

Vilniaus Universitetas

Edvardas Žurauskas

ŽMOGAUS ŠIRDIES LAIDŽIOSIOS SISTEMOS
VAIZDINIMO GALIMYBIŲ ĮVERTINIMAS PAGAL
MORFOSPEKTRINIUS IR PROTEOMINIUS TYRIMUS

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, medicina (07B)

Vilnius 2010

Disertacija rengta 2001-2009 metais Vilniaus universitete.

Moksliniai konsultantai

prof. habil. dr. Ričardas Rotomskis (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biofizika – 02B)

doc.dr. Algimantas Jasulaitis (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 07B)

TURINYS

1. ĮVADAS	5
2. TYRIMO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI	8
3. GINAMIEJI TEIGINIAI	9
4. AKTUALUMAS	11
5. NAUJUMAS IR ORIGINALUMAS	13
6. LITERATŪROS APŽVALGA	15
6.1. Žmogaus širdies laidžiosios sistemos morfologija	17
6.2. Žmogaus širdies laidžiosios sistemos tyrimų sunkumai	26
6.3. Žmogaus širdies laidžiosios sistemos anatominių ir histologinių tyrimų apžvalga	35
6.4. Širdies laidžiosios sistemos baltymų tyrimai	40
6.5. Širdies laidžiosios sistemos fluorescenciniai tyrimai	42
7. MEDŽIAGOS IR METODAI	48
7.1. Širdies audinių tyrimai rentgeno elektroniniu mikroskopu	48
7.2. Širdies audinių sugerties FT-IR spektroskopiniai tyrimai	49
7.3. Širdies audinių ultravioletinės sugerties tyrimai	49
7.4. Miokardo ir širdies laidžiosios sistemos histocheminiai dažymai	50
7.5. Širdies audinių savitosios fluorescencijos ir jos žadinimo spektroskopiniai tyrimai	53
7.6. Vaizdinimo eksperimentai	54
7.7. Širdies audinių homogenatų tyrimas	55
7.8. Elektroforetinis baltymų frakcionavimas	57
7.9. Miokardo ir širdies laidžiosios sistemos audinių dviejų kryptių elektroforezė	58
8. REZULTATAI	60
8.1. Žmogaus širdies laidžiosios sistemos preparavimo metodika	60
8.2. Širdies audinių tyrimai rentgeno elektroniniu mikroskopu	62
8.3. Širdies mėginių sugerties FT-IR spektroskopiniai tyrimai	66
8.4. Širdies audinių ultravioletinės sugerties spektrai	74
8.5. Miokardo ir širdies laidžiosios sistemos histocheminiai dažymai	78

8.6. Širdies audinių savitosios fluorescencijos ir jos žadinimo spektroskopiniai tyrimai	83
8.7. Optimalios miokardo ir Hiso pluošto atskyrimo sąlygos	94
8.8. Vaizdinimo eksperimentai	95
8.9. Širdies audinių homogenatų tyrimas	103
8.10. Elektroforetinis baltymų frakcionavimas	114
8.11. Miokardo ir širdies laidžiosios sistemos baltymų dviejų krypčių elektroforezė	121
9. REZULTATŲ APTARIMAS	124
10. IŠVADOS	131
11. PUBLIKACIJOS	133
12. LITERATŪROS SĄRAŠAS	142
13. SANTRUMPOS	152

1. ĮVADAS

Žmogaus širdies laidžioji sistema (ŠLS) yra specializuotas raumeninės kilmės audinys, kuris generuoja ir perduoda bioelektrinį impulsą, sinchroniškai sužadinantį atskirų miokardo sričių susitraukimą. Žmogaus širdies laidžiosios sistemos komponentai randami visose širdies srityse, todėl dauguma patologinių procesų neišvengiamai pažeidžia šią sistemą, trikdydami sinchronišką miokardo sužadimą ir efektyvų širdies darbą. Impulso plitimas gali sutrikti bet kurioje žmogaus širdies laidžiosios sistemos dalyje: sinusiniame mazge, atrioventrikuliniame mazge ir Hiso pluošte ar vienoje iš Hiso pluošto šakų. Vaikų širdies ritmo sutrikimai dažniausiai atsiranda dėl įgimtų laidžiosios sistemos anomalijų ir ektopinių šios sistemos židinių. Įgimti papildomi laidumo takai (Kento pluoštas) sukelia Wolff-Parkinson-White sindromą ir išsivysčius supraventrikulinėms tachikardijoms gali būti staigios mirties priežastimi. Širdies ligos ir jas komplikuojantys laidumo ir ritmo sutrikimai yra viena iš dažniausių mirties priežasčių civilizuotame pasaulyje. Apie 12% staigios kardialinės mirties atvejų anatomiciniai, mikroskopiniai ir biocheminiai širdies tyrimai nepaaiškina mirties priežasčių.

Kaip atskira struktūra žmogaus širdies laidžioji sistema aprašyta XX amžiaus pradžioje, tačiau dar penkis dešimtmečius vyko diskusijos ar ši sistema, tiksliau skilvelinė jos dalis, egzistuoja kaip atskiras anatomicinis žmogaus širdies darinys. Šias diskusijas lėmė tai, kad morfologiniai žmogaus širdies laidžiosios sistemos tyrimai yra ganėtinai sudėtingi. Tiek makroskopiškai, tiek histologiškai žmogaus širdies laidžiąją sistemą sunku atskirti nuo aplinkinių audinių, todėl siekiant įrodyti, kad tiriamojo audinio fragmentas priklauso ŠLS, būtina rasti jo ryšį su kitomis laidžiosios sistemos dalimis, t.y. būtina surasti ir ištirti visą skilvelinę širdies laidžiąją sistemą, o tai reikalauja ilgų, didelių laiko ir darbo sąnaudų. Dėl šių techninių tyrimo sunkumų, žinios apie žmogaus širdies laidžiąją sistemą yra negausios ir fragmentiškos, dažniausiai apsiriboja atskirų atvejų aprašymais, morfologiniai

radiniai prastai koreliuoja su klinikiniu vaizdu. Šiuo metu vis dar nėra vieningos nuomonės ar egzistuoja anatomiciniai laidumo takai tarp sinusinio ir atrioventrikulinio širdies laidžiosios sistemos mazgų, žmogaus širdies laidžiosios sistemos ir atskirų jos dalių matmenys literatūroje pateikiami labai skirtingi. Aprašyti anatomiciniai variantai, įgimtos ŠLS anomalijos, tačiau jų dažnumas ir pasiskirstymas nėra žinomi. Daugelio įgimtų širdies ydų atvejais, žmogaus širdies laidžiosios sistemos išsidėstymas išvis nėra žinomas. Žmogaus, mirusio dėl širdies laidumo sutrikimų širdyje dažnai nepavyksta rasti jokių svarbesnių pataloginių širdies laidžiosios sistemos pakitimų, ir atvirškščiai – ryškūs pataloginiai pokyčiai aptinkami širdyse tų žmonių, kurie niekada nesirgo širdies laidumo ir ritmo sutrikimais.

Tokius duomenų neatitikimus galima paaiškinti sudėtingomis žmogaus širdies laidžiosios sistemos tyrimo metodikomis. Anatomicinis šios struktūros preparavimas daugeliui tyrėjų pasirodė per daug sudėtingas ir šiuo metu beveik nebenaudojamas. Žmogaus širdies laidžiosios sistemos aprašymai ir tyrimai paremti iš histologinių pjūvių rekonstruotomis topografinėmis schemomis. Patikrinti, kiek šios schemas atitinka tikrovę neįmanoma, nes histologinių pjūvių gamybos metu sunaikinamas anatomicinis širdies preparatas.

Morfologiniai skirtumai, kurie leistų atskirti žmogaus širdies laidžiąją sistemą nuo miokardo, literatūroje aprašomi taip pat prieštarinčiai. Vienių tyrėjų aprašytų skirtumų kitiems dažnai nepavyksta patvirtinti, ir tokį duomenų nesutapimą galima paaiškinti skirtingų žmogaus širdies laidžiosios sistemos dalių analize. Pavyzdžiui, atrioventrikuliniame mazge gausu nervinių rezginių, turinčių sukcinatdehidrogenazės ir cholinesterazės, kitose širdies laidžiosios sistemos srityse nervinių rezginių su šiomis medžiagomis nėra.

Šiuo metu nėra sukurta tinkama žmogaus širdies laidžiosios sistemos vaizdinimo metodika, kuri palengvintų ne tik embriologinius, anatomicinius šios sistemos tyrimus, bet ir klinikinę praktiką. Operacijos metu, stovint širdžiai ir nesant elektrinės veiklos, elektrofiziologiniais metodais neįmanoma nustatyti širdies laidžiosios sistemos lokalizacijos,

netipiškas laidžiosios sistemos išsidėstymas gali tapti jos chirurginio pažeidimo priežastimi su sunkiomis pooperacinėmis komplikacijomis. Žmogaus širdies laidžiosios sistemos vaizdinimas operacijos metu padėtų išvengti šios sistemos pažeidimų.

Nors žmogaus širdies laidžiosios sistemos anatomija ir histologinė struktūra aprašyta daugiau nei prieš 100 metų, šiuo metu tikslinga peržiūrėti, patikslinti ir papildyti šias žinias. Šiam tikslui pasiekti būtina turėti specifiską, patikimą ir nesudėtingą, tinkamą kasdieniniam naudojimui, žmogaus širdies laidžiosios sistemos vaizdinimo metodiką.

2. TYRIMO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas:

Nustatyti morfologinius ir spektrinius skirtumus tarp žmogaus širdies laidžiosios sistemos, miokardo ir širdies jungiamojo audinio bei naudojantis šiais skirtumais sukurti žmogaus širdies laidžiosios sistemos vaizdinimo metodiką.

Darbo uždaviniai

1. Paruošti žmogaus širdies laidžiosios sistemos preparavimo metodiką, leidžiančią gauti širdies laidžiosios sistemos audinį be kitų širdies audinių ir pateikti žmogaus širdies audinių mėginius spektroskopiniams bei proteominiams tyrimams.
2. Ištirti žmogaus širdies laidžiosios sistemos ir kitų širdies audinių rentgenoelektroninius, infraraudonosios ir ultravioletinės (UV) sugerties bei savitosios fluorescencijos emisijos ir fluorescencijos žadinimo spektrus ir nustatyti parametrus ir spektrines sritis kuriose stebimi ženklūs žmogaus širdies laidžiosios sistemos ir kitų žmogaus širdies audinių skirtumai, naudotini širdies laidžiosios sistemos vaizdinimui širdies audinių fone.
3. Elektroforezės metodu palyginti žmogaus širdies laidžiosios sistemos ir kitų širdies audinių homogenatų baltyminę sudėtį bei jų spektrines savybes ir užregistruoti baltymų sąstato skirtumus.
4. Apibendrinus eksperimentinių tyrimų rezultatus nustatyti statistiškai patikimus skirtumus tarp žmogaus širdies laidžiosios sistemos ir kitų širdies audinių ir įvertinti jų panaudojimo galimybes kuriant laidžiosios sistemos vaizdinimo metodiką.
5. Atlikti žmogaus širdies laidžiosios sistemos vaizdinimo eksperimentus.

3. GINAMIEJI TEIGINIAI

1. Širdies laidžiojoje sistemoje bioelektrinio potencialo atsiradimui svarbūs yra jonai, tačiau atlikti tyrimai rentgenoelektroniniu mikroskopu, parodė, kad fosforo, kalcio, chloro, sieros, silicio, natrio ir kalio kiekiai žmogaus širdies laidžiosios sistemos Hiso pluošte (HP) ir miokarde (MK) paklaidų ribose yra vienodi. Todėl rentgenoelektroninės mikroskopijos metodas neleidžia atskirti žmogaus širdies laidžiąją sistemą nuo miokardo.
2. Skirtumai, nustatyti Hiso pluošto ir miokardo mėginių Furje transformacijų infraraudonosios (FT-IR) sugerties spektruose, leidžia daryti išvadą, kad žmogaus širdies laidžiosios sistemos Hiso pluoštas ir miokardas turi morfologinių skirtumų. Vienareikšmiškai žmogaus širdies laidžiosios sistemos ir miokardo mėginių FT-IR sugerties spektrų juostas priskirti konkrečių molekulių grupių virpesiams ir įvertinti skirtumų priežastis nėra įmanoma, nes biologinių audinių ir infraraudonosios sugerties spektrai yra amino rūgščių, priklausančių baltymams, peptidams ir laisvoms amino rūgštims, spektrų visuma, vienareikšmiškai nesusieta su audinio morfologija. Tačiau naudojantis IR spektro juostų ties 1450 cm^{-1} ir 1400 cm^{-1} pralaidumų santykiais galima tiksliai atskirti žmogaus širdies laidžiąją sistemą nuo miokardo.
3. Žmogaus širdies laidžiosios sistemos Hiso pluošto ir miokardo UV sugerties spektrai skiriasi savo intensyvumu aromatinių aminorūgščių sugerties srityje nuo 250 nm iki 300 nm. Nustatyta, kad žmogaus širdies Hiso pluošte triptofano yra apie 2, o tirozino apie 4 kartus daugiau negu miokarde. Vaizdinimui naudojant šioje spektro srityje spinduliuojančius šviesos šaltinius galima tikėtis skirtingos širdies audinių fluorescencijos, o tuo pačiu ir galimybės optiškai registruoti žmogaus širdies laidžiosios sistemos vaizdą kitų širdį sudarančių audinių fone.

4. Didžiausi žmogaus širdies laidžiosios sistemos Hiso pluošto ir miokardo savitosios fluorescencijos spektrų intensyvumų skirtumai stebimi 420-465 nm srityje, žadinant 320 – 370 nm srityje.
5. Žmogaus širdies laidžiosios sistemos Hiso pluoštą ir jo šakas galima spektroskopiškai atskirti nuo širdies jungiamojo audinio žadinant kolageno (330 nm) ir elastino (385 nm) sugerties juostose ir registruojant fluorescencijos intensyvumo pokyčius ties 460 nm.
6. Atlikus elektroforezę Hiso pluošto audinyje rasta apie 26 kDa molekulinės masės baltymų grupė, kurios nėra miokarde ir širdies jungiamajame audinyje.

4. AKTUALUMAS

Sergamumas širdies ir kraujagyslių ligomis sparčiai didėja. Tai ypač pastebima besivystančių regionų šalyse. Ne išimtis ir Lietuva. Visame pasaulyje nuo širdies ir kraujagyslių ligų praėjusiais metais mirė mažiausiai 16 mln. žmonių. Lietuvos žmonių mirštamumas nuo širdies ir kraujagyslių ligų smarkiai lenkia Europos Sąjungos vidurkį. Mūsų šalyje mirtys dėl širdies ir kraujagyslių sistemos patologijos sudaro daugiau kaip 54 proc. visų mirties priežasčių. Dauguma širdies ligų gali komplikotis širdies laidumo ir ritmo sutrikimais dėl širdies laidžiosios sistemos ar ją aprūpinančių kraujagyslių pažeidimo. Pavyzdžiui, tokia paplitusi liga kaip aterosklerozė, sukeldama dešinės vainikinės arterijos stenozę, laipsniškai arba staiga sutrikdo kraujo patekimą į sinusinį mazgą bei prieširdžių audinius ir tai sutrikdo elektrinio impulso atsiradimą, nuoseklų sklidimą bei normalų širdies susitraukimą. Sumažėjusi kraujotaka gali sukelti sinusinio mazgo fibrozę ir mikroskopinius randus prieširdžių sienelėje, todėl gali atsirasti vietų, kuriose sutrinka laidumas ar net išsivysto blokada. Vietos, kuriose yra sumažėjęs impulso sklidimo greitis, sudaro sąlygas grįžtamojo sujaudinimo mechanizmui atsirasti, o tai jau gali paskatinti prieširdžių virpėjimo išsivystymą. Širdies kairės vainikinės arterijos aterosklerotinė stenozę trikdo Hiso pluošto šakų aprūpinimą krauju, sukelia fibrozinis miokardo ir laidžiosios sistemos pakitimus, dėl ko atsiranda Hiso pluošto ar jo šakų blokada. Miokardo infarktas gali komplikotis atrioventrikuline ar intraskilveline blokada, skilveline tachikardija, skilvelių virpėjimu. Skilvelių virpėjimas lemia apie 70 proc. staigių, ne liginėje įvykstančių mirčių.

Kitos širdies ligos, tokios kaip hipertenzinė širdies liga, miokarditai, kardiomiopatijos, infiltracinės širdies ligos taip pat gali pažeisti bet kurią laidžiosios sistemos sritį ir tapti staigios mirties priežastimi. Taip pat sutinkamos įgimtos, izoliuotos širdies laidžiosios sistemos ydos, nesusijusios su kita širdies patologija.

Širdies laidžiosios sistemos anomalijos ar neįprasti anatomiciniai variantai aptinkami kartu su įgimtomis širdies ydomis, kurios gydomos chirurginiais metodais. Širdies operacijų metu, kai širdis sustabdoma ir nėra elektrinės veiklos, laidžiosios sistemos lokalizacijos nustatyti elektrofiziologiniais metodais neįmanoma, tokių operacijų metu iškyla tiesioginio ar netiesioginio chirurginio širdies laidžiosios sistemos pažeidimo grėsmė.

Del šių priežasčių žmogaus širdies laidžiosios sistemos patologija ir jos tyrimai išlieka aktualia problema. Dauguma patologijos ir teismo medicinos laboratorijų šiuo metu sistemingai netiria žmogaus širdies laidžiosios sistemos patologijos, nes šios sistemos morfologiniai tyrimai reikalauja daug laiko, pastangų ir įgūdžių. Literatūroje galima rasti duomenų tik apie nedideles šios sistemos tyrimų serijas. Sistemingi žmogaus širdies laidžiosios sistemos tyrimai suteiktų naujos informacijos apie šios gyvybiškai svarbios sistemos būklę įvairių širdies ligų atvejais. Radus specifinį širdies laidžiosios sistemos vaizdinimo metodą patologiniai tyrimai taptų paprastesni ir prieinami daugeliui tyrėjų.

Pavykus sukurti vaizdinimo metodiką, neturinčią žalingo poveikio laidžiosios sistemos ir kitiems širdies audiniams, nedarančią įtakos širdies funkcijai, ją būtų galima naudoti širdies operacijų metu. Tokią galimybę suteikia fluorescenciniai tyrimai, kurie gali būti atliekami nepažeidžiant audinių ir leidžia gauti informaciją apie jų sudėtį ir struktūrą nedelsiant, net operacijos eigoje.

5. NAUJUMAS IR ORIGINALUMAS

Dauguma širdies laidžiosios sistemos tyrinėjimų atliekami naudojant nedidelius eksperimentinius gyvūnus, kurių širdis nesunku tirti histologiniais metodais. Žmogaus širdies laidžiosios sistemos tyrimai yra kur kas retesni, daugiausia dėl techninių šių tyrimų sunkumų. Dažniausiai aprašomos nedidelės iširtų atvejų serijos, kuriose histologiniais metodais ieškomi pakitimai tam tikrose laidžiosios sistemos srityse. Daugiausiai tiriami sinusinis ar atrioventrikulinis mazgai ir Hiso pluoštas. Šie tyrimai atliekami naudojant širdies audinių fragmentus kartu su žmogaus širdies laidžiosios sistemos audiniu. Izoliuotas žmogaus širdies laidžiosios sistemos audinys nėra tirtas. Disertacijoje naudota žmogaus širdies laidžiosios sistemos makroskopinė/mikroskopinė preparavimo metodika leidžia gauti širdies laidžiosios sistemos audinį be kitų širdies audinių, ir pateikti atskirų audinių mėginius tolimesniems tyrimams. Todėl atlikti spektroskopiniai ir proteominiai tyrimai yra originalūs, analogiškų tyrimų, atliktų naudojant išpreparuotą žmogaus širdies laidžiosios sistemos audinį, nėra aprašyta. Pirmą kartą užregistruoti žmogaus širdies laidžiosios sistemos ir miokardo sugerties spektrai, kurie parodė, kad širdies laidžiosios sistemos audinyje yra didesnė nei miokarde aromatinų amino rūgščių koncentracija.

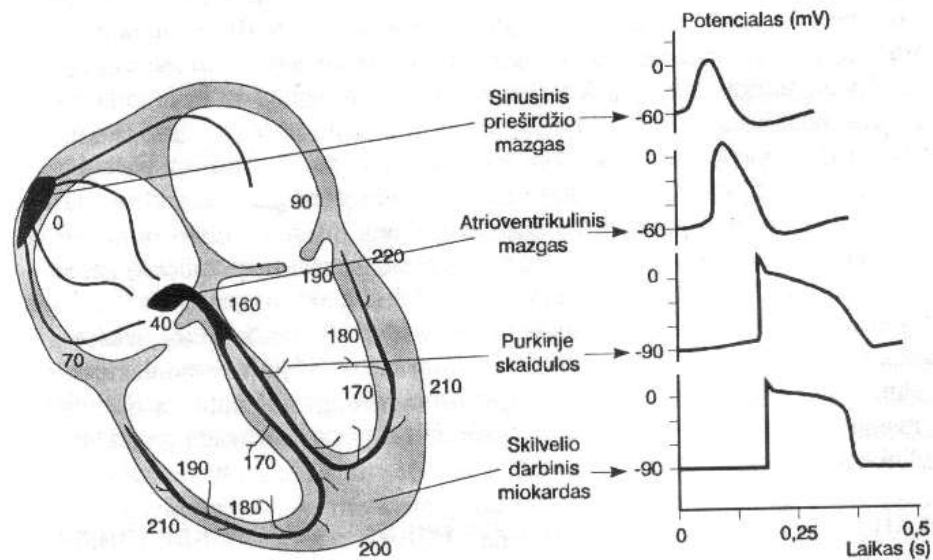
Remiantis atliktų žmogaus širdies laidžiosios sistemos ir kitų žmogaus širdies audinių spektroskopinių tyrimų rezultatais, pirmą kartą nustatytos optimalios šių audinių atskyrimo sąlygos (optimalūs fluorescencijos žadinimo spinduliuotės bangų ilgiai ir fluorescencijos registravimo sritys), atlikti vaizdinimo eksperimentai.

Naudojant išpreparuotą žmogaus širdies laidžiosios sistemos audinį atlikti pirmieji palyginamieji proteominiai tyrimai, rasta žmogaus širdies laidžiajai sistemai būdinga baltymų grupė, kurios nėra miokarde ir širdies jungiamajame audinyje. Darbe pateiktos originalios histologinių ir makroskopinių vaizdų, vaizdinimo eksperimentų iliustracijos.

Kadangi visuotinai pripažinti morfologiniai skirtumai tarp žmogaus širdies laidžiosios sistemos ir kitų žmogaus širdies audinių nėra žinomi, atlikti tyrimai suteikia naujos informacijos apie širdies audinių morfologines ypatybes.

6. LITERATŪROS APŽVALGA

Žmogaus širdis per vidutinį gyvenimo laiką susitraukia maždaug tris bilijonus kartų. Kiekvienas širdies susitraukimo ciklas priklauso nuo specializuoto širdies audinio, kuris sukelia ir perduoda bioelektrinį impulsą, tam tikru širdies ciklo momentu sužadinantį atskiras širdies raumens sritis. Šis specializuotas širdies audinys vadinamas širdies laidžiąja sistema (ŠLS). Šią sistemą sudaro sinusinis mazgas (SA), atrioventrikulinis (AV) mazgas, Hiso pluoštas (HP) ir jo šakos, Purkinje ląstelės [1]. Sinusiniame mazge atsiradęs impulsas plinta į aplinkinius prieširdžių audinius koncentriškai visomis kryptimis. Sklisdamas truputį mažesniu nei 1 m/s greičiu, per 40 ms impulsas pasiekia AV mazgą. Šiame mazge impulso sklidimo greitis sumažėja iki 0,05 m/s. Plitimo sulėtėjimas AV mazge stabdo impulsą 100-120 ms, tai leidžia pilnai depoliarizuotis prieširdžiams prieš sujauinant skilvelius. Maždaug per 0,11 sekundės impulsas pereina per AV mazgą ir pasiekia Hiso pluoštą, kuriame impulso sklidimo greitis yra pats didžiausias – 5 m/s. Šis pluoštas turi dešinę ir kairę šakas (kojytes), pernešančias depoliarizacijos bangą į skilvelius. Skilveliuose impulsas sklinda Purkinje skaidulų tinklu. Impulsui perėjęs Purkinje skaidulas, per likusią skilvelių sienelę jis plinta paprastomis miokardo ląstelėmis, kuriose perdavimo greitis yra apie 0,5 m/s. Skilvelių sujaudinimo laikas yra labai trumpas, apie 60 ms (1 pav.).



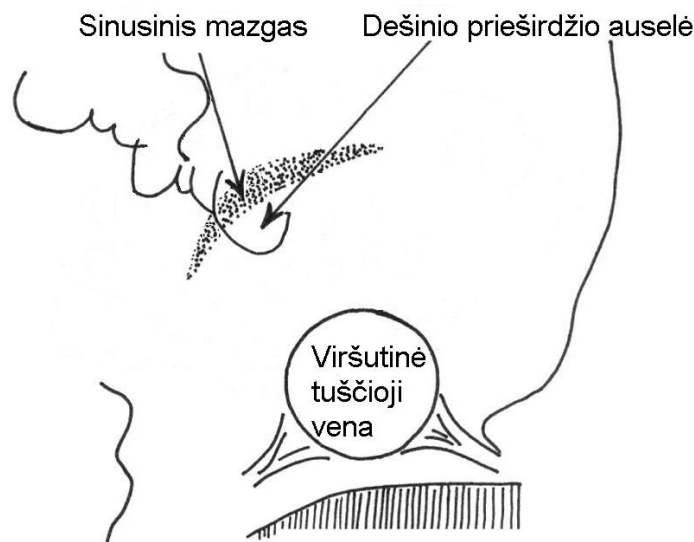
1 pav. Bioelektrinio impulso plitimas ŠLS (juoda spalva pažymėta ŠLS, skaičiai rodo bioelektrinio impulso plitimo laiką [ms] nuo sinusinio mazgo iki širdies dalių esant normaliam širdies susitraukimo dažniui; skirtingų širdies dalių veikimo potencialai). Pagal [2].

Svarbūs anatomiciniai ir fiziologiniai bioelektrinio impulso laidumo faktoriai yra skaidulų skersmuo ir geometrinis išsidėstymas, stimulo efektyvumas ir ląstelės sugebėjimas aktyvuotis. Kuo didesnis skaidulų skersmuo, tuo lengviau ir greičiau plinta impulsas, todėl didesnio skersmens Purkinje skaidulomis stimulus plinta greičiau nei paprastais kardiomiocitais. Impulso sklaidimo greitis plintant išilgai skaidulų yra didesnis negu skersine kryptimi. Susijungiant smulkioms skaiduloms į vieną didelę atskiri impulsai sumuojasi ir plitimo greitis didėja. Šakojantis skaiduloms į daug smulkių impulsas „skylą” ir plitimo greitis mažėja. Struktūrinių širdies laidžiosios sistemos ląstelių ypatybių, sąlygojančių didelį bioelektrinio impulso sklaidimo greitį Hiso pluošte ir jo šakose, šiuo metu nėra rasta.

6.1. Žmogaus širdies laidžiosios sistemos morfologija

Sinusinis (SA) mazgas

Daugumos suaugusių žmonių sinusinis mazgas yra maždaug 10–13x2-3x1-1,5 mm pusbėnulių formos struktūra, randama po epikardu šalia viršutinės tuščiosios venos jungties su dešiniu prieširdžiu ir dešinio prieširdžio auselės (2 pav.) [3]. Mazge ar šalia jo dažniausiai randama ir sinusinio mazgo arterija.



2 pav. Sinusinis mazgas. Pagal [4]

Histologiškai, sinusinį mazgą nuo aplinkinių audinių galima atskirti pagal gausų fibrozinį jungiamąjį audinį, rečiau matomas ląsteles, blyškias mazgo ląsteles ir smulkias ląsteles, išdėstytas nedideliais židiniais. Sinusiniame mazge išskirtos keturių tipų ląstelės: sinusinio mazgo, tarpinės, Purkinje ląsteles primenančios ir prieširdžių raumens ląstelės [4].

Sinusinio mazgo ląstelės yra gausiausios, verpstės formos ir mažiausio skersmens (4-6 μm) [1,4]. Šios, viena prie kitos prigludusios ląstelės, sudaro besišakojantį, trimatį rezginį. Ląstelių grupės arba pluoštai yra

apsupti bendra išorine membrana, tiesiogiai susisiekiančia su mazgą gaubiančiu jungiamuoju audiniu. Ląstelės jungiasi galas su galu ir šonas su šonu, sudaro labai negausias plyšines jungtis. Sinusinio mazgo ląstelės neturi T vamzdelių ar prieširdžių miocitams būdingų citoplazminių granulių. Citoplazmoje randami negausūs citoskeleto ir kontraktiliniai filamentai. Mitochondrijos negausios, įvairaus dydžio ir formos, jų vidinė struktūra paprastenė nei prieširdžių miocitų mitochondrijų. Ląstelių branduoliai panašūs į prieširdžių miocitų. Šios ląstelės neturi pastovaus membranos ramybės potencialo ir spontaniškai depoliarizuojasi 100-110 kartų per minutę, t.y. generuoja bioelektrinį impulsą (ritmo vedlės).

Tarpinės ląstelės supa sinusinio mazgo ląsteles ir morfologiškai yra tarpinė grandis tarp sinusinio mazgo ląstelių ir prieširdžių miocitų. Jos yra didesnio skersmens (6-10 μm) ir turi daugiau organizuotų kontraktilinių filamentų negu sinusinio mazgo ląstelės. Kontraktiliniai filamentai orientuoti pagal išilginę ląstelės ašį. Tarpląstelinės jungtys gausesnės nei sinusinio mazgo ląstelių. Citoplazmoje randama daugiau glikogeno nei prieširdžių miocituose, aptinkamos citoplazminės granulės. Šios ląstelės sujungia sinusinio mazgo ląsteles su prieširdžių miocitais [4].

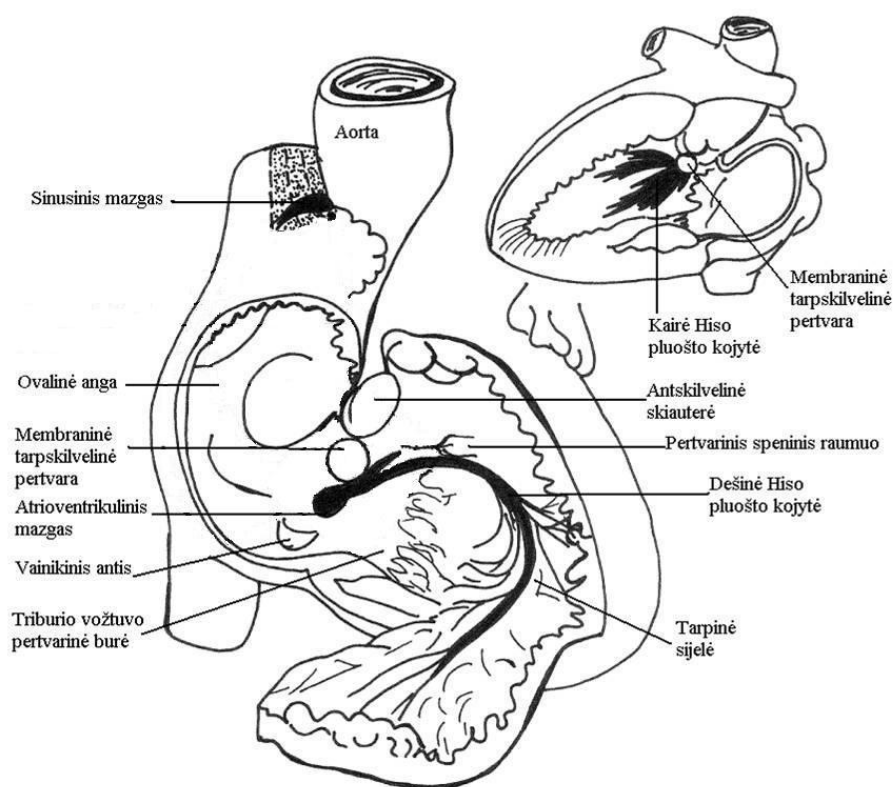
Purkinje skaidulas primenančios ląstelės yra apvalios ar ovalios (10-13 μm skersmens), turi blyškia citoplazmą, randamos grupėmis šalia mazgo centro ir sudaro apie 5% žmogaus sinusinio mazgo ląstelių [1]. Jos primena Purkinje skaidulas, neturi T sistemos vamzdelių, jų citoplazmoje daug glikogeno ir mažai kontraktilinių filamentų [4].

Ketvirtas sinusinio mazgo ląstelių tipas yra tipiškų prieširdžių raumeninės ląstelės. Šios ląstelės jungiasi su tarpinėmis ląstelėmis [4].

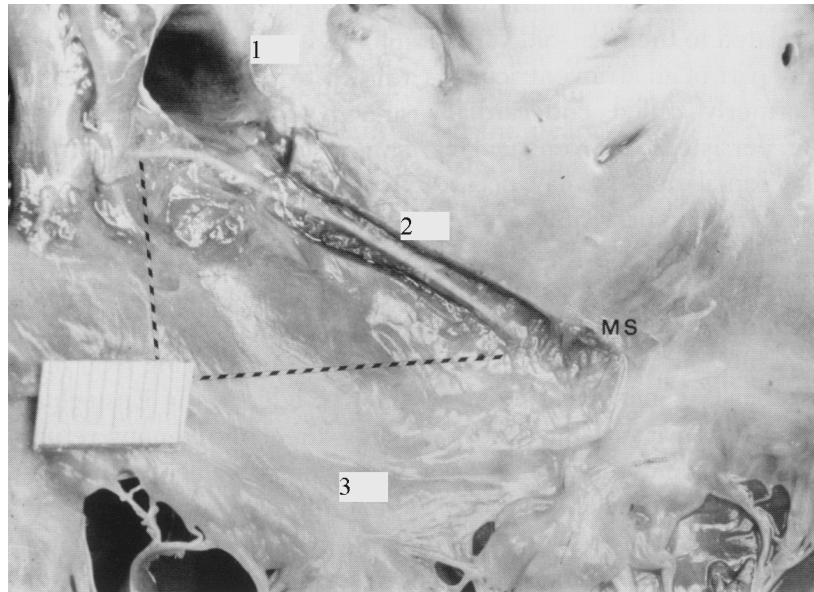
Sinusiniame mazge gausu simpatinių ir parasimpatinių nervų galūnių, nervinių rezginių su ganglijinėmis ląstelėmis. Bioelektrinis impulsas, arba veikimo potencialas, atsiradęs sinusiniame mazge, nedelsiant išplinta į prieširdžius [1].

Atrioventrikulinė (AV) sistema

Atrio-ventrikulinę širdies laidžiosios sistemos dalį sudaro atrioventrikulinis mazgas, Hiso pluoštas ir jo šakos (kojytės) (3 pav.). AV mazgas yra ta vieta, kur bioelektrinio impulso sklidimo greitis sumažėja iki 0,05 m/s. Suaugusio žmogaus širdyje AV mazgas yra 5-7x6-9x1-1,5 mm trikampio formos darinys, išdėstytas tarpširdinėje pertvaroje, maždaug virš centrinės triburio vožtuvo pertvarinės burės dalies, taip vadinamame Kocho trikampyje (4 pav.).

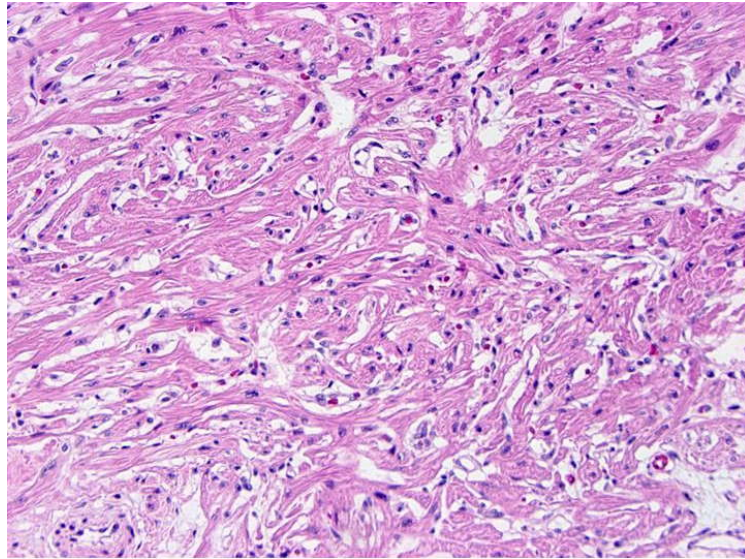


3 pav. Žmogaus širdies laidžioji sistema. Pagal [5].



4 pav. Tipiška atrioventrukulinio mazgo lokalizacija – Kocho trikampus. 1 – vainikinis antys, 2 – Todaro sausgyslė, 3 – triburio vožtuvo pertvarinė burė, MS – membraninė prieširdžių pertvaros dalis. Pagal [4].

AV mazgo ląstelių skersaruožėtumas menkai išreikštas, branduoliai išdėstyti periferijoje. Tarp ląstelių gausu kolageno ir elastinių skaidulų (5 pav.).



5 pav. Besišakojančios, įvairiomis kryptimis išsidėsčiusios atrioventrikulinio mazgo ląstelės. Hematoksilinas ir eozinas (H&E)x60.

AV mazgo morfologija įvairuoja priklausomai nuo mazgo srities. Morfologiškai skiriama (1) proksimalinė dalis, esanti šalia dešinio prieširdžio miocitų, (2) centrinė dalis ir (3) distalinė dalis, kuri pereina į Hiso pluoštą [4].

Šalia prieširdžių raumens esančioje proksimalinėje mazgo srityje AV mazgo ląstelės morfologiškai labai panašios į sinusinio mazgo ląsteles. Jos nedidelės (3,5-5 μ m skersmens), turi vieną branduolį, negausias, menkai organizuotas kontraktiles fibriles, gausų glikogeną citoplazmoje, neturi T sistemos vamzdelių. AV mazgo ląstelės su prieširdžių miocitais jungiasi per tarpines ląsteles, panašias į sinusinio mazgo periferijoje randamas ląsteles.

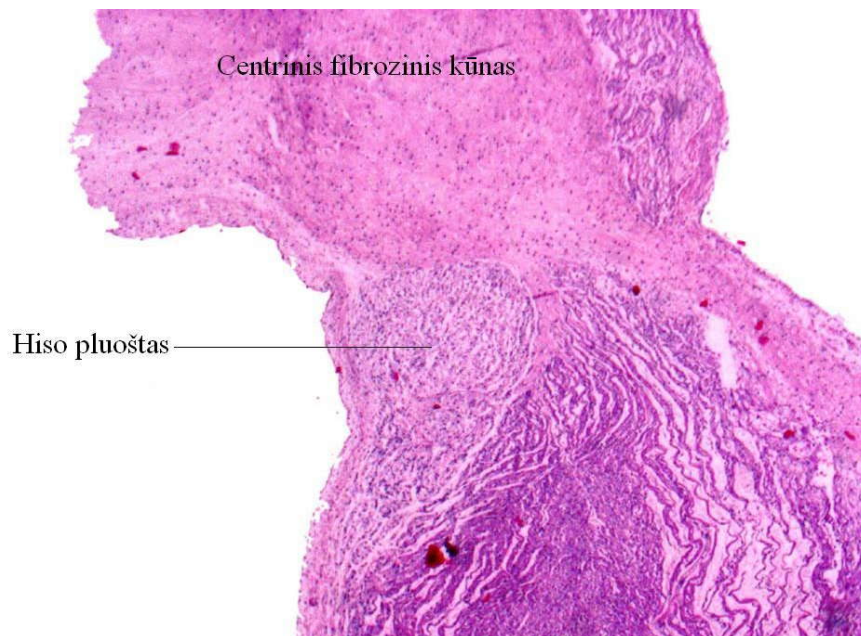
Centrinės AV mazgo dalies ląstelės yra mažesnio skersmens, jungiamuoju audiniu atskirtos į atskirus pluoštus. Šios ląstelės jungiasi galais ir sudaro gausesnes plyšines jungtis.

Į Hiso pluoštą perinančios AV mazgo distalinės dalies ląstelės didesnės, turi nedaug miofibrilių ir daug filamentinės medžiagos citoplazmoje.

Šioje srityje randamos gausios adrenerginės ir cholinerginės nervų galūnės, besijungiančios su mazgo ląstelėmis [4].

AV mazgas kaip ir sinusinis, gausiai įnervuotas, tačiau neturi vidinių nervinių rezginių [1]. Mazgas neturi aiškaus ištinio jungiamojo audinio apvalkalo, o tik atskirus jungiamojo audinio pluoštus paviršiuje ir viduje [6].

Iš priekinio AV mazgo galo išeina kompaktiškas Hiso pluoštas (iki 4 mm skersmens), kuris prasiskverbia per centrinį fibrozinį kūną ir eina išilgai tarpkilvelinės raumeninės pertvaros viršūnės [4] (6 pav.).



6 pav. Hiso pluoštas. H&Ex20.

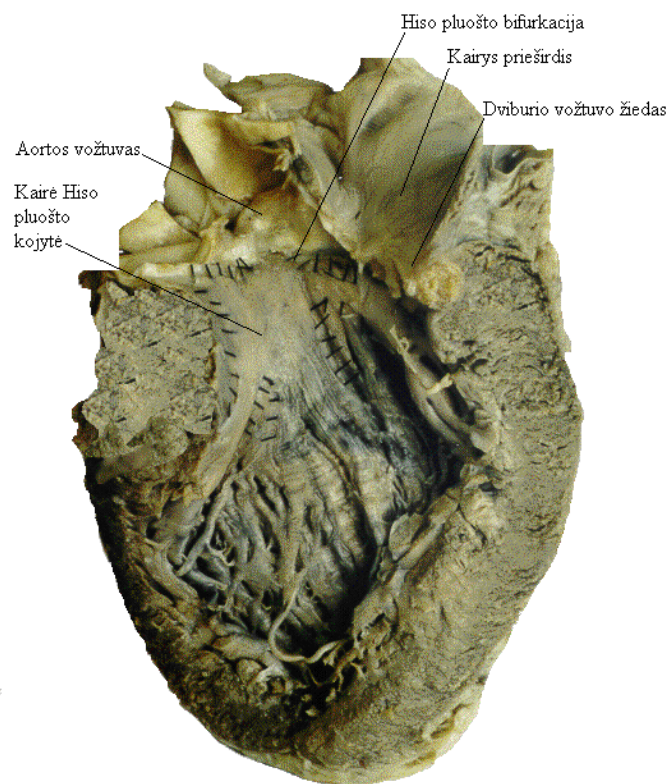
Širdies centrinį fibrozinį kūną penetruojanti pluošto dalis yra apie 1-1,5 mm ilgio, iš visų pusių apsupta jungiamojo audinio apvalkalu [3]. Nuo kairės Hiso pluošto pusės atskyja plonos laidžiojo audinio skaidulos, kurios skleidžiasi žemyn kaire tarpkilvelinės pertvaros puse. Šios skaidulos atsišakoja visame Hiso pluošto ilgyje ir sudaro kairiąją pluošto šaką (kojytę) [6] (7 pav.). Likusi pluošto dalis leidžiasi žemyn dešine

tarpskilvelinės pertvaros puse, sudarydama dešinę, maždaug 1 mm skersmens šaką (kojytę) (8 pav.).

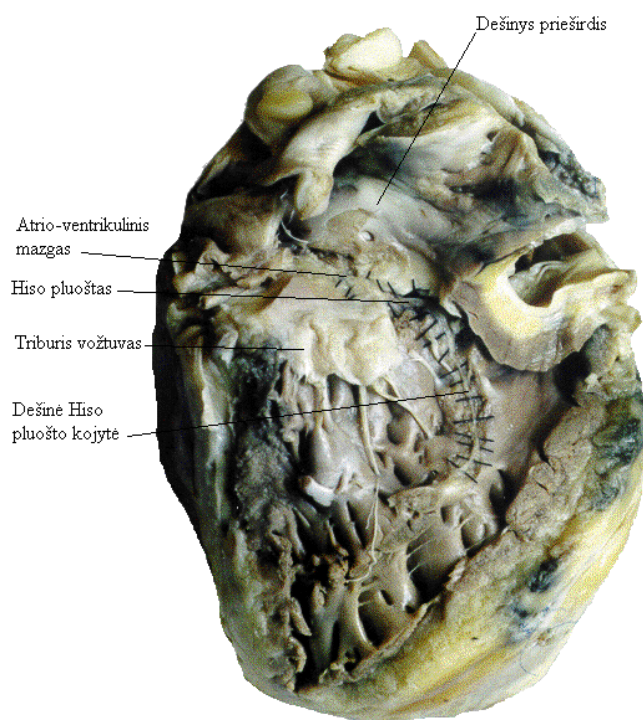
Hiso pluošto šakos širdies raumenyje toliau šakojasi, ir galiausiai baigiasi Purkinje skaidulomis, sudarančiomis jungtis tarp laidžiosios sistemos ir miokardo ląstelių.

