



**RADA NAUKOWA DYSCYPLINY ZOOTECHNIKA
I RYBACTWO**

ROZPRAWA DOKTORSKA

lek. wet. Sebastian Słodki

**WPŁYW PROCESU STARZENIA NA MIKROSTRUKTURĘ
WYBRANYCH MIĘŚNI SZKIELETOWYCH PSÓW**

***Effect of the aging process on the
microstructure
of selected skeletal muscles in dogs***

DZIEDZINA: NAUKI ROLNICZE
DYSCYPLINA: ZOOTECHNIKA I RYBACTWO

PROMOTOR PRACY

DR HAB. INŻ. JOANNA BOGUCKA, PROF. PBŚ
KATEDRA FIZJOLOGII ZWIERZĄT I ZOOFIZJOTERAPII
WYDZIAŁ HODOWLI I BIOLOGII ZWIERZĄT
POLITECHNIKA BYDGOSKA IM. J. J. ŚNIADECKICH

Bydgoszcz 2022

Podziękowania

*Serdeczne podziękowania kieruję do Pani Promotor,
dr hab. inż. Joanny Boguckiej, profesor PBS, której pomoc w powstaniu niniej-
szej rozprawy doktorskiej jest nieoceniona. Dziękuję za zaufanie, poświęcony mi
czas i cenne merytoryczne wskazówki.*

*Dziękuję również mojej żonie i przyjaciołom za ogromne wsparcie, wyrozumia-
łość i wiarę we mnie w ciągu ostatnich, intensywnych lat. Bez Was bym tego nie
osiągnął.*

Wykaz skrótów

ALT	aminotransferaza alaninowa (Alanine Transaminase)
AMPK	kinaza aktywowana 5'AMP (-5'AMP-Activated Protein Kinase)
AP	fosfataza zasadowa (Alkaline Phosphatase)
AST	aminotransferaza asparaginianowa (Aspartateaminotransferase)
ATP	adenozyno-5'-trifosforan (Adenosine Triphosphate)
ATP (MAPR)	tempo produkcji mitochondrialnego ATP (Mitochondrial ATP Production Rate)
ATPase	ATP-aza (adenozynotrifosfataza) (Adenylpyrophosphatase)
Beklina 1	białko spustowe autofagii (Beclin 1-Autophagy-related Protein)
bHLH	podstawowa helisa-pętla-helisa (Basic Helix-Loop-Helix)
BMP	białka morfogenetyczne kości (Bone Morphogenetic Proteins)
c-MET (HGFR)	receptor czynnika wzrostu hepatocytów (Hepatocyte Growth Factor Receptor)
CAMS	cząsteczki adhezji komórkowej (Cell Adhesion Molecules)
CD31	inna nazwa PECAM-1 (Cluster of differentiation 31)
CD34	gene - transbłonowe białko fosfoglikoproteiny kodowane przez gen CD34 (Transmembrane Phosphoglycoprotein Protein encoded by the CD34)
CES	syndrom ogona końskiego (Cauda Equina Syndrome)
CK	kinaza kreatynowa (Creatine Kinase)
COX	cyklooksygenaza (Cytochrome c oxidase (Cyclooxygenase))
COX-1	Cyklooksygenaza-1 (Cyclooxygenase 1)
CPK	fosfokinaza kreatyny (Creatine Phosphokinase)
CR	ograniczenie kaloryczne (Caloric Restriction)
CrP	fosforan kreatyny (Creatine Phosphate)
DHPR	receptor dihydropirydynowy (Dihydropyridine Receptor)
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy (Deoxyribonucleic Acid)
EC	komórki śródbłónka naczyniowego (Endothelial Cells)
ELAM-1	cząsteczka adhezji leukocytów do śródbłónka (Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule)
endoCAM	cząsteczka adhezyjna komórek śródbłónka (Endothelial Cell Adhesion Molecule)

eNOS	endotelialna syntaza tlenku azotu (Endothelial NOS)
ETS	system transportu elektronów (Electron Transport System)
FOXO1	białko z rodziny FOXO (Forkhead Box Protein O1)
GAPDH	dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase)
GGTP	gamma-glutamylotranspeptydaza (Gamma Glutamyl Transpeptidase)
GLDH	dehydrogenaza glutaminianowa (Glutamate Dehydrogenase)
GLUT-1	transporter glukozy typu 1 (Glucose transporter type 1)
GLUT-4	transporter glukozy typu 4 (Glucose transporter type 4)
GMP-140	cząsteczką adhezji komórkowej obecna na powierzchni aktywowanych komórek śródbłónka naczyniowego (Platelet Alpha-Granule Membrane Protein)
gp90 MEL	receptor lektynopodobny gp90 MEL (Lectin-like Receptor)
HSPs	białka szoku cieplnego (Heat Shock Proteins)
ICAM-1	cząsteczka adhezji międzykomórkowej-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1)
ICDP	dehydrogenaza izocytrynianowa (Isocitrate dehydrogenase)
IGF-1	insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (Insulin-like Growth Factor 1)
IGF-II	insulinopodobny czynnik wzrostu 2 (Insulin-like Growth Factor 2)
LC3	lekki łańcuch 3 białek związanych z mikrotubulami 1A/1B (Microtubule-associated Protein 1A/1B-light Chain 3)
LDH	dehydrogenaza mleczanowa (Lactate Dehydrogenase)
LEC-CAMs	lektynowe cząsteczki adhezyjne (Lectin Cell Adhesion Molecules)
MDA	malondialdehyd (Malondialdehyde)
MDH	dehydrogenaza jabłczanowa (Malate dehydrogenase)
MHC	ciężki łańcuch miozyny (Myosin Heavy Chain)
MPC	miogenne komórki prekursorowe (Myogenic Progenitor Cells)
MRF	miogenne czynniki regulatorowe (Myogenic regulatory factors)
mRNA	matrycowy RNA (Messenger RNA)
mSC	mięśniowe komórki satelitarne (Muscle Satellite Cells)
Msx1	czynnik transkrypcyjny (Muscle-Segment Homeobox 1)
mtDNA	DNA mitochondrialny (Mitochondrial DNA)

Myf5	miogenny czynnik regulatorowy 5 (Myogenic Regulatory Factor 5)
Myf6	miogenny czynnik regulatorowy 6 (Myogenic Regulatory Factor 6)
MyoD	białko determinujące myoblast (Myoblast Determination Protein)
MyoG	białko determinujące miogeninę (Regulatory Transcription Factor Myogenin)
NADH-TR	reduktaza tetrazolinowa (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydride Tetrazolium Reductase)
NCAM (CD56)	nerwowa cząsteczka adhezyjna (Neural Cell Adhesion Molecule)
p62	nukleoporyna o masie cząsteczkowej 62 (Nucleoporin p62)
Pax3	czynnik transkrypcyjny Pax3 (Paired box transcription factor-3)
Pax7	czynnik transkrypcyjny Pax7 (Paired box transcription factor-7)
PECAM-1	cząsteczka adhezyjna płytek krwi/komórek śródbłonna-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1)
PGC-1α	Koaktywator 1 α receptora γ aktywowanego przez proliferatory peroksysomów (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1 α)
RBC	liczba erytrocytów (Red Blood Cells)
RCF	funkcja łańcucha oddechowego (Respiratory Chain Function)
RNS	reaktywne formy azotu (Reactive Nitrogen Species)
ROS	reaktywne formy tlenu (Reactive Oxygen Species)
S1P	sfingozyno-1-fosforan (Sphingosine-1-Phosphate)
SIRT1	sirtuina 1 (Sirtuin 1)
TCA	cykl Krebsa (Tricarboxylic Acid Cycle)
Tfam	mitochondrialny czynnik transkrypcyjny A (Mitochondrial Transcription Factor A)
UCP3	mitochondrialne białko rozprzegające 3 (Mitochondrial Uncoupling Protein 3)
VCAM-1	cząsteczka adhezji komórkowej naczyń (Vascular Cell Adhesion Melecule-1)

SPIS TREŚCI

1. Wstęp	10
2. Hipoteza badawcza i cele pracy	12
2.1. Cel pracy.....	12
3. Przegląd piśmiennictwa	13
3.1. Geriatria i gerontologia.....	13
3.2. Dysfunkcja mitochondrialna jako determinanta poziomu aktywności fizycznej i starzenia się mięśni	17
3.3. Zmiany aktywności enzymatycznej i zdolności wymiany białek w procesie starzenia się mięśni	19
3.4. Zaburzenia regulacji gospodarki jonowej w starzejących się mięśniach	22
3.5. Wpływ stresu oksydacyjnego i wolnych rodników na starzejące się mięśnie	23
3.6. Mikrostruktura mięśni szkieletowych	25
3.7. Rola komórek satelitarnych w procesach miogenezy i starzeniu mięśni.....	30
3.8. Procesy angiogenezy a starzenie się mięśni	33
3.9. Czynniki środowiskowe wpływające na procesy starzenia się mięśni	36
4. Materiał i metody	40
4.1. Zwierzęta wykorzystane w badaniach.....	40
4.2. Pobranie materiału do badań	42
4.2.1. Mięśnie	42
4.2.2. Krew	44
4.3. Przygotowanie preparatów histologicznych.....	45
4.3.1. Techniki histochemiczne	45
4.3.2. Techniki immunohistochemiczne.....	46
4.4. Komputerowa analiza obrazu mikroskopowego	47
4.5. Analiza statystyczna	47
5. Wyniki i dyskusja.....	49
5.1. Cechy mikrostruktury badanych mięśni psów.....	49
5.2. Wskaźniki morfologiczne i biochemiczne krwi	70

5.3. Współzależności. Współczynniki korelacji i determinacji.....	72
6. Podsumowanie i wnioski.....	91
7. Literatura.....	94
8. Streszczenie.....	109
9. Abstract.....	113

1. WSTĘP

Słowa Josha Billingsa, który powiedział „pies jest jedyną istotą na ziemi, która kocha cię bardziej, niż siebie samego” nabierają we współczesnych czasach szczególnego znaczenia. Pies stał się nieodłącznym towarzyszem życia człowieka, coraz częściej stając się równorzędnym członkiem domowego ogniska. Samotność doskwiera wielu ludziom, którzy swoje uczucia często przelewają na zwierzęta towarzyszące, w tym głównie psy i koty. Wraz z tymi emocjonalnymi aspektami rośnie świadomość opiekunów zwierząt, a tym samym potrzeba leczenia psów celem wydłużenia czasu ich życia. Opiekunowie niezwykle troskliwie zajmują się swymi zwierzętami, oczekując także kompleksowej opieki lekarsko-weterynaryjnej. Taki stan rzeczy spowodował, że jakość i gama usług weterynaryjnych w ostatnim okresie znacząco wzrosła. Pojawiła się nowa i szybko rozwijająca dziedzina nauki, jaką jest geriatryka psów. Dziś na co dzień lekarze weterynarii spotykają w swojej pracy zawodowej psy powyżej 14-15 roku życia, a rekordziści dożywają 20 lat. Jeszcze kilka lat temu średnia długość życia psów była znacznie niższa. Wymusza to na lekarzach, ale także na technikach weterynarii i zootechnikach coraz większego pogłębiania i doskonalenia wiedzy na temat procesów starzenia się psów oraz metod wpływających na ich opóźnienie. Od wielu lat trwają szeroko zakrojone badania naukowe na temat procesów starzenia u ludzi, natomiast istnieje stosunkowo mała liczba prac badawczych dotycząca zwierząt towarzyszących, w tym psów. Jak powszechnie wiadomo, wraz z upływem lat, tak u ludzi, jak i u zwierząt, dochodzi do szeregu zmian narządowych, w tym również w układzie mięśniowym. Prawidłowa motoryka ruchowa psa jest niezwykle ważnym aspektem warunkującym jego dobrostan, a czasami dalsze życie. Brak możliwości swobodnego przemieszczania się starego psa o dużej masie ciała, a tym samym zapewnienia mu optymalnej opieki przez właściciela, może być przyczyną jego eutanazji. Zbadanie zmian mikrostruktury starzejących się mięśni psów, które jest celem niniejszej pracy, pozwoli na lepsze zrozumienie zachodzących tam procesów i wpływu na nie różnych czynników, zarówno egzo-, jak i endogennych. Współczesna kompleksowa opieka nad geriatrycznym psem obejmuje nie tylko typowe czynności lekarsko-weterynaryjne, ale także szeroko pojętą profilaktykę chorób i, co najistotniejsze, zapobieganie oraz opóźnianie procesów starzenia. W takie działania u ludzi od lat wpisuje się fizjoterapia osób starszych. Wraz z rozwojem gerontologii psów pojawiła się również potrzeba świadczenia tego typu usług u zwierząt. Aktualnie fizjoterapia zwierząt to jedna z szybciej rozwijających się dziedzin wiedzy, a zawód zoofizjoterapeuty staje się coraz bardziej popularną i potrzebną profesją. Specjalnie opracowane dla każdego zwierzęcia indywidualne programy opieki fizjoterapeutycznej pozwalają skutecznie spowolnić procesy starzenia, przede

wszystkim w układzie mięśniowym, kostnym i nerwowym. W niniejszym badaniu poddano analizie zmiany w obrębie mikrostruktury dwóch mięśni u starzejących psów: dwugłowego ramienia oraz czworogłowego uda. Z obserwacji własnych wynika, że dysfunkcja tych dwóch mięśni szczególnie często występuje u psów wraz z upływem wieku, prowadząc do poważnych zaburzeń ruchowych. Analiza zmian degeneracyjnych w mięśniach psów, w tym także ich mikrounaczynienia, profilu fizjologiczno-biochemicznego oraz zdolności do regeneracji, może stać się istotnym elementem podczas ustalania optymalnych planów postępowania leczniczego i fizjoterapeutycznego. Znajomość mikrostruktury mięśni szkieletowych psów, a także wykazanie różnic w ich budowie i funkcjonowaniu w młodym i starszym wieku zwierząt pozwoli na efektywniejsze prowadzenie terapii, pomoże poznać przyczyny oraz metody opóźniające wystąpienie związanych z wiekiem zmian starczych w mięśniach psów.

2. HIPOTEZA BADAWCZA I CELE PRACY

Procesy starzenia mięśni to wciąż aktualny i bardzo szeroko omawiany temat w medycynie ludzkiej. Trwają zaawansowane prace badawcze nad wpływem zarówno różnych czynników zewnętrznych, jak i wewnętrznych na procesy starzenia mięśni oraz opracowaniem metod opóźniających te zmiany. Tymczasem, jeśli chodzi o zwierzęta towarzyszące, w tym psy i koty, jest to temat nadal bardzo mało poznany. Istnieje stosunkowo niewielka liczba prac naukowych dotyczących tej grupy zwierząt, o czym będzie mowa w przeprowadzonym poniżej przeglądzie piśmiennictwa. Procesom starzenia mięśni szkieletowych towarzyszy szereg zmian morfologicznych, fizjologicznych oraz biochemicznych.

Przeprowadzone badania zweryfikują hipotezę czy procesy starzenia u psów prowadzą do zmian w mikrostrukturze mięśni oraz wpływają na zdolność mięśni do regeneracji. Jest to cenny aspekt poznawczy, z uwagi na rozwijającą się intensywnie dziedzinę wiedzy, jaką jest fizjoterapia zwierząt i jej możliwości w opóźnianiu procesów starzenia tkanki mięśniowej.

2.1. CEL PRACY

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była ocena wpływu procesów starzenia na cechy mikrostruktury mięśnia dwugłowego ramienia (*m. biceps brachii* - BB) i czworogłowego uda (*m. quadriceps femoris* - QF) psów.

Cele szczegółowe:

1. Ocena mikrostruktury mięśni: dwugłowego ramienia (*m. biceps brachii*) i czworogłowego uda (*m. quadriceps femoris*), w tym profilu fizjologiczno-biochemicznego włókien mięśniowych oraz zmian histopatologicznych w trakcie starzenia się psów.
2. Ocena wpływu procesów starzenia na kapilaryzację (mikrounaczynienie) mięśni oraz zdolność do regeneracji włókien mięśniowych na podstawie określenia liczby komórek satelitarnych u psów.
3. Określenie współzależności między poszczególnymi cechami mikrostruktury mięśni oraz parametrami biochemicznymi i hematologicznymi krwi.
4. Pozyskanie nowej wiedzy na temat procesów starzenia mięśni szkieletowych psów, a tym samym stworzenie podstawy do dalszych badań w tym kierunku. Umożliwi to wypracowanie skutecznych metod opóźniających degenerację starzejących się mięśni, między innymi poprzez postępowanie fizjoterapeutyczne, co znacząco poprawi dobrostan i pomoże w profilaktyce psów geriatrycznych.

3. PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA

3.1. GERIATRIA I GERONTOLOGIA

Narodziny nowego życia tak naprawdę rozpoczynają trwający do chwili śmierci proces starzenia organizmu. Do tej pory zainteresowanie procesami starzenia dotyczyło głównie ludzi. W odniesieniu do zwierząt geriatryka zyskuje na znaczeniu zwłaszcza u psów, które mają w wielu przypadkach status członka rodziny, a dzięki coraz lepszej opiece weterynaryjnej i dobrostanowi długość ich życia znacznie się wydłużyła. Efektem tego jest pojawianie się zwiększonej ilości chorób starczych, których dokładne poznanie daje możliwości zastosowania lepszych metod profilaktyki i ich leczenia. Naukami, które zajmują się procesami starzenia są gerontologia i geriatryka.

Gerontologia jest to nauka o biologicznych przyczynach i skutkach starzenia się człowieka [Szarota, 2004]. Należy do działu nauki, który zajmuje się procesami fizykochemicznymi wpływającymi na postęp starzenia się pojedynczych komórek oraz ich zespołów, skutkiem czego jest starzenie się całego organizmu. Nauka ta obejmuje również procesy psychiczne, które są niezmiernie istotne w początkowej fazie zmian starczych [Błędowski i wsp., 2013]. Zajmuje się ona również opracowaniem metod spowalniających i zapobiegających patologiom starszego wieku oraz prowadzi do określenia metod leczenia chorób wieku starczego. Geriatryka jest to dział gerontologii, który zajmuje się diagnostyką, profilaktyką i leczeniem chorób charakterystycznych dla osób w wieku starczym. Dziedzina tej nauki obejmuje problemy starości i wszelkie powiązane z nią choroby, głównie wśród ludzi, ale w ostatnich latach również wśród zwierząt. Różnice pomiędzy nimi polegają jedynie na rodzaju i sposobie wykonywanych badań oraz testów [Hoskins, 2006].

W latach trzydziestych XX wieku wykonano badania i testy, na podstawie których udowodniono, iż dobrze zaplanowana i zorganizowana opieka zdrowotna dla ludzi starszych, którzy cierpią na różnego rodzaju przewlekłe schorzenia, może zapewnić zmniejszenie ilości występowania poważnych zaburzeń zdrowotnych. Prawdziwy rozwój gerontologii rozpoczął się w latach 40-tych, gdy opieka lekarska nad starszymi osobami przerodziła się w problem społeczny. Szczególnie intensywnie problemem tym zaczęto zajmować się dopiero na początku XX wieku, kiedy wydłużyła się znacznie średnia długość życia ludzi [Polak i wsp., 2007]. Pojawiła się wówczas konieczność stworzenia społecznych form opieki dla ludzi w sędziwym wieku. Opracowano nowe metody zachowania jak najlepszej sprawności organizmów, zarówno pod względem fizycznym, jak i psychicznym, czego podstawowym celem było zagwarantowanie możliwości samodzielnej egzystencji osób starszych. Jeśli chodzi o psy, to liczba doniesień i prac naukowych jest znacznie mniejsza, jednakże w ostatnich latach sytuacja ta uległa dużej zmianie. Podobnie jak u ludzi, tak i u zwierząt, a w szczególności u psów, średnia długość życia zwiększa się. W związku z tym istnieje potrzeba

opracowania nowych programów kompleksowej opieki geriatrycznej, w tym także paliatywnej dla zwierząt domowych.

Wieloletnie badania wykazały, że psy ras większych żyją krócej niż psy mniejszych ras, w przeciwieństwie do bardziej powszechnego wzorca wśród ssaków, gdzie większe gatunki mają tendencję do dłuższego życia. Modyfikacje kynologiczne psów doprowadziły do powstania wielu ras, które znacznie różnią się wielkością i wagą ciała, a tym samym długością życia, czasami nawet dwukrotnie. Duże rasy psów cechuje: wyższa wczesna śmiertelność, wczesny początek starzenia się, podwyższona śmiertelność wyjściowa lub zwiększona szybkość starzenia [Kraus i wsp., 2013].

Powyższe wyniki badań wskazują jednoznacznie, że długość życia psów uzależniona jest w dużej mierze od ich wielkości, natomiast w ujęciu poszczególnych ras starzenie rozpoczyna się na różnych etapach ich życia [Millis, 2016]. Szacunkowo przyjęte porównanie można zaobserwować w poniższej tabeli, przedstawiającej wiek, w którym psy o określonej masie ciała mogą być przyjmowane za geriatryczne.

Tabela 1. Zależność wieku geriatrycznego od masy ciała psów [Millis i wsp., 2016]

Wielkość psa	Masa ciała (kg)	Wiek (średnia ± SD)
Mały pies	0-10	11,48±1,86
Średni pies	10-25	10,19±1,56
Duży pies	25-40	8,85±1,38
Wielki pies	>40	7,46±1,27

Analizując przedstawioną tabelę, można jednoznacznie stwierdzić, że czas życia przedstawicieli dużych ras psów jest zdecydowanie krótszy od czasu życia ras mniejszych. Bardzo duży wpływ na długość i jakość życia mają właściwie dopasowana i zbilansowana dieta, odporność na infekcję, rodzaj i ilość aktywności fizycznej oraz wszelkie czynniki zewnętrzne wpływające bezpośrednio na kondycję psychofizyczną i zdrowie zwierząt.

Starzenie jest nieuniknionym i nieodwracalnym procesem towarzyszącym każdemu żywemu organizmowi i odnosi się ono do szeregu zmian w każdym z układów i narządów ciała, które zachodzą na poziomie wszystkich komórek organizmu [Pati i wsp., 2015]. Efektem owych zmian jest obniżenie zdolności adaptacji zwierzęcia do zmieniających się czynników środowiskowych, osłabienie wielu funkcji życiowych oraz zwiększona podatność na wszelkie zagrożenia związane z chorobami. Omawiany schemat starzenia jest wieloetapowy i dotyczy wszystkich sfer życia zarówno człowieka, jak i psa. Końcowym, a zarazem ostatecznym efektem jest upośledzenie funkcjonowania prawie każdego z układów organizmu i jego śmierć [Hoskins, 2006].

Zmiany chorobowe, które występują u psów geriatrycznych, możemy podzielić na cztery grupy: zmiany mięśniowo-szkieletowe, metaboliczne, neurologiczne oraz behawioralne. Istnieją również objawy zewnętrznie świadczące o postępującym procesie starzenia, takie jak: siwienie włosów, matowy wygląd

sierści, zaćma starcza, nadmierne starcie zębów oraz upośledzenie sprawności ruchowej, będące efektem, między innymi, choroby zwyrodnieniowej stawów [Pati i wsp., 2015].

Na skutek starzenia się w układzie mięśniowo-szkieletowym zachodzą różnego rodzaju złożone i niekorzystne dla niego zmiany. Ma to istotne znaczenie szczególnie w przypadku dużych psów, gdzie ograniczenia ruchowo-motoryczne radykalnie utrudniają opiekę nad nimi. Na początku stopniowo spada masa ciała zwierzęcia, ulegają osłabieniu mięśnie, kości oraz stawy. Dochodzi do zaniku tkanki mięśniowej, zmniejszenia elastyczności ścięgien i powięzi. Wraz z upływem lat dochodzi do spadku uwodnienia organizmu, co potęguje wiele dysfunkcji starczych, osłabienia tkanek i prowadzi do wielu chorób, m. in. atrofii mięśni i choroby zwyrodnieniowej stawów [Pati i wsp., 2015]. Wraz z postępującym procesem starzenia dochodzi do utraty masy beztłuszczowej ciała, co wynika z zaniku tkanki kostnej i chrzęstnej. W efekcie nadmierne zwiększa się ilość tkanki tłuszczowej, co prowadzi do otyłości starczej. Tkanka kostna na skutek zaburzeń mineralnych i zmian strukturalnych, w tym przede wszystkim utkania beleczkowego, staje się bardzo krucha i łamiwa, co może spowodować zaostrzenie objawów i przyspieszyć tempo rozwoju chorób zwyrodnieniowych stawów [Zink i Dyke, 2013].

Metabolizm opiera się na przemianie materii i energii, która jest gwarancją sprawnej pracy komórek i narządów organizmu. Wraz z wiekiem tempo metabolizmu słabnie, a procesy kataboliczne dominują nad anabolicznymi. Wszelkie zmiany metaboliczne zachodzące u starszych psów powodują osłabienie organizmu, spadek masy ciała, letarg, pogorszenie jakości sierści, upośledzenie procesów wydalniczych oraz zmniejszenie odporności na infekcje [Zink i Dyke, 2013].

Jednym z najbardziej dynamicznych procesów zachodzących w organizmie zwierząt jest starzenie się ośrodkowego układu nerwowego, któremu towarzyszą zmiany w szlakach biochemicznych i funkcjach fizjologicznych oraz zjawiska postępującej degradacji struktur anatomicznych. Spektrum tych zmian można obserwować na poziomie molekuł, komórek nerwowych, aż wreszcie całych regionów mózgu [Borras i wsp., 1999; Kudła, 2006]. Dysfunkcja układu nerwowego zarówno ośrodkowego, jak i obwodowego wtórnie osłabia czynność innych układów i narządów, w tym układu ruchowego, endokrynologicznego czy wydalniczego. Do najczęstszych chorób układu nerwowego pojawiających się z wiekiem należą różnego rodzaju porażenia, niedowłady, starcze zespoły przedsionkowe, polineuropatie i neuromiopatie. Na skutek tych procesów dochodzi do powstania wielu dysfunkcji ruchowych o podłożu neurologicznym, które w połączeniu z upośledzeniem funkcji układu kostno-stawowego prowadzą do patologicznych zmian starczych. W wielu przypadkach uniemożliwia to samodzielne poruszanie się psów, co stanowi duży problem dla nich samych, jak i dla ich opiekunów [Zink i Dyke, 2013].

Zmiany starcze zachodzące w układzie nerwowym mogą prowadzić również do zaburzeń behawioralnych. U psów geriatrycznych obserwuje się spadek

aktywności fizycznej, dezorientację, zaburzenie cykli snu, lęki, agresję oraz utratę wcześniej wyuczonych zachowań i wzorców [Borras i wsp., 1999; Kudła, 2006]. Jest wiele przyczyn odpowiedzialnych za wyżej wymienione procesy chorobowe, ale dominujące znaczenie ma modyfikacja ilości neuroprzekazników, które regulują procesy emocjonalne i aktywność receptorów ruchowych [Kudła, 2006]. Udowodniono, iż problemy związane ze starzeniem się organizmu mają związek nie tylko z dysfunkcjami układowymi, ale również obejmują zmiany w psychice i postrzeganiu otoczenia przez pacjentów geriatrycznych. Opisywane procesy zaczynają być zauważalne u psów już w wieku siedmiu lat. Głównie dotyczy to psów ras użytkowych, w tym przewodników i psów tropiących. W większości przypadków właściciele pozostałych psów zauważają te zmiany dopiero w dużo późniejszym okresie, około jedenastego roku życia zwierzęcia [Lacey, 2017].

Oprócz wcześniej wymienionych, istnieją również inne procesy chorobowe związane ze starzeniem się organizmu zwierząt. Można do nich zaliczyć spadek wydolności układu krążeniowo-oddechowego, upośledzenie funkcji układu trawienno-pokarmowego, a także endokrynologicznego oraz moczowo-płciowego. W układzie sercowo-płucnym dochodzi m. in. do spadku pojemności minutowej i wyrzutowej serca oraz zmniejszenia elastyczności tkanki płucnej z równoczesnym jej zwłóknieniem.

Wskaźniki umieralności rosną wraz z wiekiem u wszystkich gatunków. Jednak nie wszystkie czynniki chorobowe w równym stopniu wpływają na wzrost ryzyka śmierci w wieku starczym. Choroby układu nerwowego były główną przyczyną zgonów u geriatrycznych psów i ich częstotliwość rosła wraz z wiekiem, co potwierdzono w badaniach przeprowadzonych przez Fleminga i wsp. [2011]. Choroby układu pokarmowego były drugą najczęściej występującą przyczyną zgonów u dorosłych psów, ale ich udział w całkowitej liczbie zgonów spowodowanych chorobami przewodu pokarmowego pozostawał stosunkowo stały w okresie dorosłości. Chociaż choroba układu moczowo-płciowego uplasowała się na szóstym miejscu w ogólnych przyczynach zgonów z powodu niewydolności narządowej, proporcjonalny udział w całkowitej liczbie zgonów znacząco wzrósł w najstarszej grupie wiekowej.

Analizując natomiast procesy patofizjologiczne prowadzące do śmierci, wykazano, że to choroby nowotworowe były główną przyczyną śmierci wśród dorosłych psów [Fleming i wsp., 2011]. Ich względna częstotliwość była najwyższa w całej grupie, w tym u 10-letnich psów, a następnie spadła w najstarszej grupie wiekowej. Odwrotnie, procesy metaboliczne i zwyrodnieniowe zajmowały czwarte i szóste miejsce w klasyfikacji ogólnej, ale ich proporcjonalna częstotliwość wzrastała wraz z wiekiem.

Jak już wcześniej napisano, psy większych ras żyją krócej niż psy mniejszych ras w przeciwieństwie do innych grup ssaków, gdzie większe gatunki mają tendencję do dłuższego życia niż mniejsze [Kraus i wsp., 2013]. Wykazano, że psy dużych ras umierają z powodu choroby układu moczowo-płciowego rzadziej niż psy ras miniaturowych, podczas gdy częstotliwość zgonów z powodu

chorób układu mięśniowo-szkieletowego wzrasta wraz ze wzrostem wielkości rasy psa. Tak szczegółowa analiza przyczyn zgonów psów z uwzględnieniem rasy i masy ciała tych zwierząt [Fleming i wsp., 2011] oraz zsekwencjonowanie genomu psa pod koniec 2005 roku [Lindblad-Toh i wsp., 2005] spowodowały duży przełom w badaniach i wzrost zainteresowania procesami starzenia u psów. Choroby mięśniowo-szkieletowe i żołądkowo-jelitowe przyczyniają się częściej do zgonów psów większych ras, aniżeli endokrynologiczne lub moczowopłciowe.

3.2. DYSFUNKCJA MITOCHONDRIALNA JAKO DETERMINANTA POZIOMU AKTYWNOŚCI FIZYCZNEJ I STARZENIA SIĘ MIĘŚNI

Wraz z wiekiem dochodzi również do dysfunkcji mitochondriów mięśniowych. Z upływem czasu ilość zmian w mitochondriach zwiększa się i kumuluje, osiągając ostatecznie krytyczny poziom, powyżej którego dochodzi do degeneracji i śmierci komórki. Zmiany w funkcji mitochondriów mięśniowych obejmują zmniejszenie liczby kopii mitochondrialnego DNA, obniżenie stężeń mRNA w genach kodujących białka mitochondrialne mięśni, zmniejszenie aktywności mitochondrialnych enzymów oksydacyjnych mięśni i obniżenie syntezy białek mitochondrialnych [Short i wsp., 2003]. Można znaleźć jednak dość sprzeczne wyniki na temat tego, czy rzeczywista produkcja ATP mitochondrialnego mięśni maleje z wiekiem [Petersen i wsp., 2003; Taylor i wsp., 1997]. Istnieją badania, które wykazały wyraźny spadek produkcji ATP w mitochondriach komórek mięśnia sercowego wraz z wiekiem [Nair, 2004]. Powszechnie wiadomo, że produkcja ATP w mitochondriach mięśniowych stanowi czynnik determinujący poziom spontanicznej aktywności fizycznej. Ponadto ATP jest niezbędne do skurczu mięśnia. Dostępność ATP może być sygnałem dla zmiany poziomu spontanicznej aktywności i pobudzenia do dalszej syntezy ATP. Proces ten jest kontrolowany prawdopodobnie przez ośrodki zlokalizowane w podwzgórzu, a dokładnie w jego jądrze przykomorowym. Wykazano, że regulujący ośrodek snu i czuwania neuropeptyd oreksyna A (hipokretyna 1) po wstrzyknięciu do jądra przykomorowego podwzgórza zwiększa poziom aktywności spontanicznej [Kiwaki i wsp., 2004] oraz spożycie pokarmu u gryzoni [Edwards i wsp., 1999]. Schwartz i wsp., [2003] w swoim artykule przeglądowym przedstawiają różne kataboliczne ścieżki neuronowe, które zmniejszają spożycie pokarmów i zwiększają wydatki energetyczne oraz są stymulowane przez leptyny i insulinę, w przeciwieństwie do ścieżek anabolicznych, które zwiększają spożycie pokarmów i zmniejszają wydatki energetyczne oraz wydają się być hamowane przez leptynę i insulinę. Nadal jednak brakuje wiedzy na temat dokładnego działania tych mechanizmów regulacji, jak również czy opisywane przekaźniki neuronalne, czy może inne do tej pory niezbadane specyficzne substancje chemiczne są zaangażowane w sygnalizację pomiędzy podwzgórzem, a komórkami obwodowymi.

Istnieją trzy główne systemy umożliwiające ATP zależny skurcz mięśni:

- a) najszybszy system działania w pierwszych 5 +/- 10 s skurczu mięśni, który opiera się na dostępności fosforanu kreatyny (CrP) i fosfokinazy kreatyny (CPK),
- b) szybki system beztlenowy/glikogenny, który działa w ciągu pierwszych 2 minut skurczów mięśni, gdy dostarczanie tlenu do mięśni jest nadal niedostateczne i ograniczone,
- c) powolny układ tlenowy zaczynający się po pierwszych 2 minutach skurczu mięśnia i zasadniczo działający z wykorzystaniem dostępnych rezerw tlenu [Linnane i wsp., 1998].

Próbki biopsji mięśni zbadane pod mikroskopem elektronowym wykazały, że niektóre pomiary składu mitochondriów, takie jak: liczba kopii mitochondrialnego DNA (mtDNA), a także działania kluczowych enzymów w cyklu Krebsa (TCA), takich jak syntaza cytrynianowa, spadają wraz z wiekiem. Wykazano także malejącą maksymalną szybkość produkcji ATP (MAPR) u osobników starszych, niezależnie czy użyto metody biopsyjnej z użyciem lucyferazy świetlika, czy *in vivo* za pomocą MRS (spektroskopia rezonansu magnetycznego) [Short i wsp., 2005; Lanza i wsp., 2008; Johnson i wsp., 2013]. W innych badaniach przeprowadzonych na starych szczurach, stwierdzono spadek aktywności enzymów cyklu Krebsa przy jednoczesnym zmniejszeniu adenozynotrifosforanu (ATP) i fosforanu kreatyny (CrP) [Ermini, 1976]. Zdolność utleniania mierzona przez poziomy ATP i CrP jest zmniejszona w mięśniach szkieletowych w podeszłym wieku w porównaniu do młodych tkanek [Taylor i wsp., 1997]. Pastoris i wsp., [2000] wykazali znaczny spadek bogatych w energię cząsteczek, takich jak: cytrynian, CrP i ATP w mięśniach szkieletowych ludzi starszych w porównaniu z młodymi. Zakres spadku powyższych parametrów wynosił między 80 a 90%, porównując mięśnie starych i młodych szczurów.

Badania Kinoshita i wsp. [2000] pokazują, że spadek masy mięśniowej związany z wiekiem może wynikać także z upośledzonego działania insuliny w procesach związanych z magazynowaniem glikogenu w tkance mięśniowej. Stwierdzono, że szlak syntezy glikogenu mięśniowego jest zaburzony w cukrzycy typu II, często pojawiającej się w starszym wieku. Zmniejszone działanie insuliny w tym przypadku może być związane z upośledzeniem zdolności reagowania mięśni na insulinę oraz spadkiem masy ciała. Bardzo prawdopodobna jest teza, że wraz z wiekiem rezerwy energetyczne w komórkach maleją, co może prowadzić do spadku ich aktywności.

Mitochondria to główne miejsce komórkowej produkcji ATP. Wszystkie składniki łańcucha oddechowego znajdują się na wewnętrznych błonach mitochondrialnych w serii pięciu kompleksów i wielu podjednostek. Podczas starzenia się funkcja łańcucha oddechowego (RCF-respiratory chain function) w starych mięśniach spada znacząco u ludzi od 17 do 90 roku życia, w połączeniu z akumulacją niedoboru oksydazy cytochromu C (COX). Drastyczny spadek

wydajności RCF może być wywołany czynnikami wtórnymi, chorobowymi, związanymi z wiekiem, w tym na przykład zaburzeniem hormonalnym, a nie z rzeczywistym starzeniem się mitochondriów. Ta ostatnia kwestia pozostaje nadal do wyjaśnienia. Mitochondrialna teoria starzenia się opiera się na gromadzeniu somatycznych, szkodliwych mutacji mtDNA w ciągu życia [Wang i wsp., 2001]. Takie mutacje w mtDNA obejmują duże delecje, podstawienia, krótkie powielanie i nagromadzenie 8-hydroksy dezoksyguanozyny, jako miary uszkodzenia oksydacyjnego DNA. Jeśli wyżej wymienione mutacje zakłóca produkcję komórkową ATP, będą w konsekwencji powodować zaburzenia czynności całego łańcucha oddechowego i dysfunkcję mięśni [Kunz i wsp., 2000]. Delecja mtDNA w tkance mięśniowej została potwierdzona przez kilku niezależnych od siebie badaczy. Zhang i wsp. [1998] przeanalizowali siedem mitochondrialnych mutacji mtDNA, pięć bazowych substytucji. Stwierdzili, że dwie z pięciu (A→G) są znacząco skumulowane z wiekiem. Ponadto w tej samej grupie badanych mięśni obserwowano akumulację wielokrotnych delecji związanych z wiekiem. Stwierdzono w starzejących się mięśniach mutacje heterogeniczne między parami podstawowymi 8468 i 13446 w mtDNA w obszarze znanym jako obszar powszechnej delecji, czemu towarzyszyło upośledzenie tolerancji glukozy [Fukagawa i wsp., 1999]. Wykazano spadek aktywności cyklooksygenazy (COX) wraz z wiekiem, a szczególnie jej izoforny COX-1 [Wanagat i wsp., 2001]. Naukowcy potwierdzili silną korelację pomiędzy mutacjami mtDNA, zmniejszeniem aktywności COX-1 i zaburzeniami układu transportu elektronów w starzejących się mięśniach.

Podsumowując, wydaje się, że spadek funkcji i wydolności mitochondriów ma kluczowe znaczenie w procesach degeneracji komórek mięśniowych i spadku masy mięśniowej wraz z upływem wieku.

3.3. ZMIANY AKTYWNOŚCI ENZYMATYCZNEJ I ZDOLNOŚCI WYMIANY BIAŁEK W PROCESIE STARZENIA SIĘ MIĘŚNI

Mięśnie szkieletowe różnią się pod względem morfologicznym, biochemicznym i czynnościowym. W obrębie pojedynczego mięśnia szkieletowego znajdują się różne rodzaje włókien, które klasyfikowane są ze względu na szybkość skurczu, rodzaj metabolizmu oraz wytrzymałość na zmęczenie [Pette i Staron, 2000]. Wyróżnia się trzy główne typy włókien:

1. typ I to włókna czerwone (oksydacyjne), wolno kurczące się, o metabolizmie tlenowym, bardzo wytrzymałe na zmęczenie. Siła skurczu rozwijana przez ten typ włókien jest mała, a narastanie siły powolne,
2. typ IIA to włókna pośrednie, szybko kurczące się, o metabolizmie oksydacyjno-glikolitycznym, odporne na zmęczenie. Cechują się średnim natężeniem siły i szybkości skurczu,

3. typ IIB to włókna białe (glikolityczne), szybko kurczące się, o metabolizmie glikolitycznym, podatne na zmęczenie. Włókna te cechują się najwyższą siłą skurczu i najszybszym jej narastaniem.

Każdy z typów włókien ulega w innym stopniu zmianom wynikającym z wieku, co dotyczy zarówno jego charakteru jak i tempa skurczu, o czym będzie mowa w dalszej części pracy.

