<b>10. Bibliografia</b>	<b>81</b>



## Wykaz najczęściej stosowanych skrótów

**Obrazowanie MR** - obrazowanie magnetyczno-rezonansowe

**EF (Ejection Fraction)** - frakcja wyrzutowa

**FAC (Fractional Area Change)** - powierzchniowa zmiana frakcji wyrzutowej

**ESV (End-Systolic Volume)** - objętość końcowo-skurczowa

**ESA (End-Systolic Area)** - powierzchnia końcowo-skurczowa

**EDV (End-Diastolic Volume)** - objętość końcowo-rozkurczowa

**EDA (End Diastolic Area)** - powierzchnia końcowo-rozkurczowa

**SV (Stroke Volume)** - objętość wyrzutowa

**SAC (Stroke Area Change)** - wyrzutowa zmiana powierzchni

**CO (Cardiac Output)** - rzut serca

**SCO (Slice Cardiac Output)** - powierzchniowa zmiana rzutu serca

**FR (Filling Rate)** - kinetyka napełniania

**ER (Ejection Rate)** - kinetyka wyrzutu

**IVRT (Isovolumic Relaxation Time)** - czas izowolumetrycznej relaksacji

**DT (Deceleration Time)** - czas deceleracji wczesnej fali krwi w komorze

**DCM (Dilated Cardiomyopathy)** - kardiomiopatia rozstrzeniowa



# 1. Wstęp

## 1.1. Mechanizmy prowadzące do rozwoju niewydolności serca

Niewydolność serca z zespołem towarzyszących jej charakterystycznych objawów może być uwarunkowana różnorodnymi czynnikami, związanymi bezpośrednio z zaburzeniami samego mięśnia lub z czynnikami wtórnie wywołującymi upośledzenie czynności skurczowo-rozkurczowej. Do bezpośrednich przyczyn niewydolności serca zaliczyć możemy np. mutacje aparatu kurczliwego czy powikłania infekcji wirusowych, natomiast wśród przyczyn pośrednio upośledzających czynność mięśnia sercowego wymienić można następstwa niezależnie rozwijających się chorób np. cukrzycy, nadciśnienia lub miażdżycy. Bez względu jednak na genezę upośledzenia czynności serca, kolejne etapy rozwijających się zaburzeń przebiegają podobnie prowadząc ostatecznie do jednej z kilku form niewydolności serca (jak choroba wieńcowa bądź kardiomiopatia o cechach rozstrzeni, przerostu lub restrykcji). Wynika to z faktu, że mięsień sercowy przystosowuje się do zmieniających się warunków (tzn. np. do osłabionej kurczliwości kardiomiocytów, zwiększonej sztywności komór, upośledzonej czynności naczyń wieńcowych czy zmian ciśnienia tak wewnątrz komór serca, jak i w naczyniach obwodowych) niezależnie od powodu wywołującego niekorzystne zmiany. W początkowym okresie rozwoju niewydolności przystosowanie mięśnia sercowego polega na aktywacji układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAA) oraz aktywacji układu sympatycznego [1]. Aktywacja pierwszego ze wspomnianych układów następuje wskutek spadku ciśnienia krwi w tętniczkach doprowadzających krew do kłębuszka nerkowego, co jest sygnałem świadczącym o osłabieniu kurczliwości mięśnia sercowego. W następstwie dochodzi do zwiększonego zatrzymania sodu w organizmie i zwiększenia oporu naczyniowego, a poprzez to do wzrostu ciśnienia w naczyniach, co z kolei stymuluje mięsień sercowy do zwiększenia kurczliwości. Pobudza to jednocześnie układ współczulny do wydzielania adrenaliny w nadnerczach, co dodatkowo stymuluje serce do zwiększenia jego kurczliwości i przyspieszenia relaksacji. Aktywacja drugiego ze wspomnianych układów, tj. układu sympatycznego zachodzi głównie na drodze spadku ciśnienia krwi w sercu, naczyniach płucnych i w aorcie, co osłabia pobudzenie baroreceptorów hamujących układ współczulny w mózgu i skutkuje zwiększeniem jego aktywności, a poprzez to wzrostem stężenia noradrenaliny we krwi. Noradrenalina z kolei pobudza (już osłabiony) mięsień

sercowy, dzięki czemu jego prawidłowa funkcja pozostaje zachowana. W trakcie progresji niewydolności serca aktywacja wspomnianych wyżej mechanizmów (układu RAA i układu sympatycznego) doprowadza jednak w efekcie do zmian strukturalnych mięśnia sercowego. Zwiększone ciśnienie w naczyniach obwodowych, a także w jamie serca początkowo prowadzi do reorganizacji tkanki komórek bądź przedsionków (wielkości kardiomiocytów, martwicy części komórek, zastąpienia ich tkanką łączną), a następnie do pogrubienia (przerostu) lub ścieńczenia (rozstrzeni) ścian serca. Postępujące niedokrwienie z kolei poza zmianami martwiczymi może doprowadzić do zaniku czynności pewnych fragmentów mięśnia serca, niekoniecznie oznaczającego martwicę [2]. W trakcie dalszego postępu niewydolności serca kompensacyjne procesy przebudowy stają się jednak niewystarczające, a zwiększona aktywacja mechanizmów neurohormonalnych niekorzystna, co uwidacznia się w postaci osłabionej frakcji wyrzutowej i szeregu symptomów określających stopień zaawansowania zdekompensowanej niewydolności serca [3]. Aktywowane są zatem kolejne mechanizmy mające na celu tym razem ochronę mięśnia sercowego, jak np. desensytyzacja receptorów  $\beta_1$ -adrenergicznych (tzw. *downregulation*), co niejako ochrania serce przed zbytnim obciążeniem [4, 5], zmniejszając jednak jego zdolność do wysiłku (ograniczając rezerwę chronotropową i wzrost czynności na stymulację inotropowo dodatnią). Pomimo więc stopniowych zaburzeń pracy mięśnia sercowego, aktywacja powyższych kluczowych mechanizmów kompensacyjnych (szczególnie na wczesnych etapach niewydolności serca) pozwala utrzymać prawidłowe ukrwienie tkanek i narządów, co jest niezwykle istotne dla poprawnego funkcjonowania całego organizmu.

Obecnie stosowana farmakoterapia niewydolności serca często ogranicza się jedynie do zmniejszenia objawów czy spowolnienia dalszej progresji zaburzeń, a nie do cofania istniejących zmian. Korzystne efekty skuteczności terapii widoczne są zaledwie u ok. połowy przypadków tj. w grupie pacjentów z obniżoną frakcją wyrzutową (z tzw. Heart Failure with reduced Ejection Fraction, HFrEF), podczas gdy dla grupy pacjentów z niewydolnością serca i zachowaną frakcją wyrzutową (z tzw. Heart Failure with preserved Ejection Fraction, HFpEF) wciąż brak satysfakcjonującej terapii kardioprotekcyjnej [6, 7]. Wynika to po części z faktu, że wciąż niedostatecznie dobrze poznane są mechanizmy odgrywające rolę w patogenezie niewydolności serca. Również diagnostyka zaburzeń rozkurczowych ma swoje ograniczenia, co znacznie utrudnia przeprowadzenie oceny skuteczności farmakoterapii w badaniach klinicznych [3].

Istnieje istotna potrzeba znalezienia innowacyjnych terapii niewydolności serca oraz lepszego zrozumienia mechanizmów determinujących poszczególne etapy progresji niewydolności serca. Aby było to możliwe konieczne są dobre modele niewydolności serca, odpowiadające patologiom obserwowanym u ludzi i pozwalające na studiowanie mechanizmów jej progresji, jak również dobre metody oceny zaburzeń pracy mięśnia sercowego u zwierząt doświadczalnych.

## **1.2. Modele zwierzęce w badaniach niewydolności serca; myszy Tgaq<sup>44</sup>, myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup>**

O ile szybka i trafna ocena zmian czynności mięśnia sercowego u pacjentów jest podstawą do zastosowania odpowiedniej farmakoterapii, o tyle ocena taka w badaniach modeli zwierzęcych jest podstawą do weryfikacji samego modelu oraz do zrozumienia mechanizmów odgrywających kluczową rolę w progresji upośledzenia funkcji serca, co w dalszej kolejności ma zasadnicze znaczenie w opracowywaniu i testowaniu nowych środków terapeutycznych dla pacjentów. Ze względu jednak na eksperymentalny charakter badań modeli zwierzęcych, sposób oceny czynności mięśnia sercowego jest nieco inny niż w przypadku badań ludzi. W przypadku pacjentów diagnoza opiera się na wyniku ilościowym (np. ocena parametrów wyrzutu krwi czy zmiany ciśnienia napełniania w czasie) i jakościowym (np. ocena kinetyczności ścian lewej komory), natomiast w przypadku badań zwierząt wiarygodność i porównywalność wyników wymuszają ocenę posiłkującą się jedynie wynikiem ilościowym. Stąd też, w badaniu czynności mięśnia sercowego modeli zwierzęcych niezwykle ważna jest powtarzalność wykonywanych procedur, ocena ilościowa i możliwość porównywania wyników.

By sprostać wyzwaniu współczesnych problemów farmakoterapii niewydolności serca szczególnie chętnie wykorzystuje się modele mysie, ze względu na dobrze poznany genotyp i łatwość w hodowli. Jednym z najczęściej wykorzystywanych modeli jest model podwiązania lewej tętnicy zstępującej, pozwalający na ocenę zmian niedokrwienia mięśnia sercowego [8]. Model ten niestety wymaga dużego doświadczenia w wykonywaniu zabiegów i obciążony jest wysoką śmiertelnością myszy ze względu na dużą inwazyjność operacji zaciśnięcia tętnicy. Ponadto, wywołane zmiany są ostre, a co za tym idzie nie dają możliwości na ocenę progresji wczesnych etapów zaburzeń czynności (subtelnych zmian zbytniego obciążenia mięśnia sercowego). Szerokie możliwości oceny wczesnych etapów niewydolności serca

i śledzenia progresji choroby przed wystąpieniem objawów dają natomiast myślenie modele modyfikowane genetycznie. Tym bardziej, że umożliwiają one obserwacje zmian czynności serca ze względu na wyselekcjonowane czynniki, jak otyłość, cukrzyca, miażdżyca czy udział katecholamin w progresji niewydolności serca (np. poprzez nadekspresję receptora  $\beta_1$ -adrenergicznego).

Jednym z interesujących modeli przewlekłej niewydolności serca są myszy  $Tg\alpha q^{*44}$ , u których rozwija się kardiomiopatia rozstrzeniowa [9-13]. Do rozwoju choroby dochodzi w odpowiedzi na nadekspresję stale aktywnej podjednostki białka  $G\alpha q^*$  tylko i wyłącznie w kardiomiocytach, co prowadzi do nadmiernej aktywacji receptora dla angiotensyny II (AT1), endoteliny I (ETA) i noradrenaliny ( $\alpha_1$ ) [13], jak to ma miejsce przy zwiększonej aktywności układu RAA i układu sympatycznego w toku rozwoju niewydolności serca u ludzi. Istotnie, fenotyp niewydolności serca u myszy  $Tg\alpha q^{*44}$  naśladuje patofizjologię niewydolności serca u ludzi na poziomie molekularnym, biochemicznym i czynnościowym uwzględniając w tym rozwój dysfunkcji śródbłonna w naczyniach wieńcowych [9], zmiany czynności mitochondriów [12], zaburzenia dystrybucji desminy [14]. Przerost kardiomiocytów, włóknienie mięśnia sercowego oraz fenotyp płodowy kardiomiocytów są wyraźnie widoczne już u 4 miesięcznych myszy  $Tg\alpha q^{*44}$ , jednak spadek frakcji wyrzutowej i osłabienie kinetyki wyrzutu oraz napełniania następuje dopiero u myszy 12 miesięcznych, czemu towarzyszy stopniowy wzrost śmiertelności zwierząt [10]. Pierwsze badania *in vivo* (wykonane metodą echokardiografii) wykonane u myszy  $Tg\alpha q^{*44}$  potwierdziły upośledzoną czynność skurczową i znaczną zmianę kształtu lewej komory w zaawansowanym stadium kardiomiopatii [13]. Kolejne badania, z wykorzystaniem techniki obrazowania magnetyczno-rezonansowego pozwoliły określić zmiany czynności serca na różnych etapach rozwoju patologii, jednakże obejmowały one również jedynie badania podstawowe (bez badania rezerwy czynnościowej) [9]. Wyniki przytoczonych badań pozwalają przypuszczać, że długotrwały etap skompensowanej fazy niewydolności serca w tym modelu zależy od aktywacji szeregu układów neurohormonalnych w tym od adaptacyjnej aktywacji układu RAA, która z czasem jednak przyczynia się do progresji niewydolności serca u myszy  $Tg\alpha q^{*44}$ .

Z kolei modelem szczególnie ciekawym w kontekście badań niedokrwiennej choroby serca są myszy  $apoE/LDLR^{-/-}$  pozbawione kluczowej dla transportu cholesterolu apolipoproteiny E oraz receptora dla lipoprotein o niskiej gęstości (myszy apolipoprotein E-deficient and Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Double

Knockout Mice, apoE/LDLR<sup>-/-</sup>) [10, 15, 16]. Myszy te wykazują przyśpieszony rozwój miażdżycy w stosunku do innego, często stosowanego modelu (myszy apoE<sup>-/-</sup>). Zmiany miażdżycowe u myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup> są widoczne także w naczyniach wieńcowych i prowadzą do zaburzeń przepływu krwi w lewej tętnicy wieńcowej, niedokrwienia części lewej komory i upośledzonej na tym tle czynność mięśnia sercowego [17]. Biorąc pod uwagę zaawansowane zmiany miażdżycowe występujące u myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup> w wieku 6 miesięcy [18], już na tym etapie rozwoju można spodziewać się również zmian czynności serca o podłożu niedokrwinnym. Dotychczasowe obserwacje dotyczące czynności serca myszy rozwijających miażdżycę wykazały upośledzenie rezerw czynności u myszy apoE<sup>-/-</sup> w badaniu prędkości fali wyrzutu z lewej komory [19] oraz co interesujące zachowaną kurczliwość mięśnia sercowego nawet na bardzo zaawansowanym etapie rozwoju miażdżycy u myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup> [20]. Wyniki te ograniczają się jednak jedynie do prędkości fali (w przypadku myszy apoE<sup>-/-</sup>) oraz do badania czynności mięśnia sercowego w warunkach podstawowych (w przypadku myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup>). Brak natomiast szerszej oceny ujmującej tak zmiany czynności podstawowej w odniesieniu do myszy zdrowych, jak i zmiany zależne od poziomu stymulacji ujawniających potencjalne czynnościowe niedokrwienie mięśnia sercowego w warunkach obciążenia farmakologicznego mięśnia sercowego wywołanego przez dobutaminę.

Podsumowując, zarówno w modelu kardiomiopatii rozstrzeniowej u myszy Tgαq\*44, jak i w modelu miażdżycy u myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup> obserwuje się postępującą w czasie progresję niewydolności mięśnia sercowego, z tym że w pierwszym przypadku jej przyczyną jest modyfikacja genetyczna kardiomiocytów, a w drugim postępująca miażdżycą naczyń wieńcowych. Aby rozwijać badania pod kątem oceny skuteczności farmakoterapii niewydolności serca u ludzi z wykorzystaniem tych modeli, konieczna jest dogłębna analiza zmian czynności serca, w tym zmian rezerw czynnościowych mięśnia sercowego oraz odpowiednio dopracowana metodyka tego typu badań *in vivo*.

### 1.3 Metody oceny czynności mięśnia sercowego

Stopniowy rozwój kardiomiopatii jak również zaburzeń czynności mięśnia sercowego na tle chorób towarzyszących najczęściej prowadzi do charakterystycznego zespołu objawów, klasyfikowanych wg ogólnie przyjętej skali NYHA [3]. Objawy te to stopniowe ograniczenie wydolności wysiłkowej, krótki oddech, ogólne zmęczenie i osłabienie czy tzw. palpacje. Ponadto, typowe dla niewydolności serca są oznaki

retencji płynów, jak: obrzęki, galopowy rytm serca, przesunięcie w lewo uderzenia koniuszkowego czy szmer skurczowy.

Podstawowe badania wykonywane w celu potwierdzenia przyczyn powyższych symptomów bazują przede wszystkim na technikach obrazowych oraz komplementarnej technice badania czynności bioelektrycznej serca (elektrokardiografia, EKG). Podczas gdy technika EKG pozwala rozpoznać zaburzenia przewodzenia zmian elektrycznych w sercu (mogących wynikać ze zmian strukturalnych), techniki obrazowe pozwalają określić rodzaj zmian czynnościowych (zaburzenia kinetyki, kurczliwości czy napełniania) czy morfologicznych (jak przerost czy martwica).

Najpowszechniej stosowaną techniką w ocenie serca jest echokardiografia – ultrasonograficzna technika badania serca, pozwalająca określić wiele parametrów świadczących o stanie czynności serca, jak: frakcja wyrzutowa, objętość wyrzutowa, rzut serca, objętość końcowo-skurczowa bądź końcowo-rozkurczowa lewej komory, a także przebieg prędkości krwi napływającej do komory oraz prędkości jej odkształcania w fazie rozkurczu.

Z kolei technika obrazowania czynności serca z użyciem zjawiska magnetycznego rezonansu (MR), poza anatomią i czynnością serca pozwala także na uzyskanie większej powtarzalności otrzymanych wyników, bardziej wiarygodną ocenę objętości jam serca, ich masy czy ruchu ich ścian [21-23]. Dodatkowo, w przypadkach pacjentów rozwijających złożone wrodzone choroby serca, kardiomiopatie, arytmie, guzy mięśnia sercowego, niedomykalność mitralną czy choroby osierdzia – obrazowanie MR pozostaje metodą z wyboru [21]. Ze względu jednak na koszty samego badania i jego dostępność oraz złożoność – nie jest tak powszechnie stosowana jak technika echokardiografii, choć zaleca się ją jako metodę alternatywną [3].

Niezależnie od zastosowanej techniki oceny czynności mięśnia sercowego, dodatkowych korzyści diagnostycznych dostarczają testy wysiłkowe (przeprowadzane na bieżni ruchomej lub cykloergometrze rowerowym) bądź, jak w przypadku pacjentów niezdolnych do samodzielnego wysiłku fizycznego, testy ze stymulacją  $\beta$ -adrenergiczną (stres farmakologiczny z użyciem dobutaminy, dipirydymolu czy adenozyiny). Obydwie metody wykorzystują zwiększone zapotrzebowanie mięśnia sercowego na tlen do oceny zaburzeń czynności serca bądź zaburzeń związanych z rozchodzeniem się fali EKG. Metoda, w której pacjent wykonuje wysiłek fizyczny (marsz na bieżni lub pedałowanie na cykloergometrze) obciąża mięsień sercowy w sposób fizjologiczny i prowadzi do wzrostu czynności skurczowej i rozkurczowej mięśnia sercowego (zwiększonej siły

skurczu, przyspieszenia akcji serca, kurczliwości, relaksacji i napełniania komór). Zwiększona praca mięśnia sercowego wymusza przyrost grubości ściany lewej komory w trakcie skurczu, zmniejszając końcowo-skurczową objętość komory i w efekcie zwiększając objętość, a także frakcję wyrzutową. Wraz ze wzrostem stopnia obciążenia serca przyspiesza także rytm serca, co dodatkowo powoduje wzrost przepływu krwi, w rezultacie powodując wzrost rzutu serca. Przyspieszenie akcji serca w trakcie wykonywania testu obciążeniowego jest zazwyczaj parametrem determinującym moment oceny czynności mięśnia serca, stąd też wysiłek bądź stymulacja farmakologiczna są kontynuowane do momentu osiągnięcia pewnego progu rytmu serca. Mechanizm działania stymulacji farmakologicznej (z najczęściej używaną dobutaminą) nie jest identyczny z mechanizmem obciążenia serca poprzez wysiłek fizyczny, m.in. ze względu na słabsze obciążenie wstępne (powrót żylny z nóg), a także ze względu na odmienną aktywację układu autonomicznego. Niemniej, korzyści diagnostyczne są podobne, a dobór metody zależny jest od sprawności pacjenta i możliwości pracowni. Szerokie wykorzystywanie prób wysiłkowych i testów ze stymulacją  $\beta$ -adrenergiczną wynika z tego, że możliwe do uwidocznienia upośledzenie mięśnia sercowego może zależeć od wielu czynników, takich jak: stopień upośledzenia przepływu krwi (w przypadku choroby naczyń obwodowych, czy choroby wieńcowej), wielkość obszaru niedokrwienia czy też czas jego trwania (w przypadku choroby wieńcowej bądź zatkania którejś z tętnic wieńcowych), obecność krążenia obocznego, zaburzenia ciśnienia panującego w lewej komorze czy zwiększone napięcie jej ścian (np. w wyniku zwłóknienia). Opisane nieprawidłowości spotykane są w różnego typu zaburzeniach czynności serca i mają różny wpływ na jego wydolność. Testy obciążeniowe uwidaczniają wielkości rezerwy czynnościowej i dlatego mają istotne znaczenie diagnostyczne zarówno w przypadku niewydolności serca o podłożu tzw. „nie niedokrwienym”, jak i w ocenie stopnia niedokrwienia i zaburzeń kinetycznych ścian komór w przebiegu choroby wieńcowej. Dodatkowo korzyścią płynącą ze stosowania testów obciążeniowych jest ich wartość prognostyczna w odniesieniu do długości przeżycia pacjentów i częstości hospitalizacji z przyczyn sercowych [3].

Ze względu na opisane dodatkowe korzyści związane z oceną rezerwy czynności, testy takie (z użyciem dobutaminy) znajdują zastosowanie również w badaniach doświadczalnych [24-26]. W przeciwieństwie jednak do testów klinicznych, w przypadku procedur eksperymentalnych brak jest jednolitego protokołu, co wynika

m.in. ze stopnia skomplikowania badań przeprowadzanych z użyciem małych zwierząt (najczęściej myszy). Co więcej, stosowane protokoły stymulacji z użyciem dobutaminy dotyczą zarówno wlewów dożylnych, jak i iniekcji dootrzewnowych w bolusie z zastosowaniem różnych dawek [27].



## 2. Cel pracy

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie metodyki do badania zmian rezerwy czynności mięśnia sercowego i jej zastosowanie do badań niewydolności krążenia: u myszy Tgαq\*44, u których rozwija się kardiomiopatia rozstrzeniowa, oraz u myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup>, u których rozwija się miażdżycyca.

W szczególności celem niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie metodyki stymulacji dobutaminą mięśnia sercowego oraz ocena czynności mięśnia sercowego *in vivo* techniką obrazowania MR. Wykorzystując opracowaną metodykę zbadano:

- (1) progresję niewydolności serca u myszy Tgαq\*44 rozwijających kardiomiopatię rozstrzeniową na poszczególnych etapach rozwoju patologii,
- (2) zaburzenia czynności mięśnia sercowego u myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup> z zaawansowaną miażdżycą tętnic wieńcowych.

## 3. Metody

### 3.1. Zwierzęta

Do badań progresji niewydolności mięśnia sercowego na tle kardiomiopatii rozstrzeniowej wykorzystano myszy szczepu Tgαq\*44 w wieku 4, 6, 12, 15 oraz 16-18 miesięcy oraz odpowiadające im myszy kontrolne szczepu FVB w wieku 4, 6 oraz 15 miesięcy. Do oceny czynności mięśnia sercowego ze względu na zaawansowaną miażdżycę tętnic wykorzystano natomiast dwie grupy myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup>. Pierwsza (apoE/LDLR<sup>-/-</sup>S) karmiona była standardową paszą, podczas gdy druga (apoE/LDLR<sup>-/-</sup>LCHP paszą aterogenną, nisko węglowodanową, wysoko lipidową i wysoko białkową (tzw. pasza LCHP-Low Carbohydrate High Protein). Grupę kontrolną dla myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup> stanowiły myszy szczepu C57BL/6. Myszy hodowano za barierą sanitarno-epidemiologiczną w Zwierzętarńi Instytutu Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk oraz w Zwierzętarńi Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego (Tgαq\*44 oraz FVB) oraz w Zwierzętarńi Uniwersytetu Rolniczego im. H. Kołłątaja w Krakowie (apoE/LDLR<sup>-/-</sup>). Przed badaniami myszy przywożono do Zwierzętarńi Instytutu Fizyki Jądrowej PAN w Krakowie (z przynajmniej kilkudniowym wyprzedzeniem, w celu ich aklimatyzacji).

Myszom zapewniano stały dostęp do paszy (Labofed B, Wytwórnia Pasz „Morawski”) i wody, a w pomieszczeniach panowała stała wilgotność: 60 %, oświetlenie L/D: 12/12 i temperatura: 23° C. Wszelkie procedury wykonywane w ramach badań niniejszej rozprawy uzyskały zgodę I Lokalnej Komisji Etycznej przy Uniwersytecie Jagiellońskim.

### 3.2. Obrazowanie czynności serca myszy za pomocą tomografii magnetyczno-rezonansowej

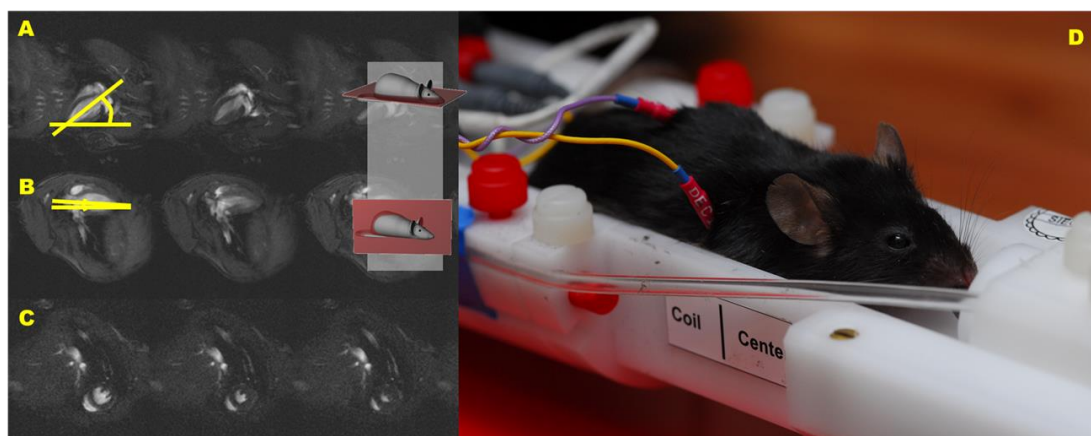
Badania obrazowania MR wykonano w przy użyciu tomografu magnetyczno-rezonansowego (MR) zbudowanego w oparciu o magnes nadprzewodzący 4,7 T/ 310 (Bruker/ Niemcy) oraz konsolę MARAN DRX (Resonance Instruments Ltd., Wielka Brytania). Pomiaru wykonano przy użyciu dedykowanej głowicy pomiarowej składającej się z cewek gradientowych (ID 60 mm, 450 mT/m/100A) i cewki radiowej częstości typu *birdcage* (ID 40 mm) wykonanych w IFJ PAN [28]. W trakcie całej procedury myszy utrzymywane były w znieczuleniu wziewnym przy pomocy izofluranu

(Aerrane, Baxter, Polska). Przed przystąpieniem do badania myszy usypiane były wzięwnie w stężeniu 2 % w mieszaninie tlenu i powietrza w stosunku 1:2 i przepływie: 0,75 l/min tlenu do 1,5 l/min powietrza. Stężenie anestetyku utrzymywano na jednakowym poziomie przez cały czas trwania badania MR (2 % izofluranu), by wykluczyć potencjalne zmiany czynności zależne od zmian perfuzji mięśnia sercowego [29]. Myszy układano w „łóżeczku” pomiarowym, zakładano podskórne elektrody w celu rejestracji fali EKG oraz endorektalny czujnik temperatury (S.A. Instruments, USA). W celu przeprowadzenia badania stymulacji  $\beta$ -adrenergicznej w trakcie obrazowania MR, zakładano myszy wenflon dootrzewnowy o długości około 10 cm, wypełniony solą fizjologiczną, a następnie łóżeczko z myszą lokowano w centrum pola widzenia tomografu. Użycie wenflonu pozwalało na podanie dobutaminy bez konieczności wyjmowania myszy z tomografu po pomiarze czynności podstawowej serca. Zapewniało to identyczne położenie obrazowanej warstwy serca w badaniu podstawowym i w badaniu po podaniu dobutaminy rozwiązując problem braku fizycznego dostępu do zwierzęcia ulokowanego w tomografie.

Podczas wykonywania całości pomiaru temperaturę utrzymywano na stałym poziomie 35° C poprzez nawiew powietrza o kontrolowanej temperaturze. Do obrazowania użyto sekwencji szybkiego echa gradientowego (sekwencja typu FLASH), w wersji z usuwaniem resztkowej magnetyzacji poprzecznej (*rf-spoiling*), z zaimplementowaną kompensacją zmian fazy sygnału wywołaną przepływem (*flow compensation*), zsynchronizowanego z przebiegiem fali EKG - zgodnie z metodyką opisaną w pracy Drelicharza i wsp. [10] (grubość warstwy: 1,5 mm, pole widzenia (Field of View, FOV): 30x30 mm, rozmiar macierzy danych: 128x128, czas echa (Echo Time, TE): 5 ms, czas repetycji (Repetition Time, TR): 5÷8 ms, liczba powtórzeń (Number of Scans, NS): 8, kąt obrotu (Flip Angle, FA): pomiędzy 25° a 30° (ustawiany tak, by osiągnąć odpowiedni kontrast pomiędzy przepływającą w komorze krwią a ścianą komory). Uzyskiwano średnio ok. 20 klatek na cykl (od 16 do 25 klatek, w zależności od długości trwania cyklu). Rytm serca oceniano na podstawie czasu pomiędzy dwoma załamkami R fali EKG (przy użyciu dedykowanego systemu rejestracji S.A. Instruments, USA). W przypadku wystąpienia silnych zaburzeń przewodzenia sygnału fali EKG (w przypadku myszy Tgαq\*44 na bardzo zaawansowanym etapie niewydolności serca), rytm serca wyliczano na podstawie histogramu otrzymywanego za pomocą dedykowanego urządzenia do zapisu czasu

pojawienia się załamka R (Tomak, Polska) oraz opracowanego w Zakładzie Tomografii Magnetyczno-Rezonansowej IFJ PAN.

Protokół pomiarowy obejmował wstępne wykonanie serii obrazów pilotowych w trybie wielowarstwowym (*multi-slice*) w płaszczyźnie czołowej, co pozwalało wyznaczyć położenie serca w klatce piersiowej myszy. Następnie, aby dokładniej zlokalizować mięsień sercowy, wykonywano pomiar w jednej, wybranej płaszczyźnie czołowej, w trybie wielu klatek (*multi-phase*). Na otrzymanych obrazach wyznaczano kąt jaki oś serca tworzyła z osią ciała (Ryc. 1 A) i na tej podstawie określano położenie kolejnych płaszczyzn. Dla tak oznaczonej orientacji, wykonywano powtórnie serię wielowarstwową, a następnie serię wielu klatek, co pozwalało wyznaczyć odpowiedni kąt projekcji osi długiej lewej komory. Na podstawie osi długiej natomiast wyznaczano prostopadłe do niej oś krótką (Ryc. 1 B i C). Pomiary objętościowe wykonywano w osi krótkiej od koniuszka do podstawy komory, pokrywając całą jamę serca przy zmniejszonej grubości warstwy do 1 mm. Badanie stymulacji  $\beta$ -adrenergicznej wykonywano w jednej warstwie w projekcji osi krótkiej na wysokości mięśni brodawkowatych.



