LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

Ignas Sabeckis

ŠIRDIES VIDUSIENINIŲ AFERENTINIŲ STRUKTŪRŲ ANATOMIJA: RECEPTORIAI, NERVINĖS SKAIDULOS IR NEURONŲ KŪNAI

Daktaro disertacija
Gamtos mokslai,
biologija (N 010)

Kaunas, 2026

Disertacija rengta 2021–2025 metais Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos fakulteto Anatomijos institute.

Mokslinis vadovas

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

Disertacija ginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto biologijos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkė

prof. dr. Ingrida Balnytė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

Nariai:

prof. habil. dr. Vaiva Lesauskaitė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010);
prof. dr. Edgaras Stankevičius (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010);
doc. dr. Gediminas Račkauskas (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001);
doc. dr. Mindaugas Račkauskas (Floridos universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Disertacija bus ginama viešajame biologijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2026 m. rugpjūčio 28 d. 14 val. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto centrinių rūmų prof. J. Žilinsko auditorijoje.
Disertacijos gynimo vietos adresas: A. Mickevičiaus g. 9, LT-44307 Kaunas, Lietuva.

LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES

Ignas Sabeckis

ANATOMY OF INTRACARDIAC AFFERENT STRUCTURES: RECEPTORS, NERVE FIBRES AND NEURONAL BODIES

Doctoral Dissertation
Natural Sciences,
Biology (N 010)

Kaunas, 2026

The dissertation has been prepared at the Institute of Anatomy, Faculty of Medicine of Lithuanian University of Health Sciences during the period of 2021–2025 year.

Scientific Supervisor:

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

The dissertation is defended at the Biology Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences.

Chairperson

Prof. Dr. Ingrida Balnytė (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biology – N 010).

Members:

Prof. Dr. Habil. Vaiva Lesauskaitė (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biology – N 010);
Prof. Dr. Edgaras Stankevičius (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biology – N 010);
Assoc. Prof. Dr. Gediminas Račkauskas (Vilnius University, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001);
Assoc. Prof. Dr. Mindaugas Račkauskas (University of Florida, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

Dissertation will be defended at the open session of the Biology Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences on 28th of August 2026 at 2 p.m. in Prof. J. Žilinskas auditorium, Main Building, of the Lithuanian University of Health Sciences.
Address: A. Mickevičiaus 9, LT-44307 Kaunas, Lithuania.

TURINYS

SANTRUMPOS 7

ĮVADAS 9

Darbo tikslas ir uždaviniai 10
Mokslinis darbo naujumas ir reikšmė 11

1. LITERATŪROS APŽVALGA 13

1.1. Širdies ekstraorganinė nervinė sistema 13
1.2. Širdies vidusieninė nervinė sistema 14
1.3. Vidusieninių mazgų morfologija ir vidusieninių neuronų neurocheminis fenotipas 16
1.4. Širdies neuronų plastiškumas 17
1.5. Galimi širdies terapinių intervencijų taikiniai 18
1.6. ŠVNS vaidmuo širdies ir kraujagyslių ligų patofiziologijai 18
1.7. Širdies mažos intensyviai fluorescuojančios ląstelės 21
1.8. Širdies nervinės galūnės 22
1.9. Širdies refleksogeninės zonos 23
1.10. ŠVNS ir prieširdžių natriurezinį peptidą sintezuojantys kardiomiocitai 24
1.11. Širdies reinervacija po organo transplantacijos 27
1.12. Širdies juntamoji inervacija ir transplantacija 29
1.13. Širdies skausmo kilmės ir plitimo mechanizmai 32

2. TYRIMŲ MEDŽIAGA IR METODAI 34

2.1. Tyrimo medžiaga 34

2.1.1. Laboratoriniai gyvūnai 34
2.1.2. Žmogaus medžiaga 34

2.2. Morfologiniai tyrimai 35

2.2.1. Preparavimas ir audinių paruošimas 35
2.2.2. Imunohistochemija 35
2.2.3. Širdies vidusieninių kraujagyslių vizualizacija 37
2.2.4. Visos širdies preparatai 38

2.3. Mikroskopavimas ir duomenų rinkimas 39

2.3.1. Konfokalinė lazerinė skenuojančioji mikroskopija 39
2.3.2. MIF ląstelių analizė 39
2.3.3. MIF ląstelių sankaupų identifikavimas 40
2.3.4. Nervinių galūnių kiekybinis įvertinimas ir schematizavimas 40
2.3.5. Puokščių tipo (JNG) nervinių galūnių statistinė analizė 41

3. REZULTATAI 42
3.1. Visos širdies preparatuose histocheminiu acetilcholinesterazės (AChE) metodu nustatytos nervinės galūnės 42
3.2. Širdies išklotinės preparatuose imunohistochemiškai nustatytos juntamosios nervinės galūnės 45
3.3. MIF ląstelių morfologiniai tipai, jų pasiskirstymas ir inervacija 53
4. REZULTATŲ APTARIMAS 64
4.1. Širdies nervinių galūnių morfologiniai tipai, jų sandara, pasiskirstymas ir galima funkcinė reikšmė 64
4.2. Širdies MIF ląstelių inervacija 66
4.3. Galima audinių paruošimo įtaka tyrimo rezultatams ir jų vertinimui 69
IŠVADOS 70
SUMMARY 72
BIBLIOGRAFIJOS SĄRAŠAS 106
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS 120
CURRICULUM VITAE 121
PADĖKA 123

SANTRUMPOS

ACh	–	acetilcholinas
AChE	–	acetilcholinesterazė
ADRS	–	antikūnų skiedimo reagentas (angl. *antibody diluent reagent solution*)
AF488	–	žalią fluorescenciją skleidžiantis žymuo
ATP	–	adenozin-5´-trifosfatas
BNP	–	B tipo natriurezinis peptidas
cAMP	–	ciklinis adenozin-5´-monofosfatas
CGRP	–	kalcitonino geno peptidas
ChAT	–	cholino acetiltransferazė
CNP	–	C tipo natriurezinis peptidas
Cy3	–	oranžinės fluorescencijos žymuo (Cyanine3)
Cy5	–	tolimosios raudonos fluorescencijos žymuo (Cyanine5)
DMSO	–	dimetilsulfoksidas
DRA	–	nugarinis dešiniojo prieširdžio porezginys (angl. *dorsal right atrial ganglionated subplexus*)
GAL	–	galaninas
JNG	–	juntamosios nervinės galūnės
HCN	–	hiperpoliarizacijos aktyvinami ciklinių nukleotidų valdomi kanalai
HuC/HuD	–	neuroniniai RNR surišantys baltymai HuC ir HuD
IPN	–	tarpkojytinis branduolys (angl. *interpeduncular nucleus)*
K-NG	–	krepšelio tipo nervinės galūnės
LC	–	kairysis vainikinis porezginys (angl. *left coronary ganglionated subplexus*)
LD	–	nugarinis kairiojo prieširdžio porezginys (angl. *left dorsal ganglionated subplexus*)
L-DOPA	–	L-3,4-dihidroksifenilalaninas
LEL	–	pomidorų lektinas
M2	–	M2 muskarininiai acetilcholino receptoriai
MD	–	vidurinis nugarinio paviršiaus porezginys (angl. *middle dorsal ganglionated subplexus*)
MIF ląstelės	–	mažos intensyviai fluorescuojančios ląstelės
NDS	–	normalus asilo serumas
NE	–	noradrenalinas
nNOS	–	neuroninė azoto oksido sintazė
NO	–	azoto monoksidas
NS	–	nervinės skaidulos
NPY	–	neuropeptidas Y
PB	–	fosfatinis buferis (angl. *phosphate buffer*)
PBS	–	fosfatu buferizuotas fiziologinis tirpalas (angl. *phosphate-buffered saline*)
PFA	–	paraformaldehido tirpalas
PGP 9,5	–	proteino geno produktas 9,5
PNP	–	prieširdžių natriurezinis peptidas

RC	–	dešinysis vainikinis porezginys (angl. *right coronary ganglionated subplexus*)
SP	–	medžiaga P (angl. *substance P)*
ŠVNS	–	širdies vidusieninė nervinė sistema
TH	–	tirozino hidroksilazė
VIP	–	vazoaktyvusis žarnyno peptidas (angl. *vasoactive intestinal peptide)*
VLA	–	pilvinis kairiojo prieširdžio porezginys (angl. *ventral left atrial ganglionated subplexus*)
VRA	–	pilvinis dešiniojo prieširdžio porezginys (angl. *ventral right atrial ganglionated subplexus)*

ĮVADAS

Širdies veiklos nervinė reguliacija yra hierarchiškai organizuota nervinių ląstelių sistema, kurioje centriniai, užširdiniai ir širdies vidusieniniai nerviniai dariniai veikia kaip funkciškai darnus neuronų tinklas [1–6]. Ypač svarbią vietą šiame tinkle užima širdies vidusieninė nervinė sistema (ŠVNS). Tai yra širdyje lokalizuotas neuronų kūnų ir nervinių skaidulų rezginys, atliekantis vietinių nervinių signalų priėmimo, apdorojimo ir perdavimo aukštesniems neuronams funkciją, per kurią yra reguliuojami širdies ir kraujagyslių sistemos atsakai į kintamus hemodinaminius ir metabolinius poreikius [1, 2, 4, 5, 7–10]. Nors ŠVNS neveikia izoliuotai ir yra susijusi su krūtinės bei kaklo užširdiniais nerviniais mazgais ir centrine nervų sistema, tačiau ji sudaro ir vietinės širdies nervinės kontrolės pagrindą. Žmogaus širdyje ši sistema pirmiausia siejama su epikardiniu nerviniu rezginiu, o širdį nervinėmis skaidulomis aprūpinantys užširdiniai nervai yra susikoncentravę prie didžiųjų kraujagyslių ančių, taip vadinamuosiuose širdies vartuose [11–14].

Vidusieninį širdies nervinį rezginį sudaro ne tik įvairių funkcijų nervinės skaidulos, bet ir epikardiniai nerviniai mazgai, kurių vieta, forma, dydis ir skaičius įvairių gyvūnų širdyse yra nevienodi. Epikardiniai mazgai telkiasi tik tam tikrose širdies sienų vietose, o juose neuronai sudaro rezginį, kuriame yra parasimpatinių, simpatinių ir tikėtina vidusieninių juntamųjų (aferentinių) nervinių skaidulų [12, 15–21]. Daugelio tyrėjų nustatyta ir patvirtinta epikardinio nervinio rezginio sandaros ir funkcinio fenotipo įvairovė rodo, kad vidusieninės širdies nervinės reguliacijos procese dalyvauja ir eferentinės, ir aferentinės nervinės struktūros [12, 22–24]. Norint širdies nervinę reguliaciją gerai suprasti, svarbu žinoti vidusieninių neuronų sandarą, jos įvairovę, jų gebėjimą keistis dėl amžėjimo, miokardo infarkto ir kitų patologinių būklių.

Širdies juntamieji (aferentiniai) neuronai yra esminė šio organo nervinės reguliacijos dalis. Širdyje kilę aferentiniai signalai inicijuoja lokalius ir centrinius nervinius refleksus, kuriuose dalyvauja nervinės skaidulos, nervinės galūnės ir neuronų kūnai, išsidėstę skirtinguose širdies sienos vietose esančiuose nerviniuose mazguose [5, 25–31]. Todėl širdies refleksogeninių zonų anatomija turi būti analizuojama tiriant užširdines ir vidusienines aferentines struktūras. Ypač svarbios yra šiuo metu vos keliose laboratorijose tiriamos epikardiniuose nerviniuose mazguose tarp nervinių ląstelių kūnų paplitusios juntamosios nervinės galūnės, kurios širdyje tikėtina tiesiogiai moduliuoja vidusieninių eferentinių neuronų funkciją [24, 32].