Hiso pluošto kamieną sudaro lygiagrečiai išdėstytos, nedidelės (apie 7,5 μm skersmens), nedaug miofibrilių turinčios raumeninės ląstelės. Kamieno miocitai mažai skiriasi nuo mazgo ląstelių, jų skersaruožėtumas neryškus, branduoliai išdėstyti periferijoje. Tolstant nuo atrioventrikulinio mazgo skaidulų skersmuo didėja.

Hiso pluošto šakos yra histologiškai skirtingos [6]. Kairė šaka primena ploną skraistę, padalintą išilginėmis kolageno pertvaromis. Atskilimo iš Hiso pluošto vietoje ją sudarančios ląstelės yra mažos ir primena pagrindinio kamieno ir dešinės šakos ląsteles (9 pav.). Tačiau jau aukštai tarpskilvelinėje pertvaroje šalia nedidelių ląstelių atsiranda tipiškos Purkinje skaidulos. Šios ląstelės vyrauja likusioje kairės šakos dalyje. Dešinė Hiso pluošto šaka yra plono cilindro formos, be aiškių vidinių kolageno pertvarų. Dauguma šakos ląstelių yra panašios į pagrindinio pluošto ląsteles. Didelės, tipiškos Purkinje skaidulos, yra labai negausios dešinėje šakoje.



7 pav. Kairys prieširdis ir skilvelis su išpreparuota kaire Hiso pluošto šaka (kojyte).



8 pav. Dešinys prieširdis ir skilvelis su išpreparuota dešine Hiso pluošto šaka (kojyte).

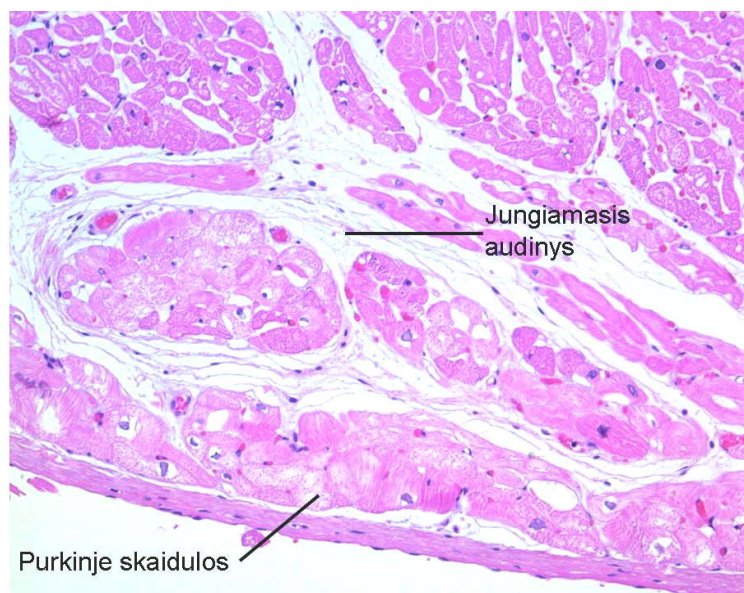


9 pav. Kairės Hiso pluošto šakos ląstelės šviesia citoplazma.
H&E x100.

Taigi, Hiso pluošto šakų ląstelių populiacija yra heterogeniška, ir Purkinje skaidulos randamos kartu su mažesnėmis ląstelėmis, primenančiomis atrioventrikulinio mazgo ląsteles, pereinamąsias ląsteles ar skilvelių miocitus [4].

Purkinje sistema

Purkinje skaidulos yra platesnės (46 μm skersmens), ir trumpesnės nei skilvelių miocitai. Jos dažnai turi du ar tris branduolius. Purkinje ląstelės kartu su miocitais sudaro ploną fibrozinio jungiamojo audinio sluoksnį apsuptus pluoštus (10 pav.).



10 pav. Purkinje ląstelės apsuptos jungiamuoju audiniu. H&Ex400.

Negausios miofibrilės randamos periferinėse Purkinje ląstelių srityse, todėl histologiniuose pjūviuose šių ląstelių citoplazma atrodo šviesi, tuščia. Ląstelių centrinėse dalyse aptinkamas gerai išvystytas sarkoplazminio tinklelio vamzdelių tinklas, gausios glikogeno granulės, citoskeleto filamentai. Tarp miofibrilių randamos negausios, mažos, pailgos mitochondrijos [4]. Purkinje ląstelės abiejų skilvelių vidiniame paviršiuje sudaro tinklą, plintantį po endokardu ir jungiasi su miokardu.

6.2. Žmogaus širdies laidžiosios sistemos tyrimų sunkumai

ŠLS audinio išsidėstymas žinduolių širdyje išlieka ne visiškai aiškus. Naudojant histocheminius (Gomori metodas cholinesterazės aktyvumui įvertinti) ir imunohistocheminius dažymo metodus HCN4 baltymams, koneksinui 43 (Cx43) išryškinti, paukščių, žmogaus embrionų ir eksperimentinių gyvūnų (pelių, žiurkių ir kiaulių) širdyse buvo aptikti į ŠLS audinį panašūs židiniai sinusinio mazgo paranodalinėje srityje, retroaortinis mazgas, ir AV vožtuvus supantys specializuotų miocitų pluoštai [7-9]. AV mazgo audinio tęsinys juosia triburio vožtuvo žiedą, o

dviburio vožtuvo žiedą juosia retro-aortinio mazgo audiniai [8]. Kai kurie židiniai atitinka L.Aschoff ir J.G.Monckeberg sukurtus morfologinius ŠLS kriterijus [7,9]. Ar analogiškos struktūros egzistuoja suaugusio žmogaus širdyje, šiuo metu nėra aišku.

Seniai žinomi normaliai suformuotos žmogaus ŠLS anatominiai variantai, aptinkami visose ŠLS dalyse. AV mazgo padėtis, forma ir matmenys gali gerokai skirtis. Jungtį tarp AV mazgo ir skilvelių paprastai sudaro viena, ištisinė raumeninė jungtis – Hiso pluoštas. Kartais vietoj vieno pluošto, centrinį fibrozinį širdies kūną penetruoja daugybiniai smulkūs pluoštai. Dalis iš jų formuoja kairę pluošto šaką, kita - dešinę, t.y. nerandama įprastinės Hiso pluošto bifurkacijos tarpkilvelinės pertvaros viršūnėje. Taip pat įvairuoja Hiso pluošto šakų matmenys ir išsidėstymas. Dešinė šaka dažniausiai leidžiasi tiesiai tarpkilveline pertvara, rečiau sudaro įstrižą kreivę [10]. Kaip dažnai išsivysto tokie ar panašūs anatominiai variantai ir kokia jų fiziologinė svarba nėra žinoma.

Egzistuoja įgimtos ŠLS anomalijos, nesusijusios su įgimtomis širdies ydomis. Galimi trijų tipų morfologiniai ŠLS defektai sukeliantys pilną įgimtą AV bloką: AV agenezė, penetruojančios Hiso pluošto dalies nutrūkimas ir skilvelinės Hiso pluošto dalies nutrūkimas. Pastarasis defektas yra labai retas. Penetruojančios Hiso pluošto dalies defektas taip pat aprašytas prieširdžių auselių izomerizmo atveju. Ar tai yra netaisyklingai susiformavusi, ar taisyklingai susiformavusi, bet vėliau pažeista ŠLS ir koks pažeidimo mechanizmas, nėra aišku, nes centrinis fibrozinis kūnas būna suformuotas normaliai. Kartais pavyksta tokiais atvejais rasti sinusinio mazgo fibrozę, kas leidžia įtarti specifinį ŠLS audinio pažeidimą [11].

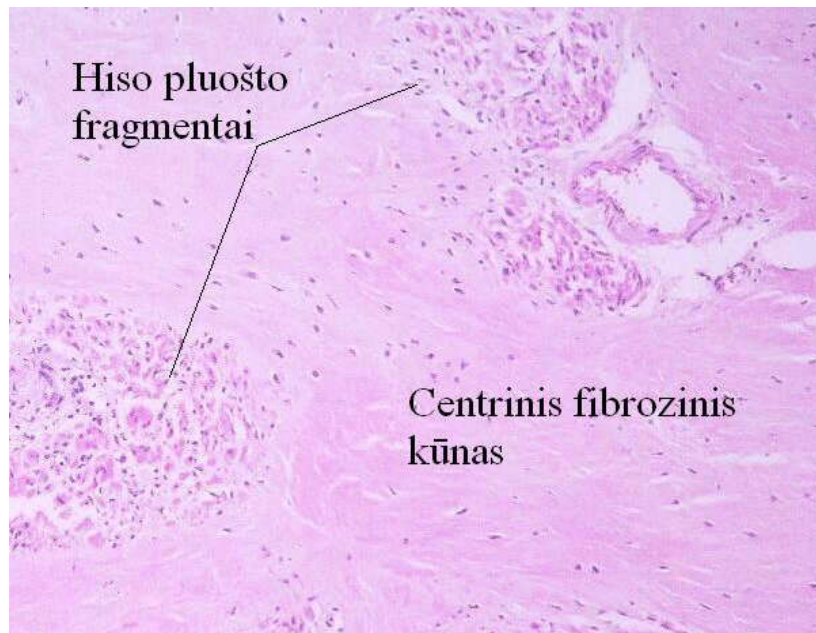
Įgimtos ŠLS anomalijos randamos tiek normaliai suformuotose širdyse, tiek įgimtų širdies ydų atvejais. Netaisyklingas sinusinio mazgo išsidėstymas randamas prieširdžių auselių inversijos, kairės jukstapozicijos, dešinio ar kairio izomerizmo atvejais. Esant dešinei jukstapozicijai, kai abiejų prieširdžių auselės išdėstytos viena šalia kitos ir dešinėje nuo aortos, sinusinis mazgas randamas įprastinėje vietoje. Priešingai, kairės jukstapozicijos atveju, kai abi

prieširdžių auselės išdėstytos viena šalia kitos kairėje nuo aortos, sinusinis mazgas randamas kairėje pusėje. Dešinio izomerizmo atveju, kai abiejose pusėse matomos morfologiškai dešinio prieširdžio ausytės, sinusinis mazgas būna dvigubas, matomas abiejose pusėse. Kairio prieširdžių izomerizmo atveju galinės skiauterėlės ir sinusinio mazgo audinio rasti nepavyksta [11]. Prieširdžių anomalijos įtakoja ir AV mazgo išsidėstymą - širdyse su prieširdžių auselių inversija (morfologiškai kairė auselė randama dešinėje, ir morfologiškai dešinė auselė kairėje) AV mazgas randamas kairėje pusėje. Skilvelių pertvaros defektai dažniausiai randami membraninėje skilvelių pertvaros dalyje, ir defektų kraštus dengia jungiamasis audinys likęs iš membraninės pertvaros dalies. Hiso pluoštas normaliai suformuotose širdyse yra trumpas, o esant membraninės dalies skilvelių pertvaros defektui būna ilgas, eina defekto pakraštyje esančiu jungiamuoju audiniu ir patenka į kairio skilvelio išmetimo traktą. Todėl užpakaliniame apatiniame defekto krašte esantį ŠLS pluoštą lengva pažeisti operacijos metu užsiuvant skilvelių pertvaros defektą [11]. Raumeninės skilvelių pertvaros dalies defektai įtakoja ŠLS priklausomai nuo jų išsidėstymo. Defektai, esantys šalia Hiso pluošto yra ypatingai svarbūs. Tokiu atveju Hiso pluoštas eina priekiniu viršutiniu defekto kraštu. Esant membraninės ir raumeninės dalių defektams, Hiso pluoštas eina raumeniniu pluoštu, esančiu tarp defektų. AV mazgas prie atrioventrikulinių defektų būna išdėstytas ne įprastinėje vietoje, o pasislinkęs atgal, link išlikusios prieširdžių ir skilvelių pertvarų jungties [11]. Šios ŠLS anomalijos menkai ištirtos, todėl tiksli ŠLS padėtis daugumos įgimtų širdies ydų atvejais išlieka nežinoma.

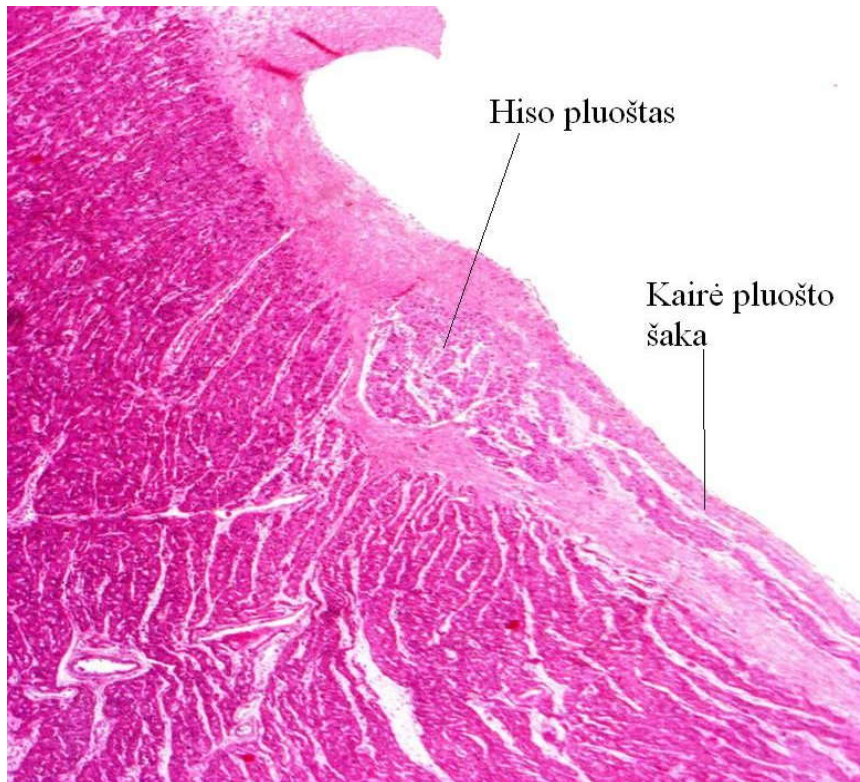
Tiriant staigias ir netikėtas kūdikių mirtis (SIDS), įvairios ŠLS anomalijos galėjusios būti mirties priežastimi, randamos apie 30% atvejų [12]. Tai yra AV mazgo ir Hiso pluošto dispersija (11 pav.), kairėje pusėje išdėstytas Hiso pluoštas (12 pav.), nodoventrikulinis Mahaim'o traktas (ŠLS pluoštas einantis per centrinę fibrozinę širdies kūną ir susijungiantis su tarpkilveline pertvara), fascikuloventrikulinis traktas (ilgas Hiso pluoštas penetruojantis tarpkilvelinę pertvarą), atskiri laidžiosios sistemos audinio židiniai neturintys ryšio su

Mahaim'o puoštais, kairės Hiso pluošto kojytės fibrozė (13 pav.), kraujosruvos, limfocitiniai infiltratai, AV mazgo arterijos fibroraumeninė displazija (14 pav.) [13,14].

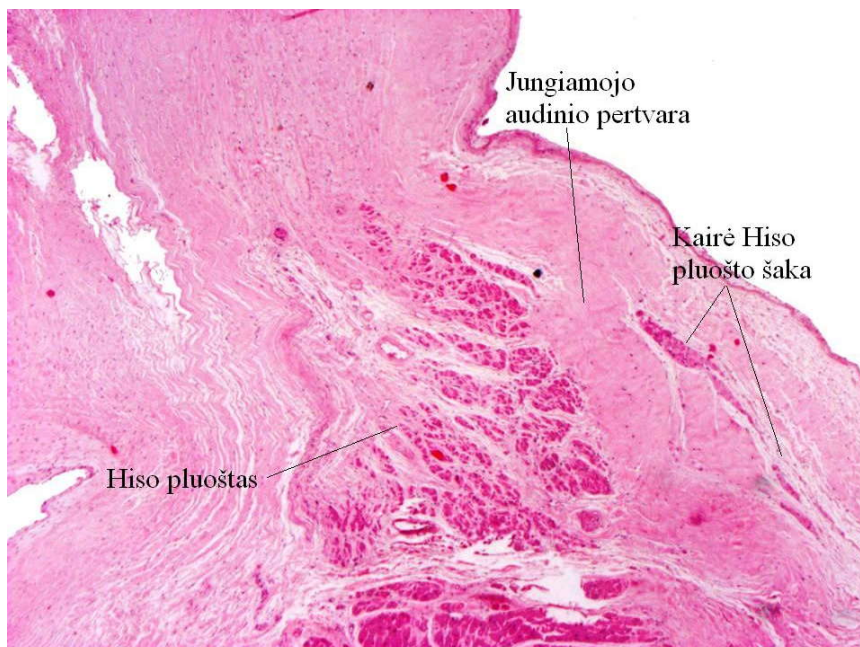
Kai kurios anomalijos neabejotinai gali būti reikšmingos staigios ir netikėtos mirties sindromo išsivystymui, kitos taip pat atsitiktinai randamos tiriant ne nuo kardialinės patologijos mirusių naujagimių širdis.



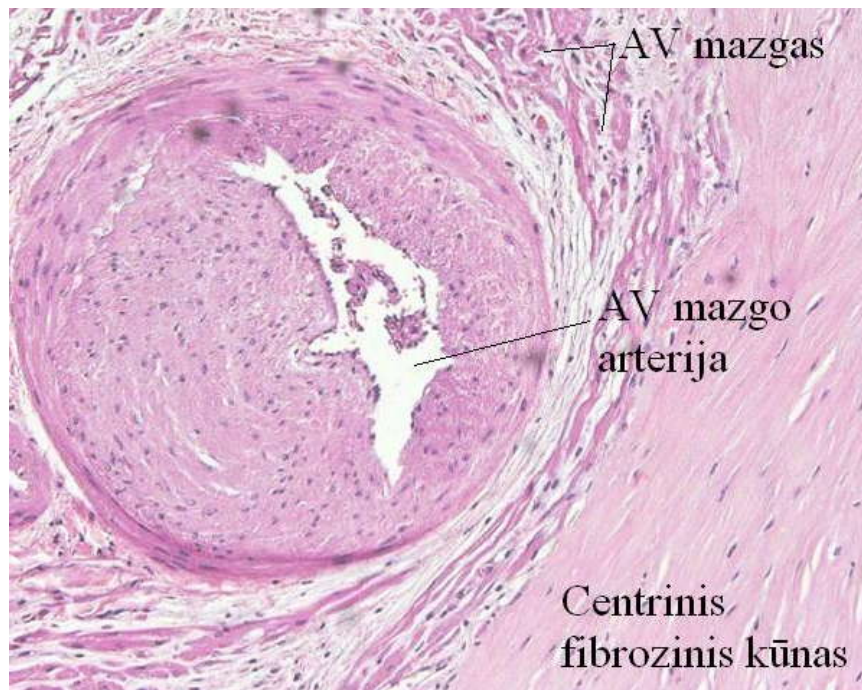
11 pav. Hiso pluošto dispersija. H&Ex100



12 pav. Kairėje tarpkilvelinės pertvaros pusėje išdėstyti Hiso pluoštas.
H&Ex40.

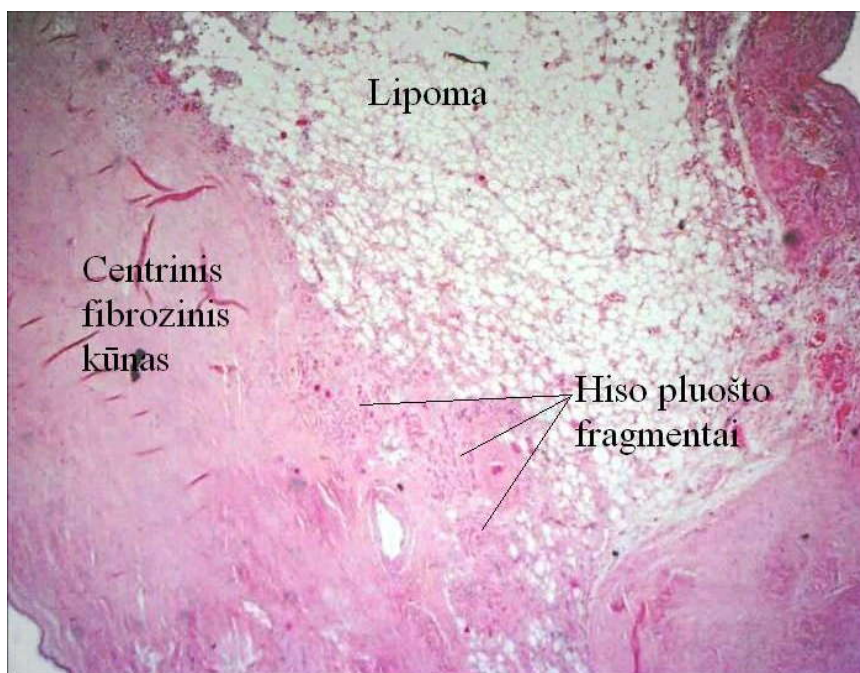


13 pav. Kairės Hiso pluošto šakos fibrozė. H&Ex40.



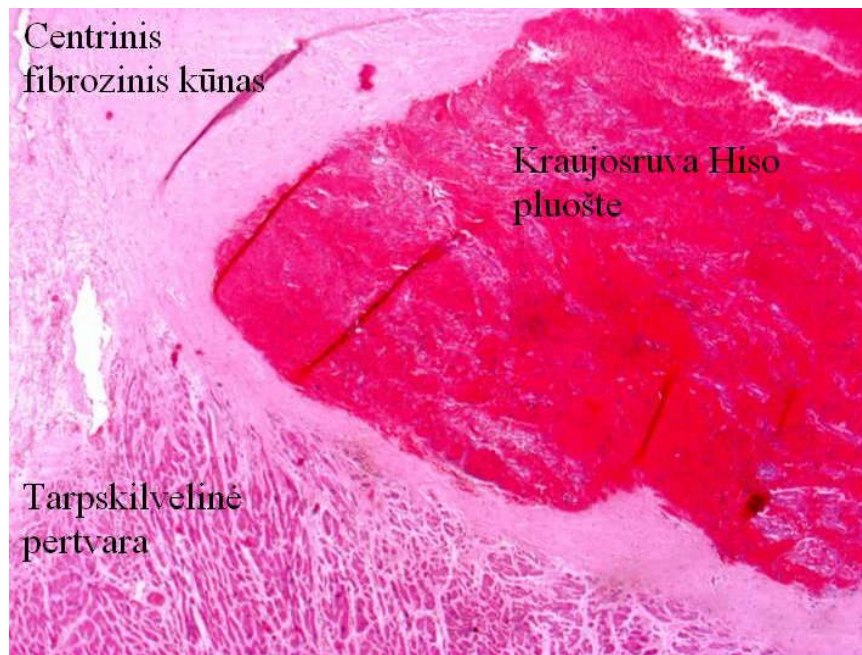
14 pav. AV mazgo fibroraumeninė displazija. H&Ex100.

Daugelis įvairios etiologijos širdies ligų gali pažeisti normaliai susiformavusią ŠLS. Tai išeminė vainikinių širdies arterijų liga, kardiomiopatijos, vožtuvų ligos, miokarditai, jungiamojo audinio ligos, amiodozė, transfuzinė siderozė, pirminiai ir metastatiniai navikai (15 pav.), trauminis ir chirurginis pažeidimas, amžiniai fibroziniai pakitimai, idiopatinė abipusė Hiso pluošto šakų fibrozė [10,15].



15 pav. Tarpširdinės pertvaros lipoma su Hiso pluošto atrofija. H&Ex40.

ŠLS gali būti tiesiogiai ar netiesiogiai traumota širdies operacijų metu. Maždaug 5 % chirurginių įgimtų širdies ydų korekcijų komplikuojasi pilnu AV bloku [16]. Apie 40 % ligonių, sergančių hipertrofine kardiomiopatija su tarpšilvelinės pertvaros asimetrija, po chirurginės pertvaros korekcijos procedūros išsivysto kairės Hiso pluošto šakos blokada, o 3 % - pilna AV blokada [17]. Apie 10 % ligonių po širdies transplantacijos išsivysto įvairaus laipsnio AV blokai dėl persodinamo organo išemijos, operacijos procedūros, transplantato atmetimo reakcijos ir t.t. [18] (16 pav.).



16 pav. Pooperacinė kraujosruva Hiso pluošte. H&Ex40.

Net tokios plačiai paplitusios chirurginės operacijos kaip vainikinių arterijų šuntavimas ir aortos vožtuvo protezavimas gali sukelti pilną AV bloką (5 % ir 3 % atitinkamai), reikalaujantį širdies stimulatoriaus implantavimo [19,20]. Jungtinėse Amerikos Valstijose kasmet implantuojama apie 250 tūkst. širdies stimuliatorių ir apie 60 tūkst. defibriliatorių [21].

Deja, bet morfologiniai ŠLS pakitimai dažnai prastai koreliuoja su klinikiniu vaizdu. ŠLS pakitimai aptinkami širdyse žmonių, kurie niekada nesirgo širdies laidumo ar ritmo sutrikimais. Ligonių, mirusių dėl širdies ritmo sutrikimų, širdyse dažnai nepavyksta rasti jokios patologijos. Tai liudija, kad žinios apie šią sistemą kol kas yra nepakankamos. Žmogaus ŠLS patologiniai tyrimai yra gana negausiai aprašyti literatūroje. Taip yra todėl, kad šiems tyrimams būtinas kruopštus, daug laiko ir sąnaudų reikalaujantis darbas. Anatomicinis žmogaus ŠLS tyrimo metodas daugeliui tyrinėtojų buvo per daug sudėtingas, ir ŠLS dažnai nepavykdavo rasti. M.J. Davies 1971 metais po nesėkmingų bandymų paskelbė, kad makroskopiškai žmogaus ŠLS neįmanoma tirti. Makroskopinis ŠLS sistemos tyrimas buvo užmirštas, ir pereita prie histologinių tyrimų [3]. Deja, pavieniai histologiniai pjūviai yra

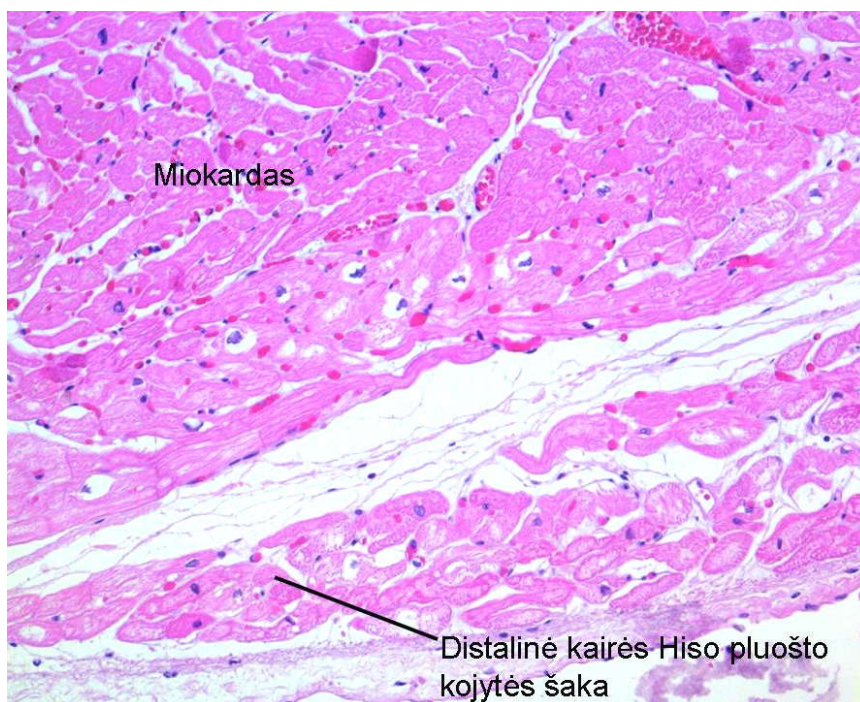
nepakankamai informatyvūs, todėl norint tinkamai ištirti vidutinio amžiaus žmogaus ŠLS būtina pagaminti nuo 6000 iki 9000 histologinių pjūvių, ir ištirti nuo 200 iki 300 dažytų preparatų. Ieškant papildomų anomalijų laidumo takų reikia serijiniais pjūviais ištirti visą AV žiedą, ir darbo apimtis padidėja kelis kartus [10].

Dėl šių priežasčių dauguma literatūroje aprašytų histologinių ŠLS tyrimų yra atlikti naudojant nedidelius eksperimentinius gyvūnus arba jų embrionus, kurių širdys daug mažesnė. Deja, skirtingų rūšių žinduolių ŠLS morfologija skiriasi. Tarprūšinius skirtumus pastebėjo ir aprašė dar S.Tawara [11]. Triušių ir žiurkių širdyse sinusinio mazgo ląstelės užima visą viršutinės tuščiosios venos sienelės storį. Pelių širdyse šį mazgą iš vis sunku rasti histologiškai. Šunų širdyse centrinę fibrozinę kūną penetruojanti Hiso pluošto dalis yra ilgesnė nei žmonių [11].

Žmonių širdyse sunku atsekti terminalines pluošto šakas, jos netenka jungiamojo audinio apvalkalo ir histologiškai mažai skiriasi nuo miokardo ląstelių (17 pav.). Avių širdyse distalinės dalys randamos kaip tipiškos Purkinje skaidulos ir yra gerai matomos. Jaučių širdyse histologiškai lengvai matomos jungtys tarp ŠLS ir miokardo ląstelių, tuo tarpu žmonių širdyse šių jungčių histologiškai rasti nepavyksta [11].

Joninių kanalų baltymų tyrimai taip pat atlikti naudojant laboratorinius gyvūnus. Šių baltymų sudėtis ir pasiskirstymas skiriasi priklausomai nuo gyvūno rūšies, todėl atlikti tyrimai neatspindi baltymų pasiskirstymo žmogaus širdyje ir ŠLS.

Matematiniai ŠLS modeliai ir 3D rekonstrukcijos taip pat kuriamos naudojant eksperimentinius gyvūnus. ŠLS identifikavimui naudojami imunohiostcheminiai dažymai neurofilamentams, prieširdžių natriuretiniam peptidui, koneksinui 43 ir įtampai jautrūs dažai. Deja, kiek šie modeliai atitinka žmogaus ŠLS, nėra aišku [22].



17 pav. Distalinės Hiso pluošto šakos histologiškai menkai skiriasi nuo miokardo. H&Ex100.

Siekiant ištirti ŠLS išsidėstymą žmogaus širdyje, šios sistemos pakitimų paplitimą ir ryšį su širdies ritmo sutrikimais, būtina turėti patikimą ŠLS vaizdinimo metodą, kuris leistų be didelių sąnaudų tirti ne tik širdis su patologiniais pakitimais, bet ir širdis be aiškios patologijos. Tai leistų atskirti fiziologiniu požiūriu svarbią ŠLS patologiją nuo anatominių variantų, amžinių pakitimų ir būklių, neturinčių įtakos ŠLS funkcijai, ko negalima atlikti naudojant šiuo metu žinomas tyrimo metodikas.

6.3. Žmogaus širdies laidžiosios sistemos anatominių ir histologinių tyrimų apžvalga

Kodėl plaka širdis tyrinėtojai domėjosi jau seniai. Dar ketvirtame amžiuje prieš mūsų erą graikų gydytojai Herophilus ir Erasistratus pastebėjo, kad širdis plaka reguliariai ir pastoviai [23]. Antrajame mūsų eros amžiuje Claudius Galen pastebėjo, kad denervuota, iš krūtinės laštos išimta širdis,

nenustoją plakti [24]. 1651 metais William Harvey kūrinysje “De Generation Animalium” rašė, kad “kraujo sužadinas” širdies susitraukimas prasideda nuo dešinio prieširdžio auselės. Prancūzų fiziologas Cezar Legallois, eksperimentuodamas su gyvūnais nustatė, kad širdies veiklą reguliuoja nervų sistema. 1830 – 1840 metais buvo atrasta simpatinė ir parasimpatinė nervų sistemos, nerviniai rezginiai, aprašytas elektrinio rezginių stimuliavimo poveikis širdies veiklai [24]. Fiziologai pasidalino į dvi stovyklas, vieni teigė, kad širdis susitraukia dėl įgimtų širdies raumens savybių (miogeninė teorija), kiti, kad širdies veiklą sukelia nervai ir aplinkiniai nerviniai rezginiai (neurogeninė teorija) [25]. Išspręsti šį fiziologų ginčą padėjo anatomiciniai atradimai. Jan Evangelista Purkinje 1839 metais avies širdies skilvelių subendokardiniame sluoksnyje pastebėjo pilkų, želatinos pavidalo ląstelių tinklą, ir manė, kad tai yra kremzliniai pluoštai. Po 6 metų Purkinje pripažino, kad tai raumeninės kilmės ląstelės, tačiau tuo metu apie laidumo funkciją nebuvo nieko žinoma [24]. 1852 metais Hermann Friedrich Stannius ir 1873 metais Luigi Luciani eksperimentavo perrišdami varlės širdį tarp prieširdžių ir skilvelių. 1873 metais Luigi Luciani išspausdino straipsnį “On the periodic function of the frog heart”, kuriame grafiškai pavaizdavo širdies atrioventrikulinį bloką. 1883 metais Walter Gaskell varlės ir vėžlio širdyse rado raumeninį pluoštą jungiantį prieširdžių ir skilvelių raumenis, manė, kad tai specializuotas raumeninis audinys. W.Gaskell pastebėjo, kad širdies raumens susitraukimas prasideda dešinio prieširdžio veniniame antyje ir plinta prieširdžiais link skilvelių [25]. Jis pakartojė H.F. Stannius ir L. Luciani eksperimentus, pademonstravo, kad bioelekcinio impulso plitimą galima nutraukti suspaudus prieširdžius su skilveliais jungiantį raumeninį pluoštą ir aprašė įvairaus laipsnio širdies blokus [10,24]. 1888 metais Wilhelm His pastebėjo, kad embrionų širdys pradeda plakti anksčiau negu išsivysto cerebrospinaliniai nervai ir rezginiai, tuo patvirtindamas miogeninę širdies veiklos teoriją. 1893 metais jis aprašė raumeninę jungtį tarp prieširdžių ir skilvelių, kuri dabar žinoma Hiso pluošto vardu [24].

Baigęs medicinos studijas Tokijo universitete, 1903 metais į Vokietiją, Marburgą, atvyko Sunao Tawara, ir pradėjo dirbti Ludwig Aschoff vadovaujame Patologinės Anatomijos Institute. Ludwig Aschoff tuo metu jau buvo pasaulyje pripažintas patologas, palaikantis miogeninę širdies veiklos teoriją. S.Tawara buvo patikėta ištirti 150 miokardito pažeistų širdžių. Tiriant šias širdis buvo atrasti reumatiniai mazgeliai, pavadinti Aschoff'o vardu. S.Tawara taip pat kruopščiai ištyrė šių širdžių Hiso pluošto sritį, ir surinko daug žinių apie širdies laidžiosios sistemos anatomiją. Serijinių pjūviais S.Tawara sugebėjo atsekti panašios histologinės struktūros laidžiosios sistemos pluoštus. Eidamas nuo skilvelio link prieširdžio jis aprašė atrioventrikulinį mazgą tarp prieširdinės pertvaros pagrinde. Distaliniame Hiso pluošto gale S.Tawara rado dvi šakas, ir galiausiai subendokardiniame sluoksnyje rado prieš 58 metus Purkinje aprašytas skaidulas. Taip jis anatomiškai įrodė, kad širdies laidžioji sistema perduoda miokardą sužadinantį bioelektrinį impulsą. Šiuos monumentalius atradimus S. Tawara padarė per 3 metus ir paskelbė 1906 metais knygoje "Das Reizleitungssystem Des Säugetierherzens" [24]. Jis pirmasis Purkinje skaidulas priskyre širdies laidžiajai sistemai [20]. Šių atradimų anatominė ir fiziologinė svarba buvo įvertinti nedelsiant [24].

1903 metais Arthur Keith susipažino su James Mackenzie darbais. J.Mackenzie dirbo bendrosios praktikos gydytoju ir turėjo sukūrus kimografą, kuriuo galėjo užrašyti pulso bangas ir analizuoti savo pacientų širdies ritmo sutrikimus. 1905 metais J.Mackenzie persikėlė į Londoną, kur užsiėmė kardiologija. J.Mackenzie paprašė A.Keith ištirti širdis ligonių, kuriuos jis stebėjo daugelį metų. A.Keith sutiko, ir vienoje iš tiriamų širdžių pastebėjo neįprasto audinio sankaupą viršutinės tuščiosios venos ir dešinio prieširdžio jungtyje. A.Keith tuo metu dar nieko nežinojo apie S.Tawara darbą ir todėl neįvertino savo atradimo svarbos. 1905 metų pabaigoje J.Mackenzie supažindino A.Keith su S.Tawara atradimais, ir paprašė patvirtinti Hiso pluošto egzistavimą. A.Keith patvirtino aprašytos AV sistemos buvimą. 1906 metais medicinos studentas Martin Flack pradėjo dirbti A.Keith laboratorijoje.

Žinodami Gaskell, Hering, Engelmann, Wenckebach ir kitų tyrėjų duomenis, kad bioelektrinis impulsas atsiranda viršutinės tuščiosios venos ir prieširdžio jungties srityje, M.Flack ir A.Keith mikroskopiškai tyrinėjo šią sritį [24]. Kol karštą vasaros dieną A.Keith su žmona važinėjosi dviračiais po apylinkes, M.Flack kurmio širdyje rado neįprastą struktūrą viršutinės tuščiosios venos ir dešinio prieširdžio auselės srityje. Sugrįžęs A.Keith pastebėjo, kad ši struktūra labai panaši į S.Tawara aprašytą atrioventrikulinį mazgą [25]. Be to, ši struktūra turėjo ryšį su klajoklio nervo ir simpatinių nervų kamienais, turėjo atskirą arteriją ir buvo išdėstyta srityje, kurioje atsiranda miokardą sužadantis impulsas. Šią struktūrą pavyko rasti ir kitų žinduolių širdyse. Savo atradimą, sinusinį mazgą kaip bioelektrinio impulso generatorių, A.Keith ir M.Flack aprašė 1907 metais "Journal of Anatomy" [24]. 1910 metais S.Tawara ir L.Aschoff pirmieji "sujungė" atskirai aprašytas ŠLS dalis į vieningą struktūrą.

Nauji atradimai sukėlė didelį susidomėjimą, ir K.F.Wenckebach 1908 metais ir S.Schonberg 1909 metais paskelbė radę prieširdžių sienelėje raumeninius pluoštus, supančius viršutinės tuščiosios venos žiotis ir nusileidžiančius užpakaline šonine dešinio prieširdžio sienele. K.F.Wenckebach manė, kad šis pluoštas yra analogiškas Hiso pluoštui. E.I.Curran 1910 metais patvirtino šių raumeninių pluoštų, išeinančių iš sinusinio mazgo, egzistavimą. C. Thorel 1909 metais taip pat rašė, kad sinusinį mazgą sudaro nerviniai elementai ir Purkinje skaidulos, jungiančios jį su atrioventrikuliniu mazgu [6]. Šie atradimai 1910 metais sukėlė karštas diskusijas Vokietijos Patologų draugijoje. Draugijos susirinkime L.Aschoff ir J.G.Monckeberg pasiūlė morfologinius kriterijus, leidžiančius atpažinti širdies laidžiosios sistemos audinį:

1. tai turi būti histologiškai atskiras miocitų pluoštas;
2. miocitų pluoštą galima atsekti serijiniuose histologiniuose pjūviuose;
3. miocitų pluoštas turi būti atskirtas jungiamuoju audiniu nuo aplinkinio miokardo [7,11].

Vėliau, kiti tyrinėtojai, W.Koch 1913 metais, R.C.Truxer ir M.Q.Smythe 1963 metais, E.W.Walls 1943 metais paneigė specializuotų takų tarp sinusinio ir AV mazgų egzistavimą, ir šiuo metu manoma, kad ŠLS mazgai neturi specializuotų tarpusavio takų [6].

Žmogaus ŠLS tyrimus apsunkino tai, kad makroskopiškai ji beveik nėra matoma. Net įprastai suformuotoje žmogaus širdyje ne visada pavyksta rasti visas ŠLS dalis. 1951 metais Widran ir Lev iš 41 širdies preparato tik 26 sugebėjo rasti dešinę Hiso pluošto šaką, o kairės nerado nei viename preparate [10]. 1959 metais Uhley ir Rivkin mėgino išryškinti žmogaus ŠLS dažydami laidžiosios sistemos audinyje esantį gausų glikogeną jodo preparatais. Šuns širdyje taip dažyta ŠLS buvo matoma kaip mėlyni pluoštai. Žmogaus širdyje pavykdavo nudažyti tik kairiąją Hiso pluošto šaką, nes dešinė yra išdėstyta tarpkilvelinės pertvaros raumenyse. Tačiau ir kairiąją kojytę išryškinti pavykdavo tik tada, jei žmogus būdavo staiga miręs, ir širdis buvo tirama ne vėliau kaip 90 minučių po mirties. Tais pačiais metais Bittencourt jodo preparatais nudažė šuns ŠLS operacijos metu, kad išvengtų operacinio ŠLS pažeidimo. Deja, jodas sukeldavo uždegiminę reakciją ir nebuvo tinkamas naudoti *in vivo*. 1961 metais Iwa suleido šuniui į vainikines arterijas fluoresceiną ir stebėjo ŠLS ultraviolete, nesukeldamas pakitimų kardiogramoje [10]. Kadangi širdies preparate makroskopiškai nepavykdavo išryškinti ŠLS, patologiniams tyrimams pradėtas naudoti histologinis metodas. Tik pavieniai tyrėjai šiuo metu naudoja makroskopinį ŠLS tyrimo metodą [26,27].

Nuo pat ŠLS atradimo buvo ieškoma patikimų ir nesudėtingų vaizdinimo metodų, kurie palengvintų šios sistemos tyrimus, padėtų išvengti chirurginio pažeidimo širdies operacijų metu. Todėl šio darbo uždavinys yra nustatyti žmogaus širdies laidžiosios sistemos ir miokardo morfologinius skirtumus ir pasinaudojus jais sukurti širdies laidžiosios sistemos vaizdinimo metodiką.

6.4. Širdies laidžiosios sistemos baltymų tyrimai

Tobulėjant audinių ir ląstelių tyrimo metodams, pradėti ultrastruktūriniai ir baltyminiai širdies audinių, taip pat ir ŠLS, tyrimai. Jau 19 a. pabaigoje histologiniai ir fiziologiniai atradimai parodė, kad nors širdis yra sudaryta iš daugelio ląstelių, ji veikia kaip vieningas funkcinis vienetas [28]. 1952 metais Silvio Weidmann įrodė, kad širdies ląstelės yra funkciškai susietos tarpusavyje, jonai gali judėti iš vienos ląstelės į kitą pagal elektrinį ir koncentracijos gradientą [8]. 1977 metais rasti plyšinių jungčių kanalai, sudaryti iš baltymų koneksinų (Cx) [29]. Plyšinės jungtys aptinkamos visuose žinduolių audiniuose, išskyrus cirkuliuojančias kraujo ląsteles ir suaugusiųjų skeleto raumenis. Šie tarpląsteliniai kanalai lemia bioelektrinio impulso plitimo greitį audinyje [30]. Plyšinės jungtys yra įvairių dydžių, jose randamų kanalų kiekis kinta nuo dešimties iki kelių tūkstančių. Kiekvieną kanalą sudaro du koneksonai (puskanaliai), išdėstyti šalia esančių ląstelių plazminėse membranose. Koneksonai užima visą membranos storį ir yra sudaryti iš 6 koneksinų molekulių. Koneksinai – tai nuo 26 kDa iki 50 kDa molekulinės masės membraniai baltymai [29]. Koneksinų pavadinimai nurodo jų molekulinę masę, t.y. Cx 26 yra 26 kD molekulinę masę turintis baltymas [31]. Koneksino tipas, ar skirtingų koneksinų tipų kombinacija lemia kanalo funkcinės savybės, laidumą įvairaus molekulinio svorio ir krūvio molekulėms [32]. Pvz.: vyraujant Cx40 impulso laidumo greitis mažėja, vyraujant Cx43 greitis didėja [28]. Žmogaus organizme aptiktas dvidešimt vienas koneksinas [33].