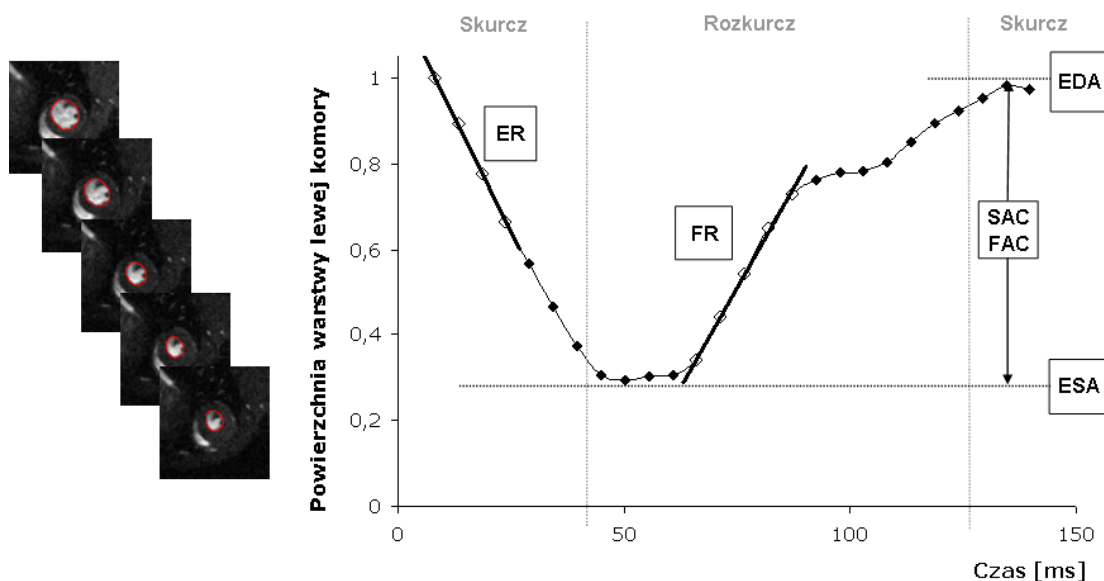
Rycina 1. Wyznaczanie płaszczyzny osi krótkiej dla obrazowania serca (opis w tekście). Na zdjęciu widoczna mysz z podpiętymi podskórnie elektrodami rejestrującymi sygnał EKG.

### 3.3. Analiza obrazów

Otrzymane obrazy analizowano za pomocą skryptu oprogramowania Aphelion, (ADCIS, Francja-USA), pozwalającego na uzyskanie pół-automatycznej segmentacji powierzchni lewej komory serca na obrazach osi krótkiej [30]. W razie potrzeby, obrazy korygowano ręcznie, by uzyskać możliwie najbardziej wiarygodne wyniki. Otrzymane dane posłużyły do wyliczenia krzywej cyklu serca, tj. zmian powierzchni lewej komory

w czasie. Na podstawie otrzymanej krzywej wyznaczano parametry określające czynność lewej komory (Ryc. 2): powierzchnię końcowo-skurczową (End Systolic Area, ESA), powierzchnię końcowo-rozkurczową (End Diastolic Area, EDA), wyrzutową zmianę powierzchni (Stroke Area Change,  $SAC=EDA-ESA$ ), powierzchniową zmianę frakcji wyrzutowej (Fractional Area Change,  $FAC=(SAC/EDA)$ ), powierzchniowy rzut serca (Slice Cardiac Output,  $SCO=SAC \cdot HR$ ), kinetykę skurczu (Ejection Rate, ER) oraz kinetykę rozkurczu (Filling Rate, FR). Kinetyka skurczu oceniana była jako kąt nachylenia w początkowej fazie skurczu (jako nachylenie krzywej stycznej do kolejnych punktów wyznaczających zmianę powierzchni lewej komory w czasie pierwszych 30 % cyklu), a kinetykę napełniania oceniano jako kąt nachylenia w początkowej fazie napełniania lewej komory (w pierwszych 30 % fazy napływu krwi do komory). Aby ocenić czynność całej komory, mierzono w analogiczny sposób czynność pozostałych warstw w osi krótkiej lewej komory (do koniuszka oraz do podstawy serca, średnio ok. 5 warstw). Otrzymane wyniki dla powierzchni warstw były następnie sumowane (suma powierzchni poszczególnych przekrojów posłużyła wyliczeniu objętości dla całej komory). Analogicznie do parametrów oceniających czynność poszczególnych warstw – oceniano więc parametry takie jak: objętość końcowo-skurczowa (End Systolic Volume, ESV), objętość końcowo-rozkurczowa (End Diastolic Volume, EDV), frakcja wyrzutowa (Ejection Fraction, EF) oraz objętość wyrzutowa (Stroke Volume,  $SV=EDV-ESV$ ). Wyniki dla parametrów oceniających kinetykę (ER, FR) z poszczególnych warstw były natomiast uśredniane. Ze względu na stosunkowo długi czas pomiaru ocenę czynności całej lewej komory przeprowadzono w wybranych grupach myszy Tgaq\*44 w wieku: 4, 6, 12 oraz 15 miesięcy. U starszych myszy, w wieku 16-18 miesięcy protokół oceny czynności spoczynkowej obejmował jedynie ocenę pojedynczej, środkowej warstwy, aby ograniczyć czas wykonania pomiaru, ekspozycji na anestezję i możliwą śmiertelność. W przypadku pozostałych grup myszy (szczepu FVB, C57BL/6 oraz apoE/LDLR<sup>-/-</sup>) przeprowadzano całą procedurę obrazowania komory (wszystkich warstw). W celu uchwycenia zmian zależnych od sposobu oceny czynności lewej komory (bazujących na ocenie pojedynczej warstwy bądź sumy kilku warstw) przeprowadzono analizę porównawczą wyników w grupach myszy FVB oraz Tgaq\*44 w wieku 4 i 15 miesięcy. Pozwoliło to oszacować różnice w ocenie czynności zależne m.in. od zdolności kompensacyjnych warstwy środkowej

i potencjalne zmiany geometrii lewej komory we wczesnej i późnej fazie niewydolności serca u myszy Tgαq\*44 w stosunku do szczepu FVB.



Rycina 2. Parametry czynności serca wyznaczone na podstawie zmian powierzchni lewej komory w czasie cyklu. ESA (End Systolic Area) – objętość końcowo-skurczowa, EDA (End Diastolic Area) – objętość końcowo-rozkurczowa, SAC (Stroke Area Change) – powierzchniowa objętość wyrzutowa, FAC (Fractional Area Change) – powierzchniowa zmiana frakcji wyrzutowej, ER (Ejection Rate) – kinetyka skurczowa, FR (Filling Rate) – kinetyka napelniania. Sposób obliczania w/w parametrów opisano w tekście.

### 3.4. Opracowanie metodyki badania rezerwy czynnościowej mięśnia sercowego u myszy *in vivo* z użyciem stymulacji $\beta$ -adrenergicznej

Ze względu na specyfikę eksperymentów, która wymagała umieszczenia i unieruchomienia myszy w centrum magnesu, zakładano im wenflony z odprowadzeniem na zewnątrz tomografu (o długości ok. 20 cm). Wenflony zakładane były dootrzewnowo, a nie dożylnie, co znacznie przyspieszało i upraszczało przebieg eksperymentów (skomplikowana procedura zakładania cewników dożylnych myszom wydłuża czas anestezji, co w przypadku myszy na zaawansowanych stadiach niewydolności może skutkować zwiększoną śmiertelnością). Ponadto, zastosowanie iniekcji dootrzewnowych w badaniu myszy techniką obrazowania MR nie wymaga zastosowania specjalistycznej, kompatybilnej z wysokim polem elektromagnetycznym

pompy infuzyjnej (potrzebnej do podawania dobutaminy we wlewie dożylnym), co dodatkowo upraszcza przeprowadzenie badania.

O ile jednak podanie dootrzewnowe dobutaminy jest stosowane w badaniach eksperymentalnych [27], o tyle nie ma jasno określonych zakresów dawek i czasu rejestracji odpowiedzi czynnościowej u zwierząt (w tym myszy), jak jest to określone w przypadku wlewów dożylnych dobutaminy u ludzi [3]. Często spotykaną w badaniach eksperymentalnych dawką podawaną myszom w celu oceny rezerwy czynnościowej mięśnia sercowego jest dawka 1,5 mg/kg podawana dootrzewnowo [27, 31, 32]. Dawka ta jednak ze względu na kondycję mięśnia sercowego może wywołać stosunkowo silny bądź stosunkowo nieznaczny efekt. Wynika to przede wszystkim z osobniczej czułości mięśnia sercowego na działanie katecholamin w zależności od wieku myszy jak również zaawansowania kardiomiopatii (ze względu na różny stopień desensytyzacji receptorów  $\beta_1$ -adrenergicznych mięśnia sercowego) bądź też od stopnia istniejącej potencjalnie choroby naczyń wieńcowych (ze względu na niedokrwienie mięśnia sercowego). W celu otrzymania charakterystyki odpowiedzi czynnościowej mięśnia serca na stymulację  $\beta$ -adrenergiczną, przetestowano szereg dawek dobutaminy w zakresie od 0,15 do 20 mg/kg. W pierwszej kolejności przetestowano kolejno dawki: 0,15/ 0,5/ 1,5 mg/kg podawane w objętości 0,2 ml objętości soli fizjologicznej każdorazowo rejestrując rytm serca i wykonując szereg pomiarów czynności. Na tej podstawie szacowano średni czas po jakim zachodziły zmiany w czynności serca. W następnej kolejności podobnie testowano szereg większych dawek: 1,5, 5,0, 20 mg/kg. Zakres zarówno „niskich” (0,15-1,5 mg/kg), jak i „wysokich” (1,5-20 mg/kg) dawek testowano na osobnych grupach myszy, by wykluczyć potencjalny wpływ zbyt dużego obciążenia, szczególnie w przypadku myszy Tg $\alpha$ \*44 na późnym etapie niewydolności oraz by podawana objętość iniekcji nie zaburzyła interpretacji wyniku. By ustalić poziom stymulacji  $\beta$ -adrenergicznej w zakresie niskich i wysokich dawek dobutaminy, mogących uwidocznienie upośledzenie rezerw czynności serca bądź stany niedokrwienne, zbadano grupy myszy najbardziej zróżnicowane pod względem możliwej odpowiedzi na stymulację  $\beta$ -adrenergiczną, tj. myszy Tg $\alpha$ \*44 na późnym etapie niewydolności (w stanie dekompensacji czynności lewej komory) oraz grupę całkowicie zdrowych myszy FVB w wieku 4 miesięcy. Opracowaną na tej podstawie metodykę zastosowano następnie do badania progresji zmian czynności mięśnia sercowego w modelu niewydolności serca o podłożu

kardiomiopatii rozstrzeniowej oraz opisanie zmian u myszy z rozwijającą się miażdżycą tętnic wieńcowych.

### **3.5. Metodyka badania rezerwy czynności lewej komory w oparciu o odpowiedź na niską oraz wysoką dawkę dobutaminy**

Po wykonaniu serii obrazów czynności serca w warunkach podstawowych, wykonywano badanie rezerwy czynności mięśnia sercowego przez podanie dobutaminy (Polfa Tarchomin, SA) według protokołu opracowanego na wcześniejszym etapie pracy. Protokół ten oparto o wyniki bazujące na najsilniejszej i najbardziej powtarzalnej zmianie czynności serca w odpowiedzi na stymulację dobutaminą z zakresu dawek niskich i wysokich tak w przypadku czynności prawidłowej, jak i istotnie zdekompensowanej. tj. stymulacji dawkami odpowiednio: 0,5 i 5 mg/kg. Obrazowanie MR czynności serca wykonywano w identyczny sposób jak w przypadku badań spoczynkowych, jednak czynność oceniana była na podstawie zmian objętości pojedynczej warstwy (na wysokości mięśni brodawkowatych), a nie uśredniana na podstawie sumy wartości ze wszystkich warstw. Efekt zmian w odpowiedzi na stymulację niską dawką dobutaminy (0,5 mg/kg) oceniano po okresie ok. 8 i 12 minut po podaniu dobutaminy. Kolejna dawka dobutaminy (5 mg/kg m.c.) podawana była po okresie ok. 20 minut od pierwszej dawki, a badanie rezerwy (zmiany czynności) oceniano po kolejnych 8 i 12 minutach. Każdorazowo wykonywano 2 pomiary, a rezerwę czynności oceniano z pomiaru, który pokazywał większą zmianę powierzchni końcowo-skurczowej lewej komory. Czynność lewej komory oceniana była na podstawie zmian powierzchni mierzonej warstwy w czasie (jak w przypadku analizy objętości całej komory, lecz bez sumowania z warstwami kolejnych przekrojów) wg analogicznych parametrów jak miało to miejsce w przypadku oceny warstw analizowanych w ocenie czynności podstawowej (tj. według parametrów: ESA, EDA, SAC, FAC, SCO, FR, ER oraz HR).

### **3.6. Analiza statystyczna**

Do oceny istotności różnic otrzymanych wyników użyto pakietu STATISTICA (Stat Soft Inc., USA) oraz programu MS Office Excel (Microsoft, USA). Wszystkie wyniki są przedstawione jako wartości średnie  $\pm$  odchylenie standardowe średniej. W przypadku analizy wyników modelu  $Tg\alpha^*44$ , weryfikację hipotez zerowych przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta dla grup niezależnych (porównania



pomiędzy grupami Tgαq\*44 oraz FVB w stanie podstawowym oraz po jednakowych dawkach dobutaminy) oraz za pomocą testu t-Studenta dla zmiennych zależnych w obrębie tego samego szczepu (do oszacowania rezerwy czynności lewej komory), przed oraz po iniekcji dobutaminy. Gdy założenia testu nie były spełnione (normalność rozkładu – test Shapiro-Wilka i jednorodność wariancji – test Browna-Forsyth'a), stosowano odpowiednie testy nieparametryczne, tj. do oceny różnic parametrów charakteryzujących czynność lewej komory pomiędzy szczepami FVB i Tgαq\*44 dla jednakowej dawki dobutaminy zastosowano test Manna – Whitney'a, z kolei do oceny istotności rezerwy czynnościowej test Wilcoxon dla par obserwacji. W przypadku analizy wyników dla modelu myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup> zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z powtarzanymi pomiarami w obrębie jednego czynnika (dawka dobutaminy). Wartości p<0,05 uznano jako statystycznie istotne.

## 4. Wyniki

### 4.1. Opracowanie metodyki badania MR *in vivo* czynności mięśnia sercowego myszy z wykorzystaniem stymulacji niską oraz wysoką dawką dobutaminy

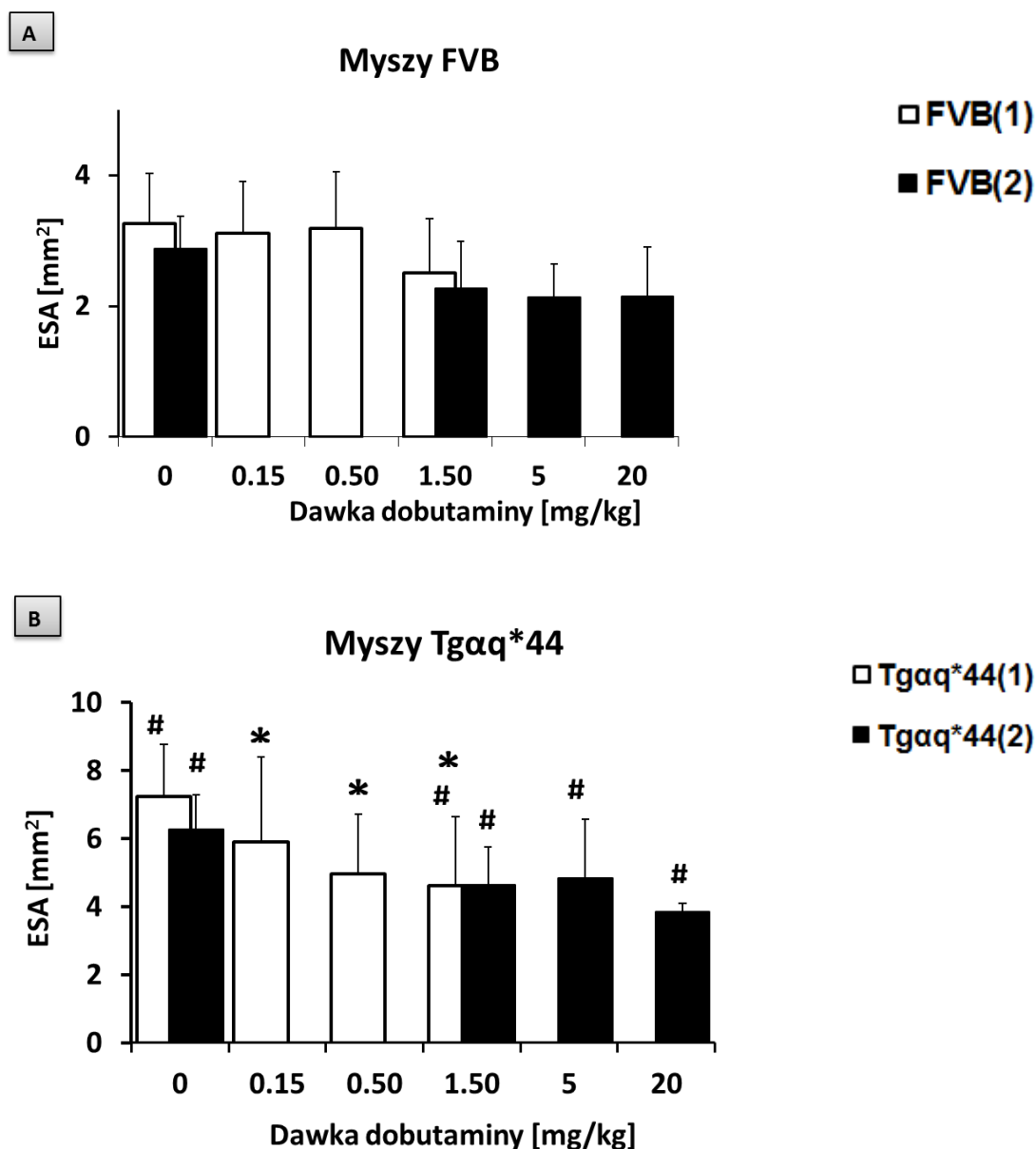
Wartości czynności podstawowej mięśnia sercowego (przed stymulacją) dla badanych grup zebrane zostały w Tabeli 1. Myszy z zaawansowaną niewydolnością mięśnia sercowego (Tgαq\*44 w wieku 16-18 miesięcy) miały wyraźnie wolniejszą akcję serca. W grupie tej wyrzutowa zmiana powierzchni (SAC) i powierzchniowa zmiana frakcji wyrzutowej (FAC) były zmniejszone. Powierzchnia końcowo-skurczowa (ESA) lewej komory była zwiększona, podczas gdy wartości końcowo-rozkurczowej powierzchni (EDA) lewej komory nie różniły się w stosunku do grupy kontrolnej myszy FVB. Kinetyka wyrzutu krwi (ER) oraz kinetyka napelniania (FR) lewej komory w grupie Tgαq\*44 były zmniejszone (Tabela 1).

Parametr	FVB (N = 9)	Tgαq*44 (N = 11)
HR [bpm]	459 ± 34	422 ± 24 *
ESA [mm <sup>2</sup> ]	4,6 ± 0,9	10,1 ± 1,8 *
EDA [mm <sup>2</sup> ]	18,3 ± 1,2	17,6 ± 2,0
FAC [%]	75,0 ± 4,3	42,2 ± 9,0 *
SAC [mm <sup>2</sup> ]	13,7 ± 1,2	7,5 ± 1,7 *
ER [EDA/ms]	0,0213 ± 0,0022	0,0124 ± 0,0034 *
FR [EDA/ms]	0,0249 ± 0,0050	0,0108 ± 0,0035 *

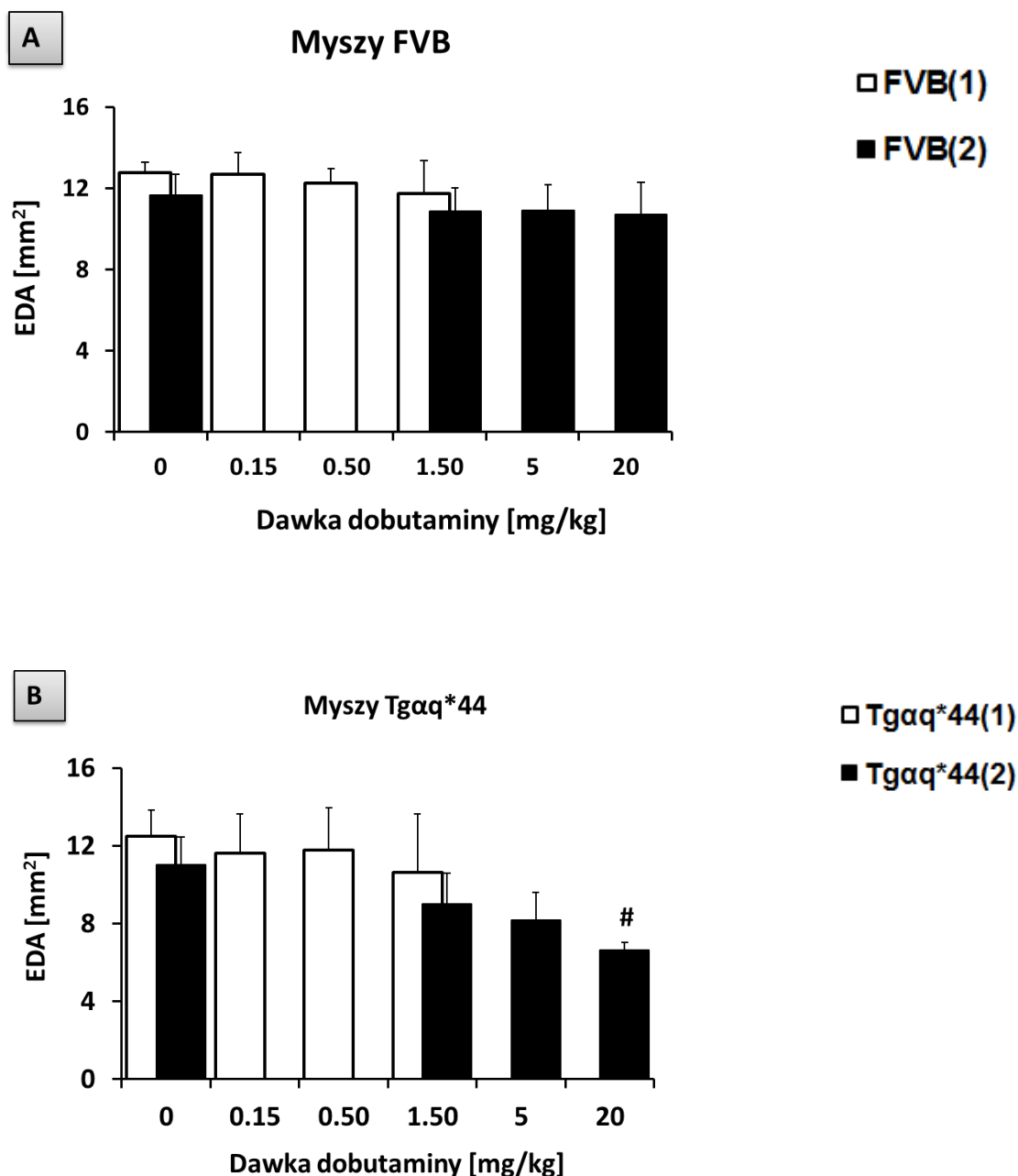
Tabela 1. Wartości parametrów czynnościowych serca w badaniu podstawowym lewej komory w grupach myszy FVB w wieku 4 miesiące oraz myszy Tgαq\*44 w wieku 16-18 miesięcy. (Wartości przedstawione jako średnie ± odchylenie standardowe; Oznaczenia skrótów w spisie skrótów. \* oznacza p<0,05 dla grupy Tgαq\*44 vs FVB).

Podanie dobutaminy w grupie myszy kontrolnych FVB w zakresie niskich dawek dobutaminy ( $\leq 1,5$  mg/kg) nie wywoływało żadnych wyraźnych zmian w badanych parametrach: powierzchni końcowo-skurczowej (ESA, Ryc. 3 A), powierzchni końcowo-rozkurczowej (EDA, Ryc. 4 A), powierzchniowej zmianie frakcji wyrzutowej (FAC, Ryc. 5 A), wyrzutowej zmianie objętości (SAC, Ryc. 6 A), kinetyce wyrzutu (ER, Ryc. 7 A) i kinetyce napełniania (FR, Ryc. 8 A). Stymulacja dobutaminą w zakresie dawek wysokich ( $\geq 1,5$  mg/kg) wywołała jedynie nieznaczący statystycznie spadek powierzchni końcowo-skurczowej (ESA, Ryc. 3 A), bez wyraźnych zmian w powierzchni końcowo-rozkurczowej (EDA, Ryc. 4 A), brak wyraźnych zmian powierzchniowej zmiany frakcji wyrzutowej (FAC, Ryc. 5 A) i wyrzutowej zmianie objętości (SAC, Ryc. 6 A). Kinetyka wyrzutu i napełniania również nie wykazały istotnych zmian w odpowiedzi na wysokie dawki dobutaminy (odpowiednio: ER i FR, Ryc. 7 A i 8 A).

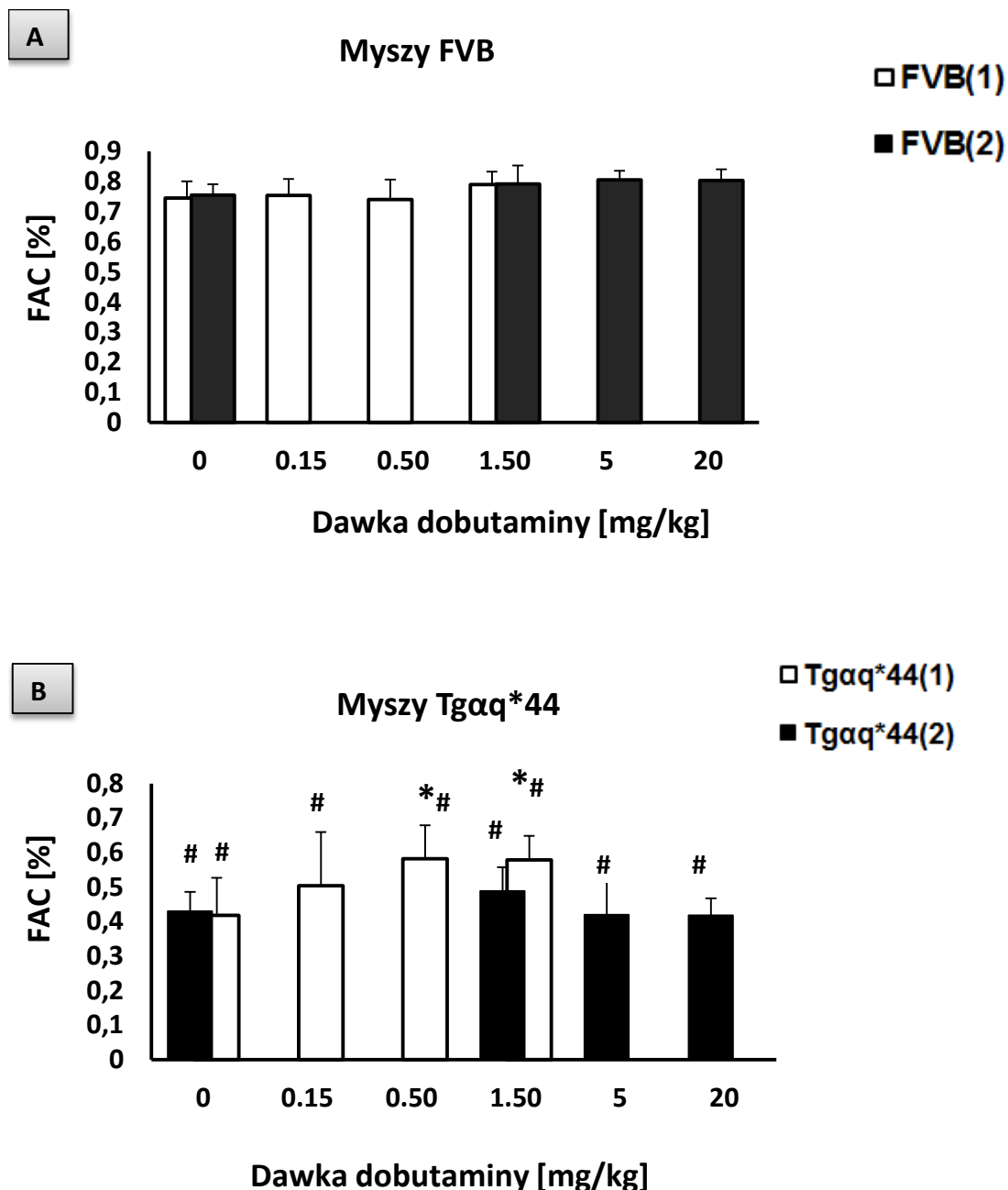
Stymulacja dobutaminą mięśnia sercowego myszy Tgaq\*44 wywoływała odmienną odpowiedź niż u myszy FVB. Podanie dobutaminy w zakresie dawek niskich wywoływało spadek powierzchni końcowo-skurczowej (ESA, Ryc. 3 B) czego nie obserwowano dla dawek wysokich. Powierzchnia końcowo-rozkurczowa (EDA) nie zmieniała się natomiast po stymulacji dobutaminą w dawkach  $\leq 1,5$  mg/kg, ale spadła po stymulacji dobutaminą w zakresie dawek wysokich (20 mg/kg). Powierzchniowa zmiana frakcji wyrzutowej i wyrzutowa zmiana powierzchni w grupie myszy Tgaq\*44 zwiększały się dla dawek dobutaminy z niskiego zakresu i nie zmieniły się po stymulacji dawkami w zakresie wysokim (FAC i SAC, Ryc. 5 B i 6 B). Wartości dla kinetyki wyrzutu, jak i kinetyki napełniania zwiększały się po podaniu dobutaminy z zakresu dawek niskich (w przypadku kinetyki wyrzutu – istotnie statystycznie) i nie zmieniły się po podaniu wysokich dawek dobutaminy (ER i FR, Ryc. 7 B i 8 B).



