

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gamtos mokslų fakultetas

Biochemijos ir biofizikos katedra

Neurobiologijos studijų programos magistrantas

Denisas DANKINAS

Magistrinis darbas

## **Sensorinių nervinių galūnėlių tyrimas pelės širdyje**

**Darbo vadovai**

**prof. D. H. Pauža**

**doc. A. Alaburda**

**Konsultantė**

**dokt. K. Rysevaitė**

**Vilnius, 2011**

# **Sensorinių nervinių galūnėlių tyrimas pelės širdyje**

Darbas atliktas LSMU Medicinos akademijoje Anatomijos katedroje

Denisas DANKINAS

Darbo vadovai:

Prof. D. H. PAUŽA

Doc. A. ALABURDA

## TURINYS

Santrumpos.....	4
ĮVADAS .....	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	7
1.1. Širdies sensorinių nervinių galūnėlių tipai.....	7
1.2. Sudėtingų neinkapsuliuotų galūnėlių morfologija ir paplitimas.....	9
1.3. Sudėtingų neinkapsuliuotų galūnėlių fiziologija ir funkcija.....	13
1.4. Tinklinių galūnėlių morfologija paplitimas.....	14
1.5. Tinklinių galūnėlių fiziologija ir funkcija.....	15
2. MEDŽIAGOS IR METODIKA.....	17
2.1. Medžiagos .....	17
2.2. Metodika.....	17
2.2.1. Širdies totalių preparatų paruošimas.....	17
2.2.2. Imunohistocheminių tyrimų metodai.....	18
2.2.3. Panaudota aparatūra ir kompiuterinės programos.....	19
2.2.4. Statistinis duomenų įvertinimas.....	21
3. REZULTATAI.....	22
3.1. Sudėtingų neinkapsuliuotų galūnėlių morfologija .....	22
3.2. Sudėtingų neinkapsuliuotų galūnėlių paplitimas.....	23
3.3. Sudėtingų neinkapsuliuotų galūnėlių skaičius.....	26
3.4. Sudėtingų neinkapsuliuotų galūnėlių plotai.....	27
3.5. Tinklinių galūnėlių morfologija ir paplitimas širdyje .....	30
4. REZULTATŲ APTARIMAS.....	31
IŠVADOS.....	34
SUMMARY.....	35
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	36
Padėka.....	42

## SANTRUMPOS

**PK** – plautinis kamienas

**Ao** – aorta

**DKV** – dešinioji kranialinė vena

**KV** – kranialinė vena

**KKV** – kairioji kranialinė vena

**KPV** – kairioji plautinė vena

**VPV** – vidurinioji plautinė vena

**DPV** – dešinioji plautinė vena

**KAu** – kairioji ausytė

**DAu** – dešinioji ausytė

**VKP** – ventralinis kairysis prieširdžio

**DDP** – dorsalinis dešinysis prieširdžio

**KK** – kairysis koronarinis

**KD** – kairysis dorsalinis

**DV** – dešinysis ventralinis

**PV** – plautinės venos

**PGP** – proteino geno produktas

**TH** – tirozino hidroksilazė

## IVADAS

Vidinė širdies nervų sistema vaidina svarbų vaidmenį širdies ritmo, miokardo laidumo ir susitraukimo jėgos reguliacijoje (Tsuboi et al., 2000; Randall et al., 2003; Olufsen et al., 2005; Cifelli et al., 2008).

Kadangi pelės širdies nervų sistemos principinė schema panaši į žmogaus (Feintuch et al., 2007), šis gyvūnas yra tinkamas modelis intrakardinės nervų sistemos tyrimams. Pastaruoju metu buvo atlikta nemažai pelės širdies nervų sistemos anatominių bei imunohistoheminių tyrimų. Jau iširti nervinių mazgų, adrenerginių, cholinerginių, peptiderginių nervinių skaidulų bei vidusieninių nervinių subrezginių pasiskirstymas, patikslinta bei detalizuota laidžiosios sistemos anatomija (Rysevaite et al., 2010, 2011). Taip pat buvo iširta sensorinių nervinių galūnelių morfologija aortos lanke (Li et al., 2010). Tačiau pelės širdies sensorinių nervinių galūnelių anatomija dar niekada nebuvo mokslinių tyrimų objektu.

Širdies sensorinės nervinės galūnelės siejamos su dviem pagrindinėmis funkcijomis. Vieno funkcinio tipo galūnelės reaguoja į spaudimą (baroreceptoriai), jų funkcija yra širdies tūrio palaikymas pastoviajame lygmenyje (Linden, 1973). Šių sensorinių nervinių galūnelių patologija siejama su tokiais sutrikimais, kaip kardiomiopatija ir širdies nepakankamumas (Linke ir Knöll, 2010).

Kito tipo galūnelės yra atsakingos už skausmo jutimą (nociceptoriai). Šių galūnelių funkcija ypatingai svarbi miokardo infarkto atvejais (Fu, 2009; Qin et al., 2009).

Pagal morfologinius požymius širdies sensorinės nervinės galūnelės yra klasifikuojamos į dvi kategorijas: tinklinės galūnelės, jos yra sudarytos iš pakartotinai besišakojančios plonų nemielinizuotų nervinių skaidulų (Miller ir Kasahara, 1964; Johnston, 1968) ir atlieka nociceptorių funkciją (Fu, 2009) ir pavienės krūmiškos sudėtingos neinkapsuliuotos galūnelės (Miller ir Kasahara, 1964; Johnston, 1968), kurios funkciškai, manoma, yra baroreceptoriai (Linden, 1973).

Kadangi pelės širdies sensorinių nervinių galūnelių morfologija dar nėra iširta, šio tyrimo tikslas buvo nustatyti pelės intrakardinių sensorinių nervinių galūnelių morfologiją bei pasiskirstymą.

**Darbo tikslas**

Panaudojant įvairius antikūnus, imunohistochemiškai išryškinti pelės širdies sensorines (juntamąsias) nervines galūnėles ir ištirti jų morfologiją bei paplitimą.

**Šiuo tikslu buvo iškelti uždaviniai:**

1. Identifikuoti širdies sensorines nervines galūnėles.
2. Ištirti galimybes jas vizualizuoti naudojant skirtingus antikūnus.
3. Nustatyti jų lokalizaciją stambių kraujagyslių bei intrakardinių nervinių subrezginių atžvilgiu.
4. Kiekybiškai įvertinti sensorines nervines galūnėles.

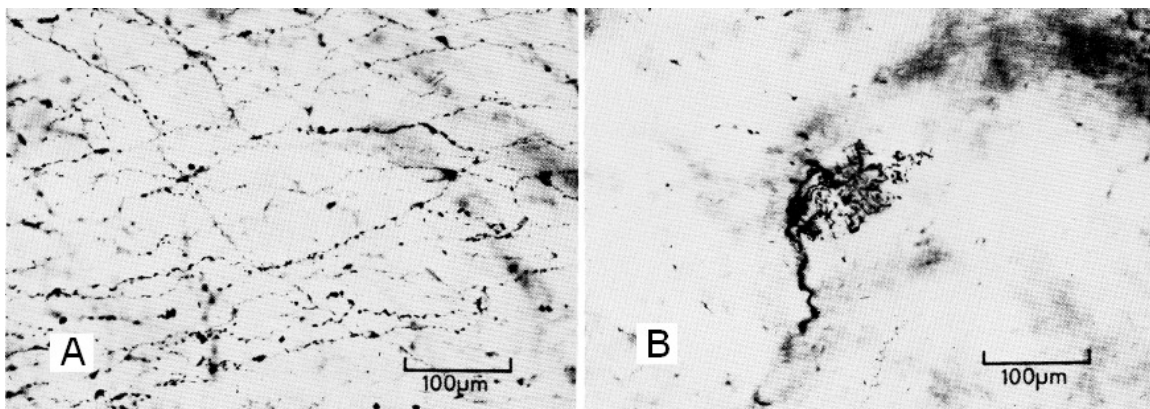
## 1. LITERATŪROS APŽVALGA

Pirmieji morfologiniai širdies sensorinių nervinių galūnėlių tyrimai pradėti dar XIX amžiaus pabaigoje, juos atliko H. J. Berkeley (1894) ir A. Smirnow (1895) (Nettleship, 1936; Выропаев, 1947; Malliani et al., 1986; Marron et al., 1995). Šių mokslininkų atradimai padarė pradžią tolimesniems šios srities morfologiniams tyrimams.

### 1.1 Širdies sensorinių nervinių galūnėlių tipai

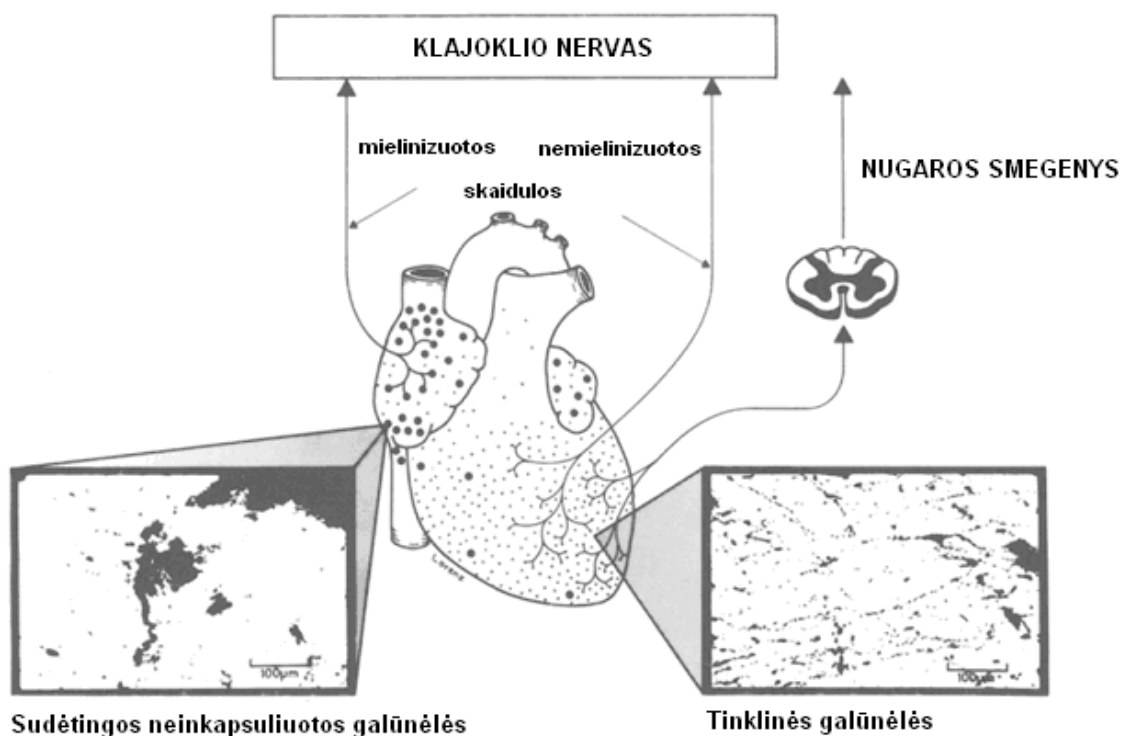
Šiuolaikiniame anatomijos moksle širdies sensorinės nervinės galūnėlės pagal morfologinius požymius klasifikuojamos į dvi kategorijas:

1. **Tinklinės galūnėlės** (*angl. end-nets*, 1.1A pav.), kurias sudaro pakartotinai besišakojančios ir besianastomozuojančios plonos nemielinizuotos nervinės skaidulos (Miller ir Kasahara, 1964; Johnston, 1968). Šio tipo galūnėlėmis pasibaigia nemielinizuotos C tipo skaidulos, kurios išeina iš klajoklio nervo ir turi mažesnę negu 2,5 m/s nervinio impulso plitimo greitį. Taipogi tinklinėmis galūnėlėmis pasibaigia įvairaus storio mielinizuotos ir nemielinizuotos simpatinės aferentinės skaidulos, prasidedančios nugaros smegenyse (1.2 pav.) (Shepherd, 1985). Tinklinės nervinės galūnėlės aptinkamos visuose trijuose širdies sienų sluoksniuose (endokarde, miokarde, epikarde) abiejuose prieširdžiuose bei kairiajame skilvelyje (Miller ir Kasahara, 1964; Hirsh, 1970 cit. pagal Shepherd, 1985; Marron et al., 1995).



**1.1 pav.** Širdies juntamosios nervinės galūnėlės. A. Tinklinės galūnėlės. B. Sudėtingos neinkapsuliuotos galūnėlės (modifikuota pagal Linden, 1973).

2. **Sudėtingos neinkapsuliuotos galūnėlės** (*angl. complex unencapsulated endings*, 1.1B pav.) – tai pavienės krūmiškai išsišakojančios galūnėlės (Miller ir Kasahara, 1964; Johnston, 1968). Storos mielinizuotos skaidulos, pasibaigiančios šiomis galūnėlėmis, turi nervinio impulso plitimo greitį nuo 8 m/s iki 32 m/s ir išeina tik iš klajoklio nervo (1.2 pav.) (Shepherd, 1985). Šio tipo sensorinės galūnėlės dar yra vadinamos gėlių puokštėmis (*angl. flower sprays*) dėl savo būdingos formos (Cheng et al., 1997). Sudėtingos neinkapsuliuotos galūnėlės lokalizuojasi endokarde, miokarde ir epikarde abiejų prieširdžių ausytėse bei tuščiųjų ir plautinių venų susijungimo su širdimi srityse (Лаврентьев, 1947; Marron et al., 1995). Sudėtingos neinkapsuliuotos širdies galūnėlės morfologiniu ir funkciniu požymiais yra homologiškos tempimo mechanoreceptoriams kituose kūno organuose (Miller ir Kasahara, 1964).