Žinduolių širdies raumenyje randami Cx43, Cx45 ir Cx40. Visoje širdyje vyrauja Cx43 kartu su negausiais Cx 40 ir Cx45. Skilvelių kardiomiocitai turi gausias plyšines jungtis sudarytas iš Cx43 ir Cx45. Prieširdžių miocitų plyšines jungtis sudaro Cx43, Cx45 ir Cx40 [32]. ŠLS miocitų plyšinių jungčių sudėtis šiek tiek skiriasi nuo skilvelių ir prieširdžių. Sinusinio mazgo miocitai turi negausias plyšines jungtis,

sudarytas iš Cx45 [25]. Sinusinis mazgas yra apsuptas jungiamojo audinio apvalkalu, išskyrus siaurą sritį tarp sinusinio mazgo ir galinės skiauterėlės, kurioje plyšines jungtis sudaro Cx45 ir Cx43. Manoma kad per šią sritį bioelektrinis impulsas plinta iš sinusinio mazgo į prieširdžius [30].

Atrioventrikulinio mazgo miocituose plyšinės jungtys taip pat negausios, bet koneksinų pasiskirstymas yra sudėtingesnis. Centrinėje mazgo dalyje vyrauja Cx45, užpakalinėje dalyje šalia prieširdžių raumens - Cx45 ir Cx43. Hiso pluošte ir jo šakose vyrauja Cx40, distalinėse sistemos dalyse - Cx43. Cx45 aptinkamas visoje atrioventrikulinėje širdies laidžiosios sistemos dalyje [32].

Koneksinų pasiskirstymas įvairių rūšių žinduolių širdyse yra skirtingas, Cx 40 nerandamas žiurkių prieširdžiuose ir jūros kiaulyčių širdies laidžiojoje sistemoje [32]. Ne visus koneksinus, rastus eksperimentinių gyvūnų ŠLS, taip pat pavyksta aptikti ir žmogaus širdyje [34]. Eksperimentuose su gyvūnais pastebėta plyšinių jungčių koneksinų ir joninių kanalų defektų įtaka bioelektrinio impulso plitimui [35]. Specifinių ŠLS koneksinų nėra rasta.

Išskirtinė širdies sinusinio mazgo ląstelių savybė yra spontaniška, lėta diastolinė depoliarizacija, kuri membraninį potencialą priartina prie slenkstinio potencialo. Vienas iš šios depoliarizacijos mechanizmų yra "keista" srovė, I_h , aprašyta 1970 metais. 1990 metais rasti šią srovę sukeliantys baltyminiai kanalai, pavadinti hiperpoliarizacijos aktyvuotais ciklinių nukleotidų vartų kanalais (HCN) [36]. HCN kanalai reguliuoja ląstelių susižadinimą žinduolių širdies ir nerviniame audiniuose, yra rasti tinklainės ganglijinėse ląstelėse. Žinduolių audiniuose rastos keturios HCN kanalų baltymų izoformos [36,37]. Tiriant žinduolių tinklainės HCN kanalus, nustatytos izoformų molekulinės masės membraninėse frakcijose. HCN1 61 kDa ir 102 kDa masės, HCN2 83 kDa, HCN3 85kDa, HCN4 120 kDa. Žiurkių galvos smegenyse rastų HCN kanalų baltymų molekulinės masės šiek tiek skiriasi nuo tinklainės HCN kanalų [37]. Įvairios HCN kanalų baltymų

izformos gali jungtis ir formuoti heteromultimerinius kanalus su tarpinėmis kinėtinėmis savybėmis [38].

Širdyje šie kanalai, pavadinti “ritmo vedlių” kanalais, nes sukelia ritmišką sinusinio mazgo ląstelių susižadinimą [37]. HCN kanalai randami sinusiniame mazge ir Purkinje skaidulose [37]. HCN kanalų pasiskirstymas žinduolių širdyse priklauso nuo amžiaus, rūšies ir širdies būklės. Vaisiaus miokarde, kai spontaniškai susitraukia visas miokardas randami gausūs HCN kanalai. Bręstant širdžiai, jų kiekis mažėja ir miocitai praranda sugebėjimą generuoti spontaniinį veikimo potencialą. Suaugusių triušiu, žiurkių ir šunų sinusiniame mazge vyrauja HCN4 kanalai. Nedidelis jų kiekis randamas atrioventrikuliniame mazge ir Purkinje skaidulose. HCN2 kanalai aptinkami prieširdžių ir skilvelių miocituose, širdies laidžiojoje sistemoje. Šių kanalų baltymų pasiskirstymas kinta esant pataloginėms širdies būklėms. Hipertrofuotoje širdyje, darbiname miokarde daugėja HCN2 ir HCN4 kiekis. Manoma, kad šie pokyčiai gali sukelti miokardo aritmogeninį aktyvumą. [39]. Žmogaus širdies laidžiajai sistemai specifikškų HCN kanalų ar juos sudarančių baltymų nerasta.

Mūsų atlikti pirmieji palyginamieji žmogaus širdies laidžiosios sistemos ir miokardo proteominiai tyrimai parodė, kad šių audinių baltyminė sudėtis skirtinga ir reikalauja tolimesnės, detalesnės analizės [40].

6.5. Širdies laidžiosios sistemos fluorescenciniai tyrimai

Plėtojantis biomedicinos technologijoms atsirado naujas diagnostikos metodas, vadinamas optine biopsija. Ji yra paremta organų ir audinių optinių savybių analize. Optinė biopsija įgalina charakterizuoti audinius, diagnozuoti ir analizuoti jų pakitimus remiantis šviesos sąveika su medžiaga. Vienas iš didžiausių spektroskopinių metodų privalumų yra toks, kad jie gali būti taikomi *in vivo* gaunant informaciją apie audinio natyvią būseną be ekscizijos sukeltų iškreipimų jau matavimo metu, ar tuoj po jo. Reikalaujantys minimalios invazijos, naudojantys

nejonizuojančią spinduliuotę, pasižymintys dideliu jautrumu ir tikslumu aptinkant pakitusius audinius, optiniai metodai turi didelį biologinį ir klinikinį potencialą.

Biocheminės fluorescencijos tyrimuose baltymų fluorescencija užima svarbiausią vietą. Biologiniuose audiniuose yra dviejų tipų molekulės: endogeniniai fluoroforai, kurie sugertą šviesą išspinduliuoja fluorescencijos pavidalu, ir molekulės, kurios sugeria šviesą, bet nespinduliuoja, o tik ją išsklaido [41,42]. Fluorescenciniai metodai skirstomi į nesensibilizuotosios ir sensibilizuotosios fluorescencijos metodus. Nesensibilizuotoji arba savitoji audinių fluorescencija pagrįsta audinių endogeninių fluoroforų optiniu sužadimu ir jų fluorescencijos stebėjimu [43]. Įprastoje dienos šviesos aplinkoje plika akimi biologinių audinių savitoji fluorescencija yra nematoma. Ją galima stebėti tik apšvietus reikiamo bangos ilgio šviesa, kurią sugeria endogeniniai fluoroforai. Audinius sudaro skirtingų fluoroforų ir nefluorescuojančių molekulių mišinys. Kiekvienas fluoroforas turi būdingus sugerties ir fluorescencijos spektrus, kurie paprastai yra sudaryti iš gana plačių ir viena kitą dengiančių juostų, todėl tiksliai identifikuoti šiuos fluoroforus yra gana sunku.

Savo unikaliomis savybėmis baltymų savitoji fluorescencija išsiskiria iš kitų fluorescencijos rūšių ir yra plačiai išnagrinėta. Fluorescencijos spektrai atspindi vidines audinių savybes, todėl jie gali būti sėkmingai naudojami paprasta akimi neatskiriamų mėginių atskyrimui. Dėl palyginti paprastos aparatūros, rezultatų atsikartojimo ir didelio jautrio mažiems biologinės medžiagos kiekiams, fluorescenciniai metodai neturi sau lygių biomediciniuose tyrimuose. Šių metodų jautris maždaug trimis eilėmis (10^3 kartų) didesnis, palyginus su sugerties spektroskopija, todėl leidžia naudoti žymiai mažesnes tiriamos medžiagos koncentracijas. Išspinduliuotos šviesos intensyvumas ir spektrinė sudėtis yra būdingi ją sugėrusiai biomolekulei ir taip pat priklauso nuo aplinkos savybių. Dėl šių

audinių savitosios fluorescencijos savybių ji plačiai taikoma įvairiose biomedicinos srityse.

Pirmasis darbas, kuriame buvo pastebėti sveikų ir navikinių audinių savitosios fluorescencijos spektrų kiekybiniai skirtumai, paskelbtas 1965 m [44]. Buvo matuoti stemplės, skrandžio, krūties ir skydliaukės sveikų ir navikinių audinių savitosios fluorescencijos spektrai. Nustatyta, kad navikų audinių fluorescencijos intensyvumas mažesnis negu sveikų audinių.

Šiuolaikinė fluorescencinė diagnostika remiasi tuo, kad sveikų audinių savitoji fluorescencija skiriasi nuo pažeistų audinių fluorescencijos. [44,45]. Kadangi daugumos fluoroforų fluorescencijos savybės priklauso nuo tarpląstelinės medžiagos sandaros ir medžiagų apykaitos ląstelėje, todėl morfologinius ir citologinius sveikų ir pažeistų ląstelių pokyčius galima nustatyti registruojant jų fluorescencijos spektrus. Fluorescencijos spektrai teikia informaciją apie audinį sudarančias biomolekules ir apie molekulę supančią terpę bei struktūrinius audinio pokyčius, pvz., būdingus navikiniams susirgimams [46-50].

Tikslus navikinių darinių ribų nustatymas susijęs su endogeninių fluoroforų triptofano, porfirino koncentracijų, struktūriniais kolageno bei elastino pokyčiais ir kvėpavimo grandinės (NADH) aktyvumu [51].

Ankstyvi ikinavikiniai pokyčiai sunkiai aptinkami tradiciniais bronchoskopiniais metodais. Fluorescencinės diagnostikos metodais jų aptikimo tikimybė žymiai didesnė [52-54].

Be to, fluorescenciniai tyrimai gali būti atliekami nepažeidžiant audinių ir leidžia gauti informaciją apie jų sudėtį ir struktūrą nedelsiant, net operacijos eigoje. Dėl minėtų savybių fluorescenciniai tyrimai yra nepakeičiami biologijoje ir medicinoje.

Daugelis biologinių objektų pasižymi savitąja fluorescencija. Jiems priklauso baltymai, membranos ir sacharidai iš esmės nefluorescuoja, o savitoji dezoksiribonukleininės rūgšties (DNR) fluorescencija yra per silpna, kad ją būtų galima pritaikyti praktikoje.

Baltymų fluorescencija yra intensyvi. Svarbiausi audiniuose sutinkami fluoroforai yra triptofanas [55], kolagenas, elastinas [58,59], redukuotas nikotinamidadenindinukleotidas (NADH) ir jo fosfatas [58], flavinai ir flavoproteinai [59], porfirinai [60].

Baltymuose yra trys fluorescuojančios aromatinės amino rūgštys: fenilalaninas (Phe), tirozinas (Tyr) ir triptofanas (Trp). Šios trys amino rūgštys yra santykinai retos baltymuose. Dominuojantis fluoroforas Trp sudaro ne daugiau 1% viso amino rūgščių kiekio. Fenilalaninas ir tirozinas paprastai nefluorescuoja, nes savo sugertą energiją perduoda triptofanui. Baltymuose dažnai būna tik viena arba dvi Trp liekanos, tai žymiai palengvina spektrų interpretaciją. Jei fluorescuotų visos 20 amino rūgščių, baltymų fluorescencijos analizė būtų neįmanoma. Reikšminga baltymų savitosios fluorescencijos savybė yra didelis Trp ir jo darinių jautris pokyčiams jų artimiausioje aplinkoje. Į Trp sudėtį įeinantis indolo žiedas yra unikalus, jautrus ir sudėtingas fluoroforas. Indolas, Trp ir jų dariniai labai jautrūs tirpiklio poliškumui bei universalioms ir specifinėms sąveikoms su tirpikliu. Dėl šios priežasties Trp liekanų fluorescencijos spektrai priklauso nuo jas supančios aplinkos poliškumo. Baltymų fluorescencijos spektrai priklauso nuo substratų surišimo, asociacijos ir denaturacijos reakcijų. Žadinant 250-280 nm bangos ilgio spinduliuote, sužadinamos visos trys aromatinės amino rūgštys, tačiau audiniuose fluorescuoja tik Trp, nes Phe ir Tyr sugerta šviesa perduodama Trp. Jei žadinimo bangos ilgis diesnis nei 295 nm, sužadinamas tik vienas Trp, nes Phe ir Tyr tokio bangos ilgio spinduliuotės nesugeria [60].

Fluorescenciniai metodai taikyti ir ŠLS tyrimuose. Aziz ir kt. ieškojo AV mazgo lokalizacijos šuns širdyje praėjus šešioms dienoms po mirties. Fluorescencija žadinta šviesolaidžiu 308 nm ir 364 nm bangos ilgio spinduliuote dešiniame skilvelyje, AV mazge ir dešiniame prieširdyje, tačiau žymesnių skirtumų tarp AV mazgo ir aplinkinių prieširdžių bei skilvelių audinių fluorescencijos nerasta [61].

Oeff ir kt., naudodami 365 nm bangos ilgio žadinančią spinduliuotę, pastebėjo šunų ir avių širdžių atrioventrikulinio mazgo ir aplinkinių prieširdžių bei skilvelių audinių fluorescencijos skirtumus. Spektro srityje nuo 450 iki 475 nm atrioventrikulinio mazgo srities fluorescencijos juostos smailė buvo žymiai intensyvesnė negu aplinkos. Taip pat nustatytas mazgo srities fluorescencijos juostos poslinkis ir žymus susiaurėjimas gretimų širdies raumenų fluorescencijos spektro atžvilgiu [62].

Perk M. ir kt. parodė, kad fluorescencinės spektroskopijos technika gali būti sėkmingai panaudota atskiriant žmogaus sinusinį ir atrioventrikulinį mazgus nuo aplinkinių audinių, nustatant mazgų sritis bei gylį po endokardu [63]. Ištyrus dvylikos žmonių širdžių mėginius, paimtus iš sinusinio ir atrioventrikulinio mazgų sričių, praėjus mažiau kaip 48 valandoms po mirties, nustatyta, kad mazgų fluorescencija, žadinant ją eksimeriniu XeCl lazeriu (308 nm), pastebimai skiriasi nuo aplinkinių audinių. Sinusinio ir AV mazgų fluorescencijos spektrai buvo registruoti ties 18 bangų ilgių nuo 365 nm iki 550 nm spektro srityje ir lyginti su aplinkinių audinių spektrais. ŠLS mazgų fluorescencijos intensyvumai spektro srityje nuo 440 nm iki 500 nm *in vitro* mažesni už prieširdžių endokardo fluorescencijos intensyvumą. Sinusinio ir atrioventrikulinio mazgų vidutiniai fluorescencijos intensyvumai ties 460 nm buvo $0,810 \pm 0,031$, o prieširdžių endokardo - $0,910 \pm 0,010$. Taip pat buvo palyginti sinusinio ir AV mazgų fluorescencijos intensyvumai su skilvelių endokardo fluorescencijos intensyvumu. Nustatyta, kad šių mazgų fluorescencijos intensyvumai 400 – 550 nm spektro srityje žymiai didesni už skilvelių endokardo fluorescencijos intensyvumą (mazgų fluorescencijos intensyvumai 475 nm spektro srityje buvo $0,709 \pm 0,003$, skilvelių endokardo - $0,334 \pm 0,030$). Žymesnių sinusinio ir atrioventrikulinio mazgų fluorescencijos intensyvumų skirtumų spektro srityje nuo 365 nm iki 550 nm nerasta [63].

Buvo analizuojami ŠLS mazgų ir prieširdžių bei skilvelių endokardo fluorescencijos intensyvumų ties pasirinktais bangų ilgiais santykiai. Visoje registruotoje spektro srityje sudaryti 35 sinusinio, AV mazgų, prieširdžių ir skilvelių endokardo fluorescencijos vidutinių intensyvumų santykiai, 16-oje iš jų nustatyti pastebimi skirtumai. Vidutinis sinusinio ir AV mazgų fluorescencijos intensyvumų santykis ties 380/450 nm rastas $1,174 \pm 0,061$ ir ties 380/475 nm - $1,379 \pm 0,079$. Prieširdžių endokardo fluorescencijos vidutinių intensyvumų santykis ties 380/450 nm $1,015 \pm 0,022$ ir ties 380/475 nm - $1,159 \pm 0,028$. Skilvelių endokardo fluorescencijos intensyvumų vidutinis santykis ties 380/450 nm - $1,991 \pm 0,101$ ir ties 380/475 nm - $2,542 \pm 0,130$. Naujuose mėginiuose sinusinis ir AV mazgai buvo identifikuoti pagal fluorescencijos intensyvumų santykius $>1,122$ ties 380/450 nm ir $>1,300$ ties 380/475 nm lyginant su prieširdžių endokardo mėginių fluorescencijos intensyvumų santykiais. Gautus rezultatus histologiniai tyrimai patvirtino 73 % sinusiniam ir 60 % - atrioventrikuliniam mazgam [63].

Kaip matyti iš pateiktų rezultatų, vienareikšmiškai sinusinį ir AV mazgus galima atskirti tik nuo skilvelių endokardo. Skirtumai tarp šių mazgų ir prieširdžių endokardo fluorescencijos intensyvumų yra labai nedideli [63].

Nepavyko rasti literatūroje aprašytų tyrimų, kuriuose būtų tyrinėti didžiausiu bioimpulso plitimo greičiu pasižyminčios širdies laidžiosios sistemos dalių, t.y. Hiso pluošto ir jo šakų, fluorescencijos ir fluorescencijos žadinimo spektrai. Daugumoje darbų fluorescencijai žadinti naudota lazerio spinduliuotė neleido atlikti žadinimo spektrų tyrimų, nes buvo apsiribojama vieno arba dviejų bangos ilgių žadinimu. Be to, minėtuose darbuose atlikti tik sinusinio ir atrioventrikulinio mazgų ir aplinkinio endokardo fluorescencijos tyrimai.

7. MEDŽIAGOS IR METODAI

Žmogaus širdies laidžiosios sistemos, miokardo, širdies jungiamojo audinio, kasos audinių (naudotų kontrolei) mėginiai paimti Valstybiniame patologijos centre, autopsijų metu. Audinių mėginių paėmimo būdai atitiko standartines autopsijos atlikimo metodikas. Po spektroskopinių tyrimų audinių mėginiai ištirti standartine histologine metodika, ir radiniai dokumentuoti autopsijos histologinio tyrimo protokole. ŠLS preparavimo metu rasti makroskopiniai morfologiniai pakitimai dokumentuoti autopsijų protokoluose.

Ištirti 77 mirusiųjų ligonių širdies audinių mėginiai. Tyrimui pasirinkti nuo 20 iki 60 metų amžiaus mirusieji, be širdies patologijos ar sisteminių ligų, galinčių pažeisti širdies audinius. Tiriamieji pasirinkti neatsižvelgiant į lytį, duomenys apie tirtus mirusiuosius nebuvo renkami, tirtoms širdims suteikti numeriai: 1-77. Audinių mėginiai paimti ne vėliau kaip per 48 valandas po mirties. Mėginiai fiksuoti 10% buferiniame formalino tirpale, tirti nedelsiant nefiksuoti arba saugoti – 70⁰C. Tyrimui naudoti Hiso pluošto ir jo šakų audiniai, miokardas ir kontrolei naudotas kasos audinys (35 mėginiai, K1 – K35). Kasos audinys naudotas FT-IR spektroskopiniams tyrimams, UV sugertiems spektroskopiniams tyrimams ir histocheminiams audinių tyrimams.

7.1. Širdies audinių tyrimai rentgeno elektroniniu mikroskopu

Rentgenoelektroniniams tyrimams nefiksuoti HP ir miokardo audiniai buvo džiovinami 80-90 ⁰C temperatūroje, kad būtų išgarintas tyrimams trukdantis vanduo (1-5 širdies preparatų audinių mėginiai). Kita dalis paruoštų HP ir miokardo audinio mėginių fiksuoti 10% neutraliame formalino tirpale ir džiovinti 80-90 ⁰C temperatūroje (6-10 širdies

preparatų audinių mėginiai). Hiso pluošto ir miokardo audinių elementinė sudėtis tirta SEM/EDX metodu JOEL firmos rentgenoelektroniniu mikroskopu, o spektrai registruoti JSM-840 su LNK firmos analizatorium AN 10/55S. Tyrimo sąlygos: silicio-ličio detektorius su berilio langeliu, zondo elektronų greitinanti įtampa - 20 kV, zondo srovė- $3 \cdot 10^{-9}$ A, plyšys-1.

Audinių mėginiai paruošti Valstybiniame patologijos centre ir tirti Teismo ekspertizės centro laboratorijoje.

7.2. Širdies audinių sugerties FT-IR spektroskopiniai tyrimai

FT-IR spektroskopiniams tyrimams naudoti nefiksuoti ir nedžiovinti HP, miokardo ir kasos audinių mėginiai (11-20 širdies preparatų audinių mėginiai ir K1-K10 kasos audinio mėginiai) ir fiksuoti 10% neutraliame formalino tirpale ir 80-90 °C temperatūroje išdžiovinti HP, miokardo ir kasos audinio (21-25 širdies preparatų audinių mėginiai ir K11-K15 kasos audinio mėginiai). Mėginių sugertis infraraudonojoje (IR) spektro srityje registruota Perkin Elmer firmos Furje transformacijų (FT-IR) spektrometru PARAGON 1000 PC su i-serijos mikroskopu $4000 \text{ cm}^{-1} - 480 \text{ cm}^{-1}$ srityje (tyrimo sąlygos: stiprinimas-2, skenavimų skaičius – 200-400, bandiniai suspausti mikrobeimantinėje kiuvetėje).

Audinių mėginiai paruošti Valstybiniame patologijos centre ir tirti Teismo ekspertizės centro laboratorijoje.

7.3. Širdies audinių ultravioletiniai sugerties spektriniai tyrimai

UV tyrimams HP, miokardo ir kasos audinių mėginiai (26-35 širdies preparatų audinių mėginiai ir K16-K25 kasos audinio mėginiai) buvo fiksuoti 10% neutraliame formalino tirpale, standartine histologine technika įlieti į parafiną ir mikrotomu Leica RM2145 supjaustyti 15 μm storio pjūviais. Audinių pjūviai uždėti ant kvarcinių langelių. UV

sugerties spektrai matuoti šviesolaidiniu spektrometru PC 1000 Plug-in (Ocean Optics Inc., FL., USA). Palyginimui tirti ir kasos audinio mėginiai.

Kontroliniams sugerties spektrams registruoti, paruošti triptofano (Trp) ir tirozino (Tyr) 10^{-3} M koncentracijos tirpalai distiliuotame vandenyje. Amino rūgštys įsigytos iš Reachim (Rusija).

Audinių mėginiai paruošti Valstybiniame patologijos centre ir tyrimai atlikti Vilniaus Universiteto Fizikos fakultete, Lazerinių tyrimų centre.

7.4. Miokardo ir širdies laidžiosios sistemos histocheminiai dažymai

Autopsijos metu, iš žmogaus širdies preparato paimta tarpškilvelinės pertvaros viršutinė dalis su HP ir jo bifurkacija, MK fragmentais (36-45 širdies preparatas). Audinių blokai, įprasta histologine metodika impregnuoti ir blokuoti parafine [64]. Parafininiai audinio blokai Leica RM 2145 mikrotomu pjaustyti 4 mikronų storio pjūviais. Paruošti preparatai dažyti žemiau aprašytais histocheminiais metodais, siekiant išryškinti Tyr ir Trp žmogaus HP audinyje. Histocheminių reakcijų kokybinei kontrolei įvertinti analogiškomis sąlygomis paruoštas ir dažytas žmogaus kasos audinys, turintis didelį Tyr ir Trp kiekį (K26-K35 kasos audinio mėginiai).

Histocheminėms reakcijoms naudoti reagentai:

Ksilenas – “Ekos-1” TU 6-09-3825-88.

Izopropilo alkoholis (100%)- “Pemko chemicals” 100035.

96% etilo alkoholis.

Natrio nitratas (NaNO_2)- “BDH” 30188.

Koncentruota acto rūgštis (CH_3COOH)- “Rachema” 99,8%.

8-amino-1-naftol-5-sulfoninė rūgštis ($\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_4\text{S}$)-“Aldrich” 21686-090%.

Kalio hidroksidas (KOH).

Amonio sulfamatas ($\text{NH}_2\text{SO}_3\text{NH}_4$) – “Sigma” A-4630 99%.

70% etilo alkoholis.

0,1 M HCL pagaminta iš koncentruotos HCL – “Barta Cihlar” 37%.

Naudotos literatūroje aprašytos histocheminės reakcijos [65].

Millon reakcija tirozinui (reakcija su fenilo grupe).

Tirpalai:

Tirpalas A.

10 gr. gyvsidabrio sulfato dedama į 90 ml. distiliuoto vandens ir 10 ml. koncentruotos sieros rūgšties mišinį, ir ištirpdoma šildant. Atvėsinus iki kambario temperatūros įpilama 100 ml. distiliuoto vandens.

Tirpalas B.

250 mg. natrio nitrito ištirpdoma 10 ml. distiliuoto vandens.

Dažomasis tirpalas.

5 ml. tirpalo B sumaišoma su 50 ml. tirpalo A.

Dažymo metodika:

1. Pamerkti pjūvius į vandenį.
2. Panardinti pjūvius į dažomąjį tirpalą ir palengva šildyti iki užvirimo, virinti 2 minutes.
3. Atvėsinti iki kambario temperatūros.
4. Tris kartus praskalauti distiliuotame vandenyje, kaskart keičiant vandenį po 2 minučių.
5. Dehidratuoti alkoholyje, dėti ant objektinio stiklelio ir užlieti ksilenu.

Diazotizavimo-sujungimo metodas tirozinui išryškinti (reakcija su fenilo grupe).

Tirpalai.

Inkubavimo tirpalas (A)

Natrio nitritas 3,5 gr.

Koncentruota acto rūgštis 4,4 ml.

Distiliuotas vanduo 47 ml.

Inkubavimo tirpalas (B)

8-amino-1-naftol-5-sulfoninė rūgštis 0,5 gr.

Kalio hidroksidas 0,5 gr.

Amonio sulfamatas 0,5 gr.

70% alkoholis 50 ml.

Dažymo metodika:

1. Pamerkti pjūvius į vandenį.
2. Pamerkti pjūvius į 4°C temperatūros inkubavimo tirpalą (A) 24 valandoms tamsoje.
3. Skalauti keturis kartus keičiant distiliuotą vandenį 4°C temperatūroje.
4. Pamerkti pjūvius į 4°C temperatūros inkubavimo tirpalą (B) 1 valandai tamsoje.
5. Skalauti pjūvius tris kartus 0.1M HCL tirpale, kiekvieną kartą keičiant tirpalą po 5 minučių.
6. Skalauti bėgančiame vandentiekio vandenyje 10 minučių.
7. Dažyti foną, jei reikia.
8. Dehidratuoti spirite ir dėti ant objektinio stiklelio, užlieti ksilenu.

DMAB metodas triptofanui išryškinti (reakcija su indolo grupe).

Tirpalai

DMAB tirpalas:

5 gr. ρ-dimetilaminobenzaldehidą ištirpdomas 100 ml. koncentruotos hidrochloratinės rūgšties.

Nitritinis tirpalas:

1 gr. natrio nitrito ištirpdoma 100 ml. koncentruotos hidrochlorinės rūgšties.

Dažymo metodika:

1. Pamerkti pjūvius į alkoholį.

2. Impregnuoti 0,5 % celoidinu.
3. Pamerkti į DMAB tirpalą 1 minutei.
4. Perkelti į nitritinį tirpalą 1-2 minutėms.
5. Atsargiai plauti tekančiame vandenyje 30 sekundžių.
6. Plauti parūgštintame alkoholyje 15 sekundžių.
7. Plauti vandenyje ir dažyti foną 1% vandeniniu neutraliu raudonių 5 minutes.
8. Dehidratuoti alkoholiuose, dėti ant objekcinio stiklelio ir užlieti ksilenu.

Audinių mėginiai paruošti ir histocheminės reakcijos atliktos Valstybiniame patologijos centre.

7.5. Širdies audinių savitosios fluorescencijos ir jos žadinimo spektroskopiniai tyrimai

Spektroskopiniams tyrimams naudoti nefiksuoti žmogaus širdies audiniai (46-50 širdies preparatas) ir fiksuoti 10% neutraliame formalino tirpale audiniai (51-55 širdies preparatas). HP šakų lokalizacijos tyrimams naudoti 2-3 cm dydžio tarpkilvelinės pertvaros fragmentai, kadangi šios šakos yra labai plonos, jų matmenys siekia 1-2 mm, todėl jos nebuvo atskiriamos nuo endokardo. Miokardo bandiniai paimti iš kairiojo širdies skilvelio, jungiamojo audinio mėginiai iš triburio vožtuvo.

HP, miokardo ir jungiamojo audinio mėginių fluorescencijos ir fluorescencijos žadinimo spektrai registruoti liuminescenciniu spektrofotometru Perkin Elmer LS50B. Monochromatorių plyšių spektriniai pločiai matavimo metu buvo palaikomi pastovūs: žadinimo monochromatoriaus – 5 nm, fluorescencijos monochromatoriaus - 7 nm. Bandiniai buvo suspaudžiami tarp dviejų kvarcinių langelių. Taip įtvirtinti jie neišdžiūdavo, ir matavimo metu jų spektrinės savybės nekito. Spektro pakitimų nerasta ir pakartojus matavimus po 1 mėn.

HP kairiosios šakos išsidėstymas širdies tarpkilvelinės pertvaros preparatuose nustatytas fluorescenciniu mikroskopu Olympus BX 60 ir skaitmenine kamera Olympus D50. Spektroskopiniams tyrimams buvo išrinkti bandiniai, kuriuose aiškiausiai matyti HP šakų fragmentai.

Mikroskopu-spektrofotometru МСФУ buvo registruoti skirtingų tarpkilvelinės pertvaros taškų fluorescencijos spektrai, apimant Hiso pluošto šakų fragmentus ir aplinkinį endokardą.

Makroskopiniam visos tarpkilvelinės pertvaros vaizdinimui naudoti trys šviesos šaltiniai. Aukšto slėgio Hg lempa ДРШ 250–3, duodanti linijinį spektrą, žadinimui buvo pasirinkta ties 366 nm esanti Hg linijų grupė, išskirta filtru УФС8. Kitas šaltinis - Xe (ksenono) šviesolaidinė lempa MAX-302, žadinimui naudotos spektro sritys ties 340, 360 ir 405 nm išskirtos interferenciniais filtrais. Trečias šviesos šaltinis – titano safyro lazerio ketvirta harmonika ties 350 nm. Tarpkilvelinės pertvaros vaizdai, gauti skaitmeninėmis CCD kameromis ToUcam Pro (Philips) ir Infinity 2.

Kontroliniams fluorescencijos spektrams registruoti, paruošti triptofano (Trp) ir tirozino (Tyr) 10^{-3} M koncentracijos tirpalai distiliuotame vandenyje. Amino rūgštys įsigytos iš Reachim (Rusija).

Audinių mėginiai paruošti Valstybiniame patologijos centre ir tyrimai atlikti Vilniaus Universiteto Fizikos fakultete, Lazerinių tyrimų centre.

7.6. Vaizdinimo eksperimentai: Hiso pluošto šakų paviršinės skyros fluorescencinė spektroskopija

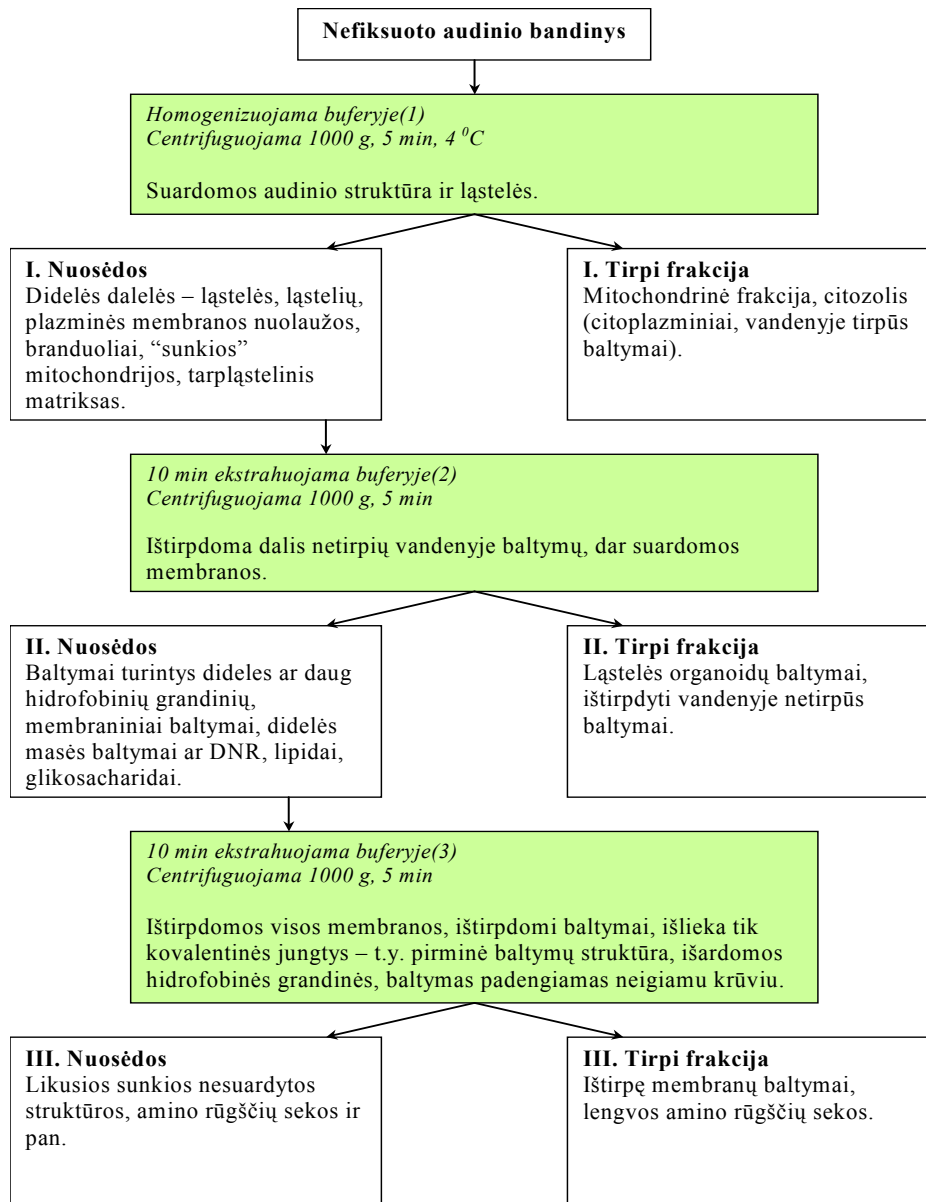
Vaizdinimo eksperimentams panaudota 10 širdžių preparatų. 5 preparatai (56-60 širdies preparatai) fiksuoti 10% neutraliame formalino tirpale. Kiti 5 preparatai siekiant įvertinti kraujo sugerties įtaką tirti nefiksuoti ir neplauti (61-65 širdies preparatai).

Širdžių preparatai paruošti Valstybiniame patologijos centre ir tyrimai atlikti Vilniaus Universiteto Fizikos fakultete, Lazerinių tyrimų centre.

7.7. Širdies audinių homogenatų tyrimas

Detalesniam širdies laidžiosios sistemos Hiso pluošto (HP), miokardo (MK) ir iš triburio vožtuvo paimto jungiamojo audinio (JA) preparatų fluorescenciją sąlygojančių fluoroforų bei jų lokalizacijos nustatymui buvo ruošiami širdies audinių homogenatai. Audinių mėginiai paimti iš 10 nefiksuotų formaline širdžių (66-75 širdies preparatai).

Audiniai buvo homogenizuojami trimis etapais, homogenizavimo etapų schema pateikta (18 pav.).



18 pav. Širdies audinių homogenizavimo etapai

Frakcijų paruošimas spektrofotometriniams tyrimams atliktas tokiu būdu: audiniai pasverti, smulkinti skalpeliu į mažus (1-5 mm) gabalėlius, tris kartus plauti 0,9% KCl ir homogenizuoti Poterio homogenizatorium dešimt kartų didesniame 5mM Tris (250 mM sacharozės ir 2 mM EGTA, pH 7,7 2 °C temp.) buferio kiekyje. Gauti homogenatai 5 min. centrifuguoti 4°C temperatūroje, pasirinkus 5000 g. Supernantas (tirpi frakcija) atskirtas nuo netirpios frakcijos ir spektrofluorimetru Perkin Elmer LS 50B užregistruoti jo fluorescencijos ir fluorescencijos žadinimo spektrai.

Netirpi frakcija dalinama į dvi dalis – spektriniam tyrimams ir tolimesniam homogenizavimui. Netirpios frakcijos dalis buvo vėl homogenizuota dešimt kartų didesniame buferio kiekyje, kurį sudarė 5 mM Tris, 180 mM KCl, 8M šlapalo, 2 mM EGTA (pH 7,7 2°C temp.). 5 min. Centrifuguota, atskirtas supernantas (antra tirpioji frakcija) ir išmatuoti atskirto supernanto ir likusių nuosėdų fluorescencijos ir jos žadinimo spektrai. Taip gautos antrosios tirpi ir netirpi frakcijos. Likusių nuosėdų (antros netirpios frakcijos) dalis vėl homogenizuota penkis kartus didesniame buferio, sudaryto iš 50 mM Tris (pH 6,8), 6 M šlapalo, 30% (v/v) glicerolio, 2% NDS (m/v) (natrio dodecilsulfato), 5 % (m/V) - 2-merkaptetanolio, kiekyje. Centrifuguota ir atskirta tirpi ir netirpi trečiosios frakcijos.

Į tirpiausias frakcijas pateko mitochondrinė frakcija, citozolis, vandenyje tirpūs ląstelės organoidų baltymai ir ištirpę membranų baltymai. Nuosėdas sudarė likusios nesuardytos struktūros, amino rūgščių sekos ir kt.

Kiekviename homogenizavimo etape spektrofluorimetru Perkin Elmer LS 50B buvo registruojami tirpių ir netirpių frakcijų bei elektroforezės metodu išskirtų atskirų baltymų grupių savitosios fluorescencijos ir jos žadinimo spektrai.

Audinių mėginiai paruošti Valstybiniame patologijos centre, homogenizuoti VU Gamtos mokslų fakulteto Biochemijos ir biofizikos katedroje ir tirti VU Fizikos fakultete, Lazerinių tyrimų centre.

7.8. Elektroforetinis baltymų frakcionavimas

Baltymų charakterizavimui, t.y. molekulinės masės nustatymui buvo atlikta audinių tirpiųjų frakcijų (50mg baltymų), gautų iš širdies audinių homogenatų (66-75 širdies preparatų audiniai), natrio dodecilsulfato poliakrilamido gelio elektroforezė (NDS-PAGE) pagal Laemmli. Baltymų grupių masės elektroforegramoje buvo nustatomos lyginant jas su

žinomos molekulinės masės žymenimis SM 0441 (118 kDa, 79 kDa, 47 kDa, 33 kDa, 25 kDa ir 19 kDa, gamintojas “Fermentas”, Lietuva).

NDS sąveikos su baltymų polipeptidinėmis grandinėmis metu suardomos baltymų antrinė ir tretinė struktūros. Surišto NDS kiekis nepriklauso nuo baltymo savybių, o yra proporcingas baltymo molekulinei masei. Frakcionuojamo baltymo elektrinį krūvį apsprendžia susirišęs su baltymu NDS kiekis, o elektroforetinis baltymų judrumas poliakrilamido gelyje priklauso tik nuo baltymų masės.

Visų audinių tirpiosios frakcijos padalintos į dvi dalis. Viename gelyje jos buvo nudažytos nespecifiškai besijungiančiais dažais Coomassie Brilliant Blue R250. Šis gelis buvo naudojamas baltymų masių nustatymui. Fluorescenciniams matavimams skirtas gelis buvo nedažytas, nudažyti tik standartiniai reperiniai baltymai. Sulyginus šiuos du gelius buvo nustatyta juostų padėtis ir išpjauti jas atitinkantys gelio gabaliukai, kurie buvo pritvirtinti prie kvarcinių langelių ir užregistruoti atskirų baltymų grupių fluorescencijos ir jos žadinimo spektrai.

Audinių mėginiai paruošti Valstybiniame patologijos centre, frakcionuoti VU Gamtos mokslų fakulteto Biochemijos ir biofizikos katedroje ir tirti VU Fizikos fakultete, Lazerinių tyrimų centre.

7.9. Miokardo ir širdies laidžiosios sistemos baltymų dviejų krypčių elektroforezė

Baltymų išskyrimas iš širdies audinių

Iš dviejų širdžių (76-77 širdies preparatai) preparavimo metu paimti Hiso pluošto audinio ir miokardo fragmentai praplauti šaltame PBS (0,05 M K/Na-fosfatinis buferis su 0,15 M NaCl, pH 7,2–7,4). buferyje ir išdžiovinti. Skystame azote audiniai grūstuvu sutrinti į miltelius. Į audinių miltelius pridėtas Chemicon Total Protein Extraction Kit reagentas ir audinių lizato baltymai izoliuoti pagal gamintojo protokolą (Chemicon

International Inc.). Audinių baltymai tirti nedelsiant arba laikyti -70°C temperatūroje.

Baltymų frakcionavimas 2DE (dviejų krypčių elektroforezės gelyje) sistemoje

Gauti širdies audinių baltymai tirti dviejų krypčių elektroforeze gelyje. Elektroforezei naudoti Immobiline DryStrip Kit reagentas pH 3-10, ir Excel Gel SDS, 8-18%. Baltymų frakcionavimas atliktas pagal gamintojo instrukciją (Immobiline DryStrip Kit for 2-D Electrophoresis with Immobiline DryStrip and ExelGel SDS, Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden). Baltymų analizei 2DE gelis dažytas PageBlue Protein Staining Solution (PageBlue Protein Staining Protocol, Fermentas, Lietuva). Žinomos molekulinės masės žymenų gamintojas "Fermentas", Lietuva).

Trimačiams vaizdams sukurti buvo naudota Matlab funkcija "surf" kartu su kitomis colormap'o, apšvietimo, ašių geometrijos derinimo funkcijomis. Dėmės iš 2DE vaizdo 3D vaizdas gaunamas pikselio skaisčio vertę atvaizduojant Dekarto koordinačių z ašyje, prieš tai 2DE vaizdą invertavus (padarius baltą dėmę juodame fone).

Audinių mėginiai paruošti Valstybiniame patologijos centre ir tirti Biochemijos instituto Vystymosi biologijos skyriuje.

8. REZULTATAI

8.1. Širdies laidžiosios sistemos preparavimo metodika

Tyrimui naudotas žmogaus HP ir jo kairės šakos audinys gautas, preparuojant 10 % neutraliame formaline fiksuotus arba nefiksuotus, atsitiktinai parinktus širdies preparatus, neatsižvelgiant į žmogaus amžių ir patologiją. Bandiniai buvo imami iš HP, nes jame yra didžiausias ramybės potencialas ir didžiausias bioelektrinio impulso sklidimo greitis, todėl tikėtina, kad ir struktūriniai skirtumai tarp HP ir miokardo turėtų būti patys didžiausi. Taip pat HP nėra gausios inervacijos, kaip sinusiniame ar AV mazge, ir rasti pakitimai negalėtų būti susieti ne su ŠLS raumens ypatybėmis, o su gausia inervacija.

ŠLS audinio preparavimui naudoti literatūroje aprašyti preparavimo metodikos principai [3]. Anatomicinis ŠLS preparavimas pagrįstas pastovia šios sistemos struktūrų padėtimi ir pastoviu santykiu su arterijomis normaliai išsivysčiusioje širdyje, ir tuo, kad ŠLS atskirta nuo aplinkinių audinių jungiamojo audinio apvalkalu. Makroskopiškai ji atrodo šviesesnė ir labiau permatoma nei širdies raumuo. Tai leidžia ŠLS atpažinti naudojant mažus ir vidutinius padidinimus. ŠLS ir pagrindinės jos kraujagyslės paruoštos preparavimo adatomis, pincetu ir žirkklėmis, naudojant 12-36 kartus didinantį mikroskopą Carl Zeiss.