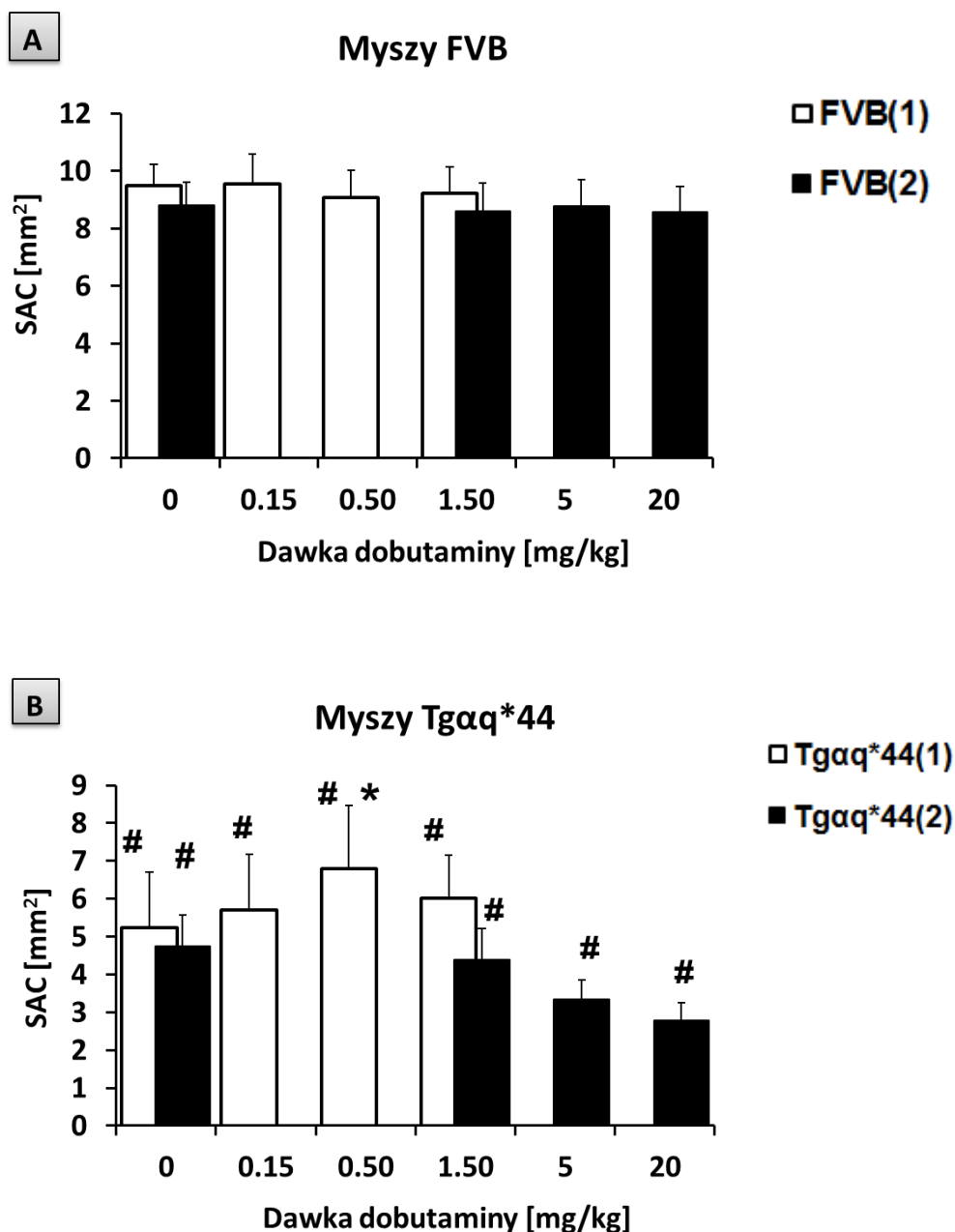
Rycina 3. Wartości powierzchni końcowo-skurczowej (ESA) u myszy FVB i Tgaq\*44 w odpowiedzi na stymulację dobutaminą w zakresie dawek niskich ( $\leq 1,5$  mg/kg) oraz w zakresie dawek wysokich ( $\geq 1,5$  mg/kg). U myszy kontrolnych FVB obserwowano wyraźny (choć nieistotny statystycznie) spadek ESA po stymulacji dobutaminą w zakresie dawek wysokich (A). W grupie myszy Tgaq\*44 znaczny spadek wartości ESA uwidacznia się po stymulacji dobutaminą w zakresie dawek niskich, a w zakresie wysokich dawek obserwowano mniej znaczące spadki wartości, choć zarówno wartości czynności podstawowej, jak i czynności po stymulacji dobutaminą w dawce  $> 1,5$  mg/kg były istotnie niższe w odniesieniu do grupy kontrolnej (B). Oznaczenia grup: (1) myszy badane stymulacją w zakresie dawek niskich i (2) myszy badane w zakresie dawek wysokich (dokładny opis w Metodycie). \* oznacza  $p < 0,05$  względem wartości dla czynności podstawowej; # oznacza  $p < 0,05$  dla grupy Tgaq\*44 względem FVB w odniesieniu do tej samej dawki dobutaminy.



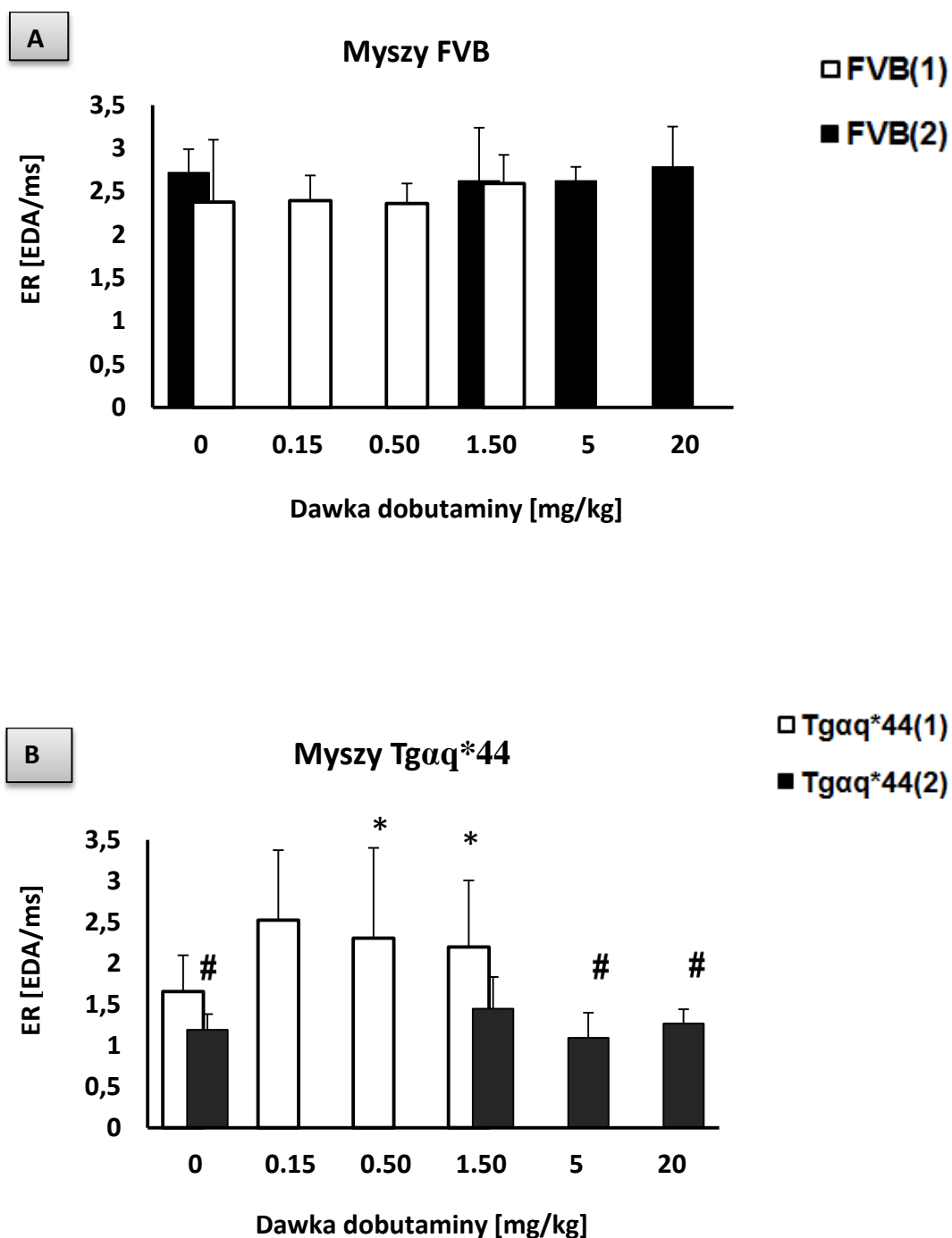
Rycina 4. Wartości powierzchni końcowo-rozkurczowej (EDA) dla myszy FVB i Tgαq\*44 w odpowiedzi na stymulację dobutaminą w zakresie dawek niskich ( $\leq 1,5$  mg/kg) oraz w zakresie dawek wysokich ( $\geq 1,5$  mg/kg). W grupie kontrolnej FVB nie obserwowano zmian wartości EDA po stymulacji dobutaminą niezależnie od podawanej dawki (A), podczas gdy w grupie Tgαq\*44 najwyższa dawka dobutaminy spowodowała istotny spadek wartości EDA (B); Oznaczenia grup: (1) myszy badane stymulacją w zakresie dawek niskich i (2) myszy badane w zakresie dawek wysokich (dokładny opis w Metodocyce). # oznacza  $p < 0,05$  dla grupy Tgαq\*44 względem FVB w odniesieniu do tej samej dawki dobutaminy.



Rycina 5. Wartości zmiany powierzchniowej frakcji wyrzutowej (FAC) dla myszy FVB i Tgaq\*44 w odpowiedzi na stymulację dobutaminą w zakresie dawek niskich ( $\leq 1,5$  mg/kg) oraz w zakresie dawek wysokich ( $\geq 1,5$  mg/kg). W grupie kontrolnej FVB obserwowano jedynie nieznaczny wzrost wartości FAC po stymulacji dobutaminą dla dawki 1,5 mg/kg bądź wyższej (A), podczas gdy w grupie Tgaq\*44 wzrost wartości obserwowany był w zakresie niskich dawek. Dawki w zakresie wysokich nie powodowały natomiast żadnych zmian wartości FAC w grupie Tgaq\*44 (B); Oznaczenia grup: (1) myszy badane stymulacją w zakresie dawek niskich i (2) myszy badane w zakresie dawek wysokich (dokładny opis w Metodyce). \* oznacza  $p < 0,05$  dla wartości po dobutaminie w stosunku do wartości czynności podstawowej, # oznacza  $p < 0,05$  dla grupy Tgaq\*44 względem FVB w odniesieniu do tej samej dawki dobutaminy.

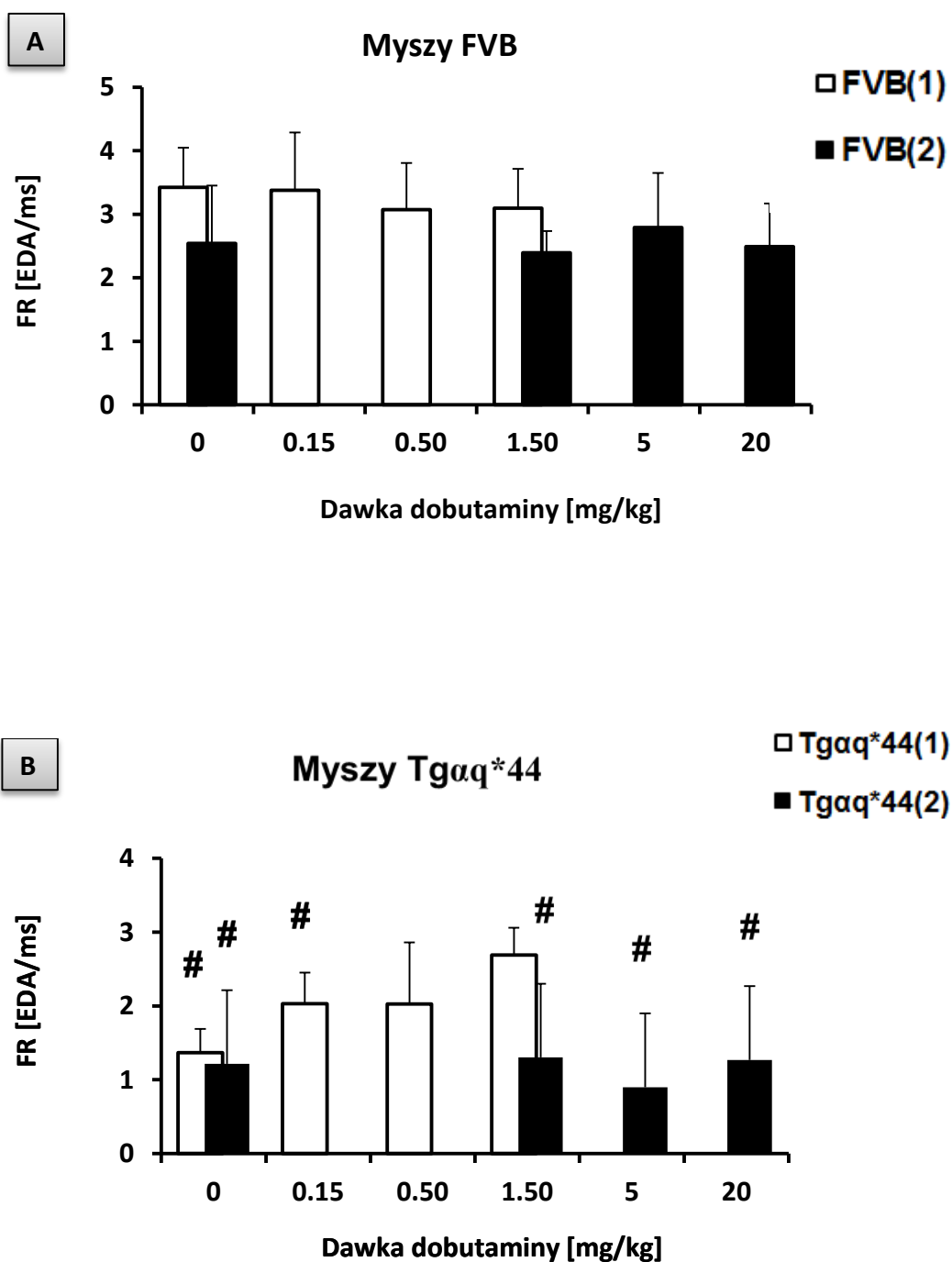


Rycina 6. Wartości wyrzutowej zmiany powierzchni (SAC) u myszy FVB i Tgαq\*44 w odpowiedzi na stymulację dobutaminą w zakresie dawek niskich ( $\leq 1,5$  mg/kg) oraz w zakresie dawek wysokich ( $\geq 1,5$  mg/kg). O ile w grupie myszy kontrolnych FVB nie odnotowano żadnych istotnych zmian po stymulacji kolejno wzrastającymi dawkami dobutaminy (A), o tyle w grupie myszy Tgαq\*44 obserwowano wzrost wartości SAC w odpowiedzi na dawkę z zakresu dawek niskich i brak lub nieznaczący statystycznie spadek odpowiedzi na stymulację dawkami z zakresu dawek wysokich (B); Oznaczenia grup: (1) myszy badane stymulacją w zakresie dawek niskich i (2) myszy badane w zakresie dawek wysokich (dokładny opis w Metodycy). \* oznacza  $p < 0,05$  dla wartości po dobutaminie w stosunku do wartości czynności podstawowej, # oznacza  $p < 0,05$  dla grupy Tgαq\*44 względem FVB w odniesieniu do tej samej dawki dobutaminy.



Rycina 7. Zmiany kinetyki wyrzutu lewej komory (ER) u myszy FVB i Tgαq\*44 w odpowiedzi na stymulację dobutaminą w zakresie dawek niskich ( $\leq 1,5$  mg/kg) oraz w zakresie dawek wysokich ( $\geq 1,5$  mg/kg). Stymulacja dobutaminą uwidoczniła brak zmian w ER w grupie myszy kontrolnych FVB (A) oraz znaczący wzrost parametru ER w grupie myszy Tgαq\*44 dla dawek z zakresu dawek niskich, podczas gdy wysokie dawki dobutaminy nie powodowały zmian wartości parametru ER (B). Oznaczenia grup: (1) myszy badane stymulacją w zakresie dawek niskich i (2) myszy badane w zakresie dawek wysokich (dokładny opis w Metodyce). \* oznacza  $p < 0,05$  dla wartości po dobutaminie w stosunku do wartości czynności podstawowej, # oznacza  $p < 0,05$  dla grupy Tgαq\*44 względem FVB w odniesieniu do tej samej dawki dobutaminy.





Rycina 8. Zmiany kinetyki napełniania lewej komory (FR) u myszy FVB i Tgαq\*44 w odpowiedzi na stymulację dobutaminą w zakresie dawek niskich ( $\leq 1,5$  mg/kg) oraz w zakresie dawek wysokich ( $\geq 1,5$  mg/kg). Zarówno w grupie kontrolnej myszy FVB, jak i w grupie myszy Tgαq\*44 nie odnotowano znaczących zmian wartości parametru FR po żadnej z podawanych dawek dobutaminy (jedynie nieznaczny wzrost wartości w grupie Tgαq\*44 po stymulacji dawkami z zakresu dawek niskich). Oznaczenia grup: (1) myszy badane stymulacją w zakresie dawek niskich i (2) myszy badane w zakresie dawek wysokich (dokładny opis w Metodyce). # oznacza  $p < 0,05$  dla grupy Tgαq\*44 względem FVB w odniesieniu do tej samej dawki dobutaminy.

Przeprowadzona ocena zmian czynności mięśnia sercowego u myszy FVB i Tgαq\*44 w zależności dawki dobutaminy pozwoliła wykryć istotne różnice odpowiedzi na stymulację dobutaminą. U myszy FVB z prawidłową czynnością serca stymulacja dobutaminą nie wywoływała istotnych zmian badanych parametrów, a jedyne nieznaczne zmiany uwidaczniały się w odpowiedzi na wysokie dawki dobutaminy. U myszy Tgαq\*44 natomiast stymulacja dobutaminą w zakresie dawek niskich wywoływała istotne zmiany wartości większości badanych parametrów. Zmiany te dotyczyły parametrów oceniających kurczliwość zarówno globalnie (FAC, SAC), jak i na poziomie samej zmiany końcowo-skurczowej (ESA) lewej komory. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że spośród dawek dobutaminy w niskim zakresie dawka 0,5 mg/kg dawała najbardziej powtarzalne wyniki tzn. istotną zmianę w wyżej wspomnianych kluczowych parametrów do oceny czynności skurczowej lewej komory, stąd też tą dawkę wybrano jako najbardziej odpowiednią (z zakresu dawek niskich) do protokołu badania kolejnych grup myszy Tgαq\*44 i FVB. Wysoka dawka dobutaminy podawana w grupie Tgαq\*44 spowodowała istotną zmianę jedynie parametru EDA, co przełożyło się także na nieznaczny spadek parametru SAC. Biorąc jednak pod uwagę brak jednoczesnych zmian dla wymienionej dawki w parametrze ESA nie należy interpretować tego wyniku jako uwidocznienie rezerwy, a raczej jako zależne od stymulacji dobutaminą upośledzenie czynności lewej komory, stąd wybór tak wysokiej dawki (20 mg/kg) odrzucono z protokołu do kolejnych badań zmian czynności serca w przebiegu niewydolności, a jako optymalną dawkę wysoką dobutaminy wybrano dawkę 5 mg/kg. Nie powodowała ona bowiem w grupie myszy Tgαq\*44 niebezpiecznego spadku czynności mięśnia serca, a jednocześnie uwidoczniała podobne co dawka 20 mg/kg zmiany w grupie kontrolnej FVB.

Podsumowując, w protokole badania czynności serca w kolejnych stadiach zaawansowania niewydolności serca zastosowano protokół stymulacji dobutaminą bazujący na dwóch dawkach tj.: dawce niskiej: 0,5 mg/kg, oraz dawce wysokiej: 5 mg/kg. Wyniki pomiarów z zastosowaniem opracowanej metodyki i dobranych dawek 0,5 mg/kg i 5 mg/kg przedstawiono w kolejnych rozdziałach niniejszej rozprawy.

#### 4.2. Analiza zmian podstawowej czynności i rezerwy mięśnia sercowego u myszy FVB w różnym wieku

##### Czynność podstawowa lewej komory

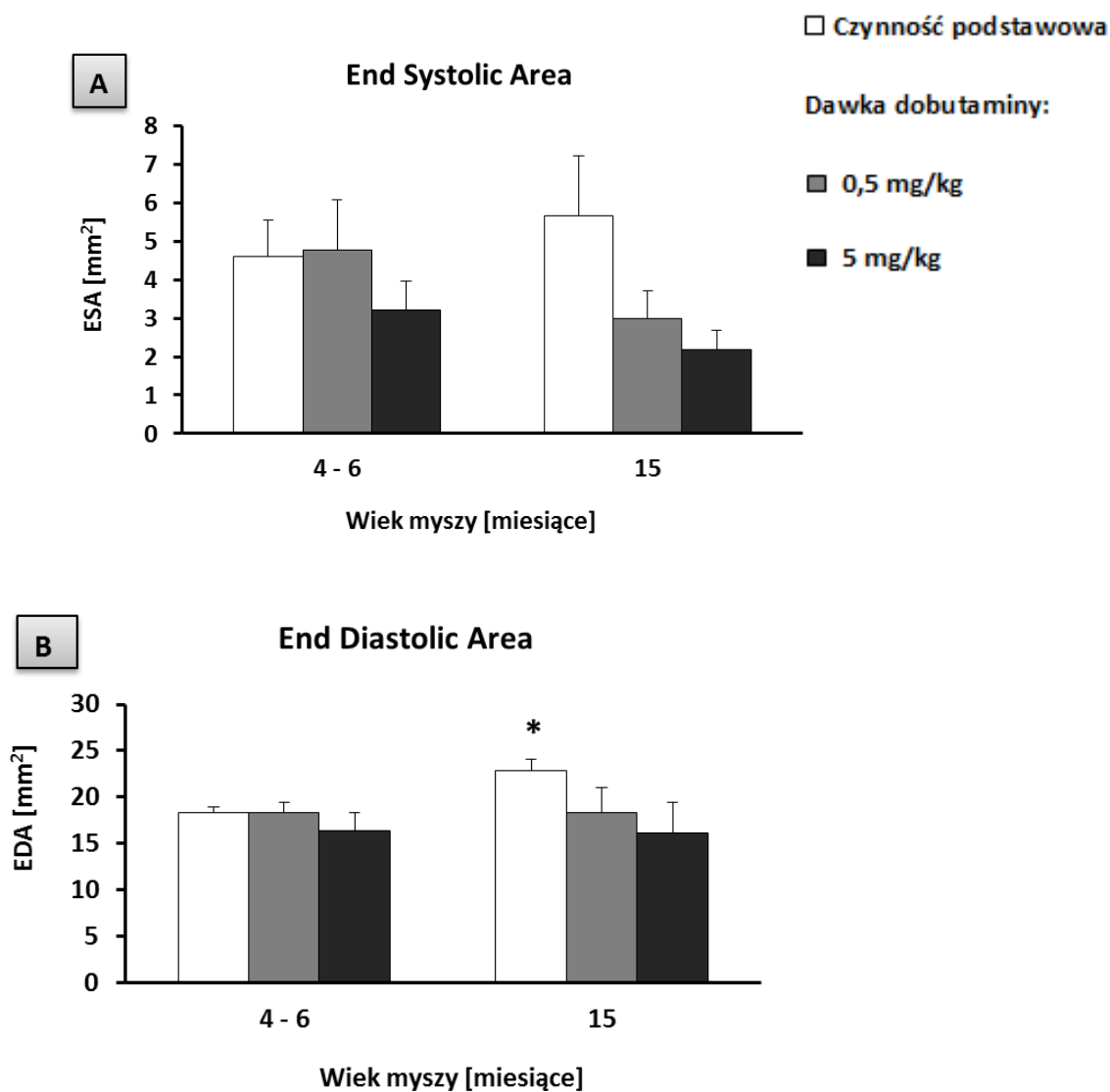
Pomiary wykonane dla myszy kontrolnych FVB w wieku 4 i 15 miesięcy pozwoliły scharakteryzować zmiany czynności serca wynikające z procesów starzenia. Istotne różnice wykazano dla kinetyki napełniania (spadek FR u myszy w wieku 15 miesięcy), podczas gdy w pozostałych parametrach: frakcji wyrzutowej (EF), objętości wyrzutowej (SV), objętości końcowo-skurczowej (ESV), objętości końcowo-rozkurczowej (EDV), rzucie serca (CO), rytmie serca (HR), i kinetyce wyrzutu (ER) nie odnotowano istotnych zmian (Tabela 2).

Wiek	4 miesiące (N=6)	15 miesięcy (N=8)
<b>EF [%]</b>	71,4 ± 8,1	72,8 ± 3,7
<b>SV [μl]</b>	39,7 ± 4,5	42,9 ± 3,6
<b>ESV [μl]</b>	15,9 ± 6,6	16,6 ± 2,6
<b>EDV [μl]</b>	55,7 ± 8,4	59,5 ± 4,8
<b>CO [μl/min]</b>	6300 ± 500	7820 ± 670
<b>HR [bpm]</b>	457 ± 37	455,4 ± 37,3
<b>ER [1/EDV]</b>	0,019 ± 0,004	0,021 ± 0,001
<b>FR [1/EDV]</b>	0,024 ± 0,003	0,018 ± 0,002*

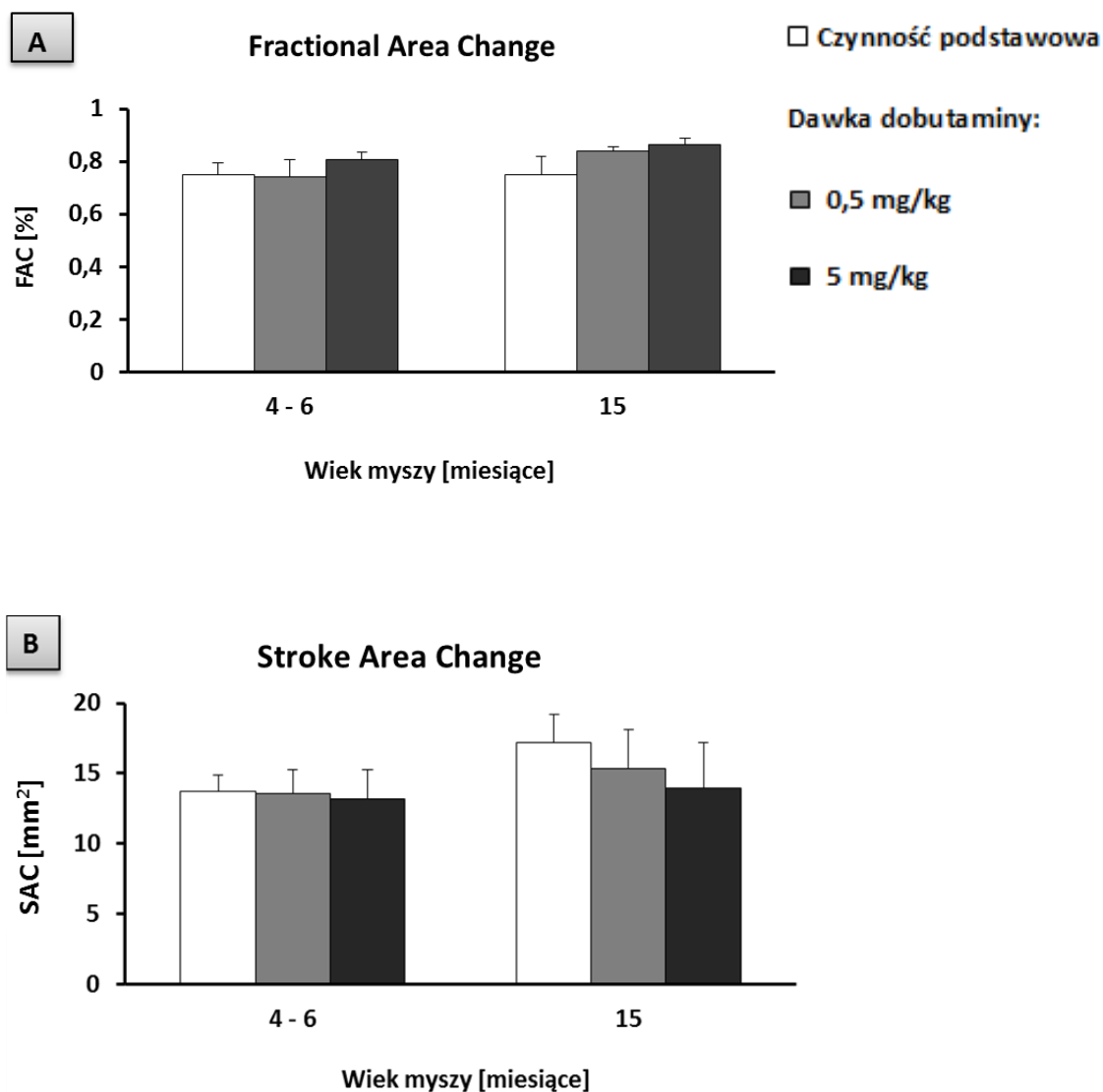
Tabela 2. Wartości parametrów podstawowej czynności lewej komory serca myszy szczepu FVB w wieku 4 i 15 miesięcy; \* oznacza  $p < 0.05$  dla grupy FVB w wieku 15 miesięcy w porównaniu do grupy FVB w wieku 4 miesiące.

Ocena rezerwy czynności lewej komory u myszy FVB

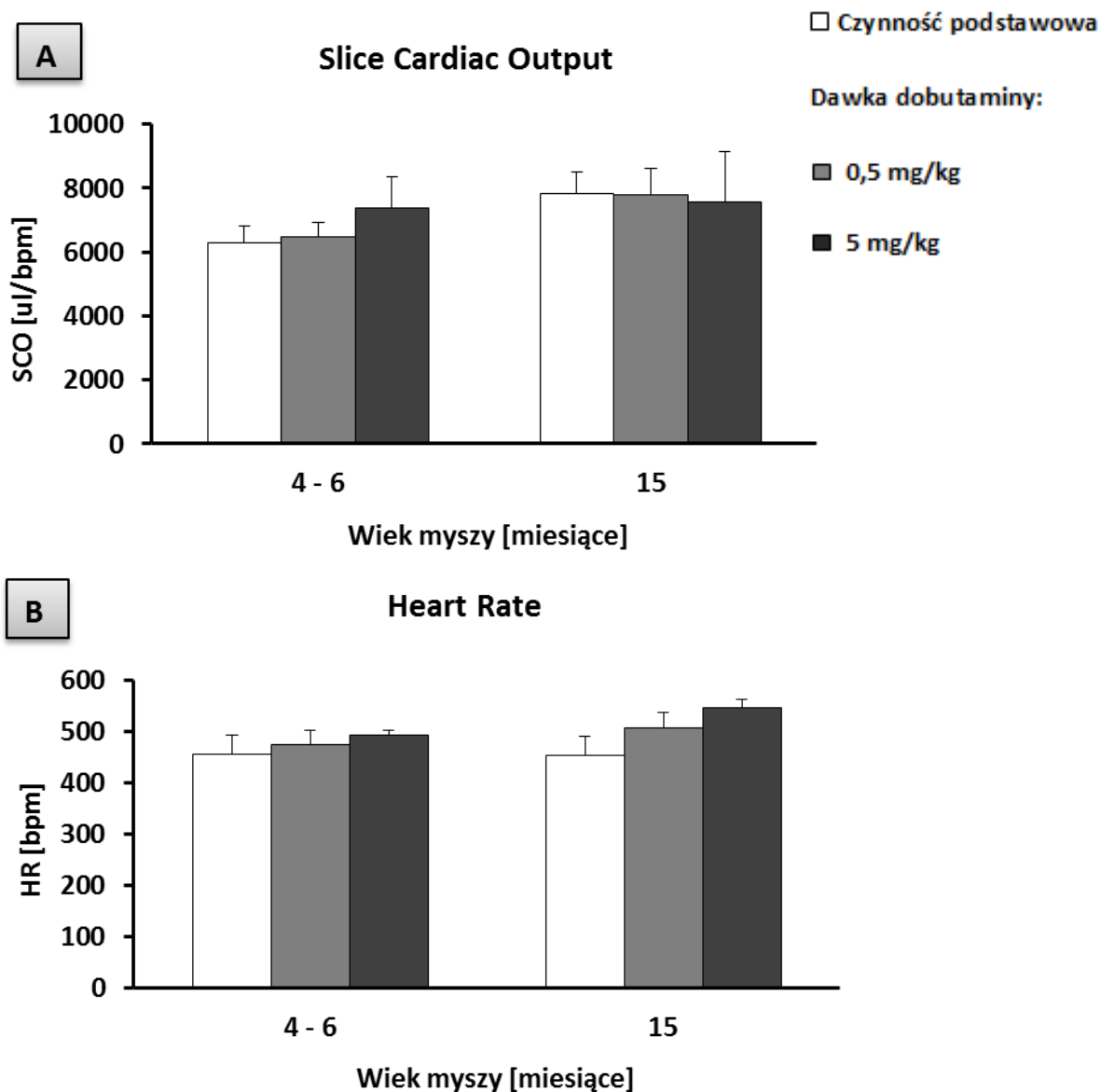
Powierzchnia końcowo-skurczowa (ESA) lewej komory nieznacznie zmniejszała się w grupie myszy młodych (4-6 miesięcy) w odpowiedzi na wysoką dawkę dobutaminy, podczas gdy w grupie myszy 15 miesięcznych spadek był widoczny już w odpowiedzi na niską dawkę dobutaminy (Ryc. 9 A). Jednocześnie, myszy 15 miesięczne miały istotnie zwiększoną powierzchnię końcowo-rozkurczową (EDA) lewej komory (w warunkach podstawowych, Ryc. 9 B). Stymulacja dobutaminą uwidoczniła kolejno zmiany rezerwy czynności w zależności od wieku myszy: narastającą odpowiedź (bez istotnych statystycznie różnic) w powierzchniowej zmianie frakcji wyrzutowej (FAC) dla myszy 15 miesięcznych (Ryc. 10 A) i towarzyszący jej spadek wyrzutowej zmiany objętości w odpowiedzi tak dla niskiej, jak i wysokiej dawki dobutaminy w tej grupie (SAC, Ryc. 10 B), czego nie obserwowano w przypadku myszy młodych (4-6 miesięcznych) ani dla niskiej dawki dobutaminy (FAC, SAC), ani też dla wysokiej dawki dobutaminy (SAC, Ryc. 10 A, B). Badanie rezerwy rzutu serca uwidoczniło natomiast nieznaczną rezerwę (wzrost nieistotny statystycznie) w grupie myszy młodych (4-6 miesięcznych) w odpowiedzi na stymulację wysoką dawką dobutaminy oraz brak wyraźnych zmian w grupie myszy 15 miesięcznych, które jednak już w warunkach podstawowych miały nieznacznie zwiększone wartości w tym parametrze (SCO, Ryc. 11 A). Przyspieszenie akcji serca nie było statystycznie istotne w żadnej z badanych grup myszy FVB po stymulacji dobutaminą zarówno w niskiej, jak i wysokiej dawce, jednak dało się zaobserwować zależny od dawki wzrost wartości, w grupie myszy starszych, 15 miesięcznych (HR, Ryc. 11 B). Nie odnotowano zmian w kinetyce skurczu ani w kinetyce napełniania lewej komory w odpowiedzi na podawane dawki dobutaminy ani w grupie myszy FVB 4-6 miesięcznych, ani w grupie myszy FVB 15 miesięcznych (Ryc. 12 A, B).