Neseniai ištirta, kad epikarde ir endokarde yra paplitusios morfologiškai savitos nervinės galūnės, kurios širdyje tikėtina inicijuoja aferentinius signalus, perduodamus antriesiems aferentiniams neuronams, esantiems tiek nuga-

ros smegenyse, tiek smegenų kamieno dangčio juntamuosiuose branduoliuose. Šios nervinės galūnės gali būti nugarinių, klajoklio nervo ir vidusieninių pirmųjų aferentinių neuronų periferinių aksonų galūnės. Iki šiol žinomi du jų morfologiniai tipai. Pirmojo, arba puokščių, tipo nervinės galūnės aptinkamos endokarde ir epikarde, o antrojo, arba krepšelio, tipo nervinės galūnės, turinčios tipiškus juntamųjų neuronų neuropeptidus (medžiaga P ir CGRP), pasiskirsto aplink kai kuriuos širdies vidusieninių nervinių mazgų neuronus [33]. Be paminėtų nervinių struktūrų širdies funkcijų nervinės reguliacijos procese tikėtina dalyvauja ir mažos intensyviai fluorescuojančios (MIF) ląstelės, kurių morfologija, pasiskirstymas ir nerviniai ryšiai yra taip pat galbūt reikšmingi aiškinant vietinius ir išorinius širdies reguliacijos mechanizmus [34]. Mūsų ištirtas MIF ląstelių inervacijos pobūdis rodo, kad juntamoji ir autonominė širdies kontrolė gali būti glaudžiai susijusi su išoriniais ir tikėtina su vietiniais aferentiniais neuronais [34]. Jei ateityje būtų patvirtintas intrakardinių aferentinių neuronų egzistavimas ir žmogaus širdyje, tai jų anatomijos žinios pirmiausia padėtų patobulinti klinikines širdies transplantacijos technologijas. Šios funkcinės grupės neuronų gyvybingumas transplantuotoje širdyje leistų išsaugoti jos intrakardinius nervinius refleksus, nes po širdies transplantacijos prarandamas organo ryšys ir su simpatinėmis, ir su parasimpatinėmis aferentinėmis nervinėmis skaidulomis. Dėl šios priežasties širdies vidusieninis nervinis rezginys tikėtina tampa deaferentinis [35–37]. Panašius struktūrinius padarinius gali ir tikriausiai sukelia ir kitos chirurginės širdies intervencijos, miokardo infarktas, širdies nepakankamumas bei kitos širdies patologinės būklės, galinčios pažeisti širdies vidusieninius nervus ir nervinius mazgus arba sukelti jų struktūrinius bei funkcinius pokyčius, ypač širdies aritmijas. Todėl šioje disertacijoje aprašyti ir analizuojami naujausi mūsų ir kitų tyrėjų duomenys apie širdyje paplitusius nervinius receptorius, aferentinių nervinių skaidulų plitimo kelius ir tikėtiną aferentinių neuronų kūnų vietą. Pastarieji yra struktūriniai širdies nervinių refleksų komponentai, lemiantys širdies veiklos nervinę reguliaciją esant normaliomis ir patologijos sąlygomis.

Darbo tikslas ir uždaviniai

Darbo tikslas

Nustatyti širdies vidusieninių aferentinių struktūrų anatomiją ir apibūdinti jų pasiskirstymą, sandarą, cheminį fenotipą ir galimą nervinį ryšį su širdies vidusieniniais neuronais bei mažomis intensyviai fluorescuojančiomis ląstelėmis.

Uždaviniai:

1. Nustatyti širdies nervinių galūnių morfologinius ir cheminius tipus bei jų pasiskirstymą žmogaus ir skirtingų rūšių gyvūnų širdyse taikant įvairius nervinių galūnių vizualizavimo metodus.
2. Atlikti žmogaus ir skirtingų rūšių gyvūnų įvairių širdies vietų nervinių galūnių morfometrinę analizę ir įvertinti tarprūšinius skirtumus.
3. Ištirti nervinių galūnių ryšį su širdies mažomis intensyviai fluorescuojančiomis ląstelėmis ir vidusieninių nervinių mazgų neuronų kūnais, įvertinti galimą jų reikšmę vidusieniniams neuroreguliaciniams mechanizmams.

Mokslinis darbo naujumas ir reikšmė

Disertacijoje aprašyti tyrimų rezultatai, atskleidžiantys žmogaus bei penkių rūšių gyvūnų širdžių nervinių galūnių pasiskirstymą ir morfologinius modelius. Šiame darbe pateikiame anatominius įrodymus, kad širdyje yra dviejų tipų nervinės galūnės. Be to, siūloma hipotezė, kad širdies refleksogeninės zonos, tikėtina, apima ne tik epikardo ir endokardo sritis, kuriose daug puokščių tipo nervinių galūnių, bet ir vidusieninius mazgus, kuriuose neuronų kūnai yra tiesiogiai moduliuojami aferentinių nervinių skaidulų, turinčių krepšelio tipo nervines galūnes.

Šiame darbe pirmą kartą pateikiame anatominius duomenis, įrodančius mažų intensyviai fluorescuojančių (MIF) ląstelių inervaciją žiurkių širdyje, ir aprašome žiurkių širdies MIF ląstelių struktūrinę įvairovę bei nervinių skaidulų citocheminius tipus, sudarančius galimus sinapsinius ryšius su šiomis ląstelėmis. Taip pat aptariame galimą širdies nervinės reguliacijos mechanizmą, vykstantį per MIF ląsteles. Pasiūlyta nauja hipotezė apie širdies MIF ląstelių nervinius ryšius su simpatinėmis, parasimpatinėmis ir klajoklio nervo juntamosiomis nervinėmis skaidulomis suteikia naujų įžvalgų apie širdies nervinę reguliaciją ir praplečia supratimą apie galimą MIF ląstelių įtaką širdies veiklai.

Disertacijoje pateikti anatominiai duomenys išplečia supratimą apie klajoklio nervo įtaką širdies nervinei reguliacijai ir suteikia galimybę paaiškinti dar ne iki galo suprastą reiškinį, kai elektrinė ar kita klajoklio nervo skaidulų stimuliacija sukelia paradoksinį simpatinį poveikį širdies veiklai. Mūsų gauti rezultatai atskleidžia galimą klajoklio nervo juntamųjų neuronų moduliacinį poveikį stiprinant simpatinį širdies aktyvumą ir gali padėti geriau suprasti širdies aritmijų bei kitų širdies nepakankamumo ligų vystymąsi, susijusį su autonominės širdies reguliacijos pusiausvyros sutrikimu.

Apibendrinant galima teigti, kad pateikti anatominiai duomenys apie širdies MIF ląstelių inervaciją leidžia pagrįsti simpatinio širdies aktyvumo stiprėjimo mechanizmą, susijusį su klajoklio nervo aferentinių skaidulų įtaka, ir praplėsti klinikinių duomenų interpretavimo galimybes pasirenkant širdies aritmijų gydymo metodus. Tai ypač aktualu taikant širdies neuroabliacijos metodą, kuris įprastai skiriamas padidėjusiam parasimpatiniam tonui normalizuoti bei nereguliariam širdies ritmui koreguoti. Tačiau tam tikrais atvejais jį naudojant galima nepasiekti pageidaujamo rezultato arba negrįžtamai sutrikdyti nervinę širdies kontrolę.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Širdies ekstraorganinė nervinė sistema

Širdies simpatiniai nervai nukreipia adrenergines užmazgines nervines skaidulas iš kaklinių bei žvaigždinio simpatinių mazgų į širdį. Šiuose simpatiniuose mazguose esančius adrenerginius užmazginius neuronus pasiekia nervinės skaidulos ikimazginių cholinerginių neuronų, esančių nugaros smegenų krūtininių T1–T5 segmentų tarpiniame šoniniame branduolyje. Tačiau tiksli žmogaus ir kitų žinduolių širdies simpatinių adrenerginių nervinių skaidulų kilmė vis dar yra diskusijų objektas [38]. Pagrindinis užmazginių simpatinių neuronų neuromediatorius yra noradrenalinas. Tačiau užmazginiai simpatiniai neuronai taip pat gali sintezuoti ir pernešti į aksonų terminales ir kitus neuromediatorius, pvz., neuropeptidą Y (NPY), galaniną (GAL), adenozin-5´-trifosfatą (ATP), serotoniną ir histaminą [39–42]. Katecholaminų sintezė priklauso nuo kelių pagrindinių fermentų aktyvumo. Tirozino hidroksilazė katalizuoja tirozino virtimą L-3,4-dihidroksifenilalaninu (L-DOPA), o dopamino β-hidroksilazė katalizuoja dopamino hidroksilinimą susidarant noradrenalinui. Iš simpatinių nervų galūnių išsiskiriantys katecholaminai didina širdies susitraukimų dažnį ir susitraukimo jėgą aktyvindami β1 adrenerginius receptorius prieširdinio skilvelių mazgo ląstelėse ir kardiomiocituose [43]. Šis poveikis susijęs su ciklinio adenozin-5´ monofosfato (cAMP) koncentracijos padidėjimu ląstelėje, kai noradrenalinas prisijungia prie širdies β1 adrenerginių receptorių. Dėl šios priežasties spartėja diastolinė depoliarizacija ir didėja ritmo vedlio kanalų katijonų srovė, kurią perduoda hiperpoliarizacijos aktyvinami ciklinių nukleotidų valdomi kanalai (angl. *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels,* HCN) [44]. Šie pokyčiai trumpina atsparumo pakartotiniam sužadinimui laikotarpį (angl. *refractory period*) ir kartu, priklausomai nuo simpatinės užmazginės iškrovos dažnio, reguliuoja skilvelių susitraukimo bei atsipalaidavimo greitį [45]. Be tiesioginio poveikio širdies susitraukimų dažniui ir jėgai, NPY ir GAL taip pat slopina acetilcholino išsiskyrimą iš greta esančių parasimpatinių nervų galūnių [46–48]. Kita vertus, intensyvi simpatinė stimuliacija papildomai stiprina širdies susitraukimo jėgą, nes skatina kalcio jonų antplūdį į širdies raumens ląsteles [49]. Pernelyg didelis simpatinis aktyvumas gali išsivystyti dėl įvairių mechanizmų. Pavyzdžiui, dėl nusileidžiančių simpatinių laidų aktyvacijos, simpatinių refleksų slopinimo sutrikimų, barorefleksinės kontrolės praradimo, hipoksijos ar išemijos sukeltos simpatinės aktyvacijos ir slopinančios GABAerginės kontrolės netekimo tarpinių smegenų, smegenų kamieno ar nugaros smegenų lygmenyse [11, 50–52].

Parasimpatiniai ikimazginiai neuronai, dalyvaujantys reguliuojant širdies veiklą, lokalizuojasi pailgosiose smegenyse: dvejiniame branduolyje, nugariniame klajoklio nervo branduolyje ir tarp šių branduolių esančioje srityje. Nuo klajoklio nervo atsiskiria viršutinės ir apatinės kaklinės širdies šakos ir krūtininės širdies šakos, kurios susipindamos su simpatinėmis širdies šakomis sudaro sudėtingą epikardinį nervinį rezginį. Šis rezginys pasižymi funkciniu selektyvumu ir dalyvauja reguliuojant atsparumo pakartotiniam sužadinimui laikotarpį, laidumo trukmę, miokardo susitraukimą bei integruojant sinapsinę informaciją iš vietinių juntamųjų neuronų [53, 54]. Dėl šios priežasties parasimpatinėje nervų sistemoje ikimazginiai neuronai yra ilgesni nei užmazginiai neuronai. Pagrindinis širdį inervuojančių parasimpatinių neuronų neuromediatorius yra acetilcholinas (ACh), tačiau iš parasimpatinių nervinių galūnių gali išsiskirti ir vazoaktyvusis žarnyno peptidas (angl. *vasoactive intestinal peptide*, VIP), ir azoto monoksidas (angl. *nitrogen oxide*, NO) [45, 55]. Acetilcholinas jungiasi prie M2 muskarininių acetilcholino receptorių, todėl miokardo ląstelėse mažėja ciklinio adenozino monofosfato koncentracija. Be to, šių receptorių aktyvinimas atveria specifinius kalio kanalus, sukeliančius hiperpoliarizuojančią srovę, ypač esant ryškiam parasimpatiniam aktyvumui [56]. Parasimpatinis poveikis mažina širdies susitraukimų dažnį pirmiausia hiperpoliarizuodamas sinusinio prieširdžio mazgo ir prieširdinio skilvelių mazgo ląsteles [40].