Sarkopenia, jako nieodłączny element starzenia się, zauważana jest u wielu gatunków zwierząt, począwszy od nicieni, owadów, aż do ssaków naczelnych. Ostatnie badania biologiczne dotyczące krótko żyjącego modelowego gatunku nicienia *Ceanorhaleiditis elegans* wykazały postępujące stopniowe degeneracje mięśni, które przypominały ludzką sarkopenię wieku średniego [Herndon i wsp., 2002]. Zaobserwowano u niego osłabienie mięśni, nie tylko budujących ścianę ciała, a także w miofibryli mięśni gardzieli. Sarkomery starszych osobników *C. elegans* stopniowo uległy dezorganizacji i zawierały mniej grubych włókien miozynowych. Również interesujące jest to, że aktywność lokomotoryczna nicieni jest ważnym wskaźnikiem przewidującym długość ich życia. Nicienie, które wykazywały wcześniejsze dysfunkcje lokomotoryczne, miały niższe przewidywalne długości życia.

Starzenie się wpływa na wydolność metaboliczną tkanki mięśniowej, a w szczególności na zmiany aktywności poszczególnych enzymów [Carmeli i wsp., 2002]. Badania dotyczące procesów starzenia mięśni u ludzi, wykonane na mięśniu obszernym bocznym, wykazały spadek aktywności enzymów glikogenolitycznych i glikolitycznych, co skutkowało zmniejszeniem zdolności oddechowych [Kleine, 1976]. Zaobserwowano między innymi spadek aktywności enzymatycznej karboksylazy pirogronianowej związanej z cyklem kwasu cytrynowego, która to katalizuje przyłączenie dwutlenku węgla do pirogronianu i tworzenie się szczawiooctanu. Ponieważ aktywność karboksylazy pirogronianowej spada w większym stopniu niż karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej, w starzejących się mięśniach prawdopodobnie z wiekiem występuje względne blokowanie tworzenia się szczawiooctanu z pirogronianu. Aktywność karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej jest głównym czynnikiem ograniczającym glukoneogenezę w starzejących się mięśniach [Kleine, 1976]. W mięśniach podlegających procesom starzenia procesy glikogenolizy (katalizowane przez fosforylasy) oraz glikolizy (katalizowane przez heksokinazy i dehydrogenazę mleczanową) są wyraźnie zmniejszone [Pastoris i wsp., 2000]. Podobnie, jak podają Lowe i wsp. [2000], aktywność dehydrogenazy aldehydu 3-fosoglicerynowego (GAPDH), a także aktywność białek i mRNA ulegają spadkowi w starzejących się glikolitycznych włóknach u szczurów. Ponadto Lawler i Demaree [2001] wykazali spadek poziomu dehydrogenazy jabłczanowej (MDH) oraz dehydrogenazy izocytrynianowej (ICDP) w mięśniach szczurów. Co ciekawe, większe aktywności ICDP zostały znalezione we włóknach oksydacyjnych starych szczurów.

W celu zrekompensowania zmniejszonej glikogenolizy starsze mięśnie zwiększają aktywność glukoneogenezy. Energia potrzebna do tego procesu może być zapewniona dzięki zwiększonej degradacji kwasów tłuszczowych w mitochondriach, o czym świadczy wysoki poziom aktywności dehydrogenazy 3-hydroksyacilo-koenzymu A w starszych mięśniach [Johnson i Hammer, 1993]. Hipoteza ta została potwierdzona, gdy odnotowano wzrost ilości mięśniowych transporterów glukozy GLUT-1 i GLUT-4 związanych z wiekiem. Wzrost GLUT-1 i GLUT-4 odpowiednio o 38 i 49%, prowadził w konsekwencji do przyspieszonego transportu glukozy do tkanki mięśniowej i zwiększył glukoneogenezę, pomimo obserwowanego wzrostu poziomu glukozy w surowicy [Martineau in., 1999].

Zmniejszenie aktywności fosfatazy alkalicznej obecnej w sarkolemie (błonie komórkowej miocytu) i podwyższony poziom fosfatazy kwaśnej w lizosomach wskazują na zwiększone procesy kataboliczne zachodzące w starszych mięśniach [Carmeli i wsp., 2002]. Zmniejszona aktywność fosfatazy alkalicznej w sarkolemie wskazuje na nieprawidłowości lub jej uszkodzenie, podczas gdy zwiększona aktywność fosfatazy kwaśnej wskazuje na wzrost degradacji lizosomalnej. Wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej zlokalizowano także w tkance łącznej otaczającej włókna mięśniowe, a także w sarkoplazmie włókien mięśniowych.

Doniesienia naukowe dotyczące wpływu starzenia się mięśni na metabolizm białek są niezwykle obszerne i wyraźnie wskazują na to, że wraz z wiekiem następuje stopniowa utrata białek mięśniowych. Potwierdza to między innymi zmniejszone stężenie N-metylohistydyny w moczu u osób starszych oraz zmniejszenie liczby i wielkości sarkomerów [Fruhbeck i wsp., 1996]. Niektórzy badacze dowiedli, że w podczas procesu starzenia się mięśni, mozaika i typy włókien mięśniowych stopniowo zmieniają się wraz z redukcją włókien typu II i wzrostem włókien typu I [Tauchi i wsp., 1971]. Wraz z wiekiem, całkowita szybkość syntezy białek miofibrylarnych jest wolniejsza niż synteza rozpuszczalnych białek sarkoplazmatycznych. Związany z wiekiem spadek syntezy białek jest uogólnionym zjawiskiem w mięśniach szkieletowych. Tempo syntezy frakcji białka miofibrylarnego jest redukowane wraz z upływem lat [Welle i wsp., 1995], co wskazuje, że starzejące się mięśnie mają mniejszą zdolność syntezy nowych białek. Synteza ciężkiego łańcucha miozyny (MHC), białka odpowiedzialnego za hydrolizę ATP, ulega redukcji wraz z wiekiem, w szczególności MHCIIa [Balagopal i wsp., 2001]. Niektórzy badacze stwierdzili ostry spadek (40%) syntezy białka mitochondrialnego [Kwong i Sohal, 2000].

Opracowano kilka ścieżek metabolicznych zaangażowanych w degradację białek we włóknach mięśniowych. Mięśnie szkieletowe mają cztery główne systemy proteolityczne, a mianowicie lizosomalny, kaspazę, kalpainy i układ ubikwityna - proteasom, z których wszystkie mogłyby potencjalnie przyczynić się do atrofii mięśniowej związanej z wiekiem.

Szlaki cytozolowe odgrywają bardzo ważną rolę w krótkotrwałych białkach, a zwłaszcza w degradacji nieprawidłowych białek akumulujących się z wiekiem. Badania nad aktywnością kalpain w starych mięśniach wykazały wzrost kalpains II [Johnson i Hammer, 1993]. Badania aktywności lizosomalnej wykazały nagromadzenie nieaktywnej katepsyny D w mięśniach starych szczurów [Wiederanders i Oelke, 1984]. Zmiany związane z wiekiem stwierdzono w profilach białka ubikwityny, która łączy się z innymi białkami przeznaczonymi do degradacji w procesie zwanym ubikwitylizacją białek [Cai i wsp., 2000]. Jednakże Dardevet i wsp. [1995] nie znaleźli żadnych zmian w szlaku ubikwityna-proteasom w mięśniach dorosłych szczurów w porównaniu z mięśniami starych szczurów. W innym badaniu wykazano, że aktywność proteolityczna proteasomu 20S, będącego złożonym kompleksem białkowym biorącym udział w degradacji ubikwitylizowanych białek w mięśniach bardzo starych szczurów, zmniejsza się wraz ze zmianami w podgrupach 20S, podczas gdy ilość białka związanego z ubikwityną pozostała stała [Bardag-Gorce i wsp., 1999].

Autofagia jest wszechobecnym procesem katabolicznym, polegającym na wewnątrzkomórkowej degradacji składników cytoplazmatycznych poprzez szlak lizosomalny. Uważa się, że zmiany związane z wiekiem, dotyczące autofagii mogą odegrać istotną rolę w sarkopenii [Tukaj, 2013]. Pagano i in. [2015] ocenili ekspresję trzech markerów autofagii: Beclin 1 (Beklina 1), LC3 i p62 w spadku masy mięśniowej u psów geriatrycznych. Celem tego doświadczenia było ustalenie czy poziom autofagii zmienia się wraz z wiekiem. Badano biopsyjnie mięśnie od 25 geriatrycznych psów i porównywano je z pięcioma zdrowymi, młodymi psami. Próbkę starszych psów oceniono poprzez rutynową histologię, barwienia histologiczne i immunohistochemiczne. Obserwowano następujące zmiany histopatologiczne: atrofię włókien, nieprawidłowości mitochondrialne pod względem funkcjonalności i/lub rozmieszczenia w cytoplazmie oraz obecność materiału zawierającego esterazę, zgodnego z obecnością lipofuscyny we wnętrzu włókien mięśniowych. Ponadto, w 80% próbek mięśni starszych psów zaobserwowano wyraźne barwienie docytoplazmatyczne dla Beclin 1 i LC3. Wyraźnie wyższą ekspresję LC3 II i Beclin 1, ale niższą ekspresję p62, stwierdzono metodą western blotting, porównując próbki mięśni od starych i młodych psów. Wyniki badania wskazują, że nasilenie procesów autofagii może być jednym z czynników powodujących zanik mięśni u psów w procesie starzenia.

3.4. ZABURZENIA REGULACJI GOSPODARKI JONOWEJ W STARZEJĄCYCH SIĘ MIĘŚNIACH

Uważa się, że wraz z wiekiem pojawia się dysfunkcja regulacji aktywności kanałów jonowych w komórkach mięśniowych. Obejmują one przede wszystkim zaburzenia w procesach sprzężenia pobudzenia mięśnia a jego skurczem. Jest to

prawdopodobnie spowodowane nieprawidłowym transportem jonów Ca^{2+} przez kanały wapniowe oraz upośledzonym działaniem kanałów chlorkowych i potasowych [Morimoto i Goto, 2000]. Stare włókna mięśniowe wykazywały znaczne spadki w stężeniu sarkoplazmatycznego Ca^{2+} , wynikające ze zmniejszonego przepływu jonów przez kanał Ca^{2+} typu L [Ferrington i wsp., 1998]. W starzejących się mięśniach obserwowano podwyższone stężenie kinazy białkowej C, co wiązało się obniżeniem przewodnictwa chlorkowego (De Luca i wsp., 1994). Co ciekawe, podawanie hormonu wzrostu w starszym wieku polepsza przewodnictwo i podnosi zależną od chlorków pobudliwość sarkolemy [De Luca i wsp., 1997]. W innych przeprowadzanych badaniach wykazano zaburzenia funkcjonowania receptorów dihydropirydyny (DHP) i receptorów rianodyny, a także zmiany poziomów kalsekwestryny, białka luminalnego siateczki sarkoplazmatycznej w starzejących się mięśniach [Margreth i wsp., 1999; Wang i wsp., 2000]. Szybkość wychwytu Ca^{2+} przez siateczkę sarkoplazmatyczną zależna od ATP jest zmniejszona o około 15% w mięśniach szkieletowych osób starszych w porównaniu z osobami dorosłymi. Stymulowane jonami Ca^{2+} działanie ATP-azy i poziom białek Ca^{2+} -ATP-azy zmienia się wraz z wiekiem, co może mieć duży wpływ na pracę starzejących się mięśni. Wykazano, że włókna wolno kurczliwe bardziej niż włókna szybko kurczliwe są dotknięte zmniejszeniem szczytowej zawartości wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} , dłuższym czasem potrzebnym do osiągnięcia maksymalnej siły skurczu i dłuższym czasem trwania skurczu [Narayanan i wsp., 1996].

Podsumowując, można stwierdzić, że upośledzenie funkcji siateczki sarkoplazmatycznej oraz zaburzenia transportu i poziomu poszczególnych jonów w komórkach, a szczególnie homeostazy wapniowej ma duże znaczenie w upośledzeniu kurczliwości starzejących się mięśni.

3.5. WPLYW STRESU OKSYDACYJNEGO I WOLNYCH RODNIKÓW NA STARZEJĄCE SIĘ MIĘŚNIE

W ostatnich latach najbardziej zmienił się pogląd na rolę stresu oksydacyjnego i wolnych rodników na procesy starzenia się mięśni. Wcześniej uważano, że starzenie się spowodowane jest przewlekłym szkodliwym oddziaływaniem reaktywnych form tlenu (ROS) w ciągu całego życia i choć ochronne układy antyoksydacyjne przeciwstawiają się temu zjawisku, to ich wydolność spada z wiekiem i staje się niewystarczająca, aby zapobiec tym procesom [Chabi i wsp., 2008]. Część badań jednak wykazuje, że wraz z wiekiem efektywność układu antyoksydacyjnego nie spada, co zaprzeczałoby wcześniejszej teorii [Barreiro i wsp., 2006]. Paradoksalnie tlen niezbędny do życia każdego ssaka może być również dla niego szkodliwym, a zjawisko to nazywa się „paradoksem tlenowym”. Dodanie pojedynczego elektronu do cząsteczki tlenu poprzez proces redukcji często występujący w tkankach prowadzi do sekwencyjnego tworzenia się szeregu struktur reaktywnych, takich

jak: O_2^- , H_2O_2 i OH , które są głównymi reaktywnymi formami tlenu wytwarzanymi w mięśniach [Reid, 2001]. Wszystkie te elementy, a zwłaszcza rodnik hydroksylowy $-OH$ powodują uszkodzenie oksydacyjne innych cząsteczkowych składników komórki, w tym: peroksydacji błony fosfolipidowej, modyfikacji DNA jądrowego lub zmian w białkach enzymatycznych i procesach proteolizy. Zjawisko to określane jest jako „stres oksydacyjny” [Sohal i Weindruch, 1996; Conley i wsp., 2000].

Podczas procesów utleniania, na białka mogą negatywnie wpływać takie składowe, jak:

- a) utlenianie łańcucha białkowego, co prowadzi do fragmentacji białka,
- b) tworzenie wiązań poprzecznych pomiędzy proteinami,
- c) utlenianie łańcuchów bocznych aminokwasów,
- d) wytwarzanie pochodnych karbonylu.

Lista związków zawierających karbonyl jest długa i należą do niej m. in. reaktywne formy aldehydowe, produkty peroksydacji lipidów, takie jak: 4-hydrokso-2-nonenal i malondialdehyd (MDA), a także substancje, które są wynikiem redukcji cukrów lub produktami ich utleniania resztami lizyny. Innym źródłem pochodnych karbonylowych białek są reakcje utleniania bocznego łańcucha grup aminowych katalizowane metalem zbliżone do reakcji Fentona [Berlett i Stadtman, 1997]. Podczas starzenia się ilość wolnych rodników może wzrosnąć w konsekwencji niewydolnego działania łańcucha oddechowego i częstych mutacji mtDNA. Komórkowe systemy antyoksydacyjne enzymatyczne i nieenzymatyczne obejmują m. in. peroksydazę glutationową, dysmutazę ponadtlenkową, katalazę witaminy A, C, E i inne [Holloszy, 1998; Ward, 1998]. Stopień utleniania białek mierzony zawartością związków karbonylowych i peroksydacją membranową lipidów ocenianą na podstawie ilości tworzących się aldehydów jest najczęstszym wskaźnikiem do określania stopnia uszkodzenia tkanki mięśniowej. Badania wykazały, że stopień peroksydacji lipidów (niestymulowany i stymulowany enzymatycznie żelazem) silnie spada w mięśniach szkieletowych myszy NMR-1 [Salminen i wsp., 1988]. Utlenianie białek przez rodniki hydroksylowe i reaktywne formy azotu (RNS) badano w tkankach mięśniowych starzejących się szczurów [Leeuwenburgh i wsp., 1998]. Wykazano, iż poziomy o-tyrozyny i 3-nitrotyrozyny nie wzrosły zasadniczo wraz z wiekiem, co wskazywałoby na to, że reaktywne formy tlenu i azotu nie kumulują się wraz z wiekiem. W innych badaniach przeprowadzonych u starzejących się szczurów wykazano, że poziom związków karbonylowych jako miara utleniania się białek wzrosła o około 50% w białkach mięśnia brzuchatego łydki w porównaniu z młodymi szczurami [Reznick i Packer, 1994].

Tymczasem nowe doniesienia naukowe przynajmniej częściowo temu zaprzeczają i pojawiają się wątpliwości, czy w rzeczywistości ROS mają tak dużą siłę niszczenia komórek, jak wcześniej uważano [Kraytsberg i wsp., 2006; Wang i wsp., 2001]. W badaniach przeprowadzonych u długo żyjącego gryzonia golca piaskowego stwierdzono, że występuje u niego wprawdzie zwiększona synteza ROS, ale z jednoczesnym zwiększonym ich wychwytywaniem przez układ

antyoksydacyjny, którego wydolność wcale nie maleje z wiekiem. W innych pracach badawczych wykazano, że zarówno odpowiednia dieta, jak i ćwiczenia fizyczne stymulują biogenezę mitochondrialną i chociaż w początkowym etapie prowadzą do wzrostu ilości ROS w komórce, to po pewnym czasie dochodzi do ich spadku na skutek zwiększenia zdolności antyoksydacyjnych [Safdar i wsp., 2010]. Co ciekawe, dodatkowa suplementacja antyoksydantów w diecie u ludzi wcale nie przynosiła pozytywnego efektu, a nawet była szkodliwa dla ich zdrowia [Bjelakovic i wsp., 2007]. Na podstawie przytoczonych powyżej faktów można przypuszczać, że wewnątrzkomórkowe ROS pełnią rolę swoistych sygnalizatorów komórkowych i że nie wszystkie mają tak szkodliwe działanie, jak wcześniej sądzono. Kluczem do opóźnienia procesu starzenia wydaje się być zachowanie równowagi pomiędzy procesami produkcji, a inaktywacji nadmiaru reaktywnych form tlenu.

Podsumowując, wydaje się niemal pewne, że oksydacyjne uszkodzenie mięśni jest znaczącym procesem odpowiedzialnym za starzenie się tkanki mięśniowej, choć w mniejszym wymiarze, niż to wcześniej zakładano, a mechanizm tych zmian jest zdecydowanie bardziej złożony i wymaga dalszych badań.

3.6. MIKROSTRUKTURA MIĘŚNI SZKIELETOWYCH

Oprócz komórek mięśniowych, w brzuscu mięśnia występują podłużnie ułożone wrzeciona nerwowo-mięśniowe. Wrzeciona nerwowo-mięśniowe to receptory czucia głębokiego mięśni szkieletowych, które przede wszystkim wykrywają zmiany długości tego mięśnia, przyczyniając się do precyzyjnej kontroli motorycznej i dostarczania informacji o położeniu osiowym i kończynowym do ośrodkowego układu nerwowego. Reakcje wrzecion mięśniowych na zmiany ich długości również odgrywają ważną rolę w regulacji skurczu mięśni. Aktywacja neuronów ruchowych poprzez odruch rozciągania zapobiega nadmiernemu rozciągnięciu mięśni [Proske i Candevia, 2009].

Wrzeciona nerwowo-mięśniowe są małymi organami zmysłów o wydłużonym kształcie. Pełnią rolę proprioceptorów, które składają się z kilku zmodyfikowanych włókien mięśniowych zamkniętych w osłonce tkanki łącznej [Brukner i wsp., 2012]. Te zmodyfikowane włókna nazywane są włóknami śródwrzecionowymi. Włókna te są zorientowane równolegle do zwykłych, wytwarzających energię włókien pozawrzecionkowych. Włókna śródwrzecionowe są na obu końcach połączone z więzadłami ścięgnistymi lub włóknami pozawrzecionkowymi, a mianowicie białkami kurczliwymi [Proske i Candevia, 2009]. Tak więc włókna śródwrzecionowe są odpowiednio rozciągane lub skracane, gdy włókna pozawrzecionkowe zmieniają długość. Środkowa część wrzeciona mięśniowego jest pokryta tkanką łączną. Dendryty czuciowe mięśnia wrzeciona aferentnego obejmują obszar centralny. Wrzeciono mięśniowe jest rozciągane, gdy mięsień wydłuża się, otwiera mechanicznie kanały jonowe w dendrytach czuciowych. Prowadzi to do pobudzenia receptora,

który wyzwala potencjały działania w mięśni, w którym znajduje się to wrzeciono [Mukherjee i Chakravarty, 2010].

W środku wrzecion mięśniowych występują dwa typy zakończeń sensorycznych: pierwotne i wtórne. Pierwotne zakończenia odpowiadają szybkości i wielkości zmiany długości mięśni. Należą do najszybszych aksonów, ponieważ posiadają osłonkę mielinową. Przyczyniają się zarówno do ruchu, jak i do utrzymania pozycji kończyn. Wtórne zakończenia są wrażliwe tylko na zmiany długości, a nie na prędkość, więc przyczyniają się tylko do koordynacji pozycji. Zakończenia te mają mniejsze aksony, a zatem wolniejszą prędkość przewodzenia. Oba zakończenia we wrzecionach mięśni są bardzo wrażliwe na zmiany długości mięśni o niskiej amplitudzie zwłaszcza, jeśli zmiany te występują z dużą częstotliwością. Zakończenie wrzeciona znajduje się na końcu neuronu lub aksonu, którego ciało komórkowe (perikarion) zlokalizowane jest w zwojach rdzeniowych [Proske i Candavia 2009; Hospod i wsp., 2001].

Wrzeciona mięśni stymulują odruchowo skurcz mięśni, aby zapobiec nadmiernemu rozciągnięciu i uszkodzeniu włókien mięśniowych - jest to znane jako rozciągnięcie lub odruch mięśniowy. Podczas rozciągania wrzeciona mięśniowego natychmiast wysyłany jest impuls do rdzenia kręgowego i występuje reakcja na rozciągnięcie się mięśnia, aby chronić go przed zbyt silnym rozciągnięciem poza fizjologiczny zakres. Czas przechodzenia bodźca i reakcji na ten bodziec jest bardzo szybki, ponieważ impuls musi pokonać krótką drogę, od receptora do rdzenia kręgowego i z powrotem [Mukherjee i Chakravarty, 2010]. Prawidłowy odruch mięśniowy ma dwa komponenty: statyczny i dynamiczny. Styczny trwa tak długo, jak długo mięsień jest rozciągany, a dynamiczny utrzymuje się tylko przez chwilę w odpowiedzi na początkowy nagły wzrost długości mięśni. Celem wrzecion mięśniowych i odruchów rozciągających jest ochrona ciała przed urazami spowodowanymi nadmiernym rozciąganiem oraz utrzymanie stałego napięcia mięśniowego [Hospod i wsp., 2001]. To proces hamujący odruch rozciągania w antagonistycznych parach mięśni. Impuls jest wysyłany z rozciągniętego wrzeciona mięśni, gdy aktywowany jest odruch rozciągania, wówczas wysyłane są przez neuron ruchowy dwa przeciwstawne impulsy. Jednocześnie inicjowany jest sygnał do skurczu rozciągniętego mięśnia oraz drugi sygnał do rozluźnienia antagonistycznego mięśnia [Kakuda i Nagaoka, 1998].

Wrzeciona kontrolują zatem, w jakim stopniu mięsień musi zostać aktywowany, aby pokonać naturalnie występujące opory mechaniczne. W miarę wzrostu obciążenia mięsień jest rozciągany w większym stopniu, a pobudzenie wrzecion powoduje większą jego aktywację. Mięśnie wykonujące precyzyjne ruchy mają wiele wrzecion na jednostkę masy, aby zapewnić dokładną kontrolę ich aktywności skurczowej [Brukner i wsp., 2012].

Wiele schorzeń, przede wszystkim neurologicznych, towarzyszących często procesom starzenia, prowadzi do poważnych zaburzeń w funkcjonowaniu wrzecion nerwowo- -mięśniowych. W konsekwencji pojawiają się dyskoordynacje ruchowe, a także patologiczna spastyczność mięśni. Dystrofia

mięśniowa często występująca u starych osobników, jak wiadomo, charakteryzuje się degeneracją włókien mięśni szkieletowych. Jednak badania nad wpływem degeneracji mięśni na włókna śródwrzecionowe wykazały, że proprioceptywna funkcja wrzecion mięśniowych nie zostaje poważnie upośledzona w dystrofii mięśniowej. Badania potwierdziły, że pacjenci z dystrofią mięśniową odczuwali bierne ruchy i doświadczyli iluzorycznych ruchów podobnych do tych postrzeganych przez osoby zdrowe pod względem kierunku i prędkości ruchu. Wykazano również, że w porównaniu ze zdrowymi osobami pacjenci z dystrofią mięśniową byli w stanie reagować podobnym zakresem ruchu przestrzennego i czasowego [Ciscar i wsp., 2004].

Podstawowymi czynnikami kształtującym masę i objętość mięśni szkieletowych są całkowita liczba włókien mięśniowych, ich grubość, długość oraz typ. Większość mięśni zwierząt charakteryzuje budowa heterogenna. Składają się one z różnych typów włókien mięśniowych o mniejszej (włókna czerwone) lub większej (włókna białe) średnicy, różniących się pod względem morfologicznym, metabolicznym i fizjologicznym, co w znacznym stopniu decyduje o jakości pozyskanego mięsa ze zwierząt gospodarskich. Poznano już wiele czynników środowiskowych i genetycznych mających istotny związek z grubością (średnicą) i udziałem procentowym różnych typów włókien w mięśniach szkieletowych tych zwierząt. W związku z tym umiejętność wpływania – w pewnym zakresie – na grubość, typ i całkowitą liczbę włókien mięśniowych umożliwia hodowlę i chów zwierząt o coraz większej wydajności mięsnej. Inaczej sytuacja przedstawia się w przypadku zwierząt towarzyszących, w tym u psów. Zróznicowanie masy mięśniowej, ilości tkanki łącznej i tłuszczowej wynika z wielu czynników, w tym przede wszystkim rasy psa, jego użyteczności, płci, wieku, a także diety. Procesy metaboliczne, w tym w obrębie mięśni szkieletowych, przebiegają u psów w sposób wyjątkowy w porównaniu z innymi gatunkami zwierząt, a przede wszystkim w odniesieniu do zwierząt gospodarskich. Jak wcześniej napisano, włókna mięśni ssaków zostały podzielone na typy I, IIA i IIB w oparciu o ich metabolizm. Włókna typu I cechują się mniejszą aktywnością ATP-azy w porównaniu z włóknami typu II. Typy I i IIA charakteryzują się metabolizmem utleniającym, podczas gdy włókna typu IIB wykazują się beztlenowym metabolizmem glikolitycznym.

Mięśnie psów zawierają głównie włókna utleniające [Armstrong i wsp., 1982; Gunn 1978a; Snow, 1987]. Guy i Snow [1981] opisali występowanie pojedynczych nisko oksydacyjnych włókien mięśniowych u psów, ale przyznają, że aktywność dehydrogenazy bursztynianowej enzymu utleniającego we włóknach niskiej oksydacji była nadal większa niż w przypadku włókien typu IIB u innych gatunków.

Co ciekawe, wykazano, że psy metabolizują wolne kwasy tłuszczowe dwukrotnie szybciej niż ludzie [de Bruijne i van den Brom, 1986]. Wynika z tego, że mięśnie psów są bardziej przystosowane do wykorzystywania tłuszczów jako surowca energetycznego niż mięśnie ludzkie. W związku z tym wyniki badań eksperymentalnych u ludzi, ale także u zwierząt laboratoryjnych oraz

gospodarskich, nie mogą być w bezpośredni sposób wykorzystywane u psów. Dużą ilość badań dotyczących tkanki mięśniowej u psów przeprowadzono na chartach i psach zaprzęgowych. Charty są rasą w sposób wyjątkowo dostosowaną do biegania, zwłaszcza do sprintu. Ich masa mięśniowa stanowi większą część całkowitej masy ciała (57% vs 43%) w porównaniu z innymi rasami psów [Gunn, 1978b]. Mięśnie kończyn u tej rasy zawierają głównie (80 - 100%) szybko kurczliwe włókna mięśniowe typu IIA i niewielką ilość wolno kurczliwych włókien, podczas gdy głębiej położone partie mięśni antygravitacyjnych kończyny u psów rasy mieszanej zawierają więcej (20 - 100%) wolno kurczliwych włókien typu I [Armstrong i wsp., 1982; Gunn, 1978a; 1979b].

Większość włókien mięśniowych kończyn zarówno u chartów, jak i u innych psów rasowych wykazuje wysoką aktywność oksydacyjną [Gunn, 1978a; Guy i Snow, 1981]. Niemniej jednak aktywność tlenowych i beztlenowych enzymów mięśniowych (odpowiednio aldolazy i cytrynianu) jest zwiększona u chartów, podczas gdy aktywność innych enzymów (kinazy kreatynowej, dehydrogeiny mleczanowej) nie różni się w porównaniu z mieszanećmi [Guy i Snow, 1981]. Sugeruje to, że równowaga pomiędzy zdolnością utleniającą i glikolityczną w mięśniach u charta jest podobna do tej u innych ras. Porównania te mogą dotyczyć jednak tylko ras psów sportowych, zaprzęgowych, myśliwskich i ratowniczych, ale nie do końca psów rasy mieszanej. Będzie to przedmiotem wykonanych w tej pracy analiz.

Ciekawe badania mikrostruktury mięśni u owczarków niemieckich wykonali De Braga i wsp. [2016]. Celem tego działania było określenie i potwierdzenie udziału procentowego włókien mięśniowych typu I i typu II, które składają się na mięsień pośladkowy średni owczarków niemieckich obu płci, w różnych grupach wiekowych. Biopsje pobrano z mięśni pośladkowych średnich czterdziestu zdrowych klinicznie psów rasy owczarek niemieckiej, stosując technikę przezskórnej biopsji igłowej. Próbkę oceniano przy użyciu histologicznych i enzymatycznych metod histochemicznych. Procent włókien typu I i II oraz stosunek ilości włókien typu I do ilości włókien typu II oceniono na podstawie masy ciała, grupy wiekowej, korelacji między płcią a grupą wiekową oraz pomiędzy płciami. Stwierdzono, że nie ma znaczącej różnicy w stosunku do rodzajów włókien dla parametrów masy ciała, grupy wiekowej oraz wieku samic. Korelacja między wiekiem samców sugerowała wzrost udziału włókien typu I, zmniejszenie udziału włókien typu II lub wzrost ich wzajemnego stosunku podczas procesu starzenia. Stwierdzono, że nastąpił spadek odsetka włókien typu II z postępującym wiekiem u psów płci męskiej, ale bez znaczącej różnicy w odsetku włókien typu I i typu II w stosunku do masy ciała [De Braga i wsp., 2016].

W procesach starzenia się mięśni istotną rolę odgrywają tzw. włókna olbrzymie (giant fibres). Mięśnie szkieletowe składają się morfologicznie i funkcjonalnie z tkanki mięśniowej oraz zawierają tkankę nerwową, łączną i naczyniową. Mięśnie szkieletowe są pokryte omięszą zewnętrzną (*epimysium*

externum) lub namięsną zewnętrzną (*perymysium externum*) będących rodzajem błony zbudowanej z tkanki łącznej włóknistej otaczającej brzusiec mięśnia szkieletowego. Tkanka łączna śródmięсна (*endomysium*) dzieli mięsień na wiązki pierwotne, wtórne i trzeciorzędowe. *Endomysium* składa się z kilku warstw włókien kolagenowych i siateczkowych oraz fibrocytów. Włókno mięśniowe jest podstawową jednostką budulcową prążkowanych mięśni szkieletowych i można je scharakteryzować jako równoległe, wielojądrowe struktury cytoplazmatyczne [Hoppeler i Fluck, 2003]. Część zmian morfologicznych mięśni szkieletowych obejmuje różnice w ich wielkości i strukturze. Z funkcjonalnego i przyczynowego aspektu patologicznego zmiany strukturalne mają charakter wieloogniskowy i są niezależne od klasy, ale mogą posłużyć do określenia rodzaju włókna.

Wohlfart [1937; 1949] po raz pierwszy opisał mikroskopowo „olbrzymie” włókna przerostowe w dystrofii mięśniowej noworodków. Zmiany morfologiczne włókien olbrzymich związane z czynnością mięśni odpowiadają zaburzeniom metabolizmu i pierwotnej degeneracji mięśni szkieletowych [Carpenter i Karpati, 1984]. Włókna olbrzymie występują w dużej grupie chorób nerwowych i mięśniowych [Dubowitz, 1995]. Ostatnie badania włókien olbrzymich obejmują szerokie spektrum zmian w postępie niektórych chorób mięśniowych. Objawami klinicznymi chorób mięśniowych są również objawy związane ze zmianami biochemicznymi, fizjologicznymi i patologicznymi [Fazarinc, 2002; Durbeej i wsp., 2000]. Makovicky i wsp. [2007] opisali występowanie, wygląd, a także strukturę morfologiczną włókien olbrzymich świń. Do badania wybrano 30 świń. Były one karmione *ad libitum* standardową mieszanką paszową. Na koniec eksperymentu zwierzęta uśmiercono przy średniej żywej masie ciała 100 ± 5 kg, w wieku 162 ± 11 dni. Wyniki pokazały, że włókna olbrzymie wykryto po raz pierwszy u 48-dniowych świń. Nie zawsze były owalne, często miały kanciasty kształt. Wraz ze wzrostem wieku świń stwierdzono większą liczbę włókien olbrzymich w różnych mięśniach. Wykazano, że największa kumulacja włókien olbrzymich występuje w mięśniu prostym uda - *m. rectus femoris* (MRF) i w mięśniu najdłuższym grzbietu *m. longissimus dorsi* (MLD). Wyniki analizy morfometrycznej wykazały, że grubość włókien olbrzymich była wyższa niż średnia grubość normalnych włókien mięśniowych u świń w wieku od 48 do 162 dni. Występowanie włókien olbrzymich nie zatrzymuje procesu wzrostu normalnych włókien mięśniowych w mięśniach [Makovicky i wsp., 2007].

Dokonując analizy piśmiennictwa, można dotrzeć do wielu prac na temat włókien olbrzymich mięśni u ludzi i różnych gatunków zwierząt. Niestety jest niewiele informacji na temat tego typu włókien w mięśniach szkieletowych u psów. Również rola tych komórek oraz przyczyny ich powstawania w mięśniach psów nadal nie jest do końca poznana.

3.7. ROLA KOMÓREK SATELITARNYCH W PROCESACH MIOGENEZY I STARZENIU MIĘŚNI

Podczas embriogenezy kręgowców, mezodermalne komórki progenitorowe prowadzą do powstania różnych linii komórkowych, w tym miocytów szkieletowych, osteocytów, chondrocytów i adipocytów, w odpowiedzi na różne sygnały pochodzące z otaczających tkanek (Brand-Saberi i wsp., 1996). Istnienie multipotencjalnych mezodermalnych komórek progenitorowych w zarodku zostało dobrze przebadane przy użyciu linii komórkowej C3H10T1/2 pochodzącej z zarodkowych komórek mezodermalnych. Komórki 10T1 / 2 łatwo różnicują się w trzy różne mezodermalne linie komórkowe, miocyty szkieletowe, adipocyty i chondrocyty po leczeniu 5-azacytydyną [Taylor i Jones, 1979]. Leczenie białkami morfogenetycznymi kości (BMP) może wywoływać różnicowanie osteogeniczne, chondrogenne i adypogenne komórek 10T1 / 2 [Katagiri i wsp., 1990; Asahina i wsp., 1996]. Ponadto, wielotorowe mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące ze szpiku kostnego mogą różnicować się do miocytów szkieletowych, adipocytów, osteocytów i chondrocytów po leczeniu różnymi induktorami, jak również transplantacji *in vivo* [Pittenger i wsp., 1999; Liechty i wsp., 2000]. Wyniki przytoczonych powyżej badań sugerują, że istnieją wspólne komórki progenitorowe, które dają początek mezenchymalnym potomkom. Uważa się, że komórki satelitarne stanowią wyspecjalizowaną grupę miogennych komórek macierzystych dojrzałego mięśnia szkieletowego. Komórki satelitarne charakteryzuje zwiększona zawartość heterochromatyny (większa niż w jądrach włókien mięśniowych) oraz niewielka ilość cytoplazmy. Populacja tych komórek satelitarnych stanowi 2-20% wszystkich jąder pod błoną podstawną, a ich największe skupiska obserwuje się w pobliżu płytki motorycznej i włókien intrafuzalnych. Wykazano, że więcej komórek satelitarnych zawierają mięśnie osobników młodych niż starych oraz że ich populacja rośnie w trakcie regeneracji uszkodzonych mięśni [Ciecierska i wsp., 2019; Yin i wsp., 2013].

Komórki satelitarne są zwykle mitotycznie spoczynkowe, ale inicjują proliferację, gdy są aktywowane m. in. przez czynnik wzrostu, uraz lub regenerację mięśni. Miogenne komórki prekursorowe (MPC), potomstwo aktywowanych komórek satelitarnych, podlegają wielokrotnym podziałom komórkowym przed ich ostatecznym różnicowaniem, tworząc wielojądrową miotubę [Seale i Rudnicki, 2000]. Komórki satelitarne reprezentują wyjątkową populację miogenicznych komórek progenitorowych, które różnią się od ich mioblastów potomnych zarówno kryteriami biochemicznymi, jak i biologicznymi [Seale i Rudnicki, 2000]. Miogenne czynniki regulatorowe (MRF), grupa specyficznych dla mięśni szkieletowych podstawowych czynników transkrypcyjnych helisa-pętla-helisa (bHLH) składających się z MyoD, Myf5, myogeniny i Myf6 odgrywają istotną rolę w aktywacji, proliferacji i różnicowaniu komórek satelitarnych [Seale i Rudnicki, 2000]. Niedawno wykazano, że pierwotne mioblasty pochodzące z komórek

satelitarnych izolowane od dorosłych myszy bez MyoD (MyoD^{-/-}) wykazują przyspieszoną szybkość wzrostu i opóźnione różnicowanie końcowe. Dlatego sugerowano, że MyoD^{-/-} pierwotne mioblasty wykazują cechy, które są bardziej prymitywne niż komórki typu dzikiego i mogą reprezentować etap pośredni pomiędzy komórką macierzystą i miogeniczną komórką prekursorową. Homozygotyczne myszy pozbawione genu Pax7 (Pax7^{-/-}), które nie przeżywają dłużej niż dwa tygodnie po urodzeniu, wykazują całkowity brak komórek satelitarnych w ich mięśniach, co sugeruje istotną rolę Pax7 w rozwoju komórek satelitarnych [Seale i wsp., 2000].

Niedawno wykonane eksperymenty metodą *in vitro* pokazują, że hodowane komórki miogenne, które uważa się za już wyspecjalizowane komórki linii mięśniowej, mogą różnicować się także w osteocyty lub adipocyty poprzez stymulację morfogenetycznymi białkami kości (BMP) [Yamaguchi i wsp., 1991; Katagiri i wsp., 1994] lub induktory adipogenne, takie jak tiazolidynodion lub kwasy tłuszczowe [Teboul i wsp., 1995]. Nadal nie ma jednak pewności czy komórki satelitarne mięśni są również zdolne do różnicowania się w linie osteogeniczne i adipogenne. Asakura i wsp. [2001] wykazali, że pierwotne mioblasty pochodzące z komórek satelitarnych wyizolowanych z dojrzałego mięśnia szkieletowego różnicują się w osteocyty lub adipocyty odpowiednio po leczeniu BMP lub adipogennymi induktorami. Ponadto komórki satelitarne włókien mięśniowych łatwiej różnicują się w osteocyty i adipocyty niż pierwotne mioblasty. Wzmocniona plastyczność mezenchymalna wykazywana przez komórki satelitarne sugeruje zatem, że komórki te reprezentują unikalny przedział komórek macierzystych z mezenchymalnym repertuarem potencjału.

Chociaż jest oczywiste, że dorosły mięsień szkieletowy zawiera szereg fenotypowo i behawioralnie odrębnych komórek o potencjale miogenicznym, wszelkie związki pomiędzy tymi składnikami pozostają nadal niewyjaśnione [Zammit i Beauchamp, 2001]. Pewne jest to, że komórki satelitarne są ostatecznie odpowiedzialne za wytwarzanie nowych miojader w okresie wzrostu i regeneracji mięśni po urodzeniu. Większość komórek satelitarnych jest stymulowana do procesów miogenezy poprzez ekspresję markerów specyficznych dla mięśni, w tym miogennego czynnika regulatorowego Myf5.