1.2 pav. Širdies sensorinių nervinių galūnėlių inervacijos schema (modifikuota pagal Shepherd, 1985).



## 1.2. Sudėtingų neinkapsuliuotų galūnelių morfologija ir paplitimas

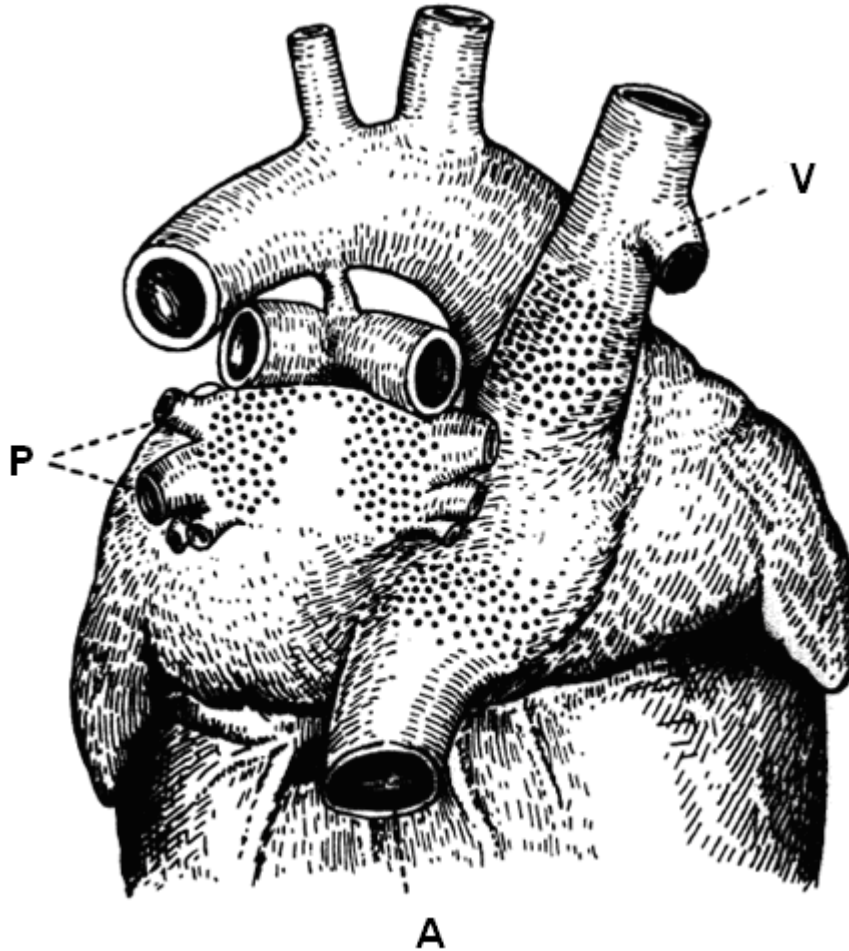
1894 m. H. J. Berkeley pirmasis aprašė nervines skaidulas, turinčias pabrinkimo formas galūnelės, stuburinių širdyse. Jis iškėlė hipotezę, kad šios skaidulos yra sensorinės (Berkeley, 1894 cit pagal Nettleship, 1936). Metais vėliau A. Smirnow naudodamasis impregnacijos sidabru ir žymėjimo metileno mėliu metodais, ištyręs varliagyvių ir žinduolių endokardą ir miokardą, aprašė įvairaus dydžio ir sudėtingumo krūmiškas galūnelės, ateinančias iš klajoklio nervo storų mielinizuotų skaidulų. Šios storos skaidulos iš epikardinio sluoksnio kartais praveria visą širdies sieną ir toliau pasiskirsto endokarde ir miokardo jungiamajame audinyje tarp širdies skersaruožių raumeninių skaidulų, kur ir pasibaigia minėtomis krūmo pavidalo nervinėmis galūnelėmis (Smirnow, 1895 cit. pagal Выропаев, 1947). Perpjaudamas klajoklio nervo aferentines skaidulas ir stebėdamas po šios operacijos nervinių galūnelių degeneraciją A. Smirnow pirmasis įrodė, kad šios nervinės galūnelės tikrai priklauso sensoriniam galūnelių tipui (Smirnow, 1895 cit. pagal Плечкова, 1947).

Vėliau šių sensorinių nervinių galūnelių lokalizacija buvo patvirtinta kelių kitų tyrėjų darbuose. Vieni mokslininkai patvirtino A. Smirnow duomenis, kad sudėtingos neinkapsuliuotos juntamosios galūnelės lokalizuojasi endokarde (Dogiel 1898, cit. pagal Выропаев, 1947; Woollard, 1926; Nettleship, 1936; Лаврентьев, 1947). Kiti tyrėjai parodė šių sensorinių nervinių galūnelių lokalizaciją širdies miokarde (Лаврентьев, 1947; Плечкова, 1947). 1898 m. panaudojus tuos pačius impregnacijos sidabru ir žymėjimo metileno mėliu metodus A. Dogiel aprašė analogines medžio pavidalo išsišakojančias ribotame plote nervines galūnelės ne tik endokarde, bet ir epikarde. Be to, jis patvirtino, kad šiomis galūnelėmis pasibaigia klajoklio nervo mielinizuotos skaidulos (Dogiel 1898, cit. pagal Выропаев, 1947). 1926 m. H. H. Woollard, ištyręs triušų bei šunų širdžių inervaciją, patvirtino A. Dogiel duomenis, kad pavienės krūmiškos nervinės galūnelės lokalizuojasi epikarde ir endokarde (Woollard, 1926).

Be to, A. Dogiel, o vėliau ir S. Michailow iškėlė hipotezę, kad šios sensorinės nervinės galūnelės gali turėti jungiamojo audinio kapsulę (Dogiel 1898 cit. pagal Выропаев, 1947; Michailow 1908 cit. pagal Nettleship, 1936). Tačiau vėlesni duomenys paneigė šią hipotezę, kas ir atsispindi sudėtingų neinkapsuliuotų sensorinių nervinių galūnelių pavadinime (Nettleship, 1936).

Nežiūrint į pateiktų tyrėjų duomenis ne visi mokslininkai sutiko, kad širdyje egzistuoja pavienės sensorinės galūnėlės, užimančios apibrėžtą plotą. H. A. Meytling manymu, visceralinėje nervinėje sistemoje egzistuoja tik tinklinės galūnėlės, o aptiktos pavienės galūnėlės yra artefaktas, atsiradęs dėl audinių fiksavimo formaline. Kita jo nuomonė buvo, kad tai, ką kiti tyrėjai traktuoja kaip nervines galūnėles, iš tikrųjų yra jungiamojo audinio dariniai (Meytling, 1953). Panašią nuomonę turėjo ir kitas visceralinės nervų sistemos tyrėjas G. A. G. Mitchell (Mitchell, 1953 cit. pagal Holmes, 1957). Tačiau vėlesni tyrėjų duomenys paneigė šias hipotezes ir galutinai patvirtino pavienių sudėtingų neinkapsuliuotų nervinių galūnelių egzistavimą.

Vėliau nemažai mokslininkų patikslino, kad sudėtingos neinkapsuliuotos jutiminės galūnėlės lokalizuojasi ne visame prieširdyje. 1936 m. W. A. Nettleship vienas pirmųjų konkretizavo, kad šio tipo galūnėlės žinduolių širdyje lokalizuojasi stambiujų kraujagyslių susijungimo su prieširdžiais srityse (Nettleship, 1936), o metais vėliau analogiškus rezultatus paskelbė J. F. Nonidez, ištyręs kačių prieširdžių receptorius (1.3 pav.) (Nonidez, 1937 cit. Pagal Linden, 1973). 1957 m. R. L. Holmes, tirdamas šunų endokardą, patvirtino 1956 m., kad dešiniajame prieširdyje sudėtingos neinkapsuliuotos galūnėlės aptinkamos tuščiųjų, o kairiajame prieširdyje – plautinių venų pamatų srityse. Šio mokslininko tyrimai rodo, kad dešiniajame prieširdyje šių juntamųjų galūnelių kiekis yra mažesnis negu pusė, tuo tarpu kai kairiajame jis atitinkamai didesnis (Holmes, 1957). Identišką kiekybinį sudėtingų neinkapsuliuotų galūnelių pasiskirstymą šalia tuščiųjų ir plautinių venų pamatų skirtinguose prieširdžiuose tais pačias metais aptiko ir J. C. G. Coleridge su bendraautorais (Coleridge et al., 1957), po to tai 1964 m. patvirtino H. M. Coleridge su savo kolegomis (Coleridge et al., 1964).



**1.3 pav.** Sudėtingų neinkapsuliuotų galūnelių lokalizacija plautinių venų pamatų srityje (P) kairiajame prieširdyje ir viršutinės (V) bei apatinės (A) tuščiųjų venų pamatų srityje kačių dešiniajame prieširdyje (modifikuota pagal Nonidez, 1937 cit. pagal Linden, 1973).

1964 m. M. R. Miller ir M. Kasahara, tyrinėdami įvairių žinduolių (avių, kačių, šunų ir beždžionių) širdies sensorinių galūnelių paplitimą, taip pat kaip ir W. A. Nettleship, J. F. Nonidez, R. L. Holmes bei kiti tyrėjai, nustatė, kad sudėtingos neinkapsuliuotos nervinės galūnelės gausiausiai lokalizuojasi prieširdžių endokarde ir epikarde stambių kraujagyslių angų zonose. Tačiau papildomai šie tyrėjai nustatė, kad skilvelių epikarde ir endokarde sudėtingų neinkapsuliuotų nervinių galūnelių nėra (Miller ir Kasahara, 1964). Taip pat Miller ir Kasahara teigė, kad savo tyrimuose visai neaptiko jokių sensorinių nervinių galūnelių širdies miokarde. Tačiau kitų autorių tyrimai, kurie buvo atlikti kaip ir prieš (Smirnow, 1895 cit. pagal Выропаев, 1947; Лаврентьев, 1947; Плечкова, 1947), taip ir po Miller ir Kasahara eksperimentų (Cheng, 1997), parodo, kad šių tyrėjų duomenys buvo klaidingi. Šį faktą galima būtų aiškinti Z. Cheng

žodžiais, kad tyrėjai nepastebi sensorinių nervinių galūnelių miokarde dėl išankstinio nusistatymo, kad visos galūnelės šiame sluoksnyje bus motorinės. Taip autorius aiškina ir mažą duomenų kiekį apie jutimines širdies miokardo galūnelės (Cheng, 1997).

Atlikdamas žmogaus endokardo morfologinius tyrimus analogiškus rezultatus gavo ir B. D. Johnston 1968 m. Jo tyrimai parodė, kad gausiausia abiejų tipų nervinių galūnelių aferentinė inervacija yra žmogaus endokarde tuščių ir plautinių venų susijungimo su prieširdžiais srityje. B. D. Johnston, taip pat kaip ir M. R. Miller su M. Kasahara, žmogaus endokardo skilveliuose sudėtingų neinkapsuliuotų nervinių galūnelių neaptiko (Johnston, 1968). Vėliau, 1997 m., Z. Cheng et al. naudodami tobulesnes fluorescencinio žymėjimo metodikas ir tyrinėdami žinduolių prieširdžius patvirtino ankstesnius kitų autorių duomenis dėl sudėtingų neinkapsuliuotų nervinių galūnelių gausiausio lokalizavimosi prieširdžių stambių kraujagyslių angų srityse (Cheng et al., 1997). Tačiau minėti autoriai vietoj sudėtingų neinkapsuliuotų galūnelių sąvokos vartojo dar 1969 m. A. Abraham, tyrusio šias galūnelės žinduolių endokarde, pasiūlytą ekvivalentišką gėlių puokščių (ang. *flower-sprays*) terminą (Abraham, 1969 cit. pagal Li, 2010; Cheng et al., 1997).

Išskyrus venų žiočių egzistuoja dar viena prieširdžių sritis, kurioje buvo aptiktos sudėtingos neinkapsuliuotos jutiminės galūnelės – tai širdies ausytės. Vienas pirmųjų šią vietą aprašė H. H. Woollard, nustatęs, kad šios nervinės galūnelės yra šunų kairiojo prieširdžio ausytėje epikarde ir endokarde (Woollard, 1926). Vėliau keletas širdies anatomijos tyrėjų pranešė savo rezultatuose, kad šioje srityje sudėtingų neinkapsuliuotų galūnelių neaptikta (Holmes 1957, Miller ir Kasahara, 1964; Johnston, 1968). Tačiau tolimesni mokslininkų, panaudojusių ir senesnius impregnacijos sidabru bei žymėjimo metileno mėliu, ir naujus imunohistocheminius vizualizavimo metodus, tyrimai galutinai parodė, kad sudėtingos neinkapsuliuotos galūnelės lokalizuojasi prieširdžių ausytėse (Floyd et al., 1972 cit. pagal Linden, 1973; Marron et al., 1995).