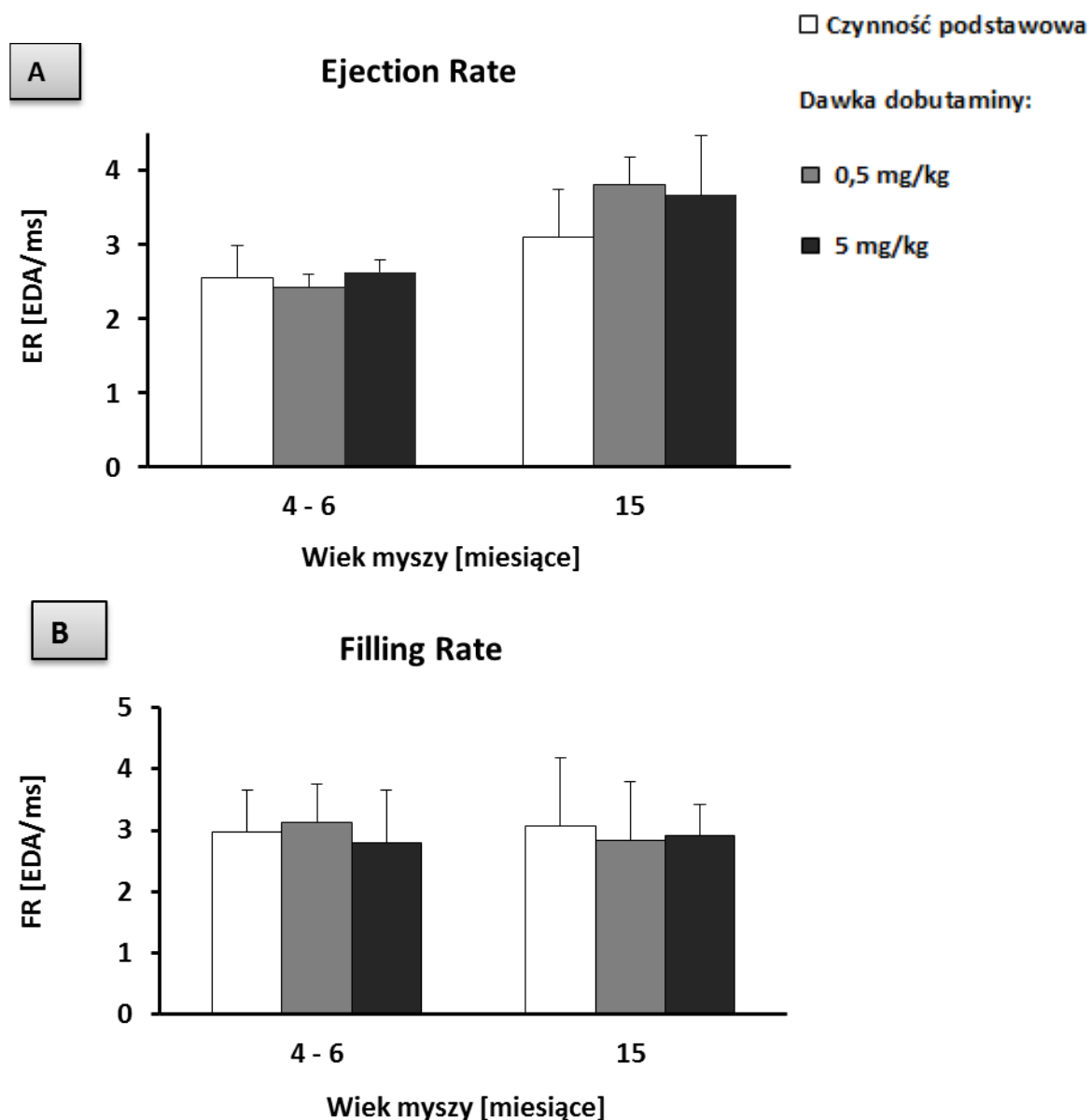
Rycina 9. Wartości powierzchni końcowo-skurczowej (ESA) oraz końcowo-rozkurczowej (EDA) w odpowiedzi na stymulację dobutaminą w dawce niskiej (0,5 mg/kg) i wysokiej (5 mg/kg) w grupach myszy kontrolnych FVB w wieku 4-6 oraz 15 miesięcy. Stymulacja dobutaminą uwiarygodniła nieznaczny choć bardzo wyraźny spadek wartości końcowo skurczowej w grupie myszy FVB 4-6 miesięcznych po podaniu niskiej dawki oraz w grupie myszy FVB 15 miesięcznych po podaniu niskiej oraz wysokiej dawki dobutaminy (A). Myszy 15 miesięczne miały istotnie zwiększoną powierzchnię końcowo-rozkurczową lewej komory w badaniu podstawowym, a stymulacja dobutaminą obniżyła nieznacznie tą wartość do poziomu obserwowanego w grupie myszy młodych (B). \* oznacza  $p < 0,05$  w stosunku do wartości czynności podstawowej w grupie myszy FVB 4-6 miesięcznych.



Rycina 10. Wartości powierzchniowej zmiany frakcji wyrzutowej (FAC) oraz wyrzutowej zmiany powierzchni (SAC) w odpowiedzi na stymulację dobutaminą w dawce niskiej (0,5 mg/kg) i wysokiej (5 mg/kg) w grupach myszy kontrolnych FVB w wieku 4-6 oraz 15 miesięcy. W odpowiedzi na stymulację dobutaminą FAC nieznacznie rosła (A), a SAC nieznacznie malała w grupie myszy 15 miesięcznych (już przy niskiej dawce dobutaminy, B), podczas gdy w grupie myszy młodych 4-6 miesięcznych obserwowano jedynie nieznaczny wzrost parametru FAC po podaniu wysokiej dawki dobutaminy (A) i zupełny brak zmian dla parametru SAC w odpowiedzi na stymulację (B).



Rycina 11. Wartości powierzchniowej zmiany rzutu serca (SCO) i rytmu serca (HR) w odpowiedzi na stymulację dobutaminą w dawce 0,5 mg/kg i 5 mg/kg w grupach myszy kontrolnych FVB w wieku 4-6 oraz 15 miesięcy. Stymulacja dobutaminą uwidoczniła wyraźny wzrost SCO w grupie myszy FVB 4-6 miesięcznych po podaniu wysokiej dawki dobutaminy i brak różnic w grupie myszy FVB 15-miesięcznych po podaniu niskiej oraz wysokiej dawki dobutaminy (A). U myszy 15-miesięcznych rytm serca przyspieszał w bardziej wyraźny sposób, choć bez istotnych zmian w stosunku do myszy FVB 4-6 miesięcznych (B).



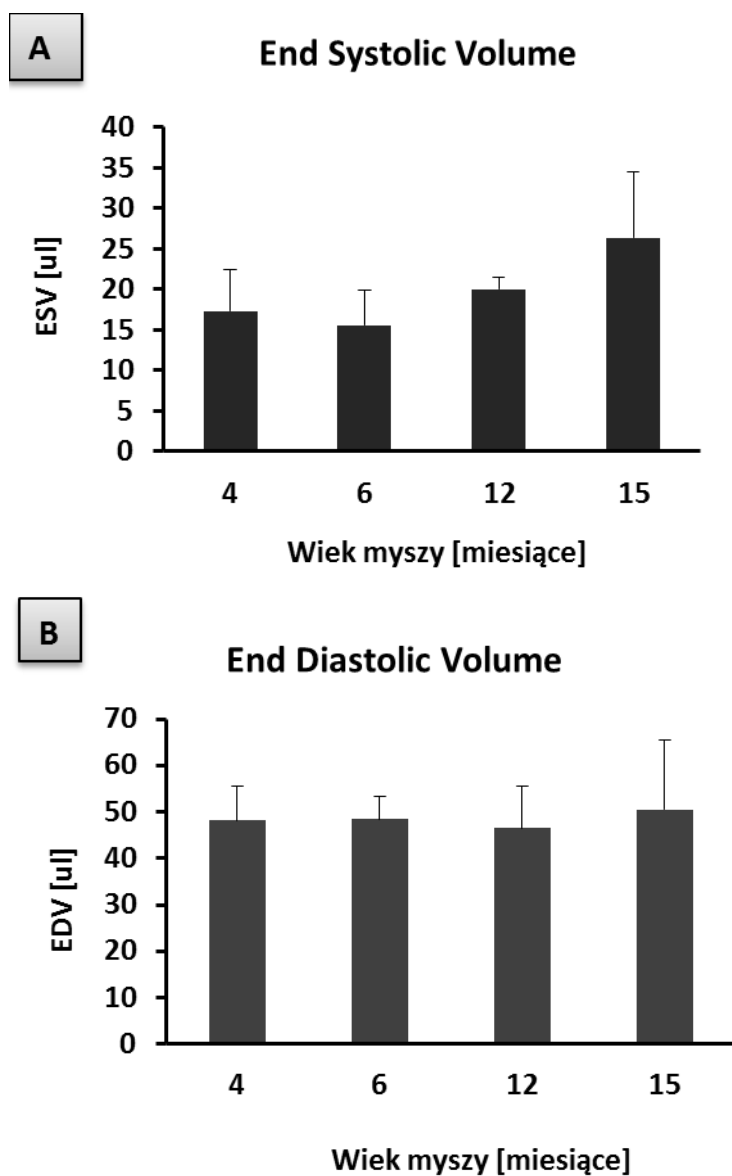
Rycina 12. Wartości kinetyki wyrzutu (ER) i kinetyki napełniania (FR) w odpowiedzi na stymulację dobutaminą w dawce 0,5 mg/kg i 5 mg/kg w grupach myszy kontrolnych FVB w wieku 4-6 oraz 15 miesięcy. Nie obserwowano istotnych statystycznie zmian ER ani dla myszy FVB 4-6 miesięcznych ani dla myszy 15 miesięcznych, choć w grupie myszy starszych podstawowa kinetyka wyrzutu była nieco zwiększona, a stymulacja dobutaminą w niskiej dawce dodatkowo spowodowała nieznaczny wzrost wartości ER (A). Kinetyka napełniania (FR) natomiast nie była różna między badanymi grupami w zakresie czynności podstawowej, nie zmieniała się też w odpowiedzi na stymulację dobutaminą (B).



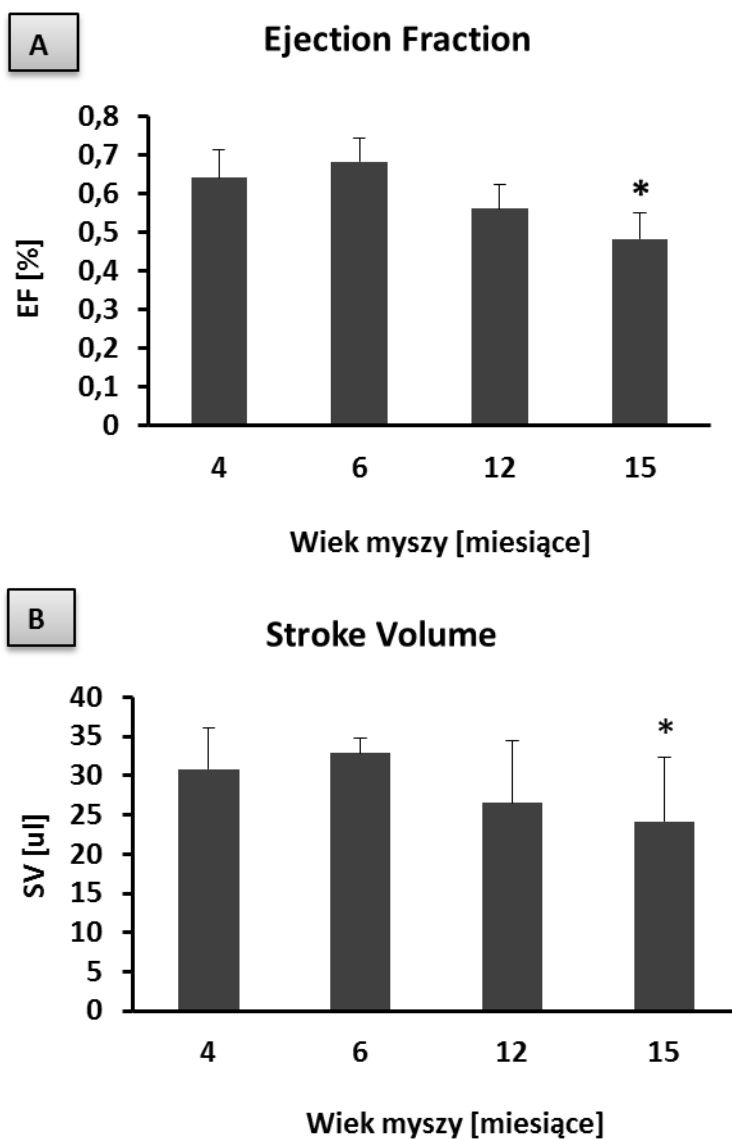
#### **4.3. Analiza zmian podstawowej czynności oraz rezerwy mięśnia sercowego u myszy z kardiomiopatią rozstrzeniową (myszy Tgαq\*44) na różnych etapach rozwoju niewydolności serca**

##### Czynność podstawowa mięśnia sercowego

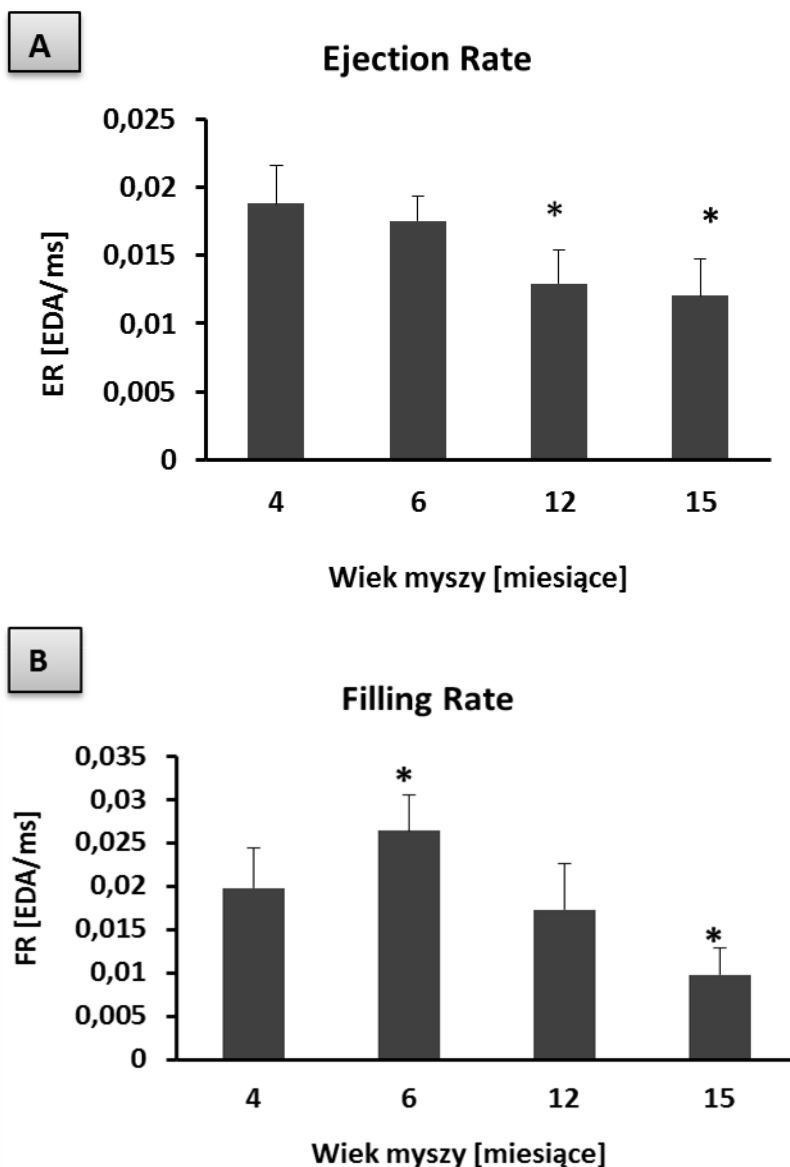
Badanie całej objętości komory pozwoliło na ocenę czynności globalnej, tzn. z uwzględnieniem zmian zależnych od przebudowy lewej komory. Objętość końcowo-skurczowa nieznacznie się zwiększała wraz z wiekiem myszy, choć nie obserwowano żadnych zmian w wartości objętości końcowo-rozkurczowej lewej komory (Ryc. 13 A,B). Spadek frakcji wyrzutowej i objętości wyrzutowej obserwowano u myszy Tgαq\*44 w wieku 15 miesięcy w stosunku do myszy młodszych (4 miesięcznych, Ryc. 14 A, B). Kinetyka wyrzutu krwi była istotnie zmniejszona u myszy Tgαq\*44 już w wieku 12 miesięcy i pozostawała zmniejszona także u myszy 15 miesięcznych w porównaniu do myszy 4 miesięcznych (Ryc. 15 A). Kinetyka napełniania lewej komory była natomiast istotnie zwiększona u myszy Tgαq\*44 w wieku 6 miesięcy, w wieku 12 miesięcy nie obserwowano już wzrostu wartości dla tego parametru, a w wieku 15 miesięcy obserwowano znaczny spadek kinetyki napełniania w stosunku do pozostałych grup myszy Tgαq\*44 (Ryc. 15 B).



Rycina 13. Wartości objętości końcowo-skurczowej (ESV) i końcowo-rozkurczowej (EDV) lewej komory serca w poszczególnych grupach wiekowych myszy Tgαq\*44 (4, 6, 12 i 15 miesięcznych). Widoczny brak zmian zarówno objętości ESV, jak i EDV w badaniu czynności podstawowej w każdej z grup.



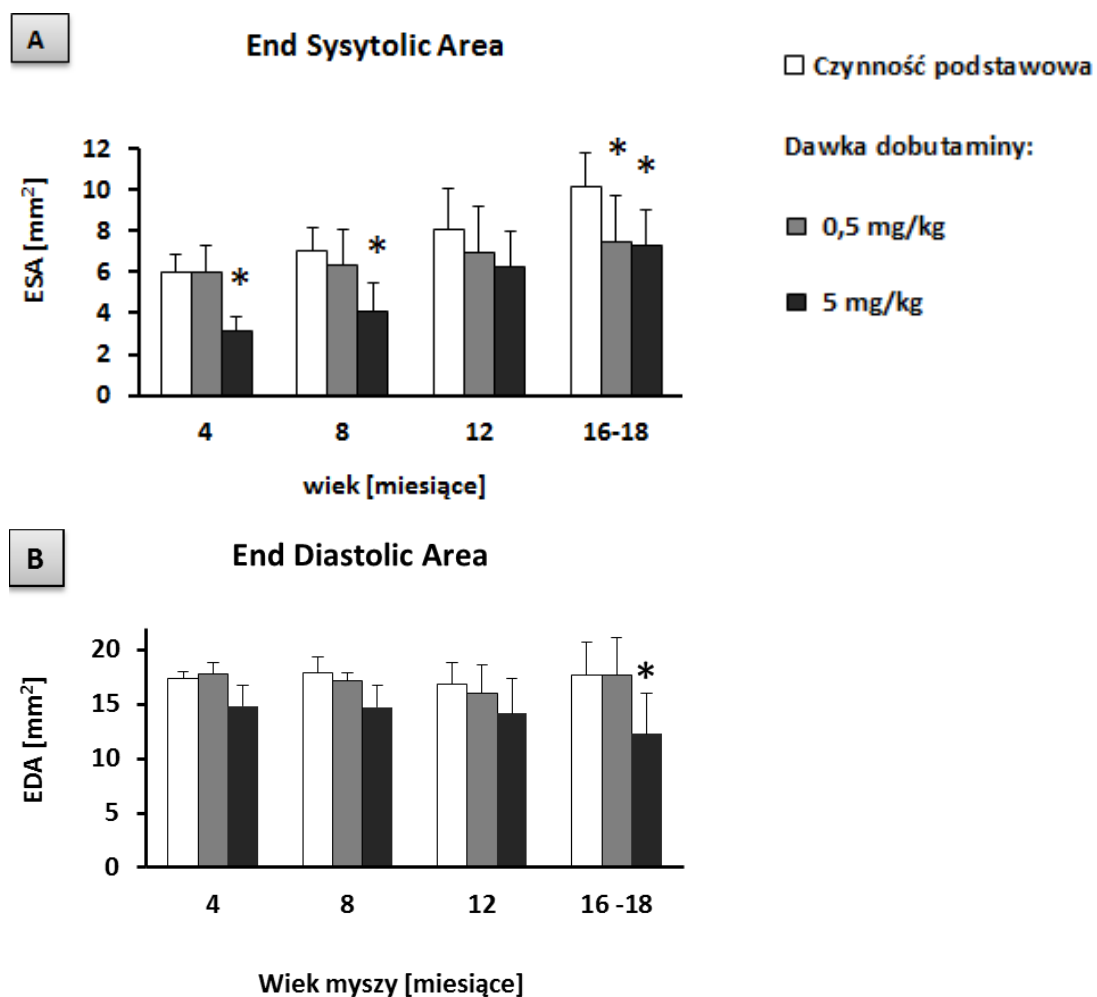
Rycina 14. Wartości frakcji wyrzutowej (EF) i objętości wyrzutowej (SV) lewej komory serca w poszczególnych grupach wiekowych myszy Tgαq\*44 (4, 6, 12 i 15 miesięcznych). Frakcja wyrzutowa utrzymywała się na podobnym poziomie w grupie myszy Tgαq\*44 w wieku 4, 6 i 12 miesięcy, jednak malała w grupie Tgαq\*44 w wieku 15 miesięcy (A). Podobnie, objętość wyrzutowa utrzymywała się na podobnym poziomie w grupach 4, 6 i 12, a w kolejnej grupie wiekowej 15 miesięcznej istotnie malała (B). \* oznacza  $p < 0,05$  w porównaniu do wartości parametru u myszy Tgαq\*44 w wieku 4 miesięcy.



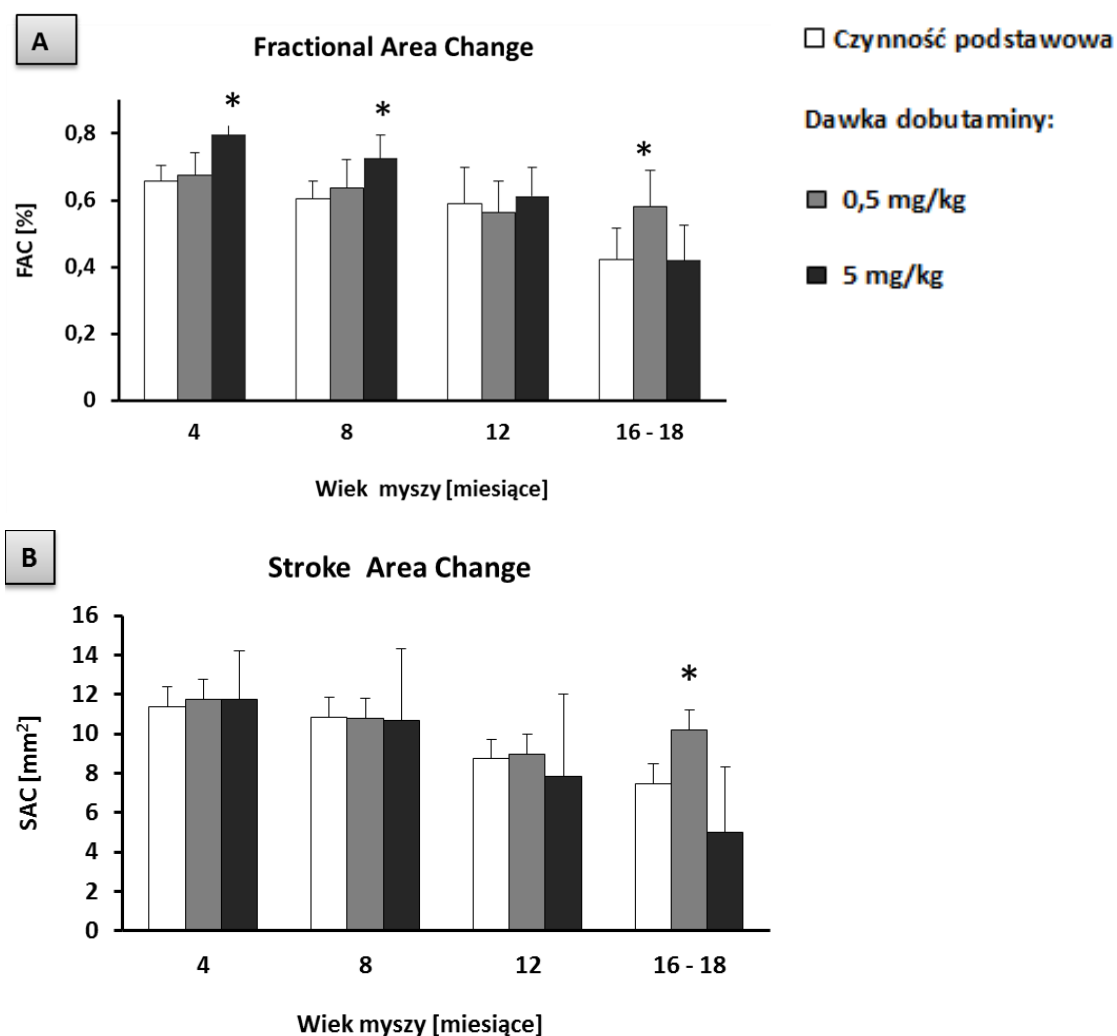
Rycina 15. Zmiany kinetyki wyrzutu (ER) i kinetyki napełniania (FR) lewej komory u myszy  $Tg\alpha q^{*44}$  w zależności od wieku. Istotny spadek ER obserwowano w grupie myszy w wieku 12 w stosunku do grupy myszy 4 miesięcznych oraz w grupie myszy 15 miesięcy w porównaniu do grupy 4 i 6 miesięcznej (A). FR wzrosła u myszy  $Tg\alpha q^{*44}$  w wieku 6 miesięcy, a następnie zmalała w wieku 12 miesięcy do poziomu obserwowanego u myszy 4 miesięcznych. W kolejnym etapie, u myszy  $Tg\alpha q^{*44}$  w wieku 15 miesięcy obserwowano dalszy spadek FR (B). \* oznacza  $p < 0,05$  w porównaniu do wartości parametru u myszy  $Tg\alpha q^{*44}$  w wieku 4 miesięcy.