Jednakże w normalnych warunkach komórki satelitarne są nieaktywne po wycofaniu się z miogenezy przed ekspresją MyoD. Ten specyficzny stan wstrzymania odróżnia przedział regeneracyjny mięśni szkieletowych od systemów komórkowych, takich jak krew czy skóra, gdzie przekształcanie od komórki macierzystej do zróżnicowanej wyspecjalizowanej komórki jest w odpowiedzi na zapotrzebowanie na stałą regenerację tych komórek. Wydaje się, że pula komórek satelitarnych spełnia wiele żądanych kryteriów przedziału komórek macierzystych, takich jak: klonogeniczność, zdolność do samoodnawiania się i zdolność do wytwarzania zróżnicowanych komórek potomnych. Jednak pozostaje niejasne, czy właściwości te są cechą wszystkich pojedynczych komórek satelitarnych [Zammit i Beauchamp, 2001]. Kluczowe pozostaje pytanie, w jaki sposób pula komórek satelitarnych jest utrzymywana

przez całe życie po narodzinach i czy te właściwości są cechą wszystkich pojedynczych komórek satelitarnych. Identyfikacja odrębnej populacji komórek satelitarnych, które nie wyrażają markerów mięśniowych lub które są behawioralnie różne, może sugerować, że większość komórek satelitarnych jest przygotowana do pełnienia roli przedziału wzmacniającego tranzyt, który jest uzupełniany z populacji rezerwowej. Nie będzie to jednak do końca wyjaśnione, dopóki nie zostanie opracowana skuteczna metoda izolacji tej grupy komórek i monitorowania ich pochodzenia oraz rozwoju [Zammit i Beauchamp, 2001]. Fakt, że Pax7 jest niezbędny do wykrywania komórek satelitarnych, sugeruje, że jego ekspresja jest ważnym czynnikiem stymulującym komórki satelitarne do dalszego ich różnicowania. Określenie funkcji multipotencjalnych komórek macierzystych w dojrzałym mięśniu szkieletowym nadaje nowy wymiar hipotezie hierarchii. Jednak prawdziwa tożsamość, a co ważniejsze, znaczenie takich komórek dla prawidłowej regeneracji pozostaje nieznanne. Chociaż wykazano, że te multipotencjalne komórki macierzyste pochodzące z dorosłego mięśnia mogą tworzyć miojądra, częstotliwość, z jaką to występuje, znajduje się na granicy wykrywalności.

Pomimo spornego pochodzenia komórki satelitarne zdają się opierać na tej samej sieci czynników transkrypcyjnych w celu określenia i różnicowania się jak miogeniczne komórki prekursorowe podczas rozwoju embrionalnego. Podobnie jak ich embrionowi kuzyni komórki satelitarne wyrażają MyoD i Myf5, a połączone zakłócenie tych genów prowadzi do ablacji komórek satelitarnych podobnych do anihilacji innych komórek miogenicznych [Rudnicki i wsp., 1993]. Pomimo że komórki satelitarne można scharakteryzować przez ekspresję charakterystycznych genów markerowych, takich jak: M-kadherynę, CD34, Msx1, cMet, MNF (Foxk1) [Garry i wsp., 2000] i Pax7 [Beauchamp i wsp., 2000; Cornelison i wsp., 2000; Seale i wsp., 2000] i przez ich typowy wygląd morfologiczny, to uważa się, że nie reprezentują one unikalnego typu komórek, ale raczej heterogenną populację komórek prekursorowych mięśni. Gen Pax7 zwrócił szczególną uwagę, ponieważ wykazano, że homozygotyczne zmutowane myszy Pax7 są pozbawione całkowicie komórek satelitarnych mięśni, co sugeruje, że Pax7 znajduje się na szczycie hierarchii molekularnej kontrolującej specyfikację komórek satelitarnych [Seale i wsp., 2000]. Okazuje się, że myszy Pax7 (A / J) nie rozwijają się i większość z nich umiera w ciągu 2-3 tygodni prawdopodobnie z powodu dysgenezyi pochodnych grzebienia nerwowego [Mansouri i wsp., 1996]. Wykazano, że funkcja Pax7 częściowo pokrywa się z paralogicznym genem Pax3 podczas rozwoju [Mansouri i Gruss, 1998], co może wyjaśniać brak dostrzegalnego fenotypu u myszy zmutowanych Pax7. Stwierdzono, że Pax3 i Pax7 utrzymują komórki w rozregulowanym stanie niezróżnicowanym i proliferacyjnym, ułatwiając na przykład powstanie złośliwego nowotworu mięśniakomięsaka prążkowanokomórkowego. Oba te geny silnie stymulują proliferację komórek w różnych tkankach [Mansouri, 1998].

W swojej pracy Oustanina i wsp. [2004] wykazali, że młode myszy Pax7 (-/-) w P11 zawierają zmniejszoną, ale nadal dużą liczbę komórek satelitarnych mięśni, które w większości zanikają podczas życia poporodowego. Ani młode, ani dorosłe myszy Pax7 (-/-) nie wykazywały znaczącego zmniejszenia liczby i wielkości miotub. To znaczy, że pozostała liczba komórek satelitarnych wystarcza do normalnego, pourodzeniowego wzrostu mięśni. Stwierdzili także korelację pomiędzy liczbą komórek satelitarnych, a zdolnością do regeneracji mięśni, co stanowi wyzwanie dla ostatnich twierdzeń o alternatywnej ścieżce regeneracji mięśni opartej na dojrzałych komórkach macierzystych. Na podstawie poporodowego spadku liczby komórek satelitarnych ustalono, że Pax7 pełni kluczową funkcję w odnawianiu, namnażaniu i utrzymywaniu komórek macierzystych mięśni, ale jednocześnie nie jest bezwzględnie potrzebny do wytworzenia linii komórek satelitarnych. W związku z tym Pax7 nie jest niezbędny ani do specyfikacji, ani do początkowej proliferacji komórek satelitarnych, ale do ich utrzymania i przedłużonej proliferacji. Ta hipoteza, że Pax7 odgrywa główną rolę w odnowie i propagacji komórek satelitarnych, ale nie w ich specyfikacji, jest zgodna z wcześniejszymi doniesieniami, że Pax3 i ewentualnie także Pax7 utrzymują komórki w rozregulowanym, nieodróżnicowanym i proliferacyjnym stanie [Mansouri, 1998].

Jest prawdopodobne, że przedział regeneracyjny dojrzałych mięśni organizmów może zawierać większą liczbę potencjalnych komórek jak i mechanizmów odpowiedzialnych za te procesy, co wymaga zdecydowanie dalszych badań.

3.8. PROCESY ANGIOGENEZY A STARZENIE SIĘ MIĘŚNI

Jak powszechnie wiadomo, z wiekiem dochodzi do wielu zmian w obrębie mikrostruktury mięśni szkieletowych. Procesy te dotyczą nie tylko zmian samych miocytów, ale także naczyń krwionośnych. Naczynia włosowate zaopatrują mięśnie i włókna mięśniowe w tlen i składniki odżywcze oraz usuwają produkty przemiany materii [Hudlicka, 1991]. Wczesne badania Ranviera [1874] wykazały, że gęstość naczyń włosowatych jest wyższa w mięśniach czerwonych niż w mięśniach białych. Dalsze badania histochemiczne i biochemiczne potwierdziły, że gęstość sieci kapilarnej jest wprost proporcjonalna do poziomu metabolizmu oksydacyjnego [Gray i Renkin, 1978]. W miarę jak mięsień dostosowuje się do różnych obciążeń, następuje przebudowa obu rodzajów mięśni, metabolizmu i gęstości naczyń włosowatych [Hudlicka, 1985; Skorjanc i wsp., 1998].

Wraz z procesem starzenia dochodzi do redukcji funkcji mięśni i tolerancji wysiłkowej. Starzejący się osobnik wykazuje wzorzec strukturalnych i funkcjonalnych adaptacji w układzie sercowo-naczyniowym i mięśniowym, które mogą zagrażać dostarczaniu do mięśni tlenu i dopasowywaniu ilości dostarczanego tlenu do jego zapotrzebowania w mięśniu. W szczególności

starzejący się mięsień sercowy ma ograniczoną zdolność do zwiększania pojemności minutowej serca podczas ćwiczeń [Lakatta, 1999] i towarzyszącego im skurczu mięśni szkieletowych zarówno u ludzi [Wahren i wsp., 1974], jak i u zwierząt [Irion i wsp., 1987]. Co więcej, starzenie się może osłabiać tętniczonaczyniową odpowiedź na adenozyne [Cook i wsp., 1992], zmieniać kontrolę miogeniczną przewodnictwa naczyniowego [Muller-Delp i wsp., 2002a] i wywoływać zależne od śródbłonka rozszerzanie naczyń krwionośnych mięśnia szkieletowego [Muller-Delp i wsp., 2002b]. Istnieją również dowody na zmniejszoną gęstość włócnicek i stosunek kapilara-włókno w starzejącym się mięśniu zarówno u ludzi, jak i u zwierząt [Degens i wsp., 1993; Haidet i Parsons, 1991] co wiąże się z redukcją objętości i funkcji mitochondrialnej [Coggan i wsp., 1993; Conley i wsp., 2000]. W przeciwieństwie do powyżej przedstawionych informacji bardzo mało wiadomo na temat wpływu starzenia na dystrybucję i hemodynamikę czerwonych krwinek (RBC) w obrębie sieci naczyń włosowatych mięśni. Taka informacja ma kluczowe znaczenie dla modelowania wymiany tlenu we krwi i miocytów oraz wyjaśnienia, w jaki sposób wpływ na ten proces mogą mieć strukturalne i funkcjonalne następstwa procesu starzenia [Russell i wsp., 2003].

Równie ważnym zagadnieniem są procesy waskulogenezy i angiogenezy w obrębie tkanki mięśniowej. Waskulogeneza zachodzi podczas rozwoju embrionalnego i polega na wytwarzaniu sieci naczyniowej *de novo*. Angiogenezę, czyli tworzenie nowych naczyń krwionośnych odchodzących od już istniejących naczyń, należy odróżnić od arteriogenezy, która polega na remodelingu małych naczyń w wyniku działania wielu czynników, m. in. urazów mechanicznych. Procesy angiogenezy są źródłem zainteresowania wielu badaczy zarówno ze względu na procesy fizjologiczne toczące się w organizmie, jak i chorobowe, w tym przede wszystkim onkologiczne.

Angiogeneza jako bardzo złożony proces obejmuje współdziałanie licznych komórek, cytokin oraz macierzy pozakomórkowej. Rola komórek i cytokin jest dobrze poznana i określona, natomiast rola macierzy pozakomórkowej wciąż pozostaje nie do końca wyjaśniona [Bronson, 1990; Kindig i Poole, 1998]. Jest to związane z trudnością badania wpływu poszczególnych elementów tego obszernego kompartmentu na wzrost nowego naczynia [Skóra i wsp., 2006].

Niezależnie od kontekstu angiogeneza stanowi złożony, wieloetapowy proces, w którym komórki śródbłonka naczyń włosowatych rozrywają swoje normalne połączenia komórkowe, migrują i proliferują do okołonaczyniowej macierzy zewnątrzkomórkowej, w której ostatecznie formują nowe połączenia międzykomórkowe, tworząc nowe naczynia włosowate. Adhezyjne interakcje komórek śródbłonka ze sobą i z macierzą zewnątrzkomórkową wraz z receptorami adhezji, które pośredniczą w tych oddziaływaniach, mają prawdopodobnie fundamentalne znaczenie dla tego procesu [Eliceiri i Cheresch, 1999].

Interakcje międzykomórkowe są regulowane przez co najmniej cztery różne rodziny transbłonowych glikoprotein: integryn, kadheryn, selektyn i cząsteczki

adhezji komórek należące do nadrodziny immunoglobulin (Albelda i Buck, 1990). Rodzina integryn jest szeroko rozpowszechnioną grupą receptorów składającą się z homologicznych, niekowalencyjnie powiązanych par heterodimerów α/β , które pośredniczą w adhezji pomiędzy leukocytami oraz pomiędzy leukocytami i komórkami śródbłonna [Springer, 1990], jak również w interakcjach komórkowych ze składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej, takimi jak: kolagen, laminina, fibrynogen i fibronektyna [Ruoslahti i Pierschbacher, 1987]. Rodzina kadheryn jest rozwojowo regulowaną grupą strukturalnie spokrewnionych, jednołańcuchowych glikoprotein 120-130 kd, które pośredniczą w adhezji komórkowej zależnej od wapnia w sposób homofilny i specyficzny dla tkanki [Takeichi, 1991]. Selektyny, zwane także lektynowymi cząsteczkami adhezyjnymi - Lec-CAMS (w tym ELAM-1, GMP-140 i gp90 MEL) wiążą leukocyty do komórek śródbłonna poprzez domenę lektynopodobną na końcu aminowym cząsteczki [Butcher i wsp., 1990; Imai i wsp., 1990; Bradley i wsp., 1990]. Cząsteczki adhezji komórkowej (CAMS) należące do nadrodziny genów immunoglobulin (Ig) wykazują różnorodność funkcji i dystrybucji tkanek. Podobnie jak inni członkowie nadrodziny Ig, CAMS mają wspólną strukturę, jednostkę homologii immunoglobuliny, która charakteryzuje się sekwencją aminokwasową o długości około 100 aminokwasów, z centralnie umieszczonym mostkiem dwusiarczkowym, który stabilizuje serię mostków dwusiarczkowych antyrównoległych pasma β do tzw. fałdu przeciwciał (splot immunoglobulinowy) [Hunkapiller i Hood, 1989].

Uważa się, że CAMS z nadrodziny immunoglobulin spełniają szereg funkcji oraz biorą udział w wielu homofilnych i heterofilnych interakcjach komórkowych [Williams i Barclay, 1988], w tym tych, które zachodzą podczas rozwoju (N-CAM) [Cunningham i wsp., 1987; Edelman, 1988], zapalenia i gojenia się ran (ICAM-1, VCAM-1) [Wawryk i wsp., 1989; Elices i wsp., 1990] i prawdopodobnie onkogenezy [Benchimol i wsp., 1989]. PECAM-1 (cząsteczka adhezyjna płytek krwi/komórek śródbłonna-1) reprezentuje ostatnio scharakteryzowanego członka nadrodziny immunoglobulin, która znajduje się na powierzchni płytek krwi, niektórych leukocytów i międzykomórkowych połączeń komórek śródbłonna w hodowlach komórkowych [Newman i wsp., 1990].

Homologiczna glikoproteina, cząsteczka adhezyjna komórek śródbłonna (endoCAM) została opisana na bydłocych komórkach śródbłonna i płytkach krwi. Wykazano, że pośredniczy ona w interakcjach pomiędzy komórkami śródbłonna [Albelda i wsp., 1990]. Badania immunochemiczne i biochemiczne [Albelda i wsp., 1990; Newman i wsp., 1990] wskazują, że PECAM-1 jest identyczny z antygenami CD31, który opisano na ludzkich płytkach krwi, monocytach i neutrofilach, a także na komórkach śródbłonna dużych i małych naczyń [van Mourik i wsp., 1985; Stockinger i wsp., 1990]. Komórki macierzyste szpiku kostnego i transformowane linie komórkowe linii mieloidalnej i megakariocytowej również wykazują ekspresję CD31 [Simmons i wsp., 1990]. Wykazano, że PECAM-1(CD31) jest skoncentrowany na hodowanych

komórkach śródbłonka w połączeniach międzykomórkowych, gdy dochodzi do ich wzajemnego nałożenia się [Albelda i wsp., 1990], że PECAM-1 ulega konstytutywnej ekspresji na ciągłym, ale nie na sinusoidalnym śródbłonku *in situ* [Albelda i wsp., 1990] oraz, że przeciwciała przeciwko endoCAM, będącemu odpowiednikowi PECAM-1, hamują zdolność komórek śródbłonka do tworzenia konfluentnej monowarstwy [Albelda i wsp., 1990].

Dane te wskazują, iż ta cząsteczka bierze udział w adhezji międzykomórkowej śródbłonka. Homologia PECAM-1 z innymi CAM z nadrodziny immunoglobulin, jej obecności na płytkach krwi, białych krwinkach i śródbłonku, jej lokalizacja do połączeń komórek śródbłonka oraz dane funkcjonalne sugerują, że PECAM-1 jest ważną cząsteczką adhezyjną komórek naczyniowych [Albelda i wsp., 1991]. Bardzo ciekawe badanie nad wpływem procesów starzenia i treningu fizycznego na ekspresję płytkowo-śródbłonkowych cząsteczek adhezji komórkowej PECAM-1 (CD31), naczyniowo-śródbłonkowej kadheryny (VE-kadheryna), naczyniowo-śródnabłonkowego czynnika wzrostu - receptor 2 oraz śródnabłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS) w mięśniach szkieletowych u ludzi przeprowadzili Gliemann i wsp. [2018]. Wykazali oni, że osoby w podeszłym wieku mają słabszą reakcję przekrwioną mięśni nóg spowodowaną ich biernymi ruchami i niższe relatywne poziomy fosforylacji PECAM-1 niż osoby młode. Stwierdzono natomiast, że pomimo słabszego przekrwienia występującego u osób starszych po treningu wzrasta poziom fosforylacji PECAM-1. Jest to kolejny dowód na to, że ćwiczenia fizyczne w starszym wieku poprawiają funkcje naczyniowe mięśni szkieletowych, a tym samym procesy ich odżywiania i regeneracji.

3.9. CZYNNIKI ŚRODOWISKOWE WPLYWAJĄCE NA PROCESY STARZENIA SIĘ MIĘŚNI

Powszechnie wiadomo, że trening fizyczny ma pozytywny wpływ na zmniejszenie skutków starzenia, a nawet może go spowolnić [Słodki i Bogucka, 2019]. Pozytywne oddziaływanie ćwiczeń polega między innymi na indukowaniu biogenezy mitochondriów i syntezy białek oraz na zwiększeniu ekspresji genu mięśni szkieletowych i zwiększeniu zdolności utleniania w mięśniach szkieletowych. Niestety standardem jest spadek aktywności fizycznej u starszych ludzi i zwierząt [Johannsen i wsp., 2008]. Należy w związku z tym zadać sobie pytanie, czy nieprawidłowe funkcjonowanie mitochondriów jest głównym objawem starzenia się, czy wynika po prostu ze spoczynkowego trybu życia osób starszych. Wątpliwości te były poddane analizie w wielu badaniach, ale istnieje duża trudność obiektywnej kontroli poziomu tej aktywności [Petersen i wsp., 2003; Coggan i wsp., 1992; Short i wsp., 2005]. Wykazano niezbitę dowody na to, że odpowiednio dobrany plan treningowy może w znaczący sposób poprawić funkcje mitochondriów mięśni szkieletowych u osób starszych [Melov i wsp., 2007; Menshikova i wsp., 2006; Short, 2004].

Dodatkowo trening ma wpływ na spowalnianie procesów apoptozy, która, jak już wcześniej wspomniano, nasila się wraz z wiekiem [Song i wsp., 2006]. Wykazano, że po 4 miesiącach ćwiczeń aerobowych u starszych osób doszło do zwiększenia syntezy białek oraz wzrostu aktywności niektórych enzymów mitochondrialnych, takich jak syntazy cytrynianowej i oksydazy cytochromu C. Oprócz tego poprawił się poziom ekspresji genów związanych z mitochondriami i biogenezą, a stopień tych zmian był zbliżony do poziomów obserwowanych u osób młodszych [Short i wsp., 2004]. Podobne wyniki uzyskano w badaniu, gdzie po 12 tygodniach ćwiczeń aerobowych u ludzi zaobserwowano wzrost ilości i aktywności mitochondriów, szczególnie w części subsarkolemalnej [Menshikova i wsp., 2006]. Ćwiczenia fizyczne zwiększają także aktywność enzymów antyoksydacyjnych i białek szoku cieplnego [Leeuwenburgh i wsp., 1994], co z kolei obniża poziom ROS i zmniejsza prawdopodobieństwo wystąpienia uszkodzeń oksydacyjnych w mitochondriach podczas procesu starzenia. Nie trzeba specjalistycznych badań, aby wiedzieć, że systematyczny trening wytrzymałościowy nie przywróci całkowicie metabolizmu komórkowego do poziomów młodych osobników, a proces starzenia i tak, choć wolniej, ale będzie postępował. W związku z tym założono, że istnieje niezależny od czynników zewnętrznych efekt tzw. wieku [Lanza i wsp., 2008]. Potwierdziło to badanie wykonane w technologii „omics”, w którym wykazano, że po 6 miesiącach treningu sygnatura transkrypcyjna starzenia się była zasadniczo, ale niekompletnie odwrócona z powrotem do transkryptomu młodszych dorosłych [Melov i wsp., 2007]. Niestety problem w tym, że dostępne dane są raczej ograniczone i dotyczą głównie krótkoterminowych programów treningowych, a nie regularnych i systematycznych ćwiczeń, co uniemożliwia precyzyjną ocenę. Podsumowując, ćwiczenia są ważnym czynnikiem łagodzącym skutki starzenia, w tym zmiany mitochondrialne, ale nie są w stanie całkowicie zapobiec tym zmianom.

Kolejnym ważnym aspektem wpływającym na tempo starzenia jest dieta, a szczególnie ilość dostarczanych z pożywianiem kalorii. Ograniczenie spożycia o około 20-40% mniej kalorii niż zwykle prowadzi do spowolnienia spadku masy i siły mięśni szkieletowych występującego wraz z wiekiem. Ograniczenie kaloryczne (CR) ma opóźniający wpływ zarówno na naturalnie postępujące procesy starzenia, jak i związane z procesami chorobowymi i niewłaściwym stylem życia. Prawidłowo dobrana i zdrowa dieta wydłuża średni i maksymalny okres życia wielu gatunków. Większość badań na gryzoniach wykazuje, że CR przedłuża maksymalny okres życia nawet o 50% i zmniejsza częstotliwość występowania wielu chorób związanych z wiekiem, w tym chorób nowotworowych i metabolicznych [Speakman i Mitchell, 2011]. Tymczasem programy badawcze nad CR u ludzi i zwierząt w dużej mierze nadal trwają i na ich ostateczne wyniki trzeba jeszcze poczekać. Uzyskane do tej pory dane wykazują, że korzyści przypisane do CR są w głównej mierze związane z redukcją stresu oksydacyjnego [Merry, 2004]. Wykazano, że dziesięcioletnie CR u naczelnych spowodowało wyraźne zmniejszenie oksydacyjnego

uszkodzenia lipidów i białek [Zainal i wsp., 2000], a u starych szczurów CR również ograniczenie produkcji ROS [Drew i wsp., 2003]. W porównaniu do geriatrycznych zwierząt karmionych *ad libitum* starzejące się zwierzęta z ograniczeniami kalorycznymi CR wykazują mniejszą liczbę mutacji mitochondrialnego mtDNA jak i jądrowego DNA oraz mniej uszkodzeń oksydacyjnych mitochondriów mięśni szkieletowych [Bevilacqua i wsp., 2005]. Wydaje się, że restrykcjami dietetycznymi można skutecznie modulować wydajność mitochondrialną, ich zawartość i funkcję. Zmniejszenie ilości kalorii w diecie obniża wydatki energetyczne u zwierząt i ludzi poprzez mitochondria, które zużywają mniej tlenu, utrzymując przy tym normalne poziomy produkcji ATP [Speakman i Mitchell, 2011; Bevilacqua i wsp., 2005; Lopez-Lluch i wsp., 2006]. Potwierdzono w badaniach na gryzoniach, że ta adaptacja energetyczna jest zależna od obniżonego wycieku protonów, a zmniejszenie wycieku protonów jest z kolei możliwe dzięki zmianie środowiska na mniej oksydacyjne [Bevilacqua i wsp., 2005]. Choć CR może wpływać na niektóre enzymy ETS, to nie ma wpływu na ekspresję genu, poziom białka lub aktywność syntazy cytrynianowej ani na działanie innych białek TCA [Baker i wsp., 2006; Hancock i wsp., 2011].

Przeanalizowano również wpływ CR na dynamikę mitochondriów. Okazało się, że CR zwiększa biogenezę mitochondriów w porównaniu z grupą kontrolną, spowalniając tym samym spadek ekspresji genu PGC-1 α wraz z wiekiem w mięśniach szkieletowych gryzoni. Dzięki temu prawdopodobnie utrzymana jest prawidłowa zdolność utleniania u starych zwierząt z CR [Baker i wsp., 2006]. Analiza dotychczasowych wyników badań wskazuje, że dzięki odpowiednim restrykcjom kalorycznym można wpłynąć na dynamikę mitochondriów tak, aby stały się one bardziej wydajne energetycznie i jednocześnie zmniejszyły ryzyko nadprodukcji ROS. Umożliwia to redukcję stresu oksydacyjnego i sprzyja efektywniejszemu usunięciu dysfunkcyjnych mitochondriów [Wohlgemuth i wsp., 2010; Lopez-Lluch i wsp., 2006; Lee i wsp., 2010]. Jednakże bez względu na mechanizmy leżące u podstaw CR, należy podkreślić jednoznacznie, że ograniczenie kaloryczne tak, jak i ćwiczenia fizyczne mogą tylko częściowo, a nie całkowicie ograniczyć negatywne objawy starzenia, takie jak: spadek siły mięśniowej, liczby, typu oraz grubości włókien mięśniowych, a w konsekwencji starczej sarkopenii [Bua i wsp., 2004; Phillips i Leeuwenburgh, 2005].

Zupełnie innym czynnikiem łagodzącym dysfunkcję starczą mitochondriów są tzw. mimetyki, z których najpopularniejszy jest resweratrol(3,5,4'-trihydroksy-trans-stilben), fitoaleksyna występująca m. in. w czerwonym winie. Okazało się, że dodatek w diecie gryzoni resweratrolu wyraźnie zwiększa liczbę kopii i funkcję mtDNA, a w konsekwencji zwiększa też procesy syntezy mitochondrialnej. Zaobserwowano także wzrost wydolności wysiłkowej i funkcji motorycznej oraz spadek dysfunkcji metabolicznych u badanych gryzoni [Lagouge i wsp., 2006; Um i wsp., 2010; Baur i wsp., 2006]. Kiedy dokonano analizy działania resweratrolu na poziomie molekularnym, okazało się, że indukuje on wzrost ekspresji PGC-1 α , Tfam i UCP3, a także zwiększa aktywność

α SIRT1, AMPK i PGC-1 α . Sprawdzono również, jak na podanie resweratrolu zareagują myszy poddane czynnikom stresowym. Wykazano, że osobniki te miały większą wytrzymałość fizyczną, maksymalną siłę skurczu i zużycie tlenu oraz wyższe poziomy transkryptów genów α i ETS PGC-1 niż myszy, które nie otrzymywały mimetyków [Murase i wsp., 2009]. Zbieżne wyniki uzyskano u szczurów, którym podano resweratrol, ale nie wykazano u nich spadku procesów apoptozy. Mimetyki zatem wpływają wyraźnie na procesy przemian tlenowych w komórkach, ale nie na same procesy apoptyczne [Jackson i wsp., 2010]. Słusznym wydaje się stwierdzenie, że CR, podobnie jak dodatek resweratrolu w diecie, przede wszystkim powoduje zmniejszenie produkcji mitochondrialnego ROS i zwiększenie katabolizmu kwasów tłuszczowych w połączeniu z obniżaniem się poziomu syntezy kwasów tłuszczowych [Lopez - Lluh i wsp., 2008]. Optymizm opisanych powyżej badań spada, kiedy przeanalizujemy efekty długoterminowej suplementacji resweratrolem. Niestety, w tym przypadku u myszy nie zaobserwowano już tak wyraźnych pozytywnych efektów suplementacji. Wprawdzie dodatek resweratrolu pozwolił utrzymać wysoką funkcję kurczliwości włókien typu II i zmniejszył stres oksydacyjny, jednak nie zapobiegł starczemu spadkowi masy i siły mięśniowej [Jackson i wsp., 2011].

4. MATERIAŁ I METODY

4.1. ZWIERZĘTA WYKORZYSTANE W BADANIACH

Do badań zakwalifikowano 33 psy w przedziale wiekowym od 8 tygodni do 18 lat. Psy podzielono na 4 grupy wiekowe:

- grupa I - psy od urodzenia do 1 roku życia (4 osobniki),
- grupa II - psy od 1 do 5 roku życia (4 osobniki),
- grupa III - psy od 5 do 10 roku życia (10 osobników),
- grupa IV - psy powyżej 10 roku życia (15 osobników).

Wszystkie wymienione psy zmarły naturalnie z powodu istniejącej choroby lub zostały poddane eutanazji w zakładzie leczniczym dla zwierząt według wskazań medycznych, zgodnie z ustawą o ochronie praw zwierząt z dnia 21 sierpnia 1997 r. Żadne z powyższych zwierząt nie zostało uśmiercone w związku z opisywanym badaniem. Wszyscy opiekunowie psów wyrazili zgodę na pobranie pośmiertne wycinków mięśni do badań. W tabeli 2. przedstawiono grupy badawcze psów z podziałem na liczbę osobników w grupie, przedziały wiekowe, płęć oraz rasę.

Tabela 2. Zestawienie badanych zwierząt z podziałem na grupy badawcze

Grupa	Numer psa	Rasa	Płęć	Wiek	Diagnoza
I	1	Mieszaniec	Samiec	8 tygodni	Robaczycza jelit (7dni*)
	2	Doberman	Samiec	3 miesiące	Wrodzona wada mięśnia sercowego (14 dni*)
	3	Bulterier	Samiec	6 miesięcy	Zatrucie (2* dni)
	4	Mieszaniec	Samica	5 miesięcy	Uraz komunikacyjny uszkodzenie OUN (5h*)
II	5	Owczarek niemiecki	Samiec	13 miesięcy	Ostra niewydolność oddechowa (2 dni*)
	6	Mieszaniec	Samiec	4 lata	Zaburzenia behawioralne, agresja (6 m-cy*)
	7	Labrador	Samiec	3 lata	Uraz komunikacyjny, złamanie kręgosłupa (3dni*)
	8	Mieszaniec	Samiec	2 lata	Ostra niewydolność nerek (14 dni*)

cd. tabeli 2.

III	9	Buldog francuski	Samica	5 lat	Dyskopatia (4m-ce*)
	10	Sznaucer miniaturowy	Samiec	7lat	Padaczka idiopatyczna (2 lata*)
	11	Mieszaniec	Samiec	6 lat	Złamanie kręgosłupa (2 dni*)
	12	Owczarek niemiecki	Samiec	8 lat	Ostre zapalenie trzustki (14 dni*)
	13	Owczarek niemiecki	Samiec	9 lat	Niewydolność mięśnia sercowego (4 m-ce*)
	14	Buldog francuski	Samica	9 lat	Nowotwór trzustki (4-tyg*)
	15	Mieszaniec	Samica	9 lat	Nowotwór płuc (2 m-ce*)
	16	Golden retriever	Samiec	9 lat	Padaczka idiopatyczna (12-m-cy*)
	17	Mieszaniec	Samiec	9 lat	Nowotwór wątroby (5 m-cy*)
IV	18	Shih tzu	Samica	10 lat	Guz mózgu, padaczka (3 m-ce*)
	19	Mieszaniec	Samiec	11 lat	Dyskopatia (7 m-cy*)
	20	Yorkshire terrier	Samica	12 lat	Ropomacicze (2 dni*)
	21	Mieszaniec	Samiec	12 lat	Nowotwór płuc (4 m-ce*)
	22	Sznaucer miniaturowy	Samiec	12 lat	Guz śledziony (24 h*)
	23	Mieszaniec	Samiec	12 lat	Powypadkowe, wieloodłamowe złamanie kości (4 h*)
	24	Chihuahua	Samica	11 lat	Niewydolność mięśnia sercowego (3 m-ce*)
	25	Labrador	Samica	13 lat	Guz mózgu (14 dni*)

cd. tabeli 2.

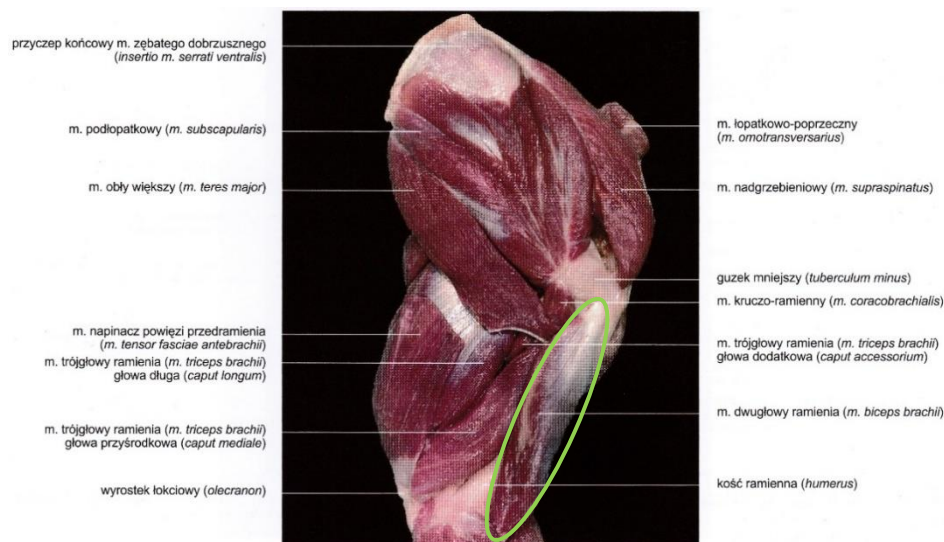
	26	Shih tzu	Samiec	14 lat	Nowotwór kości (2 m-ce*)
	27	Sznaucer miniaturowy	Samiec	14 lat	Nowotwór jąder z przerzutami do płuc (21 dni*)
	28	Mieszaniec	Samica	13 lat	Nowotwór gruczołu mlekowego (8 m-cy*)
	29	Labrador	Samiec	12 lat	Niewydolność mięśnia sercowego (12 m-cy*)
	30	Mieszaniec	Samica	13 lat	Uraz komunikacyjny, wielonarządowy(2h*)
	31	Mieszaniec	Samica	15 lat	Zator płucny (3 dni*)
	32	Cocker spaniel	Samiec	17 lat	Dyskopatia (12 m-cy*)
	33	Mieszaniec	Samiec	18 lat	Skręt żołądka (4h*)

* czas jaki upłynął od czasu zdiagnozowania choroby do śmierci zwierzęcia

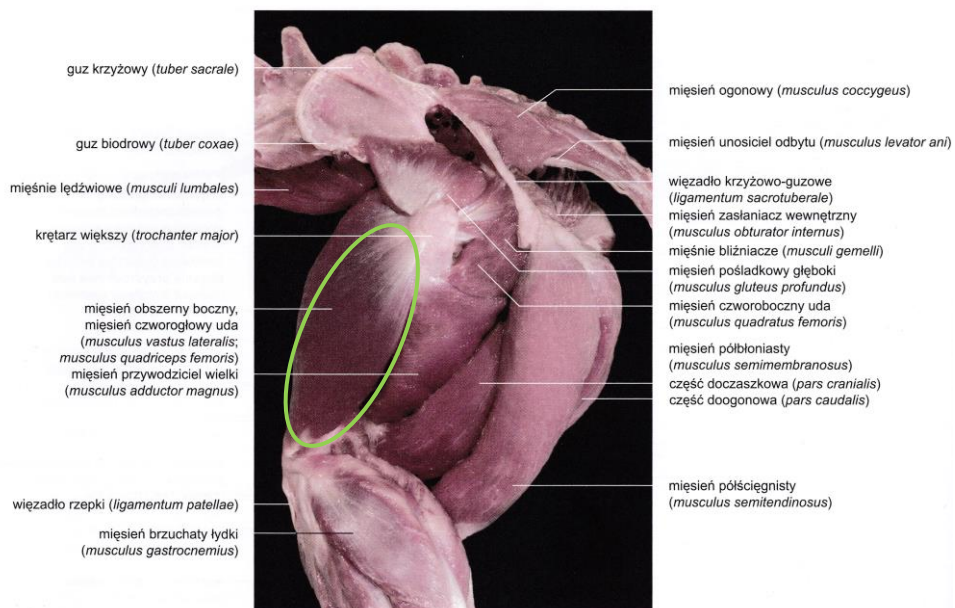
4.2. POBRANIE MATERIAŁU DO BADAŃ

4.2.1. Mięśnie

Pośmiertne wycinki do badań pobrano z dwóch mięśni: kończyna piersiowa - mięsień dwugłowy ramienia (*m. biceps brachii* - ryc. 1.), kończyna miedniczna - mięsień czworogłowy uda (*m. quadriceps femoris* – ryc. 2.).



Rycina 1. Mięsień dwugłowy ramienia (*m. biceps brachii*) u psa [König i Liebich, 2012]



Rycina 2. Mięsień czworogłowy uda (*m. quadriceps femoris*) [König i Liebich, 2012]

Zarówno mięsień dwugłowy ramienia, jak i czworogłowy uda to silnie rozbudowane mięśnie biorące ważny i aktywny udział w biomechanice ruchu

psów i dlatego wybrano je do analizy zmian w mikrostrukturze występujących wraz z wiekiem. Z obserwacji własnych wynika, że w starszym wieku często dochodzi do dysfunkcji obu tych mięśni. Mięsień dwugłowy ramienia jest mięśniem stawu ramiennego i łokciowego, zaczyna się pojedynczym ścięgnem początkowym od guzka nadpanewkowego łopatki. Przebiega początkowo w bruzdzie międzyguzkowej, a następnie wzdłuż kości ramiennej po jej przyśrodkowej stronie. Na wysokości stawu łokciowego mięsień dzieli się na dwie odnogi. Silniejsza, kończy się na guzowatości kości promieniowej, a druga na bliższym końcu kości łokciowej. Mięsień czworogłowy uda tworzy masę mięśniową w kierunku doczaszkowym od kości udowej. Składa się z czterech części, które mają oddzielne przyczepy początkowe, zaś kończą się wspólnym więzadłem prostym rzepki na guzowatości kości piszczelowej. W mięśniu czworogłowym uda wyróżnia się 4 głowy: mięsień obszerny boczny (*m. vastus lateralis*), z którego pobierano wycinki do badań, mięsień obszerny przyśrodkowy (*m. vastus medialis*), mięsień obszerny pośredni (*m. vastus intermedius*) oraz mięsień prosty uda (*m. rectus femoris*). Mięsień czworogłowy uda jest najsilniejszym prostownikiem stawu kolanowego, przesuwając tułów do przodu i stabilizuje kolano, a także bierze czynny udział w zginaniu stawu biodrowego [König i wsp., 2013].

Do badań histologicznych próbki obu mięśni pobrano w lecznicy weterynaryjnej, max. do 45 minut po śmierci zwierząt i zamrożono w ciekłym azocie (-196°C).

4.2.2. Krew

Krew do analizy pobierana była od zwierząt w celach diagnostycznych w trakcie ich leczenia oraz podczas procedury eutanazji. Badanie krwi miało pozwolić na maksymalnie precyzyjne określenie stanu zdrowotnego badanych zwierząt i jego wpływu na wyniki badań mięśni.

W uzyskanym materiale biologicznym (pełna krew pobrana do próbek z EDTA) oznaczono następujące wskaźniki morfologiczne:

- liczbę krwinek białych (WBC)
- liczbę granulocytów obojętnochłonnych (NEU), kwasochłonnych (EOS) i zasadochłonnych (BASO)
- liczbę limfocytów (LYM)
- liczbę monocytów (MON)
- liczbę krwinek czerwonych (RBC)
- stężenie hemoglobiny (HGB)
- hematokryt (HCT)
- liczbę płytek krwi (PLT).

Oznaczeń dokonano przy użyciu analizatora hematologicznego Horiba Vet ABC, wykorzystującego jako zasadę pomiaru metodę impedancyjną, polegającą na

zliczaniu i określaniu wielkości krwinek poprzez wykrywanie i pomiar zmian rezystancji elektrycznej roztworu krwinek.

W celu uzyskania surowicy część krwi pobrano do próbek bez antykoagulantu, a następnie materiał biologiczny przez 10 minut wirowano z prędkością 3000 obr./min. Analizy poziomu wybranych wskaźników biochemicznych dokonano za pomocą analizatora biochemicznego MINDRAY BS-120, przy użyciu odczynników referencyjnych firmy Stamar® (Dąbrowa Górnicza, Polska).

W pozyskanej surowicy oznaczono:

- zawartość białka całkowitego i jego frakcji (albuminy, globuliny), fruktozaminy oraz produktów przemian azotowych, takich jak: mocznik i kreatynina
- poziom glukozy, cholesterolu, trójglicerydów oraz bilirubiny
- aktywność takich enzymów jak: aminotransferaza alaninowa (ALT) i asparaginianowa (AST), fosfataza zasadowa (AP), alfa-amylaza, kinaza kreatynowa (CK), glutamylotransferaza (GGTP), dehydrogenaza glutaminianowa (GLDH), dehydrogenaza mleczanowa (LDH), lipaza
- stężenie składników mineralnych: chlorków (Cl), fosforu nieorganicznego (P), magnezu (Mg), potasu (K), sodu (Na) i wapnia (Ca).