1.2. Širdies vidusieninė nervinė sistema

Širdies vidusieninė nervinė sistema (ŠVNS) – tai širdyje esantis neuronų ir nervinių skaidulų tinklas, atliekantis integracinę funkciją autonominėje eferentinėje širdies veiklos reguliacijos procesuose [41]. Žinoma, kad ši vidusieninė nervų sistema veikia kaip vietinis nervinės informacijos priėmimo, apdorojimo ir perdavimo centras tarp pačioje širdyje esančių nervinių mazgų, užtikrinantis vadinamąją vietinę nervinę reguliaciją. ŠVNS dalyvauja reguliuodamas širdies ir kraujagyslių sistemos funkcinius atsakus į kintamus organizmo hemodinaminius ir metabolinius poreikius. Tačiau ši sistema neveikia izoliuotai. Ji sudaro sudėtinę hierarchinės autonominės širdies reguliacijos sistemos dalį, apimančią ne tik vidusieninius neuroninius tinklus, bet ir simpatinius ir juntamuosius užširdinius nervinius mazgus bei centrinę nervų sistemą [8, 57].

Širdies vidusieninės nervinės sistemos struktūrinė organizacija išanalizuota daugelyje mokslinių straipsnių, pagrįstų ir eksperimentinių gyvūnų, ir žmogaus tyrimų duomenimis [12, 58–60]. Nustatyta, kad žmogaus ŠVNS gali būti suskirstyta į septynias besijungiančias dalis, pavadintas nerviniais

porezginiais: nugarinį dešiniojo prieširdžio (angl. *dorsal right atrial*, DRA), pilvinį dešiniojo prieširdžio (angl. *ventral right atrial*, VRA), nugarinį kairiojo prieširdžio (angl. *left dorsal*, LD), pilvinį kairiojo prieširdžio (angl. *ventral left atrial*, VLA), vidurinį nugarinio paviršiaus (angl. *middle dorsal*, MD), dešinįjį vainikinį (angl. *right coronary*, RC) ir kairįjį vainikinį (angl. *left coronary*, LC) [12]. Simpatiniai ir parasimpatiniai nervai širdį pasiekia šiais pagrindiniais keliais: driekiasi šalia arterijų, aplink plaučių arterijas ir aortos šaknį arba per veninę širdies vartų sritį – aplink plaučių venų šaknis ir viršutinę tuščiąją veną [61].

Atskirų širdies sričių inervaciją gali užtikrinti ir keli nerviniai porezginiai, ir vienas konkretus porezginys. Remdamiesi nervinių porezgnių struktūrine analize, nustatyta, kad selektyviai pažeidus ar sunaikinus tam tikrus porezginius, galima sukelti specifinių širdies sričių arba net visos širdies denervaciją [12, 60].

Vidusieninių mazgų vieta, forma, dydis ir skaičius labai skiriasi priklausomai nuo rūšies. Manoma, kad jų skaičius gali būti susijęs su širdies funkciniu aktyvumu ir kūno dydžiu, nors ši priklausomybė nėra tiesioginė [11, 12, 37]. Nustatyta, kad stambių gyvūnų ir žmogaus širdies epikarde yra apie 700–1500 vidusieninių mazgų, kurie daugiausia telkiasi funkciškai svarbiose širdies srityse: ties širdies pamatu, tarpprieširdinėje, vainikinėje ir tarpskilvelinėje vagose [11, 12]. Šių mazgų vieta iš dalies sutampa su širdies laidžiosios sistemos sritimis. Manoma, kad vidusieninių mazgų nėra laisvojoje dešiniojo prieširdžio sienelėje, prieširdžių ausytėse, didžiųjų kraujagyslių kamienuose ir didžiojoje skilvelių miokardo dalyje [37, 62].

Vidusieninį nervinį mazgą sudaro heterogeninė neuronų populiacija, apimanti autonominius eferentinius neuronus (parasimpatinius ir simpatinius), vietinių grandinių neuronus bei aferentinius neuronus [57, 63]. Šie neuronai sudaro funkciškai integruotą sistemą, užtikrinančią vietinę nervinę širdies veiklos reguliaciją. Vidusieninių mazgų autonominiai eferentiniai neuronai gali būti aktyvuojami ir mechaninių ar cheminių vietinių dirgiklių, ir aferentinės informacijos, kuri per vietinių grandinių neuronus perduodama kitiems autonominiams eferentiniams neuronams ir lemia atitinkamą moduliacinį atsaką. Tačiau autonominiai eferentiniai neuronai taip pat yra veikiami simpatinių ir parasimpatinių ikimazginių impulsų, gaunamų iš aukštesnių autonominės nervų sistemos hierarchinių centrų [2, 8]. Be to, širdies vidusieninę nervinę sistemą gali tiesiogiai veikti ir kraujyje cirkuliuojantys katecholaminai, darantys įtaką širdies motorinės veiklos reguliacijai [8].

Širdies neuronų hierarchinės organizacijos persitvarkymas gali lemti širdies ligų atsiradimą arba pabloginti jau esamų ligų eigą. Ištikus miokardo infarktui, vidusieniniai neuronai aprūpinami krauju iš užsikimšusios vainikinės arterijos baseino gali patirti patologinių pokyčių, dėl kurių sutrinka jų

funkcija [1]. Esant miokardo išemijai, aferentinių nervų aktyvumas paprastai sumažėja, o vidusieniniai vietinės grandinės neuronai tampa hiperaktyvūs, nes perima aferentinių ir eferentinių signalų perdavimą iš likusio gyvybingo miokardo [64]. Manoma, kad taip siekiama palaikyti eferentinių širdies neuronų funkcinį stabilumą [4]. Tačiau per didelis vidusieninių vietinės grandinės neuronų, dalyvaujančių perduodant aferentinius signalus į eferentines grandis, aktyvumas yra siejamas su prieširdžių virpėjimu [65].

1.3. Vidusieninių mazgų morfologija ir vidusieninių neuronų neurocheminis fenotipas

Ir tarp rūšių, ir tarp individų yra nustatyta vidusieninių mazgų struktūros didelė įvairovė. Jie gali būti ovalios, sferinės, pailgos arba spiralinės formos [41]. Pauža su kolegomis [60] ištyrė kelių žinduolių rūšių širdies mazgus taikydami imunohistocheminius metodus (acetilcholinesterazę). Nors tirtų vidusieninių mazgų forma ir dydis buvo skirtingi, tačiau, atsižvelgiant į trimatę formą, jie buvo suskirstyti į du pagrindinius morfologinius mazgų tipus: sferinius (rutulinius) ir tiesius (paprastus). Sferiniai mazgų neuronai buvo tankiai susipakavę į sluoksnius ne daugiau kaip po 100–200 neuronų, o jų užimamas plotas sudarė nuo 0,01 mm^2 iki 0,17 mm^2. Tiesius mazgus sudarė keli neuronai, išsidėstę tiesiškai vienas šalia kito ir turėjo ne daugiau kaip 50 somatinių neuronų. Kaip nustatyta daugumoje autonominių mazgų, neuronų kūnas buvo 15–30 μm skersmens ir 20–45 μm dydžio, atitinkamai trumpojoje ir ilgojoje ašyse [41, 60, 66,]. Vidusieninių neuronų branduoliai paprastai yra jų periferijoje, kurioje matomas ryškus branduolys [11]. Tačiau Horackovos ir kolegų teigimu [67] vidusieniniai neuronai pasižymi įvairiomis morfologijomis: vienpoliai (aferentiniai), bipoliai ir daugiapoliai; dažniausiai randami bipoliai neuronai ir tik retais atvejais vienpoliai [61, 67]. Bipoliai neuronai yra sferinės formos arba tiesūs, iš kiekvieno poliaus driekiasi du neuritai, kurie šakojasi tolyn į keletą papildomų neuritų. Vienpoliai neuronai paprastai yra sferinės formos ir įprastai turi vieną ilgą neuritą, kuris nesišakoja gan ilgą atstumą.

Vidusieniniai neuronai morfologiškai pakinta dėl širdies ligų ir amžėjimo. Vidusieninių neuronų ir jų branduolių plotas padidėja amžėjant. Tačiau vidusieniniuose mazguose esančių satelitinių ląstelių kiekis, neuronų tankumas ir nervinių ląstelių užimamas plotas palaipsniui mažėja. Todėl manoma, kad su amžėjimu susiję pokyčiai turi įtakos širdies veiklai. Pavyzdžiui, vyresnio amžiaus žmonėms sumažėjęs chronotropinis atsakas, kurį sukelia reikšmingas vidusieninių neuronų skaičiaus sumažėjimas [69, 70].

Daug metų buvo manoma, kad širdies mazguose egzistuoja tik parasimpatiniai užmazginiai neuronai, tačiau keli tyrimai nustatė, kad žinduolių širdies nervų sistemoje randamos skirtingos neuronų populiacijos [71, 72]. Kai kurie autoriai tikina, kad širdies neuronų cheminė įvairovė gali atstovauti įvairioms funkcinėms grupėms [40, 70], o širdies mazgų neuronai yra heterogeniniai ir apima du pagrindinius signalų perdavimo tipus: cholinerginius ir adrenerginius [68, 73, 74]. Manoma, kad daugiausia vidusieninių širdies neuronų yra cholinerginiai, išskiriantys acetilcholiną – kaip pagrindinį neuromediatorių – ir vaidinantys slopinamąjį vaidmenį reguliuojant širdies veiklą. Šį faktą nustatė Horackova su kolegomis [68]. Jie įrodė cholinerginių, adrenerginių ir peptiderginių (tariamųjų juntamųjų) nervinių skaidulų ir neuronų kūnų egzistavimą naudodami dvigubą imunohistocheminį žymėjimą. Šis tyrimas parodė, kad didžioji dauguma (~ 75–100 proc.) vidusieninių neuronų buvo teigiami cholino acetiltransferazei ir tik apie 10 proc. jų buvo teigiami tirozino hidroksilazei [40, 68 74]. Antra labiausiai paplitusi širdies neuronų grupė (14 proc.) yra bifenotipinio (cholinerginio-adrenerginio) pobūdžio ląstelės, išskiriančios acetilcholiną kaip neuromediatorių [23]. Šie neuronai taip pat turi galimybę ekspresuoti fermentus, reikalingus noradrenalino sintezei, nors ir negali jo kaupti. Ši neuronų subpopuliacija greičiausiai vaidina svarbų vaidmenį patofiziologiniuose procesuose [40].

1.4. Širdies neuronų plastiškumas

Nervų sistemos kompensacinio mechanizmo galimybės, vadinamos homeostatiniu plastiškumu, yra intensyviai tyrinėjama sritis. Pirmoje nervinio plastiškumo studijoje buvo naudojami priešingi NE ir ACh miocitams sukelti veiksmai siekiant nustatyti perėjimą nuo noradrenerginio perdavimo prie cholinerginio perdavimo simpatiniuose neuronuose, kultivuotuose kartu su širdies miocitais [75]. Simpatiniai neuronai gali įgyti parasimpatinių neuronų savybių vykstant ląstelių remodeliacijai (dediferenciacijai, transdiferenciacijai arba abiem būdais) [76]. Pastaruoju metu ši savybė aiškinama neurono vidinio jaudrumo plastiškumu keičiantis jonų laidumui arba dėl cheminės sinapsės stiprumo pokyčių, susijusių su keliomis širdies ir kraujagyslių ligomis [77].

Simpatinis hiperaktyvumas ir dėl šios priežasties sumažėjusi parasimpatinė veikla vis dažniau pripažįstami svarbiomis širdies ir kraujagyslių ligų patogenezės grandimis [78, 79]. Pavyzdžiui, lėtinė skilvelių išemija gali sukelti patologinį neuronų remodeliavimąsi, nes periferinis tinklas labai destabilizuojamas dėl nepastovių skilvelių aferentinių signalų [57]. Tokius duomenis patvirtino Cao su kolegomis [80], kai pastebėjo, kad ūminis skilve-

lių miokardo infarktas (MI) kiaulėms gali sukelti infarktą patyrusio miokardo simpatinę denervaciją ir infarkto ribinės zonos hiperinervaciją.

