

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

**Milda Kuprytė**

**IŠEMINĖS KILMĖS ŠIRDIES  
NEPAKANKAMUMAS:  
PROGNOZINIŲ MIOKARDO  
STRUKTŪROS ŽYMENŲ TYRIMAS**

Daktaro disertacija  
Medicinos ir sveikatos mokslai,  
medicina (M 001)

Kaunas, 2025

Disertacija rengta 2019–2024 metais Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Kardiologijos instituto Kardialinės patologijos laboratorijoje.

### **Mokslinė vadovė**

prof. habil. dr. Vaiva Lesauskaitė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

### **Konsultantė**

prof. habil. dr. Dalia Pangonytė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

### **Disertacija ginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Medicinos mokslo krypties taryboje:**

### **Pirmininkas**

prof. habil. dr. Renaldas Jurkevičius (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

### **Nariai:**

prof. dr. Ingrida Balnytė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001);

prof. dr. Arvydas Laurinavičius (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001);

prof. dr. Dainius Haroldas Pauža (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010);

prof. dr. Marleen Praet (Gento universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Disertacija ginama viešajame Medicinos mokslo krypties tarybos posėdyje 2025 m. balandžio 9 d. 11 val. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Kardiologijos instituto Simpoziumų salėje.

Adresas: Sukilėlių pr. 15, LT-50162 Kaunas, Lietuva.

LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES

**Milda Kuprytė**

**ISCHEMIC HEART FAILURE:  
STUDY OF PROGNOSTIC  
MYOCARDIAL STRUCTURE  
MARKERS**

Doctoral Dissertation  
Medical and Health Sciences,  
Medicine (M 001)

Kaunas, 2025

The Dissertation has been prepared at the Institute of Cardiology of the Medical Academy of the Lithuanian University of Health Sciences during the period of 2019–2024.

### **Scientific Supervisor**

Prof. Habil. Dr. Vaiva Lesauskaitė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

### **Consultant**

Prof. Habil. Dr. Dalia Pangonytė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

### **The Dissertation is defended at the Medical Research Council of the Medical Academy of the Lithuanian University of Health Sciences:**

#### **Chairperson**

Prof. Habil. Dr. Renaldas Jurkevičius (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

#### **Members:**

Prof. Dr. Ingrida Balnytė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001);

Prof. Dr. Arvydas Laurinavičius (Vilnius University, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001);

Prof. Dr. Dainius Haroldas Pauža (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biology – N 010);

Prof. Dr. Marleen Praet (Ghent University, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

The dissertation will be defended at the open session of the Medical Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences at 11 a.m. on the 9<sup>th</sup> of April, 2025 in the Symposium Hall of the Institute of Cardiology, Lithuanian University of Health Sciences.

Address: Sukilėlių 15, LT-50162 Kaunas, Lithuania.

# TURINYS

SANTRUMPOS.....	7
ĮVADAS.....	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	13
1.1. Išeminės kilmės ŠN: etiologija, bendrieji patogeneziniai mechanizmai ir epidemiologija .....	13
1.2. Kardiomiocitų remodeliavimosi vaidmuo atsirandant ir progresuojant išeminės kilmės ŠN .....	16
1.3. Su kardiomiocitų remodeliavimusi susijusių jų baltymų raiškos reikšmė formuojantis išeminės kilmės ŠN.....	20
1.3.1. Kardiomiocitų citoskeleto filamento desmino dinamika .....	20
1.3.2. OPN – kardiomiocitų remodeliavimąsi moduliuojančio baltymo kompleksinis vaidmuo .....	24
1.3.3. Grem1 baltymo raiškos pokyčiai.....	27
1.3.4. Kardiomiocitų iRNR potranskripcinio brendimo pokyčiai .....	29
2. TIRTASIS KONTINGENTAS IR METODAI .....	33
2.1. Bioetikos leidimas .....	33
2.2. Tirtasis kontingentas.....	33
2.3. Tyrimo metodai .....	34
2.3.1. Kardiomiocitų histomorfometriniu tyrimas .....	34
2.3.2. Kardiomiocitų imunohistocheminis tyrimas .....	36
2.3.2.1. Imunohistocheminės reakcijos prieš desminą vizualizavimas ir vertinimas.....	37
2.3.2.2. Imunohistocheminės reakcijos prieš OPN vizualizavimas ir vertinimas.....	38
2.3.2.3. Imunohistocheminės reakcijos prieš Grem1 vizualizavimas ir vertinimas.....	39
2.3.2.4. Imunohistocheminės reakcijos prieš iRNR hnRNP C vizualizavimas ir vertinimas.....	40
2.4. Statistinė analizė.....	42

3.	TYRIMO REZULTATAI.....	43
3.1.	Kardiomiocitų morfometrinių parametų pokyčiai esant įvairios stadijos išeminės kilmės ŠN .....	43
3.2.	Kardiomiocitų desmino baltymo raiškos dinamika .....	49
3.3.	Kardiomiocitų OPN baltymo raiškos kaita.....	53
3.4.	Kardiomiocitų Grem1 raiškos pokyčiai.....	56
3.5.	Kardiomiocitų iRNR hnRNP C raiška .....	61
4.	TYRIMO REZULTATŲ APTARIMAS .....	66
4.1.	Kardiomiocitų remodeliavimosi ypatumai progresuojant išeminės kilmės ŠN .....	66
4.2.	Desmino struktūrinis persitvarkymas kardiomiocitų remodeliavimosi metu .....	69
4.3.	Kardiomiocitų OPN raiškos pokyčių dinamika, progresuojant išeminės kilmės ŠN .....	71
4.4.	Kardiomiocitų Grem1 raiškos ypatumai, esant skirtingų stadijų išeminės kilmės ŠN.....	74
4.5.	Kardiomiocitų hnRNP C raiška.....	77
	IŠVADOS .....	80
	KLINIKINĖ REIKŠMĖ.....	81
	TYRIMO APRIBOJIMAI.....	82
	SUMMARY .....	83
	LITERATŪRA.....	105
	PUBLIKACIJOS.....	122
	PRIEDAS .....	152
	CURRICULUM VITAE .....	153

## SANTRUMPOS

ACC	– (angl. <i>American College of Cardiology</i> ) Amerikos kardiologijos kolegija
ACTC1	– (angl. <i>cardiac muscle alpha actin</i> ) širdies raumens alfa aktinas
AHA	– (angl. <i>American Heart Association</i> ) Amerikos širdies asociacija
ANOVA	– (angl. <i>analysis of variance</i> ) dispersinė analizė
ATPazė	– adenzin trifosfatazė
$\beta$ 2AR	– (angl. <i>beta 2 adrenergic receptor</i> ) beta 2 adrenerginis receptorius
cAMP	– (angl. <i>cyclic adenosine monophosphate</i> ) ciklinis adenzino monofosfatas
CD	– (angl. <i>cluster of differentiation</i> ) diferenciacijos antigenas
CELF	– (angl. <i>CUG triplet RNA binding protein, Elav-like family member</i> ) citozino-uracilo-guanino RNR tripletus surišantis baltymas, priklausantis į Elav panašių baltymų šeimai
CHAMP	– (angl. <i>chromosome alignment maintaining phosphoprotein</i> ) chromosomų išrikiavimą reguliuojantis fosfoproteinas
CXC10	– (angl. <i>C-X-C motif chemokine 10</i> ) C-X-C motyvo chemokinas 10
EGFR	– (angl. <i>epithelial growth factor receptor</i> ) epitelio augimo veiksnio receptorius
Elav	– (angl. <i>embryon lethality / abnormal visual</i> ) drozofilose nustatyta genų mutacija, susijusi su padidėjusiu embriono mirštamumu ir pažeista rega
ELK1	– (angl. <i>erythroblast transformation specific-like protein 1</i> ) į eritroblastų transformacijos veiksni panašus baltymas, aktyvinantis transkripciją
Epac1	– (angl. <i>exchange factor activated by cAMP 1</i> ) cAMP aktyvintas keitimo faktorius 1
ERK1-2	– (angl. <i>extracellular signal-regulated kinase 1–2</i> ) užląstelinio signalo reguliuojama kinazė 1–2
FHL2	– (angl. <i>four and a half LIM domains protein 2</i> ) keturi su puse LIM domenų baltymas 2
FXR1	– (angl. <i>fragile X mental retardation syndrome-related protein 1</i> ) su trapiosios X protinio atsilikimo sindromu susijęs baltymas 1
Grem1	– gremlinas 1
hnRNP	– (angl. <i>heterogenous nuclear ribonucleoprotein</i> ) heterogeninis branduolio ribonukleoproteinas
iRNR	– informacinė ribonukleorūgštis
YAP1	– (angl. <i>yes-associated protein 1</i> ) transkripcijos veiksnys, aktyvinantis ląstelių proliferaciją ir slopinantis proapoptozinių baltymų genų raišką
$\kappa$	– kapa koeficientas
kDa	– kilodaltonas
LIM	– (angl. <i>acronym of LIN-11, Isl-1, and MEC-3</i> ) aminorūgščių grandinės domenas, kuris dalyvauja pernešant baltymus į eukariotinės ląstelės branduolį ir citoplazmoje susijungia su aktino citoskeleto komponentais
LMNA	– lamino baltymas
MBNL1	– (angl. <i>muscleblind-like splicing regulator 1</i> ) į raumenų slopinimą panašus ribonukleorūgščių brendimo reguliatorius 1
MEK1-2	– (angl. <i>mitogen-activated protein kinase kinase 1–2</i> ) mitogenus aktyvinančio baltymo kinazės kinazė 1–2
MIF	– (angl. <i>migration inhibitory factor</i> ) migravimą slopinantis veiksnys

MYH7	– (angl. <i>myosin heavy chain beta</i> ) miozino sunkioji grandinė beta
NYHA	– (angl. <i>New York Heart Association</i> ) Niujorko širdies asociacija
NFAT	– (angl. <i>nuclear factor of activated T-cells</i> ) aktyvintų T limfocitų branduolio veiksnys
NLRP3	– (angl. <i>nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3</i> ) su nukleotidais susijungiantis domenas, daug leucino turinčios šeimos baltymas, į kurio sudėtį įeina pirino domenas
NP	– (angl. <i>nucleoprotein of segmented negative-strand RNA virus</i> ) segmentuotos atvirkštinės RNR grandinės viruso nukleoproteinas
NRF	– (angl. <i>nuclear respiratory factor</i> ) branduolio respiracinis veiksnys
OPN	– osteopontinas
p	– tikimybė, kad alternatyvi H <sub>1</sub> hipotezė, atliekant hipotezės tikrinimo testą, yra teisinga
PDLIM5	– (angl. <i>PDZ and LIM domain 5</i> ) PDZ ir LIM domenų baltymas 5
PDZ	– (angl. <i>acronym of post synaptic density protein, Drosophila disc large tumor suppressor, and zonula occludens-1 protein</i> ) 80–90 aminorūgščių domenas, užtikrinantis sąveiką tarp ląstelės plazminės membranos ir citoskeleto komponentų
R <sup>2</sup>	– determinacijos koeficientas
r <sub>p</sub>	– Pearsono koreliacijos koeficientas
r <sub>s</sub>	– Spearmano koreliacijos koeficientas
RAF	– (angl. <i>rapidly accelerating fibrosarcoma</i> ) greitai besidauginančios fibrosarkomos kinazė
RAS	– (angl. <i>rat sarcoma virus</i> ) žiurkių sarkomos viruso baltymas
RBFOX1/2	– (angl. <i>RNA binding protein ataxin 1 / 2 homologs</i> ) su RNR susijungiančio baltymo ataksino 1 / 2 homologai
RBM	– (angl. <i>RNA binding motif protein</i> ) su RNR susijungiantis specifinės struktūros baltymas
RRID	– (angl. <i>research resource identifier</i> ) tyrimo išteklių identifikatorius
SP	– standartinė paklaida
SMAD	– (angl. „ <i>small</i> “ <i>worm phenotype and mad genes in Drosophila</i> ) transkripcijos veiksnių, kurie tiesiogiai perima signalą iš TGFβ, šeima
SRSF	– (angl. <i>serine and arginine-rich splicing factor</i> ) daug serino ir arginino turintis ribonukleorūgščių brendimo veiksnys
ŠN	– širdies nepakankamumas
TGFβ	– (angl. <i>transforming growth factor beta</i> ) transformuojantysis augimo veiksnys beta
Th1	– (angl. <i>T lymphocyte helper 1</i> ) 1 tipo T limfocitas pagalbininkas
TNNI3	– (angl. <i>troponin I3, cardiac type</i> ) troponinas I3, širdies tipas
TNNT2	– (angl. <i>troponin 2, cardiac type</i> ) troponinas 2, širdies tipas
TRA2β	– (angl. <i>transformer 2 beta</i> ) transformuojantysis 2 beta homologas
TRIS/EDTA	– tris-(hidroksimetil)-aminometanas / etilendiamintetra-acetato rūgštis
TTN	– (angl. <i>titin, or connectin</i> ) titinas, arba konektinas
VEGFR2	– (angl. <i>vascular endothelial growth factor receptor 2</i> ) kraujagyslių endotelio augimo veiksnio receptorių 2
WW	– apie 40 aminorūgščių ilgio polipeptidinės grandinės seka, į kurios sudėtį įeina dvi triptofano molekulės ir daug prolino



## ĮVADAS

Širdies nepakankamumas (ŠN) yra klinikinis sindromas, pasireiškiantis susilpnėjusia širdies funkcija dėl struktūrinių ir funkcinių pažeidimų. Iš šių pažeidimų klinikinėje praktikoje vienas dažniausiai diagnozuojamų yra išeminės kilmės ŠN [1]. Nepaisant tobulėjančios ŠN diagnostikos ir gydymo, standartizuoti pagal amžių ŠN sergamumo rodikliai ir bendras pacientų, kuriems diagnozuotas šis sindromas, skaičius didėja [2]. Prognozuojama, kad pasaulyje yra apie 64 milijonai ligonių, sergančių ŠN [1]. Todėl ŠN, kaip klinikinė, socialinė ir ekonominė problema, yra susijęs su didėjančiais hospitalizacijos [3], mirštamumo stacionare ir bendrųjų išlaidų sveikatos priežiūros sektoriuje rodikliais [4].

ŠN patogeneziniai mechanizmai yra gana plačiai apibūdinti, tačiau ankstyvųjų kompensacinių struktūrinių pokyčių, vykstančių kardiomiocituose iki pirmųjų ŠN simptomų, biologinė reikšmė ŠN formavimuisi išlieka neaiški. Dėl išeminio širdies raumens pažeidimo sukeliama viduląsteliniai molekulinio lygmens kompensaciniai procesai, kurių tikslas – atkurti ir palaikyti įprastą širdies audinio funkcionalumą [5, 6]. Šie kompleksiniai struktūriniai kompensaciniai procesai, žinomi kaip remodeliavimas, vyksta ląsteliniu ir viduląstelinio lygmenimis, keičiantis kardiomiocito citoskeleto elementams, sąveikaujantiems su šios ląstelės sarkoplazma, sarkomerais ir branduoliu, kartu keičiantis ir šios ląstelės geometrijai [7].

Dėl remodeliavimosi metu širdies skilvelių kardiomiocituose vykstančių viduląstelinių baltymų raiškos pokyčių išemijos pažeistuose audiniuose užtikrinamas kardiomiocitų plastiškumas prisitaikyti, išlikti ir atgauti pažeistų audinių funkcionalumą padidėjusio mechaninio ir oksidacinio streso sąlygomis, kartu keičiantis širdies kameros dydžiui, formai ir funkcijai [8]. Vis dėlto, užsitęsęs išemijos nulemtam miokardo remodeliavimuisi kartu eikvojami kardiomiocitų energijos ištekliai ir pažeidžiama viduląstelinės baltymų sintezės homeostazė (proteostazė) [7]. Kai viduląsteliniai kardiomiocitų kompensaciniai mechanizmai išsenka, geba išlaikyti šių ląstelių funkcionalumą vykstant remodeliavimuisi silpsta. Tai lemia viso širdies raumens funkcijos silpnėjimą, galiausiai pasireiškiantį simptominiu ŠN.

Įvertinus kardiomiocitų įtaką širdies raumens remodeliavimosi procesui ir šiose ląstelėse vykstančius baltymų raiškos persitvarkymus, vis daugiau dėmesio skiriama diagnostikos kriterijų ir žymenų, atspindinčių širdies raumens persitvarkymo metu vykstančių baltymų raiškos dinamiką ir sąsajas su kardiomiocitų formos bei funkcijos pokyčiais, paieškai [9, 10]. Nagrinėjant kardiomiocitų struktūrinės reorganizacijos biologinę reikšmę formuojantis išeminės kilmės ŠN, daug dėmesio skiriama ankstyvuosius su

kardiomiocitų remodeliavimusi ir proliferacijos geba susijusių baltymų raiškos pokyčius apibūdinantiems žymenims.

Desminas, vienas iš vyraujančių kardiomiocito citoskeleto tarpinių filamentų, yra svarbus palaikant mechaninį ląstelių atsparumą ir funkcinį integralumą vykstant remodeliavimuisi [11, 12]. Osteopontinas (OPN), fosforilintas glikoproteinas [13, 14], kaip vienas iš siūlomų ŠN gydymo taikinių [15], dalyvauja moduluojant uždegimą, stimuliuoja genų, atsakingų už kardiomiocitų hipertrofiją, raišką [16–18] ir yra svarbus perduodant signalus kitoms ląstelėms [19]. Gremlinas 1 (Grem1), Dan šeimos baltymų morfogenezinis antagonistas, yra svarbus ne tik širdies embriogenezei [20] ir audinių remodeliavimuisi [21], bet ir moduluoja angiogenezės procesus, esant hipoksinėms ląstelių mikroaplinkos sąlygoms [22]. iRNR heterogeniniai branduolio ribonukleoproteinai (iRNR hnRNP), įskaitant iRNR hnRNP C, dalyvaujantys pašalinant intronines pirminių iRNR transkriptų sekas, yra siejami su kardiomiocitų hipertrofija ir ŠN [23, 24].

Tyrimai rodo, kad šių baltymų raiškos pokyčių, vykstant širdies raumens remodeliavimuisi, apibūdinimas yra reikšmingas vertinant miokardo kontraktinio segmento ląstelių funkcinę gebą, kartu nustatomi nauji duomenys apie kardiomiocitų remodeliavimąsi, ŠN patogenezinius mechanizmus, galimus ŠN diagnostikos ir gydymo taikinius [15, 23, 25]. Klinikiniu požiūriu desmino, OPN, Grem1 ir iRNR hnRNP C raiškos pokyčių vertinimas yra svarbus ŠN rizikai įvertinti, ligos eigai stebėti, galimoms baigtims prognozuoti ir individualizuotai ŠN pacientų sveikatos priežiūrai organizuoti [23, 24, 26–30].

Nors kardiomiocitų remodeliavimosi ir baltymų raiškos persitvarkymo biologinė reikšmė ŠN formavimuisi dokumentuota, tačiau daugumos tyrimų duomenys apie kardiomiocitų geometrijos pokyčius remodeliavimosi metu yra fragmentiški [31, 32], apibūdinantys šių ląstelių geometrijos, baltymų raiškos pokyčius, kai buvo galutinės stadijos ŠN, dilatacinė kardiomiopatija ar ūminė išemija [17, 29, 33, 34]. Be to, baltymų raiškos pokyčių tyrimai dažniausiai atliekami matuojant baltymų koncentracijos pokyčius kraujo plazmoje, nesiejant šių baltymų raiškos pokyčių su konkrečių širdies raumens struktūrų (ląstelių) persitvarkymu progresuojant ŠN [10, 19, 27]. Todėl duomenys apie išeminės ŠN patogenezei reikšmingus ankstyvuosius geometrinis kardiomiocitų pokyčius remodeliavimosi metu ir baltymų, svarbių moduluojant patį kardiomiocitų remodeliavimosi procesą, raiškos persitvarkymą struktūriniu požiūriu išlieka neišsamūs, o tyrimų rezultatai sunkiai pritaikomi klinikinėje praktikoje.

## **Tyrimo tikslas**

Tyrimo tikslas – nustatyti išemine širdies liga sergančiųjų kontraktinio miokardo struktūros pakitimus, siekiant identifikuoti galimus miokardo funkcijos nepakankamumo žymenis, įvertinti šių žymenų raiškos ypatumus.

## **Tyrimo uždaviniai:**

1. Nustatyti širdies kairiojo skilvelio kardiomiocitų morfometrinių parametrų pokyčius, esant įvairios stadijos išeminės kilmės ŠN.
2. Ištirti su kardiomiocitų remodeliavimusi susijusių žymenų raiškos ypatumus, esant įvairios stadijos išeminės kilmės ŠN:
  - 2.1. išanalizuoti kardiomiocitų desmino raiškos kaitą;
  - 2.2. išnagrinėti kardiomiocitų OPN raiškos dinamiką;
  - 2.3. nustatyti kardiomiocitų Grem1 raiškos pokyčius;
  - 2.4. ištirti kardiomiocitų iRNR hnRNP C raišką.
3. Įvertinti kardiomiocitų morfometrinių parametrų ir jų remodeliavimosi žymenų sąsajas formuojantis išeminės kilmės ŠN.

## **Tyrimo naujumas ir aktualumas**

Atlikus detalų morfometrinių širdies kairiojo skilvelio tyrimą, pirmą kartą pateikiama kardiomiocitų struktūrinių pokyčių įvairovė remodeliavimosi metu, kai buvo A, B ir C–D stadijų išeminės kilmės ŠN pagal Amerikos kardiologijos kolegijos (angl. *American College of Cardiology*, ACC) / Amerikos širdies asociacijos (angl. *American Heart Association*, AHA) klasifikaciją. Iki išeminės kilmės ŠN pirmųjų simptomų atsiradimo, esant A stadijos ŠN, jau ankstyvojoje kardiomiocitų remodeliavimosi stadijoje nustatyti reikšmingi kardiomiocitų ilgio, skersmens, ploto ir tūrio pokyčiai. Šie morfometriniai rodikliai reikšmingai didėjo, esant B stadijos išeminės kilmės ŠN, o didžiausi kardiomiocitų morfometriniai rodikliai buvo, esant C–D stadijų išeminės kilmės ŠN.

Atlikus pusiau kiekybinį imunohistocheminį širdies kairiojo skilvelio tyrimą, pirmą kartą buvo detalios apibūdinti kardiomiocitų citoskeleto tarpinio filamento desmino, glikoproteino OPN, Grem1 ir iRNR potranskripcinį brendimą reguliuojančio hnRNP C raiškos pokyčiai, esant A, B ir C–D stadijų išeminės kilmės ŠN. Padidėjusi kardiomiocitų desmino, OPN ir Grem1 baltymų raiška jau buvo, esant A stadijos išeminės kilmės ŠN (ŠN rizikos). Kardiomiocitų desmino, OPN ir Grem1 baltymų raiška toliau didėjo, esant B stadijos išeminės kilmės ŠN. Esant simptominiam – pažengusiam C–D stadijų išeminės kilmės ŠN, kardiomiocitų desmino, OPN ir Grem1 baltymų raiška buvo didžiausia. Pirmą kartą dokumentuoti reikšmingi iRNR hnRNP

C baltymo raiškos kardiomiocituose pokyčiai, esant įvairios stadijos išeminės kilmės ŠN.

Progresuojant išeminės kilmės ŠN, kardiomiocitų remodeliavimosi metu nustatytos teigiamos koreliacijos tarp kardiomiocitų morfometrinių rodiklių ir desmino, OPN, Grem1 bei iRNR hnRNP C raiškos pokyčių.

Tyrimė pirmą kartą nuosekliai apibūdinta kardiomiocitų geometrijos ir baltymų raiškos pokyčių įvairovė, progresuojant išeminės kilmės ŠN, suteikia naujų mokslinių duomenų apie ankstyvuosius struktūrinius kardiomiocitų citoskeleto, remodeliavimąsi moduluojančių baltymų raiškos persitvarkymus, formuojantis išeminės kilmės ŠN. Išsamių morfometrinių ir imunohistocheminio kardiomiocitų tyrimų rezultatais įrodyta kardiomiocitų remodeliavimosi svarba išeminės kilmės ŠN patogenezei dar iki atsirandant pirmiesiems ŠN simptomams. Taip pat šie rezultatai sudaro pagrindą tolesniems kardiomiocito transkriptomo pokyčių tyrimams remodeliavimosi metu ir gali būti taikomi optimizuojant ankstyvosios išeminės kilmės ŠN diagnostikos algoritmus, ieškant naujų ŠN diagnostikos ir gydymo taikinių.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Išeminės kilmės ŠN: etiologija, bendrieji patogeneziniai mechanizmai ir epidemiologija

Kai širdies raumenyje padidėja deguonies sunaudojimas fiziologinėmis sąlygomis, suintensyvėjusi širdies vainikinių arterijų kraujotaka užtikrina padidėjusį deguonies poreikį. Progresuojant širdies vainikinių arterijų stenozei, geba aprūpinti miokardą deguonimi ir maisto medžiagomis pagal poreikius taip pat silpnėja – formuojasi miokardo išemija [35]. Išeminės kilmės širdies raumens pažeidimas dažniausiai susijęs su kliniškai reikšminga širdies vainikinių arterijų aterosklerozine stenoze [36, 37], tromboze, embolija, susiformavus komplikuotoms aterosklerozinėms plokštelėms, rečiau – su vazospazmu, arteritu, įgimtų širdies vainikinių arterijų malformacijomis [38].

Ūminės išemijos atvejais kardiomiocituose NLRP3 inflammosomos kompleksas atsiskiria nuo endoplazminio tinklo ir migruoja link mitochondrijų membranos, pažeidžiama mitochondrijų kvėpavimo grandinė, formuojasi reaktyvūs deguonies junginiai [39, 40]. Esant nežymiai išemijai kardiomiocitai geba atstatyti oksidacinio streso sukeltą funkcijos pažeidimą, reguliuojant mitochondrijų membranos poliarizaciją, adenino nukleotidų kiekį ir membranų porų selektyvų pralaidumą [41]. Vis dėlto, išemijai užsitęsus reaktyvūs deguonies junginiai, mažos molekulinės masės junginiai, susidarantys pažeidus mitochondrijų kvėpavimą reguliuojančius antioksidacinius fermentus, lemia mitochondrijų disfunkciją, keičia viduląstelinis signalus, pažeidžia viduląstelinę kalcio pusiausvyrą [42], stimuliuoja ląstelių apoptozę, nekrozę ir nespecifinio imuninio atsako reakcijas [43, 44].

Užsitęsus išemijai stimuliuojamas nespecifinis imuninis atsakas, reaktyvių deguonies junginių pagausėjimas moduliuoja uždegiminių citokinų sekreciją ir aktyvina matrikso metaloproteinazes – vyksta kolageno degradacija, pažeidžiamos miofibrilės, stimuliuojamas širdies skilvelių remodeliavimasis ir dilatacija [45]. Ūminės išemijos atveju kardiomiocitų nekrozė stimuliuoja nespecifinio imuninio atsako veikliųjų ląstelių (neutrofilinių granulocitų, makrofagų) migravimą, šalinami nekrotizavusio širdies raumens audinio fragmentai ir inicijuojama pažeistos audinio srities substitucinė reparacinė regeneracija – veikiant fibroblastams susiformuoja poinfarktinis randas [46, 47]. Užsitęsus mechaniniam ir oksidaciniam stresui, susilpnėjus miokardo kontraktilei funkcijai, aplinkinio audinio kardiomiocituose aktyvinama mitochondrijų veikla, keičiasi ląstelių medžiagų apykaita, stimuliuojama šių aplinkinių kardiomiocitų hipertrofija, kartu gausėja reaktyviųjų deguonies junginių, mažėja endogeninių antioksidacinių fermentų aktyvumas, mito-

chondrijose silpnėja oksidacinio fosforilinimo reakcijos [48]. Ilgainiui kompensacinių reakcijų veiksmingumas užsitęsusio padidėjusio krūvio ir oksidacinio streso sąlygomis silpnėja, ryškėja miokardo aktyviosios kontraktinės funkcijos nepakankamumas, progresuoja išeminės kilmės ŠN.

ŠN yra klinikinis sindromas su simptomais ir / ar požymiais, atsirandančiais dėl struktūrinių ir / ar funkcinių širdies pažeidimų, kartu didėjant natriurezinių peptidų koncentracijai ir / ar esant mažojo ir / ar didžiojo kraujo apytakos rato hiperemijos požymiams [49]. Svarbu atkreipti dėmesį, kad širdies kairiojo skilvelio išstūmio frakcija yra laikoma vienu iš pagrindinių rodiklių, padedančių diagnozuoti ŠN, jo stadiją, įvertinti ligos eigos prognozę ir pasirinkti klinikinę situaciją atitinkančią gydymo taktiką [50–52]. Įvertinus širdies struktūrinių pažeidimų apimtį, pagal ACC / AHA ŠN klasifikuojamas į [53]:

- A stadijos (ŠN rizikos) – be struktūrinių širdies ligos ar ŠN simptomų;
- B stadijos (iki ŠN) – struktūrinė širdies liga be ŠN simptomų, požymių;
- C stadijos (simptominis ŠN) – struktūrinė širdies liga su buvusiais ar esamais ŠN simptomais;
- D stadijos (pažengęs ŠN) – atsparus įprastiniam medikamentiniam ŠN gydymui, reikalingas intervencinis gydymas.

Įvertinus paciento sveikatos būklę ir funkcinį pajėgumą, pagal Niujorko širdies asociaciją (angl. *New York Heart Association*, NYHA) ŠN klasifikuojamas į [54]:

- I klasę – ŠN simptomų ir apribojimų, atliekant įprastinę fizinę veiklą (pavyzdžiui, einant, lipant laiptais), nėra;
- II klasę – nežymūs ŠN simptomai (nežymus dusulys, krūtinės anginos simptomai) ir nežymūs apribojimai, atliekant įprastą fizinę veiklą;
- III klasę – žymus fizinės veiklos apribojimas dėl ŠN simptomų, net ir atliekant mažesnio nei įprastai fizinio krūvio veiklą (pavyzdžiui, einant trumpus 20–200 metrų atstumus). ŠN simptomų nejaučiama tik esant ramybės būsenai;
- IV klasę – žymūs fizinės veiklos apribojimai. ŠN simptomai jaučiami net esant ramybės būsenai.

Įvertinus širdies kairiojo skilvelio išstūmio frakciją, ŠN klasifikuojamas į [55]:

- ŠN su labai sumažėjusia širdies kairiojo skilvelio išstūmio frakcija (širdies išstūmio frakcija  $\leq 40$  proc.);

- ŠN su sumažėjusia širdies kairiojo skilvelio išstūmio frakcija (širdies išstūmio frakcija – 41–49 proc.);
- ŠN su išsaugota širdies kairiojo skilvelio išstūmio frakcija (širdies išstūmio frakcija  $\geq$  50 proc.);
- ŠN su pagerėjusia širdies kairiojo skilvelio išstūmio frakcija (bazinė širdies kairiojo skilvelio išstūmio frakcija  $\leq$  40 proc., o širdies kairiojo skilvelio išstūmio frakcija antruoju matavimu  $>$  40 proc.).

Europoje sergamumas ŠN svyruoja nuo 12 atvejų / 1000 gyventojų Graikijoje iki 30 atvejų / 1000 gyventojų Lietuvoje ir Vokietijoje [4]. Jungtinėje Karalystėje koreguoti pagal amžių ir lytį sergamumo ŠN rodikliai 2002–2014 metų laikotarpiu buvo stabilūs ir siekė vidutiniškai 1,6 proc. [56]. Amerikoje bendras sergamumo ŠN rodiklis 2021 metais siekė 2,5 proc. [57]. Naujai diagnozuoto ŠN rodikliai siekė nuo  $<$  2 atvejų / 1000 gyventojų Italijoje iki  $\geq$  6 atvejų / 1000 gyventojų Estijoje ir Vokietijoje [4], o Nyderlanduose naujai diagnozuotų ŠN atvejų skaičius siekė 3,7 atvejo / 1000 gyventojų tarp vyrų ir 2,4 atvejo / 1000 gyventojų tarp moterų [58]. Išeminė širdies liga, kaip dažniausia ŠN su sumažėjusia kairiojo skilvelio išstūmio frakcija priežastis [59], vyrauja visuose pasaulio regionuose, išskyrus Afriką ir Aziją, kur dažniausia ŠN priežastis yra sisteminė arterinė hipertenzija [60].

Jungtinėse Amerikos Valstijose (JAV) atlikto tyrimo duomenimis, 2005–2018 metų laikotarpiu ŠN buvo viena iš trijų pagrindinių hospitalizacijos priežasčių, o 2018 metais tapo antra dažniausia hospitalizacijos priežastimi [61] ir dažniausia tarp  $>$  65 metų pacientų [62]. Pagal Europos ŠN epidemiologinius rodiklius, 2000 metais per vienerių metų laikotarpį dažniau buvo stacionarizuojami pacientai, kuriems diagnozuotas ŠN su  $<$  40 proc. sumažėjusia širdies kairiojo skilvelio išstūmio frakcija (31,9 proc.), palyginus su atvejais, kai diagnozuotas ŠN su išsaugota (23,5 proc.) ar 40–50 proc. sumažėjusia (22 proc.) širdies kairiojo skilvelio išstūmio funkcija [63].

Išanalizavus galimas ŠN baigtis Europos ir Viduržemio jūros regiono šalyse 2011–2013 metais, vienerių metų mirštamumo nuo ŠN rodikliai svyravo nuo 6,9 iki 15,6 proc. tarp pacientų, kuriems diagnozuotas lėtinis ŠN, o diagnozavus ūminį ŠN – nuo 21 iki 36,5 proc. [64]. Tarp pacientų, kuriems diagnozuotas ŠN sindromas, vieno mėnesio išgyvenamumo rodikliai siekė 95,7 proc., vienerių metų – 86,5 proc., dvejų metų – 72,6 proc., penkerių metų – 56,7 proc., o dešimties metų – 34,9 proc. [65]. Įvertinus mirties priežasčių dinamiką tarp pacientų, kuriems buvo diagnozuotas ŠN sindromas, išeminės kilmės patologijos atvejų sumažėjo nuo 74 proc. 1979–1984 metų laikotarpiu iki 51 proc. 1997–2002 metų laikotarpiu [66]. Ispanijoje išeminės kilmės patologija mirties priežastimi tarp pacientų, kuriems diagnozuotas ŠN su  $<$  50 proc. širdies kairiojo skilvelio išstūmio frakcija, nurodyta 83 proc.

atvejų 2002 metais, kai 2018 metais šis rodiklis siekė 34 proc. [67]. Jungtinėje Karalystėje atlikto tyrimo duomenimis, atvejų, kai pacientai mirė nuo išeminės kilmės ŠN, 2002–2013 metų laikotarpiu sumažėjo 27 proc. [68]. Šių ŠN rodiklių pokyčiai daugiausiai susiję su sumažėjusia staigios kardialinės mirties dėl miokardo infarkto rizika.

Vertinant ŠN epidemiologinių rodiklių dinamiką, ŠN prognozė šiek tiek pagerėjo, tačiau mirštamumo ir hospitalizacijos rodikliai tarp ŠN sergančių pacientų išlieka aukšti, o išeminės kilmės ŠN išlieka pagrindine mirties priežastimi tarp visų sergančiųjų ŠN. Remiantis epidemiologiniais prognoziniais modeliais, manoma, kad bendras sergamumas ŠN iki 2030 metų išaugs 46 proc., o sveikatos priežiūros išlaidos dėl ŠN padidės 127 proc. [57]. Todėl išeminės kilmės ŠN išlieka aktualia klinicine problema, o ankstyvieji širdies raumenyje vykstantys procesai formuojantis ŠN – reikšmingu mokslinių tyrimų objektu, siekiant įgyti daugiau žinių apie kardiomiocitų, kaip pagrindinio aktyvią kontraktilinę funkciją koordinuojančio širdies audinio komponento, struktūrinius pokyčius formuojantis ŠN, identifikuoti patikimus ankstyvos ŠN diagnostikos žymenis ir efektyvius gydymo taikinius [23].

## **1.2. Kardiomiocitų remodeliavimosi vaidmuo atsirandant ir progresuojant išeminės kilmės ŠN**

Širdies audiniuose efektyvią raumens veiklą užtikrina integraliai veikiančios komponentai – kardiomiocitai ir užląstelinė terpė, kurios sudėtyje yra skirtingų tipų kolageno ir kitų skaidulų, palaikančių bendrą širdies audinio struktūrinį integralumą. Dėl žalojamųjų veiksnių širdies audinio mikroaplinka keičiasi – aktyvinami mechanizmai, kurių tikslas – užtikrinti organizmo poreikius tenkinančią kraujotakos sistemos veiklą. Širdies remodeliavimosi vadinami dėl mechaninių ar neurohumoralinių pokyčių širdies audinyje vykstantys adaptaciniai-kompensaciniai procesai, persitvarkant širdies audinį formuojančioms ląstelių struktūroms, keičiantis širdies skilvelių dydžiui, formai ir funkcijai [69].

Procesai, kai nėštumo, augimo metu, treniruojantis suintensyvėja širdies raumens kraujotaka ir didėja kardiomiocitų tūris, yra suprantami kaip fiziologinis remodeliavimasis, o širdies raumens persitvarkymas po įvykusio ligos nulemta pažeidimo yra laikomas patologiniu remodeliavimusi [70]. Pagrindiniai širdies skilvelio remodeliavimąsi stimuliuojantys veiksniai yra susiję su skilvelio geometriniais pokyčiais ir *Laplace* dėsnio poveikiu, kai skilvelio sienos įtampa didėja tiesiogiai proporcingai skilvelio ertmės spaudimui ir spinduliui bei atvirkščiai proporcingai dvigubai skilvelio sienos storio vertei [69].



Kalbant apie išeminės kilmės širdies raumens pažeidimą, praėjus keletui dienų po miokardo infarkto, negrįžtamo ląstelių pažeidimo zonoje neutrofilinių granulocitų mažėja, daugėja pažeistos srities reparacinę regeneraciją reguliuojančių makrofagų, T limfocitų [71, 72]. Šios imuninio atsako reakcijos tęsiasi ir miokardo infarkto nepažeistose širdies raumens srityse vėlyvuju poinfarktinių zonos remodeliavimosi laikotarpiu [73]. Vėlyvuju remodeliavimosi laikotarpiu dokumentuota nespecifinio imuninio atsako veikliųjų ląstelių infiltracija ir citokinų aktyvacija stebima ir esant simptominiam ŠN, tačiau eksperimentinių duomenų, apibūdinančių šių procesų reikšmę ŠN patogenezei, trūksta [74]. Manoma, kad šiuo laikotarpiu aktyvinami kraujagyslių proliferaciją skatinantys veiksniai moduluoja gijimą, o lėtinės nespecifinės imuninio atsako reakcijos stimuliuoja pataloginį širdies raumens remodeliavimąsi.

Širdies raumenyje, ūminės išemijos atvejais atstatant kraujotaką vainikinėmis arterijomis, priklausomai nuo išemijos trukmės, sunkumo ir likutinės kraujotakos, gali išryškėti reperfuzinis miokardo pažeidimas, kurio metu kardiomiocituose sukauptas sukcinatas, atstačius kraujotaką, yra staigiai oksiduojamas, dėl ko suintensyvėja reaktyvių deguonies junginių sintezė [75]. Užsitęsusi reaktyvių deguonies junginių gamyba širdies audiniuose skatina mitochondrijų remodeliavimąsi, silpnėja energijos gamyba, aktyvinamos matrikso metaloproteinazės, taip prisidedama prie pataloginių poveikių įgautančio širdies audinio remodeliavimosi formuojantis ŠN [76].

Ankstyvuju laikotarpiu po miokardo infarkto, kai įvyksta negrįžtamas dalies kardiomiocitų pažeidimas, silpnėja kontraktinė miokardo funkcija, didėja skilvelio tūris, dėl ko proporcingai didėja įtampa skilvelio sienoje ir deguonies poreikis, o praėjus savaitėms – mėnesiams po miokardo infarkto, krūvis dar labiau padidėja, širdžiai bandant kompensuoti padidėjusį prieškrūvį ir pokrūvį [77]. Todėl kardiomiocitų hipertrofija yra tipiškas atsakas į padidėjusį krūvį, kai didėja brandžių, galutinę diferenciacijos fazę pasiekusių kardiomiocitų tūris. Didėjantis kardiomiocitų tūris, kaip fiziologinis procesas, nėštumo laikotarpiu ar intensyviai sportuojant sumažina širdies skilvelio įtampą ir deguonies suvartojimą, palaikant optimalų sistolinį tūrį. Šis procesas yra grįžtamas ir, sumažėjus krūviui, praeina be jokių pasekmių. Vis dėlto, genų, atsakingų už kardiomiocitų hipertrofiją, raišką stimuliuojanti perkrova spaudimu, tūriu ar sumažėjus miokardo kontrakcijai vyksta kaip reakcija į jau egzistuojantį širdies raumens pažeidimą. Šių persitvarkymo procesų metu eikvojami ir taip nusilpusio širdies raumens energijos ištekliai, pats remodeliavimosi procesas tampa mažiau efektyvus – progresuoja ŠN. Svarbu atkreipti dėmesį, kad fiziologinės miokardo hipertrofijos atveju širdies skilvelio sienos storis ir ertmės tūris didėja proporcingai, atitinkamai keičiantis kraujotakai, neaktyvinant specifinės pataloginės genų raiškos [78]. Kai

širdies krūvis padidėja dėl patologijos, širdies skilvelio sienos storis didėja neproporcingai skilvelio ertmės tūriui, aktyvinama fetalinių genų raiška, formuojasi su sistolinės ir / ar diastolinės funkcijos pažeidimu susijęs ŠN [79].

Miokardo remodeliavimasis, susijęs su širdies raumens hipertrofija, yra vienas svarbiausių veiksnių ŠN patogenezėje. Dėl patologijos padidėjus įtampai širdies skilvelio sienoje, kardiomiocitų mikroaplinkoje esančios ląstelės išskiria stresines signalines molekules, siekiant kompensuoti padidėjusią įtampą, šių procesų rezultatas – hipertrofiniai širdies raumens pokyčiai [80, 81]. Užsitęsusios širdies raumens išemijos atveju būtent kardiomiocitų hipertrofija yra remodeliavimosi metu vyraujantis procesas [82, 83].

Patologinės kardiomiocitų hipertrofijos metu pakartotinai aktyvinama fetalinių genų raiška, aktyvinama prieširdžių natriurezinių peptidą, B tipo natriurezinių peptidą,  $\alpha$  skeleto raumenų aktiną,  $\alpha$  ir  $\beta$  miozino sunkiąsias grandines ir sarkoplazminio tinklo  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPazę koduojančių genų raiška [84]. Reaguodami į hipertrofiją stimuliuojančius signalus, kardiomiocitai didėja ilgėjant ir / ar didėjant jų skersmeniui, priklausomai nuo aktyvintų viduląstelinių signalinių kelių [85, 86]. Dėl perkrovos spaudimu didėjant sistolinei širdies kairiojo skilvelio įtampai [87], kardiomiocitai hipertrofuoja labiau didėjant šių ląstelių skersmeniui nei ilgiui, širdies skilvelio siena storėja – vyksta koncentrinis širdies kairiojo skilvelio remodeliavimasis [88, 89]. Kardiomiocitų skersmens didėjimas, palyginus su šių ląstelių ilgėjimu, patvirtintas atlikus ŠN su išsaugota išstūmio frakcija, pritaikant gyvūnų modelį, ir sirgusiųjų idiopatine dilatacine kardiomiopatija kardiomiocitų morfometrinę analizę [90, 91].

Užsitęsus įtampai širdies skilvelio sienoje, vėlyvuju remodeliavimosi laikotarpiu kardiomiocituose silpnėja mitochondrijų, ribosomų funkcijos, oksidacinis fosforilinimas, ELK1 ir NRF1-2 signalai, ATP gamyba ir baltymų sintezė [92–94], dėl oksidacinio DNR pažeidimo aktyvinamas p53 baltymas [95]. Todėl kardiomiocitų hipertrofija šiuo etapu vyksta labiau ilgėjant ląstelėi, palyginus su jos skersmeniu [5]. Šie ultrastruktūriniai ir histomorfologiniai kardiomiocitų pokyčiai, atspindintys mažėjantį remodeliavimosi procesų veiksmingumą, širdies miocitų kontraktilinės funkcijos silpnėjimą ir dekompensaciją, reiškiasi progresuojant ŠN. Kardiomiocitų ilgėjimas, palyginus su šių ląstelių skersmens didėjimu, kaip vyraujantis pokytis vėlyvuju remodeliavimosi laikotarpiu, apibūdintas tarp dilatacine kardiomiopatija sergančių pacientų su progresuojančio ŠN simptomais, sisteminės arterinės hipertenzijos nulemtu ŠN atvejais, kai kardiomiocitų morfometriniai pokyčiai tirti pritaikius gyvūnų modelį [96–98].

Dėl užsitęsusio padidėjusio mechaninio krūvio ir išemijos nulemtu širdies raumens pažeidimo kardiomiocituose vykstantys baltymų homeostazės pokyčiai remodeliavimosi metu nėra visiškai tapatūs. Remodeliuojantis

kardiomiocitams, kai progresuoja išeminės kilmės ŠN, reikšmingai dažniau stebima suintensyvėjusi endopeptidazių aktyvumą reguliuojančių, serino tipo endopeptidazių veiklą slopinančių baltymų raiška, padidėjęs katalizinis oksidacijos-redukacijos reakcijų, glutationo sistemos ir piruvato dehidrogenazės aktyvumas, palyginus su remodeliavimosi pokyčiais dėl padidėjusio mechaninio krūvio [5]. Įvertinus išemijos atveju progresuojančių kardiomiocitų baltymų raiškos pokyčius galima teigti, kad kardiomiocitų mikroaplinkos oksidacinių rodiklių pokyčiai yra vienas svarbiausių šių ląstelių patologiškos remodeliavimosi moduliuojančių ir miokardo aktyvaus kontraktilinio komponento silpnėjimą lemiančių veiksnių progresuojant išeminės kilmės ŠN.

Įvertinus kardiomiocitų sarkomerų ir nesarkomerinių citoskeleto komponentų raiškos pokyčius remodeliavimosi metu, esant išeminės kilmės ŠN ir ŠN dėl padidėjusio mechaninio krūvio, išemijos atveju kardiomiocituose susilpnėja sarkomerų komponento miozino sunkiosios grandinės  $\beta$  ir nesarkomerinių komponentų – trečiojo, vienuoliktojo ir tryliktojo tipų miozino sunkiųjų grandinių raiška [5]. Vis dėlto, citoskeleto tarpinių gijų, arba filamentų (desmino, sinemino, vimentino, nestino bei lamino-A/C), ir mikrotubulių (tubulino  $\alpha$  bei  $\beta$ ) komponentų raiška kardiomiocituose remodeliavimosi metu suintensyvėja, kai progresuoja išeminės kilmės ŠN ir esant ŠN dėl užsitęsusio padidėjusio mechaninio krūvio. Išanalizavus dėl išemijos remodeliavimosi metu vykstančius bendruosius kardiomiocitų citoskeleto komponentų pokyčius, galima teigti, kad progresuojant išeminės kilmės širdies raumens pažeidimui, kardiomiocitų aktyvi kontraktilinė funkcija silpnėja, gausėja ląstelių pasyvų mechaninį atsparumą palaikančių citoskeleto komponentų. Todėl galima iškelti hipotezę, kad progresuojant išeminės kilmės ŠN, šie kardiomiocitų kontraktilinių bei citoskeleto struktūrų pokyčiai lemia ir širdies raumens kontraktilinės funkcijos silpnėjimą, ir skilvelio sienos elastingumo mažėjimą.

Išanalizavus kardiomiocitų remodeliavimosi įtaką išeminės kilmės ŠN, svarbu atkreipti dėmesį, kad, esant išeminiam miokardo pažeidimui, oksidacinis stresas, nespecifinio imuninio atsako veikliųjų ląstelių išskiriami citokinai stimuliuoja specifinius, išeminio pažeidimo atveju besiformuojančius kardiomiocitų pokyčius remodeliavimosi metu. Ankstyvuojant remodeliavimosi laikotarpiu šie hipertrofiniai kardiomiocitų pokyčiai kompensuoja padidėjusį krūvį. Vis dėlto, nors kardiomiocitų tūris toliau didėja ir vėlyvuojant remodeliavimosi laikotarpiu, progresuojant išeminės kilmės ŠN, dėl sarkomerų kontraktilinių komponentų pažeidimo, mažėjančio šių ląstelių elastingumo ir intensyvėjančio viduląstelinio oksidacinio streso remodeliavimasis tampa neefektyvus. Todėl galima teigti, kad mažėjantis kardiomiocitų remo-

deliavimosi veiksmingumas yra reikšmingas patogenezinis išeminės kilmės ŠN veiksnys.

Detali informacija apie kardiomiocitų geometrijos pokyčių įvairovę remodeliavimosi metu yra svarbi aiškinantis išeminės kilmės ŠN patogeninio mechanizmo grandis ir ieškant naujų, efektyvių ankstyvos ŠN diagnostikos žymenų bei gydymo taikinių [31]. Vis dėlto, išanalizavus kardiomiocitų remodeliavimosi įtaką progresuojant ŠN, patogeniniu požiūriu reikšmingi kardiomiocitų remodeliavimosi pokyčiai dažniausiai dokumentuoti morfometrinei analizei pritaikius gyvūnų modelius, taip pat esant miokardo pažeidimui dėl užsitęsusio padidėjusio mechaninio krūvio ar ūminės išemijos, simptominiam, pažengusiam ŠN. Žinios apie kardiomiocitų struktūrinius pokyčius remodeliavimosi metu, esant įvairios stadijos išeminės kilmės ŠN, išlieka fragmentiškos, o išsamių, nuoseklių duomenų apie išeminės kilmės ŠN patogenizei reikšmingą kardiomiocitų remodeliavimosi procesą trūksta.

### **1.3. Su kardiomiocitų remodeliavimosi susijusių jų baltymų raiškos reikšmė formuojantis išeminės kilmės ŠN**

#### **1.3.1. Kardiomiocitų citoskeleto filamento desmino dinamika**

Tarpiniai filamentai yra gyvybiškai svarbūs kardiomiocitų citoskeleto baltymai, užtikrinantys efektyvią širdies miocitų viduląstelinį ir tarpląstelinį signalų perdavimą [99]. Remiantis moksliniais tyrimais, įrodyta, kad tarpiniai filamentai apsaugo eukariotines ląsteles, įskaitant ir širdies audinį, nuo aplinkos lemiamo streso [11, 100]. Desminas, gausiai įvairiuose žmogaus audiniuose aptinkamas III tipo tarpinis filamentas, yra svarbus integruojant širdies aktyviojo kontraktinio ir laidžiosios sistemos komponentų struktūrų veiklą bei palaikant optimalią širdies fiziologinę funkciją [101]. Šio citoskeleto komponento raiška embriogenezės laikotarpiu stebima jau 29-ąją dieną po apvaisinimo, o 30–32-ąją dieną yra matoma ir pirmykštėse širdies sinusinio mazgo bei dešiniojo venos vožtuvo struktūrose [102].

Desminas suformuoja viduląstelinį citoskeleto tinklą, kuris sujungia kardiomiocito miofibriles su sarkoplazma, desmosomomis, T vamzdeliais, mitochondrijomis, endoplazminiu tinklu ir branduoliu, įeina į Z linijos struktūrą, moduliuoja signalinių baltymų kelius [99, 103]. Be to, kardiomiocituose desmino tinklas dalyvauja perduodant mechaninius – cheminius signalus, gaminant energiją, transportuojant kitas molekules [104], vykstant miogenezei [105] ir netiesiogiai – raumens susitraukimui [106, 107]. Tsikitis M. ir kt. (2018) atlikto tyrimo su pelėmis duomenimis, užblokavus desmino baltymą koduojančio geno raišką, kardiomiocitų sarkomerai netenka ryšio su sarko-

plazma, pažeidžiama sarkomerų citoarchitektūrinė organizacija [101]. Todėl kardiomiocitai tampa mažiau atsparūs mechaninių veiksnių pažeidimai, širdies audiniuose dažniau stebimi kardiomiocitų nekrozės ir substitucinės regeneracijos procesai, reikšmingi kardiomiopatijų patogenezei. Nesant desmino, kardiomiocituose pažeidžiami ir kompensaciniai procesai, kurių metu įprastai stabilizuojamos pažeistos miofibrilinės struktūros, stimuliuojami viduląsteliniai regeneraciniai procesai, intensyvėja citoskeleto, miofibrilinių komponentų sintezė [108].

Desmino baltymą koduoja genas, sudarytas iš devynių egzonų. Įrodyta, kad N galo segmentai yra svarbūs desmino gijos (filamento) polimerizacijai, o C galo karboksilo grupės segmentas dalyvauja tarpiniams filamentams sąveikaujant tarpusavyje, kai formuojasi tretinė erdvinė citoskeleto struktūra [109]. Dėl desminą koduojančio geno mutacijų karboksilo grupės segmente mažėja šios gijos (filamento) lankstumas, silpnėja ląstelių geba reaguoti į mechaninius aplinkos veiksmus, sutrinka mechaninio signalo perdavimas [110, 111].

Desmino savybė dinamiškai reaguoti į besikeičiančius aplinkos veiksmus priklauso ir nuo ląstelės gebos sukelti potransliacines šio tarpinio filamentų baltymo modifikacijas. Viena detaliausiai apibūdintų potransliacinių modifikacijų yra fosforilimas. Remiantis širdies ir skeleto raumenų *in vitro* tyrimų rezultatais, nustatyta, kad fosforilinant desmino N galo domeną, didėja desmino baltymo tirpumas [112]. Atlikus desmino fosforilimo proceso tyrimus, taikant pelių ŠN modelį, nustatyta, kad glikogeno sintazės kinazės 3β fosforilintas desminas yra suardomas, vyksta aktyvi šio baltymo depolimerizacija [113]. Vis dėlto, kai yra širdies perkrova spaudimu ir išeminės kilmės širdies raumens liga, monofosforilintas desminas kaupiasi kardiomiocituose ir dažniau suformuoja toksiškai ląstelę veikiančius proamiloidogeninius mikroagregatus [114]. Kedia N. ir kt. (2019) atlikto tyrimo duomenimis, desmino mikroagregatai pasižymi ne tik amiloidogeniniu poveikiu, bet *in vitro* – ir biocheminėmis savybėmis, būdingoms prioniniams baltymams [115].

Išeminės kilmės ŠN atvejais kardiomiocituose stebimi desmino mikroagregatai rodo, kad užsitęsęs išeminės kilmės širdies raumens pažeidimui desmino apsauginė funkcija ir viduląstelinų baltymų kontrolės mechanizmai silpnėja [116–118]. Be to, įvykus desmino agregacijai, greitai keičiasi kardiomiocito mitochondrijų lokalizacija ląstelėje, išryškėja šių organelių disfunkcija, kas rodo, koks šis baltymas svarbus fiziologinei mitochondrijų funkcijai [119, 120].

Nors desmino sąveika su mitochondrijomis dokumentuota pakankamai išsamiai, tačiau šios sąveikos pobūdis nėra iki galo aiškus. Desminas, netiesiogiai sąveikaudamas su mitochondrijomis per plektiną ir tiesiogiai –

per miotubularino baltymų šeimai priklausančią lipidinę fosfatazę, geba reguliuoti kardiomiocitų mitochondrijų struktūrą, funkcijas ir lokalizaciją ląstelėje [121]. Specifinė mitochondrijų vieta šalia sarkomerų, kurią užtikrina desminas, yra labai svarbi raumenų ląstelėms, ypač kardiomiocitams, kuriuose aktyviai vykstančios oksidacinio fosforilavimo reakcijos patenkina didelius šių ląstelių energijos poreikius [122]. Užblokavus desmino baltymą koduojančių genų raišką kardiomiocituose, šių ląstelių pažeidimai pirmiausiai stebimi būtent mitochondrijose. Įvykus desmino baltymą koduojančio geno mutacijai, susidarius netaisyklingai tretinei desmino konfigūracijai, ši nuo organelių struktūros ir lokalizacijos priklausanti viduląstelinė pusiausvyra pažeidžiama, o silpnėjanti kontraktinė funkcija yra svarbi kardiomiocitų formavimuisi [108]. Kai kardiomiocituose desmino sintezė nevyksta, yra vidinės mitochondrijų membranos struktūros kristos, nevyksta oksidacinio fosforilavimo reakcijos, sutrinka selektyvus mitochondrijų membranų pralaidumas, išnyksta jų membraninis potencialas – visi šie disfunkciniai poslinkiai atsispindi besikeičiančioje mitochondrijų struktūroje – mitochondrijos pabrinksta, padidėja [123].

Be to, desminas sąveikauja ir su kitais miocituose esančiais tarpiniais filamentais – III tipo tarpiniais filamentais vimentinu [124] ir sinkoilinu [125], IV tipo tarpiniais filamentais sineminu [126] ir nestinu [127] bei V tipo tarpiniu filamentu laminu [128]. Jau seniai žinoma, kad laminas B, turintis ryšį su vidiniu ląstelės branduolio membranos paviršiumi, per B lamino receptorių tiesiogiai sąveikauja su desminu [129]. Todėl ląstelėje sumažėjus desmino, ląstelės branduolio membrana deformuojasi, pažeidžiamas šios membranos vientisumas, gausėja ląstelės genetinės medžiagos pažeidimų, silpnėja jos aktyvioji kontraktinė funkcija [12]. Esant baltymą laminą koduojančio *LMNA* geno mutacijoms, pažeidžiama ir desmino citoskeleto organizacija Z linijos struktūrose bei įterptiniuose diskuose – susidaro palankios sąlygos formuotis desmino mikroagregatams [130], kurie pasižymi toksiniu poveikiu ląstelėms.

Įterptiniai diskai palaiko tarpląstelinį kardiomiocitų mechaninį ir elektrofiziologinį integralumą. Todėl desmino, su įterptiniais diskais susijungiančio per baltymą desmoplakiną, vaidmuo užtikrinant fiziologinę aktyvią kontraktinę širdies raumens funkciją [104] yra ypač svarbus. Thorne L. ir kt. (1997) tyrimo duomenimis, įvykus desmino baltymą koduojančio geno mutacijai, pažeidžiama širdies miocitų įterptinių diskų struktūra [131], dėl kardiomiocitų citoskeleto pažeidimų susilpnėja šių ląstelių elektrinis laidumas, sutrinka jų mechaninis integralumas ir miocitų kontraktinės funkcijos sinchronizacija [104].

Progresuojant įvairios kilmės ŠN, desmino kiekis pažeistuose kardiomiocituose gausėja [114, 132]. Keliami hipotezė, kad padidėjus širdies raumens darbinei apkrovai, jau esant mechaniniam ir cheminiam (oksidaciniam) stresui, desmino tretinė erdvinė struktūra pasikeičia, siekiant tolygiau paskirstyti ir taip sumažinti ląstelėse patiriamą įtampą bei apsaugoti funkciškai svarbias organeles (sarkomerus, mitochondrijas) [11]. Įvykus miokardo infarktui, dėl ūmaus oksidacinio streso širdies raumenyje progresuojant išeminiam ir reperfuziniam šio audinio pažeidimui, kardiomiocituose kaupiasi ikifibriliniai baltymų mikroagregatai ir trumposios fibrilės [114]. Todėl suintensyvėjusi nepakitusios biocheminės sandaros desmino sintezė, manoma, pasireiškia kaip kompensacinis procesas, siekiant palaikyti fiziologinę baltymų homeostazę (proteostazę) pažeistuose kardiomiocituose. Vis dėlto, suintensyvėjus desmino sintezei, atitinkamai pagal padidėjusius ląstelės poreikius persiskirsto ir energijos ištekliai, kurie pamažu išsenka, progresuojant ŠN [133]. Svarbu atkreipti dėmesį, kad širdies miocituose suintensyvėjus pakitusios struktūros desmino sintezei, formuojantis šio baltymo mikroagregatams, baltymų kokybės kontrolės sistema dėl energijos išteklių perskirstymo nesugeba palaikyti fiziologinės baltymų sintezės pusiausvyros, pasireiškia toksinis proamiloidogeninių desmino mikroagregatų poveikis, taip prisidedant prie jau progresuojančio kardiomiocitų pažeidimo ŠN atvejais [134].

Įvertinus desmino persitvarkymo ypatumus remodeliuojantis kardiomiocitams, galima teigti, kad III tipo tarpinis filamentas desminas yra svarbus užtikrinant kardiomiocitų atsparumą, veikiant stresiniams aplinkos veiksniams, ir kompensaciniuose procesuose, palaikant specializuotų funkcijų integralumą bei apsaugant organeles nuo mechaninio, cheminio (oksidacinio) streso. Progresuojant širdies raumens pažeidimui, desmino tretinė erdvinė struktūra pažeidžiama, formuojasi amiloidogeninėmis savybėmis pasižymintys mikroagregatai, sutrikdoma efektyviai kardiomiocito veiklai svarbi viduląstelių struktūrų integracija, pažeidžiamos energijos gamybai svarbios mitochondrijos – ryškėja šių širdies raumens ląstelių disfunkcija. Minėti kardiomiocitų desmino raiškos pokyčiai dažniausiai dokumentuoti, kai buvo dilatacinė kardiomiopatija, ūminė išemija, o negausūs duomenys apie širdies miocitų desmino raiškos pokyčius užsitęsusi išemijai pateikiami tik vertinant simptominių, pažengusių išeminės kilmės ŠN. Vis dėlto, duomenų apie ankstyvuosius kardiomiocitų desmino raiškos pokyčius iki prasidedant simptominiam išeminės kilmės ŠN trūksta.