Prieš pradėdant paruošti AV mazgą, reikia ištirti jo arterijos eigą. Dažniausia ji atsišakoja nuo dešinės vainikinės arterijos (*arteria coronaria dextra*), rečiau nuo kairės vainikinės arterijos apsukinės šakos (*ramus circumflexus*), dažniausiai užpakalinės tarpkilvelinės vagos (*sulcus interventricularis posterior*) lygyje. Radus AV mazgo arterijos atsišakojimo vietą, ši arterija, preparuojama iki triburio vožtuvo pertvarinės burės (*cusps septalis*) pagrindo vidurio. Tipiškais atvejais šis taškas yra tiesiai priešais vainikinio ančio (*sinus coronarius*) žiotis.

Preparuojant arteriją, atsišakančią nuo kairės ar dešinės vainikinės arterijos, užpakalinės tarpkilvelinės vagos (sulcus interventricularis posterior) lygyje perkerpama dešinio prieširdžio užpakalinė/apatinė sienelė. Toliau arterija preparuojama perpjaunant endokardą ir paviršinį miokardo sluoksnį užpakalinėje dešinio prieširdžio dalyje, pratęsiant užpakalinės/apatinės sienelės pjūvį iš užpakalio į priekį iki triburio vožtuvo pertvarinės burės pagrindo vidurio lygio. Šioje vietoje arterija panyra į AV mazgo užpakalinį kraštą arba praeina tiesiai po mazgu. Taip randamas užpakalinis AV mazgo kraštas, ir tolimesnis preparavimas šiame taške baigiamas, kad nesuardyti mazgo, nes užpakalinis kraštas be aiškių ribų pereina į dešinio prieširdžio miokardą.

Randamas priekinis mazgo kraštas: čiuopiant centrinių fibrozinį kūną, toje vietoje kur jis susijungia su aortos vožtuvo fibrozinio žiedu, ties aortos užpakalinės burės pagrindu pasluoksniui perpjaunamas dešinio prieširdžio endokardas, purios ląstelių ir miokardo sluoksniai. Leidžiantis žemyn centriniu fibrozinio kūnu atskiriami minėti audinių sluoksniai, kol randama Todaro sausgyslės susijungimo vieta su centriniu fibrozinio kūnu. Dažnai tai sutampa su centrinio fibrozinio kūno viduriu. Toliau audinių sluoksniai atskiriami nuo centrinio fibrozinio kūno dešinio šlaito iki jo dešinio krašto jungties su triburio vožtuvo (valva tricuspidalis) fibrozinio žiedu. Tai sutampa su triburio vožtuvo priekine jungtimi. Atsargiai preparuojamas fibrozinis triburio vožtuvo pertvarinės burės žiedas iki taško, kur buvo rastas užpakalinis AV mazgo kraštas. Taip randamas dešinys mazgo kraštas, kuriame jungiamojo audinio mazgo apvalkalo pluoštai jungiasi su triburio vožtuvo pertvarinės burės fibrozinio žiedu. Toliau atskiriant minėtus audinius nuo AV mazgo jungiamojo audinio apvalkalo išpreparuojamas dešinys kraštas ir sujungiami priekinio ir užpakalinio kraštų preparavimo taškai. Nuo dešinio krašto atskiriami maždaug 4-6 mm audinių link prieširdžių pertvaros, kas atitinka mazgo plotį. Taip randamas kairys mazgo kraštas, kuris retai turi aiškias ribas, todėl tiksliau būtų kalbėti apie pereinamąją

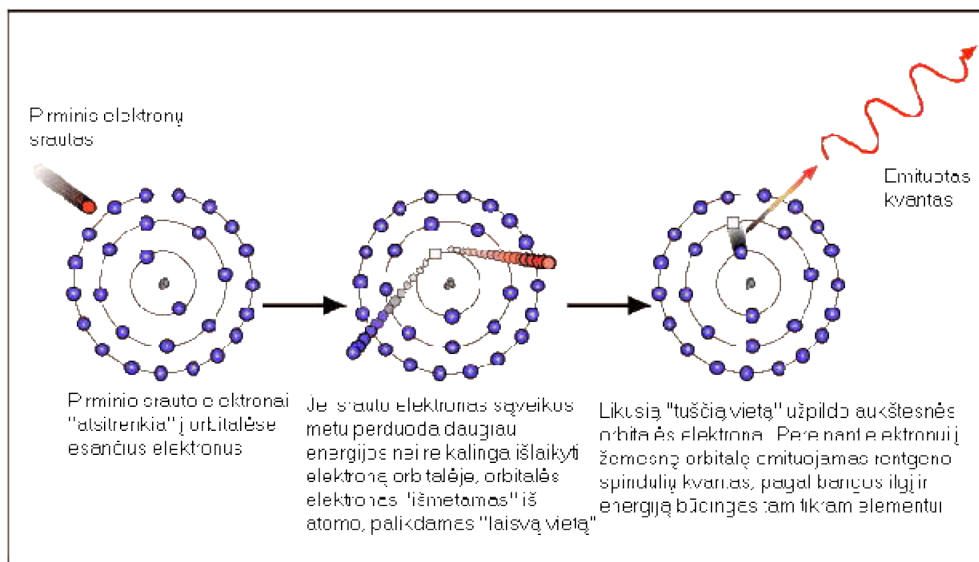
zoną tarp AV mazgo ir miokardo žemiau tarpprieširdinės pertvaros krašto. Išpreparavus mazgo priekinį kraštą tuo pat metu išryškinama ir prieširdinė HP dalis. Perėjimas iš mazgo į pluoštą yra už centrinio fibrozinio kūno jungties su triburio vožtuvo fibroziniu žiedu. Tai leidžia nesuardyti HP, įeinančio į centrinių fibrozinį kūną. Penetruojanti HP dalis lengvai randama perkirpus centrinio fibrozinio kūno dešinio krašto ir triburio vožtuvo fibrozinio žiedo jungtį. Penetruojanti HP dalis iš visų pusių apsupta jungiamuoju audiniu. Kartais ji būna jungiamojo audinio pertvarų padalinta į atskirus fragmentus, todėl preparuoti reikia labai atsargiai. HP penetruojančios dalies vientisumas yra anatomicinis požymis, rodantis, kad preparuojama teisingai. Tipiškais atvejais HP yra vienintelė jungtis tarp prieširdžių ir skilvelių raumens. Tolimesnis HP ir jo šakų preparavimas techniškai nesudėtingas. Tipiškais atvejais bifurkacija išdėstyta riboje tarp tarpskilvelinės pertvaros membraninės dalies ir raumeninės pertvaros viršūnės keteros, rečiau membraninės pertvaros pagrinde. Preparuojant skilvelinę HP dalį reikia atminti, kad nuo viso jos kairio krašto ilgio atskyla kairė šaka. Todėl tikslinga pradžioje rasti viršutinį ir dešinį kraštą ir tik po to preparuoti kairį su atskylančia šaka. Jei kairė šaka atsidalina visame kairio krašto ilgyje, ji būna labai plona. Labai svarbu tokiais atvejais jos nenutraukti, kas labai apsunkina distalinės kairės šakos dalies preparavimą. Jei kairė šaka atskyla kaip siaura kelių milimetrų juosta, ji būna daug storesnė ir lengviau preparuojama.

8.2. Širdies audinių tyrimai rentgeno elektroniniu mikroskopu

Šiuo metu žinios apie žmogaus širdies laidžiosios sistemos morfologiją ir bioelektrinio impulso perdavimo mechanizmus gana prieštaringos. Pagrindiniai anatomiciniai ir fiziologiniai impulso laidumo faktoriai yra skaidulų skersmuo, geometrinis išsidėstymas ir ląstelės sugebėjimas aktyvuotis, priklausantis ir nuo laidume dalyvaujančių teigiamų ir

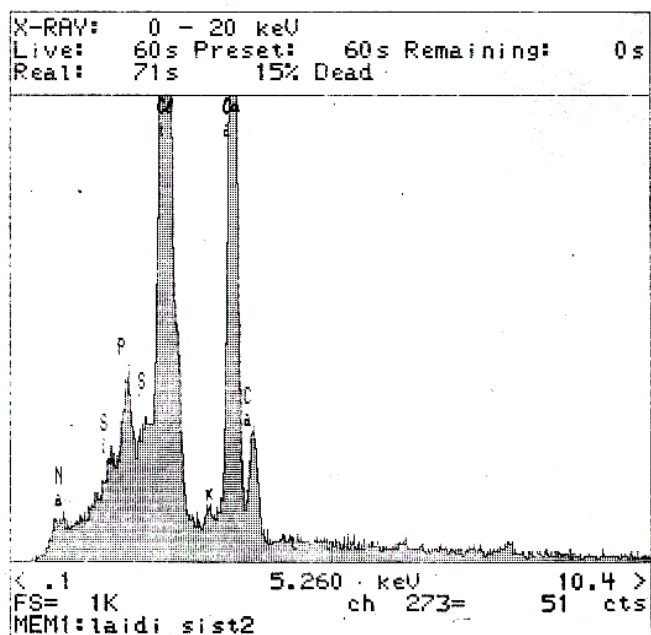
neigiamų jonų koncentracijos. Pagal Hodgkin-Huxley joninę teoriją laidumas priklauso nuo jonų koncentracijos, atvirų joninių kanalų skaičiaus ir savybių, membranos potencialo ir laiko [66]. Vieningos nuomonės apie fosforo, kalcio, chloro, sieros, silicio, natrio ir kalio jonų kiekius ŠLS ir MK audiniuose nėra, todėl pirmiausiai buvo tiriama ir lyginama elementinė ŠLS ir MK sudėtis. Tyrimų tikslas – nustatyti ar bioimpulso perdavimo greičio pokyčiai nėra susiję su skirtingais jonų kiekiais audiniuose.

Rentgenoelektroninio mikroskopo veikimas pagrįstas tuo, kad tiriamą medžiagą paveikiama elektronų srautu. Elektronai “išmuša” tiriamos medžiagos elektronus, iš artimiausių branduoliui mažos energijos orbitalių. Dėl prarastų elektronų, atomas tampa nestabilus ir siekia sugrįžti į stabilią būseną. Elektronui peršokant iš tolimesnės orbitalės į “išmušto” elektrono vietą artimesnėje branduoliui orbitalėje, atomas emituoja rentgeno kvantą. Emituoto rentgeno spindulių kvanto energija ir bangos ilgis būdingas konkrečiam cheminiam elementui (19 pav.).

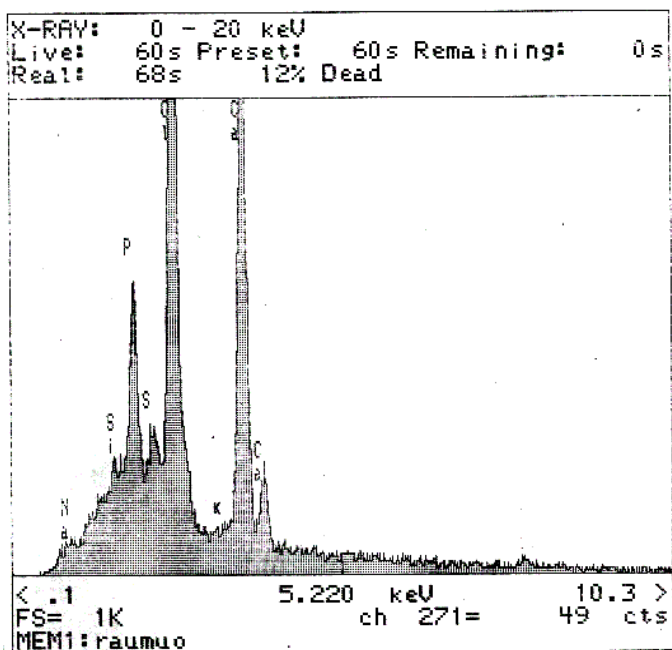


19 pav. Rentgenoelektroninio spektro principas. UV sugerties ir fluorescencijos spektrai gaunami vykstant elektronų šuoliams išoriniuose sluoksniuose.

Rentgenoelektroniniu mikroskopu HP ir MK audinių kokybinės elementinės sudėties tyrimams buvo naudojami nefiksuotų audinių mėginiai (1-5 širdies preparatų audinių mėginiai), iš kurių buvo išgarintas vanduo. Tyrimų rezultatai pateikti 20 pav. ir 21 pav.



20 pav. Rentgenoelektroninis nefiksuotų ir išdžiovintų Hiso pluošto mėginių spektras. Abscisių ašyje atidėta energija keV, ordinačių ašyje - rentgeno spektro linijų intensyvumas.



21 pav. Rentgenoelektroninis nefiksuotų ir išdžiovintų miokardo mėginių spektras. Abscisių ašyje atidėta energija keV, ordinačių ašyje - rentgeno spektro linijų intensyvumas.

Išanalizavus gautus spektrus nustatyta, kad visuose tirtuose mėginiuose rasti šie elementai: kalcis, chloras, fosforas, siera, silicis, kalis ir natris (1.lentelė). HP ir MK audiniuose intensyviausios kalcio ir chloro jonų spektrinės linijos.

1 lentelė. Rentgenoelektroniniais tyrimais nustatyta ŠLS, MK mėginių kokybinė elementinė sudėtis

Elementai Mėginiai	Ca	Cl	P	S	Si	K	Na
HP	+++	+++	++	+	+ -	+ -	+ -
MK	+++	+++	++	+	+ -	+ -	+ -

+++ - labai intensyvi analitinė linija; ++ - intensyvi analitinė linija; + - vidutinio intensyvumo analitinė linija; + - - mažai intensyvi analitinė linija.

Fiksuotų ir išdžiovintų mėginių (6-10 širdies preparatų audinių mėginiai) rentgenoelektroniniai spektrai buvo tapatūs nefiksuotų ir išdžiovintų mėginių spektrams.

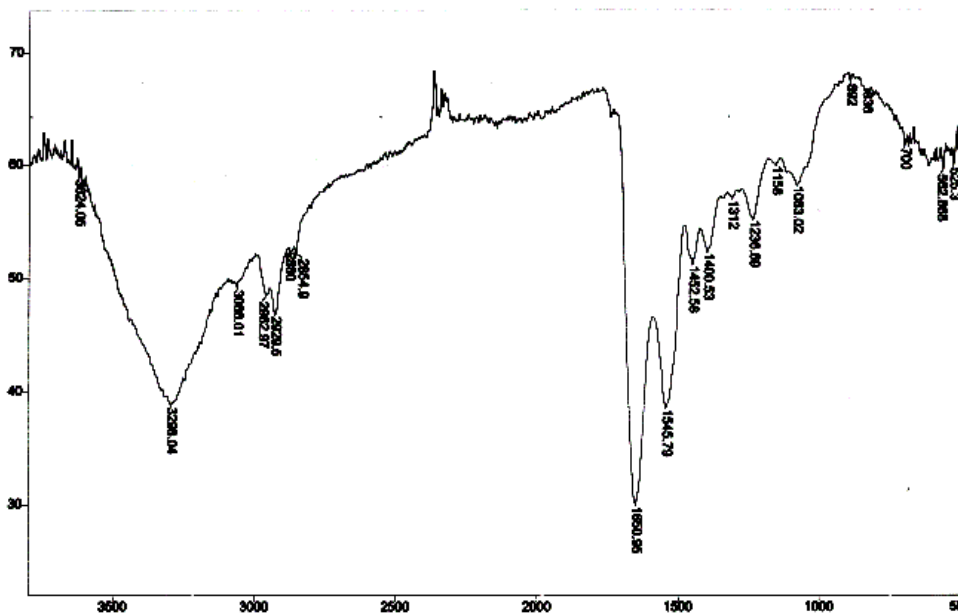
Rentgenoelektroninių tyrimų metu gauti rezultatai rodo, kad Hiso pluošto ir iš skilvelių miokardo paimtuose mėginiuose fosforo, chloro, kalcio, sieros, silicio, natrio ir kalio jonų kiekiai paklaidų ribose yra vienodi. Gauti rezultatai leidžia manyti, kad didesnis bioimpulso sklaidimo greitis HP nėra susijęs su jonų koncentracijų skirtumais ŠLS ir MK, tačiau gali būti susijęs su didesniais jų gradientais ląstelių viduje ir išorėje.

8.3. Širdies mėginių sugerties FT-IR spektroskopiniai tyrimai.

Infraraudonoji spektroskopija teikia informaciją apie sudėtingų molekulių struktūrą ir jose esančius cheminius ryšius. Per tiriamą mėginį praleidžiami infraraudonieji (IR) spinduliai. Jei IR spindulių dažniai sutampa su molekulėje esančių atomų grupių virpesių dažniais, IR spinduliai yra sugeriami. Sugerti IR spinduliai sužadina atomų virpesius (valentinius, deformacinius), tačiau IR spindulių energija nepakankama perkelti elektronus į kitą orbitalę. Organiniai junginiai dažniausiai sugeria 2,5 – 20 μm ilgio bangas. Molekulių virpesiniai spektrai yra specifiški kiekvienai molekulei, nes į jų sudėtį įeinančių atomų branduolių virpesių dažniai priklauso nuo branduolių masių ir cheminio ryšio stiprio. Organinių junginių IR spektrai priklauso nuo molekulinės vidinės sandaros ir vadinami molekulių „pirštų atspaudais“. Netgi tuo atveju, kai mėginiai sudaryti iš tų pačių molekulių, virpesiniai spektrai gali būti skirtingi, kadangi molekulių virpesinės modos gali būti įtakotos aplink jas esančių kitų molekulių. Tokiu būdu, morfologiniai HP ir MK skirtumai gali pasireikšti IR mėginių spektruose.

Pagrindinės IR spektro juostų charakteristikos yra intensyvumas, juostos plotis ir padėtis spektre (kokio ilgio bangos yra sugeriamos). Tiriamųjų

HP ir MK mėginių sugerties spektrai IR srityje turi intensyvias juostas 3500-3100 cm^{-1} srityje bei ties 1650 cm^{-1} ir 1546 cm^{-1} (22 pav.).



22 pav. Nefiksuoto ir nedžiovinoto HP mėginio IR sugerties spektras. (čia ir kituose paveiksluose abscisių ašyje atidėtas bangų skaičius, cm^{-1} , o ordinačių – pralaidumas, snt.vnt)

Šios juostos, leidžiančios identifikuoti biologinius audinius, yra būdingos polipeptidų, kurie gali būti laikomi baltymų modeliu, sugerčiai [67,68]. Juosta ties 1650 cm^{-1} priskiriama peptidinės grandinės karbonilinei grupei. Kitų spektro sričių sugertis susijusi su audinius sudarančių aminorūgščių komponentų prigimtimi. Baltymus, kaip žinoma, sudaro dvidešimties įvairių aminorūgščių kopolimerai, išsidėstę vienas prie kito tam tikra tvarka [69].

Užregistruotuose FT-IR spektruose stebimos juostos gali būti priskirtos baltymus, peptidus ir amino rūgštis sudarančių molekulinų grupių jungčių virpesiams. Pagrindinės sugerties juostos ir jas atitinkančios virpesinės modos parodytos 2 lentelėje [68,70-73].

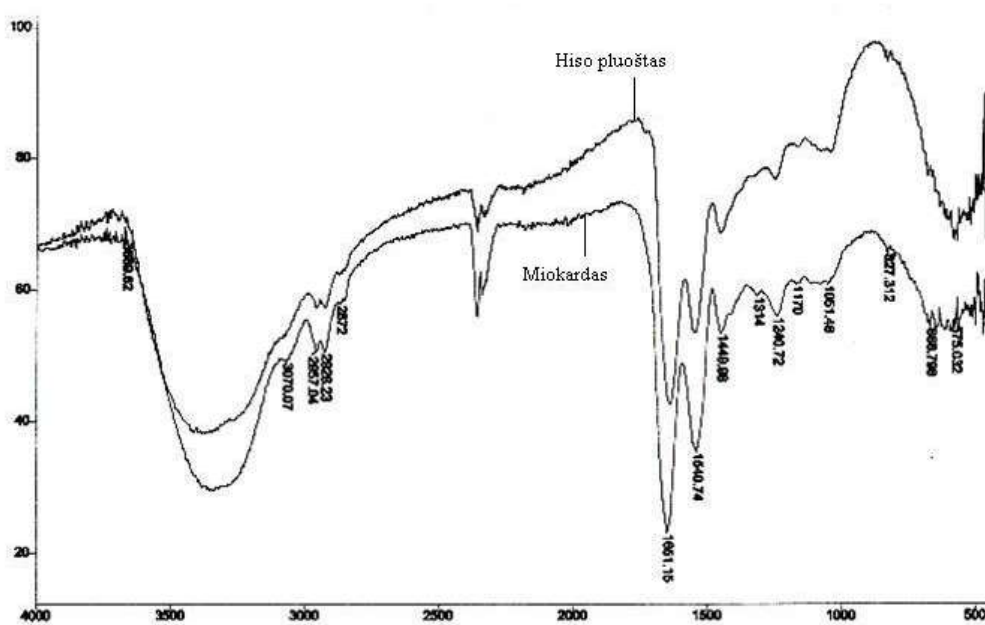
2 lentelė. FT-IR sugerties spektrų pagrindinių juostų padėtys ir charakteringų grupių virpesinės modos

Sugerties juostų smailių bangos skaičius, cm^{-1}	Virpesinės modos
3500-3100 intens.	$\nu(\text{OH})$
3350-3150 intens.	$\nu(\text{NH})$
3070	Amid II obertonas $/\delta(\text{N-H})/$
2965-2850	$\nu(\text{C-H})$ -CH=, -CH ₂ -, -CH ₃
1740	$\nu(\text{C=O})$
1650 intens.	Amid I $/\nu(\text{C=O})/$; $\delta(\text{N-H})$ NH ₃
1545 intens.	Amid II $/\delta(\text{N-H})/$
1452, 1400, 1340, 1310	$\delta(\text{CH})$ -CH=, -CH ₂ -, -CH ₃
1400	$\nu(\text{C-O})$ COO ⁻
1240	$\delta_{\text{šv}} \text{NH}_3$, $\nu(\text{C-O})$
1160	$\nu(\text{C-C})$ -CCN
1120-1060	$\nu(\text{C-O})$; $\delta_{\text{šv}} \text{CH}_3$
740-480	$\delta(\text{N-H})$, esant H-ryšiu neplokštumiai $\delta(\text{C-H Ar-žiede})$

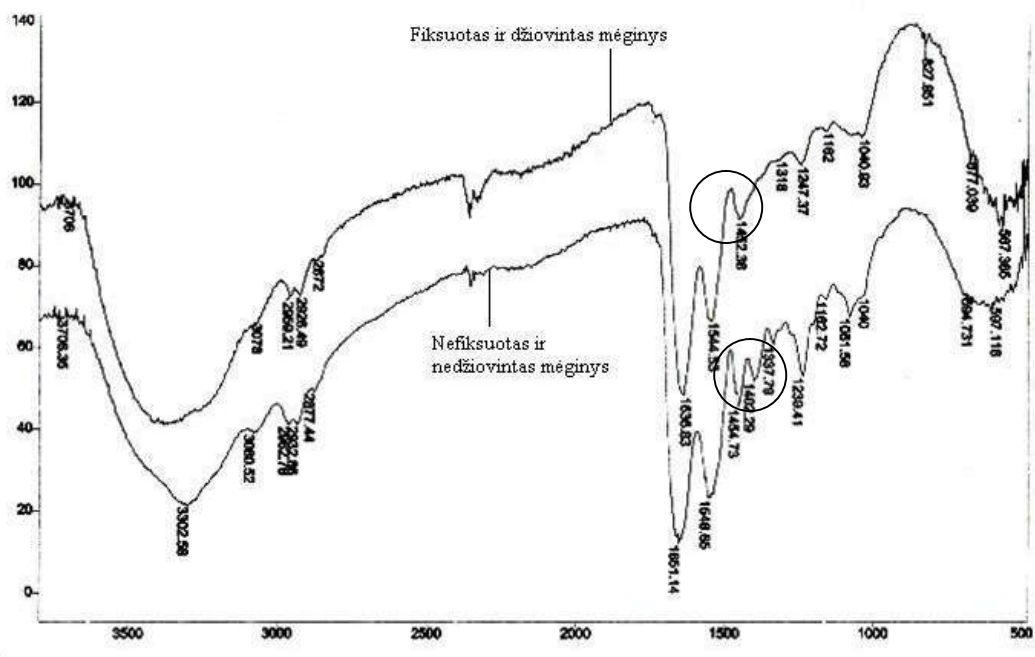
Tarpusavyje buvo palyginti skirtingais būdais paruoštų HP ir MK mėginių FT-IR spektrai. Fiksuotų bei džiovintų HP ir MK mėginių (21-25 širdies preparatų audinių mėginiai) FT-IR sugerties spektruose esminių spektrų formos, juostų padėties ir intensyvumų skirtumų nepastebėta (23 pav.).

Lyginant tarpusavyje nefiksuotų, nedžiovintų (11-20 širdies preparatų audinių mėginiai) bei fiksuotų formaline ir džiovintų (21-25 širdies preparatų audinių mėginiai) HP mėginių spektrus, pastebimi skirtumai (24 pav.).

Nefiksuotų, nedžiovintų HP mėginių spektre ties 1400 cm^{-1} stebima nauja sugerties juosta, būdinga deformaciniams C-H jungčių virpesiams ir valentiniams C-O virpesiams COO⁻ grupėse. Nefiksuotų formaline ir nedžiovintų HP mėginių spektruose taip pat šiek tiek išryškėja C-H jungčių valentinių virpesių juostos $2925\text{-}2965 \text{ cm}^{-1}$ srityje, susiaurėja vandeniliniams ryšiams būdinga juosta $3500\text{-}3100 \text{ cm}^{-1}$ srityje.

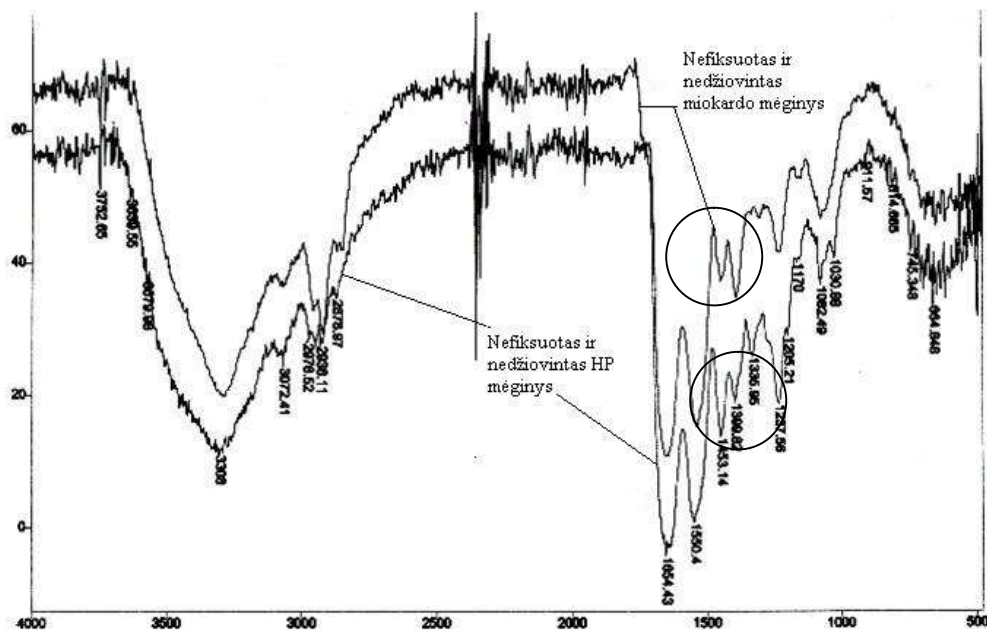


Nr.23 pav. Fiksuotų ir džiovintų HP ir MK mėginių IR sugerties spektrai.



24 pav. Fiksuotų, džiovintų ir nefiksuotų, nedžiovintų HP audinių IR sugerties spektrai.

Didžiausi sugerties juostų intensyvumų skirtumai stebimi nefiksuotų, nedžiovintų HP ir MK mėginių spektruose. 25 pav. pateiktuose nefiksuotų, nedžiovintų HP ir MK mėginių spektruose stebimas ties 1400 cm^{-1} ir 1453 cm^{-1} esančių juostų intensyvumų persiskirstymas.



25 pav. HP ir MK nefiksuotų, nedžiovintų mėginių IR sugerties spektrai.

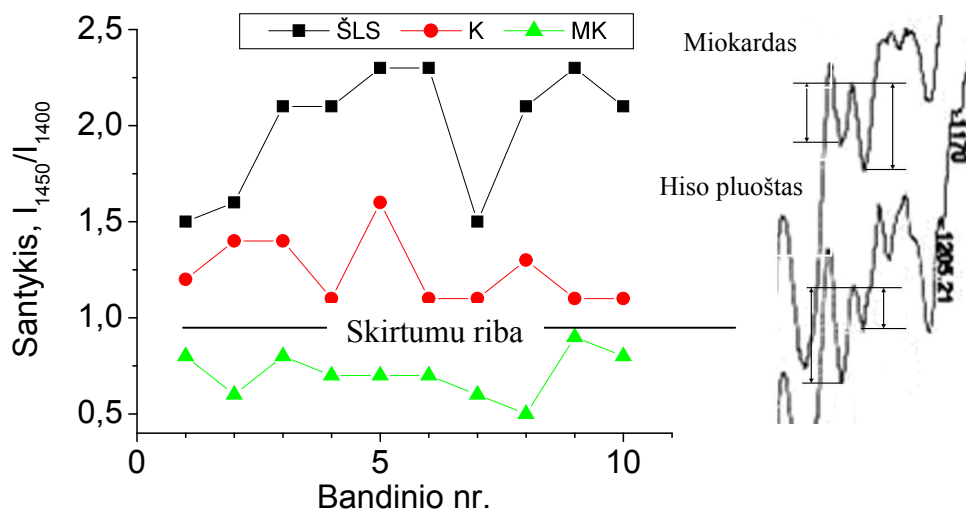
HP spektre intensyvesnė juosta ties 1453 cm^{-1} , o MK – ties 1400 cm^{-1} . MK spektre žymiai intensyvesnės juostos ties 2936 cm^{-1} ir 2976 cm^{-1} . Taip pat stebimi skirtumai 1345-1305 cm^{-1} , 1237 cm^{-1} , 1170 cm^{-1} , 1082-1030 cm^{-1} srityse. Šie skirtumai gali būti sąlygoti tiek skirtingos biomolekulių tirtuose audiniuose koncentracijos, tiek skirtingos šių audinių erdvinės struktūros ir organizacijos. Stebimus spektrų pokyčius interpretuoti vienareikšmiškai sunku. Įvertinus sugerties juostų parametrus ir molekulinės grupės, kurių virpesiams būdingos šios juostos, pagrindine 3000-2800 cm^{-1} srityje esančio skirtumo priežastimi gali būti laikomi C-H jungčių skaičiaus skirtumai HP ir MK audiniuose. Spektrų skirtumai 1460-1380 cm^{-1} ir 1345-1305 cm^{-1} srityse gali būti susiję su C-

H jungčių padėties ar šių jungčių skaičiaus kitimu molekulėse (metilo, metileno, izopropilo grupėse, C-H jungčių padėties pokyčiai aromatinuose žieduose bei anglies grandinių ilgio skirtumai molekulėse). Susidarant vidiniams molekuliniais ryšiams peptidinėse grupėse, galimi pokyčiai $\sim 1400\text{ cm}^{-1}$ srityje, susiję su COO^- karbonilo grupės virpesiais. HP mėginių spektrų juostų $1237\text{-}1030\text{ cm}^{-1}$ srityje intensyvumo padidėjimas, lyginant su MK mėginių juostomis, gali būti sietinas su C-N, C-O, N-H jungčių struktūrinės padėties aminorūgščių molekulėse skirtumais ir pokyčiais, susijusiais su vidinių molekulinų bei tarpmolekulinų ryšių susidarymu.

Palyginimui buvo užregistruoti kasos audinių infraraudonosios sugerties spektrai. Pagrindinės kasos sugerties spektro juostos gali būti interpretuojamos analogiškai HP ir MK mėginių sugerties juostoms.

Paminėtina, kad iš skirtingų širdžių paimtų HP ir MK mėginių IR sugerties spektruose nežymiai kinta kai kurių juostų spektrinė padėtis ir intensyvumai, tačiau pagrindiniai HP ir MK sugerties spektrų skirtumai pasikartoja.

26 pav. parodyti nefiksuotų ir nedžiovintų HP, MK ir K mėginių IR spektro juostų ties 1450 cm^{-1} ir 1400 cm^{-1} pralaidumų santykiai, kurių vertės pateikiamos 3 lentelėje.



26 pav. Juostų ties 1450 cm⁻¹ ir 1400 cm⁻¹ pralaidumų santyčiai nefiksuotuose ir nedžiovintuose Hiso pluošto ir miokardo bei kasos audinių mėginiuose. (ŠLS – Hiso pluoštas, K – kasa, MK – miokardas).

3 lentelė. IR spektro juostų ties 1450 cm⁻¹ ir 1400 cm⁻¹ pralaidumų santyčiai

Mėginio Nr.	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
ŠLS	1.5	1.6	2.1	2.1	2.3	2.3	1.5	2.1	2.3	2.1
K	1.2	1.4	1.4	1.1	1.6	1.1	1.1	1.3	1.1	1.1
MK	0.8	0.6	0.8	0.7	0.7	0.7	0.6	0.5	0.9	0.8

Juostų intensyvumų pokyčiai įvertinti pagal pralaidumų juostos smailėje ir vidurio taške tarp juostų skirtumus (26 pav.). HP mėginių spektruose juosta ties 1450 cm⁻¹ yra apie du kartus intensyvesnė už juostą ties 1400 cm⁻¹. Kasos mėginių spektruose šis santykis svyruoja apie 1.1, o MK - mažesnis už vienetą. Didesnė taškų sklaida HP atveju rodo, kad šie audiniai nėra visiškai vienalytiški (homogeniški). Jų nehomogeniškumas pastebimas ir mikroskopu. Juosta ties 1450 cm⁻¹ susideda iš dviejų juostų,

priskiriamų C-H ryšio deformaciniams virpesiams CH_2 ir CH_3 grupėse. Šios dvi juostos yra arti viena kitos, todėl spektre neišskiriamos. Jų integriniai intensyvumai tiesiai proporcingi minėtų grupių skaičiui molekulėje.

Nefiksuotų formaline ir nedžiovintų bandinių spektruose atsirandanti nauja juosta 1400 cm^{-1} srityje, kurios intensyvumas žymiai didesnis MK mėginių spektruose, priskiriama C-O⁻ virpesiams COO⁻ grupėse. Jonizuotas karboksilines grupes turi tik laisvos amino rūgštys, baltymuose šios grupės sudaro peptidinę jungtį. Baltymų sudėtyje yra dvi neigiamai įelektrintos amino rūgštys: α -asparagino rūgštis ir α -glutamo rūgštis. Jos turi po dvi jonizuotas karboksilines grupes, todėl vienai grupei sudarant peptidinę jungtį, antroji lieka laisva (jonizuota).

Gauti rezultatai rodo, kad MK audiniuose yra didesnis laisvų arba neigiamai įelektrintų α -asparagino ir α -glutamo rūgščių kiekis. Vienareikšmiškai HP ir MK mėginių FT-IR sugerties spektrų juostas priskirti konkrečių molekulinų grupių virpesiams ir įvertinti skirtumų priežastis nėra įmanoma, nes biologinių audinių IR sugerties spektrai yra aminorūgščių, priklausančių baltymams ir peptidams, bei laisvų aminorūgščių spektrų suma.

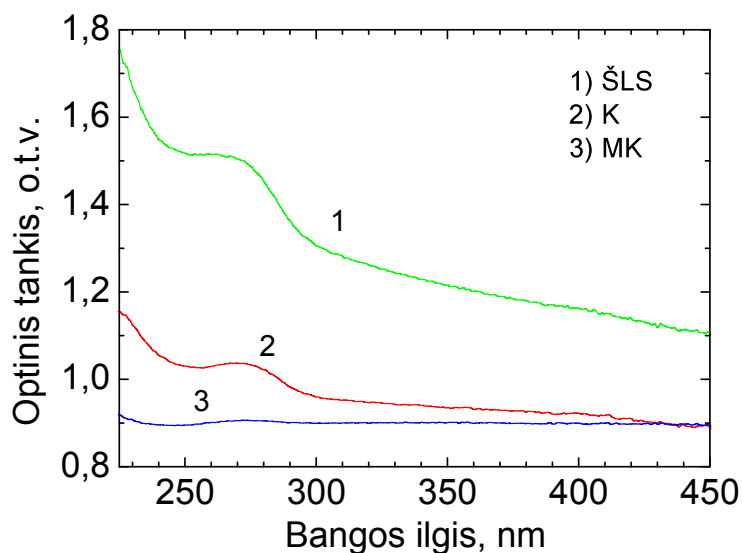
Furjė transformacijų infraraudonosios spektroskopijos (FT-IR) metodu aiškiai fiksuojami skirtumai tarp MK ir HP audinius sudarančių biomolekulių ir šią spektroskopijos metodiką galima taikyti vienareikšmiškam HP mėginių atskyrimui nuo MK mėginių.

Tačiau šie spektriniai skirtumai gali būti fiksuojami tik tiriant nedidelius širdies audinio kiekius, todėl negali būti naudojami greitam informacijos gavimui ir kasdieninėje praktikoje sunkiai pritaikomi. Be to, šis spektroskopinis metodas yra pakankamai sudėtingas.

8.4. Širdies audinių ultravioletinės sugerties spektrai

Šviesos sugerties spektroskopija teikia informaciją apie biologinių audinių specifinę sandarą ir juose vykstančius biocheminius procesus, todėl struktūrinių HP ir MK audinių skirtumų, galinčių sąlygoti skirtingas jų savybes ir funkcijas, buvo ieškoma ir ultravioletinės (UV) sugerties metodu. Biologiniuose audiniuose šioje srityje intensyviausiai sugeria baltymų sudėtyje esančios aromatinės amino rūgštys, ypač triptofanas (Trp) ir tirozinas (Tyr) [74]. Histocheminėse biologinių audinių dažymo metodikose Tyr ir Trp dažymo kokybės kontrolei naudojamas kasos audinys, nes turi palyginti daug šių aromatinių amino rūgščių [75], todėl gauti širdies audinių (26-35 širdies preparatų audinių mėginiai) spektrai lyginami su kasos audinio (K16-K25 kasos audinio mėginiai) spektrais.

15 μm storio ant kvarcinių langelių padėtų HP, MK ir kasos mėginių sugerties spektrai parodyti 27 pav.



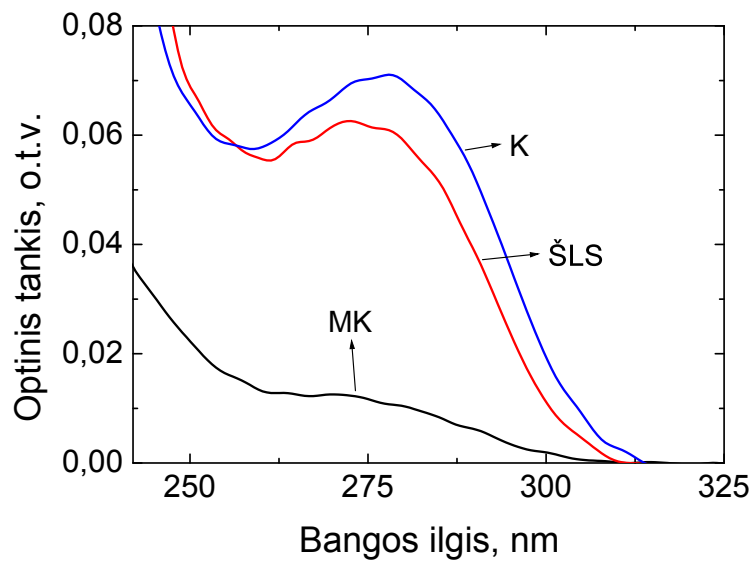
27 pav. HP (ŠLS), MK ir K audinių sugerties spektrai.

HP ir kasos mėginių sugerties spektruose stebima sugerties juosta ties 280 nm. MK mėginių sugerties spektre šios juostos santykinis intensyvumas yra labai mažas. Visais atvejais buvo matuojami nuo 8 iki

12 mėginių spektrai, po to sudedami ir suvidurkinami. Reikšmingų skirtumų tarp atskirų audinių mėginių spektrų nebuvo pastebėta. Visuose spektruose stebima šviesos sklaida, kurios intensyvumas ir eiga priklauso nuo sklaidančių dalelių dydžio. Šviesos sklaida pašalinama tokiu būdu: spektro srityje nuo 305 nm iki 430 nm, kur aminorūgštys šviesos nesugeria, spektrai aprašomi hiperbolinėmis funkcijomis, kai šviesos sklaida atvirkščiai proporcinga šviesos bangos ilgio ketvirtajam laipsniui. Kreivės pratęsimos į trumpų bangų ilgių pusę ir gautos vertės atimamos iš išmatuotų. Suvidurkinti sugerties spektrai, gauti pašalinus šviesos sklaidą, parodyti 28 pav. Kaip matyti, HP ir K mėginių spektrai yra panašūs, o jų sugerties intensyvumas ties 280 nm. yra žymiai didesnis, negu MK mėginio. Biologiniuose audiniuose esantys proteinais yra sudaryti iš 20 aminorūgščių, bet tik trys iš jų, triptofanas (Trp), tirozinas (Tyr) ir fenilalaninas (Phe) turi pakankamai dideles konjuguotas π -elektronų sistemas ir gali sugerti šviesą šioje spektro srityje [76].

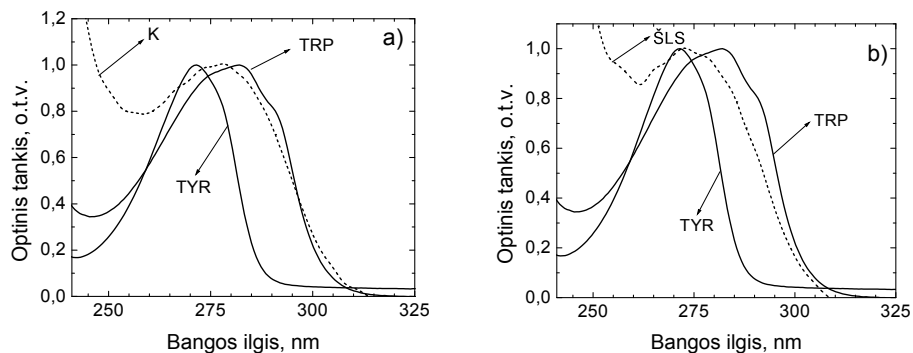
Didžiausią sugerties koeficientą turi Trp. Phe sugertis yra trumpesnių bangų srityje ir gana silpna, todėl daugelyje atvejų į ją galima neatsižvelgti. Taigi, HP ir MK mėginių sugerties spektrų skirtumus sąlygoja nevienodos Trp, Tyr ir Phe koncentracijos juose.

Širdies ir kasos audinių sugerties spektrai buvo palyginti su Trp ir Tyr tirpalų vandenyje sugerties spektrais.



28 pav. Suvidurkinti MK, HP ir kasos mėginių sugerties spektrai po sklaidos eliminavimo

Normuoti Tyr ir Trp tirpalų vandenyje bei kasos ir HP sugerties spektrai parodyti 29 pav. Matome, kad kasos sugerties spektras per 6 nm pastumtas į ilgų bangų pusę HP spektro atžvilgiu ir artimas Trp tirpalo vandenyje sugerties spektrui. Kadangi biomolekulių spektrai priklauso nuo aplinkos poliškumo (poliškumui didėjant slenka į ilgų bangų pusę), tai galima manyti, kad kasoje esantis Trp yra prieinamas vandeniui. Tuo tarpu HP esanti Trp supa mažesnio poliškumo aplinka, sąlygojanti spektro poslinkį į trumpų bangų pusę.



29 pav. Normuoti Tyr ir Trp tirpalų vandenyje bei kasos (a) ir HP (ŠLS,b) sugerties spektrai.

Sugerties spektroskopijos metodas jau seniai taikomas įvairių biologinių objektų kiekybinei analizei. Jis remiasi tuo faktu, kad mišinio optinis tankis yra lygus jį sudarančių komponentų optinių tankių sumai, t.y., kad molekulės sugeria šviesą nepriklausomai viena nuo kitos. Šviesos srautui sklindant per medžiagą, jo dalis yra sugerama. Šviesos sugertį aprašo Bugerio Lamberto, ir Bero dėsnis:

$$I = I_0 10^{-\epsilon c l}$$

Čia ϵ - ekstinkcijos koeficientas, c – sugeriančios medžiagos koncentracija, l – sugeriančio sluoksnio storis, I – praėjusios šviesos intensyvumas, I_0 – krintančios šviesos intensyvumas. Santykis $I / I_0 = T$ vadinamas pralaidumu, o jam atvirkščio santykio logaritmas $\lg I_0 / I = D$ optiniu tankiu. Išlogoritnavus Bugerio Lamberto ir Bero dėsnį, gaunamas optinis tankis $D = \epsilon c l$. Jis priklauso nuo medžiagos koncentracijos, sluoksnio storio ir ekstinkcijos koeficiento.