Vienas iš naujausių detalesnių sudėtingų neinkapsuliuotų nervinių galūnelių aprašymų buvo atliktas 1995 m. K. Marron et al. Naudodami imunohistochemines metodikas ir tirdami žmogaus endokardą bei epikardą jie patikslino, kad sudėtingos neinkapsuliuotos galūnelės abiejuose širdies sienų sluoksniuose dažniau pasitaiko kairiajame negu dešiniajame prieširdyje (Marron et al., 1995).

### 1.3. Sudėtingų neinkapsuliuotų galūnelių fiziologija ir funkcija

Tyrinėdamas prieširdžių receptorių funkcijas 1915 m. F. A. Bainbridge nustatė, kad didelio tūrio kraujo ar druskos tirpalo injekcija sukelia šunų širdies susitraukimų dažnio padidėjimą (tachikardiją), kuris išnykdavo po klajoklio nervo perskyrimo. Šio mokslininko nuomone, tokio reiškinio priežastis buvo padidėjęs spaudimas dešiniame prieširdyje (Bainbridge, 1915). Vėliau šis atsakas buvo pavadintas Bainbridge refleksu (Linden, 1973).

Nežiūrint į tai, kad kai kurių mokslininkų tyrimai patvirtino F. A. Bainbridge eksperimento rezultatus (Sassa ir Miyazaki, 1920; Anrep ir Segall, 1926), atsirado duomenų, nesutampančių su F. A. Bainbridge tyrimų rezultatais. 1925 m. A. C. DeGraff ir J. Sands patvirtino tachikardijos efektą tik pusėje tyrimų su gyvūnų atveju, tuo metu, kai likusiems gyvūnams druskos tirpalo injekcija nesukėlė jokios reakcijos (DeGraff ir Sands, 1925 cit. pagal Ballin ir Katz, 1941). Kiti mokslininkai netgi buvo aptikę priešingą reakciją – širdies susitraukimų dažnio sulėtėjimą (bradikardiją) (Aviado et al., 1951). Dėl šios priežasties kai kurie tyrėjai net siūlė atsisakyti Bainbridge reflekso sąvokos (Furnival et al., 1971; Kappagoda et al., 1972).

Vėlesniuose tyrimuose 1973 m. vėl buvo patvirtinta Bainbridge reflekso hipotezė pateikiant rezultatus, rodančius kad receptorių, lokalizuotų stambių kraujagyslių susijungimo su prieširdžiais vietoje, dirginimas sukelia tachikardiją, ir buvo nustatyta, kad šio atsako aferentiniai takai siejami su klajoklio nervu, o eferentiniai – tik su simpatinėmis skaidulomis (Linden, 1973).

Įvertinus tai, kad intraveninė kraujo injekcija daugeliu atvejų sukelia tachikardiją, tačiau kartais sukelia ir bradikardiją, vėliau buvo padaryta išvada, jog Bainbridge refleksas yra ginčytinas reiškinys (Hakumai, 1987). Svarbu paminėti, kad nors šis refleksas ir diskutuotinas, bet pati sąvoka išliko ir vartojama šiuolaikiniuose moksliniuose straipsniuose (Ichinose, 2010; Linke ir Knöll, 2010).

Prieširdžių sudėtingas neinkapsuliuotas nervines galūnelės buvo bandoma klasifikuoti pagal fiziologinius požymius atsižvelgiant į receptorių iškrovos paternus. 1948 m. D. Whitteridge aprašė klajoklio nervo impulsų seką ir nurodė, kad šitie impulsai prasideda prieširdžių ir stambių venų jungčių receptoriuose (Whitteridge, 1948). 1953 m. eksperimentuodamas su katėmis D. Whitteridge laboratorijoje A. S. Paintal patvirtino juntamųjų galūnelių lokalizavimo vietą. Jis aprašė du pagrindinius receptorių tipus – A ir B, kurių iškrovos atitinkamai sutampa laike su A ir

V tipo prieširdžių pulsiniemis bangomis (Paintal, 1953). Po dešimt metų tas pats mokslininkas atrado ir trečią – tarpinį tipą. Šio retai pasitaikančio tipo iškrovos kartu sutampa ir su A, ir V prieširdžių pulsiniemis bangomis (Paintal (1973). Ši autoriaus nuomonė buvo pagrįsta prielaida, kad bet kokio tipo receptoriaus iškrovos paternai negali reikšmingai pasikeisti, ir kad du pagrindiniai tipai A ir B atlieka skirtingas fiziologines funkcijas (Paintal, 1973). Tačiau vėlesnių tyrėjų rezultatai parodė, kad ši A. S. Paintal prielaida yra neteisinga ir kad visi prieširdžių receptoriai gali atsakyti skirtingais iškrovos paternais. Dėl šios priežasties reikia kalbėti ne apie skirtingus, bet apie vieną pagrindinį prieširdžių receptorių tipą (Kappagoda et al., 1976).

Norėdami išsiaiškinti, kokią funkciją atlieka sudėtingos neinkapsuliuotos galūnėlės širdies veikloje, R. J. Linden et al. iškėlė hipotezę, kad šitie prieširdžių receptoriai atsako už širdies tūrio palaikymą siaurose ribose. Padidėjus kraujo prietakai, pavyzdžiui, taip įvyksta skilvelių sistolės metu, receptoriai yra sudirginami, kas sukelia širdies susitraukimų dažnio padažnėjimą ir širdies tūris vėl sumažėja (Linden et al., 1973).

#### **1.4. Tinklinių galūnėlių morfologija ir paplitimas**

1895 m. A. Smirnow tyrinėdamas žinduolių prieširdžių ir skilvelių endokardą aprašė tinklą, sudarytą iš plonų skaidulų kilpų ir anastomozų, kuri jį pavadino plačiakilpiu rezginiu. Šios plonos terminalinės skaidulos ateina iš mielinizuotų ir nemielinizuotų stambesnių nervinių skaidulų (Smirnow 1895 cit. pagal Лаврентьев 1947; Smirnow 1895 cit. pagal Nettleship, 1936). Analogišką nervinių galūnėlių tinklą 1912 m. aprašė A. Morison ir 1926 m. H. H. Woollard, ištyrę triušių ir šunų širdžių epikardą bei endokardą (Morison, 1912 cit. pagal Woollard, 1926; Woollard, 1926).

Perskyręs klajoklį nervą, A. Smirnow nustatė, kad po šios operacijos įvyksta sudėtingų neinkapsuliuotų galūnėlių degeneracija, tuo metu, kai tinklinio tipo nervinės galūnėlės išlieka. Taip jis parodė, kad tinklinės juntamosios galūnėlės ateina ne tik iš klajoklio nervo (Smirnow, 1895 cit. pagal Holmes, 1957). Tačiau 1926 m. tirdamas simpatinę sensorinę inervaciją H. H. Woolard priėjo prie išvados, kad didžioji dalis širdies nervinių galūnėlių išeina būtent iš klajoklio nervo, nes eksperimentuose abipusis nugarinio mazgo pašalinimas žymiai nepakeitė to, kas, jo manymu, yra normali širdies sensorinės sistemos veikla (Woolard, 1926).

1936 m. W. A. Nettleship, skirtingai nuo H. H. Woolard, savo išvadose pateikė rezultatus, rodančius didelės sensorinių galūnėlių dalies atėjimą iš simpatinių skaidulų. Savo tyrimais jis patvirtino A. Smirnow duomenis, kad po vagotomijos tinklinės nervinės galūnėlės nedegeneruoja ir parodė, kad nugarinio mazgo pašalinimas sukelia tinklinių nervinių galūnėlių degeneraciją skilvelių endokarde (Nettleship, 1936). Svarbu, kad gausios simpatinės sensorinės širdies inervacijos egzistavimą taip pat rodo vėlesnių mokslininkų tyrimai, pavyzdžiui, 1963 m. A. Khabarova rašė, kad simpatinės jutiminės galūnėlės pasiskirsto šalia sensorinių nervinių galūnėlių atėjusių iš klajoklio nervo (Khabarova, 1963 cit. pagal Malliani et al., 1986).

1957 m. Holmes tirdamas šunų endokardą pakankamai smulkiai aprašė tinklinių galūnėlių paplitimą. Pagal jo duomenis, šio tipo juntamosios galūnėlės turi žymiai platesni pasiskirstymą negu sudėtingos neinkapsuliotos galūnėlės. Tinklinės galūnėlės buvo aptiktos visame prieširdžių endokarde ir plėtėsi į skilvelius. Šių sensorinių nervinių galūnėlių paplitimas varijavo skirtinguose preparatuose (Holmes, 1957).

Kaip jau buvo minėta anksčiau, 1964 m. M. R. Miller ir M. Kasahara ištyrė skirtingų žinduolių širdis, o ketveriais metais vėliau B. D. Johnston išnagrinėjo žmogaus širdies endokardą. Šių tyrėjų duomenys rodo, kad tinklinės nervinės galūnėlės yra paplitusios prieširdžių bei skilvelių sienų endokarde ir epikarde (Miller ir Kasahara, 1964; Johnston, 1968).

Skirtingi tyrėjai vėliau patikslino šiuos rezultatus, kad miokarde ir epikarde tinklinės nervinės galūnėlės yra labiau paplitusios būtent kairiajame skilvelyje (Muers ir Sleight, 1972ab; Oberg ir Thoren, 1972ab). O Marron et al. panaudoję modernesnes imunohistochemines metodikas teigė, kad dešiniajame skilvelyje nei endokarde, nei epikarde jokių juntamųjų nervinių galūnėlių neaptiko. Jų duomenimis, tinklinės nervinės galūnėlės lokalizuojasi epikarde ir endokarde abiejuose prieširdžiuose ir tik kairiajame skilvelyje (Marron et al., 1995).

## **1.5. Tinklinių galūnėlių fiziologija ir funkcija**

Istoriškai skilvelių tinklinės galūnėlės buvo pirmosios nervinės galūnėlės, aptiktos širdyje, ir tai įvyko anksčiau negu jos buvo aprašytos morfologiškai. A. Von Bezold ir L. Hirt 1867 m. pasiūlė hipotezę, kad širdyje egzistuoja receptoriai, darantys įtaką kraujo cirkuliacijos sistemai. Prie šių išvadų mokslininkai priėjo po to, kai jie ištyrė širdies susitraukimų dažnio sulėtėjimo

(bradikardijos) ir kraujo spaudimo sumažėjimo (hipotenzijos) efektą, sukeltą veratrum alkaloidų injekcijos į širdį, ir šio efekto išnykimą po abipusės vagotomijos (Von Bezold ir L. Hirt, 1867 cit. pagal Marron et al., 1995). Po to, kai A. Jarisch su bendraautoriais keletą kartų patvirtino šiuos rezultatus, šis reiškinys gavo Bezold-Jarisch reflekso pavadinimą (Jarisch, 1937 cit. pagal Linden, 1973; Marron et al., 1995). Vėliau G. S. Dawes lokalizavo receptorių, atsakingus už šį refleksą, kairiajame skilvelyje ir pasiūlė atsaką vadinti vainikiniu chemorefleksu (Dawes, 1954).

Pagal savo funkciją širdies chemoreceptoriai atsakingi už skausmo jutimą (nocicepciją) ir jie yra aktyvuojami miokardo išemijos (infarkto) metu. Šio sutrikimo metu širdyje vyksta trombocitų aktyvacija, kas sukelia daugelių mediatorių atpalaidavimą, vienas iš kurių yra bradikininas, suaktyvuoja širdies simpatinius sensorinius neuronus ir sukeliančių krūtinės skausmą. Manoma, kad bradikininas vaidina pagrindinį vaidmenį širdies skausmo jutimų procesuose, nors ir kitos medžiagos, išsiskiriančios išemijos metu, gali turėti įvairios įtakos širdies nocicepcijai. (Fu, 2009; Qin et al., 2009). Prie kitų mediatorių, sukeliančių širdies chemoreceptorių aktyvavimą miokardo išemijos metu, priskiriami serotoninas, histaminas, tromboksanas A<sub>2</sub> ir pieno rūgšties protonai (Fu, 2009).



## 2. MEDŽIAGOS IR METODIKA

### 2.1 Medžiagos

Juntamųjų nervinių galūnėlių tyrimui buvo panaudoti abiejų lyčių 11 suaugusių (6-12 mėnesių amžiaus) C57BL/6J linijos pelių širdies totalūs (angl. whole mount) preparatai, kuriuos sudarė iš pelės širdies iškirptas jos pagrindas su visų didžiųjų venų, plautinio kamieno ir aortos pamatinėmis dalimis. Pelės buvo gautos iš Lietuvos Sveikatos Mokslų Universiteto Veterinarijos Akademijos. Gyvūnai buvo giliai anestezuojami eterio pagalba ir eutanazuojami kaklinių slankstelių dislokacijos metodu atitinkamai su vietiniais ir valstybės laboratorinių gyvūnų panaudojimo nurodymais (Leidimo No. 0133).

Sensorinės nervinės galūnėlės buvo identifikuotos imunohistochemiškai, panaudojant antikūnus prieš tirozino hidroksilazę (TH, Chemijon, JAV) ir proteino geno produktą (PGP 9.5). Penkiuose preparatuose buvo panaudoti PGP 9.5 AbD Serotec (JAV) ir penkiuose – PGP 9.5 Chemicon (JAV) kompanijų antikūnai. Pirminiai antikūnai buvo išryškinami įvairiais žymėtais fluorochromais.