### 1.3.2. OPN – kardiomiocitų remodeliavimąsi moduliuojančio baltymo kompleksinis vaidmuo

Širdies raumenyje, kaip ir kituose audiniuose, užląstelinės terpės baltymai dalyvauja koordinuojant atsaką į miokardo pažeidimą, uždegimą ar padidėjus mechaninei įtampai [135]. Vis daugiau dėmesio skiriama OPN – vienam iš pagrindinių užląstelinės terpės baltymų, moduliuojančių širdies audinio atsaką į pažeidimą.

Žmogaus OPN, dar žinomas kaip sekretuojantysis fosfoproteinas 1, ankstyvosios T limfocitų aktyvacijos baltymas 1, yra 32 kDa baltymas, kurį sudaro 314 aminorūgščių polipeptidinė grandinė, o dėl potransliacinių baltymo modifikacijų (glikozilinimo, fosforilinimo) šio baltymo masė gali siekti iki 75 kDa [136, 137]. OPN yra ekspresuojamas įvairiose ląstelėse, pavyzdžiui, aktyvintuose makrofaguose, T limfocituose, osteoklastuose, hepatocituose, lygiųjų raumenų ląstelėse, endotelio ir epitelio ląstelėse [138]. Širdies audinyje, esant hipoksijai, uždegimui, toksiniam, mechaniniam pažeidimui, OPN baltymo raiška stebima kardiomiocituose, širdies fibroblastuose, vietiniuose makrofaguose ir širdies vainikinių arterijų endotelio ląstelėse [135]. OPN per integrinų ar CD44 receptorių aktyvina įvairius viduląstelinį signalų kelius, sąveikauja su augimo veiksniais, citokiniais, chemokiniais ir proteazėmis, dalyvauja imuninio atsako reakcijose, ląstelių adhezijos, migravimo, proliferacijos ir audinių regeneracijos procesuose [139].

OPN baltymo raiška įvairiuose organuose, įskaitant širdį, suaktyvėja jau embriogenezės laikotarpiu [140]. Vis dėlto, įvertinus OPN biologinę reikšmę formuojantis organams, *OPN<sup>-/-</sup>* pelių širdyse nenustatyta jokių patologinių morfologinių ar funkcinių pakitimų [141, 142]. Be to, suaugusiųjų kardiomiocituose bazinė OPN baltymo raiška fiziologinėmis sąlygomis išlieka ypač žema [16, 143]. Panaši, neintensyvi OPN baltymo raiška fiziologinėmis sąlygomis dokumentuota ir širdies vainikinių arterijų endotelio ląstelėse bei intersticinio audinio fibroblastuose [16, 144]. OPN baltymo raiška kardiomiocituose keičiasi veikiant aldosteronui [145], deksametazonui [16], endotelinui-1, norepinefrinui [17] ir reaktyviems deguonies junginiams [146].

Kai suintensyvėja OPN baltymo raiška kardiomiocituose, moduluojami su CD44, integrinu susiję viduląsteliniai signaliniai keliai – suaktyvėja už kardiomiocitų hipertrofiją atsakingų genų raiška, blokuojami į mitochondrijų oksoglutarato dehidrogenazę panašių baltymų, kardiomiocitų apoptozės signaliniai keliai [147]. OPN baltymo hipertrofinis poveikis kardiomiocitams taip pat gali pasireikšti ir kalcineurino / NFAT signaliniu keliu [148]. Padidėjusio mechaninio krūvio širdžiai sąlygomis, kardiomiocitai tampa gausiausiai OPN baltymą sintezuojančiomis širdies audinio ląstelėmis [17], o OPN raiška miokarde tiesiogiai koreliuoja su didėjančiu pokrūviu [149]. Pastebėta, kad



nesant OPN baltymo, kai padidėja mechaninis krūvis širdžiai, kardiomiocitai hipertrofuoja, tačiau jų hipertrofiniai pokyčiai yra mažiau išreikšti [150].

Nors širdį apsaugantis, teigiamas OPN poveikis kardiomiocitams apibūdinamas labai išsamiai, tačiau OPN vaidmuo širdies raumens remodeliavimosi procese yra daug sudėtingesnis. Collins A. R. ir kt. (2004) tyrimo duomenimis, OPN gali slopinti angiotenzino II nulemtą kardiomiocitų hipertrofiją [142]. Širdį apsaugančių mechanizmų raiška silpnėja ir veikiant per  $\beta 1$  ir  $\beta 2$  adrenoreceptorius, kai OPN baltymas aktyviau jungiasi su šių receptorių G $\alpha$  subvienetais [145], taip pat – kai šis baltymas aktyvina proapoptozinius signalus ar pažeidžia mitochondrijų funkcijas kardiomiocituose. Remiantis tyrimų rezultatais, padidėjusi OPN raiška sustiprina proapoptozinių signalų raišką kardiomiocituose esant įvairios kilmės ŠN [141, 151, 152]. Dalal S. ir kt. (2014) tyrimo duomenimis, suaktyvėjusi OPN raiška pelių kardiomiocituose tiesiogiai koreliavo su dažniau pasireiškiančia kardiomiocitų apoptoze ir silpnėjančia širdies kairiojo skilvelio funkcija [153]. Be to, Yousefi K. ir kt. (2019), tirdami ŠN su išsaugota išstūmio frakcija pelių širdis, nustatė, kad OPN baltymas gali sukelti mitochondrijų disfunkciją kardiomiocituose slopindamas į miokardo 2-oksoglutarato dehidrogenazę panašaus baltymo genų raišką [154].

Kompleksinį OPN baltymo poveikį iš dalies galima paaiškinti skirtingų širdies raumenį pažeidžiančių veiksmų aktyvinamu alternatyviu *OPN* iRNR pirminio transkripto brendimu. Alternatyvaus *OPN* iRNR potranskripcinio brendimo metu susiformuoja skirtingi antriniai *OPN* iRNR transkriptai, dėl kurių gali susidaryti kelios skirtingos OPN baltymo izoformos: OPN-a (viso ilgio iRNR transkriptas, NP\_001035147.1), OPN-b (penktojo egzono pašalinimas iš pirminio iRNR transkripto, NP\_000573.1) ir OPN-c (ketvirtojo egzono pašalinimas iš pirminio iRNR transkripto, NP\_001035149.1) [140]. Neseniai identifikuoti dar du alternatyvaus potranskripcinio brendimo metu susidarę du *OPN* antriniai iRNR transkriptai – *OPN4* (ketvirtojo ir penktojo egzonų pašalinimas iš pirminio iRNR transkripto, NP\_001238758.1) ir *OPN5* (į pirminį iRNR transkriptą įterpiamas papildomas egzonas – 3 introno liekana, NP\_001238759.1), tačiau atitinkamų OPN baltymo izoformų kol kas nedokumentuota [155]. Schipper M.-E.-I. ir kt. (2011), analizuodami *OPN* mRNR *in situ* hibridizacijos reakcijos rezultatus kardiomiocituose, esant mechaninės perkrovos nulemtam ir išeminės kilmės ŠN, reikšmingų *OPN* iRNR raiškos kardiomiocituose skirtumų nenustatė [29]. Vis dėlto, Cabiati M. ir kt. (2016) nustatė, kad OPN-a baltymo izoformos iRNR raiška kardiomiocituose buvo reikšmingai mažesnė, palyginus išeminės kilmės ŠN ir mechaninės perkrovos nulemtą ŠN, o OPN-b ir OPN-c baltymų izoformos buvo reikšmingai dažniau nustatomos esant išeminės kilmės ŠN [156].

Išeminės kilmės širdies raumens pažeidimo atvejais, OPN baltymo kiekis reikšmingai didėja jau išemine širdies liga sergančiųjų kraujo plazmoje, kai šiems pacientams dar nėra išeminės kilmės ŠN klinikinių požymių [157, 158], o širdies kairiojo skilvelio išstūmio frakcijos vertė atitinkamai mažėja [159]. Be to, pacientams, kuriems diagnozuota išeminė širdies liga, nustatyta išsaugota širdies kairiojo skilvelio išstūmio frakcija ir taikoma optimali sveikatos būklę atitinkanti terapija, OPN kiekio kraujo plazmoje pokyčiai buvo nepriklausomas veiksnys, patikimai prognozuojantis galimas nepalankias su širdies ir kraujagyslių sistemos pažeidimais susijusias ligos baigtis [160].

Kalbant apie ūminės išemijos nulemtą širdies raumens pažeidimą, OPN baltymo kiekis kraujo plazmoje reikšmingai padidėja jau antrą dieną po širdies kairiojo skilvelio priekinės sienos miokardo infarkto [161]. Reikšmingos sąsajos tarp OPN baltymo kiekio kraujo plazmoje, širdies kairiojo skilvelio remodeliavimosi ir progresuojančios širdies raumens disfunkcijos nustatomos ir praėjus 3 mėnesiams po širdies kairiojo skilvelio miokardo infarkto [157]. Bjerre M. ir kt. (2013) duomenimis, OPN kiekis kraujo plazmoje yra reikšmingas predikcinis veiksnys, vertinant pakartotinio miokardo infarkto ir ŠN riziką [162]. Manoma, kad reikšmingas kraujo plazmos OPN baltymo kiekio didėjimas pacientams, persirgusiems širdies kairiojo skilvelio priekinės sienos miokardo infarktu, yra susijęs su suintensyvėjusia OPN baltymo sinteze širdies raumenyje ir jo sekrecija į širdies vainikinę kraujotaką poinfarktiniu laikotarpiu [157]. Detaliau analizuojant OPN baltymo raiškos pokyčius išemijos pažeistame širdies raumenyje, padidėjusi OPN baltymo raiška žiurkių širdyse nustatyta ne tik miokardo infarkto zonoje, bet ir toliau nuo šio pažeidimo esančiuose miokardo regionuose [163]. Be to, užblokavus OPN baltymo genų raišką pelėms, poinfarktiniu laikotarpiu širdies kairiojo skilvelio dilatacija ir sistolinė disfunkcija buvo reikšmingai labiau išreikšta, palyginus su kontroline grupe [164, 165].

OPN baltymo kiekis kraujo plazmoje didėja ir pacientams, kuriems diagnozuotas ŠN. Šio baltymo kiekio kraujo plazmoje pokyčių prognozė vertė įrodyta, vertinant mirštamumo nuo ŠN riziką, atsižvelgiant į NYHA funkcinės klasės [166]. OPN raiška didėja ir pacientų, kuriems diagnozuota sisteminė arterinė hipertenzija bei ŠN, širdies raumenyje – nustatytos reikšmingos teigiamosios koreliacijos tarp OPN baltymo raiškos aktyvumo ir lizilio oksidazės, netirpaus kolageno, spaudimo plautiniuose kapiliaruose bei sumažėjusio širdies kairiojo skilvelio elastingumo, atitinkamai mažėjant šio skilvelio išstūmio frakcijai [167]. Be to, pacientams, kuriems diagnozuotas ŠN, padidėjęs OPN kiekis kraujo plazmoje susijęs su dažnesniais skilvelinės tachikardijos ir virpėjimo atvejais [168].

Apibendrinant OPN yra užląstelinis kompleksinis baltymas, sintezuojamas daugelyje ląstelių ir dalyvaujantis atsako į audinių pažaidą reakcijose. Kalbant apie OPN, kaip kardiomiocitų remodeliuojančią moduliuojančią baltymą, įtaką progresuojant ŠN, svarbu atkreipti dėmesį, kad OPN baltymo raiškos pokyčių reikšmė ŠN patogenezėje yra dokumentuota dažniausiai vertinant baltymo koncentracijos kraujo plazmoje pokyčius, kai yra ūminės išemijos, dilatacinės kardiomiopatijos nulemtas ŠN. Tyrimų, kuriuose būtų analizuojami OPN iRNR, baltymo raiškos pokyčiai išemijos pažeistame širdies audinyje, yra mažai. Juose dažniausiai analizuojami OPN baltymo raiškos pokyčiai, esant simptominiam, pažengusiam išeminės kilmės ŠN. Todėl širdies raumens pažeidimo metu padidėjus OPN baltymo kiekiui kraujyje, lieka neaišku, ar OPN baltymo raiškos pokyčiai tiesiogiai atspindi išeminės kilmės pažeidimo metu miokarde vykstančius procesus, koks OPN baltymo raiškos širdies audinyje šaltinis, ypač ankstyvuojami miokardo remodeliuojimosi laikotarpiu iki atsirandant išeminės kilmės ŠN simptomams.

### 1.3.3. Grem1 baltymo raiškos pokyčiai

Grem1 yra kaulų morfogenezinio baltymo antagonistas, priklausantis gausią cisteino grupę turinčių baltymų, tokių kaip noginas, chordinas, foliostatinas, superšeimai [169, 170]. Šį baltymą koduojantis genas yra 15 chromosomos 15q13-15 regione [171]. Grem1 reguliuoja nuo kaulų morfogenezinio baltymo priklausomą viduląstelinį signalinį kelią ir yra svarbus organų bei galūnių formavimuisi [172]. Padidėjusi Grem1 raiška nustatoma įvairių audinių kamieninėse ląstelėse [173]. *In vitro* tyrimai rodo, kad Grem1 baltymas yra svarbus ir kardiomiocitų diferenciacijai, slopinant nuo kaulų morfogenezinių baltymų priklausomą signalinį kelią arba moduliuojant širdies kamieninių ląstelių proliferaciją [20]. Grem1 dažniausiai jungiasi su antro ir ketvirto tipo kaulų morfogeneziniais baltymais [174], taip užblokuodamas klasikinį nuo kaulų morfogenezinio baltymo priklausomą viduląstelinį signalinį kelią, sustabdydamas SMAD1 / 5 / 8 fosforilinimą ir atitinkamų genų raišką. Svarbu atkreipti dėmesį, kad padidėjus Grem1 raiškai, taip pat aktyvinamas TGF $\beta$ , dėl ko SMAD3 fosforilinimas trunka ilgiau, intensyvėja su SMAD3 susijusio signalinio kelio profibrozinis poveikis [175, 176].

Be kaulų morfogenezinių baltymų veiklos slopinimo, dokumentuotos ir kitos, su kaulų morfogenezinių baltymų signaliniais keliais nesusijusios Grem1 funkcijos. Mitola S. ir kt. (2010) nustatė, kad Grem1, kaip agonistas, susijungia su endotelio ląstelių VEGFR2 [177], o Ji C. ir kt. (2016) papildė, kad ši sąveika vyksta per NRF2 viduląstelinį signalinį kelią [178]. Be to, Grem1 geba aktyvinti makrofagų funkciją, slopindamas makrofagų migravimo slopiklio veiklą [179]. Neseniai apibūdintas ir Grem1 vaidmuo onko-

genezės procesuose. Park S.-A. ir kt. (2020) duomenimis, Grem1 gali susijungti su piktybinių navikų ląstelių EGFR [180], o Clark K.-C. ir kt. (2020) nustatė Grem1 baltymo raiškos sąsajas su dauginės mielomos klinikine eiga [181].

Kalbant apie Grem1 baltymo biologinę reikšmę, esant širdies raumens pažeidimui, nustatyta, kad pacientų, kuriems diagnozuotas įvairios kilmės ŠN, endomiokardo biopsijų kardiomiocituose stebima suintensyvėjusi Grem1 baltymo raiška yra susijusi su didesne komplikuotos ligos eigos rizika [30]. Kadangi šie Grem1 baltymo raiškos pokyčiai analizuoti endomiokardo biopsijose, esant įvairios kilmės ŠN, nėra iki galo aišku, ar Grem1 baltymo raiškos pokyčiai yra susiję su konkrečia širdies raumenį pažeidžiančia patologija, ar tai yra bendra progresuojančios kardiomiocitų disfunkcijos remodeliavimosi metu išraiška. Padidėjus *Grem2* geno, koduojančio tai pačiai kaulų morfogenezinių baltymų antagonistų grupei priklausančią baltymą Grem2, transkripcijos aktyvumui, širdies raumens kontrakcija ir laidžiosios sistemos veikla sulėtėja [182].

Grem1 baltymas yra svarbus širdies raumens remodeliavimuisi išemijos sąlygomis, kai esant ūminei ar lėtinei hipoksijai, kardiomiocitų mikroaplinkoje pagausėjus citokinų, šiose ląstelėse stimuliuojama Grem1 sekrecija [34]. Duomenų apie Grem1 baltymo raiškos pokyčius kardiomiocituose, esant įvairaus laipsnio išeminės kilmės ŠN, nėra daug. Svarbu paminėti, kad ūminės išemijos nulemtu ŠN atvejais, Grem1 baltymo kiekio kraujo plazmoje pokyčiai yra reikšmingas pakartotinės hospitalizacijos dėl ŠN veiksnys [19]. Grem1 baltymo poveikis, kai vyksta kardiomiocitų remodeliavimasis, gali pasireikšti ir tuomet, kai šis baltymas susijungia su makrofagų migravimą slopinančiu veiksniu (MIF), dėl kurio kardiomiocituose susilpnėja hipertrofinių procesų raiška [179, 183]. Be to, Koga K. ir kt. (2011) tyrimo duomenimis, pelėms su užblokuota MIF baltymo geno raiška, pelių širdies raumenyje sukėlus ūminę išemiją, miokardo infarkto nekrozės zona buvo daug didesnė, palyginus su kontroline grupe [183]. Šie struktūriniai širdies raumens pokyčiai rodo susilpnėjusią miokardo gebą reaguoti į patiriamą oksidacinį stresą, pažeidus Grem1 moduluojamos MIF baltymo raiškos pusiausvyrą.

Išnagrinėjus Grem1 raiškos pokyčius remodeliuojantis kardiomiocitams, Grem1 baltymo biologinė reikšmė širdies audinio pažeidimo kontekste nėra iki galo aiški. Viena vertus, Grem1 baltymas dalyvauja kontroliuojant kardiomiogenezės procesą, o esant audinių pažeidimui aktyvina angiogenezę, užtikrinant regeneracijai reikalingą deguonies ir maisto medžiagų išteklių tiekimą. Kita vertus, intensyvėjanti Grem1 baltymo raiška, esant įvairios kilmės ŠN, susijusi su silpnėjančia širdies raumens funkcija. Svarbu atkreipti dėmesį, kad duomenų apie Grem1 baltymo raiškos pokyčius kardiomiocituose išeminės kilmės ŠN atvejais nėra daug. Taip pat nėra aišku, ar reikš-

mingas Grem1 baltymo kiekio kraujo plazmoje didėjimas, progresuojant išeminės kilmės ŠN, yra tiesiogiai susijęs su išeminės kilmės kardiomiocitų pažeidimu ir Grem1 baltymo raiškos pokyčiais kardiomiocituose.

#### 1.3.4. Kardiomiocitų iRNR potranskripcinio brendimo pokyčiai

Įvykus širdies raumens išeminės kilmės pažeidimui, kardiomiocituose skatinami regeneracijos procesai, tačiau pilna šių ląstelių citokinezė nevyksta. Audiniuose, įskaitant širdies raumenyje, kurių regeneracinė geba įvykus pažeidimui yra silpna, ypač aktyviai vyksta alternatyvaus iRNR potranskripcinio brendimo (angl. *splicing*) procesai [184–187]. iRNR potranskripcinis brendimas – tai viduląstelinis mechanizmas, kurio metu iš pirminio iRNR transkripto yra pašalinamos introninės, geno transliacijoje nedalyvaujančios sekos [188]. Apie 95 proc. žmogaus genomo genų turi intronines sekas, kurių pirminis iRNR transkriptas dalyvauja šiame brendimo procese [189]. Fiziologinėmis sąlygomis ląstelėse vyksta konservatyvūs iRNR brendimo procesai, kuriuose dalyvauja iRNR brendimo kompleksai (angl. *spliceosome complex*), o ląstelėms reaguojant į aplinkos veiksnius, vykstant regeneracijai, gali būti aktyvinamas alternatyvus iRNR brendimas, lemiantis naujų baltymų izoformų susidarymą [189–192]. Alternatyvus iRNR brendimas reguliuojamas [193]:

- „cis-reguliacinių elementų“ – įeina į tų pačių egzoninių, introninių iRNR sekų sudėtį – stiprintuvai (angl. *enhancers*) ir slopintuvai (angl. *silencers*);
- „trans-reguliacinių elementų“ – serino / arginino baltymai, hnRNP.

Kalbant apie ribonukleorūgščių apykaitą, hnRNP yra vieni pagrindinių baltymų, kurie dalyvauja stabilizuojant pirminį iRNR transkriptą, jį transportuojant ir parengiant genų transliacijos procesams [194], didinant RNR polimerazės II transkripcinę gebą ir reguliuojant uždegimo reakcijų aktyvumą [195]. Atlikus išsamius imunohistocheminius hnRNP raiškos nepažeistuose audiniuose tyrimus, įvairaus intensyvumo hnRNP raiška nustatyta visuose žmogaus organizmo audiniuose [195].

Šiuo metu hnRNP baltymų šeimai yra priskiriama virš dvidešimt pagrindinių nuo 34 kDa iki 120 kDa molekulinės masės hnRNP (nuo A iki U), turinčių tiesioginės sąveikos su pirminiu iRNR transkriptu sritį, ir mažųjų hnRNP, atliekančių reguliacinę funkciją [24]. hnRNP šeimos baltymai turi konservatyvų branduolio lokalizacijos signalą ir fiziologinėmis sąlygomis dažniausiai nustatomi eukariotinės ląstelės branduolyje [24]. Be to, iRNR hnRNP A1, D, E ir F/H gali būti transportuojami iš eukariotinės ląstelės branduolio į citoplazmą, kai iRNR hnRNP C ir U transportavimas fiziologinėmis sąlygomis nevyksta [195].

Dėl biologiniu požiūriu itin reikšmingos pirminio iRNR transkripto alternatyvaus brendimo įtakos reguliuojant ląstelės atsaką į aplinkos veiksnius, keičiant ląstelės adaptacinį plastiškumą, regeneracinę gebą, vis didesnis dėmesys kreipiamas į hnRNP įtaką įvairių ligų patogenezėje [196], pavyzdžiui, vykstant onkogenezei [197], neurodegeneracinių ligų (šoninė amiotrofinė sklerozė, frontotemporalinė demencija) [186], demielinizuojančių ligų [198], neuromiopatologijos [193], įgimtos širdies patologijos atvejais [199, 200]. Kai alternatyvaus iRNR pirminio transkripto brendimo mechanizmai aktyvinami pažeistame širdies audinyje, keičiasi sarkomerų komponentus ir jonų kanalų baltymus koduojančių genų raiška, susijusių su kardiomiopatija ir ŠN [201]. Nemaža dalis su RNR susijungiančių baltymų yra svarbūs širdies embriogenezei, kai susidaro miofibrilės (RBM24, RBM20, RBFOX1 / 2, FXR1 baltymai), vykstant šio organo morfogenezei, trabekulių, širdies vožtuvo struktūrų formavimuisi (CHAMP, MBNL 1 baltymai) ir remodeliavimuisi (SRSF1 / 2, SRSF10, CELF, MBNL baltymai) [202]. Dėl šiuos baltymus koduojančių genų mutacijų formuojasi įgimtos kompleksinės širdies ydos [203], pavyzdžiui, šeiminė aritmogeninė širdies dešiniojo skilvelio displazija [204], tarpširdinės ir tarpkilvelinės pertvarų defektai, širdies laidumo sistemos pažeidimai [205].

Svarbu atkreipti dėmesį, kad alternatyvaus su hnRNP veikla susijusio pirminių iRNR transkriptų brendimo mechanizmų pažeidimas postnataliniu laikotarpiu yra svarbus ir nepaveldimų širdies ligų patogenezėje [206]. Pirminių iRNR transkriptų brendimo veiksnių, svarbių reguliuojant širdies funkciją (iRNR hnRNP H, hnRNP U, RBM24, TRA2β), pažeidimai yra reikšmingi ŠN patogenezėje [199, 207–209]. Remiantis Liu T.-Y. ir kt. (2016) tyrimo duomenimis, pelėms su iRNR hnRNP A1 koduojančio geno mutacija reikšmingai keitėsi atsakingų už raumeninio audinio funkcijas genų *mtor*, *myo6*, *notch4* raiška [193]. Genas *mtor*, kurio raiška stiprėja esant hnRNP A1 koduojančio geno mutacijai, yra svarbus ne tik skeleto raumenų regeneracijai [210], bet ir kardiomiocitų išlikimui bei širdies raumens funkcionavimui [211]. Taip pat dokumentuoti ir panašūs *myo6* geno, susijusio su nežymia kardiomiocitų hipertrofija [212], raiškos, dalyvaujant iRNR hnRNP A1, pokyčiai [193].

Tyrimai rodo, kad pažeidus iRNR pirminio transkripto brendimo mechanizmą, širdies audinio kontraktiniame segmente stebimi gana specifiniai ląstelių, ultrastruktūrinio ir molekulinio lygmens pokyčiai. Ye J. ir kt. (2015) nustatė, kad mutantiniuose organizmuose blokavus iRNR hnRNP U koduojantį geną stebimas mažesnis kardiomiocitų skaičius širdies raumenyje, dažnesnė apoptozė; nevykstanti intrasarkoplazminių sarkomerų relaksacija, netolygus mitochondrijų pasiskirstymas kardiomiocituose; intensyvėjanti ląste-

lių adhezijos,  $K^+$  kanalų baltymų genų raiška; defektyvus potranskripcinis iRNR alternatyvus brendimas, paliekant daugiau introninių sekų [199].

iRNR hnRNP C yra vienas pirmųjų apibūdintų hnRNP grupės baltymų ir pirmasis tarp RNP, kuris identifikuotas kaip dalyvaujantis iRNR brendimo procesuose, teturintis vieną sąveikos su RNR domeną [213, 214]. Žmogaus organizme nustatytos dvi šio baltymo iRNR brendime dalyvaujančios izoformos (angl. *spliceofoms*) – hnRNP C1 ir hnRNP C2 – besiskiriančios viena nuo kitos 13 aminorūgščių [24]. Kadangi hnRNP C turi tik vieną sąveikos su RNR domeną, šis RNP suformuoja oligomerus su kitais hnRNP C, siekiant užtikrinti stabilesnę sąveiką su iRNR pirminio transkripto brendimo metu. iRNR hnRNP C, suformavęs tetramerines struktūras, geba atskirti ir nustatyti naujai suformuotų iRNR transkriptų ilgį [24]. Paprastai iRNR hnRNP C susijungia su ilgesniais nei 300 nukleotidų ilgio pirminiais iRNR transkriptais [215].

Būtent iRNR hnRNP C raiškos pokyčiai labiausiai susiję su įvairiais patologiniais procesais [216, 217], įskaitant aterogenezės metu vykstančią arterijos intimos hiperplaziją [218]. Remiantis vienos ląstelės RNR seko-skaitos tyrimų rezultatais, būtent iRNR hnRNP C raiška kardiomiocituose suintensyvėja labiausiai, esant išeminiam – reperfuziniam miokardo pažeidimui [219]. Išanalizavus iRNR hnRNP C raišką pacientų, kuriems diagnozuotas pažengęs išeminės kilmės ŠN, širdies audinio fragmentuose dokumentuota, kad progresuojant išeminės kilmės širdies audinio pažeidimui, kai kardiomiocitai neatlaiko mechaninio įtempimo, fosfokinazė C fosforilina iRNR hnRNP C, kuris iš ląstelės branduolio transportuojamas į intrasarkoplazminio citoskeleto sarkomerų struktūrų Z diskus, kur susijungia su kontraktinės sistemos TNNT2, PDLIM5, FHL2 ir MYH7 baltymų komponentais [220]. Taip pat pastebėta, kad progresuojant ŠN, su RNP C susijusių iRNR transkriptų, koduojančių kontraktilinius TTN, ACTC1 ir TNNI3 baltymus, gausėja sarkoplazmoje, arčiau sarkomerų struktūrų [221, 222]. Lewis Y. E. ir kt. (2018) panašius vietinės genų raiškos (angl k. *localized gene translation*) optimizavimo reiškinius dokumentavo ir žiurkių širdyse, kur iRNR pirminių transkriptų, koduojančių kontraktilinių baltymų komponentus, brendimas ir transliacija aktyviai vyko sarkoplazmoje, sarkomerų struktūrų aplinkoje [222].

Tyrimai rodo, kad net ir nedidelis iRNR hnRNP C kiekis, transportuojamas į pažeisto kardiomiocito citoplazmą, taip pat keičia ir nuo mechanosensorinės stimuliacijos priklausomo *Hippo* signalinio kelio baltymų genų pirminių iRNR transkriptų brendimą [220]. Gana seniai žinoma, kad *Hippo* signalinio kelio aktyvavimas vyrauja progresuojant įvairios kilmės širdies audinio pažeidimui [223, 224]. Be to, kai kardiomiocito branduolyje sumažėja iRNR hnRNP C, į YAP baltymo iRNR pirminį transkriptą įterpiamas

ketvirtasis egzonas, kodojantis WW domeną, atsakingą už tiesioginę nuo mechanosensorinės stimuliacijos priklausomo YAP1 baltymo sąveiką su DNR [225]. Vrbsky J. ir kt. (2021) atlikto tyrimo duomenimis, pacientams, kuriems diagnozuotas simptominis, pažengęs ŠN, į bręstantį pirminį YAP1 iRNR transkriptą įterpiami du WW domeną koduojantys ketvirtieji egzonai – susidaro pataloginės YAP1 baltymo izoformos, sutrikdomi ląstelių diferenciaciją ir proapoptozinius baltymus koduojančių genų slopinimą reguliuojantys mechanizmai [226].

Taigi, su iRNR hnRNP susijęs eukariotinių ląstelių potranskripcinių mechanizmų pažeidimas, aktyvintas iRNR pirminio transkripto alternatyvus brendimas, vietinės genų raiškos optimizavimas yra svarbūs neurodegeneracinių, demielinizuojančių, neuromiopatinių ligų patogenezėje, onkogenezeje, aterogenezeje, formuojantis įgimtoms kompleksinėms širdies ydoms. iRNR hnRNP raiškos pokyčiai susiję ir su kontraktilinių baltymų raiškos reguliavimu, formuojantis ŠN. Vis daugiau dėmesio, nagrinėjant simptominių išeminės kilmės ŠN, skiriama iRNR hnRNP C, kuris susijęs ne tik su sarkomerų komponentus reguliuojančių genų raiškos aktyvumu, bet ir dalyvauja reguliuojant ląstelių diferenciacijos bei apoptozės mechanizmus. Vis dėlto, lieka neaišku, kaip keičiasi iRNR hnRNP C raiška kardiomiocituose ankstyvuju miokardo remodeliavimosi laikotarpiu iki atsirandant pirmiesiems išeminės kilmės ŠN simptomams ir koks šio baltymo poveikis progresuojant išeminės kilmės ŠN.



## 2. TIRTASIS KONTINGENTAS IR METODAI

### 2.1. Bioetikos leidimas

Tyrimas vykdytas gavus Kauno regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto pritarimą atlikti biomedicininį tyrimą (Nr. BE-2-77, 2022-09-15). Tyrimą leista atlikti nenaudojant informuoto asmens sutikimo formos, kadangi remiantis Biomedicininų tyrimų įstatymo (2000 m. gegužės 11 d. Nr. VIII-1679) 7 straipsnio 11 punktu ir Biomedicininų tyrimų, kurių objektas yra medicinos dokumentai, atlikimo tvarkos aprašu, patvirtintu Lietuvos bioetikos komiteto direktoriaus 2011 m. liepos 27 d. įsakymu Nr. V-28, šio tyrimo objektas yra iki prašymo atlikti biomedicininį tyrimą davimo asmens sveikatos priežiūros (diagnostikos) tikslais paimtas biologinis ėminys ir sveikatos informacija. Biomedicininio tyrimo metu naudoti duomenys, iš kurių negalima nustatyti asmens tapatybės.

### 2.2. Tirtasis kontingentas

Tiriamoji širdies kairiojo skilvelio vidurinėsios sienos medžiaga atrinkta iš Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Kardiologijos instituto Kardialinės patologijos laboratorijoje daugiau nei 40 metų įvairiomis širdies ligomis sirgusiųjų audinių (įlietų į parafiną) archyvo. Tiriamieji ( $n = 84$ ) suskirstyti į tris grupes: A stadijos ŠN (ŠN rizikos), B stadijos ŠN (iki ŠN) ir C–D stadijų ŠN (simptominis ir pažengęs ŠN) [53] (2.2.1 lentelė).

A stadijos ŠN (ŠN rizikos) grupę sudarė buvę sveiki vyrai arba jų būklė pagerėjo / stabilizavosi iki staigios mirties dėl išeminės širdies ligos ne daugiau kaip 6 val. laikotarpiu nuo atsiradusių šios ligos simptomų pradžios [227]. Atlikus medicinos dokumentų analizę ir apklausus mirusiojo artimuosius, šiems vyrams iki jų mirties nebuvo nustatyta ŠN simptomų. Detalaus pomirtinio širdies morfologinio ištyrimo metu nenustatyta pofinfarktnių randų, ūminių išeminių miokardo pažeidimų trukmė buvo ne ilgesnė nei 6 val. trukmės [228]. B stadijos ŠN (iki ŠN) grupei priskirti vyrai, kurių sveikatos būklė atitiko A stadijos ŠN grupę, tačiau jiems detalaus pomirtinio širdies morfologinio ištyrimo metu kairiajame skilvelyje nustatytas pofinfarktninis randas. C–D stadijų ŠN (simptominis, pažengęs ŠN) grupę sudarė vyrai, kuriems diagnozuotas simptominis ar pažengęs išeminės kilmės ŠN, šiems pacientams atlikta širdies transplantacija ir išsamus širdies operacinės medžiagos po eksplantacijos procedūros morfologinis ištyrimas.

### 2.2.1 lentelė. Tiriamųjų imties charakteristika pagal tyrimo grupes

Požymis	Kontrolinė grupė (n = 25)	A stadijos ŠN grupė (n = 25)	B stadijos ŠN grupė (n = 23)	C–D stadijų ŠN grupė (n = 34)
Amžius (SN), metais	50,5 (7,9)	53,8 (8,0)	54,4 (7,7)	56,2 (7,2)
Lytis	Vyras	Vyras	Vyras	Vyras
ŠN simptomai	Ne	Ne	Ne	Taip
Aterosklerozinė stenozė $\geq 75$ proc. mažiausiai vienoje vainikinėje arterijoje	Ne	Taip	Taip	Taip
Randas po miokardo infarkto	Ne	Ne	Taip	Taip

Santrumpos: A, B, C, D – stadijos pagal ACC / AHA klasifikaciją.

A ir B stadijų ŠN grupių asmenys nebuvo gydyti miokardo remodeliavimąsi reguliuojamaisiais vaistais. C–D stadijų ŠN grupė buvo gydyta pagal išeminės kilmės ŠN gydymo algoritmą.

Kontrolinę grupę sudarė vyrai, kurie mirė per pirmąją parą nuo išorinių priežasčių ir ūminių ligų, nesusijusių su širdies patologija.

Visiems tiriamiesiems nebuvo nustatyta kitų miokardo remodeliavimąsi lemiančių veiksnių – sisteminės arterinės hipertenzijos, kardiomiopatijų, įgimtų ir įgytų širdies ydų, cukrinio diabeto, plaučių ligų.

Specialus morfologinis (makroskopinis ir mikroskopinis) širdies, vainikinių arterijų ir miokardo tyrimas buvo atliktas, remiantis Europos kardiovaskulinių patologų asociacijos pomirtinio tyrimo staigios kardialinės mirties atvejais metodikos rekomendacijomis [229].

Po išsamaus histologinio tyrimo kardiomiocitų morfometrinei ir imunohistocheminei analizei atrinktas širdies kairiojo skilvelio laisvosios sienos vidurinėsios dalies miokardas be ūminės išemijos pažeidimų ar poinfarktinio rando.

## 2.3. Tyrimo metodai

### 2.3.1. Kardiomiocitų histomorfometrinis tyrimas

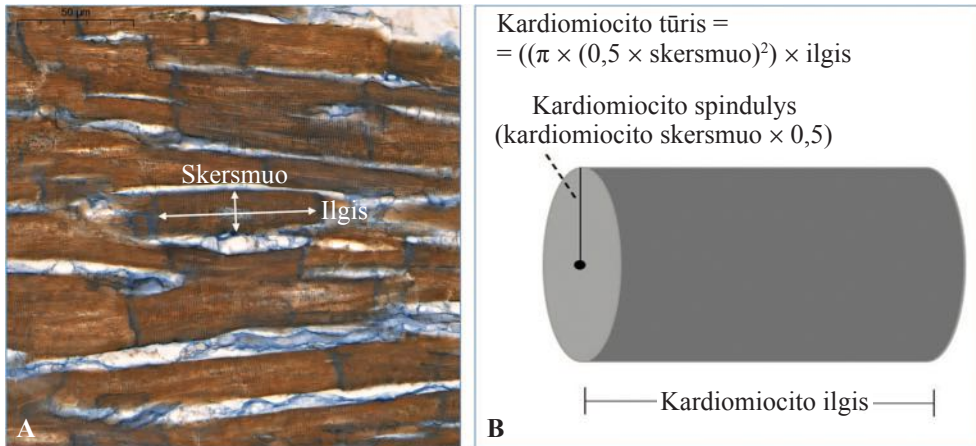
Kardiomiocitų dydžio ir formos pokyčiams remodeliavimosi metu įvertinti atlikta širdies kairiojo skilvelio histomorfometrinių analizė. Iš parafininių blokų rotaciniu mikrotomu „Leica RM2235“ („Leica Biosystems“, Deer Park, Ilinojus, JAV) buvo parengta po penkis 4  $\mu$ m storio parafininius pjūvius, juos nupjaunant žingsniniu būdu kas 20  $\mu$ m, kad atliekant histomorfometrines analizes būtų išvengta tų pačių kardiomiocitų persidengimo. Parafininiai pjūviai ištiesinti „Sakura“ (Torrance, Kalifornija, JAV) vandens vone-

lėje, uždėti ant „SuperFrost plus“ (Menzel, Braunschweig, Vokietija) objektyvių stiklelių ir džiovinėti ant histologinių pjūvių sausinimo stalo „Thermo Electron Corporation“ (Waltham, Masačiusetas, JAV).

Histomorfometriniam vertinimui miokardo pjūviai dažyti Heidenhain azano trichromo metodu kardiomiocitų įterptiniams diskams, matomiems išilgineje projekcijoje, išryškinti. Heidenhain azano trichromo histocheminiu metodu nudažyti pjūviai analizuoti motorizuotu šviesiniu mikroskopu „Olympus BX51“ („Olympus Corporation“, Tokijas, Japonija), dokumentuojant mažiausiai 80 išilginių miokardo pjūvių vidutinio padidėjimo ( $\times 20$ ) regėjimo laukų su „Evolution Qei“ („Media Cybernetics“, Rockville, Marylandas, JAV) skaitmenine kamera.

Histomorfometrinė dokumentuotų išilginių miokardo pjūvių vaizdų analizė atlikta „Image Pro Plus“ („Media Cybernetics“, Rockville, Marylandas, JAV) analizės programine įranga, kiekvienam atvejui išmatuojant mažiausiai 80 išilginės projekcijos kardiomiocitų. Matuoti tik tie išilginės projekcijos kardiomiocitai, kurių abiejuose galuose buvo matomi įterptiniai diskai, o ląstelės centre – branduolys, ir nebuvo kardiomiocitų kontraktilinių elementų struktūros pažeidimų. Išmatuotas kardiomiocito skersmuo (ties ląstelės branduoliu) ir ilgis (atstumas tarp įterptinių diskų)  $\mu\text{m}$  (2.3.1.1 pav.). Apskaičiuota kardiomiocito ilgio ir skersmens santykio rodiklis, išilginės projekcijos plotas (ilgis  $\times$  skersmuo)  $\mu\text{m}^2$  ir tūris ( $(\pi \times (0,5 \times \text{skersmuo})^2) \times \text{ilgis}$ )  $\mu\text{m}^3$ , laikant, kad kardiomiocitai yra cilindro formos.

Kardiomiocito parametrai tiksliai išmatuojami tik tada, kai pjūvis eina per ląstelės vidurį ir yra lygiagretus išilginei ašiai. Kai pjūvis eina per ląstelės vidurį, bet nėra lygiagretus kardiomiocito išilginei ašiai, kardiomiocito ilgis pervertinamas, t. y. jis nustatomas ilgesnis nei yra iš tikrųjų. Kai pjūvio plokštuma yra lygiagreti kardiomiocito centrinei plokštumai, tačiau pjūvis eina ne per branduolio centrą, tada kardiomiocito skersmuo nepakankamai įvertinamas, t. y. skersmuo nustatomas mažesnis nei yra iš tikrųjų. Apskaičiuotos galimos maksimalios kardiomiocito ilgio pervertinimo ir kardiomiocito skersmens neįvertinimo paklaidos, kurios teoriškai gali siekti atitinkamai 3,4 proc. ir 3,2 proc. [32, 230, 231].



**2.3.1.1 pav. A** – širdies kairiojo skilvelio miokardas (Heidenhain azano trichromo metodas, šviesinė mikroskopija,  $\times 40$ ): ląstelės ilgio ir skersmens matavimas; **B** – kardiomiocito morfometrinių matavimų diagrama

Matavimams reikalingas kardiomiocitų kiekis apskaičiuotas, remiantis bandomaisiais matavimais, įvertinus histomorfometrinių parametrų reikšmių vidurkius ir dispersijas. Atliktas to paties tyrėjo pakartotinių tyrimų ir dviejų tyrėjų histomorfometrinių tyrimo vertinimas (Cohen's  $\kappa$  koeficientas  $> 0,9$ ).

### 2.3.2. Kardiomiocitų imunohistocheminis tyrimas

Parafininiai  $3 \mu\text{m}$  storio pjūviai, nupjauti iš tyrimui atrinktų parafininių blokų rotaciniu mikrotomu „Leica RM2235“ („Leica Biosystems“, Deer Park, Ilinojus, JAV), uždėti ant „SuperFrost plus“ (Menzel, Braunschweig, Vokietija) objektinių stiklelių. Deparafinavimas atliktas dažymo automatu „Varistain Gemini“ (Ramsey, Minesota, JAV), naudojant ksileną ir etanolį. Deparafinuoti pjūviai praplauti distiliuotu vandeniu.

Epitopas išlaisvintas mikrobangų įrenginiu RHS-1 („Milestone Medical“, Roseland, Niujorkas, JAV), inkubuojant histologinį preparatą TRIS/EDTA („Agilent Technologies Inc.“, Wood Dale, Ilinojus, JAV) pH 9,0 buferyje, esant  $110 \text{ }^\circ\text{C}$  temperatūrai 8 min. Tolesnis imunohistocheminis tyrimas buvo atliktas, panaudojant „Shandon Coverplate“ plokšteles („Thermo Fisher Scientific“, Waltham, Masačiusetas, JAV).

Blokavus endogeninę peroksidazę, 1 val. pjūviai buvo inkubuoti su atitinkamais pirminiais antikūnais prieš desminą, OPN, Grem1 ir iRNR hnRNP C. Imunohistocheminės reakcijos vizualizavimui panaudota „EnVision FLEX+“ vizualizavimo sistema, į kurios sudėtį įeina jungties sistema su pelės arba triušio antikūnais (angl. *Mouse / Rabbit Linker*) ir krienų peroksidazės „Magenta“ chromogenas, tiriant kardiomiocitų desmino, OPN ir Grem1 baltymų

raiškos intensyvumą, arba DAB+ chromogenas, tiriant kardiomiocitų iRNR hnRNP C baltymo raiškos intensyvumą („Agilent Technologies Inc.“, K800221-2, K802121-2, GV92511-2, Wood Dale, Ilinojus, JAV), taikant gamintojo pateiktas instrukcijas. Atliktos dažymo hematoksilinu („Agilent Technologies Inc.“, S330930-2, Wood Dale, Ilinojus, JAV) ir dehidratacijos procedūros, naudojant didėjančios koncentracijos etilo alkoholio tirpalus ir ksileną. Pjūviai ant objektinių stiklelių uždengti panaudojant polistireno dengiamąją medžiagą.

Imunohistocheminių reakcijų vertinimą atliko du nepriklausomi vertintojai, kurie vertinimo metu nežinojo tiriamųjų priklausomybės tiriamajai grupei. Atliktas to paties tyrėjo kartotinių tyrimų ir dviejų tyrėjų imunohistocheminės reakcijos tyrimo palyginimas (Cohen's  $\kappa$  koeficientas > 0,9).

### **2.3.2.1. Imunohistocheminės reakcijos prieš desminą vizualizavimas ir vertinimas**

Kardiomiocitų citoskeleto pokyčiams įvertinti atliktas imunohistocheminis citoskeleto tarpinio filamento baltymo desmino tyrimas. Blokavus endogeninę peroksidazę, 1 val. pjūviai buvo inkubuoti su pirminiu triušio polikloniniu antikūnu prieš desminą (Cat#HPA018803, „Sigma-Aldrich“, „Merck Group“, Saint Louis, Misūris, JAV; RRID: AB\_1847616), 1:250 skiedimui naudojant darbinį antikūno skiedimo tirpalą („Dako REAL“, „Agilent Technologies Inc.“, Wood Dale, Ilinojus, JAV). Šis pirminis antikūnas validuotas pagal „Žmogaus baltymų atlaso“ projekto pirminių antikūnų validavimo protokolą [232].

Išorinei teigiamai imunohistocheminės reakcijos prieš desminą kontrolei panaudotas kirmėlinės ataugos audinys, o neigiamai – tonzilės audinys [233]. Išorinės kontrolės imunohistocheminės reakcijos atliktos vienu metu kartu su reakcijomis miokarde. To paties izotipo imunoglobulinas G buvo naudojamas kaip reagentų kontrolė.

Pusiau kiekybinis imunohistocheminės reakcijos prieš desminą tyrimas atliktas, vertinant imunohistocheminės reakcijos intensyvumą ir dažymosi pobūdį kardiomiocituose: 1 balas – fiziologinė raiška; 2 balai – suintensyvėjusi desmino imunohistocheminė reakcija su išlikusiu intracitoplazminiu ruožuotumu; 3 balai – suintensyvėjusi imunohistocheminė reakcija su pažeistu intracitoplazminiu ruožuotumu, matomais intracitoplazminiais mikroagregatais.

Imunohistocheminės reakcijos prieš desminą vertinimas atliktas 50 × 40 padidinimo regėjimo laukų, naudojant motorizuotą šviesinį mikroskopą „Olympus BX51“ („Olympus Corporation“, Tokijas, Japonija), kiekvienam atveju įvertinant kardiomiocitų kiekį (proc.) pagal imunohistocheminės

reakcijos intensyvumą ir dažymosi pobūdį mikropjūvyje. Imunohistocheminė reakcija prieš desminą vertinta išilginės projekcijos kardiomiocituose. Pusiau kiekybiškai įvertinus imunohistocheminės reakcijos rezultatus, siekiant visapusiškai įvertinti desmino baltymo kardiomiocituose raišką, apskaičiuotas šio baltymo raiškos intensyvumas:  $((1 \text{ balas} \times \text{kardiomiocitų kiekis proc.}) + (2 \text{ balai} \times \text{kardiomiocitų kiekis proc.}) + (3 \text{ balai} \times \text{kardiomiocitų kiekis proc.})) / 10$ .

Imunohistocheminės reakcijos prieš desminą rezultatai taip pat įvertinti, panaudojant modifikuotą „Žmogaus baltymų atlaso“ (angl. *Human Protein Atlas*) imunohistocheminių reakcijų kategorizavimo sistemą [232], vertinant baltymo raišką kardiomiocituose: 1 = maža raiška (fiziologinė (silpna) reakcija mažiausiai 25 proc. kardiomiocitų arba vidutinio stiprumo reakcija mažiau nei 25 proc. kardiomiocitų); 2 = vidutinė raiška (vidutinio stiprumo reakcija mažiausiai 25 proc. kardiomiocitų arba stipri reakcija mažiau nei 25 proc. kardiomiocitų); 3 = didelė raiška (stipri reakcija daugiau nei 25 proc. kardiomiocitų).

### **2.3.2.2. Imunohistocheminės reakcijos prieš OPN vizualizavimas ir vertinimas**

Kardiomiocitų OPN baltymo raiškos imunohistocheminis tyrimas atliktas taikant nepriklausomų antikūnų validavimo strategiją pagal Tarptautinės darbo grupės antikūnų validacijai rekomendacijas [234–236]. Todėl kardiomiocitų OPN raiškos pokyčiams įvertinti panaudoti du pirminiai antikūnai, detektuojantys nepersidengiančias imunogenų sekas: monokloninis pelės pirminis antikūnas prieš OPN (MPIIB10(1), „Developmental Studies Hybridoma Bank“, Ajova, JAV; RRID: AB\_2286610) ir polikloninis triušio antikūnas prieš OPN (PA5-13494, „Thermo Fisher Scientific“, Waltham, Masačiusetas, JAV; RRID: AB\_2286594). Pirminių antikūnų prieš OPN skiedimui panaudotas antikūnų skiedimo tirpalas („Antibody Diluent“, „Agilent Technologies Inc.“, S080983, Wood Dale, Ilinojus, JAV), taikant pirminių antikūnų skiedimo proporcijas: 1:100 – MPIIB10(1) pirminio antikūno klonui, 1:50 – PA5-13494 pirminio antikūno klonui. Praskiesti pirminiai antikūnai inkubuoti 60 min, esant kambario temperatūrai.

Išorinei teigiamai imunohistocheminės reakcijos prieš OPN kontrolei panaudotas krūties karcinomos audinys [237]. Išorinės kontrolės imunohistocheminės reakcijos atliktos vienu metu kartu su reakcijomis miokarde. To paties izotipo imunoglobulinas G buvo naudojamas kaip reagentų kontrolė.

Analizuojant imunohistocheminės reakcijos prieš OPN rezultatus, atliktas pusiau kiekybinis šios imunohistocheminės reakcijos vertinimas: 0 balų – nėra reakcijos; 1 balas – silpna reakcija; 2 balai – vidutinė reakcija;

3 balai – stipri reakcija. Naudojant motorizuotą šviesinį mikroskopą „Olympus BX51“ („Olympus Corporation“, Tokijas, Japonija), kiekvienam atvejui vertintas tik išilginės projekcijos kardiomiocitų kiekis (proc.) mikropjūvyje pagal imunohistocheminės reakcijos prieš OPN intensyvumą 50 ×40 padidinimo regėjimo laukų. Remiantis pusiau kiekybinio imunohistocheminės reakcijos prieš OPN vertinimo rezultatais, apskaičiuotas OPN baltymo raiškos intensyvumas:  $((1 \text{ balas} \times \text{kardiomiocitų kiekis proc.}) + (2 \text{ balai} \times \text{kardiomiocitų kiekis proc.}) + (3 \text{ balai} \times \text{kardiomiocitų kiekis proc.})) / 10$ .

OPN baltymo raiška kardiomiocituose taip pat įvertinta analizuojant imunohistocheminės reakcijos prieš OPN rezultatus pagal „Žmogaus baltymų atlaso“ (angl. *Human Protein Atlas*) imunohistocheminių reakcijų kategorizavimo sistemą [232]: 0 = raiškos neaptikta (reakcijos nėra arba silpna reakcija mažiau nei 25 proc. kardiomiocitų); 1 = maža raiška (silpna reakcija mažiausiai 25 proc. kardiomiocitų arba vidutinio stiprumo reakcija mažiau nei 25 proc. kardiomiocitų); 2 = vidutinė raiška (vidutinio stiprumo reakcija mažiausiai 25 proc. kardiomiocitų arba stipri reakcija mažiau nei 25 proc. kardiomiocitų); 3 = didelė raiška (stipri reakcija daugiau nei 25 proc. kardiomiocitų).

Atlikus pirminį imunohistocheminių reakcijų prieš OPN vertinimą pagal nepriklausomų antikūnų validacijos strategiją, skirtumą tarp imunohistocheminių reakcijų su MPIIB10(1) ir PA5-13494 pirminiais antikūnais prieš OPN rezultatų nenustatyta.

### **2.3.2.3. Imunohistocheminės reakcijos prieš Grem1 vizualizavimas ir vertinimas**

Siekiant nustatyti kardiomiocitų Grem1 baltymo raiškos pokyčius, esant įvairios stadijos išeminės kilmės ŠN, atliktas kardiomiocitų Grem1 raiškos imunohistocheminis tyrimas, pritaikius nepriklausomų antikūnų validacijos strategiją pagal Tarptautinės darbo grupės antikūnų validacijai rekomendacijas [234–236]. Realizuojant šią antikūnų validacijos strategiją, kardiomiocitų Grem1 baltymo raiškos imunohistocheminiam tyrimui panaudoti du nepersidengiančias imunogenų sekas detektuojantys pirminiai antikūnai: polikloninis triušio pirminis antikūnas prieš Grem1 (ab22138, „Abcam“, Kembridžas, Jungtinė Karalystė; RRID: AB\_446814) ir polikloninis triušio antikūnas prieš Grem1 (GTX03394, „GeneTex“, Irvine, Kalifornija, JAV). Pirminių antikūnų prieš Grem1 skiedimui panaudotas antikūnų skiedimo tirpalas („Antibody Diluent“, „Agilent Technologies Inc.“, S080983, Wood Dale, Ilinojus, JAV), taikant pirminių antikūnų skiedimo proporcijas: 1:100 – ab22138 pirminio antikūno klonui, 1:200 – GTX03394 pirminio antikūno

klonui. Praskiesti pirminiai antikūnai inkubuoti 60 min, esant kambario temperatūrai.

Priešinės liaukos audinys panaudotas išorinei teigiamai imunohistocheminės reakcijos prieš Grem1 kontrolei [238]. Išorinės kontrolės imunohistocheminės reakcijos atliktos vienu metu kartu su reakcijomis miokarde. Reagentų kontrolei buvo naudojamas to paties izotipo imunoglobulinas G.

Atlikus imunohistocheminę reakciją prieš Grem1, šios imunohistocheminės reakcijos rezultatai tirti pritaikius pusiau kiekybinį vertinimo metodą pagal imunohistocheminės reakcijos intensyvumą: 0 balų – nėra reakcijos; 1 balas – silpna reakcija; 2 balai – vidutinė reakcija; 3 balai – stipri reakcija. Imunohistocheminės reakcijos prieš Grem1 rezultatai vertinti analizuojant kiekvieno atvejo mikropjūvio išilginės projekcijos kardiomiocitų kiekį (proc.) pagal imunohistocheminės reakcijos intensyvumą. Vertinimas atliktas motorizuotu šviesiniu mikroskopu „Olympus BX51“ („Olympus Corporation“, Tokijas, Japonija) 50×40 padidrinimo regėjimo laukų kiekvienam atvejui. Pagal imunohistocheminės reakcijos prieš Grem1 pusiau kiekybinio vertinimo rezultatus apskaičiuotas Grem1 baltymo raiškos intensyvumas:  $((1 \text{ balas} \times \text{kardiomiocitų kiekis proc.}) + (2 \text{ balai} \times \text{kardiomiocitų kiekis proc.}) + (3 \text{ balai} \times \text{kardiomiocitų kiekis proc.})) / 10$ .

Grem1 baltymo raiškos kardiomiocituose tyrimas taip pat atliktas vertinant imunohistocheminės reakcijos prieš Grem1 rezultatus pagal „Žmogaus baltymų atlaso“ (angl. *Human Protein Atlas*) imunohistocheminių reakcijų kategorijas [232]: 0 = raiškos neaptikta (reakcijos nėra arba silpna reakcija mažiau nei 25 proc. kardiomiocitų); 1 = maža raiška (silpna reakcija mažiausiai 25 proc. kardiomiocitų arba vidutinio stiprumo reakcija mažiau nei 25 proc. kardiomiocitų); 2 = vidutinė raiška (vidutinio stiprumo reakcija mažiausiai 25 proc. kardiomiocitų arba stipri reakcija mažiau nei 25 proc. kardiomiocitų); 3 = didelė raiška (stipri reakcija daugiau nei 25 proc. kardiomiocitų).

Pritaikius nepriklausomų antikūnų validacijos strategiją, atliktas pirminis imunohistocheminių reakcijų prieš Grem1 su ab22138 ir GTX03394 pirminiais antikūnais vertinimas – šių imunohistocheminių reakcijų rezultatų skirtumų nenustatyta.

#### **2.3.2.4. Imunohistocheminės reakcijos prieš iRNR hnRNP C vizualizavimas ir vertinimas**

Kardiomiocitų iRNR hnRNP C raiškos imunohistocheminis tyrimas atliktas vadovaujantis Tarptautinės darbo grupės antikūnų validacijai rekomendacijose pateikta nepriklausomų antikūnų validacijos strategija [234–236]. Todėl, atsižvelgiant į šias rekomendacijas, kardiomiocitų iRNR hnRNP



C raiškos imunohistocheminiam tyrimui panaudoti du skirtingas imunogenų sekas detektuojantys pirminiai antikūnai: monokloninis pelės pirminis antikūnas prieš iRNR hnRNP C1 / C2 (AMAB91012, „Sigma Aldrich“, Saint Louis, Misūris, JAV; RRID: AB\_2665762; UniProt P07910) ir polikloninis triušio pirminis antikūnas prieš iRNR hnRNP C1 / C2 (SAB 2101056, „Sigma Aldrich“, Saint Louis, Misūris, JAV; RRID: AB\_10604576). AMAB91012 pirminio antikūno prieš iRNR hnRNP C1 / C2 klonui taikyta 1:100, o SAB 2101056 pirminio antikūno klonui – 1:200 pirminių antikūnų skiedimo proporcijos, panaudojant antikūnų skiedimo tirpalą „Antibody Diluent“ („Agilent Technologies Inc.“, S080983, Wood Dale, Iliojus, JAV). Praskiesti pirminiai antikūnai inkubuoti 60 min, esant kambario temperatūrai.

Išorinei teigiamai imunohistocheminės reakcijos prieš iRNR hnRNP C1 / C2 kontrolei panaudoti storosios žarnos histologiniai pjūviai [239]. Išorinės kontrolės imunohistocheminės reakcijos atliktos vienu metu kartu su reakcijomis miokarde. To paties izotipo imunoglobulinas G buvo naudojamas kaip reagentų kontrolė.

Gauti imunohistocheminės reakcijos prieš iRNR hnRNP C1 / C2 histologiniai stikleliai nuskenuoti „Pannoramic Viewer 3D Histech“ („3DHistech Ltd.“, Budapeštas, Vengrija) skeneriu. Pusiau kiekybinis imunohistocheminės reakcijos prieš iRNR hnRNP C1/C2 tyrimas atliktas „Pannoramic SlideViewer“ („3DHistech Ltd.“, Budapeštas, Vengrija) skaitmenizuotų mikroskopinių vaizdų analizės programa, vertinant imunohistocheminės reakcijos intensyvumą tik išilginės projekcijos kardiomiocitų branduoliuose: 0 balų – nėra reakcijos; 1 balas – silpna reakcija; 2 balai – stipri reakcija. Imunohistocheminės reakcijos prieš iRNR hnRNP C1 / C2 vertinimas atliktas kiekvienam atvejui įvertinant imunohistocheminės reakcijos intensyvumo dažnį (proc.) skenuoto atvejo mikropjūvio 300 kardiomiocitų. Pusiau kiekybiškai įvertinus imunohistocheminės reakcijos rezultatus, siekiant visapusiškai įvertinti iRNR hnRNP C baltymo kardiomiocituose raišką, apskaičiuotas iRNR hnRNP C baltymo raiškos intensyvumas:  $((1 \text{ balas} \times \text{kardiomiocitų kiekis proc.}) + (2 \text{ balai} \times \text{kardiomiocitų kiekis proc.})) / 10$ .

Vadovaujantis nepriklausomų antikūnų validacijos strategija, atliktas pirminis imunohistocheminių reakcijų prieš iRNR hnRNP C1 / C2 su AMAB91012 ir SAB 2101056 pirminiais antikūnais vertinimas – šių imunohistocheminių reakcijų rezultatai nesiskyrė.

## 2.4. Statistinė analizė

Kiekybinių duomenų skirstinių atitikimo normaliajam (Gauso) skirstiniui įvertinti atliktas Kolmogorov–Smirnov ( $n \geq 50$ ) ir Shapiro–Wilk ( $n < 50$ ) testai. Kiekybiniai duomenys, kurių skirstinys atitinka normalųjį, aprašyti pateikiant jų vidurkį (standartinę paklaidą, SP). Kiekybiniai duomenys, kurių skirstinys neatitinka normaliojo, aprašyti pateikiant jų medianą ir interkvartilinį plotį. Kokybiniai duomenys aprašyti pateikiant jų dažnį (proc.).

Statistiškai patikimi nepriklausomų kiekybinių rodiklių skirtumai tarp A, B, C–D stadijų ŠN ir kontrolinės grupių, kai nepriklausomų kiekybinių duomenų skirstinys atitiko normalųjį, nustatyti atliekant ANOVA su Bonferoni porinių palyginimų kriterijumi. ANOVA hierarchinis (lizdinės analizės) variantas (angl. *nested design of ANOVA*) taikytas siekiant nustatyti statistiškai patikimus nepriklausomų histomorfometrinių kiekybinių rodiklių skirtumus tarp A stadijos ŠN, B stadijos ŠN, C–D stadijų ŠN ir kontrolinės grupių. Taikant ANOVA hierarchinį variantą, A, B, C–D stadijų ir kontrolinės grupės laikytos fiksuotu veiksniu (angl. *fixed factor*), o nepriklausomų histomorfometrinių matavimų rezultatai – atsitiktiniu veiksniu (angl. *random factor*).

Statistiškai patikimi nepriklausomų kiekybinių rodiklių skirtumai tarp A, B, C–D stadijų ŠN ir kontrolinės grupių, kai nepriklausomų kiekybinių duomenų skirstinys neatitiko normaliojo skirstinio, nustatyti taikant Kruskal–Wallis testą su porinių palyginimų kriterijumi. Porinių palyginimų kriterijaus testų rezultatai analizuoti pagal Bonferroni pataisą.