Šis metodas buvo pritaikytas ir Tyr bei Trp kiekio nustatymui baltymuose [77].

Aminorūgščių Tyr ir Trp kiekio tirtuose mėginiuose įvertinimui buvo sudaryta lygčių sistema dviem bangų ilgiams:

$$D_{290} = \epsilon_{\text{Tyr},290} C_{\text{Tyr}} l + \epsilon_{\text{Trp},290} C_{\text{Trp}} l;$$

$$D_{280} = \epsilon_{\text{Tyr},280} C_{\text{Tyr}} l + \epsilon_{\text{Trp},280} C_{\text{Trp}} l.$$

Čia l -mėginio storis, D_{290} ir D_{280} -optiniai tankiai ties 290 nm ir 280 nm atitinkamai, C_{Trp} ir C_{Tyr} -Trp ir Tyr koncentracijos, ϵ_{Trp} ir ϵ_{Tyr} - Trp ir Tyr ekstinkcijos (sugerties) koeficientai ties pažymėtais bangų ilgiais.

Kadangi tikslios Tyr ir Trp sugerties koeficientų reikšmės mūsų tirtuose bandiniuose yra nežinomos, pasinaudojome literatūros duomenimis [78]. Ekstinkcijos koeficientai pateikti 4 lentelėje.

4 lentelė. Amino rūgščių ekstinkcijos koeficientai.

	TYR		TRP	
λ	290nm	280nm	290nm	280nm
ϵ	333 M ⁻¹ cm ⁻¹	1280 M ⁻¹ cm ⁻¹	4850 M ⁻¹ cm ⁻¹	5690 M ⁻¹ cm ⁻¹

Skaičiavimai atlikti neatsižvelgiant į silpną Phe sugertį. Rezultatai, gauti išsprendus šią lygčių sistemą, pateikti 5 lentelėje.

5 lentelė. Aromatinių amino rūgščių kiekiai K, HP ir MK.

	C _{Tyr} , μM	C _{Trp} , μM
K	15,0	4,0
HP	21,0	1,5
MK	5,2	0,6

Šie pusiaukiekybiniai skaičiavimų rezultatai rodo, kad HP ir kasos mėginiuose yra žymiai didesni Tyr ir Trp kiekiai negu MK mėginiuose. Trp kiekis HP mėginiuose yra 2,6 karto mažesnis, o Tyr 1,4 karto didesnis negu K mėginiuose. Palyginę aminorūgščių kiekius skirtinguose širdies audiniuose, matome, kad HP mėginiuose Trp yra 4 kartus, o Tyr 2,5 karto daugiau negu MK mėginiuose.

Iš gautų rezultatų taip pat galima daryti išvadą, kad nevienodi, aromatinių aminorūgščių kiekiai HP ir MK audiniuose gali būti susiję su skirtinga šių audinių baltymine struktūra, nuo kurios priklauso jų anatinės ir fiziologinės savybės. Be to, Trp yra pagrindinis baltymų fluoroforas, todėl galima tikėtis intensyvesnės HP fluorescencijos ir tokiu būdu vizualizuoti jo išsidėstymą širdies audiniuose.

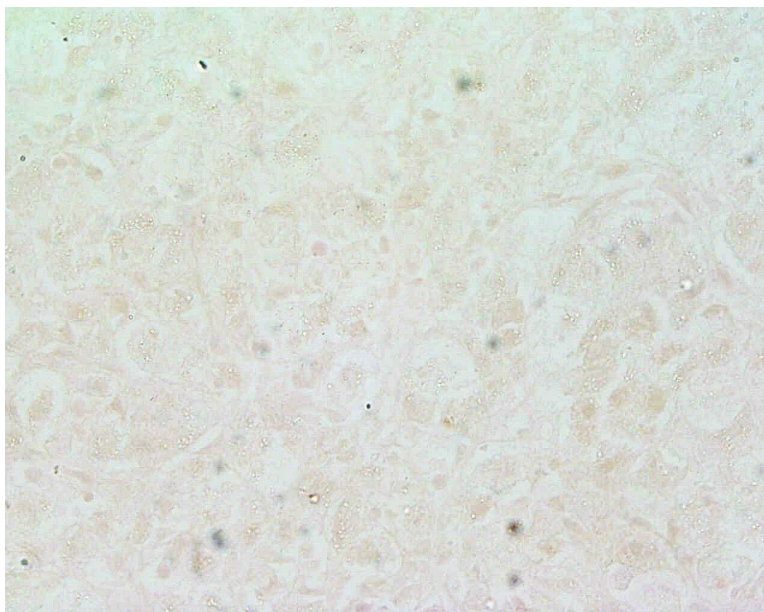
8.5. Miokardo ir širdies laidžiosios sistemos histocheminiai dažymai

Atlikti širdies audinių sugerties spektriniai tyrimai parodė, kad HP ir MK mėginiuose stebimi nedideli sugerties pokyčiai tiek infraraudojoje,

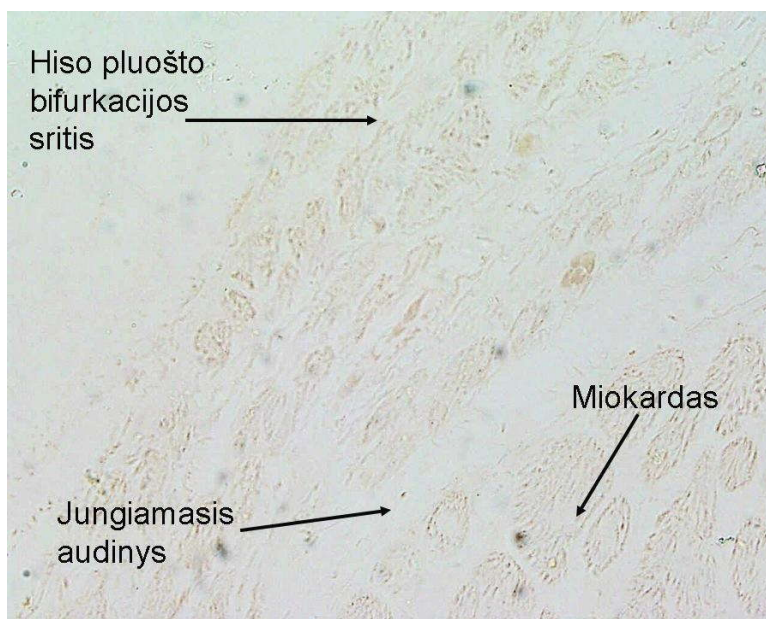
tieki UV spektro srityje yra sąlygoti skirtingos aromatinių aminorūgščių koncentracijos. Sugerties pokyčiai UV spektro srityje nėra dideli, tad paprastas spektrų palyginimas vienareikšmiškai neatsako į klausimą, iš kurios širdies vietos paimtas mėginys, bei neįgalina identifikuoti ŠLS, paėmus analizei tik vieną mėginį. Sudėtinė sugerties spektrų prigimtis taip pat nepateikia vienareikšmiško atsakymo, kuri iš trijų aromatinių rūgščių sąlygoja šiuos spektrinius skirtumus skirtinguose širdies audiniuose. Papildomas metodas naudojamas aromatinių rūgščių vizualizacijai yra histocheminis audinių dažymas, kuris ir buvo panaudotas tolesniems tyrimams (36-45 širdies preparatų audinių mėginiai ir K26-K35 kasos audinio mėginiai).

Millon reakcija tirozinui (reakcija su fenilo grupe)

Millon reakcija tirozino turinčius baltymus nudažo rausvai ar raudonai. Deja, bet atlikus šią reakciją, nepavyko išryškinti tirozino nei ŠLS nei kontroliniame kasos audinyje (30 pav. ir 31 pav.).



30 pav. Kontrolinis kasos audinys. Millon x100.

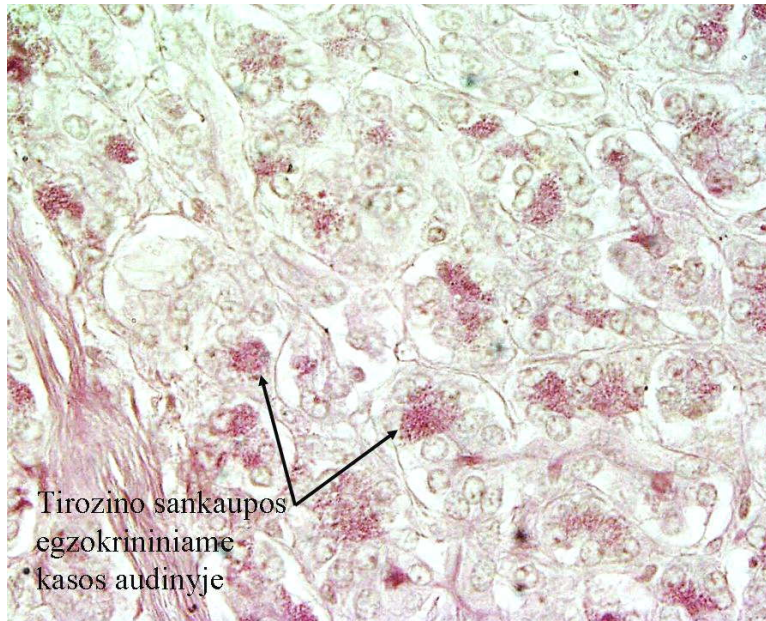


31 pav. Širdies laidžiosios sistemos audinys. Millon x100.

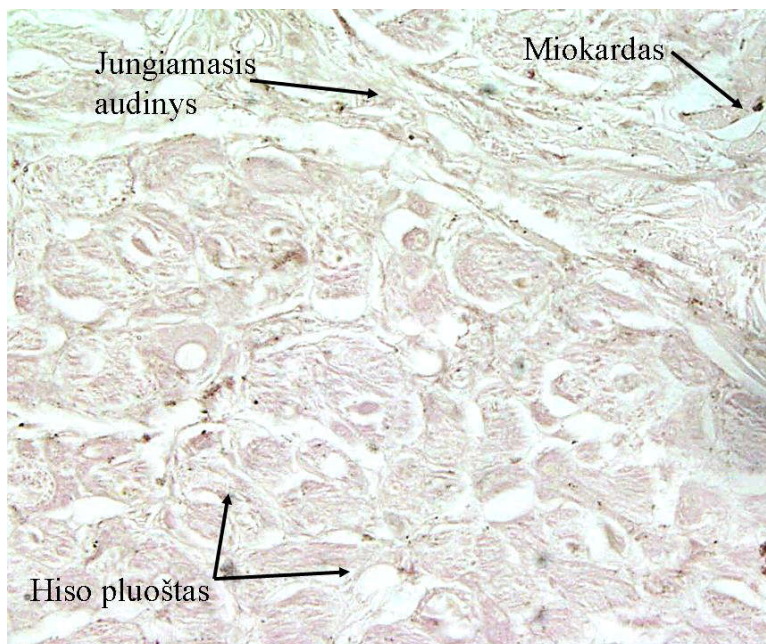
Atliktos reakcijos kokybė vertinta nepatenkinamai, ir Tyr mėgintas išryškinti kitais metodais.

Diazotizavimo-sujungimo metodas tirozinui išryškinti (reakcija su fenilo grupe)

Diazotizavimo-sujungimo metodas tirozino turinčius baltymus nudažo violetine arba raudona spalva. Atlikus šią reakciją tiroziną pavyko išryškinti tik kasos audinyje. Miokarde ir Hiso pluošte reakcija neigiama (32 pav. ir 33 pav.).



32 pav. Kasos audinys su išryškintais tirozino turinčiais baltymais.
Diazotizavimo-sujungimo metodas x100.



33 pav. Širdies laidžiosios sistemos audinys. Diazotizavimo-
sujungimo metodas x100.

DMAB metodas triptofanui išryškinti (reakcija su indolo grupe)

DMAB metodas triptofano turinčius baltymus nudažo tamsiai mėlynai.

Lašelių branduoliai raudoni (34. pav. ir 35. pav.).



34 pav. Kasos audinys. DMAB x100.



35 pav. Širdies laidžiosios sistemos audinys. DMAB x100.

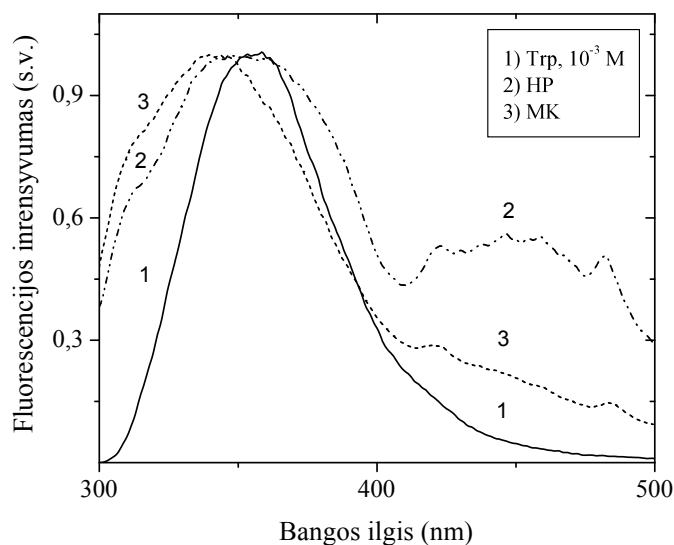
Histocheminiai dažymai neparodė, kaip tikėtasi, didesnių Trp ir Tyr koncentracijų ŠLS. Reakcijų kokybės pilnai pakako vizualizuoti triptofaną ir tiroziną kasos audinio mėginyje, tačiau ŠLS mėginiuose histocheminis dažymas nebuvo sėkmingas.

8.6. Širdies audinių savitosios fluorescencijos ir jos žadinimo spektroskopiniai tyrimai

Hiso pluošto ir kairiojo skilvelio miokardo mėginių sugerties spektrų tyrimai parodė, kad šių audinių sugerties spektrai skiriasi savo intensyvumu tolimojoje ultravioletinėje srityje nuo 250 nm iki 300 nm [74]. Nustatyta, kad MK audinių sugertis šioje srityje daug silpnesnė negu HP. Šie spektrų skirtumai buvo priskirti skirtingoms aromatinių aminorūgščių koncentracijoms tirtuose audiniuose.

Kadangi, fluorescencinės spektroskopijos metodai yra žymiai jautresni už sugerties spektroskopiją ir leidžia aptikti žymiai mažesnius tiriamų medžiagų koncentracijų pokyčius, toliau buvo tiriami širdies audinių (46-55 širdies preparatų audinių mėginiai) fluorescencijos ir jos žadinimo spektrai. Skirtumų tarp 10 % buferiniame formaline fiksuotų (46-50 širdies preparatų audinių) ir nefiksuotų (51-55 širdies preparatų audinių) mėginių nenustatyta.

HP, MK ir Trp tirpalo vandenyje fluorescencijos spektrai pateikti 36 pav.



36 pav. Trp tirpalo vandenyje, Hiso pluošto ir miokardo fluorescencijos spektrai, normuoti į didžiausią smailės vertę, $\lambda_{\text{žad}} = 255$ nm.

Kaip matyti, visų mėginių fluorescencijos spektruose stebima plati juosta artimojoje UV srityje tarp 300 nm ir 400 nm, priskiriama Trp [79-81], tačiau jos padėtis ir plotis yra nevienodi skirtingų mėginių spektruose. Trp tirpalo vandenyje spektre juostos smailė yra ties 353 nm. MK spektre ji pasislinkusi 15 nm į trumpų bangų pusę, lyginant su Trp tirpalu vandenyje. Daugelio fluoroforų, tame tarpe ir Trp, fluorescencijos spektro padėtis stipriai priklauso nuo aplinkos poliškumo. Baltymų fluorescencijos juostos padėtis kinta dėl skirtingos Trp liekanų lokalizacijos natyviuose baltymuose. Poslinkis į trumpų bangų pusę atsiranda dėl to, kad baltyminė matrica apsaugo Trp liekanas nuo hidratinio vandens. Visiškai neutralioje aplinkoje Trp fluorescencijos juosta yra ties 310 nm. Trp liekanų miokarde fluorescencijos juostos poslinkis į trumpų bangų pusę jo tirpalo vandenyje spektro atžvilgiu rodo, kad Trp liekanos miokarde yra izoliuotos nuo vandens molekulių, tačiau jų aplinka nėra visiškai neutrali, jos sudėtyje yra polinės grupės, sąlygojančios fluorescencijos juostos padėtį ties 328 nm.

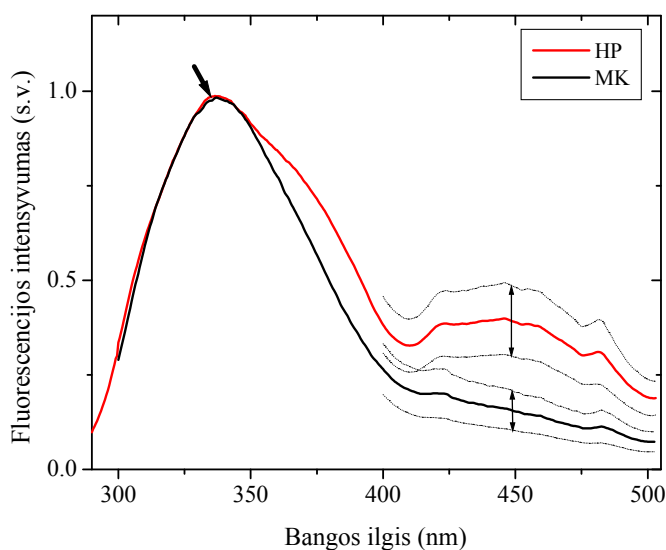
HP mėginių fluorescencijos juosta yra žymiai platesnė už Trp tirpalo vandenyje ir miokardo fluorescencijos juostas. Jos smailė užima tarpinę padėtį tarp Trp tirpalo vandenyje ir MK fluorescencijos juostų smailių. Juosta išplitusi dėl skirtingo poliškumo aplinkose lokalizuotų Trp liekanų spektrų sanklotos.

Aplinka įtakoja ne tik fluoroforų spektrų padėtį, bet ir jų fluorescencijos kvantinį našumą (išspinduliuotų ir sugertų energijos kvantų skaičių santykį). Aplinkos poliškumui didėjant Trp ir daugelio kitų fluoroforų fluorescencijos kvantinis našumas staigiai mažėja, todėl Trp fluorescencijos kvantiniai našumai MK ir HP turėtų būti skirtingi [82-84]. Kvantinis našumas MK turėtų būti didesnis už našumą HP. Dėl šios priežasties Trp fluorescencijos intensyvumai HP ir MK mėginiuose nėra vienareikšmiškai susiję su Trp liekanų kiekiais šiuose audiniuose. Tokiu būdu fluorescencijos intensyvumų lyginimas būtų nekorektiškas, nes fluorescencijos intensyvumas priklauso ne tik nuo fluoroforo koncentracijos, bet ir nuo jo kvantinio našumo. Be to, ši juosta nebūdinga atskiram audiniui, ji pasireiškia visų audinių spektruose, stebimi tik padėties ir pločio skirtumai ir pagal ją vienareikšmiškai atskirti HP ir MK audinius būtų nelengva.

Nuo 410 nm ilgesnių bangų srityje, kur Trp fluorescencija yra nežymi (36 pav., 1 kreivė), tirtų širdies audinių fluorescencijos spektrų forma ir santykinis intensyvumas žymiai skiriasi. Šioje srityje stebima plati, Trp nepriklausanti, fluorescencijos juosta. Jos santykinis intensyvumas HP spektre yra žymiai didesnis, nei MK [85]. Pagal Trp fluorescencijos juostos UV-A srityje (400-320 nm.) srityje ir šios juostos intensyvumų santykį galima vienareikšmiškai atskirti HP ir MK audinius.

Tuo tikslu buvo ištirti HP ir MK audinių, paimtų iš 6 skirtingų širdžių preparatų (50-55 preparatai), fluorescencijos spektrai žadinant aromatinių aminorūgščių sugerties srityje. Tam buvo apskaičiuotos fluorescencijos spektrų vidutinės vertės. 37 pav. pateikti suvidurkinti ir sunormuoti ties didžiausia intensyvumo verte HP ir MK mėginių fluorescencijos spektrai.

Matome, kad skirtumai fluorescencijos spektruose išlieka – HP ir MK audinių fluorescencijos spektrai skiriasi tiek juostų intensyvumais, tiek intensyvumų pasiskirstymo kreivės forma. Ryškiai matomi skirtumai - HP fluorescencijos juosta tarp 300 ir 400 nm yra 10 nm platesnė (turi petį ilgesnių bangų pusėje) nei MK. Mėlynojoje spektro srityje ženkliai skiriasi HP ir MK audinių fluorescencijos spektrų forma ir santykinis intensyvumas.



37 pav. HP ir MK audinių fluorescencijos spektrai, suvidurkinti ir normuoti ties didžiausia intensyvumo verte. $\lambda_{\text{žad}} = 255 \text{ nm}$. Punktyrine linija pavaizduotos didžiausių nukrypimų ribos atskiruose preparatuose.

Buvo įvertintas fluorescencinio HP ir MK audinių atskyrimo metodo patikimumas. Apskaičiuoti fluorescencijos juostų UV-A (ties 340 nm) ir regimojoje (ties 450 nm) spektro srityse intensyvumų santykiai ir gautos tokios jų vertės: HP – $2,5 \pm 0,8$, o MK – $6,4 \pm 1,8$. Paklaidų įvertinimui apskaičiuota vidutinė kvadratinė paklaida. Tirtų audinių fluorescencijos intensyvumų skirtumo patikimumo skaičiavimai atlikti pagal literatūroje nurodytą metodiką [86]. HP ir MK audinių fluorescencijos intensyvumų skirtumo patikimumo vertė yra 99 % ($p < 10^{-7}$).

Gauti rezultatai rodo, kad žadinant aromatinių amino rūgščių sugerties srityje (250-295 nm) pagal fluorescencijos intensyvumą ties 340 nm ir 450 nm santykius galima vienareikšmiškai atskirti HP ir MK audinius. Tačiau tokį atskyrimo metodą būtų negalima lengvai taikyti *in vivo* ar rutininiams tyrimams, nes fluorescencijos žadinimui naudojama tolimosios UV-C (280-100 nm.) srities spinduliuotė yra žalinga biologiniams audiniams. Todėl audinių atskyrimui buvo ieškoma kitų žadinimo spinduliuotės bangų ilgių artimesnėje UV spektro srityje.

Aromatinių amino rūgščių sugerties srityje sužadinama plati širdies audinių savitosios fluorescencijos juosta mėlynojoje spektro srityje gali būti sąlygota keleto kitų endogeninių fluoroforų, sužadintų ne tik tolimojoje UV-C (280-100 nm.) srityje, bet ir ilgesnių bangų spinduliuote.

Be aromatinių amino rūgščių baltymuose yra daug endogeninių fluoroforų, susijusių su tarpląstelinės medžiagos sandara, bei ląstelės medžiagų apykaita. Svarbiausi iš jų yra kolagenas, elastinas, nikotinamidadeninukleotidas (NADH), flavinai, porfirinai, lipopigmentai ir kiti glikozaminoglikanai. Daugelis jų fluorescuoja mėlynojoje spektro srityje.

Tolimesniuose tyrimuose buvo žadinta artimojoje UV-A (400-320 nm.) spektro srityje ieškant žadinimo bangos ilgių, tinkamų širdies audinių atskyrimui. Tuo tikslu HP ir MK audinių fluorescencijos ir jos žadinimo spektrai buvo registruojami keičiant žadinimo ir registruojamos fluorescencijos bangos ilgus nedideliais intervalais (38 pav.).

Emisijos arba fluorescencijos spektrai registruojami skenuojant fluorescencijos bangos ilgį, esant pastoviam žadinančios spinduliuotės bangos ilgiui. O fluorescencijos žadinimo spektras - tai fluorescencijos intensyvumo, registruojamo ties pasirinktu pastoviu bangos ilgiu, priklausomybė nuo žadinančios spinduliuotės bangos ilgio.

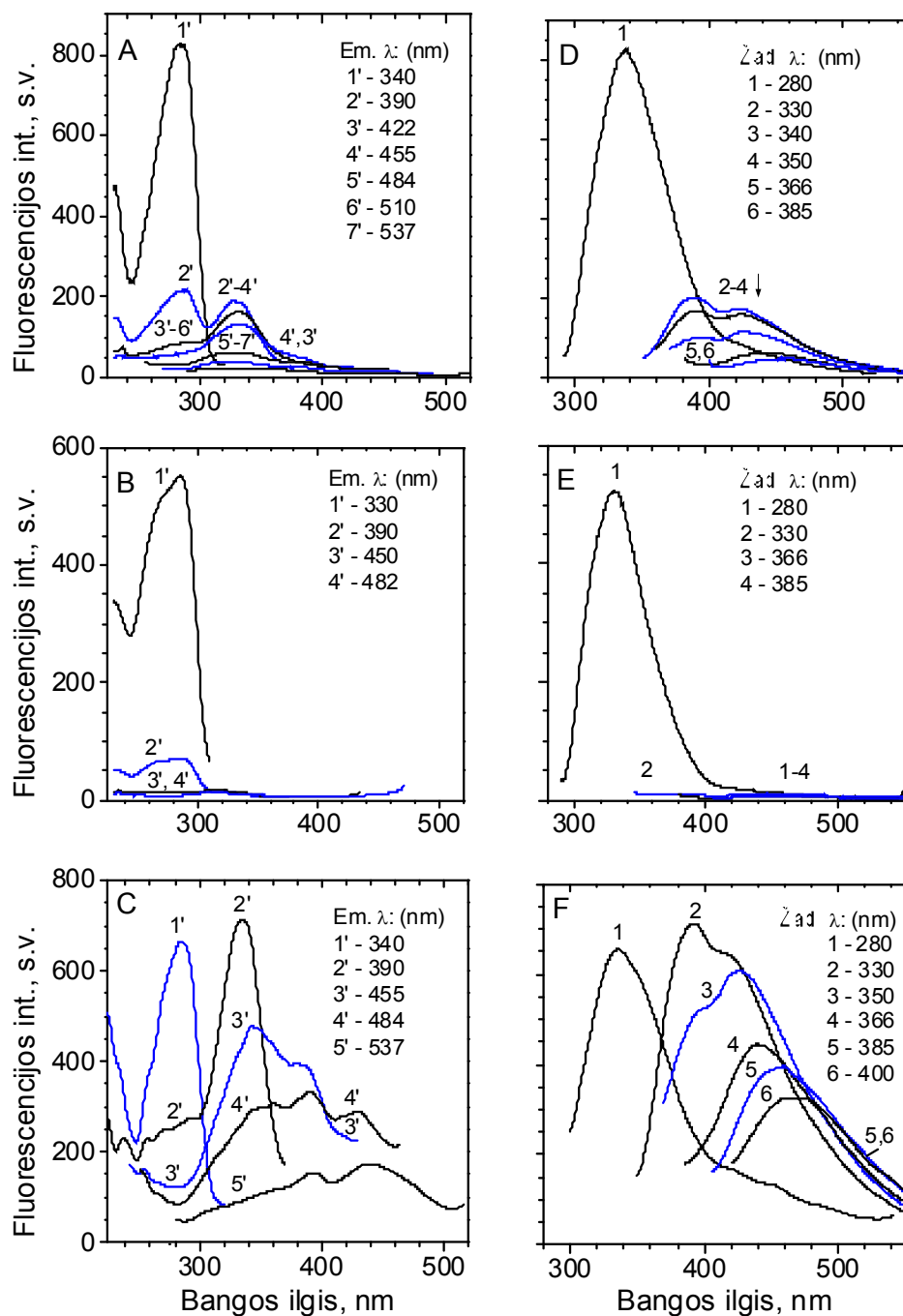
Audinių savitoji fluorescencija priklauso nuo žadinančios spinduliuotės bangos ilgio, nes audinių sudėtyje esantys fluoroforai turi skirtingus

sugerties spektrus ir, žadinant skirtingais bangos ilgiais, jų indėlis savitosios fluorescencijos spektre yra skirtingas [87].

Reikia pažymėti, kad audinių savitosios fluorescencijos ir fluorescencijos žadinimo spektrai priklauso ne tik nuo žadinimo ir fluorescencijos registravimui pasirinktų bangų ilgių, bet ir nuo audinių struktūros. Tad šių spektrų tyrimai gali išryškinti ir audinių histologinius skirtumus. Skirtingos struktūros sveikų audinių fluorescencijos spektrai yra skirtingi [88]. Kadangi ŠLS nuo aplinkinio miokardo yra atskirta jungiamojo audinio sluoksniu, tai palyginimui buvo registruojami ir iš triburio širdies vožtuvo paimto jungiamojo audinio (JA) analogiški spektrai. Jungiamasis audinys, kuriame daug elastino ir kolageno, pasižymi gana intensyvia autofluorescencija [89].

38 pav. ABC nurodyti emisijos bangos ilgiai, ties kuriais buvo registruojama fluorescencija. 38 pav. DEF – fluorescencijos žadinimui naudoti žadinančios spinduliuotės bangų ilgiai.

Žadinant 280 nm bangos ilgio spinduliuote visų mėginių fluorescencijos spektruose stebima intensyvi Trp fluorescencijos juosta artimojoje ultravioletinėje spektro srityje. Žadinant didesnio bangos ilgio spinduliuote, kurios aromatinės amino rūgštys nesugeria, mėlynoji širdies audinių fluorescencija išlieka, o jos intensyvumas HP (38pav., D) yra žymiai didesnis, negu MK (38 pav. E). Šis intensyvumų skirtumas stebimas visoje žadinimo spektro srityje nuo 330 nm iki 450 nm.



38 pav. HP (A), MK (B) ir JA (C) fluorescencijos žadinimo spektrai, gauti registruojant fluorescenciją nurodytose spektro srityse. HP (D), MK(E), JA (F) fluorescencijos spektrai, registruoti, žadinant nurodytų bangos ilgių spinduliuote.

Žadinant 330 nm bangos ilgio spinduliuote, HP fluorescencijos spektre stebima plati juosta su smaile ties 390 nm ir įdubimu ties 410 nm, kuris atsiranda dėl reabsorbcijos efekto (kraujo sugerties šioje spektro srityje [90,91]). Kraujo sudėtyje yra labai daug hemoglobino, kuris turi intensyvią sugerties juostą ties 410 nm ir lyg filtras nepraleidžia fluorescencijos.

Žadinant 340 nm ir didesnio bangos ilgio spinduliuote fluorescencijos intensyvumas persiskirsto, juostos ties 390 nm intensyvumas palaipsniui mažėja, o spektro smailė slenka į ilgų bangų pusę iki 460 nm.

JA mėlynosios fluorescencijos santykinis intensyvumas yra pats didžiausias, jis net šiek tiek didesnis už Trp juostos intensyvumą. Vieno mėginio fluorescencijos ir jos žadinimo spektrai buvo registruojami nekeičiant mėginio padėties ir fokusavimo sąlygų, todėl jų intensyvumų palyginimas yra galimas. JA mėlynoji fluorescencija žymiai skiriasi nuo HP fluorescencijos ne tik savo intensyvumu, bet ir spektro forma bei priklausomybe nuo žadinančios spinduliuotės bangos ilgio. Skirtumai tarp HP ir JA spektrų išryškėja žadinant ilgesnių nei 330 nm bangų spinduliuote. JA fluorescencijos juostos ties 460 nm intensyvumas nesikeičia žadinant 330 ir 385 nm spinduliuote, o HP sumažėja du kartus. Žadinant ties 385 nm JA juostos ties 460 nm santykinis intensyvumas yra žymiai didesnis nei HP.

Širdies mėginių fluorescencijos spektrų priklausomybė nuo žadinančios spinduliuotės bangos ilgio rodo, kad jos audiniuose yra ne vienas, o keletas endogeninių fluoroforų, sužadintų UV ir regimojoje spektro srityse. Šiuos spektrinius skirtumus lemiančių fluoroforų prigimties išaiškinimui buvo tiriami ir fluorescencijos žadinimo spektrai (38 pav., A-C). HP (38 pav., A) ir JA (38 pav., C) žadinimo spektrai skiriasi nuo MK (38 pav., B) žadinimo spektrų. MK žadinimo spektre, registruojant fluorescenciją ties 330 nm ir 390 nm, stebima viena juosta ties 280 nm, sutampanti su Trp priskiriama sugerties juosta. Šios juostos intensyvumas yra didelis visų širdies audinių spektruose registruojant fluorescenciją Trp emisijos juostoje (300 – 400 nm). HP ir JA žadinimo spektruose,

registruojant fluorescenciją ties 390 nm, atsiranda nauja juosta ties 330 nm. Šios juostos intensyvumas MK yra daug silpnesnis. Registruojant fluorescenciją ties didesniais bangų ilgiais, HP spektre ji išplinta į ilgų bangų pusę, o JA spektre susiformuoja dar viena juosta ties 385nm.

Šie rezultatai rodo, kad HP žadinimo spektro srityje nuo 300 nm iki 400 nm stebimos kelios persiklojančios juostos, kurių intensyvumai ir smailių padėtys priklauso nuo registruojamos fluorescencijos bangos ilgio (38 pav., A). JA žadinimo spektruose, lyginant juos su HP spektrais, stebima žymiai intensyvesnė juosta ties 330 nm (30 pav., C) ir geriau išskirta antra plati juosta su smaile ties 385 nm. Panašiai, kaip fluorescencijos spektrų, JA žadinimo spektrų, gautų registruojant fluorescenciją ilgų bangų srityje, intensyvumas yra didesnis, nei HP spektrų.

Širdies audinių fluorescencijos spektrų matavimai *ex vivo* parodė, kad spektro srityje nuo 390 nm iki 550 nm fluorescuoja keletas endogeninių fluoroforų, su persiklojančiomis spektro juostomis. Jų fluorescencija HP yra žymiai intensyvesnė, nei MK ir silpnesnė už JA fluorescencijos intensyvumą.

JA žadinimo spektre atsirandanti nauja labai plati juosta su smaile ties 385 nm, stebima registruojant fluorescenciją ilgų bangų (455 nm ir daugiau) srityje, gali būti priskirta elastinui. HP spektre ši juosta aiškiai neišsiskiria, stebimas tik tipiškos kolageno sugerčiai juostos ties 330 nm išplitimas į ilgų bangų pusę. Tai rodo, kad pagrindinį skirtumą tarp HP ir JA spektrų nulemia žymiai intensyvesnė elastino fluorescencija JA.

Iš fluorescencijos ir jos žadinimo spektrų palyginimo su žinomų endogeninių fluoroforų spektrais galima identifikuoti širdies audiniuose esančius ir regimojoje spektro srityje fluorescuojančius fluoroforus.

Pagrindiniai iš jų yra JA fluoroforai: struktūriniai proteinais kolagenas ir elastinas. Žmogaus širdies miokarde randamos penkios kolageno molekulinės izoformos: I, III, IV, V ir VI tipų kolagenas. Antro tipo kolagenas nerastas. Labiausiai paplitę yra fibriliniai I ir III tipo kolagenai. Jie dažnai būna kartu ir sudaro 90 % bendro kolageno kiekio miokarde. I

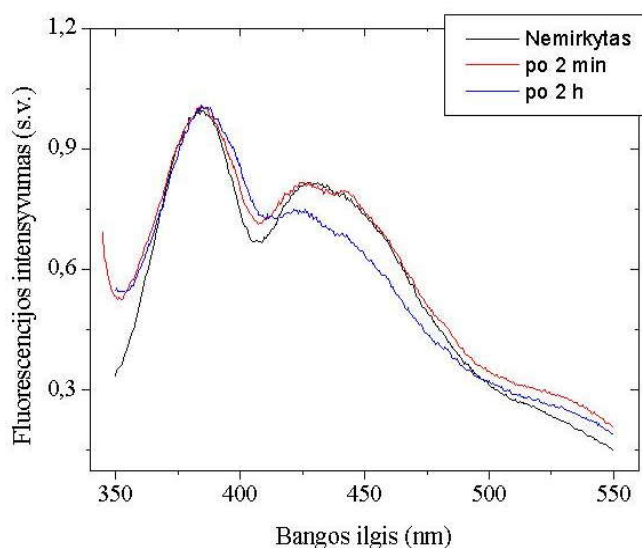
tipo kolagenas sudarytas iš storų skaidulų. III tipo kolagenas formuoja smulkų retikulinį, elastiškesnį negu I tipo kolagenas, tinklą ir dažnai būna su I tipo kolagenu, sudarydami skaidulas miokarde tarp miocitų ir raumenų skaidulų. I, III ir V tipo kolagenų spektrinės savybės yra labai panašios (6 lentelė). Jie visi žadinami artimajame UV (315 – 375 nm), o fluorescuoja 360-440 nm srityje. Fluorescencijos juostos smailė ties 390 nm. IV tipo kolageno spektrai žymiai pastumti į trumpų bangų pusę, o VI – į ilgų. Žadinimo ir fluorescencijos spektrų juostas ties 330 ir 390 nm atitinkamai galima priskirti I, III ir V tipų kolagenams.

6 lentelė. Dažnai sutinkamų endogeninių fluoroforų spektrinės savybės [92].

Fluoroforas	Žadinimo sritis, nm	Žadinimo maks., nm	Emisijos sritis, nm	Emisijos maks., nm
Triptofanas	250-290	280	310-410	340
Kolagenai:				
I ir III	315-375	345	360-440	390
IV	270-310	290	315-375	340
V	320-370	340	360-440	390
VI	390-420	410	600-625	645-660
VII	290-310			
	325-380	350	400-470	425
Elastinas	325-490	385	370-560	450
NADH ⁺	315-380	345	420-520	460
NADPH	380		420-525	460
FAD	260-480	460	500-550	520
Keratinas	260-300	280	300-400	350

Nikotinamidadenindinukleotidas (NADH) geriausiai sužadinamas artimojoje ultravioletinėje ir violetinėje regimojo spektro srityje. Kadangi jo sugerties ir fluorescencijos spektras yra gana platus NADH yra labai reikšmingas audinių savitajai fluorescencijai. Šis, su ląstelės medžiagų apykaita susijęs, fluoroforas koncentruojasi mitochondriose ir citoplazmoje. NADH fluorescencijos smailė *in vivo* yra ties 500 nm [81]. Matuojant kvėpavimo takų savitąją fluorescenciją, NADH fluorescencijos smailė lokalizuota ties 470 nm [89,93].

Siekiant patikrinti galimą NADH įnašą į mėginių fluorescenciją, buvo atliktas bandymas: mėginys mirkytas boro hidrido (BH_3) vandeniniame tirpale. Tikėtasi, kad šiame tirpale bandinyje esantis NAD^+ redukuosis ir bandinio fluorescencijos spektre atsiras arba nauja juosta, arba išaugs vienos iš juostų intensyvumas. Gauti rezultatai pateikiami 39 pav.



39 pav. HP audinių, nemirkytų ir mirkytų BH_3 vandeniniame tirpale, normuoti fluorescencijos spektrai ($\lambda_{\text{žad}} = 330 \text{ nm}$)

Mirkyto mėginio fluorescencijos spektre esminių pokyčių neužregistruota. 2 min. mirkyto mėginio fluorescencijos spektras sutapo su nemirkyto mėginio spektru, o po 2 valandų mirkymo santykinis fluorescencijos intensyvumas mėlynoje spektro srityje nežymiai sumažėjo. NADH emisijos sritis 420-520 nm, tačiau jis fluorescuoja tik redukuotas, mėginiuose *ex vivo* jo fluorescencija nepasireiškia.

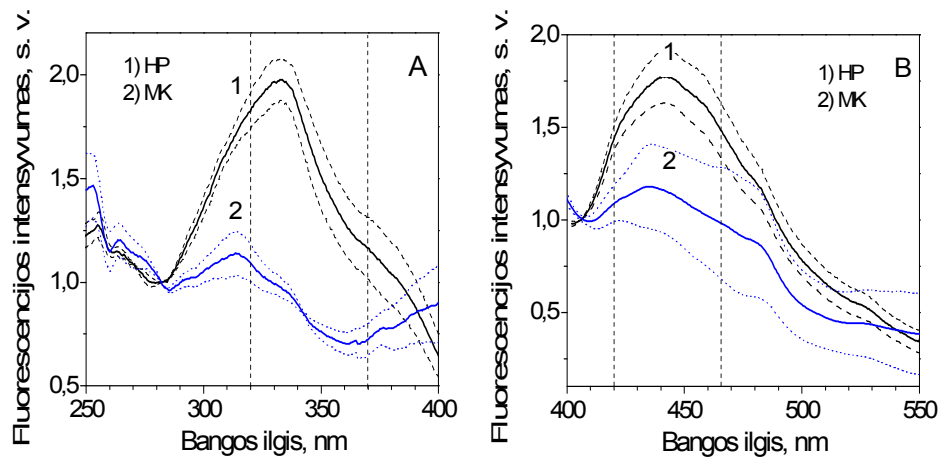
Visi literatūros apžvalgoje minėti [61-63] širdies audinių fluorescenciniai tyrimai buvo atlikti žadinant fluorescenciją monochromatine lazerio šviesa. Be to, matavimai atlikti mažos skiriamosios gebos spektrofluorimetrais, ir atskirų fluoroforų emituojamos spektro juostos neišskirtos. Fluorescencijos žadinimo spektrai visai netyrinėti. Pastebėtas tik fluorescencijos intensyvumų

skirtumas mėlynojoje spektro srityje. Kadangi kiekvienas fluoroforas turi savitus fluorescencijos ir jos žadinimo spektrus, tai jų spektrų registravimas plačiame bangų ilgių intervale įgalino išskirti atskiras juostas ir jas priskirti skirtingiems fluoroforams. Šiame darbe fluorescencija buvo žadinama plačioje spektro srityje nuo 250 nm iki 480 nm. Tokia plati žadinimo sritis sudarė galimybes selektyviai žadinti atskirus fluoroforus, surasti žadinančios spinduliuotės bangos ilgius, kuriuos būtų galima efektyviausiai panaudoti ŠLS vaizdinimui [94].

Širdies mėginių fluorescencijos ir jos žadinimo spektrų analizė parodė, kad širdies audiniuose yra keletas endogeninių fluoroforų su persiklojančiomis sugerties ir fluorescencijos juostomis. Iš jų galima išskirti tris pagrindinius su žadinimo/fluorescencijos spektrinėmis juostomis ties: 280 /340 nm triptofaną, 330 / 390 nm kolageną ir 385 / 460 nm elastiną. Skirtingi šių fluoroforų kiekiai MK, HP ir JA nulemia jų fluorescencijos spektrų skirtumus UV ir mėlynojoje spektro srityse. Labai silpną MK mėlynąją fluorescenciją galima paaiškinti žymiai mažesniais kolageno ir elastino kiekiais MK, palyginus su HP ir JA. Ypač gerai šių fluoroforų spektrų juostos išsiskiria širdies homogenatų spektruose.

8.7. Optimalios miokardo ir Hiso pluošto atskyrimo sąlygos

Bandant surasti optimaliausias Hiso pluošto ir jo šakų vaizdinimo sąlygas, buvo ieškoma optimalių fluorescencijos žadinimo spinduliuotės bangų ilgių ir fluorescencijos registravimo sričių, užtikrinančių didžiausią skaitinį ir spalvinį kontrastą tarp ŠLS ir MK audinių.



40 pav. Suvidurkinti ir sunormuoti ties 282 nm ir 406 nm atitinkamai HP ir MK bandinių fluorescencijos žadinimo ($\lambda_{fl} = 450$ nm, (A) ir fluorescencijos ($\lambda_{\text{žad}} = 366$ nm(B)) spektrai. Brūkšniuotos kreivės žymi didžiausius stebėtus nukrypimus.