1.5. Galimi širdies terapinių intervencijų taikiniai

Tobulėjant žinioms apie autonominę nervų sistemą ir jos įtaką širdies ligų patofiziologijai, autonominės reguliacijos moduliavimas tampa vis svarbesniu įvairių širdies ir kraujagyslių ligų gydymo aspektu [81, 82].

Atsižvelgiant į širdies vidusieninės nervinės sistemos reikšmę reguliuojant įvairias širdies funkcijas, vidusieniniai neuronai gali būti laikomi potencialiais širdies ir kraujagyslių ligų gydymo taikiniais. Naujausi tyrimai parodė gerus rezultatus taikant nervinių rezginių abliaciją kairiajame prieširdyje ir aplink plaučių venas gydant prieširdžių virpėjimą [83].

Be to, gydant širdies ir kraujagyslių ligas, galimas ir užširdinis autonominės širdies inervacijos moduliavimas. Tarp naujų neinvazinių ar mažai invazinių gydymo metodų minėtina: inkstų denervacija, nugaros smegenų stimuliacija ir tiesioginė klajoklio nervo stimuliacija. Šie metodai laikomi galimais arterinės hipertenzijos ir širdies nepakankamumo gydymo būdais bei perspektyviomis nefarmakologinėmis antiaritminėmis strategijomis prieširdžių ir skilvelių aritmijoms gydyti [81].

Eksperimentiniai duomenys rodo, kad ir klajoklio nervo, ir nugaros smegenų stimuliacija gali mažinti skilvelinių aritmijų dažnį. Be to, simpatinio poveikio silpninimas abliuojant kaklinį krūtininį (žvaigždinį) mazgą taip pat mažina skilvelinių aritmijų dažnį ir gali būti naudingas pacientams, sergantiems paveldimais aritmijų sutrikimais, pvz., ilgojo QT sindromu ir katecholaminergine polimorfine skilveline tachikardija [84].

1.6. ŠVNS vaidmuo širdies ir kraujagyslių ligų patofiziologijai

Širdies vidusieninė nervinė sistema yra labai svarbi įvairių širdies ir kraujagyslių sistemos patologinių būklių (išeminės širdies ligos, aritmijų, širdies nepakankamumo, hipertenzijos) patogenezei, bei tais atvejais, kai dirbtinai nutraukiama širdies centrinės nervų sistemos inervacija į širdį (pvz., po širdies transplantacijos). Šios sudėtingos sistemos reguliaciniai sutrikimai dažniausiai sukelia padidėjusį simpatinį aktyvumą ir sumažėjusį širdies parasimpatinį atsaką ir prisideda prie neigiamos sergamumo bei mirtingumo prognozės [85].

Keletas tyrimų parodė, kad įvairios širdies ligos sukelia patologinius vidusieninių neuronų pokyčius. Išeminė širdies liga neigiamai veikia miokardą dėl deguonies trūkumo, o nervų remodeliavimasis vyksta krūtinės

ląstos bei centrinės nervų sistemos lygmenyse ir vidusieniniuose neuronuose [57, 86]. Hopkins su kolegomis [86] įrodė, kad esant širdies išemijai, trečdalyje vidusieninių neuronų yra inkliuzų, nustatomas stiprus neuronų padidėjimas (66 × 54 μm; lyginant su 40 × 34 μm normalių neuronų) ir degeneraciniai jų dendritų bei aksonų pokyčiai. Be to, paskelbti pastarųjų metų tyrimai parodė, kad patyrusių miokardo infarktą gyvūnų vidusieniniai neuronai turėjo padidėjusį neuronų jaudrumą, pakitusį sinapsių efektyvumą ir adaptyvų neurocheminių fenotipų persitvarkymą bei širdies vidusieninės nervinės sistemos neuromoduliaciją [87, 88]. Atrodo, kad ŠVNS per pirmas 7 miokardo infarkto dienas iš esmės pertvarkoma ir anatominiame, ir funkciniame lygmenyje. Po miokardo infarkto, infarktą supančioje srityje, uždegiminės ląstelės – įskaitant makrofagus ir miofibroblastus – vaidina pagrindinį vaidmenį gaminant nervų augimo faktorių (angl. *nerve growth factor*, NGF), todėl atsiranda nervinių skaidulų šakojimasis ir simpatinė hiperinervacija [87]. Ilgalaikė nekontroliuojama simpatinės nervų sistemos veikla prisideda prie miokardo pažeidimo, sistolinės disfunkcijos bei mirtinų aritmijų.

Įrodyta, kad neurohormoninė aktyvacija (simpatinės sistemos peraktyvinimas ir renino-angiotenzino-aldosterono sistemos sutrikimai) vaidina pagrindinį vaidmenį širdies nepakankamumo patofiziologijoje. Širdies nepakankamumu sergančių pacientų tyrimai parodė teigiamą koreliaciją tarp mirtingumo ir epinefrino koncentracijos plazmoje. Įdomu tai, kad epinefrinas išsiskiria ne tik iš simpatinės antinksčių sistemos [89], bet ir pačioje širdyje yra katecholaminus sintetinančių neuronų populiacija, sudaranti vidinę adrenerginę sistemą [90]. Remiantis literatūra [92] galima teigti, jog ankstyvoje širdies nepakankamumo stadijoje esminių širdies vidusieninės nervinės sistemos funkcijos pokyčių nėra. Tačiau šios ligos progresavimas sukelia širdies ląstelių ir neuronų hipertrofiją, neuronai žymiai sunkiau sujaudinami, o širdies ląstelės tampa edemiškos [93]. Šie pokyčiai veikia neuronų ryšį, trikdo mazgų funkciją ir silpnina nervinio rezginio neurotransmisiją. Naudojantis tachikardijos sukelto širdies nepakankamumo modeliu buvo įrodyta, kad vidusieninių neuronų atsakas į jų nikotino receptorių aktyvavimą pakito [90], o širdies nepakankamumu sergantiems pacientams žymiai sumažėjo vidusieninių neuronų skaičius [94]. Be to, kai kurie tyrimai rodo, kad širdies nepakankamumas sumažina širdies užmazginių parasimpatinių neuronų ląstelių jaudrumą, tačiau padidina ląstelių jaudrumą širdies užmazginiuose simpatiniuose neuronuose. Atrodo, kad šie pokyčiai priklauso nuo N tipo Ca^{2+} kanalo moduliacijos [95, 96].

Po širdies persodinimo prarandama išorinių širdies neuronų kontrolė, o širdies veiklą moduliuoja vidusieninis nervinis tinklas. Dėl šios priežasties vietoje širdies denervacijos vartojamas terminas „decentralizacija po transplantacijos“ [97, 98]. Ši būklė taip pat sukelia vidusieninių neuronų membra-

nų pokyčius, dėl kurių gali padidėti jaudrumas ir išlikti sinapsinė neurotransmisija nerviniame rezginyje [99]. Toks vidusieninių neuronų prisitaikymas atspindi jų pastangas kompensuoti prarastą centrinės nervų sistemos moduliuojančią įtaką. Be to, širdies chirurginės procedūros (pvz., vožtuvų procedūros, įgimtos rekonstrukcijos, pertvaros defektų taisymas) gali pakeisti ir širdies vidusieninės nervinės sistemos veiklą. Tai susiję su pjūviais, padarytais tose vietose, kurios tankiai išraizgytos vidusieniniais mazgais [37].

Yra keletas kitų širdies vidusieninės nervinės sistemos vaidmens širdies ir kraujagyslių patologijoje pavyzdžių. Vienas jų – Chago liga, kai pastebimas didelis vidusieninių neuronų praradimas [100]. Panašiai yra sergant cukriniu diabetu, kai buvo pastebėtas Nislio medžiagos praradimas vidusieniuose neuronuose [101].

Naujausi klinikiniai duomenys rodo, kad intervencinis poveikis širdies vidusieninei nervinei sistemai gali būti taikomas ne tik prieširdžių virpėjimui gydyti, bet ir simptominei klajoklio nervo kilmės bradikardijai koreguoti, ypač kada ji vyksta su paroksizminėmis tachiaritmijomis. Meng ir kolegos [102] ištyrė 110 pacientų, kuriems buvo nustatyti dažni priešlaikiniai skilvelių susitraukimai arba paroksizminė supraventrikulinė tachikardija kartu su klajoklio nervo bradikardija. Tyrimas parodė, kad dešiniojo prieširdžio viršutinės tuščiosios venos–aortos srities nervinio rezginio modifikacija, atliekama kartu su įprastine tachiaritmijos kateterine abliacija, reikšmingai pagerino elektrofiziologinius sinusinio prieširdžio mazgo ir prieširdinio skilvelių laidumo rodiklius, padidino vidutinį ir minimalų širdies susitraukimų dažnį, sumažino širdies ritmo lėtėjimo rodiklius bei sinkopių dažnį ir dar labiau pagerino pacientų gyvenimo kokybę negu vien tik izoliuota tachiaritmijos abliacija. Šie rezultatai rodo, kad selektyvus ir anatomiškai kryptingas poveikis konkrečiam širdies autonominės inervacijos taikiniui gali turėti aiškią klinikinę naudą [102].

Svarbu tai, kad autoriai pasirinko supaprastintą dešiniojo prieširdžio strategiją, nukreiptą į viršutinės tuščiosios venos ir aortos srities nervinį rezginį (Ao-SVC GP). Straipsnyje ši sritis apibūdinama kaip svarbus klajoklio nervo skaidulų patekimo į prieširdžių nervinius rezginius taškas, per kurį nemaža dalis į prieširdžius nukreiptų klajoklio nervo skaidulų pasiekia kitus prieširdžių nervinius mazgus [11, 102–104]. Ankstesni klinikiniai ir elektrofiziologiniai tyrimai taip pat rodo, kad prieširdžio rezginių modifikacija gali pagerinti sinusinio prieširdžio mazgo funkciją, prieširdinio skilvelio mazgo laidumą ir širdies susitraukimų dažnį [105–108]. Šie duomenys papildo disertacijoje akcentuojamą sampratą, kad širdies vidusieninė nervinė sistema yra topografiškai organizuota, o jos nerviniai mazgai ir rezginiai išsidėstę nevienodai, daugiausia funkciškai svarbiose širdies srityse. Todėl šis klinikinis tyrimas netiesiogiai sustiprina anatominį argumentą, jog tiksli nervinių

širdies struktūrų vieta yra reikšminga ne tik morfologiniu, bet ir terapiniu požiūriu.

Tačiau šio tyrimo rezultatus būtina vertinti kritiškai. Patys autoriai nurodo, kad tyrimas buvo atliktas viename centre, imtis buvo palyginti nedidelė, o nei optimali pacientų atranka, nei galutiniai rezginio modifikacijos efektyvumo kriterijai dar nėra galutinai standartizuoti. Nors Ao-SVC GP modifikacija pagerino bradikardijos rodiklius ir klinikinius simptomus, tačiau ji neturėjo reikšmingos įtakos priešlaikinių skilvelių susitraukimų ar paroksizminės supraventrikulinės tachikardijos pasikartojimui. Autoriai pabrėžia, kad ilgesnėje perspektyvoje galimas autonominės inervacijos atsistatymas, todėl reikalingi ilgesnės trukmės stebėjimai. Dėl šių priežasčių Meng ir kolegų darbas [102] labiau patvirtina principinę galimybę selektyviai moduliuoti ŠVNS, negu galutinai įrodo vieno konkretaus abliacijos taikinio universalią klinikinę vertę.

1.7. Širdies mažos intensyviai fluorescuojančios ląstelės

Mažos intensyviai fluorescuojančios (MIF) ląstelės apibūdinamos kaip katecholaminus sintetinančios ląstelės, esančios žinduolių simpatiniuose nerviniuose mazguose, širdyje ir kitose organizmo vietose. Jų pavadinimas siejamas su ryškia fluorescencija, nustatoma specialiai apdorotuose audiniuose. Senesnėje literatūroje šios ląstelės buvo vadinamos chromafininėmis ląstelėmis dėl jų ryšio su chromo turinčiais dažais. Elektroninės mikroskopijos tyrimuose jos apibūdinamos kaip granulių turinčios ląstelės [109]. Imunohistochemiškai MIF ląstelės dažniausiai identifikuojamos pagal didelę katecholaminų koncentraciją ir tirozino hidroksilazės ekspresiją, todėl šis fermentas laikomas vienu patikimiausių jų žymenų.