Nepriklausomų kiekybinių duomenų koreliacinė analizė atlikta apskaičiuojant Pearsono koreliacijos koeficientą ( $r_p$ ), kai dviejų kiekybinių rodiklių skirstiniai atitiko normalųjį skirstinį, ir Spearmano koreliacijos koeficientą ( $r_s$ ) – kai skirstiniai neatitiko normaliojo skirstinio.

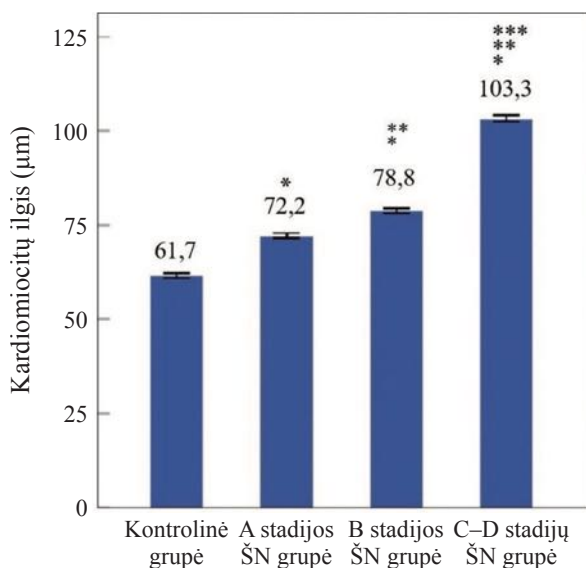
Siekiant patikslinti nustatytas reikšmingas koreliacinės analizės sąsajas tarp nepriklausomų kiekybinių rodiklių ir įvertinti jų galimą tiesioginį poveikį kitiems rodikliams statistiškai, atlikta matuotų rodiklių duomenų tiesinė regresinė analizė, kiekvienam tiesinės regresijos modeliui pateikiant modelio prognozinę ir kokybinę vertę apibūdinančius rodiklius: determinacijos koeficientą ( $R^2$ ), nepriklausomo kintamojo koeficientą, konstantą, ANOVA ir Durbin–Watson kriterijų dėl galimos modelio likučių autokoreliacijos.

Statistinės analizės metu nustatyti skirtumai laikyti statistiškai patikimais, kai  $p < 0,05$ . Statistinė analizė atlikta SPSS programa (SPSS versija 29.0, IBM, Armonk, Niujorkas, JAV).

### 3. TYRIMO REZULTATAI

#### 3.1. Kardiomiocitų morfometrinių parametų pokyčiai esant įvairios stadijos išeminės kilmės ŠN

Iš viso 8638 kardiomiocitai iš širdies kairiojo skilvelio vidurinėsios sienos buvo tinkami histomorfometrinei analizei šviesiniu mikroskopu: A stadijos ŠN grupės – 2080 kardiomiocitų, B stadijos ŠN grupės – 1992 kardiomiocitai, C–D stadijų ŠN grupės – 2637 kardiomiocitai, kontrolinės grupės – 1929 kardiomiocitai. Išanalizavus išmatuoto išilginės projekcijos kardiomiocitų ilgio pasiskirstymo dėsningumus progresuojant išeminės kilmės ŠN, nustatyta, kad jau A stadijos ŠN grupės tiriamųjų kardiomiocitų vidutinis ilgis buvo didesnis, palyginus su kontrolinės grupės analogišku parametru ( $p < 0,001$ ) (3.1.1 pav.).

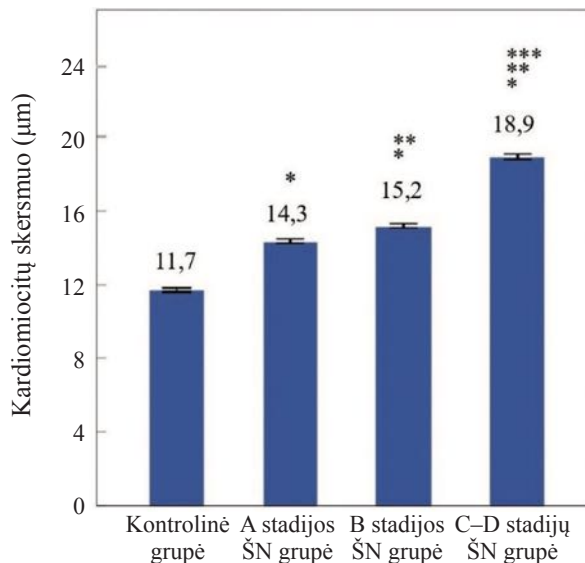


##### 3.1.1 pav. Kardiomiocitų ilgis (vidurkis ir standartinė paklaida)

Paaiškinimai: \* $p < 0,001$  – A, B ir C–D stadijų ŠN grupės, palyginus su kontroline grupe; \*\* $p < 0,001$  – B ir C–D stadijų ŠN grupės, palyginus su A stadijos ŠN grupe; \*\*\* $p < 0,001$  – C–D stadijų ŠN grupė, palyginus su B stadijos ŠN grupe.

B stadijos ŠN grupės tiriamųjų kardiomiocitų ilgis buvo didesnis, palyginus su A stadijos ŠN ( $p < 0,001$ ) ir kontrolinės grupių tiriamųjų analogišku rodikliu ( $p < 0,001$ ). C–D stadijų ŠN grupės kardiomiocitai buvo ilgiausi, palyginus su B ( $p < 0,001$ ), A stadijų ŠN ( $p < 0,001$ ) ir kontrolinės grupių tirtuoju parametru ( $p < 0,001$ ).

Panašūs kardiomiocitų histomorfometrines analizės dėsningumai buvo dokumentuoti, analizuojant kardiomiocitų skersmens morfometriniu tyrimo rezultatus (3.1.2 pav.). A stadijos ŠN grupės tiriamųjų kardiomiocitų skersmuo buvo didesnis, palyginus su kontrolinės grupės analogišku rodikliu ( $p < 0,001$ ). B stadijos ŠN grupės kardiomiocitų skersmuo buvo didesnis, palyginus su A stadijos ŠN ( $p < 0,001$ ) ir kontrolinės grupių tiriamųjų kardiomiocitų skersmeniu ( $p < 0,001$ ). C–D stadijų ŠN grupės kardiomiocitų skersmuo buvo didžiausias, palyginus su B ( $p < 0,001$ ), A stadijų ŠN ( $p < 0,001$ ) ir kontrolinės grupių skersmens parametru ( $p < 0,001$ ).

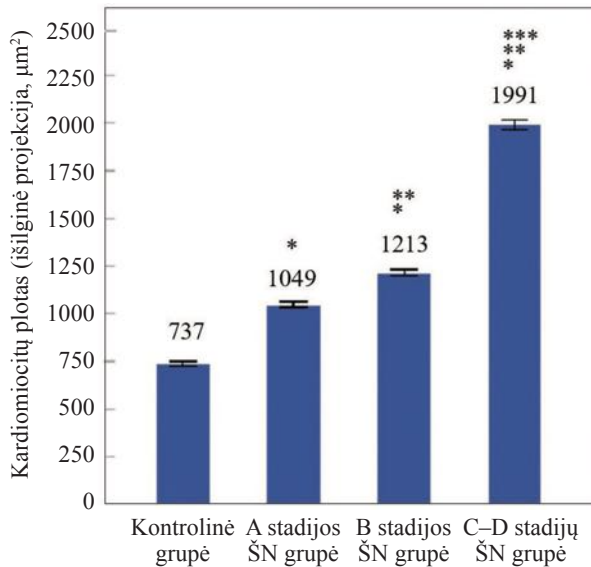


### 3.1.2 pav. Kardiomiocitų skersmuo (vidurkis ir standartinė paklaida)

Paiškinimai: \* $p < 0,001$  – A, B ir C–D stadijų ŠN grupės, palyginus su kontroline grupe; \*\* $p < 0,001$  – B ir C–D stadijų ŠN grupės, palyginus su A stadijos ŠN grupe; \*\*\* $p < 0,001$  – C–D stadijų ŠN grupė, palyginus su B stadijos ŠN grupe.

Apskaičiavus išilginės kardiomiocitų projekcijos paviršiaus plotą, didesnė šio rodiklio vertė nustatyta, kai buvo A stadijos ŠN, palyginus su kontrolinės grupės ( $p < 0,001$ ) analogišku rodikliu (3.1.3 pav.). B stadijos ŠN grupės išilginės kardiomiocitų projekcijos plotas didėjo ir buvo didesnis nei A stadijos ŠN ( $p < 0,001$ ) ir kontrolinės grupių tirtieji parametrai ( $p < 0,001$ ).

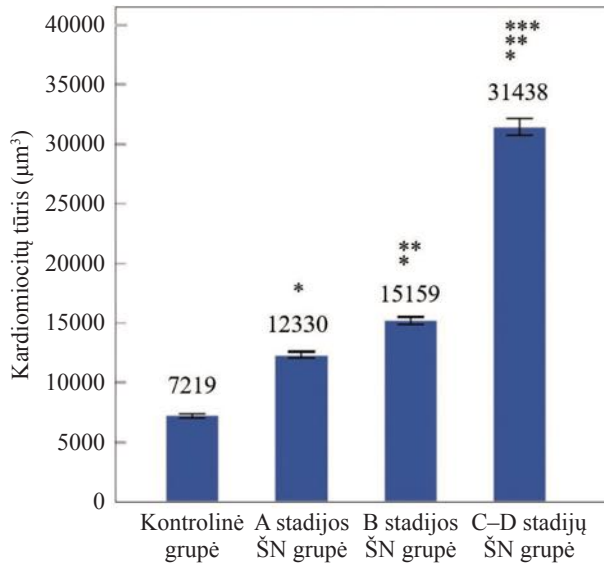
C–D stadijų ŠN grupės išilginės kardiomiocitų projekcijos plotas buvo didžiausias, šis rodiklis buvo didesnis nei B ( $p < 0,001$ ), A stadijų ŠN ( $p < 0,001$ ) ir kontrolinės grupių tiriamųjų išilginės projekcijos plotas ( $p < 0,001$ ).



### 3.1.3 pav. Išilginės kardiomiocitų projekcijos plotas (vidurkis ir standartinė paklaida)

Paaikškinimai: \* $p < 0,001$  – A, B ir C–D stadijų ŠN grupės, palyginus su kontroline grupe; \*\* $p < 0,001$  – B ir C–D stadijų ŠN grupės, palyginus su A stadijos ŠN grupe; \*\*\* $p < 0,001$  – C–D stadijų ŠN grupė, palyginus su B stadijos ŠN grupe.

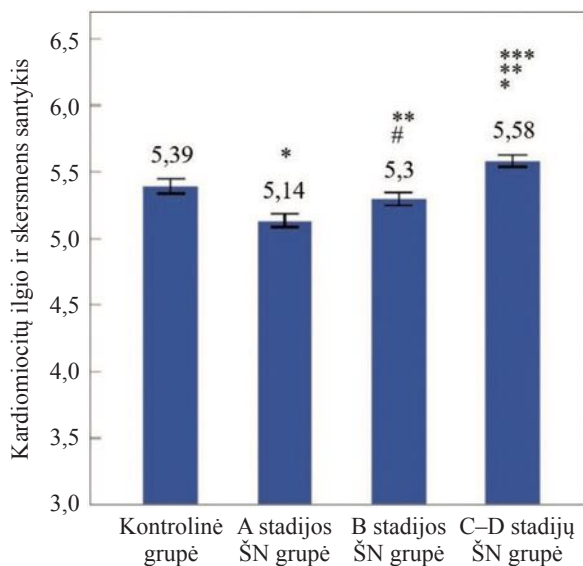
Panašūs dėsningumai pastebėti ir vertinant apskaičiuoto A, B ir C–D stadijų ŠN grupių kardiomiocitų tūrio pokyčius (3.1.4 pav.). Kardiomiocitų tūris, esant A stadijos ŠN, buvo didesnis, palyginus su kontrolinės grupės tirtuoju parametru ( $p < 0,001$ ). B stadijos ŠN grupės kardiomiocitų tūrio rodiklis didėjo, palyginus su A stadijos ŠN ( $p < 0,001$ ) ir kontrolinės grupių kardiomiocitų tūriu ( $p < 0,001$ ). C–D stadijų ŠN grupės kardiomiocitų tūris buvo beveik dvigubai didesnis negu B stadijos ŠN grupės analogiškas rodiklis ( $p < 0,001$ ) ir daugiau nei dukart didesnis, palyginus su A stadijos ŠN ( $p < 0,001$ ) ir kontrolinės grupių rezultatais ( $p < 0,001$ ).



### 3.1.4 pav. Kardiomiocitų tūris (vidurkis ir standartinė paklaida)

Paaiškinimai: \* $p < 0,001$  – A, B ir C–D stadijų ŠN grupės, palyginus su kontroline grupe; \*\* $p < 0,001$  – B ir C–D stadijų ŠN grupės, palyginus su A stadijos ŠN grupe; \*\*\* $p < 0,001$  – C–D stadijų ŠN grupė, palyginus su B stadijos ŠN grupe.

Išanalizavus kardiomiocitų geometrijos kitimus atspindinčio ilgio ir skersmens santykio rodiklio pokyčius progresuojant išeminės kilmės ŠN, nustatyta, kad šis apskaičiuotas A stadijos ŠN grupės tiriamųjų rodiklis buvo mažesnis, palyginus su kontrolinės grupės analogišku rodikliu ( $p < 0,001$ ). Tai rodo, kad šioje grupėje sparčiau didėjo kardiomiocitų skersmuo, palyginus su šių ląstelių ilgiu (3.1.5 pav.). Vis dėlto, vertinant B stadijos ŠN grupės kardiomiocitų ilgio ir skersmens santykį, nustatyta, kad B stadijos ŠN grupės ilgio ir skersmens santykis didėjo, palyginus su A stadijos ŠN grupės tiriamųjų analogišku santykiu ( $p < 0,001$ ), tačiau buvo mažesnis už kontrolinės grupės ilgio ir skersmens santykio rodiklį ( $p < 0,05$ ). C–D stadijos ŠN grupės tiriamųjų kardiomiocitų ilgio ir skersmens santykis buvo didžiausias, palyginus su B ( $p < 0,001$ ), A stadijų ŠN ( $p < 0,001$ ) ir kontrolinės grupių tirtuoju parametru ( $p < 0,001$ ).



**3.1.5 pav.** Kardiomiocitų ilgio ir skersmens santykio rodiklis (vidurkis ir standartinė paklaida)

Paaškinimai: \* $p < 0,001$  – A ir C–D stadijų ŠN grupės, palyginus su kontroline grupe; # $p < 0,05$  – B stadijos ŠN grupė, palyginus su kontroline grupe; \*\* $p < 0,001$  – B ir C–D stadijų ŠN grupės, palyginus su A stadijos ŠN grupe; \*\*\* $p < 0,001$  – C–D stadijų ŠN grupė, palyginus su B stadijos ŠN grupe.

Atlikus kardiomiocitų histomorfometrinių rodiklių rezultatų koreliacinę analizę, nustatytos teigiamosios koreliacijos tarp kardiomiocitų ilgio ir skersmens, vertinant visos imties bei atskirai – A, B ir C–D stadijų ŠN bei kontrolinės grupių – tirtuosius rodiklius (3.1.1 lentelė).

**3.1.1 lentelė.** Kardiomiocitų ilgio ir skersmens koreliacinė analizė

Kontrolinė grupė	A stadijos ŠN grupė	B stadijos ŠN grupė	C–D stadijų ŠN grupė	Visa tiriamoji imtis
0,460; $p < 0,001$	0,355; $p < 0,001$	0,400; $p < 0,001$	0,453; $p < 0,001$	0,685; $p < 0,001$

Pateikti rezultatai: Pearsono koreliacijos koeficientas.

Siekiant kiekybiniu požiūriu tiksliai įvardinti kardiomiocitų ilgio ir skersmens kitimo pobūdį, kai progresuoja išeminės kilmės ŠN, atlikta A, B, C–D stadijų ŠN ir kontrolinės grupių kardiomiocitų ilgio bei skersmens rodiklių kitimo tiesinės regresijos analizė.

Remiantis kardiomiocitų ilgio ir skersmens sąsajų tiesinės regresijos modelio analize, galima teigti, kad C–D stadijų ŠN grupės modelio prognozinė geba buvo didžiausia ( $R^2 = 0,2037$ ) ir buvo artima kontrolinės grupės prognozei gebai ( $R^2 = 0,2096$ ) (3.1.6 pav.).

Kontrolinė grupė

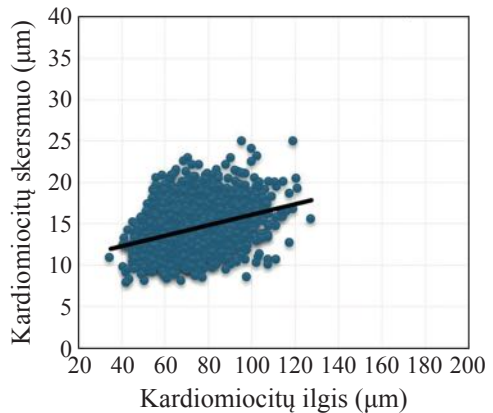
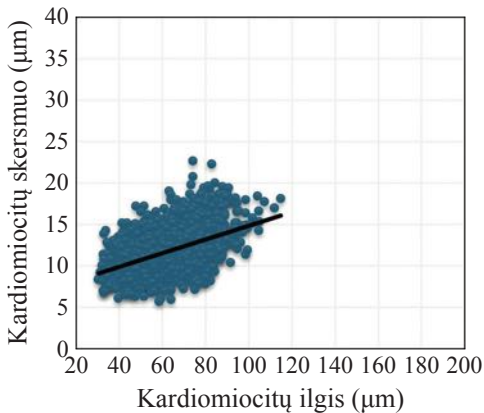
$$y = 0,0827x + 6,5967$$

$$R^2 = 0,2096$$

A stadijos ŠN grupė

$$y = 0,0635x + 9,7575$$

$$R^2 = 0,1211$$



B stadijos ŠN grupė

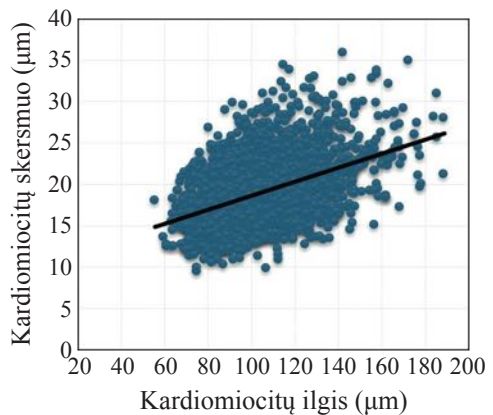
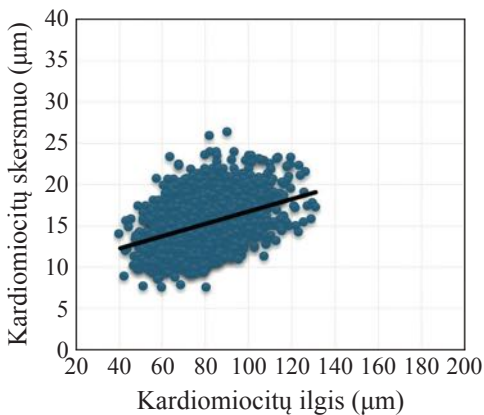
$$y = 0,0749x + 9,2807$$

$$R^2 = 0,1555$$

C–D stadijos ŠN grupė

$$y = 0,0848x + 10,165$$

$$R^2 = 0,2037$$



**3.1.6 pav.** Kardiomiocitų ilgio ir skersmens sąsajų tiesinės regresijos analizė (tiesinės regresijos modelio lygtis ir determinacijos koeficientas,  $R^2$ )

Paiškinimai: Durbin–Watson rodiklis – kontrolinė grupė – 1,51; A stadijos ŠN grupė – 1,59; B stadijos ŠN grupė – 1,61; C–D stadijų pagal ŠN grupė – 1,17. Modelio ANOVA: kontrolinė grupė –  $p < 0,001$ ; A stadijos ŠN grupė –  $p < 0,001$ ; B stadijos ŠN grupė –  $p < 0,001$ ; C–D stadijų ŠN grupė –  $p < 0,001$ .



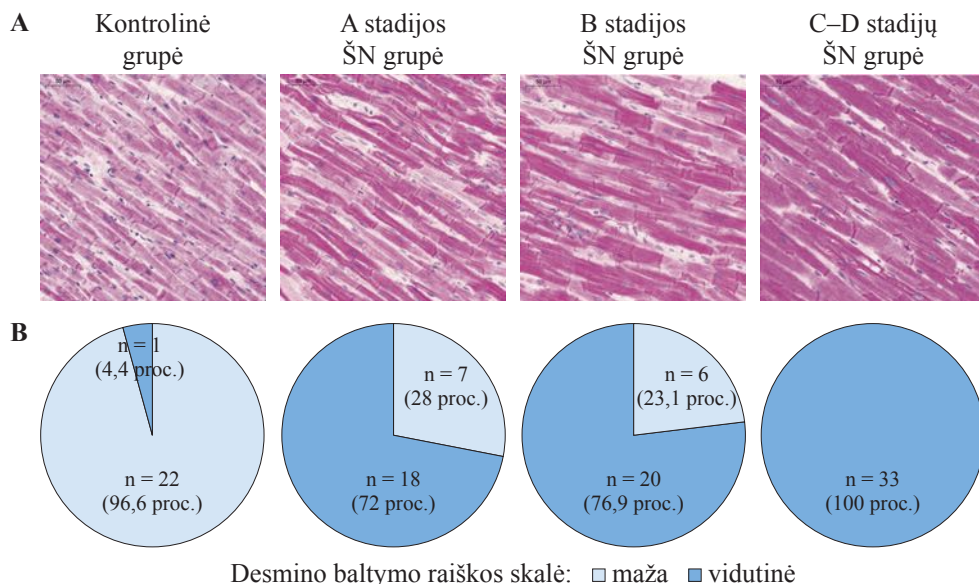
A stadijos ŠN ir B stadijos ŠN grupių tiesinės regresijos modelio prognozė buvo mažesnė (atitinkamai,  $R^2 = 0,1211$  ir  $R^2 = 0,1555$ ), palyginus su C–D stadijų ŠN ir kontrolinės grupės prognoze.

Taigi, atlikus kardiomiocitų histomorfometrinių rodiklių analizę, esant įvairios stadijos išeminės ŠN, jau A stadijos ŠN grupės kardiomiocitų histomorfometriniai rodikliai buvo didesni, palyginus su kontrolinės grupės tiriamųjų rodikliais. B stadijos ŠN grupės tiriamųjų kardiomiocitų histomorfometriniai rodikliai didėjo, palyginus su A stadijos ŠN ir kontrolinės grupių analogiškais parametrais. C–D stadijų ŠN grupės tiriamųjų histomorfometrinių rodiklių vertės buvo didžiausios. Apskaičiavus kardiomiocitų ilgio ir skersmens santykio rodiklį, nustatyta, kad A ir B stadijų ŠN grupės kardiomiocitai didėjo sparčiau didėjant šios grupės ląstelių skersmeniui, palyginus su jų ilgiu, o C–D stadijų ŠN grupių kardiomiocitai didėjo labiau ilgėjant šioms ląstelėms nei didėjant jų skersmeniui.

Nustatytos reikšmingos teigiamosios kardiomiocitų ilgio ir skersmens koreliacijos, esant įvairios stadijos išeminės kilmės ŠN. Atlikus kardiomiocitų ilgio ir skersmens sąsajų tiesinės regresijos modelio analizę, nustatyta, jog C–D stadijų ŠN grupės modelio prognozė buvo didžiausia.

### **3.2. Kardiomiocitų desmino baltymo raiškos dinamika**

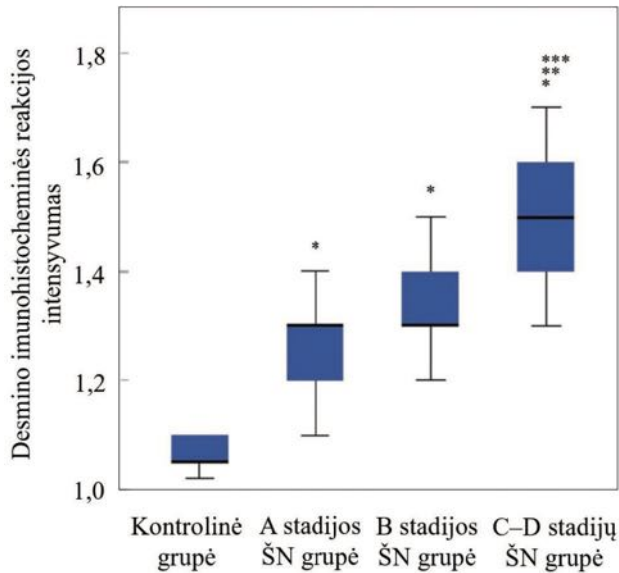
Įvertinus imunohistocheminės reakcijos prieš desminą rezultatus pagal desmino baltymo raiškos kardiomiocituose skalę, maža desmino raiška kardiomiocituose buvo nustatyta daugiau nei 95 proc. kontrolinės grupės tiriamųjų atvejų (3.2.1 pav.). A stadijos ŠN grupės kardiomiocitų vidutinė desmino baltymo raiška dokumentuota 72 proc. šios grupės tiriamųjų, likusiems nustatyta maža desmino baltymo raiška. Dažnesnė vidutinė desmino baltymo raiška stebėta B stadijos ŠN grupės tiriamiesiems, kur ši raiška buvo nustatyta daugiau nei 76 proc. šios grupės kardiomiocitų. Visiems (100 proc.) C–D stadijų ŠN grupės tiriamiesiems buvo vidutinė desmino raiška. Šioje grupėje 10 proc. kardiomiocitų buvo nustatyta suintensyvėjusi desmino baltymo imunohistocheminė reakcija su intracitoplazminiais desmino mikroagregatais.



**3.2.1 pav. Kardiomiocitų desmino raiška: (A) Imunohistocheminė reakcija, histologinis miokardo vaizdas (desminas, HPA018803), (B) Imunohistocheminės reakcijos vertinimo pagal desmino baltymo raiškos skalę rezultatai**

Remiantis pusiau kiekybiniu imunohistocheminės reakcijos prieš desminą vertinimu apskaičiavus desmino imunohistocheminės reakcijos intensyvumą, nustatyta, kad A stadijos ŠN grupės kardiomiocitų desmino imunohistocheminės reakcijos intensyvumas buvo didesnis, palyginus su kontrolinės grupės analogišku rodikliu ( $p < 0,001$ ) (3.2.2 pav.).

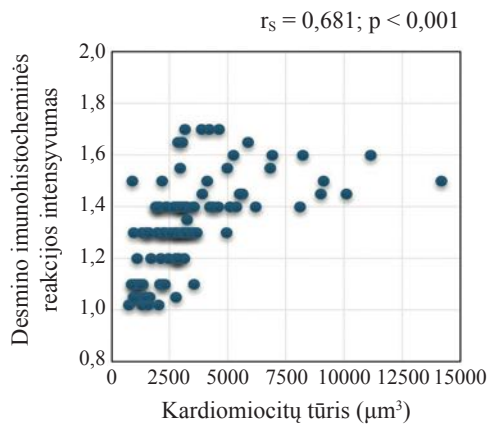
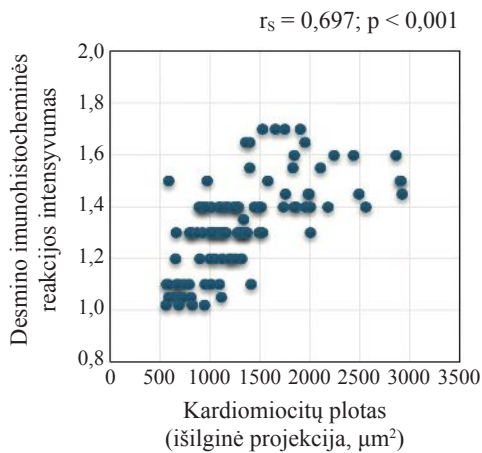
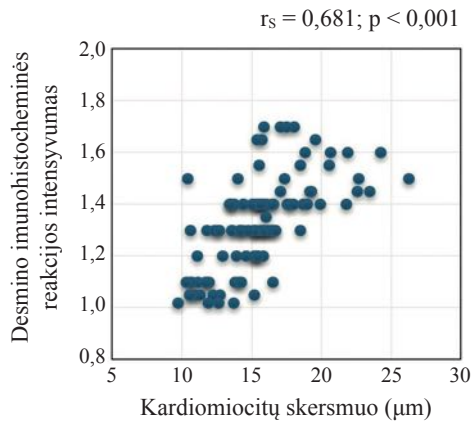
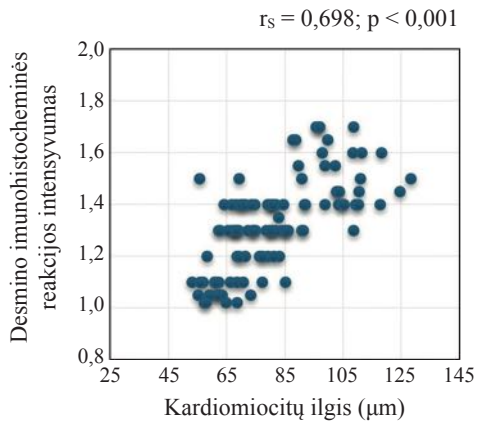
B ir A stadijų ŠN grupių desmino imunohistocheminės reakcijos intensyvumas buvo panašus ( $p > 0,05$ ). C–D stadijų ŠN grupės tiriamųjų kardiomiocitų desmino raišką apibūdinantis imunohistocheminės reakcijos intensyvumas buvo didžiausias, palyginus su kontrolinės ( $p < 0,001$ ), A ( $p < 0,001$ ) ir B stadijų ŠN grupių ( $p < 0,001$ ) imunohistocheminės reakcijos intensyvumu.



**3.2.2 pav.** *Kardiomiocitų desmino baltymo raiška: pusiau kiekybinio imunohistocheminės reakcijos vertinimo rezultatai (mediana, interkvartilinis plotis, minimali ir maksimali reikšmės)*

Paaškinimai: \* $p < 0,001$  – A, B, C–D stadijų ŠN grupės, palyginus su kontroline grupe; \*\* $p < 0,001$  – C–D stadijų ŠN grupės, palyginus su A stadijos ŠN grupe; \*\*\* $p < 0,001$  – C–D stadijų ŠN grupė, palyginus su B stadijos ŠN grupe (Kruskal–Wallis testas su poriniais palyginimais,  $p$  vertė – pagal Bonferroni pataisą).

Stipri teigiamoji koreliacija nustatyta tarp desmino imunohistocheminės reakcijos intensyvumo ir kardiomiocitų ilgio ( $r_s = 0,698$ ;  $p < 0,001$ ) (3.2.3 pav.). Panaši stipri teigiamoji koreliacija nustatyta tarp desmino baltymo raišką kardiomiocituose rodančio desmino imunohistocheminės reakcijos intensyvumo ir kardiomiocitų skersmens ( $r_s = 0,681$ ;  $p < 0,001$ ). Įvertinus sąsajas tarp desmino imunohistocheminės reakcijos intensyvumo ir kardiomiocitų išilginės projekcijos ploto bei šios reakcijos intensyvumo ir kardiomiocitų tūrio, taip pat nustatytos stiprios teigiamosios koreliacijos tarp šių rodiklių (atitinkamai,  $r_s = 0,697$ ;  $p < 0,001$  ir  $r_s = 0,681$ ;  $p < 0,001$ ).



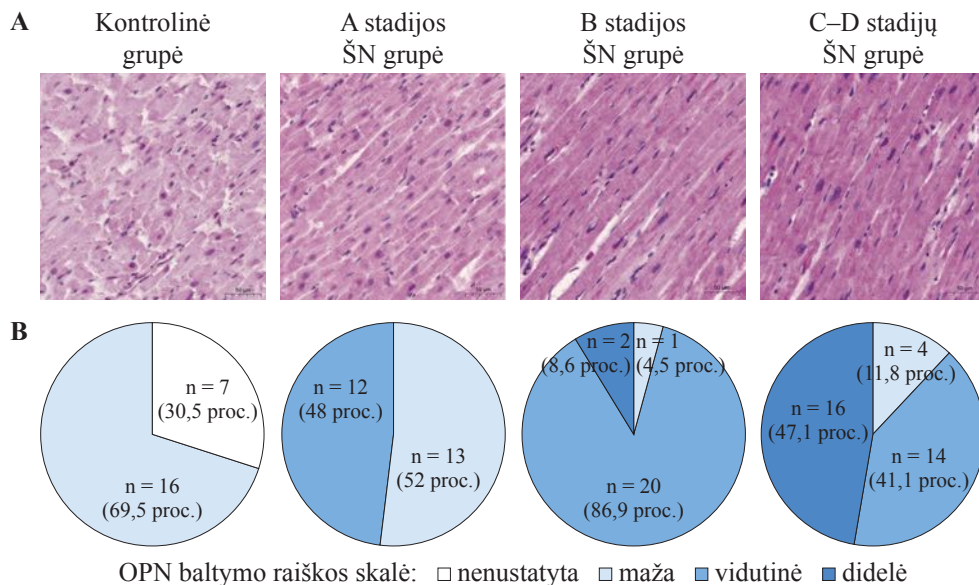
### **3.2.3 pav.** Kardiomiocitų desmino imunohistocheminės reakcijos intensyvumo ir jų histomorfometrinių rodiklių koreliacinė analizė

Išnagrinėjus kardiomiocitų desmino raiškos tyrimo rezultatus, esant įvairios stadijos išeminės kilmės ŠN, galima teigti, kad jau A stadijos ŠN grupės tiriamųjų kardiomiocitų desmino baltymo raiška buvo didesnė. Panaši kardiomiocitų desmino raiška išliko ir B stadijos ŠN grupės tiriamųjų, o didžiausia kardiomiocitų desmino raiška nustatyta, kai buvo C–D stadijų ŠN.

Taip pat svarbu atkreipti dėmesį, kad desmino baltymo raiškos kardiomiocituose pokyčiai yra susiję su kardiomiocitų histomorfometrinių rodiklių pokyčiais progresuojant išeminės kilmės ŠN.

### 3.3. Kardiomiocitų OPN baltymo raiškos kaita

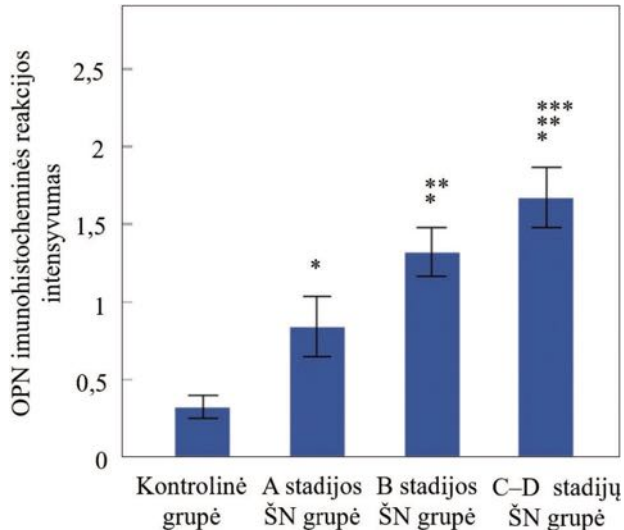
Išnagrinėjus imunohistocheminės reakcijos prieš OPN rezultatus, OPN baltymo raiškos nenustatyta virš 30 proc. kontrolinės grupės tiriamųjų kardiomiocitų (3.3.1 pav.).



**3.3.1 pav.** Kardiomiocitų OPN baltymo raiška: **(A)** Imunohistocheminė reakcija, histologinis miokardo vaizdas (OPN, MPIIB10(1)), **(B)** Imunohistocheminės reakcijos vertinimo pagal OPN baltymo raiškos skalę rezultatai

Maža kontrolinės grupės kardiomiocitų OPN raiška buvo virš 69 proc. tiriamųjų. Vidutinė A stadijos ŠN grupės kardiomiocitų OPN baltymo raiška dokumentuota 48 proc. tiriamųjų, o likusiems 52 proc. kardiomiocitų OPN raiška buvo maža. Pirmą kartą dokumentuota didelė B stadijos ŠN grupės OPN raiška buvo virš 8 proc. šios grupės tiriamųjų. Dažniausiai (virš 86 proc.) šios grupės tiriamiesiems buvo nustatoma vidutinė kardiomiocitų OPN baltymo raiška. Daugiausiai atvejų, kai stebėta didelė kardiomiocitų OPN baltymo raiška, buvo analizuojant C–D stadijų ŠN grupės kardiomiocitų OPN baltymo raišką – virš 46 proc., o vidutinė OPN raiška buvo nustatyta virš 41 proc. šios grupės tiriamųjų.

Įvertinus kardiomiocitų OPN imunohistocheminės reakcijos intensyvumą, A stadijos ŠN grupės tiriamųjų kardiomiocitų reakcijos intensyvumas buvo didesnis, palyginus su kontrolinės grupės tiriamųjų analogišku rodikliu ( $p < 0,001$ ) (3.3.2 pav.).



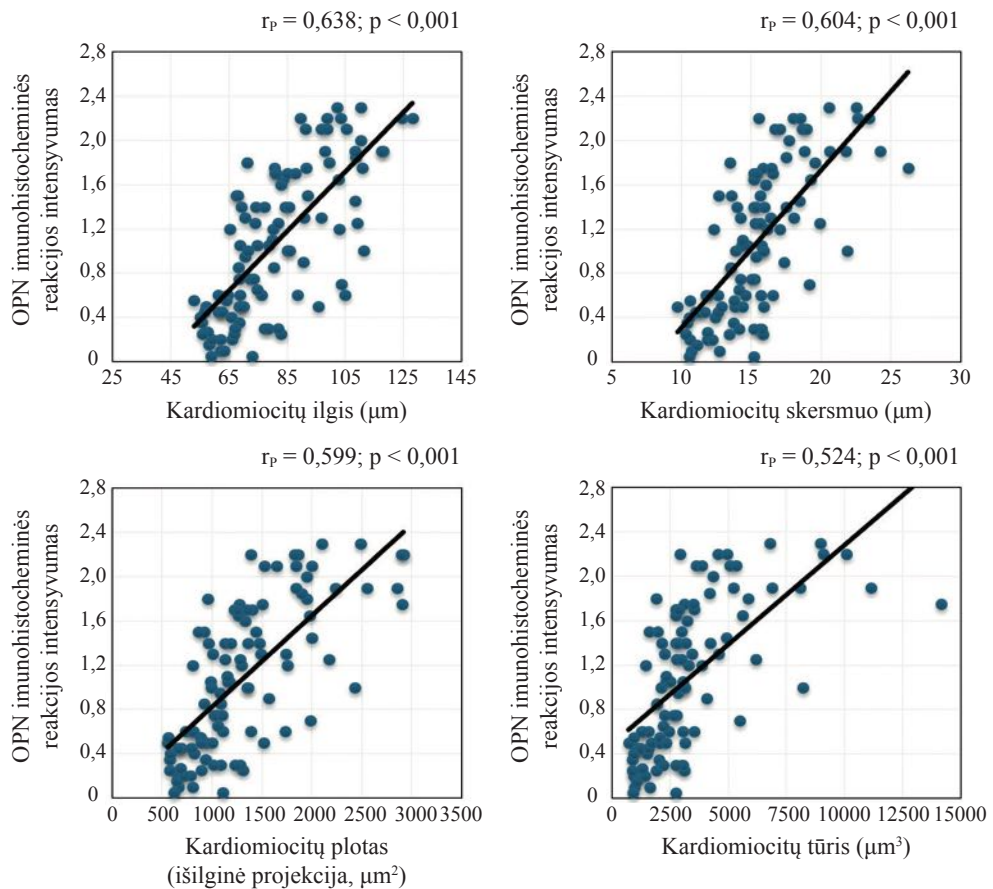
**3.3.2 pav.** Kardiomiocitų OPN baltymo raiška: pusiau kiekybinio imunohistocheminės reakcijos vertinimo rezultatai (vidurkis, standartinė paklaida)

Paaiškinimai: \* $p < 0,001$  – A, B, C–D stadijų ŠN grupės, palyginus su kontroline grupe; \*\* $p < 0,001$  – B ir C–D stadijų ŠN grupės, palyginus su A stadijos ŠN grupe; \*\*\* $p < 0,001$  – C–D stadijų ŠN grupė, palyginus su B stadijos ŠN grupe (ANOVA su poriniais palyginimais pagal Bonferroni kriterijų).

Kardiomiocitų OPN raišką apibūdinantis B stadijos ŠN grupės imunohistocheminės reakcijos intensyvumas didėjo, palyginus su kontrolinės ( $p < 0,001$ ) ir A stadijos ŠN grupių analogiškais rodikliais ( $p < 0,001$ ). Didžiausia kardiomiocitų OPN raišką kardiomiocituose atspindinčio rodiklio vertė buvo nustatyta analizuojant C–D stadijų ŠN grupės kardiomiocitų OPN raišką, kur OPN imunohistocheminės reakcijos intensyvumas buvo didesnis nei kontrolinės ( $p < 0,001$ ), A ( $p < 0,001$ ) ir B stadijų ŠN grupių analogiški rodikliai ( $p < 0,001$ ).

Išanalizavus kardiomiocitų OPN baltymo raiškos pokyčius ir šių ląstelių histomorfometrinių rodiklių kitimus progresuojant išeminės kilmės ŠN, stipri teigiamoji koreliacija nustatyta tarp OPN imunohistocheminės reakcijos intensyvumo ir kardiomiocitų ilgio rodiklių ( $r_p = 0,638$ ;  $p < 0,001$ ) (3.3.3 pav.). Stipri teigiamoji koreliacija taip pat nustatyta ir vertinant kardiomiocitų OPN

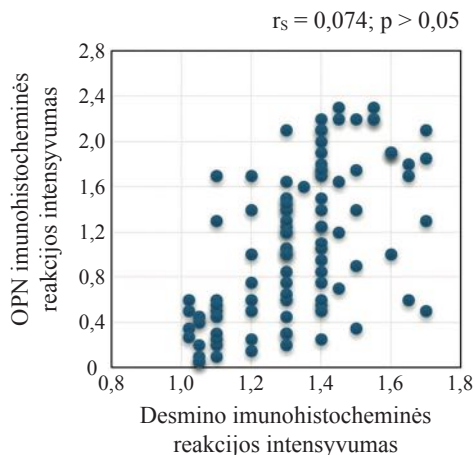
imunohistocheminės reakcijos intensyvumą bei jų skersmens sąsajas ( $r_p = 0,604$ ;  $p < 0,001$ ). Išnagrinėjus kardiomiocitų OPN imunohistocheminės reakcijos intensyvumo pokyčius ir šių ląstelių išilginės projekcijos ploto pakitimus, taip pat dokumentuota stipri teigiamoji koreliacija tarp šių rodiklių ( $r_p = 0,599$ ;  $p < 0,001$ ).



### 3.3.3 pav. Kardiomiocitų OPN imunohistocheminės reakcijos intensyvumo ir jų histomorfometrinių rodiklių koreliacinė analizė

Statistiškai vidutinė teigiamoji koreliacija nustatyta ir įvertinus sąsajas tarp kardiomiocitų OPN imunohistocheminės reakcijos intensyvumo bei jų tūrio pokyčių ( $r_p = 0,524$ ;  $p < 0,001$ ).

Įvertinus sąsajas tarp kardiomiocitų OPN ir desmino imunohistocheminių reakcijų intensyvumo, koreliacija tarp šių rodiklių buvo silpna ir statistiškai nepatikima ( $r_s = 0,074$ ;  $p > 0,05$ ) (3.3.4 pav.).



**3.3.4 pav.** *Kardiomiocitų OPN ir desmino imunohistocheminių reakcijų intensyvumo koreliacinė analizė*

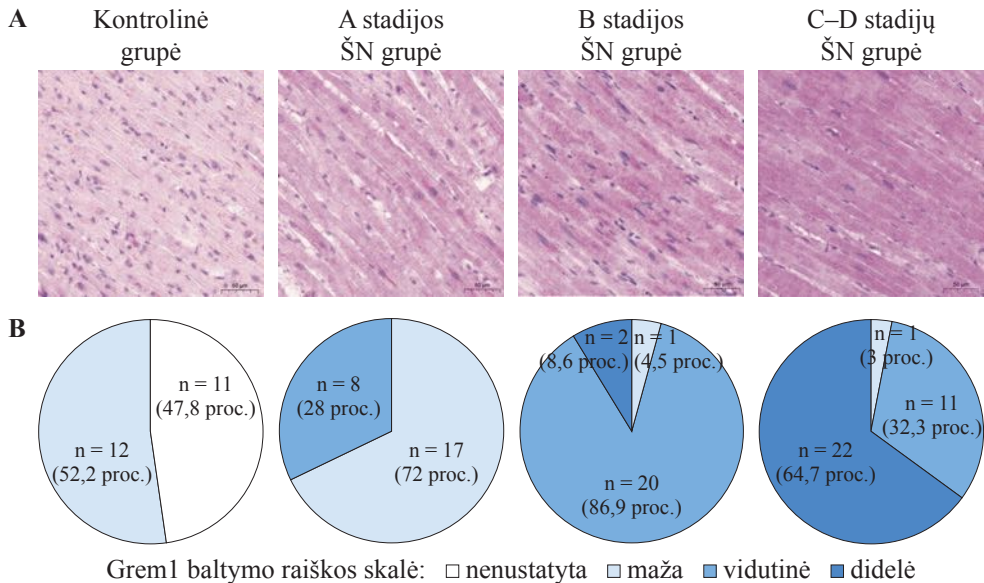
Apibendrinant kardiomiocitų OPN imunohistocheminio tyrimo rezultatus, jau A stadijos ŠN tiriamųjų kardiomiocitų OPN baltymo raiška buvo padidėjusi. B stadijos ŠN grupės tiriamųjų kardiomiocitų OPN baltymo raiška didėjo, palyginus su A stadijos ŠN ir kontrolinės grupių OPN baltymo raiška. Didžiausia OPN baltymo raiška buvo nustatyta, kai buvo C–D stadijų ŠN.

Išeminės kilmės miokardo pažeidimo nulemtu remodeliavimosi metu keičiantis histomorfometriniams kardiomiocitų rodikliams, reikšmingai keičiasi ir šių ląstelių OPN baltymo raiška – nustatytos teigiamosios koreliacijos tarp šių rodiklių.

### 3.4. Kardiomiocitų Grem1 raiškos pokyčiai

Įvertinus imunohistocheminės reakcijos prieš Grem1 rezultatus kardiomiocituose, 47 proc. kontrolinės grupės tiriamųjų kardiomiocitų Grem1 raiškos neturėjo, o daugiau nei 52 proc. atvejų dokumentuota maža kardiomiocitų Grem1 baltymo raiška (3.4.1 pav.).

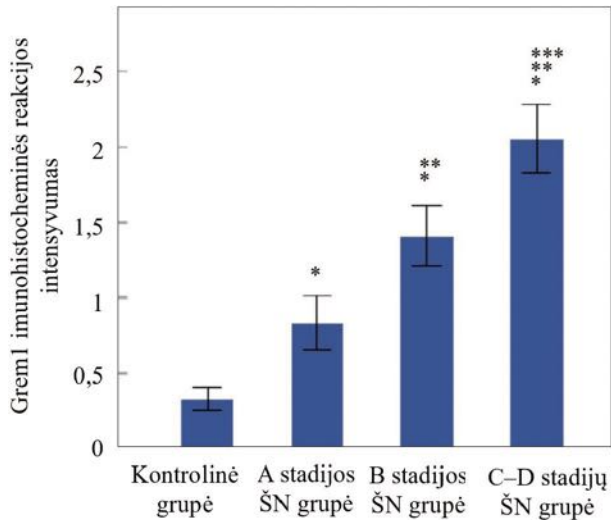




**3.4.1 pav.** Kardiomiocitų *Grem1* baltymo raiška: (A) Imunohistocheminė reakcija, histologinis miokardo vaizdas (*Grem1*, ab22138), (B) Imunohistocheminės reakcijos vertinimo pagal *Grem1* baltymo raiškos skalę rezultatai

Pirmą kartą dokumentuota vidutinė A stadijos ŠN grupės kardiomiocitų *Grem1* baltymo raiška buvo 28 proc. šios grupės tiriamųjų, o 72 proc. A stadijos ŠN grupės kardiomiocitų *Grem1* raiška buvo maža. Didelė *Grem1* baltymo raiška kardiomiocituose pirmą kartą stebėta virš 8 proc. B stadijos ŠN grupės atvejų. Šioje grupėje dažniausia buvo vidutinė kardiomiocitų *Grem1* baltymo raiška (virš 86 proc. šios grupės atvejų). Didelė kardiomiocitų *Grem1* baltymo raiška buvo dažniausia tarp C–D stadijų ŠN grupės tirtųjų (virš 64 proc.). Likusiuose daugiau nei 32 proc. C–D stadijų ŠN grupės atvejų nustatyta vidutinė kardiomiocitų *Grem1* baltymo raiška, maža *Grem1* baltymo raiška stebėta tik 3 proc. atvejų.

Pagal imunohistocheminės reakcijos prieš *Grem1* pusiau kiekybinio vertinimo kardiomiocituose metodiką įvertinus *Grem1* imunohistocheminės reakcijos intensyvumą, nustatyta, kad jau A stadijos ŠN (ŠN rizikos) grupės kardiomiocitų *Grem1* imunohistocheminės reakcijos intensyvumas buvo didesnis, palyginus su kontroline grupe ( $p < 0,001$ ) (3.4.2 pav.).

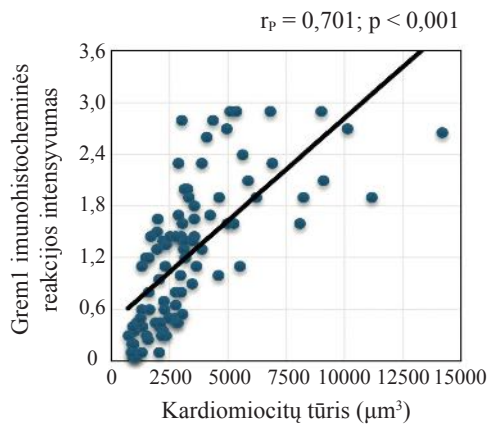
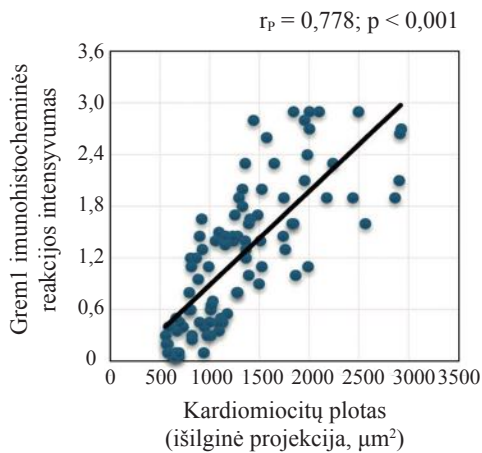
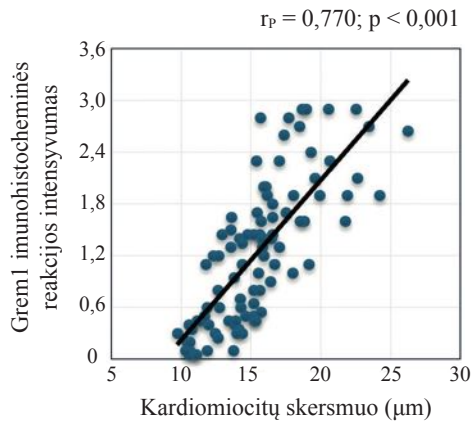
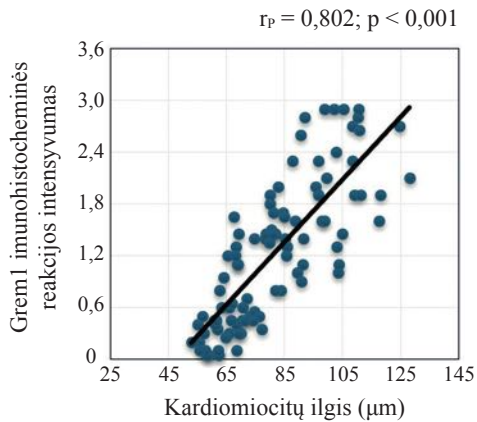


**3.4.2 pav.** Kardiomiocitų *Grem1* baltymo raiška: pusiau kiekybinio imunohistocheminės reakcijos vertinimo rezultatai (vidurkis, standartinė paklaida)

Paiškinimai: \* $p < 0,001$  – A, B, C–D stadijų ŠN grupės, palyginus su kontroline grupe; \*\* $p < 0,001$  – B ir C–D stadijų ŠN grupės, palyginus su A stadijos ŠN grupe; \*\*\* $p < 0,001$  – C–D stadijų ŠN grupė, palyginus su B stadijos ŠN grupe (ANOVA su poriniais palyginimais pagal Bonferroni kriterijų).

B stadijos ŠN grupės kardiomiocitų *Grem1* imunohistocheminės reakcijos intensyvumas buvo didesnis, palyginus su kontroline ( $p < 0,001$ ) ir A stadijos ŠN grupių *Grem1* imunohistocheminės reakcijos intensyvumu ( $p < 0,001$ ). C–D stadijų ŠN grupės kardiomiocitų *Grem1* imunohistocheminės reakcijos intensyvumas buvo didžiausias, kur šio rodiklio reikšmė buvo didesnė, palyginus su kontroline ( $p < 0,001$ ), A ( $p < 0,001$ ) ir B stadijų ŠN grupių tirtaisiais rodikliais ( $p < 0,001$ ).

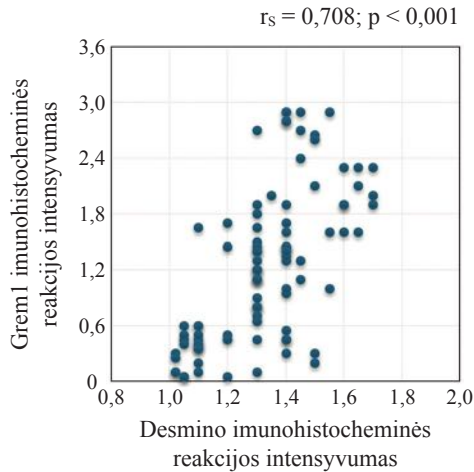
Išanalizavus kardiomiocitų *Grem1* baltymo raišką apibūdinančio *Grem1* imunohistocheminės reakcijos intensyvumo pokyčius ir histomorfometrinių kardiomiocitų rodiklių pakitimus, nustatyta stipri teigiamoji koreliacija tarp kardiomiocitų *Grem1* imunohistocheminės reakcijos intensyvumo ir jų ilgio pokyčių ( $r_p = 0,802$ ;  $p < 0,001$ ) (3.4.3 pav.).



### 3.4.3 pav. Kardiomiocitų GreM1 imunohistocheminės reakcijos intensyvumo ir jų histomorfometrinių rodiklių koreliacinė analizė

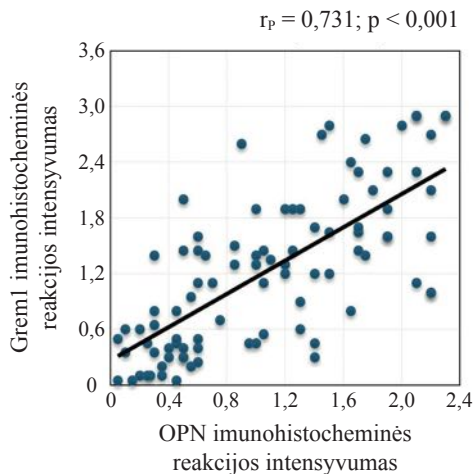
Panašūs kardiomiocitų GreM1 baltymo raiškos ir histomorfometrinių kardiomiocitų rodiklių dėsningumai stebėti ir vertinant GreM1 imunohistocheminės reakcijos intensyvumo bei kardiomiocitų skersmens pokyčių sąsajas – nustatyta stipri teigiamoji koreliacija tarp šių rodiklių ( $r_p = 0,770; p < 0,001$ ). GreM1 baltymo raiškos pokyčiai kardiomiocituose koreliavo su išilginės projekcijos kardiomiocitų ploto ( $r_p = 0,778; p < 0,001$ ) ir tūrio ( $r_p = 0,701; p < 0,001$ ) kitimais.

Įvertinus kardiomiocitų Grem1 ir desmino baltymų raiškos pokyčių sąsajas, nustatyta stipri teigiama koreliacija tarp Grem1 ir desmino imunohistocheminės reakcijos intensyvumo pokyčių ( $r_s = 0,708$ ;  $p < 0,001$ ) (3.4.4 pav.).



**3.4.4 pav.** Kardiomiocitų Grem1 ir desmino imunohistocheminių reakcijų intensyvumo koreliacinė analizė

Panašūs dėsningumai dokumentuoti ir išnagrinėjus kardiomiocitų Grem1 bei OPN baltymų raiškos pokyčius. Stipri teigiama koreliacija nustatyta tarp šių baltymų raišką kardiomiocituose apibūdinančių imunohistocheminės reakcijos intensyvumo pokyčių ( $r_p = 0,731$ ;  $p < 0,001$ ) (3.4.5 pav.).



**3.4.5 pav.** Kardiomiocitų Grem1 ir OPN imunohistocheminių reakcijų intensyvumo koreliacinė analizė

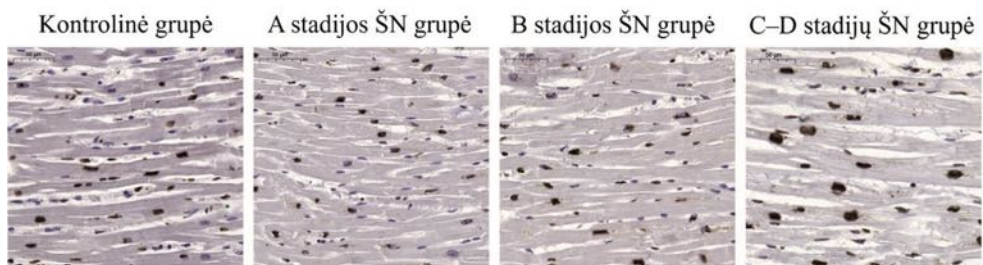
Įvertinus kardiomiocitų Grem1 raiškos pokyčius progresuojant išeminės kilmės ŠN, galima teigti, kad kardiomiocitų Grem1 raiška didėjo, kai buvo A stadijos ŠN. B stadijos ŠN grupės kardiomiocitų Grem1 baltymo raiška didėjo toliau, didžiausia kardiomiocitų Grem1 baltymo raiška nustatyta, kai buvo C–D stadijų ŠN.

Teigiamosios koreliacijos nustatytos tarp kardiomiocitų Grem1 imunohistocheminės raiškos intensyvumo ir šių ląstelių morfometrinių rodiklių pokyčių.

Panašios teigiamosios koreliacijos dokumentuotos ir tarp kardiomiocitų Grem1 bei desmino ir Grem1 bei OPN imunohistocheminių reakcijų intensyvumo pokyčių progresuojant išeminės kilmės ŠN.

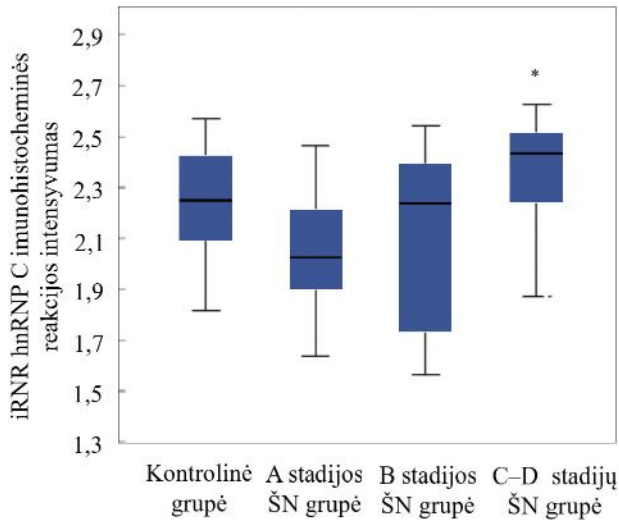
### 3.5. Kardiomiocitų iRNR hnRNP C raiška

Pagal iRNR hnRNP C imunohistocheminio tyrimo rezultatus (3.5.1 pav.) įvertintas kardiomiocitų iRNR hnRNP C imunohistocheminės reakcijos intensyvumas.



**3.5.1 pav.** Kardiomiocitų iRNR hnRNP C raiška: imunohistocheminė reakcija, histologinis miokardo vaizdas (iRNR hnRNP C, sc-32308)

A stadijos ŠN grupės iRNR hnRNP C imunohistocheminės reakcijos intensyvumas buvo mažesnis, palyginus su kontrolinės grupės analogišku rodikliu, tačiau statistškai patikimo skirtumo tarp A stadijos ŠN ir kontrolinės grupės rodiklių nebuvo ( $p > 0,05$ ) (3.5.2 pav.). Palyginus B ir A stadijų ŠN grupių kardiomiocitų iRNR hnRNP C imunohistocheminės reakcijos intensyvumą, statistškai patikimų iRNR hnRNP C baltymo raiškos pokyčius rodančių skirtumų tarp šių grupių taip pat nenustatyta ( $p > 0,05$ ). C–D stadijų ŠN grupės iRNR hnRNP C imunohistocheminės reakcijos intensyvumas buvo statistškai patikimai didesnis, palyginus su A stadijos ŠN grupės tirtuoju rodikliu ( $p < 0,001$ ). Statistiškai patikimų skirtumų, lyginant pokyčius tarp C–D ir B stadijų ŠN bei tarp C–D stadijų ŠN ir kontrolinės grupės iRNR hnRNP C imunohistocheminės reakcijos intensyvumo, nebuvo ( $p > 0,05$ ).