Ocena rezerwy czynności mięśnia sercowego u myszy Tgaq\*44 w teście z dobutaminą

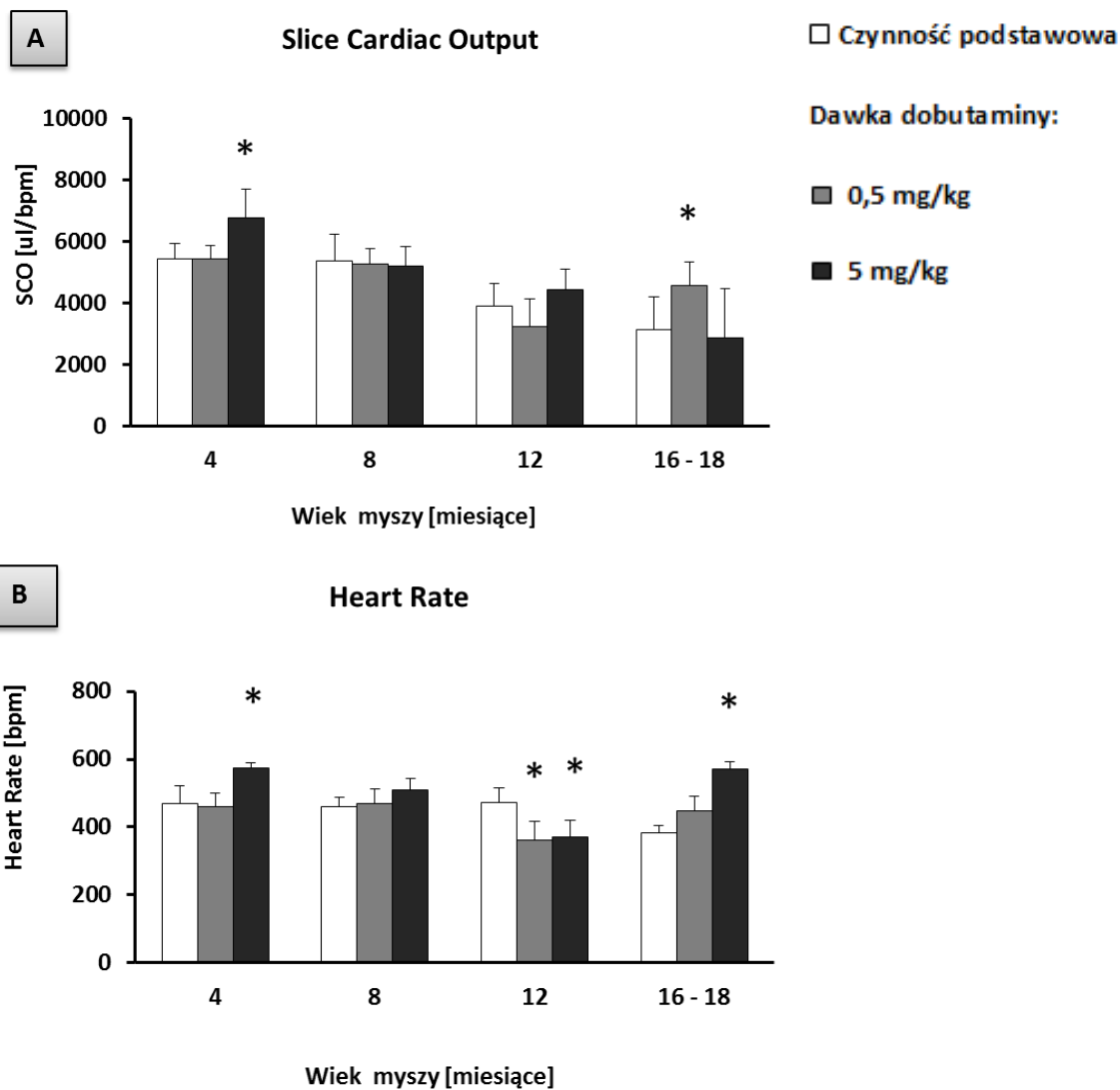
Podanie niskiej i wysokiej dawki dobutaminy zgodnie z opracowanym protokołem badania rezerwy pozwoliło lepiej uwidocznić stan czynnościowy mięśnia sercowego, niż badania czynności podstawowej. Stwierdzono: zachowaną rezerwę kurczliwości (spadek ESA) w odpowiedzi na wysoką dawkę dobutaminy w każdej z badanych grup myszy (tj. myszy Tgaq\*44 w wieku 4, 8, 12 oraz 16-18 miesięcznych, Ryc. 16 A). Powierzchnia końcowo-rozkurczowa była istotnie zmniejszona jedynie w grupie myszy Tgaq\*44 w wieku 16-18 miesięcy po stymulacji dobutaminą w wysokiej dawce (Ryc. 16 B). Podanie dobutaminy w wysokiej dawce wywołało także wzrost wartości powierzchniowej zmiany frakcji wyrzutowej u myszy Tgaq\*44 w wieku 4 i 8 miesięcy, podczas gdy podanie dobutaminy w niskiej dawce uwidocznilo wzrost wartości parametru FAC jedynie w grupie wiekowej 16-18 miesięcznej (Ryc. 17 A). Wartości wyrzutowej zmiany powierzchni zwiększały się jedynie w odpowiedzi na stymulację niską dawką dobutaminy, w grupie wiekowej 16-18 miesięcznej, w pozostałych grupach myszy Tgaq\*44 nie obserwowano zmian SAC (Ryc. 17 B). Wartości powierzchniowej zmiany rzutu serca zwiększały się w odpowiedzi na wysoką dawkę dobutaminy w grupie myszy Tgaq\*44 w wieku 4 miesiące, nie zmieniły się bez względu na podaną dawkę w grupach wiekowych: 8 i 12 miesięcznych, a zwiększały się w odpowiedzi na niską dawkę dobutaminy w grupie 16-18 miesięcznych myszy (Ryc. 18 A). Stymulacja dobutaminą uwidocznila przyspieszenie akcji serca u myszy 4 i 16-18 miesięcznych (w odpowiedzi na wysoką dawkę) oraz zwolnienie akcji serca u myszy 12 miesięcznych (w odpowiedzi na niską i wysoką dawkę dobutaminy, Ryc. 18 B). Kinetyka wyrzutu oraz napełniania lewej komory istotnie wzrosła w odpowiedzi na niską dawkę dobutaminy w grupie myszy Tgaq\*44 w wieku 16-18 miesięcy, podczas gdy w pozostałych grupach myszy Tgaq\*44 nie uwidoczniono zmian kinetyki (ani wyrzutu ani napełniania) po stymulacji dobutaminą (jedynie subtelny wzrost wartości parametru ER w pozostałych badanych grupach myszy Tgaq\*44, Ryc. 19 A i B).



Rycina 16. Wartości powierzchni końcowo-skurczowej (ESA) i końcowo-rozkurczowej (EDA) po stymulacji dobutaminą w dawce niskiej (0,5 mg/kg) oraz w dawce wysokiej (5 mg/kg), w badaniu myszy Tgaq\*44 w wieku 4, 8, 12 oraz 16-18 miesięcznych. Niska dawka dobutaminy uwiarydociła brak zmian ESA i EDA u myszy 4 miesięcznych, niewielkie spadki obu parametrów u myszy 8 i 12 miesięcznych oraz znaczny spadek ESA i brak zmian EDA w grupie 16-18 miesięcznej. Wysoka dawka dobutaminy wywołała znaczny spadek ESA u myszy 4, 8 i 16-18 miesięcznych oraz mniejszy u myszy 12-miesięcznych. Parametr EDA spadł u myszy 4, 8 i 12-miesięcznych nieznacznie, a u myszy 16-18 miesięcznych w sposób istotny. \* oznacza  $p < 0,05$  w stosunku do wartości otrzymanych w badaniu podstawowym (przed stymulacją).

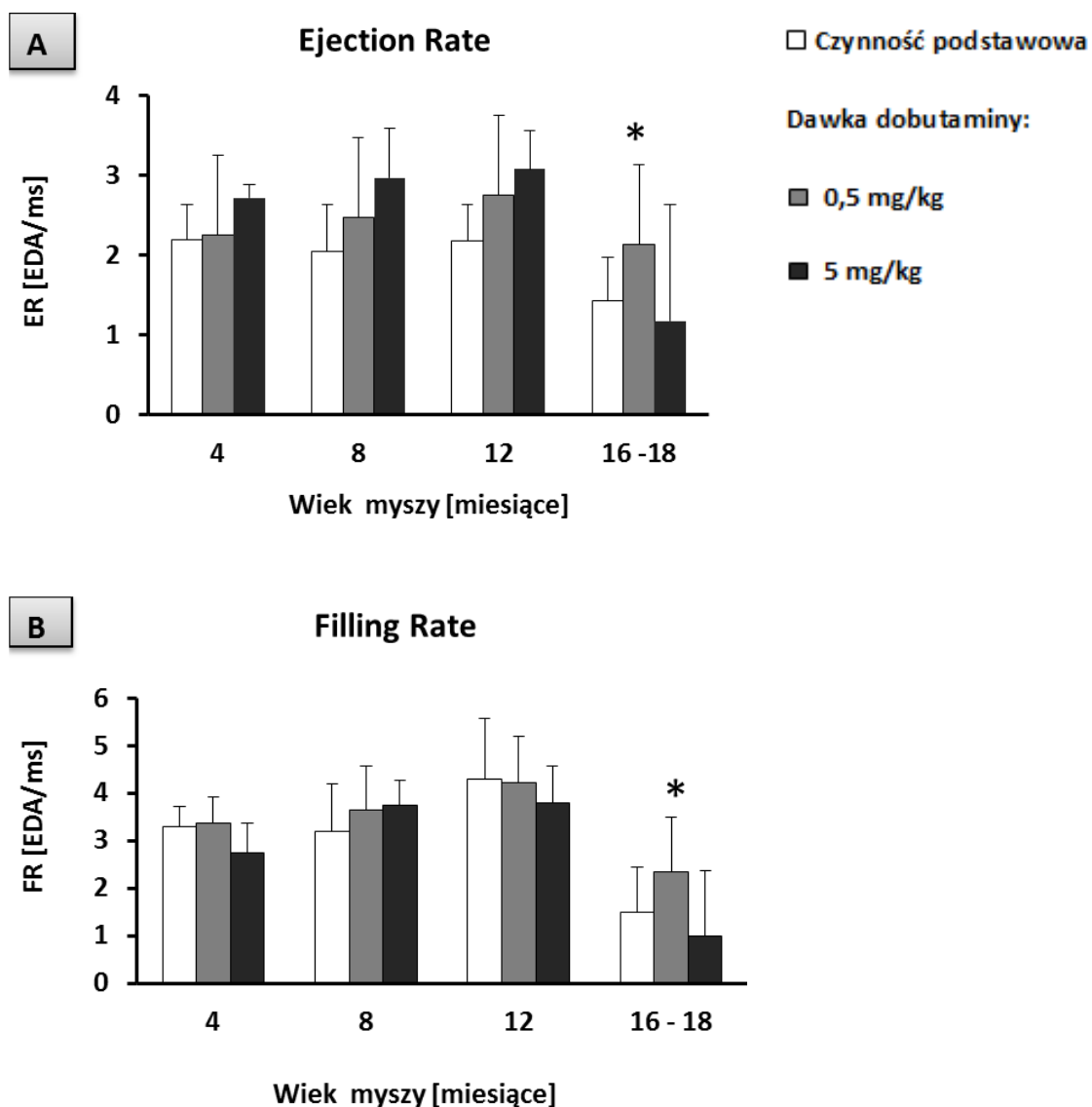


Rycina 17. Wartości powierzchniowej zmiany frakcji wyrzutowej (FAC) oraz wyrzutowej zmiany powierzchni (SAC) po stymulacji dobutaminą dla dawki niskiej (0,5 mg/kg) oraz wysokiej (5 mg/kg) dawki u myszy *Tgaq\*44* w wieku 4, 8, 12 miesięcy oraz 16-18 miesięcznych. Zmiana wartości FAC uwidoczniła została po stymulacji dobutaminą w wysokiej dawce w grupie myszy *Tgaq\*44* w wieku 4 i 8 miesięcy oraz po stymulacji dobutaminą w niskiej dawce dla grupy myszy w zaawansowanym stadium niewydolności serca, w wieku 16-18 miesięcy (A). Wartości SAC nie zmieniały się w żadnej grupie po stymulacji dobutaminą niezależnie od podawanej dawki do 12 – go miesiąca życia włącznie, natomiast wzrost uwidaczniał się w wieku 16-18 miesięcy po stymulacji niską dawką dobutaminy (B). \* oznacza  $p < 0,05$  w stosunku do wartości otrzymanych w badaniu podstawowym (przed stymulacją).



Rycina 18. Wartości powierzchniowej zmiany rzutu serca (SCO) oraz rytmu serca (HR) po stymulacji dobutaminą w niskiej (0,5 mg/kg) oraz wysokiej (5 mg/kg) dawce, badane u myszy  $Tg\alpha q^{*44}$  w wieku 4, 8, 12 oraz 16-18 miesięcznych. Rezerwa SCO uwidoczniła się po stymulacji dobutaminą jedynie w grupie myszy  $Tg\alpha q^{*44}$  w wieku 4 miesiące (po podaniu wysokiej dawki) oraz w grupie myszy  $Tg\alpha q^{*44}$  w wieku 16-18 miesięcy (po podaniu niskiej dawki). W grupach wiekowych: 8 i 12 miesięcznych parametr SCO nie zmienił się po podaniu dobutaminy (A). Rytm serca znacznie przyspieszył w grupie myszy 4 miesięcznych po podaniu wysokiej dawki dobutaminy, nie zmienił się w grupie myszy 8 miesięcznych ani po niskiej ani wysokiej dawce dobutaminy, znacznie zwolnił po niskiej i wysokiej dawce w grupie myszy  $Tg\alpha q^{*44}$  w wieku 12 miesięcy oraz istotnie przyspieszył w grupie wiekowej myszy  $Tg\alpha q^{*44}$  16-18 miesięcy (B). \* oznacza  $p < 0,05$  w stosunku do wartości otrzymanych w badaniu podstawowym.





Rycina 19. Wartości kinetyki wyrzutu (ER) oraz kinetyki napelniania (FR) po stymulacji dobutaminą w niskiej (0,5 mg/kg) oraz wysokiej (5 mg/kg) dawce, badane w grupach myszy Tgαq\*44 w wieku 4, 8, 12 oraz 16-18 miesięcznych. Oba parametry: ER oraz FR wzrosły w odpowiedzi na stymulację jedynie w grupie myszy 16-18 miesięcznych. W pozostałych grupach nie obserwowano zmian w odpowiedzi na stymulację ani w niskiej ani wysokiej dawce dobutaminy. Oznaczenia grup: (1) myszy badane stymulacją w zakresie dawek niskich i (2) myszy badane w zakresie dawek wysokich (dokładny opis w Metodyce). \* oznacza  $p < 0,05$  dla wartości po dobutaminie w porównaniu do wartości czynności podstawowej w tej samej grupie myszy.

#### **4.4. Porównanie czynności podstawowej i rezerwy mięśnia sercowego u myszy FVB oraz Tgαq\*44 na wczesnym oraz późnym etapie rozwoju niewydolności serca (w wieku 4 oraz 15 miesięcy) – podsumowanie**

Ocena czynności lewej komory uwidoczniła znacząco mniejsze wartości dla frakcji wyrzutowej i objętości wyrzutowej w grupie myszy Tgαq\*44 zarówno na wczesnym, jak i na późnym etapie niewydolności krążenia w stosunku do myszy FVB. Objętość końcowo-rozkurczowa zmniejszona była u myszy Tgαq\*44 jedynie na wczesnym etapie patologii, podczas gdy na późnym etapie obserwowano znaczny wzrost objętości końcowo-skurczowej, z jednoczesnym spadkiem kinetyki skurczowo-rozkurczowej lewej komory (Tabela 3). Porównanie wartości otrzymanych z pomiaru pojedynczej warstwy środkowej (na której następnie wykonywano test ze stymulacją dobutaminą) pomiędzy grupą FVB i Tgαq\*44 nie wykazało jednak żadnych różnic pomiędzy grupami na wczesnym etapie rozwoju. W analogicznym porównaniu wyników dla starszych myszy Tgαq\*44 i FVB (w wieku 15 miesięcy) obserwowano istotny spadek zmiany powierzchniowej frakcji wyrzutowej, wyrzutowej zmiany powierzchni oraz końcowo-rozkurczowej powierzchni lewej komory, a także spadek kinetyki skurczowo-rozkurczowej, bez zmiany w parametrze końcowo-skurczowej powierzchni lewej komory u myszy Tgαq\*44 w stosunku do myszy kontrolnych FVB w tym samym wieku (Tabela 4).

Parametr	4 miesiące		15 miesięcy	
	FVB	Tgαq*44	FVB	Tgαq*44
ESV [μl]	16,0 ± 2,7	17,3 ± 5,1	16,6 ± 6,7	26,36 ± 0,84*
EDV [μl]	55,7 ± 4,8	48,1 ± 7,4*	59,5 ± 8,4	50 ± 15
EF [%]	71 ± 4	64 ± 7*	72 ± 8	48 ± 6*
SV [μl]	39,8 ± 3,7	30,8 ± 5,2*	42,9 ± 4,5	24,2 ± 8,1*
ER [EDV/ms]	0,02 ± 0,02	0,019 ± 0,003	0,021 ± 0,004	0,012 ± 0,003*
FR [EDV/ms]	0,024 ± 0,002	0,020 ± 0,005	0,018 ± 0,003	0,010 ± 0,003*

Tabela 3. Porównanie wartości parametrów dotyczących objętości lewej komory serca dla szczepu FVB oraz Tgαq\*44 w wieku 4 oraz 15 miesięcy. \* oznacza p<0,05 dla grupy Tgαq\*44 w stosunku do wartości otrzymanych w grupie kontrolnej w podobnym wieku.

Parametr	4 miesiące		15 miesięcy	
	FVB	Tgαq*44	FVB	Tgαq*44
ESA [mm]	3,45 ± 0,74	4,1 ± 1,1	3,9 ± 1,6	4,5 ± 1,3
EDA [mm]	12,7 ± 1,5	12,7 ± 1,4	15,5 ± 1,2	9,9 ± 2,0
FAC [%]	72 ± 5	68 ± 7	75 ± 8	55 ± 7*
SAC [mm]	9,3 ± 3,3	8,6 ± 1,1	11,5 ± 1,0	5,4 ± 1,1*
ER [EDA/ms]	0,020 ± 0,005	0,021 ± 0,007	0,023 ± 0,005	0,013 ± 0,004*
FR [EDA/ms]	0,024 ± 0,007	0,022 ± 0,011	0,024 ± 0,004	0,013 ± 0,007*

Tabela 4. Porównanie parametrów czynności lewej komory bazujących na pomiarze pojedynczej warstwy dla szczepu FVB oraz Tgαq\*44 w wieku 4 oraz 15 miesięcy. \* oznacza p<0,05 dla myszy Tgαq\*44 w porównaniu do grupy FVB w podobnym wieku.

#### 4.5. Analiza zmian podstawowej czynności lewej komory oraz rezerwy czynności mięśnia sercowego u myszy z miażdżycą tętnic wieńcowych (myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup>)

##### Podstawowa czynność lewej komory serca

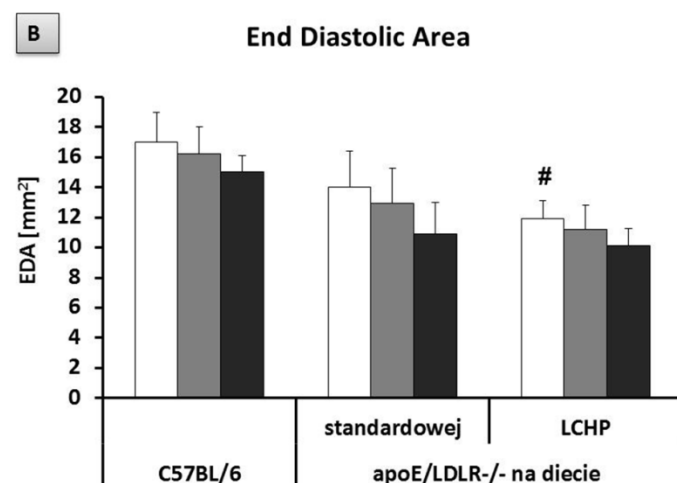
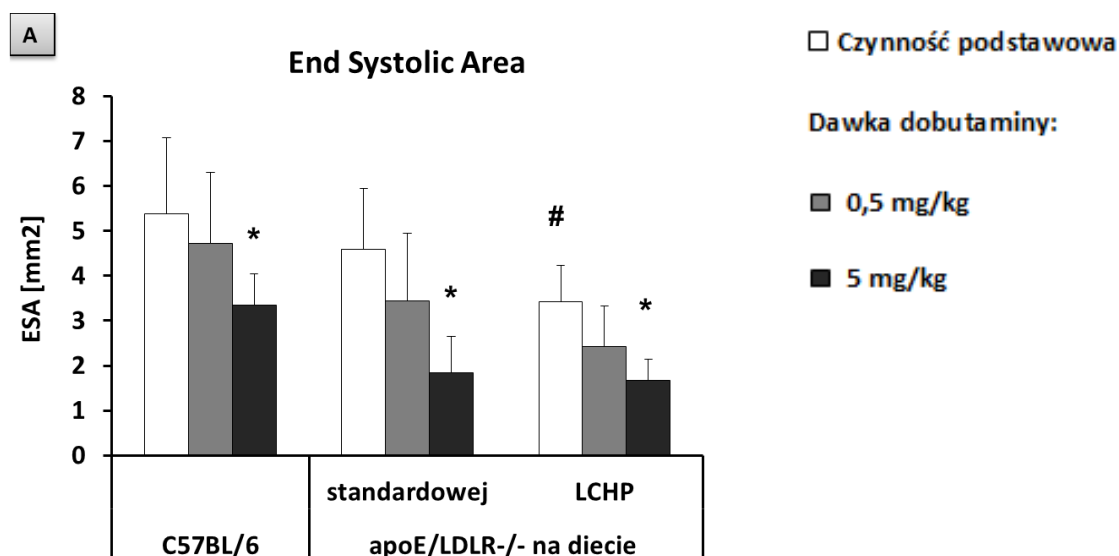
Wyniki badań podstawowej czynności lewej komory u myszy z rozwiniętą miażdżycą (myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup> w wieku 6 miesięcy) przedstawia Tabela 3. Istotne różnice dla obu grup myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup> (karmionych dietą standardową – apoE/LDLR<sup>-/-</sup>S i aterogenną – apoE/LDLR<sup>-/-</sup>LCHP) w stosunku do grupy kontrolnej C57BL/6 dotyczyły przyspieszonej akcji serca (HR), spadku objętości wyrzutowej (SV) i końcowo-rozkurczowej objętości (EDV) lewej komory. Nie odnotowano istotnych różnic w parametrach czynności mięśnia sercowego pomiędzy grupami myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup>S i apoE/LDLR<sup>-/-</sup>LCHP, jednak myszy na diecie LCHP w stosunku do grupy kontrolnej C57BL/6 miały istotnie zmniejszoną objętość końcowo-skurczową (ESV), czego nie obserwowano w grupie myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup> na diecie standardowej. Nie wykazano natomiast istotnych różnic dotyczących frakcji wyrzutowej (EF) pomiędzy żadną z badanych grup. Podobnie do wyniku dla EF, nie obserwowano zmian dla rzutu serca (CO) ani w grupie apoE/LDLR<sup>-/-</sup>S, ani w grupie myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup>LCHP w stosunku do grupy kontrolnej.

Parametr	C57BL/6	apoE/LDLR <sup>-/-</sup> S	apoE/LDLR <sup>-/-</sup> LCHP
EF [%]	69,7 ± 6,0	58,9 ± 2,2	65,3 ± 2,0
SV [μl]	51,9 ± 3,8	36,2 ± 2,2*	31,5 ± 4,7 *
ESV [μl]	29,5 ± 3,7	25,3 ± 2,1	16,5 ± 1,5 *
EDV [μl]	81,4 ± 2,8	61,5 ± 3,2*	47,9 ± 5,9 *
CO [μl/min]	24,5 ± 2,6	20,0 ± 1,3	17,6 ± 1,9
HR [bpm]	469 ± 61	551 ± 21*	570 ± 40 *

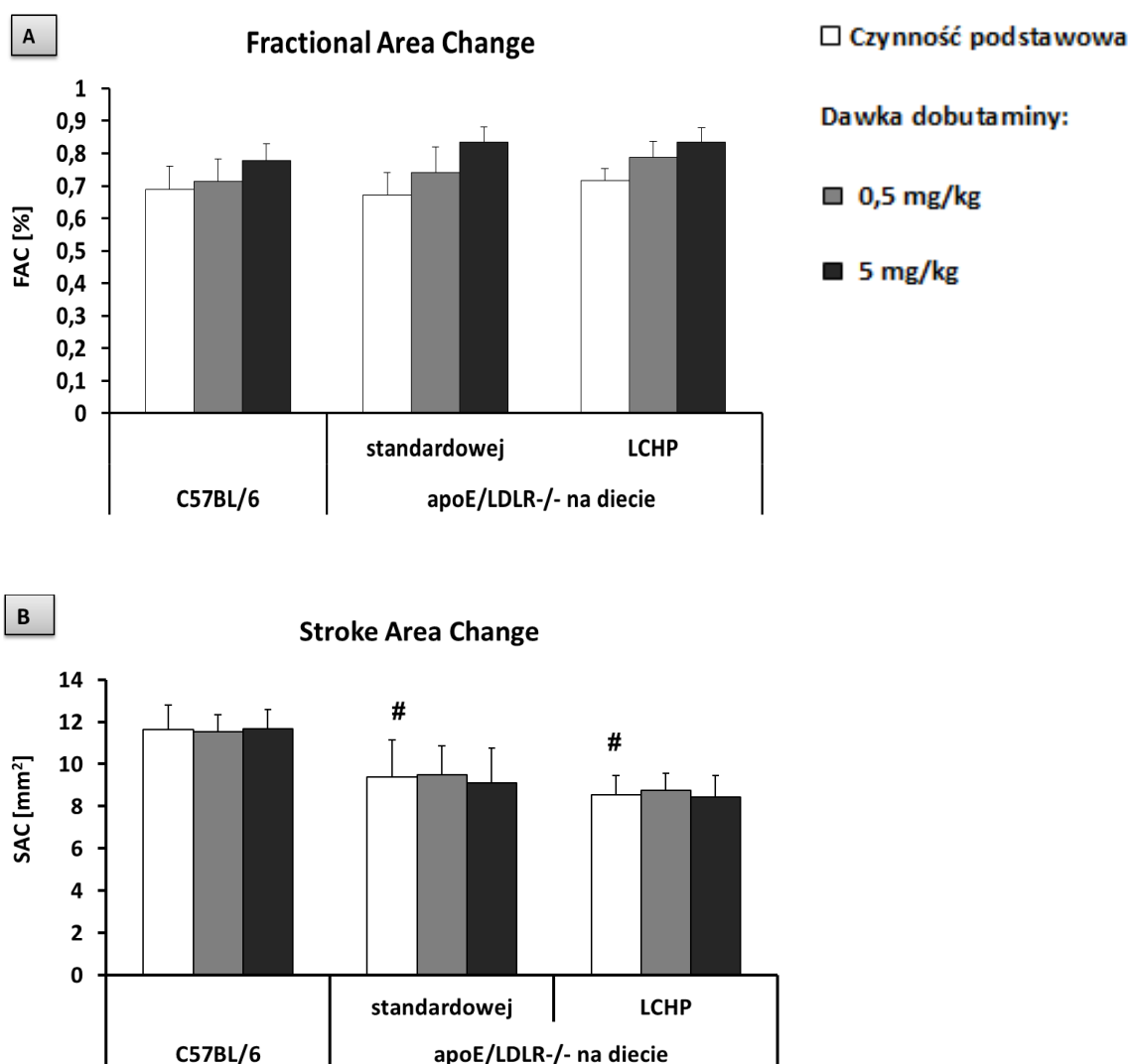
Tabela 5. Czynność lewej komory u myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup>S oraz apoE/LDLR<sup>-/-</sup>LCHP w porównaniu z czynnością lewej komory dla myszy C57BL/6. \* oznacza p<0.05 w porównaniu do grupy C57BL/6.

Ocena rezerwy czynności mięśnia sercowego

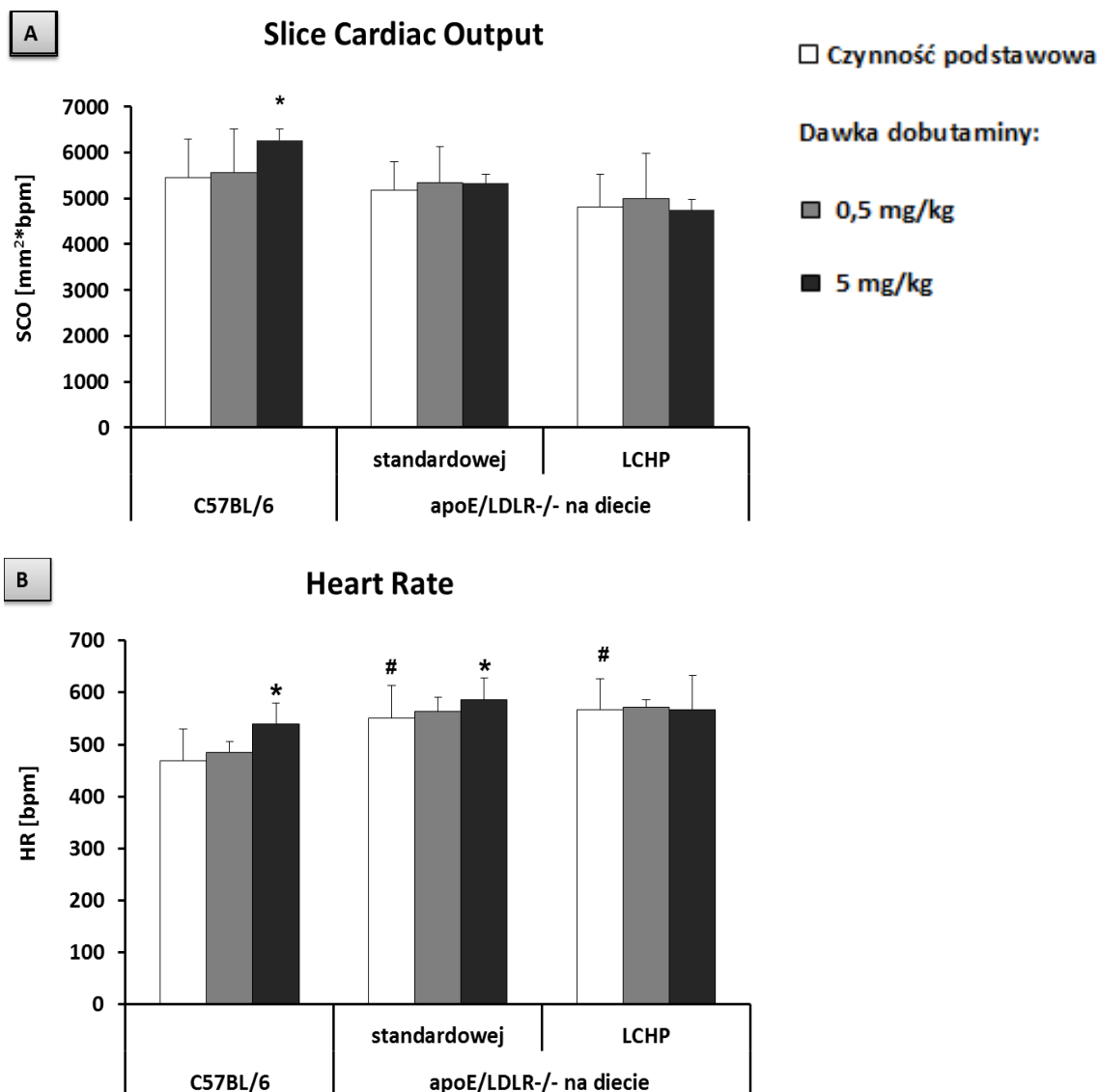
Podanie dobutaminy w niskiej oraz w wysokiej dawce (0,5 i 5 mg/kg, i.p.) wywoływało istotny statystycznie spadek powierzchni końcowo-skurczowej (ESA, Ryc. 20 A), podczas gdy dla powierzchni końcowo-rozkurczowej (EDA, Ryc. 20 B) i powierzchniowej frakcji wyrzutowej (FAC, Ryc. 21 A), pomimo braku istotnych statystycznie różnic, można zauważyć rysujące się trendy zmian. Zmiany te są podobne we wszystkich grupach, a jedyna różnica pomiędzy grupami rysuje się w wartości dla parametru EDA w warunkach podstawowych dla myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup>LCHP. Wyrzutowa zmiana powierzchni (SAC, Ryc. 21 B) jest istotnie mniejsza dla obu grup apoE/LDLR<sup>-/-</sup> w stosunku do grupy kontrolnej, choć w żadnej z grup wartości SAC nie rosną po podaniu dobutaminy. O ile w grupie kontrolnej wysoka dawka dobutaminy uwidoczniała wzrost wartości powierzchniowej zmiany rzutu serca, to zarówno w grupie apoE/LDLR<sup>-/-</sup>S, jak i w grupie apoE/LDLR<sup>-/-</sup>LCHP brak było zmiany niezależnie od podanej dawki dobutaminy (Ryc. 22 A). Stymulacja β-adrenergiczna uwidoczniała rezerwę chronotropową w grupie myszy kontrolnych oraz w grupie myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup>S, podczas gdy w grupie myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup>LCHP rytm serca już w warunkach podstawowych był istotnie zwiększony i po stymulacji β-adrenergicznej nie obserwowano żadnych istotnych dalszych zmian (Ryc. 22 B). Kinetyka wyrzutu istotnie zwiększyła się w odpowiedzi na wysoką dawkę dobutaminy w grupie apoE/LDLR<sup>-/-</sup>S oraz apoE/LDLR<sup>-/-</sup>LCHP, lecz nie uwidoczniono zmian na stymulację dobutaminą w grupie kontrolnej w tym parametrze (Ryc. 23 A). Kinetyka napelniania natomiast wzrosła istotnie statystycznie jedynie w grupie kontrolnej (Ryc. 23 B).