Poziom tyroksyny (T4) oznaczono metodą radioimmunologiczną, przy użyciu zestawów Ria-CT i INS-IRMA RIA (DIAsource ImmunoAssays S.A, Belgium) oraz automatycznego podajnika próbek NZ-322 z licznikiem gamma dla izotopu ¹²⁵I (Gamma Művek, Hungary).

4.3. PRZYGOTOWANIE PREPARATÓW HISTOLOGICZNYCH

4.3.1. Techniki histochemiczne

Zamrożone próbki mięśni przewożono do laboratorium histologicznego Katedry Fizjologii Zwierząt i Zoofizjoterapii, Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt Politechniki Bydgoskiej *im. J. i J. Śniadeckich* i ścinano w kriostacie (Thermo Shandon, Wielka Brytania), w temperaturze -25°C na skrawki o grubości 10 µm. Skrawki histologiczne przenoszono na szkiełka podstawowe i poddawano procesom barwienia, stosując odmienne reakcje histochemiczne:

- H+E (hematoksyliną i eozyną) - tzw. topograficzne barwienie przeglądowe, pozwalające ocenić całość struktury tkanki poprzez kontrastowe zabarwienie cytoplazmy i jąder komórkowych. Hematoksylina - barwnik pochodzenia roślinnego, pozyskiwany z niebieskiej kory drzewa kampszowego, jest substancją zasadową, barwiącą jądra komórkowe na kolor granatowy do czarnego.

Eozyna to związek syntetyczny, kwaśna pochodna fluoresceiny, podbarwiająca cytoplazmę na kolor różowy. Preparaty wybarwione H+E wykorzystano do określenia zmian histopatologicznych.

- Oil Red (czerwień oleista) - barwienie w celu identyfikacji tłuszczu śródmięśniowego. Zastosowany barwnik rozpuszcza się w tłuszczu, powodując jego zabarwienie na kolor czerwony.
- Reakcja na aktywność enzymu reduktazy terazolowej NADH-TR – reakcja w celu wyróżnienia dwóch typów włókien mięśniowych różniących się aktywnością enzymatyczną: włókna o wysokiej i pośredniej aktywności NADH-TR, włókna oksydatywne wolno i szybko kurczące się, wybarwiające się na kolor niebieski; włókna o niskiej aktywności NADH-TR, włókna białe, szybko kurczące się, wybarwiające się na kolor jasny, słomkowy.

4.3.2. Techniki immunohistochemiczne

Barwienia immunohistochemiczne zostały wykonane w Pracowni Profilaktyki Onkologicznej „Patolog J&J Głowaccy” w Toruniu na skrawkach parafinowych o grubości 4 μm , które pochodziły z materiału pobranego w lecznicy weterynaryjnej i utrwalonego w 4% formalinie, zbuforowanej CaCO_3 . Zastosowano następujące techniki immunohistochemiczne:

- Reakcja z wykorzystaniem przeciwciała przeciw CD31 (FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human CD31, Endothelial Cell, Klon JC70A) firmy DAKO. CD31 jest glikoproteiną należącą do nadrodziny immunoglobulin zwanych PECAM (płytkowo-śródbłonkowa cząsteczka adhezji komórkowej, uznawana za jeden z markerów komórek śródbłonka naczyń) i posłużyła w oznaczeniu gęstości mikrounaczynienia w mięśniach. Odmaskowywania antygenów dokonano w wyniku wstępnej obróbki tkanek przy użyciu roztworu EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (10x), (Dako Autostainer/Autostainer Plus). Do wizualizacji antygenów wykorzystano system detekcyjny EnVision™ FLEX+, Mouse, High pH, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Dako).
- Reakcja immunohistochemiczna na obecność białka swoistego dla komórek satelitarnych - Pax7. Odmaskowywania antygenów dokonano w buforze EDTA o pH 9,0 i po zablokowaniu endogennej aktywności peroksydazy (3,0% H_2O_2 i 5% BSA), przeprowadzono inkubację z przeciwciałem Pax7, rozcieńczonym 1:100. Zastosowano system detekcyjny EnVisionAnti Mouse firmy DAKO. Zabarwione chromogenem (DAB) skrawki podbarwiono hematoksyliną Mayer'a.

Łącznie sporządzono i przeanalizowano 330 preparatów mikroskopowych.

4.4. KOMPUTEROWA ANALIZA OBRAZU MIKROSKOPOWEGO

Sporządzone preparaty histologiczne analizowano pod mikroskopem świetlnym Ci-L firmy NIKON wyposażonego w kamerę NIKON DS-Fi3 o rozdzielczości 5,9 MPix. Analizy obrazów mikroskopowych przeprowadzono, wykorzystując program NIS ELEMENTS:

1. Barwienie H+E - analiza histopatologiczna mięśni (pow. 1,5 mm²) obejmowała oznaczenie ilościowe zmian takich jak: atrofia włókien mięśniowych, włókna olbrzymie, zmiana kształtu włókien (trójkątne, trapezowate, wydłużone), martwica włókien z fagocytozą, rozszczepienie włókien (tzw. *splitting*) oraz subiektywną ocenę przerostu tkanki łącznej. Zastosowano oznaczenia:

- 0 - brak zmiany,
- + - zmiana o małej rozległości,
- ++ - zmiana o umiarkowanej rozległości,
- +++ - zmiana bardzo rozległa.

2. Barwienie Oil Red - wykorzystując funkcję filtru obiektów o wskazanym kolorze, która oblicza procent koloru czerwonego, obliczono udział (%) tłuszczu śródmięśniowego na powierzchni 3 mm² mięśnia.

3. Barwienie na aktywność NADH-TR - obliczono udział włókien oksydacyjnych i glikolitycznych na powierzchni 1,5 mm² oraz zmierzono ich średnicę według metody podanej przez Brooke's [1970]: pomiar najkrótszych średnic.

4. Ocena gęstości mikrounaczynienia mięśni - analizowano 10 pól widzenia o największej liczbie naczyń tzw. „*hot spots*”, a następnie obliczono liczbę naczyń kapilarnych przypadających na 1 włókno mięśniowe.

5. Reakcja na obecność białka Pax7 swoistego dla komórek satelitarnych - obliczono liczbę komórek satelitarnych (PAS pozytywnych) na powierzchni 1,5 mm².

4.5. ANALIZA STATYSTYCZNA

Uzyskane dane, celem weryfikacji wyników, poddano analizie statystycznej zgodnie z metodami wnioskowania statystycznego [Łomnicki 2010; McDonald 2009; Stanisław 2007, 2006]. W ramach statystyki opisowej dla wszystkich badanych zmiennych obliczono wartości średniej arytmetycznej (\bar{x} , ang. mean) i odchylenia standardowego (\pm SD, ang. standard deviation). Przeprowadzono statystyczną charakterystykę struktury zbiorowości danych na podstawie statystycznego grupowania za pomocą szeregów statystycznych prostych. Dla analizowanych zmiennych określono liczebności absolutne i liczebności absolutne w procentach. Rozkład normalny zbadano przy pomocy testu Kołmogorowa-Smirnowa, podczas gdy równość wariancji testem Levene'a. W celu zbadania istotności różnic dla badanych cech i ich grup pod względem

biochemicznym, zmian patologicznych i typów włókien wykonano wieloczynnikową analizę wariancji (ANOVA). W przypadku wystąpienia istotnych różnic pomiędzy średnimi zastosowano test wielokrotnych porównań Tukey'a. W celu określenia zależności pomiędzy badanymi cechami przeprowadzono analizę korelacji Pearsona, określając współczynnik korelacji (R_{xy} , ang. correlation coefficient) oraz współczynnik determinacji (R_{xy}^2 , ang. coefficient of determination, R squared). Współczynnik korelacji interpretowano za Staniszem (2006), Staniszem i Sarneckim (2000), według których korelacja jest prawie pewna, gdy wartość współczynnika korelacji mieści się pomiędzy 0,9 i 1,0, bardzo wysoka, gdy jest ona pomiędzy 0,7 i 0,9, wysoka pomiędzy 0,5 i 0,7, umiarkowana/przeciętna przy współczynniku od 0,3 do 0,5 i słaba przy wartości współczynnika od 0 do 0,3. Za minimalny poziom istotności statystycznej dla wszystkich analiz przyjęto $\alpha = 0.05$. Wyniki analiz zaprezentowano za pomocą tabel oraz wykresów. Obliczenia przeprowadzono z wykorzystaniem pakietu STATISTICA 13.3 (Dell, Round Rock, TX, USA, 2020) oraz programu Microsoft Office Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA, 2019).

5. WYNIKI I DYSKUSJA

5.1. CECHY MIKROSTRUKTURY BADANYCH MIĘŚNI PSÓW

Wyniki dotyczące wartości wybranych cech mikrostruktury mięśnia dwugłowego ramienia (*m. biceps brachii* - *BB*) i czworogłowego uda (*m. quadriceps femoris* - *QF*) w zależności od wieku badanych psów zostały zestawione w tabeli 3.

Tabela 3. Średnie wartości wybranych cech mikrostruktury mięśnia dwugłowego ramienia (*m. biceps brachii*) i czworogłowego uda (*m. quadriceps femoris*) w zależności od wieku badanych psów

Mięsień	Cecha		Grupa				F	P
			1	2	3	4		
<i>biceps brachii</i> (<i>BB</i>)	Udział włókien (%)	FG	39,25 ±0,48	34,79 ±0,04	30,47 ±0,39	31,03 ±0,87	1,38	0,272
		FO	60,75 ±0,75	65,21 ±0,03	69,53 ±0,36	68,97 ±0,63	1,06	0,382
	Średnica włókien (µm)	FG	15,73 ^B ±3,11	24,93 ^A ^B ±2,31	35,99 ^A ±7,15	33,45 ^A ±4,18	12,89	<0,001
		FO	16,56 ^B ±2,37	23,22 ^A ^B ±1,59	33,42 ^A ±7,56	31,29 ^A ±4,34	8,49	<0,001
	Udział (%) tłuszczu śródmięśniowego		3,57 ±0,89	1,24 ±0,64	3,55 ±2,86	3,43 ±2,52	0,51	0,68
<i>quadriceps femoris</i> (<i>QF</i>)	Udział włókien (%)	FG	41,71 ±0,09	38,26 ±0,04	41,49 ±0,29	40,14 ±0,50	1,75	0,182
		FO	58,29 ±0,23	61,74 ±0,03	58,51 ±0,32	59,86 ±0,43	1,39	0,269
	Średnica włókien (µm)	FG	17,10 ^B ±4,17	25,10 ^A ^B ±0,28	33,48 ^A ±5,84	31,01 ^A ±5,84	7,11	<0,001
		FO	17,13 ^B ±4,34	22,15 ^A ^B ±0,92	32,55 ^A ±0,24	31,81 ^A ±5,81	8,32	<0,001
	Udział (%) tłuszczu śródmięśniowego		0,65 ^b ±0,58	3,03 ^{ab} ±2,23	6,10 ^a ±2,73	6,27 ^a ±3,78	3,03	0,05

Grupa 1 – psy w wieku ≤ 1lat
 Grupa 2 – psy w wieku > 1- ≤ 5 lat
 Grupa 3 – psy w wieku >5- ≤10 lat
 Grupa 4 – psy w wieku >10 lat

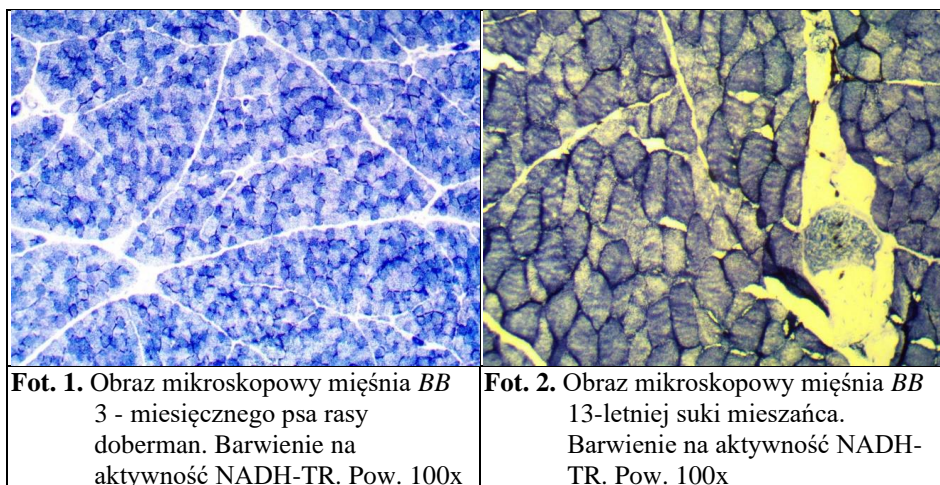
FG - glycolitic fibres, włókna glikolityczne
 FO - oxidative fibres, włókna oksydacyjne
^{a, b} - różnice statystycznie istotne dla $P \leq 0,05$
^{A, B} - różnice statystycznie istotne dla $P \leq 0,01$

Jak podają Mukund i Subramaniam [2020, cyt. za Rubinstein i Kelly, 2004], w mięśniach szkieletowych dominują cztery typy włókien mięśniowych (w obrębie dwóch głównych typów włókien), a mianowicie wolnokurczliwe (typ I) i szybkokurczliwe (typ II), zawierające podtypy IIA, IIB i IIX. Wraz ze starzeniem się organizmu zmieniają się właściwości metaboliczne poszczególnych mięśni szkieletowych. Dotyczy to zwłaszcza potencjału

oksydacyjnego i glikolitycznego mięśni [Budzińska, 2005, cyt. za Powers i wsp., 1991 i Pastoris i wsp., 2000]. Z tego względu w niniejszej pracy skupiono uwagę na dwóch typach włókien mięśniowych różniących się aktywnością enzymatyczną: włókna o wysokiej i pośredniej aktywności NADH-TR (włókna oksydatywne wolno i szybko kurczące się - FO) oraz włókna o niskiej aktywności NADH-TR (włókna glikolityczne, szybko kurczące się - FG), (Fot.1. i 2.). Zdaniem Latorre i wsp. [1993] w odniesieniu do mięśni szkieletowych psa badania mające na celu identyfikację różnych typów włókien przyniosły sprzeczne wyniki. Według wielu autorów włókna typu I i II są łatwo rozróżnialne, natomiast trudności pojawiają się podczas różnicowania włókien typu II na podklasy. Niektórzy badacze uważają nawet, iż u psów nie występują włókna typu IIB [Maxwell i wsp., 1977; Braund i wsp., 1982; Snow i wsp., 1982], a jeśli nawet są obecne, to wykazują różnice w porównaniu z typem IIB opisanym u innych ssaków [Brooke i Kaiser, 1970]. Ponadto, Snow i wsp. [1982] donoszą, iż w mięśniach psów są obecne dwie główne klasy włókien typu II, obie oksydacyjno- glikolityczne, ale różniące się budową łańcuchów ciężkich miozyny. Natomiast, na podstawie ekspresji różnych izoform MyHC można zidentyfikować różne rodzaje szybkich włókien u psa: 2A, 2X i 2B [Bergrin i wsp., 2006; Toniolo i wsp., 2007].

Przeprowadzone badania na mięśniach lokomocyjnych psów nie są zgodne z badaniami, które przeprowadzili Powers i wsp. [1991], Pastoris i wsp. [2000]. Są zdania, że z wiekiem maleje zdolność oksydacyjna mięśni szkieletowych zwierząt i ludzi. Spadek zdolności oksydacyjnej mięśni lokomocyjnych (czyli w tym przypadku spadek aktywności reduktazy tetrazolowej), jak podają Powers i wsp. [1991], może być związany z obniżeniem aktywności ruchowej wraz ze starzeniem się organizmu. W obecnych czasach jednak opiekunowie bardzo dbają o aktywność fizyczną swoich psów, nie tylko w młodym wieku, ale także w późniejszym okresie ich życia, stąd niniejsze badania nie wskazują na obniżenie zdolności oksydacyjnej mięśni *BB* i *QF* badanych psów.

Istotne statystycznie różnice w obu mięśniach wykazano w przypadku średnicy włókien mięśniowych ($P \leq 0,01$). Jak należałoby się spodziewać, najmniejszą średnicę zarówno włókien glikolitycznych (FG), jak i włókien oksydacyjnych (FO) stwierdzono w grupie psów najmłodszych (psy w wieku do 1 roku) i różniła się ona istotnie z grupą 3 (psy w wieku od 5 do 10 lat) i 4 (psy w wieku powyżej 10 lat) ($P \leq 0,01$). Dla pełnego zobrazowania różnic w wielkości włókien mięśniowych na fotografiach 1. i 2. przedstawiono obraz mikroskopowy mięśnia *BB* 3- miesięcznego psa i 13-letniej suki. W badaniach Braund i wsp. [1982] średnice włókien nie różniły się istotnie wraz z wiekiem psów, pomimo widocznej redukcji średnicy włókien typu IIA (szybkokurczliwych) we wszystkich mięśniach psów w wieku 7 lat i starszych. Acevedo i Rivero [2006] na przykładzie analizy porównawczej siedmiu mięśni psa wykazali, że włókna typu I i IIA są cieńsze niż włókna glikolityczne 2X. Można przyjąć, że potwierdziły to wyniki niniejszych badań.



Analizując udział procentowy tłuszczu śródmięśniowego, w przypadku mięśnia *BB* nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych między badanymi grupami psów. Natomiast w mięśniu *QF* mniejszą zawartością śródmięśniowej tkanki tłuszczowej charakteryzowały się psy najmłodsze, co wynika prawdopodobnie z większej aktywności ruchowej tej grupy zwierząt. W niniejszej pracy potwierdzono ogólnie opisywaną tendencję zarówno u ludzi, jak i u zwierząt do wzrostu z wiekiem zawartości tkanki tłuszczowej w strukturze mięśni [Bellows i wsp., 2015; Hausman i wsp., 2015; Wilkinson i wsp., 2018]. Taką zależność stwierdzono jednak tylko w przypadku mięśnia czworogłowego uda. Może to wynikać z faktu, że u psów zwykle bardziej rozbudowane, a zarazem otluszczone są tylne partie mięśniowe, co także dotyczy kończyn tylnych, natomiast w kończynach przednich, w tym również w obrębie mięśni ramienia, obserwuje się częściej występujące z wiekiem zaniki mięśniowe. Adipocyty (lipocyty, komórki tłuszczowe) związane z mięśniami szkieletowymi obejmują międzymięśniowy magazyn tkanki tłuszczowej, zawarty w przestrzeniach między mięśniami, oraz tkankę tłuszczową śródmięśniową, która obejmuje wszystkie adipocyty zawarte pomiędzy wiązkami włókien mięśniowych i samymi włóknami mięśni szkieletowych. Wraz ze wzrostem organizmu zwierząt zmienia się umiejscowienie odkładanego tłuszczu. W pierwszym okresie odkłada się on w okolicy nerek i jelit, następnie przyrasta tłuszcz międzymięśniowy i podskórny, a dopiero wtedy pojawia się tłuszcz śródmięśniowy [Joffe i wsp., 2013].

Tabela 4. Porównanie mikrostruktury mięśni dwugłowego ramienia (*m. biceps brachii*) i czworogłowego uda (*m. quadriceps femoris*) psów

Cecha	Mięsień		F	P
	<i>biceps brachii</i> (BB)	<i>quadriceps femoris</i> (QF)		
Udział (%) włókien FG	32,03 ^B ± 0,70	40,60 ^A ± 0,55	7,68	0,008
Udział (%) włókien FO	67,97 ± 0,42	59,40 ± 0,38	2,84	0,098
Średnica włókien FG (µm)	31,96 ± 7,91	29,93 ± 7,21	1,06	0,308
Średnica włókien FO (µm)	29,99 ± 7,35	29,85 ± 7,21	0,01	0,943
Udział (%) tłuszczu śródmięśniowego	3,34 ^B ± 2,45	5,44 ^A ± 3,56	7,06	0,010

Grupa 1 – psy w wieku ≤ 1lat

Grupa 2 – psy w wieku > 1- ≤ 5 lat

Grupa 3 – psy w wieku >5- ≤10 lat

Grupa 4 – psy w wieku >10 lat

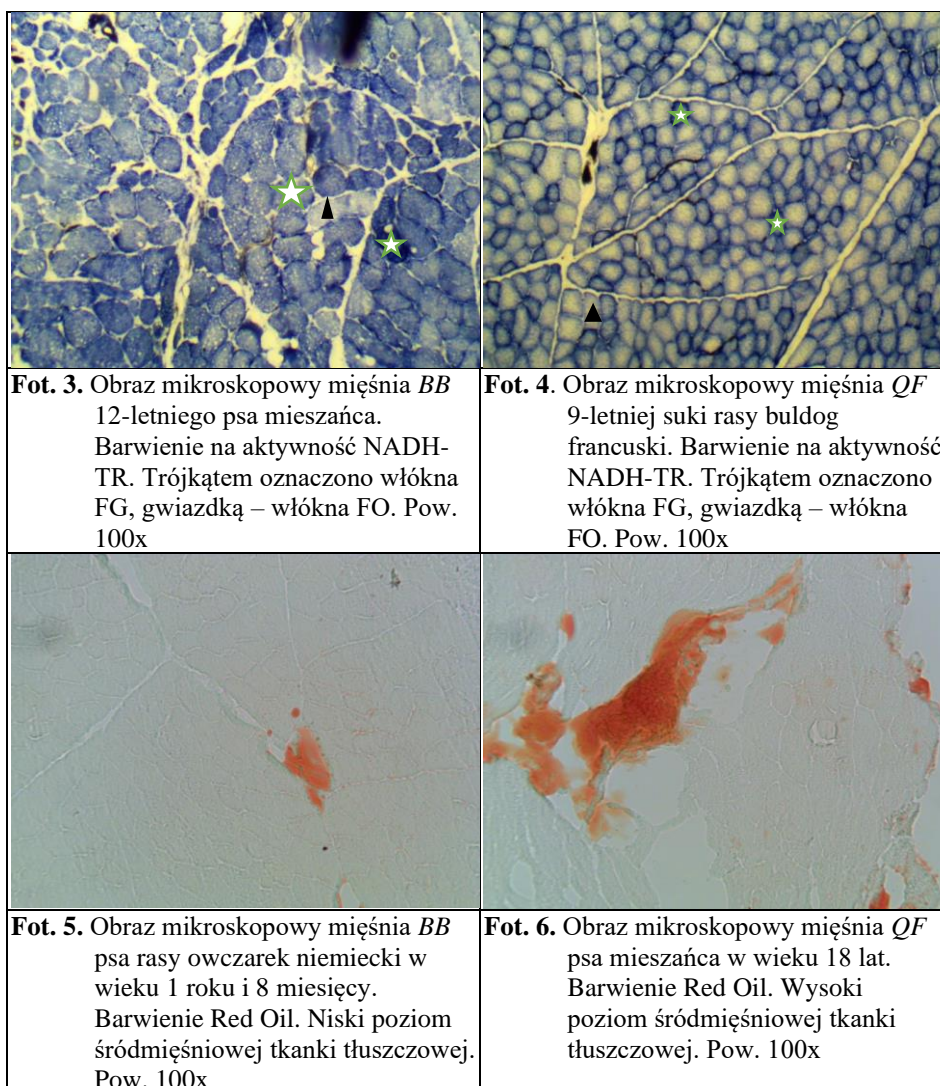
FG - glycolitic fibres, włókna glikolityczne

FO - oxidative fibres, włókna oksydacyjne

^{a, b} - różnice statystycznie istotne dla $P \leq 0,05$

^{A, B} - różnice statystycznie istotne dla $P \leq 0,01$

W tabeli 4. oraz na fotografiach 3. i 4. przedstawiono porównanie mikrostruktury mięśni dwugłowego ramienia (*m. biceps brachii*) i czworogłowego uda (*m. quadriceps femoris*). Analiza porównawcza mikrostruktury w/w mięśni wykazała różnice istotne statystycznie w udziale procentowym włókien glikolitycznych FG. W mięśniu czworogłowym uda stwierdzono więcej włókien glikolitycznych niż oksydacyjnych ($P \leq 0,01$). Z uwagi na rozbieżności w klasyfikacji włókien mięśniowych, jak również analizy mikrostruktury różnych mięśni psów, trudno jest odnieść wyniki badań własnych do wyników innych autorów. Braund i wsp. [1982] wykazali w mięśniu *triceps brachii* przeważającą liczbę włókien typu I, natomiast włókna typu IIA były liczniejsze w mięśniu *biceps femoris*. Autorzy ci w swoich badaniach stwierdzili większą średnicę włókien w grupie psów o większej masie ciała (>15 kg) w porównaniu do psów o mniejszej masie ciała (<15 kg), niemniej jednak wartości te były nieco wyższe, aniżeli uzyskane w niniejszym doświadczeniu. Podobną zależność zaobserwowano, analizując procentowy udział tłuszczu śródmięśniowego, wykazano bowiem istotnie statystycznie większą jego ilość w mięśniu czworogłowym uda (QF) niż w mięśniu dwugłowym ramienia (BB) ($P \leq 0,01$) (tabela 4., fotografie 5. i 6.).



Kapilary (naczynia włosowate) zaopatrują mięśnie i włókna mięśniowe w tlen i składniki odżywcze oraz usuwają produkty przemiany materii [Hudlicka, 1991]. Związana z wiekiem utrata masy i funkcji mięśni szkieletowych (sarkopenia) jest charakterystyczną cechą starzenia się zarówno u ludzi, jak i u zwierząt. Wang i wsp. [2014] wykazali, że apoptoza odgrywa ważną rolę w zaniku mięśni, w tym również dotyczy to procesów apoptozy komórek śródbłonna naczyń włosowatych, co prowadzi do związanego ze starzeniem się mięśni spadku ich kapilaryzacji, a to z kolei - do spadku masy i funkcjonalności mięśni. Autorzy stwierdzili także, że pomimo zwiększonej apoptozy komórek śródbłonna stosunek gęstości naczyń włosowatych do gęstości włókien mięśniowych nie zmienił się istotnie wraz z wiekiem. Badając unaczynienie

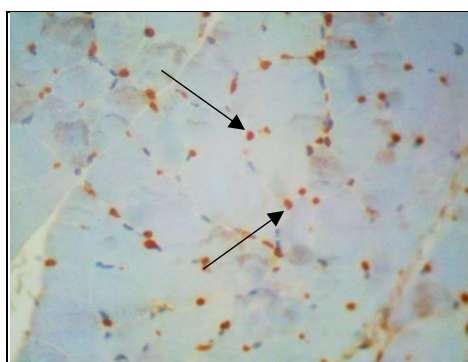
mięśni starzejących się psów, wykazano podobną zależność. W tabeli 5. przedstawiono liczbę kapilar w mięśniu dwugłowym ramienia (*m. biceps brachii*) i czworogłowym uda (*m. quadriceps femoris*) w zależności od wieku badanych psów. Na fotografiach 7. i 8. przedstawiono obrazy mikroskopowe przedstawiające unaczynienie mięśnia na przykładzie mięśnia *BB* psów w różnym wieku. Analiza immunohistochemiczna mikrounaczynienia mięśnia wykazała największą liczbę kapilar przypadających na 1 włókno mięśniowe w grupie psów w wieku od 1 do 5 lat (odpowiednio: 2,45 w mięśniu *BB* i 2,20 w mięśniu *QF*, $P \leq 0,01$), w porównaniu do grupy 1 i 4. Najmniejszą gęstością kapilar natomiast charakteryzowały się mięśnie grupy psów w wieku do 1 roku (odpowiednio: 1,50 w mięśniu *BB* oraz 1,27 w mięśniu *QF*) oraz geriatrycznych (odpowiednio: 1,26 w mięśniu *BB* oraz 1,30 w mięśniu *QF* kapilary/1 włókno mięśniowe, $P \leq 0,01$). Liczba kapilar zaopatrujących pojedyncze włókno mięśniowe wzrasta liniowo, względem przekroju poprzecznego włókna mięśniowego, a wydłużaniu się i powiększaniu średnicy włókien mięśniowych towarzyszy zwiększenie liczby kapilar krwionośnych – co związane jest ze wzrostem zwierząt. Największa liczba kapilar w grupie 2. i 3. wynika ze wzrostu i zwiększonej aktywności fizycznej. Mięśnie tych zwierząt są silnie rozbudowane, a tym samym dobrze unaczynione, co wynika z dużego zapotrzebowania na tlen i związki odżywcze, dostarczane drogą krwi. Maxwell i wsp. [1977] w badaniach na trzech mięśniach psów: *semitendinosus*, *gastrocnemius* i *extensor digitorum longus* uzyskali większą liczbę kapilar w przeliczeniu na 1 włókno mięśniowe (od 5,1 do 6,5) w porównaniu do uzyskanych w tej pracy wyników badań. Podobnie Čebašek i wsp. [2005] stwierdzili większą liczbę naczyń włosowatych w mięśniach *soleus* i *extensor digitorum longus* szczurów w porównaniu do wyników zawartych w niniejszej pracy. Jak konkludują autorzy, gęstość naczyń kapilarnych uzależniona jest zarówno od zdolności oksydacyjnej włókien mięśniowych, jak i ich średnicy, a może być także wypadkową tych dwóch cech, na co także wskazują wyniki niniejszych badań. Nadal istnieje jednak sprzeczność w badaniach dotyczących związanej ze starzeniem się zmiany liczby naczyń włosowatych – na przykład Denis i wsp. [1986] są zdania, że stopień kapilaryzacji wraz z wiekiem utrzymuje się na stałym poziomie, natomiast Coggan i wsp. [1992] stwierdzają, że stopień waskularyzacji zmniejsza się. Kano i wsp. [2002] podkreślają natomiast, że parametry te głównie zależą od wielkości włókien mięśniowych.

Tabela 5. Liczba kapilar w mięśniu dwugłowym ramienia (*m. biceps brachii*) i czworogłowym uda (*m. quadriceps femoris*) w zależności od wieku badanych psów

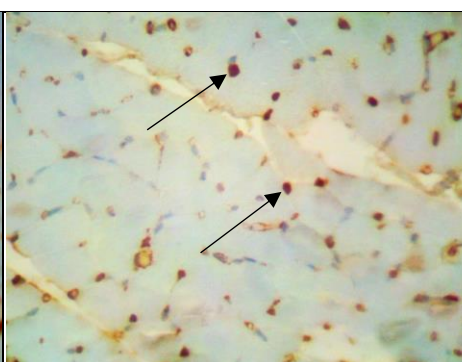
Mięsień	Cecha	Grupa				F	P
		1	2	3	4		
<i>biceps brachii</i> (BB)	Liczba kapilar/1 włókno mięśniowe	1,50 ^{BC} ±0,20	2,45 ^A ±1,20	1,75 ^{AB} ±0,31	1,26 ^C ±0,22	9,28	<0,001
<i>quadriceps femoris</i> (QF)		1,27 ^{BC} ±0,31	2,20 ^A ±0,42	1,63 ^{AB} ±0,24	1,30 ^C ±0,18	12,80	<0,001

Grupa 1 – psy w wieku ≤ 1lat
 Grupa 2 – psy w wieku > 1- ≤ 5 lat
 Grupa 3 – psy w wieku >5- ≤10 lat
 Grupa 4 – psy w wieku >10 lat

^{a, b} - różnice statystycznie istotne dla $P \leq 0,05$
^{A, B} - różnice statystycznie istotne dla $P \leq 0,01$



Fot. 7. Obraz mikroskopowy mięśnia BB 5-letniego psa mieszańca. Reakcja z wykorzystaniem przeciwciała przeciw CD31. Strzałkami oznaczono kapilary. Pow. 400x



Fot. 8. Obraz mikroskopowy mięśnia BB 12-letniej suki rasy yorkshire terier. Reakcja z wykorzystaniem przeciwciała przeciw CD31. Strzałkami oznaczono kapilary. Pow. 400x

Decydujący wpływ na wyniki badań z zakresu unaczynienia mają: aktualny stan zdrowia badanych osobników, w tym współistniejące choroby oraz rodzaj mięśnia. W przypadku psów, podobnie jak u ludzi, spotykamy się z osobnikami w różnym stanie klinicznym, co szczególnie dotyczy zwierząt w starszym wieku i dlatego prawidłowy dobór pacjenta do badania ma zasadnicze znaczenie. Aby uniknąć tych błędów i uzyskać wiarygodne wyniki badania, w swoim doświadczeniu Davidson i wsp. [1999] wykorzystali dobrze poznany klon myszy C57BL/1crfat. Zbadano po 5 samców z grupy wiekowej 6 i 28 miesięcy. Do badania pobrano mięsień płaszczkowy (*musculus soleus*) i mięsień prostownik długi palców (*musculus extensor digitorum longus*) kończyny miednicznej lewej. Wyniki w tym przypadku wskazały wzrost stopnia waskularyzacji mięśni

w starszej grupie wiekowej myszy. Ten zaskakujący wynik autorzy upatrują w nadmiernej ekspresji czynników angiogenezy, takich jak: czynniki wzrostu fibroblastów i komórek śródbłonna naczyniowego, interleukin 1 i 8, na skutek niedokrwienia mięśni u badanych myszy, czego normalnie nie obserwuje się u ludzi i innych gatunków zwierząt. Temat waskularyzacji mięśni szkieletowych, w tym również zmiany zachodzące wraz z procesami starzenia się mięśni w swojej pracy przeglądowej szeroko opisują Ranjbar i wsp. [2019]. Autorzy zwracają także uwagę na duże rozbieżności w wynikach badań nad unaczynieniem starzejących się mięśni. Przytaczają wiele prac potwierdzających ogólną tendencję do spadku stopnia mikrounaczynienia starzejących się mięśni, a tym samym ich zdolności do regeneracji. Jak powszechnie wiadomo, im silniej unaczyniona jest dana tkanka, tym ma większe zdolności do regeneracji. Dla potwierdzenia tej tezy przytoczono między innymi badania na myszach, w których wykazano, że w odpowiedzi na niedokrwienie mięśni tylnych partii ciała u starych myszy występuje wyraźne upośledzenie zdolności do regeneracji, a tym samym odbudowy naczyń włosowatych w porównaniu z młodymi osobnikami [Shimada i wsp., 2004; Yu i wsp., 2006]. Uważa się, że spadek stopnia unaczynienia mięśni może być związany z upośledzeniem zarówno zdolności do kurczenia, jak i rozszerzania się naczyń włosowatych, jako odpowiedź na dysfunkcje śródbłonna naczyniowego u osób starszych [Bloor, 2005]. Jak wynika z powyższej dyskusji, temat zmian unaczynienia mięśni szkieletowych w procesie starzenia to wciąż niewyjaśniona do końca sprawa i trwają nadal badania w tym kierunku. O ile modele ludzkie i zwierząt laboratoryjnych zostały już szczegółowo zbadane, to w przypadku psów nadal wyniki są niewystarczające.

W tabeli 6 porównano dodatkowo mikrounaczynienie (kapilaryzację) mięśnia dwugłowego ramienia (*m. biceps brachii*) i czworogłowego uda (*m. quadriceps femoris*) psów bez względu na grupę wiekową. Analizując stopień unaczynienia mięśnia dwugłowego ramienia i mięśnia czworogłowego uda, nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w kapilaryzacji pomiędzy badanymi mięśniami. Odmienne wyniki u szczurów uzyskali Kano i wsp. [2002], którzy porównywali unaczynienie mięśni *soleus* (płaszczkowaty) i *plantaris* (podeszwowy).

Tabela 6. Porównanie mikrounaczynienia (kapilaryzacji) mięśnia dwugłowego ramienia (*m. biceps brachii*) i czworogłowego uda (*m. quadriceps femoris*) psów

Cecha	Mięsień		F	P
	<i>biceps brachii</i> (BB)	<i>quadriceps femoris</i> (QF)		
Liczba kapilar/1 włókno mięśniowe	1,52 ± 0,47	1,46 ± 0,33	0,34	0,564

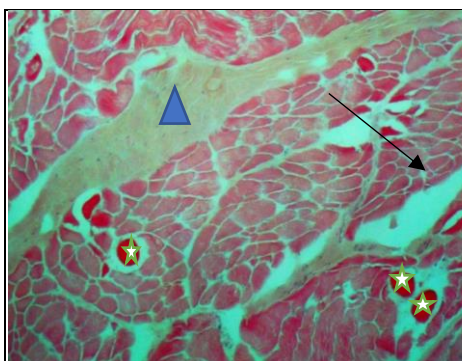
W tabeli 7 zestawiono liczbę prawidłowych włókien mięśniowych oraz wybranych zmian histopatologicznych w mięśni dwugłowym ramienia (*m. biceps brachii*) i czworogłowym uda (*m. quadriceps femoris*) w zależności od wieku badanych psów. Na fotografiach 9-12 przedstawiono przykłady zmian w strukturze badanych mięśni szkieletowych psów.