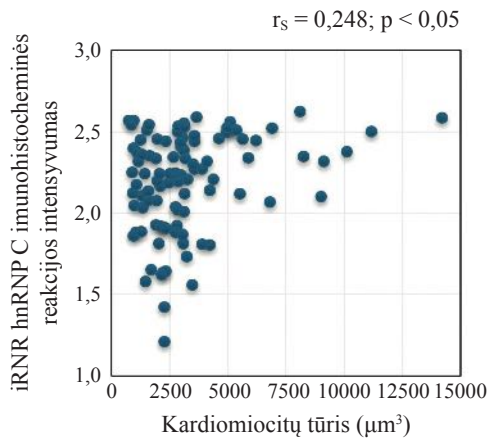
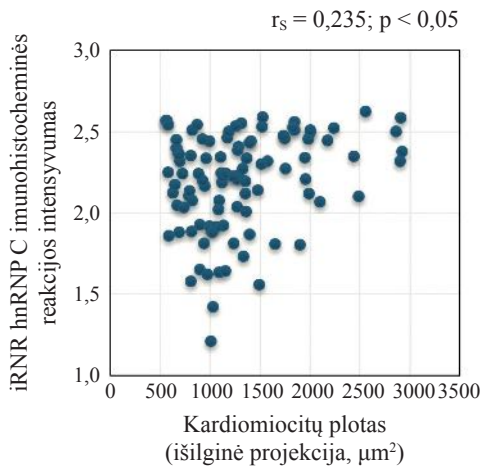
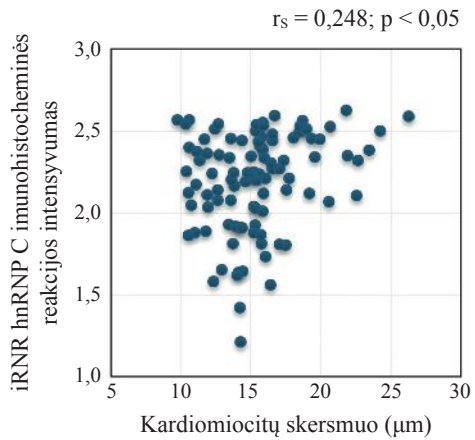
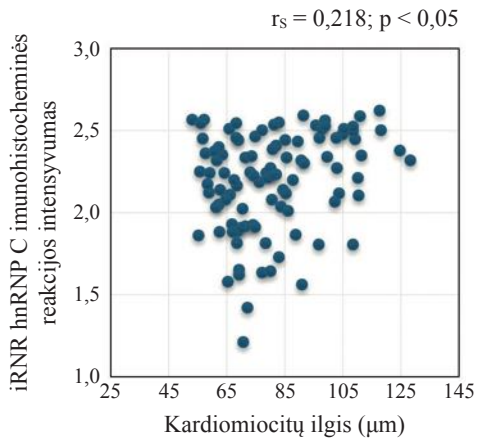


**3.5.2 pav.** *Kardiomiocitų iRNR hnRNP C baltymo raiška: pusiau kiekybinio imunohistocheminės reakcijos vertinimo rezultatai (mediana, interkvartilinis plotis, minimali ir maksimali reikšmės)*

Paaikškinimai: \* $p < 0,001$  – C–D stadijų ŠN grupė, palyginus su A stadijos ŠN grupe (Kruskal–Wallis testas su poriniais palyginimais,  $p$  vertė – pagal Bonferroni pataisą).

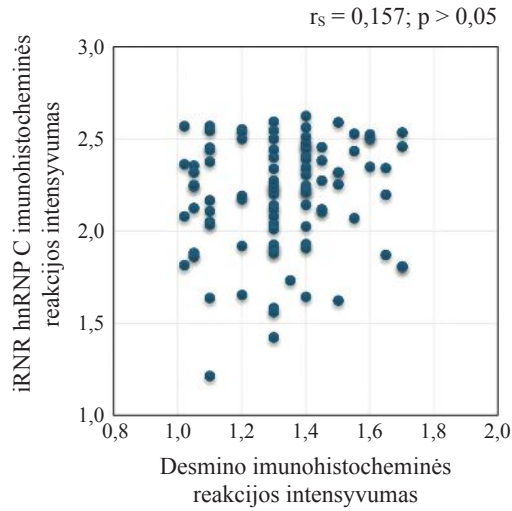
Išnagrinėjus sąsajas tarp iRNR hnRNP C baltymo raiškos pokyčių kardiomiocitų branduoliuose ir morfometrinių kardiomiocitų rodiklių pakitimų, nustatyta silpna teigiamoji koreliacija tarp iRNR hnRNP C imunohistocheminės reakcijos intensyvumo ir kardiomiocitų ilgio ( $r_s = 0,218$ ;  $p < 0,05$ ) (3.5.3 pav.).

Silpna teigiamoji koreliacija buvo dokumentuota tarp kardiomiocitų iRNR hnRNP C imunohistocheminės reakcijos intensyvumo ir šių ląstelių skersmens ( $r_s = 0,248$ ;  $p < 0,05$ ), išilginės projekcijos kardiomiocitų ploto ( $r_s = 0,235$ ;  $p < 0,05$ ) ir kardiomiocitų tūrio ( $r_s = 0,248$ ;  $p < 0,05$ ).

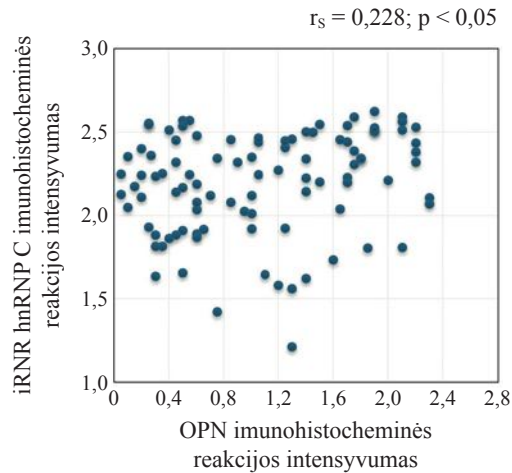


**3.5.3 pav. Kardiomiocitų iRNR hnRNP C imunohistocheminės reakcijos intensyvumo ir jų histomorfometrinių rodiklių koreliacinė analizė**

Išanalizavus iRNR hnRNP C ir desmino baltymų raiškos pokyčių, vykstant kardiomiocitų remodeliavimuisi, sąsajas, statistiškai patikimos koreliacijos tarp šių baltymų imunohistocheminių reakcijų intensyvumo pokyčių nebuvo ( $p > 0,05$ ) (3.5.4 pav.). Silpna teigiamoji koreliacija nustatyta tarp kardiomiocitų iRNR hnRNP ir OPN baltymų raiškos pokyčių progresuojant išeminės kilmės ŠN ( $r_s = 0,228; p < 0,05$ ) (3.5.5 pav.). Panašaus pobūdžio silpna teigiamoji koreliacija taip pat nustatyta, vertinant kardiomiocitų iRNR hnRNP C ir Grem1 raiškos pokyčių sąsajas ( $r_s = 0,274; p < 0,05$ ) (3.5.6 pav.).

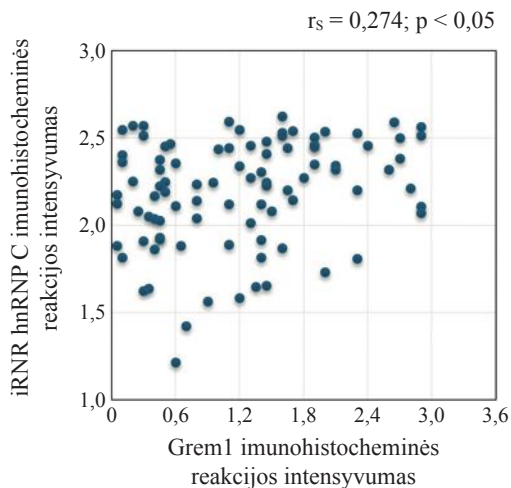


**3.5.4 pav.** *Kardiomiocitų iRNR hnRNP C ir desmino imunohistocheminių reakcijų intensyvumo koreliacinė analizė*



**3.5.5 pav.** *Kardiomiocitų iRNR hnRNP C ir OPN imunohistocheminių reakcijų intensyvumo koreliacinė analizė*





**3.5.6 pav.** *Kardiomiocitų iRNR hnRNP C ir Grem1 imunohistocheminių reakcijų intensyvumo koreliacinė analizė*

Apibendrinant kardiomiocitų iRNR hnRNP C baltymo imunohistocheminio tyrimo rezultatus, C–D stadijų ŠN kardiomiocitų iRNR hnRNP C raiška buvo didesnė, palyginus su A stadijos ŠN grupės baltymo raiškos intensyvumu. Taip pat nustatytos silpnos teigiamosios koreliacijos tarp kardiomiocitų branduolių iRNR hnRNP C baltymo raiškos bei histomorfometrinių kardiomiocitų rodiklių pokyčių, OPN, Grem1 baltymų raiškos pakitimų.

## 4. TYRIMO REZULTATŲ APTARIMAS

### 4.1. Kardiomiocitų remodeliavimosi ypatumai progresuojant išeminės kilmės ŠN

Širdies raumens remodeliavimasis yra aktyvus audinių persitvarkymo procesas, sukiamas širdies raumens pažeidimo – siekiama palaikyti optimalią širdies funkciją keičiantis audinio struktūrai [240]. Žalojamieji veiksniai, įskaitant ilgą laiką besitęsiančią išemiją, nuolat sukelia kompensacinio remodeliavimosi lemiamus struktūrinius pokyčius – laikoma, kad dažniausiai jie padeda užtikrinti kardiomiocitų mikroaplinkos homeostazę ir gebą atlikti specializuotas funkcijas. Iš esmės šių remodeliavimosi procesų paskirtis yra apsaugoti ir užtikrinti audinių terpės fiziologinį funkcionalumą, tačiau naujais mokslinių tyrimų duomenys rodo, kad, pasiekę tam tikrą kompensacijos laipsnį, šie remodeliavimosi procesai sukelia pataloginį poveikį, pasireiškiantį silpnėjančia širdies funkcija ir, galiausiai, simptominiu ŠN [5]. Kita vertus, dalis tyrėjų mano, kad šiems užsitęsusioms išeminės kilmės pažeidimo nulemtiems kardiomiocitų remodeliavimosi procesams nuo pat pradžių būdingas pataloginis poveikis ir šie pokyčiai gali rodyti ankstyvą širdies raumens pažeidimą dar iki atsirandant pirmiesiems ŠN simptomams [240].

Remiantis histomorfometriniu kardiomiocitų tyrimu, esant A, B, C ir D stadijų ŠN, rezultatais, pateikiami nauji, išsamūs kiekybiniai duomenys apie kardiomiocitų pokyčius įvairiais audinio remodeliavimosi laikotarpiais – identifikuojami specifiniai kardiomiocitų geometrijos pokyčiai jau ankstyvuju kardiomiocitų remodeliavimosi laikotarpiu dar iki atsirandant išeminės kilmės ŠN simptomams. Pirmieji reikšmingi kardiomiocitų formos pokyčiai nustatyti, esant A stadijos ŠN (ŠN rizikos), kai dar nėra kliniškai akivaizdžios struktūrinės širdies raumens ligos. Šis tyrimas yra pirmasis nuoseklus kardiomiocitų morfometrinis tyrimas, kuriame ankstyvuju ir vėlyvuju remodeliavimosi laikotarpiais žmogaus širdyje vykstantis širdies raumens persitvarkymas apibūdinamas ląsteliniu lygmeniu progresuojant išeminės kilmės ŠN.

Statistiškai patikimai padidėjęs išilginės projekcijos kardiomiocitų plotas, tūris ir sumažėjęs kardiomiocito ilgio bei skersmens santykis A stadijos ŠN grupėje rodo, kad ankstyvuju remodeliavimosi laikotarpiu kardiomiocitai įgauna ląstelės hipertrofijai tipiškus morfologinius požymius, labiau didėję ląstelės skersmeniui, palyginus su ląstelės ilgiu. Remiantis šiais histomorfometriniu kardiomiocitų tyrimo rezultatais, galima iškelti hipotezę, kad ankstyvuju remodeliavimosi laikotarpiu vyraujančią lygiagretų kardiomiocitų intracitoplazminių sarkomerų augimą lemia sutrikdyta kontraktiliškumo funkcija [241], kuri atsiranda ankstyvuju išeminio širdies raumens

pažeidimo laikotarpiu. Nagrinėjant B stadijos ŠN grupės kardiomiocitų morfometrinių tyrimo duomenis, nustatyta, kad B stadijos ŠN grupės kardiomiocitų tūris didėja labiau ilgėjant šioms ląstelėms nei augant jų skersmeniui, lyginant su A stadijos ŠN grupės analogišku rodikliu, tačiau išlieka mažesnis, lyginant su kontrolinės grupės kardiomiocitų ilgio ir skersmens santykiu.

Hemodinaminio požiūriu visų šių kardiomiocito persitvarkymų tikslas – stimuliuoti širdies raumens hipertrofiją kaip kompensacinį atsaką, siekiant sumažinti širdies skilvelio sienai tenkančio padidėjusio mechaninio krūvio poveikį ir užkirsti kelią formuotis širdies disfunkcijai [5]. Mühlfeld C. ir kt. (2020) analizavo ŠN su išsaugota išstūmio frakcija, taikydami gyvūnų modelį, ir ankstyvuojų ŠN formavimosi laikotarpiu histomorfometriškai nustatė reikšmingą kardiomiocitų skersmens didėjimą, palyginus su kontroline grupe [90]. Vigliano C. A. ir kt. (2011), tirdami idiopatinę dilatacinę kardiomiopatiją, nustatė, kad daugiau nei 50 proc. pacientų, kuriems reikšmingai padidėjęs kardiomiocitų skersmuo, pasireiškė daug labiau komplikuota su ŠN susijusi klinikinė ligos eiga [91]. Be to, šiame tyrime kardiomiocitų skersmens pokyčiai, atlikus Cox vienanarę regresinę analizę, identifikuoti kaip reikšmingas, nepriklausomas, su dažnesne pacientų mirtimi susijęs prognozinis veiksnys. Remiantis kardiomiocitų skersmens pokyčių tyrimo rezultatais, galima pagrįsti hipotezę – ankstyvuojų laikotarpiu kardiomiocitų remodeliavimasis jau nuo pat pradžių rodo besiformuojančius širdies raumens struktūros pokyčius dar iki atsirandant pirmiesiems ŠN simptomams. Todėl ankstyvuojų remodeliavimosi laikotarpiu vykstantys kardiomiocitų ląstelinės struktūros persitvarkymo procesai rodo, kad labiau didėjantis kardiomiocitų skersmuo, palyginus su šių ląstelių ilgiu, gali būti vienas pirmųjų morfologinių ankstyvojo širdies raumens remodeliavimosi laikotarpio požymių sergant išemine širdies liga. Šiuo atveju, remodeliavimasis gali būti ir prognozinis, ankstyvą širdies raumens pažaidą apibūdinantis veiksnys besiformuojant išeminės kilmės ŠN.

Jau ankstyvuojų remodeliavimosi laikotarpiu iki atsirandant pirmiesiems išeminės kilmės ŠN simptomams kardiomiocitų struktūros remodeliavimosi rezultatas yra didėjantis kardiomiocitų tūris (ir kartu auganti širdies skilvelio masė) [242], lemiantis širdies prieškrūvio didėjimą. Minėti procesai, esant išeminiam širdies raumens audinio pažeidimui, suprantami kaip kompensacinė reakcija. Vis dėlto, tyrimai rodo, kad dėl ankstyvuojų remodeliavimosi laikotarpiu vykstančio kardiomiocitų geometrijos persitvarkymo mažėja širdies skilvelio skersinės projekcijos apimtis, todėl silpnėja įcentriniai širdies skilvelio judesiai sistolės laikotarpiu ir mažėja širdies išstūmio frakcija [243]. Tad ankstyvuojų širdies raumens išeminio pažeidimo laikotarpiu dokumentuoti širdies skilvelio geometrijos ir jo funkcijos persitvarkymo procesai

atskleidžia naują, sudėtingesnę kardiomiocitų persitvarkymo ankstyvuojų remodeliavimosi laikotarpiu įtaką išeminės kilmės ŠN patogenezėje.

Ankstyvuojų remodeliavimosi laikotarpiu vyrauja kompensaciniai procesai, tačiau ankstyvasis struktūrinis kardiomiocitų persitvarkymas tėra trumpalaikė priemonė efektyviai pagerinti širdies audinio kontraktiliškumo funkciją. Dėl sukeltų hipertrofinius kardiomiocitų pokyčius lemiančių persitvarkymo procesų didėja deguonies poreikis, mažėja santykinis intramiokardinių kapiliarų tankis ir keičiasi paties širdies audinio perfuzija. Visi minėti veiksniai prisideda prie pirminio išeminės širdies ligos nulemtu miokardo audinio pažeidimo ir širdies raumens kontraktinės funkcijos silpnėjimo [241]. Atlikus C–D stadijų ŠN grupės, apibūdinančios morfoloģinius širdies miocitų pokyčius esant simptominiam – pažengusiam ŠN, kardiomiocitų histomorfometrinę analizę, nustatyta, kad vėlyvuojų remodeliavimosi laikotarpiu ir toliau stimuliuojama kardiomiocitų hipertrofija, ląsteliui santykinai daugiau ilgėjant nei didėjant jos skersmeniui, todėl kardiomiocitų tūris ir toliau didėja. Remiantis Tamura T. ir kt. (1998) tyrimo rezultatais, progresuojant ŠN širdies kairiojo skilvelio skersinė apimtis didėja daugiausiai dėl santykinio kardiomiocitų ilgėjimo [96]; šie dokumentuoti kardiomiocitų persitvarkymą vėlyvuojų remodeliavimosi laikotarpiu apibūdinantys pokyčiai rodo, kad santykinis kardiomiocitų ilgėjimas remodeliavimosi metu yra struktūrinis miokardo dekompensaciją atspindintis morfoloģinis požymis. Janczewski A. M. ir kt. (2002) tyrime, atlikus širdies kairiojo skilvelio kardiomiocitų ilgio histomorfometrinę analizę, esant dilatacinei kardiomiopatijai, dokumentuota panaši kardiomiocitų ilgio pokyčių sąsaja su progresuojančia širdies kontraktiline disfunkcija [97]. Remiantis to paties tyrimo rezultatais, reikšmingų skirtumų tarp tiriamosios ir kontrolinės grupių kardiomiocitų skersmens pokyčių nenustatyta. Svarbu atkreipti dėmesį, kad mūsų atliktame tyrime dokumentuotas reikšmingas kardiomiocitų skersmens didėjimas C–D stadijų ŠN grupėje, palyginus su A stadijos ŠN, B stadijos ŠN ir kontrolinės grupių duomenimis.

Kaip atsakas į besitęsiantį išeminį širdies raumens pažeidimą, kardiomiocitų hipertrofiniai pokyčiai vėlyvuojų remodeliavimosi laikotarpiu formuojasi daugiau keičiantis jų ilgiui nei skersmeniui – siekiant išlaikyti fiziologinę širdies išstūmio frakciją, kai efektyviai funkcionuojančių širdies raumens sričių labai sumažėję [244]. Nors nustatytas teigiamas kardiomiocitų remodeliavimosi poveikis, tačiau dėl užsitęsusių šių ląstelių persitvarkymo procesų audiniai persitempia, išsenka kompensacinio Franko–Starlingo mechanizmo ištekliai, širdies skilvelių ertmės išsiplečia [69], jų sienose didėja įtampa. Visi šie procesai prisideda prie progresuojančio širdies skilvelių sienų plonėjimo [245], funkciškai pasireiškiančio kaip ŠN. Minėti pokyčiai rodo, kad ilgai užsitęsęs išemijai kardiomiocitų remodeliavimasis tampa

svarbiu, kliniškai reikšmingą struktūrinę širdies audinių pažeidimą lemiančiu veiksmu progresuojančio išeminės kilmės ŠN patogenezėje.

Svarbu atkreipti dėmesį, kad, remiantis išeminės kilmės ŠN tyrimų rezultatais, morfologiniai kardiomiocitų ląstelinės struktūros persitvarkymo procesai, vykstantys patologiniu tapusio remodeliavimosi metu, yra svarbiausias veiksnys, lemiantis kliniškai reikšmingą širdies raumens struktūrinę pažeidimą užsitęsios išemijos sąlygomis [246]. Pagal Del Buono M. G. ir kt. (2022), užsitęsios išemijos sąlygomis hipertrofuotų kardiomiocitų ilgėjimas yra vyraujantis veiksnys, lemiantis kliniškai reikšmingus širdies skilvelių geometrijos pokyčius, širdies skilvelių sienų masės augimą [98]. Dėl šių priežasčių skilvelių sienose reikšmingai didėja išilginė sistolinė įtampa ir atsiranda negrįžtamas, progresuojantis skilvelių funkcijos silpnėjimas, kliniškai pasireiškiantis simptominiu ŠN. Tuo pačiu metu vykstantys reikšmingi hemodinamikos ir neurohumoralinės sistemos pokyčiai atspindi pamažu mažėjantį širdies ir kraujagyslių sistemos funkcinį veiksmingumą. Dėl besitęsiančios pamažu mažėjančios širdies išstūmio frakcijos aktyvinama renino, angiotenzino ir aldosterono sistema, kuri prisideda prie kardiomiocitų dydžio pokyčių, pažeidžia šių ląstelių metabolinius procesus, aktyvina baltymų sintezę kitose širdies audinio ląstelėse – fibroblastuose. Dėl aktyvintų fibroblastų širdies raumens intersticiniame audinyje gausėja kolageninio jungiamojo audinio, mažėja širdies sienų plastiškumas, kliniškai pasireiškiantis širdies diastoline disfunkcija [247].

## **4.2. Desmino struktūrinis persitvarkymas kardiomiocitų remodeliavimosi metu**

Besitęsiančios išemijos sąlygomis širdies raumenyje vykstant kardiomiocitų remodeliavimuisi, pažeidžiama intrasarkoplazminių baltymų homeostazė, keičiasi kardiomiocitų citoskeleto struktūra [248–250]. Tarpinis filamentas desminas, kaip vienas pagrindinių kardiomiocito citoskeleto į mechaninio krūvio pokyčius reaguojančių komponentų, yra svarbus užtikrinant ląstelės atsparumą didėjant mechaniniam krūviui, palaikant sarkomerų integralumą, optimizuojant intrasarkoplazminių signalų perdavimą įvairioms viduląstelinėms struktūroms, perduodant ląstelės atsako signalus į užląstelinę mikroaplinką [11]. Ląstelėse, kuriose trūksta desmino, nesant optimalios viduląstelių komponentų struktūrinės organizacijos ir vidusarkoplazminių signalų perdavimo, geba organizuoti ir palaikyti kompensacines reakcijas, reaguojant į aplinkos stresinius veiksmus, reikšmingai susilpnėja [12, 251].

Atlikus imunohistocheminį kardiomiocitų desmino raiškos pokyčių tyrimą, reikšmingai padidėjusi kardiomiocitų desmino raiška nustatyta A ir B

stadijų ŠN grupėse, palyginus su kontroline grupe. Tai rodo specifinį kardiomiocitų citoskeleto komponentų persitvarkymą jau ankstyvuojų remodeliavimosi laikotarpiu, dar iki atsirandant išeminės kilmės ŠN simptomams. Iš tikrųjų kardiomiocituose padidėjusi desmino raiška ankstyvosiose įvairių širdies ligų formavimosi stadijose gali būti vertinama kaip ląstelėse vykstančių kompensacinių procesų išraiška [252], nes, lyginant imunohistocheminės reakcijos dažymosi intensyvumą ir pobūdį A ir B stadijų ŠN grupėse, jokių morfologinių sarkomerų organizacijos pažeidimo požymių nematyti. Pawlak A. ir kt. (2012) tyrime buvo nustatyti panašūs kardiomiocitų desmino raiškos pokyčiai dilatacinės kardiomiopatijos atvejais; atkreiptas dėmesys, kad desmino raiška kardiomiocituose ypač suintensyvėja progresuojant simptominiam ŠN [26]. Išeminės ŠN atvejais Bouvet M. ir kt. (2021) nustatė, kad kardiomiocitų remodeliavimosi metu šiose ląstelėse gausėja fosforilinto desmino, mažėja šio tarpinio filamentų tirpumas, susidaro palankios sąlygos formuoti viduląsteliniai desmino mikroagregatams ateityje – visi šie desmino raiškos pokyčiai prisideda prie jau egzistuojančios išeminės kilmės širdies raumens pažeidimo progresuojant išeminės kilmės ŠN [253].

Lyginant kardiomiocitų desmino raišką, esant A ir B stadijų ŠN, abiejų grupių kardiomiocitų tarpinio filamentų raiška panaši, taip pat išsaugomas citoplazminis kardiomiocitų ruožuotumas, matomas atlikus imunohistocheminę reakciją prieš desminą. Remiantis kardiomiocitų desmino raiškos imunohistocheminio tyrimo rezultatais ir įvertinus kardiomiocitų desmino baltymo raiškos bei širdies miocitų histomorfometrinių rodiklių pokyčių sąsają, galima teigti, kad ankstyvuojų remodeliavimosi laikotarpiu kardiomiocitų citoskeleto persitvarkymo procesai yra efektyvūs, išsaugoma tarpinio filamentų sudėtis ir bendras citoskeleto bei formos integralumas. Svarbu atkreipti dėmesį, kad imunohistocheminio tyrimo metu desmino struktūrinės organizacijos pažeidimų nenustatyta ir vėlyvuojų kardiomiocitų remodeliavimosi laikotarpiu. Tai rodo, kad kardiomiocitai geba išsaugoti mechaninį atsparumą ilgesnį laiką besitęsiančios širdies raumens išemijos sąlygomis [253], taip iš dalies sulėtinamas struktūrinės širdies ligos progresavimas simptominio ŠN link.

Ypač suintensyvėjusi kardiomiocitų desmino raiška ir šios tarpinio filamentų viduląstelinės struktūrinės organizacijos pažeidimas dažniausiai stebimas C–D stadijų ŠN grupėje. Tai rodo, kad šie morfologiniai su desmino raiškos kitimais susiję kardiomiocitų pažeidimo požymiai iš esmės yra būdingi vėlyvuojų, pataloginių pobūdį įgaunančio remodeliavimosi laikotarpiu, kai dėl reikšmingai susilpnėjusios kardiomiocitų funkcijos išryškėja simptominis ŠN [254]. Ilgesnį laiką besitęsiančios širdies raumens išemijos ir mechaninės įtampos sąlygomis desmino potransliacinės modifikacijos vyksta daug aktyviau, taip susidaro skirtingos, negrįžtamai kardiomiocitų pažeidimai tipiškos

desmino baltymo izoformos [12]. Be to, padidėjęs desmino baltymo potransliacinių modifikacijų procesų aktyvumas, dažnesnės desminą koduojančių genų mutacijos [255] susijusios su patologinių tretinių šio baltymo struktūrų susidarymu, taip dar intensyviau sutrikdoma viduląstelinė sarkomerų struktūrų organizacija [251, 255], formuojasi proamiloidogeniniai oligomerai [256], kurie tampa vidusarkoplazminių desmino mikroagregatų šaltiniu. Šios patologinę tretinę erdvinę struktūrą turinčios vidusarkoplazminės desmino mikroagregatų sankaupos pasižymi tiesioginiu toksiniu poveikiu kardiomiocitams ir negrįžtamai pakeičia kardiomiocitų sarkomerų komponentų mechaniką esant simptominiam ŠN [26, 134].

### **4.3. Kardiomiocitų OPN raiškos pokyčių dinamika, progresuojant išeminės kilmės ŠN**

OPN yra baltymo žymuo, kurio diagnostinis jautrumas yra pripažintas ir plačiai nagrinėjamas kituose tyrimuose [257], kur didžiausias dėmesys skiriamas negrįžtamai pažeistam širdies raumens audiniui, kai ŠN progresuoja dilatacinės kardiomiopatijos [258], diabetinės kardiomiopatijos [10] ar išeminės širdies ligos atvejais [28, 159]. Dokumentuota reikšminga koreliacija tarp OPN koncentracijos kraujo plazmoje ir kardioechoskopinių parametrų, ŠN eigos, baigčių, hospitalizacijos rodiklių ir prognozių veiksmų [159]. Behnes M. ir kt. (2013) atkreipė dėmesį, kad OPN koncentracija kraujo plazmoje yra glaudžiai susijusi su širdies kairiojo skilvelio kardioechoskopinių parametrų pokyčiais, taip pat ūminio ŠN atvejais nustatyta reikšmingai teigiamoji koreliacija tarp OPN koncentracijos kraujo plazmoje ir funkcinės NYHA klasifikacijos bei struktūrinę širdies pažaidą apibūdinančios ACC / AHA klasifikacijos kategorijų [257]. Visa tai iliustruoja OPN biologinę svarbą ŠN patogenezei. Vis dėlto, daugumoje šių tyrimų OPN nagrinėjamas analizuojant OPN koncentraciją kraujo plazmoje, o patologinės šio rodiklio vertės nustatomos pagal kliniškai reikšmingas sąsajas su progresuojančiu ŠN, dažniausiai esant simptominiam, pažengusiam ŠN [28].

Mūsų atliktame tyrime pirmą kartą pateikiami išsamūs duomenys apie kardiomiocitų OPN raiškos dinamiką, dokumentuojant kardiomiocitų OPN baltymo raiškos pokyčius pagal OPN imunohistocheminio tyrimo rezultatus A, B ir C–D stadijų išeminės kilmės ŠN grupėse. Reikšmingai padidėjusi kardiomiocitų OPN raiška jau buvo nustatyta A stadijos ŠN (ŠN rizikos) grupėje, palyginus su kontrolinės grupės rezultatais. Kardiomiocitų OPN imunohistocheminės reakcijos intensyvumas didėjo B stadijos ŠN (iki ŠN) grupėje, o didžiausia šio imunohistocheminio tyrimo rodiklio vertė nustatyta C–D stadijų ŠN (simptominio – pažengusio ŠN) grupėje. Padidėjusią OPN

raišką išeminės kilmės ŠN atvejais tarp cukriniu diabetu sirgusių ir staiga dėl širdies patologijos mirusių pacientų, palyginus su kontroline grupe, taip pat aprašė ir Patel M. ir kt. (2020) [14]. Be to, Schipper M. E. I. ir kt. (2011) nustatė, kad OPN iRNR ir baltymo raiška kardiomiocituose, esant pažengusiam išeminės kilmės ŠN, reikšmingai sumažėjo, į širdies kairįjį skilvelį implantavus mechaninį skilvelio funkciją atliekantį prietaisą [29]. Remiantis reikšmingos kardiomiocitų OPN baltymo raiškos ir progresuojančios širdies raumens disfunkcijos sąsajos tyrimų rezultatais, galima teigti, kad OPN gali būti tiesiogiai susijęs su ryškėjančiu širdies miocitų kontraktinės funkcijos pažeidimu, lemiančiu patologinius širdies skilvelio geometrijos pokyčius – širdies raumens išemijos atveju šie pokyčiai lemia simptominio išeminės kilmės ŠN formavimąsi.

Vertinant kardiomiocitų OPN baltymo raiškos ir histomorfometrinių jų rodiklių pokyčių sąsajas, nustatyta stipri, teigiamoji koreliacija tarp kardiomiocitų OPN baltymo raiškos ir šių ląstelių ilgio, skersmens, išilginės projekcijos ir tūrio pokyčių, esant įvairios stadijos išeminės kilmės ŠN. Statistiškai patikimas koreliacijas tarp suintensyvėjusios OPN raiškos ir kardiomiocitų hipertrofijos *in vivo* ir *in vitro* sisteminės hipertenzijos atvejais gyvūnų modeliuose dokumentavo Graf K. ir kt. (1997) [17]. Tiriant OPN raiškos pokyčius, esant dilatacinei kardiomiopatijai, nustatyta stipri, teigiamoji koreliacija tarp didėjančios kardiomiocitų OPN baltymo raiškos ir atitinkamai didėjančio širdies miocitų skersmens, kai ŠN pažengęs ( $r_s = 0,731$ ;  $p < 0,001$ ) [33]. Tai atitinka ir mūsų tyrime dokumentuotus panašaus pobūdžio rezultatus. Be to, Li J. ir kt. (2017) nustatė, kad ŠN dėl spaudimo perkrovos atvejais gyvūnų eksperimentiniame modelyje kardiomiocitų OPN raiškos pokyčiai ir šių ląstelių morfometriniai kitimai sukeliama gana greitai po žalojamojo veiksnio poveikio (praėjus mažiau nei 12 savaičių po širdies raumens pažeidimo) [15]. Tai rodo OPN baltymo reikšmę ankstyvuojau remodeliavimosi laikotarpiu ir jo poveikį kardiomiocitų geometrijos pokyčiams dar iki atsirandant pirmiesiems ŠN simptomams.

OPN baltymas fiziologinėmis sąlygomis moduliuoja tarpląstelių signalų perdavimą tarp ląstelių, adhezijos bei migravimo procesus, ir šio baltymo raiška kardiomiocituose fiziologinėmis sąlygomis yra žema [16], tai rodo ir mūsų kontrolinės grupės OPN imunohistocheminio tyrimo rezultatai. Vis dėlto, širdies raumens išemijos sąlygomis OPN funkcinė reikšmė didėja. Siekiant sumažinti žalojamąjį išemijos poveikį širdies raumeniui, aktyvinami CD44 / RAF / RAS / MEK 1-2 / ERK 1-2 arba kalcineurino / NFAT viduląsteliniai signaliniai keliai [147, 148]. Šiais viduląsteliniais signaliniais keliais perduodamas signalas aktyvina su ląstelių hipertrofija susijusių genų raišką, morfologiškai pasireiškiančią kompensacine kardiomiocitų hipertrofija. Tik kontrolinėje grupėje buvo atveju, kai kardiomiocitų OPN baltymo raiškos



nestebėta visai, o padidėjusi kardiomiocitų OPN raiška dokumentuota jau A stadijos ŠN (ŠN rizikos) grupėje – šie pokyčiai rodo, kokie jautrūs ir suderinti remodeliavimosi mechanizmai veikia molekulinio ir ląstelinio lygmenimis ankstyvuoju širdies raumens persitvarkymo laikotarpiu, kompensuojant dėl išemijos susiformavusią viduląstelinę disfunkciją.

Besitęsiančios širdies raumens išemijos sąlygomis vykstant kardiomiocitų remodeliavimuisi, atitinkamai didėja ir kardiomiocitų OPN baltymo raiška. Didžiausi šio baltymo raiškos rodikliai dokumentuojami simptominio ar pažengusio išeminės kilmės ŠN atvejais. Tai rodo ir mūsų kardiomiocitų OPN imunohistocheminio tyrimo rezultatai. Šie dokumentuoti kardiomiocitų OPN baltymo raiškos pokyčiai atskleidžia biologiniu požiūriu sudėtingesnę OPN įtaką kardiomiocitų remodeliavimosi procese, kai širdį apsaugančios (kardioprotekcinės) OPN funkcijos pamažu prarandamos, progresuojant pažengusiam išeminės kilmės ŠN. Šiuos funkcinis OPN pokyčius gali paaiškinti Dalal S. ir kt. (2014) tyrimas, kuriame reikšmingai padidėjusi OPN raiška suaugusių pelių kardiomiocituose lemia dažnesnę širdies miocitų apoptozę, aktyvinamą per CD44 moduluojamą mitochondrijų mirties signalinį kelią ir padidėjusią ląstelės endoplazminio tinklo apkrovą [153]. Taip pat susilpnėjusios kardioprotekcinės OPN funkcijos gali būti paaiškinamos Pollard C. M. ir kt. (2019) aprašytu tiesioginiu slopinamuoju OPN poveikiu  $\beta$ 2AR antifibroziniam signalui per cAMP/Epac1 signalinį kelią [145]. Kartu šie besikeičiančios kardiomiocitų OPN baltymo raiškos moduluojami mechanizmai lemia funkcinis širdies skilvelių geometrijos pokyčius, didėjant širdies sienų masei ir bendrai skilvelių apimčiai. Galiausiai šie procesai tampa reikšmingais, turinčiais svarų poveikį didėjančiai išilginei sistolinei širdies sienų įtampai ir silpnėjančiai širdies skilvelių funkcijai, formuojantis klinikinius simptomus sukeliančiam išeminės kilmės ŠN [98]. Psarras S. ir kt. (2012), tirdami peles su OPN<sup>-/-</sup> mutacija ir dilatacine kardiomiopatija, nustatė 30 proc. širdies kairiojo skilvelio užpakalinės sienos sustorėjimą, 53 proc. sustiprėjusią sistolinę širdies kairiojo skilvelio funkciją ir 29 proc. rečiau susiformavusį širdies kairiojo skilvelio ertmės išsiplėtimą (dilataciją), palyginus su pelėmis, kurių OPN baltymą koduojančio geno raiška nebuvo slopinama [259]. Taip jie pagrindė pataloginį pobūdį įgaunantį OPN poveikį kardiomiocitų remodeliavimosi procesui, lemiantį pataloginius širdies kairiojo skilvelio geometrijos pokyčius.

Detaliau analizuojant mūsų tyrimo duomenis apie kardiomiocitų OPN ir desmino baltymų raiškos pokyčių sąsajas progresuojant išeminės kilmės ŠN, koreliacijos tarp kardiomiocitų OPN ir desmino baltymų raiškos pokyčių nenustatyta. Vis dėlto, svarbu atkreipti dėmesį, kad OPN dalyvauja moduluojant kardiomiocitų hipertrofinių genų raišką remodeliavimosi metu [147], o padidėjusio krūvio širdies raumeniui sąlygomis citoskeleto tarpinio fila-

mento desmino sintezė suaktyvėja, vyksta šio baltymo viduląstelinė citoarchitektūrinė reorganizacija [11]. Todėl galima teigti, kad kardiomiocitų remodeliavimosi metu OPN ir desmino paskirtis – sustiprinti aktyvią kontraktilinę funkciją išemijos pažeistuose kardiomiocituose ir užtikrinti šių ląstelių mechaninį atsparumą padidėjusio širdies raumeniui krūvio sąlygomis dar iki prasidedant pirmiesiems išeminės kilmės ŠN simptomams.

#### **4.4. Kardiomiocitų Grem1 raiškos ypatumai, esant skirtingų stadijų išeminės kilmės ŠN**

Išnagrinėjus kardiomiocitų Grem1 baltymo raiškos imunohistocheminio tyrimo rezultatus, esant įvairios stadijos išeminės kilmės ŠN, Grem1 baltymo raiška didėja jau A stadijos ŠN (ŠN rizikos) grupėje, palyginus su kontroline grupe. Panašiai kaip ir analizuojant kardiomiocitų OPN baltymo raiškos pokyčius, kardiomiocitų Grem1 baltymo raiška toliau didėja B stadijos ŠN (iki ŠN) grupėje, palyginus su A stadijos ŠN ir kontroline grupėmis. Vis dėlto, didžiausia kardiomiocitų Grem1 baltymo raiška stebėta esant simptominiam – pažengusiam ŠN. Duomenų apie kardiomiocitų Grem1 baltymo raiškos pokyčius, esant įvairios stadijos išeminės kilmės ŠN, yra itin mažai. Todėl, remiantis mūsų tyrimo rezultatais, pirmą kartą pateikiama išsami morfologinė kardiomiocitų Grem1 raiškos pokyčių, progresuojant išeminės kilmės ŠN, analizė.

Mūsų atlikto kardiomiocitų Grem1 baltymo raiškos imunohistocheminio tyrimo rezultatai yra panašūs į Mueller A. L. ir kt. (2013) [30]. Šie tyrėjai, analizuodami Grem1 baltymo raišką dilatacine kardiomiopatija sergančių pacientų endomiokardo biopsijose, nustatė, kad Grem1 baltymo raiška širdies raumens audinyje proporcingai didėja silpnėjant širdies kairiojo skilvelio funkcijai. Šio tyrimo autoriai taip pat aprašė, kad padidėjusi Grem1 baltymo raiška kardiomiocituose, esant įvairios stadijos ŠN, stebėta 74,8 proc. atvejų, kai raiškos intensyvumas pagal imunohistocheminio tyrimo rezultatus svyravo nuo labai mažo iki didelio. Panašus kardiomiocitų Grem1 baltymo raiškos intensyvumas stebėtas ir mūsų atlikto tyrimo A, B ir C–D stadijų išeminės kilmės ŠN grupėse, o Grem1 baltymo raiškos nebuvo tik kontrolinėje grupėje. Nustatyti kardiomiocitų Grem1 raiškos pokyčių dėsningumai pagrindžia Grem1 baltymo biologinę reikšmę kardiomiocitų remodeliavimosi procesuose formuojanti simptominiam ŠN. Be to, Müller I. I. ir kt. (2021) pritaikė „Western blot“ metodą ir patvirtino, kad reikšmingai padidėjusi Grem1 baltymo raiška širdies raumens audinyje buvo stebima praėjus 24 val. po pelėms sukulto eksperimentinio miokardo infarkto [34]. Vadinasi, reikšmingi

Grem1 baltymo raiškos kardiomiocituose pokyčiai vyksta jau ankstyviausiu laikotarpiu po ūminės išemijos sukkelto širdies raumens pažeidimo.

Grem1, 28 kDa glikozilintas baltymas [260], priklausantis Dan baltymų šeimos sekretinių kaulo užląstelinės terpės baltymų antagonistų grupei, dažniausiai nustatomas ląstelės endoplazminiame tinkle [179]. Su užląstelinės terpės elementais Grem1 susijungia per heparano sulfato proteoglikanus, esant su ląstele susijusiai baltymo izoformai, arba išlieka susijungęs su užląstelinės terpės glikokaliksu arti šio baltymo sekrecijos vietos prie ląstelės paviršiaus, esant sekretinei šio baltymo izoformai [261–264]. Kaur G. ir kt. (2023) nustatė, kad reikšmingai suintensyvėjusi Grem1 raiška atlieka kardio-rotekcinę funkciją – mažina reaktyvių deguonies junginių kiekį ir mitochondrijų membraninį potencialą bei aktyvina NRF / ERK1 signalinį kelią ir anti-apoptozinių baltymų raišką [265]. Kiti tyrėjai atkreipė dėmesį į apsauginį angiogenezės stimuliavimo vaidmenį, išsaugant ląstelių fiziologines funkcijas jų mikroaplinkos hipoksijos sąlygomis [34, 266, 267]. Apsauginis angiogenezę stimuliuojantis Grem1 poveikis moduluojamas per šio baltymo dimerinės formos agonistinę sąveiką su VEGFR2, kaip dokumentuota Rowan G. C. ir kt. tyrėjų (2020) [266].

Atlikus detalesnius miokardo hipoksijos sąlygomis eksperimentinius tyrimus, nustatyta, kad Grem1 geba reikšmingai sumažinti profibrozinį TGFβ poveikį, slopindamas TGFβ funkciją aktyvinti kolageno sintezę širdies fibroblastuose [34]. Tai rodo platesnio spektro Grem1 funkciją, palaikant vietinės kardiomiocitų mikroaplinkos homeostazę ir stimuliuojant remodeliavimąsi. Kalbant apie antifibrozinį Grem1 poveikį, Koli K. ir kt. (2016) nustatė, kad reikšmingai padidėjusi Grem1 raiška gali slopinti antifibrozinį Th1 chemokiną (CXC10) – taip veikiama šio antifibrozinio chemokino sintezė plaučių audinyje [21]. Deja, šis antifibrozinis Grem1 mechanizmas iki šiol nėra apibūdintas širdies raumens audinyje. Mueller K. ir kt. (2013) dokumentavo teigiamą koreliaciją tarp kardiomiocitų Grem1 baltymo raiškos ir miokardo intersticinės fibrozės, esant dilatacinei kardiomiopatijai [30]. Tai rodo, kad fibrozės procesus moduluojantis Grem1 poveikis remodeliavimosi metu, esant išeminės kilmės pažeidimui, gali būti daug sudėtingesnis, palyginus su kitais žalojamaisiais veiksniais, lemiančiais ŠN.

Be to, mūsų tyrime buvo nustatyti stiprūs teigiamieji koreliaciniai ryšiai tarp kardiomiocitų Grem1 baltymo raiškos ir šių ląstelių histomorfometrinių rodiklių pokyčių progresuojant išeminės kilmės ŠN. Mūsų duomenimis, tai pirmą kartą išsamiai apibūdinama teigiama sąsaja tarp kardiomiocitų Grem1 baltymo raiškos ir širdies miocitų histomorfometrinių pokyčių, esant įvairios stadijos išeminės kilmės ŠN. Šios teigiamosios koreliacijos tarp kardiomiocitų geometrijos pokyčių ir šių ląstelių Grem1 baltymo raiškos gali būti

paaiškintos Grem1 baltymo geba reaktyvinti ląstelių fetalinius genus įvairių ligų atvejais [21]. Reaktyvinius ląstelių fetalinius genus, keičiantis kardiomiocitų mikrostruktūroms pertvarkoma vidusarkoplazminių kontraktinių komponentų sudėtis, stimuliuojama citoskeleto reorganizacija – visi šie procesai yra svarbūs vykstant kardiomiocitų remodeliavimuisi [8]. Kardiomiocitų Grem1 baltymo raiškos pokyčių ir šio citoskeleto komponento – tarpinio filamento desmino – persitvarkymo sąsają progresuojant išeminės kilmės ŠN iliustruoja ir mūsų tyrime dokumentuota teigiama koreliacija tarp kardiomiocitų Grem1 ir desmino raiškos imunohistocheminio intensyvumo.

Kardiomiocitų remodeliavimosi metu viduląsteliniai mechanizmai kompensuoja dėl išeminės kilmės pažeidimo ryškėjančią kontraktilinę disfunkciją. Gausėjant viduląstelių kontraktilinių skaidulų kiekiui ir, dažnai, keičiantis jų sudėčiai, reaguojant į didesnę mechaninę krūvį, keičiasi ir kardiomiocito citoskeleto, įskaitant tarpinio filamento desmino, ultrastruktūra [11]. Taip remodeliavimosi metu kardiomiocituose ne tik kompensuojama ryškėjanti kontraktilinė disfunkcija, bet ir užtikrinamas mechaninis šių ląstelių atsparumas bei plastiškumas padidėjusio mechaninio krūvio ir užsitęsusio oksidacinio streso sąlygomis [100, 265]. Ši kompleksinė Grem1 baltymo ir desmino poveikį kardiomiocitų struktūriniam ir funkciniam persitvarkymui remodeliavimosi metu rodo ir mūsų tyrimo metu nustatyta reikšminga vidutinė teigiama sąsaja tarp šių baltymų raiškos kardiomiocituose pokyčių, esant įvairios stadijos išeminės kilmės ŠN. Kardiomiocitų Grem1 ir desmino raiškos pokyčių biologinė prasmė – ne tik mechaniškai prisitaikyti prie padidėjusio širdžiai krūvio, bet ir užtikrinti širdies raumens energijos poreikius optimizuojant mitochondrijų funkcionalumą, palaikyti integralius tarpląstelinis ryšius ir gebą greitai reaguoti į kardiomiocitų mikroaplinkos pokyčius remodeliavimosi metu.

Mūsų atlikto imunohistocheminio tyrimo duomenimis, taip pat nustatyta ir reikšmingai stipri, teigiama koreliacija tarp Grem1 ir OPN baltymų raiškos kardiomiocituose progresuojant išeminės kilmės ŠN. Remiantis šiais duomenimis, galima iškelti hipotezę, kad Grem1 ir OPN baltymai kardiomiocitams remodeliuojantis veikia kartu. OPN funkcija pakartotinai aktyvinant su hipertrofija susijusių genų raišką kardiomiocituose yra gerai žinoma [147, 148], o vienos ląstelės RNR raiškos tyrimai rodo, kad Grem1 yra toje pačioje hierarchinėje raiškos grupėje kaip ir kardiomiocito kontraktilinę funkciją koordinuojantys komponentai (širdies tipo troponinas T2, mioziną sujungiantis baltymas C3 ir miozino lengvoji grandinė 7) [268]. Todėl galima iškelti hipotezę, kad šie baltymai kardiomiocitų remodeliavimosi metu dalyvauja moduluojant kardiomiocitų kontraktilinius baltymus koduojančių genų raišką, kai progresuoja išemijos nulemta širdies raumens struktūrinė liga dar iki atsirandant pirmiesiems išeminės kilmės ŠN simptomams.

#### 4.5. Kardiomiocitų hnRNP C raiška

Kardiomiocituose genų raiškos persitvarkymo veiksmingumas ir sparta priklauso nuo kokybiškai veikiančių genų transkripciją reguliuojančių mechanizmų, kurie yra susiję su iRNR pirminių transkriptų brendimu – potranskripcinėmis modifikacijomis. Pirminių iRNR transkriptų brendimo procese aktyviai dalyvauja ir iRNR hnRNP grupės baltymai, įprastai atsakingi už introninių sekų pašalinimą iš šių pirminių transkriptų. iRNR hnRNP C yra vienas iš pagrindinių hnRNP grupei priklausančių baltymų, kurio svarba širdies ir kraujagyslių sistemos ligų patogenezėi yra dokumentuota [218, 269, 270].

Išanalizavome iRNR hnRNP C baltymo raiškos kardiomiocituose pokyčius, esant įvairios stadijos išeminės kilmės ŠN. Mūsų tyrime šio baltymo raiškos A ir B stadijų ŠN grupėse, palyginus su kontroline grupe, nenustatyta. iRNR hnRNP C baltymo raiška kardiomiocitų branduoliuose C–D stadijų ŠN grupėje buvo didesnė palyginus su A stadijos ŠN grupe, kur šio baltymo raiška buvo mažiausia.

Panašūs kardiomiocitų iRNR hnRNP C baltymo raiškos dėsningumai dokumentuoti ir Martino F. ir kt. (2022) tyrime. Šie tyrėjai nustatė, kad išeminės kilmės ŠN atvejais, praėjus 21 dienai po širdies kairiojo skilvelio miokardo infarkto, iRNR hnRNP C raiška pelių kardiomiocituose, nutolusiuose nuo miokardo infarkto zonos, buvo daug mažesnė (artima kontrolinei grupei), palyginus su iRNR hnRNP C baltymo raiška arčiau miokardo infarkto zonos buvusiuose kardiomiocituose ( $p < 0,001$ ) [220]. Kardiomiocito branduolyje nedidėjanti iRNR hnRNP C raiška, esant ūminiam širdies raumens pažeidimui, gali būti paaiškinama fosforilinto iRNR hnRNP migravimu iš pažeisto kardiomiocito branduolio į citoplazmą. Taip užtikrinama, kad pažeistoje ląstelėje jos specializuotai veiklai svarbių baltymų sintezė vyktų kuo arčiau originalios baltymo funkcinės srities viduląstelinėje terpėje [222]. Esant išeminės kilmės pažeidimui, didesnis iRNR hnRNP baltymo kiekis nustatomas kardiomiocito citoplazmoje, arčiau sarkomerų komponentų – širdies troponino T2 [220]. Parks K. A. ir kt. (2013) nustatė, kad iRNR hnRNP C baltymo raiška kardiomiocituose buvo mažesnė ir tarp pacientų, turinčių progresuojantį neišeminės kilmės ūminės eigos ŠN ( $p = 0,003$ ) [271]. Todėl galima iškelti hipotezę, kad šis lokalizuotos genų raiškos mechanizmas, perkeltiant potranskripcinio iRNR brendimo procesą iš kardiomiocito branduolio į citoplazmą arčiau specializuotų baltymų, nėra specifiskas tik išeminės kilmės ŠN.

Lokalizotos genų raiškos mechanizmas jau dokumentuotas kitose ląstelėse, įskaitant neuronus [272], fibroblastus [273] ir mioblastus [274]. Šio mechanizmo tikslas – maksimaliai padidinti vietinę baltymų sintezę tose

ląstelių srityse, kur šie baltymai reikalingiausi atliekant specializuotas funkcijas. Dar Angenstein F. ir kt. (2005) nustatė iRNR hnRNP C baltymo ir iRNR sankaupas neuronų sinapsių remodeliavimosi srityse, iš kurių šios molekulės pernešamos į posinapsines sritis ir sintetinami signalui perduoti reikalingi baltymai [275]. Lewis Y. E. ir kt. (2018) dokumentavo, kad aktyvūs lokalizuotos genų raiškos procesai vyksta ir žiurkių kardiomiocitų sarkomeruose, šalia kurių yra pirminių iRNR transkriptų brendimui ir baltymų transliacijai svarbūs molekuliniai komponentai [222].

Mūsų atliktame tyrime, esant C–D stadijų (simptominiam – pažengusiam) išeminės kilmės ŠN, iRNR hnRNP C baltymo raiška kardiomiocitų branduoliuose didėja, palyginus su A stadijos (rizikos) ŠN grupe. Šie dokumentuoti iRNR hnRNP C dėsningumai iš dalies sutampa su Martino F. ir kt. (2022) tyrimo rezultatais: iRNR RNP C baltymą koduojančių genų raiška, esant įvairios kilmės ŠN, kardiomiocituose padidėja iki 4,2 karto [220]. Padidėjusi kardiomiocitų iRNR hnRNP C baltymo raiška, esant simptominiam ŠN, gali būti paaiškinama apsaugine fetalinių genų reaktyvacija kardiomiocituose progresuojant dekompensaciniams širdies raumens procesams [276]. Fetalinių genų reaktyvacija suaugusiojo širdies kardiomiocituose – tai kompleksinis biologinis procesas, apimantis širdies genomo transkripcinę, potranskripcinę ir epigenetinę reguliaciją [277]. Fetalinės genų reaktyvacijos metu, progresuojant lėtiniam ŠN, suaktyvėja A ir B tipų natriurezinį peptidą,  $\beta$  miozino sunkiąją grandinę,  $\alpha$  griaučių aktiną, hiperpoliarizacijos aktyvinamą, su cikliniu nukleotidu susijusį kanalą, T tipo  $\text{Ca}^{2+}$  kanalą koduojančių genų raiška ir užblokuojama sarkoplazminio tinklo  $\text{Ca}^{2+}$  ATPazė,  $\alpha$  miozino sunkiąją grandinę koduojančių genų raiška [278].

Progresuojant lėtiniam ŠN reaktyvavus fetalinių genų raišką, siekiama sumažinti širdies raumens energijos poreikius – su  $\beta$  miozino sunkiosios grandinės veikla susijusi kontraktilinė funkcija silpnesnė, todėl kartu sunaudojama mažiau ATP, taip pat slopinami genai, kurių koduojami baltymai stimuliuoja kalcio jonų apykaitą tarp kontraktilinių skaidulų ir dalyvauja lipidų  $\beta$  oksidacijos procesuose [276]. Pasikeitus pažeistų kardiomiocitų genų raiškai, ilgainiui susilpnėja tiek sistolinė, tiek diastolinė funkcijos, o ląstelių pagrindiniu energijos šaltiniu tampa širdies raumeniui mažai įtakos turintis glikolizės procesas [279].

Vertinant kardiomiocitų iRNR hnRNP C baltymo raiškos ir jų morfometrinių rodiklių (ilgio, skersmens, išilginės projekcijos ploto ir tūrio) sąsają, mūsų tyrime nustatytos statistiškai patikimos, tačiau silpnai teigiamos koreliacijos. Šie rezultatai gali būti paaiškinami kardiomiocite vykstančiomis reikšmingai dažnesnėmis iRNR pirminių transkriptų brendimo procese dalyvaujančio komplekso sąveikomis (angl. *interactomes*) su širdies miocito

sarkomerų struktūrų ir tarpląstelinių jungčių baltymų komponentais progresuojant ŠN, palyginus su kontroline grupe [220]. Ye J. ir kt. (2015) pastebėjo, kad užblokavus tai pačiai hnRNP baltymų grupei priklausančio hnRNP U baltymo raišką, hnRNP U<sup>-/-</sup> pelių širdžių kardiomiocituose, tiriant šviesiniu mikroskopu, matomi tik neryškūs hipertrofiniai pokyčiai, širdies kairiojo skilvelio segmentinės kontrakcijos rodikliui mažėjant nuo 60 proc. iki 20 proc. [199]. Be to, šiuose hnRNP U<sup>-/-</sup> pelių kardiomiocituose dokumentuotas sarkomerų sutrumpėjimas nuo 2,24 μm iki 1,68 μm. Minėti pokyčiai rodo, kad iRNR hnRNP grupės baltymai yra svarbūs koordinuojant efektyvų, jautrų kardiomiocitų mikroaplinkos pokyčiams sarkomerų ultrastruktūrų persitvarkymą ir ląstelių kompensacinį plastiškumą širdies audiniui prisitaikant prie užsitęsusio miokardo pažeidimo [206, 280].

Detaliau analizuojant kardiomiocitų viduląstelinių struktūrų pokyčius progresuojant išeminės kilmės ŠN, mūsų tyrimo duomenimis, koreliacijos tarp citoskeleto tarpinio filamento desmino ir kardiomiocitų iRNR RNP C baltymo raiškos pokyčių nenustatyta. Šiuos tyrimo rezultatus galima paaiškinti detaliau analizuojant iRNR hnRNP C baltymo taikinius pirminiuose iRNR transkriptuose brendimo metu. Bręstant pirminiam iRNR transkriptui dažniausi iRNR hnRNP C taikiniai iRNR transkriptų egzonų segmentuose būna sritys, koduojančios baltymus, tiesiogiai įeinančius į sarkomerų struktūrų sudėtį, koordinuojančius sarkomerų komponentų judėjimą vienas kito atžvilgiu [5] ir dalyvaujančius kardiomiocito kontrakcijos procese [281]. Todėl galima teigti, kad iRNR RNP C koordinuojamas pirminių iRNR transkriptų brendimo mechanizmas yra mažiau svarbus citoskeleto tarpinio filamento desmino raiškos pokyčiams kardiomiocitų remodeliavimosi metu progresuojant išeminės kilmės ŠN.

Svarbu atkreipti dėmesį, kad mūsų tyrimo duomenimis pirmą kartą dokumentuotos silpnos teigiamos koreliacijos tarp kardiomiocitų iRNR hnRNP C ir OPN, Grem1 baltymų raiškos pokyčių rodo, kad potranskripcinės reguliacijos mechanizmai gali turėti poveikį OPN ir Grem1 baltymų raiškai vykstant širdies miocitų remodeliavimuisi išeminės kilmės ŠN atvejais. OPN iRNR potranskripcinės reguliacijos, dalyvaujant iRNR RNP, mechanizmas yra dokumentuotas ir palyginta skirtingas OPN baltymo izoformas koduojančių iRNR raiška. Mažesnės molekulinės masės OPN-b ir OPN-c baltymo izoformas koduojančių iRNR raiška nustatyta išskirtinai išemijos pažeistuose kardiomiocituose [156]. iRNR hnRNP C ir Grem1 baltymų raiškos pokyčių sąsajos kardiomiocitų remodeliavimosi metu gali būti paaiškinamos kompleksiniu šių baltymų poveikiu reguliuojant fetalinių genų reaktyvacijos mechanizmą, ryškėjant širdies miocitų pažaidai ir miokardo dekompenzacijai, kai progresuoja išeminės kilmės ŠN [21, 276].

## IŠVADOS

1. Jau A stadijos ŠN grupės kardiomiocitų ilgis, skersmuo, išilginės projekcijos plotas ir tūris didėja, palyginus su kontrolinės grupės tirtaisiais rodikliais ( $p < 0,001$ ), B stadijos ŠN grupės kardiomiocitų analogiški rodikliai didėja toliau, palyginus su A stadijos ŠN ( $p < 0,001$ ) ir kontrolinės grupių rodikliais ( $p < 0,001$ ), o C–D stadijų ŠN grupės analogiški tirtieji parametrai yra didžiausi, palyginus su A ( $p < 0,001$ ), B stadijų ŠN ( $p < 0,001$ ) bei kontrolinės grupių rodikliais ( $p < 0,001$ ).
- 2.1. A stadijos ŠN grupės kardiomiocitų tarpinio filamento desmino baltymo raiška stiprėja, palyginus su kontrolinės grupės tirtuoju parametru ( $p < 0,001$ ), tačiau B ir A stadijų ŠN grupių kardiomiocitų desmino raiška išlieka panaši ( $p > 0,05$ ), o C–D stadijų ŠN grupės kardiomiocitų desmino raiška yra didžiausia, palyginus su A ( $p < 0,001$ ), B stadijų ŠN ( $p < 0,001$ ) ir kontrolinės grupių rodikliais ( $p < 0,001$ ).
- 2.2. A stadijos ŠN grupės kardiomiocitų OPN baltymo raiška yra padidėjusi, palyginus su kontrolinės grupės rodikliu ( $p < 0,001$ ), B stadijos ŠN grupės kardiomiocitų OPN raiška didėja toliau, palyginus su A stadijos ŠN ( $p < 0,001$ ) ir kontrolinės grupių rodikliais ( $p < 0,001$ ), o C–D stadijų ŠN grupės kardiomiocitų OPN raiška yra didžiausia, palyginus su A ( $p < 0,001$ ), B stadijų ŠN ( $p < 0,001$ ) ir kontrolinės grupių tirtaisiais parametrais ( $p < 0,001$ ).
- 2.3. A stadijos ŠN grupės kardiomiocitų Grem1 baltymo raiška didėja, palyginus su kontrolinės grupės rodikliu ( $p < 0,001$ ), kardiomiocitų Grem1 ir toliau stiprėja, kai yra B stadijos ŠN, palyginus su A stadijos ŠN ( $p < 0,001$ ) ir kontrolinės grupių tirtaisiais rodikliais ( $p < 0,001$ ), o C–D stadijų ŠN grupės kardiomiocitų raiškos intensyvumas yra didžiausias, palyginus su A ( $p < 0,001$ ), B stadijų ŠN ( $p < 0,001$ ) ir kontrolinės grupių analogiškais rodikliais ( $p < 0,001$ ).
- 2.4. A ir B stadijų ŠN grupių kardiomiocitų iRNR hnRNP C baltymo raiška išlieka panaši į kontrolinės grupės ( $p > 0,05$ ), o C–D stadijų ŠN grupės kardiomiocitų iRNR hnRNP C baltymo raiška didėja, palyginus su A stadijos ŠN grupės analogišku parametru ( $p < 0,001$ ).
3. Kardiomiocitų dydžio (tūrio) pokyčiai teigiamai koreliuoja su šių ląstelių desmino ( $r_s = 0,681$ ;  $p < 0,001$ ), OPN ( $r_p = 0,524$ ;  $p < 0,001$ ), Grem1 ( $r_p = 0,701$ ;  $p < 0,001$ ) ir iRNR hnRNP C ( $r_s = 0,248$ ;  $p < 0,05$ ) baltymų raiškos pokyčiais, progresuojant išeminės kilmės ŠN.