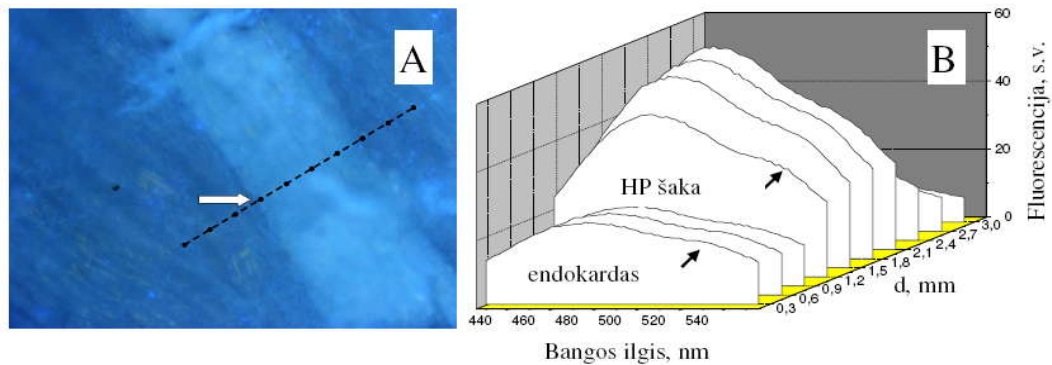
Atlikus Hiso pluošto ir miokardo suvidurkintų ir sunormuotų fluorescencijos emisijos ir fluorescencijos žadinimo spektrų parametrų analizę, nustatyta, kad didžiausias HP ir MK mėginių fluorescencijos intensyvumų skirtumai stebimi žadinant UV-A spektro srityje nuo 320 nm iki 370 nm (40 pav. A) ir registruojant fluorescenciją 420 – 465 nm srityje (40 pav. B).

8.8. Vaizdinimo eksperimentai: Hiso pluošto šakų paviršinės skyros fluorescencinė spektroskopija

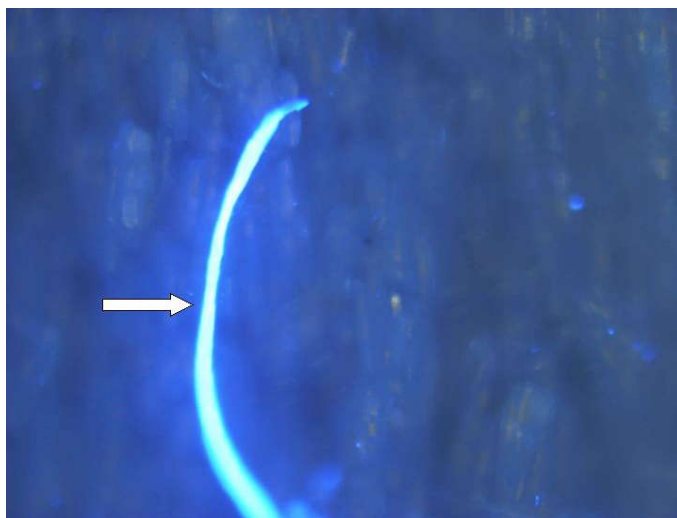
Radus optimalias Hiso pluošto ir miokardo atskyrimo sąlygas buvo mėginta nustatyti smulkių kairės HP kojų šakų išsidėstymą tarpkilvelinės pertvaros paviršiuje. Tyrimui naudoti 10% buferiniame formaline fiksuoti širdies tarpkilvelinės pertvaros preparatai (56-60 širdies preparatas).

Fluorescenciniu mikroskopu Olympus BX 60, apšvietus 366 nm spinduliuote, surasta ir skaitmenine kamera Olympus D50 nufotografuota nedidelė kairės HP kojytės šaka. Mikroskopu-spektrofotometru MCΦY buvo registruojami skirtingų tarpkilvelinės pertvaros taškų fluorescencijos spektrai, apimant endokardo ir rastų Hiso pluošto šakų audinius. 41 pav. A parodytas Hiso pluošto kairiosios šakos fragmentas su aplinkiniu endokardu, kuris buvo parinktas spektriniam skenavimo matavimams. Spektrai registruoti pastumiant mikroskopo stalelį 0,3 mm intervalais, surenkant spinduliuotę iš 0,3 mm diametro skritulio ploto. Juoda linija paveiksle rodo skenavimo kryptį, o juodi taškai – matavimo taškų padėtis. 41 pav. B pateikti fluorescencijos matavimų rezultatai, iš kurių matyti, kad HP šakos fragmento fluorescencijos intensyvumas daugiau kaip du kartus didesnis už aplinkinio endokardo fluorescencijos intensyvumą. Žadinant biologiniams audiniams mažiau pavojinga artimaja UV spinduliuote (366 nm) ir, naudojant tik širdies audinių savitąją fluorescenciją, galima gana kontrastingai vaizdinti HP šakas. Fluorescenciniu mikroskopu stebimi įvairūs objektai ir miokardo sritys fluorescuojantys UV spinduliuotėje, todėl būtini detalūs fluorescencinio vaizdo tyrimai norint vienareikšmiškai identifikuoti širdies laidžiąją sistemą. Kai kurie širdies audiniuose stebimi fluorescuojantys objektai neabejotinai yra artefaktai.

Biologiniams audiniams nebūdinga forma, lokalizacija ir parametrai leidžia manyti, kad tai gali būti organinės arba neorganinės kilmės dulkės, patekusios ant audinių paviršiaus (42 pav.).

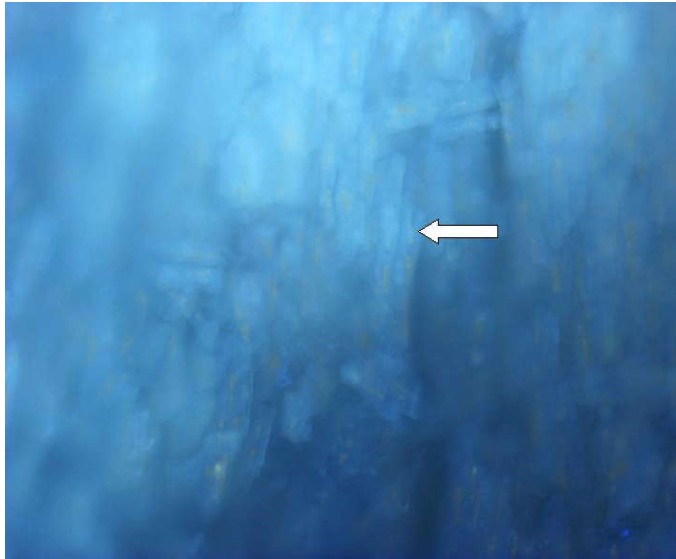


41 pav. Kairiosios HP šakos fragmentas x20 (A) ir jo fluorescencijos spektrai (B) apšvietus 366 nm spinduliuote.



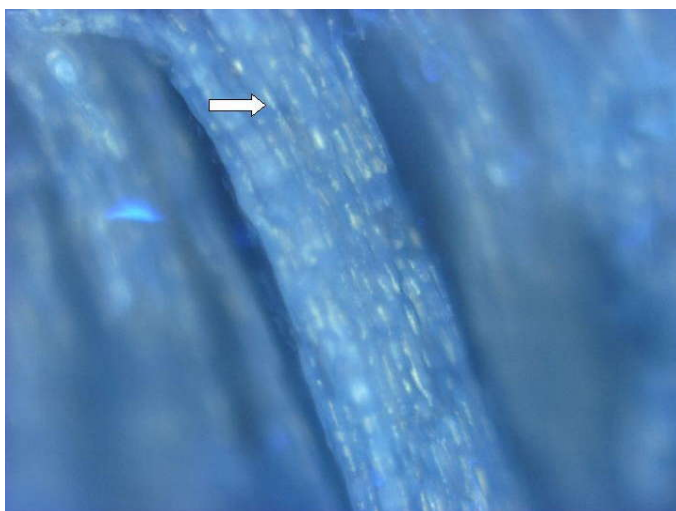
42 pav. Širdies skilvelio paviršiuje švytintis artefaktas (dulkė) x20.

366 nm bangos ilgio spinduliuotė sužadina širdies raumens fibrozės (kolageno sankaupos) ir koaguliacinės nekrozės (raumens žūtis dėl deguonies stokos) židinių savitąją fluorescenciją (43 pav.). Širdies raumens infarkto savitosios fluorescencijos savybės naudojamos ankstyvos miokardo infarkto stadijos diagnostikai, nes tai vienas jautriausių metodų, leidžiantis aptikti ūmios širdies raumens koaguliacinės nekrozės židinius anksčiau nei išsivysto histologiniai pokyčiai.



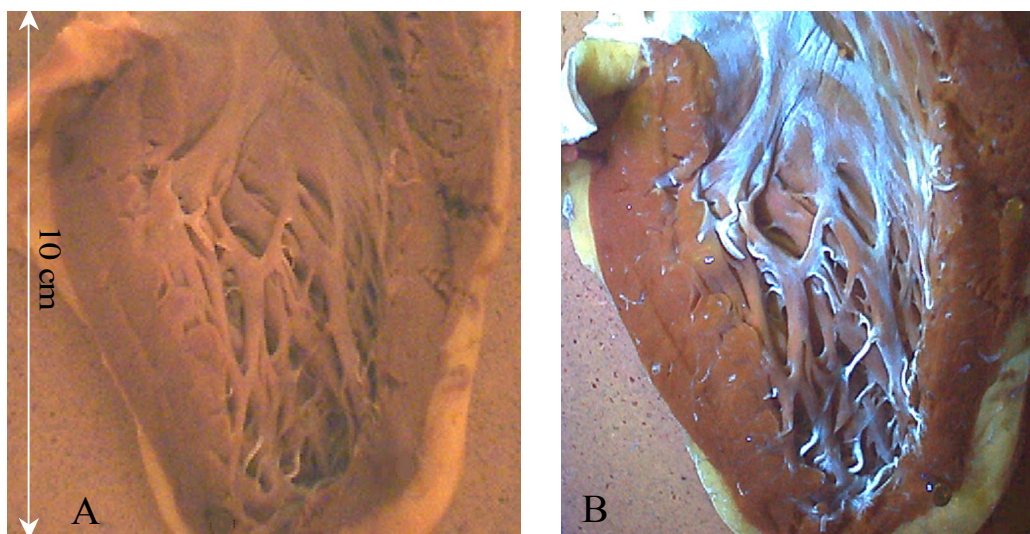
43 pav. Širdies raumens nekrozės plotas (infarktas)x20.

Skirtinga savitąja fluorescencija taip pat pasižymi širdies struktūros, kurių sudėtyje gausu kolageno ir elastino skaidulų, pvz., endokardas, išklojantis širdies ertmių vidinius paviršius. Širdies raumens ląstelėse matomos glikogeno sankaupos (44 pav.). Glikogenas yra svarbiausias atsarginis polisacharidas, susidedantis iš gliukozės molekulių, susijungusių į šakotas grandines. Skylant glikogenui, atsipalaiduoja energija, kuri naudojama širdies raumens darbui.



44 pav. Miokarde fluorescuojančios glikogeno sankaupos x20.

Makroskopiniam visos širdies tarpkilvelinės pertvaros vaizdinimui naudota aukšto slėgio Hg lempos linijų grupė ties 366 nm, išskirta filtru UFS. Bandymai atlikti dalinai užtemdytoje patalpoje. Fiksuotos buferiniame 10% formalino tirpale kairiosios tarpkilvelinės pertvaros pusės vaizdai, gauti skaitmenine CCD kamera ToUcamPro (Philips) ir personaliniu kompiuteriu, pateikti 45 pav. A dienos šviesoje ir B žadinant UV spinduliuote.



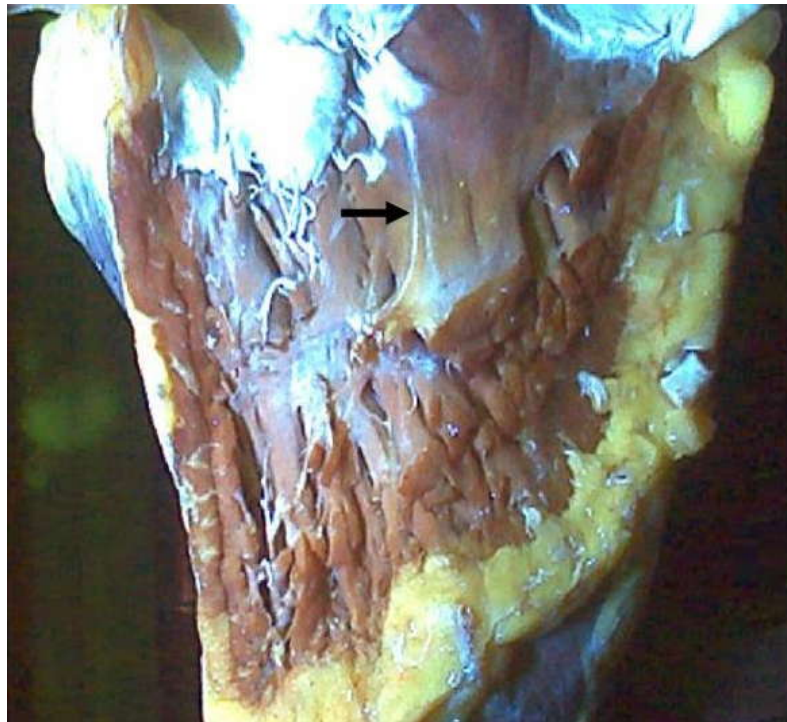
45 pav. Širdies skilvelinė pertvara ir joje matoma kairė Hiso pluošto šaka. (A - vaizdas dienos šviesoje, B - vaizdas apšvietus 366 nm bangos ilgio spinduliuote).

Kaip matyti, dienos šviesoje HP kairioji šaka neišsiskiria iš aplinkinio endokardo. Visai kitokį vaizdą turime apšvietus UV spinduliuote. Plačiai išsišakojusi HP kairioji šaka, fluorescuoja mėlynai ir yra matoma tarpkilvelinės pertvaros endokardo fone.

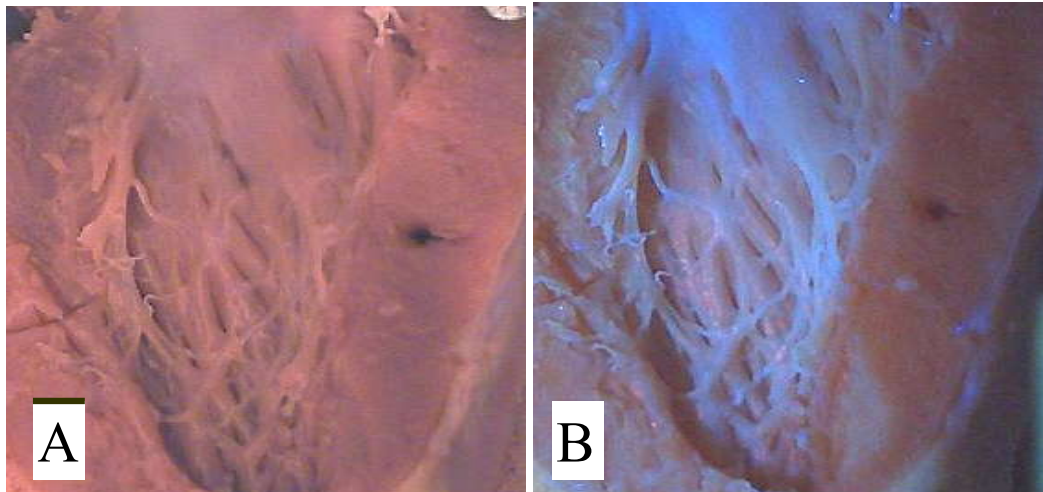
Analogiškomis sąlygomis vaizdinta dešinioji Hiso pluošto šaka (46 pav.).

Vaizdinimo eksperimentai parodė, kad HP šakų fluorescencija ne visuomet yra žymiai intensyvesnė už aplinkinių audinių fluorescenciją. Vyresnio amžiaus žmonių širdyse ir esant įvairioms patologinėms

būklėms, endokarde ir miokarde vystosi fibroziniai pakitimai, daugėja kolageno, kurio intensyvi mėlyna fluorescencija apsunkina ŠLS atskyrimą, nes savo spalva ji nesiskiria nuo HP šakų fluorescencijos (47 pav.).

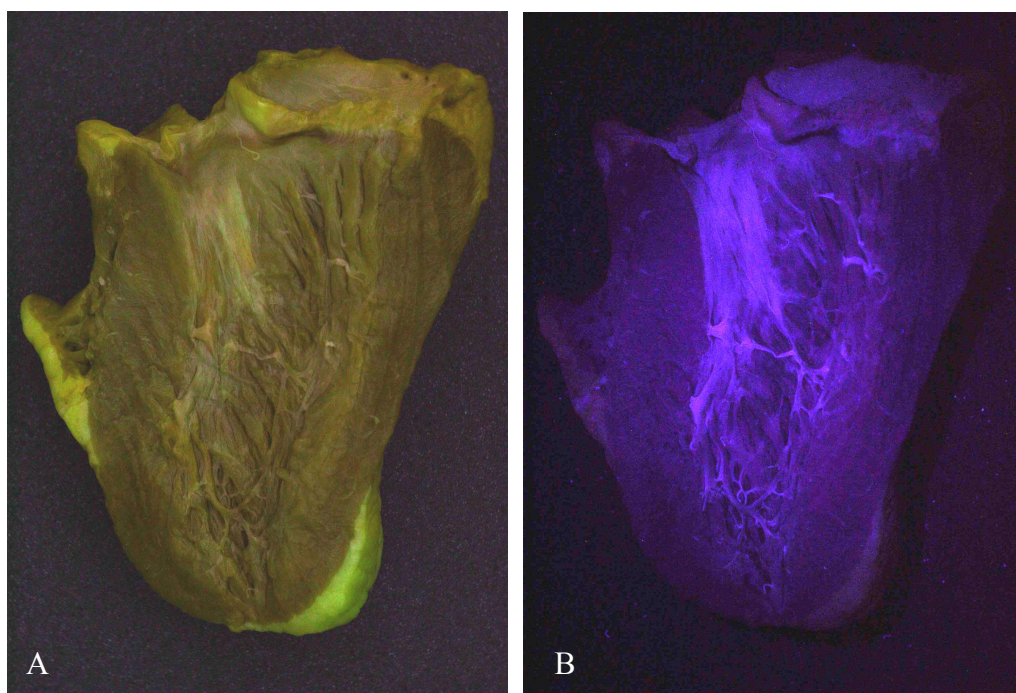


46 pav. Dešinioji HP šaka (rodyklė) apšvietus 366 nm spinduliuote.



47 pav. Kairioji HP šaka dienos šviesoje (A) ir apšvietus titano safyro lazeriu 350 nm spinduliuote (B).

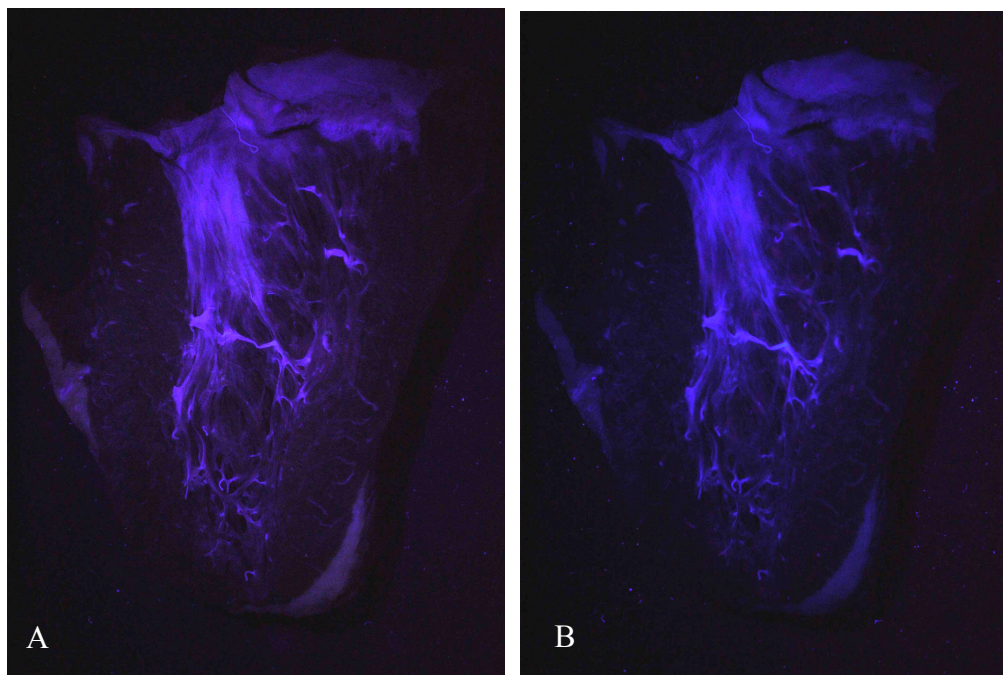
Siekiant įvertinti kraujo sugerties įtaką vaizdinimo efektyvumui, tolimesni tarpkilvelinės pertvaros vaizdinimo eksperimentai buvo atlikti su nefiksuotais formaline ir neplautais širdies preparatais (61-65 širdies preparatas). Fluorescencijos žadinimui naudota šviesolaidinė ksenono lempa, kurios siauros spektro sritys išskirtos interferenciniais filtrais. Bandymai atlikti visiškoje tamsoje. Kairiosios tarpkilvelinės pertvaros pusės vaizdai, gauti CCD kamera INFINITY2 ir personaliniu kompiuteriu, pateikti 48 pav.



48 pav. Nefiksuotos širdies kairioji tarpskilvelinės pertvaros pusė, apšvieta dienos šviesa (A) ir Xe lempos 340nm bangos ilgio spinduliuote (B).

Kaip matyti iš 48 pav., kraujo reabsorbcija netrukdo Hiso pluošto šakų vaizdinimui. Be to, vaizdinimo eksperimentuose fluorescenciją galima žadinti ne tik artimojoje ultravioletinėje spektro srityje, bet ir biologiniams audiniams nepavojinga regimosios spektro srities violetine spinduliuote (49 pav.).

Tokiais atvejais, kai intensyvi jungiamojo audinio mėlyna fluorescencija apsunkina Hiso pluošto šakų išskyrimą, kaip parodė ankstesni tyrimai, fluorescenciją reikia žadinti dviem skirtingais bangų ilgiais: 330 nm (kolageno sugerties juostoje) ir 385 nm (elastino sugerties juostoje). HP ir JA audiniai skiriasi elastino fluorescencijos juostos ties 460 nm intensyvumu. JA žadinant 330 nm ir 385 nm spinduliuote šios juostos intensyvumas nekinta, o HP žadinant ties 385 nm - sumažėja du kartus.



49 pav. Nefiksuotos širdies kairioji tarpkilvelinės pertvaros pusė, apšvietus Xe lempos 366 nm bangos ilgio spinduliuote (A) ir Xe lempos 405 nm bangos ilgio spinduliuote (B).

Dešinioji Hiso pluošto šaka yra plono cilindro formos ir daugumoje širdžių išsidėsčiusi miokarde, todėl neprieinama fluorescenciniam vaizdinimui.

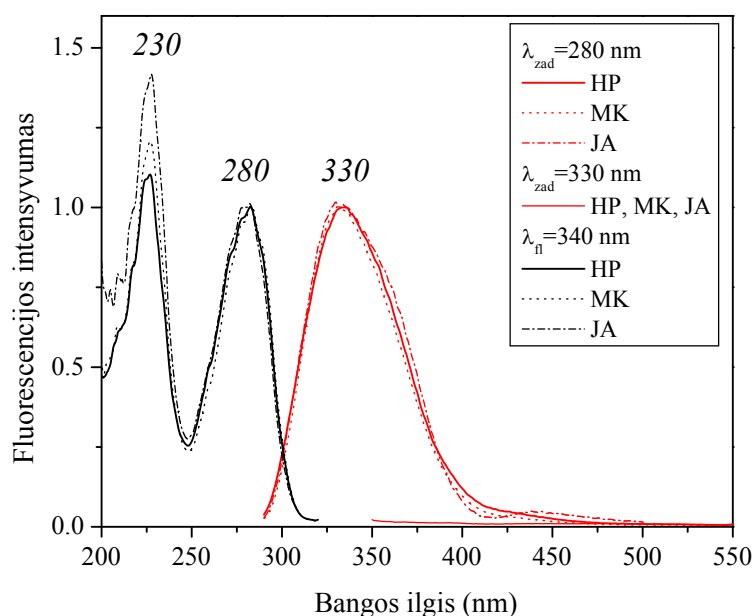
8.9. Širdies audinių homogenatų tyrimas

Detalesniam Hiso pluošto, miokardo ir jungiamojo audinių mėlynosios spektro srities fluorescenciją sąlygojančių fluoroforų, bei jų lokalizacijos audiniuose nustatymui tiriamieji audiniai buvo keliais etapais homogenizuojami. Kiekviename etape buvo registruojami susidariusių frakcijų fluorescencijos spektrai ir atliekama jų analizė [95].

I etape audinys homogenizuojamas, suardant audinio struktūrą ir ląsteles. Į tirpiąją frakciją pereina mitochondrinė frakcija, citozolis (citoplazminiai, vandenyje tirpūs baltymai), o po centrifugavimo į nuosėdas iškrinta didelės dalelės – likusios nesuardytos ląstelės, ląstelių ir

plazminės membranos nuolaužas, branduoliai, „sunkios” mitochondrijos, tarpląstelinis matriksas.

50 pav. pateikti HP, MK ir JA audinių pirmosios tirpiosios frakcijos normuoti fluorescencijos žadinimo ir fluorescencijos spektrai.

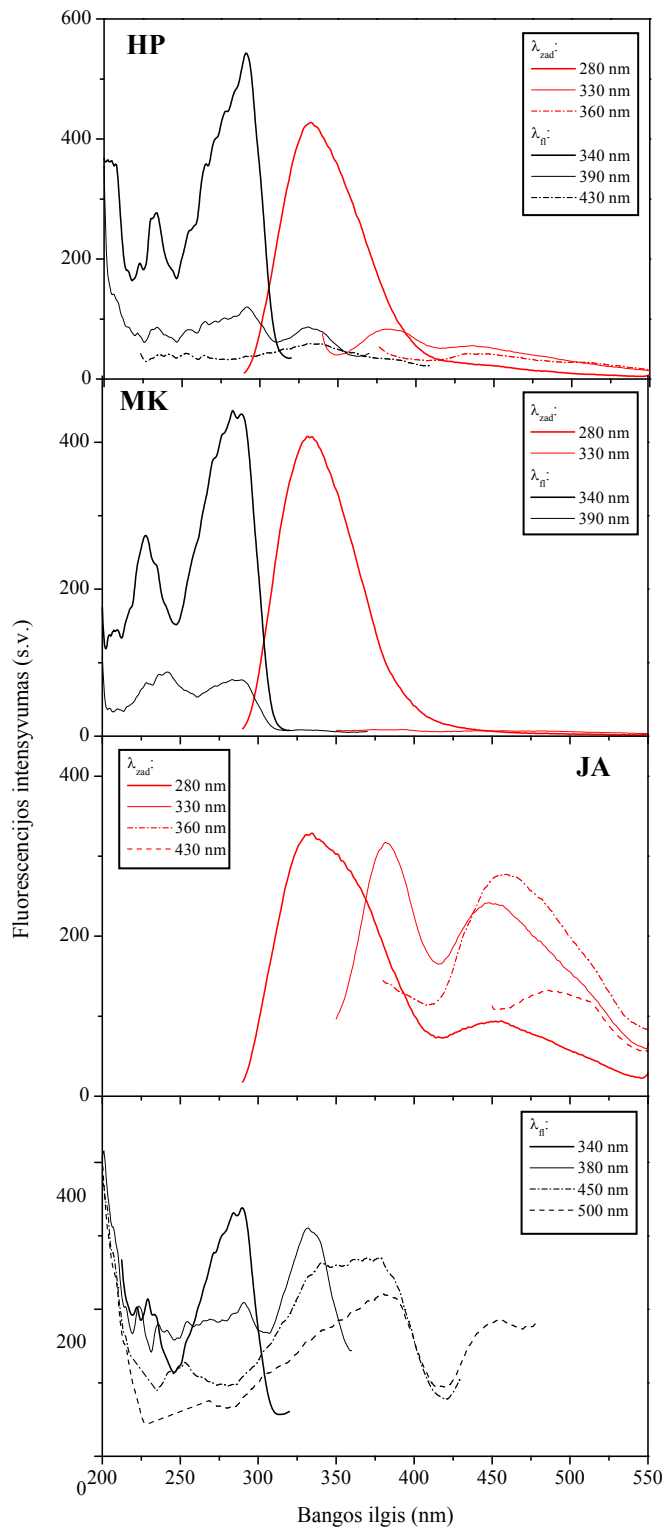


50 pav. Pirmos tirpiosios frakcijos HP, MK ir JA fluorescencijos žadinimo ir fluorescencijos spektrai ($\lambda_{zad}=280$ nm, 330 nm, $\lambda_{fl}=340$ nm) normuoti į didžiausią smailės vertę.

Kaip matyti iš 50 pav. Hiso pluošto, miokardo audinių ir jungiamojo audinio pirmųjų tirpiųjų frakcijų fluorescencijos žadinimo ir fluorescencijos spektrai yra labai panašūs ir kokybiškai nesiskiria: spektrų intensyvumo pasiskirstymo kreivių formos panašios, visų audinių fluorescencijos juostų padėtys sutampa – fluorescencijos žadinimo spektre dvi smailės ties 230 nm ir ties 280 nm, bei fluorescencijos spektre ties 330 nm, fluorescencija mėlynojoje spektro srityje labai silpna. Ilgesnio bangos ilgio šviesa, jau 330 nm, nebesužadina fluorescencijos nei vieno audinio frakcijoje.

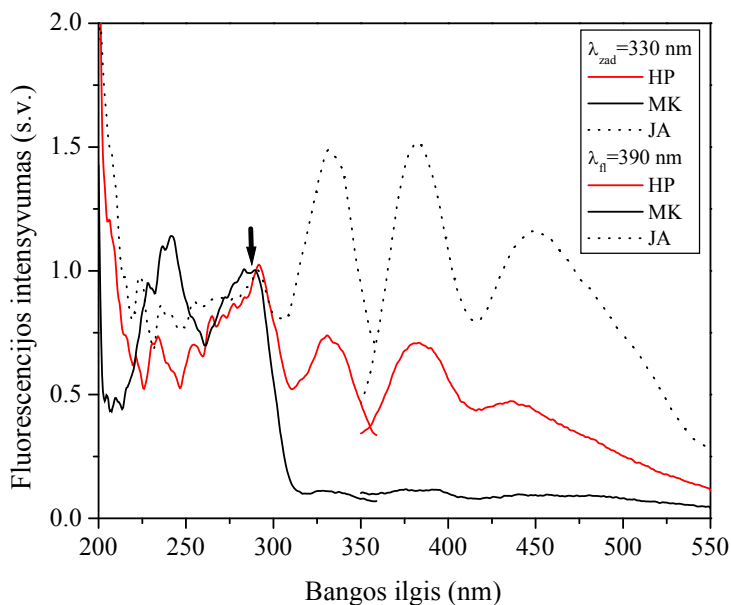
Užregistruoti I-ojo etapo netirpiosios frakcijos nuosėdų fluorescencijos spektrai yra panašūs į atitinkamo audinio fluorescencijos spektrus (51 pav.).

Visų audinių netirpių frakcijų fluorescencijos spektrams yra būdinga juosta ties 340 nm, sužadinama 280 nm srityje. Fluorescencija mėlynojoje spektro srityje, kaip ir audiniams, yra būdinga tik HP ir JA, o MK ji nėra sužadinama. Slėnis ties 415 nm gali būti sąlygotas kraujo sugerties, nes homogenatų paruošimui naudoti nefiksuoti, kraujingi audiniai [43]. 52 pav. pateikti sunormuoti ties 290 nm visų audinių homogenatų pirmos netirpios frakcijos fluorescencijos spektrai.



51 pav. Pirmosios netirpiosios frakcijos Hiso pluošto (HP), miokardo (MK) ir jungiamojo (JA) audinių fluorescencijos žadinimo ir fluorescencijos spektrai.

Skirtumai tarp homogenatų fluorescencijos spektrų, kaip ir audiniuose, geriausiai matomi žadinant 330 nm bangos ilgio spinduliuote. JA fluorescencijos intensyvumas mėlynojoje spektro srityje yra didžiausias, HP mažesnis, MK fluorescencija labai mažo intensyvumo.



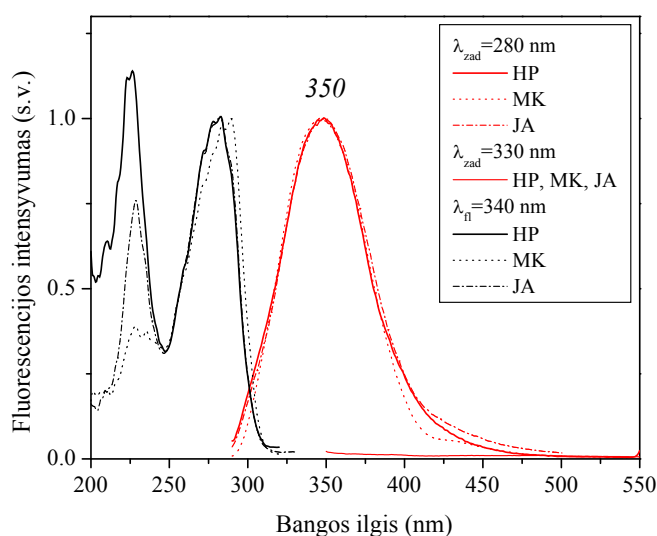
52 pav. HP, MK ir JA I netirpiosios frakcijos fluorescencijos žadinimo ir fluorescencijos spektrai ($\lambda_{\text{žad}}=330$ nm, $\lambda_{\text{fl}}=390$ nm), normuoti ties 290 nm.

II etape ekstrahuojant liekamąją frakciją dar suardomos membranos, ištirpdoma dalis netirpių vandenyje baltymų ir į tirpiąją frakciją pereina ląstelės organoidų baltymai, ištirpdyti vandenyje netirpūs baltymai, o po centrifugavimo į nuosėdas iškrinta baltymai, turintys dideles ar daug hidrofobinių grandinių, membraniniai baltymai, didelės masės baltymai ir DNR, lipidai, glikosacharidai.

Užregistruoti antrosios tirpiosios frakcijos normuoti fluorescencijos žadinimo ir fluorescencijos spektrai pateikti 53 pav.

Kaip matyti iš 53 pav. HP, MK ir JA homogenatų antrojo etapo tirpių frakcijų fluorescencijos žadinimo ir fluorescencijos spektrai taip pat yra

labai panašūs ir kokybiškai nesiskiria: spektrų intensyvumo pasiskirstymo kreivių formos panašios, visų audinių fluorescencijos juostų padėtys sutampa – fluorescencijos žadinimo spektre dvi smailės ties 230 nm ir ties 280 nm, bei fluorescencijos spektre ties 350 nm, fluorescencija mėlynojoje spektro srityje labai silpna. Ilgesnio už 330 nm bangos ilgio spinduliuotė nebesužadina nei vieno antros tirpios frakcijos homogenatų fluorescencijos. Nuo pirmosios tirpios frakcijos spektrų skiriasi tik fluorescencijos juostos smailės postūmiu 20 nm į ilgesnių bangų pusę.

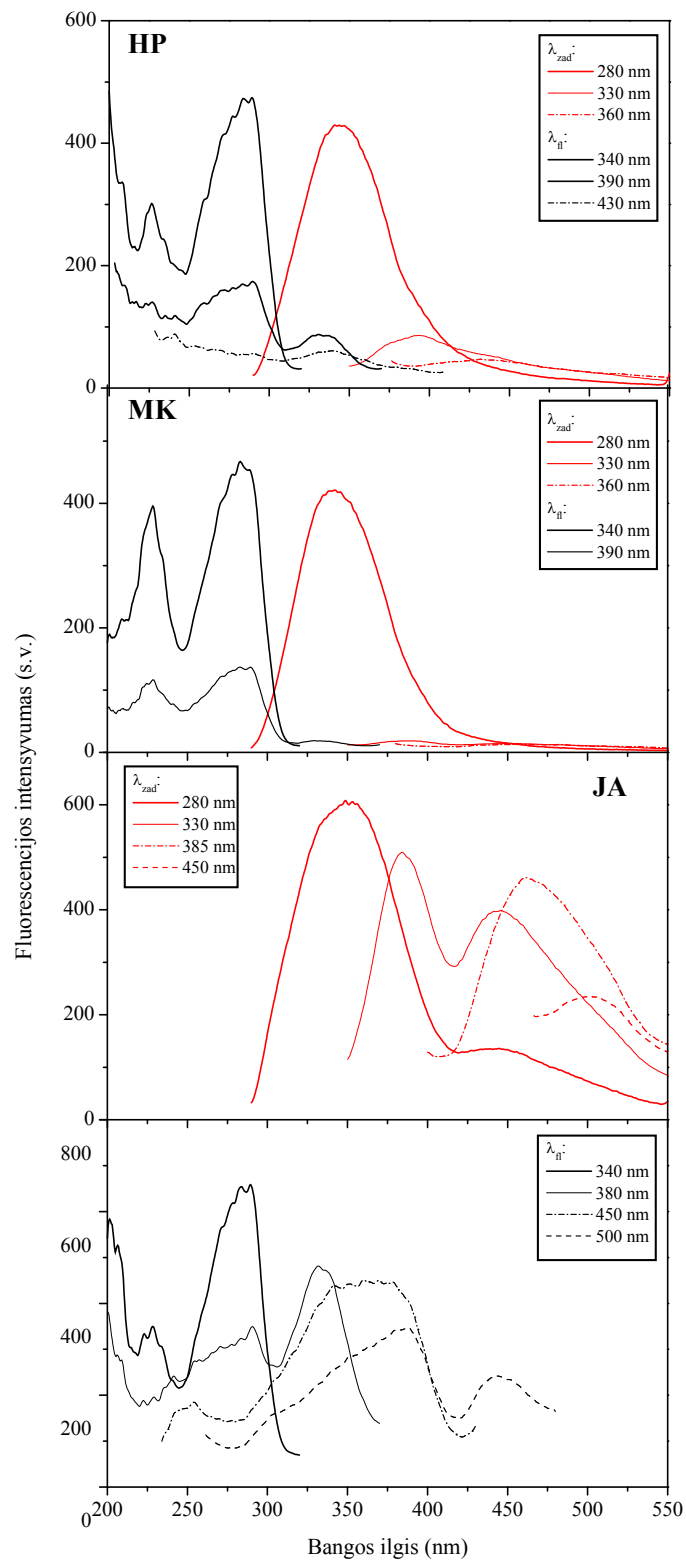


53 pav. Antrosios tirpiosios frakcijos HP, MK ir JA fluorescencijos žadinimo ir fluorescencijos spektrai ($\lambda_{\text{žad}}=280$ nm, 330 nm, $\lambda_{\text{fl}}=340$ nm) normuoti į didžiausią smailės vertę.

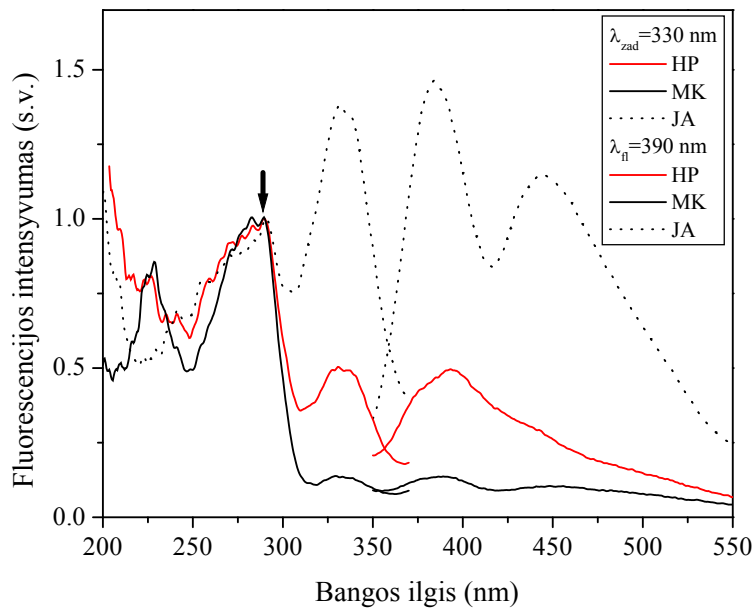
Užregistruoti II-ojo etapo nuosėdų fluorescencijos spektrai (54 pav.) taip pat yra panašūs į atitinkamo audinio fluorescencijos spektrus ir I-osios netirpios frakcijos spektrus. Šiek tiek sumažėja atskirų širdies audinių homogenatų kraujo sugertis ties 415 nm. Ryškiausi spektrų skirtumai stebimi sunormavus spektrus ir žadinant 330 nm bangos ilgio spinduliuote (55 pav.).

III ekstrahavimo etape liekamojoje frakcijoje ištirpdomos dauguma likusių membranų, ištirpdomi ir išvyniojami baltymai, išlieka tik

kovalentinės jungtys – t.y. pirminė baltymų struktūra, išardomos hidrofobinės grandinės, baltymas padengiamas neigiamu krūviu. Į tirpiają frakciją pereina ištirpę membranų baltymai, lengvos amino rūgščių sekos. Po šio ekstrakto centrifugavimo į nuosėdas iškrinta likusios sunkios nesuardytos struktūros ir amino rūgščių sekos, ir pan.

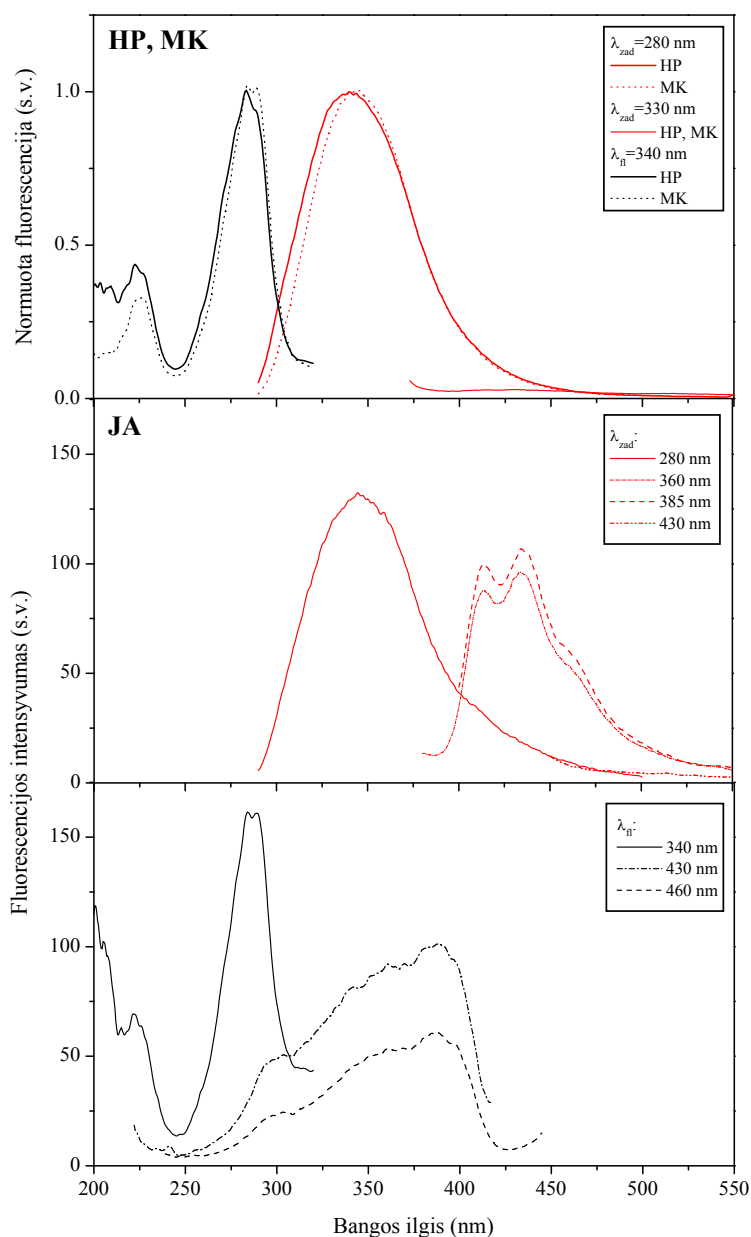


54 pav. Antrosios netirpios frakcijos Hiso pluošto (HP), miokardo (MK) ir jungiamojo (JA) audinių fluorescencijos žadinimo ir fluorescencijos spektrai.



55 pav. Antrosios netirpiosios frakcijos HP, MK ir JA fluorescencijos žadinimo ir fluorescencijos spektrai ($\lambda_{\text{zad}}=330 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{fl}}=390 \text{ nm}$), normuoti ties 290 nm.