Literatūroje dažniausiai išskiriami du MIF ląstelių tipai, besiskiriantys tiek morfologija, tiek, tikėtina, funkcine reikšme [109–110]. I tipo MIF ląstelės dažniausiai aptinkamos pavienės, turinčios ilgas ataugas ir sandara primenančios tarpinius neuronus [111–113]. Dėl to, kad jų ataugos tęsiasi iki gretimų pagrindinių neuronų kūnų, keli autoriai yra iškėlę prielaidą, jog šios ląstelės gali tiesiogiai dalyvauti vietiniame nervinės reguliacijos procese [114–120]. Šią sampratą papildo duomenys, rodantys triptofano hidroksilazės ekspresiją MIF ląstelėse, leidžiančią svarstyti ir galimą jų dalyvavimą serotonerginėje neuromoduliacijoje [121]. Kadangi serotoninas siejamas su širdies susitraukimų dažnio, susitraukimo jėgos ir atsipalaidavimo reguliacija bei su chemiškai jautrių nervinių galūnių aktyvinimu ir kraujagyslių tonuso kaita, todėl tikėtina, kad MIF ląstelių funkcinis vaidmuo gali būti platesnis, nei tik katecholaminų kaupimas ar išskyrimas [122–125]. Be to, kai kurie

autoriai, remdamiesi miego kūnelio pagrindinių ląstelių citocheminėmis, morfologinėmis ir inervacinėmis savybėmis, I tipo MIF ląstelėms priskiria galimą juntamąją funkciją [106–107].

II tipo MIF ląstelės priešingai – dažniausiai sudaro kompaktiškas apvalias sankaupas, neturi ilgų ataugų ir literatūroje dažniau siejamos su endokrinine funkcija [128]. Tokia interpretacija grindžiama keliomis nuosekliai aprašytomis ypatybėmis: tankiai susitelkusiomis katecholaminų granulėmis citoplazmoje [129], membrana apribotomis granulėmis ultrastruktūriniu lygmeniu [130], artimu ryšiu su fenestruotais kapiliarais [109] ir panašumu į chromafinines ląsteles pagal kilmę, morfologiją bei monoaminų sudėtį [131]. Todėl literatūros duomenys leidžia teigti, kad II tipo MIF ląstelės gali veikti kaip lokaliai ar sistemiškai aktyvias medžiagas išskiriančios ląstelės.

Nors abiejų tipų MIF ląstelių morfologiniai ir citocheminiai požymiai literatūroje aprašyti gana nuosekliai, tačiau tikslus jų funkcinis vaidmuo širdyje išlieka diskutuotinas. Dabartiniai duomenys leidžia teigti, kad I tipo MIF ląstelės labiau sietinos su vietine neuromoduliacija ar net juntamąja funkcija, o II tipo – su endokrinine ar parakrinine veikla. Tačiau šios prielaidos vis dar reikalauja išsamesnio funkcinio pagrindimo.

1.8. Širdies nervinės galūnės

Miller ir Kasahara [132] širdies juntamąsias nervines galūnes suskirstė į 3 skirtingus tipus: tinklelio formos (angl. *end-net)*, sudėtingas neinkapsuliuotas galūnes ir retas inkapsuliuotas galūnes. Klasikinėje širdies neuroanatomijos literatūroje neinkapsuliuotos galūnės apibūdinamos kaip išsišakojusios juntamųjų nervų skaidulos, kurių išsišakojimas sudaro puokščių tipo (angl. *flower-spray*) struktūras. Jų sandara skiriasi nuo tinklelio formos ir inkapsuliuotų galūnių. Tinklelio formos galūnės buvo apibūdintos kaip kelių tariamai skirtingų mielininių skaidulų šakotų ataugų junginiai, o sudėtingos neinkapsuliuotos galūnės – kaip atskiros, gausiai išsišakojusios vidutinio arba didelio skersmens nervinių skaidulų struktūros, pasižyminčios didele formos ir dydžio įvairove [132]. Širdyje šios galūnės gausiausiai ištirtos priešširdžių endokarde, ypač didžiųjų kraujagyslių šaknų srityse ir tarppriešširdinėje pertvaroje, todėl jos buvo siejamos su baroreceptoriams arba tempimo receptoriams būdingomis struktūromis [132].

Terminas puokščių tipo pirmiausia apibūdina šių galūnių morfologiją: viena aferentinė nervinė skaidula gale išsišakoja į kelias smulkesnes šakeles, kurios jungiamajame audinyje išsidėsto kaip puokštė. Cheng ir bendraautoriai [26], žymėdami klajoklio nervo aferentines skaidulas DiI injekcijomis į klajoklio nervo apatinį mazgą po viršmazginės deaferentacijos ir tirdami

žiurkės prieširdžių išklotinių preparatus konfokaline mikroskopija, nustatė, jog klajoklio nervo aferentinės skaidulos endokardo jungiamajame audinyje sudaro ir puokščių tipo, ir tinklelio formos galūnes. Šie autoriai pabrėžė, kad jų aprašytos puokščių tipo galūnės morfologiškai atitinka senesnėje literatūroje aprašytas sudėtingas neinkapsuliuotas nervines galūnes [26].

Panašios struktūros aprašytos ir kitose širdies bei kraujagyslių sistemos refleksogeninėse srityse. Cheng ir bendraautoriai [133] žiurkės aortos lanke nustatė klajoklio nervo aferentinių skaidulų struktūras, susijusias ir su chemorecepcinėmis, ir su barorecepcinėmis funkcijomis. Shenton ir bendraautoriai [134] puokščių tipo galūnes ir tinklelio formos galūnes išskyrė kaip dvi morfologiškai skirtingas juntamųjų galūnių rūšis žiurkės širdyje. Puokščių tipo nervinės galūnės buvo nustatytos pasitelkiant metileno mėlynojo dažymo techniką ir vizualizuotos dažniausiai kaip netaisyklingos, apie 100 μm skersmens struktūros. Kazci ir bendraautoriai [135], taikydami transgeninį Phox2b-Cre::tdTomato modelį, parodė, kad klajoklio nervo mazgo aferentinės skaidulos pelės širdyje sudaro į puokščių tipo ir tinklelio formos galūnes panašias struktūras. Be to, Murakami ir bendraautoriai [136] pateikė trimačius ultrastruktūrinius duomenis apie puokščių tipo galūnes žiurkės miego kūnelyje, kuris yra klasikinė barorecepcinė sritis.

Puokščių tipo nervinių galūnių dažniausiai randama mechaniškai aktyviose širdies ir kraujagyslių sistemos vietose. Širdyje jos tradiciškai siejamos su prieširdžių epikardu, endokardu, po endokardu esančiu jungiamuoju audiniu, veninio ančio sritimis ir tarpprieširdine pertvara. Šiuolaikiniai molekuliniai tyrimai taip pat rodo, kad klajoklio nervo juntamieji neuronai yra nevienalytė sistema, kurioje interoceptinė informacija koduojama pagal organą, audinio sluoksnį ir dirgiklio pobūdį. Dėl šios priežasties puokščių tipo nervinės galūnės turėtų būti vertinamos kaip viena morfologiškai atpažįstama šios sudėtingos aferentinės sistemos dalis, o ne kaip vienalytė receptorių populiacija [137].

1.9. Širdies refleksogeninės zonos

Širdies refleksogeninės zonos gali būti apibūdinamos kaip funkciškai specializuotos širdies ir prie jos esančių didžiųjų kraujagyslių neuroanatominės sritys, kuriose išsidėstę širdies receptoriai, juntamosios nervinės galūnės, vidusieniniai neuronai, o autonominiai nerviniai keliai registruoja širdies ertmių slėgio, kraujo tūrio, miokardo tempimo, sienos deformacijos ir vietinės cheminės terpės pokyčius [1, 25, 138–142]. Šios zonos nėra griežtai apribotos anatominės struktūros; veikiau tai topografiškai nevienodai išsidėstę recepciniai laukai, apimantys venų–prieširdžių jungtis, tuščiųjų ir plau-

tinių venų žiotis, prieširdžių ir skilvelių endokardą, skilvelių miokardą ir epikardą, vainikinių kraujagyslių sritis, aortos šaknį ir aortos lanką bei sritis, susijusias su vidusieniniais nerviniais mazgais ir rezginiais [26, 133–135, 138, 139, 143, 144]. Per šiuos recepcinius laukus klajoklio nervo aferentinės skaidulos, nugarinių nervų mazgų neuronų periferinės ataugos ir vidusieninės aferentinės struktūros perduoda informaciją apie mechaninę ir metabolinę širdies būklę centriniams bei periferiniams autonominiams tinklams [1, 4, 25, 141, 145]. Klajoklio nervo širdinės aferentinės skaidulos, kurių neuronų kūnai daugiausia yra apatiniame klajoklio nervo mazge, perduoda informaciją į atskirojo laido branduolius ir dalyvauja refleksiškai reguliuojant širdies susitraukimų dažnį, miokardo susitraukimo jėgą, vazomotorinį tonusą, inkstų simpatinį aktyvumą ir vazopresino išsiskyrimą [134, 141, 144–146]. Nugarinių nervų mazgų širdinės aferentinės skaidulos labiau siejamos su simpatinių refleksų aktyvacija ir nocicepcinių signalų perdavimu, todėl yra ypač svarbios išemijos, uždegiminės stimuliacijos ir širdies skausmo mechanizmams aiškinti [1, 25, 35, 145]. Morfologiniu požiūriu širdies refleksogeninėse srityse nustatomos įvairios terminalinės nervinės struktūros, tinklelio formos ir puokštės tipo bei į intraraumeninius masyvus panašios galūnės, tačiau jų funkcinė reikšmė nėra vienoda ir ne visais atvejais galutinai įrodyta [26, 134, 135, 146]. Todėl širdies refleksogenines zonas tikslinga laikyti integruotais juntamaisiais autonominiais domenais, kuriuose užširdinės klajoklio nervo ir nugarinių nervų aferentinės skaidulos, vidusieniniai nerviniai mazgai ir vietiniai neuroniniai tinklai kartu palaiko širdies ir kraujagyslių homeostazę bei moduliuoja širdies funkciją fiziologijos ir patologijos sąlygomis.

1.10. ŠVNS ir prieširdžių natriurezinį peptidą sintezuojantys kardiomiocitai

Širdis yra polipeptidinius hormonus sintetinantis organas, todėl ji taip pat gali būti priskiriama endokrininiams organams. Širdies gaminamų hormonų biologinis poveikis tiksliniams organams – dalyvaujantiems organizmo skysčių tūrio, slėgio ir cheminės sudėties reguliacijos procesuose – pagrindžia širdies kaip endokrininio organo funkcinį ryšį su kitomis homeostazę palaikančiomis sistemomis. Endokrininė širdies funkcija daugiausia siejama su prieširdžių ausytėmis, tačiau endokrininių savybių turinčių ląstelių aptinkama ir kitose širdies struktūrose: prieširdžių, skilvelių ir tarpskilvelinės pertvaros miokarde bei periferinės širdies laidžiosios sistemos dalyse. Tankiai išsidėsčiusios mioendokrininės ląstelės sudaro endokrininę širdies dalį ir formuoja funkcinius vienetus, atsakingus už įvairių polipeptidinių hormonų sintezę. Svarbiausias iš jų yra prieširdžių natriurezinis peptidas (PNP), dar vadinamas

prieširdžių natriureziniu faktoriumi, atliekančiu reikšmingą įtaką reguliuojant vandens ir elektrolitų pusiausvyrą bei arterinį kraujospūdį [147–149]. Kartu su kitais natriureziniais peptidais – B tipo natriureziniu peptidu (BNP) ir C tipo natriureziniu peptidu (CNP), gaminamu kraujagyslių endotelyje – PNP sudaro polipeptidinių signalinių molekulių šeimą, dalyvaujančią palaikant širdies ir kraujagyslių sistemos homeostazę. PNP ir BNP yra miokardo ląstelių išskiriami hormonai, kurių sintezę lemia tiek fiziologiniai, tiek patologiniai dirgikliai. Nors jų endokrininis poveikis, susijęs su skysčių homeostazės ir arterinio kraujospūdžio reguliavimu, yra plačiai ištirtas, tačiau vis daugiau duomenų rodo, kad šių hormonų funkcijos neapsiriboja vien endokrininiu veikimu. PNP ir BNP taip pat pasižymi reikšmingu autokrininiu ir parakrininiu poveikiu širdies audiniui bei vainikinei kraujotakai. Šis poveikis apima miokardo ląstelių augimo reguliaciją, fibroblastų dauginimosi ir tarpląstelinės medžiagos kaupimosi slopinimą, ląstelių apsauginį priešišeminį – į priešsąlygojimą panašų – (angl. *preconditioning-like*) poveikį, įtaką vainikinių kraujagyslių endotelio ir lygiųjų raumenų ląstelių dauginimuisi bei jų susitraukimui [150, 151]. Be to, padidėjusi PNP koncentracija kraujo plazmoje laikoma patikimu rodikliu, leidžiančiu prognozuoti mirties bei širdies ir kraujagyslių įvykių riziką nepriklausomai nuo tradicinių rizikos veiksnių [152].