## KLINIKINĖ REIKŠMĖ

Nors kardiomiocitų geometrijos ir baltymų raiškos pokyčių jų remodeliavimosi metu svarba formuojantis išeminės kilmės ŠN įrodyta, tačiau praktinis kardiomiocitų morfometrinių rodiklių ir baltymų raiškos pokyčių vertinimas išlieka problemiškas. Iš esmės gyvūnų modelių tyrimais pagrįsti kardiomiocitų morfometrinių rodiklių ir šių ląstelių baltymų raiškos pokyčių duomenys, standartizuotų, objektyvių, lengvai klinikinėje diagnostikos praktikoje pritaikomų, morfologiniais audinių tyrimais paremtų diagnostikos kriterijų trūkumas – tai pagrindinės kliūtys, siekiant pritaikyti ŠN patogenezinei reikšmingų kardiomiocitų remodeliavimosi pokyčių diagnostikos vertinimą širdies audiniuose iki atsirandant pirmiesiems klinikiniais išeminės kilmės ŠN požymiams.

Šis morfometrinis ir imunohistocheminis kardiomiocitų pokyčių remodeliavimosi metu, esant įvairios stadijos išeminės kilmės ŠN, tyrimas atliktas įvertinus A, B ir C–D stadijų ŠN grupių širdies kairiojo skilvelio kardiomiocitų morfometrinių rodiklių ir šių ląstelių desmino, OPN, Grem1 bei iRNR hnRNP C baltymų raiškos pokyčių įvairovę. Šie duomenys palyginti su kontrolinės grupės rezultatais. Remiantis mūsų atlikto kardiomiocitų morfometrinių ir imunohistocheminio tyrimo rezultatais, nustatyti reikšmingi kardiomiocitų histomorfometrinių rodiklių ir desmino, OPN, Grem1 bei iRNR hnRNP C imunohistocheminių reakcijų intensyvumo pokyčiai. Šie remodeliavimosi metu nustatyti duomenys gali būti panaudoti diegiant histomorfometrinių ir imunohistocheminių kardiomiocitų remodeliavimosi pokyčių vertinimą kaip pagalbinę ŠN diagnostikos priemonę klinikinėje praktikoje.

Klinikinėje patologijos diagnostikos praktikoje šis išeminės kilmės ŠN patogenezinių mechanizmų tyrimais pagrįstas, standartizuotas, kompleksinis histomorfometrinis ir imunohistocheminis kardiomiocitų pokyčių remodeliavimosi metu endomiokardo biopsijos tyrimas gali būti naudojamas, siekiant patikimai nustatyti ankstyvuosius kardiomiocitų pažeidimus iki atsirandant pirmiesiems išeminės kilmės ŠN simptomams, objektyviai įvertinti šių struktūrinių pokyčių dinamiką ir taikomo gydymo veiksmingumą pacientams, progresuojant išeminės kilmės ŠN.

## TYRIMO APRIBOJIMAI

Kardiomiocitų baltymų raiškos pokyčių tyrimui, esant įvairios stadijos išeminės kilmės ŠN, galima taikyti ir šių ląstelių baltymus koduojančių genų iRNR raiškos tyrimo metodą. Vis dėlto, įvertinus RNR irimo spartą formaliniu fiksuotuose audiniuose ir šios molekulės savybę formuoti junginius su fiksuotuose audiniuose esančiais baltymais, dėl biocheminių reakcijų reikšmingai sumažėja iš fiksuotų audinių išskirtos RNR kokybė ir kiekis. Todėl tiriant kardiomiocitų iRNR raiškos pokyčius, duomenys apie atitinkamų baltymų raiškos šiose ląstelėse pokyčių įvairovę, esant įvairios stadijos išeminės kilmės ŠN, būtų nepakankamai tikslūs.

Kiekybinis kardiomiocitų baltymų raiškos pokyčių tyrimas gali būti atliekamas taikant „Western blot“ metodą. Svarbu atkreipti dėmesį, kad pritaikius šį metodą, nustatomi viso tiriamojo audinio, bet ne atskirų, tam tikrų ląstelių kiekybiniai baltymo raiškos duomenys. Konkretaus baltymo raiškos pokyčių šaltinis lieka neaiškus. Kardiomiocitai yra pagrindinės aktyviają širdies kontraktinę funkciją atliekančios ląstelės ir informacija apie jų struktūrinius bei funkcinis poslinkius širdies remodeliavimosi metu yra svarbi, aiškinantis išeminės kilmės ŠN patogenezinį mechanizmą. Imuno-histocheminis tyrimas yra baltymų raiškos tyrimo metodas, kurį pritaikius galima tiksliai dokumentuoti baltymų raiškos pokyčius kardiomiocituose miokardo remodeliavimosi metu ir nustatyti šių pokyčių poveikį progresuojant išeminės kilmės ŠN.

# SUMMARY

## INTRODUCTION

Heart failure (HF) is a clinical syndrome characterized by a decline in cardiac function due to structural and functional injuries, with HF of ischemic origin being the most common one in the clinical practice [1]. Despite the improvements in HF diagnostics and treatment, the overall number of patients diagnosed with this syndrome is increasing [2], with a global prognosis of approximately 64 million HF patients [1]. This poses a significant clinical, social, and economic challenge, characterized by rising rates of hospitalization [3], in-hospital mortality and healthcare service infrastructure costs [4].

Although the mechanisms behind HF pathogenesis have been extensively studied, the biological significance of the early compensatory structural changes within the cardiomyocytes during HF formation before the clinical symptoms appear remains unclear. Intracellular compensatory processes at the molecular level are initiated in the heart due to ischemic injuries, and the purpose of these rearrangements is to restore and sustain physiological functionality of the cardiac tissue [5, 6]. These complex structural compensatory processes, known as remodeling, occur at the cellular and intracellular levels, reorganizing the components of the cardiomyocyte's cytoskeleton, interacting with the cellular sarcoplasm, sarcomeres and nucleus, and simultaneously changing the cellular geometry [7].

Intracellular protein expression changes within cardiomyocytes during remodeling of the cardiac tissues exposed to ischemic injury ensure the plasticity of these cells to adapt, survive, and regain the functionality of the tissues injured by the mechanical and oxidative stress. This process leads to the reorganization of the cardiac chamber's size, shape, and function [8]. However, when the cardiac remodeling induced by ischemic injury persists, it can lead the exhaustion of cardiomyocyte energy resources, and the impairment of intracellular protein synthesis homeostasis (proteostasis) [7]. The exhaustion of intracellular compensatory mechanisms in cardiomyocytes can weaken their ability to maintain functionality during remodeling, contributing to cardiac muscle dysfunction and the eventual manifestation of symptomatic HF.

Considering the role of cardiomyocytes in the cardiac remodeling process and the reorganization of protein synthesis within these cells, there is a growing focus on developing diagnostic criteria and markers. These markers would demonstrate the protein expression dynamics and their

correlations with the shape and function changes of cardiomyocytes during cardiac muscle remodeling [9, 10]. When analyzing the biological significance of the cardiomyocyte structural reorganization during the formation of ischemic HF, markers characterizing the early expression changes of proteins associated with cardiomyocyte remodeling and proliferation potential are emphasized.

Desmin, a predominant intermediate filament of the cellular cytoskeleton, plays a critical role in maintaining cellular mechanical resilience and functional integrity during the remodeling process [11, 12]. Furthermore, a phosphorylated glycoprotein OPN [13, 14], as one of the suggested targets for HF treatment [15], modulates the inflammation, stimulates the expression of cardiomyocyte hypertrophy genes [16–18], and supervises the intercellular communication [19], whereas Dan protein family morphogenetic antagonist Grem1 is critical for the cardiac embryogenesis [20], tissue remodeling [21], and modulating the angiogenesis in the hypoxic cellular microenvironment [22]. iRNA hnRNPs, including iRNA hnRNP C, participate in eliminating introns from primary iRNA transcripts and are associated with cardiomyocyte hypertrophy and HF [23, 24].

Studies demonstrate that the characterization of the expression changes of these proteins during cardiac muscle remodeling is relevant for evaluating the functional potential of myocardial contractile segment cells, this approach also acquires novel data on the cardiomyocyte remodeling, HF pathogenesis mechanisms, and probable diagnostic and therapeutic HF targets [15, 23, 25]. From a clinical perspective, analyzing desmin, OPN, Grem1, and iRNA hnRNP C protein expression is crucial for evaluating HF risk, monitoring the syndrome's clinical course, predicting outcomes, and developing personalized treatment strategies for HF patients [23, 24, 26–30].

Despite the documented biological significance of cardiomyocyte remodeling and the protein expression changes within these cells during development of HF, data on the cardiomyocyte geometry changes during remodeling remains fragmented [31, 32]. Most studies have characterized the geometry and protein expression changes of these cells in cases of the end-stage HF, dilatative cardiomyopathy, or acute ischemia [17, 29, 33, 34]. Furthermore, studies of protein expression changes in HF are typically analysed by measuring the concentration of proteins in blood plasma without defining the actual sources of protein expression changes during the remodeling of cellular structures in the cardiac muscle as HF progresses [10, 19, 27]. Consequently, data concerning the early changes in cardiomyocyte geometry during the remodeling process is not fully understood in the context of ischemic HF, and the role of protein expression in regulating cardiomyocyte

remodeling remains unclear. Therefore, the practical application of this data is currently challenging.

### **The objective of the study**

The objective of the study is to determine the structural changes of the contractile myocardium in patients with ischemic heart disease in order to identify the most likely markers of HF and to assess the expression trends of these markers.

### **The goals of the study**

The goals of the study are as follows:

1. To determine the changes in morphometric parameters of cardiomyocytes in the different stages of ischemic HF.
2. To determine the expression trends of the markers associated with cardiomyocyte remodeling in the different stages of ischemic HF:
  - 2.1. to analyze changes in desmin expression in cardiomyocytes;
  - 2.2. to characterize the dynamics of OPN expression in cardiomyocytes;
  - 2.3. to determine changes in Grem1 expression in cardiomyocytes;
  - 2.4. to describe the iRNA hnRNP C expression in cardiomyocytes.
3. To evaluate the associations between the morphometric parameters of the cardiomyocytes and their remodeling markers during the development of ischemic HF.

### **Novelty and relevance of the study**

A comprehensive morphometric study of the left ventricular myocardium was performed, and the full scope of the cardiomyocyte structural changes during the remodeling in the stages A, B, and C–D ischemic HF according to the American College of Cardiology (ACC) / American Heart Association (AHA) classification was presented for the first time in this study. This study documented the relevant changes in length, diameter, area, and volume of the stage A of HF cardiomyocytes during the early remodeling, even before the onset of symptoms of ischemic HF. These morphometric parameters increased in stage B of HF, and the study described the highest values of morphometric parameters for stages C–D of HF cardiomyocytes.

The semi-quantitative immunohistochemical analysis of the left cardiac ventricle was performed, and comprehensive characterization of the intermediate filament desmin, glycoprotein OPN, Grem1, and iRNA hnRNP C expression changes within the cardiomyocytes of the stages A, B, C–D of ischemic HF was presented for the first time in this study. Increased expres-

sion of desmin, OPN, and Grem1 proteins was observed in the A stage HF (risk HF) cardiomyocytes, and this expression of desmin, OPN, and Grem1 proteins continued to increase in the B stage ischemic HF cardiomyocytes. The highest expression of desmin, OPN, and Grem1 proteins was documented in the stages C–D ischemic HF cardiomyocytes. This study also documented for the first time the expression changes of the iRNA hnRNP C protein within the cardiomyocytes of the different stages of ischemic HF.

Positive correlations were identified between the morphometric parameters of the cardiomyocytes and the expression changes of desmin, OPN, Grem1 and iRNA hnRNP C within the cardiomyocytes in progressing ischemic HF.

The full spectrum of cardiomyocyte geometry and protein expression changes within the cardiomyocytes in progressive ischemic HF, characterized for the first time in this study, provides the novel scientific data on the early structural reorganization of the cardiomyocytes, their cytoskeletal components, and proteins that modulate the remodeling process during the development of ischemic HF. The relevance of the cardiomyocytes remodeling in the ischemic HF pathogenesis before the very first HF symptoms is validated by the extensive morphometric and immunohistochemical study of the cardiomyocytes. Moreover, these results provide the background for the future studies of the cardiomyocyte transcriptome changes during the remodeling and may be applied to optimize the diagnostic algorithms for the early diagnostics of ischemic HF, and to search for the novel diagnostic and therapeutic targets of HF.

## **STUDY CONTINGENT AND METHODS**

### **Approval of the bioethical committee**

This study was approved by the Local Kaunas Ethics Committee for Biomedical Research (No. BE-2-77, 15/09/2022). An exemption from obtaining patient consent was granted, as stipulated by the “Lithuanian Republic National Law for Biomedical Research” (No. VIII-1679, paragraph no. 7, subparagraph no. 11, 11/05/2000) and the “Regulations for Performing the Biomedical Research when the Object of Study is Medical Documentation” (approved by the Order of the Director of Lithuanian Bioethical Committee, no. V-28, 27/07/2011), the object of this study is the biological sample and the health information obtained for diagnostic purposes prior to a request to perform a biomedical study. It is important to note that personal identity cannot be determined from the data analyzed in the biomedical study.

## Study contingent

Myocardial samples of the middle wall of the left cardiac ventricle were obtained from a collection of paraffin-embedded tissues over 40 years old representing various cardiac diseases (Laboratory of Cardiac Pathology, Institute of Cardiology, Lithuanian University of Health Sciences). Selected cases ( $n = 84$ ) were further classified into the stage A HF (at-risk for HF), stage B HF (pre-HF), and stages C–D HF (symptomatic or advanced HF, correspondingly) according to the ACC / AHA classification [53].

The stage A HF group [53] included previously healthy males or those health had improved or stabilized prior to death, and who died suddenly from ischemic heart disease within six hours of experiencing symptoms of ischemic heart disease [227], no clinical symptoms of HF were documented prior to the death of these patients; no scars after the myocardial infarction were detected during the extensive morphological analysis of the cardiac tissue, and acute ischemic myocardial injury was no more than 6 hours old [228]. The stage B (pre-HF) group [53] was defined by the same characteristics as the previous group, except that the morphological changes of a scar after myocardial infarction were detected during postmortem morphological examination of the left cardiac ventricle. The stages C/D HF (symptomatic and advanced HF) group [53] included male patients who were clinically diagnosed with symptomatic or advanced ischemic HF. They underwent heart transplantation surgery, and a complete morphological evaluation of the explanted heart was performed.

Patients selected for the stage A HF and the stage B HF groups were not treated with medications that regulate myocardial remodeling. Medications according to ischemic HF treatment algorithm were applied in the stages C–D HF group.

Men who died within the first day from external causes or acute diseases that are not related to cardiac pathology were selected for the control group. These cases underwent extensive morphological examination of the heart during the postmortem analysis.

No factors affecting myocardial remodeling, like systemic arterial hypertension, cardiomyopathies, congenital and acquired cardiac valve diseases, diabetes mellitus, or pulmonary diseases, were diagnosed in all the cases selected for the study. Specific morphological (macroscopic and microscopic) examination of the heart, coronary arteries, and myocardium was performed in accordance with the methodical recommendations of the European Association of Cardiovascular Pathology on the postmortem examination in sudden cardiac death cases [229]. This methodical approach ensures comprehensive data collection on all segments of the coronary arteries and

myocardium. The extensive morphological examination of the heart and coronary arteries was performed, and myocardium samples were obtained from the middle wall of the left cardiac ventricular free wall. These samples were then subjected to morphometric and immunohistochemical analysis of the cardiomyocytes. The samples were carefully selected to avoid areas that are closer to acute ischemic injuries or scars after myocardial infarction.

## **Study methods**

### **Histomorphometric analysis of cardiomyocytes**

A histomorphometric analysis of the left cardiac ventricular middle wall myocardium was performed to document the size and shape changes of the cardiomyocytes. Five 4  $\mu\text{m}$ -thick paraffin microsections of the paraffin blocks for each case were cut by rotating microtome “Leica RM2235” (“Leica Biosystems”, Deer Park, Illinois, USA), applying the stepwise approach with a 20  $\mu\text{m}$  distance to avoid the overlapping cardiomyocytes measured several times in each selected case. These paraffin microsections were straightened in the water bath “Sakura” (Torrance, California, USA), put on the “SuperFrost Plus” (Menzel, Braunschweig, Germany) glass histoslides, and dried on the drying platforms for the histological microsections “Thermo Electron Corporation” (Waltham, Massachusetts, USA).

Standard myocardial microsections (histotopograms of the left cardiac ventricular middle wall) were stained applying Heidenhain azan trichrome histochemical method for the histomorphometric analysis, and these stained microsections were analysed by motorized light microscope “Olympus BX51” (“Olympus Corporation”, Tokyo, Japan), documenting at least 80 moderate magnification ( $\times 20$ ) microscopic fields of longitudinal plane myocardium by applying digital camera “Evolution Qei” (“Media Cybernetics”, Rockville, Maryland, USA).

Histomorphometric analysis of the documented longitudinal plane myocardial microsection was performed by using “Image Pro Plus” image analysis software (“Media Cybernetics”, Rockville, Maryland, USA), with a minimum of 80 longitudinal plane cardiomyocytes measured for each case. Only cardiomyocytes with visible intercalated discs at both cellular tips and a nucleus in the cell’s centre without the injuries to the structure of the cardiomyocytic contractile element were measured. The diameter (along the cellular nucleus) and length (distance between intercalated discs) of each cardiomyocyte were measured in  $\mu\text{m}$ . The cardiomyocyte’s length-to-diameter ratio, longitudinal plane area (length  $\times$  diameter)  $\mu\text{m}^2$ , and volume



$((\pi \times (0.5 \times \text{diameter})^2) \times \text{length}) \mu\text{m}^3$  were calculated, assuming the cardiomyocytes have a cylindrical shape.

Accurate measurement of the cardiomyocytes parameters is possible when the measuring plane is directly across the middle of the cell and is parallel to the longitudinal axis. However, when the measuring plane is directly across the middle of the cell, but not parallel to the longitudinal axis, the cardiomyocytic length is overestimated, and the greater cellular length is measured compared to the actual length. Similarly, when the measuring plane is parallel to the cell's longitudinal plane, but it is not directly across the middle of the cell, the cardiomyocytic diameter is underestimated, resulting in a measurement that is less than actual diameter. Errors in length overestimation and diameter underestimation of cardiomyocyte have been calculated, with theoretical values ranging up to 3.4% and 3.2%, respectively [32, 230, 231].

The number of cardiomyocytes required to perform the measurements was determined by pilot studies, evaluating the means and dispersions of the histomorphometric parameters values. The inter-observer and intra-observer variability was evaluated by applying Kappa ( $\kappa$ ) statistics (Cohen's  $\kappa$  coefficient  $> 0.9$ ).

### **Immunohistochemical study of the cardiomyocytes**

An immunohistochemical study of desmin, OPN, Grem1, and iRNA hnRNP C were performed to evaluate the expression changes of these proteins in cardiomyocytes in progressing ischemic HF. Paraffin 3  $\mu\text{m}$ -thick microsections were cut from the paraffin blocks of the cases selected for the study by a rotating microtome "Leica RM2235" ("Leica Biosystems", Deer Park, Illinois, USA) and placed on the "SuperFrost plus" (Menzel, Braunschweig, Germany) glass histoslides. Deparaffinization was performed by the automated stainer "Varistain Gemini" (Ramsey, Minnesota, USA), applying xylene and ethanol. Deparaffinized microsections were washed with distilled water.

Epitope retrieval was conducted using a microwave device RHS-1 ("Milestone Medical", Roseland, New York, USA), incubating the specimen in TRIS/EDTA ("Agilent Technologies Inc.", Wood Dale, Illinois, USA) pH 9.0 buffer at 110°C for 8 min. Subsequent steps of the immunohistochemical reactions were performed by applying "Shandon Coverplate" plates ("Thermo Fisher Scientific", Waltham, Massachusetts, USA).

Endogenous peroxidase was blocked, and the microsections were incubated for 1 hour with the respective primary antibodies against desmin, OPN, Grem1, and iRNA hnRNP C (Table A).

**Table A.** Characteristics of the primary antibodies applied for immunohistochemistry

Antibody	Species	Immunogen	Dilution	Manufacturer (Cat. number)	External control
Desmin	Rabbit polyclonal	Aminoacids 406–470	1:250	Sigma Aldrich (HPA018803)	Appendix
OPN	Mouse monoclonal	Sequence of full length	1:100	DSHB (MPIIB10(1))	Breast carcinoma
OPN	Rabbit polyclonal	Aminoacids 273–301	1:50	Thermo Fisher Scientific (PA5-13494)	Breast carcinoma
Grem1	Rabbit polyclonal	Aminoacids 52–67	1:100	Abcam (ab22138)	Prostate gland
Grem1	Rabbit polyclonal	Aminoacids 101–184	1:200	GeneTex (GTX03394)	Prostate gland
iRNR hnRNP C1 / C2	Mouse monoclonal	Aminoacids 102–121	1:100	Sigma Aldrich (AMAB91012)	Large intestine
iRNR hnRNP C1 / C2	Rabbit polyclonal	Sequence of full length	1:200	Sigma Aldrich (SAB 2101056)	Large intestine

The primary antibody against desmin has been validated by the antibody validation protocol of the “Human Protein Atlas” [232]. The primary antibodies against OPN, Grem1, and iRNA hnRNP C1 / C2 were validated by applying the independent antibody validation strategy according to the recommendations of the International Working Group for Antibody Validation [234–236].

The diluted primary antibodies were incubated for 60 minutes at the room temperature. The immunohistochemical reactions of external positive control were performed in parallel with the reactions in myocardium. Immunoglobulin G of the same isotype was used as the reagent control.

The visualization of the immunohistochemical reactions was accomplished by applying the “EnVision FLEX+” visualization system composed of linker system with the mouse / rabbit linker, and horseradish “Magenta” chromogen, when the intensity of desmin, OPN, and Grem1 proteins expression within the cardiomyocytes was analysed, or DAB+ chromogen, when the intensity of iRNA hnRNP C protein expression within the cardiomyocytes was studied (“Agilent Technologies Inc.”, K800221-2, K802121-2, GV92511-2, Wood Dale, Illinois, USA) under the manufacturer’s instructions. The procedures of haematoxylin staining (“Agilent Technologies Inc.”, S330930-2, Wood Dale, Illinois, USA) and dehydration with increasing concentrations of

ethanol solutions and xylene were performed. The microsections on the glass histoslides were covered applying the polystyrene covering material.

The immunohistochemical reactions was evaluated by two independent researchers, who were unaware of the groups of the selected cases. The inter-observer and intra-observer variability was evaluated by Kappa ( $\kappa$ ) statistics (Cohen's  $\kappa$  coefficient > 0.9).

When the primary evaluation of the immunohistochemical reactions against OPN, Grem1, and iRNA hnRNP C1 / C2 was performed according to the independent antibody validation strategy, no differences were detected comparing the results of the immunohistochemical reactions against different antibodies of OPN (MPIIIB10(1) vs PA5-13494), Grem1 (ab22138 vs GTX03394), and iRNA hnRNP C (AMAB91012 vs SAB 2101056).

### **Evaluation of the immunohistochemical reactions**

A semi-quantitative analysis of the immunohistochemical reactions against desmin, OPN, and Grem1 was performed evaluating the intensity and staining pattern of the immunohistochemical reaction within the cardiomyocytes: 0 – no reaction, 1 point – weak, 2 points – moderate; 3 points – strong.

The evaluation of the immunohistochemical reactions against desmin, OPN, and Grem1 was performed in 50 microscopic fields of  $\times 40$  magnification (“Olympus corporation”, Tokyo, Japan), documenting the frequency of the cardiomyocytes (%) representing the different intensity and staining pattern of the immunohistochemical reaction in the microsection for each case. The immunohistochemical reactions against desmin, OPN, and Grem1 were evaluated in the longitudinal plane cardiomyocytes only. The semi-quantitative analysis of the immunohistochemical reactions was performed by calculating the immunohistochemical expression intensity of desmin, OPN, and Grem1 to evaluate overall expression of these proteins within the cardiomyocytes:  $((1 \text{ point} \times \text{cardiomyocyte count \%}) + (2 \text{ points} \times \text{cardiomyocytes count \%}) + (3 \text{ points} \times \text{cardiomyocyte count \%})) / 10$ .

The results of the immunohistochemical reactions against desmin, OPN, and Grem1 were also evaluated by applying modified categorization system of immunohistochemical reactions by “Human Protein Atlas” [232], evaluating expression of each protein within the cardiomyocytes: 1 = low (physiological staining up to 25% cardiomyocytes); 2 = medium (moderate staining in at least 25% of cardiomyocytes or strong staining in less than 25% of cardiomyocytes); 3 = high (strong staining in at least 25% of cardiomyocytes).

Histological slides of the immunohistochemical reactions against iRNA hnRNP C1 / C2 were scanned by “Pannoramic Viewer 3D Histech” (“3DHistech Ltd.”, Budapest, Hungary) scanner. A semi-quantitative study of the immunohistochemical reaction against iRNA hnRNP C1 / C2 was performed applying digital image analysis software “Pannoramic SlideViewer” (“3DHistech Ltd.”, Budapest, Hungary), and the immunohistochemical reaction intensity was evaluated in the cardiomyocytic nuclei: 0 points – no reactions; 1 point – weak; 2 points – strong. The evaluation of the immunohistochemical reaction against iRNA hnRNP C was performed in 300 cardiomyocytes per microsection for each selected case. The immunohistochemical reaction against iRNA hnRNP C was evaluated in the longitudinal plane cardiomyocytes. The semi-quantitative analysis of the immunohistochemical reaction involved calculating the immunohistochemical expression intensity of iRNA hnRNP C to evaluate overall iRNA hnRNP C protein expression within the cardiomyocytes:  $((1 \text{ point} \times \text{cardiomyocyte count \%}) + (2 \text{ points} \times \text{cardiomyocytes count \%})) / 10$ .

### **Statistical analysis**

Normality of continuous variables distribution was assessed applying the Kolmogorov–Smirnov ( $n \geq 50$ ) and Shapiro–Wilk ( $n < 50$ ) tests. The continuous variables with a normal distribution were reported as the mean (standard error, SE) with 95% confidence intervals. The continuous variables without a normal distribution were documented as the median with the interquartile range. Non-continuous data were described by reporting their frequencies (%).

Statistically significant differences between the independent variables in Stages A, B, C–D HF, and control groups were determined by ANOVA with Bonferroni pair-wise comparisons, provided that these variables fit the normality distribution. The nested design of ANOVA was applied to determine statistically significant differences between the quantitative histomorphometric parameters of Stages A, B, C–D HF, and control groups. When the nested design of ANOVA was applied in the histomorphometric study results analysis, groups of Stages A, B, C–D HF, and control were considered as the fixed factor, whereas the results of the independent histomorphometric parameters measurements were established as a random factor.

Statistically significant differences between the independent variables in Stages A, B, C–D HF, and control groups were determined by the Kruskal–Wallis test with pairwise comparison criteria, when these variables did not fit

the normality distribution. The results of the pairwise comparison criteria were evaluated by the Bonferroni correction.

Correlation analysis of the independent continuous variables was performed by calculating the Pearson's correlation coefficient ( $r_p$ ), when the compared continuous variables fit the normality distribution, and the Spearman's correlation coefficient ( $r_s$ ) in cases the compared continuous variables did not fit the normality distribution.

A purpose to specify the association trends of the statistically significant correlation analysis results and evaluate their direct effect on other variables from a statistical point of view was established. The linear regression model's method was adopted for the measured histomorphometric data, reporting the parameters characterizing the prognostic and qualitative value of these models: determination coefficient ( $R^2$ ), coefficient of the independent variable, constant, ANOVA, and Durbin-Watson criterion for the probable autocorrelations of the model's residuals (prediction errors).

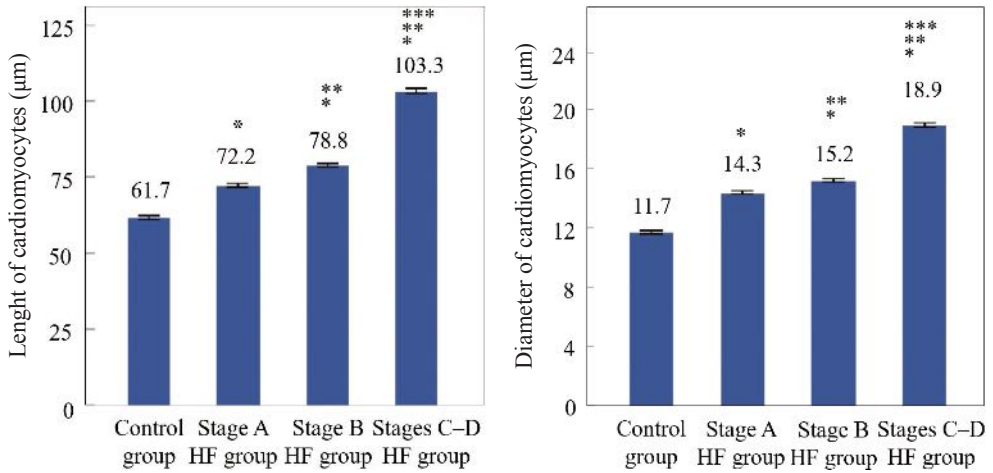
The results of the statistical analysis were established as statistically significant when  $p < 0.05$ . Statistical analysis was performed by SPSS software (SPSS version 29.0, IBM, Armonk, New York, USA).

## RESULTS

### **Changes of morphometric parameters of cardiomyocytes at different stages of ischemic HF**

A total of 8638 cardiomyocytes from the left cardiac ventricular middle wall were selected for histomorphometric analysis by light microscopy: 2080 cardiomyocytes from the stage A HF group, 1992 cardiomyocytes from the stage B HF group, 2637 cardiomyocytes from the stages C–D HF group, 1929 cardiomyocytes from the control group.

The trends of the longitudinal plane cardiomyocytes length were analyzed, and the average length of cardiomyocytes in the stage A HF group was increased, compared to the control group ( $p < 0.001$ ) (Fig. A). Additionally, the greater mean cellular length was documented in the stage B HF cardiomyocytes, compared to the stage A HF ( $p < 0.001$ ) and the control groups ( $p < 0.001$ ). The longest cardiomyocytes were observed in the C–D HF group, exceeding those in the stage A HF ( $p < 0.001$ ), stage B HF ( $p < 0.001$ ), and the control groups ( $p < 0.001$ ).

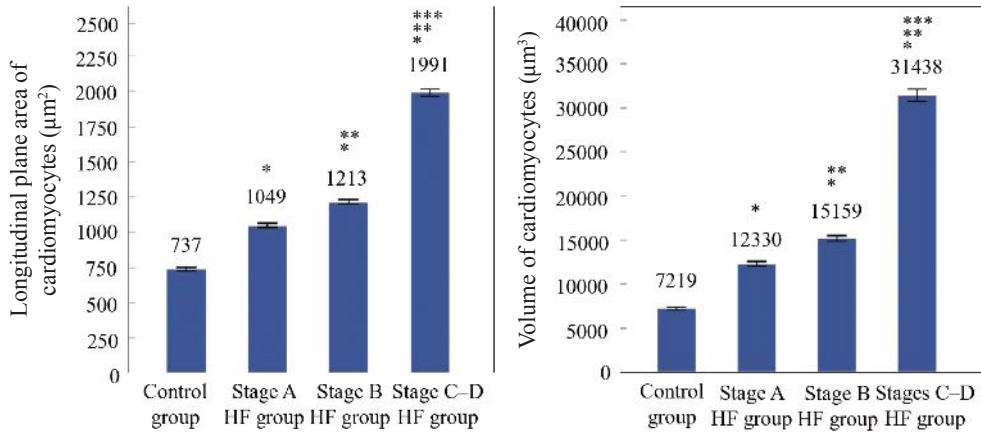


**Fig. A.** Length and diameter of cardiomyocytes (mean and standard error)

\* $p < 0.001$  – Stages A, B, C–D HF groups, compared to the control group; \*\* $p < 0.001$  – Stages B or C–D HF groups, compared to the Stage A HF group; \*\*\* $p < 0.001$  – Stages C–D HF group, compared to the Stage B HF group.

Consistent findings were noted in the cardiomyocyte histomorphometric analysis, which examined the mean diameter of the cardiomyocytes (see Fig. A). The mean diameter of the stage A HF group was found to be larger than that of the control group ( $p < 0.001$ ). Additionally, the mean diameter of the stage B HF group cardiomyocytes increased substantially compared to both stage A HF ( $p < 0.001$ ) and the control groups ( $p < 0.001$ ). The stages C–D HF group cardiomyocytic diameter exhibited the greatest value, and it was significantly greater when compared to the stage B HF ( $p < 0.001$ ), stage A HF ( $p < 0.001$ ), and the control groups ( $p < 0.001$ ).

The calculated longitudinal plane area of the cardiomyocytes revealed a significant increase in the stage A HF group, compared to the control group ( $p < 0.001$ ) (Fig. B). Furthermore, the longitudinal plane area of the stage B HF group cardiomyocytes continued to increase, demonstrating a notable difference when compared to both the stage A HF ( $p < 0.001$ ) and the control groups ( $p < 0.001$ ). The cardiomyocytes from the C–D HF group had the largest longitudinal plane area, which was larger than those from the stage B HF ( $p < 0.001$ ), stage A HF ( $p < 0.001$ ), and the control groups ( $p < 0.001$ ).

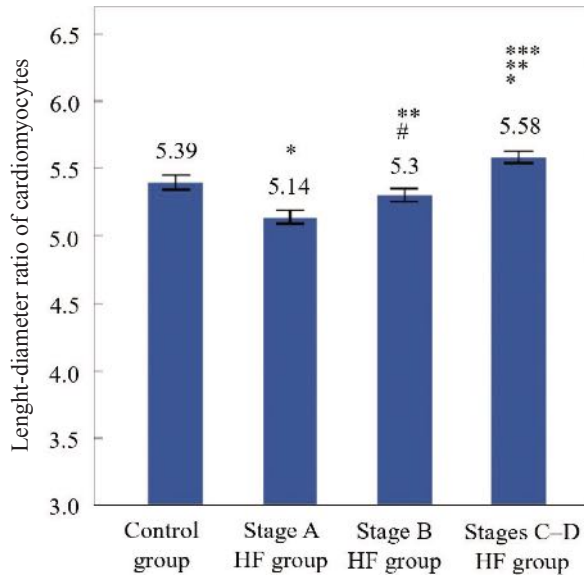


**Fig. B.** Longitudinal plane area and volume of cardiomyocytes (mean and standard error)

\* $p < 0.001$  – Stages A, B, C–D HF groups, compared to the control group; \*\* $p < 0.001$  – Stages B or C–D HF groups, compared to the Stage A HF group; \*\*\* $p < 0.001$  – Stages C–D HF group, compared to the Stage B HF group.

Analysis of the mean volume of the cardiomyocytes in the stage A, B, and C–D HF groups also demonstrated similar trends (see Fig. B). The mean volume of the stage A HF group cardiomyocytes increased, compared to the control group ( $p < 0.001$ ). This parameter of the stage B HF group cardiomyocytes continued to increase when comparing the mean value of this parameter to the stage A HF ( $p < 0.001$ ), and the control groups ( $p < 0.001$ ). The mean volume of the stages C–D HF group cardiomyocytes was almost twice as great compared to the stage B HF ( $p < 0.001$ ), and more than two-fold greater compared to the stage A ( $p < 0.001$ ), as well as the control groups ( $p < 0.001$ ).

The cardiomyocytic length-diameter ratio which represents the changes in the geometry of cardiomyocytes during the progression of ischemic HF was analyzed (Fig. C). The results demonstrated that the cellular length-diameter of stage A HF group cardiomyocytes decreased compared to the control group ( $p < 0.001$ ). However, when evaluating the cardiomyocytic length-diameter ratio of the stage B HF, it was determined that this parameter increased, compared to the stage A HF ( $p < 0.001$ ), but still did not increase up to the value of the control group ( $p < 0.05$ ). The length-diameter ratio of the stages C–D HF group cardiomyocytes continued to increase, and this parameter was greater compared to the stage B HF ( $p < 0.001$ ), stage A HF ( $p < 0.001$ ), and the control groups ( $p < 0.001$ ).



**Fig. C.** Length-diameter ratio of cardiomyocytes (mean, standard error)

\* $p < 0.001$  – Stages A, C–D HF groups, compared to the control group; # $p < 0.05$  – Stage B HF group, compared to the control group; \*\* $p < 0.001$  – Stages B or C–D HF groups, compared to the Stage A HF group; \*\*\* $p < 0.001$  – Stages C–D HF group, compared to the Stage B HF group.

A correlation analysis of the cardiomyocytic histomorphometric parameters was performed, and positive correlations were documented between the cardiomyocyte's length and diameter of the stages A ( $r_p = 0.355$ ;  $p < 0.001$ ), B ( $r_p = 0.400$ ;  $p < 0.001$ ), C–D HF ( $r_p = 0.453$ ;  $p < 0.001$ ), and the control groups ( $r_p = 0.460$ ;  $p < 0.001$ ).

While documenting the tendency of the cardiomyocytic length as well as the diameter in a quantitative manner when ischemic HF is progressing, a linear regression model method was applied to characterize the changes of the cardiomyocyte's length and diameter in stages A, B, C–D HF, and the control groups.

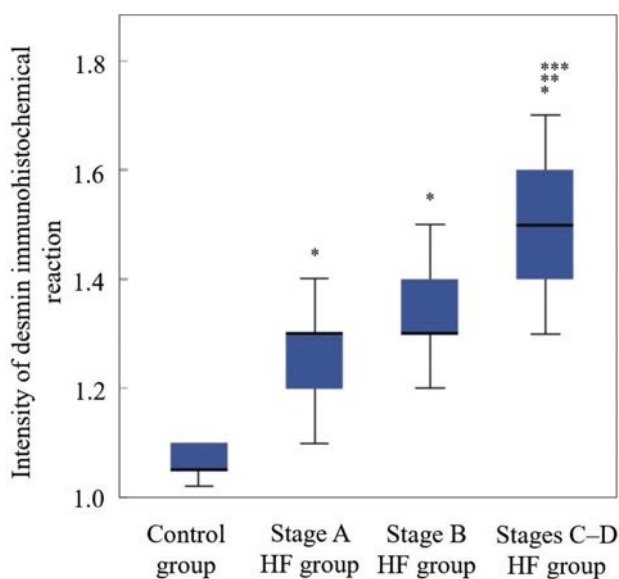
A linear regression model analysis was performed to determine the changes in the length and diameter of the cardiomyocytes. The greatest prognostic potential was determined in the stages C–D HF group linear regression model ( $R^2 = 0.2037$ ), and this potential was very similar to the control group ( $R^2 = 0.2096$ ). The prognostic potential of the stage A HF ( $R^2 = 0.1211$ ) and stage B HF ( $R^2 = 0.1555$ ) models was comparatively lower than that of the stages C–D HF and the control groups.



## Dynamics of desmin protein expression in cardiomyocytes

The immunohistochemical study of desmin expression within the cardiomyocytes was analyzed according to the modified categorization system of desmin protein expression (see Fig. 3.2.1, p. 50). The results demonstrated that low level of desmin expression within the cardiomyocytes was documented in more than 95% of cases in control group. Medium desmin expression within the cardiomyocytes was detected in 72% of the stage A HF group, and the remaining cases demonstrated low desmin protein expression within the cardiomyocytes. The cardiomyocytes of the stage B HF group exhibited medium desmin expression in more in more than 76% cases of this group. All cases (100%) of the stages C–D HF group demonstrated medium desmin protein expression in cardiomyocytes. Notably, this group also contained cases, where some cardiomyocytes displayed intracytoplasmic, non-perinuclear desmin microaggregates.

The intensity of the immunohistochemical reaction against desmin was calculated based on the semi-quantitative immunohistochemical study of desmin protein expression within the cardiomyocytes (Fig. D).



**Fig. D.** Expression of desmin protein in cardiomyocytes: results of semi-quantitative analysis of immunohistochemical reaction (median, interquartile range, minimal and maximal values)

\* $p < 0.001$  – Stages A, B, C–D HF groups, compared to the control group; \*\* $p < 0.001$  – Stages C–D HF groups, compared to the Stage A HF group; \*\*\* $p < 0.001$  – Stages C–D HF group, compared to the Stage B HF group (Kruskal–Wallis test with pairwise comparison, p value – according to Bonferroni correction).

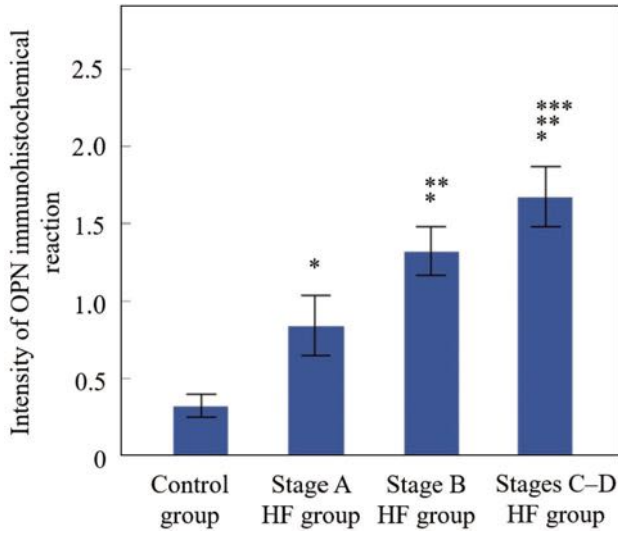
The stage A HF group's desmin immunohistochemical reaction intensity was higher than the control group ( $p < 0.001$ ). The stage A and B HF groups' desmin immunohistochemical reaction intensity was similar ( $p > 0.05$ ). The stages C–D HF group demonstrated the greatest desmin immunohistochemical intensity value when compared to the stage B HF ( $p < 0.001$ ), stage B HF ( $p < 0.001$ ), and the control groups ( $p < 0.001$ ).

When the correlation analysis between the desmin immunohistochemical reaction intensity and the cardiomyocytic histomorphometric parameters was performed, a strong positive correlation was documented between the desmin immunohistochemical reaction intensity and the cardiomyocytic length ( $r_s = 0.698$ ;  $p < 0.001$ ). A similar strong positive correlation was documented between the desmin immunohistochemical reaction intensity and the diameter of the cardiomyocytes ( $r_s = 0.681$ ;  $p < 0.001$ ). When evaluating the correlation tendencies between the desmin immunohistochemical reaction intensity and the cardiomyocyte's longitudinal plane area, as well as the volume, positive, strong correlations were detected between these parameters ( $r_s = 0.697$ ;  $p < 0.001$  and  $r_s = 0.681$ ;  $p < 0.001$ , respectively).

### **Changes of OPN protein expression in cardiomyocytes**

The results of the immunohistochemical reaction against OPN in the cardiomyocytes were analyzed, and no OPN protein expression within the cardiomyocytes was documented in more than 30% of the control group (see Fig. 3.3.1, p. 53). Meanwhile, low OPN expression within the cardiomyocytes of the control group was present in more than 69% of the cases. Medium OPN expression within the stage A HF group cardiomyocytes was documented – 48% of the cases in this group, while the remaining 52% cases demonstrated low OPN expression within the cardiomyocytes. Notably, high OPN protein expression was described for the first time in 8% of the stage A HF group. Medium OPN protein expression within the cardiomyocytes was the most common in the same group (more than 86% cases of the stage B HF group). Most cases with the high OPN protein expression were observed in cardiomyocytes of the stages C–D HF group, with more than 46% cases of this group, and medium OPN protein expression was documented in more than 41% cases of this group.

When the OPN immunohistochemical reaction intensity was calculated based on the semi-quantitative analysis of the immunohistochemical reactions against OPN in the cardiomyocytes, a greater OPN immunohistochemical reaction intensity of the stage A HF group was observed, compared to the control group ( $p < 0.001$ ) (Fig. E).



**Fig. E.** Expression of OPN protein in cardiomyocytes: results of semi-quantitative analysis of immunohistochemical reaction (mean, standard error)

\* $p < 0.001$  – Stages A, B, C–D HF groups, compared to the control group; \*\* $p < 0.001$  – Stages B or C–D HF groups, compared to the Stage A HF group; \*\*\* $p < 0.001$  – Stages C–D HF group, compared to the Stage B HF group (ANOVA with pairwise comparison according to Bonferroni criterion).

This parameter characterizing OPN protein expression of the stage B HF cardiomyocytes continued to increase compared to the stage A HF group ( $p < 0.001$ ) and the control group ( $p < 0.001$ ). The greatest value of the stages C–D HF group OPN immunohistochemical reaction intensity was determined, when comparing to the stage B HF ( $p < 0.001$ ), stage A HF ( $p < 0.001$ ), and the control group ( $p < 0.001$ ).

The correlation analysis between the OPN immunohistochemical reaction intensity and the histomorphometric parameters of the cardiomyocytes revealed a positive, strong correlation between the OPN immunohistochemical reaction intensity and the mean length of the cardiomyocytes ( $r_p = 0.638$ ;  $p < 0.001$ ). Furthermore, a positive, strong correlation was also documented between the OPN immunohistochemical reaction intensity and the cardiomyocytic diameter ( $r_p = 0.604$ ;  $p < 0.001$ ). When correlations between the OPN immunohistochemical reaction intensity and the longitudinal plane as well as the volume of the cardiomyocyte were analyzed, a strong, positive correlation was determined between the OPN immunohistochemical reaction intensity and the cellular longitudinal plane area ( $r_p = 0.599$ ;  $p < 0.001$ ), and

a moderate, strong correlation – between the OPN immunohistochemical reaction intensity and the cardiomyocytic volume ( $r_p = 0.524$ ;  $p < 0.001$ ).

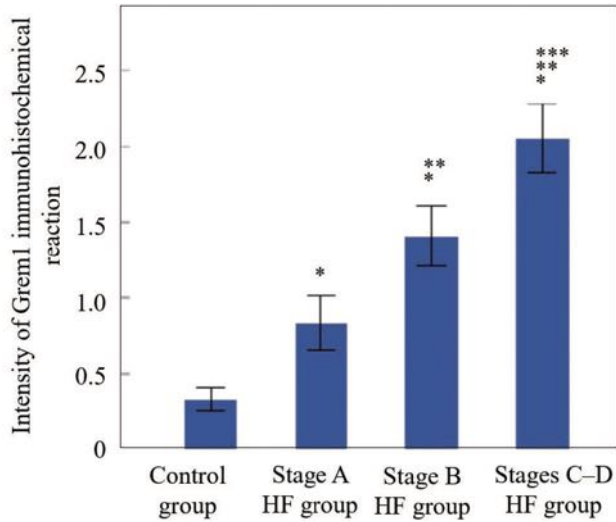
A weak, statistically insignificant correlation was documented between the intensity of OPN and desmin immunohistochemical reactions in progressive ischemic HF ( $r_s = 0.074$ ;  $p > 0.05$ ).

### **Shifts of Grem1 expression in cardiomyocytes**

Grem1 protein expression within the cardiomyocytes analyzed by adopting the immunohistochemical study method and a modified categorization system for the immunohistochemical reaction revealed that no Grem1 protein expression was documented in 47% cases of the control group, and 52% cases of this group had low Grem1 protein expression within the cardiomyocytes (see Fig. 3.4.1, p. 57). Medium Grem1 protein expression was described for the first time within the cardiomyocytes of the stage A HF group, where medium Grem1 protein expression was detected in 28% of the cases, and low Grem1 protein expression was detected in 72% of the cases. High Grem1 protein expression was documented in more than 8% of the stage B HF group. Medium Grem1 protein expression within the cardiomyocytes was predominant in this group (86% of the stage B HF group cases). High Grem1 protein expression was most common in cardiomyocytes of the stages C–D HF group, where it was observed in more than 64% of the cases in this group, while medium Grem1 protein expression was observed in the remaining 32% cases. Low Grem1 protein expression was detected in 3% of cardiomyocytes in the stages C–D HF group.

A semi-quantitative analysis of the immunohistochemical reaction against Grem1 within the cardiomyocytes in progressing ischemic HF was performed (Fig. F). An increased calculated Grem1 immunohistochemical reaction intensity of the stage A HF group was detected, compared to the control group ( $p < 0.001$ ). This parameter of the stage B HF group continued to increase when comparing the Grem1 immunohistochemical reaction intensity to the stage A HF ( $p < 0.001$ ) and the control group ( $p < 0.001$ ). The highest value for the stages C–D HF group Grem1 immunohistochemical reaction intensity parameter was detected when compared to stage B HF ( $p < 0.001$ ), stage A HF ( $p < 0.001$ ), and the control group ( $p < 0.001$ ).

A correlation analysis was performed between the Grem1 immunohistochemical reaction intensity and changes in cardiomyocyte histomorphometric parameters changes in progressing ischemic HF. A significant strong, positive correlation was documented between the Grem1 immunohistochemical reaction intensity and the length of the cardiomyocytes ( $r_p = 0.802$ ;  $p < 0.001$ ).



**Fig. F.** Expression of *Grem1* protein in cardiomyocytes: results of semi-quantitative analysis of immunohistochemical reaction (mean, standard error)

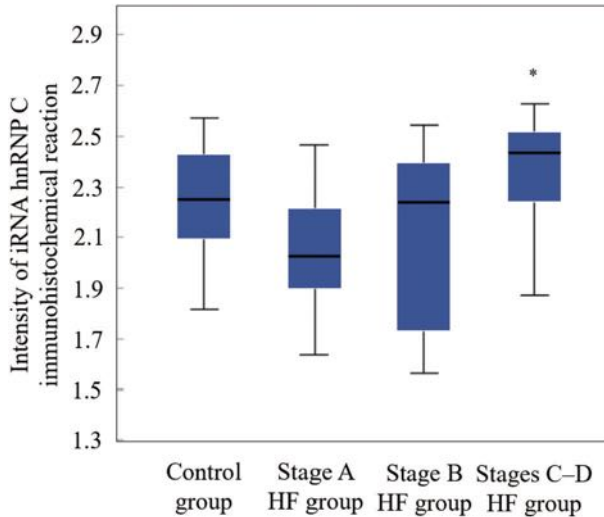
\* $p < 0.001$  – Stages A, B, C–D HF groups, compared to the control group; \*\* $p < 0.001$  – Stages B or C–D HF groups, compared to the Stage A HF group; \*\*\* $p < 0.001$  – Stages C–D HF group, compared to the Stage B HF group (ANOVA with pairwise comparison according to Bonferroni criterion).

Furthermore, a similar trend was observed in the correlation analysis between the *Grem1* immunohistochemical reaction intensity and parameters such as cellular diameter, longitudinal plane area, and volume in the context of progressing ischemic HF. A strong, positive correlation was detected between the *Grem1* immunohistochemical reaction intensity and the cardiomyocyte's diameter ( $r_p = 0.770$ ;  $p < 0.001$ ), longitudinal plane area ( $r_p = 0.778$ ;  $p < 0.001$ ), and volume ( $r_p = 0.701$ ;  $p < 0.001$ ) in the different stages of ischemic HF.

Additionally, a strong, positive correlation was detected between *Grem1* and desmin immunohistochemical reaction intensity parameters ( $r_s = 0.708$ ;  $p < 0.001$ ). Similar correlation trends were determined between *Grem1* and OPN immunohistochemical reaction intensity parameters, where a strong, positive correlation was detected ( $r_p = 0.731$ ;  $p < 0.001$ ).

## Expression of iRNA hnRNP C in cardiomyocytes

When comparing the intensity of iRNA hnRNP C immunohistochemical reaction in cardiomyocyte nuclei between the stage A and B HF groups (see Fig. 3.5.1, p. 61), no significant differences in iRNA hnRNP C immunohistochemical reaction intensities were observed ( $p > 0.05$ ) (Fig. G).



**Fig. G.** Expression of iRNA hnRNP C protein in cardiomyocytes: results of semi-quantitative analysis of immunohistochemical reaction (median, interquartile range, minimal and maximal values)

\* $p < 0.001$  – Stages C–D HF groups, compared to the Stage A HF group (Kruskal–Wallis test with pairwise comparison,  $p$  value – according to Bonferroni correction).

However, the intensity of iRNA hnRNP C immunohistochemical reaction of the stages C–D HF group was greater compared to the stage A HF group ( $p < 0.001$ ). No significant differences in the intensity of the iRNA hnRNP C immunohistochemical reaction were observed when comparing the changes in protein expression between the stages C–D and B HF groups, as well as between the stages C–D HF and the control groups ( $p > 0.05$ ).

Correlations between the iRNA hnRNP C immunohistochemical reaction intensity and the changes of the cardiomyocytic histomorphometric parameters were analyzed. A weak, positive correlation was detected between the iRNA hnRNP C immunohistochemical reaction intensity and the length of the cardiomyocytes ( $r_s = 0.218$ ;  $p < 0.05$ ). Similar correlation trends were documented when evaluating the correlations between iRNA hnRNP C immunohistochemical reaction intensity and cardiomyocyte diameter ( $r_s = 0.248$ ;

$p < 0.05$ ), longitudinal plane area ( $r_s = 0.235$ ;  $p < 0.05$ ), and volume ( $r_s = 0.248$ ;  $p < 0.05$ ).

When the correlation between iRNR hnRNP C and desmin immunohistochemical reaction intensity changes during cardiomyocyte remodeling was analyzed, no significant correlation between these two parameters was detected ( $p > 0.05$ ). A weak, positive correlation was determined between iRNA hnRNP C and OPN proteins expression in the cardiomyocytes in progressing ischemic HF ( $r_s = 0.228$ ;  $p < 0.05$ ). Similar trends of weak positive correlation were also documented between the iRNA hnRNP C and Grem1 immunohistochemical reaction intensities in the cardiomyocytes ( $r_s = 0.274$ ;  $p < 0.05$ ).

## CONCLUSIONS

1. The morphometric parameters of the cardiomyocytes of the stage A HF group (length, diameter, longitudinal plane area, and volume) increase, compared to the corresponding parameters of the control group ( $p < 0.001$ ). These parameters of the stage B HF group continue to increase, compared to the stage A HF ( $p < 0.001$ ), and the control groups ( $p < 0.001$ ), with the greatest values of the parameters of the stage C–D HF group, compared to the stage B ( $p < 0.001$ ), A HF ( $p < 0.001$ ), and the control groups ( $p < 0.001$ ).
- 2.1. The expression of intermediate filament desmin protein in cardiomyocytes of the stage A HF group increases, compared to the control group ( $p < 0.001$ ), whereas the expression of desmin protein is similar in the cardiomyocytes of stages B and A HF groups ( $p > 0.05$ ). The greatest desmin expression is in cardiomyocytes of the stages C–D HF group, compared to the corresponding parameters of stage A ( $p < 0.001$ ), B HF ( $p < 0.001$ ), and control groups ( $p < 0.001$ ).
- 2.2. The expression of OPN protein in the stage A HF group cardiomyocytes is increased compared to the same parameter of the control group ( $p < 0.001$ ), and continues to increase in stage B HF group, compared to stage A HF ( $p < 0.001$ ) and control groups corresponding parameter ( $p < 0.001$ ). The OPN expression of stages C–D HF group cardiomyocytes is the greatest compared to the stage B ( $p < 0.001$ ), A HF ( $p < 0.001$ ), and control groups ( $p < 0.001$ ).

- 2.3. The expression of Grem1 protein in cardiomyocytes of stage A HF group is increased compared to the control group parameter ( $p < 0.001$ ). This protein expression is continuously increasing in cardiomyocytes of stage B HF group, compared to stage A HF ( $p < 0.001$ ) and control groups ( $p < 0.001$ ). The greatest expression of Grem1 protein is in cardiomyocytes of stage C-D HF group compared to stage B ( $p < 0.001$ ), A HF ( $p < 0.001$ ) and control groups ( $p < 0.001$ ).
- 2.4. The iRNA hnRNP C protein expression in cardiomyocytes of stage A HF group remains similar to the control group ( $p > 0.05$ ), whereas the iRNA hnRNP C expression of stages C–D HF cardiomyocytes increases compared to stage A HF group ( $p < 0.001$ ).
3. The changes in the size of cardiomyocytes (volume) correlate positively with the changes in expression of desmin ( $r_s = 0.681$ ;  $p < 0.001$ ), OPN ( $r_p = 0.524$ ;  $p < 0.001$ ), Grem1 ( $r_p = 0.701$ ;  $p < 0.001$ ), and iRNA hnRNP C ( $r_s = 0.248$ ;  $p < 0.05$ ) in cardiomyocytes in progressing ischemic HF.



# LITERATŪRA

1. Shahim B, Kapelios CJ, Savarese G, Lund LH. Global public health burden of heart failure: An updated review. *Card Fail Rev.* 2023;9.
2. Tsao CW, Aday AW, Almarzooq ZI, Anderson CAM, Arora P, Avery CL, et al. Heart disease and stroke Statistics – 2023 update: A report from the American Heart Association. *Circ.* 2023;147(8).
3. Ide T, Kaku H, Matsushima S, Tohyama T, Enzan N, Funakoshi K, et al. Clinical characteristics and outcomes of hospitalized patients with heart failure from the large-scale Japanese registry of acute decompensated heart failure (JROADHF). *Circ J.* 2021;85(9):1438.
4. Seferović PM, Jankowska E, Coats AJS, Maggioni AP, Lopatin Y, Milinković I, et al. The heart failure association atlas: Rationale, objectives, and methods. *Eur. J. Heart Fail.* 2020;22(4):638.
5. Nomura S, Satoh M, Fujita T, Higo T, Sumida T, Ko T, et al. Cardiomyocyte gene programs encoding morphological and functional signatures in cardiac hypertrophy and failure. *Nat Commun.* 2018;9(1).
6. Kologrivova I, Shtatolkina M, Suslova T, Ryabov V. Cells of the immune system in cardiac remodeling: Main players in resolution of inflammation and repair after myocardial infarction. *Front Immunol.* 2021;12.
7. Brasoveanu AM, Mogoanta L, Malaescu GD, Predescu OI, Cotoi BV, Ifrim Chen F. Hypertensive cardiomyopathy – histopathological and immunohistochemical aspects. *Rom J Morphol Embryol.* 2019;60(2):487–494.
8. Szibor M, Pöling J, Warnecke H, Kubin T, Braun T. Remodeling and dedifferentiation of adult cardiomyocytes during disease and regeneration. *Cell Mol Life Sci.* 2013; 71(10):1907.
9. Kalogeropoulos A, Georgiopoulou V, Psaty BM, Rodondi N, Smith AL, Harrison DG, et al. Inflammatory markers and incident heart failure risk in older adults. *JACC.* 2012; 55(19):2129.
10. Scuricini A, Andreozzi F, Sgura C, Ministrini S, Bertolotto M, Ramoni D, et al. Osteopontin levels correlate with severity of diabetic cardiomyopathy in early stage of diabetes. *Diabetes Res Clin Pr.* 2023;203.
11. Singh SR, Kadioglu H, Patel K, Carrier L, Agnetti G. Is desmin propensity to aggregate part of its protective function? *Cells.* 2020;9(2).
12. Heffler J, Shah PP, Robison P, Phyo S, Veliz K, Uchida K, et al. A balance between intermediate filaments and microtubules maintains nuclear architecture in the cardiomyocyte. *Circ Res.* 2020;126(3).
13. Amilca-Seba K, Tan TZ, Thiery J, Louadj L, Thouroude S, Bouygues A, et al. Osteopontin (OPN/SPP1), a mediator of tumor progression, is regulated by the mesenchymal transcription factor slug/SNAI2 in colorectal cancer (CRC). *Cells.* 2022;11(11).
14. Patel M, Rodriguez D, Yousefi K, John-Williams K, Mendez AJ, Goldberg RB, et al. Osteopontin and LDLR are upregulated in hearts of sudden cardiac death victims with heart failure with preserved ejection fraction and diabetes mellitus. *Front Cardiovasc Med.* 2020;7.
15. Li J, Yousefi K, Ding W, Singh J, Shehadeh LA. Osteopontin RNA aptamer can prevent and reverse pressure overload-induced heart failure. *Cardiovasc Res.* 2017;113(6):633.