Rycina 20. Wartości powierzchni końcowo-skurczowej (ESA) oraz końcowo-rozkurczowej (EDA) postymulacji dobutaminą w dawce niskiej (0,5 mg/kg) oraz w dawce wysokiej (5 mg/kg) w grupie kontrolnej myszy C57BL/6, oraz w grupie rozwijającej miażdżycę: myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup>S oraz apoE/LDLR<sup>-/-</sup>LCHP. W każdej z badanych grup obserwowano istotny spadek ESA i nieznaczny spadek EDA w odpowiedzi na stymulację dobutaminą. Grupa myszy na diecie LCHP (apoE/LDLR<sup>-/-</sup>LCHP) miała dodatkowo istotnie mniejsze EDA i ESA już w warunkach podstawowych. Oznaczenia grup: (1) myszy badane stymulacją w zakresie dawek niskich i (2) myszy badane w zakresie dawek wysokich (dokładny opis w Metodocyce). \* oznacza p<0,05 w stosunku do wartości dla czynności w warunkach podstawowych; # oznacza p<0,05 dla wartości w stosunku do wartości w warunkach podstawowych w grupie kontrolnej.

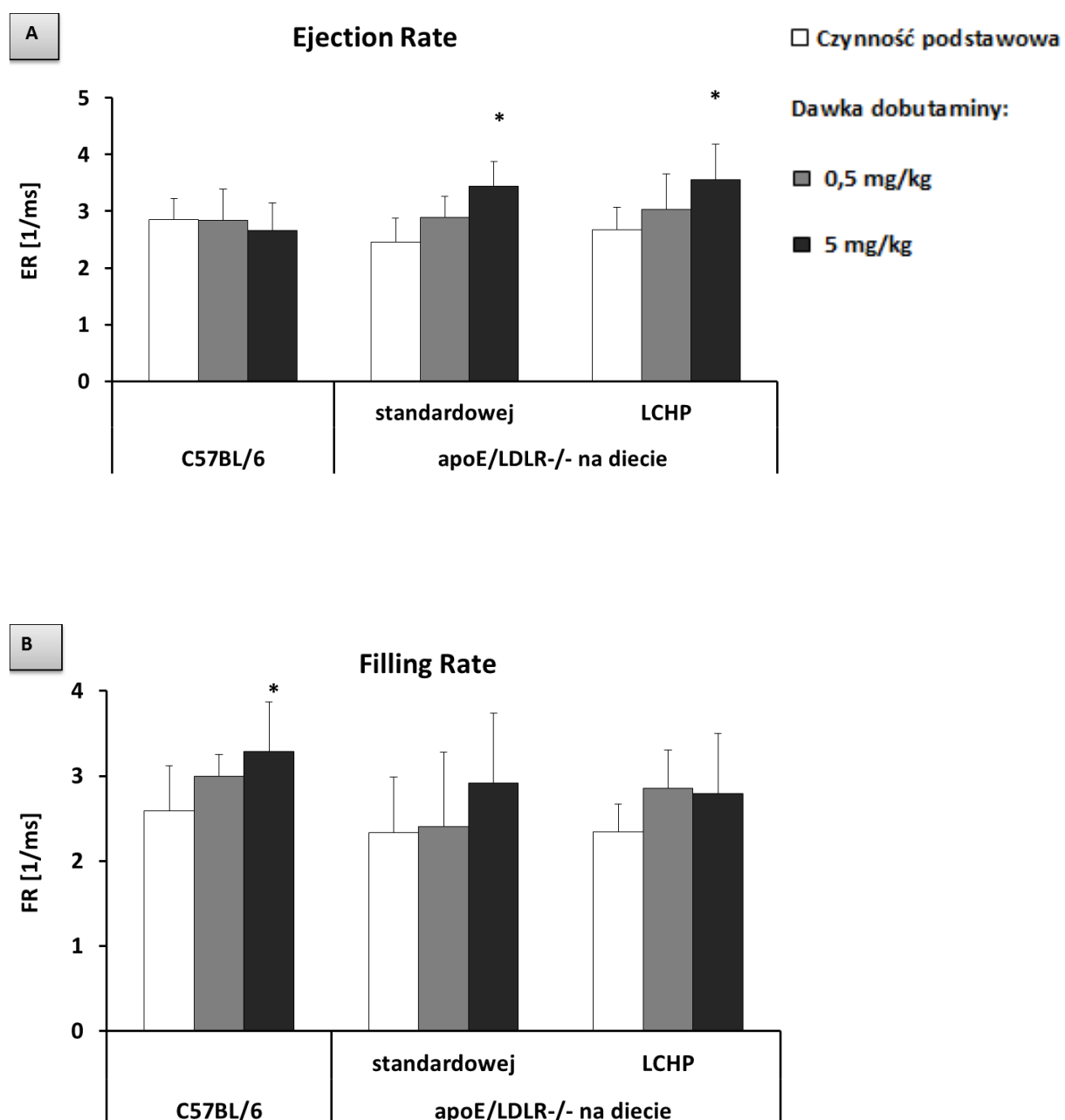


Rycina 21. Wartości powierzchniowej zmiany frakcji wyrzutowej (FAC) oraz wyrzutowej zmiany powierzchni (SAC) po stymulacji dobutaminą w dawce niskiej (0,5 mg/kg) oraz w dawce wysokiej (5 mg/kg) w grupie kontrolnej myszy C57BL/6, oraz w grupie myszy z miażdżycą na diecie standardowej (apoE/LDLR<sup>-/-</sup>S) oraz LCHP (apoE/LDLR<sup>-/-</sup>LCHP). W każdej z badanych grup obserwowano nieznaczny wzrost FAC i brak zmian SAC w odpowiedzi na stymulację dobutaminą. Zarówno myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup>S, jak i apoE/LDLR<sup>-/-</sup>LCHP miały znacznie obniżoną wyrzutową zmianę powierzchni w warunkach podstawowych w stosunku do wartości w grupie kontrolnej. Oznaczenia grup: (1) myszy badane stymulacją w zakresie dawek niskich i (2) myszy badane w zakresie dawek wysokich (dokładny opis w Metodyce). \* oznacza  $p < 0,05$  w stosunku do wartości dla czynności w warunkach podstawowych. # oznacza  $p < 0,05$  dla wartości w stosunku do wartości w warunkach podstawowych w grupie kontrolnej.



Rycina 22. Wartości powierzchniowej zmiany rzutu serca (SCO) oraz rytmu serca (HR) po stymulacji dobutaminą w dawce niskiej (0,5 mg/kg) oraz w dawce wysokiej (5 mg/kg) w grupie kontrolnej myszy C57BL/6, oraz w grupie myszy z miażdżycą na diecie standardowej (apoE/LDLR<sup>-/-</sup>S) oraz na diecie LCHP (apoE/LDLR<sup>-/-</sup>LCHP). Istotny wzrost SCO obserwowano jedynie po stymulacji wysoką dawką dobutaminy w grupie myszy kontrolnych, podczas gdy w grupie myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup>S oraz apoE/LDLR<sup>-/-</sup>LCHP nie obserwowano żadnych zmian po podaniu dobutaminy (A). Rytm serca przyspieszył w grupie kontrolnej oraz w grupie apoE/LDLR<sup>-/-</sup>S w odpowiedzi na wysoką dawkę dobutaminy i nie zmienił się w grupie myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup>LCHP (B). Zarówno jednak w grupie apoE/LDLR<sup>-/-</sup>S, jak i apoE/LDLR<sup>-/-</sup>LCHP rytm serca w warunkach podstawowych był przyspieszony. Oznaczenia grup: (1) myszy badane stymulacją w zakresie dawek niskich i (2) myszy badane w zakresie dawek wysokich (dokładny opis w Metodyce). \* oznacza p<0,05 w stosunku do wartości dla czynności w warunkach podstawowych. # oznacza p<0,05 dla wartości w stosunku do wartości w warunkach podstawowych w grupie kontrolnej





Rycina 23. Wartości kinetyki wyrzutu (ER) oraz kinetyki napełniania (FR) po stymulacji dobutaminą w dawce niskiej (0,5 mg/kg) oraz w dawce wysokiej (5 mg/kg) u myszy C57BL/6, oraz u myszy z miażdżycą na diecie standardowej (apoE/LDLR-/-S) oraz diecie LCHP (apoE/LDLR-/-LCHP). Wzrost ER w odpowiedzi na dobutaminę obserwowano jedynie w grupie apoE/LDLR-/-S i w grupie apoE/LDLR-/-LCHP (A), podczas gdy wzrost FR obserwowano jedynie w grupie kontrolnej (B). Oznaczenia grup: (1) myszy badane stymulacją w zakresie dawek niskich i (2) myszy badane w zakresie dawek wysokich (dokładny opis w Metodocyce). \* oznacza  $p < 0,05$  w stosunku do wartości dla czynności w warunkach podstawowych. # oznacza  $p < 0,05$  dla wartości w stosunku do wartości w warunkach podstawowych w grupie kontrolnej.

## 5. Dyskusja

Przedstawiona rozprawa doktorska opisuje metodykę oceny rezerwy czynności mięśnia sercowego myszy z wykorzystaniem stymulacji niską oraz wysoką dawką dobutaminy przy użyciu techniki obrazowania MR.

Za pomocą opracowanej metodyki opisano progresję niewydolności serca w mysim modelu kardiomiopatii rozstrzeniowej (myszy  $Tg\alpha q^{*44}$ ), a uzyskane wyniki wniosły szereg dodatkowych informacji dotyczących wyczerpywania się rezerwy czynności w tym modelu. Uwidoczniono zmiany wyprzedzające etap jawnej dekompensacji czynności serca u myszy  $Tg\alpha q^{*44}$ : początkowo spadek rezerwy chronotropowej, a w kolejnym etapie spadek rezerwy inotropowej i lusitropowej oraz w końcu również objawy niedokrwienia.

Z kolei badania u myszy  $apoE/LDLR^{-/-}$  rozwijających miażdżycę i karmionych dietą standardową lub aterogenną (LCHP) wykazały wczesne zaburzenia czynności mięśnia sercowego z kluczową rolą przyspieszonego rytmu serca oraz upośledzenie napelniania lewej komory. Wyniki takie sugerują rozwój niewydolności serca z zachowaną frakcją wyrzutową (HFpEF).

Obie badane patologie u myszy wydają się dobrze odzwierciedlać analogiczne patologie niewydolności serca obserwowane u ludzi. Dlatego też, opisana w niniejszej rozprawie doktorskiej metodyka oraz charakterystyka zaburzeń czynności serca w wybranych modelach może stać się punktem wyjścia do dalszych badań nad mechanizmami i nowymi sposobami farmakoterapii niewydolności serca.

Otrzymane wartości parametrów czynności mięśnia sercowego w grupach kontrolnych (szczepu FVB oraz C57BL/6) potwierdzają wartości otrzymywane przez innych badaczy [26], jednak nieco różnią się między sobą (np. obserwowano istotny efekt chronotropowy w grupie C57BL/6 w odpowiedzi na dobutaminę podczas gdy w grupie FVB efekt ten był mniej klarowny). Może to być wynikiem różnic w czynności serca samic w stosunku do samców myszy [33]. Wyniki takie mogą także odzwierciedlać drobne różnice pomiędzy wąskimi, wyselekcjonowanymi liniami genetycznymi myszy laboratoryjnych i ich stwierdzenie nie ma znaczenia dla konkluzji niniejszej rozprawy doktorskiej.

### 5.1. Opracowanie metodyki stymulacji $\beta$ -adrenergicznej do badania czynności mięśnia sercowego myszy *in vivo* techniką obrazowania MR

Wytyczne Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego (ESC, European Society of Cardiology) wskazują na istotne korzyści diagnostyczne wynikające z przeprowadzenia testów wysiłkowych bądź ich zamienników – testów ze stymulacją  $\beta$ -adrenergiczną [3]. Wyniki powyższych testów są niezwykle pomocne np. w ocenie stopnia niedokrwienia mięśnia sercowego i jego żywotności [34] lub w ocenie izolowanych zaburzeń rozkurczu mięśnia sercowego [35]. Określana za ich pomocą wielkość rezerwy czynnościowej jest parametrem prognostycznym przyszłej zachorowalności i śmiertelności z powodu chorób serca [36]. Z wyżej wymienionych powodów testy stymulacji  $\beta$ -adrenergicznej znalazły swoje zastosowanie także w badaniach doświadczalnych na zwierzętach [27, 37-41]. W odróżnieniu od badań klinicznych, badania na zwierzętach nie mają jednak ustalonej metodyki, a w literaturze znaleźć można zróżnicowane opisy stosowanych protokołów. Podawane są różne dawki dobutaminy zarówno we wlewie dożylnym (na wzór protokołu klinicznego), jak i w podaniu dootrzewnowym [41-45]. Podanie dootrzewnowe znacznie upraszcza i skraca przebieg doświadczenia, pozwalając ograniczyć czas ekspozycji na anestezję, co w przypadku zwierząt w zaawansowanych stadiach choroby ma ogromne znaczenie. Pozwala to bowiem ograniczyć śmiertelność zwierząt związaną z samym badaniem. Co prawda, po podaniu dootrzewnowym reakcja mięśnia sercowego jest opóźniona w stosunku do podania dożylnego, a czas wchłaniania dobutaminy (potencjalnie różny) determinuje czas reakcji. Związana z tym faktem zmienność wyników nie wydaje się jednak mieć charakteru systematycznego, a raczej losowy, co może jedynie wpłynąć na konieczność zwiększenia liczebności grupy potrzebnej do uzyskania istotności statystycznej porównań.

Zalecany przez Amerykańskie Towarzystwo Kardiologiczne (American Heart Association, AHA) i akceptowany przez ESC protokół testu obciążeniowego opiera się na wyraźnej zależności odpowiedzi czynnościowej mięśnia sercowego na rosnącą stymulację dobutaminą w zależności od rodzaju i stopnia niewydolności serca [46, 47]. Sugeruje to wyższość diagnostyczną testu opartego na niskiej oraz wysokiej dawce dobutaminy (w stosunku do testu opartego jedynie na pojedynczej dawce) również w badaniach zwierzęcych. Biorąc pod uwagę przytoczone argumenty oraz fakt, że dootrzewnowe podanie dobutaminy znajduje swoje zastosowanie w badaniach

modeli zwierzęcych niewydolności serca, poddano badaniu odpowiedź czynnościową mięśnia serca myszy na rosnące dawki dobutaminy podawane dootrzewnowo. Dodatkową motywacją dla opisanych badań był spory rozrzut odpowiedzi na podanie pojedynczej dawki dobutaminy (1,5 mg/kg) u myszy Tgαq\*44, uzyskany w badaniach pilotowych.

Metodykę opracowywano badając zmiany czynności serca w odpowiedzi na szeroki zakres dawek dobutaminy: od 0,15 mg/kg do 20 mg/kg w grupie myszy Tgαq\*44 z zaawansowaną niewydolnością krążenia oraz w grupie myszy kontrolnych. Ze względu na konieczność podania pięciu różnych dawek eksperyment podzielono na dwie części wykonywane równolegle: badania dla niskich dawek leżących w zakresie od 0,15 mg/kg do 1,5 mg/kg oraz wysokich dawek leżących w zakresie od 1,5 mg/kg do 20 mg/kg.

W obu zakresach powtórzona została dawka 1,5 mg/kg w celu określenia efektu działania, w zależności od kolejności jej podania wśród innych dawek. Wykazano, iż zmiana czynności serca w odpowiedzi na tę dawkę nie była powtarzalna. Obserwowano istotną statystycznie zmianę parametru lub jej brak (np. FAC, ESA w grupie myszy Tgαq\*44) w zależności od tego, czy podawano ją jako pierwszą czy ostatnią w kolejności. Uzyskane wyniki mogą być skutkiem różnej wrażliwości mięśnia sercowego na dobutaminę (co obserwuje się także u ludzi). Nie są jednak skutkiem różnego czasu wchłaniania się dobutaminy, ponieważ najsilniejszą reakcję chronotropową i inotropową każdorazowo obserwowano począwszy od 8 minuty, a trwała ona przez kolejnych kilka minut. Stąd, by uwidocznić najsilniejszą reakcję analizowano 2 wyniki (rejestrowane w 8 i 12 minucie), a do analiz brano wynik o najsilniejszej zmianie inotropowej (zmianie parametru ESA).

Spośród dawek dobutaminy w niskim zakresie, dawka 0,5 mg/kg najczęściej uwidaczniała zmiany czynności mięśnia sercowego, przy czym zmiany te obserwowano jedynie w grupie myszy Tgαq\*44 na późnym etapie niewydolności serca. Nie były one jednak widoczne w grupie myszy kontrolnych. W zakresie dawek wysokich obserwowane zmiany dotyczyły jedynie grupy kontrolnej, tj. dawka 5 mg/kg oraz dawka (20 mg/kg) uwidaczniała wyraźne, choć nieistotne statystycznie różnice w kluczowych parametrach pracy mięśnia sercowego myszy FVB (spadek parametru ESA, wzrost parametru FAC). Ujawniająca się odmienna reakcja myszy FVB oraz Tgαq\*44 w zależności od podawanej dawki wydawała się całkowicie uzasadniona ze względu na zdecydowane upośledzenie czynności serca w grupie myszy Tgαq\*44.

W świetle otrzymanych wyników ustalono, że dawka 20 mg/kg była zbyt wysoką, by móc ją bezpiecznie włączyć do protokołu badania myszy z niewydolnością serca (w grupie Tgαq\*44 powodowała znaczny spadek EDA bez spadku ESA). Do przygotowywanego protokołu włączono więc dawkę dobutaminy 5 mg/kg. Ograniczenie podawanej dobutaminy do dwóch dawek było kompromisem pomiędzy ilością informacji otrzymaną w pojedynczym eksperymencie a stopniem jego komplikacji, co za tym idzie, również czasem trwania eksperymentu.

## **5.2. Zmiany czynności mięśnia sercowego w grupie kontrolnej FVB w zależności od wieku**

Wyniki przeprowadzonych badań grup kontrolnych pozwoliły określić zarówno wartości prawidłowej czynności serca myszy, jak i zmiany czynności serca zależne od wieku, niezależne jednak od czynników ryzyka (jak np. nieodpowiednia dieta) czy zmian genetycznych. Badania czynności całej lewej komory (zsumowanie czynności wszystkich mierzonych warstw w przekroju osi krótkiej) potwierdziły prawidłowo zachowaną zarówno globalną czynność serca: brak zmian frakcji wyrzutowej (EF) i rzutu serca (CO), jak i czynność skurczową: brak zmian objętości końcowo-skurczowej (ESV) i kinetyki wyrzutu (ER) u myszy w wieku 15 miesięcy w porównaniu z myszami młodymi, 4 miesięcznymi (Tabela 2, str. 32). Niezmieniona podstawowa czynność skurczowa, jak również dostępna rezerwa czynności u myszy FVB w wieku 15 miesięcy (FAC, ER, ESA, plus zmiany tych parametrów w odpowiedzi na stymulację  $\beta$ -adrenergiczną, Ryc. 9-10, str. 34-35) pozwalają stwierdzić, że kondycja serca jest na tym etapie rozwoju dobrze zachowana i nie obserwuje się typowych późnych zmian spadku kurczliwości związanych ze starzeniem. Niemniej, pojawiają się już wczesne zmiany charakterystyczne dla zaawansowanego wieku, tj. zmiany czynności rozkurczowej, za jakie można uznać zmiany kinetyki napełniania manifestujące się wyraźnym spadkiem FR w podstawowym badaniu czynnościowym całej komory serca (Tabela 2, str. 32). Spadek kinetyki napełniania komory, obserwowany w zaawansowanym wieku, może być potencjalnie tłumaczony przez zmiany geometrii i może wynikać ze znacznie zmniejszonej kinetyki odkształcenia się ścian komory w trakcie rozkurczu w warstwach przykoniuszkowych i przypodstawnych. Spadek ten jednak nie pociąga za sobą upośledzenia rezerwy czynnościowej mięśnia sercowego.

Ocena czynności pojedynczej warstwy w przekroju osi krótkiej uwidoczniała natomiast wzrost powierzchni lewej komory w końcowej fazie rozkurczu (EDA), czego nie obserwowano w badaniu objętości całej komory (jako zmianę EDV). Taka obserwacja z kolei sugeruje zmianę geometrii lewej komory w kierunku rozstrzeni, kolejnego objawu wczesnych zmian starzenia lewej komory. W konsekwencji dochodzi do wzrostu objętości wyrzutowej (wyraźny, choć nieistotny statystycznie wzrost SV dla myszy w wieku 15 miesięcy), co także obserwuje się u ludzi w podeszłym wieku i tłumaczy się jako proces adaptacyjny starzejącego się serca, mający na celu kompensację osłabionej kinetyki napełniania w stosunku do sztywniejących ścian naczyń [27, 48].

Brak zmian rytmu serca u myszy starszych (15 miesięcznych) w stosunku do grupy myszy 4 miesięcznych potwierdza wcześniejsze doniesienia dla innego popularnie używanego w badaniach eksperymentalnych szczepu: myszy C57BL/6 [49]. Sugeruje to, że rytm serca pomimo zmienności zależnej od szczepu myszy, nie odgrywa istotnej roli w procesie starzenia się systemu naczyniowo-sercowego na badanych etapach rozwoju. Istotnie, przyspieszenie akcji serca w odpowiedzi na stymulację  $\beta$ -adrenergiczną wynika z mniejszej rezerwy chronotropowej, która u myszy wynosi tylko ok. 25 % podstawowej rytmiki, podczas gdy u ludzi wartość ta osiąga nawet do 300 % [49]. Stąd też, w badaniach eksperymentalnych z wykorzystaniem myszy nie wydaje się konieczne osiągnięcie tak wysokich progów rezerwy chronotropowej do oceny kurczliwości serca, jak w badaniach klinicznych u ludzi. Podsumowując, obserwowane zmiany czynności serca w grupie myszy zdrowych w różnym wieku, nie obciążonych żadnymi czynnikami ryzyka, jak hiperlipidemia, cukrzyca czy otyłość, okazują się zgodne z wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi wczesnych etapów starzenia się serca ludzi.

Seria opisanych badań dla myszy kontrolnych stanowiła ważny punkt odniesienia dla badań późnych zaburzeń pracy mięśnia sercowego u myszy Tgαq\*44. Wyniki te także wskazują na to, że zaburzenia czynności obserwowane u starszych myszy Tgαq\*44 są wynikiem głównie niewydolności serca, a zmiany wywołane przez starzenie się są jedynie niewielkiego stopnia i obejmują lekkie powiększenie się lewej komory, bez innych zmian czynności podstawowej i bez zmian rezerwy chronotropowej, inotropowej i lusitropowej.

Tym samym, opisane poniżej nasilające się zmiany obserwowane u myszy Tgαq\*44 są skutkiem progresji choroby, a nie procesu starzenia układu sercowo-

naczyniowego *per se*. Starzenie się może oczywiście zmiany te nasilać. To zagadnienie mogłoby stanowić osobny temat badawczy, który jednak nie był przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej.

### **5.3. Zmiany czynności lewej komory w toku rozwoju niewydolności serca w mysim modelu kardiomiopatii rozstrzeniowej (myszy Tgaq\*44)**

W celu oceny zmian czynności serca, zależnych od wieku i rozwijającej się patologii, zbadano i porównano czynność lewej komory w wybranych grupach myszy FVB i Tgaq\*44 (w wieku 4 i 15 miesięcy), zarówno dla wartości całej komory, jak i dla wartości parametrów z pojedynczej warstwy środkowej, na poziomie mięśni brodawkowatych. Badania objętości lewej komory serca nie przeprowadzano u myszy Tgaq\*44 starszych niż 15 miesięcy, ze względu na długość wymaganego czasu badania i w związku z tym ryzyka śmiertelności wynikającego z narażenia na dłuższy czas anestezji. Niemniej, porównanie to pozwoliło na ocenę nie tylko stopnia upośledzenia czynności serca w modelu Tgaq\*44, ale także na ocenę zmian objętości lewej komory ze względu na potencjalną zmianę geometrii serca. Ponadto, porównanie czynności całej komory z czynnością warstwy było niezbędne do prawidłowej interpretacji wyników, ponieważ kluczowe parametry (objętość końcowo-skurczowa czy objętość końcowo-rozkurczowa komory) są podstawą wyznaczania standardowych parametrów o znaczeniu prognostycznym (frakcja wyrzutowa) lub istotnym dla oceny ogólnej kondycji serca (objętość wyrzutowa czy rzut serca). Otrzymane wyniki wskazują na wyraźnie mniejszą objętość końcowo-rozkurczową lewej komory serca u myszy Tgaq\*44 w wieku 4 miesięcy w stosunku do myszy FVB w jednakowym wieku, przy czym uwidocznienie tej różnicy wymaga badania objętości całej komory. Brak zmiany powierzchni końcowo-rozkurczowej (przy mniejszej objętości z całej komory) sugeruje zmianę geometrii w stronę przerostu odśrodkowego lewej komory (wzrost długości promienia komory na przekroju mięśni brodawkowatych).

U myszy transgenicznym Tgaq\*44 w wieku 4 miesięcy zaobserwowano obniżone w stosunku do myszy kontrolnych (FVB) wartości frakcji i objętości wyrzutowej przy niezmięnionej objętości końcowo-skurczowej (Tabela 3, str. 45) będące wynikiem przede wszystkim zmniejszonej objętości końcowo-rozkurczowej lewej komory. Obniżone w stosunku do grupy kontrolnej wartości parametrów globalnych (jak EF czy SV) mogą sugerować upośledzenie kurczliwości serca. Biorąc jednak pod uwagę dobrze zachowaną rezerwę czynności skurczowej w grupach myszy Tgaq\*44 w wieku

4 miesięcy (a nawet i 8 miesięcy) wydaje się, że mniejsze wartości objętości końcowo-rozkurczowej u myszy Tgαq\*44 w wieku 4 miesięcy mogą wynikać ze zmian zwłóknieniowych w mięśniu sercowym, które nie doprowadziły jeszcze do kompensacyjnie zwiększonej kurczliwości (spadku końcowo-skurczowej objętości lewej komory). Za hipotezą tą przemawia również fakt, że w świetle wcześniejszych badań można wykluczyć istnienie różnic w wielkości serca między myszami FVB4 i TG4, które mogłyby tłumaczyć istnienie różnic w rozmiarze końcowo-rozkurczowym. Istotnie, wcześniejsze badania u myszy Tgαq\*44 nie wskazują na to, by serca myszy Tgαq\*44 wyjściowo były mniejsze niż serca myszy FVB [10, 12, 14]. Co interesujące, z różnicami w parametrach objętościowych nie idą w parze różnice w wartościach podstawowych parametrów obliczanych na podstawie pomiarów warstwy środkowej. Można podejrzewać, że wczesne zmiany osłabionej czynności serca myszy Tgαq\*44 są bardzo nieznaczne i dotyczą fragmentów przypadkowych i przykoniuszkowych (o cieńszej ścianie, fragmentów z natury o słabszej czynności).

Różnice wartości parametrów analizowanych z pojedynczej warstwy wykazano na późniejszym etapie rozwoju niewydolności serca u myszy Tgαq\*44, tj. pomiędzy grupami Tgαq\*44 i FVB w wieku 15 miesięcy. Dotyczyły one parametrów FAC, EDA, SAC, ER i FR. Również w tym przypadku zachowana została powierzchnia końcowo-skurczowa, co sugeruje, że zmiana parametru EDA odgrywa kluczową rolę w upośledzeniu globalnej czynności mięśnia sercowego ocenianej przy pomocy takich parametrów jak SAC i FAC. Jak wcześniej opisano, pomiary objętościowe w stanie podstawowym dla myszy na tak znacznym stopniu zaawansowania niewydolności serca nie były możliwe. Spontaniczny rozwój patologii serca w modelu myszy Tgαq\*44 na wczesnych etapach rozwoju, tj. w wieku 4 miesięcy, skutkuje powolnym zwłóknieniem lewej komory [14] i zwiększoną aktywnością mitochondriów w kardiomiocytach [12], a upośledzenie czynności lewej komory na tym etapie wydaje się manifestować jedynie obniżoną objętością końcowo-rozkurczową lewej komory. O dobrze zachowanej kondycji serca na etapie 4 miesiąca życia, pomimo zmian strukturalnych miokardium (przerost, zwłóknienie, zmiany zapalne), świadczy prawidłowa rezerwa czynności w badaniu ze stymulacją β-adrenergiczną. Kolejne etapy progresji niewydolności serca w świetle zmian parametrów podstawowych w modelu Tgαq\*44 objawiają się nietypowym wzrostem kinetyki napełniania lewej komory (FR) uwidaczniającym się w wieku 6 miesięcy. Zmiana taka na stosunkowo wczesnym etapie patologii może być próbą kompensacji upośledzonej relaksacji izowolumetrycznej



(wydłużonej fazy IVRT), bądź wydłużonego czasu skurczu przy zachowanym rytmie serca. Próby analiz tych parametrów nie wykazały jednak istotności statystycznej, ze względu na stosunkowo duży rozrzut wynikający być może z niewystarczającej rozdzielczości czasowej obrazów MR. Wzrost kinetyki napełniania lewej komory może także być wymuszony skróceniem czasu wczesnej fazy napełniania, ze względu na szybsze wyrównanie się ciśnień (pomiędzy komorą i przedsionkiem), wynikające z istotnych zmian zwłóknieniowych tkanki mięśnia obserwowanych już w wieku 4 miesięcy. Na kolejnym etapie niewydolności serca w modelu  $Tg\alpha q^{*44}$  obserwowane jest upośledzenie rezerwy rzutu serca, najprawdopodobniej z powodu upośledzenia rezerwy chronotropowej, tj. braku zmian rytmu serca w odpowiedzi na stymulację dobutaminą tak w niskiej, jak i w wysokiej dawce. W kolejnym etapie rozwoju niewydolności krążenia, tj. w 12-stym miesiącu życia, obserwowane jest upośledzenie podstawowej kinetyki wyrzutu (ER) i napełniania (FR) lewej komory. Znaczny spadek frakcji wyrzutowej oraz objętości wyrzutowej lewej komory obserwowany jest dopiero u myszy  $Tg\alpha q^{*44}$  15-sto miesięcznych, co oznacza nie tylko dalsze osłabienie czynności serca, ale przede wszystkim upośledzenie (załamanie) dotychczasowych mechanizmów kompensacyjnych, niezbędnych do zapewnienia odpowiedniej ilości krwi w obiegu przy osłabionej czynności lewej komory. Znaczne upośledzenie kurczliwości lewej komory (obserwowane na tym etapie niewydolności u myszy  $Tg\alpha q^{*44}$ ), obrzęk płuc, łącznie ze spadkiem frakcji wyrzutowej [14] tłumaczą wysoką śmiertelność obserwowaną w grupach myszy w wieku ok 15 miesięcy. Wyraźne zwolnienie akcji serca widoczne w grupie 12 miesięcznej sugeruje natomiast wystąpienie bloku przedsionkowo komorowego. Występowanie arytmii jest jedną z najczęstszych przyczyn nagłych zgonów sercowych, co bez wątpienia jest dodatkowym silnym czynnikiem śmiertelności na tym etapie niewydolności serca.