Tabela 7. Liczba prawidłowych włókien mięśniowych oraz wybranych zmian histopatologicznych w mięśni dwugłowym ramienia (*m. biceps brachii*) i czworogłowym uda (*m. quadriceps femoris*) w zależności od wieku badanych psów

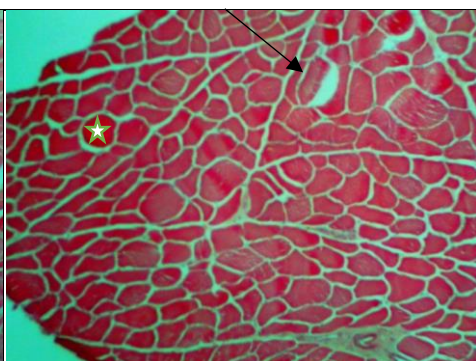
Mięsień	Cecha	Grupa				F	P
		1	2	3	4		
<i>biceps brachii</i> (BB)	Włókna prawidłowe	762,67^A ±506,50	109,00^B ±41,01	108,90^B ±33,48	130,33^B ±58,63	16,87	< 0,001
	Atrofia włókien	2,33 ±2,52	9,00 ±9,90	12,70 ±12,33	16,27 ±21,18	0,60	0,62
	Włókna olbrzymie	21,33 ±24,91	5,50 ±3,54	5,80 ±6,25	9,20 ±7,72	2,07	0,13
	Zmiana kształtu włókien	11,00 ±11,53	6,50 ±3,54	7,20 ±4,76	9,00 ±8,71	0,27	0,85
	Martwica włókien	0,00	0,00	0,00	0,13 ±0,52	0,31	0,82
	<i>Splitting</i>	0,33 ±0,58	2,00 ±2,83	2,60 ±2,59	3,40 ±2,59	1,34	0,28
<i>quadriceps femoris</i> (QF)	Włókna prawidłowe	515,00^A ±278,65	76,50^B ±21,92	128,90^B ±61,95	147,93^B ±92,93	11,09	< 0,001
	Atrofia włókien	17,00 ±15,72	3,00 ±1,41	10,40 ±12,01	19,73 ±18,73	1,09	0,37
	Włókna olbrzymie	6,67 ±3,51	6,00 ±2,83	4,50 ±2,55	7,53 ±10,33	0,30	0,82
	Zmiana kształtu włókien	19,00 ±16,82	14,00 ±2,83	11,80 ±7,98	12,00 ±8,81	0,53	0,66
	Martwica włókien	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,10 ±0,32	0,00 ±0,00	0,64	0,60
	<i>Splitting</i>	3,33 ±4,16	3,00 ±4,24	2,70 ±2,26	3,00 ±2,04	0,06	0,98

Grupa 1 – psy w wieku ≤ 1lat
 Grupa 2 – psy w wieku > 1- ≤ 5 lat
 Grupa 3 – psy w wieku >5- ≤10 lat
 Grupa 4 – psy w wieku >10 lat

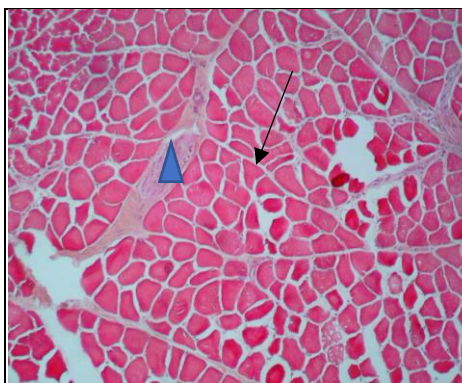
^{a, b} - różnice statystycznie istotne dla $P \leq 0,05$
^{A, B} - różnice statystycznie istotne dla $P \leq 0,01$



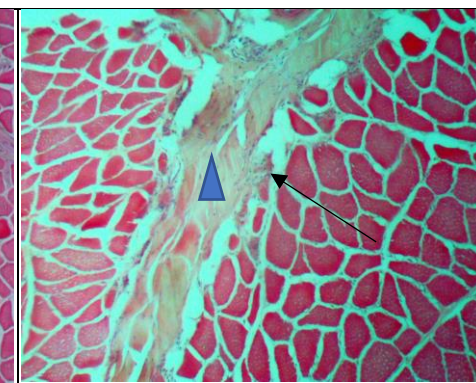
Fot. 9. Obraz mikroskopowy mięśnia *BB* 8-letniego psa rasy owczarek niemiecki. Barwienie HE. Strzałką oznaczono atrofię włókna, trójkątem - przerost omięsnej, gwiazdkami - włókna olbrzymie. Pow. 100x



Fot. 10. Obraz mikroskopowy mięśnia *BB* 10-letniej suki rasy shih tzu. Barwienie HE. Strzałką oznaczono *splitting*, gwiazdką – włókno olbrzymie. Pow. 100x



Fot. 11. Obraz mikroskopowy mięśnia *QF* 12-letniego psa mieszańca. Barwienie HE. Strzałką oznaczono zmianę kształtu włókna – włókno trójkątne, trójkątem przerost omięsnej. Pow. 100x



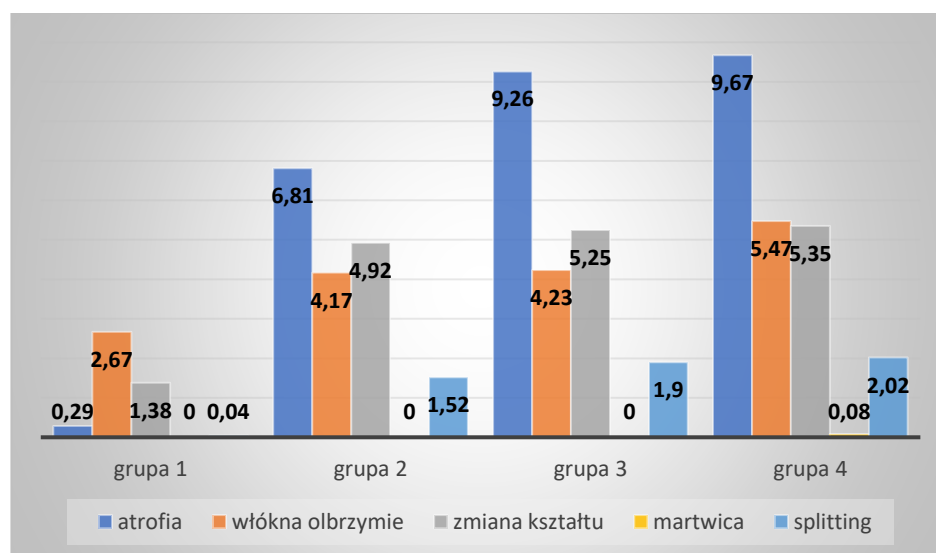
Fot. 12. Obraz mikroskopowy mięśnia *BB* 9-letniej suki rasy buldog francuski. Barwienie HE. Strzałką oznaczono martwicę włókna, trójkątem – przerost tkanki łącznej. Pow. 100x

Badając wpływ wieku psów na rozległość zmian patologicznych, a co się z tym wiąże - liczbę prawidłowych włókien mięśniowych w mięśniach *BB* i *QF*, stwierdzono, że największą liczbą prawidłowo zbudowanych komórek mięśniowych charakteryzowały się mięśnie psów najmłodszych i różniły się one istotnie statystycznie z pozostałymi grupami ($P \leq 0,01$). Na tej podstawie można zauważyć, iż wraz z wiekiem maleje liczba włókien mięśniowych, co także zaobserwowano w badaniach u ludzi [Ławniczak i wsp., 2012]. Spośród zmian patologicznych z najmniejszą częstotliwością występowały włókna martwicze.

Martwicy włókien nie stwierdzono w grupach 1., 2. i 3. w mięśniu *BB* oraz w grupach 1., 2. i 4. w mięśniu *QF*. Odnotowano natomiast zwiększoną liczbę włókien o zmienionym kształcie (innym od wielokątnego na przekroju poprzecznym), co może być związane z ich wzrostem i kształtowaniem w młodym wieku badanych osobników bądź też stanowić wstęp do zaniku włókien u psów w starszym wieku. W przypadku pozostałych zmian nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych między badanymi grupami psów. Sama liczba zmienionych patologicznie włókien, bez odniesienia ich liczby do liczby wszystkich włókien w mięśniu, nie obrazuje w pełni zmian zachodzących w mięśniach wraz z wiekiem. W związku z tym na wykresach 1. i 2. przedstawiono procentowy udział zmian patologicznych w stosunku do ogólnej liczby włókien w badanych mięśniach. Jak wynika z wykresu 1., w mięśniu *BB* odsetek zmian w strukturze włókien mięśniowych wraz z wiekiem zwierząt zwiększał się.

W mięśniu *QF* tendencja ta została zachwiana przez grupę 2. psów, w której obserwowano zwiększony udział włókien olbrzymich, zmiany kształtu oraz rozszczepienia włókien w porównaniu do pozostałych grup (wykres 2.). Należy jednak podkreślić, że najmniejszym odsetkiem zmian charakteryzowały się mięśnie psów najmłodszych, natomiast w obu mięśniach wraz z wiekiem psów zwiększeniu ulegał odsetek włókien atroficznych.

Wykres 1. Udział (%) zmian patologicznych w stosunku do ogólnej liczby włókien w mięśniu dwugłowym ramienia (*m. biceps brachii*) psów



Wykres 2. Udział (%) zmian patologicznych w stosunku do ogólnej liczby włókien w mięśniu w mięśniu czworogłowym uda (*m. quadriceps femoris*) psów

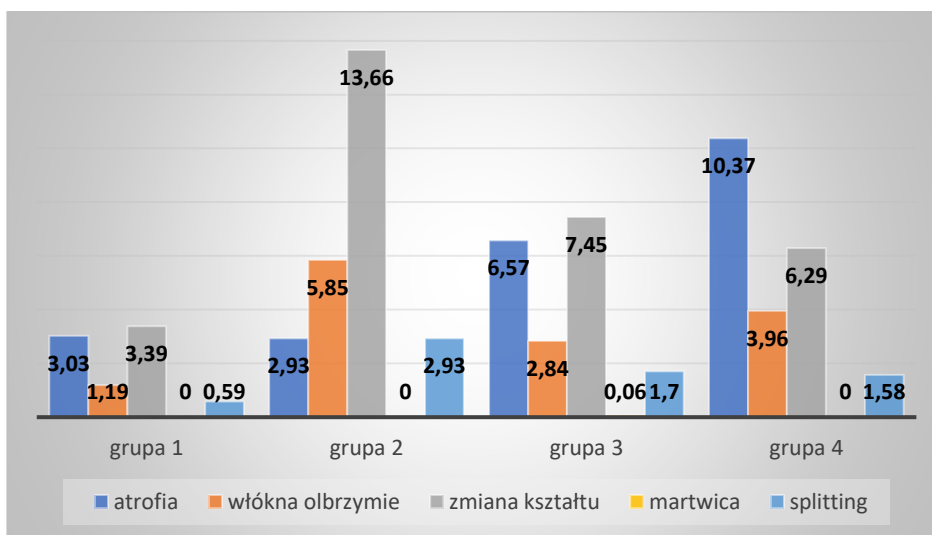


Tabela 8. Porównanie liczby prawidłowych włókien mięśniowych oraz wybranych zmian histopatologicznych w mięśniu dwugłowym ramienia (*m. biceps brachii*) i czworogłowym uda (*m. quadriceps femoris*) psów

Cecha	Mięsień		F	P
	<i>biceps brachii</i> (BB)	<i>quadriceps femoris</i> (QF)		
Włókna prawidłowe	185,00 ± 241,29	173,53 ± 156,42	0,05	0,828
Atrofia włókien	13,20 ± 16,91	15,23 ± 16,14	0,23	0,636
Włókna olbrzymie	9,03 ± 10,21	6,33 ± 7,52	1,36	0,248
Zmiana kształtu włókien	8,43 ^b ± 7,41	12,77 ^a ± 9,04	4,12	0,047
Martwica włókien	0,07 ± 0,37	0,03 ± 0,18	0,20	0,656
<i>Splitting</i>	2,73 ± 2,55	2,93 ± 2,33	0,10	0,752

^{a, b} – różnice statystycznie istotne dla $P \leq 0,05$

Tabela 8. przedstawia porównanie mięśnia dwugłowego ramienia (*m. biceps brachii*) i czworogłowego uda (*m. quadriceps femoris*) pod względem liczby prawidłowych włókien mięśniowych oraz wybranych zmian histopatologicznych

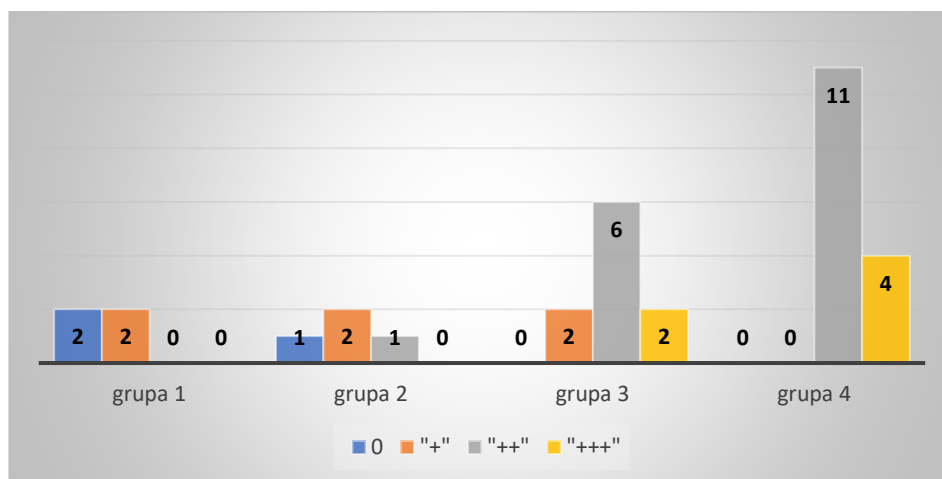
niezależnie od wieku psów. Przeprowadzona analiza wykazała, że istotnie statystycznie więcej włókien o zmienionym kształcie ($P \leq 0,01$) zawierał mięsień czworogłowy uda (*QF*) w porównaniu do mięśnia dwugłowego ramienia (*BB*) (odpowiednio: 12,77 w mięśniu *QF* i 8,43 w mięśniu *BB*, $P \leq 0,05$).

Związana z wiekiem utrata masy i siły mięśniowej jest wieloczynnikowym stanem, który występuje u różnych gatunków i stanowi jeden z głównych problemów zdrowotnych u osób starszych w medycynie ludzkiej. W medycynie weterynaryjnej zanik mięśni szkieletowych często obserwuje się u psów w starszym wieku, ale proces ten nie jest nadal dobrze poznany. Wraz z wiekiem, jak opisano już wcześniej, obserwowane są zarówno zmiany mikrostrukturalne, jak i histopatologiczne w obrębie mięśni szkieletowych zwierząt. Stopień nasilenia tych zmian jest jednak bardzo zróżnicowany u poszczególnych osobników, nawet w tej samej grupie wiekowej. Przede wszystkim wynika to z chorób współistniejących i przyjmowanych w związku z nimi leków. Do najczęściej spotykanych patologii mięśni zalicza się atrofię. Zanik (*atrophia*) oznacza stopniowe pomniejszenie objętości komórek, co prowadzi do zmniejszenia się narządu i upośledzenia jego czynności. Właśnie u zwierząt starszych zanik szczególnie widoczny jest w obrębie mięśni szkieletowych, gdzie zaraz po tkance tłuszczowej dochodzi najszybciej do zmian atroficznych [Madej i Rotkiewicz, 2011]. Istnieje wiele typów atrofii, przy czym u starszych zwierząt spotyka się najczęściej zanik tłuszczakowaty (*atrophia lipomatosa*), gdzie w miejscu zanikających włókien mięśniowych pojawiają komórki tłuszczowe, co dotyczy głównie otyłych starych psów. Innym typem zaniku jest atrofia z nieczynności (*atrophia ex inactivitate*), gdzie nieużywane mięśnie, np. z powodu upośledzonego poruszania się, ulegają stopniowemu zanikowi. Opisywana jest również atrofia z niedożywienia (*atrophia ex inanitione*), która towarzyszy wyniszczeniu organizmu i wielu przewlekłym chorobom, w tym np. niewydolności nerek u psów. Zwierzęta w trakcie tych chorób potrafią popadać w długotrwałą kacheksję prowadzącą między innymi do ich silnego wychudzenia. Dość często spotyka się również zanik spowodowany uszkodzeniem nerwów (*atrophia trophoneurotica*), co w konsekwencji powoduje upośledzenie stymulacji neurologicznej niezbędnej do prawidłowego funkcjonowania mięśni. Częstą chorobą występującą u starszych psów, szczególnie u owczarków niemieckich, jest postępujące zwyrodnienie kręgosłupa z towarzyszącą stenozą odcinka lędźwiowo-krzyżowego określaną jako syndrom ogona końskiego - *cauda equina syndrome* (CES) (Sulla i wsp., 2018]. Jest to choroba przewlekła postępująca powoli, charakteryzująca się między innymi: bólem, ograniczeniem czucia w kończynach miednicznych i ogonie, niedowładem lub porażeniem kończyn tylnych, nietrzymaniem moczu i kału, a także impotencją. Upośledzenie unerwienia kończyn tylnych i ich niedowład, szybko prowadzi do zaników denerwacyjnych mięśni obręczy miednicznej i kończyn miednicznych, co potęguje dysfunkcję ruchową i prowadzi do trwałego kalectwa chorujących psów. Kolejną opisywaną zmianą w strukturze włókien mięśniowych u psów jest obecność tzw. włókien olbrzymich. Hipertrofia, czyli

przerost włókien mięśniowych charakteryzuje się wyraźnie większą średnicą, owalnym lub okrągłym kształtem, jednolitą strukturą cytoplazmy oraz ciemniejszym zabarwieniem. Włókna olbrzymie najczęściej usytuowane są pojedynczo, mogą występować również w grupach, głównie peryferyjnie w wiązках włókien mięśniowych [Górska i Wojtysiak, 2017]. Przyczyna powstawania hipertrofii nie do końca jest znana. Większość autorów sądzi, że zmiana ta powstaje jako następstwo patologicznego pobudzenia nerwowego. Hipertrofia może być konsekwencją wielu stanów chorobowych. Do czynników powodujących hipertrofię zalicza się: uszkodzenie unerwienia, stan nieaktywności, niedożywienie, starzenie się lub wyniszczenie organizmu [Remignon i wsp., 1995]. Hipertrofia może zachodzić w każdym typie włókien mięśniowych, najczęściej jednak we włóknach typu IIB [Schubert-Schoppmeyer i wsp., 2008]. Z kolei Miraglia i wsp. [2006] wskazują, że zwiększona liczba włókien olbrzymich koreluje dodatnio ze wzrostem średnicy włókien mięśniowych. Jak już wcześniej opisano w tym badaniu, największa liczba włókien olbrzymich występowała w grupie młodych i najstarszych psów. Szczególnie dużo włókien olbrzymich obserwowano osobniczo w mięśniach starych psów z grupy 4. dotkniętych chorobami neurodegeneracyjnymi. Uzyskane wyniki są zgodne z doniesieniami naukowymi dotyczącymi przyczyn neurologicznych powstawania włókien olbrzymich. Obserwowane w badanych mięśniach rozszczepienie włókna mięśniowego, inaczej *splitting*, związane jest z uszkodzeniem włókna. W pierwszej fazie tej zmiany pojawia się szczelina, która częściowo dzieli włókno. Następnie dochodzi do całkowitego rozdziału włókna. W ostatniej fazie następuje wrastanie tkanki łącznej między rozdzielone części włókna [Murach i wsp., 2019]. *Splitting* prawdopodobnie spowodowany jest przeciążeniem komórek przez zbyt mały dopływ krwi do włókien, a przez to ich niewłaściwe odżywienie [Bogucka i wsp., 2018]. Dość często spotykana zmianą w mięśniach psów, w tym również geriatrycznych, były włókna o zmienionym kształcie (innym niż wielokątny – tj. trójkątny - angularny i trapezowaty). Podobnie, Braund i wsp. [1982] obserwowali w próbkach mięśni psów włókna o tzw. „nietypowych kształtach”. Wojtysiak i wsp. [2012] przeprowadzili badania na mięśni półbłoniastym świń (*m. semimembranosus*) i wykazali, że częstotliwość zmian kształtu włókien trójkątnych może wzrastać wraz z wiekiem oraz prawdopodobnie może poprzedzać zanik włókien mięśniowych. W naszej pracy nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w liczbie włókien mięśniowych o zmienionym kształcie pomiędzy grupami wiekowymi psów, chociaż zmiany te były często obserwowane w starzejących się mięśniach psów. Ostatnim typem zmian histopatologicznych włókien mięśniowych analizowanych w badaniach własnych była martwica (*necrosis*). Była to rzadko spotykana patologia mięśni i została stwierdzona tylko w grupie 3. i 4., czyli u zwierząt najstarszych. To może świadczyć o fakcie, że procesy martwicze w mięśniach psów pojawiają się dopiero, kiedy mięśnie ulegają procesom starzenia i bardzo rzadko obserwuje się tego typu zmiany u młodych osobników. W mięśniach szkieletowych najczęściej spotykana jest tzw. martwica

woskowa (*necrosis cerea*), nazywana też martwicą Zenkera (*Zenker's necrosis*) należąca do martwic skrzepowo-denaturacyjnych. Obserwowano ją w mięśniach poprzecznie prążkowanych u koni w przebiegu mięśniochwatu porażennego, a także u owiec, świń i ptaków, gdzie ulegające martwicy mięśnie przypominają makroskopowo białe mięso kurze, przeświecające jak mięso rybie, często usiane licznymi wynaczynieniami. W badaniach histopatologicznych można stwierdzić w takich mięśniach włókna z zanikiem poprzecznego prążkowania, o wyglądzie szklistym, rozpadające się odcinkowo na drobne grudki i ziarenka [Madej i Rotkiewicz, 2011]. Z czasem, w obrębie włókien objętych procesami martwicy pojawiają się komórki fagocytarne tzw. żerne i wówczas obraz taki nazywamy martwicą z fagocytozą [Veress i wsp., 1966]. Charakterystyczną cechą obrazu histopatologicznego mięśni szkieletowych jest przerost tkanki łącznej, dlatego na wykresach 3. i 4. przedstawiono liczbę psów wykazujących tę zmianę w obu badanych mięśniach. Na podstawie wykresów można stwierdzić, że wraz z wiekiem zwierząt zwiększa się ilość tkanki łącznej w mięśniu, przy czym przerost bardzo rozległy można spotkać jedynie w grupach psów najstarszych (3. i 4.). Jest to zgodne z opinią Purslow [2005], że młode zwierzęta charakteryzują się cienkimi błonami tkanki łącznej, która dopiero wraz z upływem lat ulega przerostowi. Przerośnięta tkanka łączna często uciska naczynia włosowate w mięśniu, w wyniku czego może dochodzić do niedotlenienia i powstawania zmian degeneracyjnych włókien.

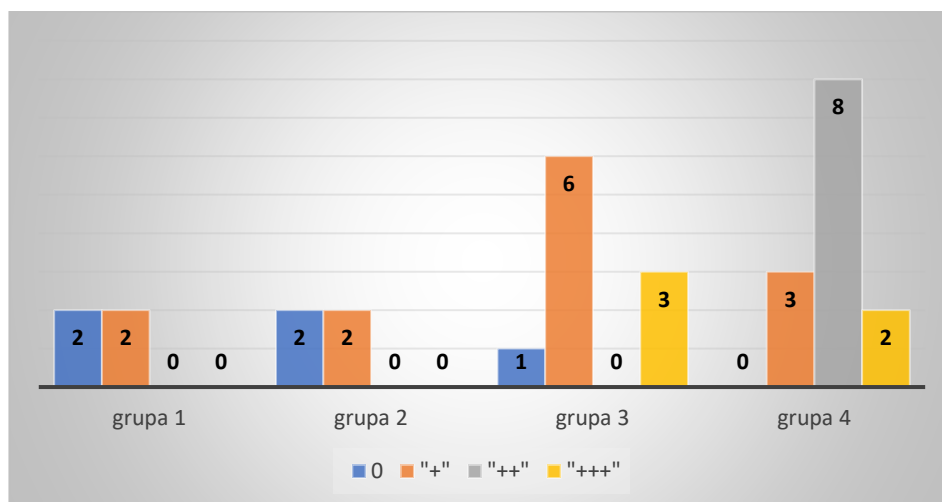
Wykres 3. Liczba psów wykazujących przerost tkanki łącznej w mięśni dwugłowym ramienia (*m. biceps brachii*)



grupa 1 – psy w wieku ≤ 1 lat
 grupa 2 – psy w wieku $> 1 - \leq 5$ lat
 grupa 3 – psy w wieku $> 5 - \leq 10$ lat
 grupa 4 – psy w wieku > 10 lat

0 - brak zmiany
 + - zmiana o małej rozległości
 ++ - zmiana o umiarkowanej rozległości
 +++ - zmiana bardzo rozległa

Wykres 4. Liczba psów wykazujących przerost tkanki łącznej w mięśni czworogłowym uda (*m. quadriceps femoris*)



grupa 1 – psy w wieku ≤ 1 lat
 grupa 2 – psy w wieku $> 1 - \leq 5$ lat
 grupa 3 – psy w wieku $> 5 - \leq 10$ lat
 grupa 4 – psy w wieku > 10 lat

0 - brak zmiany
 + - zmiana o małej rozległości
 ++ - zmiana o umiarkowanej rozległości
 +++ - zmiana bardzo rozległa

W tabeli 9. oraz na fotografiach 13. i 14. przedstawiono liczbę komórek satelitarnych (Pax-7) w mięśniu dwugłowym ramienia (*m. biceps brachii*) i czworogłowym uda (*m. quadriceps femoris*) z uwzględnieniem grup wiekowych psów.

Tabela 9. Liczba komórek satelitarnych (Pax-7) w mięśniu dwugłowym ramienia (*m. biceps brachii*) i czworogłowym uda (*m. quadriceps femoris*) w zależności od wieku badanych psów

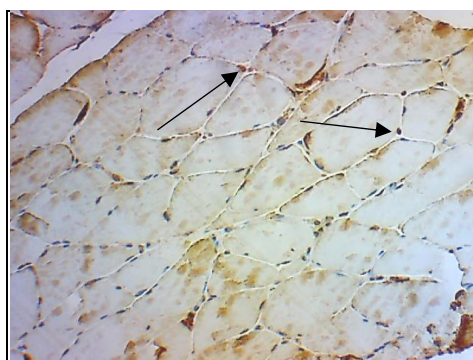
Mięsień	Cecha	Grupa				F	P
		1	2	3	4		
<i>biceps brachii</i> (BB)	Liczba komórek satelitarnych (PAX-7)	77,00 ±37,40	64,00 ±11,31	67,40 ±14,68	52,00 ±13,65	2,78	0,06
<i>quadriceps femoris</i> (QF)		65,33 ±10,50	55,00 ±4,24	63,30 ±17,02	53,60 ±12,68		

Grupa 1 – psy w wieku ≤ 1lat

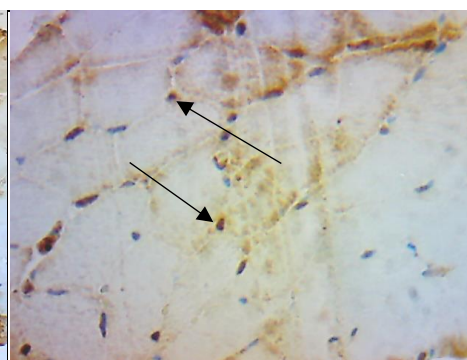
Grupa 2 – psy w wieku > 1- ≤ 5 lat

Grupa 3 – psy w wieku >5- ≤10 lat

Grupa 4 – psy w wieku >10 lat



Fot. 13. Obraz mikroskopowy mięśnia BB 9-letniego psa rasy golden retriever. Reakcja na obecność Pax 7. Strzałkami oznaczono komórki satelitarne. Pow. 200x



Fot. 14. Obraz mikroskopowy mięśnia QF 9-letniego psa rasy golden retriever. Reakcja na obecność Pax 7. Strzałkami oznaczono komórki satelitarne. Pow. 200x

Analizując wpływ wieku psów na liczbę komórek satelitarnych (Pax-7 pozytywnych), nie wykazano różnic istotnych statystycznie pomiędzy badanymi grupami. Jednak pomimo braku istotnych różnic należy zauważyć, że stosunkowo największą liczbę komórek satelitarnych, zarówno w mięśniu dwugłowym ramienia, jak czworogłowym uda stwierdzono w grupie zwierząt najmłodszych do 1. roku życia, a najmniejszą u psów geriatrycznych w wieku

powyżej 10 lat. Do bardzo podobnych wniosków doszli w swojej pracy badawczej Verdijk i wsp. [2014], którzy wykazali, że u ludzi od momentu narodzin do osiągnięcia dojrzałości radykalnie zwiększa się wielkość włókien mięśniowych, natomiast nie zmienia się liczba komórek satelitarnych. Nie wykazano również różnic w tym zakresie pomiędzy włóknami typu I i II. Stwierdzono jednak, że wraz z postępującym procesem starzenia mięśni szkieletowych dochodzi do atrofii włókien typu II i zmniejszenia liczby zawartych w nich komórek satelitarnych, a tym samym potencjału regeneracyjnego. W badaniu tym potwierdzono także, że 12-tygodniowy trening oporowy zwiększył zarówno rozmiar, jak i liczbę komórek satelitarnych we włóknach typu II, co oznacza, że ćwiczenia fizyczne stanowią dobrą metodę opóźniania procesów starzenia.

Tabela 10. Porównanie liczby komórek satelitarnych (Pax-7) w mięśni dwugłowym ramienia (*m. biceps brachii*) i czworogłowym uda (*m. quadriceps femoris*)

Cecha	Mięsień		F	P
	<i>biceps brachii</i> (BB)	<i>quadriceps femoris</i> (QF)		
Liczba komórek satelitarnych (PAX-7)	60,43 ± 18,45	58,10 ± 14,20	0,30	0,585

W tabeli 10. zestawiono liczbę komórek satelitarnych (Pax-7) w mięśni dwugłowym ramienia (*m. biceps brachii*) i czworogłowym uda (*m. quadriceps femoris*) bez podziału psów na grupy wiekowe. Jak wynika z powyższej tabeli, nie wykazano także różnic statystycznie istotnych pomiędzy w/w mięśniami.

Mięśniowe komórki satelitarne (*muscle satellite cells* - mSC) są głównymi komórkami macierzystymi mięśni odpowiedzialnymi za ich zdolności regeneracyjne i odgrywają bardzo ważną rolę w procesach dystrofii i starzenia się mięśni. Mięśnie szkieletowe stanowią około 40% masy ciała i do ich funkcji należy m. in. utrzymanie postawy, ruchliwość, regulacja temperatury ciała, magazynowanie energii i wsparcie tkanek miękkich. Mają one wysoką zdolność regeneracyjną po różnego typu urazach, co jest bezpośrednio związane z obecnością komórek satelitarnych znajdujących się między blaszką podstawną, a błoną mięśniową. U dorosłych osobników będące w stanie spoczynku mSC mogą być aktywowane przez określone sygnały pojawiające się po urazie mięśni. Tymczasem w chorobach przewlekłych procesy zwyrodnieniowe, takie jak dystrofie mięśniowe, prowadzą do ich stałej patologicznej aktywacji, co w efekcie skutkuje zubożeniem puli tych komórek i upośledzeniem procesu regeneracji [Ribeiro i wsp., 2019]. Biorąc pod uwagę tak wiele ważnych funkcji układu mięśniowego, nic dziwnego, że prawidłowa siła mięśniowa jest pozytywnie skorelowana z lepszą jakością życia zarówno ludzi, jak i zwierząt, a ujemnie skorelowana ze śmiertelnością z jakiegokolwiek przyczyny. Zainteresowaniem wielu naukowców cieszą się zdolności

regeneracyjne mięśni, a tym samym aktywność komórek satelitarnych podczas ich starzenia. Występująca z wiekiem sarkopenia i atrofia mięśni w konsekwencji prowadzi do wzrostu zachorowalności starszych osobników, w tym przede wszystkim skutkuje większą podatnością na urazy typu zwichnięcia stawów i złamania kości, co wynika ze zmniejszonej stabilizacji mięśniowej układu ruchowego. Liczne badania molekularne i genetyczne prowadzone głównie na myszach transgenicznym wyjaśniły dość szczegółowo szlaki regeneracyjne komórek mięśniowych i rolę komórek satelitarnych w tych procesach. Komórki satelitarne są tak nazwane ze względu na ich pozycję satelitarną w stosunku do włókien mięśniowych i stanowią heterogenną populację komórek macierzystych i progenitorowych potrzebnych do odbudowy mięśni. Komórki satelitarne wykazują silną ekspresję czynnika transkrypcyjnego Pax7 i sekwencyjnie wyrażają ekspresję miogennych czynników regulatorowych MRF takich jak: Myf5, MyoD, MyoG, Myf6, ponieważ ulegają stałym procesom proliferacji i różnicowania. Dojrzałe włókna mięśniowe z nieaktywnymi mSC wykazują ekspresję Pax 7 przy braku ekspresji Myf5, MyoD (Pax7+/Myf5-/MyoD-) Takie komórki to około 10% populacji mSC stanowiących długoterminową samoodnawiającą się populację komórek macierzystych. Pozostałe 90% populacji komórek satelitarnych to komórki zdeterminowane, które wyrażają ekspresję Myf5 i wydają się tworzyć krótkoterminową, samoodnawiającą się populację. Aktywacja mSC na skutek między innymi mikrourazów mięśni prowadzi do nasilonej ekspresji Myf 5, a następnie MyoD, przez mSC i konsekwencji do ich nasilonej proliferacji. W tym czasie większość mSC przestaje wykazywać ekspresję Pax7, ale część namnażających się komórek nadal zachowuje syntezę Pax7 przy jednoczesnym obniżeniu poziomu MyoD, umożliwiając w ten sposób samoodnowę populacji wyciszonych mSC. Różnicujące mioblasty (Pax7-/Myf5-/Miogenina+/Myf6+/ MyoD+) dojrzewając, ostatecznie syntetyzują białka charakterystyczne dla mięśni szkieletowych (np. miozyna, m-kadheryna), a obniżają ekspresję MyoD. Ich fuzja ze sobą lub z uszkodzonym włóknem prowadzi do powstania zregenerowanych komórek mięśniowych, charakteryzujących się początkowo centralnie położonym jądrem [Kozakowska i wsp., 2015]. Liczne badania nad regeneracją starzejących się mięśni szkieletowych, a tym samym liczbą komórek satelitarnych, nie przyniosły jednoznacznych wyników. Rozbieżności te mogą wynikać z wielu czynników, między innymi z różnic międzygatunkowych zwierząt poddanych badaniom, ich wieku, doboru mięśnia czy technik użytych do liczenia mSC. Odwracalny brak aktywności komórek mSC jest niezbędny do utrzymania długoterminowego potencjału regeneracyjnego jako swoisty podzbiór regeneracyjnych komórek macierzystych. Obecność spoczynkowych komórek satelitarnych jest stałym zabezpieczeniem regeneracyjnym dojrzałych mięśni, które w każdej chwili na skutek odpowiedniego bodźca aktywacyjnego mogą zainicjować procesy proliferacji i odbudowy uszkodzonych mięśni [Chen i wsp., 2020]. Jednak okresy przedłużającego się stanu spoczynkowego komórek satelitarnych mogą negatywnie wpłynąć na ich długoterminową żywotność,

prowadząc do osłabienia potencjału regeneracyjnego. Pomimo obniżonej syntezy białek, spowolnionego metabolizmu i ogólnej aktywności komórkowej spoczynkowe komórki satelitarne nadal wymagają procesów komórkowych, aby podtrzymać swój potencjał podziałowy. Zachodzące procesy wewnątrzkomórkowe stale generują szkodliwe metabolity, mikrouszkodzenia organelli wewnątrzkomórkowych i wzrost poziomu wolnych rodników pochodzenia mitochondrialnego [Van Velthoven i wsp., 2019]. Akumulacja szkodliwych produktów metabolizmu komórkowego, wpływa niekorzystnie na żywotność nieaktywnych komórek satelitarnych. Na szczęście mają one szereg mechanizmów ochronnych zapobiegających nadmiernemu gromadzeniu się produktów przemiany materii, uszkodzeniu DNA, a tym samym opóźniających procesy starzenia mSC [García-Prat i wsp., 2016]. Jednak spoczynkowe komórki satelitarne w dłuższych okresach uśpienia są narażone na proteotoksyczność. Podczas długotrwałego braku aktywności podziałowej komórek dochodzi do nagromadzenia dysfunkcyjnych białek i organelli, które w przeciwnym razie zostałyby zmniejszone przez regularne cykle komórkowe. Aby zapobiec potencjalnej proteotoksyczności, systemy ochrony komórkowej, takie jak ubikwityna-proteasom, czy autofagia zapewniają stałą wymianę materiału komórkowego wynikającego z podziałów komórkowych i zapewniają im dłuższą żywotność. Niestety, te i inne wcześniej opisywane mechanizmy ochronne są niewystarczające, aby utrzymać długoterminową żywotność komórek satelitarnych oraz zdolności regeneracyjne mięśni przez całe życie. W końcu spoczynkowe geriatryczne komórki satelitarne wkraczają w tak zwany stan przedstarzeniowy poprzez de-represję białka p16^{INK4a} (Cdkn2 α), które spowalnia podziały komórkowe, wydłużając czas deaktywacji komórkowej, a tym samym zwiększając uszkodzenia DNA poprzez dodatnie sprzężenie zwrotne ze wzrostem ilości wolnych rodników ROS. W efekcie tego mSC geriatrycznych mięśni nie są tak zdolne i wydajne w przechodzeniu ze stanu uśpienia G0 do aktywacji niezbędnej do regeneracji populacji komórek i w konsekwencji są niezdolne do nadażania za postępującą z wiekiem degradacją mięśni [Ciecierska i wsp., 2019]. Podobnie w niniejszej pracy stwierdzono tendencje do spadku ilości mSC u psów wraz z wiekiem, mimo że nie była to istotna statystycznie różnica. W innych badaniach wykazano, że przekroje mięśni dorosłych i geriatrycznych myszy w porównaniu z młodymi myszami wykazują oznaki zaniku mięśni: atrofię włókien, spadek stopnia unerwienia i re-ekspresję embrionalnego łańcucha ciężkiego miozyny oraz centralne położone jądra [García-Prat i wsp., 2013; 2016]. Wydaje się, że szlaki autofagii i mitofagii aktywne podczas długotrwałego spoczynku nie są wystarczającym mechanizmem, aby zapobiec procesom starzenia komórek satelitarnych i ich nieodwracalną utratą [Wen i wsp., 2016]. Właśnie dlatego stała stymulacja komórek satelitarnych do ich podziałów warunkuje ich większą przeżywalność oraz zdolności do regeneracji, co wynika z mniejszego nagromadzenia czynników proteotoksycznych poprzez tak zwane rozcieńczenie cytoplazmatyczne. Wykazano w badaniach geriatrycznych, że to między innymi

aktywność fizyczna, w tym ćwiczenia, jest jednym z najskuteczniejszych czynników stymulujących aktywność komórek satelitarnych. Aktywacja, proliferacja, a następnie różnicowanie i fuzja komórek satelitarnych do istniejących włókien mięśniowych powoduje przyrost masy mięśniowej podczas ćwiczeń fizycznych. Brak aktywności ruchowej w starszym wieku, jak i siedzący tryb życia prowadzą do szybszego spadku masy mięśniowej u starszych osobników. Co ciekawe, uszkodzenie komórek satelitarnych poprzez ich napromieniowanie powoduje, że pomimo treningu siłowego nie dochodzi do wzrostu masy mięśniowej. Potwierdza to dominującą rolę mSC w procesach odnowy i regeneracji tkanki mięśniowej [Abreu i wsp., 2017; Bogdanis, 2012]. Potrzebne są jednak dalsze badania nad funkcją mSC i procesami wpływającymi na ich wydolność regeneracyjną w starszym wieku zarówno u ludzi, jak i zwierząt domowych, co może w konsekwencji doprowadzić do opracowania skuteczniejszych metod zapobiegania starczym zanikom i dysfunkcjom układu mięśniowego.

5.2. WSKAŹNIKI MORFOLOGICZNE I BIOCHEMICZNE KRWI

Tabela 11. Wartości wybranych wskaźników morfologicznych i biochemicznych krwi psów w poszczególnych grupach wiekowych

Cecha	Grupa				F	P
	1	2	3	4		
WBC G/L	8,22±4,99	8,50 ±0,92	8,10 ±3,58	9,56 ±7,85	0,82	0,493
NEU G/L	4,47 ±2,69	4,54 ±1,12	6,71 ±3,35	8,75 ±7,08	0,90	0,454
LYM G/L	2,09 ±0,90	0,87 ±0,33	1,35 ±0,73	2,00 ±1,64	1,02	0,400
MONO G/L	0,56 ±0,13	0,75 ±0,25	0,68 ±0,43	0,53 ±0,15	0,89	0,461
EOS G/L	1,08 ^b ±0,75	2,33 ^a ±0,36	0,34 ^b ±0,08	0,26 ^b ±0,08	4,11	0,016
BASO G/L	0,02 ±0,02	0,01 ±0,02	0,08 ±0,17	0,04 ±0,04	0,58	0,636
RBC T/L	5,76 ±2,97	7,83 ±1,42	6,54 ±1,72	6,14 ±1,30	1,07	0,378
HGB G/L	114,40 ±11,34	183,00 ±4,36	158,61 ±28,61	136,55 ±46,17	2,41	0,089
HCT L/L	0,34 ±0,06	0,54 ±0,01	0,46 ±0,09	0,44 ±0,10	2,57	0,075
PLT G/L	193,33 ±188,04	358,00 ±149,96	401,66 ±277,60	263,64 ±196,41	1,09	0,369
ALBUMINY G/L	28,10 ±6,48	34,70 ±4,71	31,73 ±3,29	29,16 ±8,21	0,86	0,472
ALT U/L	32,17 ±20,45	44,01 ±35,95	31,38 ±27,54	56,42 ±33,25	1,06	0,381
ALFA-AMYLAZA U/L	1552,00 ^a ±387,06	539,33 ^b ±141,45	843,27 ^{ab} ±404,23	1122,73 ^a ±513,76	3,29	0,036
AP U/L	321,00 ±141,58	117,00 ±70,74	289,80 ±408,82	784,40 ±1259,85	0,83	0,491
AST U/L	44,83 ±15,82	35,07 ±10,34	51,71 ±26,84	47,06 ±25,65	0,36	0,780
BIAŁKO CAŁKOWITE G/L	68,03 ±21,33	72,47 ±30,42	67,56 ±26,89	62,87 ±16,97	1,04	0,389
BILIRUBINA CAKOWITA UMOL/L	2,43 ±1,60	2,69 ±0,81	3,97 ±1,69	4,77 ±4,19	0,69	0,566
CHOLESTEROL MMOL/L	5,87 ±2,25	5,64 ±1,44	6,97 ±3,33	17,09 ±38,78	0,37	0,775
CK-KINAZA KREATYNOWA U/L	361,33 ±229,77	134,67 ±54,65	251,12 ±153,41	255,63 ±121,45	1,31	0,290
FRUKTOZAMINA UMOL/L	226,49 ±54,66	224,67 ±20,31	284,77 ±58,64	278,36 ±61,62	1,49	0,239
GLDH U/L	6,21 ±3,61	33,01 ±38,08	32,26 ±37,36	21,12 ±9,84	1,06	0,380
GLUKOZA MMOL/L	3,27 ±1,14	5,33 ±0,57	18,66 ±43,67	3,51 ±1,76	0,79	0,508
GGTP U/L	3,18 ±3,13	3,49 ±1,55	3,86 ±1,44	11,91 ±14,47	1,60	0,213
KREATYNINA UMOL/L	88,80 ±39,60	68,70 ±9,56	173,13 ±181,62	130,63 ±82,79	0,78	0,515
LDH U/L	630,20 ±479,14	187,77 ±71,70	371,54 ±255,80	652,03 ±556,38	1,42	0,260
LIPAZA U/L	52,30 ±36,44	57,53 ±37,08	231,91 ±212,39	309,99 ±251,45	1,94	0,147

cd. tabeli 11.