16. Singh K, Balligand J, Fischer TA, Smith TW, Kelly RA. Glucocorticoids increase osteopontin expression in cardiac myocytes and microvascular endothelial cells. Role in regulation of inducible nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1995;270(47):28471-8.
17. Graf K, Do YS, Ashizawa N, Meehan WP, Giachelli CM, Marboe CC, et al. Myocardial osteopontin expression is associated with left ventricular hypertrophy. *Circ.* 1997; 96(9):3063–3071.
18. Lorenzen JM, Schauerte C, Hubner A, Kolling M, Martino F, Scherf K, et al. Osteopontin is indispensable for AP1-mediated angiotensin II-related miR-21 transcription during cardiac fibrosis. *Eur Heart J.* 2015;36(32).
19. Behnes M, Bertsch T, Weiss C, Ahmad-Nejad P, Akin I, Fastner C, et al. Triple head-to-head comparison of fibrotic biomarkers galectin-3, osteopontin and gremlin-1 for long-term prognosis in suspected and proven acute heart failure patients. *Int J Cardiol.* 2016;203:398–406.
20. Kami D, Shiojima I, Makino H, Matsumoto K, Takahashi Y, Ishii R, et al. Gremlin enhances the determined path to cardiomyogenesis. *PLoS ONE.* 2008;3(6).
21. Koli K, Sutinen E, Rönty M, Rantakari P, Fortino V, Pulkkinen V, et al. Gremlin-1 overexpression in mouse lung reduces silica-induced lymphocyte recruitment – A link to idiopathic pulmonary fibrosis through negative correlation with CXCL10 chemokine. *PLoS ONE.* 2016;11(7).
22. Cahill E, Costello CM, Rowan SC, Harkin S, Howell K, Leonard MO, et al. Gremlin plays a key role in the pathogenesis of pulmonary hypertension. *Circ* 2012;125(7):920-30.
23. Qin Y, Li L, Luo E, Hou J, Yan G, Wang D, et al. Role of m6A RNA methylation in cardiovascular disease (review). *Int J Mol Med.* 2020;46(6):1958.
24. Geuens T, Bouhy D, Timmerman V. The hnRNP family: Insights into their role in health and disease. *Hum Genet.* 2016;135(8):851.
25. Irion CI, Dunkley JC, John-Williams K, Condor Capcha JM, Shehadeh SA, Pinto A, et al. Nuclear osteopontin is a marker of advanced heart failure and cardiac allograft vasculopathy: Evidence from transplant and retransplant hearts. *Front Physiol.* 2020;11.
26. Pawlak A, Gil RJ, Kulawik T, Pronicki M, Karkucińska-Więckowska A, Szymańska-Dębińska T, et al. Type of desmin expression in cardiomyocytes – a good marker of heart failure development in idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Intern Med.* 2012; 272(3):287.
27. Coculescu B, Manole G, Dincă GV, Coculescu EC, Berceanu C, Stocheci CM. Osteopontin – a biomarker of disease, but also of stage stratification of the functional myocardial contractile deficit by chronic ischaemic heart disease. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2019;34(1):783.
28. Cheong K, Leu H, Wu C, Yin W, Wang J, Lin T, et al. The clinical significance of osteopontin on the cardiovascular outcomes in patients with stable coronary artery disease. *JFMA.* 2023;122(4):328.
29. Schipper MEI, Scheenstra MR, Van Kuik J, Van Wichen DF, Van Der Weide P, Dullens HFJ, et al. Osteopontin: A potential biomarker for heart failure and reverse remodeling after left ventricular assist device support. *JHLT.* 2011;30(7):805.
30. Mueller KAL, Tavlaki E, Schneider M, Jorbenadze R, Geisler T, Kandolf R, et al. Gremlin-1 identifies fibrosis and predicts adverse outcome in patients with heart failure undergoing endomyocardial biopsy. *J. Card. Fail.* 2013;19(10):678.
31. Mewton N, Croisille P, Revel D, Weber O, Higgins CB, Saeed M. Left ventricular postmyocardial infarction remodeling studied by combining MR-tagging with delayed MR contrast enhancement. *Invest Radiol.* 2008;43(4):219–228.

32. Gerdes AM. How to improve the overall quality of cardiac morphometric data. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015;309(1):H9–H14.
33. Stawowy P, Blaschke F, Pfautsch P, Goetze S, Lippek F, Wollert-Wulf B, et al. Increased myocardial expression of osteopontin in patients with advanced heart failure. *Eur. J. Heart Fail*. 2002;4(2):139.
34. Müller II, Schneider M, Müller KAL, Lunov O, Borst O, Simmet T, et al. Protective role of Gremlin-1 in myocardial function. *Eur J Clin Invest*. 2021;51(7).
35. Heusch G. Myocardial ischemia: Lack of coronary blood flow or myocardial oxygen supply/demand imbalance? *Circ Res*. 2016;119(2):194–196.
36. Kirvalidze I, Jorbenadze T, Khetsuriani R. Etiopathogenesis of cardiomyopathies: A review. *Georgian Med News*. 2009;174:104–108.
37. Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al. Heart disease and stroke statistics-2020 update: A report from the American Heart Association. *Circ*. 2020;141(9):e139–e596.
38. Dong Y, Chen H, Gao J, Liu Y, Li J, Wang J. Molecular machinery and interplay of apoptosis and autophagy in coronary heart disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2019;136:27–41.
39. Swanson KV, Deng M, Ting JP. The NLRP3 inflammasome: Molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol*. 2019;19(8):477–489.
40. Subramanian N, Natarajan K, Clatworthy MR, Wang Z, Germain RN. The adaptor MAVS promotes NLRP3 mitochondrial localization and inflammasome activation. *Cell*. 2013;153(2):348–361.
41. D'Autreaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: Mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(10):813–824.
42. Peoples JN, Saraf A, Ghazal N, Pham TT, Kwong JQ. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease. *Exp Mol Med*. 2019;51(12):1–13.
43. Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, et al. ROS and ROS-mediated cellular signaling. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:4350965.
44. Scherz-Shouval R, Elazar Z. Regulation of autophagy by ROS: Physiology and pathology. *Trends Biochem Sci*. 2011;36(1):30–38.
45. Cadenas S. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*. 2018;1859(9):940–950.
46. Ismahil MA, Hamid T, Bansal SS, Patel B, Kingery JR, Prabhu SD. Remodeling of the mononuclear phagocyte network underlies chronic inflammation and disease progression in heart failure: Critical importance of the cardiosplenic axis. *Circ Res*. 2014;114(2):266–282.
47. Sager HB, Hulsmans M, Lavine KJ, Moreira MB, Heidt T, Courties G, et al. Proliferation and recruitment contribute to myocardial macrophage expansion in chronic heart failure. *Circ Res*. 2016;119(7):853–864.
48. Wijnker PJM, Sequeira V, Kuster DWD, van der Velden J. Hypertrophic cardiomyopathy: A vicious cycle triggered by sarcomere mutations and secondary disease hits. *Antioxid Redox Signal*. 2019;31(4):318–358.
49. Bozkurt B, Coats AJS, Tsutsui H, Abdelhamid CM, Adamopoulos S, Albert N, et al. Universal definition and classification of heart failure: A report of the Heart Failure Society of America, Heart Failure Association of the European Society of Cardiology, Japanese Heart Failure Society and writing committee of the universal definition of heart failure: Endorsed by the Canadian Heart Failure Society, Heart Failure Association of India, Cardiac Society of Australia and New Zealand, and Chinese Heart Failure Association. *Eur J Heart Fail*. 2021;23(3):352–380.

50. Khan MS, Shahid I, Fonarow GC, Greene SJ. Classifying heart failure based on ejection fraction: Imperfect but enduring. *Eur J Heart Fail.* 2022;24(7):1154–1157.
51. Lund LH, Pitt B, Metra M. Left ventricular ejection fraction as the primary heart failure phenotyping parameter. *Eur J Heart Fail.* 2022;24(7):1158–1161.
52. Savarese G, Stolfo D, Sinagra G, Lund LH. Heart failure with mid-range or mildly reduced ejection fraction. *Nat Rev Cardiol.* 2022;19(2):100–116.
53. Heidenreich PA, Bozkurt B, Aguilar D, Allen LA, Byun JJ, Colvin MM, et al. 2022 AHA / ACC / HFSA guideline for the management of heart failure: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on clinical practice guidelines. *Circ.* 2022;145(18).
54. Zimmerman A, da Silveira AD, Solomon SD, Rohde LE. NYHA classification for decision-making in heart failure: Time to reassess? *Eur J Heart Fail.* 2023;25(7):929–932.
55. Savarese G, Vedin O, D'Amario D, Uijl A, Dahlström U, Rosano G, et al. Prevalence and prognostic implications of longitudinal ejection fraction change in heart failure. *JACC Heart Fail.* 2019;7(4):306–317.
56. Conrad N, Judge A, Tran J, Mohseni H, Hedgecote D, Perez Crespillo A, et al. Temporal trends and patterns in heart failure incidence: A population-based study of 4 million individuals. *Lancet.* 2018;391(10120):572–580.
57. Virani SS, Alonso A, Aparicio HJ, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, et al. Heart disease and stroke statistics-2021 update: A report from the American Heart Association. *Circ.* 2021;143(8):e254–e743.
58. Brouwers FP, de Boer RA, van der Harst P, Voors AA, Gansevoort RT, Bakker SJ, et al. Incidence and epidemiology of new onset heart failure with preserved vs. reduced ejection fraction in a community-based cohort: 11-year follow-up of PREVEND. *Eur Heart J.* 2013;34(19):1424–1431.
59. Vedin O, Lam CSP, Koh AS, Benson L, Teng THK, Tay WT, et al. Significance of ischemic heart disease in patients with heart failure and preserved, midrange, and reduced ejection fraction: A nationwide cohort study. *Circ Heart Fail.* 2017;10(6):e003875.
60. Dokainish H, Teo K, Zhu J, Roy A, Al Habib KF, El Sayed A, et al. Heart failure in Africa, Asia, the Middle East and South America: The INTER-CHF study. *Int J Cardiol.* 2016;204:133–141.
61. Salah HM, Minhas AMK, Khan MS, Pandey A, Michos ED, Metz RJ, et al. Causes of hospitalization in the USA between 2005 and 2018. *Eur Heart J Open.* 2021;1(1):oeab001.
62. Azad N, Lemay G. Management of chronic heart failure in the older population. *J Geriatr Cardiol.* 2014;11(4):329–337.
63. Chioncel O, Lainscak M, Seferovic PM, Anker SD, Crespo-Leiro MG, Harjolla V-P, et al. Epidemiology and one-year outcomes in patients with chronic heart failure and preserved, mid-range and reduced ejection fraction: An analysis of the ESC heart failure long-term registry. *Eur J Heart Fail.* 2017;19(12):1574–1585.
64. Crespo-Leiro MG, Anker SD, Maggioni AP, Coats AJ, Filippatos G, Ruschitzka F, et al. European Society of Cardiology Heart Failure Long-Term registry (ESC-HF-LT): 1-year follow-up outcomes and differences across regions. *Eur J Heart Fail.* 2016;18(6):613–625.
65. Jones NR, Roalfe AK, Adoki I, Hobbs FDR, Taylor CJ. Survival of patients with chronic heart failure in the community: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Heart Fail.* 2019;21(11):1306–1325.

66. Henkel DM, Redfield MM, Weston SA, Gerber Y, Roger VL. Death in heart failure: A community perspective. *Circ Heart Fail.* 2008;1(2):91–97.
67. Moliner P, Lupon J, de Antonio M, Domingo M, Santiago-Vacas E, Zamora E, et al. Trends in modes of death in heart failure over the last two decades: Less sudden death but cancer deaths on the rise. *Eur J Heart Fail.* 2019;21(10):1259–1266.
68. Conrad N, Judge A, Canoy D, Tran J, Pinho-Gomes AC, Millett ERC, et al. Temporal trends and patterns in mortality after incident heart failure: A longitudinal analysis of 86 000 individuals. *JAMA Cardiol.* 2019;4(11):1102–1111.
69. Frantz S, Hundertmark MJ, Schulz-Menger J, Bengel FM, Bauersachs J. Left ventricular remodelling post-myocardial infarction: Pathophysiology, imaging, and novel therapies. *Eur Heart J.* 2022;43(27):2549–2561.
70. Bolognese L, Neskovic AN, Parodi G, Cerisan G, Buonamici P, Santoro GM, et al. Left ventricular remodeling after primary coronary angioplasty: Patterns of left ventricular dilation and long-term prognostic implications. *Circ.* 2002;106(18):2351–2357.
71. Fraccarollo D, Neuser J, Moller J, Riehle C, Galuppo P, Bauersachs J. Expansion of CD10(neg) neutrophils and CD14(+)HLA-DR(neg/low) monocytes driving proinflammatory responses in patients with acute myocardial infarction. *Elife.* 2021;10:e66808.
72. Fraccarollo D, Thomas S, Scholz C, Hilfiker-Kleiner D, Galuppo P, Bauersachs J. Macrophage mineralocorticoid receptor is a pleiotropic modulator of myocardial infarct healing. *Hypertension.* 2019;73(1):102–111.
73. Swirski FK, Nahrendorf M. Cardioimmunology: The immune system in cardiac homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(12):733–744.
74. Adamo L, Rocha-Resende C, Prabhu SD, Mann DL. Reappraising the role of inflammation in heart failure. *Nat Rev Cardiol.* 2020;17(5):269–285.
75. Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijevic D, Sundier SY, Robb EL, et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature.* 2014;515(7527):431–435.
76. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodeling. *Cardiovasc Res.* 2009;81(3):449–456.
77. Heusch G, Libby P, Gersh B, Yellon D, Böhm M, Lopaschuk G, et al. Cardiovascular remodeling in coronary artery disease and heart failure. *Lancet.* 2014;383(9932):1933–1943.
78. Irsvag V, Kemi OJ, Arbo I, Loennechen JP, Wisløf U, Langaas M, et al. Pathological and physiological hypertrophies are regulated by distinct gene programs. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2009;16(6):690–697.
79. Kehat I, Molkentin JD. Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. *Circ.* 2010;122(25):2727–2735.
80. Maillet M, van Berlo JH, Molkentin JD. Molecular basis of physiological heart growth: Fundamental concepts and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(1):38–48.
81. Ovchinnikova E, Hoes M, Ustyantsev K, Bomer N, de Jong TV, van der Mei H, et al. Modeling human cardiac hypertrophy in stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cell Reports.* 2018;10(3):794–807.
82. Lim H, Fallavollita JA, Hard R, Kerr CW, Carty JM. Profound apoptosis-mediated regional myocyte loss and compensatory hypertrophy in pigs with hibernating myocardium. *Circ.* 1999;100(23):2380–2386.
83. Weil BR, Techiryan G, Suzuki G, Konecny F, Carty JM. Adaptive reductions in left ventricular diastolic compliance protect the heart from stretch-induced stunning. *JACC Basic Transl Sci.* 2019;4(4):527–541.

84. Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther.* 2010;128(1):191–227.
85. Cao DJ, Gillette TG, Hill JA. Cardiomyocyte autophagy: Remodeling, repairing, and reconstructing the heart. *Curr Hypertens Rep.* 2009;11(6):406–411.
86. Haider AW, Larson MG, Benjamin EJ, Levy D. Increased left ventricular mass and hypertrophy are associated with increased risk for sudden death. *J Am Coll Cardiol.* 1998;32(5):1454–1459.
87. Huston JH, Shah SJ. Understanding the pathobiology of pulmonary hypertension due to left heart disease. *Circ Res.* 2022;130(9):1382–1403.
88. Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(8):589–600.
89. Dorn GW II. The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy. *Hypertens.* 2007;49(5):962–970.
90. Mühlfeld C, Rajces A, Manninger M, Alogna A, Wierich MC, Scherr D, et al. A transmural gradient of myocardial remodeling in early-stage heart failure with preserved ejection fraction in the pig. *J Anat.* 2020;236(3):531–539.
91. Vigliano CA, Cabeza Meckert PM, Diez M, Favalaro LE, Cortez C, Fazzi L, et al. Cardiomyocyte hypertrophy, oncosis, and autophagic vacuolization predict mortality in idiopathic dilated cardiomyopathy with advanced heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2011;57(14):1523–1531.
92. Bueno OF, Molkentin JD. Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death. *Circ Res.* 2002;91(9):776–781.
93. Babu GJ, Lalli MJ, Sussman MA, Sadoshima J, Periasamy M. Phosphorylation of elk-1 by MEK/ERK pathway is necessary for c-fos gene activation during cardiac myocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32(8):1447–1457.
94. Rosca MG, Tandler B, Hoppel CL. Mitochondria in cardiac hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2013;55:31–41.
95. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;301(6):2181.
96. Tamura T, Onodera T, Said S, Gerdes AM. Correlation of myocyte lengthening to chamber dilation in the spontaneously hypertensive heart failure (SHHF) rat. *J Mol Cell Cardiol.* 1998;30(11):2175–2181.
97. Janczewski AM, Kadokami T, Lemster B, Frye CS, McTiernan CF, Feldman AM. Morphological and functional changes in cardiac myocytes isolated from mice over-expressing TNF-alpha. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;284(3):960.
98. Del Buono MG, Moroni F, Montone RA, Azzalini L, Sanna T, Abbate A. Ischemic cardiomyopathy and heart failure after acute myocardial infarction. *Curr Cardiol Rep.* 2022;24(10):1505.
99. Henning RH, Brundel BJM. Proteostasis in cardiac health and disease. *Nat Rev Cardiol.* 2017;14(11):637–653.
100. Toivola DM, Strnad P, Habtezion A, Omary MB. Intermediate filaments take the heat as stress proteins. *Trends Cell Biol.* 2010;20(2):79–91.
101. Tsikitis M, Galata Z, Mavroidis M, Psarras S, Capetanaki Y. Intermediate filaments in cardiomyopathy. *Biophys Rev.* 2018;10(4):1007.
102. Liu H, Jing Y, Wang J, Yang Y, Wang Y, Li H, et al. Expression patterns of intermediate filament proteins desmin and lamin A in the developing conduction system of early human embryonic hearts. *J Anat.* 2019;236(3):540.

103. Bar H, Strelkov SV, Sjoberg G, Aebi U, Herrmann H. The biology of desmin filaments: How do mutations affect their structure, assembly, and organisation? *J Struct Biol.* 2004;148(2):137–152.
104. Capetanaki Y, Papatheanasiou S, Diokmetzidou A, Vatsellas G, Tsikitis M. Desmin related disease: A matter of cell survival failure. *Curr Opin Cell Biol.* 2015;32:113–120.
105. Fuchs C, Gawlas S, Heher P, Nikouli S, Paar H, Ivankovic M, et al. Desmin enters the nucleus of cardiac stem cells and modulates Nkx2.5 expression by participating in transcription factor complexes that interact with the nkx2.5 gene. *Biol Open.* 2016;5(2):140–153.
106. Diermeier S, Iberl J, Vetter K, Haug M, Pollmann C, Resichl B, et al. Early signs of architectural and biomechanical failure in isolated myofibers and immortalized myoblasts from desmin-mutant knock-in mice. *Sci Rep.* 2017;7(1):1391–x.
107. Paulin D, Li Z. Desmin: A major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Exp Cell Res.* 2004;301(1):1–7.
108. Agnetti G, Herrmann H, Cohen S. New roles for desmin in the maintenance of muscle homeostasis. *FEBS J.* 2022;289(10):2755–2770.
109. Hnia K, Ramspacher C, Vermot J, Laporte J. Desmin in muscle and associated diseases: Beyond the structural function. *Cell Tissue Res.* 2015;360(3):591–608.
110. Bär H, Goudeau B, Wälde S, Casteras-Simon M, Mücke N, Shatunov A, et al. Conspicuous involvement of desmin tail mutations in diverse cardiac and skeletal myopathies. *Hum Mutat.* 2007;28(4):374–386.
111. Bär H, Schopferer M, Sharma S, Hochstein B, Mücke N, Herrmann H, et al. Mutations in desmin's carboxy-terminal "tail" domain severely modify filament and network mechanics. *J Mol Biol.* 2010;397(5):1188–1198.
112. Agnetti G, Halperin VL, Kirk JA, Chakir K, Guo Y, Lund L, et al. Desmin modifications associate with amyloid-like oligomers deposition in heart failure. *Cardiovasc Res.* 2014;102(1):24–34.
113. Aweida D, Rudesky I, Volodin A, Shimko E, Cohen S. GSK3-beta promotes calpain-1-mediated desmin filament depolymerization and myofibril loss in atrophy. *J Cell Biol.* 2018;217(10):3698–3714.
114. Rainer PP, Dong P, Sorge M, Fert-Bober J, Holewinski RJ, Wang Y, et al. Desmin phosphorylation triggers preamyloid oligomers formation and myocyte dysfunction in acquired heart failure. *Circ Res.* 2018;122(10):e75–e83.
115. Kedia N, Arhzaouy K, Pittman SK, Sun Y, Batchelor M, Wehl CC, et al. Desmin forms toxic, seeding-competent amyloid aggregates that persist in muscle fibers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019;116(34):16835–16840.
116. Sanbe A, Osinska H, Saffitz JE, Glabe CG, Kaye R, Maloyan A, et al. Desmin-related cardiomyopathy in transgenic mice: A cardiac amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101(27):10132–10136.
117. Winter L, Unger A, Berwanger C, Spörrer M, Türk M, Chevessier F, et al. Imbalances in protein homeostasis caused by mutant desmin. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2019;45(5):476–494.
118. Willis MS, Patterson C. Proteotoxicity and cardiac dysfunction-Alzheimer's disease of the heart? *N Engl J Med.* 2013;368(5):455–464.
119. Capetanaki Y, Bloch RJ, Kouloumenta A, Mavroidis M, Psarras S. Muscle intermediate filaments and their links to membranes and membranous organelles. *Exp Cell Res.* 2007;313(10):2063–2076.

120. Maloyan A, Sanbe A, Osinska H, Westfall M, Robinson D, Imahashi K, et al. Mitochondrial dysfunction and apoptosis underlie the pathogenic process in alpha-B-crystallin desmin-related cardiomyopathy. *Circulation*. 2005;112(22):3451–3461.
121. Hnia K, Tronchere H, Tomczak KK, Amosii L, Schultz P, Beggs AH, et al. Myotubularin controls desmin intermediate filament architecture and mitochondrial dynamics in human and mouse skeletal muscle. *J Clin Invest*. 2011;121(1):70–85.
122. Capetanaki Y. Desmin cytoskeleton: A potential regulator of muscle mitochondrial behaviour and function. *Trends Cardiovasc Med*. 2002;12(8):339–348.
123. Diokmetzidou A, Soumaka E, Kloukina I, Tsikitis M, Makridakis M, Varela A, et al. Desmin and  $\alpha$ B-crystallin interplay in the maintenance of mitochondrial homeostasis and cardiomyocyte survival. *J Cell Sci*. 2016;129(20):3705.
124. Shahraz S, Pittas AG, Saadati M, Thomas CP, Lundquist CM, Kent DM. Change in testing, awareness of hemoglobin A1c result, and glycemic control in US adults, 2007–2014. *JAMA*. 2017;318(18):1825–1827.
125. Poon E, Howman EV, Newey SE, Davies KE. Association of syncollin and desmin: Linking intermediate filament proteins to the dystrophin-associated protein complex. *J Biol Chem*. 2002;277(5):3433–3439.
126. Granger BL, Lazarides E. Synemin: A new high molecular weight protein associated with desmin and vimentin filaments in muscle. *Cell*. 1980;22(3):727–738.
127. Cizkova D, Soukup T, Mokry J. Expression of nestin, desmin and vimentin in intact and regenerating muscle spindles of rat hind limb skeletal muscles. *Histochem Cell Biol*. 2009;131(2):197–206.
128. Cartaud A, Jasmin BJ, Changeux JP, Cartaud J. Direct involvement of a lamin-B-related (54 kDa) protein in the association of intermediate filaments with the postsynaptic membrane of the Torpedo marmorata electrocyte. *J Cell Sci*. 1995;108(Pt 1):153–160.
129. Georgatos SD, Blobel G. Lamin B constitutes an intermediate filament attachment site at the nuclear envelope. *J Cell Biol*. 1987;105(1):117–125.
130. Galata Z, Kloukina I, Kostavasili I, Varela A, Davos CH, Makridakis M, et al. Amelioration of desmin network defects by alpha B-crystallin overexpression confers cardioprotection in a mouse model of dilated cardiomyopathy caused by LMNA gene mutation. *J Mol Cell Cardiol*. 2018;125:73–86.
131. Thornell L, Carlsson L, Li Z, Mericskay M, Paulin D. Null mutation in the desmin gene gives rise to a cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29(8):2107–2124.
132. Chen CY, Caporizzo MA, Bedi K, Vite A, Bogush AI, Robison P, et al. Suppression of deetyrosinated microtubules improves cardiomyocyte function in human heart failure. *Nat Med*. 2018;24(8):1225.
133. Neubauer S. The failing heart – an engine out of fuel. *N Engl J Med*. 2007;356(11):1140–1151.
134. Del Monte F, Agnetti G. Protein post-translational modifications and misfolding: New concepts in heart failure. *Proteomics Clin Appl*. 2014;8(7-8):534–542.
135. Singh M, Foster CR, Dalal S, Singh K. Role of osteopontin in heart failure associated with aging. *Heart Fail Rev*. 2010;15(5):487–494.
136. Sørensen ES, Højrup P, Petersen TE. Posttranslational modifications of bovine osteopontin: identification of twenty-eight phosphorylation and three O-glycosylation sites. *Protein Sci*. 1995;4(10):2040–2049.
137. O'Regan A. The role of osteopontin in lung disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003;14(6):479–488.
138. Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, Wesson JA, Johnson R, Hughes J. Osteopontin – a molecule for all seasons. *QJM*. 2002;95(1):3–13.



139. Icer MA, Gezmen-Karadag M. The multiple functions and mechanisms of osteopontin. *Clin Biochem.* 2018;59:17–24.
140. Lee GS, Salazar HF, Joseph G, Lok ZSY, Caroti CM, Weiss D, et al. Osteopontin isoforms differentially promote arteriogenesis in response to ischemia via macrophage accumulation and survival. *Lab Invest.* 2019;99(3):331–345.
141. Matsui Y, Jia N, Okamoto H, Kon S, Onozuka H, Akino M, et al. Role of osteopontin in cardiac fibrosis and remodeling in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Hypertension.* 2004;43(6):1195–1201.
142. Collins AR, Schnee J, Wang W, Kim S, Fishim MC, Bruemmer D, et al. Osteopontin modulates angiotensin II-induced fibrosis in the intact murine heart. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43(9):1698–1705.
143. Singh M, Foster CR, Dalal S, Singh K. Osteopontin: Role in extracellular matrix deposition and myocardial remodeling post-MI. *JMCC.* 2011;48(3):538.
144. Xie Z, Singh M, Singh K. ERK1/2 and JNKs, but not p38 kinase, are involved in reactive oxygen species-mediated induction of osteopontin gene expression by angiotensin II and interleukin-1beta in adult rat cardiac fibroblasts. *J Cell Physiol.* 2004;198(3):399–407.
145. Pollard CM, Desimine VL, Wertz SL, Perez A, Parker BM, Maning J, et al. Deletion of osteopontin enhances beta(2)-adrenergic receptor-dependent anti-fibrotic signalling in cardiomyocytes. *Int J Mol Sci.* 2019;20(6):1396.
146. Jiang P, Zhang D, Qiu H, Yi X, Zhang Y, Cao Y, et al. Tiron ameliorates high glucose-induced cardiac myocyte apoptosis by PKC delta-dependent inhibition of osteopontin. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2017;44(7):760–770.
147. Mamazhakypov A, Sartmyrzaeva M, Sarybaev AS, Schermuly R, Sydykov A. Clinical and molecular implications of osteopontin in heart failure. *CIMB.* 2022;44(8):3573.
148. Mohamed IA, Gadeau A, Fliegel L, Lopaschuk G, Mlih M, Abdulrahman N, et al. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1-induced osteopontin expression facilitates cardiomyocyte hypertrophy. *PLoS ONE.* 2015;10(4).
149. Ndisang JF, Chibbar R, Lane N. Heme oxygenase suppresses markers of heart failure and ameliorates cardiomyopathy in L-NAME-induced hypertension. *Eur J Pharmacol.* 2014;734:23–34.
150. Xie Z, Singh M, Singh K. Osteopontin modulates myocardial hypertrophy in response to chronic pressure overload in mice. *Hypertension.* 2004;44(6):826–831.
151. Sam F, Xie Z, Ooi H, Kerstetter DL, Colucci WS, Singh M, et al. Mice lacking osteopontin exhibit increased left ventricular dilation and reduced fibrosis after aldosterone infusion. *Am J Hypertens.* 2004;17(2):188–193.
152. Subramanian V, Krishnamurthy P, Singh K, Singh M. Lack of osteopontin improves cardiac function in streptozotocin-induced diabetic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292(1):673.
153. Dalal S, Zha Q, Daniels CR, Steagall RJ, Joyner WL, Gadeau AP, et al. Osteopontin stimulates apoptosis in adult cardiac myocytes via the involvement of CD44 receptors, mitochondrial death pathway, and endoplasmic reticulum stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014;306(8):1182.
154. Yousefi K, Irion CI, Takeuchi LM, Ding W, Lambert G, Eisenberg T, et al. Osteopontin promotes left ventricular diastolic dysfunction through a mitochondrial pathway. *J Am Coll Cardiol.* 2019;73(21):2705–2718.
155. Bastos ACSDF, Gomes AVP, Silva GR, Emerenciano M, Ferreira LB, Gimba ERP. The intracellular and secreted sides of osteopontin and their putative physiopathological roles. *IJMS.* 2023;24(3).

156. Cabiati M, Svezia B, Matteucci M, Botta L, Pucci A, Rinaldi M, et al. Myocardial expression analysis of osteopontin and its splice variants in patients affected by end-stage idiopathic or ischemic dilated cardiomyopathy. *PLoS ONE*. 2016;11(8).
157. Tamura A, Shingai M, Aso N, Hazuku T, Nasu M. Osteopontin is released from the heart into the coronary circulation in patients with a previous anterior wall myocardial infarction. *Circ J*. 2003;67(9):742–744.
158. Maniatis K, Siasos G, Oikonomou E, Vavuranakis M, Zaromytidou M, Mourouzis K, et al. Osteoprotegerin and osteopontin serum levels are associated with vascular function and inflammation in coronary artery disease patients. *Curr Vasc Pharmacol*. 2020;18(5):523–530.
159. Georgiadou P, Iliodromitis EK, Kolokathis F, Varounis C, Gizas V, Mavroidis M, et al. Osteopontin as a novel prognostic marker in stable ischaemic heart disease: A 3-year follow-up study. *Eur J Clin Invest*. 2010;40(4):288–293.
160. Abdalrhim AD, Marroush TS, Austin EE, Gersh BJ, Solak N, Rizvi SA, Bailey KR, et al. Plasma osteopontin levels and adverse cardiovascular outcomes in the PEACE trial. *PLoS One*. 2016;11(6):e0156965.
161. Suezawa C, Kusachi S, Murakami T, Toeda K, Hirohata S, Nakamura K, et al. Time-dependent changes in plasma osteopontin levels in patients with anterior-wall acute myocardial infarction after successful reperfusion: Correlation with left-ventricular volume and function. *J Lab Clin Med*. 2005;145(1):33–40.
162. Bjerre M, Pedersen SH, Møgelvang R, Lindberg S, Jensen JS, Galatius S, et al. High osteopontin levels predict long-term outcome after STEMI and primary percutaneous coronary intervention. *Eur J Prev Cardiol*. 2013;20(6):922–929.
163. Frangiogiannis NG. The extracellular matrix in ischemic and nonischemic heart failure. *Circ Res*. 2020;125(1):117.
164. Shirakawa K, Endo J, Kataoka M, Katsumata Y, Yoshida N, Yamamoto T, et al. IL (interleukin)-10-STAT3-galectin-3 axis is essential for osteopontin-producing reparative macrophage polarization after myocardial infarction. *Circ*. 2018;138(18):2021–2035.
165. Krishnamurthy P, Peterson JT, Subramanian V, Singh M, Singh K. Inhibition of matrix metalloproteinases improves left ventricular function in mice lacking osteopontin after myocardial infarction. *Mol Cell Biochem*. 2009;322(1-2):53–62.
166. Rosenberg M, Zugck C, Nelles M, Juenger C, Frank D, Remppis A, et al. Osteopontin, a new prognostic biomarker in patients with chronic heart failure. *Circ Heart Fail*. 2008;1(1):43–49.
167. Lopez B, Gonzalez A, Lindner D, Westermann D, Ravassa S, Beaumont J, et al. Osteopontin-mediated myocardial fibrosis in heart failure: A role for lysyl oxidase? *Cardiovasc Res*. 2013;99(1):111–120.
168. Francia P, Adduci C, Semprini L, Borro M, Ricotta A, Sensini I, et al. Osteopontin and galectin-3 predict the risk of ventricular tachycardia and fibrillation in heart failure patients with implantable defibrillators. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2014;25(6):609–616.
169. Brazil DP, Church RH, Surae S, Godson C, Martin F. BMP signalling: Agony and antagonism in the family. *Trends Cell Biol*. 2015;25(5):249–264.
170. Khokha MK, Hsu D, Brunet LJ, Dionne MS, Harland RM. Gremlin is the BMP antagonist required for maintenance of Shh and Fgf signals during limb patterning. *Nat Genet*. 2003;34(3):303–307.

171. Topol LZ, Marx M, Laugier D, Bogdanova NN, Boubnavov NN, Clausen PA, et al. Identification of *drm*, a novel gene whose expression is suppressed in transformed cells and which can inhibit growth of normal but not transformed cells in culture. *Mol Cell Biol*. 1997;17(8):4801–4810.
172. Michos O, Panman L, Vintersten K, Irer K, Zeller R, Zuniga A. Gremlin-mediated BMP antagonism induces the epithelial-mesenchymal feedback signaling controlling metanephric kidney and limb organogenesis. *Development*. 2004;131(14):3401–3410.
173. Worthley DL, Churchill M, Compton JT, Tailor Y, Rao M, Si Y, et al. Gremlin 1 identifies a skeletal stem cell with bone, cartilage, and reticular stromal potential. *Cell*. 2015;160(1-2):269–284.
174. Church RH, Krishnakumar A, Urbanek A, Geschwindner S, Meneely J, Bianchi A, et al. Gremlin1 preferentially binds to bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and BMP-4 over BMP-7. *Biochem J*. 2015;466(1):55–68.
175. Murphy M, Docherty NG, Griffin B, Howlin J, McArdle E, McMahon R, et al. IHG-1 amplifies TGF-beta1 signaling and is increased in renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(9):1672–1680.
176. Rodrigues-Diez R, Rodrigues-Diez RR, Lavoz C, Carvajal G, Droguett A, Garcia-Redondo AB, et al. Gremlin activates the Smad pathway linked to epithelial mesenchymal transdifferentiation in cultured tubular epithelial cells. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:802841.
177. Mitola S, Ravelli C, Moroni E, Salvi V, Leali D, Ballmer-Hofer K, et al. Gremlin is a novel agonist of the major proangiogenic receptor VEGFR2. *Blood*. 2010;116(18): 3677–3680.
178. Ji C, Huang J, Xu Q, Zhang J, Lin MT, Tu Y, et al. Gremlin inhibits UV-induced skin cell damages via activating VEGFR2-Nrf2 signaling. *Oncotarget*. 2016;7(51):84748–84757.
179. Müller I, Schönberger T, Schneider M, Borst O, Ziegler M, Seizer P, et al. Gremlin-1 is an inhibitor of macrophage migration inhibitory factor and attenuates atherosclerotic plaque growth in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(44): 31635.
180. Park S, Sung NJ, Choi B, Kim W, Kim SH, Surh Y. Gremlin-1 augments the oestrogen-related receptor alpha signalling through EGFR activation: Implications for the progression of breast cancer. *Br J Cancer*. 2020;123(6):988–999.
181. Clark KC, Hewett DR, Panagopoulos V, Plakhova N, Opperman KS, Bradley AL, et al. Targeted disruption of bone marrow stromal cell-derived Gremlin1 limits multiple myeloma disease progression in vivo. *Cancers (Basel)*. 2020;12(8):2149. doi: 10.3390/cancers12082149.
182. Müller II, Melville DB, Tanwar V, Rybski WM, Mukherjee A, Shoemaker MB, et al. Functional modeling in zebrafish demonstrates that the atrial-fibrillation-associated gene *GREM2* regulates cardiac laterality, cardiomyocyte differentiation and atrial rhythm. *Dis Model Mech*. 2013;6(2):332–341.
183. Koga K, Kenessey A, Ojamaa K. Macrophage migration inhibitory factor antagonizes pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013;304(2):282.
184. Barbosa-Morais NL, Irimia M, Pan Q, Xiong HY, Gueroussov S, Lee LJ, et al. The evolutionary landscape of alternative splicing in vertebrate species. *Science*. 2012; 338(6114):1587–1593.

185. Traunmuller L, Gomez AM, Nguyen T, Scheiffele P. Control of neuronal synapse specification by a highly dedicated alternative splicing program. *Science*. 2016; 352(6288):982–986.
186. Hinkle ER, Wiedner HJ, Black AJ, Giudice J. RNA processing in skeletal muscle biology and disease. *Transcription*. 2019;10(1):1–20.
187. Nikonova E, Kao S, Spletter ML. Contributions of alternative splicing to muscle type development and function. *Semin Cell Dev Biol*. 2020;104:65–80.
188. Fochi S, Lorenzi P, Galasso M, Stefani C, Trabetti E, Zipeto D, et al. The emerging role of the RBM20 and PTBP1 ribonucleoproteins in heart development and cardiovascular diseases. *Genes*. 2020;11(4).
189. Baralle FE, Giudice J. Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017;18(7):437–451.
190. Licatalosi DD, Darnell RB. RNA processing and its regulation: Global insights into biological networks. *Nat Rev Genet*. 2010;11(1):75–87.
191. Kalsotra A, Cooper TA. Functional consequences of developmentally regulated alternative splicing. *Nat Rev Genet*. 2011;12(10):715–729.
192. Ellis JD, Barrios-Rodiles M, Colak R, Irimia M, Kim T, Calarco JA, et al. Tissue-specific alternative splicing remodels protein-protein interaction networks. *Mol Cell*. 2012;46(6):884–892.
193. Liu T, Chen Y, Jong Y, Tsai HJ, Lee CC, Chang YS, et al. Muscle developmental defects in heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 knockout mice. *Open Biol*. 2017;7(1):160303. doi: 10.1098/rsob.160303.
194. Dreyfuss G, Philipson L, Mattaj IW. Ribonucleoprotein particles in cellular processes. *J Cell Biol*. 1988;106(5):1419–1425.
195. Chaudhury A, Chander P, Howe PH. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) in cellular processes: Focus on hnRNP E1's multifunctional regulatory roles. *RNA*. 2010;16(8):1449.
196. Masuda A, Andersen HS, Doktor TK, Okamoto T, Ito M, Andresen BS, et al. CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3' UTRs and facilitate mRNA decay. *Sci Rep*. 2012; 2:209.
197. Wang L, Yu Q, Chen X, Gong R, Wang J, Ma B, et al. Identification of HnRNP family as prognostic biomarkers in five major types of gastrointestinal cancer. *CGT*. 2022; 22(5):449.
198. Salapa HE, Hutchinson C, Popescu BF, Levin MC. Neuronal RNA-binding protein dysfunction in multiple sclerosis cortex. *Ann Clin Transl Neurol*. 2020;7(7):1214.
199. Ye J, Beetz N, O'Keeffe S, Tapia JC, Macpherson L, Chen WV, et al. hnRNP U protein is required for normal pre-mRNA splicing and postnatal heart development and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(23):E3020-9.
200. Yu Z, Tang PL, Wang J, Bao S, Shieh JT, Leung AW, et al. Mutations in Hnrnpa1 cause congenital heart defects. *JCI Insight*. 2018;3(2):e98555.
201. Beqqali A. Alternative splicing in cardiomyopathy. *Biophys Rev*. 2018;10(4):1061–1071.
202. Blech-Hermoni Y, Ladd AN. RNA binding proteins in the regulation of heart development. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013;45(11):2467–2478.
203. Lale S, Yu S, Ahmed A. Complex congenital heart defects in association with maternal diabetes and partial deletion of the A2BP1 gene. *Fetal Pediatr Pathol*. 2011;30(3):161–166.

204. Li D, Bachinski LL, Roberts R. Genomic organization and isoform-specific tissue expression of human NAPOR (CUGBP2) as a candidate gene for familial arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *Genomics*. 2001;74(3):396–401.
205. Mori AD, Bruneau BG. TBX5 mutations and congenital heart disease: Holt-Oram syndrome revealed. *Curr Opin Cardiol*. 2004;19(3):211–215.
206. Lara-Pezzi E, Gomez-Salinerio J, Gatto A, Garcia-Pavia P. The alternative heart: Impact of alternative splicing in heart disease. *J Cardiovasc Transl Res*. 2013;6(6):945–955.
207. Yang J, Hung L, Licht T, Kostin S, Looso M, Khrameeva E, et al. RBM24 is a major regulator of muscle-specific alternative splicing. *Dev Cell*. 2014;31(1):87–99.
208. Liu J, Beqaj S, Yang Y, Honore B, Schuger L. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-H plays a suppressive role in visceral myogenesis. *Mech Dev*. 2001;104(1-2):79–87.
209. Zheng X, Reho JJ, Wirth B, Fisher SA. TRA2beta controls Mypt1 exon 24 splicing in the developmental maturation of mouse mesenteric artery smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2015;308(4):289.
210. Zhang P, Liang X, Shan T, Jiang Q, Deng C, Zheng R, et al. mTOR is necessary for proper satellite cell activity and skeletal muscle regeneration. *Biochem Biophys Res Commun*. 2024;463(1-2):102–108.
211. Zhang P, Shan T, Liang X, Deng C, Kuang S. Mammalian target of rapamycin is essential for cardiomyocyte survival and heart development in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;452(1):53–59.
212. Mohiddin SA, Ahmed ZM, Griffith AJ, Tripodi D, Friedman TB, Fananapazir L, et al. Novel association of hypertrophic cardiomyopathy, sensorineural deafness, and a mutation in unconventional myosin VI (MYO6). *J Med Genet*. 2004;41(4):309–314.
213. Swanson MS, Nakagawa TY, LeVan K, Dreyfuss G. Primary structure of human nuclear ribonucleoprotein particle C proteins: Conservation of sequence and domain structures in heterogeneous nuclear RNA, mRNA, and pre-rRNA-binding proteins. *Mol Cell Biol*. 1987;7(5):1731–1739.
214. Han SP, Tang YH, Smith R. Functional diversity of the hnRNPs: Past, present and perspectives. *Biochem J*. 2010;430(3):379–392.
215. McCloskey A, Taniguchi I, Shinmyozu K, Ohno M. hnRNP C tetramer measures RNA length to classify RNA polymerase II transcripts for export. *Science*. 2012;335(6076):1643–1646.
216. Borreca A, Gironi K, Amadoro G, Ammassari-Teule M. Opposite dysregulation of fragile-X mental retardation protein and heteronuclear ribonucleoprotein C protein associates with enhanced APP translation in alzheimer disease. *Mol Neurobiol*. 2016;53(5):3227–3234.
217. Fischl H, Neve J, Wang Z, Patel R, Louey A, Tian B, et al. hnRNPC regulates cancer-specific alternative cleavage and polyadenylation profiles. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(14):7580–7591.
218. Panchenko MP, Silva N, Stone JR. Up-regulation of a hydrogen peroxide-responsive pre-mRNA binding protein in atherosclerosis and intimal hyperplasia. *Cardiovasc Pathol*. 2009;18(3):167–172.
219. Gladka MM, Molenaar B, de Ruiter H, van der Elst S, Tsui H, Versteeg D, et al. Single-cell sequencing of the healthy and diseased heart reveals cytoskeleton-associated protein 4 as a new modulator of fibroblasts activation. *Circulation*. 2018;138(2):166–180.

220. Martino F, Varadarajan NM, Perestrelo AR, Hejret V, Durikova H, Vukic D, et al. The mechanical regulation of RNA binding protein hnRNPC in the failing heart. *Sci Transl Med.* 2022;14(672):eabo5715.
221. Cadar AG, Zhong L, Lin A, Valenzuela MO, Lim CC. Upstream open reading frame in 5'-untranslated region reduces titin mRNA translational efficiency. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;453(1):185–191.
222. Lewis YE, Moskovitz A, Mutlak M, Heineke J, Caspi LH, Kehat I. Localization of transcripts, translation, and degradation for spatiotemporal sarcomere maintenance. *J Mol Cell Cardiol.* 2018;116:16–28.
223. Heallen T, Zhang M, Wang J, Bonilla-Claudio M, Klysik E, Johnson RL, et al. Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science.* 2011;332(6028):458–461.
224. Perestrelo AR, Silva AC, Oliver-De La Cruz J, Martino F, Horvath V, Caluori G, et al. Multiscale analysis of extracellular matrix remodeling in the failing heart. *Circ Res.* 2021;128(1):24–38.
225. Nardone G, Oliver-De La Cruz J, Vrbsky J, Martini C, Pribyl J, Skladal P, et al. YAP regulates cell mechanics by controlling focal adhesion assembly. *Nat Commun.* 2017;8:15321.
226. Vrbsky J, Vinarsky V, Perestrelo AR, De La Cruz JO, Martino F, Pompeiano A, et al. Evidence for discrete modes of YAP1 signaling via mRNA splice isoforms in development and diseases. *Genomics.* 2021;113(3):1349–1365.
227. ESC Scientific Document Group. 2022 ESC guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death. *G Ital Cardiol (Rome).* 2023;24(3 Suppl 1):e1–e132.
228. Michaud K, Basso C, d'Amati G, Giordano C, Kholova I, Preston SD, et al. Diagnosis of myocardial infarction at autopsy: AECVP reappraisal in the light of the current clinical classification. *Virchows Arch.* 2020;476(2):179–194.
229. Basso C, Burke M, Fornes P, Gallagher PJ, De Gouveia RH, Sheppard M, et al. Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death. *Virchows Arch.* 2007;452(1):11.
230. Lobo J, See EY, Biggs M, Pandt A. An insight into morphometric descriptors of cell shape that pertain to regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med.* 2016;10(7):539–553.
231. Rastogi V, Puri N, Arora S, Kaur G, Yadav L, Sharma R. Artefacts: A diagnostic dilemma – a review. *J. Clin Diagn Re.* 2013;7(10):2408-2413.
232. Lindskog C, Backman M, Zieba A, Asplund A, Uhlén M, Landegren U, et al. Proximity ligation assay as a tool for antibody validation in human tissues. *J Histochem Cytochem.* 2020;68(7):515.
233. NordiQC: Desmin (DES): antibody information. Available at: <https://www.nordiqc.org/epitope.php?id=42>.
234. Uhlen M, Bandrowski A, Carr S, Edwards A, Ellenberg J, Lundberg E, et al. A proposal for validation of antibodies. *Nat Methods.* 2016;13(10):823-7.
235. Edfors F, Hober A, Linderbäck K, Maddalo G, Azim A, Sivertsson Å, et al. Enhanced validation of antibodies for research application. *Nat Commun.* 2018;9(1).
236. Weller MG. Ten basic rules of antibody validation. *Anal Chem Insights.* 2018;13:1177390118757462.
237. Gothlin Eremo A, Lagergren K, Othman L, Montgomery S, Andersson G, Tina E. Evaluation of SPP1/Osteopontin expression as predictor of recurrence in tamoxifen treated breast cancer. *Sci Rep.* 2020;10(1):1451-w.

238. The Human Protein Atlas. Greml1: antibody data. Available at: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000166923-GREML1/summary/antibody#IHC>.
239. The Human Protein Atlas. hnRNP C: antibody data. Available at: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000092199-HNRNPC/summary/antibody#IHC>.
240. Tracy E, Rowe G, Leblanc AJ. Cardiac tissue remodeling in healthy aging: The road to pathology. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2020;319(1):C166-C182.
241. Kehat I, Molkentin JD. Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. *Circ.* 2024;122(25):2727.
242. Nicol RL, Frey N, Pearson G, Cobb M, Richardson J, Olson EN. Activated MEK5 induces serial assembly of sarcomeres and eccentric cardiac hypertrophy. *EMBO J.* 2001;20(11):2757–2767.
243. Bogaert J, Bosmans H, Maes A, Suetens P, Marchal G, Rademakers FE, et al. Remote myocardial dysfunction after acute anterior myocardial infarction: Impact of left ventricular shape on regional function: A magnetic resonance myocardial tagging study. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35(6):1525–34.
244. Zhang Y, Chan AKY, Yu C, Lam WW, Yip GW, Fung WH, et al. Left ventricular systolic asynchrony after acute myocardial infarction in patients with narrow QRS complexes. *Am Heart J.* 2005;149(3):497–503.
245. Tsuda T. Clinical assessment of ventricular wall stress in understanding compensatory hypertrophic response and maladaptive ventricular remodeling. *J Cardiovasc Dev Dis.* 2021;8(10):122.
246. Cauty MJM. Myocardial injury, troponin release, and cardiomyocyte death in brief ischemia, failure, and ventricular remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2022;323(1):H1–H15.
247. Schwinger RHG. Pathophysiology of heart failure. *Cardiovasc Diagn Ther.* 2021;11(1):263.
248. Tsutsui H, Ishihara K, Cooper G IV. Cytoskeletal role in the contractile dysfunction of hypertrophied myocardium. *Science.* 1993;260(5108):682–687.
249. Tagawa H, Koide M, Sato H, Zile MR, Carabello BA, Cooper G. IV. Cytoskeletal role in the transition from compensated to decompensated hypertrophy during adult canine left ventricular pressure overloading. *Circ Res.* 1998;82(7):751–761.
250. Ishibashi Y, Tsutsui H, Yamamoto S, Takahashi M, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, et al. Role of microtubules in myocyte contractile dysfunction during cardiac hypertrophy in the rat. *Am J Physiol.* 1996;271(5 Pt 2):1978.
251. Milner DJ, Taffet GE, Wang X, Pham T, Tamura T, Hartley C, et al. The absence of desmin leads to cardiomyocyte hypertrophy and cardiac dilation with compromised systolic function. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31(11):2063–2076.
252. Corbett JM, Why HJ, Wheeler CH, Richardson PJ, Archard LC, Yacoub MH, et al. Cardiac protein abnormalities in dilated cardiomyopathy detected by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis.* 1998;19(11):2031–2042.
253. Bouvet M, Dubois-Deruy E, Turkieh A, Mulder P, Peugeot V, Chwastyniak M, et al. Desmin aggregation in rat and human ischemic heart failure through PKC zeta and GSK3 beta as upstream signaling pathways. *Cell Death Discov.* 2021;7(1):153–2.
254. Brodehl A, Gaertner-Rommel A, Milting H. Molecular insights into cardiomyopathies associated with desmin (DES) mutations. *Biophys Rev.* 2018;10(4):983.
255. Goebel HH, Muller HD. Protein aggregate myopathies. *Semin Pediatr Neurol.* 2006;13(2):96–103.
256. Hein S, Kostin S, Heling A, Maeno Y, Schaper J. The role of the cytoskeleton in heart failure. *Cardiovasc Res.* 2000;45(2):273–8.

257. Behnes M, Brueckmann M, Lang S, Espeter F, Weiss C, Neumaier M, et al. Diagnostic and prognostic value of osteopontin in patients with acute congestive heart failure. *European J of Heart Fail.* 2013;15(12):1390.
258. Podzinkova J, Palecek T, Kuchynka P, Marek J, Danek BA, Jachymova M, et al. Plasma osteopontin levels, but not its myocardial expression, reflect heart failure severity in recently diagnosed dilated cardiomyopathy. *Herz.* 2020;45(Suppl 1):105–110.
259. Psarras S, Mavroidis M, Sanoudou D, Davos CH, Xanthou G, Varela AE, et al. Regulation of adverse remodelling by osteopontin in a genetic heart failure model. *European Heart Journal.* 2011;33(15):1954.
260. Beck S, Simmet T, Müller I, Lang F, Gawaz M. Gremlin-1 C-terminus regulates function of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Cell Physiol Biochem.* 2016;38(2):801.
261. Kišonaitė M, Wang X, Hyvönen M. Structure of gremlin-1 and analysis of its interaction with BMP-2. *Biochemical Journal.* 2016;473(11):1593.
262. Stabile H, Mitola S, Moroni E, Belleri M, Nicoli S, Coltrini D, et al. Bone morphogenic protein antagonist Drm/gremlin is a novel proangiogenic factor. *Blood.* 2024;109(5):1834-40.
263. Topol LZ, Bardot B, Zhang Q, Resau J, Huillard E, Marx M, et al. Biosynthesis, post-translation modification, and functional characterization of Drm/gremlin. *J Biol Chem.* 2000;275(12):8785-93.
264. Maciel TT, Melo RS, Schor N, Campos AH. Gremlin promotes vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *JMCC.* 2007;44(2):370.
265. Kaur G, Wang X, Li X, Ong H, He X, Cai C. Overexpression of GREM1 improves the survival capacity of aged cardiac mesenchymal progenitor cells via upregulation of the ERK/NRF2-associated antioxidant signal pathway. *Cells.* 2023;12(8).
266. Rowan SC, Piuzeau L, Cornwell J, Li L, McLoughlin P. Gremlin 1 blocks vascular endothelial growth factor signaling in the pulmonary microvascular endothelium. *Pulm circ.* 2020;10(1):1.
267. Sun Z, Cai S, Liu C, Cui Y, Ji J, Jiang WG, et al. Increased expression of Gremlin1 promotes proliferation and epithelial mesenchymal transition in gastric cancer cells and correlates with poor prognosis of patients with gastric cancer. *CGP.* 2019;17(1):49.
268. Digre A, Lindskog C. The human protein atlas-integrated omics for single cell mapping of the human proteome. *Protein Sci.* 2023;32(2):e4562.
269. Wang H, Albadawi H, Siddiquee Z, Stone JM, Panchenko MP, Watkins MT, et al. Altered vascular activation due to deficiency of the NADPH oxidase component p22phox. *Cardiovasc Pathol.* 2014;23(1):35–42.
270. Stone JR, Collins T. Rapid phosphorylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 in response to physiologic levels of hydrogen peroxide in human endothelial cells. *J Biol Chem.* 2002;277(18):15621–15628.
271. Parks KA, Semigran MJ, Stone JR. Myocardial upregulation of hnRNP-C predicts short term recovery in patients with acute systolic heart failure. *J Card Fail.* 2009;15(6):S41.
272. Willis DE, van Niekerk EA, Sasaki Y, Mesngon M, Merianda TT, Williams GG, et al. Extracellular stimuli specifically regulate localized levels of individual neuronal mRNAs. *J Cell Biol.* 2007;178(6):965–980.
273. Lawrence JB, Singer RH. Intracellular localization of messenger RNAs for cytoskeletal proteins. *Cell.* 1986;45(3):407–415.
274. Rodriguez AJ, Shenoy SM, Singer RH, Condeelis J. Visualization of mRNA translation in living cells. *J Cell Biol.* 2006;175(1):67–76.



275. Angenstein F, Evans AM, Ling S, Settlage RE, Ficarro S, Carrero-Martinez FA, et al. Proteomic characterization of messenger ribonucleoprotein complexes bound to nontranslated or translated poly(A) mRNAs in the rat cerebral cortex. *J Biol Chem.* 2005;280(8):6496–6503.
276. Nandi SS, Mishra PK. Harnessing fetal and adult genetic reprogramming for therapy of heart disease. *J Nat Sci.* 2015;1(4):e71.
277. Dirx E, Da Costa Martins PA, De Windt LJ. Regulation of fetal gene expression in heart failure. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(12):2414.
278. Distefano G, Sciacca P. Molecular pathogenesis of myocardial remodeling and new potential therapeutic targets in chronic heart failure. *Ital J Pediatr.* 2012;38:41–41.
279. Izumo S, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85(2):339–343.
280. Harvey PA, Leinwand LA. The cell biology of disease: Cellular mechanisms of cardiomyopathy. *J Cell Biol.* 2011;194(3):355–365.
281. Backlund M, Stein F, Rettel M, Schwarzl T, Perez-Perri JI, Brosig A, et al. Plasticity of nuclear and cytoplasmic stress responses of RNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(9):4725–4740.

## PUBLIKACIJOS

Straipsniai, kuriuose paskelbti disertacijos tyrimo duomenys:

1. Kuprytė M., Lesauskaitė V., Keturakis V., Bunevičienė V., Utkienė L., Jusienė L., Pangonytė D. Remodeling of Cardiomyocytes: Study of Morphological Cellular Changes Preceding Symptomatic Ischemic Heart Failure. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24:14557. doi: 10.3390/ijsm241914557.
2. Kuprytė M., Lesauskaitė V., Siratavičiūtė V., Utkienė L., Jusienė L., Pangonytė D. Expression of Osteopontin and Gremlin 1 Proteins in Cardiomyocytes in Ischemic Heart Failure. *Int. J. Mol. Sci.* 2024; 25:8240. doi: 10.3390/ijsm25158240.

Konferencijos, kuriose paskelbti disertacijos tyrimo duomenys:


1. Kuprytė M., Lesauskaitė V., Pangonytė D. (2022). Morphometric study of left ventricular cardiomyocytes' remodeling in progressing heart failure (HF) of ischemic origin. M&PD 2022 – The annual meeting of the ESC Working Group on Myocardial & Pericardial diseases: 7–8 October 2022, Turin, Italy / ESC Working Group on Myocardial & Pericardial diseases. Turin: ESC Working Group on Myocardial & Pericardial diseases, 2022, p. 1.
2. Kuprytė M., Lesauskaitė V., Pangonytė D. (2023). Study of novel immunomarkers' expression in left ventricular cardiomyocytes during remodeling in progressing heart failure (HF) of ischemic origin. Læknablaðið. Fylgirit: 28 Nordic-Baltic Congress of Cardiology [(NBCC 2023) The Future of Cardiology]: June [8–10] 2023, Reykjavík / [Icelandic Society of Cardiology]. Kópavogur: Læknafélag Íslands (Icelandic Medical Association), 2023, fylgirit 117, 2023, p. 1–1, ISSN 0254-1394.
3. Kuprytė M., Lesauskaitė V., Pangonytė D. (2023). Morphometric and immunohistochemical study of left ventricular cardiomyocytes' morphology during remodeling in progressing ischemic heart failure (HF). *Virchows Archiv: 35<sup>th</sup> European Congress of Pathology – Abstracts*, 2023, nr. S1 (483), 173-173, ISSN 0945-6317. doi: 10.1007/s00428-023-03602-w.
4. Kuprytė M., Lesauskaitė V., Pangonytė D. (2023). Study of post-transcriptional processing during cardiomyocyte remodeling in ischemic heart failure. 10<sup>th</sup> Association for European Cardiovascular Pathology (AECVP) Biennial Meeting: Padova, 2023, 21-23 September: Abstract book, 2023, 39.

No special permission is required to reuse all or part of article published by MDPI, including table and figures. Furthermore, no special permission is required for authors to submit their work to external repositories ([MDPI | Open Access Information](#))



Communication

# Remodeling of Cardiomyocytes: Study of Morphological Cellular Changes Preceding Symptomatic Ischemic Heart Failure

Milda Kuprytė<sup>1</sup>, Vaiva Lesauskaitė<sup>2</sup> , Vytenis Keturakis<sup>1</sup>, Vitalija Bunevičienė<sup>1</sup>, Lina Utkienė<sup>1</sup>, Lina Jusienė<sup>1</sup> and Dalia Pangonytė<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Cardiac Pathology, Institute of Cardiology, Lithuanian University of Health Sciences, LT-44307 Kaunas, Lithuania; milda.kupryte@ismu.lt (M.K.); vytenis.keturakis@ismuni.lt (V.K.)

<sup>2</sup> Laboratory of Molecular Cardiology, Institute of Cardiology, Lithuanian University of Health Sciences, LT-44307 Kaunas, Lithuania; vaiva.lesauskaite@ismuni.lt

\* Correspondence: dalia.pangonyte@ismuni.lt

**Abstract:** Although major pathogenesis mechanisms of heart failure (HF) are well established, the significance of early (mal)adaptive structural changes of cardiomyocytes preceding symptomatic ischemic HF remains ambiguous. The aim of this study is to present the morphological characterization of changes in cardiomyocytes and their reorganization of intermediate filaments during remodeling preceding symptomatic ischemic HF in an adult human heart. A total of 84 myocardial tissue samples from middle-left heart ventricular segments were analyzed histomorphometrically and immunohistochemically, observing the cardiomyocyte's size, shape, and desmin expression changes in the remodeling process: Stage A of HF, Stage B of HF, and Stages C/D of HF groups (ACC/AHA classification). Values  $p < 0.05$  were considered significant. The cellular length, diameter, and volume of Stage A of HF increased predominantly by the diameter vs. the control group ( $p < 0.001$ ) and continued to increase in Stage B of HF in a similar pattern ( $p < 0.001$ ), increasing even more in the C/D Stages of HF predominantly by length ( $p < 0.001$ ). Desmin expression was increased in Stage A of HF vs. the control group ( $p < 0.001$ ), whereas it was similar in Stages A and B of HF ( $p > 0.05$ ), and most intense in Stages C/D of HF ( $p < 0.001$ ). Significant morphological changes of cardiomyocytes and their cytoskeletal reorganization were observed during the earliest remodeling events preceding symptomatic ischemic HF.

**Keywords:** remodeling; cardiomyocyte; histology; ischemia; heart failure



**Citation:** Kuprytė, M.; Lesauskaitė, V.; Keturakis, V.; Bunevičienė, V.; Utkienė, L.; Jusienė, L.; Pangonytė, D. Remodeling of Cardiomyocytes: Study of Morphological Cellular Changes Preceding Symptomatic Ischemic Heart Failure. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 14557. <https://doi.org/10.3390/ijms241914557>

Academic Editor: Simona Gurzu

Received: 21 August 2023

Revised: 19 September 2023

Accepted: 22 September 2023

Published: 26 September 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Heart failure (HF) is causing a significant clinical, public, and economic burden worldwide [1,2], remaining associated with frequent hospitalizations [3], high rates of in-hospital mortality, and rising global health expenditures [4]. Most cardiac muscle pathologies with predominating ischemic injuries contribute towards the progress of cardiac muscle dysfunction, which eventually manifests as symptomatic HF [5]. Although major pathogenesis mechanisms of HF are well established, the significance of early (mal)adaptive structural changes of cardiomyocytes preceding symptomatic ischemic HF remains ambiguous [6,7]. An ischemic injury initiates a complex of heterogenous compensatory molecular intracellular processes, which are meant to restore and maintain the regular function of the heart [8,9]. These compensatory processes, known as remodeling, manifest on intracellular and cellular levels, changing the inner cytoskeletal composition of intermediate filaments, such as desmin, interacting with sarcolemma, sarcomeres, and nucleus, and as a result, transforming the shape and improving the functional resilience of cardiomyocytes [10].