Remiantis morfologinių ir fiziologinių tyrimų duomenimis, tiek žmogaus, tiek laboratorinių gyvūnų širdyje mioendokrininės ląsteles inervuoja gausios eferentinės ir aferentinės nervinės skaidulos, nervai bei vidusieninės nervinės ląstelės, lemiančios šių ląstelių simpatinę, parasimpatinę ir juntamąją reguliaciją [153].

Kadangi širdies transplantacija sukelia persodintos širdies denervaciją, todėl sutrinka pagrindiniai nerviniai ir humoraliniai mechanizmai, palaikantys normalią natrio ir skysčių išskyrimo adaptaciją pagal jų suvartojimą [154]. Dėl šios priežasties gali padidėti plazmos tūris ir būti pažeista normali vandens bei mineralinių medžiagų pusiausvyros reguliacija [155]. Be to, ortotopinė širdies transplantacija – kai donoro širdis implantuojama į įprastą recipiento širdies anatominę vietą pašalinus visą ar didžiąją dalį recipiento širdies – lemia širdies mechanoreceptoriuose generuojamos aferentinės informacijos praradimą. Fizinio krūvio metu, kai neuroendokrininę sistemą aktyvina osmoziniai ir nerviniai veiksniai, širdies mechanoreceptorių aferentiniai impulsai normaliomis sąlygomis slopina integracinius centrus pogumburyje ir pailgosiose smegenyse taip ribodami sužadinimo mechanizmų aktyvaciją [156, 157]. Klinikiniai tyrimai parodė, kad širdies transplantacijos recipientų plazmoje prieširdžių natriurezinio peptido koncentracija ramybės būsenoje yra padidėjusi, o fizinio krūvio metu ji būna reikšmingai – maždaug du–tris kartus – didesnė nei kontrolinės grupės [155]. Padidėjusi prieširdžių natriure-

zinio peptido koncentracija dažnai siejama su hipertenzija ir skysčių susikaupimu, todėl po transplantacijos gali išsivystyti komplikacijos, išliekančios kelis mėnesius po operacijos [157, 158].

Širdies transplantacija yra tinkamas eksperimentinis modelis, leidžiantis vertinti alotransplanto denervacijos poveikį PNP sintezei ir sekrecijai. Šiuo požiūriu ypač informatyvi yra širdies ir plaučių transplantacija, nes sudaro galimybę tirti organo denervacijos įtaką PNP sistemai nesant reikšmingo bendros prieširdžių audinio masės padidėjimo, būdingo ortotopinei dviprieširdinei širdies transplantacijai (angl. *orthotopic bi-atrial heart transplantation*), kai paliekama dalis recipiento prieširdžių [159].

Nors gerai žinoma, kad miokardo ląstelės sintetina, kaupia ir išskiria PNP, tačiau širdies autonominės inervacijos vaidmuo inicijuojant PNP sintezę ir sekreciją tebėra diskusijų objektas. Nustatyta, kad širdies transplantacijos recipientai fizinio krūvio metu geba sintetinti ir išskirti PNP į kraują, todėl manoma, kad širdies inervacija nėra būtina šio peptido sekrecijai. Tai leidžia teigti, kad PNP išsiskyrimą reguliuojantys mechanizmai bent iš dalies priklauso nuo kitų veiksnių ir gali veikti nepriklausomai nuo širdies inervacijos [158, 160, 161].

Daugelis tyrėjų mano priešingai. T. y. padidėjusi PNP koncentracija plazmoje patvirtina hipotezę, jog širdies inervacija slopina PNP sekreciją ir ramybės būsenoje, ir po ūminio kraujo tūrio padidėjimo [159, 162, 163].

Kai kurių autorių duomenimis padidėjusi PNP koncentracija plazmoje širdies transplantacijos recipientams gali būti siejama su po transplantacijos išliekančia lėtine širdies deaferentacija [156, 163, 164, 165].

Svarbu pažymėti, kad acetilcholinesterazei pozityvių nervų ir nervinių ląstelių bei bendriesiems neuronų žymenims imunoreaktyvių nervinių struktūrų morfologiniai tyrimai parodė, jog šios struktūros alotransplantuotoje širdyje išlieka net iki 63 mėnesių po transplantacijos [166]. Be to, prieširdžių natriurezinio peptido imunoreaktyvumas miokardo ląstelėse nustatytas tiek donorų, tiek recipientų širdyse. Donoro širdyje nustatyti nervai buvo retesni negu recipiento širdyje ir tik retai pasižymėjo imunoreaktyvumu tirozino hidroksilazei, somatostatinui, vazoaktyviajam žarnyno peptidui, su kalcitonino genu susijusiam peptidui, medžiaga P, neurokininams ar acetilcholinesterazei. Nors po širdies transplantacijos dauguma už širdie ribų esančių nervų išlieka funkciškai denervuoti, tačiau alotransplante vis dar aptinkami gyvybingi vidusieniniai nervai, o miokardo ląstelės išsaugo gebėjimą sintetinti prieširdžių natriurezinį peptidą [166].

Apibendrinant pateiktus duomenis, būtina paminėti keletą svarbių įžvalgų. Nepriklausomai nuo taikomos širdies transplantacijos chirurginės technikos – dviejų tuščiųjų venų ar standartinės dviprieširdinės – transplantuota donoro širdis patiria užširdinę denervaciją, t. y. decentralizaciją, nes operaci-

jos metu širdis yra atskiriama nuo visų donoro už širdies esančių nervų. Kai transplantacija atliekama standartine dvipriešširdine technika ir didžioji dalis recipiento priešširdžių išlieka nepašalinta, jo organizme išsaugomas nemažas kiekis nuosavo priešširdžių audinio, kuris gali ir toliau būti veikiamas įprastos nervinės reguliacijos. Tačiau taikant abu transplantacijos metodus, donoro širdies audiniuose išlieka vidusieninė nervų sistema, kuri, tikėtina, turi įtakos donoro širdies endokrininei funkcijai. PNP sintezės, kaupimo ir sekrecijos lygis širdies transplantacijos recipientams gali būti labai įvairus ir sunkiai prognozuojamas net praėjus daugeliui metų po transplantacijos. Tai priklauso nuo kelių veiksnių: išlikusio recipiento priešširdžių audinio kiekio, transplantuoto donoro širdies audinio, galinčio sintetinti ir išskirti priešširdžių natriurezinį peptidą (PNP), nuo širdies vidusieninės nervų sistemos gyvybingumo ir gausos tiek recipiento priešširdžių, tiek donoro alotransplanto audiniuose. Siekiant palaikyti optimalią PNP koncentraciją plazmoje širdies transplantacijos recipientams, širdies chirurgams svarbu gerai išmanyti mioendokrininių ląstelių pasiskirstymo ypatumus bei tikslią žmogaus širdies vidusieninio nervinio rezginio topografiją. Tai leidžia maksimaliai apsaugoti šias struktūras ir prieš transplantaciją, ir operacijos metu. Išlikusi gyvybinga širdies vidusieninių nervų sistema donoro ir recipiento širdies audiniuose, tikėtina, yra vienas svarbiausių veiksnių, padedančių palaikyti optimalų PNP lygį širdies transplantacijos recipientų organizme.

1.11. Širdies reinervacija po organo transplantacijos

Neabejotina, kad širdies transplantacijos metu nutrūksta visi ryšiai tarp užširdinės ir vidusieninės nervinių širdies sistemos dalių [167, 168]. Ilgą laiką nebuvo fiziologinių duomenų, patvirtinančių transplantuotos žmogaus širdies reinervaciją. Todėl fizinio krūvio metu nustatomas širdies minutinio tūrio padidėjimas pacientams po širdies transplantacijos buvo aiškinamas tik dviem mechanizmais: padidėjusiu veninio kraujo grįžimu ir padidėjusia kraujyje cirkuliuojančių katecholaminų koncentracija [169–171]. 20-to a. aštunto ir net devinto dešimtmečių klinikiniai stebėjimai aiškiai rodė, kad pirmus penkerius metus po širdies transplantacijos funkciniu požiūriu reikšminga širdies reinervacija nevyksta, nes net praėjus penkeriems metams, daugeliui pacientų didžiausias fizinio krūvio pajėgumas ir širdies susitraukimų dažnio atsakas į krūvį išlikdavo mažesni nei normalūs [172].

Pirmi patikimi duomenys apie ribotą transplantuotos žmogaus širdies reinervaciją vėlyvuoju laikotarpiu po širdies transplantacijos (praėjus 3–9 metams) buvo gauti pradėjus širdies radionuklidinei vaizdinei diagnostikai taikyti specifinius simpatinių eferentinių skaidulų žymenis. Naudojant

pozitronų emisijos tomografiją su adrenerginių nervinių skaidulų žymeniu [11C] hidroksiefedrinu, daugumai pacientų po širdies transplantacijos buvo nustatyta simpatinė reinervacija daugiausia priekinės tarpskilvelinės vagos srityje. Nors ramybės būsenoje hemodinaminių skirtumų tarp pacientų, kuriems nustatyta reinervacija, ir pacientų, kuriems ji nenustatyta, nebuvo, tačiau pacientų su reinervacija širdies susitraukimų dažnis ir kontraktilinis atsakas į fizinį krūvį buvo reikšmingai didesnis ir artimesnis sveikų kontrolinių asmenų rodikliams [173–176]. Radiologiniais tyrimais nustatyti simpatinės skilvelių miokardo reinervacijos ir beta adrenerginių receptorių moduliacijos duomenys paneigė hipotezę, kad pacientams po širdies transplantacijos išlieka nuolatinė širdies denervacija [176].

Nors transplantuotos žmogaus širdies simpatinės reinervacijos mastas laikui bėgant didėja, tačiau jis gali labai skirtis tarp pacientų. Be to, įvairiais laikotarpiais po transplantacijos gali būti nustatomas ir visiškai nereinervuotas miokardas. Nustatyta, kad širdies reinervacijai įtakos turi keli veiksniai: klinikinė eiga prieš operaciją, per operaciją ir po jos, donoro ypatybės bei imunogenetiniai veiksniai [174]. Įrodyta, kad reinervacijos mastas koreliuoja su laiku po operacijos ($r = 0,387$), donoro amžiumi ($r = –0,309$), recipiento amžiumi ($r = –0,243$) ir atmetimo epizodų dažniu ($r = –0,267$). Be to, perioperacinės aortos komplikacijos ir aortos užspaudimo laikas buvo atvirkščiai susiję su transplantuotos žmogaus širdies simpatinės reinervacijos mastu ($r = –0,331$). Remiantis pateiktais duomenimis, galima teigti, kad simpatinė reinervacija po širdies transplantacijos nepriklauso tik nuo praėjusio laiko. Ji labiau tikėtina jaunesnio amžiaus donorų ir recipientų atvejais, kai operacija atliekama greitai ir be komplikacijų, o atmetimo epizodai būna retesni [174, 177].