MOCZNIK MMOL/L	9,05 ±1,08	5,28 ±1,01	19,55 ±25,02	12,07 ±6,39	0,95	0,429
TRÓJGLICERYDY MMOL/L	0,96 ±0,24	0,75 ±0,16	1,67 ±1,30	1,50 ±1,53	0,50	0,686
ALBUMINY/GLOBULINY G/L	0,70 ±0,28	0,91 ±0,57	0,88 ±0,55	0,86 ±0,34	0,17	0,918
GLOBULINY G/L	39,93 ±3,30	37,77 ±4,29	35,83 ±5,86	33,71 ±6,35	1,19	0,333
CHLORKI MMOL/L	118,67 ±8,02	105,67 ±4,16	104,37 ±7,89	106,93 ±11,46	1,69	0,192
FOSFOR NIEORGANICZNY MMOL/L	2,22 ±0,27	1,18 ±0,40	2,47 ±3,39	1,62 ±0,49	0,53	0,666
MAGNEZ MMOL/L	0,92 ±0,23	0,87 ±0,07	0,90 ±0,13	0,96 ±0,16	0,54	0,659
POTAS MMOL/L	4,28 ±0,37	4,78 ±0,60	5,15 ±1,23	4,66 ±0,68	1,00	0,408
SÓD MMOL/L	146,67 ±6,66	146,33 ±0,58	147,50 ±17,90	149,94 ±8,11	0,15	0,928
WAPŃ MMOL/L	2,37 ±0,50	2,63 ±0,21	2,97 ±0,93	2,57 ±0,51	0,96	0,425
T4 CAŁKOWITE UG/DL	2,84 ±0,87	3,27 ±0,67	1,97 ±1,09	2,01 ±1,03	1,83	0,165

Grupa 1 – psy w wieku ≤ 1lat ^{a, b} – różnice statystycznie istotne dla $P \leq 0,05$

Grupa 2 – psy w wieku > 1- ≤ 5 lat ^{A, B} – różnice statystycznie istotne dla $P \leq 0,01$

Grupa 3 – psy w wieku >5- ≤10 lat

Grupa 4 – psy w wieku >10 lat

W tabeli 11. przedstawiono wartości wybranych parametrów morfologicznych i biochemicznych krwi psów w poszczególnych grupach wiekowych. Uzyskane wartości w zdecydowanej większości mieściły się w zakresie wartości referencyjnych dla tego gatunku zwierząt [Winnicka, 2015]. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono istotnie statystycznie większą liczbę granulocytów kwasochłonnych w grupie psów w wieku od 1 do 5 lat w porównaniu do zwierząt z pozostałych trzech grup wiekowych ($P \leq 0,05$). Ponadto, poziom alfa-amylazy w grupach 1. i 4. był wyższy w porównaniu do psów z grupy 2. ($P \leq 0,05$). Powszechnie wiadomo, że parametry morfologiczne i biochemiczne krwi uważane są za ważne wskaźniki kliniczne, które są szeroko stosowane w celu określenia stanu zdrowia [Kelada i wsp., 2012; Grotty i Knottenbelt, 2002]. Pozwalają one na ocenę wpływu różnych czynników na stan homeostazy zwierząt. Odnotowana w grupie 1. i 2. niewielka eozynofilia trudna jest do interpretacji. Granulocyty kwasochłonne są ważnym składnikiem układu immunologicznego i często biorą udział w reakcjach odpornościowych związanych z nadwrażliwością i inwazją pasożytniczą. Chociaż górny zakres referencyjny dla stężenia eozynofili we krwi u psów wynosi 0,75 G/l, uważa się, że istotna eozynofilia występuje, gdy liczba przekracza 2,2-2,5 G/l [www.vin.com/apputil/content/defaultadv1.aspx?meta=Generic&pId=11268&id=3866504]. Ponadto, należy pamiętać, że istnieją predyspozycje rasowe do zwiększonego poziomu granulocytów kwasochłonnych we krwi obwodowej [Lilliehöök i Tvedten, 2003]. Analizując poziom alfa-amylazy w surowicy krwi psów, można stwierdzić, że wartości tego parametru, pomimo dużych różnic w obrębie poszczególnych grup, mieściły się w szerokich granicach wartości normatywnych. Najczęstszą przyczyną podwyższenia aktywności tego enzymu

jest ostre zapalenie trzustki, natomiast obniżenie poziomu alfa-amylazy wynika z reguły z martwicy gruczołu trzustkowego [Winnicka., 2015; Lazarow, 2020].

5.3. WSPÓLZALEŻNOŚCI. WSPÓLCZYNNIKI KORELACJI I DETERMINACJI.

W tabelach 12. i 13. przedstawiono współczynniki korelacji (R_{xy}) i determinacji (R_{xy}^2) pomiędzy cechami mikrostruktury, zmianami patologicznymi, liczbą komórek satelitarnych (PAX-7) i kapilaryzacją mięśnia dwugłowego ramienia (*m. biceps brachii*) i czworogłowego uda (*m. quadriceps femoris*) psów.

Tabela 12. Współczynniki korelacji (R_{xy}) między cechami mikrostruktury, zmianami patologicznymi, liczbą komórek satelitarnych (PAX-7) i kapilaryzacją mięśnia dwugłowego ramienia (*m. biceps brachii*) i czworogłowego uda (*m. quadriceps femoris*) psów

Cecha	Ogólna liczba włókien	Udział włókien FG	Udział włókien FO	Średnica włókien FG	Średnica włókien FO	Liczba włókien prawidłowych	Udział tłuszczu śródmięśniowego	Atrofia włókien	Włókna olbrzymie	Zmiana kształtu włókien	Splitting	Martwica włókien	Przerost tkanki łącznej	Liczba komórek satelitarnych	Liczba kapilar
Ogólna liczba włókien		0,82**	0,91**	-0,31*	-0,32*	0,11	-0,13	-0,02	-0,02	0,21	0,01	0,19	-0,17	-0,10	-0,27**
Udział włókien FG	0,82**		0,51**	-0,48**	-0,41**	0,22	-0,07	<0,01	0,04	0,29*	0,01	0,03	-0,30*	-0,10	-0,23
Udział włókien FO	0,91**	0,51**		-0,12	-0,19	<0,01	-0,14	-0,03	-0,06	0,10	0,01	0,26*	-0,08	-0,07	-0,24

cd. tabeli 12.

Średnica włókien FG	-0,31*	-0,48**	-0,12		0,93**	-0,58**	0,23	0,14	-0,11	-0,12	0,24	0,07	0,15	-0,15	0,03
Średnica włókien FO	-0,32*	-0,41**	-0,19	0,93**		-0,53**	0,30*	0,16	-0,12	-0,10	0,16	<0,001	0,05	-0,13	-0,02
Liczba włókien prawidłowych	0,11	0,22	<0,01	-0,58**	-0,53**		-0,21	-0,01	0,50**	0,02	-0,20	-0,01	0,11	0,40**	-0,11
Udział tuszczu śródmięśniowego	-0,13	-0,07	-0,14	0,23	0,30*	-0,21		0,08	0,13	0,05	<0,001	-0,01	-0,08	-0,10	-0,06
Atrofia włókien	-0,02	<0,01	-0,03	0,14	0,16	-0,01	0,08		0,23	0,23	<0,001	0,01	0,15	-0,10	-0,30*
Włókna olbrzymie	-0,02	0,04	-0,06	-0,11	-0,12	0,50**	0,13	0,23		0,14	0,01	-0,05	0,23	0,07	-0,19
Zmiana kształtu włókien	0,21	0,29*	0,10	-0,12	-0,10	0,02	0,05	0,23	0,14		0,39**	-0,11	-0,35**	0,05	-0,16
<i>Splitting</i>	0,01	0,01	0,01	0,24	0,16	-0,20	<0,001	0,36**	0,01	0,39**		0,04	-0,09	-0,22	-0,10

cd. tabeli 12.

Martwica włókien	0,19	0,03	0,26*	0,07	<0,001	-0,01	-0,01	0,01	-0,05	-0,11	-0,04		0,27*	0,01	-0,12
Przerost tkanki łącznej	-0,17	-0,30*	-0,08	0,15	0,05	0,11	-0,08	0,15	0,23	-0,35**	-0,09	0,27*		0,08	-0,08
Liczba komórek satelitarnych	-0,10	-0,10	-0,07	-0,15	-0,13	0,40**	-0,10	-0,10	0,07	0,05	-0,22	0,01	0,08		0,21
Liczba kapilar	-0,27*	-0,23	-0,24	0,03	-0,02	-0,11	-0,06	-0,30*	-0,19	-0,16	-0,10	-0,12	-0,08	0,21	

Współczynniki korelacji istotne przy: * – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$

Tabela 13. Współczynniki determinacji (R_{xy}^2), pomiędzy cechami mikrostruktury, zmianami patologicznymi, liczbą komórek satelitarnych (PAX-7) i kapilaryzacją mięśnia dwugłowego ramienia (*m. biceps brachii*) i czworogłowego uda (*m. quadriceps femoris*) psów

Cecha	Ogólna liczba włókien	Udział włókien FG	Udział włókien FO	Średnica włókien FG	Średnica włókien FO	Liczba włókien prawidłowych	Udział tłuszczu śródmięśniowego	Atrofia włókien	Włókna o brzymie	Zmiana kształtu włókien	Splitting	Martwica włókien	Liczba komórek satelitarnych	Liczba kapilar
Ogólna liczba włókien		0,67**	0,83**	0,10*	0,10*	0,01	0,02	<0,001	<0,001	0,04	<0,001	0,04	0,01	0,07*
Udział włókien FG	0,67**		0,26**	0,23**	0,17**	0,05	<0,01	<0,001	<0,01	0,08*	<0,001	<0,001	0,01	0,05
Udział włókien FO	0,83**	0,26**		0,01	0,03	<0,001	0,02	<0,001	<0,01	0,01	<0,001	0,07*	0,01	0,06
Średnica włókien FG	0,10*	0,23**	0,01		0,87**	0,33**	0,05	0,02	0,01	0,01	0,06	0,01	0,02	<0,001
Średnica włókien FO	0,10*	0,17**	0,03	0,87**		0,28**	0,09*	0,02	0,01	0,01	0,03	<0,001	0,02	<0,001
Liczba włókien prawidłowych	0,01	0,05	<0,001	0,33**	0,28**		0,04	<0,001	0,25**	<0,001	0,04	0,01	0,16**	0,01

cd. tabeli 13.

Udział tłuszczu środmięśniowego	0,02	<0,01	0,02	0,05	0,09*	0,04		0,01	0,02	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01
Atrofia włókien	<0,001	<0,001	<0,001	0,02	0,02	<0,001	0,01		0,05	0,05	0,13**	<0,001	0,01	0,09*
Włókna olbrzymie	<0,001	<0,01	<0,01	0,01	0,01	0,25**	0,02	0,05		0,02	<0,001	<0,001	0,01	0,04
Zmiana kształtu włókien	0,04	0,08*	0,01	0,01	0,01	<0,001	<0,001	0,05	0,02		0,15**	0,01	<0,001	0,02
<i>Splitting</i>	<0,001	<0,001	<0,001	0,06	0,03	0,04	<0,001	0,13**	<0,001	0,15**		<0,001	0,05	0,01
Martwica włókien	0,04	<0,001	0,07*	0,01	<0,001	0,01	<0,001	<0,001	<0,001	0,01	<0,001		<0,001	0,01
Liczba komórek satelitarnych	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,16**	0,01	0,01	0,01	<0,001	0,05	<0,001		0,05
Liczba kapilar	0,07*	0,05	0,06	<0,001	<0,001	0,01	<0,01	0,09*	0,04	0,02	0,01	0,01	0,05	

Współczynniki determinacji istotne przy: * – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$

Analizując korelacje wykazano, że ogólna liczba włókien wysoko istotnie statystycznie koreluje z udziałem poszczególnych typów włókien, natomiast w mniejszym stopniu istotnie koreluje z ich średnicą. Wraz ze wzrostem całkowitej liczby włókien mięśniowych rośnie udział włókien FG ($r=0,82$,

$P \leq 0,01$) i FO ($r=0,91$, $P \leq 0,05$), natomiast zmniejsza się ich średnica (odpowiednio: FG: $r=0,31$, $P \leq 0,05$ i FO: $r=-0,32$, $P \leq 0,05$). Jak wykazano w tabeli 13., ogólna liczba włókien aż w 83% jest determinowana przez udział włókien oksydacyjnych (FO) i nieco w mniejszym stopniu (67%) przez udział włókien glikolitycznych (FG), natomiast tylko w 10% przez średnicę zarówno włókien FG, jak i FO. Podsumowując powyższe zależności, należy podkreślić, że przyrostowi całkowitej liczby włókien mięśniowych towarzyszy zmniejszenie ich grubości, bez względu na to, czy są to włókna oksydacyjne (FO), czy włókna glikolityczne (FG). Chociaż różnice w stopniu determinacji ogólnej liczby włókien przez liczbę włókien FO i FG nie są duże, to jednak głównie włókna oksydacyjne determinują całkowitą liczbę włókien mięśniowych.

Na podstawie przeprowadzonych analiz można stwierdzić, że wraz ze wzrostem udziału włókien glikolitycznych (FG) istotnie statystycznie zmniejsza się ich średnica ($r=-0,48$, $P \leq 0,01$) oraz średnica włókien oksydacyjnych (FO) ($r=-0,41$, $P \leq 0,01$). Kiedy wzrasta średnica włókien FG wysoko istotnie wzrasta również średnica włókien FO ($r=0,93$, $P \leq 0,01$). Tymczasem, co jest warte podkreślenia, wzrostowi średnicy włókien FO towarzyszy nie tylko jednoczesny wzrost średnicy włókien FG ($r=0,93$, $P \leq 0,01$), ale także zwiększa się istotnie statystycznie udział procentowy tłuszczu śródmięśniowego ($r=0,30$, $P \leq 0,05$), a cecha ta jest determinowana w 9%. Potwierdza to powszechnie znane informacje, że włókna mięśniowe czerwone posiadają w swojej strukturze więcej tłuszczu strukturalnego niż szybko kurczliwe włókna białe.

W dalszej analizie wzajemnych korelacji stwierdzono istotną zależność, że wraz ze wzrostem całkowitej liczby włókien mięśniowych zmniejsza się istotnie statystycznie stopień ich unaczynienia ($r=-0,27$, $P \leq 0,05$). Ogólna liczba włókien w istotny sposób determinowana jest przez liczbę kapilar w mięśniu, chociaż współczynnik determinacji wynosił w tym przypadku tylko 7%. Analizując tę zależność, można stwierdzić, że wzrost liczby włókien w danym mięśniu wcale nie prowadzi do ich lepszego unaczynienia, co może mieć istotny wpływ na ich dotlenienie, jak i odżywienie. Pytanie, jak to się ma do intensywnie trenujących psów i przyrostu ich masy mięśniowej, a w konsekwencji funkcjonowania tych mięśni. Wiele doniesień naukowych, mówi o tym, że bardzo istotną jest kwestia wypośrodkowania intensywności treningu fizycznego do wieku tak, aby zapewnić równowagę między produkcją wolnych rodników (ROS), a utrzymaniem masy mięśniowej i sprawności fizycznej. Odpowiednio dobrany trening jest skuteczną metodą zapobiegającą starczym zanikom masy mięśniowej, utrzymuje mięśnie w dobrej kondycji, w tym zapewnia utrzymanie ich odpowiedniej siły i wytrzymałości. Jednak nadmierny wysiłek oddziałuje niekorzystnie na tkankę mięśniową. Większość badań wskazuje, że ćwiczenia fizyczne zwiększają ilość ROS w komórkach, co związane jest ze zwiększonym zapotrzebowaniem na tlen. Schematy ćwiczeń mogą odgrywać różne role w produkcji wolnych rodników i białek szoku cieplnego (HSPs) [McArdle i wsp., 2000]. Okazuje się, że powtarzające się skurcze ekscentryczne wywołują więcej uszkodzeń komórkowych niż inne typy aktywności skurczowej mięśni [Friden

i Lieber, 2001]. Spowodowane jest to prawdopodobnie wzrostem wydatków energetycznych i nadmiernym obciążeniem mechanicznym komórek, co predysponuje do zwiększonej produkcji wolnych rodników [Balagopal i wsp., 2001]. Wykazano, że wyczerpujące ćwiczenia powodowały wzrost stężenia karbonylu pochodzenia białkowego, uszkodzenia oksydacyjnego DNA mięśni i zwiększenie procesów utleniania białek [Sen, 1995; Radak i wsp., 1999]. Przytoczone powyżej badania dotyczą jednak ludzi i zwierząt laboratoryjnych. Nadal zdecydowanie brakuje tego typu sprawdzonej wiedzy dotyczącej zwierząt towarzyszących, w tym psów. W związku z tym opisywane badanie ma charakter niejako innowacyjny i otwiera możliwości dalszych doświadczeń i analiz w tym kierunku.

Dalsza analiza otrzymanych wyników wykazała także, że wraz ze wzrostem udziału włókien FG znacząco statystycznie rośnie liczba włókien mięśniowych o zmienionym kształcie ($r=0,29$, $P\leq 0,05$), przy spadku ilości tkanki łącznej ($r=-0,30$, $P\leq 0,05$). Jednocześnie stwierdzono, że wraz ze wzrostem udziału włókien FO zwiększa się liczba komórek mięśniowych uległych martwicy ($r=0,26$, $P\leq 0,05$). Mogłoby to nasuwać podejrzenie, że włókna oksydacyjne częściej ulegają procesom martwicy niż włókna glikolityczne. Jednak, aby tego dowiedzieć, należałoby wykonać dodatkowe badania w tym kierunku na większej i bardziej reprezentatywnej grupie zwierząt.

Oceniając kolejne korelacje, zaobserwowano, że istotnie statystycznie wzrostowi prawidłowych włókien mięśniowych towarzyszy wzrost liczby komórek satelitarnych (Pax-7) ($r=0,40$, $P\leq 0,01$), a tym samym potencjał regeneracyjny mięśni. Badając dalsze korelacje wzięto pod uwagę zmiany patologiczne w mięśniach i ich mikrostrukturę. Wykazano, że postępującej atrofii mięśniowej istotnie statystycznie towarzyszy wzrost liczby rozszczepionych włókien mięśniowych ($r=0,36$, $P\leq 0,01$) i spadek unaczynienia (kapilaryzacji) mięśni ($r=-0,30$, $P\leq 0,05$). Bardzo często procesy atrofii mięśniowej inicjowane są przez upośledzenie ich unaczynienia, co potwierdzili Madej i Rotkiewicz [2011]. Jednocześnie wykazano, że wzrostowi liczby rozszczepionych włókien mięśniowych towarzyszy istotny statystycznie wzrost liczby komórek mięśniowych o zmienionym kształcie ($r=0,39$, $P\leq 0,01$). Wykazano także, że większa liczba komórek o zmienionym kształcie koreluje istotnie ze spadkiem ilości tkanki łącznej w mięśniach badanych psów ($r=-0,35$, $P\leq 0,01$). Toczące się w mięśniach procesy patologiczne często współistnieją obok siebie jako efekt działania czynników uszkadzających mięśnie, jak np. urazy, a także choroby ogólnoustrojowe, jakie często występują u psów w starszym wieku. Szczególnie te ostatnie, mają duży wpływ na rozległość zmian patologicznych w mięśniach starych psów, co należy brać pod uwagę interpretując wyniki badań własnych. Dlatego tak ważne jest, aby dobrać jak najbardziej jednorodną grupę badawczą nie tylko pod względem płci, wieku czy rasy psów, ale także chorób współistniejących. Niestety, tak jak w tym doświadczeniu, trudno dokonać tego w przypadku geriatrycznych psów, co może mieć wpływ na wyniki badań.

Tabela 14. Współczynniki korelacji (R_{xy}) pomiędzy wartościami wskaźników morfologicznych i biochemicznych krwi a cechami mikrostruktury mięśnia dwugłowego ramienia (*m. biceps brachii*) i czworogłowego uda (*m. quadriceps femoris*) u psów

Cecha	Ogólna liczba włókien	Udział włókien FG	Udział włókien FO	Średnica włókien FG (μm)	Średnica włókien FO (μm)	Udział tłuszczu Śródmięśniowego
WBC G/L	0,35	0,19	0,41*	-0,14	-0,17	0,10
NEU G/L	0,30	0,11	0,38*	0,02	-0,02	0,05
LYM G/L	-0,03	0,03	-0,07	0,06	0,21	-0,04
MONO G/L	-0,14	-0,01	-0,21	0,09	-0,01	0,12
EOS G/L	-0,15	-0,07	-0,18	-0,22	-0,21	-0,13
BASO G/L	-0,01	-0,06	0,02	0,24	0,09	-0,02
RBC T/L	-0,22	-0,23	-0,17	0,23	0,12	0,02
HGB G/L	-0,06	-0,04	-0,07	0,18	0,00	-0,20
HCT L/L	-0,20	-0,23	-0,14	0,34	0,24	0,02
PLT G/L	-0,18	-0,17	-0,16	0,06	0,02	-0,31
ALBUMINY G/L	-0,09	-0,14	-0,05	0,11	0,04	-0,05
ALT U/L	-0,17	-0,12	-0,17	0,16	0,17	-0,03
ALFA-AMYLAZA U/L	0,25	0,25	0,21	-0,18	-0,08	-0,21
AP U/L	0,14	0,12	0,12	0,10	0,09	-0,35
AST U/L	0,00	0,03	-0,03	0,11	0,19	0,04
BIAŁKO CAŁKOWITE G/L	-0,29	-0,21	-0,30	0,26	0,11	-0,01
BILIRUBINA CAKOWITA UMOL/L	-0,14	-0,13	-0,13	0,19	0,21	-0,03
CHOLESTEROL MMOL/L	0,12	0,06	0,14	-0,03	-0,08	0,13
CK-KINAZA KREATYNOWA U/L	0,34	0,35	0,28	-0,19	-0,19	-0,36*
FRUKTOZAMINA UMOL/L	0,27	0,13	0,32	0,14	0,10	0,13
GLDH U/L	-0,10	-0,04	-0,13	0,05	-0,01	-0,10
GLUKOZA MMOL/L	-0,15	-0,08	-0,17	0,16	0,12	0,42*
GGTP U/L	-0,09	-0,08	-0,07	0,18	0,14	-0,11
KREATYNINA UMOL/L	0,17	0,16	0,16	0,00	0,08	-0,03
LDH U/L	0,09	-0,18	0,26	0,08	-0,07	0,06
LIPAZA U/L	0,29	0,02	0,44*	0,42*	0,47**	0,24
MOCZNIK MMOL/L	0,08	0,08	0,06	-0,03	0,05	-0,11

cd. tabeli 14.

TRÓJGLICERYDY MMOL/L	-0,24	-0,23	-0,20	0,21	0,14	0,23
STOSUNEK ALBUMINY/GLO- BULINY G/L	0,00	-0,03	0,03	0,04	-0,01	0,19
GLOBULINY G/L	0,16	0,08	0,19	-0,08	-0,08	-0,30
CHLORKI MMOL/L	-0,35	-0,05	-0,51**	-0,44*	-0,32	0,22
FOSFOR NIEORGANICZNY MMOL/L	0,06	0,09	0,03	-0,16	-0,08	-0,05
MAGNEZ MMOL/L	0,04	-0,14	0,15	0,19	0,14	-0,17
POTAS MMOL/L	-0,18	-0,12	-0,20	0,00	0,02	-0,11
SÓD MMOL/L	0,01	-0,07	0,07	0,08	0,05	-0,08
WAPŃ MMOL/L	0,15	-0,11	0,31	0,28	0,29	-0,26
T4 CAŁKOWITE UG/DL	-0,35	-0,19	-0,42*	-0,22	-0,11	-0,05

Współczynniki korelacji istotne przy: * – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$

Tabela 15. Współczynniki determinacji (R_{xy}^2) pomiędzy wartościami wskaźników morfologicznych i biochemicznych krwi a cechami mikrostruktury mięśnia dwugłowego ramienia (*m. biceps brachii*) i czworogłowego uda (*m. quadriceps femoris*) u psów

Cecha	Ogólna liczba włókien	Udział włókien FG	Udział włókien FO	Średnica włókien FG (μm)	Średnica włókien FO (μm)	Udział tłuszczu śródmięśniowego
WBC G/L	0,12	0,03	0,17*	0,02	0,03	0,01
NEU G/L	0,09	0,01	0,14*	0,00	0,00	0,00
LYM G/L	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00
MONO G/L	0,02	0,00	0,04	0,01	0,00	0,01
EOS G/L	0,02	0,01	0,03	0,05	0,05	0,02
BASO G/L	0,00	0,00	0,00	0,06	0,01	0,00
RBC T/L	0,05	0,06	0,03	0,05	0,02	0,00
HGB G/L	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,04
HCT L/L	0,04	0,05	0,02	0,12	0,06	0,00
PLT G/L	0,03	0,03	0,02	0,00	0,00	0,10
ALBUMINY G/L	0,01	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00
ALT U/L	0,03	0,02	0,03	0,03	0,03	0,00
ALFA-AMYLAZA U/L	0,06	0,06	0,04	0,03	0,01	0,05
AP U/L	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,12
AST U/L	0,00	0,00	0,00	0,01	0,04	0,00

cd. tabeli 15.

BIAŁKO CAŁKOWITE G/L	0,09	0,05	0,09	0,07	0,01	0,00
BILIRUBINA CAKOWITA UMOL/L	0,02	0,02	0,02	0,04	0,04	0,00
CHOLESTEROL MMOL/L	0,01	0,00	0,02	0,00	0,01	0,02
CK-KINAZA KREATYNOWA U/L	0,12	0,12	0,08	0,04	0,03	0,13*
FRUKTOZAMINA UMOL/L	0,07	0,02	0,10	0,02	0,01	0,02
GLDH U/L	0,01	0,00	0,02	0,00	0,00	0,01
GLUKOZA MMOL/L	0,02	0,01	0,03	0,03	0,01	0,18*
GGTP U/L	0,01	0,01	0,01	0,03	0,02	0,01
KREATYNINA UMOL/L	0,03	0,02	0,02	0,00	0,01	0,00
LDH U/L	0,01	0,03	0,07	0,01	0,00	0,00
LIPAZA U/L	0,09	0,00	0,19*	0,18*	0,22**	0,06
MOCZNIK MMOL/L	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01
TRÓJGLICERYDY MMOL/L	0,06	0,05	0,04	0,04	0,02	0,05
STOSUNEK ALBUMINY/GLO- BULINY G/L	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04
GLOBULINY G/L	0,02	0,01	0,03	0,01	0,01	0,09
CHLORKI MMOL/L	0,12	0,00	0,26**	0,19*	0,10	0,05
FOSFOR NIEORGANICZNY MMOL/L	0,00	0,01	0,00	0,02	0,01	0,00
MAGNEZ MMOL/L	0,00	0,02	0,02	0,03	0,02	0,03
POTAS MMOL/L	0,03	0,01	0,04	0,00	0,00	0,01
SÓD MMOL/L	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01
WAPŃ MMOL/L	0,02	0,01	0,10	0,08	0,09	0,07
T4 CAŁKOWITE UG/DL	0,13	0,03	0,17*	0,05	0,01	0,00

Współczynniki determinacji istotne przy: * – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$

W tabeli 14. i 15. zestawiono współczynniki korelacji (R_{xy}) i determinacji (R_{xy}^2), pomiędzy wartościami wskaźników morfologicznych i biochemicznych krwi, a cechami mikrostruktury mięśnia dwugłowego ramienia (*m. biceps brachii*) i czworogłowego uda (*m. quadriceps femoris*). Zaslужująca na uwagę

zależność wskazuje, że wraz ze wzrostem ilości śródmięśniowej tkanki tłuszczowej istotnie statystycznie wzrasta poziom glukozy ($r=0,42$, $P \leq 0,05$) przy stopniu determinacji 18%. Wynik ten potwierdza fakt, że otyłość to jeden z podstawowych czynników prowadzących do hiperglikemii, a w konsekwencji także do cukrzycy, zarówno u ludzi, jak i u zwierząt. Otyłość definiuje się jako nagromadzenie nadmiernej ilości tkanki tłuszczowej w tkankach ciała, w tym także tkance mięśniowej. Dostępne źródła podają, że ponad 30% populacji psów obciążonych jest otyłością, a zjawisko to ma tendencje wzrostową. Podstawową przyczyną takiego stanu jest głównie przekarmianie zwierząt, które wynika ze złego dawkowania gotowych karm przy jednoczesnym stosowaniu domowego żywienia. Innymi przyczynami otyłości mogą być choroby, takie jak nadczynność kory nadnerczy czy niedoczynność tarczycy. Otyłość wiąże się z poważnymi zmianami metabolicznymi i hormonalnymi w organizmie. Może predysponować między innymi do choroby zwyrodnieniowej stawów, niewydolności oddechowej i krążeniowej, nietolerancji glukozy i cukrzycy, nadciśnienia, tendencji do hipertermii, a także zwiększa ryzyko wystąpienia niektórych typów nowotworów [Fettman i wsp., 1997; German, 2006; Zoran, 2010].

Tabela 16. Współczynniki korelacji (R_{xy}) pomiędzy wartościami wskaźników morfologicznych i biochemicznych krwi a włóknami prawidłowymi i zmianami patologicznymi mięśnia dwugłowego ramienia (*m. biceps brachii*) i czworogłowego uda (*m. quadriceps femoris*) psów

Cecha	Liczba włókien prawidłowych	Zmiana kształtu	Martwica włókien	<i>Splitting</i>	Włókna olbrzymie	Tkanka łączna
WBC G/L	0,19	-0,02	0,84**	0,03	0,28	0,36*
NEU G/L	-0,11	0,21	0,77**	0,15	0,06	0,29
LYM G/L	0,23	0,22	-0,17	0,13	0,20	-0,01
MONO G/L	-0,09	0,17	-0,28	0,14	0,05	0,06
EOS G/L	0,00	0,00	-0,04	-0,21	-0,07	0,30
BASO G/L	-0,10	0,09	-0,06	0,39*	0,09	0,36*
RBC T/L	-0,36*	-0,25	-0,16	0,01	-0,33	-0,11
HGB G/L	-0,25	-0,05	0,01	0,05	-0,09	0,08
HCT L/L	-0,43*	-0,25	-0,07	-0,01	-0,35	-0,05
PLT G/L	-0,10	-0,39*	0,09	-0,19	0,05	0,23
ALBUMINY G/L	-0,27	-0,22	0,30	-0,07	-0,29	0,06
ALT U/L	-0,17	-0,15	-0,04	-0,10	-0,03	0,12
ALFA-AMYLAZA U/L	0,40*	0,07	0,29	0,09	0,34	-0,03
AP U/L	0,06	0,60**	-0,05	0,32	0,03	-0,06
AST U/L	-0,05	0,26	0,00	0,05	-0,14	-0,15
BIAŁKO CAŁKOWITE G/L	-0,23	-0,19	-0,11	0,05	-0,14	0,07

cd. tabeli 16.

BILIRUBINA CAKOWITA UMOL/L	-0,21	0,07	-0,01	0,04	-0,22	-0,14
CHOLESTEROL MMOL/L	-0,09	0,13	-0,03	0,02	-0,07	-0,06
CK-KINAZA KREATYNOWA U/L	0,42*	0,09	0,13	-0,12	0,39*	0,06
FRUKTOZAMINA UMOL/L	-0,22	-0,14	0,03	-0,16	0,06	0,14
GLDH U/L	-0,14	-0,09	0,00	-0,01	0,15	0,34
GLUKOZA MMOL/L	-0,05	-0,07	-0,04	-0,06	-0,15	-0,09
GGTP U/L	-0,08	0,02	-0,06	0,02	-0,02	0,01
KREATYNINA UMOL/L	-0,16	-0,02	0,02	0,11	-0,09	-0,15
LDH U/L	0,03	-0,05	0,36*	0,11	0,01	0,04
LIPAZA U/L	-0,17	-0,04	0,50**	0,22	0,14	0,21
MOCZNIK MMOL/L	-0,08	0,00	-0,04	0,17	-0,10	-0,17
TRÓJGLICERYDY MMOL/L	-0,10	-0,22	-0,07	-0,19	-0,14	0,24
STOSUNEK ALBUMINY/GLOBU LINY G/L	-0,12	-0,02	0,17	-0,09	-0,13	0,06
GLOBULINY G/L	0,18	-0,10	-0,20	-0,10	0,07	-0,20
CHLORKI MMOL/L	0,44*	0,09	-0,37*	-0,13	0,30	-0,08
FOSFOR NIEORGANICZNY MMOL/L	0,04	0,05	-0,01	0,16	-0,06	-0,12
MAGNEZ MMOL/L	-0,08	0,10	0,36*	0,03	-0,32	-0,09
POTAS MMOL/L	-0,16	-0,11	-0,02	0,09	-0,19	-0,05
SÓD MMOL/L	-0,14	-0,12	-0,02	-0,11	-0,10	0,07
WAPŃ MMOL/L	-0,20	-0,02	0,14	0,08	-0,36*	-0,23
T4 CAŁKOWITE UG/DL	0,20	0,06	-0,19	0,02	0,15	-0,07

Współczynniki korelacji istotne przy: * – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$

Tabela 17. Współczynniki determinacji (R_{xy}^2) pomiędzy wartościami wskaźników morfologicznych i biochemicznych krwi a włóknami prawidłowymi i zmianami patologicznymi mięśnia dwugłowego ramienia (*m. biceps brachii*) i czworogłowego uda (*m. quadriceps femoris*) psów

Cecha	Liczba włókien prawidłowych	Zmiana kształtu	Martwica włókien	<i>Splitting</i>	Włókna olbrzymie	Tkanka łączna
WBC G/L	0,04	0,00	0,70**	0,00	0,08	0,13*
NEU G/L	0,01	0,05	0,59**	0,02	0,00	0,09
LYM G/L	0,05	0,05	0,03	0,02	0,04	0,00
MONO G/L	0,01	0,03	0,08	0,02	0,00	0,00

cd. tabeli 17.

EOS G/L	0,00	0,00	0,00	0,04	0,01	0,09
BASO G/L	0,01	0,01	0,00	0,15*	0,01	0,13*
RBC T/L	0,13*	0,06	0,02	0,00	0,11	0,01
HGB G/L	0,06	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01
HCT L/L	0,18*	0,06	0,00	0,00	0,12	0,00
PLT G/L	0,01	0,15*	0,01	0,04	0,00	0,05
ALBUMINY G/L	0,07	0,05	0,09	0,00	0,08	0,00
ALT U/L	0,03	0,02	0,00	0,01	0,00	0,01
ALFA-AMYLAZA U/L	0,16*	0,00	0,08	0,01	0,11	0,00
AP U/L	0,00	0,36**	0,00	0,10	0,00	0,00
AST U/L	0,00	0,07	0,00	0,00	0,02	0,02
BIAŁKO CAŁKOWITE G/L	0,05	0,03	0,01	0,00	0,02	0,00
BILIRUBINA CAKOWITA UMOL/L	0,04	0,00	0,00	0,00	0,05	0,02
CHOLESTEROL MMOL/L	0,01	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00
CK-KINAZA KREATYNOWA U/L	0,18*	0,01	0,02	0,01	0,15*	0,00
FRUKTOZAMINA UMOL/L	0,05	0,02	0,00	0,03	0,00	0,02
GLDH U/L	0,02	0,01	0,00	0,00	0,02	0,11
GLUKOZA MMOL/L	0,00	0,01	0,00	0,00	0,02	0,01
GGTP U/L	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
KREATYNINA UMOL/L	0,02	0,00	0,00	0,01	0,01	0,02
LDH U/L	0,00	0,00	0,13*	0,01	0,00	0,00
LIPAZA U/L	0,03	0,00	0,25**	0,05	0,02	0,04
MOCZNIK MMOL/L	0,01	0,00	0,00	0,03	0,01	0,03
TRÓJGLICERYDY MMOL/L	0,01	0,05	0,00	0,04	0,02	0,06
STOSUNEK ALBUMINY/GLOBU LINY G/L	0,01	0,00	0,03	0,01	0,02	0,00
GLOBULINY G/L	0,03	0,01	0,04	0,01	0,00	0,04
CHLORKI MMOL/L	0,19*	0,01	0,14*	0,02	0,09	0,01
FOSFOR NIEORGANICZNY MMOL/L	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01
MAGNEZ MMOL/L	0,01	0,01	0,13*	0,00	0,10	0,01
POTAS MMOL/L	0,02	0,01	0,00	0,01	0,03	0,00
SÓD MMOL/L	0,02	0,01	0,00	0,01	0,01	0,00

cd. tabeli 17.

WAPŃ MMOL/L	0,04	0,00	0,02	0,01	0,13*	0,05
T4 CAŁKOWITE UG/DL	0,04	0,00	0,04	0,00	0,02	0,00

Współczynniki determinacji istotne przy: * – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$

W tabeli 16. i 17. zestawiono współczynniki korelacji (R_{xy}) i determinacji (R_{xy}^2) pomiędzy wartościami parametrów morfologicznych i biochemicznych krwi a liczbą włókien prawidłowych i zmianami patologicznymi w mięśni dwugłowym ramienia (*m. biceps brachii*) i czworogłowym uda (*m. quadriceps femoris*) psów. W analizie wzajemnych korelacji stwierdzono, że wraz ze wzrostem liczby komórek o zmienionym kształcie istotnie statystycznie rośnie we krwi poziom fosfatazy zasadowej AP ($r=0,60$, $P \leq 0,01$), co jest determinowane w 36%. Fosfataza zasadowa występuje w postaci 3 izoenzymów – jelitowego, kostnego i wątrobowego. Wzrost jej aktywności towarzyszy między innymi chorobom wątroby i kości, w tym nowotworom kości, ale także pojawia się po leczeniu glikokortykosteroidami i hiperadrenokortycyzmie u psów [Winnicka, 2015]. Nadmiar glikokortykoidów u psów prowadzi m.in. do wielu zmian patologicznych w obrębie tkanki mięśniowej, w tym atrofii mięśni i nadmiernego otłuszczenia mięśni, którym często towarzyszy wzrost liczby komórek o zmienionym kształcie, co tłumaczyłoby w tym przypadku wzrost poziomu ALP.

Wykazano także, że wzrostowi liczby komórek mięśniowych uległych martwicy towarzyszy podwyższony poziom krwinek białych WBC ($r=0,84$, $P \leq 0,01$) i neutrofilii ($r=0,77$, $P \leq 0,01$) we krwi przy jednocześnie wysokich współczynnikach determinacji, wynoszących odpowiednio 70% i 59%. Wzrost poziomu leukocytów powinien być zawsze analizowany wraz ze zmianami ilościowymi poszczególnych rodzajów krwinek białych. W przeprowadzonym doświadczeniu wzrostowi całkowitej liczby białych krwinek, towarzyszyło podwyższenie poziomu neutrofilii, czyli granulocytów obojętnochłonnych. Jak podaje Winnicka [2015], taka zmiana obrazu morfologicznego może pojawiać się między innymi w ostrych i przewlekłych stanach zapalnych, stresie fizycznym (np. po znacznym wysiłku), zatruciach, leczeniu glikokortykosteroidami i w niektórych chorobach nowotworowych. Stanom tym może towarzyszyć uszkodzenie tkanki mięśniowej i wzrost odsetka komórek martwiczych.