Szersza charakterystyka kondycji serca na późnym etapie niewydolności była możliwa dzięki ocenie odpowiedzi czynnościowej na różne dawki dobutaminy w grupie myszy  $Tg\alpha q^{*44}$  w wieku 16-18 miesięcy. Wyczerpanie rezerwy kurczliwości na wcześniejszym etapie patologii (tj. brak zmian czynności serca w odpowiedzi na stymulację dobutaminą w parametrze FAC i ESA w wieku 12 miesięcy) i słabsza czynność w badaniu podstawowym u myszy  $Tg\alpha q^{*44}$  w wieku 16-18 miesięcy przemawiają za hipotezą o niedokrwiennym podłożu odpowiedzi na stymulację niską dawką dobutaminy na późnym etapie patologii. Wzrost wartości parametrów FAC, SAC, ER i FR oraz spadek parametru ESA w tej grupie myszy wynikałby zatem

ze stymulacji dobutaminą fragmentów lewej komory, będących prawdopodobnie w stanie hibernacji bądź ogłuszenia. Choć, wynikający z upośledzenia perfuzji naczyń wieńcowych, stan niedokrwienia mięśnia sercowego typowy jest raczej dla pierwotnej choroby niedokrwiennej, obserwuje się go także w grupie pacjentów rozwijających różnego rodzaju kardiomiopatie o „nie niedokrwinnym podłożu”, w tym także w grupie pacjentów w zaawansowanych stadiach kardiomiopatii rozstrzeniowej [50].

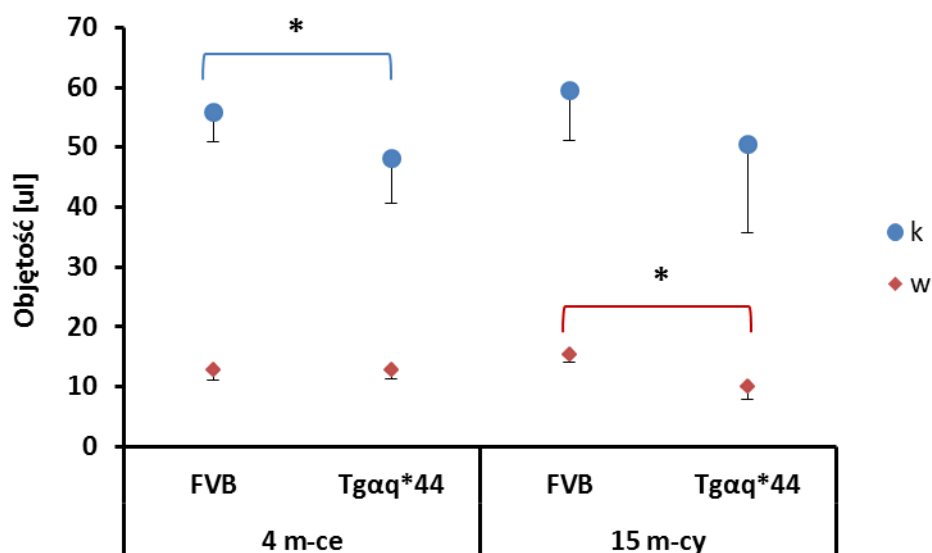
Podsumowując, opracowana w niniejszej rozprawie metodyka badawcza pozwala wykryć wczesne zmiany w progresji niewydolności serca, jak również upośledzenie rezerwy czynności na późnym etapie patologii serca u myszy Tgaq\*44. Wczesne zmiany (u myszy w wieku 6 i 8 miesięcy) obejmowały zaskakujący wzrost kinetyki napelniania lewej komory i upośledzenie rezerwy chronotropowej przy całkowicie zachowanej rezerwie inotropowej. Z kolei późne zmiany (u myszy w wieku 12 miesięcy) dotyczyły rezerwy inotropowej, która wyprzedza zaawansowane upośledzenie podstawowej czynności skurczowo-rozkurczowej oraz zaskakującej dwufazowej odpowiedzi na stymulację dobutaminą o charakterze niedokrwinnym. Zaburzeniom tym, w końcowej fazie niewydolności serca, towarzyszył całkowity brak rezerwy inotropowej i lusitropowej w odpowiedzi na wysoką dawkę dobutaminy oraz przyspieszona akcja serca.

Interesujący jest brak zmian powierzchni końcowo-rozkurczowej lewej komory w kolejnych etapach rozwoju kardiomiopatii. Fakt ten można jednak tłumaczyć tym, że uzyskane wyniki są wartościami średnimi dla osobnych grup myszy (tzn. nie pokazują zmian dla każdej myszy w czasie jej życia, ale obrazują aktualny stan lewej komory dla osobnych myszy). Takie podejście, tzn. pomiar różnych grup myszy, skupia się na charakterystyce czynności serca tylko tych grup, jakie przeżyły do określonego etapu patologii, pomijając całkowicie ocenę czynności myszy padłych w trakcie rozwoju kardiomiopatii. Brak oczekiwanych zmian powierzchni końcowo-rozkurczowej w kolejnych etapach patologii może także bezpośrednio wynikać z procesu włóknienia i przez to sztywnienia ścian lewej komory, co wydaje się być bezpośrednim następstwem nadekspresji podjednostki  $\alpha$  białka G w receptorach dla angiotensyny II, endoteliny I oraz aldosteronu w kardiomiocytach myszy Tgaq\*44. Tym bardziej, że istotne zmiany zwłóknieniowe lewej komory serca zostały opisane już w grupach myszy 4 miesięcznych, u których zarówno podstawowa czynność serca, jak i rezerwa czynności w odpowiedzi na stymulację  $\beta$ -adrenergiczną jest prawidłowa [10, 14].

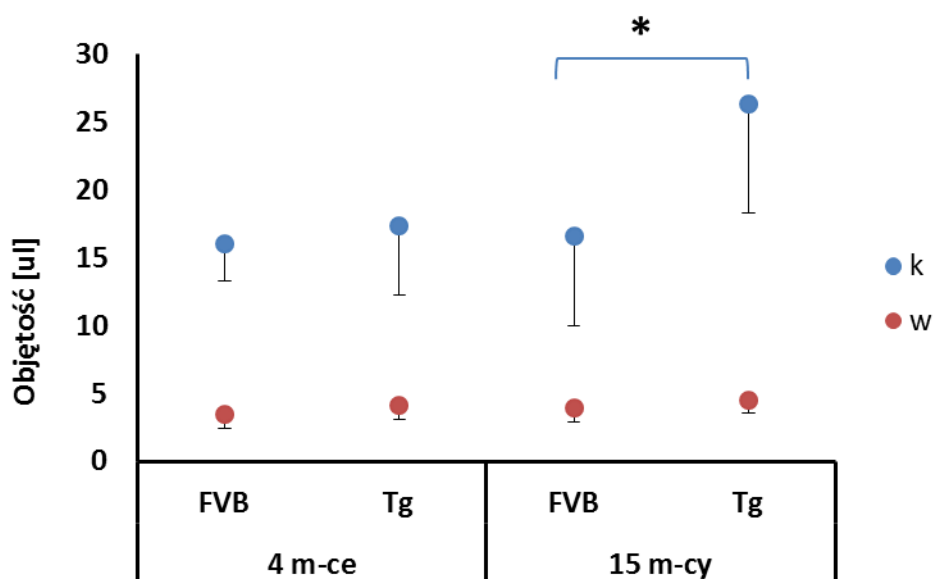
Co interesujące, zmiany te nie są więc następstwem aktywacji systemu RAA, lecz naśladują skutki takiej aktywacji.

#### **5.4. Porównanie czynności mięśnia sercowego w analizie pojedynczej warstwy oraz w analizie sumy warstw tworzących całą komorę**

Przedstawione wyniki pozwalają stwierdzić, że zmiany podstawowej czynności oceniane w badaniu całej komory znacznie wyraźniej uwidaczniają czynność lewej komory aniżeli analogiczne zmiany obserwowane w badaniu pojedynczej warstwy z poziomu mięśni brodawkowatych (mniejsze wartości EF względem FAC, a SV względem SAC już na etapie 4 miesięcy niewidoczne w analizie analogicznych wartości z pojedynczej warstwy u myszy Tgαq\*44 w porównaniu do myszy FVB, Ryc. 24). Z kolei jednak, wyniki badania całej komory nie opisują tak dokładnie jej realnego stanu (czynności wraz z jej dostępną rezerwą w warunkach wzmożonej pracy) jak testy przeprowadzane w warunkach indukowanego farmakologicznie stresu β-adrenergicznego, który z przyczyn metodycznych mógł być wykonywany tylko na pojedynczej warstwie. Z tego względu, aby możliwe było uzyskanie możliwie pełnego opisu, wykonywano pomiary zarówno objętościowe w warunkach podstawowych, jak i pomiary na jednej warstwie z dodatkowym testem dobutaminowym. Jedynie w przypadku grupy myszy Tgαq\*44 w wieku 15 miesięcy ograniczono się do wykonania pomiaru podstawowego (komory, bez testu z dobutaminą), ze względu na zaawansowaną dekompensację lewej komory i obserwowane silne zaburzenia rytmu serca. Do badań rezerwy wykorzystano kolejne grupy myszy Tgαq\*44 (w wieku 16-18 miesięcy życia), które z kolei nie zostały poddane pomiarowi objętości całych komór.



Rycina 24. Zmiana objętości komory oraz warstwy w ocenie objętości bądź warstwy końcowo-rozkurczowej lewej komory (EDV względem EDA). Wczesne zmiany wielkości lewej komory (powiększenia światła komory) pomiędzy myszami FVB i Tgαq\*44 (w wieku 4 miesięcy) uwidaczniają się jedynie w badaniu objętości całej komory (k). Późne zmiany natomiast, wskazujące na *remodelling* komory łatwiej uwidocznic w badaniu pojedynczej warstwy na przekroju mięśni brodawkowatych (w).



Rycina 25. Zmiana objętości komory i warstwy w ocenie objętości bądź warstwy końcowo-skurczowej lewej komory (ESV względem ESA). Istotne zmiany światła jamy wskazujące na *remodelling* komory uwidaczniają się jedynie w badaniu całej komory (k) na stosunkowo późnym etapie zaawansowania rozwoju niewydolności. Badanie pojedynczej warstwy (w) na przekroju mięśni brodawkowatych nie uwidacznia tak wyraźnie zmian ze względu na osłabioną kurczliwość.

Podsumowując, otrzymane wyniki pozwalają ocenić stan mięśnia sercowego zarówno ze względu na możliwe zmiany wynikające z przebudowy (tzw. *remodellingu*) lewej komory, jak i ze względu na stopniowe upośledzenie czynności związane z wyczerpywaniem się rezerw (inotropowej czy chronotropowej), świadczących o stopniu zaawansowania niewydolności serca. Biorąc pod uwagę aktywacje różnego rodzaju mechanizmów kompensacyjnych (stymulujących przerost mięśnia sercowego czy zwiększających jego kurczliwość) - wiarygodna ocena stopnia zaawansowania niewydolności serca wymaga informacji zarówno o czynności podstawowej wynikającej ze zmian objętości całej komory, jak i o zmianach czynności wynikających z dostępnych rezerw.

### **5.5. Zmiany czynności mięśnia sercowego w mysim modelu miażdżycy (myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup>)**

Badanie czynności serca u myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup> pozwoliło ocenić wpływ istotnie rozwiniętej miażdżycy tętnic na czynność lewej komory serca. Oprócz myszy spontanicznie rozwijających chorobę, zbadano także grupę karmioną dietą przyspieszającą zmiany miażdżycowe, co pozwoliło uwidocznic stosunkowo niewielkie zmiany obrazujące kolejny etap upośledzonej pracy serca. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wskazują na osłabioną czynność podstawową obu grup myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup>. Osłabienie to uwidacznia się jako znacznie zmniejszona objętość wyrzutowa lewej komory (SV), co w przypadku grupy apoE/LDLR<sup>-/-</sup>S wynika przede wszystkim z istotnie zmniejszonej objętości końcowo-rozkurczowej lewej komory (EDV), podczas gdy w przypadku grupy apoE/LDLR<sup>-/-</sup>LCHP spadek objętości wyrzutowej wynika zarówno z obniżonej wartości EDV, jak i z końcowo-skurczowej objętości (ESV) lewej komory. Dodatkowy (poza EDV) spadek wartości parametru ESV dla grupy apoE/LDLR<sup>-/-</sup>LCHP w stosunku do wartości w grupie kontrolnej, sugeruje wtórnie (do zmian napełniania komory) wzmożoną kurczliwość. Zmniejszona objętość wyrzutowa może znacznie ograniczać dopływ odpowiedniej ilości tlenu do tkanek obwodowych, może także tłumaczyć brak nadciśnienia w mysich modelach rozwijających miażdżycę pomimo spadku podatności naczyń i wzrostu oporu obwodowego [51].

Znacznie przyspieszony podstawowy rytm serca (HR) w obu grupach myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup> sugeruje kompensacyjną aktywację autonomicznego układu

sympatycznego, bądź też zaburzenie równowagi układu sympatycznego w stosunku do układu parasympatycznego z nieprawidłowo zawyżoną aktywacją tego pierwszego [52]. Istotna odpowiedź inotropowa na małą dawkę dobutaminy dla grupy apoE/LDLR<sup>-/-</sup>S (spadek wartości ESA), jak i istotnie mniejsza podstawowa wartość końcowo-skurczowa dla grupy apoE/LDLR<sup>-/-</sup>LCHP (ESV, ESA) wydają się potwierdzać hipotezę o wzmożonej aktywności układu sympatycznego. O ile jednak w przypadku rozwiniętej niewydolności serca wzrost rytmu nie powoduje wzrostu kurczliwości (zaburzona relacja częstotliwości i kurczliwości) [53], o tyle w przypadku zaburzeń czynności serca, obserwowanych w badanych grupach myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup>, wartości powierzchniowej zmiany frakcji wyrzutowej (FAC) rosną w odpowiedzi na stymulację  $\beta$ -adrenergiczną, podobnie jak w grupie kontrolnej. Można zatem wnioskować o bardzo wczesnych lecz istotnych zaburzeniach czynności serca w mysim modelu miażdżycy apoE/LDLR<sup>-/-</sup>. Zaburzenia te, jak się wydaje wynikają nie tylko z obciążenia serca na skutek miażdżycy, ale także są rezultatem aktywacji mechanizmów kompensacyjnych, typowych w przebiegu niewydolności serca u ludzi.

Istotnie obniżona wartość końcowo-rozkurczowej objętości komory u myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup>LCHP wskazuje na znacznie zwiększone ciśnienie napełniania oraz sugeruje przerost ścian i wczesne objawy związane z zaburzeniami napełniania lewej komory. Doniesienia na temat czynności serca u myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup> [20] są ograniczone. W badaniu echokardiograficznym wykazano jedynie zmniejszenie wartości SV i EDV u myszy w wieku około 16 miesięcy.

Tak późno uwidocznione zmiany mogą być efektem użytej przez Gronrosa i wsp. techniki echokardiografii, która w porównaniu do techniki obrazowania MR charakteryzuje się mniejszą dokładnością, zwłaszcza w odniesieniu do zmian objętości komory. Niemniej, obserwowane zwiększenie kurczliwości (w wynikach przytoczonej pracy Gronrosa i wsp. oraz w wynikach niniejszej rozprawy doktorskiej) ma zapewne związek z koniecznością utrzymania przez serce prawidłowej frakcji wyrzutowej (zmniejszenie objętości końcowo-skurczowej lewej komory, widoczne w grupie o najbardziej zaawansowanej patologii naczyń, apoE/LDLR<sup>-/-</sup>LCHP). Wzrost kurczliwości natomiast stymulowany jest m.in. poprzez przyspieszoną akcję serca, wyraźnie obserwowaną u wszystkich myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup>. Jest to mechanizm obserwowany w przebiegu niewydolności serca, a także w upośledzeniu funkcji naczyń obwodowych, związany ze wspomnianą aktywacją układu sympatycznego i wzrostem wydzielania katecholamin. Może być także skutkiem neuropatii układu

autonomicznego, jak ma to miejsce u pacjentów z cukrzycą, i tego nie można wykluczyć.

Niemniej, skrócony cykl pracy serca wpływa przede wszystkim na długość czasu fazy napełniania komory, skracając przy tym czas perfuzji lewej komory [54], co wtórnie może doprowadzać do zwiększonego zapotrzebowania mięśnia sercowego na tlen, a w rezultacie do przewlekłego niedokrwienia. W wyniku długotrwałej aktywacji układu sympatycznego, której towarzyszy przyspieszona akcja serca, zwiększa się stężenie noradrenaliny we krwi, co może z kolei wzmocnić procesy apoptozy i wtórnie doprowadzić do przebudowy ścian naczyń, a w konsekwencji do aktywacji mechanizmów proaterogennych [55]. Jako, że wzrost rytmu serca sprzyja dysfunkcji śródbłonna i rozwoju miażdżycy, można podejrzewać, że zaburzenia czynności naczyń wieńcowych obserwowane u myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup> na badanym etapie rozwoju, wynikają nie tylko z mutacji genetycznej, ale także wtórnie z chronicznej wzmożonej aktywacji układu sympatycznego. W sporej grupie pacjentów, badanych po przebytych zawałach mięśnia sercowego, także odnotowano istotnie zwiększony rytm serca [56]. Sugeruje to z kolei szczególną rolę przyspieszonej akcji serca w przypadku niewydolności serca o etiologii niedokrwiennej. O ile jednak w przypadku grupy apoE/LDLR<sup>-/-</sup>S stymulacja dobutaminą uwidacznia niewielką rezerwę chronotropową, o tyle w grupie apoE/LDLR<sup>-/-</sup>LCHP rezerwa chronotropowa wydaje się wyczerpana całkowicie. W badaniach czynności serca u myszy apoE<sup>-/-</sup> nie wykazano zmiany ani rzutu serca, ani przyspieszonej akcji serca (w wieku 7 miesięcy) [51]. U starszych myszy (apoE<sup>-/-</sup> w wieku 13 miesięcy) odnotowano z kolei istotny wzrost rzutu serca oraz objętości minutowej przy stałe niezmiennym rytmie serca [51, 57, 58], a u myszy 16 miesięcznych wykazano ponadto znacznie upośledzoną rezerwę czynności [19]. Przeciwnie jednak do badań czynności serca u myszy apoE<sup>-/-</sup> w wieku 13 miesięcy i z zaawansowaną miażdżycą [57], przedstawione powyżej wyniki badań u myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup> nie potwierdzają zwiększonego rzutu serca, widoczny jest jednak brak rezerwy w tym parametrze. W kolejnym badaniu Cole i wsp. [59] wykazali, że u myszy apoE<sup>-/-</sup>, rozwój rozstrzeni lewej komory z istotnym upośledzeniem kurczliwości widoczny jest już u myszy 10 miesięcznych. Dodatkowo, kontrowersyjne wydaje się istnienie nadciśnienia tętniczego u myszy apoE<sup>-/-</sup>. Co ciekawe, u myszy apoE<sup>-/-</sup> nie obserwowano przyspieszenia rytmu serca [19], jakie obserwowano w niniejszej pracy. Można więc sądzić, że te dwa mysie modele miażdżycy (apoE<sup>-/-</sup> oraz

apoE/LDLR<sup>-/-</sup>) rozwijają niewydolność krążenia odmiennie lub opisywane różnice wynikają nierównocennego nasilenia miażdżycy w tych modelach..

Podsumowując, charakterystyka czynności serca w warunkach indukowanego dobutaminą stresu w obu modelach rozszerzyła znacząco wiedzę o fenotypach badanych patologii. Wyniki te są wstępnym krokiem do lepszego zrozumienia mechanizmów odgrywających istotne role w progresji niewydolności krążenia oraz do oceny skuteczności nowych sposobów farmakoterapii niewydolności serca rozwijającej się na skutek aktywacji neurohormonalnej oraz na skutek postępującego niedokrwienia.

Pomimo uderzających różnic pomiędzy badanymi modelami w charakterze zaburzeń czynności mięśnia sercowego, obie badane patologie ostatecznie prowadzą do zaburzeń krążenia wieńcowego jednak ich nasilenie i rozwój typowej dysfunkcji naczyń wieńcowych następuje u myszy Tgaq\*44 w wieku 16-18 miesięcy, a nie u myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup> w wieku 6 miesięcy (praca doktorska Paweł Gwóźdź, wyniki nieopublikowane). Nasuwa się przypuszczenie, że te różnice mogą wynikać z różnego czasu trwania patologii (6 miesięcy u myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup> i ponad rok Tgaq\*44). Można jednak również sądzić, że u myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup> rozwijających miażdżycę, pomimo odkładania się blaszek miażdżycowych, aktywowane są mechanizmy kompensacyjne utrzymujące prawidłową czynność naczyń oporowych i krążenia wieńcowego i to one utrzymują stosunkowo dobrą czynność mięśnia sercowego. Istotnie, zależne od śródbłonna odpowiedzi krążenia wieńcowego są potęgowane u myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup> (praca doktorska Paweł Gwóźdź, wyniki nieopublikowane). Z kolei prawdopodobne zmiany niedokrwienne u myszy Tgaq\*44 mogą wynikać z niekorzystnych skutków długotrwale działających mechanizmów kompensacyjnych aktywowanych w toku rozwoju niewydolności serca i niewydolności śródbłonkowych mechanizmów kompensacyjnych [9].

Reasumując, skuteczna farmakoterapia niewydolności krążenia, bez względu na jej pierwotną przyczynę, być może powinna obejmować również korektę dysfunkcji naczyń wieńcowych i naśladować mechanizmy kompensacyjne naczyń wieńcowych uruchamiane przez niedokrwienie. Można przypuszczać, że takie podejście mogłoby przynieść większą korzyść, aniżeli przyjęte obecnie podejście oparte na hamowaniu skutków nadmiernej aktywacji układów neurohormonalnych. Lepsze poznanie



mechanizmów kompensacyjnych krążenia wieńcowego scharakteryzowanych modeli doświadczalnych opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej wydaje się być nieodzownym elementem aby opracować nowe, skuteczne sposoby farmakoterapii niewydolności serca oparte o mechanizmy śródbłonna wieńcowego.

## 6. Wnioski

1. Opracowana w niniejszej rozprawie doktorskiej metodyka oceny czynności mięśnia sercowego w warunkach obciążenia farmakologicznego niską i wysoką dawką dobutaminy w badaniu obrazowania MR pracy serca myszy pozwala na badanie rezerwy skurczowej, rozkurczowej i chronotropowej mięśnia sercowego myszy *in vivo*, i lepszą ocenę stanu czynnościowego mięśnia sercowego niż jedynie ocena parametrów podstawowych mięśnia sercowego bądź ocena zmian po stymulacji pojedynczą dawką. Zastosowana metodyka pozwoliła na opis zaburzeń czynności mięśnia sercowego u myszy  $Tg\alpha q^{*44}$  oraz  $ApoE/LDLR^{-/-}$ .
2. Wykazano, że u myszy  $Tg\alpha q^{*44}$  u których rozwija się kardiomiopatia rozstrzeniowa następuje nietypowy wzrost kinetyki napełniania lewej komory na wczesnym etapie niewydolności serca, a w kolejnych etapach: wyczerpywanie się rezerwy chronotropowej, inotropowej i lusitropowej (pomiędzy 8 a 12 miesiącem). Późny etap rozwoju niewydolności serca u myszy  $Tg\alpha q^{*44}$  (z istotną dekompenzacją krążenia) obejmuje cechy niedokrwienia mięśnia sercowego.
3. Wykazano, że u myszy  $apoE/LDLR^{-/-}$  rozwijających miażdżycę frakcja wyrzutowa oraz rezerwa inotropowa jest zachowana, natomiast upośledzona jest objętość wyrzutowa, co sugeruje to zaburzone napełnianie lewej komory. U myszy  $apoE/LDLR^{-/-}$  przyspieszony jest również rytm serca i zwiększona kurczliwość w warunkach podstawowych co wskazuje na aktywację mechanizmów kompensacyjnych, które towarzyszą zaawansowanej miażdżycy.
4. Wykazano, że u myszy  $apoE/LDLR^{-/-}$  karmionych dietą proaterogenną LCHP, u których stopień miażdżycy był bardziej zaawansowany niż u myszy  $apoE/LDLR^{-/-}$  karmionych dietą standardową, zaburzenia czynności serca były bardziej zaawansowane w stosunku do czynności u myszy  $apoE/LDLR^{-/-}$  karmionych dietą standardową. Zmiany obejmowały upośledzenie rezerwy chronotropowej i zmniejszenie objętości końcowo-rozkurczowej, co sugeruje upośledzenie napełniania lewej komory. Myszy  $apoE/LDLR^{-/-}$  karmionych dietą proaterogenną LCHP mogą więc stanowić przydatny model do badań niewydolności serca z zachowaną frakcją wyrzutową, tzw. niewydolności rozkurczowej serca.

5. W sumie opisane w tej rozprawie zaburzenia podstawowej czynności mięśnia sercowego oraz upośledzona rezerwa czynnościowa u myszy Tgαq\*44, jak i u myszy apoE/LDLR dobrze odzwierciedla zmiany obserwowane w toku rozwoju niewydolności serca u ludzi. Zastosowanie opracowanej metodyki badawczej oraz mysich modeli niewydolności krążenia (myszy Tgαq\*44 i apoE/LDLR<sup>-/-</sup>) mogłoby być przydatne w badaniu mechanizmów odgrywających rolę w progresji niewydolności serca u ludzi i skuteczności nowych terapii niewydolności serca.

## 7. Streszczenie

Upośledzenie czynności serca, w zależności od podłoża patologii, może wynikać z bezpośrednich zaburzeń struktury bądź czynności lub też może pośrednio być skutkiem chorób predysponujących do upośledzenia pracy serca, szczególnie związanych upośledzoną perfuzją naczyń wieńcowych. W obu przypadkach dochodzi do stopniowych zaburzeń czynności skurczowej i rozkurczowej, a powoli postępujące zmiany aktywują mechanizmy, których dokładne zbadanie na wczesnych etapach patologii niewydolności serca u ludzi sprawia dużą trudność ze względu na brak objawów. Niemniej, wczesne zaburzenia czynności lewej komory można badać wykorzystując modele zwierzęce.

Celem badań było opracowanie metodyki oceny rezerwy czynności mięśnia sercowego u myszy w badaniu obrazowania magnetyczno rezonansowego oraz zastosowanie go do oceny czynności serca w dwóch mysich modelach niewydolności krążenia o odmiennej etiologii choroby. W pierwszym modelu (myszy Tgaq\*44 rozwijające kardiomiopatię rozstrzeniową) oceniano zmiany czynności i wielkość dostępnych rezerw czynnościowych lewej komory na różnych etapach rozwoju patologii, natomiast w przypadku drugiego modelu (myszy 6-8 miesięczne apoE/LDLR<sup>-/-</sup> rozwijające miażdżycę) analogiczne zmiany badano u myszy karmionych dietą standardową bądź dietą proaterogenną (LCHP – low carbohydrate high protein).

Na podstawie otrzymanych obrazów MR oceniano zmianę powierzchni lewej komory w czasie, co pozwalało wyznaczyć tzw. krzywą cyklu serca, na podstawie której wyznaczano następnie: frakcję wyrzutową, objętość wyrzutową, rzut serca, objętość końcowo-skurczową i końcowo-rozkurczową oraz kinetykę wyrzutu i kinetykę napelniania komory. Po wykonaniu serii pomiarów dla czynności serca w warunkach podstawowych, wykonywano test stymulacji dobutaminą w zakresie dawek niskich oraz wysokich. Powtarzano pomiar czynności serca w trakcie najsilniejszej odpowiedzi chronotropowej, a z uzyskanych danych do analiz wybierano krzywe cyklu serca wskazujące na najsilniejszą odpowiedź inotropową. Uzyskane wyniki pozwoliły: (1) określić protokół stymulacji dobutaminą w zakresie dawki niskiej oraz wysokiej w iniekcji dootrzewnowej podczas obrazowania MR czynności serca myszy (2) scharakteryzować postęp kardiomiopatii rozstrzeniowej u myszy Tgaq\*44 na różnym etapie patologii ze względu na zmiany podstawowej czynności serca oraz czynności

serca w warunkach narastającej stymulacji  $\beta$ -adrenergicznej (3) ocenić zmiany czynności serca w mysim modelu miażdżycy rozwijającej się spontanicznie oraz przyspieszonej przez dietę LCHP. Zmiany czynności serca w modelu Tg $\alpha$ \*44 ujawniły wczesny wzrost kinetyki rozkurczowej u myszy 6 miesięcznych, upośledzenie rezerwy rzutu serca w wieku 8 miesięcy oraz upośledzenie kinetyki skurczowo rozkurczowej na kolejnych etapach rozwoju niewydolności serca w wieku 12 miesięcy. Późne zmiany upośledzenia czynności serca u myszy Tg $\alpha$ \*44 dotyczą upośledzenia frakcji i objętości wyrzutowej w wieku 15 miesięcy, a w kolejnym etapie zdekompensowanej już niewydolności serca uwidoczniono istnienie paradoksalnie niedokrwionych fragmentów lewej komory i silne zaburzenia globalnej czynności w odpowiedzi na wysoką dawkę dobutaminy. Obserwowane zmiany czynności serca w grupie kontrolnej wskazywały natomiast na charakterystyczne cechy rozstrzeni i zaburzeń napełniania dla zaawansowanego wieku. Zmiany czynności podstawowej serca obserwowane w modelu myszy rozwijających miażdżycę dotyczyły istotnie zwiększonego rytmu serca oraz spadku objętości późno rozkurczowej i objętości wyrzutowej w obu badanych grupach apoE/LDLR<sup>-/-</sup>, z jednoczesnym istotnym spadkiem objętości końcowo-skurczowej jedynie w grupie myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup> karmionych dietą LCHP. Stymulacja dobutaminą pozwoliła wykluczyć stany istotnego niedokrwienia w sercu, a jednocześnie wykazała silną rezerwę inotropową proporcjonalną do użytej dawki dobutaminy, wskazującą na prawidłowo zachowaną czynność skurczową lewej komory. Całkowity brak rezerwy chronotropowej w grupie myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup> karmionych dietą LCHP sugeruje wyraźne upośledzenie perfuzji naczyń wieńcowych i wzmożoną aktywację sympatycznego układu nerwowego (wzrost stężenia katecholamin we krwi). Podsumowując, przeprowadzone badania pozwoliły:

- opracować protokół badania *in vivo* czynności serca myszy na różnych etapach niewydolności serca z wykorzystaniem testu stymulacji  $\beta$ -adrenergicznej
- ocenić zmiany czynności podstawowej oraz rezerwy chronotropowej, rozkurczowej i skurczowej serca w unikatowym modelu niewydolności serca u myszy Tg $\alpha$ \*44 w trakcie progresji niewydolności serca
- ocenić zmiany czynności podstawowej oraz rezerwy chronotropowej rozkurczowej i skurczowej u myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup> rozwijających miażdżycę

spontanicznie bądź dodatkowo z przyspieszonym rozwojem patologii poprzez dietę LCHP.

W sumie opisane w tej rozprawie zaburzenia podstawowej czynności mięśnia sercowego oraz upośledzona rezerwa czynnościowa zarówno u myszy Tgαq\*44, jak i u myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup> dobrze odzwierciedla zmiany obserwowane w toku rozwoju niewydolności serca u ludzi. Zastosowanie opracowanej metodyki badawczej oraz mysich modeli niewydolności krążenia (myszy Tgαq\*44 i apoE/LDLR<sup>-/-</sup>) mogłoby być przydatne w badaniu mechanizmów odgrywających rolę w progresji niewydolności serca u ludzi i w badaniach skuteczności nowych terapii niewydolności serca.