Pažymėtina, kad kai kurie vidusieniniai nervai ilgą laiką po širdies transplantacijos išgyvenusių pacientų širdyse histologiškai buvo nustatyti maždaug dešimtmečiu anksčiau, negu transplantuotų širdžių reinervacija buvo patvirtinta pozitronų emisijos tomografija naudojant katecholaminų analogą [11C] hidroksiefedriną [170]. Deja, šie svarbūs anatominiai atradimai tuo metu nebuvo tinkamai įvertinti nei gydytojų praktikų, nei pačių morfologų, nes vyravo nuomonė, kad normali miokardo inervacija transplantuotoje žmogaus širdyje tikriausiai neatsistato net ir praėjus 12 metų po operacijos, o transplantuotose širdyse nustatyti nervai ir nervinės skaidulos galėjo būti kilę tik iš išlikusių donoro užmazginių parasimpatinių neuronų [166, 170]. Ankstyva skilvelių audinio reinervacija taip pat buvo patvirtinta autotransplantuotos šuns širdies modeliu praėjus vieneriems metams po transplantacijos [178]. Svarbu pažymėti, kad autotransplantuotoje šuns širdyje histologiniais tyrimais buvo nustatyta: vidusieninių nervų eiga per siūlių linijas, pakartotinai atsiradusi neuroninė įeiga į miokardą ir širdies nervinių mazgų

ląsteles iš užširdinių simpatinių eferentinių neuronų bei parasimpatinių eferentinių ikimazginių neuronų. Tačiau šie struktūriniai pokyčiai neatsispindėjo nei širdies ritmo kintamume, nei skilvelių beta adrenerginių receptorių funkcijoje, nes beta adrenerginių receptorių gimiringumas ir tankis išliko normalūs [178]. Apibendrinant galima teigti, kad transplantuotos širdies reinervacija gali įvykti skirtingu laiku po operacijos, tačiau jos mastas ir pobūdis priklauso nuo daugelio prieš tai aptartų veiksnių.

1.12. Širdies juntamoji inervacija ir transplantacija

Neuroniniai juntamieji mechanoreceptoriai (baroreceptoriai) ir chemoreceptoriai yra plačiai pasiskirstę širdies sienelėse ir vainikinėse kraujagyslėse. Jų sužadinimas lemia įvairias refleksines širdies ir kraujagyslių sistemos reakcijas [179]. Širdies chirurginės intervencijos gali iš esmės pakeisti aferentinių neuronų gebėjimą priimti ir perduoti informaciją apie širdies mikroaplinką, nes pooperaciniu laikotarpiu pakinta visa širdies neuroninės reguliacijos hierarchija, atsakinga už signalų iš širdies audinių integraciją ir perdavimą [180].

Po širdies transplantacijos atsirandanti širdies aferentinių nervų denervacija keičia fiziologinį organizmo atsaką į fizinį krūvį. Nustatyta, kad transplantacijos recipientams fizinio krūvio metu noradrenalino koncentracija yra reikšmingai didesnė, nors ir pradinė šio mediatoriaus koncentracija šios grupės veniniame kraujyje taip pat buvo didesnė ($p < 0,05$; dispersinė analizė). Manoma, kad padidėjęs simpatinis aktyvumas yra kompensacinis atsakas į pakitusią širdies funkciją, atsirandančią dėl toninio simpatinės veiklos slopinimo netekimo, nulemto širdies receptorių degeneracijos [181].

Po širdies transplantacijos baroreceptorių, esančių širdies skilvelių sienose, aferentinė denervacija gali sutrikdyti refleksinę vazodilataciją ir paveikti kraujo tūrio homeostazę ir arterinio kraujospūdžio reguliaciją bei prisidėti prie hipervolemijos ir arterinės hipertenzijos išsivystymo [182, 183]. Nustatyta, kad pacientams po širdies transplantacijos kraujospūdžio pereinamieji pokyčiai pasižymi sistolinio kraujospūdžio sumažėjimu ir mažesne jo atsikūrimo tendencija lyginant su sveikais asmenimis. Tačiau duomenys, rodantys normalius kraujospūdžio pereinamuosius pokyčius esant ryškiai širdies aferentinių nervų denervacijai po transplantacijos, verčia abejoti vidusieninių, ypač skilvelių sienoje esančių, receptorių reikšme refleksiniam kraujospūdžiui reguliuoti [184].

Taip pat sukaupta pakankamai duomenų, įrodančių, kad po širdies transplantacijos atsiradusi širdies aferentinių nervų denervacija keičia organizmo atsaką į laipsniškai didinamą neigiamą apatinės kūno dalies slėgį, t. y.

ir į kardiopulmoninių baroreceptorių mechaninės apkrovos sumažėjimą. Taikant neigiamą apatinės kūno dalies slėgį (–10, –20 ir –40 mm Hg), pacientų po širdies transplantacijos vidutinio arterinio kraujospūdžio, dilbio kraujagyslių pasipriešinimo ir norepinefrino koncentracijos plazmoje atsakai buvo gerokai silpnesni negu sveikų asmenų. Svarbu pažymėti, kad susilpnėjęs atsakas į laipsniškai didinamą neigiamą apatinės kūno dalies slėgį nėra susijęs su imunosupresiniais vaistais, vartojamais po širdies transplantacijos, nes pacientams po inkstų transplantacijos, gydytiems panašiu režimu, buvo nustatytas sustiprėjęs dilbio kraujagyslių vazokonstrikcinis atsakas [185].

Ankstesni tyrimai parodė, kad širdies aferentinių nervų aktyvinimas žmogui sukelia itin specifišką refleksinį poveikį regioninio vazomotorinio tonuso reguliacijai. Chemiškai jautrių skilvelinių aferentinių nervų aktyvinimas gali sukelti arba difuzinę refleksinę vazodilataciją, apimančią visų galūnių griaučių raumenų kraujotaką, arba labai specifišką vazodilataciją, apsiribojančią palyginti nedideliu dilbio kraujagyslių baseinu. Pavyzdžiui, pacientams, kurių skilvelių inervacija buvo išlikusi, į vainikines arterijas suleidus Renografino, buvo nustatytos priešingos krypties kraujagyslinės reakcijos dilbyje ir blauzdoje: dilbio kraujagyslių pasipriešinimas sumažėjo (nuo 50 ± 11 iki 31 ± 8 vienetų), o blauzdos kraujagyslių pasipriešinimas padidėjo (nuo 42 ± 7 iki 59 ± 9 vienetų; $p < 0,05$ lyginant blauzdą su dilbiu). Po širdies transplantacijos dilbio vazodilatacija paprastai išnyksta, o tai rodo, kad ši reakcija yra refleksinė ir ją sukelia skilvelių aferentiniai nervai. Įdomu tai, kad blauzdos vazokonstrikcija gali išlikti net ir po skilvelių deaferentacijos. Tai leidžia teigti, kad šią reakciją lemia kiti mechanizmai, o ne skilvelių aferentinių nervų aktyvinimas – galbūt sinoaortiniai baroreceptoriai [186].

Viena iš klinikinių širdies denervacijos pasekmių yra širdies kilmės skausmo jutimo išnykimas pacientams po širdies transplantacijos. Šį reiškinį daugiausia lemia transplantacijos metu nutraukiami skilvelių simpatiniai aferentiniai nervai, kurie įprastai perduoda širdies skausmo signalus [187].

Tačiau literatūroje nuolat aprašomi pacientai, kuriems po širdies transplantacijos pasireiškia krūtinės skausmo sindromas [187, 188]. Jeigu šis skausmas yra širdinės kilmės, tai reikštų, kad juntamąją informaciją iš širdies perduodantys aferentiniai nervai bent iš dalies yra reinervavę transplantuotą širdį.

Eksperimentiniai tyrimai su šunimis, kuriems kairiojo skilvelio juntamieji receptoriai, susiję su klajoklio nervo aferentinėmis skaidulomis, buvo chemiškai stimuliuojami kriptenaminu (lot. *Vevatrum album,* baltojo čemerio alkaloido ekstraktu), parodė, kad per pirmus dvejus metus po transplantacijos aferentinė reinervacija pasitaiko retai, tačiau ilgalaikėje perspektyvoje (praėjus 8–12 metų) autotransplantuotoje širdyje išsivysto plati aferentinė reinervacija. Dėl šios priežasties atsikuria palyginti normalūs kardiopulmo-

niniai barorefleksiniai atsakai į kraujo tūrio padidėjimą [189]. Tyrimai su žmonėmis, kai buvo registruojami refleksiniai atsakai, sukeliami stimuliuojant skilvelių chemoreceptorines galūnes selektyviai suleidžiant rentgenokontrastinę medžiagą (meglumino diatrizoatą) į dešiniąją ir kairiąją vainikines arterijas, leidžia teigti, kad klajoklio nervo širdies aferentinių nervų reinervacija po širdies transplantacijos gali įvykti ne anksčiau kaip praėjus 6 metams po operacijos [190, 191]. Panašūs duomenys gauti ir tiriant skilvelių simpatinius aferentinius nervus, kurie gali būti susiję su anginos pasireiškimu pacientams po širdies transplantacijos ir kurie ilgainiui, kartu su simpatinėmis nervinėmis skaidulomis, reinervuoja donoro širdį. Svarbu pažymėti, kad širdies transplantacijos recipientams, sergantiems vainikine širdies liga, anginos pasireiškimas yra tiesiogiai susijęs su miokardo išemija [187].

Po transplantacijos vėlyvuoju laikotarpiu (49 ± 18 mėn.) pacientams atsistojus pastebimas atsinaujinęs, nedidelis ir vėluojantis padidėjęs širdies susitraukimų dažnis (iki 12 ± 8 k./min.) rodo atsiradusią aferentinę reinervaciją, kurios visiškai nėra ankstyvuoju laikotarpiu (2 ± 2 mėn.) po transplantacijos. Įdomu tai, kad širdies susitraukimų dažnio padidėjimo amplitudžių įvairovė nustatyta tik vėlyvuoju po transplantacijos laikotarpiu tirtiems pacientams – jų širdies susitraukimų dažnis galėjo padidėti nuo 6 ± 3 k./min. iki 28 ± 5 k./min., t. y. kai kuriais atvejais šis atsakas buvo panašus į sveikų asmenų. Nors dauguma autorių vėlyvuoju po transplantacijos laikotarpiu atsirandantį širdies susitraukimų dažnio atsaką sieja su simpatine širdies reinervacija, tačiau neatmetama galimybė, kad jį gali lemti ir vidusieniniai mechanizmai [184].

Duomenys apie širdies denervaciją ir įvairius refleksinius kardiopulmoninius atsakus pacientams po širdies transplantacijos leidžia teigti, kad daugeliu atvejų po transplantacijos išlieka širdies vidusieniniai nerviniai mazgai. Kadangi šie mazgai, daugiausia išsidėstę abiejų prieširdžių paviršiuje ir apima įvairių tipų nervines ląsteles, taip pat juntamuosius ir vietinės grandinės neuronus [31, 180, 192], galima daryti prielaidą, kad jie yra svarbūs palaikant vietinius širdies ir kraujagyslių refleksus donoro širdyje bent iki tol, kol vėlyvuoju po transplantacijos laikotarpiu recipiento aferentinės nervinės skaidulos reinervuoja transplantuotą širdį. Tuomet vidukrūtiniai refleksai, apimantys neuronų hierarchiją širdies nerviniuose mazguose ir vidukrūtiniuose užširdiniuose nerviniuose mazguose, pradeda koordinuotai veikti kartu su centriniais neuronais, esančiais nugaros smegenyse, smegenų kamiene bei priekinių smegenų centriniuose regionuose, ir taip užtikrina širdies minutinio tūrio reguliaciją kiekvieno širdies susitraukimo metu. Todėl Aroros su bendraautoriais [192] pasiūlymas denervuotą donoro širdį vadinti decentralizuota, o ne aferentiškai denervuota, laikytinas pagrįstu.