Analizując uzyskane dane, stwierdzono także, że większa liczba obumarłych komórek mięśniowych koreluje istotnie statystycznie ze zwiększonym poziomem dehydrogenazy mleczanowej LDH ($r=0,36$, $P \leq 0,05$) we krwi badanych psów. Dehydrogenaza mleczanowa (LDH) jest enzymem obecnym prawie we wszystkich tkankach organizmu, ale w prawidłowych warunkach tylko niewielkie poziomy są wykrywane we krwi. Wynika to z faktu, że LDH fizjologicznie pozostaje wewnątrz komórek organizmu, a jej poziom wzrasta tylko podczas ich uszkodzenia lub rozpadu. W związku z tym LDH jest ważnym wskaźnikiem uszkodzenia komórek. Dehydrogenaza mleczanowa jest

katalizatorem przemiany mleczanu do pirogronianu (w obecności NAD⁺) oraz reakcji odwrotnej: przemiany pirogronianu do mleczanu (w obecności NADH). Największą aktywność LDH wykazuje w komórkach o intensywnym metabolizmie energetycznym, w tym także w mięśniach szkieletowych i w mięśniu sercowym różnych gatunków zwierząt [Milne i wsp., 1987]. Całkowita aktywność LDH jest sumą aktywności pięciu różnych izoenzymów (różne formy molekularne LDH). Całkowita aktywność LDH może świadczyć o uszkodzeniu tkanek, ale jest wskaźnikiem nieswoistym i nie może być wykorzystana do określenia przyczyny albo lokalizacji uszkodzenia. Każdy z pięciu izoenzymów jest związany do pewnego stopnia z określoną lokalizacją tkankową (choć lokalizacje różnych izoenzymów nieco się na siebie nakładają). Swoistymi dla tkanki mięśniowej izoenzymami są LDH₄ i LDH₅. Ponieważ w niniejszym doświadczeniu odnotowano wzrost całkowitego poziomu LDH, bez podziału na izoenzymy, można tylko przypuszczać, że zmiana ta związana była m.in. z uszkodzeniem tkanki mięśniowej, w tym także martwicą komórek mięśniowych. W badaniach przeprowadzonych przez Procajło [2006], mających na celu wykazanie wartości diagnostycznej takich markerów jak: aminotransferaza asparaginianowa (AST), kinaza kreatynowa (CK), dehydrogenaza mleczanowa (LDH) i jej izoenzymy, białko C-reaktywne (CRP), glukoza i kwas mlekowy w wykrywaniu stanów subklinicznych uszkodzeń mięśni szkieletowych stwierdzono, że wzrost aktywności AST, CK i LDH₅ u psów obciążonych treningiem świadczył o uszkodzeniu tkanki mięśniowej. Wykazano także, że brak dostosowania intensywności treningu i obciążenia do wydolności organizmu powodowało wzrost stężenia glukozy i kwasu mlekowego w osoczu psów zaprzęgowych. U niektórych badanych psów odnotowano ponadto wzrost stężenia białka C-reaktywnego - CRP, co może świadczyć o stanach zapalnych mięśni lub wiązać się ze stresem powysiłkowym. Brak fizycznej adaptacji do intensywności treningu może skutkować zwiększoną urazowością mięśni, a pomiary markerów uszkodzenia mięśni ułatwiają rozpoznanie takiego stanu, co ma szczególne znaczenie u starszych psów.

Dalsza analiza wyników wykazała, że istotnemu statystycznie wzrostowi liczby komórek olbrzymich w mięśniach towarzyszył wzrost poziomu kinazy kreatynowej CK ($r=0,39$, $P\leq 0,05$). Kinaza kreatynowa (CK) inaczej zwana fosfokinazą kreatynową (CPK) to enzym, który aktywnie uczestniczy w procesach przemian energetycznych zachodzących w komórce. Katalizuje odwracalną reakcję przenoszenia grupy fosforanowej z fosfokreatyny na ADP, regenerując ATP, albo z ATP na kreatynę, odbudowując zapasy fosfokreatyny. Jest enzymem kluczowym w bioenergetyce komórki, odgrywając ważną rolę w homeostazie komórkowego ATP także w mięśniach, które podczas skurczów zużywają duże ilości energii. U psów, podobnie jak u większości ssaków, istnieją dwa podtypy tego enzymu: M – mięśniowy (muscle) i B - mózgowy (brain). Ponadto wyróżnia się trzy izoenzymy CK, które są dimerami: CK-MM, CK-BB i CK-MB. Kolejne izoenzymy będące oktamerami (CK-MiMi) zostały wyizolowane w mitochondriach. Zarówno u ludzi jak i u psów CK jest głównie

zlokalizowana w mięśniach szkieletowych i mięśniu sercowym [Aktas i wsp., 1993]. Co ciekawe, aktywność CK jest uzależniona m.in. od rasy zwierząt. Wykazano, że aktywność CK w mięśniu półbłoniastym i mięśniu pośladkowym u psów rasy greyhound jest znacząco większa niż u mieszzańców [Guy i Snow, 1981]. Wynika to prawdopodobnie ze specyfiki rasy jako psa sportowego, o silnie rozbudowanej strukturze i masie mięśniowej. Wykazano także, że aktywność CK jest większa we włóknach typu IIA - oksydacyjno-glikolitycznych niż we włóknach typu I - oksydacyjnych [Lindena i wsp., 1982]. Podczas badań na psach stwierdzono także, że dystrybucja poszczególnych izoenzymów CK, w tym głównie CK- MB, różni się w porównaniu od człowieka. Izoenzym CK – MM znajduje się głównie w mięśniach szkieletowych i sercu, podczas gdy CK-MB stosunkowo w niewielkim stopniu w mięśniu sercowym, a dziesięciokrotnie wyższym w innych tkankach, takich jak: jelita, płuca czy nerki [Aktas i wsp., 1993]. Oznaczanie aktywności CK jest najbardziej specyficznym i czułym testem służącym do ujawnienia patologii mięśni. Do podwyższenia aktywności tego enzymu w surowicy krwi może dojść nie tylko wskutek uszkodzenia komórki, ale także w następstwie zmiany przepuszczalności błony komórkowej. Wszystkie procesy, które prowadzą do zaburzeń w przemianach metabolicznych, dając w efekcie nawet niewielki deficyt energetyczny, mogą zwiększać przepuszczalność błon komórkowych i powodować przenikanie enzymu do surowicy krwi [Rogulski i Spooner, 1996]. Po uwolnieniu z komórek CK dociera do osocza głównie drogą limfatyczną i jest szybko z niego usuwana z okresem półtrwania około 2 godzin.

Tabela 18. Współczynniki korelacji (R_{xy}) pomiędzy wartościami wskaźników morfologicznych i biochemicznych krwi a mikrounaczynieniem (kapilaryzacją) mięśnia dwugłowego ramienia (*m. biceps brachii*) i czworogłowego uda (*m. quadriceps femoris*) psów

Cecha	Kapilaryzacja	Cecha	Kapilaryzacja
WBC G/L	-0,33	GGTP U/L	-0,12
NEU G/L	-0,30	KREATYNINA UMOL/L	-0,20
LYM G/L	-0,26	LDH U/L	-0,39*
MONO G/L	0,29	LIPAZA U/L	-0,28
EOS G/L	0,02	MOCZNIK MMOL/L	-0,12
BASO G/L	-0,13	TRÓJGLICERYDY MMOL/L	0,11
RBC T/L	0,47**	STOSUNEK ALB/GLOB G/L	-0,05
HGB G/L	0,29	GLOBULINY G/L	0,21
HCT L/L	0,30	CHLORKI MMOL/L	-0,06

cd. tabeli 18.

PLT G/L	0,13	FOSFOR NIEORGANICZNY MMOL/L	0,01
ALBUMINY G/L	0,12	MAGNEZ MMOL/L	-0,25
ALT U/L	0,02	POTAS MMOL/L	0,22
ALFA-AMYLAZA U/L	-0,39*	SÓD MMOL/L	-0,21
AP U/L	-0,27	WAPŃ MMOL/L	-0,02
AST U/L	-0,21	T4 CAŁKOWITE UG/DL	0,15
BIAŁKO CAŁKOWITE G/L	0,29		
BILIRUBINA CAŁKOWITA UMOL/L	-0,09		
CHOLESTEROL MMOL/L	-0,12		
CK-KINAZA KREATYNOWA U/L	-0,42*		
FRUKTOZAMINA UMOL/L	-0,17		
GLDH U/L	0,15		
GLUKOZA MMOL/L	0,19		

Współczynniki korelacji istotne przy: * – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$

Tabela 19. Współczynniki determinacji (R_{xy}^2) pomiędzy wartościami wskaźników morfologicznych i biochemicznych krwi a mikrounaczynieniem (kapilaryzacją) mięśnia dwugłowego ramienia (*m. biceps brachii*) i czworogłowego uda (*m. quadriceps femoris*) psów

Cecha	Kapilaryzacja	Cecha	Kapilaryzacja
WBC G/L	0,11	GGTP U/L	0,01
NEU G/L	0,09	KREATYNINA UMOL/L	0,04
LYM G/L	0,07	LDH U/L	0,15*
MONO G/L	0,08	LIPAZA U/L	0,08
EOS G/L	0,00	MOCZNIK MMOL/L	0,02
BASO G/L	0,02	TRÓJGLICERYDY MMOL/L	0,01
RBC T/L	0,22**	STOSUNEK ALB/GLOB G/L	0,00
HGB G/L	0,09	GLOBULINY G/L	0,04
HCT L/L	0,09	CHLORKI MMOL/L	0,00

cd. tabeli 19.

PLT G/L	0,02	FOSFOR NIEORGANICZNY MMOL/L	0,00
ALBUMINY G/L	0,01	MAGNEZ MMOL/L	0,06
ALT U/L	0,00	POTAS MMOL/L	0,05
ALFA-AMYLAZA U/L	0,15*	SÓD MMOL/L	0,04
AP U/L	0,07	WAPŃ MMOL/L	0,00
AST U/L	0,04	T4 CAŁKOWITE UG/DL	0,02
BIAŁKO CAŁKOWITE G/L	0,08		
BILIRUBINA CAŁKOWITA UMOL/L	0,01		
CHOLESTEROL MMOL/L	0,01		
CK-KINAZA KREATYNOWA U/L	0,18*		
FRUKTOZAMINA UMOL/L	0,03		
GLDH U/L	0,02		
GLUKOZA MMOL/L	0,04		

Współczynniki determinacji istotne przy: * – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$

W tabelach 18. i 19. przedstawiono współczynniki korelacji (R_{xy}) i determinacji (R_{xy}^2) między wartościami wskaźników morfologicznych i biochemicznych krwi, a mikrounaczynieniem (kapilaryzacją) mięśnia dwugłowego ramienia (*m. biceps brachii*) i czworogłowego uda (*m. quadriceps femoris*) psów. Analizując wzajemne zależności, stwierdzono, że wzrostowi mikrounaczynienia towarzyszy wysoce istotny statystycznie spadek poziomu kinazy kreatynowej CK ($r = -0,42$, $P \leq 0,05$) i dehydrogenazy mleczanowej LDH ($r = -0,39$, $P \leq 0,05$) we krwi. Wzrost mikrounaczynienia mięśni świadczy między innymi o nasilonych procesach odbudowy i regeneracji komórek mięśniowych po ich uszkodzeniu. Nawiązując do wcześniej opisanych informacji, gdzie podkreślono, że zarówno wzrost LDH, jak i CK związany jest między innymi z uszkodzeniem komórek, w tym przede wszystkim mięśniowych, to spadek poziomu tych enzymów będzie charakterystyczny dla późniejszych procesów regeneracyjnych mięśni. Wykazano również, że wzrostowi unaczynienia towarzyszy wysoce istotny statycznie wzrost ilości krwinek czerwonych RBC we krwi ($r = 0,47$, $P \leq 0,05$). Wynik ten jest potwierdzeniem ostatnich doniesień wskazujących, że krwinki czerwone (RBC) i komórki śródbłonna naczyniowego (EC), a nie jak wcześniej sądzono płytki krwi, mogą być głównym źródłem sfingozyno-1-fosforanu (S1P) [Jessup, 2006]. Sfingolipidy, do których zaliczamy m.in. S1P, stanowią grupę związków lipidowych występujących we wszystkich

komórkach eukariotycznych i wielu prokariotycznych. S1P powstaje w wyniku fosforylacji sfingozyny, a jego rolą jest stymulacja migracji komórek śródbłonna naczyniowego, a także dojrzewania nowo powstałych naczyń i formowania bariery naczyniowej [Xiong i Hla, 2014, Peters i Alewijnse, 2007]. Z tego powodu, podczas regeneracji tkanki mięśniowej dochodzi do nasilonych procesów jej kapilaryzacji, czemu towarzyszy wzrost ilości krwinek czerwonych, będących ważnym źródłem czynnika S1P.

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Rozwój współczesnej medycyny weterynaryjnej jak i świadomości opiekunów dotyczącej dobrostanu zwierząt towarzyszących spowodował, że średnia długość życia psów w ostatnich latach znacząco wzrosła. W związku z tym, geriatria psów to jedna z prężniej rozwijających się specjalizacji weterynaryjnych w Polsce i na świecie. Od wielu lat prowadzone są bardzo liczne badania nad mechanizmami starzenia się u ludzi, co pozwoliło na bardzo dokładne poznanie tych procesów. Nowe potrzeby spowodowały, że pojawiają się coraz liczniejsze publikacje dotyczące zmian starczych u psów, w tym również w układzie ruchowym. Oprócz wydolności narządów wewnętrznych, prawidłowa sprawność fizyczna psów to także bardzo ważny element ich funkcjonowania w środowisku domowym, a przede wszystkim możliwość komfortowego, pozbawionego bólu życia. Poważne ograniczenia wydolności ruchowej geriatrycznych psów, szczególnie ras dużych i olbrzymich to jedna z częstych przyczyn ich eutanazji. Procesy starzenia się mięśni psów w większości aspektów w niewielkim stopniu różnią się od zmian zachodzących wraz z wiekiem w tkance mięśniowej u ludzi.

Przeprowadzona analiza pobranych próbek mięśni psów - dwugłowego ramienia i czworogłowego uda za pomocą badań histologicznych i immunohistochemicznych pozwoliła ocenić wpływ starzenia na mikrostrukturę mięśni szkieletowych tych zwierząt. Badania zostały uzupełnione o analizę morfologiczną i biochemiczną ich krwi. Uzyskane wyniki potwierdziły, że zmianom starczym u psów, podobnie jak u ludzi, towarzyszy stopniowa degeneracja włókien mięśniowych, wzrost udziału zmian histopatologicznych, w tym atrofii oraz upośledzenie stopnia waskularyzacji i zdolności regeneracyjnych. Klinicznym efektem opisywanych zmian patologicznych w mięśniach jest pogarszająca się sprawność ruchowa starzejących się psów, wpływająca znacząco na ich dobrostan. Dalsze badania biomechanizmu starzenia się mięśni na poziomie komórkowym z wykorzystaniem nowoczesnych metod badawczych, w tym genetycznych, mogą pozwolić w przyszłości wprowadzić nowe, jeszcze skuteczniejsze metody opóźniające zmiany degeneracyjne w tkance mięśniowej starzejących się psów. Z dużym prawdopodobieństwem oparte one będą na wykorzystaniu zarówno metod farmakologicznych, jak i fizjoterapeutycznych czy dietetycznych. Indywidualnie dobrane programy opóźniające efekty starzenia się psów, podobnie jak ma to miejsce w medycynie ludzkiej, będą ważnym elementem opieki weterynaryjnej i zoofizjoterapeutycznej. Z całą pewnością dotyczyć będą między innymi, optymalizacji aktywności ruchowej starszych psów, ich prawidłowego żywienia, w konsekwencji zapobieganiu otyłości zwierząt towarzyszących, co aktualnie stanowi bardzo poważny problem.

Analiza wyników przeprowadzonych badań pozwoliła na sformułowanie następujących wniosków:

1. Wraz z wiekiem psów nie stwierdzono zmian w udziałach procentowych poszczególnych typów włókien mięśniowych w badanych mięśniach. Obserwowana tendencja do zwiększenia odsetka włókien oksydacyjnych, szczególnie w przypadku mięśnia *biceps brachii*, może wskazywać na to, że zdolność oksydacyjna mięśni szkieletowych nie uległa spadkowi wraz z wiekiem.
2. W obu badanych mięśniach największą liczbę kapilar stwierdzono w grupie psów od 1 roku do 5 lat i różniła się ona istotnie z grupą psów najmłodszych (do 1 roku) oraz najstarszych (powyżej 10 lat). Taki wynik świadczyć może o dopiero rozpoczętym procesie angiogenezy w młodym wieku zwierząt lub zmniejszeniu mikrounacznienia w wieku starszym.
3. Największą liczbę prawidłowo zbudowanych włókien mięśniowych oraz najmniejszy odsetek zmian patologicznych w mięśniu *BB* i *QF* stwierdzono w grupie psów najmłodszych. Wraz z procesem starzenia mięśni następowało zwiększenie udziału włókien atroficznych oraz tkanki łącznej, której przerost bardzo rozległy obserwowano tylko u psów powyżej 5 lat i geriatrycznych.
4. Nie stwierdzono różnic w liczbie komórek satelitarnych między badanymi grupami psów, obserwowano jedynie tendencję spadkową liczby komórek Pax 7-pozytywnych wraz z wiekiem, aczkolwiek proces ten jest uzależniony od wielu czynników osobniczych, w tym także chorobowych.
5. Starzejące się mięśnie psów, w związku ze spadkiem stopnia unaczynienia oraz liczby komórek satelitarnych, wykazują mniejszy potencjał regeneracyjny, a tym samym tendencję do zwiększania się liczby zmian patologicznych. Należy podkreślić, że rodzaj oraz stopień nasilenia zmian patologicznych i degeneracyjnych w tkance mięśniowej u starzejących się psów w dużym stopniu zależy zarówno od ich dobrostanu, jak i współistniejących chorób narządowych.
6. Na podstawie uzyskanych korelacji stwierdzono, że:
 - a) wzrostowi kapilaryzacji mięśni towarzyszy znaczący wzrost liczby krwinek czerwonych we krwi. Jest to prawdopodobnie związane z faktem, że to krwinki czerwone są głównym źródłem sfingozyno-1-fosforanu (S1P) stymulującego migrację komórek śródbłonna naczyniowego, a także dojrzewanie nowo powstałych naczyń i formowanie bariery naczyniowej,
 - b) wraz z wiekiem psów wzrasta udział zmian patologicznych w obrębie tkanki mięśniowej, czemu towarzyszy wzrost poziomu kinazy kreatynowej (CK) we krwi, która jest ważnym markerem stopnia uszkodzenia tkanki mięśniowej, jak również zwiększenie

liczby leukocytów, w tym głównie neutrofilii, co jest związane z toczącymi się procesami zapalnymi, a także regeneracyjnymi uszkodzonych włókien mięśniowych.

7. Uzyskane wyniki badań nad wpływem procesu starzenia na mikrostrukturę wybranych mięśni szkieletowych psów, ze względu na swój pionierski charakter, są cenną bazą danych do dalszych prac badawczych w tym zakresie, a także do określenia roli fizjoterapii w opóźnianiu procesów starzenia tkanki mięśniowej psów oraz jej zdolności regeneracyjnych. Ostatecznie zebrana wiedza może przyczynić się to do znaczącej poprawy dobrostanu psów geriatrycznych.

7. LITERATURA

- [1] Abreu P., Mendes S.V., Ceccatto V.M., Hirabara S.M., 2017. Satellite cell activation induced by aerobic muscle adaptation in response to endurance exercise in humans and rodents. *Life Sci.* 170, 33–40.
- [1] Acevedo L.M., Rivero J.L.L., 2006. New insights into skeletal muscle fibre types in the dog with particular focus towards hybrid myosin phenotypes. *Cell Tissue Res* 323, 283–303.
- [2] Aktas M., Auguste D., Lefebvre H.P., Toutain P.L., Braun J.P., 1993. Creatine kinase in the dog: a review. *Vet Res Commun.* 17(5), 353-69.
- [3] Albelda S.M., Buck C.A., 1990. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.* 4, 2868-2880.
- [4] Albelda S.M., Muller W.A., Buck C.A., Newman P.J., 1991. Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J. Cell. Biol.* 114(5), 1059-68.
- [5] Albelda S.M., Oliver P.D., Romer L.H., Buck C.A., 1990. Endo CAM: a novel endothelial cell-cell adhesion molecule. *J. Cell Biol.* 110, 1227-1237.
- [6] Armstrong R.B., Saubert C.W., Seeherman H.J., Taylor C.R., 1982. Distribution of fiber types in locomotory muscles. *Am. J. Anat.* 163(1), 87-98.
- [7] Asahina I., Sampath T.K., Hauschka P.V., 1996. Human osteogenic protein-1 induces chondroblastic, osteoblastic, and/or adipocytic differentiation of clonal murine target cells. *Exp. Cell Res.* 222, 38–47.
- [8] Asakura A., Komaki M., Rudnicki M., 2001. Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation.* 68(4-5), 245-53.
- [9] Baker D.J., Betik A.C., Krause D.J., Hepple R.T., 2006. No decline in skeletal muscle oxidative capacity with aging in long-term calorically restricted rats: effects are independent of mitochondrial DNA integrity. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 61(7), 675-684.
- [10] Balagopal P., Schimke J.C., Ades P., Adey D., Nair K.S., 2001. Age effect on transcript levels and synthesis rate of muscle MHC and response to resistance exercise. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.* 280, E203-E208.
- [11] Bardag-Gorce F., Farout L., Veyrat-Durebex C., Briand Y., Briand M., 1999. Changes in 20S proteasome activity during ageing of the LOU rat. *Mol. Biol. Rep.* 26, 89-93.
- [12] Barreiro E., Coronell C., Lavina B., Laviña B., Ramírez-Sarmiento A., Orozco-Levi M., Gea J., PENAM Project., 2006. Aging, sex differences, and oxidative stress in human respiratory and limb muscles. *Free Radic. Biol. Med.* 41, 797-809.
- [13] Baur J.A., Pearson K.J., Price N.L., Jamieson H.A., Lerin C., Kalra A., Prabhu V.V., Allard J.S., Lopez-Lluch G., Lewis K., Pistell P.J., Poosala S., Becker K.G., Boss O., Gwinn D., Wang M., Ramaswamy S., Fishbein K.W., Spencer R.G., Lakatta E.G., Le Couteur D., Shaw R.J., Navas.P., Puigserver P., Ingram D.K., de Cabo R., Sinclair D.A., 2006. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature.* 444(7117), 337-342.
- [14] Beauchamp J.R., Heslop L., Yu D.S., Tajbakhsh S., Kelly R.G., Wernig A., Buckingham M.E., Partridge T.A., Zammit P.S., 2000. Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J Cell Biol.* 151, 1221–1234.

- [15] Bellows J., Colitz M.H.C., Daristotle L., Ingram D.K., Lepine A., Tomlinson J., Zhang J., 2015. Common physical and functional changes associated with aging in dogs *J Am Vet Med Assoc.* 246(1),67-75.
- [16] Benchimol S., Fuks A., Jothy S., Beauchemin N., Shirota K., Stanners C.P., 1989. Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell.* 57,327-334.
- [17] Bergin M., Bicer, S., Lucas, C. A. and Reiser, P. J., 2006. Three-dimensional compartmentalization of myosin heavy chain and myosin light chain isoforms in dog thyroarytenoid muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 290(5), C1446-58.
- [18] Berlett B.S., Stadtman E.R., 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 272, 20313-20316.
- [19] Bevilacqua L., Ramsey J.J., Hagopian K., Weindruch R., Harper M.E., 2005. Long-term caloric restriction increases UCP3 content but decreases proton leak and reactive oxygen species production in rat skeletal muscle mitochondria. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 289(3), E429-38.
- [20] Bjelakovic G., Nikolova D., Gluud L.I., Simonetti R.G., Gluud C., 2007. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 297,842-857.
- [21] Bloor C.M., 2005. Angiogenesis during exercise and training. *Angiogenesis.* 8(3),263-71.
- [22] Błędowski P., Stogowski A., Wieczorowska-Tobis K., 2013. Wyzwania współczesnej gerontologii. Wydawnictwo Naukowe Wyższej Szkoły Nauk Humanistycznych i Dziennikarstwa, Poznań.
- [23] Bogdanis G.C., 2012. Effects of physical activity and inactivity on muscle fatigue. *Front. Physiol.* 3, 142.
- [24] Borrás D., Ferrer I., Pumarola M., 1999. Age-related changes in the brain of the dog. *Vet. Pathol.*, 36,202-211.
- [25] Brand-Saberi, B., Wilting, J., Ebersperger, C., Christ B., 1996. The formation of somite compartments in the avian embryo. *Int. J. Dev. Biol.* 40,411-420.
- [26] Braund K.G., McGuire J.A., Lincoln C. E., 1982. Observations on Normal Skeletal Muscle of Mature Dogs: A Cytochemical, Histochemical, and Morphometric Study. *Vet. Pathol.* 19,577-595.
- [27] Bronson R., 1990. Cross-sectional pathology of aging rodents. [W:] *Genetic Effects of Aging II*, H. D. Caldwell(red), NJ: Telford, 279-357.
- [28] Brooke M.H., Kaiser K.K., 1970. Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch Neurol.* 23(4),369-79.
- [29] Brooke M.H., 1970. Some comments on neural influence on the two histochemical types of muscle fibres. In *Physiology and Biochemistry on Muscle as a Food*; Briskey, E.J., Cassens, R.G., Marsh, B.B. (red.), University Wisconsin: Madison, WI, USA, 131.
- [30] Brukner, P., Khan, K. M., Bahr, R., Blair, S., Cook, J. L., Crossley, K., McConnell, J., McCrory, P. R., Noakes, T., 2012. *Brukner & Khan's Clinical Sports Medicine.* McGraw-Hill Education.
- [31] Bua E., McKiernan S.H., Aiken J.M., 2004. Calorie restriction limits the generation but not the progression of mitochondrial abnormalities in aging skeletal muscle. *FASEB J.* 18(3),582-584.
- [32] Budzińska K., 2005. Wpływ starzenia się organizmu na biologię mięśni szkieletowych. *Gerontologia Polska.* tom 13, nr 1, 1-7.

- [33] Butcher E. C., 1990. Cellular and molecular mechanisms that direct leukocyte traffic. *Am. J. Pathol.* 136,3-11.
- [34] Cai D., Li M., Lee K., Wong W., Chan K., 2000. Age-related changes of aqueous protein profiles in rat fast and slow twitch skeletal muscles. *Electrophoresis.* 21,465-472.
- [35] Carmeli E., Coleman R., Reznick A.Z., 2002. The biochemistry of aging muscle. *Exp. Gerontol.* 37,477-489.
- [36] Carpenter S., Karpati G., 1984. *Pathology of skeletal muscle.* Churchill and Livingstone. New York.
- [37] Čebašek V., Kubínová L., Ribarič S., Eržen I., 2005. Capillary network in slow and fast muscles and in oxidative and glycolytic muscles fibres. *Image Anal Stereol.* 24,51-58.
- [38] Chabi B., Ljubcic V., Menzies K.J., Huang J.H., Saleem A., Hood D.A., 2008. Mitochondrial function and apoptotic susceptibility in aging skeletal muscle. *Aging Cell.* 7,2-12.
- [39] Chen W., Datzkiw D., Rudnicki M.A., 2020. Satellite cells in ageing: use it or lose it. *Open Biol.* 10(5),200048.
- [40] Ciecierska A., Sadkowski T., Motyl T., 2019. Rola komórek satelitowych we wzroście i regeneracji mięśni szkieletowych. *Med. Weter.* 75 (12), 707-712
- [41] Ciscar E. R., Trefouret S., Aimonetti J.M., Attarian S., Pouget J., Roll J.P., 2004. Is muscle spindle proprioceptive function spared in muscular dystrophies? A muscle tendon vibration study. *Muscle and Nerve.* 29(6), 861-866.
- [42] Coggan A.R., Abduljalil A.M., Swanson S.C., Earle M.S., Farris J.W., Mendenhall L.A., Robitaille P.M., 1993. Muscle metabolism during exercise in young and old untrained and endurance-trained men. *J. Appl. Physiol.* 75,2125–2133.
- [43] Coggan A.R., Spina R.J., King D.S., Rogers M.A., Brown M., Nemeth P.M., Holloszy J.O., 1992. Histochemical and enzymatic comparison of the gastrocnemius muscle of young and elderly men and woman. *J. Gerontol.* 47(3), B71-B76.
- [44] Conley K.E., Esselman P.C., Jubrias S.A., Cress M.A., Inglin B., Mogadam C., Schoene R.B., 2000. Ageing, muscle properties and maximal O₂ uptake rate in humans. *J. Physiol.* 526,211–217.
- [45] Cook J.J., Wailgum T.D., Vasthare U.S., Mayrovitz H.N., Tuma R.F., 1992. Age-related alterations in the arterial microvasculature of skeletal muscle. *J. Gerontol.* 47, B83–B88.
- [46] Cornelison D.D., Olwin B.B., Rudnicki M.A., Wold B.J., 2000. MyoD (-/-) satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient. *Dev. Biol.* 224,122–137.
- [47] Cunningham B.A., Hemperly J.J., Murray B.A., Prediger E.A., Brackenbury R., Edelman G.M., 1987. Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science.* 236,799-806.
- [48] Dardevet D., Sornet C., Taillandier D., Savary I., Attaix D., Grizard J., 1995. Sensitivity and protein turnover response to glucocorticoids are different in skeletal muscle from adult and old rats. Lack of regulation of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in aging. *J. Clin. Invest.* 96,2113-2119.

- [49] Davidson Y. S., Clague J.E., Horan M.A., Pendleton N., 1999. The Effect of Aging on Skeletal Muscle Capillarization in a Murine Model.
- [50] Denis C., Chatard J.C., Dormois M., Linossier M.T., Geysant A., Lacour J.R. 1986. Effects of endurance training on capillary supply of human skeletal muscle on two age groups (20 and 60 years). 81(5),379-83.
- [51] Dubowitz V., 1985. Muscle biopsy. A practical approach. Ballière-Tindall. W. B. Saunders, London, Toronto.
- [52] de Bruijne J. J., van den Brom W. E., 1986. The effect of long-term fasting on ketone body metabolism in the dog. *Comp Biochem Physiol B*.83(2), 391-5
- [53] De Braga S., Padilha G.F., Ferreira A. M. R., 2016. Evaluation of Muscle Fiber Types in German Shepherd Dogs of Different Ages. 299,1540–1547.
- [54] De Luca A., Pierno S., Cocchi D., Camerino C.D., 1997. Effects of chronic growth hormone treatment in aged rats on the biophysical and pharmacological properties of skeletal muscle chloride channels. *Br. J. Pharmacol.* 121,369-374.
- [55] De Luca A., Tricarico D., Pierno S., Conte-Camerino D., 1994. Aging and chloride channel regulation in rat fast-twitch muscle fibers. *Pflugers Arch.* 427,80-85.
- [56] Degens H., Veerkamp J.H., Van Moerkkerk H.T.B., Turek Z., Hoofd L.J.C., Binkhorst R.A., 1993. Metabolic capacity, fibre type area and capillarization of rat plantaris muscle. Effects of age, overload and training and relationship with fatigue resistance. *Int. J. Biochem.* 25,1141–1148.
- [57] Drew B., Phaneuf S., Dirks A., Selman C., Gredilla R., Lezza A., Barja G., Leeuwenburgh C., 2003. Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial energy production in gastrocnemius muscle and heart. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284(2), R474-80.
- [58] Durbeej M., Cohn R. D., Hrstka R. F., Moore S. A., Allamand V., Davidson B. L., Williamson R. A., Campbell K. P., 2000. Disruption of the beta sarcoglycan gene reveals pathogenetic complexity of limb-girdle muscular dystrophy type 2E. 141-151.
- [59] Edelman G. M., 1988. Morphoregulatory molecules. *Biochemistry.* 27,3533 - 3543.
- [60] Edwards C.M., Abusnana S., Sunter D., Murphy K.G., Ghatei M.A., Bloom S.R., 1999. The effect of the orexins on food intake: comparison with neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone and galanin. *J. Endocrinol.* 160, R7-12.
- [61] Eliceiri B.P., Cheresh D.A., 1999. The role of α v integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J. Clin. Invest.* 103,1227–1230.
- [62] Elices M.J., Osborn L., Takada Y., Crouse C., Luhowskyj S., Hemler M.E., Lobb R.R., 1990. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell.* 60,577-584.
- [63] Ermini M., 1976. Ageing changes in mammalian skeletal muscle: biochemical studies. *Gerontology.* 22,301-316.
- [64] Fazarinc G., Candek-Potokar M., Ursic M., Vrecl M., Pogacnik A., 2002. Giant muscle fibres in pigs with different Ryr1 genotype. 31, 367-371.
- [65] Fettman M.J., Stanton C.A., Banks I., Hamar D.W., Johnson., Hegstad R.L., Johnston S., 1997. Effects of neutering on bodyweight, metabolic rate and glucose tolerance in domestic cats. 62,131–6.

- [66] Ferrington D.A., Krainev A.G., Bigelow D.J., 1998. Altered turnover of calcium regulatory proteins of the sarcoplasmic reticulum in aged skeletal muscle. *J.Biol. Chem.* 273,5885-5891.
- [67] Fleming J. M, Creevy K. E., Promislow D.E.,2011.Mortality in north american dogs from 1984 to 2004: an investigation into age-, size-, and breed-related causes of death.*J Vet Intern Med* .25(2),187-98.
- [68] Friden J., Lieber R.L., 2001. Eccentric exercise-induced injuries to contractile and cytoskeletal muscle fibre components. 171(3),321-6.
- [69] Fruhbeck G., Muguerza B., Castilla-Cortazar I., Santidrian S., 1996. Effect of aging on the rate of muscle protein turnover in rat. *Rev. Esp. Fisiol.* 52,207-214.
- [70] Fukagawa N.K., Li M., Liang P., Russell J.C., Sobel B.E., Absher P.M., 1999. Aging and high concentrations of glucose potentiate injury to mitochondrial DNA. *Free Radic. Biol. Med.* 27,1437-1443.
- [71] García-Prat L., Muñoz-Cánoves P., Martínez-Vicente M., 2016. Dysfunctional autophagy is a driver of muscle stem cell functional decline with aging. *Autophagy* 12, 612–613.
- [72] Garcia-Prat L., Sousa-Victor P., Munoz-Canoves P., 2013. Functional dysregulation of stem cells during aging: a focus on skeletal muscle stem cells. *FEBS J.* 280, 4051–4062.
- [73] Garry D.J., Meeson A., Elterman J., Zhao Y., Yang P., Bassel-Duby R., Williams R.S., 2000. Myogenic stem cell function is impaired in mice lacking the forkhead/winged helix protein MNF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97,5416–5421.
- [74] German A.J., 2006. The growing problem of obesity in dogs and cats. 136, 1940S–6S.
- [75] Gliemann L., Rytter N., Piil P., Nilton J., Lind T., Nyberg M., Cocks M., Hellsten Y., 2018. The Endothelial Mechanotransduction Protein Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 Is Influenced by Aging and Exercise Training in Human Skeletal Muscle. *Front Physiol.* 9,1807.
- [76] Górska M., Wojtysiak D., 2017. Pathological Changes in the Microstructure of Pale, Soft, Exudative (PSE) and Normal Turkey Breast Muscle. *Folia Biologica.* 65(3).
- [77] Gray S.D., Renkin E.M., 1978. Microvascular supply in relation to fiber metabolic type in mixed skeletal muscles of rabbits. *Microvasc. Res.* 16,406-25. (, R. J., ed.), 86–93. World Greyhound.
- [78] Gunn H.M., 1978a. Differences in the histochemical properties of skeletal muscles of different breeds of horses and dogs. *J. Anat.* 127(Pt 3),615-34.
- [79] Gunn H.M., 1978b. The proportions of muscle, bone and fat in two different dogs. *Res. Vet. Sci.* 24(3),277-82.
- [80] Guy P.S., Snow D.H., 1981. Skeletal muscle fibre composition in the dog and its relationship to athletic ability. *Res. Vet. Sci.* 31(2),244-8.
- [81] Haidet G.C., Parsons D., 1991. Reduced exercise capacity of senescent beagles: evaluation of the periphery. *Am. J. Physiol.* 260, H173–H182.
- [82] Hancock C.R., Han D.H., Higashida K., Kim S.H., Holloszy J.O., 2011. Does calorie restriction induce mitochondrial biogenesis? A reevaluation. *FASEB J.* 25(2),785-791.
- [83] Hausman G.J., Basu U., Du M., Fernyhough-Culver M., Dodson M.V., 2014. Intermuscular and intramuscular adipose tissues: Bad vs. good adipose tissues. *Adipocyte.* 10,3(4),242-55.

- [84] Herndon L.A., Schmeissner P.J., Dudaronek J.M., Brown P.A., Listner K.M., Sakano Y., Paupard M.C., Hall D.H., Driscoll M., 2002. Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. Elegans*. *Nature*. 419,808-814.
- [85] Holloszy J.O., 1998. Longevity of exercising male rats: effect of an antioxidant supplemented diet. *Mech. Ageing Dev.* 100,211-219.
- [86] Hoppeler H., Fluck M., 2003. Plasticity of skeletal muscle mitochondria: structure and function. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 35, 95-104.
- [87] Hoskins J. D., 2006. Geriatria i gerontologia psów i kotów. Wyd. Galaktyka, Łódź.
- [88] Hospod V., Aimonetti J.-M., Roll J.-P., Ribot-Ciscar E., 2001. Changes in human muscle spindle sensitivity during proprioceptive attention task. *The Journal of Neuroscience*. 27(19),5172-5178.
- [89] Hudlicka O., 1991. What makes blood vessels grow? *J. Physiol.* 444,1-24.
- [90] Hudlicka O., 1985. Development and adaptability of microvasculature in skeletal muscle. *J. Exp. Biol.* 115,215-28.
- [91] Hunkapiller T., Hood L., 1989. Diversity of the immunoglobulin gene superfamily. *Adv. Immunol.* 44,1-63.
- [92] Imai, Y., True D.D., Singer M.S., Rosen S.D., 1990. Direct demonstration of the lectin activity of gp90MEL, a lymphocyte homing receptor. *J. Cell. Biol.* 111,1225-1232.
- [93] Irion G.L., Vasthare U.S., Tuma R.F., 1987. Age related change in skeletal muscle blood flow in the rat. *J. Gerontol.* 42,660-665.
- [94] Jackson J.R., Ryan M.J., Alway S.E., 2011. Long-term supplementation with resveratrol alleviates oxidative stress but does not attenuate sarcopenia in aged mice. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 66(7),751-764.
- [95] Jackson J.R., Ryan M.J., Hao Y., Alway S.E., 2010. Mediation of endogenous antioxidant enzymes and apoptotic signalling by resveratrol following muscle disuse in the gastrocnemius muscles of young and old rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 299(6),R1572-R1581.
- [96] Jessup W., 2008. Lipid metabolism: sources and stability of plasma sphingosine-1-phosphate. *Curr Opin Lipidol.* 19(5),543-544.
- [97] Joffe Y.T., Collins M., Goedecke J.H., 2013. The Relationship between Dietary Fatty Acids and Inflammatory Genes on the Obese Phenotype and Serum Lipids. *Nutrients*. 5, 1672-1705.
- [98] Johannsen D.L., DeLany J.P., Frisard M.I., Welsch M.A., Rowley C.K., Fang X., Jazwinski S.M., Ravussin E., Louisiana Healthy Aging Study., 2008. Physical activity in aging: comparison among young, aged, and nonagenarian individuals. *J. Appl. Physiol.* 105(2),495-501.
- [99] Johnson M.L., Robinson M.M., Nair K.S., 2013. Skeletal muscle aging and the mitochondria. *Trends Endocrinol. Metab.* 24,247-256.
- [100] Johnson P., Hammer J.L., 1993. Cardiac and skeletal muscle enzyme levels in hypertensive and aging rats. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 104,63-67.
- [101] Kakuda N., Nagaoka M., 1998. Dynamic response of human muscle spindle afferents to stretch during voluntary contraction. *Journal of Physiology*. 513(2),621-628.
- [102] Kano Y., Shimegi S., Furukawa H., Matsudo H., Mizuta, T., 2002. Effects of aging on capillary number and luminal size in rat soleus and plantaris muscles. *Journal of Gerontology A: Biological Science and Medical Science*. 57, B422-427.

