

VILNIAUS UNIVERSITETAS

JONAS VENIUS

FUNKCIŠKAI BESISKIRIANČIŲ ŽMOGAUS ŠIRDIES AUDINIŲ
FLUORESCENCINIAI TYRIMAI IR VAIZDINIMAS

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, biofizika (02B)

Vilnius 2013

Disertacija rengta 2005-2012 metais Vilniaus universitete.

Mokslinis vadovas:

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

Konsultantas:

Doc. dr. Edvardas Žurauskas (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

TURINYS

I. ĮVADAS	5
II. TYRIMO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI.....	8
III. GINAMIEJI TEIGINIAI	9
IV. AKTUALUMAS	11
V. NAUJUMAS	13
VI. LITERATŪROS APŽVALGA	15
6.1 Optinė biopsija.....	16
6.1.1 Fluorescencija	17
6.1.2 Audinių liuminescencija.....	21
6.1.3 Fluorescencijos taikymas diagnostikoje.....	24
6.2 Širdies anatomija	27
6.2.1 Širdies laidžioji sistema.....	28
6.2.2 Miokardas.....	31
6.2.3 Jungiamasis audinys.....	33
6.3 Širdies audinių tyrimai.....	36
6.3.1 Širdies laidžiosios sistemos anatomijos tyrimai.....	38
6.3.2 Širdies laidžiosios sistemos vaizdinimo tyrimai.	41
VII. MEDŽIAGOS IR METODAI	48
7.1 Širdies audinių vaizdinimas.....	49
7.2 Širdies audinių nuostovioji fluorescencinė spektroskopija	49
7.3 Širdies audinių spektroskopinis vaizdinimas.....	53
7.4 Širdies audinių fluorescencinė laikinės skyros spektroskopija	54
7.5 Širdies audinių vaizdinimas konfokaline atspindžio mikroskopija ..	56
7.6 Širdies audinių atskyrimas <i>in vivo</i> operacijos metu	60

VIII. REZULTATAI IR APTARIMAS.....	63
8.1 Širdies laidžiosios sistemos vaizdinimo eksperimentai.....	63
8.2 Širdies audinių tyrimai nuostoviosios fluorescencinės spektroskopijos metodu	67
8.3 Širdies audinių spektrinis vaizdinimas	81
8.4 Širdies audinių fluorescencinė laikinės skyros spektroskopija	88
8.5 Širdies audinių vaizdinimas konfokaline atspindžio mikroskopija..	99
8.5.1 Konfokalinės mikroskopijos ir fluorescencinės spektroskopijos metodikų palyginimas	108
8.6 Širdies audinių vaizdinimas <i>in vivo</i> operacijos metu	115
X. PUBLIKACIJOS.....	121
XI. LITERATŪROS SĄRAŠAS.	126

I. ĮVADAS

Sveikata, didžiausias žmonių turtas, todėl ir didžiausios pastangos, kurias žmonija deda į mokslą, turėtų būti nukreiptos būtent sveikatos išsaugojimo linkme. Kai kurios ligos jau gali būti apspręstos žmogui dar negimus, kai kurios ligas patys įsitaisome dėl vienokio ar kitokio organizmą žalojančio poveikio, galiausiai, kai kurios ligos nepriklausomai nuo gyvenimo būdo dėl vis dar neaiškių priežasčių pasirenka vieną ar kitą žmogų. Nėra daug susirgimų, kurių, atsiradimo priežastys yra visiškai aiškios, todėl ir kelią užkirsti galime tik nedaugeliui ligų. Kaip taisyklė, liga niekada nepuola visu pajėgumu iš karto, todėl ją aptikus dar ankstyvoje stadijoje galima daug lengviau užkirsti kelią fatališkomis pasekmėms. Deja, bet dėl įvairių priežasčių dažniausiai žmonės kreipiasi medicininės pagalbos ligai jau gerokai įsisenėjus. Šiuo atveju reikalingi sudėtingi, brangūs ir kartais patį organizmą niokojantys medikamentiniai, spinduliniai ar operaciniai gydymo metodai.

Sveikatos informacijos centro duomenimis kraujodaros organų ir kraujagyslių sistemos ligos vis dar yra dažniausia mirties priežastis Lietuvoje. Šios ypatingai svarbios sistemos sutrikimai apima tiek įgimtas, tiek dėl žalingo gyvenimo būdo įgytas ar paveldėtas ligas. Daugeliu atvejų nėra imamas jokių prevencijos priemonių, todėl galiausiai vienintelis būdas pašalinti sveikatos sutrikdymus sukėlusias priežastis lieka operacija. Atskiri atvejai yra įgimtos širdies ir kraujotakos sistemos ligos, dažniausiai pasireiškiančios pirmuose gyvenimo metuose. Tai ypatingai sudėtingi atvejai, kadangi dėl patologijos širdies struktūra yra pakitusi ir atskirų jos dalių tiksli lokalizacija gali būti nežinoma. Tokios situacijos labai apsunkina chirurgų darbą ir sumažina sėkmingos operacijos tikimybę, taip pat padidėja pooperacinių komplikacijų galimybė. Pagrindinė širdies funkcija yra tinkamas žmogaus organizmo aprūpinimas krauju, kas didžiąja dalimi priklauso nuo tvarkingo ir ritmingo širdies darbo. Širdies plakimo ritmą užduoda ir elektrinio impulso sklaidimą kontroliuoja širdies laidžioji sistema (ŠLS) sudaryta iš sinusinio (SA) bei

atrioventrikulinio (AV) mazgų, Hiso pluošto (HP) bei Purkinje skaidulų tinklo. Atliekant širdies operacijas yra ypatingai svarbu identifikuoti ŠLS lokalizaciją ir nepažeisti šios gyvybiškai svarbios sistemos, tačiau dėl raumeninės kilmės ji yra sunkiai vizualiai atskiriama nuo darbinio širdies raumens miokardo (MK). ŠLS yra išsidėsčiusi visose širdies srityse ir kol kas, dėl sudėtingo šios sistemos aptikimo, vis dar nėra vieningos nuomonės apie tam tikrų laidžiosios sistemos takų egzistavimą. ŠLS ir atskirų jos dalių matmenys literatūroje pateikiami labai skirtingi, o daugelio įgimtų širdies ydų atvejais, žmogaus širdies laidžiosios sistemos išsidėstymas išvis nėra žinomas, todėl operacijos metu atsiranda galimybė pažeisti ŠLS, ko pasekoje sutrikdomas tvarkingas širdies darbas. Dalies komplikacijų galima būtų išvengti, jei operacijos metu ŠLS būtų matoma. Šiam tikslui reikalinga vaizdinimo metodika, kurioje realiu laiku būtų analizuojami skirtingi širdies audiniai ir išryškinama tik laidžioji sistema. Daugeliu atvejų biopsiniai tyrimai yra auksinis standartas, tačiau akivaizdu, jog šiuo atveju jie nėra tinkami, kadangi mikroskopinis audinio ištyrimas yra ilgai trunkantis ir informaciją neša tik apie vieną tašką. Taigi, vaizdinimo metodika turėtų būti neinvazinė, paprastai ir greitai atliekama, tačiau vis dėlto labai informatyvi, kadangi skirtumai ieškomi tarp labai panašių – raumeninės kilmės audinių.

Sparčiai tobulėjant naujoms technologijoms bei gydymo ir diagnostikos metodams svarbią vietą tarp jų užima optinės diagnostikos technologijos, dažnai pristatomos kaip optinė biopsija. Šie metodai pasižymi išskirtinėmis savybėmis, darančiomis juos patraukliais taikyti įvairių susirgimų diagnostikoje. Svarbiausia, tai yra neinvaziniai, o taip pat palyginti nesudėtingi ir greitai atliekami metodai, tačiau, nepaisant paprastumo, jie yra itin jautrūs. Plačiausiai biologinių objektų optinėms savybėms bei jų pakitimams tyrinėti naudojamas metodas yra fluorescencinė spektroskopija. Biologiniam audiniui būdinga savitoji (auto) fluorescencija, kurią sąlygoja jame esantys natūralūs fluoroforai. Daugumos endogeninių fluoroforų fluorescencija yra susijusi su audinių struktūra ir biologiniame objekte vykstančiais metaboliniais vyksmais, todėl savitoji audinių fluorescencija gali rodyti tiek ligos pažeistą audinį, tiek

išryškinti audinio morfologinius ar metabolinius specifiškumus, kurie sunkiai nustatomi kitais būdais. Fluorescenciniai metodai šiuo metu yra sparčiai besivystanti neinvazinės diagnostikos kryptis. Naudojant fluorescencinės spektroskopijos metodus nustatomas audinių gyvybingumas, vaizdinama skiriamoji riba tarp sveiko ir navikinio audinio odos paviršiuje. Sukurti įvairūs diagnostikos metodai, pagrįsti savitąja audinių fluorescencija, ištirtos daugumos endogeninių ir egzogeninių fluoroforų spektrinės charakteristikos, nustatytos sąsajos tarp fluorescencijos spektrų, jų intensyvumo bei biologinio objekto tarpląstelinės medžiagos sandaros, medžiagų apykaitos ląstelėje, morfologinių ir citologinių sveikų ir navikinių ląstelių pokyčių, jų išsigimimo.

Nepaisant plataus optinių metodų taikymo biologinių audinių tyrimams bei diagnostikai, fluorescencinės spektroskopijos metodais atliktų ŠLS tyrimų yra labai nedaug. Visi eksperimentai yra atlikti *ex vivo* audiniuose, neįskaitant kraujo įtakos. Esminiai atradimai, kurie padaryti tiriant eksperimentinių gyvūnų širdis, yra tai, kad laidžiosios sistemos mazgų (AV ir SA) fluorescencija yra intensyvesnė nei skilvelių ir šiek tiek silpnesnė nei prieširdžių, tačiau žymesnių skirtumų AV ir miokardo fluorescencijos spektruose nepastebėta. Pastaruoju metu buvo atlikti žmogaus širdies preparatų tyrimai ieškant optinių parametrų skirtumų tarp skirtingo tipo širdies audinių. Tyrimai buvo atlikti išpreparuojuose širdies audiniuose, pašalinus juos dengiantį endokardą ir neatsižvelgiant į jo fluorescencines savybes. Nustatyta, kad ŠLS ir MK pasižymi skirtinga sugertimi ultravioletinėje (UV) srityje, taip pat stebėti ir fluorescencijos intensyvumo skirtumai 400 – 550 nm srityje, tačiau jų tiesioginis pritaikymas nebūtų labai tikslus, kadangi fluorescencijos intensyvumas priklauso nuo žadinimo-surinkimo sąlygų ir užregistruoti fluorescencijos intensyvumų skirtumai gali būti sąlygoti ne skirtingo tipo audinių, o nevienodo šviesolaidžio prispaudimo prie audinio. Praktikoje turėtų būti naudojama metodika, kuri būtų nejautri šiems faktoriams. Taipogi atliekant spektroskopinius tyrimus nėra fluorescencijos duomenų tikslaus susiejimo su audinio morfologija bei struktūra, todėl fluorescencinių metodų taikymo ŠLS šakų vaizdinime galimybės vis dar išlieka neaiškios.

II. TYRIMO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Tyrimo tikslas:

Sukurti žmogaus širdies laidžiosios sistemos identifikavimo metodiką paremtą audinių optinių parametų tyrimu.

Uždaviniai:

1. Ištirti nepreparuotų širdies audinių, kuriuose EK nėra atskirtas, optinius parametrus fluorescencijos bei fluorescencijos žadinimo metodais.
2. Ištirti kraujo įtaką registruojamiems širdies audinių fluorescencijos spektrams.
3. Remiantis nustatytais spektriniais skirtumais sukurti ŠLS vaizdinimo metodiką.
4. Ištirti širdies audinius fluorescencine laikinės skyros spektroskopija.
5. Ištirti funkciškai besiskiriančius širdies audinius konfokaliniu atspindžio mikroskopu.
6. Atlikti ŠLS vaizdinimui sukurtos metodikos įvertinimą *in vivo*, operacijos metu.

III. GINAMIEJI TEIGINIAI

1. Nepreparuoatų širdies audinių – ŠLS, MK ir JA, kuriuose EK nėra atskirtas, fluorescencijos spektrai žadinant 330 nm spinduliuote skiriasi tiek savo forma, tiek intensyvumu. Spektre yra stebimos dvi smailės ties 390 nm ir 430 nm, kurių intensyvumų santykis ŠLS, MK ir JA yra skirtingas. Žadinimui naudojant 380 nm spinduliuotę fluorescencijos spektrai skiriasi savo intensyvumu, tačiau esminių spektro formos pokyčių nėra.

2. Intensyviausia kraujo sugertis yra stebima ties ~ 420 nm, todėl jo buvimas gyvuose audiniuose stipriai įtakoja fluorescencijos spektrus. Tyrimai kraujingų (šaldytų) širdies audinių leido įvertinti kraujo įtaką ir atsižvelgiant į ją parinkti optimalias fluorescencijos žadinimo ir registravimo sąlygas – žadinimui tikslinga naudoti 330 – 380 nm spinduliuotę, o fluorescenciją registruoti ties 460 nm.

3. Kiekviename tyrimo taške fluorescenciją žadinant 330 nm ir 380 nm spinduliuote yra registruojami du fluorescencijos spektrai, kurių intensyvumai ŠLS, JA ir MK audinių yra skirtingi. Fluorescencijos intensyvumų santykis $I(330)/I(380)$ ties 460 nm yra charakteringas kiekvienam audinio tipui, todėl tokia metodika, paremta audinių fluorescenciniu tyrimu galima taikyti taškiniam ŠLS identifikavimui bei nedidelių plotų vaizdinimui.

4. Taikant fluorescencinę laikinės skyros spektroskopijos metodiką nustatyta, jog mažiausiai trys fluoroforai yra atsakingi už ŠLS, MK ir JA fluorescenciją. Raumeninių audinių (ŠLS ir MK) fluorescencijos gyvavimo trukmės bei fluoroforų santykiniai indėliai į fluorescencijos spektrus reikšmingai nesiskiria, tuo tarpu JA ir ŠLS gyvavimo trukmės skiriasi reikšmingai, taip pat skiriasi ir santykiniai fluoroforų įnašai į registruojamus fluorescencijos spektrus. Remiantis šiais skirtumais buvo identifikuoti visi trys fluoroforai, atsakingi už fluorescenciją 430 – 550 nm srityje.

5. Konfokaliniu atspindžio mikroskopu, naudojant 800 nm bangos ilgio spinduliuotę audinių apšvietimui, gali būti vaizdinami JA sudarantys kolageno

ir elastino pluoštai, MK sudarantys miocitai bei Hiso pluošto šakose esančios Purkinje ląstelės ir jų skaidulos.

6. Operacijos metu *in vivo* registruojami širdies audinių spektriniai dėsningumai atitinka stebėtus *ex vivo* audiniuose, todėl sukurta metodika yra tinkama ŠLS atskyrimo tyrimams gyvuose audiniuose, tačiau, norint šį metodą pritaikyti kasdieniniam naudojimui operacijos metu, reikalinga ypatingai greita bei jautri aparatūra.

IV. AKTUALUMAS

Širdies ir kraujagyslių ligos vis dar yra pagrindinė mirties priežastis Lietuvoje ir visose išsivysčiusio pasaulio šalyse [1,2]. Iš dalies tokia situacija susiklosto dėl pasyvaus gyvenimo būdo bei netinkamos mitybos. Vystantis sutrikimams daugeliu atvejų nėra imamasi jokių prevencijos priemonių, todėl galiausiai vienintelis būdas pašalinti sveikatos sutrikdymus sukėlusias priežastis lieka chirurginė intervencija. Invazinės procedūros visada yra susijusios su tam tikra pooperacinių komplikacijų rizika. Skirtingiems organams ši rizika yra skirtinga, tačiau širdyje, kurioje yra net keletas funkciškai besiskiriančių audinių, pažeidimų rizika yra gana didelė. Tai ypač susiję su laidžiąja sistema, kuri yra atsakinga už širdies plakimo ritmo diktavimą bei atskirų širdies dalių tvarkingą susitraukimą. Laidumo takų pažeidimas gali sąlygoti tam tikrus ritmo sutrikimus ar visišką impulso perdavimo blokadą [3-6]. ŠLS yra raumeninės kilmės audinys, todėl vizualiai yra sunkiai atskiriama nuo aplinkinio raumens ir operuojant lengvai gali būti pažeidžiama. Tokios situacijos galima išvengti jei būtų žinomas tikslus laidžiosios sistemos išsidėstymas, arba ŠLS būtų galima identifikuoti chirurginių procedūrų metu. Deja, bet kol kas atskirų ŠLS dalių išsidėstymas vis dar yra tikslinamas, o įvairiausių patologijų atvejais apskritai nėra aiškus [7,8]. Įvairių širdies patologijų turi net 5 – 8 % naujagimių, o prenatalinių mirčių skaičius dėl širdies vystymosi sutrikimų gali būti dar didesnis [9-10].

Vyraujantis mirtingumas nuo širdies ir kraujagyslių ligų rodo ne tik sveikatai žalingą gyvenimo būdą, bet ir tai, jog žinios apie širdies anatomiją bei jos veiklą vis dar yra nepakankamos. Besivystančioje embriono širdyje yra randamas platesnis laidumo audinių pasiskirstymas negu subrendusioje širdyje [11], tačiau visa vystymosi eiga nėra tiksliai nustatyta, todėl neaišku, kaip vienoki ar kitokie širdies vystymosi ar įgimti defektai įtakoja, ar ateityje įtakos širdies veiklą [12]. Nemažos dalies susirgimų, kurie aptinkami jau suaugusiems asmenims, priežastys yra įgimtos patologijos, kurios pasireiškė

tik po daugelio metų [13-15]. Tuomet jau yra labai sunku atsekti, dėl kokių priežasčių atsirado sutrikimas [16], o kai kuriais atvejais širdies ritmo sutrikimų priežastys negali būti paaiškinamos. Taip pat nėra pilnai iširta ir kitų, tiesiogiai nesusijusių su impulsų generacija ar perdavimu, susirgimų įtaka laidžiajai sistemai. Dabartiniais neinvaziniais vaizdinimo metodais ŠLS nėra matoma, todėl patologijos, kol jos nesukelia rimtų sveikatos sutrikdymų nėra užfiksuojamos. Įvairiausių negalavimų atsiradimas jau yra susijęs su tam tikrais fiziologiniais ir biocheminiais organizmo pakitimais vykstančiais senstant organizmui, o išsamus supratimas apie ŠLS vystymąsi leistų susieti stebimus simptomus su laidžiosios sistemos patologijomis ir imtis prevencinių priemonių, kad užkirsti kelią galimoms fatališkomis pasekmėms.

Esama situacija rodo, jog ŠLS yra itin sudėtingas tiriamasis objektas – laidžiosios sistemos audinio kilmė yra raumeninė, tačiau jis pasižymi nerviniam audiniui būdingomis greito signalo perdavimo funkcijomis, o atskiri ŠLS pluoštai yra apsupti JA tinklu, izoluojančiu juos nuo MK. Dėl šių priežasčių ŠLS negali būti vienareikšmiškai identifikuojama iš kito tipo širdies audinių net ir *ex vivo*. Žymenų, vaizdinančių tik laidžiąją sistemą, nėra [17], o mikroskopinis identifikavimas yra labai sudėtingas [18]. Nors šiuolaikinių technologinių bei biocheminių įrankių pagalba buvo identifikuotos kai kurių ŠLS dalių lokalizacijos [19], tačiau tiksli visų ŠLS takų lokalizacija nėra žinoma net ir patologiškai sveikoje širdyje [17]. Taigi stingant žinių apie žmogaus ŠLS anatomiją ir neesant patikimų vaizdinimo metodikų yra neabejotinas poreikis laidžiosios sistemos identifikavimo metodams tiek gyvuose audiniuose, tiek tiriant širdies audinių preparatus.

V. NAUJUMAS

Šiai dienai žmogaus širdies laidžiosios sistemos atskirų dalių lokalizacijos kol kas nėra tiksliai nustatytos [7,8]. Tai sąlygoja vis dar netobulos laidžiosios sistemos aptikimo metodikos. Dabar atliekami ŠLS tyrimai naujausiomis technologijomis pasitelkiant genų inžineriją suteikia labai svarbių žinių apie ŠLS įvairiose žmogaus vystymosi stadijose [11,19], taip pat leidžia numatyti galimas vystymosi sutrikimų pasekmes [12]. Deja, tokių technologijų taikymas nėra įmanomas gyvuose objektuose, o dėl jų sudėtingumo bei komplikuoto pačių audinių paruošimo panaudojimas *ex vivo* taipogi yra labai ribotas. Kol kas nėra universalus ir paprasto ŠLS identifikavimo metodo nei *in vivo*, nei *ex vivo* tyrimams.

Visas vaizdinimo ar identifikavimo metodikas galima skirstyti į dvi grupes – tinkančias taikyti *in vivo*, ir tinkančias tik *ex vivo* tyrimams. Gyvų biologinių audinių charakterizavimui plačiai yra naudojami neinvaziniai optiniai tyrimo metodai [20-26]. Fluorescencinės spektroskopijos metodais tiriant eksperimentinių gyvūnų širdis nustatyta, kad SA bei AV mazgo fluorescencija skiriasi nuo juos supančių audinių fluorescencijos. Intensyvumų skirtumai stebimi ir tarp mazgų bei skilvelių endokardo fluorescencijos spektrų [27-30]. Žmogaus ŠLS mazgų fluorescencija yra silpnesnė nei prieširdžių, tačiau intensyvesnė nei skilvelių [31]. Vis dėlto fluorescencinė spektroskopija atliktų žmogaus laidžiosios sistemos šakų bei Hiso pluošto tyrimų yra labai nedaug. Iki šiol širdies audiniai daugiausia buvo tirti pašalinus dengiantį endokardą [32], kurio didžiąją dalį sudaro kolageno ir elastino pluoštai. Endokardas dengia visą vidinį širdies paviršių, todėl jo optinės savybės turėtų stipriai įtakoti širdies audinių fluorescencijos spektrus. Atlikti tyrimai iš esmės akcentuoja tik intensyvumų skirtumus, tačiau intensyvumas didele dalimi priklauso ne tik nuo audinio vidinių parametrų, bet ir nuo fluorescencijos žadinimo-surinkimo sąlygų, todėl siekiant vienareikšmiškai atskirti ŠLS reikalinga metodika, kuri būtų nejautri tyrimo sąlygoms.

Egzistuoja dar vienas fluorescencinis audinių optinių parametrų tyrimo metodas, kuris suteikia informaciją apie konkrečius audinyje esančius fluoroforus. Tai yra fluorescencinė laikinės skyros spektroskopija, kuria galima nustatyti fluoroforų skaičių bei pagal charakteringas fluorescencijos gyvavimo trukmes juos identifikuoti. Šia metodika yra tyrinėjami įvairūs žmogaus audiniai, ieškoma skirtumų tarp navikinių ir sveikų audinių [33,34], tiriami širdies bei kraujagyslių audiniai [35]. Didžiausias dėmesys yra skiriamas aterosklerozės pažeistų kraujagyslių diagnostikai [36-39], tuo tarpu širdies laidumo audinys laikinės skyros spektroskopija kol kas nėra tirtas. Šiuo metu, dėl pakankamai sudėtingos aparatūros, tai yra *ex vivo* audiniams tirti taikomas metodas, tačiau pati procedūra yra neinvazinė ir panaši į nuostoviosios fluorescencijos registravimą, todėl galima tikėtis, jog technikai tobulėjant, tokia procedūra galės būti taikoma ir *in vivo*.

Kol kas netyrinėtos ir itin perspektyvios *in vivo* tyrimams konfokalinės atspindžio mikroskopijos galimybės širdies audinių vaizdinimui. Ši metodika yra unikali tuo, kad įgalina tirti audinius ląstelių lygmenyje įvairiuose sluoksniuose nesuardant paties audinio. Konfokalinė atspindžio mikroskopija plačiai taikoma *in vivo* odos pigmentinių darinių diagnostikai, yra nustatyti kontrasto šaltiniai įvairiuose odos sluoksniuose [40-45]. Širdies sienelės struktūra bei sudėtis yra kitokia ir galimi kontrasto šaltiniai skirtingo tipo širdies audinių atspindžio vaizduose nėra žinomi, todėl nėra aišku, kokios struktūros širdies audiniuose galės būti vaizdinamos ir ar tai bus pakankama ŠLS identifikavimui.

Apibendrinant ŠLS tyrimus galima teigti, kad nepaisant gausių širdies audinių tyrimų, laidžiosios sistemos vaizdinimas vis dar yra eksperimentiniame lygmenyje ir kol kas nėra tikslus. Didžioji dalis darbų yra atliekami arba tiriant eksperimentinius gyvūnus, arba audinių preparatus *ex vivo*, tuo tarpu gyvoje žmogaus širdyje atliktų laidumo audinių tyrimų spektroskopiniais metodais nepavyko rasti.

VI. LITERATŪROS APŽVALGA

Sveikatos informacijos centro duomenimis trys pagrindinės mirties priežastys Lietuvoje yra kraujotakos sistemos ligos, piktybiniai navikai ir išorinės mirties priežastys [1]. 2011 m. tai sudarė 85,1 proc. visų mirties priežasčių. Nuo kraujotakos sistemos ligų mirė daugiau nei pusė t.y. 56,3 proc. Taigi, kraujodaros organų ir kraujagyslių sistemos ligos vis dar yra dažniausia mirties priežastis Lietuvoje. Analogiška situacija stebima ir visame pasaulyje [2]. Tai yra susiję su išsivysčiusiame pasaulyje gyvenančių žmonių gana pasyviu gyvenimo būdu bei netinkama mityba. Tam tikrais atvejais, dėl vis dar trūkstančių žinių apie širdies anatomiją ir veiklą, širdies veiklos sutrikimo priežastys taip ir lieka neaiškios. Dažniausiai sveikatos sutrikdymus sukėlusios priežastys yra šalinamos atliekant chirurginę intervenciją, kurios metu atsiranda galimybė pažeisti laidžiąją širdies sistemą, kuri vizualiai nėra matoma. Dėl to negrįžtamai sutrinka ritmingas širdies darbas ir pacientą gali ištikti mirtis [3-6,46]. Pagrindinė su tuo susijusi problema, jog kol kas nėra tiksliai aiškus visų ŠLS dalių išsidėstymas, o patikimų vaizdinimo metodų taipogi neegzistuoja.

Šiai dienai audinių tyrimui ir vaizdinimui yra taikoma daugybė metodų, tame tarpe įvairios tomografijos, ultragarsinės sistemos, įgalinančios gauti trimačius vaizdus, tačiau labai specifinių, nedaug vienas nuo kito besiskiriančių audinių vaizdinimui yra naudojama mikroskopinė analizė arba įvairūs dažymai panaudojant tam tikrus žymenis. Be jokios abejonės, mikroskopinė audinių analizė vis dar išlieka auksiniu standartu atpažįstant audinių tipus ar nustatant diagnozę, tačiau tam tikrais atvejais, kuomet informacija apie tiriamą vietą yra reikalinga nedelsiant, toks metodas nėra tinkamas. Šis metodas taip pat turi savų trūkumų tiriant ir *ex vivo* audinius, kadangi mikroskopavimui skirtų preparatų paruošimo metu yra sudarkoma natūrali audinio struktūra, taip kartais prarandant dalį informacijos. Daugeliu atvejų, mikroskopiniam ištyrimui atiduotų organų tolimesnis anatomicinis

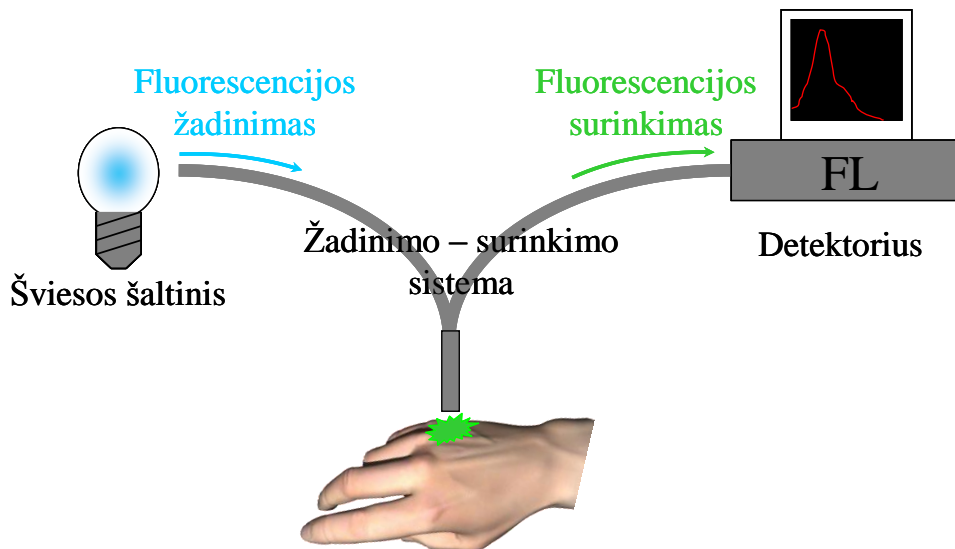
tyrimas taip pat būna sudėtingas, todėl vis didesnis dėmesys yra skiriamas alternatyviems bei neinvazyviems – optiniams tyrimo metodams, dažnai pristatomiems kaip optinė biopsija.

6.1 Optinė biopsija

Optinė biopsija – tai neinvazinis diagnostikos metodas, paremtas audinių optinių savybių tyrimu [47,26]. Plačiąja prasme optinė biopsija apima visus tyrimo metodus, kuriuose informacija apie tiriamą objektą yra gaunama naudojant optines sistemas. Žodžiu biopsija yra nurodoma, kad informacija turi būti gaunama nebe viso žmogaus ar atskirų organų lygiu, o audinių struktūros, sudėties ar net ląstelinio ir dar smulkesnio baltyminės sudėties lygiu. Optinės biopsijos metode gali būti naudojama tiek fluorescencinė spektroskopija, tiek optinė koherentinė tomografija, tiek infraraudonasis ar fotosensibilizuotas vaizdinimas, mikroskopija *in vivo* ir kt.[20-26]. Dažniausiai optinės biopsijos procedūrai yra naudojamas fluorescencinės spektroskopijos metodas. Fluorescencija tai yra audinio atsakas į apšvietus/sužadintus atitinkamos spalvos/bangos ilgio šviesa. Biologiniam audiniui būdinga savitoji (auto) fluorescencija, kurią sąlygoja jame esantys natūralūs fluoroforai. Daugumos endogeninių fluoroforų fluorescencija yra susijusi su audinių struktūra ir biologiniame objekte vykstančiais metaboliniais vyksmais, todėl savitoji audinių fluorescencija gali atspindėti tiek ligos pažeistą audinį, tiek išryškinti audinio morfologinius ar metabolinius specifiškumus, kurie sunkiai nustatomi kitais būdais. Kai audinyje esančių endogeninių fluoroforų fluorescencija nėra pakankamai informatyvi, galima panaudoti selektyviai tam tikruose audiniuose besikaupiančias medžiagas – sensibilizatorius ir stebėti indukuotą fluorescenciją. Pavyzdžiui, navikinių susirgimų atvejais sensibilizatorius susikaupia vėžiniame audinyje ir apšvietus tam tikro bangos ilgio spinduliuote, kurią sugeria sensibilizatorius, stebimas naviko švytėjimas. Pakankamai nesena, tačiau labai perspektyvi diagnostikos sritis yra fluorescencinis vaizdinimas panaudojant selektyviai susikaupiančius fluorescuojančius

žymenis. Tokiu atveju dėka selektyvios antikūno-antigeno sąveikos žymuo susikaupia tik tam tikroje vietoje ir stebint jo liuminescenciją identifikuojama dominančios vietos lokalizacija.

Principinė optinės biopsijos schema yra pateikta 6.1.1 pav. [48]. Pagrindiniai optinės diagnostinės aparatūros elementai yra šviesos šaltinis, skirtas fluorescencijos žadinimui, detektorius, kuris užregistruoja optinį signalą bei žadinimo–surinkimo sistema, kuria žadinančioji spinduliuotė yra nuvedama iki audinio ir surenkama audinio fluorescencija. Kiekvienas iš šių elementų atlieka labai svarbų vaidmenį ir priklausomai nuo atliekamos užduoties gali arba turi būti keičiamas.



6.1.1 pav. Optinės biopsijos schema [48]

6.1.1 Fluorescencija

Fluorescencija - tai viena iš atskirų liuminescencijos atvejų. Pagal dalelių sužadavimo pobūdį liuminescencija būna kelių rūšių:

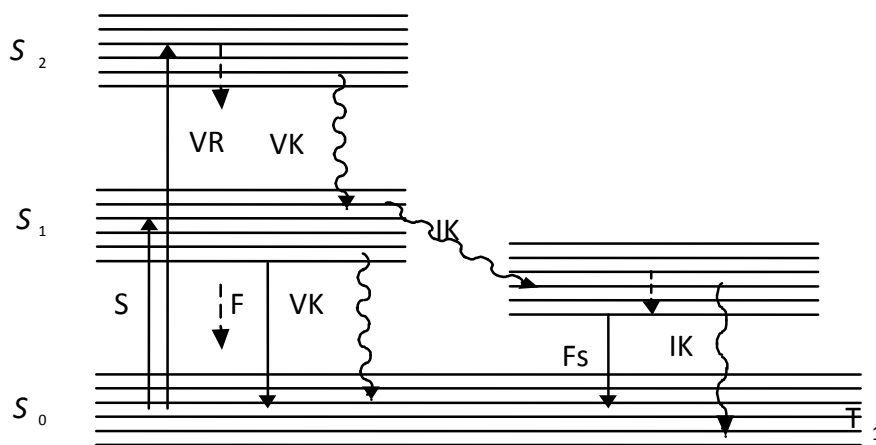
- fotoluminescencija – medžiaga švyti sugėrusi ultravioletinę ar regimąją spinduliuotę;

- chemiluminescencija – kai švytėjimą sukelia savitos cheminės reakcijos;

- rentgenoluminescencija – švytėjimas sugėrus rentgeno spinduliuotę;

- elektroluminescencija – švytėjimas sukeltas stipraus elektrinio lauko.

Pagal švytėjimo trukmę liuminescencija skirstoma į fluorescenciją bei fosforescenciją. Tiek fluorescencija, tiek ir fosforescencija pašalinus sužadinančiąją šviesą išnyksta ne akimirksniu, bet trunka ilgesnį arba trumpesnį laiką. Laikas, per kurį švytėjimas susilpnėja e kartų, vadinamas švytėjimo trukme. Fluorescencijos trukmė yra apie 10^{-9} - 10^{-8} s, o fosforescencija trunka nuo 10^{-6} iki 1s. Abu šie reiškiniai aiškinami molekulės relaksacija iš sužadinto singuletinio ir tripletinio lygmenų (6.1.1.1 pav.)



(S – sugertis, F – fluorescencija, VR – virpesinė relaksacija, VK – vidinė konversija, IK – interkombinacinė konversija, Fs – fosforescencija)

6.1.1.1 pav. Organinės molekulės energijos lygmenų Jablonskio diagrama.

Molekulė, sugėrusi šviesos kvantą, tampa sužadinta – išorinės orbitalės elektronas peršoka į vieną iš laisvų molekulės elektroninių lygmenų. Tokia molekulės būseną yra nestabili, todėl per labai trumpą laiką ji grįžta į pagrindinę būseną, perteklinę energiją atiduodama aplinkinėms molekulėms, transformuodama ją į savo atomų virpesinę ir rotacinę energiją, arba

išspinduliuodama energiją šviesos kvanto pavidalu, t.y., liuminescuodama. Relaksacija iš aukštesnių sužadintų būsenų vyksta pakopomis – pradžioje sužadintos molekulės nespinduliniu keliu per $\sim 10^{-13}$ s relaksuoja į pirmo sužadinto elektroninio lygmens nulinį virpesinį polygmenį. Toks nespindulinis šuolis tarp elektroninių lygmenų vadinamas vidine konversija. Iš žemiausio sužadinto energinio lygmens S_1 galimi trys relaksacijos vyksmai: vidinė konversija iš $S_1 \rightarrow S_0$ (energija atiduodama aplinkai), interkombinacinė konversija $S_1 \rightarrow T_1$ (pakinta būsena – iš singletu į tripletą) ir fluorescencija – molekulės grįžimas į pagrindinę būseną išspinduliuojant fotoną. Šių vyksmų tikimybės priklauso nuo molekulės simetrijos ir taip pat nuo S_1 ir S_0 lygmenų energijų skirtumo. Kuo ΔE didesnis, tuo vidinės konversijos $S_1 \rightarrow S_0$ tikimybė mažesnė, o fluorescencijos tikimybė didesnė. Taigi fluorescencijos tikimybė (tuo pačiu ir kvantinis našumas) priklauso nuo konkuruojančių vyksmų, kurie mažina sužadintojo S_1 lygmens užpildą.

Bet kuri fluorescuojanti molekulė pasižymi tik jai būdingu spektru, kurio forma nepriklauso nuo žadinančios bangos ilgio. Kaip taisyklė, molekulė fluorescuoja iš žemiausio virpesinio pirmosios sužadintos elektroninės S_1 būsenos lygmens. Iš aukštesniųjų elektroninių lygmenų paprastai vyksta tik nespinduliniai šuoliai [49].

Dėl šiluminių energijos nuostolių, atsirandančių vidinės konversijos metu, fluorescencijos spektras pasilenka į raudonąją pusę sugerties spektro atžvilgiu, tačiau fluorescencijos juosta dalinai persikloja su sugerties juosta. Tai sritis, kurioje molekulė išspinduliuoja didesnės energijos kvantą nei sugėrė. Pagal energijos tvermės dėsnį taip gali atsitikti tik tada, kai trūkstamą energijos dalį molekulė kompensuoja virpesinės energijos sąskaita.

Kiekvienas daugiaatomių molekulių elektroninis energijos lygmuo turi daug virpesinių, rotacinių polygmenų. Spinduliniai šuoliai galimi iš S_1 sužadinto elektroninio lygmens žemiausio virpesinio polygmens į pagrindinio S_0 lygmens skirtingus virpesinius polygmenis. Šių šuolių energija skiriasi, todėl fluorescencijos spektrų juostos yra išplitusios.

Sugertos energijos kiekis pagal Lamberto – Bugero – Bero dėsnį lygus:

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

čia $\varepsilon c l = D$ – bandinio optinis tankis.

Iš viso sugerto šviesos kiekio, fotonų dalis, priklausanti nuo fluorescencijos kvantinio našumo φ , bus išspinduliuota įvairaus bangos ilgio bangų pavidalu įvairiomis kryptimis. Šviesos filtrais arba monochromatoriumi galima išskirti gerokai siauresnės spektrinės srities šviesą, kuri gali būti registruojama kaip fluorescencijos intensyvumas:

$$I_{fl} = K \varphi I_0 (1 - 10^{-\varepsilon c l}).$$

I_{fl} proporcingas žadinančios spinduliuotės intensyvumui I_0 , kvantiniam našumui φ , sugerties koeficientui $(1-T)$. Konstanta K priklauso nuo fluorescencijos surinkimo kampo, spektro pločio, atkertamo monochromatoriumi arba filtrais ir detektoriaus jautrumo.

Bendru atveju fluorescencijos intensyvumas, kaip ir sugerties koeficientas, nėra proporcingas koncentracijai c , tačiau toks proporcingumas įmanomas bandiniuose, turinčiuose mažą optinį tankį ($D \leq 0,1$). Esant tokioms sąlygoms galima naudoti artinį, kuris gaunamas I_{fl} išraišką išskleidus eilute ir paėmus pirmąjį jos narį:

$$I_{fl} \approx I_0 \cdot 2,3K \varphi D = I_0 \cdot 2,3K \varphi \varepsilon c l.$$

Tokiu būdu, esant mažam medžiagos optiniam tankiui, fluorescencijos intensyvumas proporcingas fluorescuojančios medžiagos koncentracijai [50]. Tuo ir yra grindžiama kiekybinė fluorescencinė analizė. Eksperimento metu matuojamas fluorescencijos intensyvumas I_1 medžiagos, kurios koncentracija c_1 yra žinoma, tada matuojamas tiriamojo bandinio fluorescencijos intensyvumas I . Bandinyje esančių fluorescuojančių dalelių koncentracija lygi:

$$c = c_1 \frac{I}{I_1}.$$

Dėka skirtingos fluoroforų koncentracijos audiniuose, stebimi skirtingo intensyvumo tų audinių fluorescencijos spektrai.

6.1.2 Audinių liuminescencija

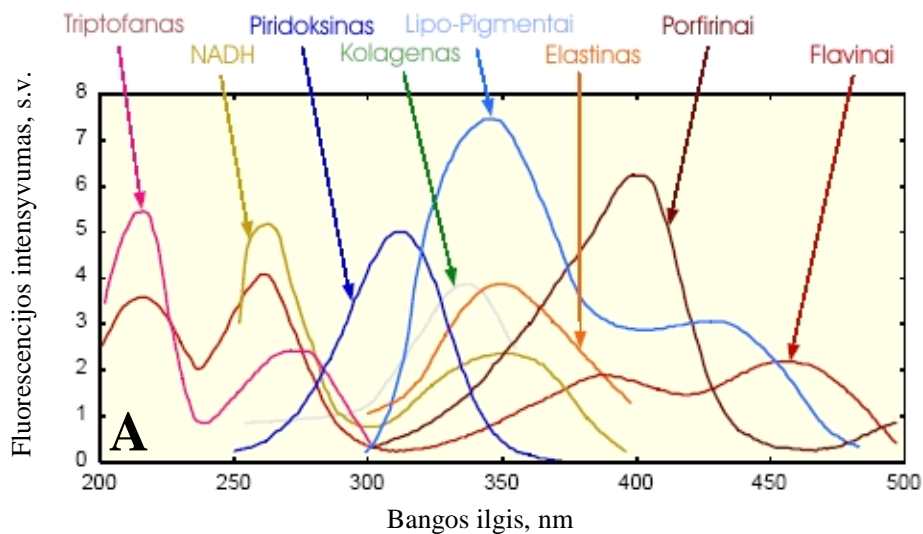
Audiniai liuminescuoja dėl juose esančių fluorescuojančių molekulių – fluoroforų. Vieni pagrindinių biologinio audinio komponentų, kurių fluorescenciją galima panaudoti diagnostikoje, yra baltymai. Lipidai, membranos, sacharidai iš esmės ne fluorescuoja, o dezoksiribonukleininės rūgšties (DNR) fluorescencija yra per silpna, kad ją būtų galima panaudoti praktiškai. Baltymų fluorescenciją sąlygoja branduolį sudaro baltymuose esančios aromatinės amino rūgštys – fenilalaninas (Phe), tirozinas (Tyr) ir triptofanas (Trp). Svarbi baltymų struktūros ypatybė yra ta, kad trys fluorescuojančios amino rūgštys baltymuose yra santykinai retos. Trp, kuris yra pagrindinis fluoroforas, sudaro apie 1% amino rūgščių kiekio. Baltyme gali būti viena arba kelios Trp liekanos (radikalai). Trp emisijos spektras labai priklauso nuo aplinkos, todėl baltyme esant didesniam radikalų kiekiui, fluorescencijos spektras tampa sudėtingesnis, nes skiriasi kiekvienos liekanos aplinka.

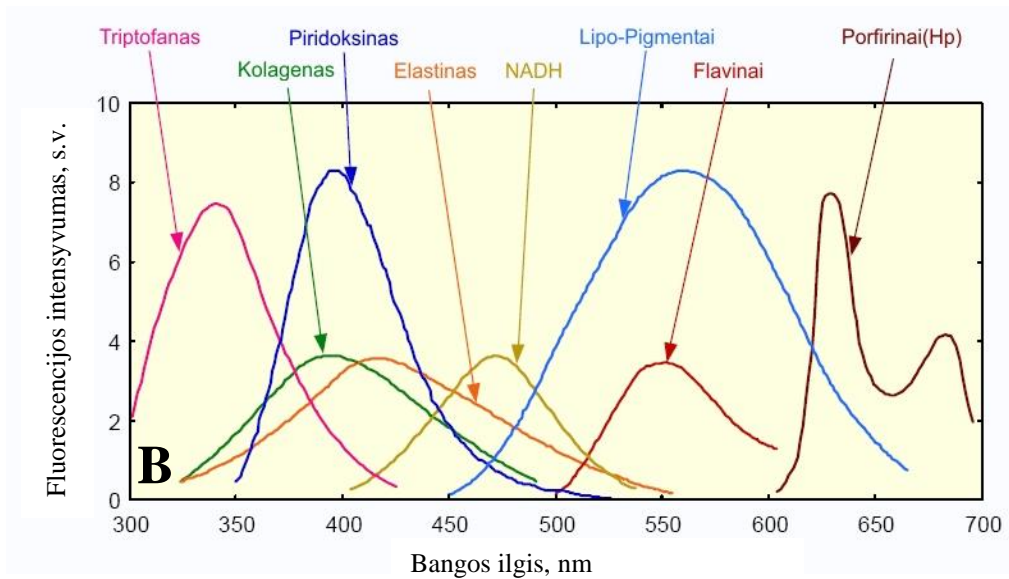
Iš visų amino rūgščių intensyviausiai fluorescuoja Trp, kuris turi didžiausią ekstinkcijos koeficientą. Dėl plačios Trp sugerties srities, energija, sugerta Tyr ir Phe, dažnai yra perduodama Trp liekanoms, esančioms tame pačiame baltyme. Phe sugeria trumpiausių bangos ilgių šviesą. Jo fluorescencijos juostos smailė yra ties 282 nm. Vandeninis Tyr tirpalas intensyviausiai fluorescuoja ties 303 nm. Šios amino rūgšties fluorescencija beveik nepriklauso nuo tirpiklio poliškumo. Trp vandeninis tirpalas turi fluorescencijos juostos smailę ties 350 nm, kuri yra labai jautri tirpiklio poliškumui ir aplinkos pokyčiams [51].

Baltymų fluorescencija įprastai yra sužadinama šviečiant 280 nm ar ilgesnių bangos ilgių spinduliuote, o fluorescencija stebima 300 – 430 nm srityje, tačiau šviečiant ultravioletine ar net matoma šviesa deguonimi prisotintus Trp vandeninius tirpalus jų fluorescencijos juosta slenka į ilgesniųjų bangų pusę. Poslinkis priklauso nuo švitinimo laiko. Šiuos pokyčius sąlygoja indolo žiedo destrukcija, kurios metu susidaro keletas naujų molekulių, tame

tarpe ir N-formilkinureninas (FKN), kinureninas (KN) ir 3-hidroksikinureninas. FKN fluorescuoja ties 430 nm. KN, kuris gaunamas po tolimesnės Trp oksidacijos, fluorescuoja 450 nm srityje [51,52].