### 2.2 Metodika

#### 2.2.1 Širdies totalių preparatų paruošimas

Po eutanazijos pelės krūtinė buvo atveriamą išilgai krūtinkaulio ir per metalinį kateterį į kairįjį širdies skilvelį buvo švirkščiamas kambario temperatūros fosfatinis buferinis fiziologinis tirpalas, sudarytas iš 8.06 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.94 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ir 137 mM NaCl, ištirpintų aukšto grynumo destiliuotame H<sub>2</sub>O (pH 7.4).

Išplovus širdies kameras ir sieneles nuo kraujo širdis buvo išimama iš krūtinės ąstos, patalpinama į kamerą su atvėsintu fosfatinu buferiniu fiziologiniu tirpalu. Šioje kameroje skilveliai buvo atskiriami nuo prieširdžių išilgai vainikinės vagos, išsaugant aortos ir plautinio kamieno pagrindus. Kairiosios kranialinės venos pagrindas ir prieširdžių šoninės sienos buvo perkerpamos taip, kad prieširdžiai su aortos ir plautinio kamieno pagrindais galėtų būti tolygiai ištempti, prismaigstant taip paruošta preparatą 10 – 14 mikroadatėlių ant silikoninio pagrindo

specialioje mikrokameroje. Ant silikono prismeigti preparatai buvo chemiškai fiksuojami 30 min. kambario temperatūros 4% paraformaldehido tirpale, paruoštame 0,01 M fosfatiniame buferiniame fiziologiniame tirpale (pH-7,4) paraformaldehido fiksatyvo pašalinimui.

## 2.2.2 Imunohistocheminių tyrimų metodai

Po fiksavimo preparatai buvo tris kartus po 10 minučių plaunami fosfatiniame buferiniame fiziologiniame tirpale. Toliau buvo atliekama dehidratacija didėjančios koncentracijos etanolio tirpalais:

30° etanolyje – 5 min.

50° etanolyje – 10 - 15 min.

70° etanolyje – 10 - 15 min.

80° etanolyje – 10 - 15 min.

90° etanolyje – 10 - 15 min.

96° etanolyje – 10 - 15 min.

100° etanolyje – 10-15 min., 3 kartus

Audinių pralaidumui padidinti preparatai buvo laikomi 2 valandas Dent'o tirpale, kuris buvo iš anksto ruošiamas sumaišant 1:4 santykiu 100° etanolį su dimetilsulfoksidu. Kraujo likučių ir raumeninių ląstelių išbalinimui preparatai buvo laikomi per naktį tirpale, paruoštame 1:4 santykiu iš 30% vandenilio peroksido ir Dent'o tirpalo. Kitą dieną preparatas buvo rehidratuojamas mažėjančios koncentracijos etanolio tirpale bei tris kartus po 10 minučių buvo plaunamas fosfatiniame buferiniame fiziologiniame tirpale su 0,5% Triton X-100 (Carl Roth, Karlsruhe, Vokietija). Siekiant sumažinti nespecifinę imunohistocheminę reakciją į antikūnus preparatai 2 val. būdavo inkubuojami blokuojančiame fosfatiniame buferiniame fiziologiniame tirpale, turinčiame 10% normalaus asilo serumo (NDS; CarlRoth, Vokietija) ir 1% jaučio serumo albumino (BSA; CarlRoth, Vokietija). Po inkubacijos preparatai buvo tris kartus po 10 minučių buvo skalaujami fosfatiniame buferiniame fiziologiniame tirpale bei 48 valandas inkubuojami 4°C temperatūroje pirminių antikūnų mišinyje (1 lentelė). Po pirminių antikūnų reakcijos su antigenais preparatai buvo tris kartus po 10 minučių plaunami fosfatiniame buferiniame fiziologiniame tirpale ir 4 valandas inkubuojamos antrinių antikūnų mišinyje (2.1 lentelė).

Pabaigus inkubaciją antrinių antikūnų tirpale preparatai tris kartus po 10 minučių būdavo plaunami fosfatiniame buferiniame fiziologiniame tirpale, perkelti ir ištiesinami (išskleidžiami) ant objektinių stiklelių, užliejami Vectashield (Vector Laboratories, JAV) dengiamąja terpe, uždengiami dengiamuoju stikleliu, kurio kraštai hermetiškai užklijuojami skaidriu nagų laku.

**2.1 lentelė.** Tyrime naudotų antikūnų sąrašas

<b>Antikūnai</b>	<b>Kilmė</b>	<b>Skiedimas</b>	<b>Katalogo Nr.</b>	<b>Gamintojas</b>
<b>Pirminiai</b>				
anti-TH	Avis	1:500	AB1542	Chemicon*
anti-PGP 9.5	Triušis	1:2000	AB1761	Chemicon*
anti-PGP 9.5	Triušis	1:500	7863-0504	AbD Serotec**
<b>Antriniai antikūnai prieš:</b>				
Avį, konjuguoti su FITC	Asilas	1:150	AP184F	Chemicon*
Triušį, konjuguoti su Cy3	Asilas	1:300	AP182C	Chemicon*

Gamintojų adresai:

\*Chemicon International, Temecula, California, USA;

\*\* AbD Serotec Incorporation, Raleigh, USA.

### 2.2.3 Naudojama aparatūra ir programos

Pagaminti totalūs preparatai buvo analizuojami bei fotografuoti 50x, 100x, 200x, 400x padidinimais fluorescenciniais mikroskopais Axio Imager Z1 ir Axio Imager M1 (Carl Zeiss, Gottingen, Vokietija), skaitmenine monochromine fotokamera AxioCam MRm (Carl Zeiss, Gottingen, Vokietija) ir 38 ir 43 filtrų rinkiniais, reikalingais sužadinti su antriniais antikūnais konjuguotą fluoresceino (FITC) ir cianino (Cy3) fluorescenciją.

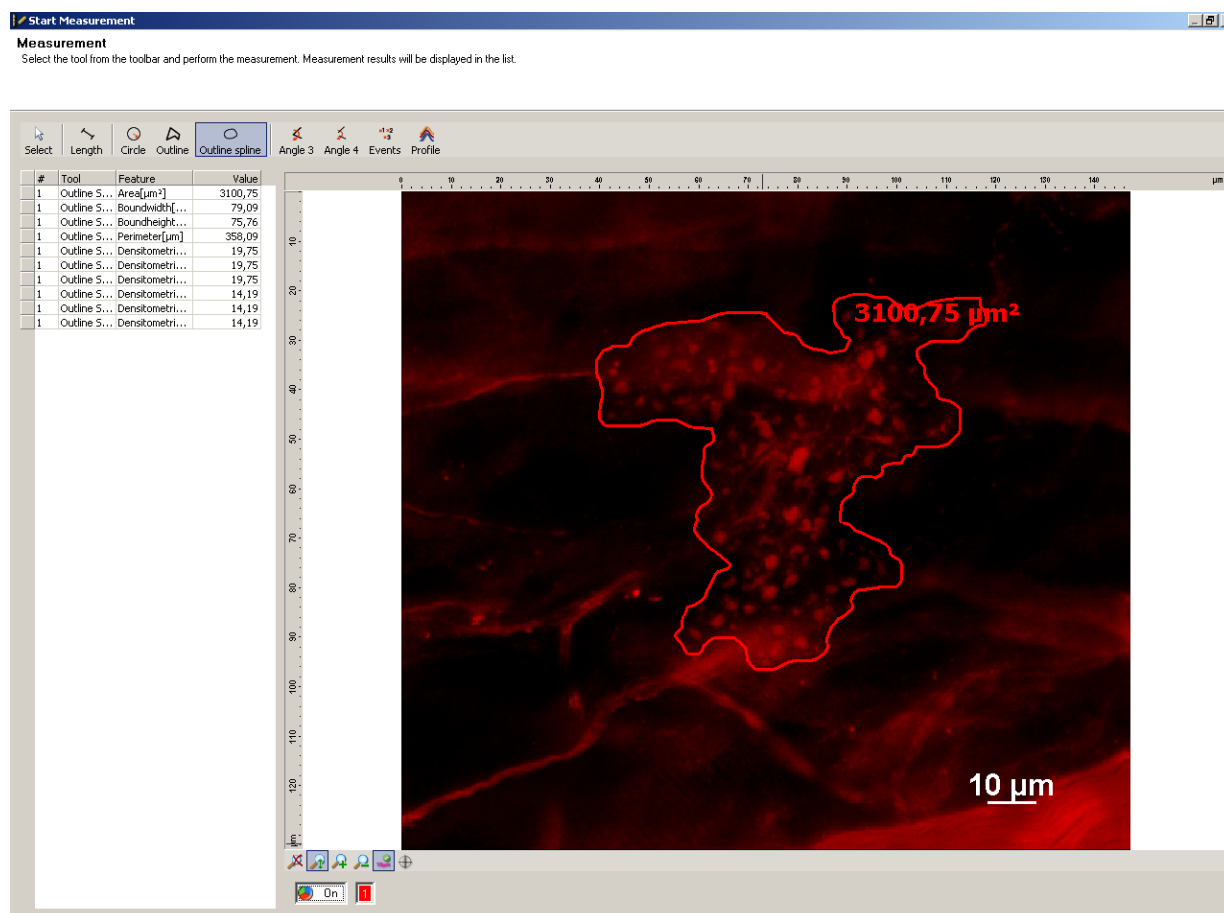
Juntamųjų nervinių galūnėlių ploto matavimams buvo panaudotas specialius matavimo modulius AxioVision 4.7.1 programinėje įrangoje (2.2 pav.).

Praktikos metu naudota papildoma eksperimentinė įranga: svarstyklės - TP-1502, Denver Instrument; magnetinė maišyklė – Variomag Mono; magnetinė maišyklė – Heidolph, Mr Hei-Standard; pH matuoklis – Ecoscan, Eutech Instruments; purtyklė – Gene Touch Mixer, Vortex-1;

reciprokinė purtyklė – GFL 3016; mini centrifūga – Roth; automatinės pipetės – pipet4u ir Gilson; mikrochirurginiai įrankiai.

Juntamosios nervinės galūnėlės buvo ieškomos epikardo, miokardo ir endokardo širdies sienų sluoksniuose ir atitinkamai rūšiuojamos į sudėtingas neinkapsuliuotas ir tinklines pagal pagrindinę dviejų tipų klasifikaciją. Charakterizuojant juntamasias nervines galūnėles ir norint iširti jų paplitimą buvo išmatuojamas sudėtingų neinkapsuliuotų juntamųjų nervinių galūnėlių plotas ir suskaičiuojamas jų skaičius. Matuojant plotą, struktūros buvo apvedamos su pele kompiuterio ekrane (2.1 pav.). Kadangi tinklinės galūnėlės sudaro tinklą, kuris tolygiai paplinta skirtinguose sluoksniuose, jų ploto ir skaičiaus nustatymai buvo neįmanomi. Todėl šio tipo galūnėlių buvo aprašytas pasiskirstymas įvairiuose širdies sienų sluoksniuose.

Užbaigus matavimą duomenys buvo pervedami į „SPSS 17.0“ programą ir čia apdorojami statistiškai.



2.1 pav. Specialius ploto matavimo modulius AxioVision 4.7.1 programinėje įrangoje.

#### **2.2.4 Statistinis duomenų įvertinimas**

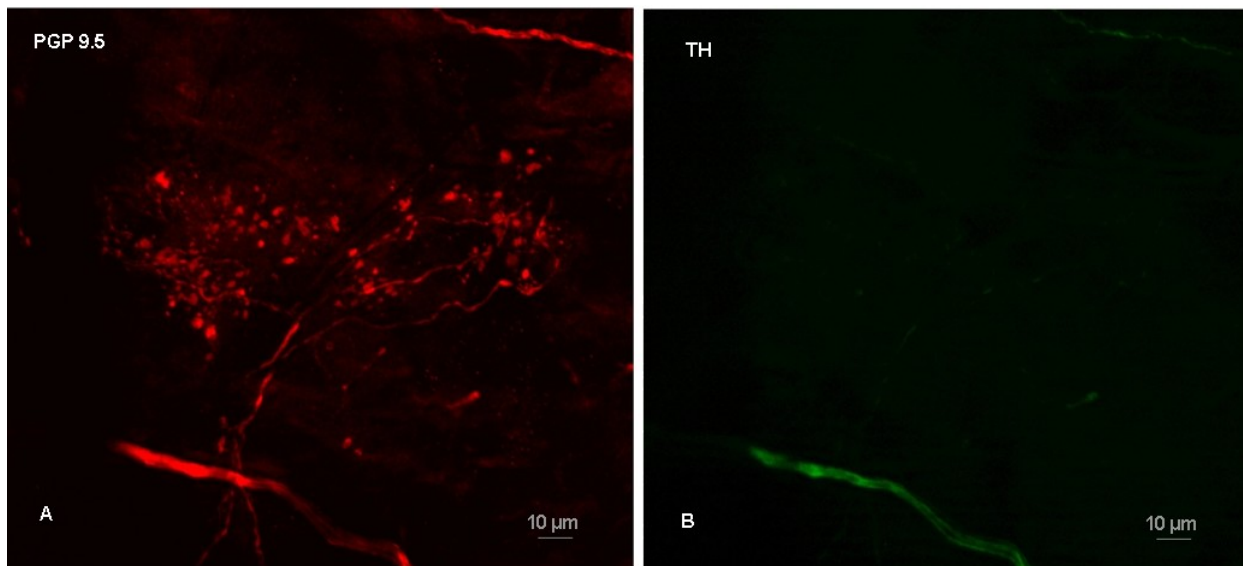
Sensorinių nervinių galūnėlių skaičiaus ir ploto vidurkiai bei standartinės paklaidos statistiškai buvo įvertinami „SPSS 17.0“ programa. Rezultatai pateikiami lentelėse, grafikuose ir aptariami tekste. Skirtumai tarp nervinių galūnėlių plotų dydžių buvo statistiškai įvertinti atliekant nepriklausomų duomenų Stjudento t-testą. Rezultatų skirtumas laikytas statistiškai reikšmingas, kai  $p < 0,05$ .