Continuous myocardial remodeling in the context of ischemic injury not only maintains cellular resilience under excessive muscle tension but also increases cellular energetic demands and disrupts the homeostasis of protein synthesis [8]. Desmin, as a predominating

intermediate cytoskeletal filament, starts misfolding due to impaired post-translational modifications [11–13]. These events contribute to even more extensive damage of the heart muscle compared to the initial ischemic injury and become the structural basis for ischemic HF formation long before the first HF symptoms appear [8].

So far, data on early cardiomyocyte morphological changes occurring in remodeling and leading to HF are fragmented and controversial, based mostly on a quantitative organometric [14] or (semi)qualitative histological analysis of heart muscle tissue. Moreover, no substantial correlations between cellular size and inner cytoskeletal changes during the remodeling process of intermediate filaments, such as desmin, are based on extensive histomorphometric research. Usually, these studies present results based on low-quality selected samples [15], most of them exploring end-stage HF due to dilatative cardiomyopathy. Furthermore, ischemic injury is one of the predominating causes of HF, and by comparing tendencies of desmin expression in cardiomyocytes alone, some authors have already described significant differences between dilatative cardiomyopathies and heart muscle diseases with continuous ischemic injury. Additionally, most morphological data concerning HF pathogenesis come from animal-based studies with a rare focus on remodeling initiated and maintained by isolated continuous ischemic injury preceding symptomatic HF [16]. Therefore, knowledge about early structural changes in the remodeling of cardiomyocytes and their cytoskeletal reorganization specific to continuous ischemic injury in the human heart remains obscure.

This study is an attempt to present an extensive quantitative morphological characterization of the earliest cellular structural changes of cardiomyocytes that are observed during remodeling and precede symptomatic ischemic HF in an adult human heart. The characterization of remodeling in cardiomyocytes that suffer from continuous ischemic injury will provide substantial morphological evidence on the effect of remodeling for the pathogenesis of ischemic HF and will expand our overall knowledge of the complexity of the earliest cellular decompensation processes leading towards tissue deterioration and clinically diagnosed organ failure.

## 2. Results

### 2.1. Histomorphometric Analysis of Cardiomyocytes

Overall, 8638 cardiomyocytes from the middle segment of the left cardiac ventricle were fit for histomorphometric analysis via light microscopy according to the histomorphometric analysis criteria established in the study design. When analyzing two-dimensional cellular histomorphometric parameters (Table 1), the length of the cardiomyocytes in the longitudinal plane of Stage A of the HF group was already significantly increased compared to the control group ( $p < 0.001$ ), indicating histomorphometrically detectable morphological cellular changes at the earliest stages of remodeling initiated by ischemic injury of the heart muscle and preceding symptomatic ischemic HF. According to further analysis of the cellular length, the value of this parameter in the cardiomyocytes of Stage B of the HF group was significantly increased compared to both cardiomyocytes in Stage A of the HF and control groups ( $p < 0.001$ ), and the length of the cells in Stages C/D of HF was increased even more compared to those in Stage B of the HF group ( $p < 0.001$ ).

Similar tendencies of cellular diameter changes were observed during the remodeling process when analyzing cardiomyocytes in Stage A of HF, Stage B of HF, and Stages C/D of the HF groups. A significant increase in the cellular diameter was already observed when comparing cardiomyocytes in Stage A of the HF group to the control group ( $p < 0.001$ ). This histomorphometric parameter was increased in Stage B of the HF group compared to the same parameter in Stage A of the HF and control groups ( $p < 0.001$ ). Also, the cellular diameter of the cardiomyocytes in Stages C/D of the HF group was increased compared to this parameter in Stage B of the HF group ( $p < 0.001$ ).

**Table 1.** Histomorphometric parameters of cardiomyocytes in stage A of HF, stage B of HF, stages C/D of HF, and the control groups.

Parameter	Control Group	Stage A of the HF Group	Stage B of the HF Group	Stages C/D of the HF Group
Number of the representative cardiomyocytes	1929	2080	1992	2637
Mean length (SE), $\mu\text{m}$	61.82 (0.34)	72.23 * (0.32)	78.86 *** (0.33)	103.28 **** (0.29)
95% CI of length, $\mu\text{m}$	61.16–62.47	71.59–72.86	78.21–79.50	102.71–103.83
Mean diameter (SE), $\mu\text{m}$	11.73 (0.06)	14.34 * (0.05)	15.19 *** (0.05)	18.92 **** (0.05)
95% CI of diameter, $\mu\text{m}$	11.62–11.84	14.23–14.45	15.08–15.30	18.83–19.02
Mean volume (SE), $\mu\text{m}^3$	7271 (201)	12,320 * (193)	15,170 *** (197)	31,433 **** (172)
95% CI of volume, $\mu\text{m}^3$	6877–7666	11,941–12,699	14,783–15,557	31,096–31,769
Mean cellular length–diameter ratio (SE)	5.392 (0.025)	5.137 * (0.024)	5.301 #, ** (0.025)	5.583 **** (0.022)
95% CI of cellular length–diameter ratio	5.343–5.442	5.090–5.185	5.252–5.349	5.541–5.625

All multiple comparisons were performed by applying the nested design of ANOVA with *Bonferroni* post hoc tests: \*  $p < 0.001$ —Stage A of HF, Stage B of HF, Stages C/D of HF vs. control group; \*\*  $p < 0.001$ —Stage B of HF and Stages C/D of HF vs. HF of A group; \*\*\*  $p < 0.001$ —HF of C/D stage vs. Stage B of HF; #  $p < 0.05$ —Stage B of HF group vs. control group. HF—heart failure; stages A, B, C, D of HF—according to ACC/AHA classification; SE—standard error; CI—confidence interval.

Further analysis of the cellular volume confirmed similar tendencies of the morphological changes observed during the remodeling process in the cardiomyocytes. The cardiomyocytes in Stage A of the HF group were significantly larger compared to the control group ( $p < 0.001$ ). The volume of cells in Stage B of the HF group significantly increased compared to the volume of cardiomyocytes in Stage A of the HF and control groups ( $p < 0.001$ ). The cells in Stages C/D of the HF group were even larger compared to those in Stage B of the HF group ( $p < 0.001$ ).

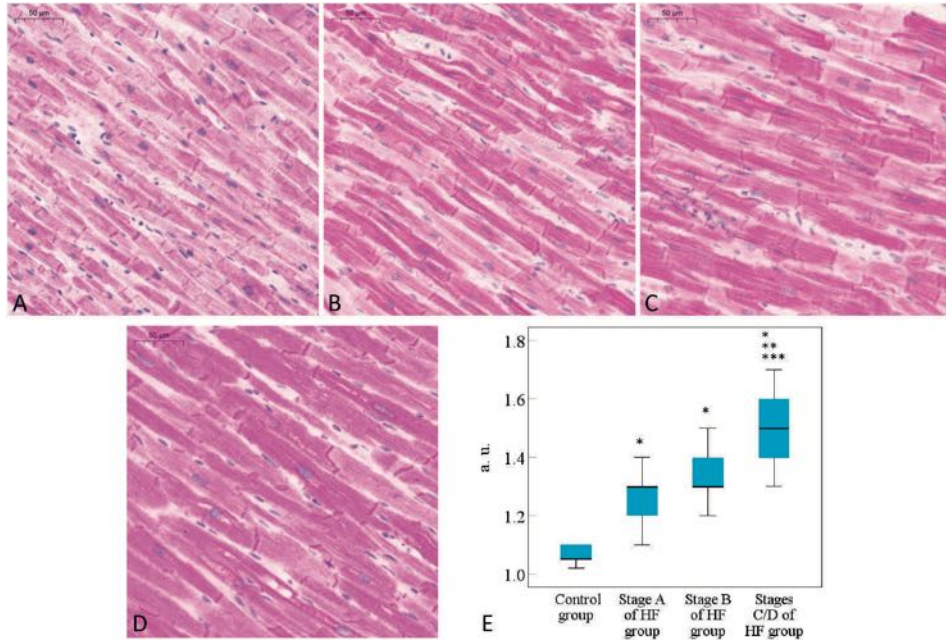
Interestingly, when analyzing a length–diameter ratio of cardiomyocytes in Stage A of the HF, Stage B of the HF, and Stages C/D of the HF groups, more complex tendencies of cardiomyocyte remodeling were detected via cellular histomorphometric analysis. A significant decrease in the cellular length–diameter ratio was observed in Stage A of the HF group compared to the control group ( $p < 0.001$ ), indicating the cellular growth pattern associated with predominantly increasing diameter over the length. Additionally, this cellular length–diameter ratio increased in Stage B of the HF group compared to Stage A of the HF group ( $p < 0.001$ ). Yet, this value in Stage B of the HF group was smaller compared to the control group ( $p < 0.05$ ). The cellular length–diameter ratio significantly increased in the cardiomyocytes of Stages C/D of the HF group compared to the cardiomyocytes in Stage A of the HF, Stage B of the HF, and the control groups ( $p < 0.001$ ), indicating that the size of cardiomyocytes in this group increased mostly because of increasing cellular length compared to cellular diameter.

## 2.2. Immunohistochemical Analysis of Desmin Expression in Cardiomyocytes

Overall preliminary observation of the results of an immunohistochemical reaction against the desmin in the selected heart muscle tissue samples was performed to detect the cardiomyocytes in the longitudinal plane that are fit for the study design to evaluate the tendencies of desmin expression in the cardiomyocytes (Figure 1).

Desmin expression in the cardiomyocytes evaluated using the immunohistochemical method already increased in Stage A of the HF group compared to the control group ( $p < 0.001$ ), indicating the significant tendencies of desmin expression during the earliest stages of cardiomyocyte remodeling, preceding symptomatic ischemic HF. Desmin expression in the cardiomyocytes of Stage B of the HF group increased compared to the control group ( $p < 0.001$ ), whereas there was no significant difference when comparing Stage B of the HF group to Stage A of the HF group ( $p > 0.05$ ). Still, desmin expression was more significantly increased in Stages C/D of the HF group compared to Stage B of the HF, Stage A

of the HF, and control groups ( $p < 0.001$ ). Additionally, when observing desmin expression in the cardiomyocytes of Stages C/D of HF, cardiomyocytes with microscopically visible intrasarcoplasmic microaggregates of desmin were predominating, most likely indicating disrupted intracellular homeostasis of desmin in the late stages of remodeling.



**Figure 1.** Desmin expression in the cardiomyocytes. Representative images of the myocardium immunohistochemistry in the control: (A) Stage A of the HF (B); Stage B of the HF (C); Stages C/D of the HF groups (D). Bar graph of the semi-quantitative analysis (E), results are presented as median, the 25th and 75th percentiles). \*  $p < 0.001$ —statistically significant differences—Stage A of HF, Stage B of HF, Stages C/D of HF vs. the control group data; \*\*  $p < 0.001$ —Stage B of HF and Stages C/D of HF vs. Stage A of HF group data; \*\*\*  $p < 0.001$ —Stages C/D of HF vs. Stage B of HF (*Kruskal–Wallis’s* test with the pairwise comparisons were applied with the significance values adjusted by the *Bonferroni* correction for multiple tests). HF—heart failure; stages A, B, C, D of HF—according to ACC/AHA classification; a.u.—arbitrary units.

While exploring the associative trends of the desmin expression and the cellular histomorphometric parameters, statistically significant strong positive correlations were detected between intrasarcoplasmic desmin expression and cardiomyocyte length ( $r = 0.82$ ,  $p < 0.001$ ), diameter ( $r = 0.74$ ,  $p < 0.001$ ), and volume ( $r = 0.74$ ,  $p < 0.001$ ). The correlation defining the association between the cellular length–diameter ratio and the intracellular desmin expression was positively weak ( $r = 0.24$ ,  $p < 0.05$ ).

### 3. Discussion

The remodeling of the heart muscle is an active process of tissue reorganization, which is initiated in the context of cardiac tissue injury with the goal of maintaining an optimal pumping function by altering the composition of the tissue [17]. The tissues exposed to the injuring factors, such as continuous ischemia, constantly initiate compensatory remodeling

changes, which are considered mostly positive in their effect to optimize inner homeostasis and the performance of specialized functions. Still, as protective and preserving these remodeling processes are considered, current data on the tissue remodeling processes indicate that, at some point, this remodeling becomes maladaptive, manifesting in reduced cardiac output and eventually leading to symptomatic HF [8]. On the other hand, some consider that these remodeling processes occurring in the heart muscle when exposed to a prolonged ischemic injury are pathological from the very beginning when these processes are initiated in the cardiomyocytes and may already indicate early heart muscle disease before the very first HF symptoms [5,17].

Our histomorphometric and immunohistochemical study of cardiomyocytes at different stages of ischemic HF according to the ACC/AHA classification presents novel extensive quantitative data on the cellular changes during the early and late phases of tissue remodeling, reporting the early disproportional changes in the cardiomyocytes preceding symptomatic ischemic HF. The cardiomyocytes already demonstrate significant changes in shape and intermediate filament desmin expression in the selected cases, representing an increased risk of developing HF without clinically identifiable myocardial structural disease. To the authors knowledge, this is the first detailed report with easily reproducible data characterizing the early and late remodeling events in cardiomyocytes on a cellular basis in an adult human heart before the very first symptoms of ischemic HF appear in a cohort of statistically representative size.

Increased overall volume and decreased length–diameter ratio of the cardiomyocytes in Stage A of the HF group compared to the control group indicates that the cardiomyocytes acquire morphological features of cellular hypertrophy with increased diameter over the cellular length at the earliest stages of the remodeling. According to these histomorphometric findings, it can be hypothesized that early remodeling with predominating increased cellular thickness due to the assembly of intracellular sarcomeric components mainly in parallel patterns occurs due to impaired contractility [18], manifesting in the early ischemic injuries of cardiac tissue. Further analysis of the histomorphometric data in Stage B of the HF (pre-HF) group detected a less disproportional increase in cardiomyocytes, with the cellular diameter changes being still predominant over cellular length, even in the late stages of remodeling preceding ischemic HF. This pattern of cardiomyocyte volume increase indicates that longer exposure to a continuous ischemic environment leads to decreased contractile elements that start transforming morphologic cellular features into those that macroscopically manifest as eccentric cardiac hypertrophy [19].

Hemodynamically, the purpose of these cellular changes is to induce cardiac hypertrophy as a compensatory response to reduce the tension of the cardiac ventricular wall and prevent cardiac dysfunction [8]. Still, a study on HF with preserved ejection fraction (HFpEF) reported by Mühlfeld C. et al. (2020) detected a significantly increased cellular diameter in early HF stage compared to a control group when applying the histomorphometric approach of tissue remodeling analysis to an animal heart [20], considering these morphological changes as a part of the structural basis for the already developing heart muscle disease. Interestingly, a study on idiopathic dilatative cardiomyopathy performed by Vigliano C. A. et al. (2011) identified that more than 50% of the patients with an increased mean diameter of their cardiomyocytes had significantly worse HF-associated outcomes, and the Cox regression univariate analysis determined increased cardiomyocyte diameter as an important independent predictor of patient's death [21], further supporting the hypothesis that detected morphological changes in the remodeling preceding ischemic HF are considered part of myocardial disease from the very beginning. Altogether, these tendencies suggest that increased cardiomyocyte diameter may be disproportionately one of the first morphological changes of the remodeling in the context of ischemic injury when compared to cellular length, also demonstrating the ambiguous nature of these remodeling processes that represent not only the compensatory capacity of heart muscle but also become a predicting factor for symptomatic ischemic HF in the future.

The early remodeling processes initiated in the cardiomyocytes preceding symptomatic ischemic HF promote significant increases in the overall cellular volume (and simultaneously, the mass of cardiac ventricle), supposedly strengthening the suggestion of contractility function being gradually lost as a result of ischemic injury, and thus increasing cardiac preload. Although these cellular events are considered to be compensatory in the context of ischemic injury, the morphological changes associated with the early remodeling of cardiomyocytes also lead to significant circumferential shortening of the cardiac ventricle in the remote regions of the previously observed ischemic injuries with reduced systolic wall movements and ejection fraction [22], further emphasizing a novel and more intricate role of early cardiomyocyte remodeling in the pathogenesis mechanism of symptomatic ischemic HF.

Despite the predominating compensatory aspect of early remodeling, these structural changes in the cardiomyocytes during the early stages of remodeling provide only a short-term effective solution to improve the contractile activity of heart muscle. The oxygen demand and perfusion of the myocardium are altered due to initiated hypertrophic changes when the capillary density is relatively decreased, contributing to the reinforcement of the pathology by accelerating cardiac contractile dysfunction [18]. Further results from the histomorphometric analysis of the cardiomyocytes in Stages C/D of the HF group, representing the morphological changes in the symptomatic ischemic HF, revealed that the maladaptive remodeling process continues to induce significant hypertrophic changes in the cardiomyocytes with an increasing cellular length over diameter, as well as an overall cellular volume. According to Tamura T. et al. (1998), the lengthening of cardiomyocytes alone accounts for increased cardiac chamber circumference progressing to HF [23]; therefore, significant changes in the longitudinal axis of the cardiomyocytes can be assumed as a histomorphological feature of decompensation. A study conducted by Janczewski A. M. et al. (2002) determined similar results through the use of the histomorphometric approach of a single left cardiac ventricle cardiomyocyte length in dilatative cardiomyopathy [24]. Interestingly, no significant differences in the cellular diameter were detected when comparing the experimental and the control groups in the same study, whereas our study determined a moderate but statistically significant increase in cardiomyocyte diameter in Stages C/D of the HF group, implying more complex morphological differences in remodeling in cases of continuous ischemic cardiac injury compared to dilatative cardiomyopathy.

In response to continuous ischemia, cardiomyocytes tend toward hypertrophy with predominant lengthening during late remodeling in order to maintain physiological stroke volume with a reduced number of properly functioning myocardial tissue segments [25]. Nonetheless, these cellular changes during cardiomyocyte remodeling result in overstretching, exhaustion of the compensatory Frank–Starling mechanism, ventricular dilatation [5], and increasing cardiac wall stress, which contribute to the progression of ventricular wall thinning [26], thus creating a vicious circle and further supporting the role of the adverse remodeling in the pathogenesis mechanism of the advancing ischemic HF.

In fact, results from studies on ischemic HF demonstrate that the morphological changes in cardiomyocytes induced by adverse remodeling contribute towards a clinically significant deterioration of the heart muscle more than any other structural component of the organ in cases of prolonged ischemia [27]. According to Del Buono M. G. et al. (2022), in response to continuous ischemic exposure, elongation of hypertrophic cardiomyocytes becomes a predominant factor, causing significant cardiac geometry changes, increasing the mass of the cardiac wall, and left ventricular enlargement, eventually contributing to increased systolic longitudinal wall stress and irreversible global ventricular dysfunction, manifesting as symptomatic HF [28]. Simultaneously, significant changes in hemodynamics and neurohormonal activation reflect the overall decreasing efficiency in the functionality of the cardiovascular system. A continuous reduction in cardiac output contributes towards the activation of the renin–angiotensin–aldosterone system and, as a result, affects the size and disturbs the metabolism of cardiomyocytes, also increasing protein synthesis in various



different cells of the myocardial tissue, including fibroblasts, which tend to produce the extracellular matrix, thus promoting the increasing stiffness of the myocardial tissue and diastolic cardiac dysfunction [29].

As a result of the remodeling induced by continuous ischemic injury to the heart muscle, intrasarcoplasmic protein homeostasis is affected, and structural alterations of the cardiomyocyte cytoskeletal components also occur [30–32]. Desmin, being a major load-bearing structure of cardiomyocytes, as an intermediate filament, participates in ensuring cellular resilience against mechanical stressors, maintaining sarcomeric integrity, optimizing the intrasarcoplasmic communication between the different intracellular compartments and transmitting the signals of the cellular response towards the extracellular microenvironment [33]. Cells with desmin deficiency are not able to respond to extracellular stimuli by promoting compensatory reactions; therefore, these intracellular processes are disrupted and managed without a sufficiently balanced organization of intrasarcoplasmic compartments [34,35].

An immunohistochemical study of the desmin expression in the cardiomyocytes detected a significantly increased desmin expression in the cardiomyocytes of Stage A of HF and Stage B of HF compared to the control group, indicating the specific features of the early reorganization of the cytoskeletal components in cardiomyocytes during remodeling. Indeed, the upregulation of desmin expression in the early stages of any cardiac disease may be assumed to be a compensatory process [36] because no immunohistochemical features of desmin expression disarray are observed in these groups. A study conducted by Pawlak A. et al. (2012) presented similar tendencies in terms of desmin expression in the HF due to dilatative cardiomyopathy and noticed that the desmin expression increases significantly as HF develops [37]. Also, a study on ischemic HF by Bouvet M. et al. (2021) detected that an increasing amount of phosphorylated desmin impacts its solubilization and creates the intracellular conditions for irreversible aggregate formation in the future when the deterioration of the heart muscle is progressing towards symptomatic HF [38].

Yet, when comparing desmin expression in Stage A of the HF and Stage B of the HF groups, the expression of this intermediate filament is similar in both groups in terms of cardiomyocytes, and the immunohistochemical reaction preserves its striated cytoplasmic pattern in most cardiomyocytes. Therefore, one can assume that the cytoskeletal reorganization process is efficient in the early stages of remodeling, preserving the regular assembly mechanisms of the intermediate filaments and the overall integrity of the cytoskeletal structures. Interestingly, it may also be hypothesized that the undistorted desmin arrangement observed during the later events of the remodeling continues to mostly maintain the organized functional resilience and contractility of the cardiomyocytes [38], thus preventing the more rapid progression of heart muscle disease into the symptomatic HF to some level.

The increased expression of desmin with disrupted intrasarcoplasmic organization and microaggregates in the cardiomyocytes are observed predominantly in symptomatic ischemic HF, indicating that these morphological features represent end-stage remodeling processes in failing cardiomyocytes [39]. As a result of continuous ischemic injury and mechanical tension, the post-translational processing of desmin is performed more actively, creating different proteoforms of desmin typical to irreversibly dysfunctional heart muscle [35]. Also, the enhanced activity of the post-translational modifications or mutations of the N-terminal domain of desmin [40] may cause the misfolding of this intermediate filament, further disrupting the organizational compartments of sarcomeric components [34] and producing pro-amyloidogenic oligomers [12,40], which may become a source for protein aggregate formation, thus contributing to direct toxic cellular injury and altering the overall mechanics of the sarcomeric component of the cardiomyocytes in the symptomatic ischemic HF irreversibly [37,41].

Overall, the extensive characterization of the remodeling process in the cardiomyocytes preceding symptomatic ischemic HF based on histomorphometric and immunohistochemical analyses in a statistically representative cohort provides a structurally based insight into the dynamics of the remodeling process and its role in the pathogenesis of ischemic

HF. Although the relevance of the remodeling process in the pathogenesis of HF is well recognized, practical translation of the structural data on the remodeling process into clinical, diagnostic settings remains controversial and problematic due to the poor reproducibility of these data [15]. Still, the role of using uniform reference criteria in morphological cardiac tissue assessment and thus maintaining efficient collaboration between clinicians, radiologists, molecular biologists, and geneticists is acknowledged [42]. Therefore, the knowledge of the cellular changes in the cardiomyocyte remodeling process based on the quantitative structural data obtained from the study with a representative cohort may provide a practical diagnostic solution, creating an objective, unbiased diagnostic tool as part of a clinical follow-up panel of the course of myocardial disease in the context of continuous ischemic injury, assisting in evaluating the effects of the medications improving cardiac remodeling processes, and providing structurally validated basic data for future studies of the remodeling process in cardiomyocytes.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Study Design and Groups

Myocardial tissue samples from the middle segments of the human left cardiac ventricles were selected from the paraffin blocks of the cardiovascular tissue collection of the Laboratory of Cardiac Pathology of the Institute of Cardiology (Lithuanian University of Health Sciences, LUHS, Kaunas, Lithuania) to achieve the goal of exploring the remodeling of cardiomyocytes by detecting the earliest morphological cellular changes preceding symptomatic ischemic HF.

Overall, 84 selected myocardial tissue samples were further classified into three groups according to the archival clinical data and the results of the histomorphologic analysis of the heart (Table 2).

**Table 2.** Characterization of the groups selected to detect the morphological changes in cardiomyocyte remodeling preceding symptomatic ischemic HF.

	Control Group	Stage A of the HF Group	Stage B of the HF Group	Stages C/D of the HF Group
Number of cases	25	26	25	33
Mean age (SD), years	50.5 (8.7)	54.4 (8.6)	54.4 (7.4)	56.8 (7.5)
Sex	Male	Male	Male	Male
Cardiovascular disease of ischemic origin	No	Yes	Yes	Yes
Previous clinical symptoms of HF	No	No	No	Yes
Stage of HF according to ACC/AHA *	Not applied	At-Risk for HF	Pre-HF	Symptomatic HF

\* Stage of HF was diagnosed according to the American College of Cardiology (ACC)/American Heart Association (AHA) classification [43]. HF—heart failure; stages A, B, C, D of HF—according to the ACC/AHA classification; SD—standard deviation.

The characterization of the groups selected to detect the morphological changes in cardiomyocyte remodeling preceding symptomatic ischemic HF:

- Stage A of HF (At risk for HF group)—patients who died suddenly within 1 h after the first clinical symptoms of myocardial infarction (MI) in the witnessed cases or within 24 h of last being seen alive in the unwitnessed cases [44,45]; no previous symptoms of HF were reported, no scars after MI were detected during the morphological tissue inspection, the acute ischemic injuries were up to 6 h [46], HF was diagnosed as being A stage according to the American College of Cardiology (ACC)/American Heart Association (AHA) classification [43], and an extensive morphological examination of the heart was performed during this postmortem procedure ( $n = 26$ );
- Stage B of HF (Pre-HF group)—patients who died suddenly due to the cardiovascular complications associated with the ischemic heart injury within 1 h after the first clinical symptoms in the witnessed cases or within 24 h of last being seen alive in

the unwitnessed cases [44,45]; no previous symptoms of HF were reported, but a scar after MI was detected in the postmortem morphological inspection of the heart, HF was classified as B stage according to the ACC/AHA classification [43], and the extensive morphological examination of the heart was performed during this postmortem procedure ( $n = 25$ );

- Stages C/D of HF (Symptomatic/Advanced HF group)—patients who were diagnosed with symptomatic ischemic HF classified as C or D stage according to ACC/AHA classification [43], a heart transplantation procedure was performed for them, and an extensive morphological examination of surgical material after the failing heart procedure was carried out ( $n = 33$ ).

Male patients who died from external causative factors or acute non-cardiovascular diseases with their hearts being examined during the postmortem procedure were selected as a control group ( $n = 25$ ).

No other disease that could cause the reorganization of the myocardial tissue components (e.g., systemic arterial hypertension, congenital or acquired cardiac valve disease, cardiomyopathy, diabetes mellitus, pulmonary diseases, etc.) was diagnosed for these patients.

The samples of the myocardial tissue from the middle segments of the free wall of the left cardiac ventricles in all three groups were obtained for further microscopic testing, avoiding areas of close MI or scarring after MI. Detailed histomorphological diagnostics were performed for all the selected cases before a histomorphometric study.

#### 4.2. Histomorphometric Analysis of Cardiomyocytes

A histomorphometric approach was adopted to objectively evaluate the remodeling changes in cardiomyocyte size and shape. Therefore, 5 formalin-fixed paraffin-embedded serial sections of 4  $\mu\text{m}$  thickness were produced for each selected case, applying the stepwise approach with a distance of 20  $\mu\text{m}$  to avoid the same overlapping cardiomyocytes being measured several times in each selected case. The produced serial sections were stained using the *Heidenhain's azan trichrome* method to visualize the intercalated discs of the cardiomyocytes in the longitudinal plane required for histomorphometric cellular analysis. The histological slides stained using the *Heidenhain's azan trichrome* method were examined with light microscopy (motorized microscope Olympus BX51, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) at 20 $\times$  magnification and 80 representative microscopic fields in 5 serial sections for each selected case in Stage A of HF, Stage B of HF, Stages C/D of HF, and the control groups were recorded by a digital camera (Evolution Qei, Media Cybernetics, Rockville, MD, USA) to collect and measure up to 80 cardiomyocytes for the each selected case.

The histomorphometric analysis of the stored, recorded images was performed using Image Pro Plus 6.0 software (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA), measuring the two-dimensional cellular histomorphometric parameters (the length and the diameter), afterwards calculating the length–diameter ratio (cell length/cell diameter) and the volume ( $(\pi \times (0.5 \times \text{cell diameter})^2) \times \text{cell length}$ ) for each cardiomyocyte in the representative longitudinal plane. The cardiomyocytes in the longitudinal plane were considered representative when the intercalated discs at both lateral cellular tips and the central position of the nucleus were observed using light microscopy. The histomorphometric analysis was performed in a blind manner to avoid observer bias, and none of the researchers knew what groups of the selected cases during this process of histomorphometric analysis were.

#### 4.3. Semi-Quantitative Immunohistochemical Analysis of Desmin Expression in Cardiomyocytes

An immunohistochemical approach was adopted to objectively evaluate the changes in intracellular intermediate filament desmin expression during the remodeling process. The selected formalin-fixed paraffin-embedded myocardial tissue samples of Stage A of HF ( $n = 26$ ), Stage B of HF ( $n = 25$ ), Stages C/D of HF ( $n = 33$ ), and the control ( $n = 25$ ) groups (see Table 2) were cut into 3  $\mu\text{m}$  thick sections and placed onto SuperFrost slides (Menzel, Braunschweig, Germany). The deparaffinization sections were washed with

distilled water, and the epitope retrieval procedure was performed using a microwave tissue processor RHS-1 (Milestone Medical, Roseland, NJ, USA) and incubating the samples in TRIS/EDTA buffer (Target Retrieval Solution, pH 9.0, Agilent Technologies Inc., Wood Dale, IL, USA) at 110 °C for 8 min. Immunohistochemical staining was performed using “Shandon Coverplate” plates (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Endogenous peroxidase was blocked, and the samples were incubated with the primary rabbit polyclonal antibody against desmin (Cat#HPA018803, RRID: AB\_1847616, Sigma-Aldrich, Merck Group, St. Louis, MO, USA), as validated by the *Human Protein Atlas* project, and diluted to 1:250 in the antibody diluent (Dako REAL, Agilent Technologies Inc., Wood Dale, IL, USA) for 1 h. The binding sites were visualized using the “EnVision Flex+” visualization system with the *HRP Magenta* chromogen (Agilent Technologies Inc., Wood Dale, IL, USA), counterstaining the sections with *Mayer’s* hematoxylin and coating with cover glasses using a polystyrene coating material. The tissues taken from an appendix served as a positive control, and tonsil fragments served as a negative control, applying the same protocol used for the immunohistochemical reaction as that used in the analyzed myocardial samples and running these reactions simultaneously. The IgG of the same isotype as the primary antibody dilution served as a reagent control.

The semi-quantitative analysis of the immunohistochemical reaction against desmin was performed using a score evaluation for the immunohistochemical reaction intensity and pattern: 1 point, physiological expression; 2 points, increased desmin expression with preserved intracytoplasmic striated pattern; and 3 points, increased desmin expression with deranged intracytoplasmic striated pattern, intracytoplasmic microaggregate formation. The results of the immunohistochemical reaction were observed in the 50 microscopic fields at 40× magnification (light microscopy, motorized microscope Olympus BX51, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) for each produced microsection for each selected case, indicating the number of cardiomyocytes within each reaction pattern separately in the whole microsection area of the selected case according to the study design (% of all the longitudinal plane cardiomyocytes visible in the whole myocardial microsection). The immunohistochemical reaction was evaluated only in those cardiomyocytes where both the lateral cellular intercalated discs and the central nucleus were visible in the longitudinal plane. A formula to evaluate the overall scope of the intensity of the immunohistochemical reaction in the selected myocardial tissue was applied:  $((1 \text{ point} \times \text{count of the representative cardiomyocytes \%}) + (2 \text{ points} \times \text{count of the representative cardiomyocytes \%}) + (3 \text{ points} \times \text{count of the representative cardiomyocytes \%}))/100$ . The evaluation of the immunohistochemical reactions was presented in arbitrary units (a.u.). The evaluation was performed by the two researchers independently, and none of these researchers knew the groups of the selected cases during this evaluation process. The inter-observer and intra-observer variability was evaluated via Kappa ( $\kappa$ ) statistics (*Cohen’s*  $\kappa$  coefficient > 0.9).

#### 4.4. Statistical Analysis

The normality of the data distribution was assessed with the *Kolmogorov–Smirnov* tests. The numerical data that fit a normal distribution were reported as the mean (standard error, SE) with 95% confidence intervals (CI). The numerical data that did not fit a normal distribution were reported as the median with the interquartile range. The statistically significant differences between Stage A of HF, Stage B of HF, Stages C/D of HF, and the control groups were determined via ANOVA with post hoc *Bonferroni* tests for the multiple comparisons when the numerical data fitted the normal distribution. The nested design of the ANOVA was used to compare the numerical variables of the histomorphometric data, assuming Stage A of HF, Stage B of HF, Stages C/D of HF, and the control groups as a fixed factor and the histomorphometric measurements within each case as a random factor. When the numerical data did not fit the normality distribution, independent samples *Kruskal–Wallis’s* test with pairwise comparisons were applied to compare the results between Stage A of HF, Stage B of HF, Stages C/D of HF, and the control groups, also analyzing the significance values adjusted using *Bonferroni* correction for the multiple tests. *Spearman’s*

rank correlation was applied to evaluate the correlation trends. The values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant. The statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software (SPSS Statistics version 29.0, IBM, Armonk, NY, USA).

## 5. Conclusions

Overall, the significant morphological changes in the cardiomyocytes and their cytoskeletal reorganization are already observed during the earliest events of remodeling, when heart muscle is exposed to continuous ischemic injury, and these specific structural changes precede symptomatic ischemic HF. The morphological alterations of the cellular diameter and length correlating with the increased desmin expression during the ongoing remodeling are extensively characterized in this study, presenting quantitative morphological evidence of the early structural cellular and cytoskeletal changes, with a focus on their morphofunctional impact on the pathogenesis of symptomatic ischemic HF. The morphological features that are specific to cardiomyocytes during early remodeling preceding symptomatic ischemic HF may be applied to pathological diagnostic practices as part of histomorphometrically and immunohistochemically validated diagnostic tools to identify the earliest structural features of failing cardiomyocytes before the first symptoms of HF appear to optimize a physiologically guided and timely individualized treatment strategy.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.K., V.L. and D.P.; methodology, M.K. and D.P.; validation, M.K., V.K. and D.P.; formal analysis, M.K., V.K., V.B. and D.P.; investigation, M.K., V.K., V.B., L.U. and L.J.; resources, V.L. and D.P.; data curation, M.K. and D.P.; writing, original draft preparation, M.K.; writing, review and editing, D.P. and V.L.; visualization, M.K. and D.P.; supervision, V.L. and D.P.; project administration, V.L. and D.P.; funding acquisition, V.L. and D.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was supported by the Science Fund of Lithuanian University of Health Sciences (Order of the Rector of Lithuanian University of Health Sciences for the Support of the Doctoral Scientific Research by the Science Fund of Lithuanian University of Health Sciences No. V-786).

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Local Kaunas Ethics Committee for Biomedical Research (No. BE-2-77, 15 September 2022, Kaunas, Lithuania).

**Informed Consent Statement:** Patient consent was waived because, according to the “Lithuanian Republic National Law for Biomedical Research” (No. VIII-1679, clause no. 7, subclause no. 11, 11 May 2000) and “Regulations for Performing the Biomedical Research when the Object of Study is Medical Documentation” (ratified by Order of Director of Lithuanian Bioethical Committee, no. V-28, 27 July 2011), the object of this study contains the biological samples and clinical information obtained for the clinical diagnostic purposes before the biomedical research was conceptualized and performed. Only residual material of the biological samples after the diagnostic pathology procedures were analyzed in this research. All biological data analyzed in the study were encoded anonymously, and the identification of any personal patient’s data cannot be retraced.

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

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Tromp, J.; Ferreira, J.P.; Janwanishstaporn, S.; Shah, M.; Greenberg, B.; Zannad, F.; Lam, C.S. Heart failure around the world. *Eur. J. Heart Fail.* **2019**, *21*, 1187–1196. [CrossRef] [PubMed]
2. Stretti, L.; Zippo, D.; Coats, A.J.; Anker, M.S.; von Haehling, S.; Metra, M.; Tomasoni, D. A year in heart failure: An update of recent findings. *ESC Heart Fail.* **2021**, *8*, 4370–4393. [CrossRef] [PubMed]
3. Ide, T.; Kaku, H.; Matsushima, S.; Tohyama, T.; Enzan, N.; Funakoshi, K.; Sumita, Y.; Nakai, M.; Nishimura, K.; Miyamoto, Y.; et al. Clinical characteristics and outcomes of hospitalized patients with heart failure from the large-scale Japanese registry of acute decompensated heart failure (JROADHF). *Circ. J.* **2021**, *85*, 1438–1450. [CrossRef]

4. Seferović, P.M.; Jankowska, E.; Coats, A.J.; Maggioni, A.P.; Lopatin, Y.; Milinković, I.; Polovina, M.; Lainščak, M.; Timmis, A.; Huculeci, R.; et al. The heart failure association atlas: Rationale, objectives, and methods. *Eur. J. Heart Fail.* **2020**, *22*, 638–645. [CrossRef] [PubMed]
5. Frantz, S.; Hundertmark, M.J.; Schulz-Menger, J.; Bengel, F.M.; Bauersachs, J. Left ventricular remodelling post-myocardial infarction: Pathophysiology, imaging, and novel therapies. *Eur. Heart J.* **2022**, *43*, 2549–2561. [CrossRef] [PubMed]
6. Zhang, J.; Bolli, R.; Garry, D.J.; Marbán, E.; Menasché, P.; Zimmermann, W.-H.; Kamp, T.J.; Wu, J.C.; Dzau, V.J. Basic and translational research in cardiac repair and regeneration. *JACC* **2021**, *78*, 2092–2105. [CrossRef]
7. De Ponti, F.E.; Scott, C.L. In matters of the heart, (cellular) communication is key. *Immunity* **2021**, *54*, 1906–1908. [CrossRef]
8. Nomura, S.; Satoh, M.; Fujita, T.; Higo, T.; Sumida, T.; Ko, T.; Yamaguchi, Y.; Tobita, T.; Naito, A.T.; Ito, M.; et al. Cardiomyocyte gene programs encoding morphological and functional signatures in cardiac hypertrophy and failure. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 4435. [CrossRef]
9. Kologrivova, I.; Shtatolkina, M.; Suslova, T.; Ryabov, V. Cells of the immune system in cardiac remodeling: Main players in resolution of inflammation and repair after myocardial infarction. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 664457. [CrossRef]
10. Brasoveanu, A.-M.; Mogoanta, L.; Malaescu, G.D.; Predescu, O.L.; Cotoi, B.-V.; Chen, F.I. Hypertensive cardiomyopathy—Histopathological and immunohistochemical aspects. *Rom. J. Morphol. Embryol.* **2019**, *60*, 487–494.
11. Guichard, J.L.; Rogowski, M.; Agnetti, G.; Fu, L.; Powell, P.; Wei, C.-C.; Collawn, J.; Dell'Italia, L.J. Desmin loss and mitochondrial damage precede left ventricular systolic failure in volume overload heart failure. *Am. J. Physiol.* **2017**, *313*, H32–H45. [CrossRef] [PubMed]
12. Hein, S.; Kostin, S.; Heling, A.; Maeno, Y.; Schaper, J. The role of the cytoskeleton in heart failure. *Cardiovasc. Res.* **2000**, *45*, 273–278. [CrossRef] [PubMed]
13. Tsikitis, M.; Galata, M.; Mavroidis, M.; Psarras, S.; Capetanaki, Y. Intermediate filaments in cardiomyopathy. *Biophys. Rev.* **2018**, *10*, 1007–1031. [CrossRef]
14. Mewton, N.; Croisille, P.; Revel, D.; Weber, O.; Higgins, C.; Saeed, M. Left ventricular postmyocardial infarction remodeling studied by combining MR-Tagging with delayed MR Contrast Enhancement. *Investig. Radiol.* **2008**, *43*, 219–228. [CrossRef] [PubMed]
15. Gerdes, A.M. How to improve the overall quality of cardiac morphometric data. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2015**, *309*, H9–H14. [CrossRef]
16. Chen, C.Y.; Caporizzo, M.A.; Bedi, K.; Vite, A.; Bogush, A.I.; Robison, P.; Heffler, J.G.; Salomon, A.K.; Kelly, N.A.; Babu, A.; et al. Suppression of deetyrosinated microtubules improves cardiomyocyte function in human heart failure. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 1225–1233. [CrossRef]
17. Tracy, E.; Rowe, G.; LeBlanc, A.J. Cardiac tissue remodeling in healthy aging: The road to pathology. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2020**, *319*, C166–C182. [CrossRef]
18. Kehat, I.; Molkentin, J.D. Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. *Circulation* **2010**, *122*, 2727–2735. [CrossRef]
19. Nicol, R.L.; Frey, N.; Pearson, G.; Cobb, M.; Richardson, J.; Olson, E.N. Activated MEK5 induces serial assembly of sarcomeres and eccentric cardiac hypertrophy. *EMBO J.* **2001**, *11*, 2757–2767. [CrossRef]
20. Mühlfeld, C.; Rajces, A.; Manninger, M.; Alogna, A.; Wierich, M.C.; Scherr, D.; Post, H.; Schipke, J. A transmural gradient of myocardial remodeling in early-stage heart failure with preserved ejection fraction in the pig. *J. Anat.* **2020**, *236*, 531–539. [CrossRef]
21. Vigliano, C.A.; Cabeza Meckert, P.M.; Diez, M.; Favaloro, L.E.; Cortés, C.; Fazzi, L.; Favaloro, R.R.; Laguens, R.P. Cardiomyocyte hypertrophy, oncosis, and autophagic vacuolization predict mortality in idiopathic dilated cardiomyopathy with advanced heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2011**, *57*, 1523–1531. [CrossRef] [PubMed]
22. Bogaert, J.; Bosmans, H.; Maes, A.; Suetens, P.; Marchal, G.; Rademakers, F.E. Remote myocardial dysfunction after acute anterior myocardial infarction: Impact of left ventricular shape on regional function. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2000**, *35*, 1525–1534. [CrossRef] [PubMed]
23. Tamura, T.; Onodera, T.; Said, S.; Gerdes, A.M. Correlation of myocyte lengthening to chamber dilation in the spontaneously hypertensive heart failure (SHHF) rat. *JMCC* **1998**, *30*, 2175–2181. [CrossRef] [PubMed]
24. Janczewski, A.M.; Kadokami, T.; Lemster, B.; Frye, C.S.; McTiernan, C.F.; Feldman, A. Morphological and functional changes in cardiac myocytes from mice overexpressing TNF $\alpha$ . *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2002**, *284*, H960–H969. [CrossRef]
25. Zhang, Y.; Chan, A.K.; Yu, C.-M.; Lam, W.W.; Yip, G.W.; Fung, W.-H.; So, N.M.; Wang, M.; Sanderson, J.E. Left ventricular systolic asynchrony after acute myocardial infarction in patients with narrow QRS complexes. *Am. Heart J.* **2005**, *149*, 497–503. [CrossRef]
26. Tsuda, T. Clinical assessment of ventricular wall stress in understanding compensatory hypertrophic response and maladaptive ventricular remodeling. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* **2021**, *8*, 122. [CrossRef]
27. Canty, J.M., Jr. Myocardial injury, troponin release, and cardiomyocyte death in brief ischemia, failure, and ventricular remodeling. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2022**, *323*, H1–H5. [CrossRef]
28. Del Buono, M.G.; Moroni, F.; Montone, R.A.; Azzalini, L.; Sanna, T.; Abbate, A. Ischemic cardiomyopathy and heart failure after acute myocardial infarction. *Curr. Cardiol. Rep.* **2022**, *24*, 1505–1515. [CrossRef]
29. Schwinger, R.H.G. Pathophysiology of heart failure. *Cardiovasc. Diagn. Ther.* **2021**, *11*, 263–276. [CrossRef]

30. Tsutsui, H.; Ishihara, K.; Cooper, G., IV. Cytoskeletal role in the contractile dysfunction of hypertrophied myocardium. *Science* **1993**, *260*, 682–687. [CrossRef]
31. Tagawa, H.; Koide, M.; Sato, H.; Zile, M.R.; Carabello, B.A.; Cooper, G., IV. Cytoskeletal role in the transition from compensated to decompensated hypertrophy during adult canine left ventricular pressure overloading. *Circ. Res.* **1998**, *82*, 751–761. [CrossRef] [PubMed]
32. Ishibashi, Y.; Tsutsui, H.; Yamamoto, S.; Takahashi, M.; Imanaka-Yoshida, K.; Yoshida, T.; Urabe, Y.; Sugimachi, M.; Takeshita, A. Role of microtubules in myocyte contractile dysfunction during cardiac hypertrophy in rat. *Am. J. Physiol.* **1996**, *271 Pt 2*, H1978–H1987. [CrossRef] [PubMed]
33. Singh, S.R.; Kadioglu, H.; Patel, K.; Carrier, L.; Agnetti, G. Is desmin propensity to aggregate part of its protective function? *Cells* **2020**, *9*, 491. [CrossRef] [PubMed]
34. Milner, D.J.; Taffet, G.E.; Wang, X.; Pham, T.; Tamura, T.; Hartley, C.; Gerdes, M.A.; Capetanaki, Y. The absence of desmin leads to cardiomyocyte hypertrophy and cardiac dilation with compromised systolic function. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1999**, *31*, 2063–2076. [CrossRef]
35. Heffler, J.; Shah, P.P.; Robison, P.; Phyto, S.; Veliz, K.; Uchida, K.; Bogush, A.; Rhoades, J.; Jain, R.; Prosser, B.L. A balance between intermediate filaments and microtubules maintains nuclear architecture in the cardiomyocyte. *Circ. Res.* **2020**, *126*, e10–e26. [CrossRef]
36. Corbett, J.M.; Why, H.J.; Wheeler, C.H.; Richardson, P.J.; Archard, L.C.; Yacoub, M.H.; Dunn, M.J. Cardiac protein abnormalities in dilated cardiomyopathy detected by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* **2005**, *19*, 2031–2042. [CrossRef]
37. Pawlak, A.; Gil, R.J.; Kulawik, T.; Pronicki, M.; Karkucińska-Więcowska, A.; Szymańska-Debińska, T.; Gil, K.; Lagwinski, N.; Czarnowska, E. Type of desmin expression in cardiomyocytes—A good marker of heart failure development in idiopathic dilated cardiomyopathy. *J. Intern. Med.* **2012**, *272*, 287–297. [CrossRef]
38. Bouvet, M.; Dubois-Deruy, E.; Turkieh, A.; Mulder, P.; Peugeot, V.; Chwastyniak, M.; Beseme, O.; Dechaumes, A.; Amouyel, P.; Richard, V.; et al. Desmin aggregopathy in rat and human ischemic heart failure through PKC $\zeta$  and GSK3 $\beta$  as upstream signalling pathways. *Cell Death Discov.* **2021**, *7*, 153. [CrossRef]
39. Brodehl, A.; Gaertner-Rommel, A.; Milting, H. Molecular insights into cardiomyopathies associated with desmin (DES) mutations. *Biophys. Rev.* **2018**, *10*, 983–1006. [CrossRef]
40. Osborn, M.; Goebel, H.H. The cytoplasmic bodies in a congenital myopathy can be stained with antibodies to desmin, the muscle-specific intermediate filament protein. *Acta Neuropath.* **1983**, *62*, 149–152. [CrossRef]
41. del Monte, F.; Agnetti, G. Protein post-translational modifications and misfolding: New concepts in heart failure. *Proteomics* **2014**, *8*, 534–542. [CrossRef] [PubMed]
42. Leone, O.; Veinot, J.P.; Angelini, A.; Baandrup, U.T.; Basso, C.; Berry, G.; Bruneval, P.; Burke, M.; Butany, J.; Calabrese, F.; et al. 2011 Consensus statement on endomyocardial biopsy from the Association for European Cardiovascular Pathology and the Society for Cardiovascular Pathology. *Cardiovasc. Pathol.* **2012**, *21*, 245–274. [CrossRef] [PubMed]
43. Heidenreich, P.A.; Bozkurt, B.; Aguilar, D.; Allen, L.A.; Byun, J.J.; Colvin, M.M.; Deswal, A.; Drazner, M.H.; Dunlay, S.M.; Evers, L.R.; et al. 2022 AHA/ACC/HFSA Guideline for the management of heart failure: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on clinical practice guidelines. *Circulation* **2022**, *145*, e895–e1032. [CrossRef] [PubMed]
44. WHO Scientific Group on Sudden Cardiac Death & World Health Organization. *Sudden Cardiac Death: Report of a WHO Scientific Group [Meeting Held in Geneva from 24 to 27 October 1984]*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1985; Available online: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/39554> (accessed on 8 August 2023).
45. Zeppenfeld, K.; Tfelt-Hansen, J.; de Riva, M.; Winkel, B.G.; Behr, E.R.; Blom, N.A.; Charron, P.; Corrado, D.; Dagres, N.; de Chillou, C.; et al. 2022 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death. *Eur. Heart J.* **2022**, *43*, 3997–4126. [CrossRef]
46. Michaud, K.; Basso, C.; D'amati, G.; Giordano, C.; Kholová, I.; Preston, S.D.; Rizzo, S.; Sabatasso, S.; Sheppard, M.N.; Vink, A.; et al. Diagnosis of myocardial infarction at autopsy: AECVP reappraisal in the light of the current clinical classification. *Virchows Arch.* **2019**, *476*, 179–194. [CrossRef]


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

No special permission is required to reuse all or part of article published by MDPI, including table and figures. Furthermore, no special permission is required for authors to submit their work to external repositories ([MDPI | Open Access Information](#))



Article

# Expression of Osteopontin and Gremlin 1 Proteins in Cardiomyocytes in Ischemic Heart Failure

Milda Kuprytė<sup>1</sup>, Vaiva Lesauskaitė<sup>2</sup> , Vitalija Siratavičiūtė<sup>1</sup>, Lina Utkienė<sup>1</sup>, Lina Jusienė<sup>1</sup> and Dalia Pangonytė<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Cardiac Pathology, Institute of Cardiology, Lithuanian University of Health Sciences, LT-50161 Kaunas, Lithuania; milda.kupryte@ismuni.lt (M.K.); vitalija.sirataviciute@ismuni.lt (V.S.); lina.utkiene@ismuni.lt (L.U.); lina.jusiene@ismuni.lt (L.J.)

<sup>2</sup> Laboratory of Molecular Cardiology, Institute of Cardiology, Lithuanian University of Health Sciences, LT-50161 Kaunas, Lithuania; vaiva.lesauskaite@ismuni.lt

\* Correspondence: dalia.pangonyte@ismuni.lt

**Abstract:** A relevant role of osteopontin (OPN) and gremlin 1 (Grem1) in regulating cardiac tissue remodeling and formation of heart failure (HF) are documented, with the changes of OPN and Grem1 levels in blood plasma due to acute ischemia, ischemic heart disease-induced advanced HF or dilatative cardiomyopathy being the primary focus in most of these studies. However, knowledge on the early OPN and Grem1 proteins expression changes within cardiomyocytes during remodeling due to chronic ischemia remains insufficient. The aim of this study was to determine the OPN and Grem1 proteins expression changes in human cardiomyocytes at different stages of ischemic HF. A semi-quantitative immunohistochemical analysis was performed in 105 myocardial tissue samples obtained from the left cardiac ventricles. Increased OPN immunostaining intensity was already detected in the stage A HF group, compared to the control group ( $p < 0.001$ ), and continued to increase in the stage B HF ( $p < 0.001$ ), achieving the peak of immunostaining in the stages C/D HF group ( $p < 0.001$ ). Similar data of Grem1 immunostaining intensity changes in cardiomyocytes were documented. Significantly positive correlations were detected between OPN, Grem1 expression in cardiomyocytes and their diameter as well as the length, in addition to positive correlation between OPN and Grem1 expression changes within cardiomyocytes. These novel findings suggest that OPN and Grem1 contribute significantly to reorganization of cellular geometry from the earliest stage of cardiomyocyte remodeling, providing new insights into the ischemic HF pathogenesis.

**Keywords:** osteopontin; gremlin 1; immunohistochemistry; cardiomyocyte remodeling; ischemic heart failure



**Citation:** Kuprytė, M.; Lesauskaitė, V.; Siratavičiūtė, V.; Utkienė, L.; Jusienė, L.; Pangonytė, D. Expression of Osteopontin and Gremlin 1 Proteins in Cardiomyocytes in Ischemic Heart Failure. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 8240. <https://doi.org/10.3390/ijms25158240>

Academic Editor: Anastasios Lymperopoulos

Received: 14 June 2024

Revised: 12 July 2024

Accepted: 23 July 2024

Published: 28 July 2024



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

## 1. Introduction

Heart failure (HF) is a clinical syndrome associated with inadequate cardiac output due to structural and functional abnormalities, with an ischemic origin being one of the principal causes for HF [1]. As a result of improved diagnostic and treatment strategies, the age-adjusted incidence of HF is declining [2], but the total number of patients living with this diagnosed cardiac pathology is still increasing with an estimated 64 million HF patients worldwide, causing a significant medical and economic burden [1]. Although general tendencies of HF pathogenesis mechanisms are well established, studies show that these mechanisms do not adequately address the highly complicated nature of remodeling processes occurring due to ischemic injuries in cardiac muscle until ischemic HF develops. While inducing intracellular protein expression changes in cardiomyocytes of both ischemic and non-ischemic regions of cardiac ventricles, remodeling provides the cellular plasticity to adapt, survive, and regain functionality of the damaged tissue, resulting in changes of the cardiac chamber size, shape, and function [3]. Nonetheless, when these intracellular adaptive mechanisms are exhausted, cardiomyocyte's ability to maintain functionality



starts to become disrupted, leading to the deterioration of the whole cardiac muscle tissue, and eventually progressing towards symptomatic HF [4].

Considering the established cardiomyocyte's role in remodeling and the increasing focus on the changes in intracellular protein expression during the remodeling in myocardial tissue, a scientific interest has emerged focusing on the easily identifiable and representative protein markers to observe the actual reorganization of protein expression changes in cardiomyocytes [4–6]. Osteopontin (OPN), a matricellular phosphorylated glycoprotein [7,8] and a proposed therapeutic HF target [9], is known to balance inflammatory processes, induce expression of genes responsible for cardiomyocyte hypertrophy [10–12], and participate in intercellular communication [13]. Moreover, significant positive correlative trends between the OPN levels in plasma and the deteriorating cardio-metabolic function, severity of cardiac ventricular dysfunction are described [6,14,15]. Also, gremlin 1 (Grem1), a bone morphogenetic protein antagonist of the Dan protein family, crucial in the embryogenesis of the heart [16,17], regulation of specific immune response reactions, remodeling of the tissues [18], and modulation of angiogenesis in hypoxic microenvironment [19], demonstrates diagnostic potential in clinical follow-up and outcome prognosis for acute HF [13].

Studies demonstrate that the OPN and Grem1 expression level changes observed during remodeling can contribute towards determining the cellular functionality potential, while also revealing the new aspects of HF pathogenesis mechanisms and serving as validated diagnostic tools for the detection of therapeutic targets to sustain functionality of cardiac myocytes [9,20]. Also, accurate and quantifiable data on the OPN and Grem1 expression in cardiomyocytes can contribute to the stratification of different risk group patients, follow-up of the HF disease progress, and the evaluation of individualized HF treatment strategy [21–24].

However, despite extensively characterized clinical significance of OPN and Grem1 changes in ischemic HF-associated cardiac injury context, most of the studies present correlative analysis of OPN, Grem1 expression changes and clinical parameters of progressing cardiac dysfunction relying on the blood plasma levels of these proteins [6,13,21,22], without documenting the actual primary source of these changes within myocardial tissue. Notably, a small number of studies focusing on immunohistochemical OPN and Grem1 expression in myocardial tissue cells exist. Still, most of these studies principally describe OPN and Grem1 expression changes in cardiomyocytes that are exposed to dilatative cardiomyopathy, acute ischemia or ischemic heart disease-induced advanced HF [11,23,25,26]. Characterization of the OPN and Grem1 proteins expression changes in cardiomyocytes at the early stages of ischemic HF, crucial for extending the knowledge on the OPN and Grem1 roles in the earliest events within failing cardiomyocytes in ischemic HF pathogenesis and searching for the novel diagnostic or therapeutic targets, remains principally out of scope in these studies. Moreover, most of the studies on OPN and Grem1 expression in HF are largely limited on a single, mostly symptomatic, end-stage HF in animal or cell culture models without control groups as the major limitations of diagnostically applicable results [23–25,27,28]. Therefore, OPN and Grem1 proteins expression data on the earliest events within failing cardiomyocytes during remodeling in myocardial tissue exposed to continuous ischemia before symptomatic ischemic HF in the human organism remain obscure.

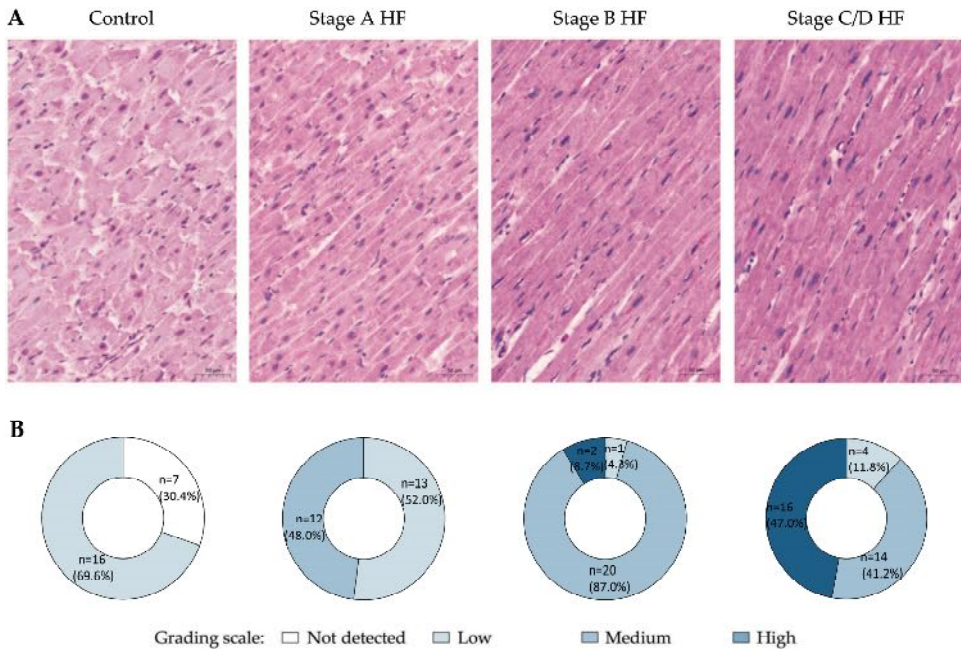
This study aimed to detect and document the significant expression changes of OPN and Grem1 proteins in cardiomyocytes at different stages of ischemic HF, including stage A (at-risk for HF), stage B (pre-HF), and stages C/D HF (symptomatic and advanced HF) according to the American College of Cardiology (ACC)/American Heart Association (AHA) classification [29], by applying validated semi-quantitative immunohistochemical evaluation. Considering the OPN and Grem1 proteins roles in HF pathogenesis, it was hypothesized that significant changes of OPN and Grem1 proteins expression in cardiomyocytes can be already observed at the earliest stages of ischemic HF before the first clinical HF symptoms appear. Further, we have explored the correlation between expression changes of OPN as well as Grem1 proteins in cardiomyocytes and their cellular geomet-

ric parameters, further illustrating the roles of OPN and Grem1 proteins in the earliest events of cardiomyocyte remodeling contributing to advancing ischemic HF. Importantly, experimental animal model data on OPN and Grem1 expression in failing myocardium are translated into the clinical setting by testing the study hypothesis of OPN and Grem1 proteins expression in cardiomyocytes of human myocardial tissues.

**2. Results**

**2.1. OPN Expression**

A semi-quantitative analysis of immunohistochemical reaction against OPN revealed that the low level of OPN staining was predominating in the control group, with approximately one-third of cases documented with no detected OPN immunostaining in cardiomyocytes at all (Figure 1).

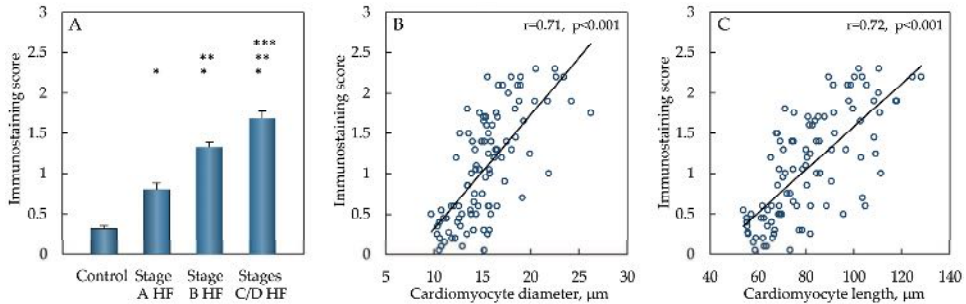


**Figure 1.** Expression patterns of OPN in cardiomyocytes of different groups. (A) Representative images of myocardium immunohistochemistry (OPN, MPIIB10(1)). (B) Pie charts depict group stratification according to the grading scale of immunohistochemical reaction in cardiomyocytes. Abbreviations: HF—heart failure; stages A, B, C, D of HF—according to ACC/AHA classification. Scale bar: 50 µm.