Dauguma endogeninių fluoroforų yra susiję su struktūrine audinių matrica, arba ląstelių metabolizmo procesais. Ląstelėse pagrindiniai fluoroforai yra lokalizuoti mitochondrijose ir lizosomose. Tai yra aromatinės amino rūgštys, lipopigmentai, NADPH bei įvairūs kofermentai. Fluoroforai, įtraukti į ląstelių metabolizmo procesus, turi redukuotų nikotinamido adenino dinukleotidų (NADH) ir flavinų, kurie taip pat randami mitochondrijose ir citoplazmoje. NADH fluorescencijos smailė matuojant audiniuose *in vivo* yra ties 500 nm, flavinų – ties 550 nm [53,54]. Tarpląsteliniam matrikse pagrindiniai fluoroforai yra kolagenas ir elastinas, kurių fluorescencija yra susijusi su skersiniais ryšiais (cross - linking) tarp amino rūgščių [54,55]. Kolagenas fluorescuoja 330 – 510 nm spektrinėje srityje (smailė ties 390 nm), o elastinas – 330 – 550 nm srityje (smailė ties 410 nm). Šių dviejų fluoroforų fluorescencijos kvantinis našumas, palyginus su kitais endogeniniais fluoroforais, yra aukščiausias, todėl ir įnašas į bendrą audinio fluorescencijos spektrą yra didžiausias [54]. Pagrindinių audinio fluoroforų fluorescencijos žadinimo bei fluorescencijos spektrai pateikti 6.1.2.1 paveiksle.





6.1.2.1 pav. Pagrindinių audinio fluoroforų fluorescencijos žadinimo (A) bei fluorescencijos (B) spektrai [56]

Kiti endogeniniai fluoroforai savo sudėtyje turi aukščiau minėtų aromatinių amino rūgščių (Trp, Tyr, Phe), kurių fluorescencija stebima 300 – 430 nm spektrinėje srityje. Įvairūs porfirinai fluorescuoja 600 – 700 nm srityje. Galutiniai lipidų metabolizmo produktai – lipopigmentai (keroidai, lipofuscina) – fluorescuoja 450 – 660 nm spektrinėje srityje (smailė apie 550 nm) [54,55].

Gausybė audinyje esančių fluorescuojančių medžiagų leidžia panaudoti fluorescencinę spektroskopiją diagnozuojant įvairius susirgimus, susijusius su atitinkamų fluoroforų fluorescencijos spektrų pokyčiais, tačiau būtent dėl persiklojančių žadinimo bei fluorescencijos spektrų šių duomenų analizė yra labai sudėtinga, todėl tiriant bandinį žadinimo šviesos bangos ilgis parenkamas atsižvelgiant į tai, kokių fluoroforų tiriamame audinyje daugiausia bei kurie fluoroforai atsakingi už spektro charakteringumą.

Pagrindinės fluoroforų savybės, į kurias reiktų atsižvelgti analizuojant audinių fluorescencijos spektrus:

a) kiekvienas fluoroforas turi specifinius sugerties bei fluorescencijos spektrus;

b) bet kuriame audinyje yra mišinys įvairių fluoroforų su skirtingomis koncentracijomis;

c) fluoroforai yra netolygiai pasiskirstę audinyje, ypač skiriasi fluoroforų koncentracijos einant gilyn į audinį. Taigi, audinio fluorescencijos spektras, bus sudarytas iš skirtingo fluoroforų indėlio kiekviename sluoksnyje.

Susirgimų diagnostika naudojant savitosios fluorescencijos metodą priklauso nuo vieno ar kelių veiksnių:

1) fluoroforų koncentracijos, arba pasiskirstymo tam tikrame tūryje pakitimo [25,53,57,58].

2) medžiagų apykaitos pakitimų (pvz.: NADH fluorescuoja tik redukuotas) [25,53,57,59].

3) biocheminės/biofizikinės audinio mikroaplinkos pakitimų, kurie įtakoja fluoroforų skaičių, fluorescencijos spektro smailių pakitimus ir juostų pločius.

4) audinio architektūros pakitimai, pavyzdžiui raumeninio sluoksnio plonėjimas [60].

5) fluorescencijos signalo silpnėjimas, susijęs su molekulių nespinduline relaksacija [51,55].

6.1.3 Fluorescencijos taikymas diagnostikoje

Pagal diagnostikoje naudojamų audinio fluoroforų prigimtį fluorescencinės diagnostikos metodus galima suskirstyti į dvi pagrindines grupes:

1. Savitoji fluorescencija – metodų visuma, pagrįsta audiniuose esančių endogeninių fluoroforų fluorescencijos registravimu. Registruojant endogeninių fluoroforų fluorescenciją galima charakterizuoti pakitusios sistemos (lyginant su atitinkama normalia sistema) fiziologinę būseną, detektuoti mikroskopinius piktybinius audinių pakitimus, nepakenkiant aplinkiniams audiniams.

2. Sensibilizuota fluorescencija – metodai, kuriuose audinių fluorescencija sensibilizuojama (jautrinama) panaudojant selektyviai

besikaupiančius egzogeninius fluoroforus arba liuminescuojančius žymenis (pvz. nanodalelės) arba medžiagas, indukuojančias endogeninių fluoroforų sintezę (pvz. ALA inicijuota PpIX sintezė). Sensibilizuotos diagnostikos metodai dažnai taikomi kartu su terapija ir padeda sekti terapijos eigą, nustatyti naviko išplitimą, matmenis bei išryškinti (vizualizuoti) naviko kraštus [61,62].

Pagal naudojamų šviesolaidinių sistemų geometriją fluorescencinės diagnostikos metodus galima suskirstyti į paviršinę diagnostiką bei giluminę diagnostiką. Šiuo metu pateikiami rezultatai dažniausiai remiasi paviršinės diagnostikos metodais, kuomet registruojama fluorescencija yra mišinys visų fluorescencijos signalų ateinančių iš įvairių audinio gylių.

Informacija apie audinių optines savybes gaunama dviem metodais – matuojant audinių fluorescencijos bei fluorescencijos žadinimo spektrus. Fluorescencinio spinduliavimo spektroskopijoje eksperimento metu žadinimo bangos ilgis yra pastovus, o fluorescencijos intensyvumas registruojamas plačioje spektrinėje srityje. Fluorescencijos žadinimo spektroskopijoje intensyvumas registruojamas ties vienu pasirinktu bangos ilgiu, o žadinančios spinduliuotės bangos ilgis keičiamas pasirinktoje audiniui būdingoje sugerties spektro srityje. Idealiu atveju, jei nėra energijos pernašos tarp audinyje esančių fluoroforų, žadinimo spektras turėtų atitikti sugerties spektrą. Kadangi audinyje yra labai didelis kiekis sugeriančiųjų bei sklaidančiųjų elementų, todėl sugerties spektroskopijai reikalingi specialiai paruošti itin ploni bandiniai, o fluorescencijos žadinimo metodika yra neinvazinis tyrimo metodas kurį labai patogu taikyti nustatant audinių sugerties spektrus *in vivo*.

Fluorescenciniai diagnostiniai metodai šiuo metu jau yra taikomi klinikoje, įvairių lokalizacijų navikams diagnozuoti ar išplitimo riboms nustatyti:

- a) Šlapimo pūslės tyrimams. Įvedama 5 – (δ) aminolevulino rūgštis (ALA), kuri inicijuoja protoporfirino IX (PpIX) gamybą. Pašvietus spinduliuote, kurią sugeria sensibilizatorius, naviko fluorescencija matoma plika akimi [63].

- b) Ankstyvųjų vėžio stadijų aptikimui bronchuose bei plaučiuose. Taip pat naudojami sensibilizatoriai – hematoporfirino dariniai (HpD) arba fotofrinas. Šiuo metu mėginama naudoti ALA aerozolio pavidalo [64]. Gauti geri rezultatai ALA naudojant burnos gleivinės pažaidų aptikimui [65].
- c) Virškinamojo trakto susirgimų detekcijai bei diferenciacijai. Jų gydymui naudojama FNT [66].
- d) Galvos ir kaklo navikų aptikimui. Registruojama audinių savitoji fluorescencija. Taip pat stebėti ALA indukuoto PpIX fluorescencijos intensyvumo skirtumai sveikame ir navikiniame audinyje [67].
- e) Ginekologijoje. Pagrindinė sritis yra gimdos kaklelio ankstyvųjų vėžinių susirgimų aptikimas [68,69].
- f) Krūties vėžio diagnostikai. Krūties vėžys atsiranda gilesniuose audinių sluoksniuose, ir neinvaziniais metodais negalima gauti tikslios informacijos. Fluorescencijos metodas dažniausiai taikomas naviko aptikimui bei jo ribų nustatymui [69].
- g) Smegenų navikų aptikimui. Labai dažna mirties nuo smegenų vėžio priežastis yra pakartotinis naviko atsiradimas operuotoje vietoje, todėl spektroskopiniais diagnostikos metodais stengiamasi kuo tiksliau nustatyti naviko ribas. Tam naudojama ALA indukuota PpIX fluorescencija [70,71].
- h) Odos susirgimų diagnostikai bei klasifikacijai. Šiuo metu odos susirgimai dažniausiai nustatomi labai paprastu būdu – vizualiai apžiūrint, ir, jeigu audinys atrodo įtartinas, imama biopsija arba iš karto atliekama operacija. Tik nedaugeliu atvejų taikomi fluorescenciniai metodai, nes odos fluoroforų autofluorescencija dar nėra tinkamai ištirta. Pastaruoju metu atliekama eilė eksperimentų, skirtų odos savitosios fluorescencijos tyrimui [72].
- i) Aterosklerotinių pažaidų aptikimui kraujagyslėse. Kadangi aterosklerozė yra lėtinė arterijų liga, tai jos aptikimas pradinėje, dar nepavojuingoje stadijoje, padėtų išvengti didesnių kraujotakos sutrikimų bei sudėtingų

operacijų. Daugiausia žadantys yra fluorescencijos gyvavimo trukmių matavimų rezultatai [33,73].

Kaip taisyklė, jei diagnostikai yra naudojamas išorinis sensibilizatorius (fotosensibilizatorius), po fotosensibilizuotos diagnostikos yra taikoma FNT. Toks metodas puikiai tinka ir įprastinių operacijų metu – stebint navike susikaupusio sensibilizatoriaus fluorescenciją operacijos metu galima matyti naviko kraštus ir pagal tai koreguoti operacijos eigą, taip pat po operacijos yra švitinamas naviko guolis, taip sunaikinant ir galimai likusias pavienes naviko ląsteles [74].

Nors optinė biopsija yra labai patraukli, jautri ir palyginti nesudėtingai atliekama diagnostinė procedūra, jos taikymas yra komplikuoatas dėl gausybės fluorescuojančių, sklaidančių ir sugeriančių molekulių audinyje. Pagrindinė užduotis prieš įvedant šį metodą į kliniką yra susijusi su spektrinės srities selektyviam tiriamojo objekto fluorescencijos žadinimui bei registravimui nustatymu. Ieškant tinkamų tyrimo sąlygų yra naudojama sistema, kuria galima registruoti fluorescencijos spektrus *in vivo*, keičiant žadinimo spinduliuotės bangos ilgus. Tokiu būdu yra sudaroma fluorescencijos žadinimo – emisijos matrica, kuri apibūdina įvairių fluoroforų indėlį tam tikrame spektriniame ruože [75]. Deja, bet selektyvių sričių nevisada pavyksta surasti, todėl yra pasitelkiami sudėtingi spektrinių duomenų analizės metodai, kuriamos įvairios metodikos ar galiausiai yra įvedami išoriniai žymekliai.

6.2 Širdies anatomija

Širdis yra fibro-raumeninis organas varinėjantis kraują po organizmą. Širdies sandara bei funkcijos yra nustatytos jau seniai. Pagrindinės širdies ertmės yra prieširdžiai ir skilveliai. Į dešinįjį prieširdį suteka kraujas iš kūno, o į kairįjį iš plaučių. Susitraukdami prieširdžiai pripildo skilvelius, tuo tarpu dešinysis skilvelis susitraukdamas išstumia kraują į plaučius, o kairysis – į kūną. Taip susidaro kraujotakos ratas. Tvarkingą ir ritmingą atskirų širdies dalių susitraukimą kontroliuoja širdies laidžioji sistema. Kryptingam ir

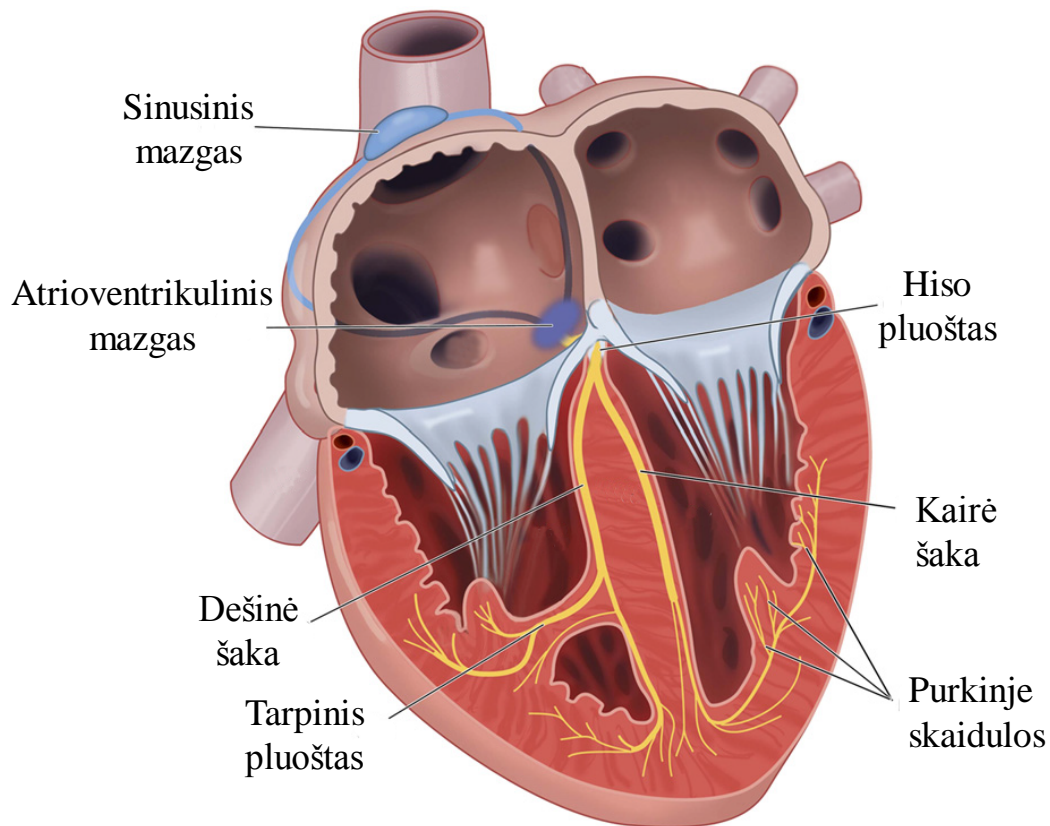
efektyviam kraujo cirkuliavimui palaikyti širdyje ir kraujagyslėse yra sudėtingos vožtuvų sistemos.

Širdies audinį galima suskirstyti į tris pagrindinius tipus, nuo kurių priklauso širdies struktūra bei funkcijos. Tai didžiausią širdies audinio masę užimantis raumuo – miokardas; širdies “skeletą” formuojantis jungiamasis audinys, kuris sudaro pagrindą MK ląstelių tvirtinimuisi ir augimui, o taipogi formuoja vožtuvų audinį [76,77]. Ir paskutinis tipas, užimantis palyginus nedidelę širdies audinio dalį, tačiau ypatingai svarbus širdies darbui yra laidumo audinys.

6.2.1 Širdies laidžioji sistema.

ŠLS yra specializuotas širdies audinys, generuojantis ir perduodantis bioelektrinį impulsą, sinchroniškai sužadinantį atskirų MK sričių susitraukimą [7,12,78]. Širdies laidžiosios sistemos išsidėstymas bei jos morfologinė kilmė visą laiką nuo pat jos atradimo buvo diskusijų objektas. Nebuvo nustatyti kriterijai, pagal kuriuos „laidumo“ ląsteles galima vienareikšmiškai atskirti nuo „susitraukiančiųjų“ ląstelių. Šiuolaikinių technologinių bei biocheminių įrankių pagalba buvo identifikuotos įvairių ŠLS dalių lokalizacijos, tačiau vizualiai, nenaudojant sudėtingų dažymo ir preparavimo metodikų, šios ląstelės vis dar yra neatskiriamos [17]. Šiuo metu jau yra neabejojama raumenine ŠLS kilme. Histologinių tyrimų metu ŠLS ląstelės yra atpažįstamos tik kaip turinčios mažiau miofibrilių ir daugiau glikogeno, tačiau kitokių specifinių struktūrinių ŠLS ląstelių komponentų, skiriančių jas nuo paprasto miokardo nėra [79]. Nepaisant raumeninės kilmės ši sistema yra unikali ir atlieka tik jai vienai visame žmogaus organizme būdingą funkciją – inicijuoja ir valdo širdies plakimo ritmą ir atskirų jos dalių susitraukimo eiliškumą, kas yra būtina palaikant efektyvią kraujo tėkmę. ŠLS ląstelės sudaro tinklą iš vientisų pluoštų, izoliuotų nuo MK jungiamuoju audiniu. ŠLS pagal morfologiją ir funkciją nėra vienalytė, atskiros dalys pasižymi tik joms būdingomis savybėmis ir funkcijomis. Pagrindinės ŠLS sudarančios dalys yra sinusinis mazgas,

atrioventrikulinis mazgas, Hiso pluoštas ir Purkinje skaidulos (6.2.1.1 pav.) [80,81].



6.2.1.1 pav. Širdies laidžiosios sistemos išsidėstymas širdyje [Adaptuota iš 79]

Bioelektrinis impulsas, vadinamas ritmo vedliu, yra spontaniškai generuojamas SA mazge, kuris yra lokalizuotas dešiniajame prieširdyje. Nors širdies MK ląstelės gali susitraukti ir be išorinio stimulo, tačiau tvarkingą MK susitraukimą inicijuoja būtent SA ląstelės, kurių susižadinimo dažnis yra didžiausias. Vedantysis potencialas yra generuojamas lėtos, diastolinės depoliarizacijos, reguliuojamos keletu skirtingų joninių srovių, tame tarpe T- ir L- tipo kalcio srovių [82,83]. SA mazgo dominavimą lemia „sekinantis slopinimas“ – MK ląstelės depoliarizuojamos iš SA sklindančiu impulsu anksčiau nei lėta MK ląstelės depoliarizacija pasieks slenkstinį lygį. SA mazgo funkcijos sutrikimai pirmiausia pasireiškia plakimo ritmo sulėtėjimu –

bradikardija. Taipogi pasireiškia visišku SA signalo prapuolimu, nereguliais širdies susitraukimais ar tachikardija [84].

SA mazge sugeneruotas potencialas toliau plinta laidžiąja sistema iki AV mazgo, lokalizuoto ties tarpširdinės pertvaros pagrindu. AV mazge impulsas yra sulėtinamas ir tuo metu spėja susitraukti prieširdžiai, taip išstumdami kraują į skilvelius. Taigi viena iš pagrindinių AV mazgo funkcijų yra bioelektrinio impulso užlaikymas [85]. Tuo pačiu AV mazgas apsaugo skilvelius nuo dažno susitraukinėjimo esant prieširdžių aritmijai, o taip pat gali atlikti ritmo vedlio funkcijas sutrikus SA mazgo veiklai [85]. Toliau elektrinis sužadimas keliauja į skilvelius. Sveikoje širdyje yra vienintelis kelias, kuriuo impulsas iš AV mazgo praeina per prieširdžių-skilvelių jungtį. Tai Hiso pluoštas. Impulso sklidimas šiuo pluoštu yra greičiausias ir siekia 5 m/s [86,87]. Šis pluoštas turi dešinę ir kairę šakas, kuriomis elektrinis sužadimas yra perduodamas į skilvelius. Skilveliuose impulsas sklinda Purkinje skaidulų tinklu. Impulsui pasiekus Purkinje skaidulų pabaigą, per likusią skilvelių sienelę jis plinta miokardo ląstelėmis. Taigi pagrindinė laidžiosios sistemos skilveliuose funkcija yra greitai perduoti elektrinį sužadimą skilvelių MK ląstelėmis [88]. MK taip pat yra randama išsibarsčiusių specializuotų ląstelių, kurios skiriasi savo elektrofiziologinėmis savybėmis bei molekuline sudėtimi lyginant su paprastais kardiomiocitais [89-91]. Kai kurių genų, būdingų raumeninėms ląstelėms, raiška šiose ląstelėse yra prislopinta, tuo tarpu genų, susijusių su nerviniu audiniu, raiška yra padidėjusi. Jose yra aptinkama koneksino Cx40, kuris yra HP ir Purkinje ląstelėms būdingas baltymas ir yra atsakingas už greitą bioelektrinio impulso perdavimą tarp ląstelių. Šios specializuotos ląstelės yra tarsi tarpinis variantas tarp laidumo ir raumeninių ląstelių [92-98].

Anatominiai ir fiziologiniai bioelektrinio impulso laidumo faktoriai, kurie yra svarbūs impulso plitimui, yra skaidulų skersmuo ir geometrinis išsidėstymas, stimulo efektyvumas ir ląstelės sugebėjimas aktyvuotis. Kuo didesnis skaidulų skersmuo, tuo lengviau ir greičiau plinta impulsas, todėl Purkinje skaidulomis stimulus plinta greičiau nei paprastais kardiomiocitais.

Impulso sklaidimo greitis plintant išilgai skaidulų yra didesnis negu skersine kryptimi. Yra manoma, kad ŠLS gebėjimą maždaug dešimt kartų greičiau perduoti elektrinį impulsą lemia ir anatomiciniai, ir fiziologiniai ypatumai: skaidulų dydis ir geometrinis išsidėstymas, aukštesnis nei paprasto miokardo transmembraninis potencialas bei didesnis kanalų skaičius [7,17].

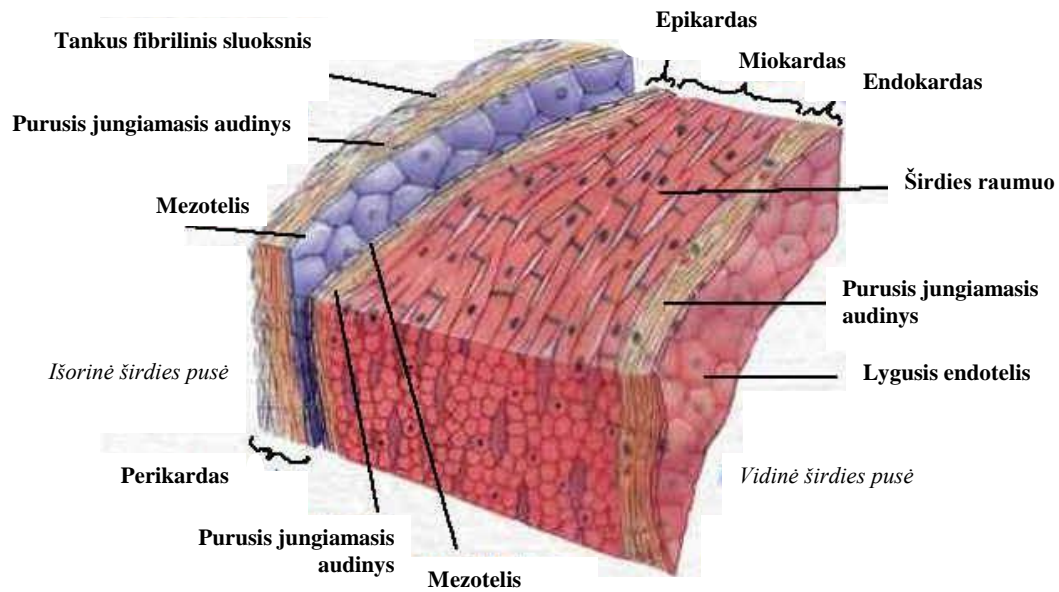
Pagrindiniai morfologiniai kriterijai, pagal kuriuos yra atpažįstamas ŠLS audinys, nustatyti dar 1910 metais:

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 [17,99].

Pastaruoju metu yra nustatyta daug žymenų, leidžiančių nudažyti ŠLS ląsteles įvairiose jos vystymosi stadijose [11], tačiau nei vienas iš jų nedažo tik ŠLS – daugeliu atvejų yra dažomas ir visas nervinis audinys [100]. ŠLS tyrimus apsunkina dar ir tai, kad besivystančioje širdyje (embrionuose) ŠLS zonų yra aptinkama daugiau, nei išsivysčiusioje širdyje [11].

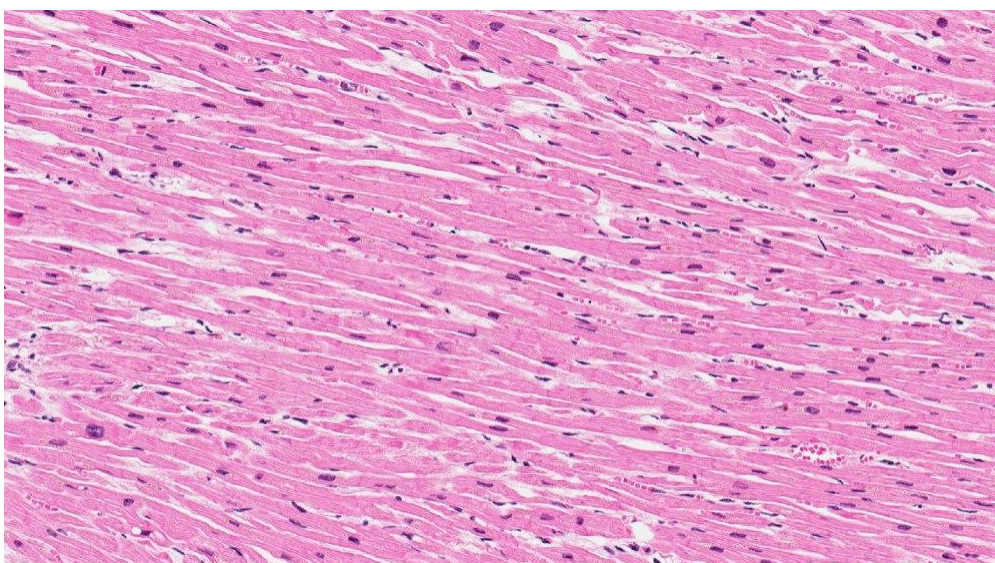
6.2.2 Miokardas

Gausiausias širdies audinys yra MK, kurio pagrindinė funkcija yra širdies sutraukimas. Šio proceso metu kraujas yra išstumiamas į kūną ir atitinkamus organus. ŠLS dažniausiai yra išsidėsčiusi MK fone, todėl labai svarbu vizualiai atskirti šiuos du audinius. Širdies sienelė sudaryta iš įvairių sluoksnių: išorinio apsauginio sluoksnio – perikardo, po juo esančio epikardo, miokardo ir endokardo, kuris dengia vidines širdies ertmes (6.2.2.1 pav.).



6.2.2.1 pav. Širdies sienelės skersinio pjūvio schema dešinio skilvelio viduryje [Adaptuota iš 101]

Gausiausias sienelės sluoksnis yra MK [76,77]. Širdies skersaruožio raumens ląstelės – miocitai – yra pailgos, zigzago pavidalo galais ir atskirtos viena nuo kitos struktūromis, kurios vadinamos įterptiniais (interkaliciniais) diskais, ir turinčios vieną branduolį ląstelės centre (6.2.2.2 pav.).



6.2.2.2 pav. Miokardo pluoštai išilginiame pjūvyje

Miocitai nesudaro vieningos ištisinės visumos, kaip buvo manoma anksčiau. Mikroskopinis skilvelių miokardo tyrimas rodo, kad miocitai sudaro atskirus sluoksnius su plačiais tarpais tarp jų. Kaip tokia struktūra įtakoja širdies elektrines savybes nėra aišku [102]. Morfologiškai širdies raumuo priklauso skersaruožiams raumenims, tačiau pagal kitus požymius jis užima tarpinę padėtį tarp skersaruožių ir lygiųjų. Baltymai sudaro apie 20 proc. visos raumenų masės. Viduląstelinius raumenų baltymus galima suskirstyti į vandenyje tirpius sarkoplazmos (raumeninių skaidulų citoplazmos) baltymus ir vandenyje netirpius fibrilinius miofibrilių (kontraktilinių baltymų kompleksas) baltymus. Sarkoplazmos baltymus sudaro glikolizės fermentai, azoto ir lipidų apykaitoje dalyvaujantys fermentai, baltymai, sujungiantys kalcį ir mioglobinas, nuo kurio priklauso raumenų spalva (funkcija-kaupiti raumenyse deguonį). Pagrindiniai miofibrilių baltymai (80 proc.) yra miozinas ir aktinas. Be jų, miofibrilėse yra dar keli, vadinamieji minoriniai baltymai – tropomiozinas (7 proc.), troponino kompleksas (5 proc.), a-aktininas ir kiti pagalbiniai baltymai. Miofibrilių baltymai tiesiogiai dalyvauja raumens susitraukimo metu.

Raumenyse, be anksčiau minėtų baltymų, yra mažos molekulinės masės organinių junginių, savo struktūroje turinčių azoto. Tai yra nukleotidai, kreatinas, kreatininas, fosfokreatinas, karnitinas, laisvosios amino rūgštys, amino rūgščių dariniai ir kt. Iš nukleotidų daugiausia yra adenino nukleotidų – ATP, ADP ir AMP. Vienam neišdžiovintam raumens gramui tenka apie 2,60 nmol ATP, 0,81 μmol ADP, 0,93 μmol AMP. Kitų nukleotidų: GTP, UTP ir CTP, yra dar mažiau.

Pagrindinė neazotinė organinė medžiaga raumenyse yra glikogenas. Jo kiekis raumenyse svyruoja nuo 0,3 proc. iki 2 proc. (dažniausiai yra apie 1 proc.).

6.2.3 Jungiamasis audinys

Jungiamasis audinys yra labai svarbus struktūrinis elementas. Šis audinys yra reikšmingas tiek viso organizmo, tiek atskiro organo, tiek jį sudarančių ląstelių mastu. JA yra atsakingas už organizmo mechaninį tvirtumą

bei judėjimą, organų formos palaikymą, audinių skysčių tekėjimą, ląstelių migraciją, žaizdų gijimą ir netgi dalyvauja metabolinių procesų kontrolėje [103,104]. JA ląstelės sudaro tik nedidelį kiekį viso jungiamojo audinio, todėl pagrindines savybes apsprendžia ne ląstelės, o tarpląstelinio matrikso pluoštų tipas, kiekis bei išsidėstymas. Tarpląstelinis matriksas pagrinde yra sudarytas iš tarpląstelių pluoštų, proteoglikanų ir glikoproteinų. Šie komponentai yra sintetinami ir palaikomi tik tam tikram audinio tipui būdingų specifinių ląstelių [103].

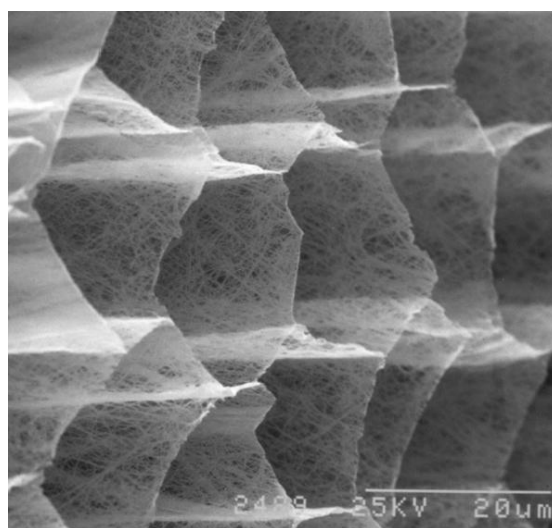
Širdyje JA taip pat yra labai svarbus audinys. Neskaitant struktūrinės JA funkcijos suformuojant širdies „skeletą“, JA taip pat supa ŠLS šakas ir izoliuoja laidumo ląsteles nuo MK. Pačiame MK jungiamojo audinio yra nedaug, tačiau jis yra esminis užtikrinant širdies mechanines savybes [105]. Širdies išorė ir vidinis paviršius taip pat yra padengti tam tikro tipo JA, o širdies viduje yra kraujo tėkmę reguliuojantys vožtuvai, kurių pagrindinė sudedamoji dalis yra JA. Taipogi yra nustatyta, kad širdies ritmo sutrikimai, tokie kaip laidumo defektai ir tachiaritmijos, yra glaudžiai susiję su JA ligomis [106].

Širdis yra daug JA turintis organas, todėl šio audinio reikšmė tiek širdies funkcijai, tiek atliekant optinius tyrimus yra labai svarbi. Širdyje yra sutinkama daug JA sudarančio kolageno tipų [107]. Ekstraląsteliniam MK matrikse yra 50-85 % kolageno I ir 10-45 % kolageno III [105,108]. Tuo tarpu širdies vožtuvo sudėtyje yra randama kolageno I (74%), kolageno III (24%) ir kolageno V (2%) [109]. Skirtingų lokalizacijų ar funkcijų JA sudėtis yra skirtinga, todėl tikėtina, kad gali skirtis ir jo optinės savybės. Šiuo metu nėra atlikta jokių tyrimų, susijusių su širdyje esančių skirtingų JA tipų fluorescencijos spektrais.

Širdies raumenyje tarpląstelinis purusis JA yra išsidėstęs panašiai kaip ir griaučių raumenyse [110]. Plonas išorinis JA apvalkalas dengia visą MK. Purusis JA (*premysium*) gaubia miocitų pluoštus, o JA tarpfluksinis (*endomysium*) jungia atskirus miocitus. *Premysium* ir *endomysium* JA sudėtyje dominuoja I ir III tipo kolagenai, *premysium* frakcijoje mažiau III tipo kolageno

nei *endomysium*. Jungiamasis audinys MK yra kelių skirtingų struktūrų. Susiformavusioje širdyje *premysium* struktūra yra kaip kolageno fibrilių raizginys, apgaubiantis miocitų pluoštus. *Endomysium* JA yra sudarytas iš kolageno atramų arba iš kolageno mikrogijų tinklelio – t.y. bazalinės laminos.

Nors tarpląstelinis JA matriksas įvairiuose audiniuose bei organizmuose turi labai skirtingas savybes, matrikso formavime dalyvauja medžiagos vos iš keleto junginių grupių. Vienas funkcinis požiūriu svarbiausių, gausiausiai tarpląsteliniam matrikse randamų ir visuose organizmuose sutinkamų junginių yra glikoproteinas kolagenas, kurio įvairios rūšys sudaro pagrindinę netirpių fibrilinių baltymų klasę. Didelė dalis kolagenų, tarp jų I, II, VI tipo, formuoja fibriles, kurios susijungia į storesnius, optiniu mikroskopu matomus kolageno siūlus. Tarpląsteliniam matrikse kolagenas formuoja stabilų tinklą. *Endomysium* atskiras raumens ląsteles skiriantis sluoksnis yra sudarytas iš plonų kolageno fibrilių pseudo-atsitiktinio tinklo (6.2.3.1 pav):



6.2.3.1 pav. Buliaus *sternomandibularis* raumens skersinio pjūvio, paveikto NaOH siekiant pašalinti raumeninės ląstelės turinį ir proteoglikanus iš tarpląstelinio jungiamojo audinio, mikronuotrauka, gauta skenuojančiu elektroniniu mikroskopu. [111]

Kolagenas iš kitų baltymų išsiskiria ypatingu atsparumu tempimui. Dėl specifinės trimatės struktūros kolagenas gali išsitemti tik apie 10% nuo pradinio savo ilgio [103]. Žmogaus organizme kolagenai sudaro 25% visų kūno baltymų. Šiuo metu yra žinoma 28 skirtingų pagal struktūrą ir atliekamas funkcijas kolageno tipų, tačiau atliekamos funkcijos dar nėra susietos su tam tikra, konkrečia chemine modifikacija [112]. Kiekvienas iš kolageno tipų būdingas tam tikroms kūno dalims, bet tame pačiame tarpląsteliniame matrikse galima rasti dviejų ir daugiau tipų kolagenus. Nepaisant gana žymių struktūros skirtumų visų tipų kolagenai turi bendrų ypatumų. Visų kolagenų molekulės yra trimerai [113], sudaryti iš savitos struktūros polipeptidinių grandinių, vadinamų α -grandinėmis.

Dar vienas labai svarbus JA komponentas yra elastinas, kuris sudaro labai elastingus pluoštus, o iš jų formuojasi trimatis tinklas. Tempiant elastino ilgis be jokių pažeidimų gali padidėti net iki 150% nuo pradinio savo ilgio [103]. Rentgenografinė analizė parodė, kad elastino pluoštai neturi reguliarios struktūros. Elastine dominuoja nedidelės, nepolinės amino rūgščių liekanos – 30 proc. glicino, taip pat alaninas ir valinas (30 proc.), bei gausu prolino. [113].

Kiti pagrindiniai JA tarpląstelinio matrikso komponentai yra tirpūs didelės molekulinės masės angliavandeniai, vadinami proteoglikanais (pagrindinis glikozaminoglikanas), kurie užpildo tarpfibrilines ertmes. Labai svarbi šių makromolekulių funkcija yra matrikso drėkinimas, kolageno tinklo stabilizavimas ir atsparumas kompresijai, todėl jie dominuoja kremzlėse ir sąnariuose. Proteoglikanai taip pat dalyvauja ir metaboliniuose procesuose [103].

6.3. Širdies audinių tyrimai.

Širdies tyrimams yra naudojama gausybė metodų – nuo pačių paprasčiausių, tokių kaip elektrokardiograma iki labai sudėtingų, tokių kaip ultragarsas, branduolio magnetinio rezonanso ar kompiuterinė tomografija, mikroskopinė ir biocheminė analizė [8,114-116]. Visi tyrimo metodai, kurių

metu nereikalinga chirurginė intervencija, dažniausiai suteikia informaciją apie širdies struktūrą arba jos veiklą, tuo tarpu pačių audinių tyrimai, išryškinantys skirtingus audinių tipus ar funkcijas, kol kas atliekami arba operacijos metu zondą priartinus prie tiriamojo audinio, arba *ex vivo* išpjovus audinį. Metodų, įgalinančių *in vivo* tirti biologinius audinius ląstelių lygmenyje, kol kas nėra daug. Plačiausiai yra naudojama optinė koherentinė tomografija ir konfokalinė mikroskopija [117,118]. Abiem šiais metodais yra gaunami ląstelių vaizdai, remiantis skirtingomis audinių optinėmis savybėmis (lūžio rodiklis, atspindys). Širdies ir kraujagyslių audinių tyrimams kol kas yra taikoma tik optinė koherentinė tomografija, tuo tarpu konfokalinė mikroskopija iš esmės naudojama tik dermatologijoje. Egzistuoja ir daugiau metodų, suteikiančių informaciją apie audinius *in vivo* ląsteliniam ar molekuliniam lygmenyje, tačiau tai nėra tiesioginio atvaizdavimo metodai. Pvz. fluorescencine spektroskopija gaunami duomenys tiek apie audinių sudėtį, tiek apie jų struktūrą ar vykstančius procesus, tačiau šiuo atveju yra registruojami fluorescuojantys endogeniniai ar egzogeniniai fluoroforai ir iš jų spektrų ar spektrinių pokyčių yra kuriami vaizdai ar daromos atitinkamos išvados.

Širdis yra ypatingai „nepatogus“ objektas tyrimams. Pirmiausia – tai yra gyvybiškai svarbus organas ir bet kokia intervencija gali turėti neigiamų pasekmių tinkamam jos darbui. Antra – širdis yra izoliuotas ir gerai apsaugotas organas, todėl pasiekti ją įvairiais zondais yra komplikota. Trečia – širdis visą laiką juda, todėl tai apsunkina tikslius ir atsikartojančius tyrimus ir galiausiai – širdyje yra gausu kraujo, kuris stipriai iškraipo ar kitaip įtakoja širdies audinių optines savybes. Dėl šių priežasčių yra labai nedaug metodikų tinkančių širdies audinių tyrimams *in vivo*, todėl ir tyrimų yra atlikta labai negausiai. Pagrindiniai tyrimai yra atliekami arba *ex vivo*, arba su eksperimentiniais gyvūnais.

Širdis bei jos bendrosios funkcijos yra nustatytos ir iširtos jau gana seniai, tačiau sudėtinga širdies anatomija, o ypač laidžioji sistema ir jos išsidėstymas vis dar yra tikslinama [8]. Tikslus ŠLS mazgų bei takų išsidėstymo nežinojimas susijęs su sunkumais, kurie iškyla tyrinėjant laidžiąją

sistemą. Žmogaus ŠLS tyrimus apsunkina 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 preparatų tik 26 sugebėjo rasti dešinę Hiso pluošto šaką, o kairės nerado nei viename preparate [18]. K. Reemtsma 1958 m. preparuodamas 11 širdies preparatų tik 3 rado atrioventrikulinį mazgą ir pluoštą, o M.J. Davies 1971 m. po nesėkmingo bandymo paskelbė, kad anatomiškai išpreparuoti širdies laidžiąją sistemą neįmanoma ir, kaip ir daugelis kitų, perėjo išimtinai prie histologinio tyrimo [119]. Deja, pavieniai histologiniai pjūviai nėra pakankamai 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 anomalių laidumo takų reikia serijiniais pjūviais ištirti visą AV žiedą, ir darbo apimtis padidėja kelis kartus [18]. Vis dėlto, dabar egzistuojantys širdies laidžiosios sistemos aprašymai paremti histologinių pjūvių tyrimu ir rekonstruotomis topografinėmis schemomis, tačiau patikrinti šių schemų tikslumo neįmanoma, nes jas kuriant sunaikinamas anatomicinis preparatas. Tik pavieniai tyrėjai naudoja ŠLS makroskopinio tyrimo metodą [120,121], bet vieningos ir patogios procedūros kol kas nėra, todėl ŠLS atpažinimo ar vaizdinimo metodikos sukūrimas įgalintų tiksliau ištirti ŠLS lokalizaciją tiek sveikose širdyse, tiek įvairių patologijų atvejais, ko pasekoje būtų įmanomas tikslesnis įvairių širdies veiklos sutrikimų įtakos vertinimas plakimo ritmui bei įvairių aritmijų atsiradimo priežasčių ir jų pasekmių nustatymas. Tokios metodikos pritaikymas ŠLS vaizdinimui *in vivo* taipogi padėtų išvengti širdies ritmo sutrikimų dėl operacinių pažeidimų.

6.3.1 Širdies laidžiosios sistemos anatomijos tyrimai.

Širdies laidžioji sistema yra specializuotų audinių grupė atsakinga už širdies raumens susitraukimo inicijavimą ir koordinavimą [7]. Yra skiriamos trys pagrindinės ŠLS dalys – sinusinis mazgas, atrioventrikulinis mazgas ir Hiso-Purkinje sistema. Tokia laidumo sistemos struktūra yra pripažįstama jau

daugiau nei 100 metų [7], tačiau atsirandant naujiems technologiniams ir biocheminiams tyrimo metodams bei taikant įvairias modeliavimo metodikas nustatomi vis nauji laidžiosios sistemos takai bei vystymosi ypatumai [122]. Kol kas yra naudojami šios sistemos vaizdai iš seniau atliktų darbų [123,124], kuriuose nurodoma, kad Hiso-Purkinje sistema yra labai šakota ir išplitusi per abu skilvelius, tačiau detalaus Hiso-Purkinje sistemos modelio nėra ligi šiol.

Embrionų ŠLS tyrimuose buvo nustatyta, kad pradinėse organizmo vystymosi stadijose ŠLS apima didesnę širdies audinių dalį nei subrendusiuose organizmuose [11], todėl ŠLS tyrimai pasuko dviem pagrindinėmis kryptimis – išsivysčiusios ŠLS tyrimai subrendusiuose organizmuose ir ŠLS lokalizacijos ir vystymosi analizė įvairiose organizmo brendimo stadijose.

Vadovėliuose vis dar yra įprasta SA mazgą vaizduoti kaip nedidelį mazgelį viršutinės tuščiosios venos ir dešiniojo prieširdžio sandūroje, tačiau elektrofiziologiniai tyrimai, atlikti su pacientais parodė, kad vedantysis impulsas gali atsirasti ne tik šioje vietoje, bet ir visoje zonoje tarp viršutinės ir apatinės tuščiosios venos [125]. Šis pastebėjimas taipogi buvo patvirtintas ir sveikų žmonių širdyse [126,127] bei triušiuose ir žiurkėse [128,129]. Remiantis histologinių pjūvių analize ir atitinkamų baltymų imunohistocheminiu dažymu buvo sudarytas trimatis triušio sinusinio mazgo modelis, kuris taip pat parodė, kad triušio sinusinis mazgas yra gana didelė erdvinė struktūra, besitęsianti nuo viršutinės iki apatinės tuščiosios venos. Taikant tokias pačias technologijas buvo sudarytas ir AV mazgo modelis [130].

Tyrimų su pelėmis metu yra nustatyta, kad vystantis embrionui, laidžioji sistema formuojasi tuose audiniuose, kuriuose yra ekspresuojamas Tbx3 transkripcijos faktorius. Pastebėta, kad Tbx3 ekspresuojančios ląstelės yra randamos tam tikrose širdies vietose, kur įprastai laidžiosios sistemos nėra (pvz. netoli triburio ir dviburio vožtuvų) [131].

Sekantis tyrimas, kuriame buvo stebėti analogiški rezultatai, buvo atlikti su jūros kiaulytėmis [132]. Širdies audiniuose buvo nudažytas koneksinas Cx43 ir $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ siurblys NCX1. Cx43 yra ekspresuojamas darbiniam MK,

bet jo nėra laidžiojoje sistemoje, tuo tarpu NCX1 yra ekspresuojamas abiejų tipų audinių. Tokiu būdu sritys, kuriose buvo matyti tiksliai nudažytas NCX1, buvo atpažintos kaip laidžioji sistema. Šiame tyrime buvo nustatytos trys lokalizacijos, kuriose yra aptinkama ląstelių, panašių į laidžiosios sistemos (ekspresuojančių NCX1, bet neekspresuojančių Cx43). Pirmoji sritis yra tarpširdinėje pertvareje ir vadinama „užtaortiniu mazgu“ [132]. Šis mazgas siejasi su AV mazgu bei kitais į laidžiosios sistemos audinį panašiais žiedais aplink dviburį ir triburį vožtuvus. Šiuose žieduose yra aptinkamas jonų kanalas HCN4, būdingas širdies plakimo ritmą užduodančioms ląstelėms [128,132], taip pat yra stebimas autonominis ar indukuotas aktyvumas [7]. Žieduose aplink dviburį ir triburį vožtuvus bei užtaortiniame mazge taipogi yra pagrindinė masė visų ląstelių, ekspresuojančių Tbx3 pelės embriono širdyje prieširdžių-skilvelių jungtyje [131].