### 3. REZULTATAI

Šis tyrimas yra tolesnis gilinimasis į pelės intrakardinę nervų sistemą. Kadangi prieš tai Rysevaitė su kolegomis detaliai išnagrinėjo intrakardinių nervinių subrezginių anatomiją ir imunohistochemiją (Rysevaite et al., 2010, 2011), tęsiant jos tyrimą mūsų uždavinys buvo aptikti sensorines nervines galūnes ir nustatyti jų lokalizaciją stambiuju kraujagyslių žiočių bei Rysevaitės darbe aprašytų subrezginių atžvilgiu. Kitas uždavinys buvo išnagrinėti sensorinių galūnėlių imunohistochemines savybes – ištirti jų vizualizavimą panaudojus skirtingus antikūnus.

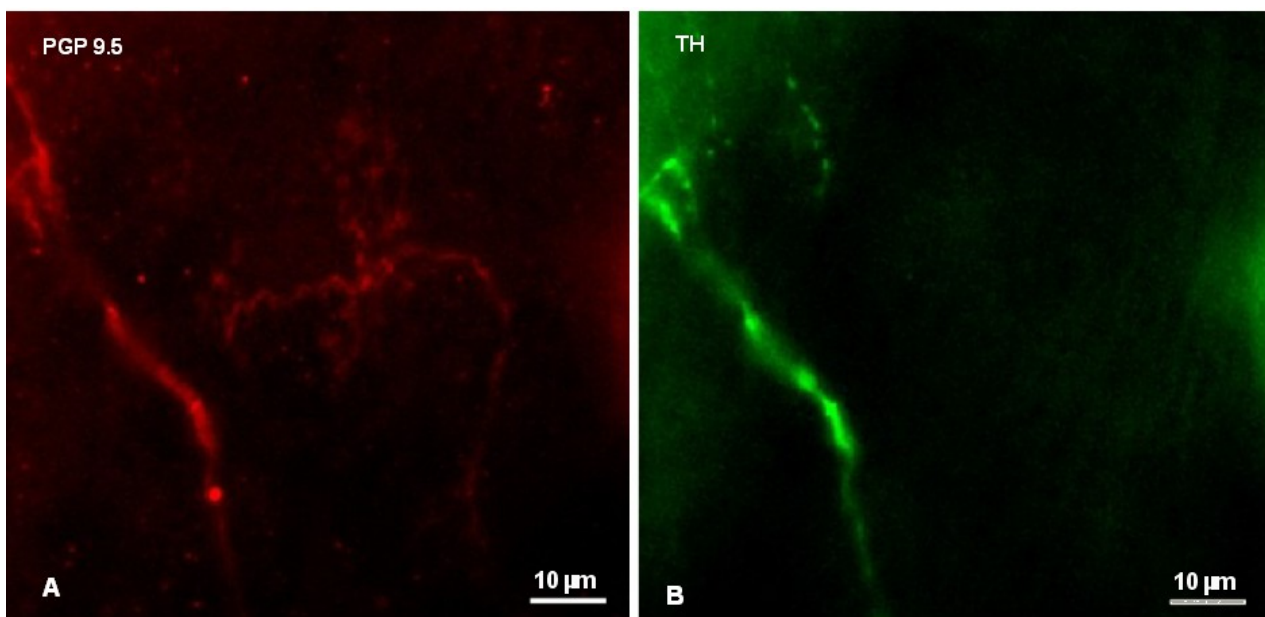
#### 3.1. Sudėtingų neinkapsuliuotų galūnėlių imunohistocheminis vizualizavimas

Atlikus tyrimą sudėtingos neinkapsuliuotos galūnės buvo aptiktos panaudojus proteino geno produktą PGP 9.5 AbD Serotec (3.1 pav. A) keturiuose iš šešių pelių preparatų. Panaudojus antikūną prieš tirozino hidroksilazę (TH) šio tipo sensorinių nervinių galūnėlių aptikti nepavyko (3.1 pav. B, 3.2 pav. B).



**3.1 pav.** Sudėtingų neinkapsuliuotų galūnėlių vizualizavimo palyginimas panaudojus (A) proteino geno produktą PGP 9.5 AbD Serotec ir (B) prieš tirozino hidroksilazę (TH) antikūną.

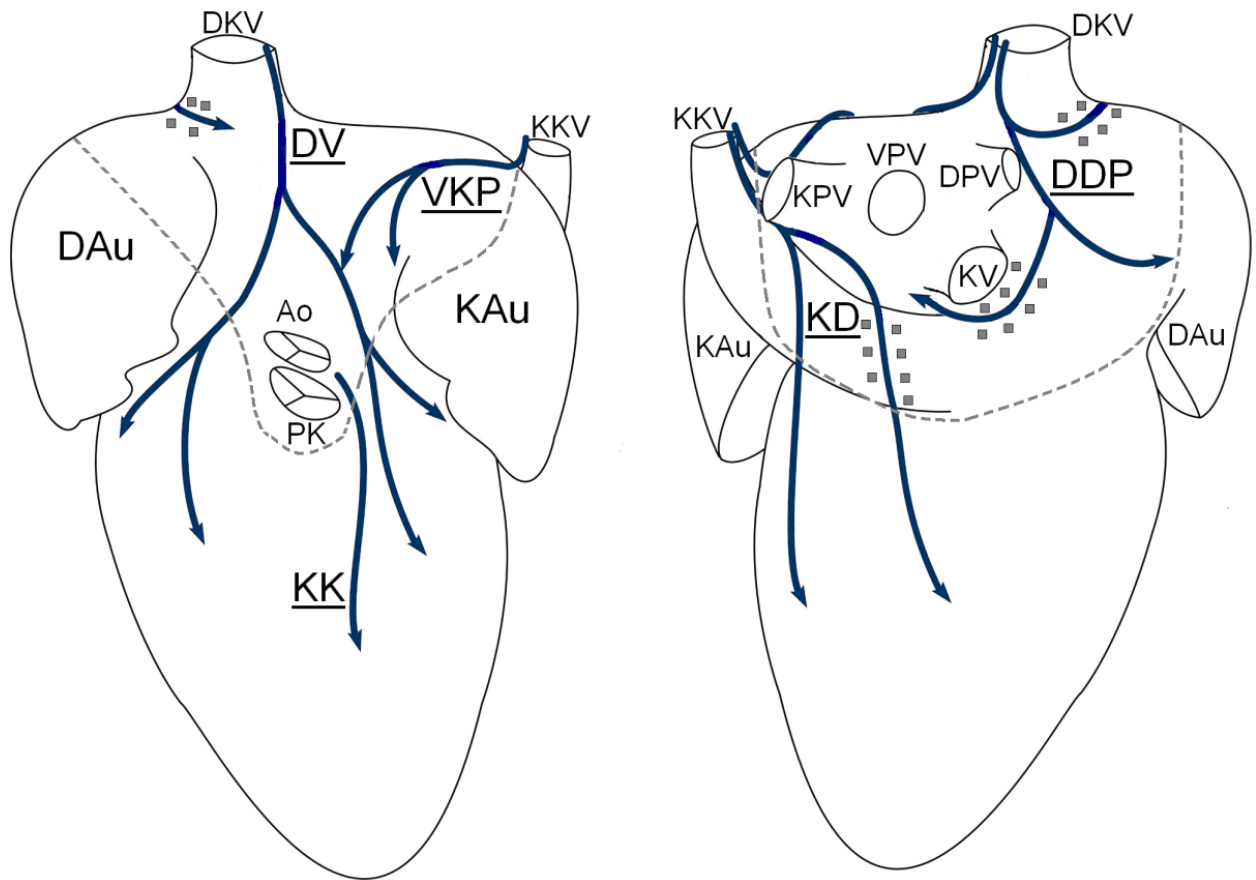
Nežiūrint į tai, kad panaudojus AbD Serotec kompanijos proteino geno produktą PGP 9.5 buvo gauti teigiami vizualizavimo rezultatai, kitos kompanijos analogiško proteino geno produkto PGP 9.5 Hemicon panaudojimas sudėtingų neinkapsuliuotų galūnėlių vizualizuoti nesugebėjo, visuose penkiuose preparatuose geriausiu atveju buvo galima pastebėti labai neryškius šių galūnėlių pėdsakus (3.2 pav. A).



**3.2 pav.** Sudėtingų neinkapsuliuotos galūnėlių vizualizavimas (A) panaudojus proteino geno produktą PGP 9.5 Hemicon ir (B) antikūną prieš tirozino hidroksilazę TH.

### 3.2. Sudėtingų neinkapsuliuotų galūnėlių paplitimas

Mūsų tyrimo rezultatai rodo, kad sudėtingos neinkapsuliuotos galūnėlės specifiskai lokalizuojasi dešiniajame prieširdyje DKV, KV ir KKV žiočių srityje širdies epikarde. Šalia plautinių venų žiočių kairiajame prieširdyje šio tipo galūnėlių nebuvo aptikta (pav. 3.3, 3.4).

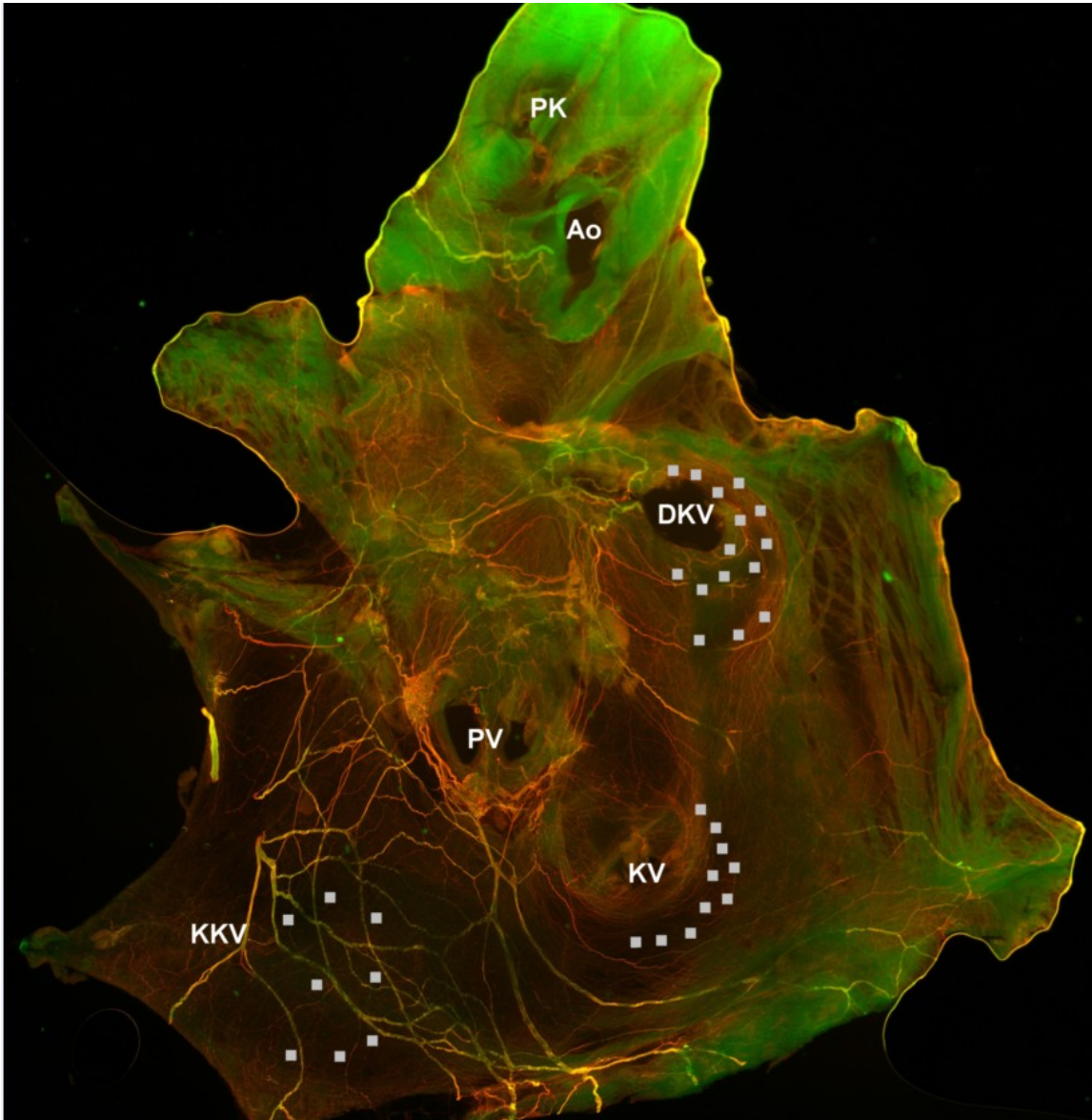


**3.3 pav.** Sudėtingų neinkapsuliuotų sensorinių galūnelių lokalizavimo schema pelės širdies epikarde (modifikuota pagal Rysevaite et al., 2010).