When analyzing OPN immunostaining in cardiomyocytes of the stage A HF group, almost half of the cases within this group demonstrated medium level of OPN expression, while low level of OPN staining was observed in cardiomyocytes of remaining cases. A small number of cases with the high OPN grading scale category was first observed in the stage B HF group, where the medium level of OPN immunostaining in cardiomyocytes was predominant in more than 85% of the cases within this group. The high level of OPN immunostaining in cardiomyocytes was also detected in the stages C/D HF group, where

this grading scale category was observed in almost half of the cases within this group, while more than one-third of cases demonstrated medium level of OPN immunostaining in the same group.

When comparing the OPN immunostaining score, this score increased significantly in the stage A HF group compared to the control group ( $p < 0.001$ ) (Figure 2). OPN immunostaining score continued to increase in the stage B HF group and was significantly higher compared to the control ( $p < 0.001$ ) and stage A HF groups ( $p < 0.001$ ). The highest immunostaining score of OPN expression in cardiomyocytes was detected in the stages C/D HF group, which was significantly increased compared to the control ( $p < 0.001$ ), stage A HF ( $p < 0.001$ ), and stage B HF groups ( $p < 0.001$ ).

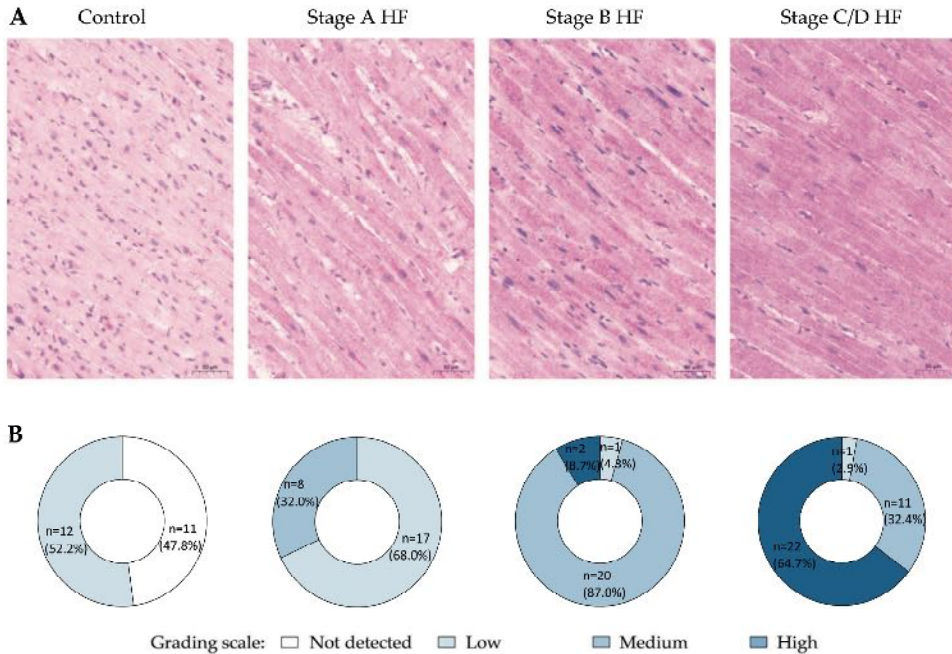


**Figure 2.** OPN expression in different groups. Semi-quantitative analysis results of OPN immunostaining (A), data are presented as mean and standard error: \*  $p < 0.001$ —stage A HF, stage B HF, and stage C/D HF groups compared to the control group; \*\*  $p < 0.001$ —stage B HF and stage C/D groups compared to stage A HF group; \*\*\*  $p < 0.001$ —stages C/D HF group compared to stage B HF group (ANOVA with post hoc Bonferroni tests for multiple comparisons). Correlations of OPN immunostaining score and cardiomyocyte diameter (B), OPN immunostaining score and cardiomyocyte length (C). Abbreviations: HF—heart failure; stages A, B, C, D of HF—according to ACC/AHA classification;  $\mu\text{m}$ —micrometer;  $r$ —Pearson’s correlation coefficient.

While exploring the associative trends of OPN expression in cardiomyocyte and the cardiac myocyte’s geometric parameters, strong positive correlations were detected between the OPN expression in cardiomyocyte’s cytoplasm and its cellular diameter ( $r = 0.71$ ,  $p < 0.001$ ) as well as in the intracytoplasmic OPN expression in cardiac myocytes and the cardiomyocyte length ( $r = 0.72$ ,  $p < 0.001$ ) (see Figure 2).

## 2.2. Grem1 Expression

A low level of Grem1 immunostaining was predominating in more than half of the cases within the control group (Figure 3). Notably, no detectable Grem1 immunostaining in cardiomyocytes was observed in almost half of the control group cases. The medium level of grading scale category was detected in more than one-fourth of the stage A HF group cases, whereas the remaining cases demonstrated predominantly weak immunostaining intensity of Grem1 in cardiomyocytes. Interestingly, the high level of Grem1 was first observed in almost one-tenth of the cases of the stage B HF group, where the medium level of Grem1 immunostaining grading scale was documented in more than 80% cases within this group. The most abundant number of cases presenting a high level of Grem1 immunostaining intensity was observed in the stages C/D HF group with more than two-thirds of the analyzed cases demonstrating predominantly strong Grem1 immunostaining pattern.

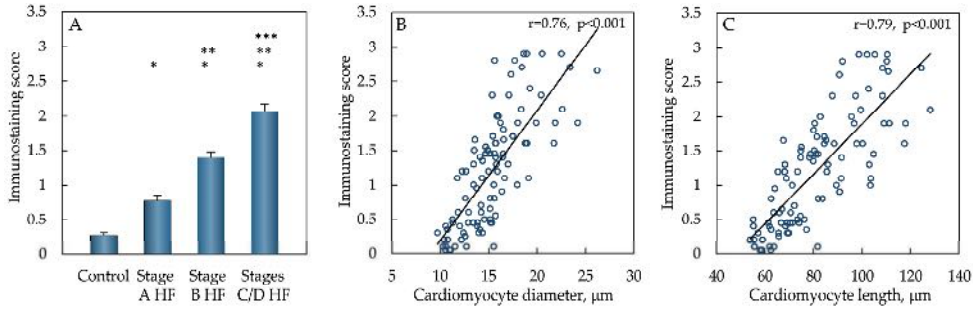


**Figure 3.** Expression patterns of Grem1 in cardiomyocytes of different groups. (A) Representative images of myocardium immunohistochemistry (Grem1, ab22138). (B) Pie charts depict group stratification according to the grading scale of immunohistochemical reaction in cardiomyocytes. Abbreviations: HF—heart failure; stages A, B, C, D of HF—according to ACC/AHA classification. Scale bar: 50  $\mu$ m.

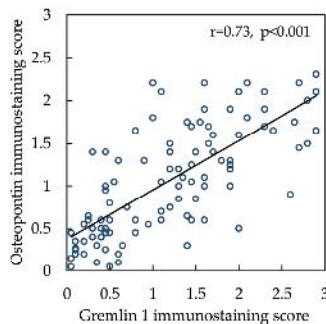
Furthermore, a significantly increased Grem1 immunostaining score was detected in the stage A HF group compared to the control group ( $p < 0.001$ ) (Figure 4). Even higher value of Grem1 immunostaining score was documented in the stage B HF group, when comparing this parameter to the control ( $p < 0.001$ ) and stage A HF groups ( $p < 0.001$ ). Immunostaining score of Grem1 expression in cardiomyocytes continued to increase in the stages C/D HF group, where the highest value of this score was observed, comparing this Grem1 immunostaining score to the control ( $p < 0.001$ ), stage A HF ( $p < 0.001$ ), and stage B HF groups ( $p < 0.001$ ).

Analysis of the correlations between intracytoplasmic Grem1 expression in cardiac myocytes and their diameter as well as the length was performed, and a strong positive correlation was detected between the Grem1 immunostaining score and the cardiomyocyte diameter ( $r = 0.76, p < 0.001$ ), as well as between the Grem1 immunostaining score and the cellular length of cardiac myocyte ( $r = 0.79, p < 0.001$ ) (see Figure 4).

Interestingly, analysis of the correlation between OPN and Grem1 immunostaining scores demonstrated a significantly strong positive correlation of these proteins' expression in the cardiac myocytes ( $r = 0.73, p < 0.001$ ) (Figure 5).



**Figure 4.** Grem1 expression in different groups. Semi-quantitative analysis results of Grem1 immunostaining (A), data are presented as mean and standard error: \*  $p < 0.001$ —stage A HF, stage B HF, and stage C/D HF groups compared to the control group; \*\*  $p < 0.001$ —stage B HF and stage C/D groups compared to stage A HF group; \*\*\*  $p < 0.001$ —stages C/D HF group compared to stage B HF group (ANOVA with post hoc Bonferroni tests for multiple comparisons). Correlations of Grem1 immunostaining score and cardiomyocyte diameter (B), Grem1 immunostaining score and cardiomyocyte length (C). Abbreviations: HF—heart failure; stages A, B, C, D of HF—according to ACC/AHA classification;  $\mu\text{m}$ —micrometer;  $r$ —Pearson’s correlation coefficient.



**Figure 5.** Correlation between OPN and Grem1 immunostaining scores. Abbreviation:  $r$ —Pearson’s correlation coefficient.

### 3. Discussion

OPN is a protein with widely analyzed and acknowledged sensitive diagnostic properties [30], when it comes to different pathologies of irreversibly deteriorating cardiac muscle with progressing HF due to dilatative cardiomyopathy [31], diabetic cardiomyopathy [6], or ischemic heart disease [22,32]. Significant correlative tendencies of OPN and echocardiography parameters, HF course, outcomes, hospitalization, prognostic as well as predictive indicators are documented [30,32]. Behnes M. et al. noticed that plasma levels of OPN were equivalent with echocardiographic left cardiac ventricular parameters and correlated positively with the functional New York Heart Association (NYHA) classification as well as with the structural classification of HF by the ACC/AHA classification in acute HF [30], furthermore emphasizing the overall biological importance of OPN in HF pathogenesis. Still, most of these studies focus on OPN changes measuring the OPN concentration levels in blood plasma, while setting the pathological values of this parameter based on the clinical correlations with HF which is already advanced [22].

To the best of our knowledge, our study is the first attempt to present an extensive characterization of OPN protein expression dynamics in cardiomyocytes, validated by immunohistochemical staining in the different stages of ischemic heart disease-induced HF. Our study is the first one to describe a significantly increased OPN protein expression in cardiomyocytes in the stage A ischemic HF (at-risk for HF), OPN immunostaining intensity evaluated in cardiomyocytes continued to increase significantly at the stage B HF (pre-HF). The predominantly highest level of OPN immunoreactivity was documented in cardiac myocytes at the stages C/D HF (symptomatic and advanced HF). A significantly increased OPN expression was detected in ischemic heart disease-induced HF within sudden cardiac death cases of diabetes mellitus patients compared to the control group in the study by Patel M. et al. [8]. Also, Schipper M. E. I. et al. documented that expression of OPN mRNA as well as the OPN protein in cardiomyocytes of ischemic heart disease-induced advanced HF was significantly decreased after the implantation of left ventricular assist device [23]. These findings of OPN expression changes in cardiac myocytes correlating with progressing cardiac muscle dysfunction suggest that OPN may be directly involved in disrupting the contractile function of the cardiac muscle exposed to ischemia, leading to maladaptive changes of cardiac ventricular geometry, and, eventually, to advanced ischemic heart disease-induced HF.

A correlative trend of OPN expression and the geometric parameters of cardiomyocyte, representing cardiac ventricular geometry changes on a macroscopic scale, revealed significant positive correlative trends between OPN expression in the cardiomyocytes and cellular diameter as well as cellular length of the cardiac myocytes when myocardium is exposed to ischemic injury. To our knowledge, this is the first time such correlations between the OPN protein expression changes within cardiomyocytes and cardiac myocyte geometry are characterized in myocardial tissue exposed to continuous ischemia. Associative trends between the enhanced OPN expression and cardiomyocyte hypertrophy both *in vivo* and *in vitro* were already characterized by Graf et al. in systemic arterial hypertension on animal experiments [11]. The study of OPN expression in dilatative cardiomyopathy demonstrated that the increasing OPN expression in cardiac myocytes was observed simultaneously with the increasing mean diameter of cardiomyocyte in advanced HF ( $r = 0.731, p < 0.001$ ) [25], corresponding to the similar data in our study. Furthermore, Li J. et al. determined that significant dynamic changes of OPN expression and cellular morphometric changes start manifesting quite early after exposure to the injuring factor, with less significant dynamic changes of OPN expression being apparent after 12 weeks of implementing a pressure overload-induced HF experimental model on animals [9], supporting the fact of OPN biological significance at the early stages of cardiomyocyte injury and its effect on cellular geometry changes.

OPN, as a matricellular protein, modulates the processes of intercellular communication, cellular adhesion, and migration under physiological circumstances, and its expression in non-injured cardiomyocytes is documented as low [10], corresponding to the findings of OPN protein expression in the control group of our study. However, when the cardiomyocyte is exposed to ischemic conditions, a more extensive scope of OPN functions is promoted immediately. Initiated intracellular signaling pathways, such as CD44/RAF/RAS/MEK1-2/ERK1-2 or calcineurin/NFAT, lead to the activation of the cellular hypertrophy-inducing genes expression [33,34], eventually manifesting as a compensatory hypertrophy in the cardiac myocyte to serve as a protective mechanism against ischemic cellular injury. Since non-detectable OPN expression in cardiomyocytes was observed exclusively in the control group of our study, it can be hypothesized that the significantly increased OPN expression in cardiomyocytes already observed at the stage A HF of our study demonstrates how sensitive and balanced cellular molecular mechanisms of the remodeling are from the very beginning to react and compensate immediately for any intracellular dysfunctions caused by ischemia.

As remodeling of cardiomyocytes induced by chronic ischemia continues, OPN expression in cardiomyocytes continues to increase simultaneously in stage B ischemic HF

until it reaches a peak of this protein expression in symptomatic and advanced stages of ischemic HF observed in our study. These findings indicate the more complex biological role of OPN in cardiac myocyte remodeling when cardioprotective aspect of OPN functions is lost in advancing ischemic injury of failing cardiac muscle. This can be explained by results of Dalal S. et al. study where researchers revealed that OPN overexpression in adult mice cardiac myocytes leads to increased cardiomyocyte apoptosis via CD44-mediated mitochondrial death pathways and endoplasmic reticulum stress [35]. Also, decrease of cardioprotective OPN effect can be explained by direct inhibitory role of OPN in cardiac  $\beta$ 2AR anti-fibrotic signaling via cAMP/Epac1 pathway described by Pollard C.M. et al. [36]. Together, these mechanisms modulated by changes in cardiomyocyte OPN expression affect functional cardiac ventricular geometry by increasing cardiac wall mass, and ventricular enlargement. Eventually these processes contribute to the increased systolic longitudinal wall stress and global ventricular dysfunction, clinically advancing towards symptomatic HF [37]. Psarras S. et al. determined an increase of the posterior left cardiac ventricular wall thickness by 30% together with an increase of the systolic left cardiac ventricular function by 53% and a decrease of the left cardiac ventricular dilation by 29% with almost normalized end-diastolic diameter values in OPN<sup>-/-</sup> mutated mice with dilatative cardiomyopathy [38], further proving OPN's role in adverse cardiomyocyte remodeling and pathological changes of cardiac ventricular geometry. As a result of decreasing cardiac output, renin-angiotensin-aldosterone system is also activated, further affecting the size of cardiomyocytes, and increasing activity of fibroblasts, thus promoting myocardial stiffness and diastolic dysfunction while progressing to the advanced HF [39].

While representing a more detailed characterization of the processes in cardiomyocytes advancing towards ischemic HF, a significant increase of Grem1 expression in cardiomyocytes was already detected in the ischemic at-risk for HF group compared to the control group in our study. Similarly to OPN expression in cardiomyocytes, Grem1 expression was found to be even more increased in cardiomyocytes of pre-HF group. The highest level of Grem1 immunostaining was detected in the symptomatic and advanced HF group, determining significant differences of Grem1 expression when comparing the results of Grem1 immunostaining analysis to the control, at-risk for HF, and pre-HF groups. Since data on Grem1 expression in cardiomyocytes exposed to ischemia is scarce, these findings firstly presented in our study represent a unique morphological insight of Grem1 expression changes in cardiomyocytes of deteriorating cardiac muscle, advancing towards symptomatic ischemic heart disease-induced HF.

Characterized findings of Grem1 protein expression in cardiomyocytes documented in our study were consistent with study results of Mueller A. L. et al., where intensity of Grem1 expression correlating with the declining left cardiac ventricular function was detected by the immunohistochemistry in the endomyocardial biopsies of patients diagnosed with dilatative cardiomyopathy [24]. Researchers also noticed that 74.8% of selected study cases expressed Grem1 in cardiomyocytes of progressing HF, ranging from very low to very strong intensity of immunohistochemical Grem1 reaction, further emphasizing a significant Grem1 role in the remodeling of cardiomyocytes advancing towards symptomatic HF. Furthermore, Müller I. I. et al. applied Western blot method to confirm that protein levels of Grem1 were the most abundant after 24 h passed after experimental myocardial infarction in mice [26], indicating that effects of Grem1 already manifest at the earliest stages of acute ischemic cardiac muscle injury.

Grem1, a 28 kDa glycosylated protein [40] of Dan protein family of secreted bone matricellular protein (BMP) antagonists, is found in the cellular endoplasmic reticulum and interacts with the elements of the extracellular microenvironment via binding to heparan sulphate proteoglycans in a cell-associated form or resides bound to extracellular glycoalyx close to the protein secretion site near the cellular surface in a secreted form [41–45]. Kaur G. et al. determined that overexpression of Grem1 serves a cardioprotective function by decreasing reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential, increasing signaling of NRF/ERK1 pathway as well as the anti-apoptotic proteins expression [46],

whereas other researchers indicated the protective importance of angiogenesis while preserving the regular cellular function after exposure to hypoxic environment [26,47,48]. The protective angiogenetic effect of Grem1 is modulated via its dimeric form interacting with VEGFR2 as the agonist of this receptor, as described by Rowan G. C. et al. [47].

Further experimental analysis of myocardial tissue affected by hypoxic conditions revealed that Grem1 is also able to downregulate the profibrotic effects of TGF $\beta$  by reducing its functions to activate the collagen synthesis in the myocardial fibroblasts [26], suggesting a more likely complex Grem1 role to maintain the local microenvironmental homeostasis and facilitate the remodeling. Consistent with the protective role of Grem1, Koli K. et al.'s study was able to determine that Grem1 overexpression may lead to a local decrease in the anti-fibrotic Th1 chemokine (CXC10), thus affecting anti-fibrotic chemokine production in pulmonary tissue [18]. Yet, this mechanism of protective Grem1 effect is not characterized in the myocardial tissue.

Moreover, significantly positive correlations between Grem1 expression in cardiomyocytes and the geometric parameters of cardiac myocytes, while the heart muscle is deteriorating towards ischemic HF, were detected in our study. To the best of our knowledge, this is the first time such associative tendencies describing the cardiac myocyte's geometry changes and Grem1 expression in cardiomyocytes at different stages of ischemic HF are characterized. Documented positive correlations between the changing cardiomyocyte geometry parameters and the overexpression of Grem1 in cardiac myocytes can be explained by Grem1 effect to reactivate cellular embryonic programs in many diseases [18]. The reactivation of the cellular embryonic programs promotes microstructural changes of cardiomyocytes by reorganizing their contractile elements and initiating cytoskeletal rearrangements, serving as a one of the key mechanisms in the cardiac myocyte remodeling [3].

Significantly positive correlation of OPN and Grem1 proteins expression in cardiomyocytes exposed to continuous ischemia documented for the first time by our study suggests possible collaborative role of these proteins within cardiomyocyte during the cellular remodeling when advancing towards ischemic heart disease-induced HF. Still, interaction mechanisms between OPN and Grem1 are not entirely clear. The OPN role in activation of cardiomyocyte hypertrophy-inducing genes expression is documented [33,34], and single cell type RNA expression studies demonstrate that Grem1 is found in the same cluster as the cardiac muscle contractility-coordinating components (troponin T2 of cardiac type, myosin-binding protein C3, and myosin light chain 7) [49]. Therefore, taking our findings on positively correlating expression of OPN and Grem1 into consideration, it can be hypothesized that these proteins may collaborate in regulating the expression of contractile proteins in cardiomyocytes during the cellular remodeling, eventually contributing to ischemic HF. Interestingly, knowing that OPN also synergizes with signaling pathways through epithelial growth factor receptor [50], and Grem1 is an important molecule in adult stem cell control as well as tissue differentiation [51], it can be further hypothesized that both OPN and Grem1 proteins may be involved in regulating cellular adaptive plasticity via changing cellular differentiation mechanisms when myocardial tissue is exposed to continuous ischemia.

Despite the recognized role of OPN and Grem1 proteins expression changes in failing cardiac myocytes contributing to ischemic HF pathogenesis, practical application of OPN and Grem1 protein expression observation in cardiomyocytes during remodeling remains problematic. Lack of standardized uniform criteria and corresponding protein expression data based mostly on experimental animal models create obstacles to assessing the OPN and Grem1 expression in myocardial tissue obtained from the human organism properly [52]. This validated semi-quantitative immunohistochemical study of OPN and Grem1 expression in cardiomyocytes advancing towards ischemic HF in representative human myocardial tissue samples provides an easy reproducible method of immunohistochemical myocardial tissue assessment in clinical setting. Moreover, these data characterizing OPN and Grem1 protein expression in cardiomyocytes of control group set a reference criteria, describing significantly increased OPN and Grem1 protein expression already in stage A



ischemic HF, when there are no clinical symptoms of ischemic HF. Therefore, monitoring OPN and Grem1 expression in cardiomyocytes of cardiac muscle tissue fragments (endomyocardial biopsies) can serve as an ancillary diagnostic tool for a clinical follow-up of patients with failing cardiac function before the first symptoms of ischemic HF appear.

The limitations of this study must be stated. OPN and Grem1 expression at the protein level in cardiomyocytes of left cardiac ventricular tissue was analyzed immunohistochemically in our study. We were reluctant to perform mRNA analysis on the archived formalin-fixed paraffin-embedded myocardial tissue. Still, knowing how mRNA is susceptible to degradation, events of RNA fragmentation and RNA cross-linking with tissue proteins during the tissue fixation greatly reduce the amount and quality of extracted RNA, thus misrepresenting OPN and Grem1 mRNA expression in formalin-fixed myocardial tissues.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Study Design and Groups

Myocardial tissue samples from the middle segments of human left cardiac ventricles were selected from the paraffin blocks archive of the Laboratory of Cardiac Pathology of Institute of Cardiology (Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania). In total, 82 selected samples of myocardial tissue were further classified into the stage A HF (at-risk for HF), stage B HF (pre-HF), and stages C/D HF (symptomatic and advanced HF, correspondingly) based on the ACC/AHA classification [29].

The demographic and clinical characteristics of the study groups are presented in Table 1. Stage A HF (or at-risk for HF) group was composed of previously healthy male individuals or whose health state had improved or stabilized prior to their death, and who died suddenly due to ischemic heart disease within six hours of experiencing the symptoms of ischemic heart disease [53,54]. No previous HF symptoms were reported for these individuals. A complete postmortem morphological investigation of the heart was performed for them. Acute ischemic injuries of no more than 6 h were documented, and no scars after myocardial infarction were detected in all the cases of this group [55]. The stage B (pre-HF) group was defined by the same characteristics as aforementioned group, except the morphological changes of a scar after myocardial infarction were detected during postmortem morphological investigation of the left cardiac ventricle. The stages C/D HF (symptomatic and advanced HF) group was comprised of male patients who were clinically diagnosed with symptomatic or advanced ischemic HF classified as stage C or D according to ACC/AHA classification [29], a surgical procedure of a heart transplantation was performed for them, and a complete morphological investigation of the explanted heart was carried out.

**Table 1.** Characteristics of the study population by groups.

Characteristic	Control Group n = 23	Stage A HF Group n = 25	Stage B HF Group n = 23	Stages C/D HF Group n = 34
Age (SD), years	50.5 (7.9)	53.8 (8.0)	54.4 (7.7)	56.2 (7.2)
Sex	Male	Male	Male	Male
Previous clinical symptoms of HF	No	No	No	Yes
Atherosclerotic stenosis $\geq$ 75% in at least one coronary artery	No	Yes	Yes	Yes
Scar after myocardial infarction	No	No	Yes	Yes
Mean length (SD) of left ventricular cardiomyocyte, $\mu$ m [56]	61.8 (6.3)	72.2 (5.4)	78.9 (6.3)	103.3 (10.7)
Mean diameter (SD) of left ventricular cardiomyocyte, $\mu$ m [56]	11.7 (1.5)	14.3 (1.0)	15.2 (1.3)	18.9 (2.7)

Abbreviations: HF—heart failure; stages A, B, C, D of HF—according to ACC/AHA classification; SD—standard deviation.

Male patients who died from the external causes or acute non-cardiovascular diseases, and their hearts were examined during postmortem morphological investigation were selected as a control group.

No other diseases or conditions, such as systemic arterial hypertension, congenital or acquired cardiac valve disease, cardiomyopathy, diabetes mellitus or pulmonary diseases, that could lead to the heart's remodeling were diagnosed for all these patients. A comprehensive histological examination was performed for all selected cases before an immunohistochemical study. Therefore, samples of myocardial tissue from the middle segments of the free wall of left cardiac ventricles in all selected cases were extracted with special attention to avoiding the areas affected by acute ischemic injuries or scarring after myocardial infarction.

#### 4.2. Immunohistochemistry

An immunohistochemical approach with independent antibody validation strategy in accordance with recommendations by the International Working Group for Antibody Validation was adopted to evaluate expression of OPN and Grem1 in cardiomyocytes in ischemic HF [57–59].

Selected formalin-fixed paraffin embedded myocardial tissue samples were cut into 3  $\mu$ m microsections applying a Leica RM2235 microtome (Leica Biosystems, Deer Park, IL, USA), mounting these microsections on Menzel SuperFrost Plus slides (Menzel, Braunschweig, Germany) afterwards. The slides were left to air-dry at room temperature overnight and baked at 50 °C for a minimum of 12 h. Deparaffinization by xylene, immersion in decreasing concentrations of ethyl alcohol and rehydration with distilled water procedures were performed.

Antigen retrieval was performed applying a microwave tissue processor RHS-1 (Milestone Medical, Roseland, NJ, USA) and incubating the samples in TRIS/EDTA buffer (Target Retrieval Solution, pH 9.0, Agilent Technologies Inc., Wood Dale, IL, USA) at 110 °C for 8 min. Immunohistochemical staining was performed using “Shandon Coverplate” plates (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Endogenous peroxidase was blocked.

Two distinct primary antibodies were applied to assess OPN expression in cardiomyocytes: monoclonal mouse anti-human OPN (MPIIB10(1)) antibody (Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA, USA) and polyclonal rabbit anti-human OPN (PA5-13494) antibody (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (Table 2). The aforementioned strategy was also applied to evaluate Grem1 expression in cardiomyocytes: polyclonal rabbit anti-human Grem1 (ab22138) antibody (Abcam, Cambridge, UK) and polyclonal rabbit anti-human Grem1 (GTx03394) antibody (GeneTex, Irvine, CA, USA).

**Table 2.** Characteristics of the primary antibodies used for immunohistochemistry.

Antibody	Species	Immunogen	Dilution	Manufacturer (Catalog Number)	RRID	Lot Number
Osteopontin (OPN)	Mouse monoclonal	Bone protein fractions, immunogen sequence—full length	1:100	Developmental Studies Hybridoma Bank, DSHB (MPIIB10(1))	AB_2286610	-
Osteopontin (OPN)	Rabbit polyclonal	KLH conjugated synthetic peptide corresponding to amino acids 273 through 301 from the C-terminal region of human SPP1	1:50	Thermo Fisher Scientific (PA5-13494)	AB_2286594	Y14041893
Gremlin 1 (Grem1)	Rabbit polyclonal	Synthetic peptide, corresponding to amino acids from 52 through 67	1:100	Abcam (ab22138)	AB_446814	GR3362005-1
Gremlin 1 (Grem1)	Rabbit polyclonal	KLH conjugated synthetic peptide derived from human gremlin 1, corresponding to amino acids from 101 through 184	1:200	GeneTex (GTx03394)	-	822303719

Abbreviations: OPN—osteopontin; Grem1—gremlin 1; KLH—keyhole limpet hemocyanin; SPP1—secreted phosphoprotein 1; DSHB—Developmental Studies Hybridoma Bank; RRID—Research Resource Identifier.

Primary antibodies of OPN and Grem1 were diluted with Antibody Diluent (Agilent Dako, S080983, Santa Clara, CA, USA) by applying appropriate proportions of dilution (see Table 2). They were incubated at room temperature for 60 min. Afterwards, EnVision FLEX+ visualization system with Mouse or Rabbit Linker and HRP Magenta chromogen (Agilent Dako, K800221-2, K802121-2, GV92511-2, Santa Clara, CA, USA), following the manufacturer's instructions, was applied. Procedures of hematoxylin counterstaining (Agilent Dako, S330930-2, Santa Clara, CA, USA), dehydration by increasing concentrations of ethyl alcohol and xylene were performed before permanent coverslip using a polystyrene coating material.

The tissue fragments of breast carcinoma served as a positive control for anti-human OPN antibody, whereas kidney tissue samples served as a positive control for anti-human Grem1 antibody. The same protocols of immunohistochemical reactions were applied in all these control tissues as in analyzed myocardial samples, running these immunohistochemical reactions simultaneously. This step was performed to ensure the specificity of the primary antibodies. The IgG of the same isotype as the primary antibody dilution served as a reagent control, not yielding any specific staining.

#### 4.3. Analysis of OPN and Grem1 Immunostaining

A semi-quantitative evaluation for OPN and Grem1 expression in cardiomyocytes was applied by using a score evaluation for the immunohistochemical reaction intensity: 0 points = not detected, 1 point = weak, 2 points = moderate, 3 points = strong. The results of each immunohistochemical reactions were observed in the 50 microscopic fields at 40× magnification (light microscopy, motorized microscope Olympus BX51, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) for each selected case, indicating the amount of cardiomyocytes within each category of grading scale separately in the selected case according to the study design (% of all the longitudinal plane cardiomyocytes per case). A formula to evaluate the overall scope of the intensity of the immunohistochemical reactions in the selected myocardial tissue was applied: immunostaining score = (1 point × amount of the representative cardiomyocytes %) + (2 points × amount of the representative cardiomyocytes %) + (3 points × amount of the representative cardiomyocytes %)/10.

Also, analysis of the immunohistochemical reactions against OPN and Grem1 was performed applying a stratification system, based on the workflow outlined in the Human Protein Atlas [60]: 0 = not detected (negative or weak staining in less than 25% of cardiomyocytes); 1 = low (weak staining in at least 25% of cardiomyocytes and moderate staining in less than 25% of cardiomyocytes); 2 = medium (moderate staining in at least 25% of cardiomyocytes or strong staining in less than 25% of cardiomyocytes), 3 = high (strong staining of at least 25% cardiomyocytes). The categories characterized on the workflow by the Human Protein Atlas were identified for each selected case in the stage A HF, stage B HF, stages C/D HF, and control groups.

Results of OPN and Grem1 immunohistochemical reactions applying the independent antibody validation strategy in accordance with recommendations by the International Working Group for Antibody Validation [57–59] revealed no significant differences when analyzing the immunohistochemical reactions with the alternative immunogens of OPN and Grem1 antibodies, concluding that the immunohistochemical study had the enhanced reliability score [60]. The evaluation was performed by two researchers independently, and none of these researchers knew what the groups of selected cases during this process of evaluation were. The inter-observer and intra-observer variability was evaluated by Kappa ( $\kappa$ ) statistics (Cohen's  $\kappa$  coefficient > 0.9).

#### 4.4. Statistical Analysis

Normality of continuous variables distribution was assessed with the Shapiro-Wilk tests. Continuous variable that fits normality distribution was reported as mean (standard deviation or standard error). Statistically significant differences between the stage A HF, stage B HF, stages C/D HF, and control groups were determined by ANOVA with post hoc

Bonferroni tests for multiple comparisons. Pearson's correlation was applied for evaluating correlation trends. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant. Statistical analysis was performed by Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software (SPSS Statistics version 29.0, IBM, Armonk, NY, USA).

## 5. Conclusions

A significant increase of OPN and Grem1 proteins expression in cardiomyocytes, already observed in the stage A HF (or at-risk for HF) group, was documented in our study by immunohistochemical analysis, continuing to increase in the stage B HF (or pre-HF) group, and achieving the peak expression in the stages C/D HF. These novel findings, together with the characterized positive correlations between the changes of OPN and Grem1 expression in cardiac myocytes and their cellular geometry suggest that OPN and Grem1 are involved in rearranging cardiomyocyte's geometry and possibly functions of intracellular contractile elements from the earliest stage of cardiac myocyte remodeling, providing a new insight into the pathogenesis mechanism of ischemic HF.

Considering the role of OPN and Grem1 in the pathogenesis mechanisms of ischemic heart disease-induced HF, targeting OPN and Grem1 as the possible diagnostic and therapeutic agents can create an alternative option in the attempts to optimize the individual patient-focused healthcare strategy for ischemic HF patients. Also, our data provide a validated source for ongoing studies in the *OPN* and *Grem1* genes translation, diagnostic and therapeutic HF targets research, thus extending the overall fundamental knowledge on the remodeling processes in cardiomyocytes and HF pathogenesis.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.K., V.L. and D.P.; methodology, M.K. and D.P.; validation, M.K. and D.P.; formal analysis, M.K., V.S. and D.P.; investigation, M.K., V.S., L.U. and L.J.; resources, V.L. and D.P.; data curation, M.K. and D.P.; writing—original draft preparation, M.K.; writing—review and editing, D.P. and V.L.; visualization, M.K. and D.P.; supervision, V.L. and D.P.; project administration, V.L. and D.P.; funding acquisition, V.L. and D.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was supported by the Science Fund of Lithuanian University of Health Sciences (Order of the Rector of Lithuanian University of Health Sciences for the Support of the Doctoral Scientific Research by the Science Fund of Lithuanian University of Health Sciences No. V-786).

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Local Kaunas Ethics Committee for Biomedical Research (No. BE-2-77, 15 September 2022, Kaunas, Lithuania).

**Informed Consent Statement:** Patient consent was waived because, according to the "Lithuanian Republic National Law for Biomedical Research" (No. VIII-1679, clause no. 7, subclause no. 11, 11/05/2000) and "Regulations for Performing the Biomedical Research when the Object of Study is Medical Documentation" (ratified by Order of Director of Lithuanian Bioethical Committee, no. V-28, 27/07/2011), the object of this study contains biological samples and clinical information obtained for clinical diagnostic purposes before the biomedical research was conceptualized and performed. Only residual material of biological samples after diagnostic pathology procedures were analyzed in this research. All biological data analyzed in the study were encoded anonymously and identification of any personal patient's data cannot be retraced.

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

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

## Abbreviations

ACC/AHA: American College of Cardiology/American Heart Association; ANOVA: analysis of variance;  $\beta$ 2AR: beta 2 adrenergic receptor; BMP: bone matricellular protein; cAMP: cyclic adenosine monophosphate; CD44: cluster of differentiation 44; CXC10: C-X-C motif chemokine 10; DSHB: Developmental Studies Hybridoma Bank; Epac1: exchange factor activated by cAMP1; ERK1-2: extra-

cellular signal-regulated kinase 1-2; Grem1: gremlin 1; HF: heart failure; HRP: horseradish peroxidase; Ig: immunoglobulin; kDa: kilodalton; KLH: keyhole limpet hemocyanin; MEK1-2: mitogen-activated protein kinase 1-2; NFAT: nuclear factor of activated T-cells; NRF: nuclear respiratory factor; NYHA: New York Heart Association; OPN: osteopontin; RAF kinase: rapidly accelerated fibrosarcoma kinase; RAS protein: rat sarcoma virus protein; RRID: research resource identifier; SD: standard deviation; SPP1: secreted phosphoprotein 1; TGFβ: transforming growth factor beta; VEGFR2: vascular endothelial growth factor receptor 2.

## References

- Shahim, B.; Kapelios, C.J.; Savarese, G.; Lund, L.H. Global public health burden of heart failure: An updated review. *Card Fail Rev.* **2023**, *9*, e11. [CrossRef] [PubMed]
- Tsao, C.W.; Aday, A.W.; Almarazgo, Z.I.; Anderson, C.A.M.; Arora, P.; Avery, C.L.; Baker-Smith, C.M.; Beaton, A.Z.; Boehme, A.K.; Buxton, A.E.; et al. Heart disease and stroke statistics—2023 update: A report from the American Heart Association. *Circulation* **2023**, *147*, e93–e621. [CrossRef] [PubMed]
- Szibor, M.; Pöling, J.; Warnecke, H.; Kubin, T.; Braun, T. Remodeling and dedifferentiation of adult cardiomyocytes during disease and regeneration. *Cell. Mol. Life Sci.* **2014**, *71*, 1907–1916. [CrossRef] [PubMed]
- Opie, L.H.; Commerford, P.J.; Gersh, B.J.; Pfeffer, M.A. Controversies in ventricular remodelling. *Lancet* **2006**, *367*, 356–367. [CrossRef]
- Kalogeropoulos, A.; Georgiopoulou, V.; Psaty, B.M.; Rodondi, N.; Smith, A.L.; Harrison, D.G.; Liu, Y.; Hoffman, U.; Bauer, D.C.; Newman, A.B.; et al. Inflammatory markers and incident heart failure risk in older adults: The health ABC (health, aging, and body composition) study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2010**, *55*, 2129–2137. [CrossRef] [PubMed]
- Scurcinin, A.; Andreozzi, F.; Sgura, C.; Ministrini, S.; Bertolotto, M.; Ramoni, D.; Liberale, L.; Camici, G.G.; Mannino, G.C.; Succurro, E.; et al. Osteopontin levels correlate with severity of diabetic cardiomyopathy in early stage of diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2023**, *203*, 110885. [CrossRef] [PubMed]
- Amilca-Seba, K.; Tan, T.Z.; Thiery, J.-P.; Louadj, L.; Thouroude, S.; Bouygues, A.; Sabbah, M.; Larsen, A.K.; Denis, J.A. Osteopontin (OPN/SPP1), a mediator of tumor progression, is regulated by the mesenchymal transcription factor Slug/SNAI2 in colorectal cancer (CRC). *Cells* **2022**, *11*, 1808. [CrossRef] [PubMed]
- Patel, M.; Rodriguez, D.; Yousefi, K.; John-Williams, K.; Mendez, A.J.; Goldberg, R.B.; Lymperopoulos, A.; Tamariz, L.J.; Goldberger, J.J.; Myerburg, R.J.; et al. Osteopontin and LDLR are upregulated in hearts of sudden cardiac death victims with heart failure with preserved ejection fraction and diabetes mellitus. *Front. Cardiovasc. Med.* **2020**, *7*, 610282. [CrossRef] [PubMed]
- Li, J.; Yousefi, K.; Ding, W.; Singh, J.; Shehadeh, L.A. Osteopontin RNA aptamer can prevent reverse pressure overload-induced heart failure. *Cardiovasc. Res.* **2017**, *113*, 633–643. [CrossRef]
- Singh, K.; Balligand, J.L.; Fischer, T.A.; Smith, T.W.; Kelly, R.A. Glucocorticoids increase osteopontin expression in cardiac muscle cells and microvascular endothelial cells. Role in regulation of inducible nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **1995**, *27*, 28471–28478. [CrossRef]
- Graf, K.; Do, Y.S.; Ashizawa, N.; Meehan, W.P.; Giachelli, C.M.; Marboe, C.C.; Fleck, E.; Hsueh, W.A. Myocardial osteopontin expression is associated with left ventricular hypertrophy. *Circulation* **1997**, *96*, 3063–3071. [CrossRef] [PubMed]
- Lorenzen, J.M.; Schauerer, C.; Hübner, A.; Kölling, M.; Martino, F.; Scherf, K.; Batkai, S.; Zimmer, K.; Foinquinos, A.; Kaucsar, T.; et al. Osteopontin is indispensable for AP1-mediated angiotensin II-related miR-21 transcription during cardiac fibrosis. *Eur. Heart J.* **2015**, *36*, 2184–2196. [CrossRef] [PubMed]
- Behnes, M.; Bertsch, T.; Weiss, C.; Ahmad-Nejad, P.; Akin, I.; Fastner, C.; El-Battrawy, I.; Lang, S.; Neumaier, M.; Borggrefe, M.; et al. Triple head-to-head comparison of fibrotic biomarkers galectin-3, osteopontin and gremlin-1 for long-term prognosis in suspected and proven acute heart failure patients. *Int. J. Cardiol.* **2016**, *203*, 398–406. [CrossRef] [PubMed]
- Soejima, H.; Irie, A.; Fukunaga, T.; Oe, Y.; Kojima, S.; Kaikita, K.; Kawano, H.; Sugiyama, S.; Yoshimura, M.; Kishikawa, H.; et al. Osteopontin expression of circulating T cells and plasma osteopontin levels are increased in relation to severity of heart failure. *Circ. J.* **2007**, *71*, 1879–1884. [CrossRef]
- Singh, M.; Foster, C.R.; Dalal, S.; Singh, K. Osteopontin: Role in extracellular matrix deposition and myocardial remodeling post-MI. *J. Mol. Cell Cardiol.* **2010**, *48*, 538–543. [CrossRef]
- Rider, C.C.; Mulloy, B. Bone morphogenetic protein and growth differentiation factor cytokine families and their protein antagonists. *Biochem. J.* **2010**, *429*, 1–12. [CrossRef]
- Kami, D.; Shiojima, I.; Makino, H.; Matsumoto, K.; Takahashi, Y.; Ishii, R.; Naito, A.T.; Toyoda, M.; Saito, H.; Watanabe, M.; et al. Gremlin enhances the determined path to cardiomyogenesis. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e2407. [CrossRef] [PubMed]
- Koli, K.; Sutinen, E.; Rönty, M.; Rantakari, P.; Fortino, V.; Pulkkinen, V.; Greco, D.; Sipilä, P.; Myllärniemi, M. Gremlin-1 overexpression in mouse lung reduces silica-induced lymphocyte recruitment—a link to idiopathic pulmonary fibrosis through negative correlation with CXCL10 chemokine. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0159010. [CrossRef]

19. Cahill, E.; Costello, C.M.; Rowan, S.C.; Harkin, S.; Howell, K.; Leonard, M.O.; Southwood, M.; Cummins, E.P.; Fitzpatrick, S.F.; Taylor, C.T.; et al. Gremlin plays a key role in the pathogenesis of pulmonary hypertension. *Circulation* **2012**, *125*, 920–930. [CrossRef]
20. Iansen Irion, C.; Dunkley, J.C.; John-Williams, K.; Condor Capcha, J.M.; Shehadeh, S.A.; Pinto, A.; Loebe, M.; Webster, K.A.; Brozzi, N.A.; Shehadeh, L.A. Nuclear osteopontin is a marker of advanced heart failure and cardiac allograft vasculopathy: Evidence from transplant and retransplant hearts. *Front. Physiol.* **2020**, *11*, 928. [CrossRef]
21. Coculescu, B.-I.; Manole, G.; Valeriu Dinca, G.; Coculescu, E.C.; Berteau, C.; Stoceci, C.M. Osteopontin—a biomarker of disease, but also of stage stratification of the functional myocardial contractile deficit by chronic ischemic heart disease. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2019**, *34*, 783–788. [CrossRef] [PubMed]
22. Cheong, K.-I.; Leu, H.B.; Wu, C.-C.; Yin, W.-H.; Wang, J.-H.; Lin, T.-H.; Tseng, W.-K.; Chang, K.-C.; Chu, S.-H.; Yeh, H.-I.; et al. The clinical significance of osteopontin on the cardiovascular outcomes in patients with stable coronary artery disease. *J. Formos. Med. Assoc.* **2023**, *122*, 328–337. [CrossRef] [PubMed]
23. Schipper, M.E.I.; Scheenstra, M.R.; van Kuik, J.; van Wichen, D.F.; van der Weide, P.; Dullens, H.F.J.; Lahpor, J.; de Jonge, N.; De Weger, R.A. Osteopontin: A potential biomarker for heart failure and reverse remodeling after left ventricular assist device support. *J. Heart Lung Transplant.* **2011**, *30*, 805–810. [CrossRef] [PubMed]
24. Mueller, K.A.L.; Tavlaki, E.; Schneider, M.; Jorbenadze, R.; Gei, T.; Kandolf, R.; Gawaz, M.; Mueller, I.I.; Zuern, C.S. Gremlin-1 identifies fibrosis and predicts adverse outcome patients with heart failure undergoing endomyocardial biopsy. *J. Cardiac. Fail.* **2013**, *19*, 6780684. [CrossRef] [PubMed]
25. Stawowy, P.; Blaschke, F.; Pfausch, P.; Goetze, S.; Lippek, F.; Wollert-Wulf, B.; Fleck, E.; Graf, K. Increased myocardial expression of osteopontin in patients with advanced heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* **2002**, *4*, 139–146. [CrossRef] [PubMed]
26. Müller, I.I.; Schneider, M.; Müller, K.A.L.; Lunov, O.; Borst, O.; Simmet, T.; Gawaz, M. Protective role of Gremlin-1 in myocardial function. *Eur. J. Clin. Invest.* **2021**, *51*, e13539. [CrossRef] [PubMed]
27. Rosenberg, M.; Meyer, F.J.; Gruenig, E.; Lutz, M.; Lossnitzer, D.; Wipplinger, R.; Katus, H.A.; Frey, N. Osteopontin predicts adverse right ventricular remodelling and dysfunction in pulmonary hypertension. *Eur. J. Clin. Invest.* **2012**, *42*, 933–942. [CrossRef] [PubMed]
28. Subramanian, V.; Krishnamurthy, P.; Singh, K.; Singh, M. Lack of osteopontin improves cardiac function in streptozotocin-induced diabetic mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2007**, *292*, H673–H683. [CrossRef]
29. Heidenreich, P.A.; Bozkurt, B.; Aguilar, D.; Allen, L.A.; Byun, J.J.; Colvin, M.M.; Deswal, A.; Drazner, M.H.; Dunlay, S.M.; Evers, L.R.; et al. 2022 AHA/ACC/HFSA Guideline for the management of heart failure: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on clinical practice guidelines. *Circulation* **2022**, *145*, e895–e1032. [CrossRef]
30. Behnes, M.; Brueckmann, M.; Lang, S.; Espeter, F.; Weiss, C.; Neumaier, M.; Ahmad-Nejad, P.; Borggrefe, M.; Hoffman, U. Diagnostic and prognostic value of osteopontin in patients with acute congestive heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* **2013**, *15*, 1390–1400. [CrossRef]
31. Podzimkova, J.; Palecek, T.; Kuchynka, P.; Marek, J.; Danek, B.A.; Jachymova, M.; Safarikova, M.; Kalousova, M.; Zima, T.; Linhart, A. Plasma osteopontin levels, but not its myocardial expression, reflect heart failure severity in recently diagnosed dilated cardiomyopathy. *Herz* **2020**, *45*, S105–S110. [CrossRef] [PubMed]
32. Georgiadou, P.; Iliodromitis, E.F.; Kolokathis, F.; Varounis, C.; Gizas, V.; Mavroidis, M.; Capetanaki, Y.; Boudoulas, H.; Kremastinos, D.T. Osteopontin as a novel prognostic marker in stable ischaemic heart disease: A 3-year follow-up study. *Eur. J. Clin. Invest.* **2010**, *40*, 288–293. [CrossRef]
33. Mamazhakypov, A.; Sartmyrzaeva, M.; Sarybaev, A.S.; Schermuly, R.; Sydykov, A. Clinical and molecular implications of osteopontin in heart failure. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2022**, *44*, 3573–3597. [CrossRef]
34. Mohamed, I.A.; Gadeau, A.P.; Fliegel, L.; Lopaschuk, G.; Mlih, M.; Abdulrahman, N.; Fillmore, N.; Mraiche, F. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1-induced osteopontin expression facilitates cardiomyocyte hypertrophy. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0123318. [CrossRef] [PubMed]
35. Dalal, S.; Zha, Q.; Daniels, C.R.; Steagall, R.J.; Joyner, W.L.; Gadeau, A.P.; Singh, M.; Singh, K. Osteopontin stimulates apoptosis in adult cardiac muscle cells via the involvement of CD44 receptors, mitochondrial death pathway, and endoplasmic reticulum stress. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2014**, *306*, H1182–H1191. [CrossRef] [PubMed]
36. Pollard, C.M.; Desimone, V.L.; Wertz, S.L.; Perez, A.; Parker, B.M.; Maning, J.; McCrink, K.A.; Shehadeh, L.A.; Lymperopoulos, A. Deletion of osteopontin enhances beta (2)-adrenergic receptor-dependent anti-fibrotic signaling in cardiomyocytes. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1396. [CrossRef] [PubMed]
37. Del Buono, M.G.; Moroni, F.; Montone, R.A.; Azzalini, L.; Sanna, T.; Abbate, A. Ischemic cardiomyopathy and heart failure after acute myocardial infarction. *Curr. Cardiol. Rep.* **2022**, *24*, 1505–1515. [CrossRef] [PubMed]
38. Psarras, S.; Mavroidis, M.; Saboudou, D.; Davos, C.H.; Xanthou, G.; Varela, A.E.; Panoutsakopoulou, V.; Capetanaki, Y. Regulation of adverse remodelling by osteopontin in a genetic heart failure module. *Eur. Heart J.* **2012**, *33*, 1954–1963. [CrossRef]
39. Schwinger, R.H.G. Pathophysiology of heart failure. *Cardiovasc. Diagn. Ther.* **2021**, *11*, 263–276. [CrossRef]
40. Beck, S.; Simmet, T.; Müller, I.; Lang, F.; Gawaz, M. Gremlin-1 C-terminus regulates function of Macrophage Inhibitory Factor (MIF). *Cell Physiol. Biochem.* **2016**, *38*, 801–808. [CrossRef]

41. Kišonaitė, M.; Wang, X.; Hyvönen, M. Structure of Gremlin-1 and analysis of its interaction with BMP-2. *Biochem. J.* **2016**, *473*, 1593–1604. [CrossRef] [PubMed]
42. Stabile, H.; Mitola, S.M.F.; Moroni, E.; Belleri, M.; Nicoli, S.; Coltrini, D.; Peri, F.; Pessi, A.; Orsatti, L.; Talamo, F.; et al. Bone morphogenic protein antagonist *Drm/gremlin* is a novel proangiogenic factor. *Blood* **2007**, *109*, 1834–1840. [CrossRef] [PubMed]
43. Mueller, I.; Schönberg, T.; Schneider, M.; Borst, O.; Ziegler, M.; Seizer, P.; Leder, C.; Mueller, K.; Lang, M.; Appenzeller, F.; et al. Gremlin-1 is an inhibitor of macrophage migration inhibitory factor and attenuates atherosclerotic plaque growth in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 31635–31645. [CrossRef]
44. Topol, L.Z.; Bardot, B.; Zhang, Q.; Resau, J.; Huillard, E.; Marx, M.; Calothy, G.; Blair, D.G. Biosynthesis, post-translation modification, and functional characterization of *Drm/Gremlin*. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 8785–8793. [CrossRef]
45. Maciel, T.T.; Melo, R.S.; Schor, N.; Campos, A.H. Gremlin promotes vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *J. Mol. Cell Cardiol.* **2008**, *44*, 370–379. [CrossRef]
46. Kaur, G.; Wang, X.; Li, X.; Ong, H.; He, X.; Cai, C. Overexpression of GREM1 improves the survival capacity of aged cardiac mesenchymal progenitor cells via upregulation of the ERK/NRF2-associated antioxidant signal pathway. *Cells* **2023**, *12*, 1203. [CrossRef]
47. Rowan, S.C.; Piuzeau, L.; Cornwell, J.; Li, L.; McLoughlin, P. Gremlin 1 blocks vascular endothelial growth factor signaling in the pulmonary microvascular endothelium. *Pulm. Circ.* **2020**, *10*, 1–11. [CrossRef]
48. Sun, Z.; Cai, S.; Liu, C.; Cui, Y.; Ji, J.; Jiang, W.G.; Ye, L. Increased expression of Gremlin1 promotes proliferation and epithelial mesenchymal transition in gastric cancer cells and correlates with poor prognosis of patients with gastric cancer. *Cancer Genom. Proteom.* **2020**, *17*, 49–60. [CrossRef] [PubMed]
49. The Human Protein Atlas: Gremlin-1—RNA Single Cell Type Specificity. Available online: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000166923-GREM1/single-cell+type> (accessed on 1 June 2024).
50. Shevde, L.A.; Samant, R.S. Role of osteopontin in the pathophysiology of cancer. *Matrix Biol.* **2014**, *37*, 131–141. [CrossRef] [PubMed]
51. Gooding, S.; Leedham, S.J. Gremlin 1—small protein, big impact: The multiorgan consequences of disrupted BMP antagonism. *J. Pathol.* **2020**, *251*, 349–352. [CrossRef]
52. Leone, O.; Veinot, J.P.; Angelini, A.; Baandrup, U.T.; Basso, C.; Berry, G.; Bruneval, P.; Burke, M.; Butany, J.; Calabrese, F.; et al. 2011 Consensus statement on endomyocardial biopsy from the Association for European Cardiovascular Pathology and the Society for Cardiovascular Pathology. *Cardiovasc. Pathol.* **2012**, *21*, 245–274. [CrossRef]
53. WHO Scientific Group on Sudden Cardiac Death; World Health Organization. *Sudden Cardiac Death: Report of a WHO Scientific Group [Meeting Held in Geneva from 24 to 27 October 1984]*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1985; Available online: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/39554> (accessed on 27 September 2023).
54. Zeppenfeld, K.; Tfelt-Hansen, J.; de Riva, M.; Winkel, B.G.; Behr, E.R.; Blom, N.A.; Charron, P.; Corrado, D.; Dagres, N.; de Chillou, C.; et al. 2022 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death. *Eur. Heart J.* **2022**, *43*, 3997–4126. [CrossRef]
55. Michaud, K.; Basso, C.; d’Amati, G.; Giordano, C.; Kholova, I.; Preston, S.D.; Rizzo, S.; Sabatasso, S.; Sheppard, M.N.; Vink, A.; et al. Diagnosis of myocardial infarction at autopsy: AECVP reappraisal in the light of the current clinical classification. *Virchows Arch.* **2020**, *476*, 179–194. [CrossRef]
56. Kupryté, M.; Lesauskaitė, V.; Keturakis, V.; Bunevičienė, V.; Utkienė, L.; Jusienė, L.; Pangonytė, D. Remodeling of cardiomyocytes: Study of morphological cellular changes preceding symptomatic ischemic heart failure. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 14557. [CrossRef]
57. Uhlen, M.; Bandrowski, A.; Carr, S.; Edwards, A.; Ellenberg, J.; Lundberg, E.; Rimm, D.L.; Rodriguez, H.; Hiltke, T.; Snyder, M.; et al. A proposal for validation of antibodies. *Nat Methods* **2016**, *13*, 823–827. [CrossRef]
58. Edfors, F.; Hober, A.; Linderbäck, K.; Maddalo, G.; Azimi, A.; Sivertsson, Å.; Tegel, H.; Hober, S.; Al-Khalili Szigyarto, C.; Fagerberg, L.; et al. Enhanced validation of antibodies for research applications. *Nat Commun.* **2018**, *9*, 4130. [CrossRef]
59. Weller, M.G. Ten basic rules of antibody validation. *Anal Chem Insights.* **2018**, *13*, 1177390118757462. [CrossRef]
60. The Human Protein Atlas: Assays, Annotation, Reliability Score. Available online: <https://www.proteinatlas.org/about/assays+annotation> (accessed on 27 September 2023).

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

# PRIEDAS



## KAUNO REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS

Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, A. Mickevičiaus g. 9, LT 44307 Kaunas, tel. (+370) 37 32 68 89; el.paštas: kaunorbtek@ismuni.lt

### LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ

2022-09-15 Nr. BE-2-77

<b>Biomedicininio tyrimo pavadinimas: „Išeminės kilmės širdies nepakankamumo struktūrinių pokyčių ir molekulinį mechanizmų tyrimas“</b>	
Protokolo Nr.:	<b>1</b>
Data:	<b>2022-09-12</b>
Versija:	<b>2</b>
Asmens informavimo forma	<b>Atleista nuo informuoto asmens sutikimo formos</b>
Pagrindinis tyrėjas:	<b>prof. habil. dr. Dalia Pangonytė</b>
Biomedicininio tyrimo vieta:	Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Įstaigos pavadinimas:	Kardiologijos institutas
Adresas:	Sukilėlių pr. 15, LT-50162, Kaunas

Išvada:

Kauno regioninio biomedicininis tyrimų etikos komiteto posėdžio, įvykusio **2022 m. rugsėjo 6 d.** (protokolo Nr. 2022-BE-10-0013) sprendimu pritarta biomedicininio tyrimo vykdymui.

Mokslinio eksperimento vykdytojai įsipareigoja: (1) nedelsiant informuoti Kauno Regioninį biomedicininis Tyrimų Etikos komitetą apie visus nenumatytus atvejus, susijusius su studijos vykdymu, (2) iki sausio 15 dienos – pateikti metinį studijos vykdymo apibendrinimą bei, (3) per mėnesį po studijos užbaigimo, pateikti galutinį pranešimą apie eksperimentą.

Kauno regioninio biomedicininis tyrimų etikos komiteto nariai			
Nr.	Vardas, Pavardė	Veiklos sritis	Dalyvavo posėdyje
1.	Doc. dr. Gintautas Gumbrevičius	Klinikinė farmakologija	Taip
2.	Prof. dr. Kęstutis Petrikonis	Neurologija	Ne
3.	Dr. Saulius Raugelė	Chirurgija	Ne
4.	Dr. Lina Jankauskaitė	Pediatrija	Taip
5.	Prof. dr. Džilda Veličienė	Endokrinologija	Taip
6.	Doc. dr. Eimantas Peičius	Visuomenės sveikata	Taip
7.	Aušra Degutyė	Visuomenės sveikata	Taip
8.	Dr. Žydrūnė Luneckaitė	Visuomenės sveikata	Taip
9.	Viktorija Bučinskaitė	Teisė	Taip

Kauno regioninis biomedicininis tyrimų etikos komitetas dirba vadovaudamasis etikos principais nustatytais biomedicininis tyrimų Etikos įstatyme, Helsinkio deklaracijoje, vaistų tyrinėjimo Geros klinikinės praktikos taisyklėmis.

Kauno RBTEK pirmininkas



Doc. dr. Gintautas Gumbrevičius



## CURRICULUM VITAE

**Vardas, pavardė:** **Milda Kuprytė**

**Adresas:** Lietuvos sveikatos mokslų universitetas  
Kardiologijos institutas  
Kardialinės patologijos laboratorija  
Sukilėlių pr. 15, LT-50103 Kaunas, Lietuva

**El. paštas:** milda.kupryte@lsmuni.lt;  
milda.kupryte@kaunoklinikos.lt

### **Išsilavinimas:**

2019–2024 Lietuvos sveikatos mokslų universitetas,  
Kardialinės patologijos laboratorija,  
Kardiologijos institutas,  
doktorantūros podiplominės studijos

2010–2014 Lietuvos sveikatos mokslų universitetas,  
podiplominės studijos ir gydytojo patologo  
profesinė kvalifikacija

2004–2010 Lietuvos sveikatos mokslų universitetas,  
medicinos magistro laipsnis ir gydytojo  
profesinė kvalifikacija

### **Darbo patirtis:**

2015–dabar Lektorė Lietuvos sveikatos mokslų universiteto  
Patologinės anatomijos klinikoje

2014–dabar Gydytoja patologė Lietuvos sveikatos mokslų  
universiteto ligoninės Kauno klinikų Patologinės  
anatomijos klinikoje

2010–2014 Gydytoja rezidentė Lietuvos sveikatos mokslų  
universiteto ligoninės Kauno klinikų Patologinės  
anatomijos klinikoje

### **Narystė:**

2021–dabar Europos kardiovaskulinių patologų asociacijos narė  
2021–dabar Europos patologijos draugijos narė  
2014–dabar Lietuvos patologų draugijos narė

## CURRICULUM VITAE

**Name, Surname:** Milda Kuprytė  
**Address:** Laboratory of Cardiac Pathology  
Institute of Cardiology  
Lithuanian University of Health Sciences  
Sukilėlių 15, LT-50103 Kaunas, Lithuania  
**E-mail:** milda.kupryte@lsmuni.lt;  
milda.kupryte@kaunoklinikos.lt

### Education:

2019–2024 Lithuanian University of Health Sciences,  
Laboratory of Cardiac Pathology,  
Institute of Cardiology,  
Doctoral (PhD) Postgraduate studies.

2010–2014 Lithuanian University of Health Sciences,  
Postgraduate studies, and professional qualification  
of pathologist

2004–2010 Lithuanian University of Health Sciences,  
Master's Degree of Medicine and professional  
qualification of physician

### Work experience:

2015–present Lecturer at Lithuanian University of Health Sciences,  
Department of Pathological anatomy

2014–present Pathologist at Hospital of Lithuanian University  
of Health Sciences Kauno klinikos,  
Department of Pathological anatomy

2010–2014 Resident at Hospital of Lithuanian University  
of Health Sciences Kauno klinikos,  
Department of Pathological anatomy

### Memberships:

2021–present Member of Association of European Cardiovascular  
Pathologists

2021–present Member of European Society of Pathology

2014–present Member of Lithuanian Society of Pathologists