Sekanti širdies sritis, kurioje aptinkama į laidžiąją sistemą panašių ląstelių, yra lokalizuota skilveliuose ir iš dalies apjuosia aortą. Ši sritis vadinama *aortos mazgu*. Dar 1985 metais buvo aptikta ši sritis ir pavadinta „pluošto aklavietė“ [133]. Aortos mazgas, kaip ir dešinioji bei kairioji Hiso pluošto šakos, yra Hiso pluošto tąsa [132].

Trečioji širdies sritis, kurioje randamos į ŠLS panašios ląstelės, yra prie plaučių arterijos šaknies ir yra vadinama *arterijos mova*. Analogiška sritis yra ir aplink aortą, ji iš dalies persidengia su aortos mazgu. Kokios yra funkcijos šių, į ŠLS ląsteles panašių sričių, kol kas nėra aišku. Anksčiau buvo klaidingai manyta, kad būtent per šias sritis elektrinis impulsas pereina prieširdžių-skilvelių jungtį. Šiuo metu jau yra įrodyta, kad tam tikrų susirgimų atvejais žiedai aplink dviburį ir triburį vožtuvus vis tik suformuoja laidumo takus [134].

Taigi, nei viena iš aukščiau paminėtų į ŠLS audinį panašių sričių neatlieka jokios žinomos funkcijos, būtinos širdies ritmo signalo generavimui ar perdavimui, tačiau yra manoma, kad jos yra susiję su ritmo sutrikimais [131,135].

Šie atliekami naujausi ŠLS tyrimai tik įrodo, kad laidžiosios sistemos išsidėstymas net ir anatomiškai sveikoje širdyje vis dar nėra tiksliai nustatytas,

todėl tam tikrų anomalijų atvejais jos lokalizacijos numatymas praktiškai yra neįmanomas. Skirtingi autoriai naudoja skirtingas ŠLS identifikavimo metodikas, kurios dažniausiai yra paremtos įvairių baltymų genetinėmis modifikacijomis eksperimentiniuose gyvūnuose. Remiantis šiais darbais jau yra sukaupta nemažai informacijos, kaip vystosi laidžioji sistema ir yra numatyta kaip įvairios patologijos ar pažeidimai galėtų įtakoti širdies plakimo ritmą, tačiau kol kas vis dar nėra jokio metodo, kuris padėtų aptikti ŠLS išsidėstymą širdyje „in vivo“.

6.3.2 Širdies laidžiosios sistemos vaizdinimo tyrimai.

Širdies ir kraujagyslių audiniai šiuo metu yra plačiai tyrinėjami taikant optinius, biocheminius ir kitus metodus, tačiau ŠLS tyrimai, o ypač ŠLS vaizdinimo, dėl ypatingai sudėtingo pačio tiriamojo objekto, yra atliekami labai negausiai.

Vienas iš naujesnių širdies tyrimų, netiesiogiai nešančių informaciją apie širdies laidumo takus bei sužadavimo atsiradimą ir jo plitimą, yra širdies elektrinių savybių tyrimas aukštos skiriamosios gebos EKG. Prieš atliekant šį tyrimą yra gaunami paciento širdies magnetinio rezonanso vaizdai – širdies anatomijai nustatyti. Vėliau tam tikrose vietose pacientui yra pritvirtinama net 65 elektrodai, ir analizuojant visų jų signalus nustatoma sužadintų sričių lokalizacija, jų plitimas ir sužadavimo trukmė [136]. Analogiški aukštos skiriamosios gebos EKG tyrimai yra atliekami ir panaudojant ultragarsinį širdies struktūrų vaizdinimą [137]. Paminėti neinvaziniai vaizdinimo metodai galėtų būti panaudoti aiškinantis aritmijos atsiradimo priežastis ar aptinkant aritmijos židinius, kuomet tikslus ŠLS lokalizacijos nustatymas nėra būtinas. Kitais atvejais, kai ŠLS identifikavimas ar atskyrimas nuo aplinkinių audinių yra gyvybiškai svarbus, dėl raumeninės šios sistemos kilmės, tyrimo metodas turi būti paremtas daug subtilesne, audinių vidinių parametrų analize.

Visus ŠLS vaizdinimo ar detektavimo metodus galima suskirstyti pagal tai, kokiam tikslui jie gali būti panaudoti:

1. ŠLS aptikimui širdies audinių preparatuose arba širdyje „*ex vivo*“;
2. ŠLS aptikimui gyvoje širdyje „*in vivo*“.

Visi biocheminiai ŠLS identifikavimo metodai, pagrįsti tam tikrų baltymų genetinėmis modifikacijomis ar įvairių dažų ir žymenų prikabinimu prie laidžiajai sistemai būdingų specifinių baltymų, gali būti taikomi tik *ex vivo* arba eksperimentiniuose gyvūnuose. Tokie metodai daugiausia yra susiję su transmembraniniais jonų laidumo kanalais [138], kadangi laidžiojoje sistemoje, o ypač Hiso pluošte, impulso sklidimo greitis, kurį nulemia jonų judėjimas per kanalus, yra daug didesnis nei MK. Tyrimai taipogi parodė, kad įvairių laidžiosios sistemos patologijų atvejais, jonų kanalai ar jų kiekis irgi yra pakitę [7], o SA ir AV mazgai išsiskiria HCN4 jonų kanalų gausa ir taip gali būti vizualizuoti. [138,139].

Taikant šiuolaikines genų inžinerijos technologijas pelės AV mazgas ir Hiso – Purkinje sistema buvo vizualizuota stebint genetiškai modifikuoto baltymo koneksino Cx40 fluorescenciją [7,140], tačiau šio modifikuoto baltymo švytėjimas taip pat buvo registruotas ir koronarinėse arterijose bei prieširdžiuose [141,142]. Analogiška situacija yra ir taikant kitus biocheminius vaizdinimo metodus – pažymima arba tik tam tikra dalis laidžiosios sistemos, arba ne tik ŠLS, bet ir kitos širdies struktūros [143]. Taip yra todėl, kad ŠLS nėra vienalytė ir yra sudaryta iš skirtingas funkcijas atliekančių dalių.

Visiškai naujas ŠLS vaizdinimo *ex vivo* metodas, kuriuo buvo pateiktas triušio ir žiurkės ŠLS išsidėstymas, yra mikro kompiuterinė tomografija [144]. Šiuo būdu yra atliekamas itin aukštos skyros trimatis rentgeno vaizdinimas. Siekiant ŠLS išskirti iš aplinkinių audinių yra naudojama papildoma jodo pagrindu susintetinta kontrastinė medžiaga I₂KI, tačiau kontrasto prigimtis širdies audiniuose visgi nėra visiškai aiški. Manoma, kad jodas yra imobilizuojamas glikogeno struktūrose [145] ir todėl MK pasižymi stipresne rentgeno spindulių sugertimi, lyginant su JA, tačiau šiuo atveju sunku paaiškinti, kodėl laidžioji sistema, kurioje glikogeno randama dar gausiau nei MK, rentgeno vaizduose atrodo tamsiau nei MK, kas rodo mažesnę rentgeno

spindulių sugertį. Šis metodas yra patrauklus tuo, kad pats vaizdų gavimo būdas nėra invazinis, todėl tikėtina, jog ateityje mikro tomografijos metodas galėtų būti taikomas ir širdies audinių *in vivo* tyrimuose.

Tą patį būtų galima pasakyti ir apie kitą tomografiją – branduolių magnetinį rezonansą. Nors kol kas šiuo metodu yra vaizdinamos tik bendros širdies struktūros [115,146], tačiau aptikus tam tikrus skirtumus bei nustatius tinkamus magnetinio rezonanso parametrus metodas būtų tinkamas ir skirtingo tipo širdies audinių trimačių vaizdų gavimui.

Šiek tiek kitokia situacija yra su optiniais metodais, kurie paremti audinių savybių tyrimu be išorinių žymeklių. Tokie tyrimo bei diagnostikos metodai jau yra taikomi *in vivo* tyrimuose [33,54,61,66-73,74], tačiau pagrindinis šių metodų trūkumas – ribotas tiriamosios spinduliuotės prasiskverbimo gylis į audinius, kuris siekia nuo kelių mikrometrų iki kelių milimetrų.

Širdies audinių tyrimų optiniais metodais yra atlikta labai nedaug. Didžioji dalis tyrėjų nenaudoja jokių išorinių fluorescuojančių žymenų, kadangi kol kas nėra jokio ŠLS specifinio žymens, kurį būtų galima naudoti *in vivo*. Vis dėlto netiesioginiam laidumo takų ar aritmijos židinių nustatymui buvo panaudoti įtampai jautrūs fluorescuojantys dažai. Skaitmenine kamera fiksuoti prieširdžių vaizdai, kur iš fluorescencijos signalo lokalizacijos nustatytos impulso atsiradimo ir sklidimo zonos [147]. Tyrimas atliktas su izoliuotomis avių širdimis. Nors iš principo tokia procedūra yra įmanoma atlikti ir žmogui, tačiau kol kas visi žinomi įtampai jautrūs dažai yra fototoksiški ir jų naudoti *in vivo* negalima.

Nesensibilizuotu metodu laidžiosios sistemos AV mazgo lokalizacijos ieškota šuns širdyje. Fluorescencija žadinta 308 nm ir 364 nm bangos ilgio spinduliuote, tačiau žymesnių skirtumų AV ir miokardo fluorescencijos spektruose nepastebėta [27].

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 nm iki

475 nm atrioventrikulinio mazgo srities fluorescencijos juostos smailė buvo žymiai intensyvesnė negu aplinkinių audinių. Taip pat nustatytas mazgo srities fluorescencijos juostos poslinkis ir žymus susiaurėjimas gretimų širdies raumenų fluorescencijos spektro atžvilgiu [30].

Siekiant aptikti skirtumus tarp AV ir SA audinių taip pat buvo tirta ir žmogaus širdis. Fluorescencija žadinta XeCl eksimeriniu lazeriu 308 nm. Mazgų audinio ir aplinkinio endokardo spektrai, gana žymiai skyrėsi fluorescencijos intensyvumu 440 nm – 500 nm spektrinėje srityje. Prieširdžių endokardo fluorescencija buvo intensyvesnė. Mazgų audinys taip pat buvo atskirtas ir nuo skilvelių endokardo – jo fluorescencija buvo silpnesnė 430 nm – 550 nm spektrinėje srityje [31].

Nilsson ir bendraautorai [28] tyrė kiaulės širdies miokardo (su endo/epikardu), aortos bei laidumo takų fluorescenciją žadindami 337 nm bangos ilgio spinduliuote. Visuose spektruose išryškėja fluorescencijos juosta su smaile 390 nm – 410 nm srityje, kuri priskiriama kolagenui (smailė ties 390 nm) ir elastinui (smailė ties 410 nm). Aortos savitosios fluorescencijos spektras sudarytas iš kolageno ir elastino persiklojusių spektrų, taip pat ties 420 nm stebėtas kraujo reabsorbcijos efektas. Miokardas su endo/epikardu šioje spektrinėje srityje fluorescavo intensyviau, nei miokardas be endo/epikardo. Miokardo savitosios fluorescencijos spektre taip pat matyti plati fluorescencijos juosta, kurios intensyvumo smailė yra ties 463 ± 3 nm.

Viename iš naujesnių darbų tirta jaunų avių miokardo bandinių, paimtų iš prieširdžių ir skilvelių fluorescencija, žadinant ją argono jonų lazerio spinduliuote, kurios bangos ilgis 457,9 nm. Fluorescencija registruota 500 nm – 700 nm spektrinėje srityje. Nustatyta, kad prieširdžių fluorescencija yra intensyvesnė nei skilvelių. Be to, prieširdžių ir skilvelių spektrai skyrėsi ir savo forma. Didesni fluorescencijos intensyvumų skirtumai aptikti trumpesniųjų bangų srityje [29].

Visuose aukščiau paminėtuose darbuose aptikti širdies audinių spektriniai skirtumai daugiausia yra sąlygoti nevienodo fluorescencijos intensyvumo skirtingose širdies srityse. Deja, bet fluorescencijos intensyvumas

labai priklauso nuo žadinimo-surinkimo sąlygų, kurias operacijos metu būtų labai sudėtinga išlaikyti nepakitusias visuose tiriamuosiuose taškuose, todėl skirtingas registruojamas intensyvumas gali būti sąlygotas ne kito tipo audinio, o skirtingų žadinimo-surinkimo sąlygų. Šios optiniams metodams būdingos problemos galima išvengti registruojant ne fluorescencijos intensyvumą, o fluorescencijos gyvavimo trukmę. Fluorescencijos gyvavimo trukmė yra laikas, kurį energijos gavęs fluoroforas išbūna sužadintoje būsenoje iki energijos atidavimo šviesos pavidalu. Ši trukmė yra charakteringa kiekvienam fluoroforui ir priklauso nuo molekulių aplinkos sąlygų, tačiau ji nepriklauso nuo žadinančiosios spinduliuotės intensyvumo, fluoroforų koncentracijos ir nėra įtakojama reabsorbcijos ar sklaidos [148,149]. Taigi nepriklausomai nuo žadinimo-surinkimo sąlygų skirtingų audinių tipų fluorescencijos gyvavimo trukmės būtų skirtingos ir šiuos audinius būtų galima atskirti. Fluorescencinė laikinės skyros spektroskopija jau yra taikoma širdies ir kraujotakos sistemos tyrimuose [35]. Ieškant audinių aterosklerotinių pakitimų, buvo tirta žmogaus aortos sienelių fluorescencija bei matuota fluorescencijos gyvavimo trukmė, žadinant azoto lazerio 337 nm bangos ilgio spinduliuote. Aterosklerozės pažeistų audinių fluorescencijos spektrai savo forma ir fluorescencijos gyvavimo trukme skyrėsi nuo sveikos aortos fluorescencijos spektrų [36]. Šie autoriai, remdamiesi fluorescencijos spektrais ir gyvavimo trukmėmis, sveikos aortos sienelių emisiją priskiria elastino, kolageno bei glikozaminglikanų fluorescencijai. Taip pat pažymima, kad senstant elastino kiekis žmogaus aortoje mažėja palyginus su kolageno kiekiu [36]. Kiti mokslininkai taip pat daugiausia tiria žmogaus aterosklerozės pažeistas arterijas – aortą *ex vivo* [37], vainikines arterijas *ex vivo* [37,38] bei miego arterijas *ex vivo* ir *in vivo* [39], tačiau ŠLS tyrimų fluorescencine laikinės skyros spektroskopija kol kas nėra atlikta.

Atskira optinės biopsijos sritis yra vaizdinimas ypatingai aukštos skyros technikomis, įgalinančiomis tyrinėti gyvų biologinių objektų pavienes ląstelės. Beveik visi širdies audinių aukštos skyros vaizdinimo eksperimentai yra atliekami optine koherentine tomografija ir yra nukreipti koronarinių arterijų

tyrimams [150-152]. Vos keletas darbų buvo atlikti vaizdinant Purkinje skaidulų fragmentus [153,154]. Deja, kol kas šios metodikos pritaikymas tokiems tyrimams *in vivo* nėra įmanomas.

Kur kas plačiau klinikinėje praktikoje naudojama konfokalinė atspindžio mikroskopija. Tai yra vienas iš nedaugelio metodų skirtų ląstelių trimačiam vaizdinimui. Dar visai neseniai specialiai paruošti mėginiai buvo apžiūrimi plataus lauko mikroskopu, kai XX a. viduryje buvo užpatentuota konfokalinės mikroskopijos idėja. Nepraėjus nei 50 metų, ši ypatingai informatyvi technologija buvo pritaikyta gyvų audinių tyrimams [41,155-158]. Konfokaliniu mikroskopu yra atliekamas audinių *in vivo* ištyrimas skirtinguose sluoksniuose (sluoksnio storis apie 1-5 μm) iki 0,35 mm gylio [40,159]. Iki šiol tai buvo įmanoma tik *ex vivo* audinių supjausčius itin plonais pjūviais. Šiuo metu ši virtuali optinė biopsija jau yra taikoma gerybinių ir piktybinių odos pažaidų atskyrimui, o taip pat naudojama fundamentaliuose odos tyrimuose bei klinikinėje dermatologijoje [40-45]. Dėl lanksčių sistemos galimybių pasiekiant sudėtingai prieinamas vietas bei plataus pritaikymo biologinių audinių tyrimams, tokia metodika puikiausiai turėtų tikti ir širdies audinių tyrimams ir ŠLS atskyrimui nuo aplinkinių audinių.

Apibendrinant ŠLS tyrimus galima teigti, kad nepaisant gausių širdies audinių tyrimų, laidžiosios sistemos vaizdinimas vis dar yra eksperimentiniame lygmenyje ir kol kas nėra tikslus. Taikant biocheminius metodus ŠLS negali būti vienareikšmiškai identifikuojama iš kito tipo širdies audinių net ir *ex vivo*. Kol kas neegzistuoja biocheminis žymeklis, kuris žymėtų tiksliai laidžiąją sistemą. Tomografiniai metodai iš esmės yra naudojami tik širdies funkcijoms ar struktūrai tirti. Kol kas netyrinėtos ir itin perspektyvios *in vivo* tyrimams konfokalinės mikroskopijos galimybės širdies audinių vaizdinimui. Taikant fluorescencinės spektroskopijos metodus nustatyta, kad sinusinio bei AV mazgo fluorescencija skiriasi nuo juos supančių audinių fluorescencijos, intensyvumų skirtumai stebimi ir tarp mazgų bei skilvelių endokardo fluorescencijos spektrų. Prieširdžių fluorescencijos spektrų forma ir intensyvumai panašūs kaip ir laidžiosios sistemos mazgų. Taip pat stebėti

optinės koherentinės tomografijos vaizdų ir fluorescencijos gyvavimo trukmių skirtumai skirtingose širdies zonose bei aterosklerozės pažeistose arterijose, tačiau nei viename mums žinomame straipsnyje nėra atlikti ŠLS vaizdinimo eksperimentai fluorescencinės spektroskopijos metodu, taipogi netirta HP ir jo šakų fluorescencija ar gyvavimo trukmė, todėl ŠLS atskyrimo bei vaizdinimo problema vis dar išlieka aktuali.

VII. MEDŽIAGOS IR METODAI

Atlikus išsamią širdies audinių tyrimų analizę buvo suplanuoti laidžiosios sistemos tyrimai net keliomis metodikomis. Pirmiausia atliktas širdies audinių fluorescencinis vaizdinimas, vėliau atlikti nuostoviosios bei laikinės skyros fluorescencinės spektroskopijos tyrimai bei spektroskopinis vaizdinimas. Taipogi atlikti pirmieji širdies audinių vaizdinimo eksperimentai atspindžio konfokaline mikroskopija, ir, galiausiai, sukurta ŠLS atskyrimo metodika buvo išbandyta širdies audinių atskyrimui *in vivo*, operacijos metu.

Žmogaus širdies laidžiosios sistemos, miokardo bei jungiamojo audinio mėginiai paimti Valstybiniame patologijos centre, autopsijų metu. Audinių mėginių paėmimo būdai atitiko standartines autopsijos atlikimo metodikas. Iširti 24 mirusiųjų 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: 1-24. Audinių mėginiai paimti ne vėliau kaip per 48 valandas po mirties. Prieš išpjaunant mėginius širdis buvo praplaunama fiziologiniu tirpalu, siekiant pašalinti likusį kraują. Paimti mėginiai fiksuoti 10% buferiniame formalino tirpale ir laikyti 4°C temperatūroje. Nefiksuoti bei neišplauti bandiniai tirti nedelsiant arba saugoti – 70 °C. Atlikus eksperimentus, priklausomai nuo keliamų tikslų, audinių mėginiai iširti standartine histologine metodika siekiant identifikuoti/patvirtinti tirtų audinių tipą.

Skirtumų reikšmingumas tarp širdies audinių fluorescencijos duomenų buvo vertinamas poromis tarp ŠLS ir MK, taip pat tarp ŠLS ir JA. Skirtumų reikšmingumas tarp MK ir JA nebuvo vertintas. Duomenų vertinimas viename bandinyje buvo atliekamas naudojant nepriklausomą t-Testą, tuo tarpu fluorescencijos duomenų skirtumų reikšmingumas tarp skirtingų bandinių vertintas naudojant porinio t-Testo metodiką.

7.1 Širdies audinių vaizdinimas

Remiantis anksčiau atliktais tyrimais, kurių metu buvo tirtos širdies audinių preparatų optinės savybės bei identifikuotos potencialios selektyvaus ŠLS fluorescencijos sužadinimo sritys [160,161], atlikti širdies audinių fluorescencinio vaizdinimo eksperimentai. Šių eksperimentų metu vaizdai buvo fiksuojami dienos šviesoje bei apšvietus UV spinduliuote (365 nm). Fluorescencijos žadinimui buvo naudojama aukšto slėgio gyvsidabrio garų lempa ДПИИ 250–3, o reikalinga 365 nm spinduliuotė išskirta filtru УФС8. Vaizdai registruoti skaitmenine *Philips ToUcam* kamera. Vėliau vaizdai buvo apdoroti, siekiant išryškinti fluorescuojančias sritis.

ŠLS vaizdinimo eksperimentams pasirinktos tarpkilvelinės pertvaros, kadangi vienoje pusėje, beveik per visą pertvarą yra išsiraizgiusi kairioji HP šaka. Kitoje pusėje yra siauras pluoštas – dešinioji šaka, tačiau ją retai pavyksta aptikti, todėl vaizdinta daugiausiai buvo būtent kairioji HP šaka. Vaizdinimas atliktas pertvarose iš keturių širdžių, kurios buvo išpreparuotos Valstybiniame patologijos centre, ir fiksuojamos 10% neutraliame formalino tirpale. Tarp eksperimentų pertvaros buvo laikomos tamsoje 4°C temperatūroje.

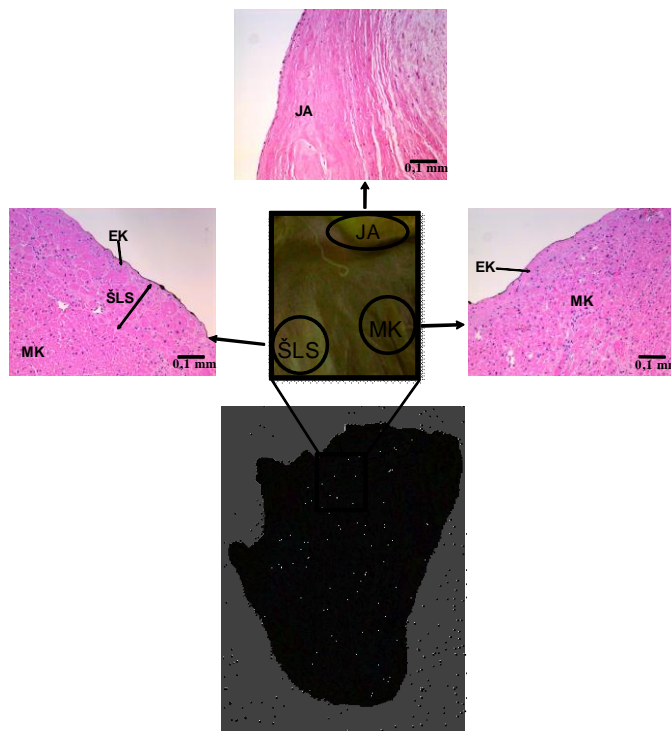
7.2 Širdies audinių nuostovioji fluorescencinė spektroskopija

Širdies audinių nuostoviosios spektroskopijos tyrimams mėginiai buvo paimti vadovaujantis ŠLS identifikavimo metodika [32] iš 13 širdžių. Dauguma laidžiosios sistemos bei ją supančių audinių preparatų, 3-4 cm dydžio, buvo parengti iš kairiosios HP šakos, kur ŠLS išeina į paviršių. JA preparatai buvo parengiami iš aortos sienelės, o MK iš skilvelių sienelės arba tarpkilvelinės pertvaros.

Spektroskopinių tyrimų pirmajame etape buvo ieškoma ŠLS atskyrimui tinkamos fluorescencijos žadinimo ir detektavimo srities bei buvo vertinama kraujo įtaka registruojamiems fluorescencijos spektrams. Šiame etape buvo ištirta 18 fiksuotų širdies preparatų, parengtų iš 3 širdžių bei 12 nefiksuotų

preparatų parengtų iš 2 fiziologiniu tirpalu neplautų širdžių. Iš kiekvienos širdies buvo parengiami du ŠLS, du JA ir du MK preparatai.

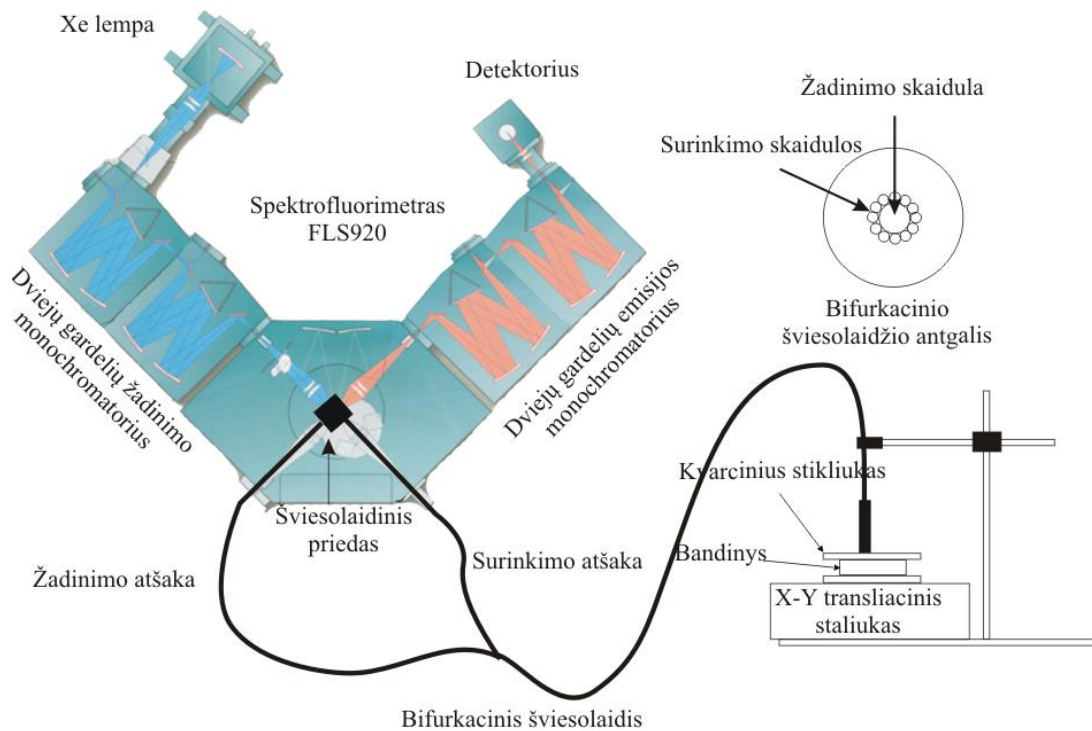
Antrame spektroskopinių tyrimų etape širdies audiniai buvo tiriami pagal nustatytas fluorescencijos žadinimo bei detektavimo sritis pritaikant sukurtą ŠLS identifikavimo metodiką. Šiems tyrimams buvo parengiami bandiniai, kuriuose galima aptikti visų trijų tipų širdies audinius (ŠLS, MK ir JA). Tyrimams parinktose širdyse nebuvo pastebimos patologijos bei aiškių fibrozės židinių, todėl tokie bandiniai buvo paimti iš viršutinės tarpškilvelinės pertvaros dalies, apimant ir dalį aortos sienelės (Pav. 7.2.1).



7.2.1 pav. Širdies audinių tyrimo schema - preliminari audinių lokalizacija buvo nurodoma patyrusio patologo, atlikus spektroskopinius tyrimus tos vietos buvo ištirtos histologiškai

Atitinkamų širdies audinių preliminari lokalizacija buvo nurodoma patyrusio patologo remiantis anatominiais atlasais. Preparatai buvo fiksuoti formalino tirpale ir tarpe eksperimentų laikyti tamsoje 4°C temperatūroje. Tokiems tyrimams buvo parengti 8 bandiniai iš 8 širdžių. Eksperimentų metu širdies audiniai taip pat buvo fotografuojami dienos šviesoje bei panaudojant papildomą 365 nm spinduliuotės apšvietimą.

Širdies audinių nuostovioji fluorescencinė spektroskopija buvo atliekama modulinio tipo optinės biopsijos aparatūra [48] įmontavus specialų priedą, įgalinusių prijungti šviesolaidinį zondą. Pagrindinis visos aparatūros elementas yra spektrofluorimetras FLS 920 (Edinburgh Instruments), kurio schema pateikta 7.2.2 pav.



7.2.2 pav. Fluorescencinės spektroskopijos eksperimento aparatūros schema. Žadinančiosios spinduliuotės parinkimui ir fluorescencijos detektavimui naudotas spektrofluorimetras FLS 920. Spinduliuotės nuvedimui iki audinio bei surinkimui naudotas bifurkacinis šviesolaidinis zondas, kurio antgalis pavaizduotas viršutiniame dešiniajame kampe. Tyrimo metu bandiniai buvo įtvirtinami ant transliacinio staliuko.

Fluorescencijos žadinimui yra įmontuota 450 W ksenono lempa, o norimas bangos ilgis iš viso spinduliuojamo spektro yra išrenkamas dviejų gardelių monochromatoriumi. Tokio tipo monochromatoriaus pasirinkto bangos ilgio ir pašalinės šviesos santykis yra $1:10^{-10}$. Fluorescencijos

surinkimo atšakoje taip pat yra įmontuotas dviejų gardelių monochromatorius ir itin didelį jautrumą užtikrinantis termoelektriniu būdu šaldomas fotodaugintuvas (detektorius). Registruojamas fluorescencijos spektras automatiškai yra pakoreguojamas atsižvelgiant į lempos intensyvumo netolygumus bei detektoriaus nevienodą jautrumą skirtingos energijos spinduliutei.

Šviesolaidinis priedas, kuris montuojasi vietoje standartinio kiuvečių laikiklio, buvo specialiai suprojektuotas ir pagamintas Edinburg Instruments, kas užtikrino žadinančiosios spinduliuotės suvedimą į šviesolaidį bei surinktos fluorescencijos perdavimą į spektrofluorimetro registravimo atšaką su mažiausiais nuostoliais.

Širdies audinių tyrimams buvo įsigytas specialus bifurkacinis šviesolaidinis zondas, tinkamas sterilizacijai aukšta temperatūra bei cheminėmis medžiagomis. Šis zondas sudarytas iš dviejų šviesolaidžių, kurie viename zondo gale sueina į bendrą pluoštą. Tyrimuose naudotas „saulutės“ tipo zondas, kurio antgalyje vieno šviesolaidžio gijos sueina į centrą, o kitos išsidėstę aplink vienodu atstumu nuo centro. Bifurkacinio šviesolaidinio zondo antgalis pavaizduotas 7.2.2 pav. Centrine bifurkacinio šviesolaidžio gija, kurios skersmuo 600 μm , yra žadinama fluorescencija, o 12 aplinkui ratu išsidėsčiusių skaidulų (kiekvienos skersmuo 200 μm) yra skirtos audinio fluorescencijos surinkimui. Žadinančiosios spinduliuotės galia audinio paviršiuje neviršijo 50 μW .

Širdies audinių tyrimams nuostoviąja spektroskopija buvo atliekami dviejų tipų eksperimentai. Pirmojo tipo eksperimentuose šviesolaidis buvo tiesiogiai priglaudžiamas prie širdies audinio tiriamojo taško. Antro tipo eksperimentuose širdies preparatai būdavo suspaudžiami tarp dviejų kvarcinių stikliukų ir įtvirtinami ant mikrometrinio staliuko, kurio judėjimo kryptį galima keisti dvejomis, viena kitai statmenomis, kryptimis (Pav. 7.2.2). Šviesolaidis buvo įtvirtintas į laikiklį ir jo antgalis priglaudžiamas prie stikliuko. Skirtingos preparato vietos buvo pasirenkamos sukiojant mikrometrinį staliuką. Tokia eksperimento schema užtikrino vienodas fluorescencijos žadinimo – surinkimo

sąlygas skirtinguose bandinio taškuose ir tai leido vertinti skirtingų vietų fluorescencijos intensyvumus.

7.3 Širdies audinių spektroskopinis vaizdinimas

Širdies audinių spektroskopiniam vaizdinimui naudoti 2-3 cm dydžio širdies tarpkilvelinės pertvaros preparatai paimti iš 2 širdžių analogiškai 7.2 skyriuje aprašyti metodikai. Šiuose eksperimentuose buvo naudojami tik fiksuoti bandiniai. Preparatai taip pat buvo fotografuojami dienos šviesoje bei panaudojant papildomą 365 nm spinduliuotės apšvietimą, o vaizdinimo sritys pažymėtos preparatų nuotraukose. Atlikus tyrimus buvo atliekama šių vietų histologinė analizė.

Širdies audinių spektroskopinio vaizdinimo esmė yra tai, kad kiekviename vaizdo taške (pikselyje) yra registruojamas fluorescencijos spektras ar fluorescencijos intensyvumo vertės. Tokių spektrinių vaizdų registravimo sistema buvo realizuota naudojant 7.2.2 paveiksle pateiktą aparatūrą. Bandiniai, suspausti tarp kvarcinių stikliukų, buvo įtvirtinami ant transliacinio staliuko ir šviesolaidis prigludžiamas iš viršaus. Tiriamoji vieta buvo keičiama sukant mikrometrinio stalelio sraigtus, šviesolaidžiui esant priglaustam prie dengiamojo kvarcinio stiklelio. Kadangi eksperimento metu keičiant bandinio padėtį šviesolaidžio prigludimas išliko toks pat, todėl laikoma, kad kiekviename matavimo taške buvo išlaikomos tos pačios fluorescencijos žadinimo-surinkimo sąlygos. Tokiu būdu užregistruoti intensyvumų skirtumai yra sąlygoti tik audinio vidinių parametrų ir gali būti vertinami kaip diagnostinė informacija.

Širdies audinių spektroskopinis vaizdinimas buvo atliekamas dviem etapais. Pirmame etape atliktas itin tikslus pavienės ŠLS šakos ribų nustatymas (1 preparatas). Eksperimento metu per gydytojo patologo nurodytą laidžiosios sistemos šaką buvo atliktas linijinis skenavimas, spektrus matuojant kas 500 μm . Antrame etape buvo atliktas širdies preparatų plokštuminis skenavimas, taip užregistruojant spektrinį preparato vaizdą. Šio skenavimo metu širdies

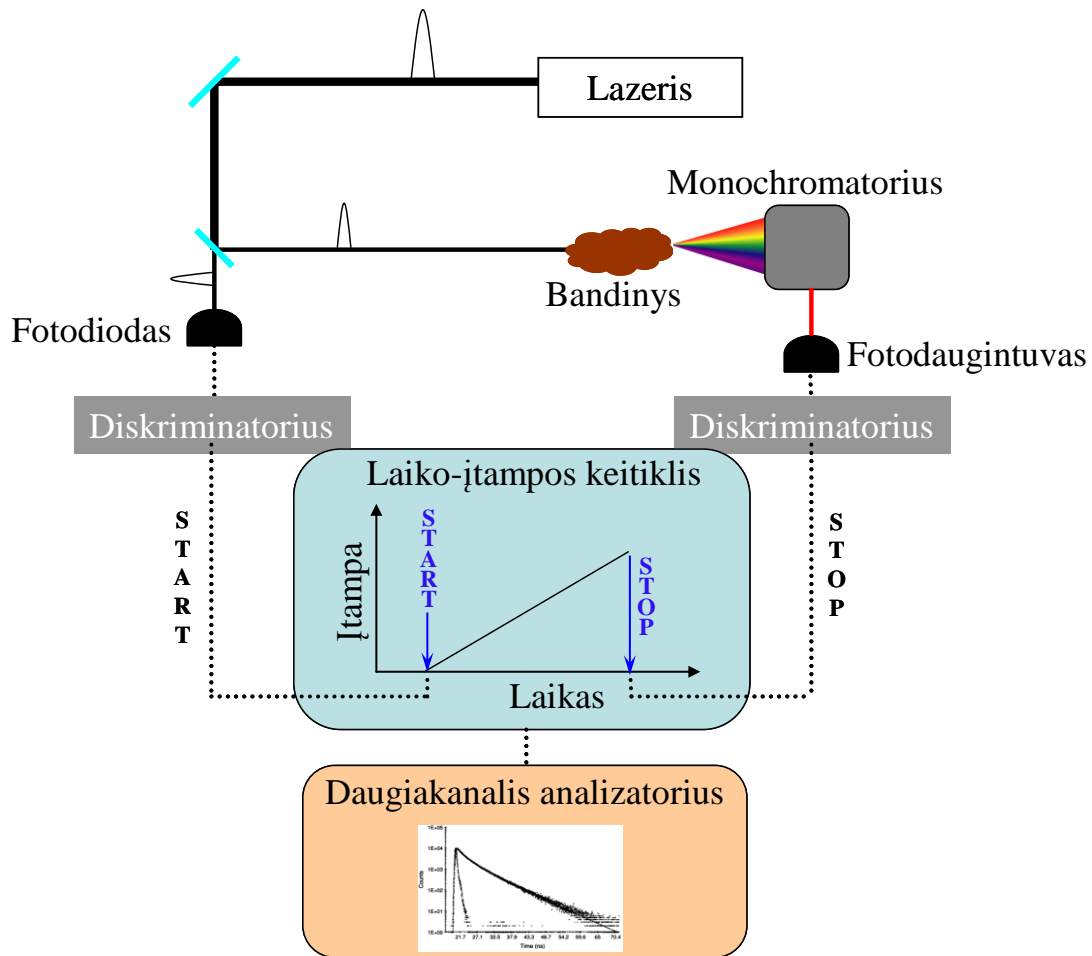
audinio plotas buvo nuskenuotas fluorescenciją registruojant kas 1 mm (2 preparatai). Po spektrinių matavimų buvo atlikta preparato histologinė analizė keturiuose tolygiai per visą bandinį išsidėsčiusiuose pjūviuose. Vienas iš keturių pjūvių buvo padarytas išilgai linijinio skenavimo linijai.

7.4 Širdies audinių fluorescencinė laikinės skyros spektroskopija

Laikinės skyros fluorescencine spektroskopija taip pat tirti 3-4 cm dydžio širdies audinių preparatai, paimti iš vienos širdies analogiškai 7.2 skyriuje aprašyti metodikai. Šiems eksperimentams buvo paruošti trys fiksuoti bandiniai, po vieną kiekvienam audinio tipui. Preparatai buvo fotografuojami dienos šviesoje bei panaudojant papildomą 365 nm spinduliuotės apšvietimą, o fluorescencijos gyvavimo trukmių registravimo vietos pažymėtos preparatų nuotraukose arba pačiuose preparatuose. Po fluorescencinių laikinės skyros tyrimų buvo atliekama šių vietų histologinė analizė.

Eksperimentų metu širdies audinio preparatai buvo įtvirtinami į kietų bandinių laikiklį ir dedami į prietaiso vidų, į standartinio kiuvečių laikiklio poziciją. Preparatai buvo suspaudžiami tarp dviejų kvarcinių langelių, taip apsaugant juos nuo išdžiuvimo. Matavimai atlikti 7.2.2 paveiksle pavaizduota aparatūra, papildomai prijungus 405 nm bangos ilgio spinduliuotės impulsinį, 66.9 ps trukmės, puslaidinikinį lazerį.

Spektrofluorimetre FLS920 fluorescencijos gyvavimo trukmės yra registruojamos naudojant laike koreliuotų pavienių fotonų skaičiavimo metodiką (TCSPC – angl. time correlated single photon counting) 7.4.1 pav.



7.4.1 pav. Laike koreliuotų pavienių fotonų skaičiavimo schema: lazerio impulsas padalijamas į dvi dalis, kurių viena paleidžia laiko įtampos keitiklį, o kita sužadina bandinį. Keitiklis ima kaupti įtampą, o ją sustabdo bandinio molekulės išspinduliuotas fluorescencijos fotonas, kurį užregistruoja fotodaugintuvas. Trukmė tarp į fotodiodą atėjusio impulso ir fotodaugintuvu užregistruoto fono atitinkanti įtampos vertė įrašoma daugiakanaliniu analizatoriumi. Atlikus eksperimentą daug kartų, gaunamas laikinis fluorescencijos trukmės pasiskirstymas (fluorescencijos gesimo kinetika) [48].

Fluorescencijos gyvavimo trukmių matavimuose yra registruojamas fluorescencijos fotonų skaičiaus pasiskirstymas laike. Laiko momentas, kuriame yra surinkta daugiausiai fotonų, yra laikomas fluorescencijos pradžia, o trukmė, ties kuria fotonų skaičius sumažėja e kartų, vadinama fluorescencijos gyvavimo/gesimo trukme τ . Biologinių audinių savitosios fluorescencijos

kvantinis našumas yra labai nedidelis, todėl trukmės buvo matuojamos, kol didžiausias fotonų skaičius ties vienu laiko momentu pasiekdavo 1000. Užregistruotas gesimo kreives yra atliekami matematiniai skaičiavimai, kurių tikslas yra nustatyti, kiek mažiausiai kintamųjų reikia norint tiksliai aprašyti eksperimentiškai gautus rezultatus. Yra žinoma, jog molekulėse energijos atidavimo intensyvumas iš sužadintos būsenos, taigi ir fluorescencijos gesimas vyksta pagal eksponentinę dėsnį. Jei gesimo kreivė gali būti aprašoma vienu kintamuoju, vadinasi fluorescuoja vieno tipo molekulės, jei dviem – fluorescuoja dviejų tipų ir t.t. Kintamųjų vertės – laiko trukmės yra išskaičiuojamos modeliavimo proceso metu. Prieš atliekant modeliavimą turi būti parenkamas eksponentų (kintamųjų) skaičius, o tuomet gauta modelinė kreivė sulyginama su eksperimentiniais duomenimis. Taip pat yra skaičiuojamos liekanos, kurios nurodo modeliavimo tikslumą. Kintamųjų skaičius bei vertės, kurioms esant gaunamos mažiausios paklaidos, yra laikomos tiriamoje medžiagoje esančių fluoroforų charakteringomis fluorescencijos gyvavimo trukmėmis. Charakteringos gyvavimo trukmės τ ir komponentų, atsakingų už fluorescencijos spektrą skaičius bei santykinis kiekis apskaičiuoti naudojant FAST programą (Edinburgh Instruments). Vertinant fluorescencijos gyvavimo trukmes itin trumpose trukmėse (ps eilės) buvo atliekama dekonvoliucijos procedūra. Šios procedūros metu, skaičiuojant gyvavimo trukmes, yra atsižvelgiama į lazerio spinduliuotės impulso trukmę bei paties prietaiso techninius parametrus. Visa tai vadinama prietaiso atsako funkcija (IRF - *angl.* instrument response function), kuri buvo išmatuojama naudojant polimerines mikrosferas suspenduotas vandenyje (Thermo Scientific).

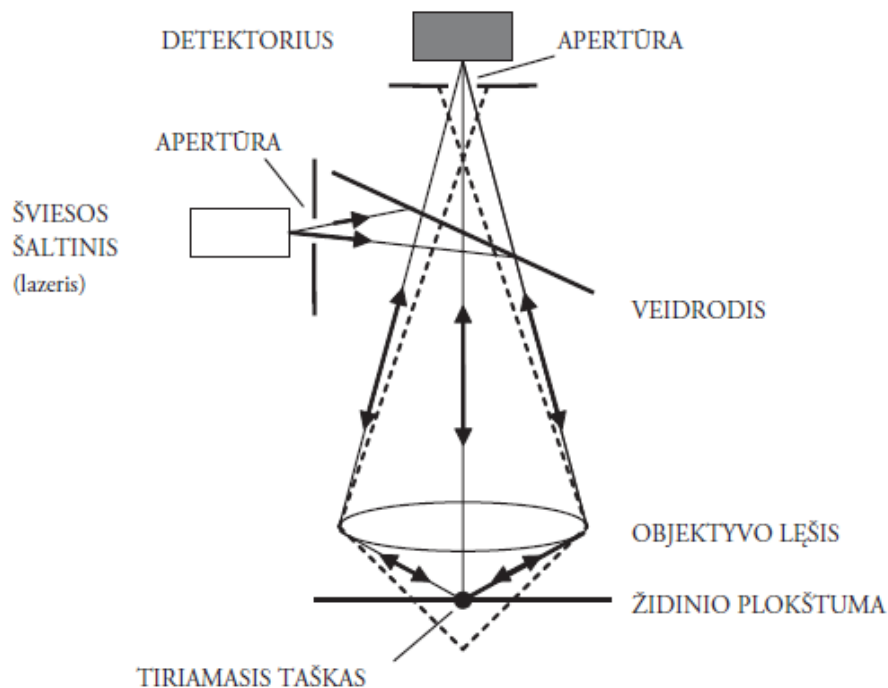
7.5 Širdies audinių vaizdinimas konfokaline atspindžio mikroskopija

Širdies audinių vaizdinimui konfokaline atspindžio mikroskopija naudoti 2-3 cm dydžio preparatai paimti iš keturių širdžių analogiškai 7.2

skyrįje aprašyti metodikai. Šiuose eksperimentuose buvo naudojami tik fiksuoti bandiniai. Purkinje skaidulų vaizdinimui širdies audiniai buvo paimti iš periferinių tarpkilvelinės pertvaros dalių. Papildomai iš aortos buvo paimti JA preparatai bei iš skilvelių raumens paimti MK preparatai.

Bandiniai su Purkinje skaidulomis taip pat buvo fotografuojami dienos šviesoje bei panaudojant papildomą 365 nm spinduliuotės apšvietimą, o vaizdinimo sritys pažymėtos preparatų nuotraukose. Po tyrimų buvo atlikta šių vietų histologinė analizė.