*Sutrumpinimai.* Arterijos: PK – plautinis kamienas, Aa – aorta; venos: DKV – dešinioji kranialinė, KV – kaudalinė, KKV – kairioji kranialinė, KPv – kairioji plautinė, VPv – vidurinioji plautinė, DPv – dešinioji plautinė; ausytės: KAu – kairioji, DAu – dešinioji; nerviniai subrezginiai: VKP – ventralinis kairysis prieširdžio, DDP – dorsalinis dešinysis prieširdžio, KK – kairysis koronarinis, KD – kairysis dorsalinis, DV – dešinysis ventralinis. Punktyru pažymėta tiriamoji širdies sritis. Kvadratais pažymėtos sudėtingos neinkapsuliuotos galūnelės.

1. Šalia DKV sudėtingomis neinkapsuliuotomis galūnelėmis pasibaigia DDP nervinio subrezginio skaidulos. Reikia pastebėti, kad šio tipo galūnelės buvo aptiktos ventralinėje, dešiniojoje ir dorsalinėje DKV angos dalyse. Kairiojoje šios venos angos dalyje, pro kurią į prieširdį įeina DDP skaidulos, sudėtingų neinkapsuliuotų galūnelių nebuvo aptikta.
2. To paties subrezginio skaidulos pasibaigia sudėtingomis neinkapsuliuotomis galūnelėmis ir KV žiočių srityje. Šios galūnelės rastos dorsalinėje ir dešiniojoje KV angos dalyse.
3. Taip pat šio tipo galūnelėmis pasibaigia ir KD nervinio subrezginio skaidulos KKV žiočių srityje.





**3.4 pav.** Sudėtingų neinkapsuliuotų sensorinių galūnėlių lokalizavimo schema totaliajame preparate pelės širdies pagrindo epikarde.

*Sutrumpinimai.* Arterijos: **PK** – plautinis kamienas, **Ao** – aorta; venos: **DKV** – dešinioji kranialinė, **KV** – kaudalinė, **KKV** – kairioji kranialinė, **PV** – plautinės. Kvadratais pažymėtos sudėtingos neinkapsuliuotos galūnėlės.

### 3.3. Sudėtingų neinkapsuliuotų galūnėlių skaičius

Atliekant kiekybinį sudėtingų neinkapsuliuotų nervinių galūnėlių įvertinimą, jos buvo suskaičiuotos šalia kiekvienos iš trijų dešiniojo prieširdžio angų venų, prie kurių šios sensorinės galūnėlės buvo aptiktos. Taip pat buvo apskaičiuotas jų skaičiaus vidurkis su standartiniais nuokrypiais. Rezultatai pateikti 3.1 lentelėje ir 3.5 pav.

**3.1 lentelė.** Sudėtingų neinkapsuliuotų galūnėlių pasiskirstymas dešiniojo prieširdžio DKV, KV ir KKV žiočių srityse.

<i>Dešiniojo prieširdžio venų sritys</i>	<i>Sudėtingų neinkapsuliuotų galūnėlių skaičių vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai</i>
DKV	32 (13,5)
KV	22,6 (6,1)
KKV	18,3 (7,8)

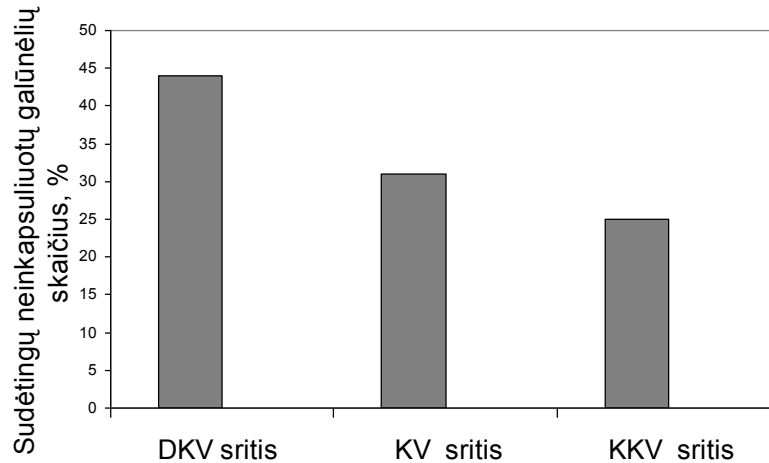
DKV – dešinioji kranialinė vena;

KV – kaudalinė vena;

KKV – kairioji kranialinė vena.

Suskaičiavus sudėtingų neinkapsuliuotų nervinių galūnėlių kiekį šalia DKV, KV ir KKV žiočių buvo nustatyta, kad vidutiniškai daugiausia šio tipo nervinių galūnėlių buvo aptikta DKV angos srityje (3.1 lentelė, 3.5 pav.) (32 galūnėlės, 44 % viso galūnėlių skaičiaus). Mažesnis kiekybinis skirtumas tarp galūnėlių skaičiaus aptiktas KV ir KKV žiočių srityse. Šalia KV angos vidutiniškai buvo rasta 22,6 galūnėlės (31 %). KKV angos srityje sudėtingų neinkapsuliuotų galūnėlių skaičiaus vidurkis yra 18,3, tai yra ketvirtadalis visų šio tipų nervinių galūnėlių.

Tačiau tam, kad galima būtų pasakyti, ar šie skirtumai yra statistiškai reikšmingi, reikia iširti didesnę preparatų imtį.



**3.5 pav.** Sudėtingų neinkapsuliuotų galūnėlių procentinis pasiskirstymas dešiniojo prieširdžio DKV, KV ir KKV žiočių srityse.

DKV – dešinioji kranialinė vena;  
 KV – kaudalinė vena;  
 KKV – kairioji kranialinė vena.

### 3.4 Sudėtingų neinkapsuliuotų galūnėlių plotai

Taip pat kiekybiniam sensorinių galūnėlių įvertinimui buvo pamatuoti sudėtingų neinkapsuliuotų galūnėlių plotai ir suskaičiuota, kokį vidutinį bendrą plotą užima galūnėlės kiekvienos venos angos srityje. Kaip matyti iš 3.2 lentelės ir 3.6 pav.,  $149110 \mu\text{m}^2$ , tai sudaro apie pusę (48,3 %) visų nervinių galūnėlių ploto, sudėtingos neinkapsuliuotos galūnėlės užima DKV žiočių srityje (3.2 lentelė, 3.6 pav.), tai yra ten, kur jų skaičius yra didžiausias (3.1 lentelė, 3.5 pav.). Mažiausias plotas –  $49879 \mu\text{m}^2$  arba 16,2 %, padengtas sudėtingomis neinkapsuliuotomis galūnėlėmis KV angos srityje. KKV angos sritis užima tarpinę poziciją, nežiūrint į tai, kad joje buvo aptiktas pats mažiausias galūnėlių skaičius. Šioje srityje šio tipo sensorinės galūnėlės dengia  $109515 \mu\text{m}^2$ , tai sudaro 36,5 % visų sudėtingų nervinių galūnėlių užimto ploto. Bet norint nustatyti, ar plotų skirtumai yra statistiškai reikšmingi, reikia didesnės preparatų imties.

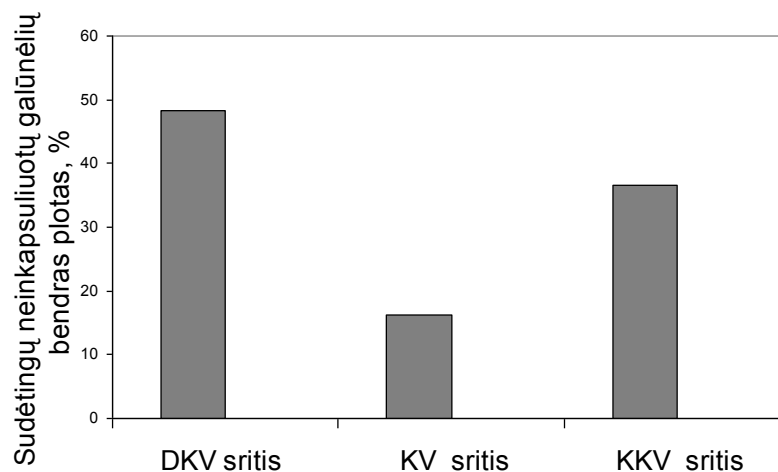
**3.2 lentelė.** Sudėtingų neinkapsuliuotų galūnėlių bendro ploto pasiskirstymas dešiniojo prieširdžio DKV, KV ir KKV žiočių srityse.

<i>Dešiniojo prieširdžio venų sritys</i>	<i>Sudėtingų neinkapsuliuotų galūnėlių bendras plotas, <math>\mu\text{m}^2</math></i>
DKV	149110
KV	49879
KKV	109515

DKV – dešinioji kranialinė vena;

KV – kaudalinė vena;

KKV – kairioji kranialinė vena.



**3.6 pav.** Sudėtingų neinkapsuliuotų galūnėlių plotų procentinis pasiskirstymas dešiniojo prieširdžio DKV, KV ir KKV žiočių srityse.

DKV – dešinioji kranialinė vena;

KV – kaudalinė vena;

KKV – kairioji kranialinė vena.

Norint nustatyti, šalia kokios dešiniojo prieširdžio venos angos neinkapsuliuotos galūnėlės turi vidutiniškai didžiausią plotą, DKV, KV ir KKV žiočių galūnėlių plotų vidurkiai buvo palyginti panaudojus Stjudento t kriterijų. Kaip pateikta 3.3 lentelėje ir 3.7 pav., vidutiniškai mažiausią plotą  $691,6 \mu\text{m}^2$  turi sudėtingos neinkapsuliuotos galūnėlės, lokalizuotos

KV žiočių srityje. Šios srities sensorinių galūnėlių plotų vidurkis statistiškai reikšmingai skiriasi tiek nuo DKV, tiek nuo KKV angų sričių galūnėlių plotų vidurkių (3.7 pav.). KV angos srities sensorinės nervinės galūnėlės ne tik yra pačios mažiausios pagal savo ploto vidurkį, bet, kaip buvo minėta anksčiau, jos užima mažiausią bendrą plotą iš visų trijų dešiniojo prieširdžio venų žiočių sričių (3.2 lentelė, 3.6 pav.).

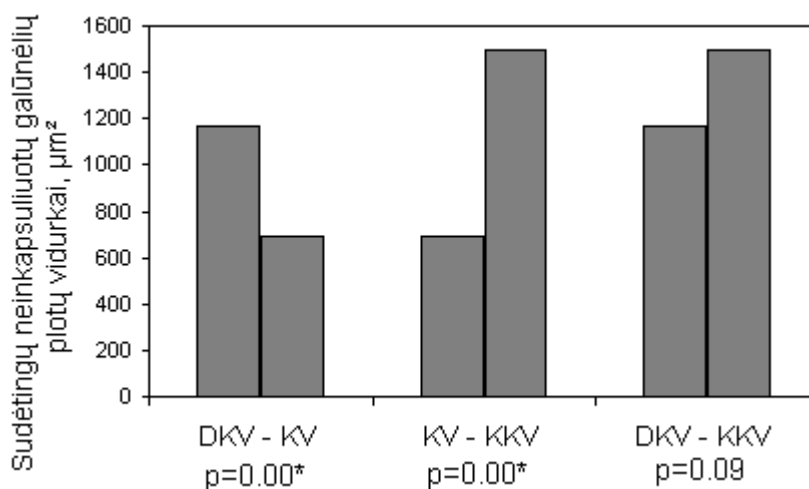
**3.3 lentelė.** Sudėtingų neinkapsuliuotų galūnėlių plotų pasiskirstymas dešiniojo prieširdžio DKV, KV ir KKV žiočių srityse.

<i>Dešiniojo prieširdžio venų sritys</i>	<i>Sudėtingų neinkapsuliuotų galūnėlių plotų vidurkiai, <math>\mu\text{m}^2</math> ir standartiniai nuokrypiai</i>
DKV	1165 (1131,8)
KV	691,6 (504,2)
KKV	1500,2 (1454,8)

DKV – dešinioji kranialinė vena;

KV – kaudalinė vena;

KKV – kairioji kranialinė vena.



**3.7 pav.** Sudėtingų neinkapsuliuotų galūnėlių plotų vidurkių palyginimas dešiniojo prieširdžio DKV, KV ir KKV žiočių srityse.

DKV – dešinioji kranialinė vena;

KV – kaudalinė vena;

KKV – kairioji kranialinė vena.