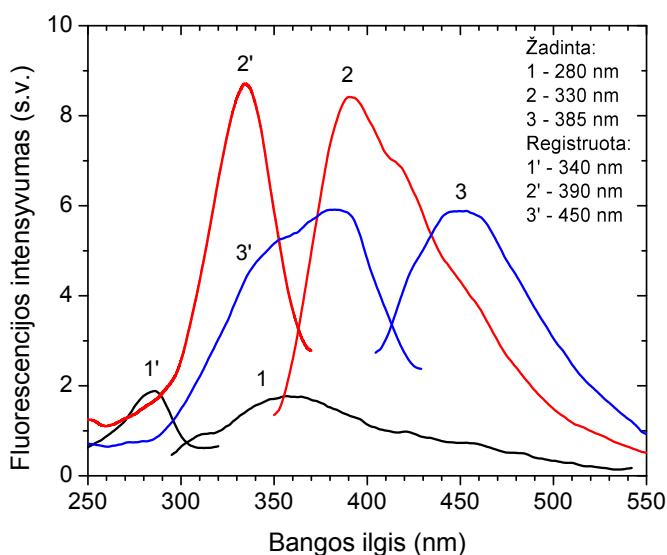
Užregistruoti III-ojo etapo tirpiosios frakcijos normuoti fluorescencijos žadinimo ir fluorescencijos spektrai pateikti 56 pav. Visų audinių frakcijų spektruose išlieka būdinga Trp fluorescencijos juosta ties 340 nm, sužadinama ties 280 nm, tik jungiamojo audinio spektre ji pasislinkusi į ilgų bangų pusę per 10 nm (350 nm). Hiso pluošto ir miokardo tirpių frakcijų spektrų skirtumai yra nežymūs, fluorescencija mėlynojoje spektro srityje nesužadinama. Jungiamojo audinio žadinimo spektre atsiranda plati juosta 300-400 nm srityje, sudaryta iš kelių persiklojančių juostų, o fluorescencijos spektre – mėlyna fluorescencija.



56 pav. Trečiosios tirpiosios frakcijos Hiso pluošto (HP), miokardo (MK) ir jungiamojo (JA) audinių fluorescencijos žadinimo ir fluorescencijos spektrai ($\lambda_{zad}=280$ nm, 330 nm, $\lambda_{\lambda}=340$ nm); HP ir MK spektrai normuoti į didžiausią smailės vertę.

III-ojo etapo nuosėdų fluorescencijos žadinimo ir fluorescencijos spektrams būdingos tos pačios juostos kaip ir atitinkamų audinių ir pirmų dviejų netirpių frakcijų spektrams, pasikeitę tik jų santykiniai

intensyvumai. 57 pav. parodyti JA homogenatų trečios netirpios frakcijos fluorescencijos ir jos žadinimo spektrai, gauti žadinant skirtingais bangu ilgiais. Kaip matyti, Trp žadinimo juosta ties 280 nm ir jo fluorescencijos juosta ties 340 nm, kurios nehomogenizuotų audinių ir tirpių frakcijų spektruose buvo pačios intensyviausios, yra labai silpnos. Matyt, dauguma Trp turinčių baltymų perėjo į tirpias frakcijas. Pati intensyviausia žadinimo spektrų juosta stebima ties 330 nm, ji priklauso kolagenui. Žadinant šioje spektro srityje registruojama intensyvi kolageno fluorescencijos juosta ties 390 nm. Žadinimo spektro juosta ties 385 nm ir fluorescencijos juosta ties 460 nm priskiriamos elastinui.



57 pav. Jungiamojo audinio III netirpios frakcijos fluorescencijos ir jos žadinimo spektrai esant skirtingiems žadinimo ir registravimo bangų ilgiams. Žadinimo spektrai pažymėti brūkšniuotais skaičiais. 1 ir 1' – Trp; 2 ir 2' – kolagenas, 3 ir 3' – elastinas.

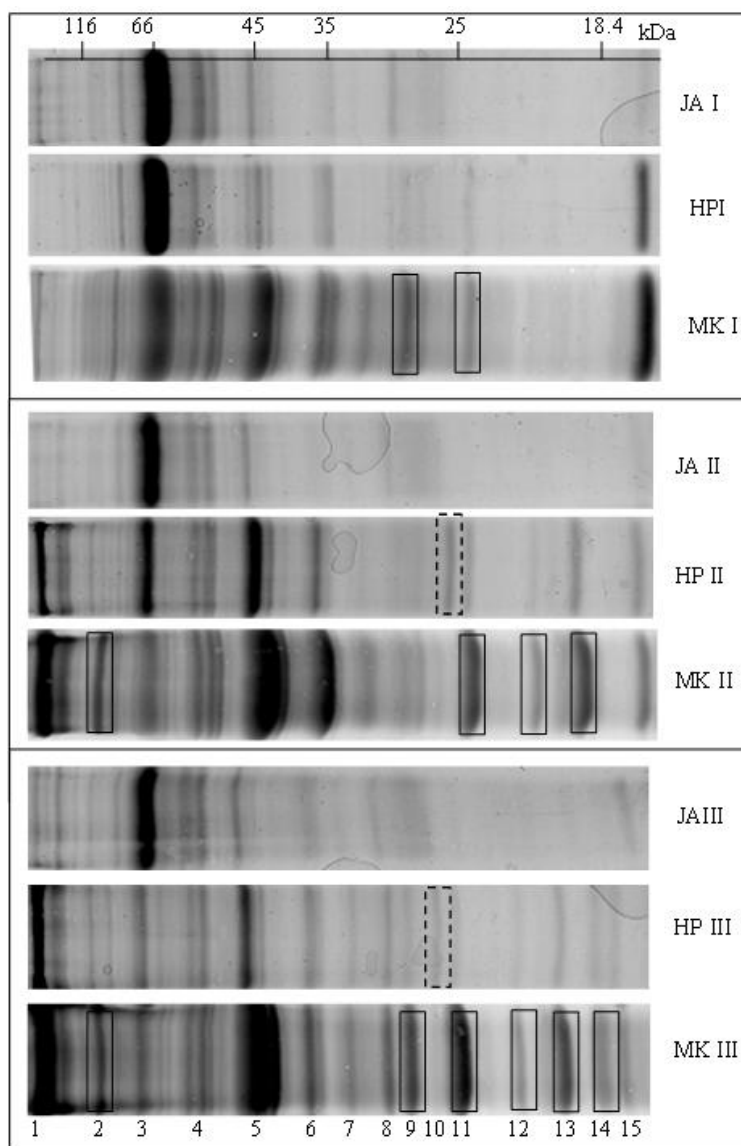
Audinių homogenizavimo metodas padeda nustatyti endogeninių fluoroforų pasiskirstymą atskirose frakcijose. Tyrimai parodė, kad tirpių frakcijų spektruose dominuoja Trp liekanų fluorescencija, o regimojoje

spektro srityje fluorescuojantys endogeniniai fluoroforai lieka netirpiose frakcijose.

8.10. Elektroforetinis baltymų frakcionavimas

Išsamesni visų širdies audinių tirpiųjų frakcijų baltyminės sudėties tyrimai atlikti elektroforezinės analizės SDS-Page metodu [92] ir užregistruoti skirtingose frakcijose esančių elektroforezės metodu išskirtų atskirų baltymų grupių fluorescencijos ir jos žadinimo spektrai. Žadinimui pasirinkta 270 nm bangos ilgio spinduliuotė, nes šioje srityje gerai sugeria abu pagrindiniai baltymų fluoroforai: Trp ir Tyr.

Kaip matyti, HP, MK ir JA audinių baltyminė sudėtis yra skirtinga (58 pav.).



58 pav. Širdies audinių homogenatų SDS-PAGE elektroforegramos. Viršuje masių skalė, apačioje baltymų grupių numeriai. Skaičiai I, II, III reiškia pirmą, antrą ir trečią tirpias frakcijas atitinkamai. Ištinine linija pažymėtos MK būdingos baltymų grupės, brūkšniuota – HP.

Pirma baltymų grupė (masė 150-160 kDa), sudaryta iš dviejų mažesnių baltymų grupių, stebima tik II ir III tirpiose HP ir MK frakcijose. Visose trijose JA frakcijose šių baltymų yra labai mažai. Ši baltymų grupė būdinga tik raumeninės kilmės HP ir MK audiniams ir gali būti panaudota atskiriant juos nuo JA audinių.

Trečia baltymų grupė (66 kDa) dominuoja visose JA frakcijose ir I bei II HP frakcijoje. Visose MK frakcijose bei III HP frakcijoje jų yra mažiau. Be to, Hp ir JA ši baltymų grupė yra glikozilinta, o MK ne. Tai rodo, kad labai artimų molekulinį masių širdies audinių baltymai yra skirtingi.

Ketvirta baltymų grupė (57-52 kDa), sudaryta iš dviejų, o visose MK frakcijose net iš trijų mažesnių baltymų grupių, stebima visose HP, MK ir JA audinių frakcijose. Šiai grupei priklausančių baltymų kiekių visų audinių visose frakcijose skirtumai yra nedideli.

Penkta baltymų grupė (45 kDa) dominuoja II ir III MK frakcijose. Ji stebima ir HP II bei III frakcijose. Visose JA frakcijose ir I HP frakcijoje šių baltymų yra mažiau.

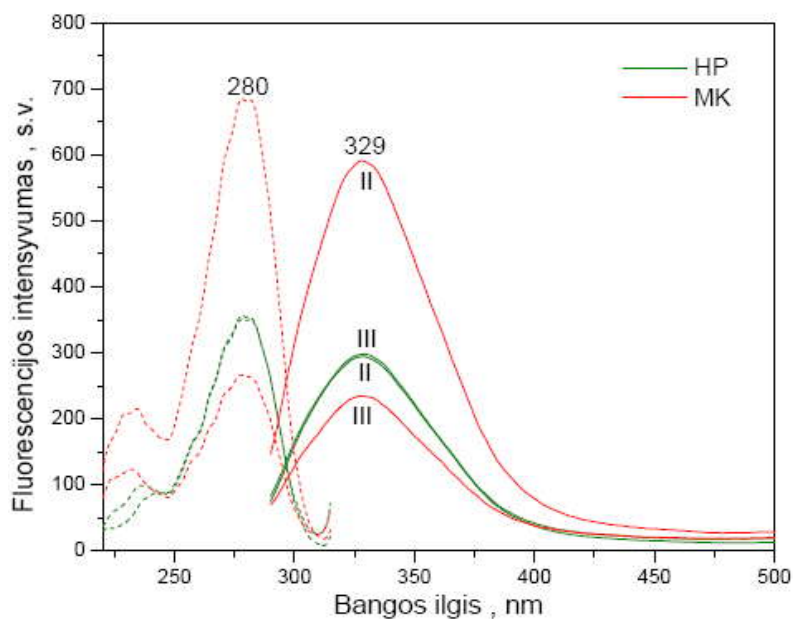
Keletas baltymų grupių (2, 9, 11, 12, 13, 14) išryškėja MK II ir III frakcijose. Jos būdingos tik MK.

Reikia pažymėti, kad dešimta baltymų grupė (~26 kDa) aptinkama tik HP II ir III frakcijose. Pirmoje tirpioje frakcijoje, į kurią patenka mitochondrinė frakcija, citozolis ir kiti vandenyje tirpūs baltymai, ji nepastebėta. Tokiu būdu galima daryti išvadą, kad šie baltymai priklauso vandenyje netirpių membranų baltymų grupei. Parinkus šios grupės baltymams tinkamą dažiklį arba juos pažymėjus fluorescuojančiais žymekliais, būtų galima vaizdinti širdies laidžiąją sistemą.

Buvo užregistruoti kai kurių didesnių baltymų grupių fluorescencijos ir fluorescencijos žadinimo spektrai.

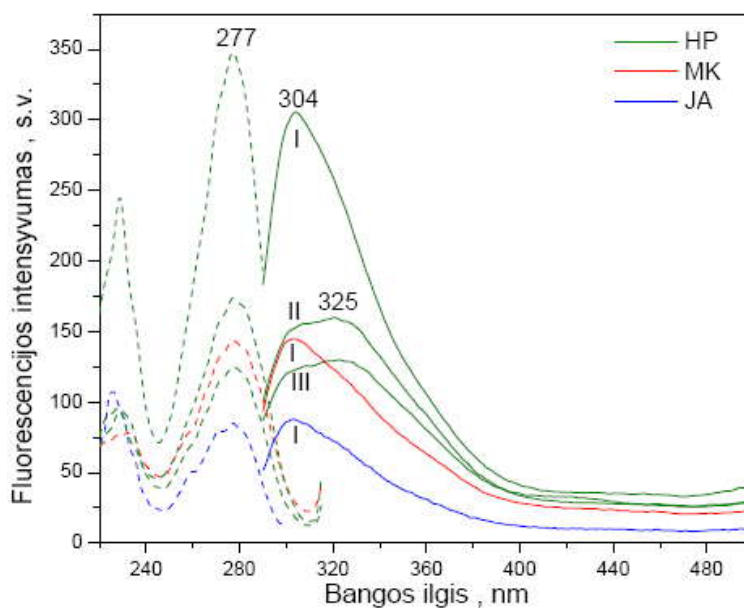
Kaip matyti iš 59 pav., pirmos baltymų grupės HP ir MK II bei III frakcijų fluorescencijos ir fluorescencijos žadinimo spektrai yra labai panašūs. Žadinimo spektro juosta ties 280 nm, o fluorescencijos spektro - ties 329 nm priskiriamos pagrindinio baltymų fluoroforo Trp liekanoms. Visiškai neutralioje aplinkoje Trp fluorescencijos juosta yra ties 310 nm, vandenyje – ties 350 nm. Anksčiau buvo minėta, kad Trp fluorescencijos juostos padėtis labai priklauso nuo jį supančios aplinkos poliškumo. Juostos padėtis ties 328 nm rodo, kad Trp liekanos yra lokalizuotos šios

grupės baltymų viduje ir baltymo struktūra apsaugo jas nuo tirpiklio įtakos, tačiau jų aplinkoje yra polinių grupių.



59 pav. HP ir MK pirmos baltymų grupės (160-155kDa), II bei III tirpiųjų frakcijų fluorescencijos žadinimo ($\lambda_{fl}=329$ nm) ir fluorescencijos ($\lambda_{zad}=270$ nm) spektrai.

Buvo užregistruoti trečios baltymų grupės visų audinių I frakcijų, o HP dar II ir III frakcijų spektrai (60 pav.).

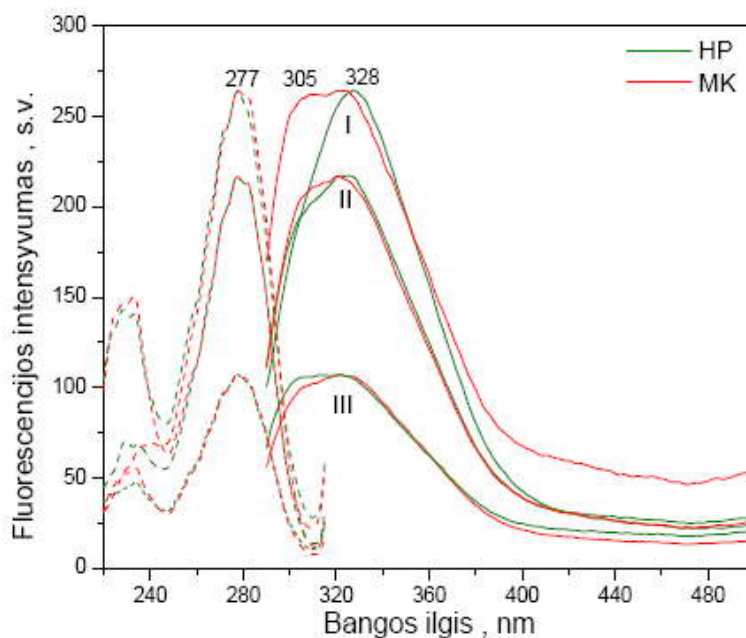


60 pav. Trečios baltymų grupės (66 kDa) HP, MK ir JA I frakcijos, HP II ir III frakcijų fluorescencijos žadinimo ($\lambda_{\text{fl}}=329$ nm) ir fluorescencijos ($\lambda_{\text{žad}}=270$ nm) spektrai.

Kaip matyti, trečios baltymų grupės skirtingų audinių ir skirtingų frakcijų spektrai yra nevienodi. Visų audinių I frakcijos spektrai yra labai specifiški. Juose nėra dominuojančio baltymų fluoroforo Trp fluorescencijos juostos 330 nm srityje. Ties 304 nm stebimą fluorescencijos juostą galima priskirti Tyr liekanoms. Trp sugeria ilgesnių bangų spinduliuotę nei Tyr, todėl paprastai Tyr sugertą energiją perduoda to paties baltymo Trp liekanoms, Tyr fluorescencija gesinama. Tyr liekanų fluorescencija stebima tik tuose baltymuose, kuriuose Trp nėra, arba jis yra lokalizuotas pakankamai toli nuo Tyr ir energijos pernaša nevyksta. Tada stebima abiejų fluoroforų (Tyr ir Trp) liekanų fluorescencija. Tokį atvejį turime HP II ir III frakcijose. Šių frakcijų fluorescencijos spektruose stebima plati juosta, sudaryta iš dviejų persiklojančių juostų su smailėmis ties 304 ir 325 nm, priskiriamų Tyr ir Trp.

Galima daryti išvadą, kad visų audinių I frakcijos trečią baltymų grupę sudaro baltymai, kurių sudėtyje nėra Trp, o HP II ir III frakcijų baltymuose šių fluoroforų liekanos išsidėsčiusios pakankamai toli vienos nuo kitų. Fluorescencinių tyrimų rezultatai rodo, kad savo aminorūgštine sudėtimi HP audinių II ir III frakcijų baltymai skiriasi nuo HP I frakcijos baltymų ir nuo pirmos grupės baltymų.

Ketvirtos baltymų grupės (57-52 kDa) HP, MK ir JA I, II, III tirpiųjų frakcijų fluorescencijos žadinimo ($\lambda_{fl}=329$ nm) ir fluorescencijos ($\lambda_{\text{žad}}=270$ nm) spektrai parodyti 61 pav.

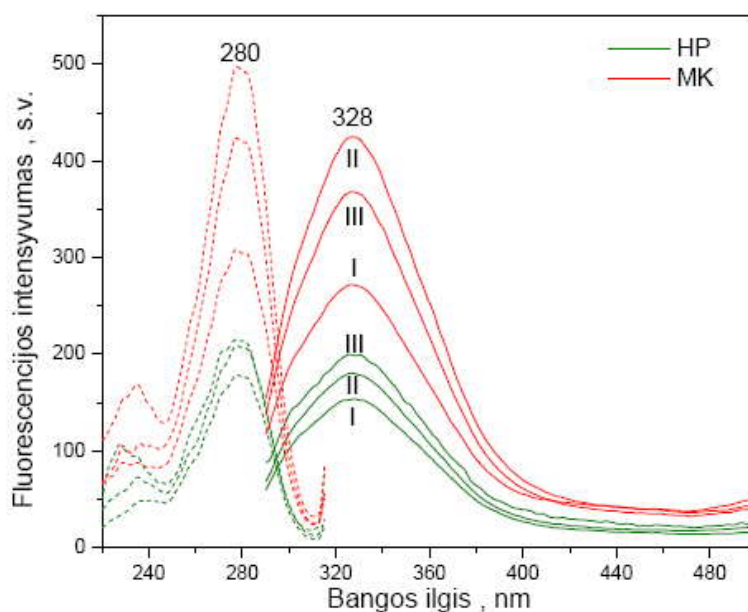


61 pav. Ketvirtos baltymų grupės (57-52 kDa) HP, MK ir JA I, II, III tirpiųjų frakcijų fluorescencijos žadinimo ($\lambda_{fl}=329$ nm) ir fluorescencijos ($\lambda_{\text{žad}}=270$ nm) spektrai.

Didžiausi skirtumai stebimi I frakcijos spektruose. HP fluorescencijos spektre stebima Trp liekanų juosta ties 328 nm, o MK – dvi persiklojančios Trp ir Tyr liekanų fluorescencijos juostos ties 328 ir 305 nm. HP ir MK II ir III frakcijų spektrai sudaryti iš persiklojančių Tyr ir Trp fluorescencijos juostų. MK II frakcijos spektre Tyr liekanų

fluorescencijos juosta yra nežymiai intensyvesnė už HP. III frakcijoje stebimas atvirkščias reiškinys.

Penktos baltymų grupės (45 kDa) visų širdies audinių, visų tirpių frakcijų spektrai labai panašūs (62 pav.). Visuose fluorescencijos spektruose stebima tik Trp fluorescencijos juosta ties 328 nm ir juosta ties 280 nm žadinimo spektre.



62 pav. Penktos baltymų grupės (45 kDa) HP, MK ir JA I, II, III tirpiųjų frakcijų fluorescencijos žadinimo ($\lambda_{fl}=329$ nm) ir fluorescencijos ($\lambda_{\text{žad}}=270$ nm) spektrai.

Visų audinių homogenatų tirpių frakcijų spektruose dominavo Trp ir Tyr liekanų fluorescencija, o regimojoje spektro srityje fluorescuojantys endogeniniai fluoroforai liko netirpiose frakcijose. Nors integruoti visų audinių tirpių frakcijų spektrai neturi žymesnių skirtumų, elektroforezės metodu labiausiai išryškintų atskirų baltymų grupių spektrai yra skirtingi. Nustatyta, kad net artimų masių baltymai turi skirtingus fluorescencijos spektrus.

Elektroforetiniai-fluorescenciniai tyrimai rodo, kad žmogaus širdies HP, MK ir JA audinių baltyminės sudėtys yra skirtingos, o fluorescencinės spektroskopijos metodas, taikant jį kartu su elektroforetiniais, gali būti sėkmingai naudojamas klasifikuojant baltymus.

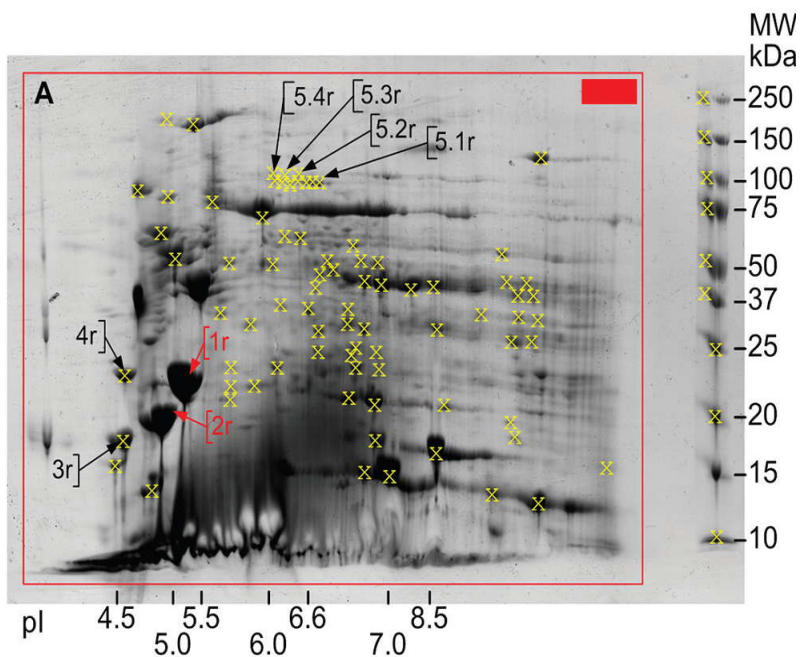
8.11. Miokardo ir Hiso pluošto baltymų dviejų kryptių elektroforezė

Baltymų pavyzdžių elektroforetinis frakcionavimas poliakrilamidiniame gelyje yra vienas iš svarbiausių analitinių darbo įrankių dirbant su baltymais. Naudojant šį metodą galima frakcionuoti ir palyginti sudėtingus baltymų mišinius, įvertinti valymo eigoje baltymų švarumą bei tokias fizines baltymų charakteristikas, kaip juos sudarančių subvienetų sąstatą, baltymų molekulinį svorį, krūvį bei izoelektrinį tašką.

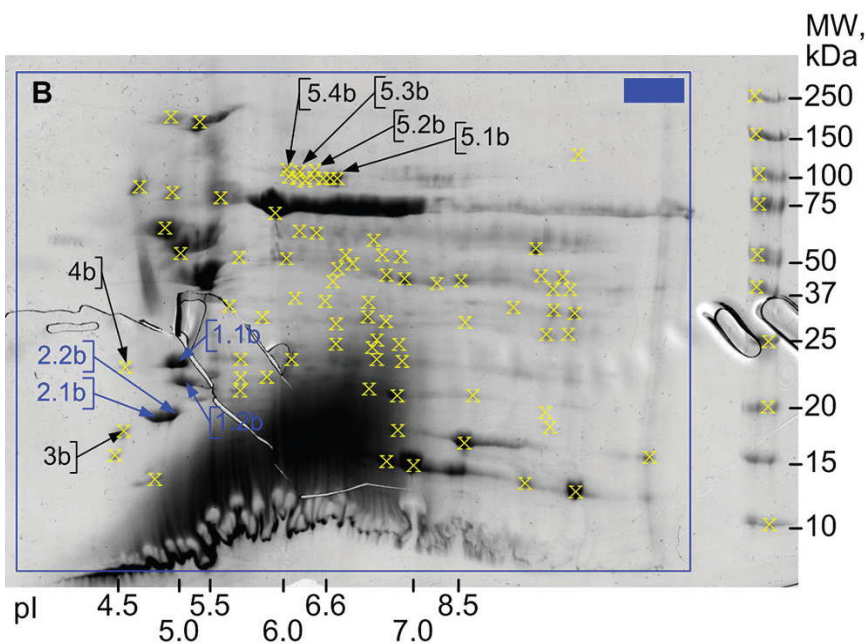
Baltymų kompleksų mišinių analizei bei mišinių valymui naudojamas IzoElektroFokusavimo (IEF) metodas, kai denatūruotų baltymų judėjimas yra sąlygojamas tirpių amfolitų sukuriamo pH gradiento poliakrilamidinio gelio tinkle. pH gradientas gelyje susiformuoja, kai amfolitai (mažos apkrautos organinės molekulės – daugybė amfoterinių buferių) veikiami elektros lauko migruoja gelyje iki savo izoelektrinio taško (pI), pastarajame sudarydami pastovią pH reikšmę turinčią sritį pasižyminčią stipriu buferiniu talpumu ir geru laidumu. Denatūruoti baltymai ištirpinti specialiuose tirpinimo buferiuose pH gradientą turinčiame gelyje migruoja iki baltymo pI atitinkančio taško ir pastarajame sustoja. Vienoje elektroforetinėje sistemoje pagal baltymų izoelektrinį tašką frakcionuoti baltymai vėliau gali būti skirstomi kitoje elektroforetinėje sistemoje pagal molekulinį svorį praplečiant baltymų pasiskirstymą antros krypties gelyje.

Šiuo metodu atliktas pirminis, bendras miokardo ir žmogaus širdies Hiso pluošto audinių baltyminės sudėties įvertinimas. Iš žmogaus

miokardo pavyko išskirti apie 200 polipeptidų (63 pav.). Bendras polipeptidų kiekis miokarde buvo didesnis nei Hiso pluošte (64 pav).



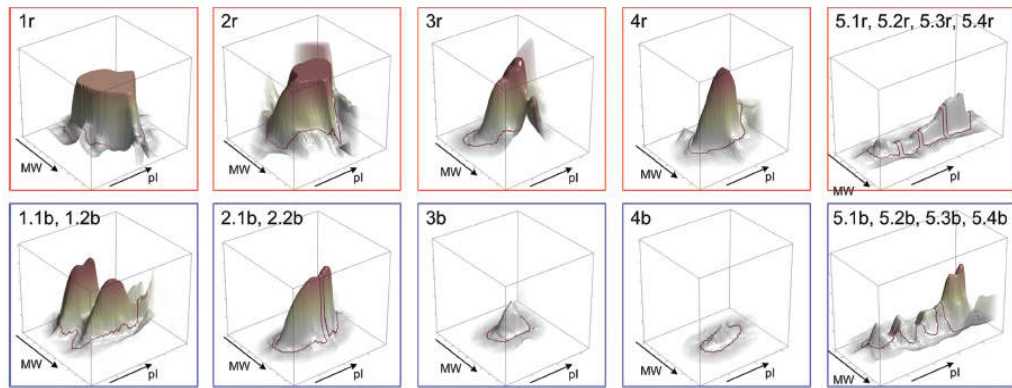
63 pav. Miokardo proteomo žemėlapis. Baltymai ir gelis dažyti Coomassie Brilliant Blue G-250 (Fermentas, Lietuva).



64 pav. Hiso pluošto proteomo žemėlapis. Baltymai ir gelis dažyti Coomassie Brilliant Blue G-250 (Fermentas, Lietuva).

Detalesniam įvertinimui pasirinktos 5 baltymų grupės, pažymėtos atitinkamai 1, 2, 3, 4, 5.

Skaitmeniniu būdu sukurti pasirinktų baltymų grupių 3D vaizdai (65 pav.).



65 pav. Pasirinktų baltymų grupių 3D vaizdas. 1r, 2r, 3r, 4r, 5.1r, 5.2r, 5.3r ir 5.4r – miokardo baltymų grupės. 1.1b, 1.2b, 2.1b, 2.2b, 3b, 4b, 5.1b, 5.2b, 5.3b ir 5.4b – Hiso pluošto baltymų grupės. MW – molekulinė masė, pI – izoelektrinis taškas.

Baltymų, pažymėtų 1, 2, 3, ir 4 didesnis kiekis buvo rastas miokarde, o pažymėtų 5 – Hiso pluošte. 1 ir 2 pažymėtos baltymų grupės Hiso pluošte, skirtingai nuo miokardo, yra ne homogeniškos, o sudarytos iš dviejų baltymų grupių. Akivaizdūs pasirinktų baltymų grupių raiškos lygių skirtumai tarp tirtų audinių.

Kaip matyti 3D pasirinktų baltymų grupių vaizduose, jau pirminė miokardo ir Hiso pluošto baltymų analizė parodė, kad šie audiniai skiriasi savo baltymine sudėtimi. Tikslinga tęsti proteominę šių audinių analizę siekiant identifikuoti baltymus, kurių raiškos lygis kinta miokarde ir žmogaus širdies laidžiojoje sistemoje [40].

9. REZULTATŲ APTARIMAS

Širdies laidžioji sistema, kaip vieninga anatomicinė struktūra, aprašyta praėjusio šimtmečio pradžioje. Tada L.Aschoff ir J.G.Monckeberg nurodė pagrindinius morfologinius kriterijus, būtinus atpažinti širdies laidžiąją sistemą. Žmogaus širdies laidžioji sistema pradėta tirti makroskopiniu ir histologiniu metodais. Makroskopinis tyrimas yra paprastesnis, užima mažiau laiko ir kaštų, todėl daugelis širdies laidžiosios sistemos tyrinėtojų naudojo anatomicinį preparavimo metodą (M. Holl 1911 m., E.W. Walls 1945 m., M. Lev 1951 m.) ir įvairias modifikacijas (Sitnikov V. A. 1972 m., Umovist M.I. 1973 m. Siniov A.F., Krimski L.D. 1985m.). Deja, makroskopiniai tyrimai ne visada būdavo sėkmingi. K. Reemtsma 1958 m. preparuodamas 11 normaliai susiformavusios širdies preparatų tik 3 rado atrioventrikulinį mazgą ir Hiso pluoštą. M.J. Davies 1971 m. po nesėkmingo bandymo paskelbė, kad anatomicškai išpreparuoti širdies laidžiąją sistemą neįmanoma ir perėjo prie histologinio tyrimo, kaip ir daugelis kitų (S.Bharati 1978m., J. Windran 1951m.; R.C.Truxex 1958m.). Daugumai autoritetų atsisakius anatomicinio širdies laidžiosios sistemos tyrimo, šis preparavimo metodas buvo nepelnytai užmirštas. Šiuo metu širdies laidžiosios sistemos aprašymai pagrįsti histologinių pjūvių tyrimu ir rekonstruotomis topografinėmis schemomis. Patikrinti šių schemų tikslumą neįmanoma, nes jas kuriant sunaikinamas anatomicinis širdies preparatas. Audinių blokai histologiniam tyrimui imami iš tų širdies sričių, kuriose yra tipiškai išsidėsčiusi širdies laidžioji sistema, arba kur tyrėjas tikisi ją rasti. Jei paimtuose blokuose laidžiosios sistemos rasti nepavyksta, belieka serijiniais pjūviais tirti visą širdį, t.y. paruošti tūkstančius histologinių preparatų ir juos iširti. Makroskopiam laidžiosios sistemos preparavimui reikia įgūdžių, tačiau šis metodas turi nemažai privalumų. Makroskopinio preparavimo metu galima įvertinti visos skilvelinės ŠLS dalies būklę, išsidėstymą ir esant patologijos įtarimui, paimti audinio fragmentus histologiniam tyrimui, t.y. tokiam

tyrimui užtenka paruošti tik kelis histologinius preparatus, tuo metu kai tiriant širdies laidžiąją sistemą histologiniu būdu, būtina visą tiriamą audinio bloką supjaustyti serijiniais pjūviais, t.y. paruošti kelis tūkstančius preparatų ir juos ištirti. Dėl šių priežasčių geriausiai taikyti makroskopinio preparavimo metodą histologiškai tiriant tik tam tikras širdies laidžiosios sistemos sritis, taip sutaupant laiką ir išlaidas. Makroskopinio preparavimo metodiką galima modifikuoti, atsižvelgiant į tyrimo tikslus ir poreikius. Pavyzdžiui, įtariant operacinį Hiso pluošto pažeidimą galima netirti SA ar AV mazgų, distalinių Hiso pluošto šakų sričių. Tokia metodika labai palengvina ŠLS tyrimus, tačiau yra tinkama įvertinti tik normaliai suformuotos širdies laidžiosios sistemos būklę. Esant įgimtoms širdies ydoms ar širdies laidžiosios sistemos anomalijoms preparuoti ŠLS yra labai sudėtinga. Nesant tinkamų anatominių ŠLS išsidėstymo žymenų, kurie naudojami normaliai suformuotose širdyse su tipiška išsidėsčiusia laidžiąja sistema, makroskopinis preparavimas beveik neįmanomas.

Makroskopinė preparavimo metodika taip pat leidžia gauti švarų, cheminėmis medžiagomis nepaveiktą ŠLS audinį. Be abejo, ŠLS audinį galima gauti iš parafininio bloko, tačiau toks mėginys jau bus fiksuotas, įlietas į parafiną, vėliau deparafinizuotas. Audinio apdorojimas gali turėti įtakos tolimesnių tyrimų rezultatams. Be to, makroskopinio preparavimo metu paprastai pavyksta be aplinkinių audinių fragmentų paimti Hiso pluoštą ir proksimalinę dešinės šakos dalį. Gautas švarus, be aplinkinių audinių ir chemiškai nepaveiktas Hiso pluošto audinys, pirmą kartą buvo ištirtas rentgenoelektroniniu mikroskopu (SEM/EDX metodu), pirmą kartą atlikta FT-IR spektroskopinė analizė ir kiti originalūs tyrimai. Pirmą kartą palyginti Hiso pluošto nefiksuotų ir formaline fiksuotų audinių mėginių tyrimų duomenys, siekiant rasti stabilius morfologinius audinių skirtumus, neišnykstančius fiksacijos buferiniame formalino tirpale metu.

Bioelektrinio impulso atsiradimui ir plitimui reikšmingi kalio, kalcio, natrio, chloro jonai, jų koncentracijos ir pasiskirstymas, todėl buvo atlikti

rentgenoelektroniniai tyrimai SEM/EDX (skenuojantis elektroninis mikroskopas/energiją išskleidanti rentgeno spektroskopija) metodu leidžiantys nustatyti tiriamos medžiagos elementinę sudėtį. Tirtuose Hiso pluošto ir skilvelių miokardo mėginiuose nustatyti fosforo, chloro, kalcio, sieros, silicio, natrio ir kalio jonų kiekiai yra vienodi. Matyt, didesnis bioimpulso sklidimo greitis Hiso pluoštu nėra susijęs su jonų koncentracijų skirtumais.

Furjė transformacijų infraraudonosios spektroskopijos (FT-IR) metodu buvo palyginti skirtingais būdais paruošti audinių mėginiai. Skirtumų tarp fiksuotų ir džiovintų Hiso pluošto ir miokardo mėginių nerasta. Skirtumai pastebėti tiriant nefiksuotus ir nedžiovintus Hiso pluošto ir miokardo mėginius. Fiksavimas buferiniame 10% formalino tirpale ir džiovinimas neturėtų paveikti stabilių, struktūrinių baltymų, todėl labiausiai tikėtina, kad rasti skirtumai tarp nevienodai paruoštų širdies audinių yra susiję su citoplazmoje esančių laisvų molekulių pokyčiais. Tokią prielaidą netiesiogiai patvirtina gauti rezultatai, rodantys, kad miokarde yra didesnis laisvų arba neigiamai įelektrintų (α -asparagino ir α -glutamo) rūgščių kiekis. Biologinių audinių FT-IR sugerties spektrai yra aminorūgščių, priklausančių baltymams ir peptidams, bei laisvų aminorūgščių spektrų suma, todėl Hiso pluošto ir miokardo mėginių FT-IR sugerties spektrų juostas priskirti konkrečių molekulinų grupių virpesiams ir įvertinti skirtumų priežastis nėra įmanoma. Negalima vienareikšmiškai teigti, kad rasti skirtumai susiję tik su laisvomis amino rūgštimis. Furjė transformacijų infraraudonosios spektroskopijos (FT-IR) metodu rasti skirtumai tarp miokardo ir Hiso pluošto audinius sudarančių biomolekulių leidžia patikimai atskirti tirtus audinius, tačiau šis metodas gali būti naudojamas tiriant tik nedidelius širdies audinio kiekius, todėl neturi didesnės praktinės reikšmės kaip vaizdinimo būdas. Be to, šis spektroskopinis tyrimas yra pakankamai sudėtingas.

Morfologinius skirtumus tarp žmogaus širdies laidžiosios sistemos Hiso pluošto ir miokardo taip pat patvirtino ir UV sugerties tyrimai. Šie tyrimai

parodė skirtingus aromatinių amino rūgščių kiekius tirtuose širdies audiniuose. Trp kiekis Hiso pluošto mėginiuose buvo 4 kartus, o Tyr 2,5 karto didesnis negu MK mėginiuose. UV sugerties spektriniam tyrimams naudoti neutraliame buferiniame formaline fiksuoti ir į parafiną įlieti audiniai, todėl tikėtina, kad aromatinės amino rūgštys, lėmusios UV sugerties spektrų skirtumus yra stabilių, struktūrinių baltymų sudėtyje. Nevienodi šių aromatinių aminorūgščių kiekiai HP ir MK audiniuose gali būti susiję su skirtinga šių audinių baltymine struktūra, nuo kurios priklauso jų fiziologinės savybės. Skirtumai pastebėti trumpųjų UV-B bangų srityje (280 nm), o šio bangos ilgio spinduliuotė yra potencialiai pavojinga biologiniams audiniams, gali sukelti nudegimo reakciją, todėl praktinis šio metodo taikymas būtų sudėtingas. Formalino tirpale fiksuotuose audiniuose nustatytus skirtumus, matyt, tikėtina rasti ir kitais, paprastesniais metodais.

Histocheminiai dažymai neišryškino didesnių Trp ir Tyr koncentracijų ŠLS. Kaip parodė UV sugerties spektrai, kasoje aromatinių amino rūgščių molekulės yra labiau polinėje aplinkoje, prieinamos vandeniui. Hiso pluošte esantį Trp supa mažesnio poliškumo aplinka, sąlygojanti spektro poslinkį į trumpųjų bangų pusę, t.y. molekulės mažiau prieinamos vandeniui. Nors negalima tiksliai nustatyti priežasčių, kodėl histocheminiai dažymai neparodė didesnio aromatinių amino rūgščių kiekio širdies audiniuose, galima įtarti, kad tai lėmė skirtingas šių amino rūgščių išsidėstymas baltymuose ir skirtinga jas supanti aplinka.

Skirtumus tarp žmogaus širdies laidžiosios sistemos Hiso pluošto ir miokardo taip pat parodė ir savitosios fluorescencijos ir jos žadinimo spektroskopiniai tyrimai. Žadinant aromatinių amino rūgščių sugerties srityje (250-295 nm) pagal fluorescencijos intensyvumą ties 340 nm ir 450 nm santykius galima vienareikšmiškai atskirti HP ir MK audinius. Tačiau tokį atskyrimo metodą, kaip ir UV sugerties spektroskopiją, būtų sudėtinga taikyti *in vivo* ar rutininiams tyrimams, nes fluorescencijos žadinimui naudojama tolimosios UV-C (280-100 nm) srities spinduliuotė,

kuri yra žalinga biologiniams audiniams. Aromatinių amino rūgščių sugerties srityje sužadinama plati širdies audinių savitosios fluorescencijos juosta mėlynojoje spektro srityje gali būti sąlygota keleto kitų endogeninių fluoroforų (kolageno, elastino, nikotinamidadeninukleotido (NADH), flavinų, porfirinų, lipopigmentų ir kitų glikozaminoglikanų), sužadinamų ne tik tolimojoje UV-C (280-100 nm.) srityje, bet ir ilgesnių bangų spinduliuote. Kiekvienas fluoroforas turi savitus fluorescencijos ir jos žadinimo spektrus, jų spektrų registravimas plačiame bangų ilgių intervale leidžia išskirti atskiras juostas ir jas priskirti skirtingiems fluoroforams. Šiame darbe fluorescencija buvo žadinama plačioje spektro srityje nuo 250 nm iki 480 nm. Tokia plati žadinimo sritis sudarė galimybes selektyviai žadinti atskirus fluoroforus, surasti žadinančios spinduliuotės bangos ilgus, kuriuos būtų galima efektyviausiai panaudoti ŠLS vaizdinimui [94].

Širdies mėginių fluorescencijos ir jos žadinimo spektrų analizė leido išskirti kelis endogeninius fluoroforus su persiklojančiomis sugerties ir fluorescencijos juostomis. Rasti trys pagrindiniai fluoroforai su žadinimo/fluorescencijos spektrinėmis juostomis ties: 280 /340 nm triptofanas, 330 / 390 nm kolagenas ir 385 / 460 nm elastinas. Skirtingi šių fluoroforų kiekiai MK, HP ir JA nulemia jų fluorescencijos spektrų skirtumus UV ir mėlynojoje spektro srityse. Labai silpną MK mėlynąją fluorescenciją galima paaiškinti žymiai mažesniais kolageno ir elastino kiekiais MK, palyginus su HP ir JA. Ypač gerai šių fluoroforų spektrų juostos išsiskiria širdies homogenatų spektruose.

Tokiais atvejais, kai endokardo jungiamojo audinio intensyvi mėlyna fluorescencija apsunkina Hiso pluošto šakų išskyrimą, fluorescenciją reikia žadinti dviem skirtingais bangų ilgiais: 330 nm (kolageno sugerties juostoje) ir 385 nm (elastino sugerties juostoje). HP ir JA audiniai skiriasi elastino fluorescencijos juostos ties 460 nm intensyvumu. JA žadinant 330 nm ir 385 nm spinduliuote šios juostos intensyvumas nekinta, o HP žadinant ties 385 nm - sumažėja du kartus. Naudojantis šiais skirtumais

galima sukurti žmogaus ŠLS vaizdinimo sistemos modelį. Pagal šią vaizdinimo sistemą reikėtų keliuose endokardo taškuose registruoti dviem skirtingais bangų ilgiais sužadintus spektrus ir grafiškai atvaizduoti laidžiosios sistemo eigą. Tokiai vaizdinimo sistemai reikalinga gan sudėtinga aparatūra, o didesnės tarpskilvelinės pertvaros paviršiaus dalies taškinis skenavimas užimtų daug laiko.

Visų audinių homogenatų tirpių frakcijų spektruose dominavo Trp ir Tyr liekanų fluorescencija, o regimojoje spektro srityje fluorescuojantys endogeniniai fluoroforai liko netirpiose frakcijose. Nors visų audinių tirpių frakcijų spektrai neturi žymesnių skirtumų, elektroforezės metodu labiausiai išryškintų atskirų baltymų grupių spektrai yra skirtingi. Net artimų masių baltymai turi skirtingus fluorescencijos spektrus, tai reiškia, kad šie tirpiose frakcijose išskirti ŠLS ir MK baltymai yra skirtingų struktūrų.

Elektroforezės būdu rasta baltymų grupė (~26 kDa) aptinkama tik HP II ir III frakcijose. Pirmoje tirpioje frakcijoje, į kurią patenka mitochondrinė frakcija, citozolis ir kiti vandenyje tirpūs baltymai, ji nepastebėta. Tokiu būdu galima daryti išvadą, kad šie baltymai priklauso vandenyje netirpių membranų baltymų grupei, t.y. stabilūs struktūriniai baltymai. Rasta baltymų grupė nepriklauso žinomiems plyšinių jungčių koneksinams, kurių molekulinės masės yra 40 kDa, 43 kDa ir 45 kDa. Taip pat kitokios yra ir žinomų HCN baltymų molekulinės masės (nuo 61 kDa iki 120 kDa). Todėl tiksliai nustatyti, kokiems baltymams priklauso Hiso pluošte rasta 26 kDa molekulinės masės baltymų grupė, šiuo metu negalima.