Konfokalinė atspindžio mikroskopija yra unikali tuo, kad įgalina užregistruoti erdvinius objektų vaizdus. Kitaip tariant, galima pažvelgti į objekto vidų nesuardant paties objekto. Tai yra lyg analogija rentgeno ir magnetinio rezonanso tomografijoms, tačiau šiuo metodu pasiekama skyra siekia keletą mikrometrų, todėl galima tyrinėti netgi tokius objektus, kaip pavienės audinių ląstelės. Konfokalinės mikroskopijos schema pateikta 7.5.1 paveiksle.



7.5.1 pav. Konfokalinės mikroskopijos schema [162].

Šioje metodikoje objekto apšvietimui yra naudojama lazerinė spinduliuotė. Norint pasiekti kuo aukštesnę skiriamąją gebą spinduliuotės kelyje papildomai yra montuojama kelių mikrometrų skersmens apertūra. Naudojant lazerius tai nėra būtinas elementas. Tuomet šviesa sudėtingos optinės sistemos pagalba yra nukreipiama į objektyvą, kuris spinduliuotę sufokusuoja į vieną tašką židinio nuotolio atstume – židinio plokštumoje. Šviesa, atsispindėjusi nuo objekto, patenka į objektyvą ir keliauja į detektorius. Prieš detektorius vėlgi yra įmontuota apertūra, kuri ir įgalina erdvinį objektų vaizdinimą. Šios apertūros padėtis yra suderinta taip, kad pro ją patenka tik nuo objektyvo židinio plokštumoje esančių objektų atsispindėjusi šviesa. Į objektyvą, be abejo, patenka spinduliuotė ir iš kitų plokštumų, tačiau objektų, esančių arčiau ar toliau objektyvo židinio vaizdai yra atkuriami arba prieš apertūrą, arba už jos ir į detektorius patenka tik nedidelė dalis tokios spinduliuotės, kuri nulemia tam tikro foninio apšvietimo atsiradimą. Kuo didesnis objektyvo fokusavimo aštrumas (skaitinė apertūra), tuo plonesnė yra židinio plokštuma ir tuo geresnė yra pasiekama aksialinė skyra.

Vaizdai konfokalinėje mikroskopijoje yra gaunami taškas po taško skenuojant audinį. Taip gaunamas vaizdas vienos plokštumos, kurios storis ~ 3-5 μm . Tuomet spinduliuotė yra sufokusuojama giliau nuskenutos plokštumos ir vėl atliekamas plokštuminis skenavimas. Taigi atlikus 5-10 ar daugiau plokštuminių skenavimų galima atkurti erdvinį objekto vaizdą. Atspindžio konfokalinėje mikroskopijoje vaizdai yra gaunami dėka skirtingų audinio/ląstelės struktūrų nevienodo atspindžio koeficiento. Vaizdai yra nespaltoti – stipriau atspindinčios struktūros atrodo šviesiau, mažiau atspindinčios struktūros atrodo tamsiau.

Širdies audinių vaizdinimas konfokaline atspindžio mikroskopija atliktas „Vivascope 1500“ prietaisu (7.5.2 pav.).



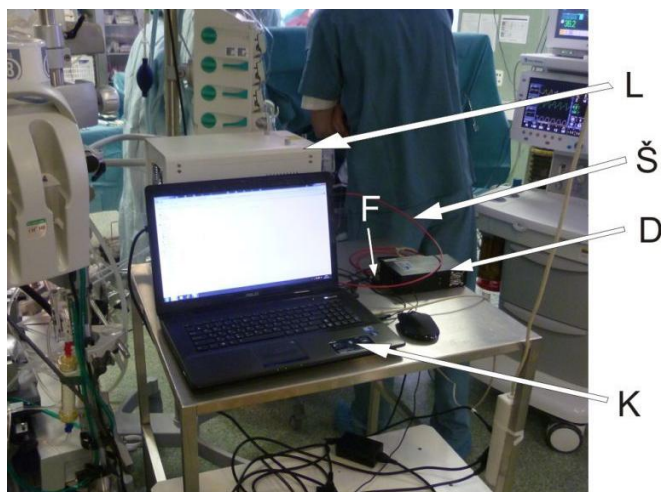
7.5.2 pav. Konfokalinės atspindžio mikroskopijos sistema, pritaikyta biologinių audinių apžiūrai (Vivascope 1500, Lucid).

Šiame įrenginyje yra įmontuotas nuolatinės veikos puslaidininkinis lazeris, kurio emituojamos bangos ilgis 800 nm. Šviesa į audinį yra fokusuojama 30 kartų didinančiu objektyvu, kurio skaitinė apertūra yra lygi 0,9. Tokiu objektyvu yra pasiekama 1–2 μm lateralinė ir 3–5 μm aksialine skiriamoji geba. Lazero spinduliuotės galia, kad nesukeltų terminių efektų, neviršija 30 mW, o naudojama infraraudonoji 800 nm spinduliuotė įgalina objektų vaizdinimą biologiniame audinyje iki 350 μm gylio [40,159]. Užfiksavus signalą, gautą iš vieno taško, lazero spindulys pasislenka per keletą mikrometrų ir apšviečia greta esantį tašką, iš kurio atspindėta šviesa taip pat patenka į detektorius. Taip, nejudinant audinio, yra nuskanuojamas 0,5 x 0,5 mm tiriamasis laukas. Tuomet audinys yra paslenkamas objektyvo atžvilgiu 0,5 mm ir vėl atliekamas 0,5 x 0,5 mm lauko skanavimas. Procedūra gali būti kartojama ir bendras skanavimo laukas, sudarytas iš nedidelių plotelių, siekia 8 x 8 mm. Tiriant audinius konfokaliniu mikroskopu yra naudojamas imersinis skystis, kuris eliminuoja atspindžius nuo audinio paviršiaus ir sumažina nukrypimus, atsirandančius dėl sferinio optinės sistemos paviršiaus.

7.6 Širdies audinių atskyrimas *in vivo* operacijos metu

Viena iš dažniausiai pasitaikančių operacijų, kuomet laidžiosios sistemos vizualizacijos problema ypač aktuali, yra įgimtų širdies ydų korekcijos. Šiuo atveju, dėl jau esančios ydos, chirurgai negali būti tikri, kad laidžioji sistema bus išsidėsčiusi kaip sveikoje širdyje. Dažniausiai tokios operacijos yra atliekamos nedidelio amžiaus vaikams, todėl partneriais buvo pasirinkti vaikų kardiochirurgai iš Vilniaus universitetinių ligoninių Santariškių klinikos. Šiam vienkartiniam tyrimui atlikti buvo gautas Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto leidimas bei tėvų ir Vilniaus savivaldybės vaikų apsaugos teisių atstovų sutikimai. Jokia informacija apie pacientą nebuvo renkama.

Širdies audinių atskyrimas operacijos metu buvo atliktas pagal šiame darbe sukurtą spektroskopinę metodiką. Konsultuojantis su kardiochirurgais buvo surinkta mobili optinės biopsijos aparatūra, tinkanti širdies audinių optinių savybių tyrimui operacijos metu. Ši aparatūra yra pavaizduota 7.6.1 paveiksle.



2.2.12 pav. Aparatūra integruota į operacinėje naudojamą įrangą. Paveiksle matoma ant mobilaus staliuko sumontuotas dviejų bangos ilgių šviesos šaltinis (L), detektorius (D), prie jų prijungti žadinimo bei surinkimo šviesolaidžiai (Š), žadinančios spinduliuotės atkirtimo filtras (F) bei kompiuteris (K), kuriame instaliuota spektrų apdorojimo programa.

Aparatūros esminiai komponentai yra šviesos šaltinis (L) ir detektorius (D). Sukurtoje ŠLS atskyrimo metodikoje, siekiant eliminuoti įvairius artefaktus, fluorescencijos intensyvumas viename taške registruojamas du kartus žadinant skirtingų bangos ilgių spinduliuote. Tam yra reikalingas dviejų bangos ilgių, kaip galima siauresnio spektrinio pločio, spinduliuotės šviesos šaltinis. Tyrime naudota japonų gamintojo Asahi Spectra medicininė ksenono lempa. Specialiai mūsų tyrimui buvo suprojektuotas ir pagamintas priedas, įgalinantis sujungti bifurkacinį šviesolaidį su šia lempa. Reikiamo bangos ilgio spinduliuotė buvo išrenkama naudojant interferencinius filtrus, kurie užtikrina itin siauro spektrinio pločio (FWHM ~ 10 nm), tačiau pakankamo intensyvumo žadinančiąją spinduliuotę. Filtrai buvo keičiami motorizuotu filtrų laikikliu, taip filtrų keitimo laiką sutrumpinant iki kelių milisekundžių.

Sekantis, itin svarbus komponentas – spektrų registravimo įrenginys (D). Biologinio audinio atsakas, kuomet nenaudojami jokie papildomi liuminescuojantys žymekliai, yra labai silpnas, todėl detektorius turi būti labai jautrus, bet tuo pačiu ir greitas. Tyrime naudotas šviesolaidinis spektrometras QE65000 (Ocean Optics), kuriame yra įmontuota termoelektriniu būdu aušinama 1024 x 58 puslaidininkinių detektorių matrica įgalinanti vienu metu registruoti visą liuminescencijos spektrą, taip minimizuojant detektavimo laiką. Siekiant aukšto jautrumo, viename matricos stulpelyje esančių 58 detektorių signalas yra sumuojamas, taip pasiekiant ir itin gerą signalo-triukšmo santykį (>1000:1).

Atliekant optinę biopsiją surinkimo šviesolaidį pasiekia ne tik audinio fluoroforų fluorescencija, bet ir atsispindėjusi bei išsklaidyta žadinimo šviesa. Dėl molekulės viduje vykstančių energinių virsmų fluorescencija visada stebima ilgesnių bangų srityje nei ją sukėlusį spinduliuotę, todėl surinktos spinduliuotės kelyje prieš detektorius, buvo dedamas fluorescencijos atkirtimo filtras (F).

Prieš tyrimą operacinėje visi mobilios optinės biopsijos aparatūros komponentai buvo nuvalyti sterilizuojančiu tirpalu. Tyrimo metu operaciniame

lauke buvo dirbama tik bifurkaciniu šviesolaidžiu, kuris prieš procedūrą buvo mirkytas sterilizaciniame tirpale 24 val.

Operacijos metu chirurgas šviesolaidį priglauzdavo tiesiog prie audinio paviršiaus. Buvo ieškoma visų trijų širdies audinių – JA, ŠLS ir MK. Kiekviename tyrimo taške buvo registruojami trys spektrai: atraminis signalas, siekiant įvertinti aplinkos šviesos įtaką (šiuo atveju žadinančioji spinduliuotė buvo išjunginama); tuoj pat po to buvo registruojami savitosios fluorescencijos spektrai žadinant 330 nm bei 380 nm spinduliuote. Tyrimas viename taške užtrukdavo apie 30s. Šio registravimo metu operuojantis chirurgas šviesolaidinį zondą turėjo išlaikyti nejudamai. Iš viso buvo užregistruoti 72 fluorescencijos spektrai iš 24 širdies vietų. Iš jų 10 vietų iš JA srities, 4 vietos iš MK bei 10 vietų, kuriose ieškota ŠLS. Duomenų apdorojimas bei spektrų analizė buvo atlikta po operacijos.

VIII. REZULTATAI IR APTARIMAS

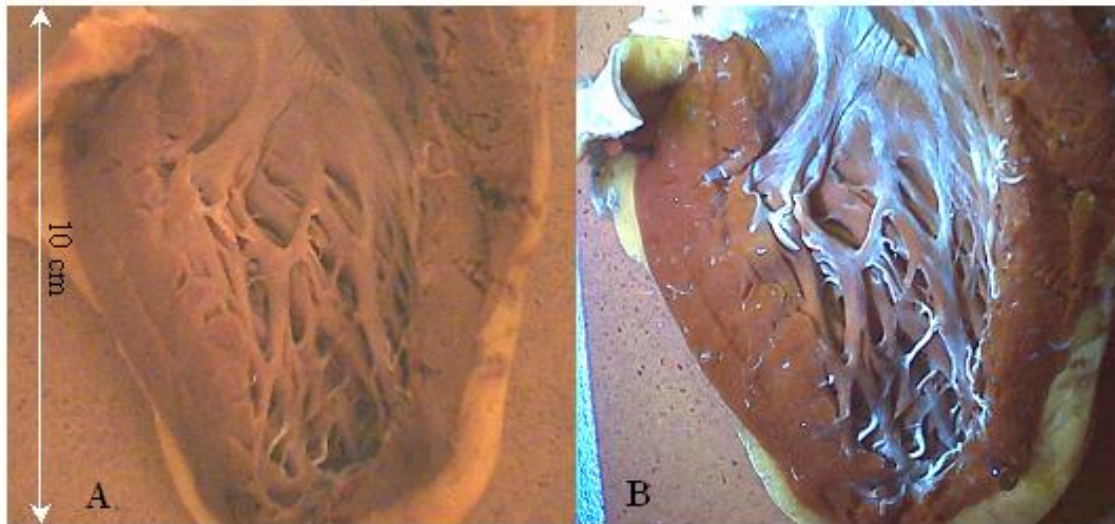
Širdies audinių tyrimai mūsų grupėje buvo pradėti 2001 metais. Pirminiai rezultatai, kurie leido pasukti optinių tyrimų kryptimi, buvo MK ir ŠLS preparatų sugerties spektroskopijos duomenys [160]. Šių tyrimų metu užregistruoti ŠLS ir MK sugerties skirtumai UV spektro srityje ties 280 nm. Tai rodo, kad ŠLS sudėtyje yra daugiau aromatinių aminorūgščių (triptofano, tirozino, fenilalanino), kurių įtakojami sugerties skirtumai taipogi galėtų atsispindėti ir fluorescencijos spektruose. Fluorescencinė spektroskopija yra daug lengviau pritaikoma biologinių audinių tyrimams, kadangi spektras yra matuojamas nuo audinio paviršiaus, tuo tarpu sugerties spektroskopijai reikalingas specialus audinių paruošimas ir jos pritaikymas *in vivo* yra neįmanomas. Vis dėlto sugerties spektroskopija yra labai informatyvi parenkant fluorescencijos žadinimo bangos ilgį, todėl prieš atliekant fluorescencinės spektroskopijos tyrimus buvo matuojamas fluorescencijos žadinimo spektras, kuris neesant audinyje sudėtingų pernašos procesų atitinka sugerties spektrą.

Pradinių fluorescencinės spektroskopijos tyrimų metu buvo tiriami gryni, atskirti nuo vidinio dengiamojo sluoksnio endokardo, širdies audiniai. Nustatyta, kad žadinant 365 nm spinduliuote, išskirta iš Hg lempos spektro, ŠLS fluorescencija yra pusantro karto intensyvesnė nei MK srityje nuo 450 nm iki 550 nm [163]. Taipogi nustatyta, kad aptikti fluorescencijos intensyvumo skirtumai yra pakankami dviejų (MK ir ŠLS) vizualiai nesiskiriančių audinių atskyrimui, todėl buvo atlikti pirminiai širdies audinių vaizdinimo fluorescenciniu metodu eksperimentai.

8.1 Širdies laidžiosios sistemos vaizdinimo eksperimentai

ŠLS vaizdinimo metu užregistruoti tarpkilvelinės pertvaros vaizdai dienos šviesoje bei panaudojant papildomą 365 nm spinduliuotės apšvietimą

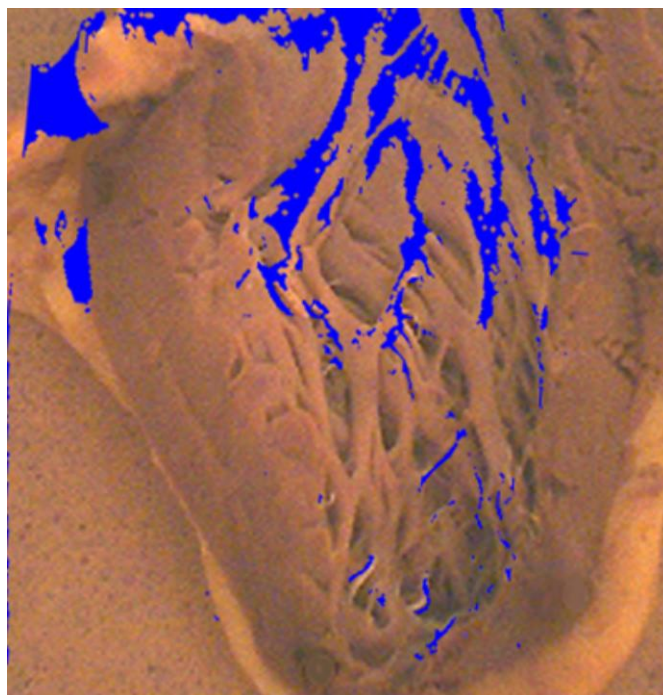
pateikti 8.1.1 paveiksle. Analogiškai buvo vaizdintos ir dar dvi širdies pertvaros [161].



8.1.1 pav. Širdies tarpkilvelinė pertvara ir joje matoma kairė Hiso pluošto šaka. Vaizdas dienos šviesoje (A), vaizdas apšvietus 365 nm bangos ilgio spinduliuote (B).

Dienos šviesos nuotraukoje matyti vidinės širdies struktūros, trabekulės, tačiau laidžiosios sistemos vertinimas galimas tik pagal anatominius atlasus, tuo tarpu fluorescencinėje nuotraukoje matyti aiškiai išsiskiriantys fluorescuojantys takai, kurie koreliuoja su kairiosios HP šakos lokalizacija – pertvaros viršuje švyti plati HP šaka, kuri tęsiasi iki pat skilvelių apačios. Pjūvių vietose miokarde matomi ploni siūliukai yra Purkinje skaidulos. Iš šių pavyzdžių matyti, kad širdies laidžiosios sistemos struktūra yra labai sudėtinga, todėl vienareikšmiškai nusakyti Hiso pluošto šakų išsidėstymo nenaudojant jokių vaizdinimo priemonių yra labai sunku. Norint gauti tikslesnį ŠLS išsidėstymo vaizdą, buvo atliekami kompiuteriniai vaizdų modeliavimai. Vaizdų apdorojimo metu išryškintos tik fluorescuojančios vietos. Šiam tikslui vaizde buvo išmatuotos raudonos, žalios ir mėlynos spalvos (RGB) santykinės intensyvumų vertės iš laidžiosios sistemos buvimo vietos (viršutinėje

tarpskilvelinės pertvaros dalyje). Vėliau atlikus skaičiavimus apibrėžtos tiksliai tos sritys, kuriose RGB vertės skyrėsi $\pm 5\%$ nuo išmatuos ŠLS vertės. Dienos šviesos nuotrauka, su apibrėžtais ŠLS kontūrais, išskirtais pagal šią metodiką pateikta 8.1.2 paveiksle.



8.1.2 pav. Kompiuteriu sumodeliuotas ŠLS vaizdas.

Iš pateiktų rezultatų matyti, kad net ir pritaikius pakankamai primitivų atskyrimo algoritmą, intensyviai fluorescuojančios vietos gali būti atskiriamos nuo nefluorescuojančių aplinkinių audinių (MK). Vis dėlto, atlikus išsamią fluorescencinių bei modeliųjų vaizdų analizę nustatyta, kad tarpskilvelinės pertvaros šonuose bei viršuje išsiskiria gerokai intensyviau nei laidžioji sistema švytinčios vietos – daug kolageno ir elastino turinčios struktūros, pvz. vožtuvas, kraujagyslių sienelės. Taigi fluorescencinėse nuotraukose po vaizdų apdorojimo į išskiriamą sritį patenka ir audiniai, kurių pagrindinė sudedamoji dalis yra JA. Taip yra todėl, kad JA didelę dalį sudaro audinių struktūriniai komponentai kolagenas ir elastinas, kurių fluorescencija yra smarkiai žadinama 365 nm spinduliuote, todėl papildomas 365 nm apšvietimas galėtų būti

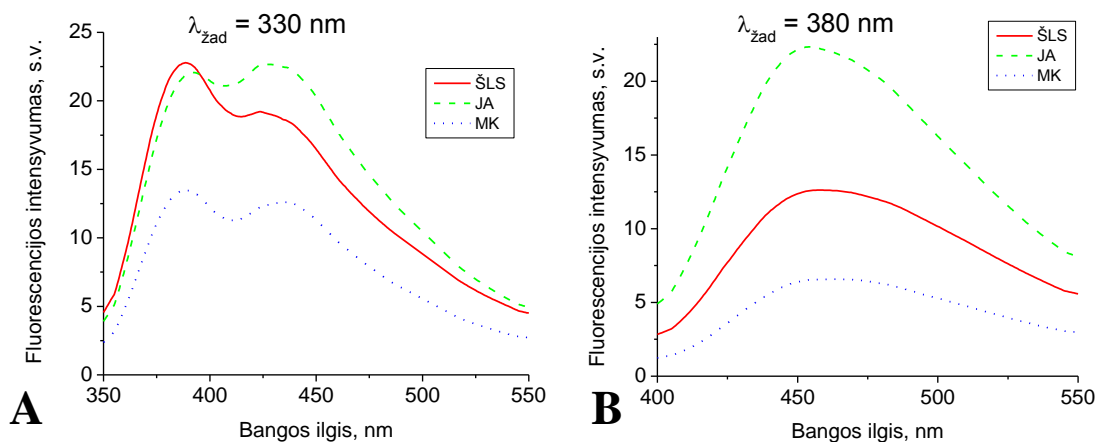
naudojamas tik apytiksliam ŠLS lokalizacijos įvertinimui, tuo tarpu tiksliam laidžiosios sistemos fluorescencijos atskyrimui nuo kito tipo širdies audinių fluorescencijos reikalinga sudėtingesnė fluorescencijos spektrų analizė, kuri gali būti atliekama tik naudojant fluorescencijos spektrų registravimo sistemas. Fluorescencinė spektroskopija įgalina pastebėti net ir nedidelius tų pačių fluoroforų fluorescencijos skirtumus, kurie yra sąlygoti skirtingos aplinkos ar audinio struktūros.

Kolageno ir elastino fluorescencija ir šių baltymų buvimas širdyje yra susijęs ne tik su vožtuvais bei kraujagyslių sienelėmis. Visas vidinis širdies paviršius yra padengtas endokardo sluoksniu, kurio vieni iš pagrindinių sudedamųjų komponentų taip pat yra kolagenas ir elastinas, todėl endokardo fluorescencija neabejotinai įtakos fluorescencinių vaizdų kontrastą, sumažinant intensyvumų skirtumus tarp ŠLS ir MK audinių. Tam tikrais atvejais širdyje yra stebimos kolageno bei elastino sankaupos – dažniausiai pagyvenusių žmonių širdyse MK yra stebimi fibrozės židiniai (JA sankaupos), kurie taipogi fluorescuoja intensyviau nei MK ir klaidingai gali būti identifikuoti kaip ŠLS dalis. Šių fibrozės židinių atsiradimo priežastis yra miokardo infarkto atvejai, kuomet dėl sutrikusios kraujotakos žuvus širdies raumens ląstelėms jų vietą užima JA.

Taigi atsižvelgiant į tai, kad kolagenas ir elastinas yra randamas daugelyje širdies audinių, o šių baltymų fluorescencija yra stebima ne tik pavienėse struktūrose, bet ir visame širdies vidiniame paviršiuje, visi tolesni tyrimai buvo atliekami nepašalinus dengiamojo EK sluoksnio. Į tolesnius širdies audinių tyrimus taip pat buvo įtraukti ir JA tipo audiniai, o siekiant nustatyti vienareikšmiško ŠLS atskyrimo nuo kitų tipų širdies audinių sąlygas, audinių fluorescencija buvo tiriama spektroskopiniais metodais.

8.2 Širdies audinių tyrimai nuostoviosios fluorescencinės spektroskopijos metodu

Pirmajame tyrimų etape buvo ieškoma ŠLS atskyrimui tinkamos fluorescencijos žadinimo ir detektavimo srities bei buvo vertinama kraujo įtaka registruojamiems fluorescencijos spektrams. Pagrindiniai fluoroforai, atsakingi už širdies audinių fluorescenciją regimojoje spektro srityje, yra kolagenas ir elastinas. Kolagenas yra sužadinamas 300 nm – 380 nm srityje ir fluorescencija yra registruojama 360 nm – 480 nm srityje. Elastinas yra sužadinamas 330 nm – 450 nm srityje, o fluorescencija yra stebima 350 nm – 550 nm srityje [164]. Remiantis šiais duomenimis bei anksčiau atliktais išpreparuotų širdies audinių tyrimais [32], fluorescencijai žadinti buvo pasirinkta 330 nm (kolageno sugerties smailė) ir 380 nm (elastino sugerties smailė) spinduliuotė. Fiksuotų širdies audinių fluorescencijos spektrai pateikiami 8.2.1 paveiksle.

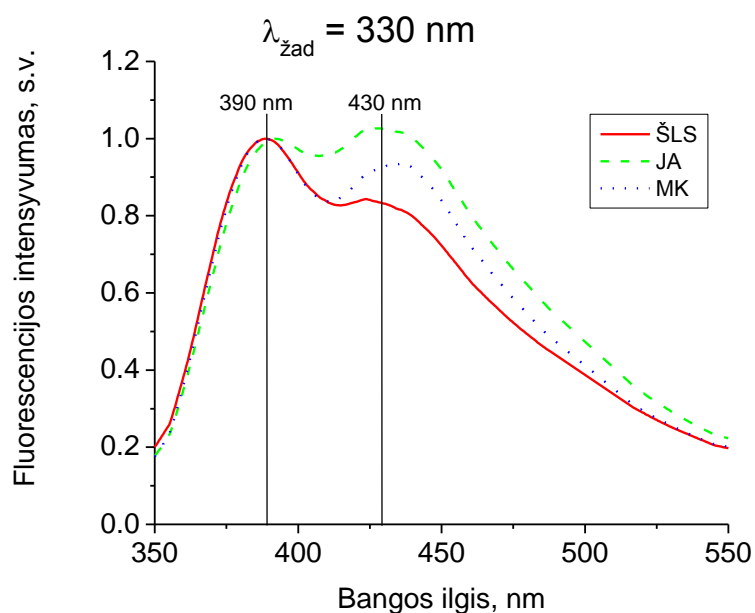


8.2.1 pav. Tipiniai fiksuotų širdies audinių fluorescencijos spektrai. A paveikslas – fluorescencija žadinta 330 nm spinduliuote, B paveikslas – fluorescencija žadinta 380 nm spinduliuote.

Žadinant 330 nm spinduliuote daugiausiai yra sužadinamas kolagenas ir nestipriai elastinas. Intensyviausiai žadinant šiuo bangos ilgiu fluorescuoja JA ir ŠLS, tuo tarpu MK fluorescencija yra beveik du kartus mažesnė. Fluorescencijos spektre stebima įduba ties 413 nm greičiausiai yra įtakota

likusio kraujo. Žadinant 380 nm spinduliuote intensyviausiai fluorescuoja JA, silpniau ŠLS, o MK fluorescencija yra silpniausia. Tokie charakteringi intensyvumų pasiskirstymai galėtų būti panaudoti ŠLS atskyrimui nuo MK, tačiau ŠLS šiuo atveju lengvai galėtų būti supainiota su JA. Kita vertus, fluorescencijos intensyvumas labai priklauso nuo fluorescencijos registravimo sąlygų, pvz., nevienodai priglautas šviesolaidis gali nulemti to pačio audinio tipo skirtingo intensyvumo fluorescencijos spektrus. Šiuo atveju atliekant eksperimentus audinys buvo uždengtas stikliuku ir šviesolaidis priglautas prie jo, todėl manoma, kad eksperimento metu sąlygos buvo išlaikytos vienodos ir intensyvumų skirtumai yra įtakoti paties audinio savybių. Realiomis sąlygomis tai užtikrinti būtų gerokai sunkiau, tačiau tai yra įmanoma vaizdinant, kuomet širdis apšviečiama homogeniškai pasiskirsčiusia spinduliuote, taip užtikrinant vienodo intensyvumo žadinimą visose srityse, ir vaizdas yra fiksuojamas kamera. Tuomet stebima įvairių vietų skirtingo intensyvumo fluorescencija būtų nulemta skirtingo tipo audinių, tačiau kaip ir minėta, šiuo atveju ŠLS negalėtų būti vienareikšmiškai atskirta nuo JA.

Apibendrinant galima teigti, jog žadinant 380 nm spinduliuote stebimi didžiausi širdies audinių fluorescencijos intensyvumų skirtumai, tuo tarpu žadinant 330 nm spinduliuote yra stebimi didžiausi širdies audinių spektrų formos skirtumai. Žadinant šio bangos ilgio spinduliuote fluorescencijos spektre susiformavusios smailės ties 390 nm ir 430 nm yra skirtingo intensyvumo visuose audiniuose (8.2.2 pav.).



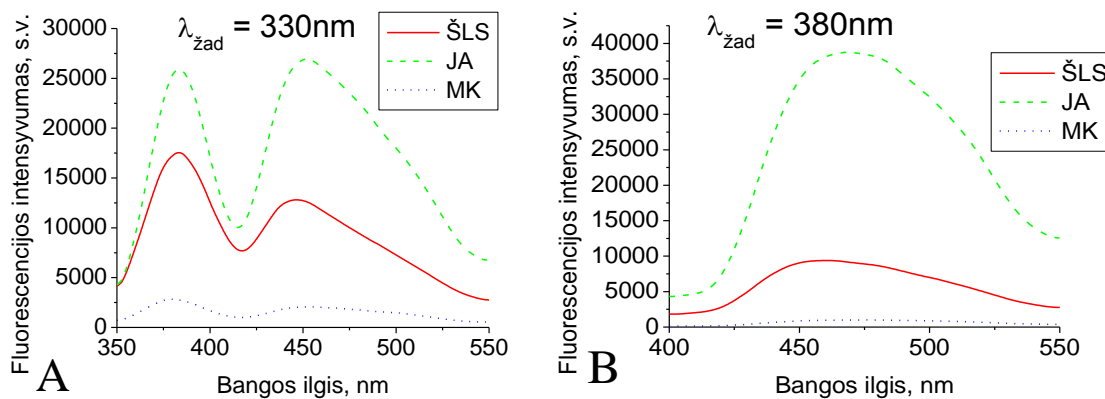
8.2.2 pav. Fluorescencijos spektrai, sunormuoti į pirmąją smaile.

Intensyvumų santykis $R^{(audinio)} = I_{390}/I_{430}$ yra charakteringas kiekvienam audiniui: $R^{(ŠLS)} = 1.20 \pm 0.02$, $R^{(JA)} = 0.97 \pm 0.02$ ir $R^{(MK)} = 1.11 \pm 0.04$. Nors apskaičiuotų santykių skirtumai ir yra pakankami visų trijų audinių atskyrimui, tačiau matavimai šioje srityje gali būti stipriai iškraipomi kraujo.

Šie pirmojo tyrimų etapo rezultatai parodo, jog nėra specifinės fluorescencijos žadinimo ar detektavimo srities, kurią pasirinkus būtų galima selektyviai sužadinti ar stebėti tik kurio nors vieno širdies audinio tipo (ŠLS, MK ar JA) fluorescenciją. Tai leidžia daryti išvadą, jog taipogi nėra fluoroforo, kuris egzistuotų tik kuriame nors viename audinio tipe. Elektroforezės tyrimai, kurie buvo atlikti su audinių ekstraktais, taipogi parodė, kad ŠLS, MK ir JA yra sudaryti iš panašios masės baltymų, tačiau skiriasi jų kiekiai [165]. Vadinasi stebimi spektriniai skirtumai pirmiausiai yra nulemti skirtingų kolageno ir elastino kiekių. Daugiausia šių baltymų, kurie yra esminiai audinių struktūriniai elementai, yra JA, todėl JA fluorescencija ir yra intensyviausia. MK yra raumeninis audinys ir yra atsakingas už širdies sutraukimą, todėl struktūrinių baltymų jame yra mažiau ir MK fluorescencijos intensyvumas yra pastebimai mažesnis nei JA. ŠLS ląstelės, kurios yra atsakingos už greitą

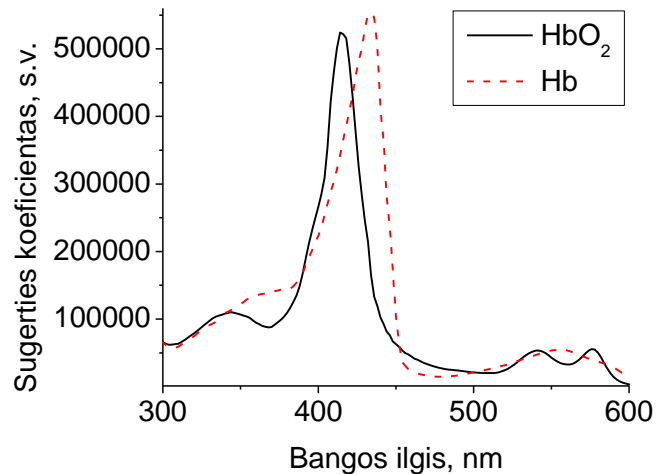
impulso perdavimą, taip pat turi nedaug kolageno ir elastino, tačiau stebima pakankamai intensyvi ŠLS fluorescencija gali būti susijusi su laidžiąją sistema supančiu apvaskalu sudarytą iš kolageno ir elastino. Šis apvaskalas izoliuoja laidžiosios sistemos takus nuo MK ir yra būdingas Hiso pluoštui bei Purkinje tinklui [166], todėl tikėtina, jog fluorescencijos intensyvumas bus panašus visose šiose ŠLS dalyse.

Aptikti fluorescencijos intensyvumo bei spektrinės formos skirtumai rodo, jog charakterizuojant širdies audinius fluorescencinės spektroskopijos metodu didžiausias kontrastas tarp skirtingo tipo audinių gali būti pasiektas tik išnaudojant abiejų fluoroforų – kolageno ir elastino fluorescenciją. Remiantis šiais rezultatais ir buvo sukurta ŠLS atskyrimo metodika. Pagrindinė metodikos idėja yra kiekviename tyrimo taške fluorescenciją žadinti kolageno ir elastino sužadimui būdingais spinduliuotės bangos ilgiais (330 nm ir 380 nm), o fluorescenciją registruoti toje spektro srityje, kur yra stebimi didžiausi pokyčiai – 400 nm – 500 nm intervale. Vienintelis apribojimas šioje spektrinėje srityje yra fluorescencijos reabsorbcija dėl gyvuose biologiniuose audiniuose esančio kraujo. Tai yra viena iš pagrindinių problemų, su kuria susiduriama taikant optinius metodus gyvų audinių diagnostikai. Visas žmogaus kūnas yra išraizgytas didesnių ar mažesnių kraujagyslių, kapiliarų, todėl net ir neesant kraujo ant audinio paviršiaus, optinės audinių savybės yra smarkiai įtakojamos kraujo. Nors chirurginės intervencijos metu kraujas yra pašalinamas iš operacijos lauko [167], vis dėlto kraujo buvimo galimybė negali būti atmesta, todėl buvo atlikti tyrimai siekiant įvertinti kraujo įtaką registruojamiems širdies audinių fluorescencijos spektrams.



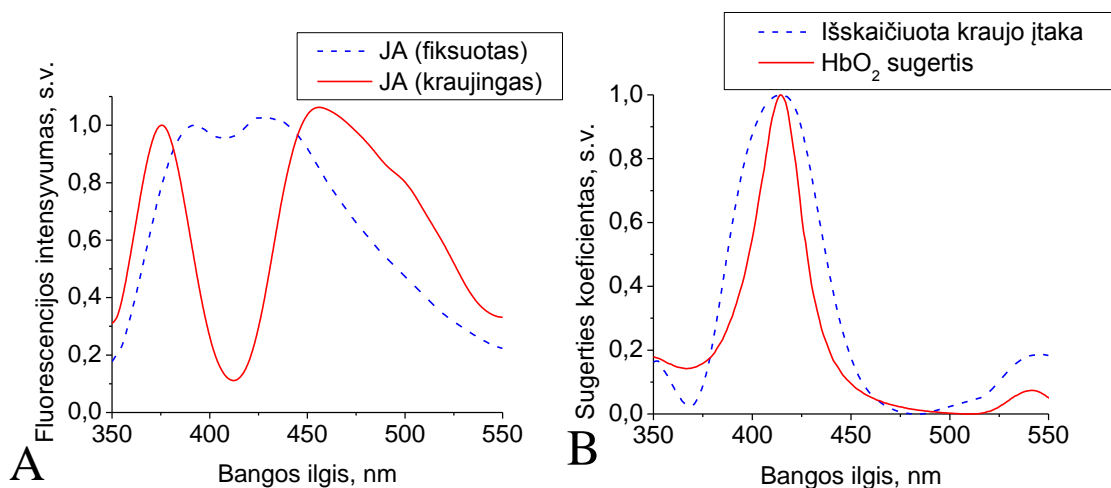
8.2.3 pav. Tipiniai kraujingų širdies audinių fluorescencijos spektrai. A paveikslas – fluorescencija žadinta 330 nm spinduliuote, B paveikslas – fluorescencija žadinta 380 nm spinduliuote.

Kraujo įtakos vertinimui buvo išmatuoti fluorescencijos spektrai nefiksuotų širdies audinių, kuriuose kraujas nebuvo išplautas. Šių audinių fluorescencijos spektrai pavaizduoti 8.2.3 paveiksle. Žadinant 330 nm spinduliuote ties 413 nm stebima dar didesnė įduba nei fiksuotuose audiniuose. Atitinkamai žadinant 380 nm spinduliuote fluorescencijos spektre stebimas intensyvumo sumažėjimas trumpabangėje spektro pusėje. Siekiant nustatyti, ar stebimi pokyčiai yra tikrai nulemti kraujo, buvo atlikta išsamesnė abiejų tipų spektrų analizė. Pagrindinis kraujo komponentas, kuris stipriausiai sugeria šviesą, yra hemoglobinas. Hemoglobinas kraujyje egzistuoja dviejų būsenų – oksiduotas ir redukuotas. Hemoglobino sugerties spektras pateiktas 8.2.4 paveiksle.



8.2.4 pav. Oksiduoto (HbO_2) ir redukuoto (Hb) hemoglobino spektrai

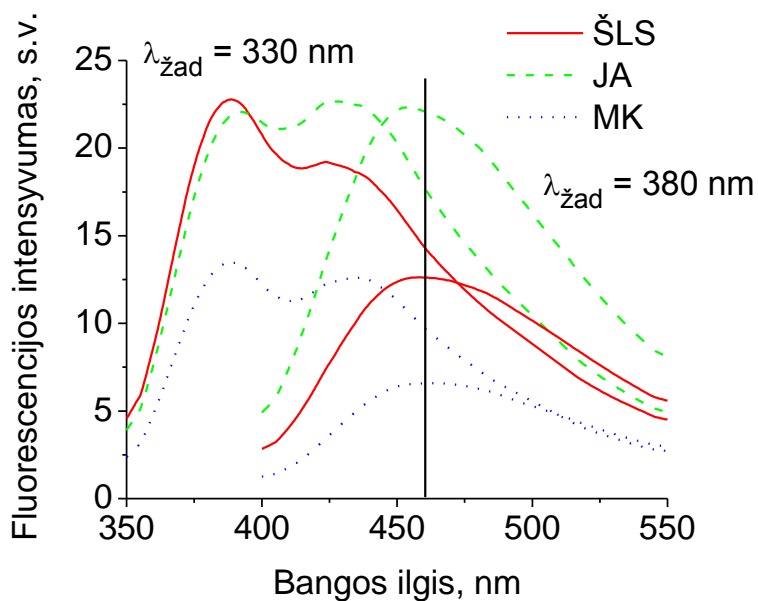
Pagal Lamberto-Bugero dėsnį, sugerties koeficientas yra proporcingas $A \approx (I_0 - I)/I_0 = I_s/I_0$, kur I_0 yra krentančios į bandinį šviesos intensyvumas, I – praėjusios pro bandinį šviesos intensyvumas, I_s – sugertos šviesos intensyvumas. Analogiškus veiksmus galima atlikti ir su užregistruotais širdies audinių fluorescencijos spektrais. Analizei pasirinkti JA fluorescencijos spektrai žadinant 330 nm spinduliuote (8.2.5A pav.).



8.2.5 pav. A paveikslas – fiksuoto ir kraujingo jungiamojo audinio normuoti fluorescencijos spektrai. Fluorescencija žadinta 330 nm. B paveikslas – išskaičiuotos kraujo įtakos bei kraujo sugerties spektrų palyginimas.

Fiksuoto audinio fluorescencijos spektras atitinka krentančios į bandinį šviesos intensyvumą I_0 , o kraujingo audinio fluorescencijos spektras atitinka praėjusios pro bandinį šviesos intensyvumą I . Atlikus veiksmus išskaičiuota kraujo įtaka (8.2.5B pav.), kuri atitinka kraujo sugerties spektrą (8.2.4 pav.) Šiuo atveju dominuoja oksiduoto hemoglobino sugertis, nes ore esantis kraujas greitai įsisotina deguonimi ir redukuoto hemoglobino įtakos beveik nestebime.

Iš atliktos analizės paaiškėjo, kad fluorescencijos skirtumai, stebimi tarp fiksuotų ir nefiksuotų audinių 380 nm – 450 nm spektrinėje srityje, yra nulemti kraujo sugerties, todėl anksčiau aptikti ŠLS spektriniai ypatumai 390 nm – 430 nm srityje gali būti įtakojami kraujo tiriant gyvus audinius. Taigi, siekiant išvengti kraujo reabsorbcijos, spektriniai skirtumai tarp širdies audinių turi būti nagrinėjami toje srityje, kur kraujo sugertis yra minimali, t.y. spektrinėje srityje tarp 450 nm ir 530 nm. Ilgabangėje spektro dalyje, tolstant nuo kraujo Soret sugerties juostos, kraujo sugertis mažėja, tačiau skirtumai tarp širdies audinių taip pat mažėja, todėl tinkamiausia sritis turėtų būti kuo arčiau mėlynosios spektro dalies. Atsižvelgiant į oksiduoto ir redukuoto hemoglobino sugertį bei širdies audinių fluorescencijos spektrus, tolimesniems tyrimams pasirinkta fluorescencijos registravimo sritis ties 460 nm. Ties šiuo bangos ilgiu kraujo sugertis mūsų nagrinėjamoje spektrinėje srityje yra mažiausia, taipogi šioje srityje yra vieno iš pagrindinių širdies audinių fluoroforo elastino fluorescencijos spektro maksimumas. Kolagenas ties šiuo bangos ilgiu taipogi fluorescuoja, todėl ties 460 nm stebėsime abiejų fluoroforų fluorescenciją. Dėl nevienodo šių struktūrinių baltymų kiekybinio pasiskirstymo įvairių tipų širdies audiniuose yra stebimas skirtingas fluorescencijos intensyvumų pokytis ties 460 nm žadinant 330 nm ir 380 nm (8.2.6 pav.).



8.2.6 pav. ŠLS, JA ir MK fluorescencijos spektrai žadinant 330 nm ir 380 nm spinduliuote. Vertikali linija yra atidėta ties 460 nm.

ŠLS fluorescencijos intensyvumas ties 460 nm pakinta labai nežymiai esant skirtingiems žadinimo bangos ilgiams. MK fluorescencija pakeitus žadinimo bangos ilgį iš 330 nm į 380 nm susilpnėja, tuo tarpu JA fluorescencija sustiprėja. Siekiant išryškinti šių intensyvumo pokyčių svarbą yra skaičiuojamas fluorescencijos intensyvumo verčių ties 460 nm santykis $I_{330}^{ad}(460)/I_{380}^{ad}(460)$. Pasinaudojant šiais charakteringais intensyvumų pokyčiais audinių atskyrimo metodika gali būti modifikuota į labai paprastą procedūrą – fluorescencija yra žadinama paeiliui 330 nm ir 380 nm spinduliuote ir fluorescencijos intensyvumai yra užregistruojami tik ties vienu bangos ilgiu – t.y. neregistruojamas visas fluorescencijos spektras, o tik intensyvumo vertė ties 460 nm. Taip sutrumpėja signalo registravimo laikas iki keleto sekundžių. Taip pat, tyrimo aparaturoje nebūtina naudoti spektrų registravimo įrenginio, pakaktų tik detektoriaus, gebančio registruoti ateinančios spinduliuotės intensyvumą. Tokie detektoriai yra jautresni ir pigesni. Dar vienas tokios metodikos esminis privalumas – jog ši metodika nejautri žadinimo-registravimo sąlygų pokyčiams. Taip yra todėl, kad viename

tyrimo taške nejudinant šviesolaidžio yra užregistruojami du intensyvumai ir yra skaičiuojamas šių intensyvumų santykis. Kintant žadinimo-registravimo sąlygoms kinta registruojamas fluorescencijos intensyvumas, tačiau skaičiuojant santykį pokytis, įtakotas nevienodų sąlygų, yra eliminuojamas.

Remiantis šia metodika buvo ištirti 8 bandiniai. Tik trijuose iš šių bandinių pavyko anatomiškai identifikuoti ir pažymėti visus tris audinių tipus (ŠLS, MK ir JA), tuo tarpu visuose 8 buvo pažymėta ŠLS ir MK lokalizacija. Fluorescencijos spektrai buvo matuoti tik šiuose, patyrusio patologo identifikuotuose taškuose, kurių morfologija buvo patvirtinta po fluorescencinių matavimų.

Atliekant fluorescencinius matavimus pastebėta, kad kai kuriuose bandiniuose registruojami fluorescencijos intensyvumai buvo gerokai didesni nei kituose bandiniuose. Tai stebėta visų tipų audiniams. Dėl to suskaičiuoti intensyvumų santykiai taipogi buvo gerokai didesni, nei kituose bandiniuose. Stebimi efektai gali būti nulemti nevienodos audinių struktūros bei sudėties skirtingose širdyse, taipogi dėl nevienodo EK storio bei skirtingos preparatų paėmimo vietos širdyje. Iš viso buvo išmatuota 37 vietų (19 ŠLS, 13 MK ir 5 JA) fluorescencijos intensyvumų santykiai. Suskaičiuoti intensyvumų santykiai $\langle R^{aud} \rangle(460) = I_{330}^{ad} / I_{380}^{ad}$ yra apibendrinti 1 lentelėje. Lentelėje taip pat pateiktos skirtumų reikšmingumo lygio vertės suskaičiuotos visiems 8 preparatams (tarp ŠLS ir MK) ir 3 preparatams (tarp ŠLS ir JA). Fluorescencijos intensyvumų santykių tame pačiame preparate skirtumų reikšmingumas buvo įvertintas naudojant nepriklausomą t-Testą, kai nulinė hipotezė ($\langle R^{HCS} \rangle - \langle R^{MC} \rangle \geq 0$, $\langle R^{HCS} \rangle - \langle R^{CT} \rangle \leq 0$). Nepriklausomų imčių testas pasirinktas todėl, kad šiuo atveju yra ieškoma skirtumų tarp nesusijusių imčių – skirtingų audinių (ŠLS, MK ir JA).