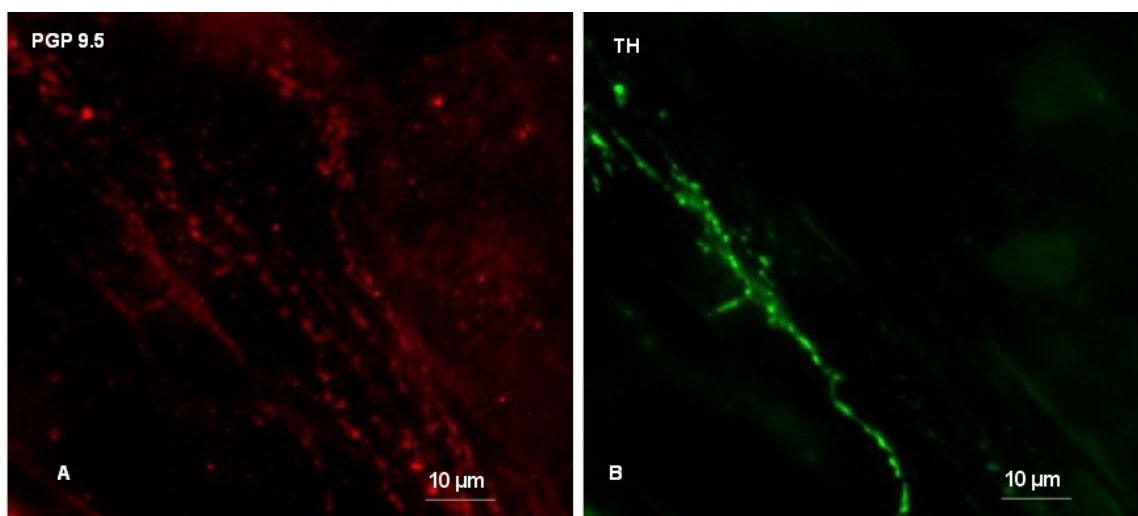
\* - statistiškai reikšmingas skirtumas

Sudėtingos neinkapsuliuotos galūnėlės KKV angos srityje pagal savo vidutinį plotą yra pačios didžiausios, jų vidurkis yra  $1500,2 \mu\text{m}^2$ . Tačiau, kadangi šioje srityje šio tipo galūnėlių skaičius yra mažiausias, bendras receptorinis plotas šalia KKV angos neviršija DKV žiočių sensorinių galūnėlių bendro ploto srities (3.1 lentelė, 3.5 pav.). Taip pat statistiškai reikšmingai vidutinis KKV angos galūnėlių plotas nuo analogiško DKV žiočių srities rodiklio nesiskiria (3.7 pav.). DKV angos srities sensorinių nervinių galūnėlių vidurkis yra  $1165 \mu\text{m}^2$ . Kadangi šioje srityje sudėtingų neinkapsuliuotų galūnėlių yra daugiausia, bendras receptorinis plotas DKV pamate sudaro apie 50 % visų šio tipo galūnėlių ploto (3.6 pav.).

### 3.5. Tinklinių galūnėlių imunohistocheminis vizualizavimas ir paplitimas

Tinklinės galūnėlės buvo aptiktos naudojant proteino geno produktus PGP 9.5 AbD Serotec ir PGP 9.5 Chemicon (3.7 pav.). Kai kurios iš jų buvo aptiktos panaudojus antikūną prieš tirozino hidroksilazę (TH) (3.8 pav. B).

Atlikus tyrimą, paaiškėjo, kad tinklinės nervinės galūnėlės tolygiai pasiskirstytos visoje tiriamoje srityje visuose trijuose širdies sluoksniuose (epikarde, miokarde ir endokarde).

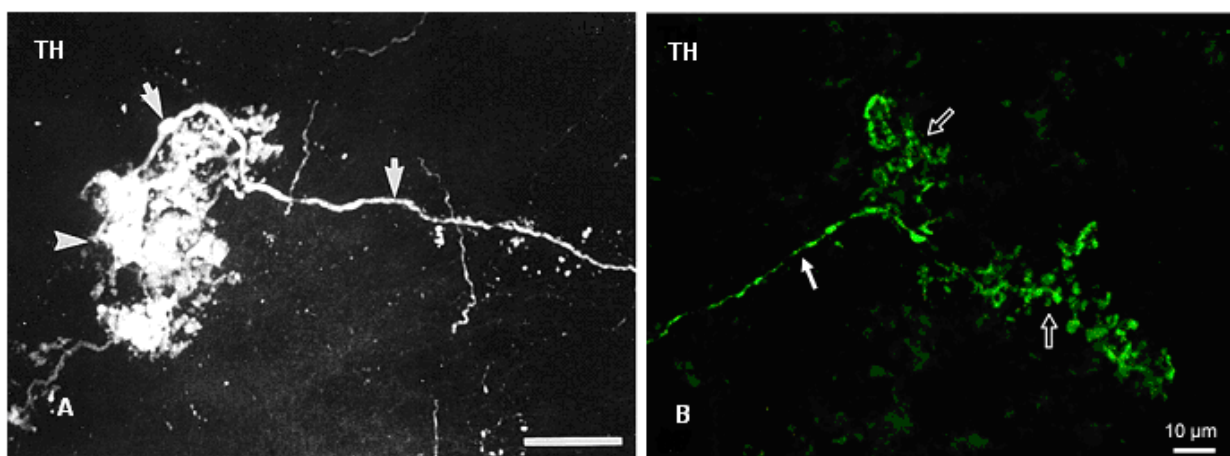


**Pav. 3.8** Tinklinių galūnėlių vizualizavimo palyginimas (A) panaudojus proteino geno produktą PGP 9.5 ir (B) prieš tirozino hidroksilazę TH antikūną.

#### 4. REZULTATŲ APTARIMAS

Proteino geno produkto PGP 9.5 gebėjimas vizualizuoti sudėtingas neinkapsuliuotas galūnėles sutampa su Marron su bendraautoriais pateiktais širdies galūnėlių tyrimo duomenimis (Marron et al., 1995). Be to, analogiškus rezultatus aptiko ir mokslininkai, tiriantys morfologiškai bei funkciškai homologiškas sensorines sudėtingas neinkapsuliuotas galūnėles kituose organuose: gerklose (Mazzone, 2005), plaučių, stemplės ir širdies visceralinėje pleuroje (Pintelon et al., 2007). Specifinę formą turinčių neinkapsuliuotų nervinių galūnėlių sensorinė funkcija ne kartą buvo įrodyta nervų degeneracijos metodu (Smirnow, 1985, cit. pagal Holmes, 1957; Netllship, 1936).

Mūsų tyrime panaudojus antikūną prieš tirozino hidroksilazę (TH) sudėtingų neinkapsuliuotų sensorinių nervinių galūnėlių aptikti nepavyko. Tai atitinka kitų tyrėjų rezultatus, nes pagal tradicinį požiūrį antikūnas prieš tirozino hidroksilazę (TH) žymi simpatines adrenergines motorines galūnėles (Katz et al., 1987; Finley et al., 1992; Pintelon et al., 2007). Tačiau yra duomenų, kad šio antikūno dėka buvo pažymėtos ir nervinės galūnėlės, savo forma primenančios sudėtingas neinkapsuliuotas sensorines galūnėles. Tokių rezultatų buvo gauta žmogaus širdyje (4.1 pav. A) (Marron et al., 1995) ir žiurkės visceralinėje pleuroje (4.1 pav. B) (Pintelon et al., 2007).



**4.1 pav.** Sudėtingų neinkapsuliuotų galūnėlių vizualizavimas panaudojus antikūną prieš tirozino hidroksilazę (TH) žmogaus širdyje (A) (modifikuota iš Marron et al., 1995) ir žiurkės visceralinėje pleuroje (B) (modifikuota iš Pintelon et al., 2007).

Kadangi Marron su bendraautoriais ir Pintelon su kolegomis nebuvo atlikę jokių papildomų analizių šių nervinių galūnėlių inervacijos nustatymui, autoriai nėra užtikrinti, ar šios reaguojančios į antikūną prieš tirozino hidroksilazę (TH) galūnėlės iš tikrųjų yra sensorinės ir priklauso sudėtingų neinkapsuliuotų sensorinių galūnėlių kategorijai (Marron et al., 1995; Pintelon et al., 2007). Be to, kadangi yra duomenų, kad chemoreceptoriai gali turėti tirozino hidroksilazės baltymą (Finley et al., 1992), šios galūnėlės gali būti atipiniais chemoreceptoriais. Papildomai reikia atkreipti dėmesį, jog yra duomenų, kad arterijų mechanoreceptoriai irgi gali turėti tirozino hidroksilazės baltymą (Czyzyk-Krzeska, 1991). Tačiau, ar tokie mechanoreceptoriai egzistuoja širdyje, dar nėra žinoma.

Širdies sienos epikardo sudėtingų neinkapsuliuotų nervinių galūnėlių morfologija ir paplitimas yra mažai ištirti. Mūsų tyrime nustatytas šio tipo sensorinių nervinių galūnėlių lokalizavimas prieširdžių epikarde sutampa su kitų tyrėjų duomenimis (Dogiel 1898, cit. pagal Выропаев, 1947; Woollard, 1926; Miller ir Kusahara, 1964; Marron et al., 1995).

Širdies mechanoreptorių išsidėstymas tik dešiniojo prieširdžio venų žiočių srityje, kuri mes aptikome tyrimo metu, yra gana logiškas, nes būtent į šį prieširdį suteka didžiojo apytakos rato kraujas ir dešiniojo prieširdžių sienų tempimas natūraliai yra didesnis. Tačiau toks rezultatas nesutampa su Marron ir kolegų, kurie aptiko šio tipo galūnėles ne tik dešiniajame prieširdyje šalia tuščiųjų venų angų, bet ir kairiojo prieširdžio plautinių venų žiočių srityse, kur sudėtingų neinkapsuliuotų galūnėlių skaičius, anot jų, net didesnis (Marron et al., 1995). Šį nesutapimą galima būtų bandyti aiškinti tuo, kad Marron et al. ir mūsų darbuose buvo tiriami skirtingų rūšių žinduoliai – žmogus ir pelė, kurių širdies tūriai labai skiriasi.

Taip pat mūsų gauti duomenys skiriasi nuo kitų autorių, kurie teigia, kad sudėtingos neinkapsuliuotos galūnėlės buvo aptiktos ne tik epikarde, bet ir kituose prieširdžių sienos sluoksniuose (Dogiel 1898, cit. pagal Выропаев, 1947; Woollard, 1926; Nettleship, 1936; Лаврентьев, 1947; Плечкова, 1947; Miller ir Kusahara, 1964; Johnston, 1968; Marron et al., 1995).

Kadangi visi minėti mokslininkai tyrė stambesnius žinduolius (kates, šunis, beždžiones, žmones), vėl galima būtų kelti hipotezę, kad rezultatų neatitikimai yra dėl rūšių skirtumų, kadangi žinoma, kad skirtingos širdies vidinės nervinės sistemos savybės gali varijuoti priklausomai nuo rūšies (Nettleship, 1936; Woolard, 1926). Antra priežastis gali būti paties



proteino geno produkto PGP 9.5 savybės. Kadangi Hemicon kompanijos PGP 9.5 visai nevizualizavo sudėtingų neinkapsuliuotų galūnėlių, gali būti, kad AbD Serotec PGP 9.5 galėjo vizualizuoti šio tipo galūnėles tik širdies sienos epikardo sluoksnyje.

Mūsų aptiktas tinklinių galūnėlių tolygus pasiskirstymas visoje tiriamose srityje visuose trijuose širdies sienos sluoksniuose sutampa su kitų tyrėjų duomenimis (Smirnow 1895 cit. pagal Лаврентьев 1947; Holmes, 1957; Miller ir Kasahara, 1964; Johnston, 1968; Longhurst, 1980).

Šių nervinių galūnėlių vizualizavimas panaudojus proteino geno produktą PGP 9.5 sutampa su Marron ir kolegų rezultatais (Marron et al., 1995). Kai kurių tinklinių nervinių galūnėlių išryškėjimas panaudojus antikūną prieš tirozino hidroksilazę (TH) irgi atitinka kitų tyrėjų duomenis (Marron et al., 1995). Tačiau kadangi, kaip jau buvo minėta anksčiau, tradiciškai manoma, kad antikūnas prieš tirozino hidroksilazę (TH) žymi simpatines adrenergines motorines galūnėles (Katz et al., 1987; Finley et al., 1992; Pintelon et al., 2007) ir kadangi chemoreceptoriai irgi turi tirozino hidroksilazės baltymą (Finley et al., 1992), sunku pasakyti, ar mūsų tyrime tikrai buvo aptiktos sensorinės tinklinės galūnėlės, ar jos visgi atlieka motorinę funkciją. Norint atsakyti į šį klausimą reikia atlikti papildomų tyrimų.

## IŠVADOS

1. Pelės širdyje yra dviejų tipų – sudėtingos neinkapsuliuotos (*angl. complex unencapsulated endings*) ir tinklinės (*angl. end-nets*) – sensorinės nervinės galūnėlės, išryškinamos imunohistochemiškai su antikūnu prieš proteino geno produktą PGP 9.5 (AbD Serotec, JAV).
2. Sudėtingos neinkapsuliuotos galūnėlės paplitusios kaudalinės, kairiosios bei dešinėsios kranialinių venų sinusų (žiočių) srityje.
3. Tinklinės galūnėlės tolygiai pasiskirsto visame širdies pagrinde visuose trijuose širdies sienos sluoksniuose – epikarde, miokarde ir endokarde.
4. Vidutiniškai mažiausią plotą užima sudėtingos neinkapsuliuotos galūnėlės, lokalizuotos kaudalinės venos žiočių srityje. Šios srities sensorinių nervinių galūnelių plotų vidurkiai statistiškai reikšmingai skiriasi nuo nervinių galūnelių, lokalizuotų dešinėsios ir kairiosios kranialinių venų žiočių srityse, užimamų plotų.