## Abstract

Heart Failure development may be a direct effect of pathological changes in the heart structure or cardiac function or may be an indirect effect of systemic pathological processes that influence the heart and lead to cardiac remodelling with the subsequent development of the heart failure. In both cases there is a progressive impairment of systolic and diastolic cardiac function and activation of mechanisms that allow the heart to adapt for pathological condition and maintain its function preserved as long as possible. Slowly progressive changes in the cardiac function at early stages of the heart failure are difficult to assess in patients due to lack of symptoms. Detailed studies on the heart failure and its mechanisms are possible however with the use of murine models of various pathologies.

The aim of this work was to develop a dobutamine stress test protocol for cardiac magnetic resonance imaging (MRI) in mice in vivo and its application to the characterization of two different murine models of heart failure: Tg $\alpha$ q\*44 mice that develop dilated cardiomyopathy and apoE/LDLR<sup>-/-</sup> mice at the advanced stage of atherosclerosis when fed standard (apoE/LDLR<sup>-/-</sup>S) or Low Carbohydrate High Protein diet (apoE/LDLR<sup>-/-</sup>LCHP).

Cardiac function of the control and Tg $\alpha$ q\*44 mice at the advanced stage of heart failure was measured in vivo using cine FLASH MRI (Bruker 4,7 T) at rest and under  $\beta$ -adrenergic test (dobutamine). Based on cardiac cycle curve following parameters were obtained Ejection Fraction, Cardiac Output, Stroke Volume, End Systolic Volume and End Diastolic Volume. For determination of appropriate doses of dobutamine in the i.p. injection during MRI protocol, 5 different doses were injected i.p. in the range from 0,15 mg/kg to 20 mg/kg.

Low and high dobutamine doses that uncovered cardiac inotropic changes and gave reproducible results, were: 0,5 and 5 mg/kg. These doses were applied to the characterization of cardiac changes in Tg $\alpha$ q\*44 mice (at 4, 8 and 12 months of age) and in apoE/LDLR<sup>-/-</sup> mice at the advanced stage of atherosclerosis (when fed standard or after two months of LCHP diet).

Results presented in this work confirmed previous data about resting cardiac function in Tg $\alpha$ q\*44 mice and extended them. There was: increased filling rate in Tg $\alpha$ q\*44 mice at the age of 6 months and decreased ejection rate, filing rate and ejection fraction at the age of 16 months and uncovered lack of cardiac chronotropic

reserve at the age of 8 months, then cardiac systolic and diastolic kinetic deterioration at the age of 12 months of age. Further changes involved decreased ejection fraction and stroke volume (at the age of 15 months of age), and then, at the decompensation stage of disease (16-18 months of age): low and high dose of dobutamine uncovered cardiac ischemic response. Obtained results suggest profound influence of diastolic function at early stage in Tgαq\*44 mice that proceed contractility impairment and cardiac decompensation in course of the development of dilated cardiomyopathy and successive exhaustion of cardiac chronotropic and inotropic reserve, with secondary impairment of coronary perfusion that leads to a typical ischemic dobutamine response.

Changes in cardiac function as regards apoE/LDLR<sup>-/-</sup> mice were as follows: accelerated heart rate, decreased end diastolic volume and decreased stroke volume. ApoE/LDLR<sup>-/-</sup> mice on LCHP diet had additionally decreased end systolic volume. Dobutamine stress test confirmed preserved contractility (as decreased end systolic area and increased fractional area change) and uncovered lack of slice cardiac output in apoE/LDLR<sup>-/-</sup>S and apoE/LDLR<sup>-/-</sup>LCHP mice with lack of chronotropic reserve only in the latter group.

In conclusion, MRI based methodology for the assessment of cardiac function using i.p. low and high dobutamine dose stress test allowed for better characterization of cardiac function in heart failure in Tgαq\*44 mice developing dilated cardiomyopathy and apoE/LDLR<sup>-/-</sup> with advanced atherosclerosis then basal cardiac assessment neither assessment based on one dose. This experience may be well used in future experimental studies to explore cardioprotective therapies and mechanism of heart failure progression.



## 8. Spis ilustracji

Rycina 1. Schemat ułożenia myszy w łóżeczku pomiarowym. ....	16
Rycina 2. Parametry czynności serca wyznaczone na podstawie zmian powierzchni lewej komory w czasie cyklu. ....	18
Rycina 3. Wartości powierzchni końcowo-skurczowej (ESA) u myszy FVB i Tgaq*44 w odpowiedzi na stymulację dobutaminą w zakresie dawek niskich ( $\leq 1,5$ mg/kg) oraz w zakresie dawek wysokich ( $\geq 1,5$ mg/kg). ....	24
Rycina 4. Wartości powierzchni końcowo-rozkurczowej (EDA) dla myszy FVB i Tgaq*44 w odpowiedzi na stymulację dobutaminą w zakresie dawek niskich ( $\leq 1,5$ mg/kg) oraz w zakresie dawek wysokich ( $\geq 1,5$ mg/kg). ....	25
Rycina 5. Wartości zmiany powierzchniowej frakcji wyrzutowej (FAC) dla myszy FVB i Tgaq*44 w odpowiedzi na stymulację dobutaminą w zakresie dawek niskich ( $\leq 1,5$ mg/kg) oraz w zakresie dawek wysokich ( $\geq 1,5$ mg/kg). ....	26
Rycina 6. Wartości wyrzutowej zmiany powierzchni (SAC) u myszy FVB i Tgaq*44 w odpowiedzi na stymulację dobutaminą w zakresie dawek niskich ( $\leq 1,5$ mg/kg) oraz w zakresie dawek wysokich ( $\geq 1,5$ mg/kg). ....	27
Rycina 7. Zmiany kinetyki wyrzutu lewej komory (ER) u myszy FVB i Tgaq*44 w odpowiedzi na stymulację dobutaminą w zakresie dawek niskich ( $\leq 1,5$ mg/kg) oraz w zakresie dawek wysokich ( $\geq 1,5$ mg/kg). ....	28
Rycina 8. Zmiany kinetyki napełniania lewej komory (FR) u myszy FVB i Tgaq*44 w odpowiedzi na stymulację dobutaminą w zakresie dawek niskich ( $\leq 1,5$ mg/kg) oraz w zakresie dawek wysokich ( $\geq 1,5$ mg/kg). ....	29
Rycina 9. Wartości powierzchni końcowo-skurczowej (ESA) oraz końcowo-rozkurczowej (EDA) w odpowiedzi na stymulację dobutaminą w dawce niskiej (0,5 mg/kg) i wysokiej (5 mg/kg) w grupach myszy kontrolnych FVB w wieku 4-6 oraz 15 miesięcy. ....	33
Rycina 10. Wartości powierzchniowej zmiany frakcji wyrzutowej (FAC) oraz wyrzutowej zmiany powierzchni (SAC) w odpowiedzi na stymulację dobutaminą w dawce niskiej (0,5 mg/kg) i wysokiej (5 mg/kg) w grupach myszy kontrolnych FVB w wieku 4-6 oraz 15 miesięcy. ....	34
Rycina 11. Wartości powierzchniowej zmiany rzutu serca (SCO) i rytmu serca (HR) w odpowiedzi na stymulację dobutaminą w dawce 0,5 mg/kg i 5 mg/kg w grupach myszy kontrolnych FVB w wieku 4-6 oraz 15 miesięcy. ....	35

- Rycina 12. Wartości kinetyki wyrzutu (ER) i kinetyki napełniania (FR) w odpowiedzi na stymulację dobutaminą w dawce 0,5 mg/kg i 5 mg/kg w grupach myszy kontrolnych FVB w wieku 4-6 oraz 15 miesięcy. .... 36
- Rycina 13. Wartości objętości końcowo-skurczowej (ESV) i końcowo-rozkurczowej (EDV) lewej komory serca w poszczególnych grupach wiekowych myszy Tgaq\*44 (4, 6, 12 i 15 miesięcznych). .... 38
- Rycina 14. Wartości frakcji wyrzutowej (EF) i objętości wyrzutowej (SV) lewej komory serca w poszczególnych grupach wiekowych myszy Tgaq\*44 (4, 6, 12 i 15 miesięcznych). .... 39
- Rycina 15. Zmiany kinetyki wyrzutu (ER) i kinetyki napełniania (FR) lewej komory u myszy Tgaq\*44 w zależności od wieku. .... 40
- Rycina 16. Wartości powierzchni końcowo-skurczowej (ESA) i końcowo-rozkurczowej (EDA) po stymulacji dobutaminą w dawce niskiej (0,5 mg/kg) oraz w dawce wysokiej (5 mg/kg), w badaniu myszy Tgaq\*44 w wieku 4, 8, 12 oraz 16-18 miesięcznych..... 42
- Rycina 17. Wartości powierzchniowej zmiany frakcji wyrzutowej (FAC) oraz wyrzutowej zmiany powierzchni (SAC) po stymulacji dobutaminą dla dawki niskiej (0,5 mg/kg) oraz wysokiej (5 mg/kg) dawki u myszy Tgaq\*44 w wieku 4, 8, 12 miesięcy oraz 16-18 miesięcznych..... 43
- Rycina 18. Wartości powierzchniowej zmiany rzutu serca (SCO) oraz rytmu serca (HR) po stymulacji dobutaminą w niskiej (0,5 mg/kg) oraz wysokiej (5 mg/kg) dawce, badane u myszy Tgaq\*44 w wieku 4, 8, 12 oraz 16-18 miesięcznych..... 44
- Rycina 19. Wartości kinetyki wyrzutu (ER) oraz kinetyki napełniania (FR) po stymulacji dobutaminą w niskiej (0,5 mg/kg) oraz wysokiej (5 mg/kg) dawce, badane w grupach myszy Tgaq\*44 w wieku 4, 8, 12 oraz 16-18 miesięcznych. .... 45
- Rycina 20. Wartości powierzchni końcowo-skurczowej (ESA) oraz końcowo-rozkurczowej (EDA) po stymulacji dobutaminą w dawce niskiej (0,5 mg/kg) oraz w dawce wysokiej (5 mg/kg) w grupie kontrolnej myszy C57BL/6, oraz w grupie rozwijającej miażdżycę: myszy apoE/LDLR<sup>-/-</sup>S oraz apoE/LDLR<sup>-/-</sup>LCHP. .... 50
- Rycina 21. Wartości powierzchniowej zmiany frakcji wyrzutowej (FAC) oraz wyrzutowej zmiany powierzchni (SAC) po stymulacji dobutaminą w dawce niskiej (0,5 mg/kg) oraz w dawce wysokiej (5 mg/kg) w grupie kontrolnej myszy C57BL/6, oraz w grupie myszy z miażdżycą na diecie standardowej (apoE/LDLR<sup>-/-</sup>S) oraz LCHP (apoE/LDLR<sup>-/-</sup>LCHP). .... 51
- Rycina 22. Wartości powierzchniowej zmiany rzutu serca (SCO) oraz rytmu serca (HR) po stymulacji dobutaminą w dawce niskiej (0,5 mg/kg) oraz w dawce

wysokiej (5 mg/kg) w grupie kontrolnej myszy C57BL/6, oraz w grupie myszy z miażdżycą na diecie standardowej (apoE/LDLR <sup>-/-</sup> S) oraz na diecie LCHP (apoE/LDLR <sup>-/-</sup> LCHP).....	52
Rycina 23. Wartości kinetyki wyrzutu (ER) oraz kinetyki napelniania (FR) po stymulacji dobutaminą w dawce niskiej (0,5 mg/kg) oraz w dawce wysokiej (5 mg/kg) u myszy C57BL/6, oraz u myszy z miażdżycą na diecie standardowej (apoE/LDLR <sup>-/-</sup> S) oraz diecie LCHP (apoE/LDLR <sup>-/-</sup> LCHP).....	53
Rycina 24. Zmiana objętości komory oraz warstwy w ocenie objętości bądź warstwy końcowo-rozkurczowej lewej komory (EDV względem EDA).....	64
Rycina 25. Zmiana objętości komory i warstwy w ocenie objętości bądź warstwy końcowo-skurczowej lewej komory (ESV względem ESA).....	64

## 9. Spis tabel

Tabela 1. Wartości parametrów czynnościowych serca w badaniu podstawowym lewej komory w grupach myszy FVB w wieku 4 miesiące oraz myszy Tgαq*44 w wieku 16-18 miesięcy. ....	22
Tabela 2. Wartości parametrów podstawowej czynności lewej komory serca myszy szczepu FVB w wieku 4 i 15 miesięcy; * oznacza p<0.05 dla grupy FVB w wieku 15 miesięcy w porównaniu do grupy FVB w wieku 4 miesiące. ....	31
Tabela 3. Porównanie wartości parametrów dotyczących objętości lewej komory serca dla szczepu FVB oraz Tgαq*44 w wieku 4 oraz 15 miesięcy. ....	47
Tabela 4. Porównanie parametrów czynności lewej komory bazujących na pomiarze pojedynczej warstwy dla szczepu FVB oraz Tgαq*44 w wieku 4 oraz 15 miesięcy. ....	47
Tabela 5. Czynność lewej komory u myszy apoE/LDLR-/-S oraz apoE/LDLR-/-LCHP w porównaniu z czynnością lewej komory dla myszy C57BL/6. ....	48

## 10. Bibliografia

- [1] G. S. Francis, S. R. Goldsmith, T. B. Levine, M. T. Olivari and J. N. Cohn, *The neurohumoral axis in congestive heart failure*. *Ann Intern Med* 101, 370-377 (1984).
- [2] R. F. Kelly, W. Sluiter and E. O. McFalls, *Hibernating myocardium: is the program to survive a pathway to failure?* *Circ Res* 102, 3-5 (2008).
- [3] J. J. McMurray, S. Adamopoulos, S. D. Anker, A. Auricchio, M. Bohm, K. Dickstein, V. Falk, G. Filippatos, C. Fonseca, M. A. Gomez-Sanchez, T. Jaarsma, L. Kober, G. Y. Lip, A. P. Maggioni, A. Parkhomenko, B. M. Pieske, B. A. Popescu, P. K. Ronnevik, F. H. Rutten, J. Schwitter, P. Seferovic, J. Stepinska, P. T. Trindade, A. A. Voors, F. Zannad, A. Zeiher, J. J. Bax, H. Baumgartner, C. Ceconi, V. Dean, C. Deaton, R. Fagard, C. Funck-Brentano, D. Hasdai, A. Hoes, P. Kirchhof, J. Knuuti, P. Kolh, T. McDonagh, C. Moulin, B. A. Popescu, Z. Reiner, U. Sechtem, P. A. Sirnes, M. Tendera, A. Torbicki, A. Vahanian, S. Windecker, T. McDonagh, U. Sechtem, L. A. Bonet, P. Avraamides, H. A. Ben Lamin, M. Brignole, A. Coca, P. Cowburn, H. Dargie, P. Elliott, F. A. Flachskampf, G. F. Guida, S. Hardman, B. Iung, B. Merkely, C. Mueller, J. N. Nanas, O. W. Nielsen, S. Orn, J. T. Parissis and P. Ponikowski, *ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. *Eur J Heart Fail* 14, 803-869 (2012).
- [4] A. Ahmed, *Myocardial beta-1 adrenoceptor down-regulation in aging and heart failure: implications for beta-blocker use in older adults with heart failure*. *Eur J Heart Fail* 5, 709-715 (2003).
- [5] A. Madamanchi, *Beta-adrenergic receptor signaling in cardiac function and heart failure*. *Mcgill J Med* 10, 99-104 (2007).
- [6] T. E. Owan, D. O. Hodge, R. M. Herges, S. J. Jacobsen, V. L. Roger and M. M. Redfield, *Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction*. *N Engl J Med* 355, 251-259 (2006).
- [7] R. S. Vasan, M. G. Larson, E. J. Benjamin, J. C. Evans, C. K. Reiss and D. Levy, *Congestive heart failure in subjects with normal versus reduced left ventricular ejection fraction: prevalence and mortality in a population-based cohort*. *J Am Coll Cardiol* 33, 1948-1955 (1999).
- [8] L. H. Michael, C. M. Ballantyne, J. P. Zachariah, K. E. Gould, J. S. Pocius, G. E. Taffet, C. J. Hartley, T. T. Pham, S. L. Daniel, E. Funk and M. L. Entman, *Myocardial infarction and remodeling in mice: effect of reperfusion*. *Am J Physiol* 277, H660-H668 (1999).
- [9] L. Drelicharz, V. Kozlovski, T. Skorka, S. Heinze-Paluchowska, A. Jasinski, A. Gebaska, T. Guzik, R. Olszanecki, L. Wojnar, U. Mende, G. Csanyi and S. Chlopicki, *NO and PGI(2) in coronary endothelial dysfunction in transgenic mice with dilated cardiomyopathy*. *Basic Res Cardiol* 103, 417-430 (2008).
- [10] L. Drelicharz, M. Wozniak, T. Skorka, U. Tyrankiewicz, S. Heinze-Paluchowska, M. Jablonska, A. Gebaska and S. Chlopicki, *Application of*

- magnetic resonance imaging in vivo for the assessment of the progression of systolic and diastolic dysfunction in a mouse model of dilated cardiomyopathy.* *Kardiol Pol* 67, 386-395 (2009).
- [11] I. F. Edes, A. Toth, G. Csanyi, M. Lomnicka, S. Chlopicki, I. Edes and Z. Papp, *Late-stage alterations in myofibrillar contractile function in a transgenic mouse model of dilated cardiomyopathy (Tgalphaq\*44).* *J Mol Cell Cardiol* 45, 363-372 (2008).
- [12] M. Elas, J. Bielanska, K. Pustelny, P. M. Plonka, L. Drelicharz, T. Skorka, U. Tyrankiewicz, M. Wozniak, S. Heinze-Paluchowska, M. Walski, L. Wojnar, D. Fortin, R. Ventura-Clapier and S. Chlopicki, *Detection of mitochondrial dysfunction by EPR technique in mouse model of dilated cardiomyopathy.* *Free Radic Biol Med* 45, 321-328 (2008).
- [13] U. Mende, C. Semsarian, D. C. Martins, A. Kagen, C. Duffy, F. J. Schoen and E. J. Neer, *Dilated cardiomyopathy in two transgenic mouse lines expressing activated G protein alpha(q): lack of correlation between phospholipase C activation and the phenotype.* *J Mol Cell Cardiol* 33, 1477-1491 (2001).
- [14] U. Mackiewicz, E. Czarnowska, M. Brudek, B. Pajak, M. Duda, K. Emanuel, G. Csanyi, A. Fedorowicz, E. Grochal, U. Tyrankiewicz, T. Skorka, U. Mende, B. Lewartowski and S. Chlopicki, *Preserved cardiomyocyte function and altered desmin pattern in transgenic mouse model of dilated cardiomyopathy.* *J Mol Cell Cardiol* 52, 978-987 (2012).
- [15] S. Bonthu, D. D. Heistad, D. A. Chappell, K. G. Lamping and F. M. Faraci, *Atherosclerosis, vascular remodeling, and impairment of endothelium-dependent relaxation in genetically altered hyperlipidemic mice.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 2333-2340 (1997).
- [16] J. L. Breslow, *Mouse models of atherosclerosis.* *Science* 272, 685-688 (1996).
- [17] G. Caligiuri, B. Levy, J. Pernow, P. Thoren and G. K. Hansson, *Myocardial infarction mediated by endothelin receptor signaling in hypercholesterolemic mice.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6920-6924 (1999).
- [18] R. B. Kostogrys, M. Franczyk-Zarow, E. Maslak, M. Gajda, L. Mateuszuk, C. L. Jackson and S. Chlopicki, *Low carbohydrate, high protein diet promotes atherosclerosis in apolipoprotein E/low-density lipoprotein receptor double knockout mice (apoE/LDLR(-/-)).* *Atherosclerosis* 223, 327-331 (2012).
- [19] J. Vincelette, B. Martin-McNulty, R. Vergona, M. E. Sullivan and Y. X. Wang, *Reduced cardiac functional reserve in apolipoprotein E knockout mice.* *Transl Res* 148, 30-36 (2006).
- [20] J. Gronros, J. Wikstrom, U. Hagg, B. Wandt and L. M. Gan, *Proximal to middle left coronary artery flow velocity ratio, as assessed using color Doppler echocardiography, predicts coronary artery atherosclerosis in mice.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 1126-1131 (2006).
- [21] S. V. Raman and O. P. Simonetti, *The CMR examination in heart failure.* *Heart Fail Clin* 5, 283-300, v (2009).
- [22] J. Schwitter, *Extending the frontiers of cardiac magnetic resonance.* *Circulation* 118, 109-112 (2008).

- [23] J. Schwitter and A. E. Arai, *Assessment of cardiac ischaemia and viability: role of cardiovascular magnetic resonance*. Eur Heart J 32, 799-809 (2011).
- [24] L. Stegger, K. P. Schafers, U. Flogel, L. Livieratos, S. Hermann, C. Jacoby, P. Keul, E. M. Conway, O. Schober, J. Schrader, B. Levkau and M. Schafers, *Monitoring left ventricular dilation in mice with PET*. J Nucl Med 46, 1516-1521 (2005).
- [25] M. H. Vandsburger and F. H. Epstein, *Emerging MRI methods in translational cardiovascular research*. J Cardiovasc Transl Res 4, 477-492 (2011).
- [26] F. Wiesmann, J. Ruff, C. Dienesch, A. Leupold, E. Rommel, A. Haase and S. Neubauer, *Cardiovascular phenotype characterization in mice by high resolution magnetic resonance imaging*. MAGMA 11, 10-15 (2000).
- [27] F. Wiesmann, J. Ruff, S. Engelhardt, L. Hein, C. Dienesch, A. Leupold, R. Illinger, A. Frydrychowicz, K. H. Hiller, E. Rommel, A. Haase, M. J. Lohse and S. Neubauer, *Dobutamine-stress magnetic resonance microimaging in mice : acute changes of cardiac geometry and function in normal and failing murine hearts*. Circ Res 88, 563-569 (2001).
- [28] S. Heinze-Paluchowska, T. Skorka, L. Drelicharz, S. Chlopicki and A. Jasinski, *MR imaging of mouse heart in vivo using a specialized probehead and gradient system*. Pol J Chem 80, 1133 (2006).
- [29] J. You, J. Wu, J. Ge and Y. Zou, *Comparison between adenosine and isoflurane for assessing the coronary flow reserve in mouse models of left ventricular pressure and volume overload*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 303, H1199-H1207 (2012).
- [30] S. Kosecka, L. Wojnar, R. Petryniak, T. Skorka, S. Heinze-Paluchowska, U. Tyrankiewicz and S. Chlopicki, *Application of image analysis for quantification of cardiac function in vivo by MRI in the mouse model of heart failure*. Inzynieria Materiałowa 29, 459-462 (2008).
- [31] R. Clark, R. Mannikko, D. J. Stuckey, M. Iberl, K. Clarke and F. M. Ashcroft, *Mice expressing a human K(ATP) channel mutation have altered channel ATP sensitivity but no cardiac abnormalities*. Diabetologia 55, 1195-1204 (2012).
- [32] M. W. Merx, E. A. Liehn, U. Janssens, R. Lutticken, J. Schrader, P. Hanrath and C. Weber, *HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin profoundly improves survival in a murine model of sepsis*. Circulation 109, 2560-2565 (2004).
- [33] V. J. McIntosh, P. C. Chandrasekera and R. D. Lasley, *Sex differences and the effects of ovariectomy on the beta-adrenergic contractile response*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 301, H1127-H1134 (2011).
- [34] A. Evangelista, F. A. Flachskampf, R. Erbel, F. ntonini-Canterin, C. Vlachopoulos, G. Rocchi, R. Sicari, P. Nihoyannopoulos, J. Zamorano, M. Pepi, O. A. Breithardt and E. Plonska-Gosciniak, *Echocardiography in aortic diseases: EAE recommendations for clinical practice*. Eur J Echocardiogr 11, 645-658 (2010).
- [35] S. F. Nagueh, C. P. Appleton, T. C. Gillebert, P. N. Marino, J. K. Oh, O. A. Smiseth, A. D. Waggoner, F. A. Flachskampf, P. A. Pellikka and A. Evangelisa, *Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography*. Eur J Echocardiogr 10, 165-193 (2009).

- [36] D. Poldermans, P. M. Fioretti, E. Boersma, J. J. Bax, I. R. Thomson, J. R. Roelandt and M. L. Simoons, *Long-term prognostic value of dobutamine-atropine stress echocardiography in 1737 patients with known or suspected coronary artery disease: A single-center experience*. *Circulation* 99, 757-762 (1999).
- [37] P. Gurha, C. breu-Goodger, T. Wang, M. O. Ramirez, A. L. Drumond, D. S. van, Y. Chen, N. Bartonicek, A. J. Enright, B. Lee, R. J. Kelm, Jr., A. K. Reddy, G. E. Taffet, A. Bradley, X. H. Wehrens, M. L. Entman and A. Rodriguez, *Targeted deletion of microRNA-22 promotes stress-induced cardiac dilation and contractile dysfunction*. *Circulation* 125, 2751-2761 (2012).
- [38] M. Huntgeburth, K. Tiemann, R. Shahverdyan, K. D. Schluter, R. Schreckenber, M. L. Gross, S. Modersheim, E. Caglayan, J. Muller-Ehmsen, A. Ghanem, M. Vantler, W. H. Zimmermann, M. Bohm and S. Rosenkranz, *Transforming growth factor beta(1) oppositely regulates the hypertrophic and contractile response to beta-adrenergic stimulation in the heart*. *PLoS One* 6, e26628 (2011).
- [39] C. U. Lorentz, W. R. Woodward, K. Tharp and B. A. Habecker, *Altered norepinephrine content and ventricular function in p75NTR<sup>-/-</sup> mice after myocardial infarction*. *Auton Neurosci* 164, 13-19 (2011).
- [40] D. J. Stuckey, C. A. Carr, P. Camelliti, D. J. Tyler, K. E. Davies and K. Clarke, *In vivo MRI characterization of progressive cardiac dysfunction in the mdx mouse model of muscular dystrophy*. *PLoS One* 7, e28569 (2012).
- [41] M. H. Vandsburger, B. A. French, P. A. Helm, R. J. Roy, C. M. Kramer, A. A. Young and F. H. Epstein, *Multi-parameter in vivo cardiac magnetic resonance imaging demonstrates normal perfusion reserve despite severely attenuated beta-adrenergic functional response in neuronal nitric oxide synthase knockout mice*. *Eur Heart J* 28, 2792-2798 (2007).
- [42] C. Christoffersen, E. Bollano, M. L. Lindegaard, E. D. Bartels, J. P. Goetze, C. B. Andersen and L. B. Nielsen, *Cardiac lipid accumulation associated with diastolic dysfunction in obese mice*. *Endocrinology* 144, 3483-3490 (2003).
- [43] J. L. Daire, J. P. Jacob, J. N. Hyacinthe, P. Croisille, K. Montet-Abou, S. Richter, D. Botsikas, M. Lepetit-Coiffe, D. Morel and J. P. Vallee, *Cine and tagged cardiovascular magnetic resonance imaging in normal rat at 1.5 T: a rest and stress study*. *J Cardiovasc Magn Reson* 10, 48 (2008).
- [44] P. Meneton, M. Bloch-Faure, A. A. Hagege, H. Ruetten, W. Huang, S. Bergaya, D. Ceiler, D. Gehring, I. Martins, G. Salmon, C. M. Boulanger, J. Nussberger, B. Crozatier, J. M. Gasc, D. Heudes, P. Bruneval, T. Doetschman, J. Menard and F. henc-Gelas, *Cardiovascular abnormalities with normal blood pressure in tissue kallikrein-deficient mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2634-2639 (2001).
- [45] M. Rubio, I. Bodi, G. A. Fuller-Bicer, H. S. Hahn, M. Periasamy and A. Schwartz, *Sarcoplasmic reticulum adenosine triphosphatase overexpression in the L-type Ca<sup>2+</sup> channel mouse results in cardiomyopathy and Ca<sup>2+</sup> -induced arrhythmogenesis*. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 10, 235-249 (2005).
- [46] G. F. Fletcher, G. J. Balady, E. A. Amsterdam, B. Chaitman, R. Eckel, J. Fleg, V. F. Froelicher, A. S. Leon, I. L. Pina, R. Rodney, D. A. Simons-Morton, M. A.



- Williams and T. Bazzarre, *Exercise standards for testing and training: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association*. *Circulation* 104, 1694-1740 (2001).
- [47] C. M. Kramer, J. Barkhausen, S. D. Flamm, R. J. Kim and E. Nagel, *Standardized cardiovascular magnetic resonance imaging (CMR) protocols, society for cardiovascular magnetic resonance: board of trustees task force on standardized protocols*. *J Cardiovasc Magn Reson* 10, 35 (2008).
- [48] E. G. Lakatta, *Heart aging: a fly in the ointment?* *Circ Res* 88, 984-986 (2001).
- [49] D. F. Dai, L. F. Santana, M. Vermulst, D. M. Tomazela, M. J. Emond, M. J. MacCoss, K. Gollahon, G. M. Martin, L. A. Loeb, W. C. Ladiges and P. S. Rabinovitch, *Overexpression of catalase targeted to mitochondria attenuates murine cardiac aging*. *Circulation* 119, 2789-2797 (2009).
- [50] R. M. de Jong, J. H. Cornel, H. J. Crijns and D. J. van Veldhuisen, *Abnormal contractile responses during dobutamine stress echocardiography in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy*. *Eur J Heart Fail* 3, 429-436 (2001).
- [51] Y. X. Wang, M. Halks-Miller, R. Vergona, M. E. Sullivan, R. Fitch, C. Mallari, B. Martin-McNulty, C. da, V, A. Freay, G. M. Rubanyi and K. Kauser, *Increased aortic stiffness assessed by pulse wave velocity in apolipoprotein E-deficient mice*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278, H428-H434 (2000).
- [52] A. Hjalmarson, *Significance of reduction in heart rate in cardiovascular disease*. *Clin Cardiol* 21, II3-II7 (1998).
- [53] G. Hasenfuss, *Benefit of heart rate reduction in heart failure*. *Curr Heart Fail Rep* 7, 156-158 (2010).
- [54] D. Merkus, F. Kajiya, H. Vink, I. Vergroesen, J. Dankelman, M. Goto and J. A. Spaan, *Prolonged diastolic time fraction protects myocardial perfusion when coronary blood flow is reduced*. *Circulation* 100, 75-81 (1999).
- [55] G. D. Giannoglou, Y. S. Chatzizisis, C. Zamboulis, G. E. Parcharidis, D. P. Mikhailidis and G. E. Louridas, *Elevated heart rate and atherosclerosis: an overview of the pathogenetic mechanisms*. *Int J Cardiol* 126, 302-312 (2008).
- [56] J. Daly, D. Jackson and P. M. Davidson, *The experience of hope for survivors of acute myocardial infarction (AMI): a qualitative research study*. *Aust J Adv Nurs* 16, 38-44 (1999).
- [57] C. J. Hartley, A. K. Reddy, S. Madala, B. Martin-McNulty, R. Vergona, M. E. Sullivan, M. Halks-Miller, G. E. Taffet, L. H. Michael, M. L. Entman and Y. X. Wang, *Hemodynamic changes in apolipoprotein E-knockout mice*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279, H2326-H2334 (2000).
- [58] Y. X. Wang, *Cardiovascular functional phenotypes and pharmacological responses in apolipoprotein E deficient mice*. *Neurobiol Aging* 26, 309-316 (2005).
- [59] L. K. Cole, V. W. Dolinsky, J. R. Dyck and D. E. Vance, *Impaired phosphatidylcholine biosynthesis reduces atherosclerosis and prevents lipotoxic cardiac dysfunction in ApoE<sup>-/-</sup> Mice*. *Circ Res* 108, 686-694 (2011).