1 lentelė. Fluorescencijos intensyvumų santykiai žadinant 330 nm ir 380 nm bangos ilgio spinduliuote suskaičiuoti ties 460 nm.

Preparato Nr.	$\langle R^{JA} \rangle (460)$ $\pm SD [n]$	$P(H_0 = 0)$ $\times 10^{-3}$	$\langle R^{SLS} \rangle (460)$ $\pm SD [n]$	$P(H_0 = 0)$ $\times 10^{-3}$	$\langle R^{MK} \rangle (460)$ $\pm SD [n]$
1			1.01 ± 0.03 [3]	6.9	1.31 [1]
2	0.92±0.01 [2]	49.8	1.14 ± 0.13 [4]	4.1	1.60 ± 0.15 [3]
3	1.12 [1]	– *	1.64 [1]	– *	1.94 [1]
4	0.84±0.04 [2]	17.2	1.22± 0.09 [2]	26.3	1.49 ± 0.01 [2]
5			1.08 ± 0.1 [3]	1.28	2.16 ± 0.16 [2]
6			1.85 ± 0.02 [2]	21.5	2.23 [1]
7			2.75 ± 0.02 [2]	12.7	3.98 ± 0.28 [2]
8			1.59 ± 0.02 [2]	5.35	3.14 [1]
Vidutinių verčių vidurkis	0.96±0.14 [5]	(25.0)	1.54±0.58 [19]	(3.10)	2.23± 0.91 [13]

$\langle R^{JA} \rangle$, $\langle R^{SLS} \rangle$ ir $\langle R^{MK} \rangle$ – vidutinės atitinkamo audinio intensyvumų santykių vertės tame pačiame preparate;

SD – standartinis nuokrypis;

[n] – matavimo vietų skaičius;

$P(H_0 = 0)$ – reikšmingumo lygio vertės esant nulinei hipotezei ($\langle R^{HCS} \rangle - \langle R^{MC} \rangle \geq 0$, $\langle R^{HCS} \rangle - \langle R^{CT} \rangle \leq 0$);

* $P(H_0 = 0)$ vertė negali būti suskaičiuota, kadangi standartinių paklaidų skirtumas yra lygus 0. Vis dėlto dvi vertės yra reikšmingai skirtingos su 95% tikimybe.

Vidutinės vertės $\langle R^{aud} \rangle (460)$ suskaičiuotos tam tikram audinio tipui yra pakankamai išsibarsčiusios skirtinguose bandiniuose (1 lentelė, 2,4,6 stulpeliai). Kaip ir minėta, šie skirtumai gali būti sąlygoti vidinių audinių parametru, kurie yra nevienodi skirtingose širdyse, todėl vidutinių verčių vidurkių (1 lentelė, paskutinė eilutė) standartiniai nuokrypiai yra pakankamai dideli. Visų tirtų ŠLS vietų visuose bandiniuose vidurkis yra $1,54 \pm 0,58$; visų tirtų JA vietų visuose bandiniuose vidurkis yra $0,96 \pm 0,14$; visų tirtų MK vietų

visuose bandiniuose vidurkis yra 2.23 ± 0.91 . Paklaidos yra tokios didelės, jog iš to išplaukia, kad tiesioginis santykių palyginimas iš skirtingų preparatų (širdžių) nėra patikimas ir praktiškai nenaudingas. Tuo tarpu skirtingų širdies audinių fluorescencijos intensyvumų santykių vidutinės vertės tame pačiame bandinyje (širdyje) visada skyrėsi reikšmingai. Kaip taisyklė, vidutinė ŠLS vertė tame pačiame bandinyje buvo reikšmingai didesnė nei JA ir reikšmingai mažesnė nei MK (1 lentelė, fluorescencijos intensyvumų santykių vertės eilutėse).

Statistinis skirtumų reikšmingumas tarp ŠLS ir JA taip pat tarp ŠLS ir MK vidutinių verčių visuose tirtuose bandiniuose buvo įvertintas naudojant porinį t-Testą esant tai pačiai nulinei hipotezei. Šiuo atveju pasirinktas priklausomų imčių testas, todėl, kad lyginant duomenis tarp skirtingų širdžių yra laikoma, jog skirtingo tipo audiniai tame pačiame preparate yra genetiškai susiję. Tai patvirtina ir anksčiau stebėtas efektas, jog kai kurių bandinių fluorescencija net ir esant toms pačioms žadinimo-registravimo sąlygoms yra gerokai intensyvesnė nei kitų. Natūralu, kad skirtingų asmenų baltyminė audinių sudėtis ar jų struktūra yra specifiška, todėl tai leidžia daryti prielaidą, jog tos pačios širdies skirtingo tipo audiniai, lyginant juos su kita širdimi, yra susiję.

Paskaičiuoti vidutinių verčių skirtumų reikšmingumai yra pateikti 1 lentelėje paskutinėje eilutėje $P(H_0 = 0)$ stulpeliuose. Šios vertės atspindi vidutines tikimybes teisingai atskirti audinių tipus bet kuriame bandinyje (širdyje). Tarp ŠLS ir JA gauta vertė 0,025 rodo, kad tikimybė JA klaidingai atpažinti kaip ŠLS yra mažesnė nei 3%, o vertė tarp ŠLS ir MK, kuri lygi 0,0031 rodo, jog MK klaidingai priskirti ŠLS yra dar mažesnė tikimybė.

Apibendrinant galima teigti, jog skirtingų širdžių suvidurkinta vieno tipo audinio vertė paklaidų ribose nesiskiria nuo vidutinės vertės kito tipo audinio, tačiau skirtumai toje pačioje širdyje tarp skirtingų audinių tipų yra statistiškai reikšmingi ir pakankami tų audinių atskyrimui. Tai rodo sukurtos metodikos tinkamumą atskirti ŠLS nuo kitų širdies audinių tipų, tačiau tik toje pačioje širdyje. Siekiant procedūrą standartizuoti metodika turi būti

modifikuota atsižvelgiant į individualius skirtumus tarp širdžių. Šiam tikslui visi fluorescencijos intensyvumų santykiai kiekviename bandinyje buvo sunormuoti į ŠLS santykį tame bandinyje. Tokiu būdu gautos normuotos vidutinės vertės $\langle R^{aud}_n \rangle(460) = \langle R^{aud} \rangle(460) / \langle R^{ŠLS} \rangle(460)$. Šios vertės pateiktos 2 lentelėje. Normavimas suteikia papildomą galimybę suskaičiuoti gautų verčių patikimumo intervalus. Patikimumo intervalai suskaičiuoti esant 95 % atskyrimo tikimybei. Pavyzdžiui, ŠLS ir JA atveju „0,15“ reiškia, kad audinys, kurio $\langle R^{aud}_n \rangle(460)$ didesnis nei 0,85 gali būti atpažintas kaip ŠLS. Analogiškai ŠLS ir MK atveju „0,24“ reiškia, kad audinys, kurio $\langle R^{aud}_n \rangle(460)$ didesnis nei 1,24 nebegali būti priskirtas ŠLS ir gali būti atpažintas kaip MK. Taigi suskaičiuotas patikimumo intervalas $0,85 < R^{aud}_n(460) < 1,24$ apibūdina širdies audinį, kuris remiantis fluorescencinės spektroskopijos duomenimis su 95 % tikimybe gali būti priskirtas ŠLS. Galima paminėti, kad šis patikimumo intervalas nei viename tirtame bandinyje nebuvo viršytas.

2 lentelė. Fluorescencijos intensyvumų santykiai žadinant 330 nm ir 380 nm bangos ilgio spinduliuote suskaičiuoti ties 460 nm ir sunormuoti į ŠLS vertę.

Preparato Nr.	$\langle R^{JA}_n \rangle(460)$	Patikimumo intervalas	$\langle R^{ŠLS}_n \rangle(460)$	Patikimumo intervalas	$\langle R^{MK}_n \rangle(460)$
1			1 ± 0.03		1.3
2	0.81 ± 0.01		1 ± 0.11		1.40 ± 0.13
3	0.68		1		1.18
4	0.69 ± 0.03		1 ± 0.07		1.22 ± 0.01
5			1 ± 0.09		2.00 ± 0.15
6			1 ± 0.01		1.21
7			1 ± 0.01		1.45 ± 0.1
8			1 ± 0.01		1.97
Vidurkis	0.73 ± 0.07	0.15	$1 \pm 0.11^*$	0.24	1.47 ± 0.33

$\langle R^{JA}_n \rangle$, $\langle R^{ŠLS}_n \rangle$ ir $\langle R^{MK}_n \rangle$ – vidutinės atitinkamo audinio intensyvumų santykių vertės sunormuotos į $\langle R^{ŠLS} \rangle$ vertę tame pačiame bandinyje;

* Skaičiavimuose naudota didžiausia standartinės paklaidos vertė.

Remiantis šiais rezultatais galima daryti išvadą, jog atliekant ŠLS atskyrimo procedūrą užregistruoti fluorescencijos intensyvumai turi būti perskaičiuojami kiekviename bandinyje (širdyje) sunormuojant juos į vertę gautą iš srities, kuri tiksliai gali būti priskirta ŠLS. Tuomet likusioje širdies dalyje audinių identifikavimui yra naudojami normuoti intensyvumų santykiai. Deja, bet net ir nedidelė tikslios ŠLS dalies lokalizacija ne visada gali būti identifikuota širdyje operacijos metu, todėl normavimą būtų kur kas patogiau atlikti į vieną iš didžiausių širdies dalį užimančių audinių – MK. Šio raumens vienareikšmiškas atpažinimas net ir operacijos metu nėra sudėtingas ir širdies audinių identifikavimo procedūra galėtų būti pradedama išmatuojant atramines vertes nuo MK audinio. Šiuo atveju yra reikalinga vidutinė normuota MK vertė $\langle R_n^{MK} \rangle$ (2 lentelė). $\langle R_n^{MK} \rangle(460)$ vertė 1,47 suskaičiuota iš 8 preparatų parodo, kiek kartų toje pačioje širdyje fluorescencijos intensyvumų santykis MK bus aukštesnis nei fluorescencijos intensyvumų santykis ŠLS. Ši vertė gali būti pavadinta atstojamąja MK verte V_{MK} . Be abejo, siekiant didesnio patikimumo, ši vertė turėtų būti suskaičiuota iš kuo didesnio kiekio preparatų. Tuomet tikėtinas ŠLS intensyvumų santykis gali būti apskaičiuojamas taip: $\langle R^{\check{S}LS} \rangle(460) = \langle R^{MK} \rangle(460)/V_{MK}$, kur $\langle R^{MK} \rangle(460)$ yra atraminių MK signalų, išmatuojamų procedūros pradžioje, vidutinė vertė. Pavyzdžiui, preparate (širdyje) Nr. 2, fluorescencijos intensyvumų santykių vidurkis, kuris atitiktų atraminių verčių vidurkį, yra 1,6 (1 lentelė, preparatas Nr. 2). Pagal aprašytą metodą suskaičiuojame ŠLS atitinkančią vertę šiame preparate: $\langle R^{\check{S}LS} \rangle(460) = 1,6/1,47 = 1,09$. Apatinė ir viršutinė ŠLS audinio vertės taip pat gali būti apskaičiuotos iš patikimumo intervalų (2 lentelė). Apatinė vertė yra suskaičiuojama $\langle R^{\check{S}LS} \rangle(460) - 0,15$, o viršutinė $\langle R^{\check{S}LS} \rangle(460) + 0,24$. Reikia atkreipti dėmesį, jog intervalų vertės 2 lentelėje buvo suskaičiuotos normuotoms vertėms, todėl šiuo atveju, skaičiuojant ne normuotas vertės, intervalą apibūdinantys skaičiai turi būti padauginami iš ŠLS vertės $\langle R^{\check{S}LS} \rangle(460)$, šio konkretaus pavyzdžio atveju iš 1,09. Taigi apatinė intervalo vertė, kuriai esant širdies audinys dar gali būti atpažintas kaip ŠLS, o žemiau šios vertės

esantis audinys jau bus priskiriamas JA, yra suskaičiuojama $\langle R^{\text{ŠLS}} \rangle(460) - (0,15 \cdot 1,09) = 0,93$. Analogiškai yra gaunama viršutinė vertė, kuriai dar esant audinys yra atpažįstamas kaip ŠLS, o ją viršijus jau yra priskiriamas MK: $\langle R^{\text{ŠLS}} \rangle(460) + (0,24 \cdot 1,09) = 1,35$. Šios ribinės vertės parodo, jog preparate Nr. 2 esantys širdies audiniai, kurių išmatuotų fluorescencijos intensyvumų santykiai $\langle R^{\text{aud}} \rangle(460)$ patenka į intervalą tarp 0,93 ir 1,35, su 95% tikimybe gali būti identifikuoti kaip ŠLS. Apskaičiuotos intervalo vertės koreliuoja ir su eksperimentiškai išmatuotais intensyvumų santykiais (1 lentelė, 2 preparatas) – $1,14 \pm 0,13$ (ŠLS); $0,92 \pm 0,01$ (JA); $1,60 \pm 0,15$ (MK). Taigi visos eksperimentiškai išmatuotos JA ir MK vertės neperžengė apskaičiuoto intervalo ribų. Šis pavyzdys parodo, jog ŠLS atpažinimo procedūra sėkmingai gali būti pradama nuo atraminių MK verčių išmatavimo. Toliau, panaudojus atstojamąją MK vertę V_{MK} bei patikimumo intervalus (2 lentelė) yra suskaičiuojamos ŠLS audiniui būdingos fluorescencijos intensyvumų santykių vertės, kuriomis remiantis yra atliekamas kitų tiriamų širdies vietų identifikavimas.

Fluorescencijos intensyvumai taip pat buvo registruoti ir atsitiktinai pasirinktose širdies vietose, kurios nebuvo pažymėtos patologo. Šių tyrimų metu pastebėta, jog tam tikrose vietose registruotų intensyvumų santykiai negalėjo būti priskirti nei vienam audinio tipui. Tokia situacija gali susidaryti dėl šviesolaidžio, naudojamo fluorescencijos žadinimui (0,6 mm) ir registravimui (0,2 mm), skaidulų skersmens. Šiose neaiškiose vietose šviesolaidis galėjo būti priglaustas ties dviejų skirtingų tipų audinių riba, todėl užregistruotas fluorescencijos intensyvumas buvo sudarytas iš abiejų audinių tipų fluorescencijos signalų mišinio. To pasėkoje suskaičiuotų intensyvumų santykio vertė buvo tarpe tarp tame pačiame preparate išmatuotų verčių iš anatomiškai identifikuotų ir tam tikram audiniui priskirtų vietų. Nors tokių taškų nebuvo užregistruota daug, tačiau jų atsiradimo galimybė praktinio taikymo metu negali būti atmesta. Siekiant patvirtinti neaiškių taškų atsiradimo

hipotezę reikalingas itin tikslus laidžiosios sistemos šakų ribų nustatymas bei jų susiejimas su fluorescencijos intensyvumais.

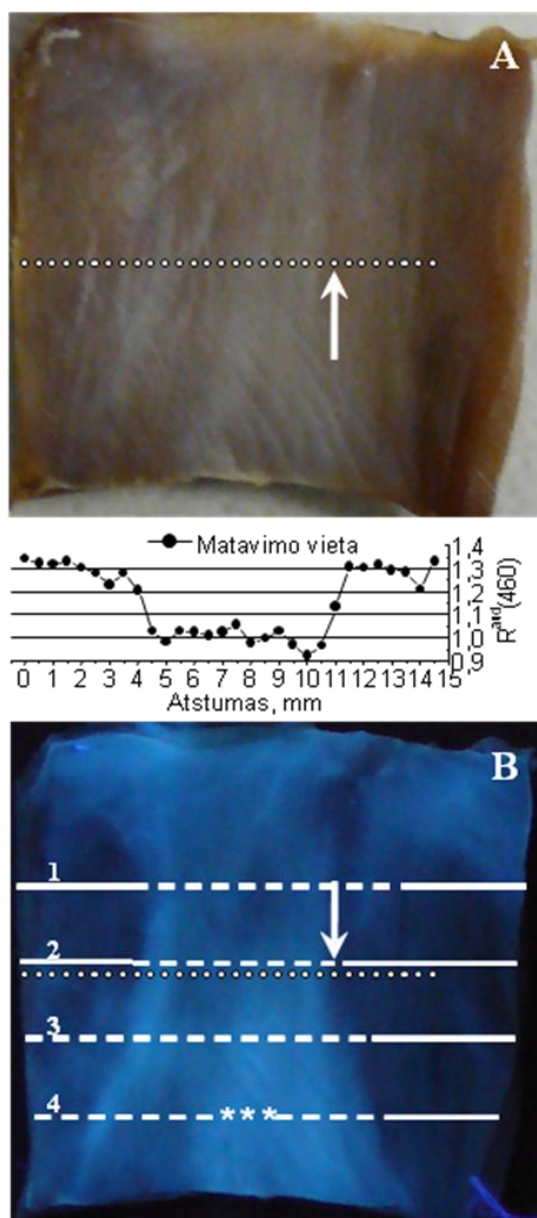
Apibendrinant fluorescencinės nuostoviosios spektroskopijos tyrimų rezultatus galima teigti, jog išanalizavus fluorescencijos spektrus bei įvertinus kraujo reabsorbcijos įtaką sukurta širdies audinių identifikavimo metodika, paremta intensyvumų santykių skaičiavimu. Remiantis šia metodika galima vienareikšmiškai identifikuoti visus tris širdies audinių tipus (ŠLS, MK ir JA) tame pačiame preparate (širdyje). Atlikus normavimo procedūras kiekvieno bandinio vertėms yra gaunamos normuotos vertės, kurios leido palyginti to paties tipo audinius skirtingose širdyse. Normavimo procedūra taip pat įgalino suskaičiuoti verčių patikimumo intervalą, kuriame audinys gali būti atpažįstamas kaip ŠLS. Pasinaudojus normuotomis vertėmis suskaičiuota atstojamoji MK vertė, kuri nusako, kiek kartų vidutinis intensyvumų santykis MK yra didesnis nei vidutinis intensyvumų santykis ŠLS. Suskaičiavus šia vertę iš daugelio širdžių, ji būtų bendra visiems atvejams ir galėtų pasitarnauti kaip atskaitos vertė pradedant identifikavimo procedūrą.

8.3 Širdies audinių spektrinis vaizdinimas

Skyrelyje 8.2 aprašyta metodika gali būti taikoma taškiniam ŠLS atpažinimui, tačiau kaip jau buvo minėta, gali pasitaikyti atvejų, kuomet tiriamasis taškas negali būti priskirtas nei vienam audinio tipui. Norint identifikuoti visus taškus, reikalingas vaizdas, kurio kiekviename taške atsispindėtų fluorescencijos intensyvumų santykis. Toks vaizdas gali būti gaunamas tiriamąją vietą skenuojant šviesolaidžiu ar spinduline skenavimo sistema. Praktiškai spektriniam audinių vaizdinimui daug patogiau būtų taikyti nekontaktinę spindulinę sistemą, tačiau kol kas tokios aparatūros egzistavimas mums nėra žinomas, o jos sukonstravimas būtų labai brangus. Šio darbo apimtyje buvo atliktas šviesolaidinis audinių skenavimas.

Pirmiausia, siekiant įvertinti spektrinio metodo tikslumą nustatant ŠLS ribas bei išsiaiškinti jau minėtų neaiškių taškų atsiradimo priežastis buvo

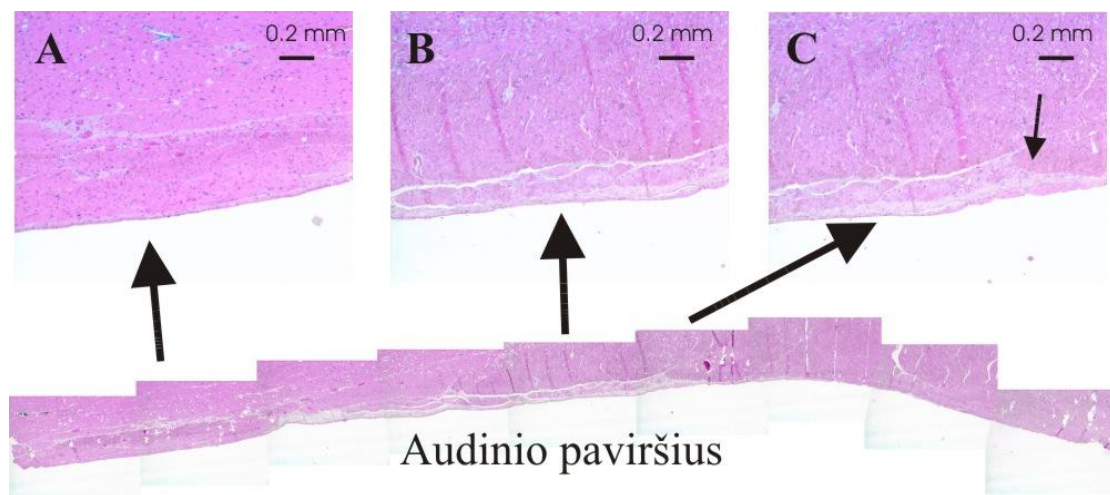
atliktas itin tikslus širdies audinių skanavimas. Šiam tyrimui naudotas 2x2 cm dydžio fiksuotas preparatas, kuriame buvo pažymėta ŠLS šakos lokalizacija. Tyrimo metu per nurodytą laidžiosios sistemos šaką buvo atliktas linijinis skanavimas, spektrus matuojant kas 500 μm . Preparato dienos šviesos ir fluorescencinis vaizdai bei skanavimo rezultatai pateikti 8.3.1 paveiksle.



8.3.1 pav. Linijinis širdies preparato skenavimas. A paveikslas – preparato nuotrauka dienos šviesoje. B paveikslas – preparato nuotrauka panaudojus papildomą 365 nm spinduliuotės apšvietimą. Taškais abiejuose nuotraukose pažymėtos vietos, kur registruoti fluorescencijos intensyvumai.

Tarp nuotraukų pateikti intensyvumų santykiai $\langle R^{aud} \rangle(460) = I_{330}^{žad} / I_{380}^{žad}$ tuose taškuose.

Kaip ir ankstesniuose eksperimentuose, kiekviename skenavimo taške fluorescencija žadinta 330 nm ir 380 nm spinduliuote, o fluorescencijos intensyvumas registruotas ties 460 nm. Skenavimas atliktas vaizduose pateikta linija, intensyvumus matuojant kiekviename taške. Keturios linijos 8.3.1B paveiksle atitinka pjūvius, kuriuose po spektrinių tyrimų buvo atlikta histologinė analizė. ŠLS lokalizacija kiekviename pjūvyje pažymėta brūkšniukais (- - -), MK pažymėta tiesia linija (—), o JA, kuris buvo identifikuotas tik ketvirtame pjūvyje, pažymėtas žvaigždutėmis (***) . Pjūvis Nr. 2 buvo atliktas būtent per skenavimo liniją. Šio pjūvio histologinės analizės mikroskopiniai vaizdai pateikti 8.3.2 paveiksle.



8.3.2 pav. Audinio pjūvio Nr. 2 histologinis vaizdas. Paveiksle A matyti įprastinis MK, kurį iš paviršiaus dengia plonas EK sluoksnis. B paveiksle matyti netoli audinio paviršiaus esantis laidžiosios sistemos pluoštas. ŠLS šaką sudaro raumeninių ląstelių bei Purkinje skaidulų pluoštas apsuptas JA izoliaciniu sluoksniu. C paveiksle matyti ŠLS pluošto riba, kuri pažymėta rodykle.

Iš skenavimo rezultatų matyti, kad tose vietose, kurios histologiškai buvo patvirtintos kaip laidžioji sistema (histologinis pjūvis Nr.2, brūkšniuota dalis), $\langle R^{aud} \rangle(460)$ vertė yra ~ 1 . Kadangi šiame pjūvyje nebuvo aptikta JA, tai galima teigti, jog šiame preparate ŠLS audinį atitinkančios vertės yra ~ 1 . Reikia atkreipti dėmesį, jog analizuojant rezultatus pastebėtas itin geras fluorescencinio vaizdo bei skenavimo rezultatų sutapimas. Tose vietose, kur fluorescencinėje nuotraukoje matyti intensyvus švytėjimas, suskaičiuoti intensyvumų santykiai yra artimi 1, t.y. atitinka ŠLS. Tai įrodo, jog papildomas apšvietimas 365 nm spinduliuote galėtų būti informatyvus pirminiam ŠLS lokalizacijos įvertinimui.

Normavimo procedūra šiame audinyje nebuvo atlikta, kadangi vidutinė ŠLS santykio vertė yra ~ 1 . Reiktų pastebėti, jog ir anksčiau tirtuose bandiniuose (1 lentelė, 1 ir 5 preparatai) pasitaikė, jog vidutinė nenormuota ŠLS santykio vertė buvo ~ 1 . Kitose šio preparato vietose, kurios histologiškai buvo atpažintos kaip MK (histologinis pjūvis Nr.2, tiesi linija), $\langle R^{aud} \rangle(460)$ vertė yra $\sim 1,3$. Iš to galima daryti išvadą, kad visose šio preparato vietose, kuriose fluorescencijos intensyvumų santykis yra $\sim 1,3$, audinys gali būti atpažintas kaip MK. Linijinio skenavimo metu nebuvo užregistruota mažesnio intensyvumų santykio nei 0,9 ir histologiškai šiame pjūvyje JA nebuvo aptikta, todėl galima teigti, jog šio preparato vietose, kuriose fluorescencijos intensyvumų santykis yra mažiau už 0,9, audinys gali būti atpažintas kaip JA.

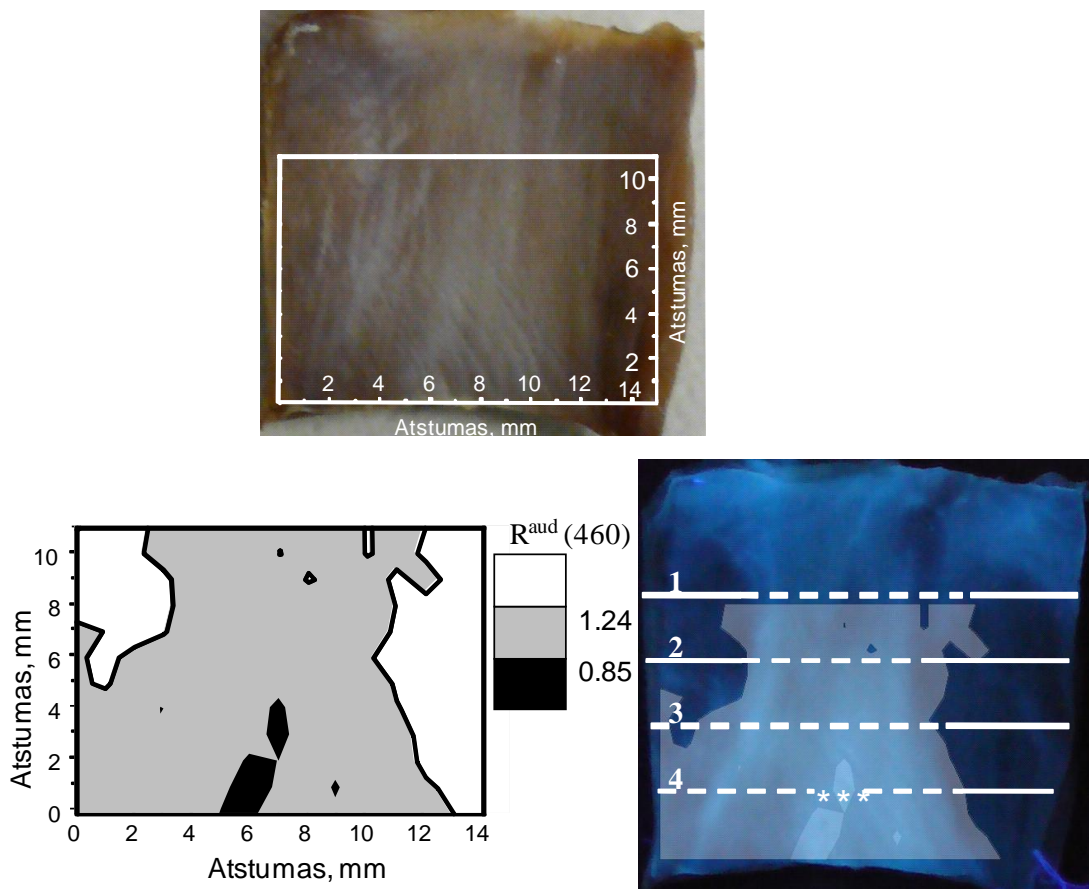
Šiame bandinyje taip pat buvo aptiktas taškas, kurio intensyvumų santykio vertė negali būti vienareikšmiškai priskirta nei vienam audinio tipui. Šio taško lokalizacija 8.3.1 paveiksle yra pavaizduota rodykle. Sprendžiant iš histologinės analizės (8.3.2 pav.) bei fluorescencinės nuotraukos šis taškas buvo užregistruotas dviejų skirtingų audinių tipų – ŠLS ir MK sandūroje. Taigi tokiu atveju yra patvirtinama neaiškių taškų atsiradimo priežastis. Iš 8.3.1 paveikslo skenavimo rezultatų matyti, jog tokia situacija praktiškai nesudarytų didelių problemų, kadangi ji galėtų būti išspręsta užregistravus fluorescencijos intensyvumus vos per milimetro dalį toliau nuo neaiškios vietos.

Eksperimentiškai nustatytos ribos taip pat gali būti įvertintos naudojant patikimumo intervalus suskaičiuotus 2 lentelėje. Šiame preparate ŠLS vertė $\langle R^{\text{ŠLS}} \rangle(460) \approx 1$, todėl apatinė santykio vertė, kada audinys dar gali būti priskiriamas laidžiajai sistemai yra apskaičiuojama: $1.00 - (0.15 \times \langle R^{\text{ŠLS}} \rangle(460)) = 1 - 0.15 = 0.85$. Viršutinė santykio vertė, iki kurios audinys dar gali būti atpažįstamas kaip ŠLS yra apskaičiuojama: $1.00 + (0.24 \times \langle R^{\text{ŠLS}} \rangle(460)) = 1.00 + 0.24 = 1.24$. Taigi suskaičiuotos ribinės vertės atitinka praktiškai išmatuotus fluorescencijos intensyvumų santykius. Tai vėlgi patvirtina, jog pagal sudarytą audinių identifikavimo metodiką gaunami santykiai yra specifiški kiekvienam audinio tipui ir gali būti panaudoti jų atskyrimui.

Skenavimo metu gauti intensyvumų santykiai, net ir esant tam pačiam audinio tipui, šiek tiek kinta (8.3.1 pav.). Toks intensyvumų pokytis gali būti sąlygotas pačio audinio mikrostruktūros. Laidžiosios sistemos pluoštas yra sudarytas iš plonų skaidulų ir dėl tam tikro šviesolaidžio skersmens kiekvieną kartą po šviesolaidžio antgaliu gali patekti skirtingas šių skaidulų skaičius, dėl ko ir bus registruojamas nevienodas fluorescencijos intensyvumas. Būtent dėl skyros, kurią riboja žadinančiojo šviesolaidžio skersmuo, pavienių smulkių ŠLS dalių nėra įmanoma išskirti. Naudojant turimą sistemą yra pasiekama geresnė nei 1 mm skyra, kurios nepakanka aptikti plonytėms Purkinje skaiduloms, tačiau pavojingiausi ŠLS pažeidimai nėra susiję su Purkinje skaidulų pažeidimais. Svarbiausia yra nepažeisti didesnių laidžiosios sistemos šakų, kurių chirurginis ar kitoks pažeidimas gali sutrikdyti elektrinio signalo patekimą į tam tikrą širdies dalį, taip sutrikdant tvarkingus širdies susitraukimus. Laidžiosios sistemos šakos skilveliuose išsišakoja į tankų Purkinje skaidulų tinklą, kurių pažeidimas sukels tik lokalius signalo perdavimo į raumenį sutrikimus, kuris bendram širdies darbui didelės reikšmės neturės. Kita vertus, mažinant žadinimo šviesolaidžio skersmenį galima būtų pasiekti 100 μm – 200 μm skyrą, tačiau praktiškai tai yra nenaudinga, kadangi chirurgui operacijos metu labai sunku pasiekti geresnį nei 1 mm tikslumą, o taip pat naudojant tokį ploną šviesolaidį kelis kartus sumažėja registruojamas

fluorescencijos intensyvumas, dėl ko kartais apskritai gali būti sudėtinga užregistruoti signalą.

Paskutiniame etape, siekiant nustatyti spektrinio metodo tinkamumą visos ŠLS šakos bei jos ribų identifikavimui buvo atliktas to paties preparato, naudoto linijiniam skenavimui, spektrinis vaizdinimas. Šiuo tikslu visame audinio paviršiuje 11 x 15 mm plote buvo registruojami fluorescencijos intensyvumai ir kiekviename taške skaičiuojamas santykis $\langle R^{aud} \rangle(460) = \frac{I_{330}^{ad}}{I_{380}^{ad}}$. Plokštuminio skenavimo plotas yra pažymėtas dienos šviesos nuotraukoje 8.3.3 paveiksle.



8.3.3 pav. Plokštuminis preparato skenavimas. Viršuje pavaizduota dienos šviesos nuotrauka; apačioje kairėje – spektrinis vaizdas; apačioje dešinėje pateiktas kombinuotas spektrinio skenavimo ir fluorescencinės nuotraukos vaizdas. Spektriniame vaizde balta spalva atitinka MK, pilka spalva atitinka ŠLS ir juoda spalva atitinka JA. Keturios linijos kombinuotame vaizde atitinka pjūvių vietas, kur buvo atlikta histologinė analizė.

Remiantis linijinio skenavimo rezultatais bei patikimumo intervalais iš 2 lentelės buvo apibrėžta sritis, kurioje $\langle R^{aud} \rangle (460)$ kito intervale nuo 0.85 iki 1.24 (8.3.3 pav. spektrinis vaizdas). Ši sritis su 95 % tikimybe gali būti priskirta ŠLS audiniui. Gautas fluorescencijos intensyvumų plokštuminis pasiskirstymas buvo sulietas su fluorescencine nuotrauka. Kaip matyti kombinuotame vaizde sritis, kurioje intensyvumų santykis yra nuo 0.85 iki 1.24 atitinka tas preparato sritis, kurios išsiskiria intensyvia fluorescencija. Nedideli nesutapimai ties laidžiosios sistemos kraštais yra sąlygoti mažesnės spektrinio vaizdinimo skyros. Plokštuminio skenavimo metu taip pat buvo užregistruota nedidelė sritis, kurios intensyvumų santykis buvo mažesnis nei nustatyta ŠLS santykio apatinė riba. Ši sritis buvo priskirta JA (8.3.3 pav. juoda sritis viduriniame vaizde). Vėliau atlikta histologinė analizė patvirtino JA sankauptų egzistavimą 4 histologinio pjūvio vidurinėje dalyje. Sulyginus spektrinio vaizdinimo rezultatus su histologiškai nustatytomis ŠLS ribomis stebėtas geras identifikuotų sričių sutapimas.

Apibendrinant širdies audinių spektrinio vaizdinimo rezultatus galima teigti, jog fluorescencijos intensyvumų santykių skaičiavimu kiekviename taške (pikselyje) paremtu metodu galima atlikti pavienių ŠLS šakų identifikavimą bei ribų nustatymą. Dėl ribotos skyros šis metodas yra tinkamas tik stambesnių laidžiosios sistemos pluoštų aptikimui. Tuo tarpu plonesnių Purkinje skaidulų tinklas sąlygotų padidėjusį bendrą foninį fluorescencijos intensyvumą, tačiau pavienės smulkios skaidulos nebūtų išskiriamos. Nors šiame darbe buvo pristatyta tik pati ŠLS identifikavimo idėja panaudojant fluorescencinės spektroskopijos metodą, geras rezultatų sutapimas su histologinės analizės duomenimis tik patvirtina šio metodo galimybes būti taikomam ŠLS identifikavimui ar ribų nustatymui operacijos metu. Širdies vietose, kur JA buvimas yra mažai tikėtinas, papildomas 365 nm spinduliuotės apšvietimas taipogi būtų naudingas vertinant apytiksliai ŠLS lokalizaciją. Anotomiškai sudėtingesnėse vietose yra reikalinga spektrinė analizė, kuri net ir neatliekant vaizdinimo, o tik tiriant pavienius taškus, padėtų identifikuoti vizualiai neatskiriamus audinius.

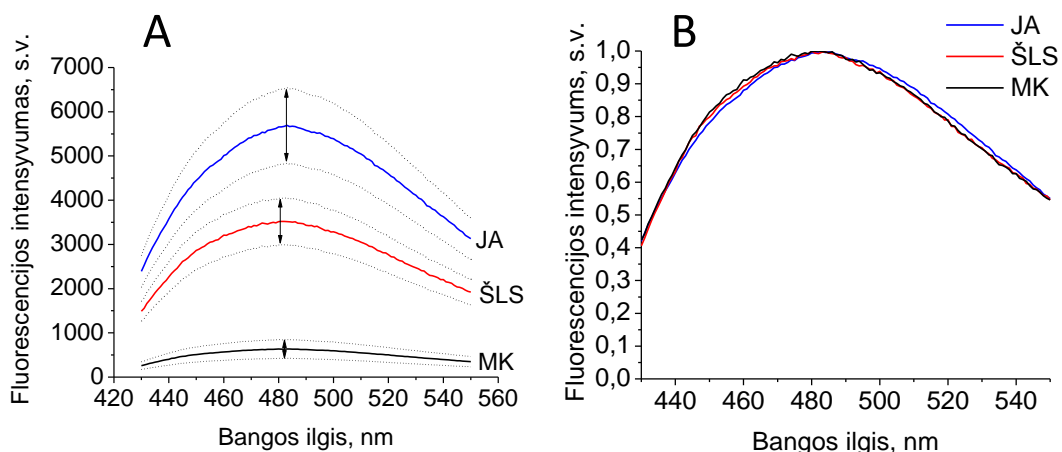
8.4 Širdies audinių fluorescencinė laikinės skyros spektroskopija

Atliekant optinę biopsiją, paremtą audinių fluorescencijos ar fluorescencijos žadinimo matavimais, rezultatai priklauso nuo įvairių parametru. Pirmiausia tai yra paties audinio optinės savybės, kurios registruojamos fluorescenciniais metodais. Tai yra jo fluorescuojančių komponentų sudėtis bei kiekis, taip pat fluorescenciją sugeriančios medžiagos (reabsorbicija), tokios kaip kraujas. Kita dalis registruojamo fluorescencijos signalo priklauso nuo registravimo sistemos bei pačios registravimo procedūros. Būtent pirmoji dalis, kuri neša informaciją apie vidinius audinio parametrus ar jų pokyčius, yra naudinga diagnostikos tikslams. Deja tam tikrais atvejais, ypač dirbant su gyvais biologiniais objektais, kuomet tyrimo sąlygos yra tam tikros ir negali būti keičiamos (pvz. plakanti širdis, kraujuojančias audinys), vertinga diagnostinė informacija yra užgožiama pašalinių efektų. Siekiant to išvengti yra kuriamos įvairios metodikos, modifikuojamos optinės biopsijos aparatūros arba pasirenkamas kitokia diagnostikos procedūra. Vis dėlto, optiniai metodai jautumu lenkia daugelį žinomų diagnostikos būdų, jie prilygsta sudėtingiems biocheminiams analizės metodams, tačiau būdami neinvaziniai puikiai tinka biologinių objektų *in vivo* tyrimams, todėl ieškoma naujų optinių tyrimo būdų, kurie nebūtų jautrūs aukščiau išvardintiems pašaliniams efektams. Šiuo metu vis plačiau yra taikoma fluorescencinė laikinės skyros spektroskopija. Tai yra metodas, kuriuo yra registruojama audinyje esančių fluoroforų sužadintos būsenos gyvavimo trukmės. Ši trukmė yra specifika kiekvienam fluoroforui ir nepriklauso nuo tyrimo sąlygų, taip jos neįtakoja fluoroforų koncentracijos audinyje netolygumai ir fluorescencijos signalo slopinimas dėl reabsorbicijos, sklaidos ir pan.

Šiame darbe tiriamasis objektas optinių tyrimų atžvilgiu taip pat yra labai sudėtingas. Širdis gali būti ir judantis objektas, todėl tyrimo metu būtų labai sunku išlaikyti vienodas tyrimo sąlygas kiekviename taške, tai gali būti ir kraujuojančias objektas, todėl būtų sugeriamas tiek žadinančioji spinduliuotė, tiek fluorescencija. Visa tai stipriai įtakoja registruojamą fluorescencijos signalą.

Atsižvelgiant į šiuos sunkumus buvo sukurta audinių identifikavimo metodika, tačiau jos papildymas optiniu metodu, kuris nėra jautrus aukščiau išvardintiems efektams, tam tikrais atvejais leistų užtikrinti diagnostikos patikimumą bei praplėsti taikymo ribas. Tuo tikslu širdies audiniai papildomai buvo ištirti fluorescencine laikinės skyros spektroskopija.

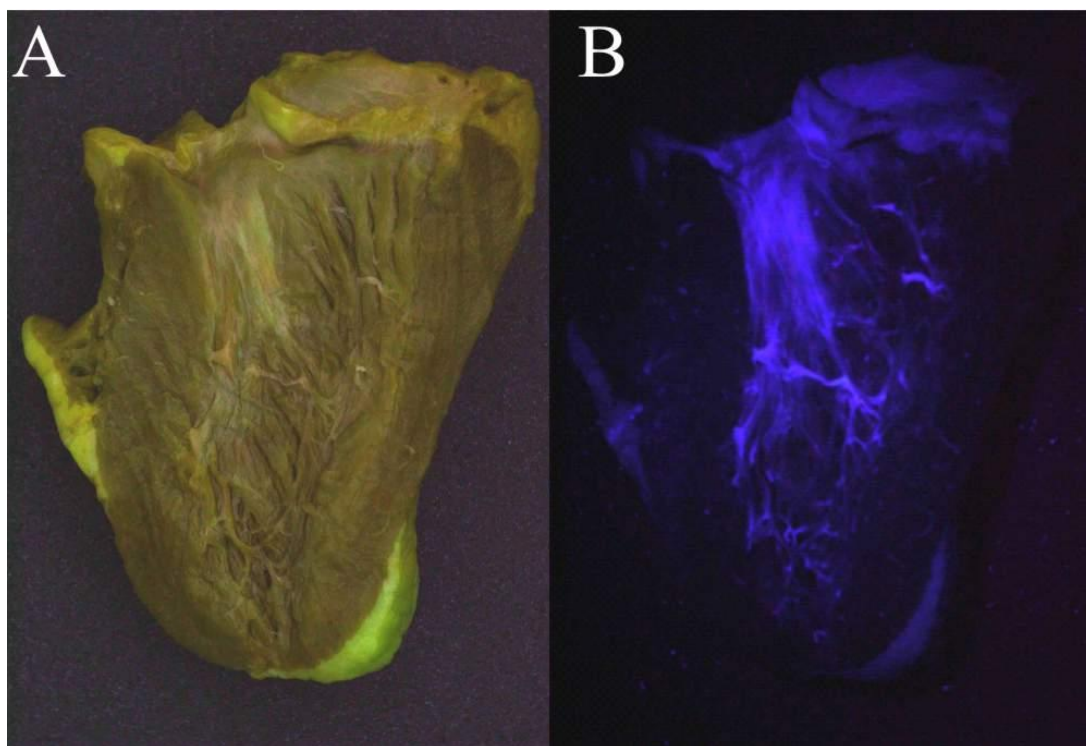
Šiems eksperimentams atlikti reikalingas impulsinis šviesos šaltinis, kurio impulso trukmė būtų trumpesnė nei tiriamojo fluoroforo sužadintos būsenos gyvavimo laikas. Tyrimuose naudotas 66.9 ps impulso trukmės lazeris, emituojantis 405 nm bangos ilgio spinduliuotę. Šioje srityje yra sužadinamas elastinas ir šiek tiek kolagenas. Vidutiniai širdies audinių fluorescencijos spektrai, žadinant 405 nm spinduliuote pateikti 8.4.1A paveiksle.



8.4.1 pav. A paveiksle pateikti vidutiniai ŠLS, MK ir JA fluorescencijos spektrai žadinant 405 nm spinduliuote. Taškeliais pateiktos linijos atitinka standartinio nuokrypio vertes. B paveiksle pateikti vidutiniai visų audinių tipų normuoti fluorescencijos spektrai.

Visuose spektruose yra stebima neišraiškinga plati juosta, kurios intensyvumo maksimumas yra ties 482 nm. Iš normuotų spektrų matyti, jog ir ŠLS, ir MK, ir JA fluorescencijos spektrų formos yra beveik vienodos (8.4.1B pav.), kas leidžia teigti, jog ir fluoroforai, atsakingi už fluorescenciją 430 nm –

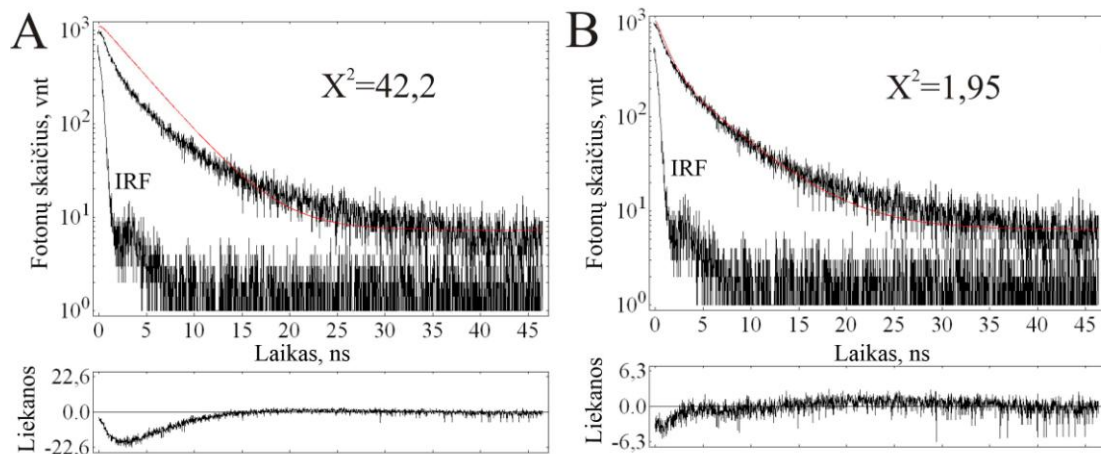
550 nm spektro srityje žadinant 405 nm spinduliuote visuose audiniuose yra tie patys. Stebimi intensyvumų skirtumai 8.4.1A paveiksle gali būti sąlygoti nevienodo fluoroforų kiekio šiuose audiniuose, ar fluorescencijos kvantinio našumo, kuris priklauso nuo fluoroforų supančios mikroaplinkos. Šie rezultatai, kaip ir stebėti anksčiau, fluorescencijos žadinimui naudojant 365 nm spinduliuotę, parodo, jog apšvietus audinį 405 nm bangos ilgio šviesa ŠLS gali būti atskirta nuo MK dėl intensyvesnio švytėjimo, tačiau to nepakanka ŠLS atskirti nuo JA. Toks apytikslės ŠLS lokalizacijos būdas būtų netgi patrauklesnis, nei taikant 365 nm apšvietimą, kadangi 405 nm spinduliuotė jau laikoma visiškai nekenksminga biologiniams audiniais. Tuo tikslu buvo atliktas širdies tarpkilvelinės pertvaros vaizdinimas apšvietus ją 405 nm spinduliuote (8.4.2 pav.).