- [103] Katagiri T., Yamaguchi A., Ikeda T., Yoshiki S., Wozney J.M., Rosen V., Wang E.A., Tanaka H., Omura S., Suda T., 1990. The non-osteogenic mouse pluripotent cell line, C3H10T1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172,295–299.
- [104] Katagiri T., Yamaguchi A., Komaki M., Abe E., Takahashi N., Ikeda T., Rosen V., Wozney J.M., Fujisawa-Sehara A., Suda T., 1994. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J. Cell Biol.* 127,1755–1766.
- [105] Kelada S.N.P., Aylor D. L., Peck B.C.E., Ryan J.F., Tavarez U., Buus R. J., Miller D.R., Chesler E.J., Threadgill D.W., Churchill G.A., de Villena F.P.M., Collins F.S., 2012. Genetic analysis of hematological parameters in incipient lines of the collaborative cross. G3 (Bethesda).
- [106] Kindig C.A., Poole D.C., 1998. A comparison of the microcirculation in the rat spinotrapezius and diaphragm muscle. *Microvasc. Res.* 55,249–259.
- [107] Kinoshita J., Tanaka Y., Niwa M., Yoshii H., Takagi M., Kowamori R., 2000. Impairment of insulin-induced vasodilation is associated with muscle insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 47,185-190.
- [108] Kiwaki K., Kotz C.M., Wang C., Lanningham-Foster L., Levine J.A., 2004. Orexin A (hypocretin 1) injected into hypothalamic paraventricular nucleus and spontaneous physical activity in rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 286, E551-9.
- [109] Kleine T.O., 1976. Glycolytic and gluconeogenic enzyme activities in skeletal muscle of differently aged persons. *Acta Gerontol.* 6,489-494.
- [110] König H.E., Liebich H.G. 2012. *Anatomia zwierząt domowych. Kolorowy atlas i podręcznik.* Wyd. Galaktyka, Łódź.
- [111] König H. K. Liebich H. G., 2013. *Veterinary Anatomy of Domestic Mammals 6th Edition.*
- [112] Kozakowska M., Dulak J., Józkwicz A., 2015. Mięśniowe komórki progenitorowe – charakterystyka i funkcja. 42, 465-490.
- [113] Kraus C., Pavard S., Promislow D.E., 2013. The Size–Life Span Trade-Off Decomposed: Why Large Dogs Die Young. *Am. Nat.* 181(4),492-505.
- [114] Kraytsberg Y., Kudryavtseva E., McKee A.C., Ceula C., Kowall N.W., Khrapko K., 2006. Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. *Nat. Genet.* 38,518-520.
- [115] Kudła J., 2006. Zaburzenia behawioralne u psów i kotów w podeszłym wieku. *Magazyn Weterynaryjny*, 15(109), 38-40,
- [116] Kunz W.S., Kudin A., Vielhaber S., Elger C.E., Attardi G., Villani G., 2000. Flux control of cytochrome c oxidase in human skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 275,27741-27745.
- [117] Kwong L.K., Sohal R.S., 2000. Age-related changes in activities of mitochondrial electron transport complexes in various tissues of the mouse. *Arch. Biochem. Biophys.* 373:16-22.
- [118] Lacey L. 2017. Geriatric cats and dogs – vet nurses’ role in old age pet care. *Vet. Times.* 20(4).

- [119] Lagouge M., Argmann C., Gerhart-Hines Z., Meziane H., Lerin C., Daussin F., Messadeq N., Milne J., Lambert P., Elliott P., Geny B., Laakso M., Puigserver P., Auwerx J., 2006. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell*. 127(6),1109-1122.
- [120] Lakatta E.G., 1999. Cardiovascular aging research: the next horizons. *J. Am. Geriatr. Soc.* 47:613–625.
- [121] Lanza I.R., Short D.K, Short K.R., Raghavakaimal S., Basu R., Joyner M.J., McConnell J.P., Nair K.S., 2008. Endurance exercise as a countermeasure for aging. *Diabetes*. 57,2933-2942.
- [122] Latorre R., Gil F., Vázquez J. M., Moreno F., Mascarello F., Ramirez G.,1993. Skeletal muscle fibre types in the dog. *J Anat.* 182(Pt 3), 329–337.
- [123] Lawler J.M., Demaree S.R., 2001. Relationship between NADP-specific isocitrate dehydrogenase and glutathione peroxidase in aging rat skeletal muscle. *Mech. Ageing Dev.* 122,291-304.
- [124] Lazarov L., 2020. Acute pancreatitis in dogs -age, breed and sex predisposition. *Tradition and Modernity in Veterinary Medicine*. vol. 5, 2(9), 10–14.
- [125] Lee H.Y., Choi C.S., Birkenfeld A.L., Alves T.C., Jornayvaz F.R., Jurczak M.J., Zhang D., Woo D.K., Shadel G.S., Ladiges W., Rabinovitch P.S., Santos J.H., Petersen K.F., Samuel V.T., Shulman G.I.,2010. Targeted expression of catalase to mitochondria prevents age-associated reductions in mitochondrial function and insulin resistance. *Cell Metab.* 12(6),668-674.
- [126] Leeuwenburgh C., Fiebig R., Chandwaney R., Ji L.L., 1994. Aging and exercise training in skeletal muscle: responses of glutathione and antioxidant enzyme systems. *Am. J. Physiol.* 267, R439-R445.
- [127] Leeuwenburgh C., Hansen P., Shaish A., Holloszy J.O., Heinecke J.W., 1998. Markers of protein oxidation by hydroxyl radical and reactive nitrogen species in tissues of aging rats. *Am. J. Physiol.* 274, R453-461.
- [128] Liechty, K.W., MacKenzie, T.C., Shaaban, A.F., Radu, A., Moseley, A.M., Deans, R., Marshak, D.R. and Flake, A.W., 2000. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat. Med.* 6,1282–1286.
- [129] Lilliehöök I., Tvedten H., 2003. Investigation of hypereosinophilia and potential treatments. *33(6)*, 1359-78.
- [130] Lindblad-Toh, K, et al. 2005. Genome Sequence, Comparative Analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 438, 803-819.
- [131] Lindena J., Küpper W., Trautschold I., 1982. Effect of transient hypoxia in skeletal muscle on enzyme activities in lymph and plasma. *20(2)*,95-102.
- [132] Linnane A.W., Kovalenko S., Gingold E.B., 1998. The universality of bioenergetic disease. Age-associated cellular bioenergetic degradation and amelioration therapy. *Ann. NY Acad. Sci.* 854,202-213.
- [133] Lopez-Lluch G., Hunt N., Jones B., Zhu M., Jamieson H., Hilmer S., Cascajo M.V., Allard J., Ingram D.K., d Navas P., De Cabo R., 2006. Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetics efficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103(6),1768-1773.
- [134] Lopez-Lluch G., Irueta P.M., Navas P., de Cabo R., 2008. Mitochondrial biogenesis and healthy aging. *Exp. Gerontol.* 53(9),813-819.

- [135] Lowe D.A., Degens H., Chen K.D., Alway S.E., 2000. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase varies with age in glycolytic muscles of rats. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 55, B160-B164.
- [136] Ławniczak A., Kmiec Z., 2012. Zmiany mięśni szkieletowych w trakcie starzenia: fizjologia, patologia i regeneracja. *Postepy Hig Med Dosw (online)*. 2012. 66,392-400.
- [137] Madej J., Rotkiewicz T., 2011. *Patologia ogólna zwierząt*. Wydawnictwo UWM, Olsztyn.
- [138] Makovický P., Makovický P., Chrenková M., 2009. Histopathological Aspects of giant fibres in selected muscles of the pig. *Isr. J. Vet. Med.* 64(2), 31-35.
- [139] Mansouri A. Gruss P., 1998. Pax3 and Pax7 are expressed in commissural neurons and restrict ventral neuronal identity in the spinal cord. *Mech. Dev.* 78,171–178.
- [140] Mansouri A., 1998. The role of Pax3 and Pax7 in development and cancer. *Crit. Rev. Oncogenesis.* 9,141–149.
- [141] Mansouri A., Stoykova A., Torres M., Gruss P., 1996. Dysgenesis of cephalic neural crest derivatives in Pax7^{-/-} mutant mice. *Development.* 122,831–838.
- [142] Margreth A., Damiani E., Bortoloso E., 1999. Sarcoplasmic reticulum In aged skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* 167,331-338.
- [143] Martineau L.C., Chadan S.G., Parkhouse W.S., 1999. Age-associated alterations in cardiac and skeletal muscle glucose transporters, insulin and IGF-1 receptors, and PI3-kinase protein content in the C57BL/6 mouse. *Mech. Ageing Dev.* 106,217-232.
- [144] Maxwell L. C., Barclay J. K., Mohrman D. E., Faulkner J. A., 1997. Physiological characteristics of skeletal muscles of dogs and cats. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* Vol. 233, No. 1.
- [145] McArdle A., Jackson M.J., 2000. Exercise, oxidative stress and ageing. 197,539-541.
- [146] McGrotty Y.L., Knottenbelt C.M., 2002. Significance of plasma protein abnormalities in dogs and cat. *In Practice.* 4(9).
- [147] Melov S., Tarnopolsky M.A., Beckman K., Felkey K., Hubbard A., 2007. Resistance exercise reverses aging in human skeletal muscle. *PLoS ONE.* 2(5), e465.
- [148] Menshikova E.V., Ritov V.B., Fairfull L., Ferrell R.E., Kelley D.E., Goodpaster B.H., 2006. Effects of exercise on mitochondrial content and function in aging human skeletal muscle. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 61(6),534-40.
- [149] Merry B.J., 2004. Oxidative stress and mitochondrial function with aging-the effects of calorie restriction. *Aging Cell.* 3(1),7-12.
- [150] Millis D. L., Levine D., Taylor R., 2016. *Rehabilitacja psów*. Wyd. Edra Urban & Partner, Wrocław.
- [151] Milne E.M., Doxey D.L., 1987. Lactate dehydrogenase and its isoenzymes in the tissues and sera of clinically normal dogs. 43, 222-224.
- [152] Miraglia D., Mammoli R., Branciarri R., Ranucci D., Cenci-Goga B. T., 2006. Characterization of Muscle Fibre Type and Evaluation of the Presence of Giant Fibres in Two Meat Chicken Hybrids. *Vet. Res. Commun.* 30, 357–360.
- [153] Morimoto S., Goto T., 2000. Role of troponin I isoform switching in determining the pH sensitivity of Ca²⁺ regulation in developing rabbit cardiac muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67,912-917.

- [154] Mukherjee A., Chakravarty A., 2010. Spasticity mechanisms—for the clinician. *Front Neurol.*1,149.
- [155] Mukund K.,Subramaniam S.,2020.Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease.*Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.*12(1), e1462.
- [156] Muller-Delp J., Spier S.A., Ramsey M.W., Lesniewski L.A., Papadopoulos A.D., Humphrey J.D., Delp M.D., 2002a. Effects of aging on vasoconstrictor and mechanical properties of rat skeletal muscle arterioles. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 282, H1843–H1854.
- [157] Muller-Delp J.M., Spier S.A., Ramsey M.W., Delp M.D., 2002b. Aging impairs endothelium-dependent vasodilation in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 283, H1662– H1672.
- [158] Murach K.A., Dungan C.M., Peterson C.A., McCarthy J.J.,2019. Muscle Fiber Splitting Is a Physiological Response to Extreme Loading in Animals.*Exerc. Sport. Sci. Rev.*47(2),108-115.
- [159] Murase T., Haramizu S., Ota N., Hase T., 2009. Suppression of the aging-associated decline in physical performance by a combination of resveratrol intake and habitual exercise in senescence-accelerated mice. *Biogerontology.* 10 (4),423-434.
- [160] Nair K. S. 2004. Aging muscle. Special Article. *EV McCollum Adward Lecture.* 1-5.
- [161] Narayanan N., Jones D.L., Xu A., Yu J.C., 1996. Effects of aging on sarcoplasmic reticulum function and contraction duration in skeletal muscles of the rat. *Am. J. Physiol.* 271, C1032-C1040.
- [162] Newman P.J., Berndt M.C., Gorski J., White G.C. 2nd, Lyman S., Paddock C., Muller W.A., 1990. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science.* 247(4947),1219-22.
- [163] Oustanina S., Hause G., Braun T., 2004. Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification. *MBO J.* 23(16),3430-9.
- [164] Pagano T.B., Wojcik S., Costagliola A., De Biase D., Iovino S., Iovane V., Russo V., Papparella S., Paciello O., 2015. Age related skeletal muscle atrophy and upregulation of autophagy in dogs. *Vet. J.* 206(1),54-60.
- [165] Pastoris O., Boschi F., Verri M., Baiardi P., Felzani G., Vecchiet J., Dossena M., Catapano M., 2000. The effects of aging on enzyme activities and metabolite concentrations in skeletal muscle from sedentary male and female subjects. *Exp. Gerontol.* 35,95-104.
- [166] Pati S., Panda S.K., Acharya A.P., Senapati S., Behera M., Behera S.S.,2015. Evaluation of geriatric changes in dogs.*Vet. World.* 8(3),273-8.
- [167] Peters S. L., Alewijnse A.E., 2007. Sphingosine-1-phosphate signaling in the cardiovascular system, *Curr. Opin. Pharmacol.* 7 (2),186–192.
- [168] Petersen K.F., Befroy D., Dufour S., Dziura J., Ariyan C., Rothman D.L., DiPietro L., Cline G.W., Shulman G.I., 2003. Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science.* 300(5622), 1140-2.
- [169] Pette D., Staron R.S., 2000. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc. Res. Tech.* 50,500-509.

- [170] Phillips T., Leeuwenburgh C., 2005. Muscle fiber specific apoptosis and TNF-alpha signalling in sarcopenia are attenuated by life-long calorie restriction. *FASEB J.* 19(6),668-670.
- [171] Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R., 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 284,143–147.
- [172] Polak A., Porzych K., Kędziora-Kornatowska K., Motyl J., Porzych M., Słupski M., Lackowska D., 2007. Poznawczy i praktyczny wymiar gerontologii – interdyscyplinarnej nauki o starzeniu się i starości. *Gerontologia Polska* 15(3), 51-53.
- [173] Procajło A., 2006. Przydatność diagnostyczna markerów uszkodzenia mięśni szkieletowych u psów zaprzęgowych w treningu. *Medycyna Weterynaryjna.* 62 (3), 306-310.
- [174] Proske U., Candevia S.C., 2009. The kinaesthetic senses. *Journal of Physiology.* 17,4139-4146.
- [175] Purslow P.P., 2005. Intramuscular connective tissue and its role in meat quality. *Meat Science.* 70(3);435-47.
- [176] Radak Z., Kaneko T., Tahara S., Nakamoto H., Ohno H., Sasvari M., Nyakas C., Goto S., 1999. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. 27, 69-74.
- [177] Ranjbar, K., Fayazi B., 2019. Vascularisation of skeletal muscle. [W:] *Muscle Cells-Recent Advances and Future Perspectives.* Valarmathi, M.T.
- [178] Ranvier L., 1874. Note sur les vaisseaux sanguins et la circulation dans les muscles rouges. *Comptes Rendues hebdomadares des Seances et Memoires de la Societe de Biologie.* 26,28-31.
- [179] Remignon, H., Gardahaut M. F., Marche G., Ricard F. H., 1995. Selection for rapid growth increases the number and the size of muscle fibers without changing their typing in chickens. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 16,95-102.
- [180] Reznick A.Z., Packer L., 1994. Oxidative damage to protein: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 233,357-363.
- [181] Ribeiro A.J., Souza L.S., Almeida C.F., Ishiba R., Fernandes S.A., Guerrieri D.A., Santos A., Onofre-Oliveira P.C.G., Vainzof M., 2019. Muscle satellite cells and impaired late-stage regeneration in different murine models for muscular dystrophies. *Scientific Reports* 9(1),1-11.
- [182] Rogulski J., Spooner R., 1996. *Enzymologia kliniczna.* [W:] *Biochemia kliniczna;* Red. Angielski S., Jakubowski Z., Dominiczak M.H. Wydawnictwo Perseusz Gdańsk. 150–1636.
- [183] Rudnicki M.A., Schnegelsberg P.N., Stead R.H., Braun T., Arnold H.H., Jaenisch R., 1993. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell.* 75, 1351–1359.
- [184] Ruoslahti E., Pierschbacher M.D., 1987. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science.* 238,491-497.
- [185] Russell J.A., Kindig C.A., Behnke B.J., Poole D.C., Musch T.I., 2003. Effects of aging on capillary geometry and hemodynamics in rat spinotrapezius muscle. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 285(1), H251-8.

- [186] Safdar S., Hamadeh M.J., Kaczor J.J., Raha S., Debeer J., Tarnopolsky M.A., 2010. Aberrant mitochondrial homeostasis in the skeletal muscle of sedentary older adults. *PLoS ONE*. 5(5), e10778.
- [187] Salminen A., Saari P., Kihlström M., 1988. Age-and sex-related differences in lipid peroxidation of mouse cardiac and skeletal muscles. *Comp. Biochem. Physiol. B*. 89,695-699.
- [188] Schubert-Schoppmeyer A., Fiedler I., Nürnberg G., Jonas L., Ender K., Maak S., Rehfeldt. C., 2008. Simulation of giant fibre development in biopsy samples from pig longissimus muscle. *Meat Sci*. 80(4), 1297-303.
- [189] Schwartz M.W., Woods S.C., Seeley R.J., Barsh G.S., Baskin D.G., Leibel R.L., 2003. Is the energy homeostasis system inherently biased toward weight gain? *Diabetes*. 52,232-8.
- [190] Seale P., Rudnicki M.A., 2000. A new look at the origin, function, and “Stem-Cell” status of muscle satellite cells. *Dev. Biol*. 218,115–124.
- [191] Seale P., Sabourin L.A., Girgis-Gabardo A., Mansouri A., Gruss P., Rudnicki M.A., 2000. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*. 102, 777–786.
- [192] Sen C.K., 1995. Oxidants and antioxidants in exercise. *J Appl Physiol*. 79(3):675-86.
- [193] Shimada T., Takeshita Y., Murohara T., Sasaki K., Egami K., Shintani S., Katsuda Y., Ikeda H., Nabeshima Y., Imaizumi T., 2004. Angiogenesis and vasculogenesis are impaired in the precocious-aging klotho mouse. *31;110(9)*,1148-55.
- [194] Short K.R., 2004. Mitochondrial ATP measurements. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. 287(1), R243-R245.
- [195] Short K.R., Bigelow M.L., Kahl J., Singh R., Coenen-Schimke J., Raghavakaimal S., Nair K.S., 2005. Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proc. Nat.l Acad. Sci. U.S.A.* 102,5618-5623.
- [196] Short K.R., Vittone J.L., Bigelow M.L., Proctor D.N., Nair K.S., 2004. Age and aerobic exercise training effects on whole body and muscle protein metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 286(1), E92-101.
- [197] Simmons D.L., Walker C., Power C., Pigott R., 1990. Molecular cloning of CD31, a putative intercellular adhesion molecule closely related to carcinoembryonic antigen. *J. Exp. Med*. 171,2147-2152.
- [198] Skóra J., Biegus J., Pupka A., Barć P., Sikora J., Szyber P., 2006. Molekularne podstawy angiogenezy. *Postępy Hig. Med. Dosw*. 60,410-5.
- [199] Skorjanc D., Jaschinski F., Heine G., Pette D., 1998. Sequential increases in capillarization and mitochondrial enzymes in low-frequency-stimulated rabbit muscle. *Am. J. Physiol*. 274(3),C810-8.
- [200] Słodki S., Bogucka J., 2019. Mitochondrial Theory of Skeletal Muscle Ageing – New Facts, New Doubts. *J Vet Res*. 63(1),149–160.
- [201] Snow D. H., 1987. Metabolic responses in racing greyhounds. [W]: *The Racing Greyhound: Volume 4* (Clifford, R. J. ed.), pp. 86–93. World Greyhound Racing Federation, London, UK.
- [202] Snow D.H., Billeter R., Mascarello F., Carpeno E., Rowlerson A., Jenny E., 1982. No classical type IIB fibres in dog skeletal muscle. *Histochemistry*. 75, 53–65.
- [203] Sohal R.S., Weindruch R., 1996. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*. 273,59-63.

- [204] Song W., Kwak H.B., Lawler J.M., 2006. Exercise training attenuates age-induced changes in apoptotic signalling in rat skeletal muscle. *Antioxid. Redox Signal.* 8(3-4),517-528.
- [205] Speakman J.R. Mitchell S.E., 2011. Caloric restriction. *Mol. Aspects Med.* 32(3),159-221.
- [206] Springer T. A.,1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature.* 346(6283),425-34.
- [207] Stockinger H., Gadd S.J., Eher R., Majdic O., Schreiber W., Kasinrerck W., Strass B., Schnabl E., Knapp W., 1990. Molecular characterization and functional analysis of the leukocyte surface protein CD31. *J. Immunol.* 145,3889-3897.
- [208] Sulla I., Balik V., Hornak S., Ledecy V.,2018. Cauda equina syndrome in dogs – a review. *Acta Vet. Brno.* 87,321-330
- [209] Szarota Z., 2004. *Gerontologia społeczna i oświatowa.* Wyd. Naukowe AP, Kraków.
- [210] Takeichi M., 1991. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science.* 251,1451-1455.
- [211] Tauchi H., Yoshioka T., Kobayashi H., 1971. Age change of skeletal muscles of rats. *Gerontologia.* 17,219-227.
- [212] Taylor D.J., Kemp G.J., Thompson C.H., Radda G.K., 1997. Ageing: effects on oxidative function of skeletal muscle in vivo. *Mol. Cell. Biochem.* 174,321-324.
- [213] Taylor S.M., Jones P.A., 1979. Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell.*17,771–779.
- [214] Teboul L., Gaillard D., Staccini L., Inadera H., Amri E.Z., Grimaldi P.A., 1995. Thiazolidinediones and fatty acids convert myogenic cells into adipose-like cells. *J. Biol. Chem.* 270,28183–28187.
- [215] Toniolo L.,Maccatrozzo L., Patrino M., Elisabetta Pavan E., Caliaro F., Rossi R., Rinaldi C., Canepari M., Reggiani C., Mascarello F., 2007. Fiber types in canine muscles: Myosin isoform expression and functional characterization. *Am J Physiol Cell Physiol.*292(5),C1915-26.
- [216] Tukaj C., 2013. The significance of macrophagy in health and disease. *Folia Morphol.* 72,87-93.
- [217] Um J.H., Park S.J., Kang H., Yang S., Foretz M., McBurney M.W., Kim M.K., Viollet B., Chung J.H., 2010. AMP-activated protein kinase-deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol. *Diabetes.* 259(3),554-563.
- [218] Van Mourik J.A., Leeksa O.C., Reinders J.H., de Groot P.G., Zandbergen-Spaargaren J., 1985. Vascular endothelial cells synthesize a plasma membrane protein indistinguishable from the platelet membrane glycoprotein IIa. *J. Biol. Chem.* 260,11300-6.
- [219] Van Velthoven C.T.J., Rando T.A.,2019. Stem cell quiescence: Dynamism, Restraint, and Cellular Idling. *24(2)213–225.*
- [220] Verdijk L.B., Snijders T., Drost M., Delhaas T., Kadi F., van Loon L.J.C.,2014. Satellite cells in human skeletal muscle; from birth to old age. *AGE.*36,545–557.
- [221] Veress B., Kerényi T, Hüttner I., Jellinek H., 1966. The phases of muscle necrosis. *J Pathol Bacteriol.* 92(2),511-7.
- [222] Wahren J., Saltin B., Jorfeldt L., and Pernow B., 1974. Influence of age on the local circulatory adaptation to leg exercise. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 33,79–86.

- [223] Wanagat J., Cao Z., Pathare P., Aiken J.M., 2001. Mitochondrial DNA deletion mutations colocalize with segmental electron transport system abnormalities, muscle fiber atrophy, fiber splitting, and oxidative damage in sarcopenia. *FASEB J.* 15,322-332.
- [224] Wang H., Listrat. A., Meunier B., Gueugneau M., Coudy-Gandilhon C., Combaret L., Taillandier D., Polge C., Attaix D., Lethias C., Lee K., Lim G.K., B chet D., 2014. Apoptosis in capillary endothelial cells in ageing skeletal muscle. *Aging Cell.*13(2):254-62.
- [225] Wang Y., Michikawa Y., Mallidis C., Bai Y., Woodhouse L., Yarasheski K.E., Miller C.A., Askanas V., Engel W.K., Bhasin S., Attardi G., 2001. Muscle-specific mutations accumulate with aging in critical human mtDNA control sites for replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98,4022-4027.
- [226] Wang Z.M., Messi M.L., Delbono O. 2000. L-type Ca²⁺ channel charge movement and intracellular Ca²⁺ in skeletal muscle fibers from aging mice. *Biophys. J.* 78,1947-1954.
- [227] Ward J. 1998. Should antioxidant vitamins be routinely recommended for older people? *Drugs Aging.* 2,16-175.
- [228] Wawryk S.O., Novotny J.R., Wicks I.P., Wilkinson D., Maher D., Salvaris E., Welch K., Fecondo J., Boyd A.W., 1989. The role of the LFA-1/ICAM-1 interaction in human leukocyte homing and adhesion. *Immunol. Rev.* 108,135-161.
- [229] Welle S., Thornton C., Statt M., 1995. Myofibrillar protein synthesis in young and old human subjects after three months of resistance training. *Am. J. Physiol.* 268, E422-E427.
- [230] Wen X., Klionsky D.J., 2016 Autophagy is a key factor in maintaining the regenerative capacity of muscle stem cells by promoting quiescence and preventing senescence. *Autophagy* 12, 617–618.
- [231] Wiederanders B., Oelke B., 1984. Accumulation of inactive cathepsin D in old rats. *Mech. Ageing Dev.* 24,265-271.
- [232] Wilkinson D.J., Piasecki M., Atherton P.J., 2018. The age-related loss of skeletal muscle mass and function: Measurement and physiology of muscle fibre atrophy and muscle fibre loss in humans. *Ageing Res Rev.* 47, 123–132.
- [233] Williams A.F., Barclay A.N., 1988. The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 6,381-405.
- [234] Winnicka A., 2015. Wartości referencyjne podstawowych badań laboratoryjnych w weterynarii. Wydanie VI zmienione. Wydawnictwo SGGW. Warszawa.
- [235] Wohlfart G., 1937. Uber das Vorkommen verschiedener Arten von Muskelfasern in der Skelettmuskulatur des Menschen und einiger S ugetiere. *Acta psychiat.* 13, 1-19.
- [236] Wohlfart G., 1949. Muscular trophy in diseases of the lower motor neuron; contribution to the anatomy of the motor units. *Arch. Neurol. Psychiat.* 61, 599-620.
- [237] Wohlgemuth S.E., Seo A.Y., Marzetti E., Lees H.A., Leeuwenburgh C., 2010. Skeletal muscle autophagy and apoptosis during aging: effects of calorie restriction and life-long exercise. *Exp. Gerontol.* 45(2), 138-148.
- [238] Wojtysiak D., Poltowicz K., Migdal W., 2012. Effect of breed and age on histopathological changes in pig m. semimembranosus. *Ann. Anim. Sci.* 12, 311-321.

- [239] Xiong Y., Hla T., 2014. S1P control of endothelial integrity, *Curr. Top. Microbiol.Immunol.* 378, 85–105.
- [240] Yamaguchi A., Katagiri T., Ikeda T., Wozney J.M., Rosen V., Wang E.A., Kahn A.J., Suda T., Yoshiki S., 1991. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *J. Cell. Biol.* 113,681–687.
- [241] Yin H., Price F., Rudnicki M. A., 2013.Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol. Rev.* 93, 23-67.
- [242] Yu J., Lei L., Liang Y., Hinh L., Hickey R.P. Huang Y., Liu D., Yeh J.L., Rebar E., Case C., Spratt K., Sessa W.C., Giordano F.J., 2006. An engineered VEGF-activating zinc finger protein transcription factor improves blood flow and limb salvage in advanced-age mice. *20(3)*,479-81.
- [243] Zainal T.A., Oberley T.D., Allison D.B., Szweda L.I., Weindruch R., 2000. Caloric restriction of rhesus monkeys lowers oxidative damage in skeletal muscle. *FASEB J.* 14(12),1825-36.
- [244] Zammit P., Beauchamp J., 2001. The skeletal muscle satellite cell: stem cell or son of stem cell? *Differentiation.* 68(4-5),193-204.
- [245] Zhang C., Liu V.W., Addressi C.L., Sheffield D.A., Linnane A.W., Nagley P., 1998. Differential occurrence of mutations in mitochondrial DNA of human skeletal muscle during aging. *Hum. Mutat.* 11,360-371.
- [246] Zink M. C., Van Dyke J. B., 2013. *Canine Sports Medicine and Rehabilitation.*Wiley-Blackwell Publishing, Chichester, UK.
- [247] Zoran D.L., 2010. Obesity in dogs and cats: a metabolic and endocrine disorder. *40(2)*,221-39.

8. STRESZCZENIE

Wpływ procesu starzenia na mikrostrukturę wybranych mięśni szkieletowych psów

lek. wet. Sebastian Słodki

Słowa kluczowe: starzenie mięśni, psy, mikrostruktura mięśni

Starzenie się mięśni to wciąż aktualny i bardzo szeroko omawiany temat zarówno w medycynie ludzkiej, jak i weterynaryjnej. W odniesieniu do zwierząt towarzyszących, w tym psów i kotów, jest to nadal mało poznane zagadnienie. Istnieje stosunkowo niewielka liczba prac naukowych, opisujących zmiany zachodzące u tych zwierząt wraz z upływem lat. Starzeniu towarzyszy szereg zmian mikrostrukturalnych w mięśniach, a także morfologicznych i biochemicznych we krwi. Celem pracy była ocena wpływu procesów starzenia na cechy mikrostruktury mięśnia dwugłowego ramienia (*m. biceps brachii* - *BB*) i czworogłowego uda (*m. quadriceps femoris* - *QF*) psów. Cele szczegółowe obejmowały: ocenę mikrostruktury mięśni *BB* i *QF*, w tym profilu fizjologiczno-biochemicznego włókien mięśniowych, oraz zmian histopatologicznych w trakcie starzenia się psów, ocenę wpływu procesów starzenia na kapilaryzację (mikrounaczynienie) mięśni oraz zdolność do regeneracji włókien mięśniowych na podstawie określenia liczby komórek satelitarnych u psów, a także określenie współzależności między poszczególnymi cechami mikrostruktury mięśni oraz parametrami biochemicznymi i hematologicznymi krwi.

Do badań zakwalifikowano 33 psy w przedziale wiekowym od 8 tygodni do 18 lat. Psy podzielono na 4 grupy wiekowe: grupa I - psy od urodzenia do 1 roku życia (4 osobniki), grupa II - psy od 1 do 5 roku życia (4 osobniki), grupa III - psy od 5 do 10 roku życia (10 osobników), oraz grupa IV - psy powyżej 10 roku życia (15 osobników). Wszystkie wymienione psy zmarły naturalnie z powodu istniejącej choroby lub zostały poddane eutanazji w zakładzie leczniczym dla zwierząt według wskazań medycznych, zgodnie z obowiązującą w Polsce ustawą o ochronie praw zwierząt. Wszyscy opiekunowie psów wyrazili

zgodę na pobranie pośmiertne wycinków mięśni do badań. U żadnego z powyższych zwierząt nie stwierdzono współistniejącej choroby mającej bezpośredni wpływ na procesy starzenia, a tym samym degeneracji mięśni szkieletowych. Krew do analizy pobierana była od zwierząt w celach diagnostycznych, w trakcie ich leczenia oraz podczas procedury eutanazji. Badanie krwi miało pozwolić na dokładne określenie stanu zdrowotnego badanych zwierząt i jego wpływu na wyniki badań mięśni. Bezpośrednio po śmierci psów pobrano wycinki mięśni *BB* i *QF* w celu wykonania preparatów histologicznych techniką kriokatową i parafinową. Wykonano następujące barwienia histochemiczne: reakcję na aktywność enzymu reduktazy tetrazolinowej NADH-TR w celu określenia typów włókien mięśniowych, topograficzne barwienie przeglądowe H+E (hematoksyliną i eozyną) w celu określenia zmian histopatologicznych w mięśniach oraz barwienie Oil Red (czerwienią oleistą) w celu określenia poziomu śródmięśniowej tkanki tłuszczowej. W badaniach immunohistochemicznych przeprowadzono reakcję z wykorzystaniem przeciwciała przeciw CD31 celem oceny mikrounaczynienia mięśni oraz reakcję immunohistochemiczną na obecność białka swoistego dla komórek satelitarnych – Pax-7 celem określenia potencjału regeneracyjnego komórek mięśniowych psów w poszczególnych grupach wiekowych. Sporządzone preparaty histologiczne analizowano pod mikroskopem świetlnym Ci-L firmy NIKON wyposażonego w kamerę NIKON DS-Fi3 o rozdzielczości 5,9 MPix. Analizy obrazów mikroskopowych przeprowadzono, wykorzystując program NIS ELEMENTS. Uzyskane dane, celem weryfikacji wyników, poddano analizie statystycznej zgodnie z metodami wnioskowania statystycznego.

Wraz z wiekiem psów nie stwierdzono zmian w udziałach procentowych poszczególnych typów włókien mięśniowych w badanych mięśniach. Obserwowana tendencja do zwiększenia odsetka włókien oksydacyjnych, szczególnie w przypadku mięśnia *BB*, może wskazywać na to, że zdolność

oksydacyjna mięśni szkieletowych nie uległa spadkowi wraz z wiekiem. W obu badanych mięśniach największą liczbę kapilar stwierdzono w grupie psów od 1 roku do 5 lat i różniła się ona istotnie z grupą psów najmłodszych (do 1 roku) oraz najstarszych (powyżej 10 lat). Taki wynik świadczyć może o dopiero rozpoczętym procesie angiogenezy w młodym wieku zwierząt lub zmniejszeniu mikrounaczynienia w wieku starszym. Największą liczbę prawidłowo zbudowanych włókien mięśniowych oraz najmniejszy odsetek zmian patologicznych w mięśniu *BB* i *QF* stwierdzono w grupie psów najmłodszych. Wraz z procesem starzenia mięśni następowało zwiększenie udziału włókien atroficznych oraz tkanki łącznej, której bardzo rozległy przerost obserwowano tylko u psów powyżej 5 lat i geriatrycznych. Nie stwierdzono różnic w liczbie komórek satelitarnych między badanymi grupami psów, obserwowano jedynie tendencję spadkową liczby komórek Pax 7-pozytywnych wraz z wiekiem, aczkolwiek proces ten jest uzależniony od wielu czynników osobniczych, w tym także chorobowych. Starzejące się mięśnie psów, w związku ze spadkiem stopnia unaczynienia oraz liczby komórek satelitarnych, wykazują mniejszy potencjał regeneracyjny, a tym samym tendencję do zwiększania się liczby zmian patologicznych. Należy podkreślić, że rodzaj oraz stopień nasilenia zmian patologicznych i degeneracyjnych w tkance mięśniowej u starzejących się psów w dużym stopniu zależy zarówno od ich dobrostanu, jak i współistniejących chorób narządowych. Na podstawie uzyskanych korelacji stwierdzono, że wzrostowi kapilaryzacji mięśni towarzyszy znaczący wzrost liczby krwinek czerwonych we krwi. Prawdopodobnie jest to związane z faktem, że krwinki czerwone są głównym źródłem sfingozyno-1-fosforanu (S1P) stymulującego migrację komórek śródbłonna naczyniowego, a także dojrzewanie nowo powstałych naczyń i formowanie bariery naczyniowej. Ponadto wraz z wiekiem psów wzrasta udział zmian patologicznych w obrębie tkanki mięśniowej, czemu towarzyszy wzrost poziomu kinazy kreatynowej (CK) we krwi, która jest ważnym markerem stopnia uszkodzenia tkanki mięśniowej, oraz zwiększona

liczba leukocytów, w tym głównie neutrofilii, co jest związane z toczącymi się procesami zapalnymi, a także regeneracyjnymi uszkodzonych włókien mięśniowych.

Uzyskane wyniki badań nad wpływem procesu starzenia na mikrostrukturę wybranych mięśni szkieletowych psów ze względu na swój pod wieloma względami pionierski charakter są cenną bazą danych do dalszych prac badawczych, w tym także do określenia roli fizjoterapii w opóźnianiu procesów starzenia tkanki mięśniowej psów oraz jej zdolności regeneracyjnych.

9. ABSTRACT

Effect of the aging process on the microstructure of selected skeletal muscles in dogs

DVM Sebastian Słodki

Key words: aging muscles, dogs, muscles microstructure

Muscle aging is still a current and widely discussed topic in both human and veterinary medicine. With regard to companion animals, including dogs and cats, this is still not well known. Relatively few scientific works describe the age-related changes in these animals. Aging is accompanied by several microstructural changes in the muscles as well as morphological and biochemical in the blood. The thesis aimed to assess the influence of aging processes on the microstructure of the biceps brachii (BB) and quadriceps (QF) muscles of dogs. The detailed objectives included: assessment of the BB and QF muscle microstructure, including the physiological and biochemical profile of muscle fibers and histopathological changes during the aging of dogs, assessment of the impact of aging processes on muscle capillarization (microvascularisation), and the ability to regenerate muscle fibers based on the calculation of the number of satellite cells in dogs and to determine the correlation between the individual features of the muscle microstructure as well as the biochemical and hematological parameters of the blood.

Thirty-three dogs ranging in age from 8 weeks to 18 years old were enrolled in the study. They were divided into 4 age groups: group I - dogs from birth to 1 year of age (4 individuals), group II - dogs from 1 to 5 years of age (4 individuals), group III - dogs from 5 to 10 years of age (10 individuals), and group IV - dogs over 10 years of age (15 individuals). All these dogs died naturally due to an existing disease or were euthanized in an animal treatment facility according to medical indications, in accordance with the Polish Animal Protection Act. All dog owners consented to the post-mortem collection of muscle biopsies for testing. In none of the above animals was found a concomitant disease that had

a direct impact on the aging processes, and thus skeletal muscle degeneration. Blood was collected for analysis from animals for diagnostic purposes, during their treatment, and during the euthanasia procedure. The blood test was to accurately measure the health status of the tested animals and its impact on the results of tested muscles. Immediately after the death of the dogs, sections of BB and QF muscles were taken for histological preparations using the cryo and paraffin technique. The following histochemical staining was performed: reaction to the activity of the enzyme NADH-TR tetrazolium reductase to determine the types of muscle fibers, H + E (hematoxylin and eosin) staining to determine the histopathological changes in the muscles, and Oil Red staining to determine the level of intramuscular adipose tissue. In immunohistochemical testing, a reaction using an anti-CD31 antibody was carried out to assess muscle microvasculature, and an immunohistochemical reaction to the presence of a satellite-specific protein - Pax-7 to determine the regenerative potential of canine muscle cells in the different age groups. The histological preparations were analyzed under the NIKON Ci-L light microscope equipped with a NIKON DS-Fi3 camera with a resolution of 5.9 MPix. Analyzes of microscopic images were performed using the NIS ELEMENTS program. The obtained data, in order to verify the results, were subjected to statistical analysis in accordance with the methods of statistical inference.

With the age of the dogs, there was no change in the percentage of each type of muscle fiber in the muscles tested. The observed tendency to increase the percentage of oxidative fibers, especially in the case of the BB muscle, may indicate that the oxidative capacity of skeletal muscles did not decrease with age.

In both examined muscles, the highest number of capillaries was found in the group of dogs from 1 to 5 years of age, and it differed significantly from the group of the youngest (up to 1 year) and the oldest (over 10 years) dogs. Such a result may indicate that the angiogenesis process has just started at a young age of animals or a decrease in microvascularization at an older age. The youngest

dogs had the highest number of correctly built muscle fibers and the lowest percentage of pathological changes in the BB and QF muscles. Along with the aging of muscles, there was an increase in the share of atrophic fibers and connective tissue. A very extensive overgrowth of this tissue was observed only in dogs over 5 years old and in geriatric dogs. There were no differences in the number of satellite cells between the examined groups of dogs, only a decreasing trend in the number of Pax 7-positive cells with age was observed, although this process depends on many individual factors, including disease ones. Aging muscles of dogs, due to the decrease in the degree of vascularization and the number of satellite cells, show a lower regenerative potential, and thus a tendency to increase the number of pathological changes. It should be emphasized that the type and severity of pathological and degenerative changes in the muscle tissue of aging dogs largely depend on both their welfare and concomitant organ disease. Based on the obtained correlations, it was found that the increase in muscle capillarization was accompanied by a significant increase in the number of red blood cells in the blood. This is probably due to the fact that red blood cells are the main source of sphingosine-1-phosphate (S1P), which stimulates the migration of vascular endothelial cells, as well as the maturation of newly formed vessels and the formation of the vascular barrier. In addition, with age, the share of pathological changes in the canine muscle tissue increases, which is accompanied by an increase in the level of creatine kinase (CK) in the blood, which is an important marker of the degree of muscle tissue damage, as well as an increased number of leukocytes, mainly neutrophils, which is connected with ongoing inflammatory and regenerative processes of damaged muscle fibers.

The obtained results of research on the influence of the aging process on the microstructure of selected skeletal muscles of dogs, due to their pioneering nature, are a valuable database for further research in this area, including the role of physiotherapy in delaying the aging processes of the canine muscle tissue and its regenerative abilities.