VILNIUS UNIVERSITY  
FACULTY OF NATURAL SCIENCES  
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS

Denisas Dankinas

**THE RESEARCH of SENSORY NERVE TERMINALS in the MOUSE HEART**

Master thesis

Summary

There are two types of cardiac sensory endings – complex unencapsulated endings and end-nets. The aim of this study was to examine morphology of sensory terminals in the basis of mouse heart and ability of different antibodies to visualize these terminals.

Our results showed that both end-net and complex unencapsulated endings can be visualized with PGP 9.5 (AbD Serotec, USA). Complex unencapsulated endings are localized in heart wall epicardium near the apertures of caudal, right cranial and left cranial veins in the right atrium. End-net terminals are diffusely distributed in all three layers (endocardium, myocardium, epicardium) of heart wall. Complex unencapsulated endings near the caudal vein aperture have the lowest area compared with the sensory endings near the other two veins apertures.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abracham A. Microscopic innervation of the heart and blood vessels in vertebrates including man. Oxford: Pergamon Press; 1969.
2. Anrep GV. The central and reflex regulation of the heart rate. *The Journal of Physiology*, 1926; 61(2):215-31.
3. Aviado DM, Li TH, Kalow W, Schmidt CF, Turnbull GL, Peskin GW, Hess ME, Weiss AJ. Respiratory and Circulatory Reflexes From the Perfused Heart and Pulmonary Circulation of the Dog. *American Journal of Physiology*. 1951;165:261-77.
4. Bainbridge FA. The influence of venous filling upon the rate of the heart. *The Journal of Physiology*. 1915;50(2):65-84.
5. Ballin I, Katz LN. Observations on the localization of the receptor area of the Bainbridge reflex. *American Journal of Physiology*. 1941;135(1):202-13.
6. Berkley HJ. The intrinsic nerve supply of the cardiac ventricles in certain vertebrates. *Johns Hopkins Hospital*. 1894;4:248-55.
7. Cheng Z, Powley TL, Schwaber JS, Doyle FJ. Vagal Afferent Innervation of the Atria of the Rat Heart Reconstructed With Confocal Microscopy. *The Journal Of Comparative Neurology*. 1997;381:1-17.
8. Cifelli C, Rose RA, Zhang H, Voigtlaender-Bolz J, Bolz SS, Backx PH, et al. RGS4 regulates parasympathetic signaling and heart rate control in the sinoatrial node. *Circulation Research* 2008;103:527-35.
9. Coleridge HM, Coleridge JCG, Kidd C. Cardiac receptors in the dog with particular reference to two types of afferent ending in the ventricular wall. *The Journal of Physiology*. 1964;174:323-9.
10. Coleridge JCG, Hemingway A, Holmes RL, Linden RJ. The location of atrial receptors in the dog: a physiological and histological study. *The Journal of Physiology*. 1957;136(1):174-97.

11. Czyzyk-Krzeska MF, Bayliss DA, Lawson EE, Millhorn DE. Expression of messenger RNAs for peptides and tyrosine hydroxylase in primary sensory neurons that innervate arterial baroreceptors and chemoreceptors. *Neuroscience Letters*. 1991;129:98-102.
12. Dawes GS, Comroe JH. Chemoreflexes from the heart and lungs. *Physiological reviews*. 1954;34(2):167-201.
13. Degraff AC, Sands J. Are reflexes from the large veins or auricle of importance in the regulation of the circulation? *American Journal of Physiology*. 1925;74:400-15.
14. Dogiel A. Die sensiblen Nervenendigungen im Herzen und in den Blutgefäßen der Säugethiere. *Archiv für Mikroskopische Anatomie*. 1898;52:44-70
15. Feintuch A, Zhu Y, Bishop J, Davidson L, Dazai J, Bruneau BG, Henkelman RM. 4D cardiac MRI in the mouse. *NMR in Biomedicine*. 2007;20:360-5.
16. Finley JC, Polak J, Katz DM. Transmitter diversity in carotid body afferent neurons: dopaminergic and peptidergic phenotypes. *Neuroscience*. 1992;51:973-87.
17. Floyd K, Linden RJ, Saunders DA. Presumed receptors in the left atrial appendage of the dog. *The Journal of Physiology*. 1972;227(2):27-8.
18. Fu LW, Longhurst JC Regulation of Cardiac Afferent Excitability in Ischemia. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2009;194:185-225.
19. Furnival CM, Linden RJ, Snow HM. Reflex effects on the heart of stimulating left atrial receptors. *The Journal of Physiology*, 1971; 218: 447-63.
20. Hakumäki MOK. Seventy years of the Bainbridge reflex. *Acta physiologica scandinavica* 1987;130(2):177-85.
21. Hirsch EF. *The Innervation of the Vertebrate Heart*. Springfield: Thomas edition; 1970.
22. Holmes RL. Structures in the atrial endocardium of the dog which stain with methylene blue, and the effects of unilateral vagotomy. *Journal of Anatomy*. 1957;91(2):259-66.
23. Ichinose MJ, Sala-Mercado JA, Coutsos M, Li ZH, Ichinose TK, Dawe E, O'Leary DS. Modulation of cardiac output alters the mechanisms of the muscle metaboreflex pressor response. *American Journal of Physiology*. 2010;298(1):245-50.
24. Jarish A, Henze C. Über Blutdrucksenkung durch chemische Erregung depressorischer Nerven. *Archives of Pharmacology*. 1937;187:706-30.
25. Johnston BD. Nerve endings in the human endocardium. *American Journal of Anatomy*. 1968;122(3):621-9.

26. Kappagoda CT, Linden RJ, Mary DA. Atrial receptors in the cat. *The Journal of Physiology*. 1976;262:431-46.
27. Kappagoda CT, Linden RJ, Snow HM. The effect of stretching the superior vena caval-right atrial junction on right atrial receptors in the dog. *The Journal of Physiology*. 1972; 227(3):875-87.
28. Katz DM, Adler JE, Black IB. Catecholaminergic primary sensory neurons: autonomic targets and mechanisms of transmitter regulation. *Federation proceedings*. 1987;46:24-9.
29. Khabarova AY. *The afferent innervation of the heart*. London: Pitman Medical Publishing Co.; 1963.
30. Li L, Huang C, Ai J, Yan B, Gu H, Ma Z, Li AY, Xinyan S, Harden SW, Hatcher JT, Wurster RD, Cheng ZJ. Structural remodeling of vagal afferent innervation of aortic arch and nucleus ambiguus (NA) projections to cardiac ganglia in a transgenic mouse model of type 1 diabetes (OVE26). *The Journal of Comparative Neurology*. 2010;518(14):2771-93.
31. Linden RJ. Function of Cardiac Receptors. *Circulation* 1973;48:463-80.
32. Linke WA, Knöll RH. Cardiac Mechanosensation and Clinical Implications. *The European Journal of Cardiovascular Medicine*. 2010;1(2)33-7.
33. Malliani A, Lombardi F, Pagani M. Sensory innervation of the heart. *Progress in Brain Research*. 1986;67:39-48.
34. Marron K, Wharton J, Sheppard MN, Fagan D, Royston D, Kuhn DM, de Leval MR, Whitehead BF, Anderson RH, Polak JM. Distribution, Morphology, and Neurochemistry of Endocardial and Epicardial Nerve Terminal Arborizations in the Human Heart. *Circulation*. 1995;92:2343-51.
35. Mazzone SB. An overview of the sensory receptors regulating cough. *Cough*. 2005;1:1-9.
36. Meytling HA. Structure and significance of the peripheral extension of the autonomic nervous system. *The Journal of Comparative Neurology*. 1953;99(3):495-543.
37. Michailow S. Zur Frage uber den feineren Bau des intracardialen Nervensystems. *Anat Anz*. 1908;97:24-32.
38. Miller MR, Kasahara M. Studies on the nerve endings in the heart. *American Journal of Anatomy*. 1964;115(2):217-33.
39. Mitchell GAG. Visceral nerves demonstrated by combined intravital and supravital techniques. *Acta Anatomica*. 1953;18(2):81-6.

40. Morison A. On the innervation of the sino-auricular node (Keith-Flack) and the auriculo-ventricular bundle (Kent-His). *Journal of Anatomy and Physiology*. 1912;46(4):319-27.
41. Muers MF, Sleight P. Action potentials from ventricular mechanoreceptors stimulated by occlusion of the coronary sinus in the dog. *Journal of Physiology* 1972b;221:283-309.
42. Muers MF, Sleight P. The reflex cardiovascular depression caused by occlusion of the coronary sinus in the dog. *Journal of Physiology*. 1972a ;221(2):259-82.
43. Nettlehip WA. Experimental studies on the afferent innervation of the cat's heart. *The Journal of Comparative Neurology*. 1936;64(1):115–33.
44. Nettlehip WA. Experimental studies on the afferent innervation of the cat's heart. *The Journal of Comparative Neurology*. 1936;64(1):115–33.
45. Nonidez JF. Identification of the receptor areas in the venae cavae and pulmonary veins which initiate reflex cardiac acceleration. (Bainbridge's reflex). *American Journal of Anatomy* 1937;61(2): 203-31.
46. Oberg B, Thoren P. Increased activity in left ventricular receptors during hemorrhage or occlusion of caval veins in the cat-A possible cause of vasovagal reaction. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1972b; 85:164-73.
47. Oberg B, Thoren P. Studies on left ventricular receptors, signalling in non-medullated vagal afferents. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1972a; 85:145-63.
48. Olufsen MS, Ottesen JT, Tran HT, Ellwein LM, Lipsitz LA, Novak V. Blood pressure and blood flow variation during postural change from sitting to standing: model development and validation. *American Journal of Physiology*. 2005;99:1523-37.
49. Paintal AS. A study of right and left atrial receptors. *The Journal of Physiology*. 1953;20:596-610.
50. Paintal AS. Vagal sensory receptors and their reflex effects. *Physiological review*. 1973;53(1):159-227.
51. Pintelon I, Brouns I, De Proost I, Van Meir F, Timmermans JP, Adriaensen D. Sensory Receptors in the Visceral Pleura Neurochemical Coding and Live Staining in Whole Mounts. *Cell Molecular Biology*. 2007;36:541–51.
52. Qin C, Du J, Tang J, Foreman RD. Bradykinin is Involved in the Mediation of Cardiac Nociception during Ischemia through Upper Thoracic Spinal Neurons. *Current Neurovascular Research*. 2009;6:89-94.

53. Randall DC, Brown DR, McGuirt AS, Thompson GW, Armour JA, Ardell JL. Interactions within the intrinsic cardiac nervous system contribute to chronotropic regulation. *American Journal of Physiology*. 2003;285:1066-75.
54. Rysevaite K, Saburkina I, Pauziene N, Vaitkevičius R, Noujaim S, Jalife J, Pauza DH. Immunohistochemical characterization of the intrinsic cardiac neural plexus in whole-mount mouse heart preparations. *Heart Rhythm*. 2011;8:731-8.
55. Rysevaite K, Saburkina I, Pauziene N, Noujaim S, Jalife J, Pauza DH. Morphologic pattern of the intrinsic ganglionated nerve plexus in mouse heart. *Heart Rhythm*. 2010;8(3):448-54.
56. Sassa K, Miyazaki H. The influence of venous pressure upon the heart-rate. *The Journal of Physiology*, 1920;54(4):203-12.
57. Shepherd JT. The Heart as a Sensory Organ. *Journal of the American College of Cardiology*. 1985;5(6):83-7.
58. Smirnow A. Ueber die sensiblen Nervenendigungen im Hertzen bei Amphibien und Saeugetieren. *Anat. Anz. Bd.* 1895;10(23)735-7.
59. Tsuboi M, Furukawa Y, Nakajima K, Kurogouchi F, Chiba S. Inotropic, chronotropic, and dromotropic effects mediated via parasympathetic ganglia in the dog heart. *American Journal of Physiology*. 2000;279:1201-7.
60. Von Bezold A, Hirt L. Über die physiologischen Wirkungen des essigsauen Veratrin. *Untersuchungen aus dem physiologischen*. 1867;1:75-156.
61. Whitteridge D. Afferent nerve fibres from the heart and lungs in the cervical vagus. *The Journal of Physiology*. 1948;107:496-512.
62. Woolard HH. The Innervation of the Heart. *Journal of Anatomy*. 1926;60(4):345-73.
63. Выропаев ДН. Нервные регуляторные аппараты человека. In: Лаврентьев БИ, editor. *Морфология чувствительной иннервации внутренних органов*. Москва: Издательство Академии Медицинских Наук СССР; 1947. p 70-83.
64. Лаврентьев БИ. Чувствительные нервные аппараты сердца. In: Лаврентьев БИ, editor. *Морфология чувствительной иннервации внутренних органов*. Москва: Издательство Академии Медицинских Наук СССР; 1947. p 40-5.



65. Плечкова ЕК. Рецепторы миокарда и коронарных сосудов. In: Лаврентьев БИ, editor. Морфология чувствительной иннервации внутренних органов. Москва: Издательство Академии Медицинских Наук СССР; 1947. p 46-69.

## **Padėka**

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovui prof. D. H. Paužai už suteiktą galimybę atlikti magistro darbą LSMU Anatomijos katedros Elektroninės mikroskopijos laboratorijoje. Taip pat labai dėkoju dokt. K. Rysevaitei už pagalbą ruošiant preparatus ir naudingos informacijos suteikimą magistrinio darbo rašymo metu.