8.4.2 pav. Širdies tarpkilvelinės pertvaros vaizdinimas. A paveikslas – vaizdas dienos šviesoje. B paveikslas – vaizdas apšvietus 365 nm spinduliuote.

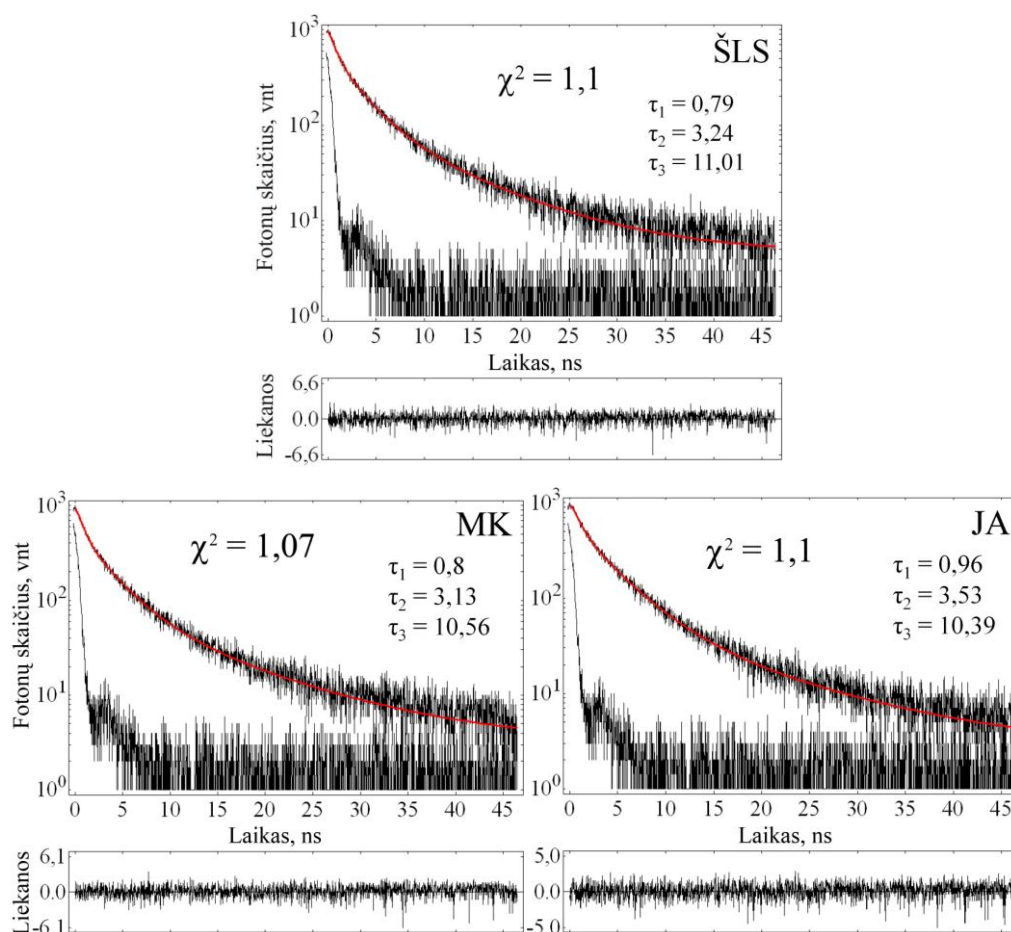
Fluorescenciniame vaizde matyti nuo pat tarpkilvelinės pertvaros viršaus besidriekianti plati fluorescuojanti sritis, kuri apačioje išsišakoja į smulkesnius pluoštus. Tokia struktūra atitinka kairiąją HP šaką, tačiau pagal fluorescencijos intensyvumą šioje intensyviai fluorescuojančioje srityje sunku išskirti kur yra ŠLS ir kur JA, todėl tikslesnė širdies audinių analizė fluorescencijos žadinimui naudojant 405 nm spinduliuotę buvo atlikta fluorescencine laikinės skyros spektroskopija.

Fluorescencijos gyvavimo, kitaip dar vadinamo gesimo, trukmė yra matuojama ties vienu bangos ilgiu. Širdies audinių tyrimuose gyvavimo trukmės buvo registruotos intervale 430 nm – 550 nm kas 5 nm. Siekiant nustatyti kiek fluoroforų yra atsakingi už audinių fluorescenciją buvo atliekamas matematinis modeliavimas keičiant kintamųjų skaičių. ŠLS modeliavimo rezultatai aproksimuojant eksperimentinius rezultatus viena ir dviem eksponentėm pateikti 8.4.3 paveiksle. Skaičiavimams pasirinkta fluorescencijos gesimo kreivė užregistruota ties 480 nm.



8.4.3 pav. ŠLS fluorescencijos gesimo eksperimentiniai rezultatai (juoda kreivė) ir modelinė kreivė (raudona kreivė). Taip pat yra pateikta prietaiso atsako funkcija (IRF kreivė). A paveikslas – aproksimuota viena eksponente. B paveikslas – aproksimuota dviem eksponentėm.

Atlikus eksperimentinių duomenų aproksimavimą vienkسونentiniu gesimo dėsnio stebimas akivaizdus modelinių ir eksperimentinių rezultatų nesutapimas. Tai iliustruoja didelės liekanos ties trumpom laiko trukmėm bei itin didelė χ^2 vertė. Analogiški rezultatai stebimi ir 2 eksponenčių aproksimacijos atveju. Aproksimacija yra laikoma teisinga, jei nestebimas liekanų padidėjimas bet kurioje laiko skalės srityje ir χ^2 vertė yra artima 1, tačiau praktiškai χ^2 vertei esant netgi 1,2 laikoma, jog modeliavimo rezultatai atitinka eksperimentinius. Taigi abiem atvejais aproksimacijos yra neteisingos ir tai rodo, jog daugiau nei 1 ar 2 fluorescuojantys komponentai formuoja ŠLS fluorescencijos gesimo kreives. Analogiški rezultatai gauti ir JA bei MK audinių atvejais. Vėliau atlikta eksperimentinių rezultatų, užregistruotų ties 480 nm, aproksimacija trimis eksponentėmis (8.4.4 pav.).



8.4.4 pav. Fluorescencijos gesimo, užregistruoto ties 482 nm, eksperimentiniai rezultatai ir jų aproksimacija trimis eksponentėmis.

Kaip matyti iš pateiktų grafikų, modeliniai rezultatai aproksimavus trimis eksponentėmis sutampa su eksperimentiniais duomenimis. Tai iliustruoja ir tolygiai ties nuline verte pasiskirsčiusios liekanos, ir χ^2 vertė. Suskaičiuoti kiekvienos eksponentės charakteringi laikai (fluorescencijos gyvavimo/gesimo trukmės τ_1 , τ_2 , τ_3) yra pateiktos paveikslėliuose. Galima daryti išvadą, jog žadinant 405 nm spinduliuote mažiausiai trys fluorescuojantys komponentai yra atsakingi už ŠLS, MK ir JA fluorescenciją ties 480 nm. Tuo tarpu iš nuostoviosios fluorescencijos spektrų buvo identifikuoti tik du pagrindiniai širdies audinių fluoroforai – kolagenas ir elastinas [168-170]. Yra žinoma, jog širdyje randamas kolagenas yra keletu formų. Širdies tarpląstelinio matrikso kolageno pagrindinė sudedamoji dalis yra kolagenas I, kuris sudaro 85% bendros kolageno masės [171]. Širdyje dar yra randami ir kiti fibriles formuojantys kolageno tipai, tai kolagenas III ir kolagenas V. Širdies vožtuvas, kurio pagrindinė sudedamoji dalis yra JA, yra sudarytas iš kolageno I (74%), kolageno III (24%) ir kolageno V (2%) [109], todėl galima teigti, jog fluorescencijos spektrus labiausiai įtakoja kolageno I ir kolageno III fluorescencija. Remiantis šiais duomenimis gali būti identifikuoti visi trys širdies audinių fluorescenciją sudarantys komponentai, kurių skaičius nustatytas fluorescencinės laikinės skyros spektroskopijos duomenimis. Tai yra kolagenas I, kolagenas III ir elastinas. Nuostoviosios fluorescencinės spektroskopijos metodu šie trys fluoroforai negalėjo būti išskirti, kadangi elastino ir kolageno III fluorescencijos spektrai persikloja [173].

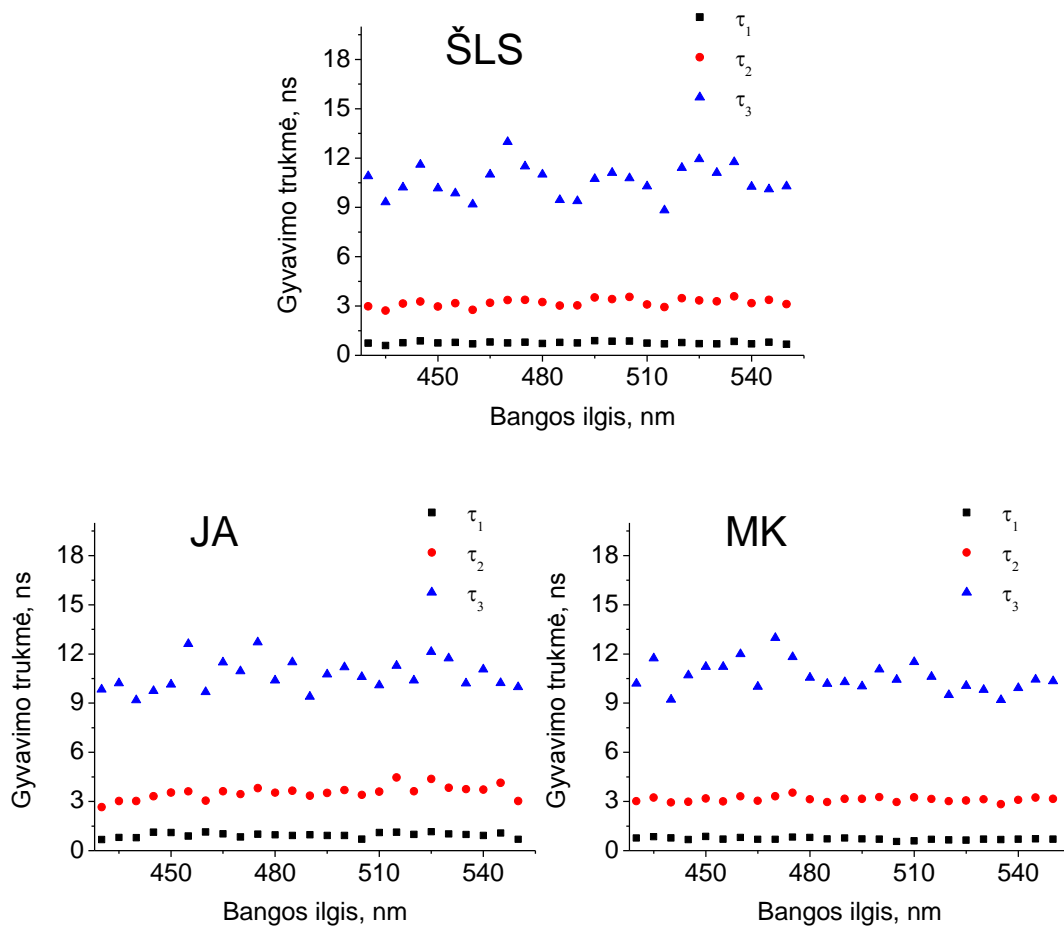
Siekiant nustatyti koks yra kiekvieno iš šių trijų fluorescuojančių komponentų santykinis indėlis (F) į fluorescencijos spektrą, buvo atlikta sudėtinių komponentų analizė, kurios metu buvo išskaičiuojamas kiekvienos eksponentės „svorinis daugiklis“ atliekant eksperimentinių rezultatų aproksimavimą. Duomenys yra pateikti 8.4.1 lentelėje.

8.4.1 lentelė. Kiekvieno iš trijų komponentų (F1, F2 ir F3) santykiniai indėliai procentais į fluorescencijos spektrą.

	MK	ŠLS	JA
F1	27.24	26,5	19.15
F2	47.08	48,5	51.5
F3	25.67	25,0	29.35

Šios vertės nurodo, koks yra kiekvieno iš fluoroforų indėlis į fluorescencijos spektrą žadinant 405 nm spinduliuote ties konkrečiu bangos ilgiu (šiuo atveju ties 480 nm). Jos nenurodo audinio tikslios sudėties, kadangi šiuo metodu nestebimos nefluorescuojančios audinio sudedamosios dalys, tačiau iš jų vis tik galima vertinti fluoroforų santykinį kiekį kiekviename iš širdies audinių. ŠLS ir MK santykiniai visų komponentų kiekiai yra labai panašūs, tuo tarpu JA santykinė sudėtis yra kitokia. Šiuo metu jau yra įrodyta, jog laidžioji sistema yra raumeninės kilmės audinys, todėl ŠLS ir MK savo sudėtimi yra panašūs.

Visi rezultatai, tiek gyvavimo trukmių, tiek santykinų indėlių yra apskaičiuoti ties vienu bangos ilgiu – 480 nm, todėl nėra aišku, ar tie patys fluoroforai ir santykiniai jų kiekiai bus stebimi kitose fluorescencijos registravimo srityse. Tam tikslui buvo suskaičiuotos fluorescencijos gyvavimo trukmės bei santykiniai indėliai kiekvieno iš fluorescuojančio komponento visame registravimo intervale nuo 430 nm iki 550 nm. ŠLS, MK ir JA fluorescencijos gyvavimo trukmės visame šiame spektriniame ruože yra pateiktos 8.4.5 paveiksle.



8.4.5 pav. ŠLS, MK ir JA audinių fluorescencijos gyvavimo trukmės užregistruotos žadinant 405 nm spinduliuote.

Iš pateiktų rezultatų matyti, kad gyvavimo trukmės visame registravimo intervale iš esmės nekinta. Stebimas tam tikras verčių išsibarstymas, tačiau dėsningų pokyčių, kurie galėtų reikšti kito fluorescuojančio komponento atsiradimą, nestebime nei vienam audinio tipui. Fluorescencijos gyvavimo trukmės yra kiekvieno fluoroforo, esančio tam tikroje būsenoje ar aplinkoje, charakteringas parametras. Tai yra tarsi jo „pirštų antspaudas“. Tai, jog gyvavimo trukmės nekinta visame registravimo intervale nuo 430 nm iki 550 nm rodo, jog fluoroforai toje spektrinėje srityje fluorescuoja tie patys. Remiantis šiais rezultatai buvo suskaičiuotos vidutinės gyvavimo trukmės ir įvertinti skirtumai tarp skirtingo tipo audinių gyvavimo trukmių. Skirtumų tarp vidutinių ŠLS ir kitų dviejų audinių trukmių reikšmingumas buvo įvertintas

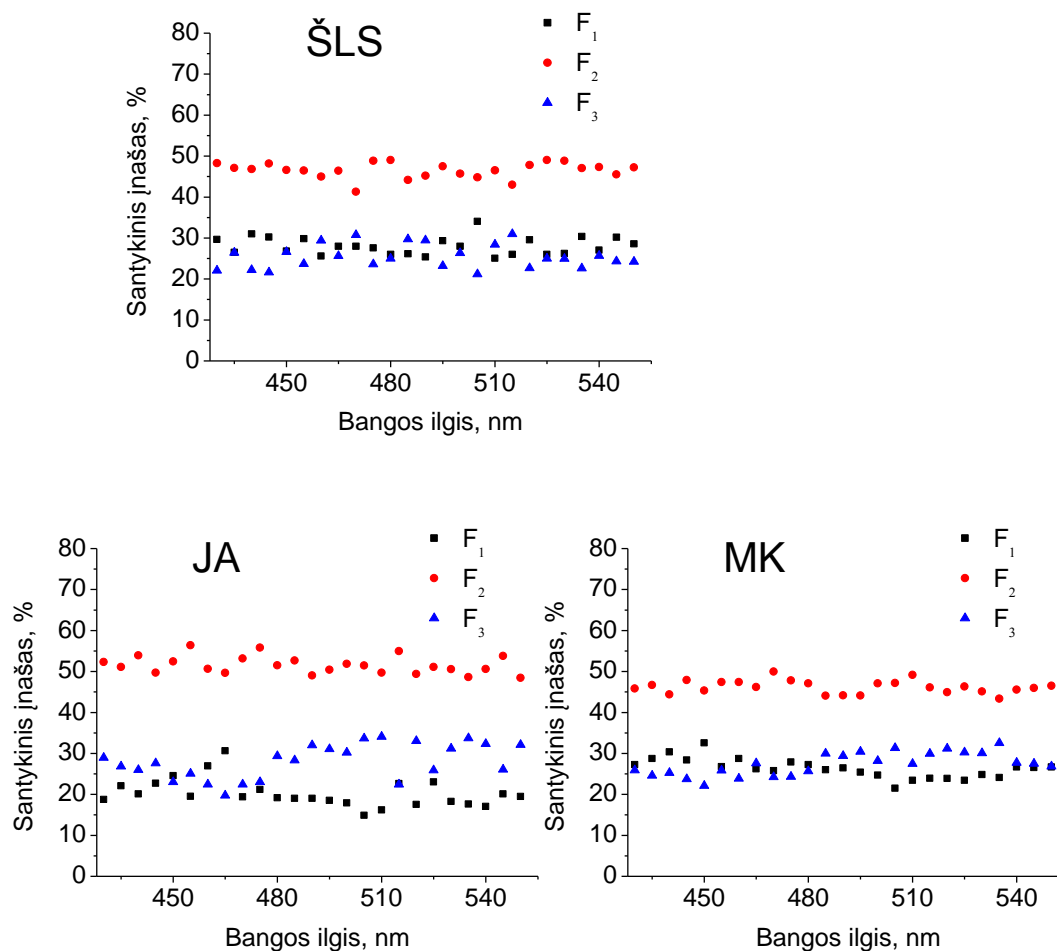
naudojant porinį t-Testą esant nulinei hipotezei $\tau^{\text{ŠLS}} - \tau^{\text{JA}} = 0$ ir $\tau^{\text{ŠLS}} - \tau^{\text{MK}} = 0$. Skaičiavimų rezultatai pateikti 8.4.2 lentelėje.

8.4.2 lentelė. Širdies audinių vidutinės gyvavimo trukmės ir vidutiniai standartiniai nuokrypiai suskaičiuoti intervale 430 nm – 550 nm. $P(H_0 = 0)$ – reikšmingumo lygio vertės esant nulinei hipotezei.

	MK	$P(H_0 = 0)$	ŠLS	$P(H_0 = 0)$	JA
τ_1	0.7 ± 0.1	0.07	0.7 ± 0.1	2.9×10^{-5}	0.9 ± 0.1
τ_2	3.1 ± 0.2	0.19	3.2 ± 0.3	2.2×10^{-4}	3.5 ± 0.4
τ_3	10.6 ± 1	0.94	10.7 ± 1.2	0.84	10.7 ± 1.7

ŠLS ir MK gyvavimo trukmės reikšmingai nesiskiria, todėl šių dviejų audinių atskyrimas pagal fluorescencijos gyvavimo trukmes yra neįmanomas. Tuo tarpu JA ir ŠLS gyvavimo trukmės, apibūdinančios greitai energiją prarandančius fluorescuojančius komponentus (τ_1 ir τ_2) yra reikšmingai skirtingos. Analizuojant šių dviejų audinių nuostoviosios fluorescencijos spektrus (8.4.1B pav.) buvo nustatyta, jog jų formos yra beveik identiškos, todėl padaryta išvada, jog abiejuose audiniuose fluorescuoja tos pačios medžiagos. Laikinės skyros spektroskopijos eksperimentuose stebimi pirmų dviejų komponentų nedideli, tačiau reikšmingi fluorescencijos gyvavimo trukmių skirtumai nepaneigia šios išvados. Fluorescencijos gyvavimo trukmės yra įtakojamos tokių mikroaplinkos faktorių kaip pH, jonų koncentracija bei įvairios reakcijos, fermentų aktyvumas, temperatūros svyravimai [35], todėl suskaičiuotų gyvavimo trukmių skirtumai gali būti sąlygoti tų pačių fluorescuojančių medžiagų skirtingo struktūrinio išsidėstymo ar juos supančios mikroaplinkos. Šie audiniai pagal funkcijas yra visiškai skirtingi, todėl natūralu, jog ir audinio struktūra bei juose esančios medžiagos, kurios sudarydamos skirtingą mikroaplinką įtakoja fluorescencijos gyvavimo trukmes, yra skirtingos.

Taigi nustačius, jog fluoroforai visame fluorescencijos registravimo intervale yra tie patys, buvo atlikta analizė siekiant nustatyti, ar kinta santykinis šių fluoroforų indėlis į registruojamą fluorescenciją. Visų trijų komponentų santykiniai indėliai registravimo intervale 430 nm – 550 nm žadinant 405 nm spinduliuote pateikti 8.4.6 paveiksle.



8.4.6 pav. Fluorescuojančių širdies audinių komponentų santykiniai įnašai procentais į fluorescencijos spektrą.

Kaip matyti iš pateiktų grafikų, fluoroforų indėlis irgi iš esmės nekinta, kas reiškia, jog ir fluorescencijos spektro sudėtis bet kurioje spektrinėje srityje iš intervalo 430 nm – 550 nm yra tokia pati. Taip pat buvo suskaičiuoti ŠLS, MK ir JA kiekvieno iš trijų komponentų vidutiniai indėliai $\langle F \rangle$ visame registravimo intervale. Skirtumų tarp vidutinių ŠLS ir kitų dviejų audinių

komponentų indėlių reikšmingumas buvo įvertintas naudojant porinį t-Testą esant nulinei hipotezei $F^{\text{ŠLS}} - F^{\text{JA}} = 0$ ir $F^{\text{ŠLS}} - F^{\text{MK}} = 0$. Vertės pateiktos 8.4.3 lentelėje.

8.4.3 lentelė. Santykiniai fluoroforų kiekiai suskaičiuoti intervale 430 nm – 550 nm. $P(H_0=0)$ – reikšmingumo lygio vertės esant nulinei hipotezei.

	MK	$P(H_0 = 0)$	ŠLS	$P(H_0 = 0)$	JA
<F1>	27 ± 3	0.09	28 ± 2	3.34x10-8	20 ± 4
<F2>	46 ± 2	0.57	47 ± 2	1.51x10-5	51 ± 4
<F3>	27 ± 3	0.08	25 ± 3	0.01	29 ± 5

Analogiškai kaip ir gyvavimo trukmių atveju, MK ir ŠLS audinių vidutinių indėlių vertės <F1>, <F2> ir <F3> tarpusavyje nesiskiria reikšmingai. Taigi šie du audinių tipai, būdami raumeninės kilmės, nesiskiria ir komponentine sudėtimi. Tai reiškia, jog kolageno I, kolageno III ir elastino santykinis kiekis abiejuose audiniuose yra toks pat. Vis dėlto, absoliutus tų pačių fluorescuojančių medžiagų kiekis yra skirtingas. Tai yra stebima iš fluorescencijos spektrų. ŠLS fluorescencija yra gerokai intensyvesnė nei MK, todėl galima daryti išvadą, jog visų trijų fluorescuojančių komponentų ŠLS yra daugiau, tačiau jų proporcija yra tokia pati kaip ir MK.

JA ir ŠLS audinių santykinė sudėtis yra skirtinga. Tai stebima iš reikšmingai besiskiriančių visų trijų fluorescuojančių komponentų vidutinių kiekių <F1>, <F2> ir <F3> (8.4.3 lentelė). Pirmojo komponento yra daugiau ŠLS, o antrojo ir trečiojo – JA. Iš 8.4.3 lentelės matyti, jog pirmojo komponento yra daugiau abiejuose raumeninės kilmės audiniuose (ŠLS ir MK), kurie pasižymi tamprumu ir elastiškumu, todėl šis pirmasis fluorescuojantis komponentas gali būti identifikuojamas kaip elastinas. Antrojo ir trečiojo komponentų raumeninės kilmės audiniuose yra mažiau nei JA, kuris atsakingas už audinių formos palaikymą bei struktūros tvirtumą, todėl šie du fluorescuojantys komponentai atitinka kolageną. Antrojo komponento yra

ženkliai daugiau, todėl jis gali būti priskirtas gausiausiai JA esančiam fluoroforui kolagenui I, tuomet trečiasis komponentas atitinka kolageną III.

Fluorescuojančių komponentų santykinų kiekių analizės rezultatai rodo, jog santykinė JA ir ŠLS audinių sudėtis yra skirtinga. Šie duomenys neatitinka nuostoviosios fluorescencijos rezultatų žadinant 405 nm spinduliuote, kuriuose stebimi beveik identiškos formos JA ir ŠLS fluorescencijos spektrai (8.4.1 pav.). Spektrinės formos sutapimas reiškia ne tik tų pačių fluoroforų buvimą audiniuose, bet ir santykinų jų kiekių sutapimą. Neatitikimas tarp nuostoviosios ir kinetinės spektroskopijos duomenų gali būti paaiškinamas tuo, jog kolageno III ir elastino nuostoviosios fluorescencijos spektrai persikloja. Elastino yra daugiau ŠLS, tuo tarpu kolageno daugiau JA, o dėl persiklojančių jų spektrų intensyvumų skirtumai nėra stebimi.

Išanalizavus širdies audinių fluorescencinės laikinės skyros spektroskopijos rezultatus žadinimui naudojant 405 nm spinduliuotę ir fluorescenciją registruojant 430 nm – 550 nm srityje galima apibendrinti, jog ŠLS ir MK tiek fluorescencijos gyvavimo trukmės, tiek santykiniai fluoroforų kiekiai reikšmingai nesiskiria ir laikinės skyros metodika šie audiniai yra neatskiriami. Tuo tarpu ŠLS ir JA pasižymi ir skirtingomis fluorescencijos gyvavimo trukmėmis (τ_1 ir τ_2), ir nevienoda fluoroforų santykinė sudėtimi, todėl laikinės skyros spektroskopijos metodu šie audiniai gali būti atskiriami. Tyrimų metu taip pat nustatyta, jog tiek gyvavimo trukmės, tiek santykiniai fluoroforų kiekiai registravimo intervale 430 nm – 550 nm nekinta, todėl siekiant laikinės skyros metodiką pritaikyti audinių atskyrimui fluorescencijos gyvavimo trukmės bei fluorescuojančių komponentų santykiniai kiekiai gali būti registruojami bet kurioje srityje iš spektrinio ruožo 430 nm – 550 nm.

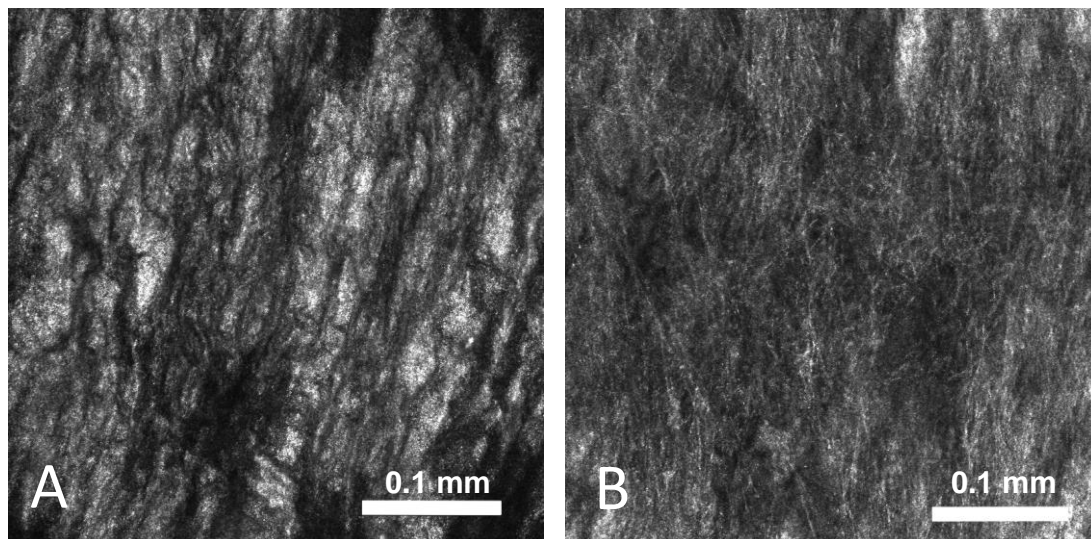
8.5 Širdies audinių vaizdinimas konfokaline atspindžio mikroskopija

Anksčiau aprašyti optinės biopsijos metodai, paremti nuostoviąją bei laikine fluorescencine spektroskopija, suteikia informaciją apie audinyje

esančius fluoroforus bei jų būsenas. Analizuojant šiuos duomenis yra daromos atitinkamos išvados apie organizmo fiziologinius ar funkcinius pakitimus. Tam tikrais atvejais būna sunku stebimus fluorescencijos pokyčius susieti su realiais organizmo parametrais, arba atvirkščiai – esant tam tikriems organizmo pakitimams sunku tai pastebėti fluorescencinės spektroskopijos duomenyse. Naudojant kitus optinius metodus, tokius kaip mikroskopija, yra stebimi tiesioginiai audinio struktūros ar jį sudarančių ląstelių ypatumai ir pakitimai, kurie remiantis ilgamete biologinių objektų tyrimo mikroskopija patirtimi lengvai gali būti pastebimi ir atpažįstami. Ligi šiol esminis mikroskopijos trūkumas buvo tai, kad apžiūrai audinys turėjo būti specialiai paruošiamas, todėl tokios metodikos taikymas apsiribojo tik *ex vivo* tyrimais. Mokslui ir technologijoms žengiant į priekį mikroskopo struktūra buvo patobulinta ir sukurtas naujas prietaisas, įgalinantis biologinių audinių ląsteles apžiūrėti *in vivo*. Šios *in vivo* mikroskopijos ribotumas yra susijęs su didele šviesos sklaida ir sugertimi biologiniuose objektuose. Norint pasiekti kuo didesnę diagnostikos gylį, tyrimams turi būti naudojama šviesa iš audinių optinio skaidrumo lango. Šios srities spinduliuotė beveik nesukelia fluorescencijos audiniuose, todėl yra naudojama atspindžio metodika, kuomet infraraudonosios srities lazerine spinduliuote yra apšviečiamas audinys ir registruojamas atspindys. Tai yra nauja metodika, todėl kol kas nėra identifikuoti skirtingų audinių parametrai, kurie nulemia vaizdo kontrastą. Laidžioji sistema bei aplinkiniai audiniai skiriasi tiek savo sudėtimi, tiek struktūra, todėl tikėtina, jog atspindys nuo šiuos audinius sudarančių komponentų turėtų būti skirtingas ir tokiu būdu jie galėtų būti identifikuojami. Siekiant nustatyti galimus kontrasto šaltinius širdies audiniuose bei įvertinti atspindžio mikroskopijos galimybes vaizdinant ŠLS buvo atlikti visų trijų širdies audinių tipų vaizdinimo eksperimentai konfokaline atspindžio mikroskopijos sistema Vivascope 1500.

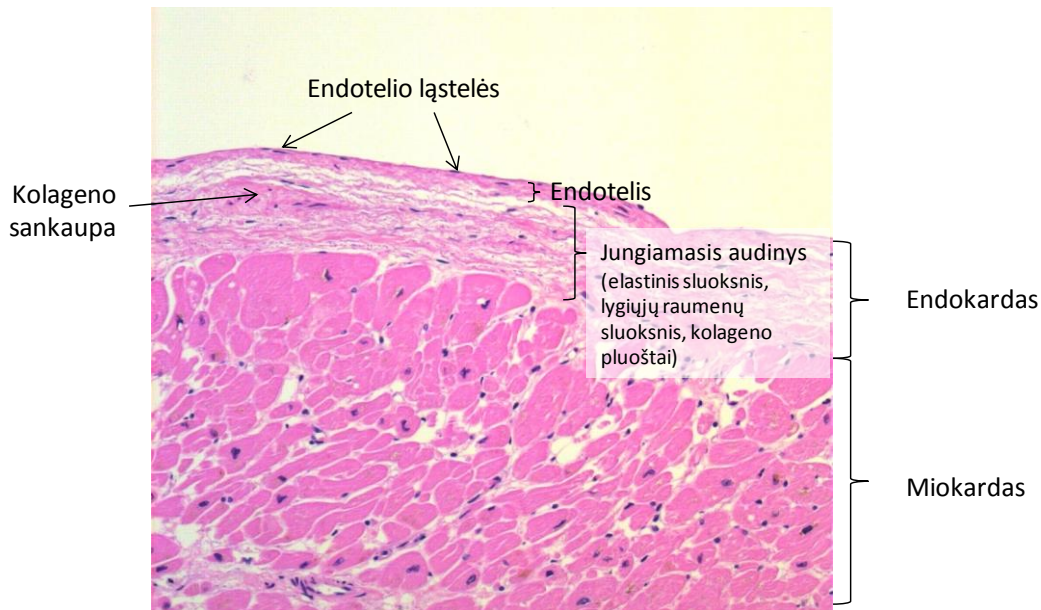
Šiuo metu pasaulyje didžioji dalis tyrimų, atliekamų atspindžio konfokalinės mikroskopijos metodu, yra skirti odos bei pigmentinių darinių tyrimams [140-142,150,174,175]. Širdies audiniai, tuo labiau laidžioji sistema, šiuo metodu nėra tirti.

Vaizdinimo eksperimentų metu širdies audinių preparatai buvo skenuojami nuo pat paviršiaus sluoksnis po sluoksniu, taip užregistruojant skirtinguose gyliuose esančių širdies sienelės sluoksnių atspindžio vaizdus. Vidinio širdies paviršiaus – endokardo atspindžio vaizdas pateiktas yra pateiktas 8.5.1A paveiksle.



8.5.1 pav. Skirtingų endokardo sluoksnių atspindžio vaizdai. Vaizdai yra gauti skenuojant tą pačią vietą skirtinguose gyliuose. Paveikslas A – paviršinis sluoksnis – endotelis. Paveikslas B – vaizdas 16 μm gylyje.

Endokardas yra sudarytas iš keleto skirtingų sluoksnių (8.5.2 pav.).



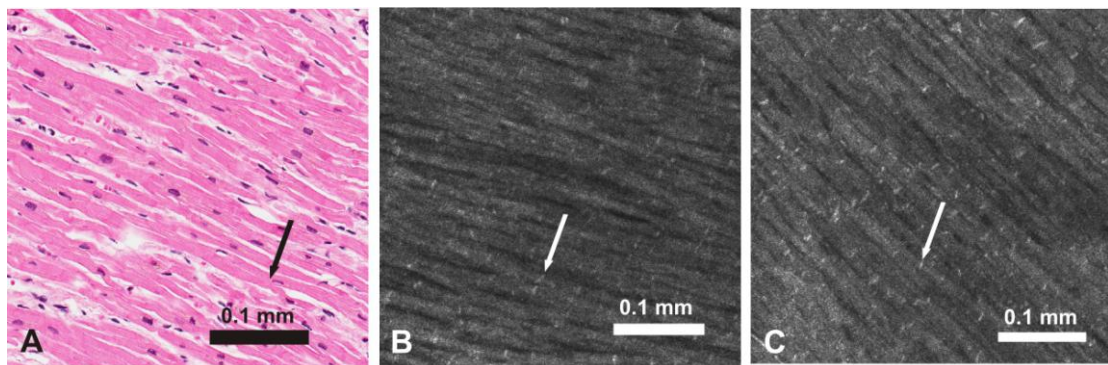
8.5.2 pav. Širdies audinio pjūvis, nudažytas hematoksilinu ir eozinu. Paviršinis endokardo sluoksnis yra sudarytas iš endotelio ląstelių monosluoksnio. Rodyklėmis yra pažymėti endotelio ląstelių branduoliai. Vidinė endokardo struktūra nėra aiškiai išreikšta. Histologiniame preparate matomi tik kolageno ir elastino pluoštai, sudarantys subendotelinį jungiamąjį audinį.

Endokardo sluoksnių skaičius skirtingose vietose yra skirtingas ir kinta nuo trijų iki penkių. Endotelis – paviršinis širdies sienelės sluoksnis yra sudarytas iš endotelio ląstelių monosluoksnio, JA ląstelių ir kolageno fibrilių [87]. Endotelio ląstelės yra labai plonos (apie 3 μm), todėl konfokalinės atspindžio mikroskopijos metodu iš jų sudarytas monosluoksnis nėra išskiriamas. Šviesūs plotai matomi endokardo paviršiuje 8.5.1A paveiksle yra atspindys nuo nelygaus kolageno paviršiaus, dengiančio gilesnius endokardo sluoksnius. Sekantis sluoksnis, kuris gali būti aiškiai išskiriamas atspindžio vaizduose yra sudarytas iš netvarkingai išsidėsčiusių skaidulų (Pav. 8.5.1B). Vaizdas yra užregistruotas 16 μm gylyje. Ligi šio gylio jokio kito aiškiai skirtingo sluoksnio nestebėta. 8.5.1B paveiksle matomas šviesus tinklas yra kolageno ir elastino pluoštai, sudarantys vidinį ir išorinį JA sluoksnį. Analogiška endokardo struktūra yra stebima ir histologinio preparato vaizde

(8.5.2 pav.). Tamsūs plotai atspindžio vaizde (8.5.1B) stebimi tarp šviesaus kolageno ir elastino tinklo atitinka tarpląstelinį užpildą. Viso endokardo storis priklausomai nuo lokalizacijos yra skirtingas ir kinta nuo 10 μm iki 200 μm [109,174].

Vertikali ir horizontali konfokalinės atspindžio mikroskopijos skyra yra prastesnė nei gali būti pasiekama atliekant histologinius tyrimus, todėl objektai, kurie yra mažesni nei 1,25 μm ir sluoksniai plonesni nei 5 μm nėra išskiriami. Šiuo metu tik keletas klinikoje naudojamų metodų įgalina ištirti vidines audinių struktūras nesuardant paties audinio. Kompiuterinio bei branduolių magnetinio rezonanso tomografijų skyra yra pakankama vaizdinti skirtingo tipo audinius, tačiau subtilūs vidinės audinio struktūros ar sudėties skirtumai yra nepastebimi, todėl konfokalinės atspindžio mikroskopijos galimybės vaizdinti kolageno ir elastino skaidulas bei jų sudaromą tinklą nepažeidžiant paties audinio gali būti panaudotos fibrozės židinių nustatymui ar miokardo infarkto pažeistų vietų identifikavimui operacijos metu.

Sekantis sluoksnis, kuris yra išskiriamas atspindžio konfokaliu mikroskopu, buvo užregistruotas 4 μm giliau po endokardu, maždaug 20 μm gylyje (8.5.3 pav.).

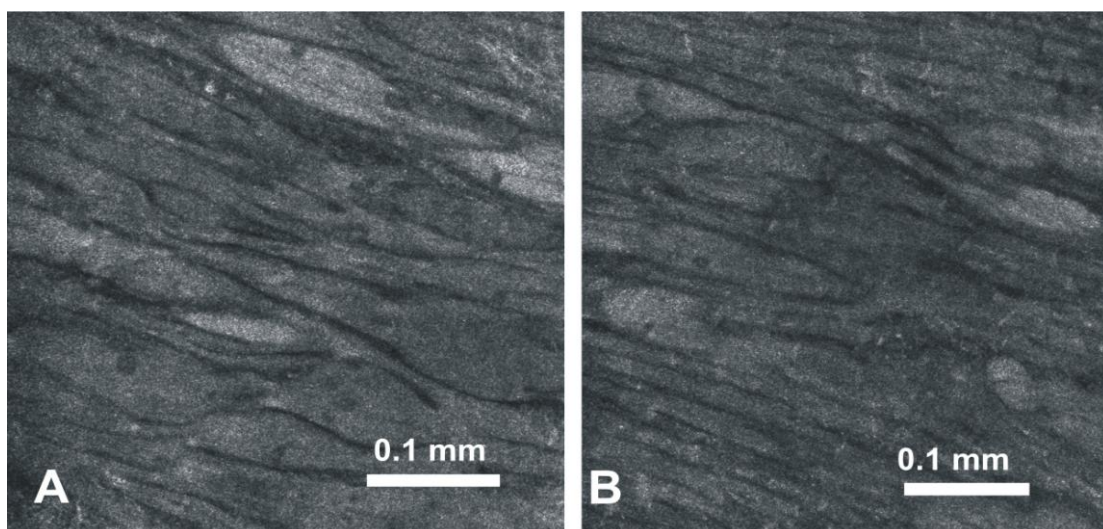


8.5.3 pav. Darbinis miokardas. Paveikslas A – vaizdas miokardo preparato, dažyto hematoksilinu ir eozinu. Paveikslas B – konfokalus atspindžio vaizdas užregistruotas ~ 20 μm gylyje nuo paviršiaus. Paveikslas C – miocitų pluoštai ~ 35 μm gylyje. Tarp miocitų esantys interkaliaciniai diskai (parodyti rodyklėmis) yra geriau matomi atspindžio vaizduose.

Atspindžio vaizde yra stebima charakteringa MK struktūra, kurioje matosi lygiagrečiais pluoštais išsidėstę miocitai. 8.5.3 B ir C vaizduose skiriasi miocitų pluoštų kryptys. Tai atitinka skirtingus raumenų sluoksnius. MK be miocitų taip pat yra intersticiumas su JA ląstelėmis, elastino ir kolageno pluoštai bei kraujagyslės. Taip pat tam tikrose širdies vietose MK audinyje yra įsiterpusi laidžioji sistema [109,174]. Aktino ir miozino pluoštai esantys miocituose atspindi lazerinę spinduliuotę ir lemia pilką jų spalvą, tuo tarpu MK intersticiumas konfokalinėse atspindžio nuotraukose yra matomas kaip tamsūs plotai. Interkaliaciniuose diskuose yra gausu baltymų, kurie formuoja tarpplastelines jungtis ir stipriai atspindi šviesą. Šios jungtys atspindžio vaizduose išryškėja kaip itin šviesios struktūros (8.5.3 pav. rodyklės). Vidutinis miocitų diametras išmatuotas konfokalinės atspindžio mikroskopijos vaizduose yra ~10 μm .

MK storis skirtingose širdies vietose kinta nuo kelių milimetrų iki daugiau nei vieno centimetro. Maksimalus konfokalinio atspindžio mikroskopo vaizdinimo gylis priklauso nuo audinio optinių savybių bei apšvietimo bangos ilgio. 800 nm bangos ilgio spinduliuotė įgalina registruoti pakankamo kontrasto MK vaizdus iki 250 μm gylio. Iš gilesnių sluoksnių atsispindėjusi šviesa pakeliui į detektorius yra sugerama ir jo nepasiekia, arba patyrusi daugybę atspindžių nebeišlaiko informacijos apie tašką, nuo kurio atsispindėjo. Tokie fotonai bus stebimi kaip bendras triukšmas. Vaizdinimas Vivascope 1500 prietaise yra atliekamas 9 kadrai/sekundę, todėl prailginus vieno kadro (vaizdas 500 μm x 500 μm) registravimo laiką būtų užregistruojami geresnio kontrasto vaizdai ir gilesni sluoksniai taip pat galėtų būti vaizdinami. Jei trumpi registravimo laikai vis dėlto yra būtini vaizdinimui realiaame laike, tuomet geresnis kontrastas galėtų būti pasiektas naudojant jautresnius detektorius.

Tam tikrose MK vietose buvo aptiktos ląstelės, kurios skyrėsi nuo miocitų (8.5.4 pav.).

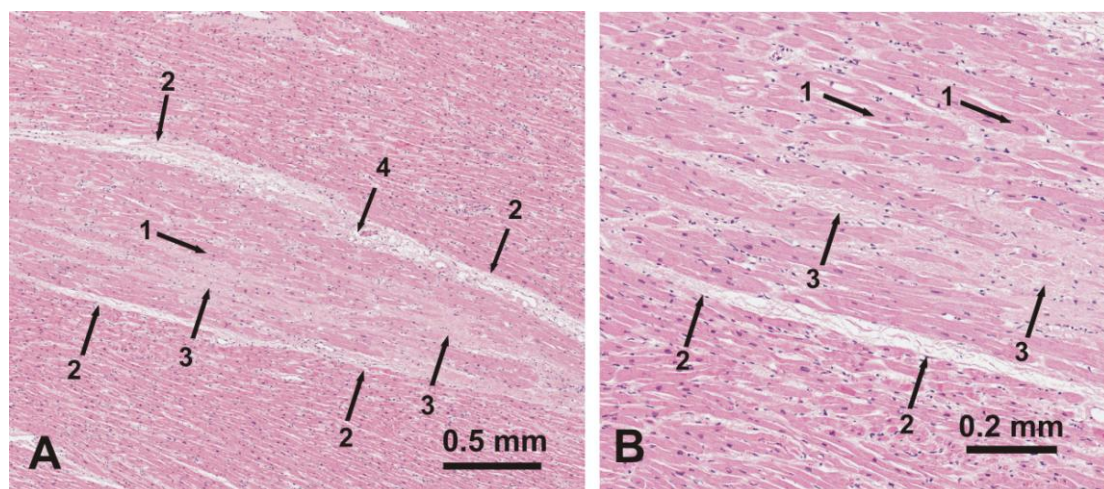


8.5.4 pav. Širdies audinio atspindžio vaizdas, rodantis heterogenišką ląstelinę struktūrą. Paveiksle A matyti didelės ląstelės, kurios savo forma skiriasi nuo miocitų. Ląstelių branduoliai yra matomi kaip tamsios dėmės ląstelių viduje. Paveiksle B matyti, jog ląstelės yra išsidėsčiusios lygiagrečiais pluoštais ir yra persipynusios su miocitais.