Pirmieji dviejų krypčių elektroforezės tyrimai taip pat parodė aiškius baltyminius skirtumus tarp žmogaus širdies laidžiosios sistemos ir miokardo. Bendras išskirtas polipeptidų kiekis buvo didesnis miokarde negu Hiso pluošte. Atskiros tirtos baltymų grupės ŠLS, skirtingai nuo miokardo, yra ne homogeniškos, o sudarytos iš dviejų baltymų grupių.

Atlikti tyrimai parodė, kad žmogaus širdies laidžiosios sistemos ir miokardo baltyminės sudėtys yra skirtingos. Kokie baltymai yra specifiški

žmogaus ŠLS, kur jie išsidėstę ir kokia jų fiziologinė reikšmė bioimpulso plitimui šiuo metu negalima pasakyti. Atlikti pirmieji vaizdinimo eksperimentai parodė, kad optiniais metodais galima išryškinti ŠLS kitų širdies audinių fone. Tačiau, šiuo metu sukurtos vaizdinimo metodikos yra techniškai gana sudėtingos, todėl sunkiai pritaikomos kasdieninėje praktikoje. Detalesni proteominiai tyrimai leistų identifikuoti ir iširti žmogaus ŠLS specifiską baltymų grupę, nustatyti šios baltymų grupės savybes ir lokalizaciją ląstelėse. Parinkus šios grupės baltymams tinkamą dažiklį arba juos pažymėjus fluorescuojančiais žymekliais, būtų galima vaizdinti širdies laidžiąją sistemą. Tokia vaizdinimo sistema būtų daug paprastesnė ir lengviau naudojama.

10. IŠVADOS

1. Paruošta žmogaus širdies laidžiosios sistemos preparavimo metodika leidžianti gauti širdies laidžiosios sistemos audinį be kitų širdies audinių, ir pateikti audinių mėginius spektroskopiniams ir proteominiams tyrimams.

2. Žmogaus širdies laidžiosios sistemos ir kitų širdies audinių palyginamieji spektroskopiniai tyrimai parodė:

a. Rentgenoelektroniniu mikroskopu skirtumų tarp žmogaus HP ir MK nerasta. Fosforo, kalcio, chloro, sieros, silicio, natrio ir kalio kiekiai HP ir MK audiniuose yra vienodi.

b. Infraraudonosios sugerties spektruose yra aiškūs skirtumai tarp HP ir MK audinius sudarančių biomolekulių. FT-IR metodu atlikti tyrimai parodė, kad MK audiniuose yra didesnis laisvų arba neigiamai įelektrintų amino rūgščių kiekis.

c. UV sugerties tyrimai parodė aiškius skirtumus tarp ŠLS ir MK. Šiuos skirtumus sąlygoja nevienodi aromatinių amino rūgščių kiekiai HP ir MK.

d. Fluorescencijos ir jos žadinimo spektrų analizė parodė, kad širdies audiniuose yra trys endogeniniai fluoroforai (triptofanas, elastinas ir kolagenas) su persiklojančiomis sugerties ir fluorescencijos juostomis. Skirtingi šių fluoroforų kiekiai MK, HP ir JA nulemia jų fluorescencijos spektrų skirtumus UV ir mėlynojoje spektro srityje.

e. Hiso pluoštą ir jo šakas galima atskirti nuo jungiamojo audinio fluorescencinės spektroskopijos metodu žadinant savitąją šių audinių fluorescenciją dviejų skirtingų bangų ilgių spinduliuote: 330 nm (kolageno sugerties juostoje) bei 380 nm (elastino sugerties juostoje) ir stebint fluorescencijos pokyčius mėlynoje spektro srityje ties 460 nm. Jungiamojo audinio atveju žadinant abiejose spektro srityse fluorescencijos intensyvumas nekinta, o Hiso pluošto atveju žadinant elastino sugerties juostoje - sumažėja du kartus.

f. Širdies audinių homogenatų fluorescencijos spektrų analizė parodė, kad fluorescencija mėlynojoje spektro srityje priklauso netirpioms struktūroms. Ji stebima tik netirpių frakcijų spektruose.

3. Hiso pluošto ir skilvelių miokardo baltyminė sudėtis skirtinga. Baltymų elektroforezės metodu rasta baltymų grupė (~26 kDa) aptinkama tik HP II ir III frakcijose.

4. Rasti fluorescenciniai ir baltyminės sudėties skirtumai tarp žmogaus HP ir MK leidžia manyti, kad bioelektrinio impulso sklidimo greičių skirtumus sąlygoja ne tik ląstelių išsidėstymas, skersmuo, bet ir specifiniai morfologiniai skirtumai. Pasinaudojus nustatytais morfologiniais skirtumais galima sukurti žmogaus širdies laidžiosios sistemos vaizdinimo metodiką, kuri leistų nustatyti ŠLS anatomines ypatybes.

11. PUBLIKACIJOS

PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS

Straipsniai mokslinės informacijos instituto pagrindinių leidinių sąrašė (ISI)

1. Venius J., Labeikytė D., Žurauskas E., Strazdaitė V., Bagdonas S., Rotomskis R. Investigation of human heart tissue extracts by spectroscopic methods. *Biologija*. 2006. Nr.3. p.53-58. Lietuvos mokslų akademija. ISSN:1392-0146
2. Matuzevičius D., Žurauskas E., Navakauskienė R, Navakauskas D. Improved proteomic characterization of human myocardium and heart conduction system by computational methods. *Biologija*. 2008. Vol.54.No.4. P.283-289. doi:10.2478/v10054-008-0058-9. Lietuvos mokslų akademija. ISSN:1392-0146
3. Bagdonas S., Zurauskas E., Streckyte G., Rotomskis R. Spectroscopic studies of the human heart conduction system *ex vivo*: Implication for optical visualization. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 92(2008) .P.128-134. doi:10.1016/j.jphotobiol.2008.05.010. ISSN 1011-1344

Straipsniai kituose recenzuojamuose mokslo leidiniuose

4. Žurauskas E., Jasulaitis A. Anatomic study of the conduction system of the heart. *Acta Medica Lituanica*. 1997.4. P.149-151. ISSN 1392-0138
5. Žurauskienė E., Žurauskas E., Streckytė G., Bagdonas S., Žvaigždinas K., Rotomskis R. Premises of visualisation of the conduction system of heart: spectroscopic investigations. *Lithuanian Journal of Physics*. 2001, T.41, nr.4-6, p.505-508. ISSN 1392-1932

6. Žurauskas E., Bagdonas S., Bandzaitytė L., Streckytė G., Rotomskis R. Visualisation of the conduction system of heart by fluorescence spectroscopy. Lithuanian Journal of Physics, Vol.44, No.1, pp. 35-40(2004) ISSN 1392-1932
7. Venius J., Žurauskas E., Bagdonas S., Žurauskienė E., Rotomskis R. Optical visualization of the heart conduction system. Acta bio-optica et informatica medica. Inżynieria Biomedyczna. ISSN 1234-5563. 3-4/2005, vol. 12. p.6-9.

Pranešimai konferencijose

1. Gasperavičienė G., Žurauskas E., Nikitiniene V. Širdies laidžiosios sistemos tyrimas FT-IR spektroskopijos metodu. 34-oji Lietuvos nacionalinė fizikos konferencija, 2001 m. birželio 14-16 d. Vilnius. Programa ir pranešimų tezės. P.148.
2. Bagdonas S., Žurauskas E., Streckytė G., Žvaigždinas K., Žurauskienė E. Širdies laidžiosios sistemos vizualizacijos prielaidos : spektroskopiniai tyrimai. 34-oji Lietuvos nacionalinė fizikos konferencija, 2001 m. birželio 14-16 d. Vilnius. Programa ir pranešimų tezės. P.146.
3. Bagdonas S., Žurauskas E., Bandzaitytė L., Streckytė G., Rotomskis R. Hiso pluošto ir jo šakų vaizdinimas nuostoviosios fluorescencinės spektroskopijos metodu. 35-oji jubiliejinė Lietuvos nacionalinė fizikos konferencija : programa ir pranešimų tezės. Vilnius 2003 m. birželio 12-14 d. P.161.
4. Zurauskas E., Bandzaitytė L., Bagdonas S., Zurauskienė E., Rotomskis R. Visualisation of the conduction system of heart by fluorescence spectroscopy. 10th Congress of the European Society for Photobiology. September 6-11, 2003. General Hospital Vienna, Austria. Programme and Book of Abstracts. P.128.

5. Venius J., Bagdonas S., Žurauskas E., Rotomskis R. Optinė biopsija naudojant fluorescencinę spektroskopiją. Biomedicininė inžinerija: tarptautinės konferencijos pranešimų medžiaga, Kauno technologijos universitetas, 2004 m. spalio 28-29 d. Kaunas : Technologija, 2004. p. 221-226. (2004) (P000 - Fiziniai mokslai, B000 - Biomedicinos mokslai)
6. Strazdaitė V., Venius J., Žurauskas E., Bagdonas S., Rotomskis R. Žmogaus širdies audinių baltyminės sudėties tyrimai elektroforezės ir fluorescencinės spektroskopijos metodais. Bioinžinerija ir bioinformatika: 9-osios Lietuvos jaunųjų mokslininkų konferencijos "Mokslas-Lietuvos ateitis" medžiaga. Vilniaus Gedimino technikos universitetas. 2006 m. balandžio 6-7 d. Vilnius.
7. Žurauskas E. Širdies laidžioji sistema ir jos vaizdinimas fluorescenciniais metodais. Tarptautinė konferencija : Nauji metodai ir naujos technologijos biomedicinoje. 2008 m. gegužės 22-24. Vilnius.

Mokomoji knyga:

1. Fluorescencinis vaizdinimas biomedicinoje: mokomoji knyga, Vilniaus universiteto Onkologijos institutas. R.Rotomskis, E.Žurauskas, E.Žurauskienė, S.Bagdonas, V.Žalgevičienė. p.222. Vilnius 2008. ISBN 978-99862765-52-12.

PUBLIKACIJŲ IR PRANEŠIMŲ KONFERENCIJOSE NE
DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS

1. Jurevičius B., Žurauskas E. Įgimtų širdies ydų morfologinių komponentų bei jų derinių dažnumas. *Medicina*. 1995. t.31. No. 2. P. 92-95.
2. Žurauskas E., Jasulaitis A. Plaučių biopsijos reikšmė esant įgimtoms širdies ydoms. *Medicina*. 1996. t.32. No. 3.P.21-23.
3. Turkevičius G., Valaika A., Žurauskas E., Žemaitis K. Vidinės užkrūtinkaulinės arterijos išdalinimas lazeriu. III Lietuvos krūtinės ir širdies chirurgų draugijos suvažiavimas. Kaunas. 1996.09.20. *Medicina*. 1996. t.32, pr.8. P.107-108.
4. Žurauskas E., Jasulaitis A. Pleksogeninės plaučių arteriopatijos morfologija. Lietuvos patologų draugijos X suvažiavimas. Kaunas. 1996. Stendinis pranešimas.
5. Turkevičius G., Valaika A., Žurauskas E., Žemaitis K. Mobilisation of arteria thoracica interna with Nd:YAG laser. Cardiac interventions: The 3rd Baltic Sea Conference, June 1-3. 1997. Vilnius. Lithuania. Vilnius, p.27.
6. Stasiūnienė J., Jasulaitis A., Grabauskienė V., Urbonienė D., Žurauskas E., Žebrauskas P. State of pulmonary arteries in children with congenital atrioventricular communication. Cardiac intervevtions: The 3rd Baltic sea conference, June 1-3. 1997. Vilnius. Lithuania. Vilnius, p.61.
7. Jasulaitis A., Žurauskas E., Stasiūnienė J., Grabauskienė V., Urbonienė D., Žebrauskas P. Congenital heart defects and pulmonary hypertension. The 3rd Baltic Sea Conference “Cardiac Interventions”, June 1-3, 1997. Vilnius, Lithuania. Book of abstracts. P.62.
8. Sipavičius R., Gražienė V., Laurinavičius A., Žurauskas E., Žilinskas V., Petrauskaitė R., Sirvydis V. Comaparison of low

- potassium Euro-Collins solution and standart Euro-Collins solution in a canine single – lung transplantation model. The 12th meeting of the European Association for Cardiothoracic Surgery, 20-23 September, 1998, Brussels, Belgium. Abstracts, P.366.
9. Barysas D., Rasimavičius G., Žurauskas E., Juodžbaliene E., Žemaitis K., Sirvydis V. Mirties mechanizmo įtaka persodintam hipovoleminio asistolinio donoro plaučiui. *Medicina*. 1999. T.35. Pr.7. P.169-173.
 10. Turkevičius G., Žurauskas E., Žemaitis K. Lipnių plėvelių panaudojimas eksperimente kraujavimui iš širdies sustabdyti. *Lithuanian Journal of Cardiology*. 1999; 6(3), P.636-638.
 11. Ignatavičiūtė Ž.M., Storpirstytė A., Kosinskas E., Žurauskas E., Utkus A. Idiopatinė paveldima restrikcinė kardiomiopatija. *Lithuanian Journal of Cardiology*. 1999; 6(3), P.685-688.
 12. Lankutienė L., Dranenkienė A., Žurauskas E., Karalius R., Sirvydis V. Liekamoji plaučių arterijos hipertenzija po įgimtų širdies ydų chirurginio gydymo. VI Lietuvos pediatrų draugijos suvažiavimas. Šiauliai, 1999 m. birželio 10-11d. P.80.
 13. Turkevičius G., Grebelis A., Žurauskas E., Žemaitis K. Širdies, plaučių ir kraujagyslių defektų padengimas hemostazinėmis plėvelėmis eksperimente. *Medicina*. 2000. t.36. Nr.11-12. P.1385-1388.
 14. Turkevičius G., Valaika A., Žurauskas E., Žemaitis K. Torakotomija Rubino lazeriu. *Medicina*. 2001, T.37, nr.11, p. 1221-1224.
 15. Sipavičius R, Gražienė V, Žurauskas E, Šalkus G, Laurinavičius A, Sirvydis V. Sumažinto kalio kiekio Euro-Collinso ir standartinio Euro-Collinso tirpalų palyginimas šuns kairiojo plaučio transplantacijos modelyje. *Medicinos teorija ir praktika* 2003, 33: 14-18.
 16. Jankauskienė S., Žurauskas E., Laurinavičienė A., Vaišnyte B., Barkauskas E., Kučinskiene Z., Laurinavičius A. *Chlamydia*

- pneumoniae* nustatymas aterosklerozės pažeistame audinyje ir lėtinėmis aterosklerozės sukeltomis ligomis sergančių ligonių serologines būklės tyrimas. *Laboratorine medicina*. 2003, Nr. 4(20), p. 21-26.
17. Turkevičius G., Žurauskas E., Žemaitis K. Nusileidžiančios aortos sienelės sutvirtinimas perikardu (eksperimentinis tyrimas). *Medicina*, 2004, t.40, pr.1, psl.84-86.
 18. Rucinskas K., Miniauskas S., Zurauskas E., Sirvydis V. The giant symptomatic solitary fibrous tumor in the thoracic cavity. 53rd International Congress of the European Society for Cardiovascular Surgery. June 2-5, 2004, Ljublijana, Slovenia. *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery*, 2004, vol.3 Suppl. 1. Abstracts. p. S62.
 19. Sipavicius R., Graziene V., Zurauskas E., Laurinavicius A. Assessment of preservation quality of low potassium euro-collins solution and standard euro-collins solution in a canine single-lung transplant model. 53rd International Congress of the European Society for Cardiovascular Surgery. June 2-5, 2004, Ljublijana, Slovenia. *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery*, 2004, vol.3 Suppl. 1. Abstracts. p. S73.
 20. Jurgaitienė R., Paužienė N., Aželis V., Žurauskas E. Morphometric study of age-related changes in the human intracardiac ganglia. *Medicina*. 2004, t. 40, nr. 6, p. 574-581. (2004) (B000 - Biomedicinos mokslai)
 21. Laucevičius A., Sirvydis V., Čelutkienė J., Marcinkutė A., Žurauskas E., Geboes K., Malickaitė R., Čibiras S., Jurkuvėnas V., Bubulis R., Balčiūnas M., Kibarskis A., Valavičienė A., Skripkauskienė I. Heart failure in a young woman due to toxoplasmic myocarditis. *Seminars in cardiology: an official journal of Estonian, Latvian and Lithuanian Societies of Cardiology, Baltic Atherosclerosis Society and Lithuanian Heart Association/Lietuvos*

- širdies asociacija. Lietuvos kardiologų draugija 2004, vol. 10, no. 4, p. 217-224. (2004) (B000 - Biomedicinos mokslai)
22. Jankauskienė S., Kučinskienė Z., Žurauskas E., Bogušienė I., Laurinavičienė A., Laurinavičius A. Direct detection of *Chlamydia pneumoniae* and cytomegalovirus in atherosclerotic tissue by immunohistochemistry and evaluation of serological response to these infections. *Acta medica Lituanica/Lietuvos mokslų akademija* 2004, t. 11, no 4, p. 6-13. (2004) (B000 - Biomedicinos mokslai)
23. Jankauskienė S., Žurauskas E., Laurinavičienė A., Vaišnytė B., Barkauskas E., Kučinskienė Z., Laurinavičius A. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic tissue and investigation of serological status in patients with chronic atherosclerosis. *Atherosclerosis. Supplement* 2004, vol. 5, no. 1, p. 125. (2004) (B000 - Biomedicinos mokslai)
24. Sirvydis V., Grebelis A., Turkevičius G., Pronckus V., Sipavičius R., Stankevičius S., Balčiūnas M., Radikas P., Žurauskas E. Disekuojamoji torakoabdominalinės aortos aneurizma: nediagnozuota fistulė į kairįjį pagrindinį bronchą. *Lietuvos chirurgija: Lietuvos chirurgų asociacijos mokslinis žurnalas* 2004, t. 2, nr. 4, p. 308-314. (2004) (B000 - Biomedicinos mokslai)
25. Maknavičius S., Pošiūnas G., Strumila A., Žurauskas E., Valiulis A. Plaučių ir tarpuplaučio pseudonavikai. *Vaikų pulmonologija ir alergologija*. 2005m. balandis, VIII tomas, Nr.1. (2753-2758).
26. Sučilienė E., Budgenienė D., Valiulis A., Bardisevičiene I., Drazdienė N., Našliūnienė A., Vaitkevičienė R., Žurauskas E. Generalizuota tuberkulioze sergančios motinos naujagimis (klinikinis atvejis) *Vaikų pulmonologija ir alergologija*. 2005 m. spalio. T.VIII, Nr.2, p.3019 – 3022.
27. Bukelskienė V., Baltriukienė D., Bironaitė D., Imbrasaitė A., Širmenis R., Balčiūnas M., Žurauskas E., Kalvelytė A. Muscle-

- derived primary stem cell lines for heart repair. *Seminars in cardiology*, 2005, Vol.11, No.3. p.99-105. ISSN 1648-7966.
28. Zablockis R., Nargėla R., Danila E., Žurauskas E., Characiejūtė V. Plaučių alveolių proteinozė // *Vaikų pulmonologija ir alergologija*. 2006. 9(1). 3187-3192.
29. Balčiūnas M., Ručinskas K., Čelutkienė J., Žurauskas E., Malickaitė R., Valentinavičienė G., Jurkuvėnas V., Sirvydis V., Laucevičius A. Successful treatment of multiple organ dysfunction after doxorubicin-induced congestive heart failure with left ventricle assist device. *Seminars in cardiology*. 2005. Vol. 11. No.4.
30. Lapienis J., Zalgevičienė V., Zakarevicius E., Zurauskas E., Sukackaitė A., Graželiene G., Didziapetriene J., Rotomskis R. Spectroscopic evidence of placenta as a natural barrier for a photodrug. *Medical physics in the Baltic states. Proceedings of the 4th International Conference on Medical Physics*. Kaunas, Lithuania, 2006, p. 8-11.
31. Plaučių vėžys : sergamumas, biologija, diagnostika ir ankstyvųjų stadijų gydymas : mokomoji knyga. Vilniaus universiteto Onkologijos institutas ; [recenzentas: R. Nargėla]. - Vilnius, 2006. - d. D. 1 [Z.A. Kučinskienė, R. Briedienė, J. Kurtinaitis, R. Rynkevičienė, K. Sužiedėlis, L. Griciūtė, B. Kazbarienė, G. Prasmickienė, S. Uleckienė, J. Didziapetrienė, E. Žurauskas ; K.P. Valuckas, S. Cicėnas]. - 2006. - 431 p.: iliustr. - Santr. angl. - Bibliogr. sk. gale. - ISBN 9986-784-58-1
32. Maknavičius S., Pošiūnas G., Gurskas P., Strumila A., Jasevičius M., Žurauskas E. Priekinio tarpuplaučio germinogeninis navikas. Lietuvos vaikų chirurgų draugijos konferencija „Lietuvos vaikų chirurgija 2007“. Kaunas. 2007. Pranešimų tezės. p.19.
33. Zablockis R., Nargėla R., Laurinavičius A., Žurauskas E., Sosnovskaja I., Davidavičienė E. Sergančiųjų tuberkulioziniu pleuritu lyties, amžiaus, diagnozės metodo bei laiko nuo ligos

- simptomų pradžios iki diagnozės nustatymo įvertinimas. Vaikų pulmonologija ir alergologija. 2007 m. balandis, X tomas, Nr.1 (3511-3516). ISSN 1392-5261
34. Zurauskas E., Usinskiene J., Gaigalaite V., Blanc R., Usinskas A., Laurinavicius A., Dirbtiniu intrakranijines aneurizmos modelių kurimas angiografiniams tyrimams. *Medicina (Kaunas)* 43 (7): 562-7 2007.
35. Danila E., Žurauskas E., Zablockis R., Nargėla R.. Organizuojanti pneumonija. *Vaikų pulmonologija ir alergologija*. 2008m. Balandis, XI tomas, Nr.1. (3856-3866). ISSN 1392-5261
36. Danila E., Ostanevičiūtė E., Žurauskas E., Aleksonienė R. Amiodarono sukeltas plaučių pažeidimas. *Laboratorinė medicina*. 2008, t.10, Nr.(13), p18-22.
37. Danila E., Žurauskas E., Loskutovienė G., Zablockis R., Nargėla R., Biržietytė V., Valentinavičienė G. Significance of bronchoscopic lung biopsy in clinical practice. *Advances in Medical Science*. Vol.53(1). pp 11-16. doi: 10.2478/v10039-008-0011-2. Medical University of Bialostok, Poland.
38. Malickaitė R., Jurgauskienė L., Simanavičienė S., Stanevičienė A., Ručinskas K., Žurauskas E.. Periferinio kraujo T limfocitų potipių kitimas pirmus tris mėnesius po širdies transplantacijos. *Laboratorinė medicina*. 2008,t.10, Nr.3(39),p.146-150.
39. Danila E., Žurauskas E. Diagnostic value of epithelioid cell granulomas in bronchoscopic biopsies. *Internal Medicine* 47:2121-2126, 2008.
40. Danila E, Šileikienė V., Nargėla R., Žurauskas E. Different course of silicosis in four brothers of one family. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* 2009;22(1):1-7 doi 10.2478/v10001-09-0004-9.

12. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Silber E.N., Heart Disease. Second Edition. Macmillan Publishing Company. New York. 1987. p.3-88.
2. Abraitis R., Cibas P., Gronow G., Gutmanas A., Illert M., Hultborn H., Kėvelaitis E., Kummel H., Malysz A., Miliauskas R., Skurvydas A., Stasiulis A., Wiese H. – Žmogaus fiziologija. – Kaunas, 2001. – p. 478.
3. Синев А.Ф., Крымский Л.Д. Хирургическая анатомия проводящей системы сердца. Медицина. Москва. 47:108. 1985.
4. Silver M.D. Cardiovascular Pathology. Churchill Livingstone. New York. 55:60, 1367:1429. 1991.
5. Hutchins G.M. An introduction to Autopsy Technique. College of American Pathologists, Northfield, Illinois. 70:74. 1994.
6. Умовист М.Н. Проводящая система при врожденных дефектах перегородок сердца Здоров'я. Киев. 9:40. 1973.
7. Anderson R.H., Yanni J., Boyett M.R., Chandler N.J., Dobrzynski H. The anatomy of the cardiac conduction system. Clinical Anatomy 22:99-113(2008).doi 10.1002/ca.20700.
8. Anderson R. H. The disposition and innervation of atrioventricular ring specialized tissue in rats and rabbits. J.Anat. (1972), 113, 2, pp. 197-211.
9. Yanni J., Boyett M. R., Anderson R. H., Dobrzynski H. The extent of the specialized atrioventricular ring tissues. Heart Rhythm (2009), v.6. I 5. p. 672-680. doi:10.1016/j.hrthm.2009.01.031
10. Davies M.J. Pathology of conducting tissue of the heart. Butterworth&Co.(Publishers)Ltd. 1971. SBN390-25447-9
11. Development of the cardiac conduction system. Symposium on Development of the Cardiac Conduction System, held at the Novartis Foundation, London, May 21-23, 2002. ISBN 0-470-85035-3.
12. Ottaviani G. Role of post-mortem investigations in determining the cause of sudden unexpected death in infancy.Arch.Dis.Child. 2009, 94:170. doi:10.1136/adc.2008.147108

13. Ottaviani G., Maturri L. Histopathology of the cardiac conduction system in sudden intrauterine unexplained death. *Cardiovascular Pathology*. 2008 May-June; 17(3):146-55.
14. Suarez-Mier M.P., Aquilera B. Histopathology of the conduction system in sudden infant death. *Forensic Science International*. 93 (1998) 143-154.
15. Marques N., Mimoso J., Bohorquez R., Lazaro M., Brito H., Pereira M.A, Valente I., Mendonca I., Gomes V. Unstable angina as initial manifestation of Wegener granulomatosis: case report. *Rev.Port.Cardiol*. 2008 Nov;27(11):1469-77.
16. Karpawich P.P. Pacemaker therapy in the postoperative patient. *Turkish journal of arrhythmia, pacing and electrophysiology*. Volume 1, Number 3, Supplement 1, June 2003.
17. Talreja D.R., Nishimura R.A., Edwards W.D., Valeti U.S., Ommen S.R., Tajik A.J., Dearani J.A., Schaff H.V., Holmes D.R. Alcohol septal ablation versus surgical septal myectomy. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004; 44:2329-2332, doi:10.1016/j.jacc.2004.09.036
18. Guanggen C., Kobashigawa J., Margarian A., Luyi S. Cause of atrioventricular block in patients after heart transplantation. *Transplantation: Volume 76(1)15 July 2003pp 137-142*.
19. Emkanjoo Z., Mirza-Ali M., Alizadeh A., Hosseini S., Jorat M.V., Nikoo M.H., Sadr-Ameli M.A. Predictors and frequency of conduction disturbances after open heart surgery. *Indian Pacing and Electrophysiology Journal (ISSN 0972-6292)*, 8(1):14-21(2008)
20. Limongelli G., Ducceschi V., D'Andrea A., Renzulli A., Sarubbi B., De Feo M., Cerasuolo F., Calabro R., Cotrufo M. risk factors for pacemaker implantation following aortic valve replacement: a single centre experience. *Heart: Volume 89(8) August 2003pp 901-904*.
21. Marban E. Cardiac channelopathies. *Nature* 415, 213-218 (10 January 2002) doi:10.1038/415213a

22. Dobrzynski H., Tellez J., Greener I.D., Nikolski V.P., Wright S.E., Parson S.H., Jones S.A., Landcaster M.K., Yamamoto M., Honjo H., Takagishi Y., Kodama I., Efimov I.R., Billeter R., Boyett M.R. Computer three-dimensional reconstruction of the sinoatrial node. *Circulation* 2005; 111; 846-854. doi: 10.1161/01.CIR.0000152100.04087.DB
23. Liu F., Ismat F.A., Patel V.V. Role of hmeodomain-only protein in the cardiac conduction system. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2006 August; 16(6): 193-198 doi:10.1016/j.tcm.2006.03.009
24. Silverman M.E., Grove D., Upshaw Ch. Why does the heart Beat? *Circulation*. 2006;113:2775-2781.
doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.616771.
25. Silverman M.E., Hollman A. Discovery of the sinus node by Keith and Flack: on the centennial of their 1907 publication. *Heart* 2007;93:1184-1187. doi:10,1136/hrt.2006.105049.
26. Yanagawa N., Nakajima Y. A simple dissection method for the conduction system of the human heart. *Anat.Sci.Ed.* 2:78-80. 2009. doi:10.1002/ase.67
27. Žurauskas E., Jasulaitis A. Anatomic study of the conduction system of the heart.// *Acta Medica Lituanica*. 1997.4. P.149-151.
28. Peters N.S. Gap junctions: Clarifying the Complexities of Connexins and Conduction. *Circulation Research*. 2006;99;1156-1158.
DOI:10.1161/01.RES.0000251936.26233.0d
29. Finbow M.E., Pitts D.J. Is the gap junction channel – the connexon – made of connexin or ductulin? *Journal of Cell Science* 106, 463-472(1993).
30. Desplantez T., Dupont E., Severs J.N., Weingart R. Gap junction and cardiac impulse propagation. *Membrane Biology* (2007) 218:13-28. doi 10.1007/s00232-007-9046-8
31. <http://en.wikipedia.org/wiki/Connexin> , žiūrēta 2009.05.02.

32. Severs N.J., Bruce A.F., Dupont E., Rothery S. Remodeling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. *Cardiovascular Research* (2008) 80, 9-19. doi:10.1093/cvr/cvn133.
33. Sohl G., Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular Research* (2004); 62:228-232.
34. Kreuzberg M.M., Liebermann M., Segschneider S., Dobrowolski R., Dobrzynski H., Kaba R., Rowlinson G., Dupont E., Severs N.J., Willecke K. Human connexin31.9, unlike its orthologous protein connexin30.2 in the mouse, is not detectable in the human cardiac conduction system. *J.Mol.Cell Cardiol.* 2009Apr;46(4): 553-9. doi:10.1016/j.yjmcc.2008.12.007
35. Hagedorff A., Kirchhoff S., Kruger O., Eckhardt D., Plum A., Schumacher B., Wolper C. – Electrophysiological characterization of connexin 40 deficient hearts – in vivo studies in mice. – *Z. Cardiol.* – 2001, 90 (12), p.898-905.
36. Barbuti A., DiFrancesco D. Control of cardiac rate by “funny” channels in health and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1123:213-223(2008).doi:10.1196/annals.1420.024.
37. http://undergraduatestudies.ucdavis.edu/explorations/2007/Explorations_Volume10_TeresaTan.pdf, žiūrėta 2009.04.11.
38. Accili E.A., Proenza C., Baruscotti M., DiFrancesco D. From funny current to HCN channels: 20 year of excitement. *News in Physiological Sciences*, Vol. 17, No. 1, 32-37, February 2002.
39. Herrmann S., Stieber J., Ludwig A. Pathophysiology of HCN channels. *European Journal of Physiology.* (2007) 454:517-522. doi 10.1007/s00424-007-0224-4.
40. Matuzevičius D., Žurauskas E., Navakauskienė R., Navakauskas D. Improved proteomic characterization of human myocardium and heart conduction system by computational methods. *Biologija.* 2008. Vol.54.No.4. P.283-289. doi:10.2478/v10054-008-0058-9. Lietuvos mokslų akademija. ISSN:1392-0146

41. Richards-Kortum R., Servick-Murac E. – Quantitative Optical Spectroscopy for Tissue Diagnosis. – Annu. Rev. Phys. Chem. – 1996, 47, p. 555–606.
42. Richards-Kortum R., R. Drezek, K. Sokolov, I. Pavlova, M. Follen Survey of endogenous biological fluorophores. In: Handbook of biomedical fluorescence, eds. M.-A. Mycek, B. W. Pogue. Marcel Dekker, Inc., New York, 237-264. 2003.
43. Rotomskis R., Streckytė G. Fluorescencinė diagnostika biomedicinoje. Vilnius: Vilniaus universiteto leidykla. P. 78-123. 2007.
44. Lycette R. M., Leslie R. B. Fluorescence of malignant tissue. Lancet. 1965 Aug 28;2(7409):436
45. Alfano R. R., D. B. Tata, J. Cordero, P. Tomashefsky, F. Longo, M. Alfano (1987) Fluorescence spectra from cancerous and normal human breast lung tissues. IEEE J. Quant. Electron., 20, 1507-1511.
46. Bottiroli G., Croce A. C., Locatelli D., Marchinesini R., Pignoli E., Tomatis S., Cuzzoni C., Dipalma S., Dalfante M., Spinelli P.(1995) Natural fluorescence of normal and neoplastic human colon: a comprehensive *ex vivo* study. Lasers Surg. Med., 16, 48-60.
47. Rotomskis R., G. Streckytė (2004) Fluorescencinė navikų diagnostika. Medicina. 40, 1219-1230.
48. Rotomskis R., Streckytė G., Griciūtė L. Fotosensibilizuota navikų terapija: pirminiai vyksmai, “Lietuvos mokslas”, 2002, Vilnius, 278 p.
49. Tamošiūnas M., Makaryčeva J., Labanauskienė J., Bagdonas S., Aleksandravičienė C., Didžiapetrienė J., Griciūtė L., Rotomskis R. (2004) Autofluorescence of transplantable hepatoma A22 (MH-A22): prospects of tumor tissue optical biopsy. Eksp. Onkologija, 26, 118-124]
50. Van Dam J., Bjorkman D.J. (1996) Shedding some light on high-grade dysplasia. Gastroenterology, 111,247-249.
51. Schneckenburger H., Gschwend M., Paul R. J. (1995) Time-gated spectroscopy of intrinsic fluorophores in cells and tissues. In: Optical biopsy and fluorescence spectroscopy and imaging, eds. R. Cubeddu, R.

Marchesini, S. G. Mordon, K. Svanberg, H. H. Rinneberg, G. Wagnieres. Proc. SPIE, 2324,187-195].

52. Goujon D., Zellweger M., Bergh H., Wagnieres G. (2000) Autofluorescence imaging in the tracheo-bronchial tree. Photodynamics News, 3, 11-14.

53. Zellweger M., Grosjean P., Goujon D., Monnier P., Van Den Berg H., Wagnieres G. (2001) Autofluorescence spectroscopy to characterize the histopathological status of bronchial tissue *in vivo*. J. Biomed. Opt., 6, 41-52.

54. Zellweger M., Goujon D., Forrer M., Van Den Berg H., Wagnieres G. (2001) Absolute autofluorescence spectra of healthy bronchial tissue *in vivo*. Appl. Opt., 40,3784-3791.

55. Hubmann M. R., Leiner M. J. P., Schaur R. J. (1990) Ultraviolet fluorescence of human sera: I. Sources of characteristic differences in ultraviolet fluorescence spectra of sera from normal and cancer-bearing humans. Clin. Chem., 36, 1880-1883

56. Katz A., Alfano R.R. (2000) Noninvasive fluorescence-based instrumentation for cancer and precancer detection and screening. In: *In vitro* diagnostic instrumentation, ed. G.E. Cohn Proc. SPIEE, 3931, 223-226.

57. Andersson-Engels S., Baert L., Berg R. et al. (1991) Fluorescence characteristics of human atherosclerotic plaque and malignant tumors. In: Optical methods for tumor treatment and early diagnosis: mechanisms and techniques, ed. T. J. Dougherty, Proc. SPIE, 1426, 31-43

58. Andersson-Engels S., Johansson J., Stenram U., K. Svanberg K., Svanberg S. (1990) Malignant tumor and atherosclerotic plaque diagnosis using laser-induced fluorescence. IEEE J. Quant. Electr., 26, 2207-2217

59. Alfano R. R., Tang G. C., Pradhan A., Lam W., Choy D. S. J., Opher E. (1987) Fluorescence spectra from cancerous and normal human breast and lung tissues. IEEE J. Quant. Electron., 23, 1806-1811

60. Rava R. P., Richards-Kortum R., Fitzmaurice M. et al (1991) Early detection of dysplasia in colon and bladder tissue using laser induced fluorescence. In: Optical methods for tumor treatment and early diagnosis mechanisms and techniques, ed. T. J. Dougherty. Proc. SPIE, 1426, 68-75].
61. Aziz D.J., Caruso A., Aguire M., Gmitro A.F. – Fluorescence response of selected tissues in the canine heart: an attempt to find the conduction system. – Proc. SPIE. – 1992,1642, p. 166-175. doi: 10.1117/12.137301
62. Oeff M, Hug U, Stormer U, et al. Fluorescence spectroscopy for identification of the AV node prior to ablation. Circulation 1991;84,11-13
63. Perk M., Flynn G.J., Gulamhusein S., Wen Y., Smith C., Bathgate B., Tulip J., Parfrey N.A., Lucas A. – Laser induced fluorescence identification of sinoatrial and atrioventricular nodal conduction tissue. – Pacing Clin. Electrophysiology. – 1993, 16 (8), p.1701-1712.
64. Laurinavičienė A., Smaliukienė R. Histologinių technologijų vadovas. Eugrimas. Vilnius. 2008. p.29-46. ISBN 978-9955-790-15-0
65. Bancroft J., Stevens A., Turner D. Theory and practice of Histological techniques. Churchill Livingstone. New York. P.139-151.1996.
66. Nelson M.E. Chapter excerpt from: Electrophysiological Models. New York, p.12, 2004.
67. Dechant J., Danz R., Schmolke R. Ultrarotspektroskopische Untersuchungen an Polymeren. Chimiya. Moscow. 1976. p 338-345 [in Russian].
68. Bellamy L. J. The Infra-Red spectra of complex molecules, Inostr. Literature. Moscow. 1963. [in Russian].
69. Schanfield M. S. in: Encyclopedia of Forensic Sciences, ed. J. A. Siegel, P. J. Saukko, G. C. Knupfer. Academic Press. San Diego. v. II, p 479-485.
70. Nakanishi R. Infrared Spectra and Structure of the Organic Compounds. Mir. Moscow. 1965. [in Russian].

71. Cross A.D. An Introduction to Practical Infrared Spectroscopy. Inostr.literatura. Moscow. 1961. [in Russian].
72. Colthup N. B., Doly L. H., Wiberley S. E. Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy, Academic Press Inc., 1999.
73. Taturina L., Pozniakova F. Spectral Analysis of the Polymers. Chimiya. Leningrad. 1986. [in Russian].
74. Žurauskiene E., Žurauskas E., Streckyte G., Bagdonas S., Žvaigzdas K., Rotomskis R. Premises of visualization of the conduction system of heart: spectroscopic investigations. Lithuanian Journal of Physics. 2001. 41, No. 4-6, 505-508.
75. Stevens A., Bancroft J.D. Theory and practice of histological techniques. Churchill Livingstone. New York. 139:151. 1966.
76. Voet D., Voet J.G. Biochemistry. Wiley. New York. 1995.
77. Гиллем Т., Штерн Е. Электронные спектры поглощения органических соединений. Изд.ин.лит. Москва, 1957.
78. Fasman G.D. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, Proteins, I, 183-203, CRC Press, 3 ed., 1976.
79. Wagniers G. A., Star W. M., Wilson B. C. In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. J. Photohem. Photobiology. 1998. 68. p. 603-632.
80. Lakowicz J.R. – Principles of fluorescence spectroscopy. – New York, 1999.
81. Schomacker K.T., Frisoli J.K, Compton C.C., Flote T.J., Richter J.M., Nishioka N.S., Deutsch T.F., Ultraviolet laser induced fluorescence of colonic tissue: basic biology and diagnostic potential, Lasers in Surgery and Medicine, V.12, p. 63-78. 1992.
82. Prompers J. J., Hilbers C. W., Pepermans H. A. (1999) Tryptophan mediated photo reduction of disulfide bond causes unusual fluorescence behavior of Fusarium solani pisi cutinase. FEBS Lett. 456, 409-416.
83. Jezek P., Lillo P., Polecha J. (1998) Tryptophan fluorescence of mitochondrial uncoupling protein. Gen. Physiol. Biophys. 17, 157-178.

84. Chen Y., Barkley M.D. (1998) Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins. *Biochemistry* 37, 9976-9982.
85. Žurauskas E., Bagdonas S., Bandzaitytė L., Streckytė G., Rotomskis R. Visualization of the conduction system of heart by fluorescence Spectroscopy. *Lithuanian Journal of Physics*, Vol.44, No.1, pp.35-40. 2004.
86. Bandzaitienė Z., Bandzaitis A.R. – Biometriniai rodikliai ir jų matematinio apdorojimo metodika. – *Botanika Lithuanica*. – 2001, 7 (3) p. 295-302
87. Ecker C., Montan S., Jaramilo E., Koizumi K, Rubio C., Anderson-Engels S., Svanberg K., Slezak P. Clinical spectral characterization of colonic mucosal lesion using autofluorescence and delta-aminolevulinic acid sensitization. *An International Journal of Gastroenterology and Hepathology*. V.44, p. 511-518. 1999.
88. Bottioli G., Croce A.C., Locatelli D., Marchesini R., Pignoli E., Tomatis S., Cuzzoni C., Di Palma S., Dalfante M., Spineli P. Natural fluorescence of normal and neoplastic human colon: a comprehensive “ex vivo” study. *Lasers in Surgery and Medicine*, V.16, p. 48-60 1995.
89. Stepp H, Sroka R., Baumgartner R. Fluorescence endoscopy of gastrointestinal diseases: Basic principles, techniques and clinical experience. *Endoscopy*, No 30, p.379-386, 1998.
90. Maarek M. I., Marcu L., Fishbein M.C., Grundfest W.S. – Time-Resolved Fluorescence of Human Aortic Wall: Use for Improved Identification of Atherosclerotic Lesions. – *J. Lasers in Surgery and Medicine*. – 2000, 27, p. 241-254.
91. Marcu L., Fishbein M.C., Maarek M.I., Grundfest W.S. Discrimination of Human Coronary Artery Atherosclerotic Lipid-Rich Lesions by Time-Resolved Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001;21,1244-1250].

92. DaCosta R.S., Andersson H, Wilson B.C. Molecular fluorescence excitation-emission matrices relevant to tissue spectroscopy. *Photochem. Photobiol.* 78, 384-392. 2003.
93. Haringsma J., Tygat G.N. Fluorescence and autofluorescence. *Bailliere's Clinical Gastroenterology* V.13, No1. p. 1-10 1999.
94. Bagdonas S., Zurauskas E., Strekyte G., Rotomskis R. Spectroscopic studies of the human heart conduction system ex vivo: implication for optic visualization. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 92 (2008) 128-134. doi:10.1016/j.jphotobiol.2008,05,010
95. Venius J., Labeikytė D., Žurauskas E., Strazdaitė V., Bagdonas S., Rotomskis R. Investigation of human heart tissue extracts by spectroscopic methods. *Biologija.* 2006. Nr.3. P 53-58.

13. SANTRUMPOS

ŠLS – širdies laidžioji sistema;
AV – atrioventrikulinis;
SA – sinusinis mazgas;
HP – Hiso pluoštas;
SIDS – staigios ir netikėtos kūdikių mirties sindromas;
JA – jungimasis audinys;
H&E – hematoksilinas ir eozinas,
UV – ultravioletas;
FT-IR – Furje transformacijų infraraudonoji spektroskopija;
Trp – triptofanas;
Tyr – tirozinas;
Phe – fenilalaninas;
NDS – natrio dodecilsulfatas;
EGTA – etileno glikolio tetraacetinė rūgštis;
Tris – tris(hidroksimetil)aminometanas (HOCH₂);
PAGE – poliakrilamido gelis;
SDS-PAGE – natrio sulfato dedocylpoliakrilamido gelis;
NAD – nikotinamidadenindinukleotidas;
NADH – redukuota nikotinamidadenindinukleotido forma;
keV – kiloelektronvoltas;
IR – infraraudonieji spinduliai;
Snt.vnt. – santykiniai vienetai;
In vivo – lotyniškai, *in* – priešdėlis žymintis buvimą viduje, *vivo* – gyvas.
Moklse *in vivo* suprantamas kaip eksperimento atlikimas gyvame audinyje arba gyvo audinio viduje, tiriamam organizmui esant gyvam.

In vitro - lotyniškai, *in* – priešdėlis žymintis buvimą viduje, *vitro* – stiklas.

Moklėse *in vitro* suprantamas kaip eksperimento atlikimas dirbtinėje aplinkoje, ne gyvame audinyje ar organizme.

pI – izoelektrinis baltymo taškas, kuriame baltymas neturi elektrinio krūvio.