Šios ląstelės yra daug storesnės nei miocitai ir turi apvalius branduolius. Ląstelės taip pat yra išsidėsčiusios lygiagrečiais pluoštais, kurie yra persipynę su miocitais (8.5.4B pav.). Yra žinoma, kad už elektrinio signalo perdavimą periferinėse širdies dalyse yra atsakingos Purkinje ląstelės [12,17,87,176]. Laidžiosios sistemos šakose Purkinje ląstelių yra nedaug, jos formuoja Purkinje skaidulas, kurios yra persipynusios su miocitais [87,12,176]. Purkinje ląstelės yra maždaug 46 μm skersmens. Toks pat skersmuo yra ir ląstelių stebimų atspindžio vaizduose (8.5.4. pav.). Kito tipo laidumo ląstelių skersmuo yra ~ 7-10 μm ir labiau primena įprastus miocitus [87]. Mūsų žiniomis širdyje nėra jokių kitų ląstelių, kurių skersmuo būtų ~ 46 μm . Remiantis šiais faktais 8.5.4 paveiksle atspindžio vaizduose stebimos ląstelės gali būti atpažintos kaip Purkinje ląstelės. Reikėtų pažymėti, jog ligi šiol jokiais metodais nebuvo pavykę užregistruoti Purkinje ląstelių neišpreparuotame ir nedažytame audinyje. Kontrastas šių ląstelių konfokaliniuose atspindžio vaizduose yra nulemtas ląstelių viduje esančių mikrotubulių tinklo, filamentų, miofibrilių ir

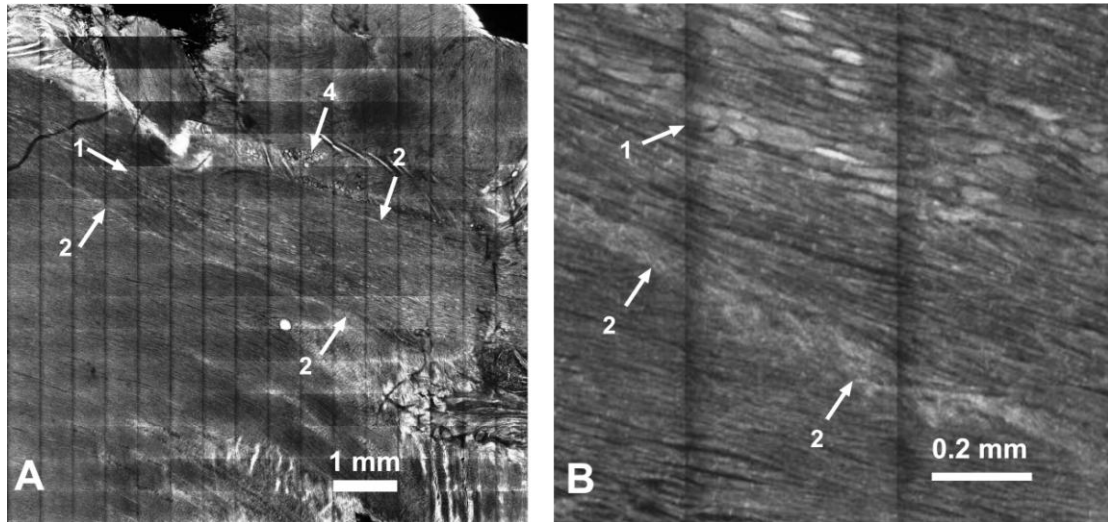
glikogeno granulių. Sveikose širdyse glikogenas yra difuziškai pasiskirstęs ląstelių citoplazmoje ir dėl ribotos konfokalinės atspindžio mikroskopijos skyros šios mažos granulės nėra išskiriamos. Glikogenas šviesą atspindi arba išsklaido, todėl ląstelių vidus atrodo šviesus. Geresnė skyra galėtų būti pasiekama audinių apšvietimui naudojant trumpesnių bangos ilgių spinduliuotę, tačiau trumpesnių bangos ilgių šviesa yra stipriau sugeriama audinyje esančių komponentų ir dėl to sumažėja įsiskverbimo gylis. Vis dėlto naudojant 800 nm spinduliuotę pasiekama skyra yra pakankama vaizdinti kolageno ir elastino pluoštus, pavienius miocitus ir Purkinje ląsteles.

Dar viena charakteringa laidžiosios sistemos histologinė ypatybė yra tai, jog ŠLS šakos yra apsuptos izoliaciniu JA sluoksniu. Histologinis laidžiosios sistemos šakos vaizdas pateiktas 8.5.5 paveiksle. Kaip matyti iš histologinių vaizdų, JA supa ne tik Purkinje skaidulas, bet visą ŠLS šaką.



8.5.5 pav. Dešinė Hiso pluošto šaka. Audinio pjūviai dažyti hematoksilinu ir eozinu. Rodyklės Nr.1 žymi Purkinje ląsteles. Rodyklės Nr.2 rodo JA sluoksnį, kuris Hiso pluoštą atskiria nuo MK. Rodyklės Nr.3 žymi JA esantį Hiso pluošto viduje. Paveiksle A esanti rodyklė Nr.4 rodo apvalius lipocitus.

Šios aukščiau išvardintos ŠLS ypatybės yra aiškiai matomos ir konfokaliniuose atspindžio vaizduose, kurie buvo gauti iš nesupjaustytų ir nedažytų širdies audinio preparatų (8.5.6 pav.).



8.5.6 pav. Dešinės Hiso pluošto šakos preparatų konfokaliniai atspindžio vaizdai, užregistruoti 55 μm gylyje. Rodyklės Nr.1 žymi Purkinje ląsteles, rodyklės Nr.2 žymi Hiso pluoštą supantį JA. Paveiksle A Rodyklė Nr. 4 rodo už pluošto esančią lipocitų sankaupą.

Miokardo fone išsiskiria JA izoliuotas Hiso pluošto šakos fragmentas. Pluoštas yra sudarytas iš Purkinje ląstelių (8.5.6 pav. Rodyklės Nr. 1), kurios sudaro lygiagrečias skaidulas ir kartu su jas supančiais miocitais sudaro pluoštinę struktūrą. Izoliacinis sluoksnis yra sudarytas iš JA ir atspindžio nuotraukose matomas kaip plonų, susipynusių kolageno skaidulų tinklas (8.5.6 pav. Rodyklės Nr. 2). Viršutinėje pluošto dalyje 8.5.6A paveiksle yra matoma lipocitų sankaupa.

Apibendrinant vaizdinimo atspindžio konfokaline mikroskopija rezultatus galima paminėti, jog ši metodika buvo pirmą kartą pritaikyta širdies audinių tyrimams. Tyrimų metu mes parodėme, kad horizontali ir vertikali metodo skyra įgalina išskirti skirtingus endokardo sluoksnius dėl nevienodai išsidėsčiusių kolageno ir elastino skaidulų. Pavieniai miocitai, kurių vidutinis

skersmuo yra ~ 10 μm , taip pat gali būti vaizdinami. Konfokaline atspindžio mikroskopija, panašiai kaip ir optine koherentine tomografija, vaizdai yra gaunami dėl skirtingai atspindėtos šviesos nuo tam tikrų audinio elementų. Vietos, kuriose gausu baltymų, pvz. interkaliaciniai diskai, stipriai atspindi šviesą ir išsiskiria iš aplinkinių struktūrų. Tam tikrose MK vietose buvo aptiktos didelės ląstelės, kurios remiantis anatominiais ir histologiniais kriterijais buvo atpažintos kaip Purkinje ląstelės.

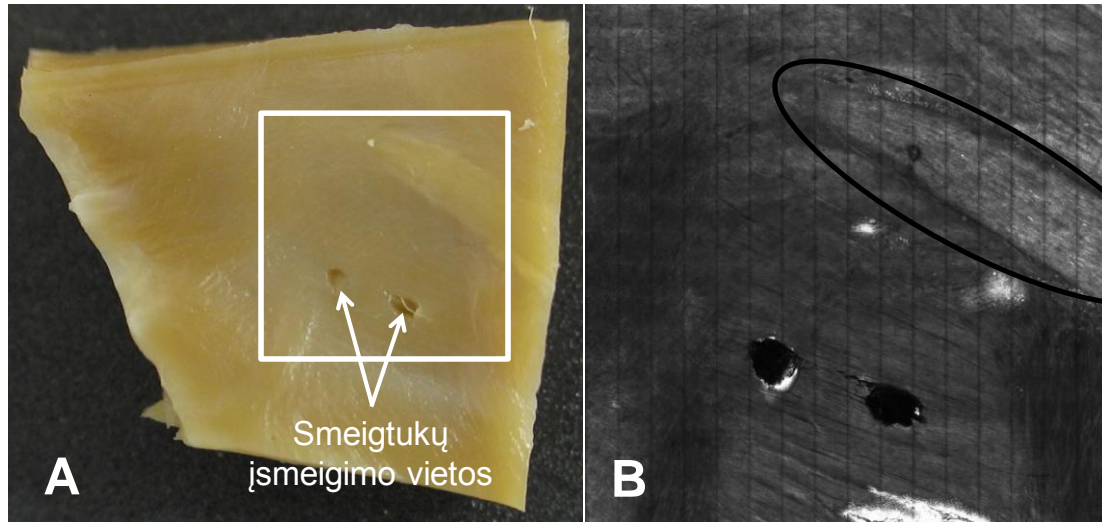
Nors šie pirminiai rezultatai buvo gauti *ex vivo* audiniuose, tačiau jie yra labai svarbūs. Šiuo metu rinkoje jau yra pristatyti dar tobulesni instrumentai, įgalinantys registruoti konfokaličius vaizdus net ir sunkiai prieinamose vietose. Atspindžio konfokalinis mikroskopas gali būti modifikuotas į fluorescencinį konfokalinį mikroskopą, tokiu būdu vaizdinant ne tik skirtingu atspindžio rodikliu pasižyminčius audinių elementus. Taigi konfokalinė mikroskopija, įgalinanti registruoti pavienių ląstelių vaizdus gyvuose audiniuose atveria naujus kelius širdies audinių tyrimuose *in vivo* ir laidžiosios sistemos vaizdinimui.

8.5.1 Konfokalinės mikroskopijos ir fluorescencinės spektroskopijos metodikų palyginimas

Konfokalinės mikroskopijos metodu yra gaunami tiesioginiai audinių sudarančių komponentų vaizdai. Šiuo atveju identifikuoti skirtumus yra gerokai paprasčiau, nei analizuojant fluorescencijos spektrus. Skyra pasiekama konfokalinės mikroskopijos metodu yra geresnė nei fluorescencinės spektroskopijos, kadangi registruojant fluorescenciją skyra yra lemiamą šviesolaidžio skersmens. Didžiausias konfokalinio vaizdinimo trūkumas – nedidelis kokybiško vaizdo registravimo gylis, tuo tarpu fluorescencija gali būti užregistruota ir iš didesnių gylių. Tyrimuose su modelinėmis sklaidančiomis sistemomis buvo parodyta, jog parinkus tam tikrą žadinimo – surinkimo sistemos geometriją galima selektyviai registruoti gilesnių sluoksnių fluorescenciją [177,178]. Taigi buvo atliktas konfokalinės

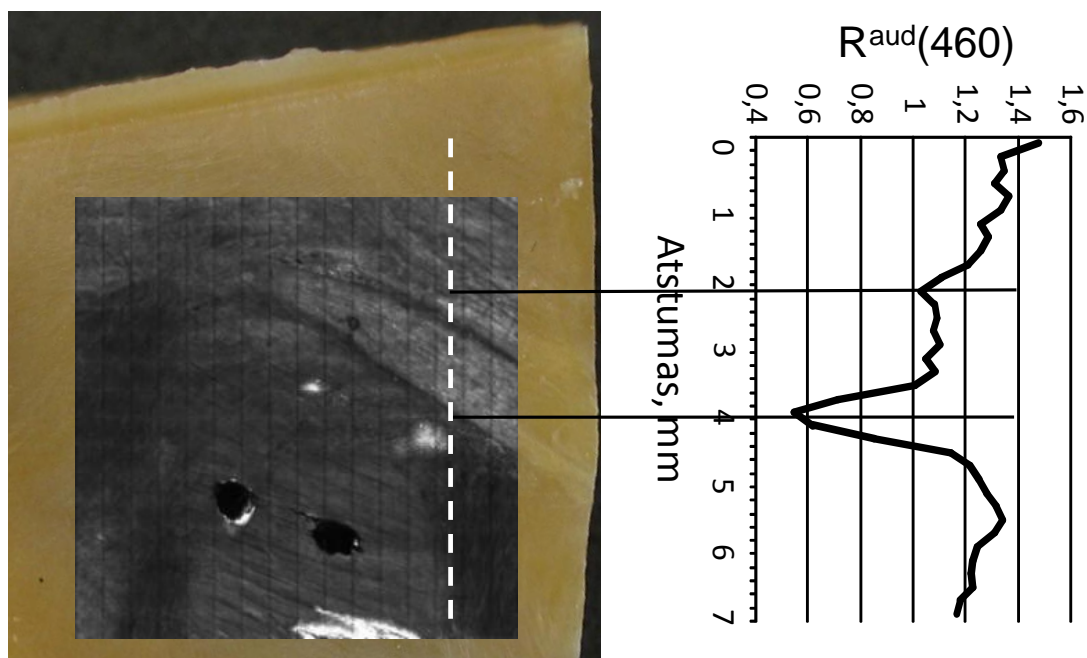
mikroskopijos ir fluorescencinės spektroskopijos metodų palyginimas, siekiant įvertinti abiejų sistemų diagnostikos gylius.

Šiam tikslui buvo parinktas bandinys, kuriame ŠLS šaka yra lokalizuota ne lygiagrečiai paviršiui, bet leidžiasi gilyn. Bandinio konfokalinis atspindžio vaizdas sugretintas su dienos šviesos nuotrauka pateiktas 8.5.1.1 paveiksle.



8.5.1.1 pav. Paveikslas A – širdies preparato vaizdas dienos šviesoje. Baltas kvadratas žymi vaizdinimo konfokaliniu mikroskopu plotą. Vaizdinimo plotas 8x8 mm. Rodyklėmis pažymėtos smeigtukų įsmeigimo vietos, kurios buvo panaudotos vaizdų sugretinimui. Paveikslas B – konfokalinis atspindžio vaizdas 100 μm gylyje. Juodai yra apvestas laidžiosios sistemos pluoštas. Vaizde matyti, jog bandinio krašte ŠLS pluoštas yra skanavimo plokštumoje, o bandinio viduryje pluoštas leidžiasi gilyn į audinį.

Tyrimo metu fluorescencijos spektrai buvo matuoti šviesolaidžiu kas 200 μm . Vienu atveju skenavimas atliktas išilgai laidžiosios sistemos šakos, kitais atvejais – skersai šakos (įvairiose vietose). Skenavimas šviesolaidžiu vyko pagal 7.2 skyriuje aprašytą metodiką. Kiekviename registravimo taške buvo skaičiuojamas fluorescencijos intensyvumų santykis ties 460 nm, žadinant 330 ir 380 nm spinduliuote. Pirmojo skenavimo rezultatai, kurio metu intensyvumai registruoti skersai laidžiosios sistemos šakos netoli bandinio krašto, pateikti 8.5.1.2 paveiksle.

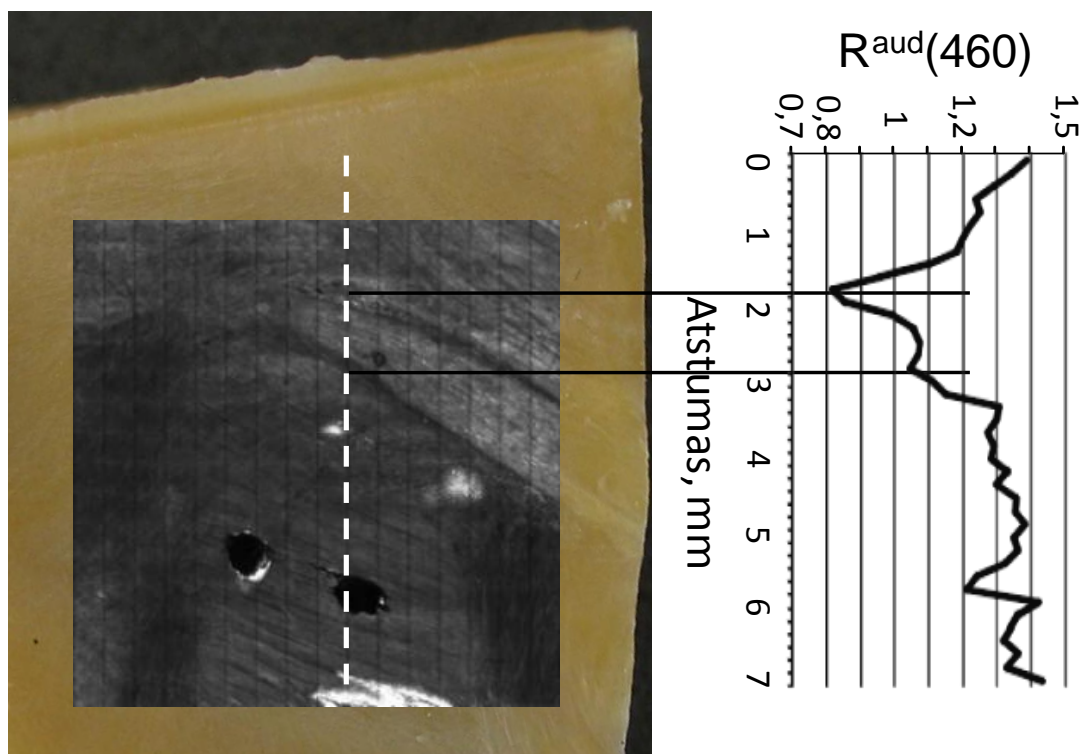


8.5.1.2 pav. Širdies preparato pirmojo skenavimo per laidžiosios sistemos šaką rezultatai. Ant preparato nuotraukos, toje vietoje kur atliktas vaizdinimas konfokaliniu mikroskopu, uždėtas konfokalinis atspindžio vaizdas. Linija, kurioje buvo registruojami fluorescencijos intensyvumai, pažymėta punktyrine linija. Dešinėje pateikti fluorescencijos intensyvumų santykių skaičiavimo rezultatai. Linijomis pažymėti taškai, kurie pagal intensyvumų santykių metodiką atitinka ŠLS pluošto ribas.

Šie rezultatai, kurie buvo skirti palyginti dviejų metodų galimybes, dar kartą patvirtino fluorescencinės spektroskopijos metodo tinkamumą ŠLS atskyrimui. Fluorescencijos intensyvumų santykiai gerai koreliuoja su konfokaliniu atspindžio vaizdu. Toje vietoje kur prasideda ŠLS pluoštas, yra stebimas staigus santykio vertės sumažėjimas (8.5.1.2 pav., ties 4 mm žyma), kas rodo JA buvimą. Dengiamojo JA buvimas aplink ŠLS šakas yra žinomas iš laidžiosios sistemos morfologijos. Tą patį galima pasakyti ir iš atspindžio vaizdų – šioje vietoje matyti JA sudarančių skaidulų pluoštas. Kita pluošto krašto riba nėra tokia aiški atspindžio vaizduose, tačiau intensyvumo santykių kreivėje stebimas staigus, nors ir nedidelis santykio vertės sumažėjimas (8.5.1.2 pav., ties 2 mm žyma). Laidžiosios sistemos pluošto ribose

intensyvumų santykis yra artimas 1, o MK ribose santykis viršija 1,2. Analogiški duomenys buvo gauti ir anksčiau, širdies preparatus tiriant ir vaizdinant nuostoviosios fluorescencijos metodu (8.2 ir 8.3 skyriai). Šis konfokalinės mikroskopijos ir fluorescencinės spektroskopijos duomenų palyginimas leido pirmą kartą itin tiksliai susieti spektroskopijos duomenis su audinio morfologija. Toks dviejų metodikų derinimas ženkliai palengvina bei patikslina spektroskopinių duomenų interpretavimą. Taip pat reikėtų paminėti, jog derinant abi metodikas pirmą kartą fluorescencijos registravimo taškai buvo parinkti pagal morfologiškai (citologiškai) svarbiausias vietas, todėl buvo gauta tiesioginė koreliacija tarp audinio morfologijos ir fluorescencijos spektrų. Atsižvelgiant į išskirtines konfokalinės mikroskopijos galimybes vaizdinti įvairius audinių sluoksnius nesuardant paties audinio, konfokalinė mikroskopija galėtų būti pripažinta kaip naujas auksinis standartas moksliniuose tyrimuose lyginant neinvazinių optinių metodų duomenis su audinio morfologija.

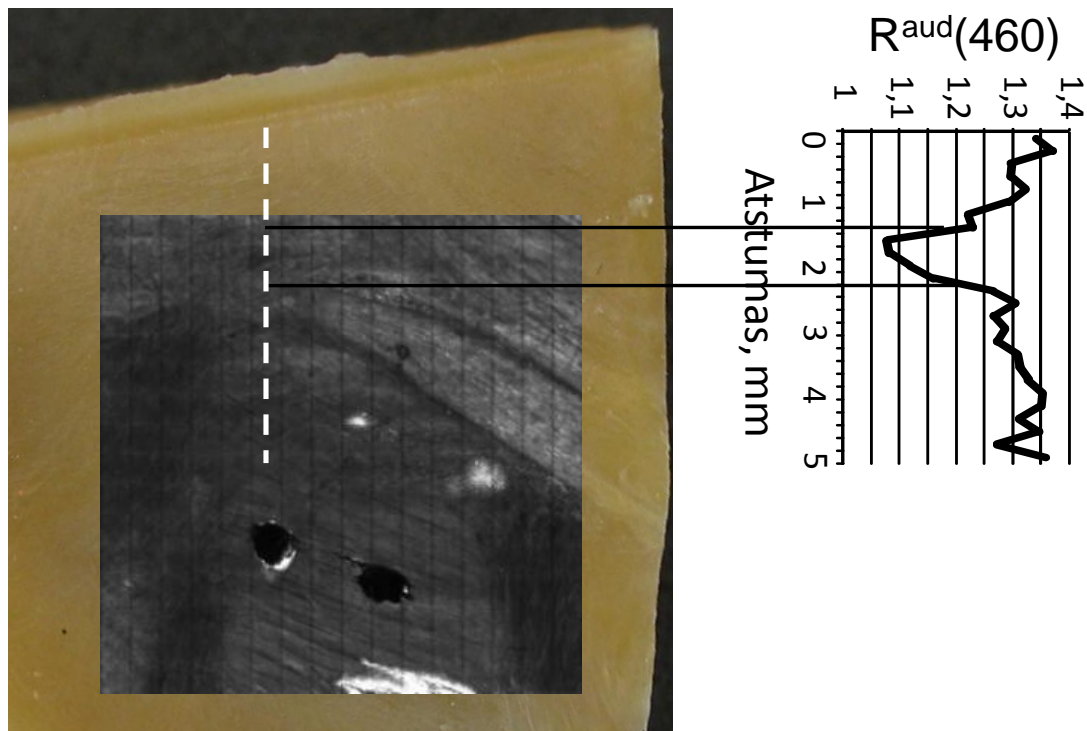
Sekantis bandinio skenavimas šviesolaidžiu buvo atliktas toliau nuo bandinio krašto. Kaip matyti iš 8.5.1.1 pav. tolstant nuo preparato krašto ŠLS pluoštas leidžiasi gilyn į audinį. Tyrimo rezultatai pateikti 8.5.1.3 paveiksle.



8.5.1.3 pav. Širdies preparato antrojo skenavimo per laidžiosios sistemos šaką rezultatai. Linija, kurioje buvo registruojami fluorescencijos intensyvumai, pažymėta punktyrine linija. Dešinėje pateikti fluorescencijos intensyvumų santykių skaičiavimo rezultatai. Linijomis pažymėti taškai, kurie pagal intensyvumų santykių metodiką atitinka ŠLS pluošto ribas.

Rezultatai yra analogiški, kaip ir pirmojo skenavimo atveju. Tos vietos, kuriose fluorescencijos intensyvumų santykių vertės yra artimos 1, pagal konfokalinę atspindžio nuotrauką atitinka ŠLS pluoštą. Staigūs intensyvumo santykių vertės pokyčiai ties 1,9 mm ir 2,9 mm (8.5.1.3 pav.) atitinka JA izoliacinį sluoksnį aplink laidžiosios sistemos pluoštą. MK audinio ribose intensyvumų santykis viršija 1,2 vertę, kas vėlgi gerai koreliuoja su anksčiau gautais rezultatais.

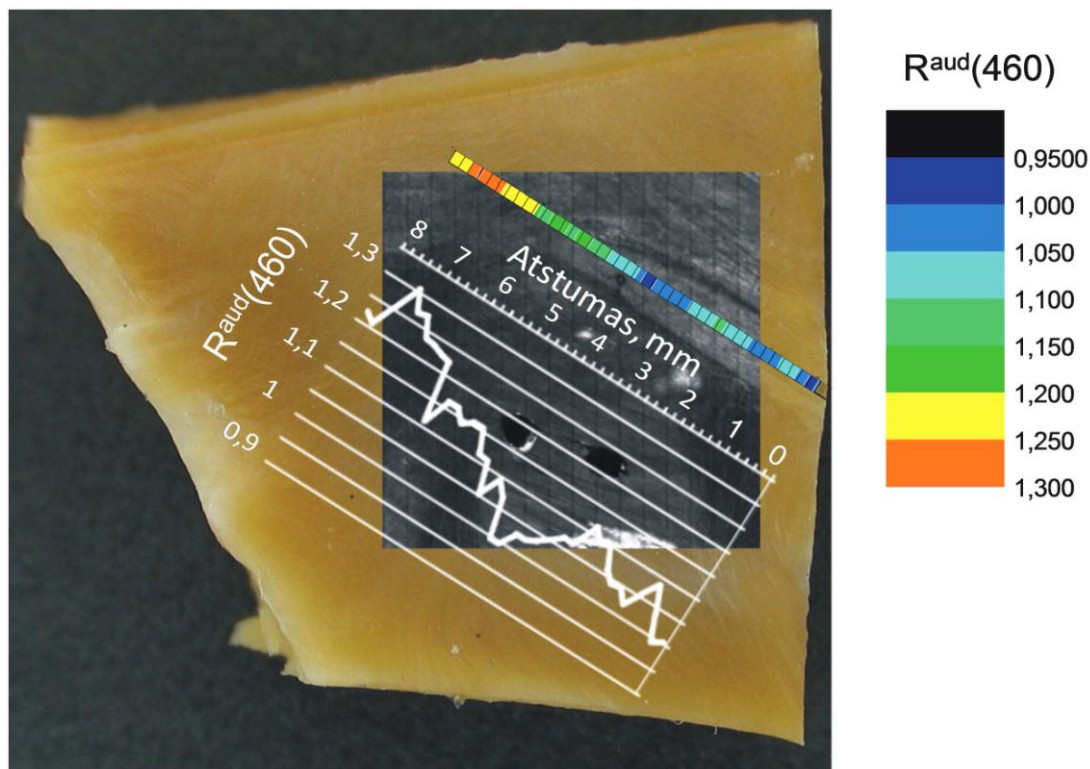
Trečiasis skersinis laidžiosios sistemos skenavimas buvo atliktas toje vietoje, kur atspindžio vaizde ŠLS pluošto jau nebematyti – jis yra gilesniuose sluoksniuose. Skenavimo rezultatai pateikti 8.5.1.4 paveiksle.



8.5.1.4 pav. Širdies preparato trečiojo skenavimo per laidžiosios sistemos šaką rezultatai. Linija, kurioje buvo registruojami fluorescencijos intensyvumai, pažymėta punktyrine linija. Dešinėje pateikti fluorescencijos intensyvumų santykių skaičiavimo rezultatai. Linijomis pažymėti taškai, kurie pagal intensyvumų santykių metodiką atitinka ŠLS pluošto ribas.

Remiantis fluorescencijos intensyvumų santykiais ir šioje bandinio vietoje vis dar galima nustatyti ŠLS lokalizaciją, tačiau šiuo atveju nėra registruojamas JA egzistavimas ties pluošto kraštais ir todėl pluošto ribos gali būti nustatytos iš staigaus intensyvumo santykio vertės sumažėjimo ties 1,5 mm ir staigaus padidėjimo ties 2,4 mm (8.5.1.3 pav.). Intensyvumų santykių vertės šiame skenavimo ruože (daugiau už 1,06 ir mažiau už 1,2) atitinka ŠLS verčių intervalą. MK audinio ribose intensyvumų santykis vėlgi viršija 1,2.

Paskutinis audinio skenavimas šviesolaidžiu buvo atliktas išilgai laidžiosios sistemos šakos, pradedant nuo preparato krašto, kur laidžiosios sistemos šaka yra paviršiuje ir baigiant toje vietoje, kur atspindžio nuotraukoje ŠLS jau nebesimato. Tyrimo rezultatai pateikti 8.5.1.5 paveiksle.



8.5.1.5 pav. ŠLS pluošto išilginis skenavimas. Skenavimo vieta yra pažymėta spalvota linija. Spalvos atitinka tam tikras fluorescencijos intensyvumų santykių vertes. Dešinėje pateikta skalė, kur skirtingos spalvos žymi tam tikrus intensyvumų santykių verčių intervalus. Paveiksliuke (balta kreivė) yra pateiktos ir intensyvumų santykių vertės kiekviename registravimo taške.

Šio skenavimo rezultatai leidžia palyginti dviejų neinvazinių metodų vaizdinimo gylius. Konfokalinės mikroskopijos metodu ŠLS lokalizaciją buvo galima įvertinti iki ~ 150 μm gylio, tačiau tyrimuose panaudotas atspindžio vaizdas buvo užregistruotas 100 μm gylyje, nes iš gilesnių sluoksnių užregistruotuose vaizduose ŠLS ribos nebėra pakankamai ryškios. Pluošto galas, kuris atspindžio vaizduose dar aiškiai galėjo būti išskiriamas iš aplinkinių audinių, yra lokalizuotas ties 5 – 5,5 cm žyma (8.5.1.5 pav.). Tuo tarpu fluorescencinės spektroskopijos metodu galima identifikuoti laidžiąją sistemą iki 7 mm žymos. Šioje vietoje ŠLS yra giliau nei 150 μm . Taigi, šviesolaidžiu registruojant širdies audinių fluorescenciją ŠLS galima būtų aptikti giliau, kur tiesioginio vaizdinimo metodu, pagrįstu atspindžio registravimu, jau nebegaunami pakankamo kontrasto vaizdai.

Apibendrinant dviejų neinvazinių metodų palyginimo rezultatus galima teigti, jog konfokalinė atspindžio mikroskopija yra itin aukštos erdvinės skyros metodas, leidžiantis identifikuoti ne tik laidžiosios sistemos lokalizaciją, bet ir vaizdinti smulkiąsias širdies audinio struktūras, tačiau tai yra brangus metodas, o jo taikymas širdies operacijos metu ne visada gali būti įmanomas dėl sudėtingo priėjimo prie tiriamos vietos. Nepaisant to, konfokalinė atspindžio mikroskopija galėtų tapti nepamainomu įrankiu širdies audinių fundamentiniuose tyrimuose, kadangi atliekant įvairiuose gyliuose esančių sluoksnių vaizdinimą pats audinys nėra suardomas ir jis gali būti naudojamas arba pakartotiniuose tyrimuose, arba tyrimuose kitais metodais. Tuo tarpu šviesolaidinė fluorescencinė spektroskopija yra ženkliai paprastesnis ir pigesnis metodas, kuriuo galima ištirti net ir pačios sudėtingiausios lokalizacijos vietas. Šiuo metodu nėra gaunami tiesioginiai ŠLS vaizdai, todėl taikant fluorescencijos intensyvumų santykių metodiką gali būti nustatytas tik laidžiosios sistemos pluoštų išsidėstymas širdyje, tačiau atliekant širdies operacijas informacija apie ŠLS lokalizaciją yra pakankama, kad išvengti ŠLS pažeidimo. Šio metodo skyra yra pakankama pavienių ŠLS šakų vaizdinimui. Ankstesnių tyrimų metu buvo parodyta, jog naudojant atitinkamus šviesolaidinius zondus gali būti identifikuojami 1 mm skersmens laidžiosios sistemos pluoštai [179], todėl dėl itin plačių galimybių parenkant zondu geometrines formas šviesolaidinė ŠLS aptikimo metodika turėtų puikiai tikti tyrimams *in vivo*.

8.6 Širdies audinių vaizdinimas *in vivo* operacijos metu

Atlikus širdies audinių analizę įvairiais optiniais metodais bei įvertinus kiekvieno iš jų galimybes laidžiosios sistemos identifikavimui gyvuose audiniuose, nuspręsta pirminius ŠLS atskyrimo tyrimus *in vivo* atlikti fluorescencine ne laikinės skyros spektroskopija, taikant intensyvumų santykių metodiką, aprašytą 8.2 skyriuje.

Tyrimas operacijos metu suteikė labai daug svarbios informacijos. Visų pirma buvo realiomis sąlygomis įvertinta laidžiosios sistemos aptikimo metodika bei diagnostinė aparatūra, pateikta 7.6 skyriuje. Operacijos metu buvo registruojami spektrai visų trijų širdies audinių – JA, ŠLS ir MK. Kiekviename tyrimo taške buvo registruojami trys spektrai: atraminis signalas, siekiant įvertinti aplinkos šviesos įtaką (šiuo atveju žadinančioji spinduliuotė buvo išjungiamą); tuoj pat po to buvo registruojami autofluorescencijos spektrai žadinant 330 nm bei 380 nm spinduliuote. Tyrimas viename taške užtrukdavo apie 30s. Šio registravimo metu operuojantis chirurgas šviesolaidinį zondą turėjo išlaikyti nejudamai. Iš viso buvo užregistruoti 72 fluorescencijos spektrai iš 24 širdies vietų. Iš jų 10 vietų iš JA srities, 4 vietos iš MK bei 10 vietų, kuriose ieškota ŠLS.

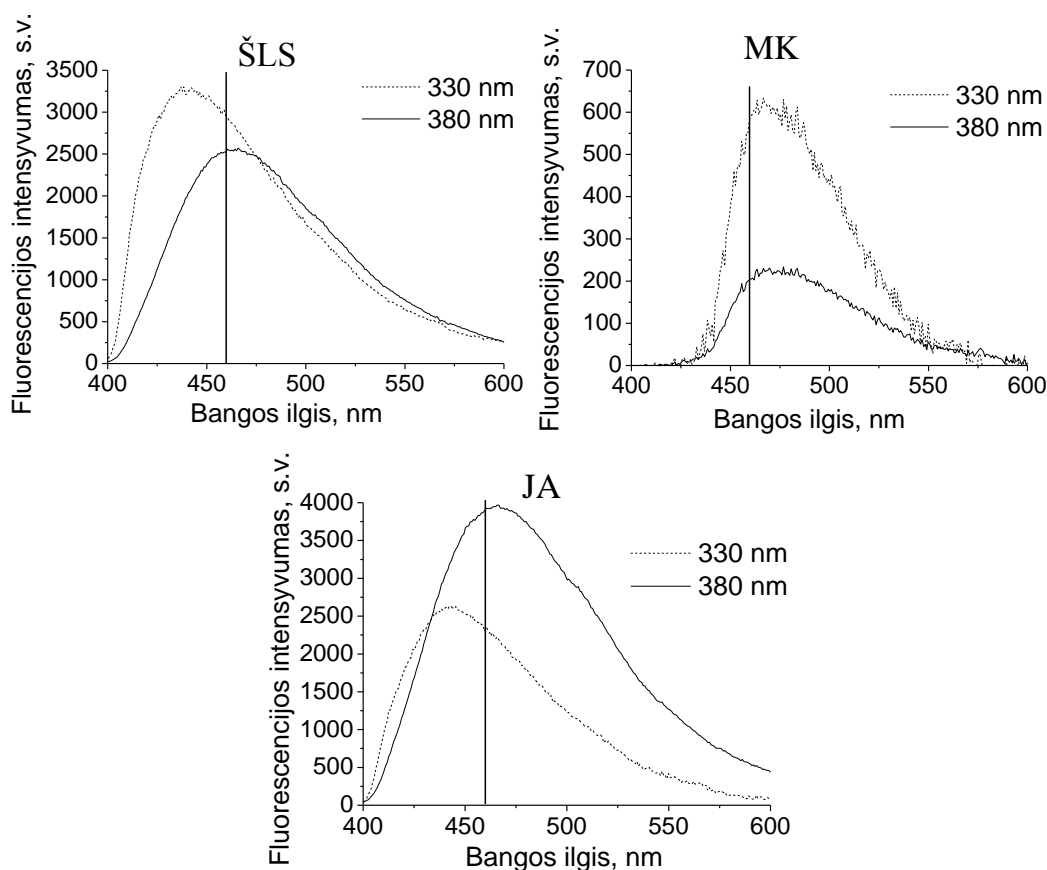
Deja, bet širdies audinių fluorescencinio vaizdinimo skaitmenine kamera nepavyko atlikti. Operacijos metu širdis yra atveriamą minimaliai, kiek yra reikalinga atitinkamos ydos ar pažeidimo korekcijai. Taip pat yra keliami itin griežti sterilumo reikalavimai įrangai, kuria dirbama operaciniame lauke.

Taipogi reikėtų paminėti, jog nepaisant to, kad operacijos metu kraujotaka iš širdies yra atjungiamą ir operaciniame lauke kraujo būna minimaliai, tačiau priglaudus zondą susidariusiame įdubime, per 30s šiek tiek susirinkdavo kraujo.

Pirminiai rezultatai patvirtino ir anksčiau, *ex vivo* bandiniuose stebėtus fluorescencijos intensyvumo ypatumus – intensyviausiai fluorescuoja JA, silpniausiai MK. Tose vietose, kur ieškota ŠLS, intensyvumas buvo šiek tiek mažesnis nei JA, tačiau gerokai didesnis nei MK. Įvertinus visų 24 vietų spektrų intensyvumus buvo atlikta pirminė analizė. Iš visų 10 tirtų JA vietų, 3 buvo pripažintos kaip netinkamai išmatuotos. Tai reiškia, jog pakito šviesolaidžio priglaudimas prie audinio ir buvo užregistruota daug pašalinės šviesos arba tyrimo vietoje prisirinko kraujo. JA atveju spektrai registruoti nuo vožtuvo paviršiaus, todėl tai galima laikyti neabejotiną JA. Visos 4 tirtos MK vietos buvo išmatuotos tinkamai, spektrai registruoti nuo skilvelio raumens. ŠLS lokalizacijos ieškota prieširdžiuose, šalia pjūvio vietos. Iš 10 ŠLS

paieškos vietų, pagal spektrų intensyvumus, 3 vietos buvo atmestos, kaip netinkamai užregistruotos. Likusioms 7 buvo atlikta spektrų analizė pagal aukščiau aprašytą santykių skaičiavimo metodiką. Pagal šią metodiką taip pat buvo įvertinti ir JA bei MK vietų fluorescencijos spektrai.

Atlikus spektrų analizę ir paskaičiavus intensyvumų santykius, gautos MK, bei JA audinių vidutinės vertės. MK – $2,8 \pm 0,6$; JA – $0,9 \pm 0,2$. Remiantis šiomis vertėmis buvo sudarytas intervalas, kuriame esančios vertės gali būti priskirtos ŠLS – nuo 1,1 iki 2,2. Pagal šią analizę tik 2 vietos (intensyvumų santykiai 1,2 ir 2,1) iš tinkamai išmatuotų 7 gali būti priskirtos ŠLS. Likusių 5 vietų suskaičiuoti intensyvumų santykiai atitiko MK. Tipiniai ŠLS, JA ir MK spektrai pateikti 8.6.1 pav. Paveiksle taip pat pateikti žadinimo bangos ilgiai bei pažymėta sritis ties 460 nm, kur skaičiuoti intensyvumų santykiai.



8.6.1 pav. ŠLS, MK ir JA fluorescencijos spektrai gyvoje širdyje

Spektrai savo forma labai panašūs į anksčiau *ex vivo* bandiniuose registruotus fluorescencijos spektrus. Šiuo atveju nėra charakteringos įdubos ties 410 nm, kuri yra stebima širdies audinių preparatuose (8.6.2 pav.) žadinant 330 nm bangos ilgio spinduliuote. Taip yra todėl, kad registravimui naudojamas žadinančios spinduliuotės atkirtimo filtras, kuris šviesą praleidžia nuo ~ 400 nm.

Analizuojant šiuos pirmuosius rezultatus padarytos labai svarbios išvados. Visų širdies audinio tipų – JA, MK ir ŠLS – fluorescencijos spektrų intensyvumas ir forma iš esmės yra panašūs į *ex vivo* širdies audinių registruotus spektrus. Tai leidžia daryti prielaidas, kad ŠLS atskyrimo metodika, nustatyta širdies audinių preparatuose, turėtų tikti ir *in vivo* audiniams atskirti. Taip pat pastebėta, kad fluorescencijos spektrų intensyvumas, per ilgą registravimo laiką (~ 30s), vis dėlto priklauso nuo šviesolaidinio zondo padėties. Tiek ilgai išlaikyti žadinimo/registravimo sąlygas nepakitusias labai sudėtinga, todėl gaunamas nevienodas žadinimo intensyvumas 330 nm ir 380 nm spinduliuotei, kas nulemia ir fluorescencijos intensyvumo skirtumus. Dar viena aplinkybė, kuri neišvengiamai įtakoja fluorescencijos registravimą, yra tai, kad operacijos metu spektrus tenka registruoti esant pakankamai stipriam aplinkiniam apšvietimui. Tyrimo metu buvo registruojamas atraminis signalas ir vėliau, atliekant skaičiavimus, jo įtaka buvo eliminuojama, tačiau dėl neišlaikytų visiškai vienodų žadinimo/registravimo sąlygų šis įvertinimas ne visais atvejais buvo tikslus. Todėl ateityje, siekiant patikimų rezultatų, reikia modifikuoti tiek šviesos šaltinį, tiek detektavimo įrenginį ir registravimo laiką sutrumpinti iki keleto sekundžių.

Registruojant spektrus ant šviesolaidžio antgalio nors ir nedideliais kiekiais renkasi kraujas, todėl po kiekvieno matavimo šviesolaidis turėtų būti nuvalomas. Tai ypač matosi MK spektruose, kur fluorescencijos spektro intensyvumas trumpabangėje srityje yra sumažėjęs. Šiuo atveju, problema vėl būtų išspręsta sutrumpinus registravimo laiką.

Apibendrinant visus širdies audinių tyrimus galima padaryti išvadas, jog optiniais diagnostikos metodais registruojami širdies audinių optiniai parametrai yra nevienodi skirtingiems audiniams. ŠLS ir MK pasižymi skirtingu fluorescencijos intensyvumu, tuo tarpu pritaikius dviejų žadinimo bangos ilgių metodiką gali būti atskirti visi trys audinių tipai – ŠLS, JA ir MK. Fluorescencinės laikinės skyros spektroskopijos metodu taip pat aptikti tiek fluorescencijos gyvavimo trukmės, tiek kompoziciniai skirtumai tarp JA ir ŠLS. Vaizdinant širdies audinius konfokalia atspindžio mikroskopijos aparatūra sugebėta išskirti skirtingus JA sluoksnius, taip pat MK sudarančius miocitus bei jų pluoštus ir, svarbiausia, aptikome pavienes purkinje ląsteles, sudarančias ŠLS. Taip pat buvo užregistruotas ŠLS šakos vaizdas, iš kurio paaškinta stebimų fluorescencijos skirtumų galima kilmė. Šiuo metu pasaulyje jau yra daug mažesnių ir mobilesnių konfokalinės mikroskopijos prietaisų, todėl tikėtina, kad ateityje tokia metodika galėtų būti pritaikyta ir ŠLS aptikimui gyvuose audiniuose. Galiausiai, atlikus ŠLS atskirti eksperimentus operacijos metu *in vivo* nustatyta, kad užregistruoti fluorescencijos spektrai bei suskaičiuoti intensyvumų santykiai yra labai panašūs į *ex vivo* registruojamų savitosios fluorescencijos spektrų. Šie rezultatai sudaro prielaidas ŠLS atskyrimui nustatytomis metodikomis bei nubrėžė tolimesnes metodikos bei aparatūros tobulinimo kryptis.

IX. IŠVADOS

1. Fluorescenciniais metodais ištyrus nepreparuotus širdies audinius nustatyta, jog didžiausi optinių parametų skirtumai tarp skirtingo tipo širdies audinių yra stebimi fluorescenciją žadinant 330 nm – 380 nm srityje, o registruojant 400 nm – 550 nm spektriniame ruože.
2. Ištyrus kraujo įtaką registruojamiems spektrams nustatyta, jog dėl kraujo reabsorbcijos fluorescencija turi būti registruojama ties 460 nm.
3. Remiantis nustatytais spektriniais skirtumais sukurta ŠLS atskyrimo metodika, kuri paremta intensyvumų santykių skaičiavimu:

$$\langle R_{aud} \rangle (460) = \frac{I_{330}^{žad}}{I_{380}^{žad}}$$

Suskaičiuota vertė $\langle R_{aud} \rangle (460)$ yra skirtinga ŠLS, MK ir JA audiniams. Tokia metodika yra nejautri fluorescencijos žadinimo-surinkimo sąlygoms ir gali būti naudojama ne tik taškiniam širdies audinių identifikavimui, bet galimas ir tikslus ŠLS ribų nustatymas bei nedidelių plotų vaizdinimas.

4. Raumeninės kilmės audinių (ŠLS ir MK) fluorescencijos gyvavimo trukmė bei santykinė sudėtis reikšmingai nesiskiria, tuo tarpu JA ir ŠLS tiek fluorescencijos gyvavimo trukmės (τ_1 ir τ_2), tiek santykinė komponentinė sudėtis (F1 - F3 komponentai) yra skirtinga. Šie komponentiniai skirtumai yra nulemti santykinai didesnio elastino kiekio ŠLS ir didesnio kolageno kiekio JA.
5. Dėl skirtingų šviesą atspindinčių komponentų bei jų išsidėstymo širdies audiniuose konfokaliniu atspindžio mikroskopu galima identifikuoti MK, JA, Purkinje ląsteles ir ŠLS pluoštus, todėl metodas yra tinkamas neinvaziniams širdies audinių tyrimams ir ŠLS vaizdinimui.
6. Operacijos metu užregistruoti spektriniai dėsniumai atitinka stebėtus *ex vivo* tyrimų metu, todėl ŠLS identifikavimo metodika, paremta fluorescencijos intensyvumų santykių skaičiavimu, yra tinkama širdies audinių tyrimams *in vivo*.

X. PUBLIKACIJOS

Straipsniai mokslinės informacijos instituto pagrindinių leidinių sąrašė (ISI)

1. J. Venius, S. Bagdonas, E. Zurauskas, R. Rotomskis. Visualization of human heart conduction system by means of fluorescence spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*. 16, 107001 (Oct 03, 2011).
2. J. Venius, S. Bagdonas, E. Zurauskas, R. Rotomskis. Time resolved fluorescence spectroscopy of the heart tissues. *Lithuanian Journal of Physics*. Vol. 51, No. 4, pp. 370–376 (2011).
3. J. Venius, E. Zurauskas, R. Rotomskis. High resolution imaging of the human cardiac conduction system using reflectance confocal microscopy. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*. *Priimtas spaudinti*.

Straipsniai kituose recenzuojamuose mokslo leidiniuose

1. J. Venius, S. Bagdonas, E. Žurauskas, R. Rotomskis. Optical biopsy using fluorescence spectroscopy. *Biomedical engineering; Proceedings of International Conference, Kaunas, Technologija, (2004)*, p.221-226.
2. J. Venius, E. Žurauskas, S. Bagdonas, E. Žurauskienė, R. Rotomskis. Optical visualization of the heart conduction system. *Acta Bio-Optica et Informatica Medica*. Vol.12, 6-9, 2005. 10.
3. V. Strazdaitė, J. Venius, E. Žurauskas, S. Bagdonas, R. Rotomskis. Žmogaus širdies audinių baltyminės sudėties tyrimai elektroforezės ir fluorescencinės spektroskopijos metodais. 9-osios Lietuvos jaunųjų mokslininkų konferencijos „Bioinžinerija ir Bioinformatika“ medžiaga. Vilnius: Technika, 2006. p.90-97.
4. J. Venius, D. Labeikytė, E. Žurauskas, V. Strazdaitė, S. Bagdonas, R. Rotomskis. Investigation of human heart tissue extracts by spectroscopic methods. *Biologija*. 2006. Nr. 3. P. 53–58.

5. J. Venius, R. Rotomskis. Analysis of different fluorescence excitation-emission systems for optical biopsy. Proceedings of the 4th international conference on medical physics. Kaunas, 2006. p.5-7.
6. J. Venius, R. Rotomskis. Non invasive diagnostic method for the detection of non superficial lesions. Proceedings of the 5th international conference on medical physics. Kaunas, 2007. p.15-18.

Vadovėlis aukštosioms mokykloms.

Rotomskis R., Streckytė G., Bagdonas S., Venius J. Optinės diagnostikos technologijos (optinė biopsija) Vilnius: VU leidykla, 2008, 252 p.

Patentas.

Laima PLĖŠNIENĖ-BLOZNELYTĖ, Aleksandras MORDAS, Jurgita LIUTKEVIČIŪTĖ-NAVICKIENĖ, Vytautas ČEPULIS, Konstantinas Povilas VALUCKAS, Valerijus OSTAPENKO, Laimutė RUTKOVSKIENĖ, Jonas VENIUS. Intraarterinė fotodinaminė diagnostika. (LT 5823 B).

Pranešimai mokslinėse konferencijose.

1. J. Venius, E. Žurauskas, S. Bagdonas, E.Žurauskienė, R. Rotomskis. „Optical visualization of the heart conduction system“. Pranešimas tarptautinėje konferencijoje „International symposium on new trends in photodynamic therapy and diagnosis“. Wroclaw, 2004 07 21-22.
2. J. Venius, S. Bagdonas, E. Žurauskas, R. Rotomskis. „Optical biopsy using fluorescence spectroscopy“. Pranešimas tarptautinėje konferencijoje „Biomedical Engineering“. Kaunas, 2004 10 28-29.
3. J. Venius, V. Karabanovas, R. Rotomskis. „Depth-resolved fluorescence measurements of quantum dots in scattering medium“. Pranešimas tarptautinėje konferencijoje „11th Congress of the European Society for Photobiology“. Aix-les-Bains, 2005 09 03-08.

4. V. Strazdaitė, J. Venius, E. Žurauskas, S. Bagdonas, R. Rotomskis. „Žmogaus širdies audinių baltyminės sudėties tyrimai elektroforezės ir fluorescencinės spektroskopijos metodais“. Pranešimo bendraautorius, skaityto 9-ojoje Lietuvos jaunųjų mokslininkų konferencijoje „Bioinžinerija ir Bioinformatika“. Vilnius, 04 06, 2006.
5. J. Venius “Heart tissue imaging by fluorescence spectroscopy”. Pranešimas tarptautinėje konferencijoje „Teaching Biophysics: Curricula, Methods, Problems”. Vilnius, birželio 8-10, 2006.
6. L. Jazukevičius, M. Burkanas, J. Venius. „The use of 5-ALA for the evaluation of skin cancer treatment results“. Pranešimo bendraautorius, skaityto 6-ajame Baltijos Šalių Dermatovenerologų Kongrese. Ryga, rugsėjo 14-16, 2006.
7. J. Venius, R. Rotomskis „Analysis of different fluorescence excitation-emission systems for optical biopsy. Pranešimas tarptautinėje konferencijoje „Medical physics in the Baltic states“. Kaunas, lapkričio 17-18, 2006.
8. J. Venius, R. Rotomskis „Neinvazinė fluorescencinė diagnostika iš gilesnių audinio sluoksnių“. Pranešimas Lietuvos nacionalinėje fizikos konferencijoje. Vilnius, birželio 11 – 13, 2007.
9. J. Venius, R. Rotomskis. „Instrumentation for selective fluorescence detection from deeper layers of the tissue“. Pranešimo bendraautorius, skaityto tarptautinėje konferencijoje „12th Congress of the European Society for Photobiology“. Bath, UK, 2007 09 01-06.
10. L. Jazukevičius, M. Burkanas, J. Venius. „5-ALA photodynamic treatment of actinic ceratosis“. Pranešimo bendraautorius, skaityto 7-ajame Baltijos Šalių Dermatovenerologų Kongrese. Ryga, rugsėjo 6-8, 2007.
11. J. Venius, R. Rotomskis „Non invasive diagnostic method for the detection of non superficial lesions“. Pranešimas tarptautinėje konferencijoje „Medical physics in the Baltic states“. Kaunas, spalio 5-6, 2007.

12. J. Venius „Giluminė diagnostika biomedicinoje“. Pranešimas konferencijoje „Biomedicininės fizikos ir nanofotonikos mokslo ir studijų centras“. Vilnius, balandžio 29d. 2008.
13. J. Venius „Depth resolved diagnostics in biomedicine“. Pranešimas tarptautinėje konferencijoje „Innovative methods and new technologies in Biomedicine“. Vilnius, gegužės 22-24, 2008.
14. J. Liutkevičiūtė – Navickienė, J. Venius „Fluorescence diagnostics of skin tumors using 5-aminolevulinic acid and its methyl ester“. Pranešimo bendraautorius, skaityto konferencijoje „5th Baltic Congress of Oncology“. Ryga, gegužės 14-15, 2010.
15. Jurgita Liutkeviciute Navickiene, Laima Bloznelyte-Plesniene, Jonas Venius, Aleksandras Mordas, Laimute Rutkovskiene „Fluorescence spectroscopy and photodynamic diagnostics of skin cancer“. Pranešimo bendraautorius skaityto konferencijoje „24th International Congress Laser Medicine“, Florencija, Rugpjūčio 5 – 6, 2010.
16. Mordas A, Bloznelyte-Plesniene L, Cepulis V, Venius J, Liutkeviciute-Navickiene J, Rutkovskiene L. Intra-arterial fluorescence diagnostics of oral cancer. The European Multidisciplinary Cancer Congress ECCO 16 ESMO 36 ESTRO 30, Stockholm, Sweden, 23-27 September 2011.
17. Liutkeviciute Navickiene J, Bloznelyte-Plesniene L, Mordas A, Rutkovskiene L, Venius J. Photodynamic diagnostics of skin and mucosal cancer in periorbital area. The European Multidisciplinary Cancer Congress ECCO 16 ESMO 36 ESTRO 30, Stockholm, Sweden, 23-27 September 2011.
18. I. Vaisnorienė, J. Didziapetriene, J. Venius, R. Rotomskis, K.P. Valuckas. „Atypia grading in nevi by reflectance confocal microscopy“. XXIst International Pigment Cell Conference. 21-24 Sept 2011, Bordeaux – France.
19. J. Venius, E. Zurauskas, R. Rotomskis. „The heart tissues differentiation by time resolved fluorescence spectroscopy“. Pranešimas tarptautinėje

konferencijoje „12th Conference on Methods and Applications of Fluorescence“, 11-14th September 2011 - Strasbourg FRANCE.

20. J. Venius, S. Bagdonas, E. Zurauskas, R. Rotomskis. „Širdies audinių tyrimai fluorescencinės spektroskopijos su laicine skyra metodu“. Pranešimas „Lietuvos nacionalinėje fizikos konferencijoje“, Vilnius, 2011.

XI. LITERATŪROS SĄRAŠAS.

1. Higienos institutas Sveikatos informacijos centras. Mirties priežastys 2011 metais. 2012, Vilnius.
2. World Health Organization. World health statistics 2012.
3. Lan YT, Lee JC, Wetzel G. Postoperative arrhythmia. *Curr Opin Cardiol.* 2003 Mar;18(2):73-8.
4. El-Khally Z, Thibault B, Staniloae C, Theroux P, Dubuc M, Roy D, Guerra P, Macle L, Talajic M. Prognostic significance of newly acquired bundle branch block after aortic valve replacement. *Am J Cardiol.* 2004 Oct 15;94(8):1008-11.
5. Huynh H, Dalloul G, Ghanbari H, Burke P, David M, Daccarett M, Machado C, David S. Permanent pacemaker implantation following aortic valve replacement: current prevalence and clinical predictors. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2009 Dec;32(12):1520-5.
6. Ferrari AD, Süssenbach CP, Guaragna JC, Piccoli Jda C, Gazzoni GF, Ferreira DK, Albuquerque LC, Goldani MA. Atrioventricular block in the postoperative period of heart valve surgery: incidence, risk factors and hospital evolution. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2011 Jul-Sep;26(3):364-72.
7. Boyett MR. 'And the beat goes on.' The cardiac conduction system: the wiring system of the heart. *Exp Physiol.* 2009 Oct;94(10):1035-49.
8. Kawashima T, Sasaki H. Gross anatomy of the human cardiac conduction system with comparative morphological and developmental implications for human application. *Ann Anat.* 2011 Feb 20;193(1):1-12.
9. Richards A.A., Garg V. Genetics of Congenital Heart Disease. *Curr Cardiol Rev.* 2010 May; 6(2): 91–97.
10. Pierpont M.E., Basson C.T., Benson D.W., Jr., Gelb B.D., Giglia T.M., Goldmuntz E., McGee G., Sable C.A., Srivastava D., Webb C.L. Genetic basis for congenital heart defects: current knowledge. *Circulation.* 2007. 115, p. 3015–3038.

11. Jongbloed MR, Mahtab EA, Blom NA, SchaliJ MJ, Gittenberger-de Groot AC. Development of the cardiac conduction system and the possible relation to predilection sites of arrhythmogenesis. *ScientificWorldJournal*. 2008 Mar 3;8:239-69.
12. Mikawa T., Hurtado R. Development of the cardiac conduction system. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Volume 18, Issue 1, February 2007, Pages 90-100.
13. De Ruiter M.C., Alkemade F.E., Gittenberger-de Groot A.C., Poelmann R.E., Havekes L.M., van Dijk K.W. Maternal transmission of risk for athero- sclerosis. *Current Opinion in Lipidology* (2008), 19, 333–337.
14. Barker, D.J., The origins of the developmental origins theory. *Journal of Internal Medicine* (2007). 261, 412–417.
15. Eriksson J.G., Kajantie E., Thornburg K.L., Osmond C., Barker D.J., Mother's body size and placental size predict coronary heart disease in men. *European Heart Journal* (2011). 32, 2297–2303.
16. Poelmann RE, Gittenberger-de Groot AC. Cardiac birth defects. *Differentiation*. 2012 Jul;84(1):1-3.
17. Anderson RH, Yanni J, Boyett MR, Chandler NJ, Dobrzynski H. The anatomy of the cardiac conduction system. *Clin Anat*. 2009 Jan;22(1):99-113.
18. Davies M.J. Pathology of conducting tissue of the heart. Butterworth&Co.(Publishers)Ltd. 1971. SBN390-25447-9
19. Christoffels V.M., Moorman A.F.M. Development of the Cardiac Conduction System Why Are Some Regions of the Heart More Arrhythmogenic Than Others? *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*. 2009; 2: 195-207.
20. Wang TD, Van Dam J. Optical biopsy: a new frontier in endoscopic detection and diagnosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2004 Sep;2(9):744-53.

21. Singh R, Chen Yi Mei SL, Tam W, Raju D, Ruszkiewicz A. Real-time histology with the endocytoscope. *World J Gastroenterol*. 2010 Oct 28;16(40):5016-9.
22. Newton RC, Kemp SV, Shah PL, Elson D, Darzi A, Shibuya K, Mulgrew S, Yang GZ. Progress toward optical biopsy: bringing the microscope to the patient. *Lung*. 2011 Apr;189(2):111-9.
23. Thekkek N, Richards-Kortum R. Optical imaging for cervical cancer detection: solutions for a continuing global problem. *Nat Rev Cancer*. 2008 Sep;8(9):725-31.
24. Alfano RR. Advances in optical biopsy for cancer diagnosis. *Technol Cancer Res Treat*. 2011 Apr;10(2):101.
25. Costas B. Review of biomedical optical imaging—a powerful, non-invasive, non-ionizing technology for improving in vivo diagnosis. *Measurement Science and Technology*, (2009). Volume 20, Issue 10, pp. 104020.
26. Johansson A., Kromer K., Sroka R., Stepp H. Clinical optical diagnostics: Status and perspectives. *Medical Laser Application*, 2008. Vol. 23, No. 4.
27. 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.
28. Nilsson A.M.K., Heinrich D., Olajos J., Andersson – Engels S. Near infrared diffuse reflection and laser – induced fluorescence spectroscopy for myocardial tissue characterisation. *Spectrochimica Acta*. 1997, Part A, 53.
29. Kochiadakis G. E., Chrysostomakis S. I., Kalebubas M. D., et.al. The Role of Laser-Induced Fluorescence In Myocardial Tissue Characterisation. *CHEST*. 2001, 120(1), p. 233-239.
30. Oeff M, Hug U, Stormer U, et al. Fluorescence spectroscopy for identification of the AV node prior to ablation. *Circulation* 1991;84,11-13.

31. Perk M, Flynn GJ, Gulamhusein S, Wen Y, Smith C, Bathgate B, Tulip J, Parfrey NA, Lucas A. Laser induced fluorescence identification of sinoatrial and atrioventricular nodal conduction tissue. *Pacing Clin Electrophysiol.* 1993 Aug;16(8):1701-12.
32. Bagdonas S, Zurauskas E, Streckyte G, Rotomskis R. Spectroscopic studies of the human heart conduction system ex vivo: implication for optical visualization. *J Photochem Photobiol B.* 2008 Aug 21;92(2):128-34.
33. Marcu L. Fluorescence lifetime techniques in medical applications. *Ann Biomed Eng.* 2012 Feb;40(2):304-31.
34. Meier JD, Xie H, Sun Y, Sun Y, Hatami N, Poirier B, Marcu L, Farwell DG. Time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy as a diagnostic instrument in head and neck carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010 Jun;142(6):838-44.
35. Marcu L. Fluorescence lifetime in cardiovascular diagnostics. *J Biomed Opt.* 2010 Jan-Feb;15(1):011106.
36. Jean – Michel I. Maarek, Laura Marcu, Michel C. Fishbein, Warren S. Grundfest, Time – Resolved Fluorescence of Human Aortic Wall: Use for improved Identification of Atherosclerotic Lesions, *Lasers in Surgery and Medicine.* 2000, 27, p. 241 – 254.
37. L. Marcu, W. S. Grundfest, and M. C. Fishbein, “Time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy for staging atherosclerotic lesions,” in *Fluorescence in Biomedicine*, M. A. Mycek and B. Pogue, Eds., (2003) pp. 397–430, Marcel Dekker, New York.
38. L. Marcu, Q. Y. Fang, J. A. Jo, T. Papaioannou, A. Dorafshar, T. Reil, J. H. Qiao, J. D. Baker, J. A. Freischlag, and M. C. Fishbein, “In vivo detection of macrophages in a rabbit atherosclerotic model by timeresolved laser-induced fluorescence spectroscopy,” *Arteriosclerosis* (2005) 181,2, 295–303.
39. L. Marcu, J. A. Jo, Q. Fang, T. Papaioannou, T. Reil, J. H. Qiao, J. D. Baker, J. A. Freischlag, and M. C. Fishbein, “Detection of ruptureprone

- atherosclerotic plaques by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy,” *Arteriosclerosis* (2009) 204,1, 156–164.
40. Gerger A, Koller S, Kern T, Massone C, Steiger K, Richtig E, Kerl H, Smolle J. Diagnostic Applicability of In Vivo Confocal Scanning Laser Microscopy in Melanocytic Skin Tumors. *J Invest Dermatol*. Mar 2005; 124(3):493-8.
 41. Gerger A, Koller S, Weger W, Richtig E, Kerl H, Samonigg H, Krippel P, Smolle J. Sensitivity and Specificity of Confocal Laser-Scanning Microscopy for In Vivo Diagnosis of Malignant Skin Tumors. *Cancer*. 2006 Jul 1;107(1):193-200.
 42. Gerger A, Hofmann-Wellenhof R, Samonigg H, Smolle J. In vivo confocal laser scanning microscopy in the diagnosis of melanocytic skin tumours. *Br J Dermatol*. 2009 Mar;160(3):475-81. Epub 2009 Jan 10.
 43. Psaty E, Halpern A. Current and emerging technologies in melanoma diagnosis: the state of the art. *Clin Dermatol*. 2009 Jan-Feb; 27(1):35-45.
 44. Marghoob A, Scope A. The complexity of Diagnosing Melanoma. *J Invest Dermatol* 2009 Jan; 129(1):11-3. DOI: 10.1038/jid.2008.388.
 45. Agero ALC, Benvenuto-Andrade C, Astner S, Patel Y, Rajadhyaksha M, González S. Confocal Microscopy of Skin Tumors. *Journal of Plastic Dermatology*. 2005; 1:2.
 46. Skippen PW, Sanatani S, Gow RM, Froese N. Diagnosis of postoperative arrhythmias following paediatric cardiac surgery. *Anaesth Intensive Care*. 2009 Sep;37(5):705-19.
 47. Hegyi J, Hegyi V, Ruzicka T, Arenberger P, Berking C. New developments in fluorescence diagnostics. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2011 May;9(5):368-72. doi: 10.1111/j.1610-0387.2011.07582.x.
 48. Rotomskis R., Streckytė G., Bagdonas S., Venius J. *Optinės diagnostikos technologijos (optinė biopsija)* Vilnius: VU leidykla, 2008, 252 p.
 49. P. Brazdžiūnas. *Bendroji fizika III d., Optika*. 1963. p. 259 – 268.
 50. Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я. *Физико химические основы фотобиологических процессов*. Москва, 1989.

51. Lakowicz J.R. Principles of fluorescence spectroscopy. 4th Printing., 2006, XXVI, 954 p.
52. Truong T.B. Charge Transfer to a Solvent State. Luminescence Studies of Tryptophan in Aqueous 4,5 M CaCl₂ Solutions at 300 and 77 K. J. Phys.Chem. 1980, 84, p. 960-964.
53. Brown JQ, Vishwanath K, Palmer GM, Ramanujam N. Advances in quantitative UV-visible spectroscopy for clinical and pre-clinical application in cancer. Curr Opin Biotechnol. 2009 Feb;20(1):119-31. Epub 2009 Mar 4.
54. Monici M. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. Biotechnol Annu Rev. 2005;11:227-56.
55. G.A. Wagnieres, W.M. Star, B.C. Wilson. In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. J. Photochem. Photobiol. 1998, 68, p. 630-632.
56. Mizeret J. Cancer detection by endoscopic frequency-domain fluorescence lifetime imaging (FD-FLIM). Thesis presented at the Swiss Federal Institute of Technology.
57. Zhu C, Palmer GM, Breslin TM, Harter J, Ramanujam N. Diagnosis of breast cancer using fluorescence and diffuse reflectance spectroscopy: a Monte-Carlo-model-based approach. J Biomed Opt. 2008 May-Jun;13(3):034015.
58. Van Dam J, Bjorkman DJ. Shedding some light on high-grade dysplasia. Gastroenterology. 1996, 111, p. 247-249.
59. Lohmann W., Mussmann J., Lohmann C., et al. Native fluorescence of the cervix uteri as a marker for dysplasia and invasive carcinoma. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 1989, 31, p. 249-253.
60. Lam S., Becker HD. Future diagnostic procedures. Thorac. Endosc. 1996, 6, p. 363-379.
61. Tyrrell J, Campbell S, Curnow A. Validation of a non-invasive fluorescence imaging system to monitor dermatological PDT. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2010 Jun;7(2):86-97. Epub 2010 Apr 24.

62. Leblond F, Davis SC, Valdés PA, Pogue BW. Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: Review of instruments, methods and applications. *J Photochem Photobiol B*. 2010 Jan 21;98(1):77-94. Epub 2009 Nov 26.
63. Bulgakova N., Ulijanov R., Vereschagin K., Sokolov V., Teplov A., Rusakov I., Chissov V. In vivo local fluorescence spectroscopy in PDD of superficial bladder cancer. *Medical Laser Application* 2009. Volume 24, Issue 4, Pages 247–255.
64. Allison R, Moghissi K, Downie G, Dixon K. Photodynamic therapy (PDT) for lung cancer. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2011. Volume 8, Issue 3 , Pages 231-239.
65. Mallia RJ, Subhash N, Sebastian P, Kumar R, Thomas SS, Mathews A, Madhavan J. In vivo temporal evolution of ALA-induced normalized fluorescence at different anatomical locations of oral cavity: application to improve cancer diagnostic contrast and potential. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2010 Sep;7(3):162-75.
66. Watanabe K, Hida N, Ajioka Y, Hori K, Kamata N, Sogawa M, Yamagami H, Tominaga K, Watanabe T, Fujiwara Y, Matsumoto T, Arakawa T. Photodynamic diagnosis of endoscopically invisible flat dysplasia in patients with ulcerative colitis by visualization using local 5-aminolevulinic acid-induced photosensitization. *Gastrointest Endosc*. 2010 May;71(6):1094-6. Epub 2010 Feb 20.
67. Bredell MG, Besic E, Maake C, Walt H. The application and challenges of clinical PD-PDT in the head and neck region: a short review. *J Photochem Photobiol B*. 2010 Dec 2;101(3):185-90. Epub 2010 Jul 16.
68. Allison R.R., Cuenca R., Downie G.H., Randall M.E., Bagnato V.S., Sibata C.H. PD/PDT for gynecological disease: A clinical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2005, Volume 2, Issue 1, Pages 51–63.
69. Löning M., Soergel P., Hillemanns P. Fluorescence diagnosis and photodynamic therapy in intra-abdominal gynecologic diseases and breast

- cancer – A review. *Medical Laser Application*, 2009, Volume 24, Issue 1, Pages 18–26.
70. Stylli SS, Kaye AH. Photodynamic therapy of cerebral glioma - a review. Part II - clinical studies. *J Clin Neurosci*. 09/2006; 13(7):709-17.
 71. Niyazi M, Siefert A, Schwarz SB, Ganswindt U, Kreth FW, Tonn JC, Belka C. Therapeutic options for recurrent malignant glioma. *Radiother Oncol*. 2011 Jan;98(1):1-14.
 72. van der Beek N, de Leeuw J, Demmendaal C, Bjerring P, Neumann HA. PpIX fluorescence combined with auto-fluorescence is more accurate than PpIX fluorescence alone in fluorescence detection of non-melanoma skin cancer: an intra-patient direct comparison study. *Lasers Surg Med*. 2012 Apr;44(4):271-6. doi: 10.1002/lsm.21134.
 73. Marcu L, Jo JA, Fang Q, Papaioannou T, Reil T, Qiao JH, Baker JD, Freischlag JA, Fishbein MC. Detection of rupture-prone atherosclerotic plaques by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy. *Atherosclerosis*. 2009 May;204(1):156-64.
 74. Yano, S., Hirohara, S., Obata, M., Hagiya, Y., Ogura, S.i., Ikeda, A., Kataoka, H., Tanaka, M., Joh, T. Current states and future views in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry & Photobiology, C: Photochemistry Reviews*, Volume 12, issue 1 (March, 2011), p. 46-67.
 75. Zuluaga A. F., Utzinger U., Durkin A., Fuchs H., Gillenwater A., Jacob R., Kemp B., Fan J., Richards-Kortum R. Fluorescence Excitation Emission Matrices of Human Tissue: A System for in Vivo Measurement and Method of Data Analysis. *Applied Spectroscopy*, (1999)Vol. 53, Issue 3, pp. 302-311.
 76. Mahadevan V. *Anatomy of the heart. Surgery (Oxford)*, Volume 30, Issue 1, January 2012, Pages 5-8 KARTU CITUOTI.
 77. Ellis H., *The anatomy of the heart. Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, Volume 13, Issue 8, August 2012, Pages 355-357.
 78. Christoffels VM, Smits GJ, Kispert A, Moorman AF. Development of the pacemaker tissues of the heart. *A. Circ Res*. 2010 Feb 5;106(2):240-54.

79. Jongbloed MR, Vicente Steijn R, Hahurij ND, Kelder TP, Schalijs MJ, Gittenberger-de Groot AC, Blom NA. Normal and abnormal development of the cardiac conduction system; implications for conduction and rhythm disorders in the child and adult. *Differentiation*. 2012 Jul;84(1):131-48.
80. Pennisi J., Rentschler S., Gourdie R.G., Fishman G.I., Mikawa T., Induction and patterning of the cardiac conduction system. *International Journal of Developmental Biology*. 2002. 46,765–775.
81. Gourdie, R.G., Harris, B.S., Bond, J., Justus, C., Hewett, K.W., O'Brien, T.X., Thompson, R.P., Sedmera, D. Development of the cardiac pacemaking and conduction system. *Birth Defects Research*. 2003. 69, 46–57.
82. Kaupp UB, Seifert R. Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu Rev Physiol* 2001;63:235–57.
83. Yasui K, Liu W, Opthof T, Kada K, Lee JK, Kamiya K, et al. I(f) current and spontaneous activity in mouse embryonic ventricular myocytes. *Circ Res* 2001;88:536–42.
84. Dobrzynski H, Boyett MR & Anderson RH. New insights into pacemaker activity: promoting understanding of sick sinus syndrome. *Circulation* (2007) 115, 1921–1932
85. Bakker ML, Moorman AF, Christoffels VM. The atrioventricular node: origin, development, and genetic program. *Trends Cardiovasc Med*. 2010 Jul;20(5):164-71.
86. Langman J., Woerdeman M.W. *Atlas of Medical Anatomy*, The Saunders Press, Philadelphia, 1982.
87. Silver M., Gotlieb A.I., Schoen F.R. *Cardiovascular Pathology*. Churchill Livingstone. 3 edition (May 25, 2001).
88. Boyden PA, Hirose M, Dun W. Cardiac Purkinje cells. *Heart Rhythm*. 2010 Jan;7(1):127-35. Epub 2009 Sep 16.

89. Dangman KH, Danilo Jr P, Hordof AJ, Mary-Rabine L, Reder RF, Rosen MR. Electrophysiologic characteristics of human ventricular and Purkinje fibers. *Circulation* 1982;65:362–8.
90. Gourdie RG, Wei Y, Kim D, Klatt SC, Mikawa T. Endothelin-induced conversion of embryonic heart muscle cells into impulse-conducting Purkinje fibers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6815–8.
91. Takebayashi-Suzuki K, Yanagisawa M, Gourdie RG, Kanzawa N, Mikawa T. In vivo induction of cardiac Purkinje fiber differentiation by coexpression of preproendothelin-1 and endothelin converting enzyme-1. *Development* 2000;127:3523–32.
92. Gros DB, Jongsma HJ. Connexins in mammalian heart function. *Bioessays* 1996;18:719–30.
93. Coppin SR, Severs NJ, Gourdie RG. Connexin45 (a 6) expression delineates an extended conduction system in the embryonic and mature rodent heart. *Dev Genet* 1999;24:82–90.
94. Gourdie RG, LoCW. Cx43 gap junctions in cardiac development and disease. In: Perrachia C, editor. *Current topics in membranes. Gap junctions*, vol. 49. Academic Press; 2000. p. 581–602.
95. Gourdie RG, Green CR, Severs NJ, Anderson RH, Thompson RP. Evidence for a distinct gap-junctional phenotype in ventricular conduction tissues of the developing and mature avian heart. *Circ Res* 1993;72:278–89.
96. Gourdie RG, Severs NJ, Green CR, Rothery S, Germroth P, Thompson RP. The spatial distribution and relative abundance of gap-junctional connexin40 and connexin43 correlate to functional properties of components of the cardiac atrioventricular conduction system. *J Cell Sci* 1993;105:985–91.
97. Saffitz JE, Davis LM, Darrow BJ, Kanter HL, Laing JG, Beyer EC. The molecular basis of anisotropy: role of gap junctions. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1995;6:498–510.

98. Jalife J, Morley GE, Vaidya D. Connexins and impulse propagation in the mouse heart. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1999;10:1649–63.
99. 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.
100. Mesbah K., Harrelson Z., Theveniau-Ruissy M., Papaioannou V.E., Kelly R.G., Tbx3 is required for outflow tract development. *Circulation Research*. 2008. 103, 743–750.
101. <http://apbrwww5.apsu.edu/thompsonj/Anatomy%20&%20Physiology/20/2020%20Exam%20Reviews/Exam%201/CH18%20Pericardial%20Cavity%20and%20Pathology.htm> (2012 m. spalio 24 d.)
102. Hooks A., Tomlinson K.A., Marsden S.G., LeGrice I.J. – Cardiac microstructure: implications for electrical propagation and defibrillation in the heart. – *Circulation Research*. – 2002, 23. 91(4), p. 331-343.
103. Culav EM, Clark CH, Merrilees MJ. Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy. *Phys Ther*. 1999 Mar;79(3):308-19.
104. Fomovsky GM, Thomopoulos S, Holmes JW. Contribution of extracellular matrix to the mechanical properties of the heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2010 Mar;48(3):490-6.
105. Weis SM, Emery JL, Becker KD, McBride DJ Jr, Omens JH, McCulloch AD. Myocardial mechanics and collagen structure in the osteogenesis imperfecta murine (oim). *Circ Res*. 2000 Oct 13;87(8):663-9.
106. Lazzarini PE, Capecchi PL, Guideri F, Acampa M, Galeazzi M, Laghi Pasini F. Connective tissue diseases and cardiac rhythm disorders: an overview. *Autoimmun Rev*. 2006 May;5(5):306-13.
107. Murata K, Motayama T, Kotake C. Collagen types in various layers of the human aorta and their changes with the atherosclerotic process. *Atherosclerosis*. 1986 Jun;60(3):251-62.
108. Polyakova V, Loeffler I, Hein S, Miyagawa S, Piotrowska I, Dammer S, Risteli J, Schaper J, Kostin S. Fibrosis in endstage human heart failure:

- severe changes in collagen metabolism and MMP/TIMP profiles. *Int J Cardiol.* 2011 Aug 18;151(1):18-33.
109. Cole W.G., Chan D., Hickey A.J., Wilcken D.E., Collagen composition of normal and myxomatous human mitral heart valves. *Biochem J.* 1984 April 15; 219(2): 451–460.
 110. McCormik R.J., Thomas D.P. – Collagen Crosslinking in the Heart: Relationship to Development and Function. – *Basic Appl. Myol.* – 1998, 8(2), p. 143-150.
 111. Purslow P. The structure and functional significance of variations in the connective tissue within muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology.* – 2002, Part A 133, p. 947-966.
 112. Bächinger H.P., Mizuno K., Vranka J.A., Boudko S.P. Collagen Formation and Structure. *Comprehensive Natural Products II — Chemistry and Biology.* Elsevier Science & Technology, (2010). Volume 5, Pages 469–530.
 113. Voet D., Voet G.J. – *Biochemistry (Secon Edition).* – New York, 1995. – p. 1361.
 114. Selton-Suty C, Juillièrè Y. Non-invasive investigations of the right heart: how and why? *Arch Cardiovasc Dis.* 2009 Mar;102(3):219-32.
 115. von Bary C, Dornia C, Eissnert C, Nedios S, Roser M, Hamer OW, Gerds-Li JH, Paetsch I, Jahnke C, Gebker R, Weber S, Fleck E, Kriatselis C. Predictive value of left atrial volume measured by non-invasive cardiac imaging in the treatment of paroxysmal atrial fibrillation. *J Interv Card Electrophysiol.* 2012 Aug;34(2):181-8.
 116. Rojas CA, Jaimes CE, El-Sherief AH, Medina HM, Chung JH, Ghoshhajra B, Abbara S. Cardiac CT of non-shunt pathology of the interatrial septum. *J Cardiovasc Comput Tomogr.* 2011 Mar-Apr;5(2):93-100.
 117. Ulrich M, Lange-Asschenfeldt S, González S. In vivo reflectance confocal microscopy for early diagnosis of nonmelanoma skin cancer. 2012. *Actas Dermosifiliogr.*

118. Ferrante G, Presbitero P, Whitbourn R, Barlis P. Current applications of optical coherence tomography for coronary intervention. 2012 Mar 8. *Int J Cardiol.*
119. Синев А.Ф., Крымский Л.Д. Хирургическая анатомия проводящей системы сердца. *Медицина. Москва.* 47:108. 1985.pr.8. P.107-108.
120. 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
121. Žurauskas E., Jasulaitis A. Anatomic study of the conduction system of the heart.// *Acta Medica Lituanica.* 1997.4. P.149-151.
122. Tusscher KH, Panfilov AV. Modelling of the ventricular conduction system. *Prog Biophys Mol Biol.* 2008 Jan-Apr;96(1-3):152-70.
123. Tawara S. *The Conduction System of the Mammalian Heart. An Anatomico-histological Study of the Atrioventricular Bundle and the Purkinje Fibers.* Imperial College Press, (2000).London.
124. Ansari A, Ho S.Y., Anderson R.H. Distribution of the Purkinje fibres in the sheep heart. *Anat Rec* (1999) 254, 92–97.
125. Schuessler RB, Boineau JP & Bromberg BI (1996). Origin of the sinus impulse. *J Cardiovasc Electrophysiol* 7, 263–274.
126. Ramanathan C, Ghanem RN, Jia P, Ryu K & Rudy Y. Noninvasive electrocardiographic imaging for cardiac electrophysiology and arrhythmia. *Nat Med* (2004)10,422–428.
127. Ramanathan C, Jia P, Ghanem R, Ryu K & Rudy Y. Activation and repolarization of the normal human heart under complete physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* (2006) 103, 6309–6314.
128. Yamamoto M, Dobrzynski H, Tellez J, Niwa R, Billeter R, Honjo H, Kodama I & Boyett MR. Extended atrial conduction system characterized by the expression of the HCN4 channel and connexin45. *Cardiovasc Res* (2006) 72, 271–281.
129. Fedorov VV, Hucker WJ, Dobrzynski H, Rosenshtraukh LV & Efimov IR. Postganglionic nerve stimulation induces temporal inhibition of

- excitability in the rabbit sinoatrial node. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2006) 291, H612–H623.
130. Li J, Greener ID, Inada S, Nikolski VP, Yamamoto M, Hancox JC, Zhang H, Billeter R, Efimov IR, Dobrzynski H & Boyett MR (2008). Computer three-dimensional reconstruction of the atrioventricular node. *Circ Res* 102, 975–985.
 131. Hoogaars WM, Tessari A, Moorman AF, de Boer PA, Hagoort J, Soufan AT, Campione M & Christoffels VM. The transcriptional repressor Tbx3 delineates the developing central conduction system of the heart. *Cardiovasc Res* (2004) 62, 489–499.
 132. Yanni J, Boyett MR, Anderson RH & Dobrzynski H. The extent of the specialized atrioventricular ring tissues. *Heart Rhythm* (2009) 6, 672–680.
 133. Kurosawa H & Becker AE. Dead-end tract of the conduction axis. *Int J Cardiol* (1985) 7, 13–20.
 134. Becker AE, Anderson RH, Durrer D & Wellens HJ. The anatomical substrates of Wolff-Parkinson-White syndrome. A clinicopathologic correlation in seven patients. *Circulation* (1978) 57, 870–879.
 135. Frey B, Kreiner G, Fritsch S, Veit F & Gossinger HD. Successful treatment of idiopathic left ventricular outflow tract tachycardia by catheter ablation or minimally invasive surgical cryoablation. *Pacing Clin Electrophysiol* (2000) 23, 870–876.
 136. Berger T, Fischer G, Pfeifer B, Modre R, Hanser F, Trieb T, Roithinger FX, Stuehlinger M, Pachinger O, Tilg B, Hintringer F. Single-beat noninvasive imaging of cardiac electrophysiology of ventricular pre-excitation. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Nov 21;48(10):2045-52.
 137. Konofagou EE, Provost J. Electromechanical wave imaging for noninvasive mapping of the 3D electrical activation sequence in canines and humans in vivo. *J Biomech*. 2012 Mar 15;45(5):856-64.
 138. Chandler NJ, Greener ID, Tellez JO, Inada S, Musa H, Molenaar P, DiFrancesco D, Baruscotti M, Longhi R, Anderson RH, Billeter R,

- Sharma V, Sigg DC, Boyett MR & Dobrzynski H. Molecular architecture of the human sinus node – insights into the function of the cardiac pacemaker. *Circulation* (2009) 119, 1562–1575.
139. Brioschi C, Micheloni S, Tellez JO, Pisoni G, Longhi R, Moroni P, Billeter R, Barbuti A, Dobrzynski H, Boyett MR, DiFrancesco D & Baruscotti M. Distribution of the pacemaker HCN4 channel mRNA and protein in the rabbit sinoatrial node. *J Mol Cell Cardiol* (2009) 47, 221–227.
140. Miquerol L, Beyer S, Kelly RG. Establishment of the mouse ventricular conduction system. *Cardiovasc Res.* 2011 Jul 15;91(2):232-42.
141. Miquerol L, Meysen S, Mangoni M, Bois P, van Rijen HV, Abran P, Jongsma H, Nargeot J, Gros D. Architectural and functional asymmetry of the His-Purkinje system of the murine heart. *Cardiovasc Res.* 2004 Jul 1;63(1):77-86.
142. Miquerol L, Moreno-Rascon N, Beyer S, Dupays L, Meilhac SM, Buckingham ME, Franco D, Kelly RG. Biphasic development of the mammalian ventricular conduction system. *Circ Res.* 2010 Jul 9;107(1):153-61.
143. Mesbah K., Harrelson Z., Theveniau-Ruissy M., Papaioannou V.E., Kelly R.G. Tbx3 is required for outflow tract development. *CirculationResearch* 103, 743–750. 2008
144. Stephenson RS, Boyett MR, Hart G, Nikolaidou T, Cai X, Corno AF, Alphonso N, Jeffery N, Jarvis JC. Contrast enhanced micro-computed tomography resolves the 3-dimensional morphology of the cardiac conduction system in mammalian hearts. *PLoS One.* 2012;7(4):e35299.
145. Lecker DN, Kumari S, Khan A Iodine binding capacity and iodine binding energy of glycogen. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* (1997) 35: 1409–1412.
146. Prochnau D, Kühnert H, Heyne JP, Figulla HR, Surber R. Cardiac magnetic resonance imaging as a tool to link cardiac conduction disease

- to myocarditis with minimal left ventricular impairment. *J Electrocardiol.* 2012 Mar;45(2):161-3.
147. Kalifa J, Klos M, Zlochiver S, Mironov S, Tanaka K, Ulahannan N, Yamazaki M, Jalife J, Berenfeld O. Endoscopic fluorescence mapping of the left atrium: a novel experimental approach for high resolution endocardial mapping in the intact heart. *Heart Rhythm.* 2007 Jul;4(7):916-24.
 148. M.-A. Mycek and B. W. Pogue, Eds., *Handbook of Biomedical Fluorescence*, Marcel Dekker, New York (2003).
 149. R. Cubeddu, D. Comelli, C. D'Andrea, P. Taroni, and G. Valentini, "Time-resolved fluorescence imaging in biology and medicine," *J. Phys. D* 35(9), R61–R76 (2002).
 150. Miles R. B., Lempert W. R., Forkey J. N., *Laser Rayleigh scattering.* *Meas. Sci. Technol.* 2001, 12, p. 33–51.
 151. Markolf H. Niemz, *Laser – tissue interactions.* Germany, 1996, p. 9-44.
 152. Jacques S.L., Alter C.A., Prahl S.A., Angular dependence of HeNe laser light scattering by human dermis. *Lasers Life Sci.* 1 1987, p. 303-309.
 153. Jenkins M, Wade RS, Cheng Y, Rollins AM, Efimov IR. Optical Coherence Tomography Imaging of the Purkinje Network. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2005 May;16(5):559-60.
 154. Ambrosi CM, Moazami N, Rollins AM, Efimov IR. Virtual histology of the human heart using optical coherence tomography. *J Biomed Opt.* 2009 Sep-Oct;14(5):054002.
 155. Eichert, S; Mohrle, M; Breuninger, H; Rocken, M; Garbe, C; Bauer, J. Diagnosis of cutaneous tumors with in vivo confocal laser scanning microscopy. 07.11.2009 , DOI: 10.1111/j.1610-0387.2010.07333.x
 156. González, S; Gilaberte-Calzada, Y. In vivo reflectance-mode confocal microscopy in clinical dermatology and cosmetology. *Journal of Cosmetic Science* 30 (1), 1–17, February 2008. doi:10.1111/j.1468-2494.2008.00406.x.

157. Braznan L, Landthaler M, Szeimies R. In Vivo Confocal Laser Microscopy in Dermatology. *Lasers in Medical Science*, June 2007; 22(2): 73-82.
158. Leeson DT, Meyers CL, Subramanyan K. In Vivo Confocal Fluorescence Imaging of Skin Surface Cellular Morphology: A Pilot Study of its Potential as a Clinical Tool in Skin Research. *Int J Cosmet Sci*. 2006; 28:9-20.
159. Rajadhyaksha M; Gonzalez S; Zavislan JM; Anderson, RR; Webb, RH. In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin II: Advances in instrumentation and comparison with histology. *J Invest Dermatol*. Sep 1999; 113(3):293-303.
160. 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
161. 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.
162. Bieliauskiene G., Bylaite M. Konfokalus skenuojamasis lazerinis mikroskopas nauja diagnostikos priemone dermatologijoje. *Medicinos teorija ir praktika* 2008 - T. 14 (Nr. 2), 184–191 p.
163. Venius J., Bagdonas S., Žurauskas E., Rotomskis R. Optical biopsy using fluorescence spectroscopy. *Biomedical engineering; Proceedings of International Conference, Kaunas, Technologija*, (2004), p.221-226.
164. G.A. Wagnieres, W.M. Star, B.C. Wilson. In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. *J. Photochem. Photobiol*. 1998, 68, p. 630-632.
165. J. Venius et al., Investigation of human heart tissue extracts by spectroscopic methods, *Biologija*; Issue 3, p.53-58, 2006.

166. 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.
167. H.J. Geissler and U. Mehlhorn. Cold crystalloid cardioplegia. Multimedia Manual of Cardiothoracic Surgery. doi:10.1510/mmcts.2004.001040
168. G. Filippidis, G. Zacharakis, G. E. Kochiadakis, S. I. Chrysostomakis, P. E. Vardas, C. Fotakis, and T. G. Papazoglou, „Ex Vivo Laser-Induced Fluorescence Measurements of Lamb and Human Heart Tissue“. Laser Physics, Vol. 13, No. 5, 2003, pp. 769–772.
169. A.M.K. Nilsson et al., Near infrared diffuse reflection and laser – induced fluorescence spectroscopy for myocardial tissue characterisation, Spectrochimica Acta, Part A, 53, p.1901-1912, 1997.
170. L. Marcu et al., Time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy for staging atherosclerotic lesions, in: M.A. Mycek, B.W. Pogue (Eds.), Handbook of Biomedical Fluorescence, Marcel Dekker Inc., New York, Basel, p.397–430, 2003.
171. Sara M. Weis, Jeffrey L. Emery, K. David Becker, Daniel J. McBride, Jr, Jeffrey H. Omens, Andrew D. McCulloch, „Myocardial Mechanics and Collagen Structure in the Osteogenesis Imperfecta Murine“. Circulation Research. 2000;87:663-669.
172. W G Cole, D Chan, A J Hickey, and D E Wilcken, „Collagen composition of normal and myxomatous human mitral heart valves“. Biochem J. 1984 April 15; 219(2): 451–460.
173. Korol RM, Canham PB, Liu L, Viswanathan K, Ferguson GG, Hammond RR, Finlay HM, Baker HV, Lopez C, Lucas AR. Detection of altered extracellular matrix in surface layers of unstable carotid plaque: an optical spectroscopy, birefringence and microarray genetic analysis. Photochem Photobiol. 2011 Sep-Oct;87(5):1164-72.
174. Forsgren S, Strehler E, Thornell LE. Differentiation of Purkinje fibres and ordinary ventricular and atrial myocytes in the bovine heart: an

- immuno- and enzyme histochemical study. *Histochem J.* 1982 Nov;14(6):929-42.
175. Beyer S, Kelly RG, Miquerol L. Inducible Cx40-Cre expression in the cardiac conduction system and arterial endothelial cells. *Genesis* 49:83-91(2011).
176. Frank H. Netter. *Atlas of Human Anatomy*. Saunders; 5 edition (May 3, 2010).
177. J. Venius, R. Rotomskis. Analysis of different fluorescence excitation-emission systems for optical biopsy. *Proceedings of the 4th international conference on medical physics*. Kaunas, 2006. p.5-7.
178. J. Venius, R. Rotomskis. Non invasive diagnostic method for the detection of non superficial lesions. *Proceedings of the 5th international conference on medical physics*. Kaunas, 2007. p.15-18.
179. J. Venius, S. Bagdonas, E. Zurauskas, R. Rotomskis. Visualization of human heart conduction system by means of fluorescence spectroscopy. *J. Biomed. Opt.* 16, 107001 (Oct 03, 2011).