1.13. Širdies skausmo kilmės ir plitimo mechanizmai

Širdies skausmas yra sudėtingas visceralinės jutimo sistemos reiškinys, kurio negalima aiškinti vien tik tiesioginiu ryšiu tarp audinio pažaidos dydžio ir skausmo intensyvumo. Nors širdis yra gausiai inervuotas krūtinės ląstos organas, visgi ji pasižymi santykiniu nejautrumu lėtiniam mechaniniam poveikiui. Nguyen [193] pabrėžia paradoksą, kad progresuojanti miokardo hipertrofija, skilvelių dilatacija ar fibrozė dažnai ilgą laiką nesukelia aiškaus skausmo, o nocicepcija išryškėja daugiausia ūmių būklių metu, ypač esant išemijai ar uždegimui. Šis neatitikimas tarp struktūrinio persitvarkymo ir sąmoningo skausmo suvokimo leidžia teigti, kad širdies juntamieji signalai yra ne tiesiog silpni, bet selektyviai moduliuojami periferiniuose ir centriniuose lygiuose [29, 193, 194].

Dabartiniai duomenys rodo, kad širdies juntamoji inervacija organizuota bent dviem funkciškai skirtingais aferentiniais keliais. Vieną jų sudaro klajoklio nervo aferentinės nervinės skaidulos, kylančios iš klajoklio nervo juntamųjų mazgų ir daugiausia perduodančios žemo slenksčio mechanosensorinę informaciją apie širdies prisipildymą, sienelės tempimą ir homeostazinę būklę. Kitą kelią sudaro krūtininiai nugariniai visceraliniai aferentai, kurių neuronų kūnai yra nugarinių mazgų srityje ir kurie daugiausia dalyvauja perduodant išemijos, uždegimo bei metabolinių pokyčių sukeltus nocicepcinius signalus. Būtent šie didelio slenksčio aferentai yra siejami su tipiniu stenokardiniu skausmu ir jo plitimu į krūtinę, kaklą, petį bei viršutinę galūnę [29, 193, 194]. Todėl širdies skausmas yra ne vien periferinis reiškinys, bet ir specifinio aferentinių srautų atrankos rezultatas.

Svarbu tai, kad abu minėti aferentiniai keliai skiriasi ne tik topografija, bet ir dirgiklių selektyvumu. Nguyen [193], remdamasis Foreman ir bendraautoriais [194], Pan ir bendraautoriais [195] bei Pan ir Chen [196], nurodo, kad nugariniai širdies nociceptoriai dažniau aktyvinami metabolinių ir cheminių veiksnių, negu lėtai progresuojančios mechaninės deformacijos. Tuo tarpu klajoklio nervo mechanosensoriniai aferentai perduoda toninę arba lėtai kintančią informaciją, svarbią refleksinei širdies ir kraujagyslių sistemos reguliacijai. Šis skirtumas padeda paaiškinti, kodėl lėtinė skilvelių hipertrofija ar dilatacija gali vykti beveik be skausmo, o ūmi miokardo išemija greitai peržengia nocicepcinį slenkstį ir sukelia klasikinį anginiį skausmą. Kitaip tariant, esant lėtiniam mechaniniam stresui, širdies struktūriniai pokyčiai dažnai vyksta kliniškai tyliai, be nuolatinio skausmo [145, 193, 196].

Be aferentinių kelių diferenciacijos, svarbūs ir vietiniai skausmo slopinimo mechanizmai. Nguyen [193] siūlo Širdies mechanoaferentinio slopinimo modelį (angl. *Cardiac Mechanoafferent Silencing Model*, CMSM), pagal kurį lėtinio mechaninio krūvio metu širdyje gali susidaryti slopinanti mikro-

aplinka, mažinanti nociceptinių C tipo nervinių skaidulų jaudrumą. Remiantis tame straipsnyje aptariamais duomenimis, adenozinas gali hiperpoliarizuoti C skaidulas, azoto monoksidas didinti ciklinio guanozino monofosfato koncentraciją, o GABAerginiai mechanizmai papildomai mažinti aferentinį aktyvumą. Be to, keliama prielaida, kad Piezo kanalų aktyvacija dėl skilvelio sienelės tempimo gali keisti baroreceptorinių signalų apdorojimą ir netiesiogiai slopinti nocicepcinį aktyvumą [193, 197–200]. Tačiau būtina pabrėžti, kad šie mechanizmai kol kas daugiausia grindžiami eksperimentiniais duomenimis ir teoriniais svarstymais, todėl jų tiesioginis pritaikymas žmogaus širdies nocicepcijai reikalauja tolesnių tyrimų.

Širdies skausmo pobūdį lemia ir centrinis juntamųjų signalų apdorojimas. Nguyen [193] pažymi, kad klajoklio nervo aferentai daugiausia baigiasi atskirojo laido branduolyje, kuris dalyvauja kardiovaskulinių refleksų reguliacijos procesuose, o nugariniai širdies aferentai įsijungia į kylančius nocicepcinius kelius per nugaros smegenų užpakalinius ragus. Todėl širdies kilmės skausmas gali būti juntamas kakle, petyje ar viršutinėje galūnėje, nes centriniai neuronai gauna tiek visceralinius, tiek somatinius jutiminius signalus ir ne visada tiksliai atskiria jų kilmę. Be to, priepetinio branduolio ir kitų kamieno centrų ryšiai gali lemti ne tik vegetacinius, bet ir afektinius atsakus į širdies nocicepciją [193, 201–203]. Tai rodo, kad širdies skausmas yra visos interocepcinės sistemos, o ne vien periferinių receptorių funkcijos išraiška.

Anatominė širdies sandara taip pat gali prisidėti prie santykinai menko skausmingumo lėtinio mechaninio streso metu. Nguyen [139] pažymi, kad miokardas, nors ir tankiai inervuotas, neturi tokio stambaus centralizuoto nervinio rezginio kaip, pavyzdžiui, pilvinis rezginys, būdingas kai kuriems kitiems vidaus organams. Be to, širdiplėvė gali ilgą laiką prisitaikyti prie laipsniško tempimo nesukeldama aštraus somatinio skausmo, o ryškesni somatiniai skausmo požymiai dažniau atsiranda tada, kai dirginama pasieninė širdiplėvė ar diafragminiai paviršiai, pavyzdžiui, sergant ūminiu perikarditu. Todėl tamponada ar lėtinė širdies plėtra dažniau pasireiškia spaudimo ar diskomforto jausmu, o ne ryškiu vietiniu skausmu. Tačiau išeminis pažeidimas aktyvina kitą, chemiškai jautresnę, nocicepcinę sistemą [193, 204, 205].

2. TYRIMŲ MEDŽIAGA IR METODAI

2.1. Tyrimo medžiaga

2.1.1. Laboratoriniai gyvūnai

Tyrime buvo panaudotos 2–3 mėnesių amžiaus 24 Wistar linijos žiurkės (12 patinų ir 12 patelių), 6–8 savaičių amžiaus suaugusios BALB/c linijos pelės (6 patinai ir 6 patelės) bei suaugusios miniatiūrinės kiaulės (4 patinai ir 4 patelės). Laboratoriniai gyvūnai buvo laikomi ir jiems atlikta eutanazija Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Biologinių tyrimų centre laikantis vietinių ir nacionalinių laboratorinių gyvūnų laikymo priežiūros ir naudojimo reikalavimų (leidimo Nr. LT-61-19-004). Į tyrimą taip pat buvo įtraukti dviejų vietinių rūšių suaugę šikšnosparniai – Brandto pelėausis (*Myotis brandtii*) ir Vandeninis pelėausis (*Myotis daubentonii*) (po 2 patinus ir po 2 pateles kiekvienos rūšies). Subrendusių miniatiūrinių kiaulių (4 patinų ir 4 patelių) širdys gautos bendradarbiaujant su kitais tyrėjais ir laikantis 3R principų (angl. *Replacement, Reduction, Refinement*). Šikšnosparnių širdžių neuroanatominiai duomenys ir vaizdinė medžiaga gauti iš Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Anatomijos instituto (Kaunas, Lietuva) archyvo, sudaryto vykdant ankstesnius tyrimų projektus pagal Lietuvos aplinkos apsaugos departamento 1995 metais ir 1997 metais išduotus leidimus Nr. 16 ir 57.

2.1.2. Žmogaus medžiaga

Šiame tyrime buvo naudoti anksčiau paruošti žmogaus visos širdies preparatai, dažyti histocheminiu acetilcholinesterazės metodu, kuris detaliai aprašytas *2.2.4. Visos širdies preparatai* skyriuje. Acetilcholinesteraze dažytų žmogaus širdžių kolekcija saugoma Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Anatomijos institute 4 proc. buferiniame formalino tirpale. Kolekciją sudaro saugomi archyviniai preparatai ir žmogaus širdys, išimtos atliekant autopsiją Teismo medicinos instituto morge iš atvejų, kai nebuvo nustatyta širdies patologija, ne vėliau kaip per 12–24 valandas po mirties. Medžiaga surinkta gavus Kauno bioetikos komiteto leidimą Nr. BE-2-62 (2004–2008 m.) ir buvo naudota ankstesniuose tyrimų projektuose. Iš viso tyrimo metu buvo ištirtos 3 moterų (26–33 metų), 3 paauglių vyrų ir 8 suaugusių vyrų (18–36 metų) širdys.

2.2. Morfologiniai tyrimai

2.2.1. Preparavimas ir audinių paruošimas

Po eutanazijos anglies dioksidu ir patvirtinus gyvūno mirtį (širdies veiklos, pėdos bei ragenos refleksų nebuvimas), gyvūnai buvo paguldomi ant silikoninio chirurginio kilimėlio nugarine padėtimi. Krūtinės srityje vidurio linijoje chirurginėmis žirklėmis buvo atliktas pjūvis siekiant atverti krūtinės ląstą. Diafragma ir perikardas atsargiai atskirti sudarant operacinę prieigą. Atidengta širdis buvo kaniuliuojama į kairiojo skilvelio ertmę, kad širdies audiniai būtų perfuzuojami 0,1 M fosfatu buferizuotu fiziologiniu tirpalu (PBS). Širdys *in situ* perfuzuotos PBS tirpalu esant 110–120 mmHg slėgiui. Po perfuzijos atlikta cheminė prefiksacija 4 proc. paraformaldehido (PFA) tirpalu 0,1 M PBS (pH 7,4). Vėliau širdys pašalintos ir papildomai fiksuotos 40 minučių ką tik pagamintame 4 proc. PFA tirpale. Po dviejų plovimų PBS tirpalu prieširdžiai buvo kruopščiai atskirti nuo skilvelių ir tarppieširdinės pertvaros. Po to skilveliai ir prieširdžiai buvo išskleisti ir pritvirtinti smeigtukais prie silikoninio Petri lėkštelės dugno, užpildyto šaltu PBS tirpalu. Paruošti skilvelių ir prieširdžių preparatai nuosekliai dehidratuoti didėjančios koncentracijos etanolio tirpaluose (30 proc., 50 proc., 70 proc., 90 proc., 96 proc. ir triskart 100 proc.) kiekviename tirpale laikant po 10 minučių. Po to jie buvo 2 valandas panardinti į Dento tirpalą (dimetilsulfoksidas (DMSO) ir 100 proc. etanolis, 1:4 v/v) siekiant pagerinti antikūnų prasiskverbimą. Fluorescenciniam kontrastui sustiprinti preparatai per naktį buvo balinti panardinant į Dento tirpalą su 30 proc. vandenilio peroksidu (1:4 v/v). Po balinimo atlikta rehidratacija nuosekliai mažinant etanolio koncentraciją atvirkštine tvarka. Vėliau preparatai du kartus po 10 minučių plauti 0,1 M PBS tirpalu ir 30 minučių inkubuoti 1 proc. Triton X-100 (Carl Roth, Karlsruhe, Vokietija) tirpale 0,1 M PBS.

2.2.2. Imunohistochemija

Išskleisti visos širdies preparatai buvo inkubuoti kambario temperatūroje 2 valandas 5 proc. normaliame asilo serume (angl. *normal donkey serum*, NDS Chemicon International, Temekula, Kalifornija, JAV), praskiestame antikūnų skiedimo reagentu (angl. *antibody diluent reagent solution*, ADRS; Life Technologies™, Frederick, JAV). Šis etapas apsaugo preparatą nuo nespecifinio antikūnų prisijungimo ir padidina vėlesnio imunohistocheminio žymėjimo specifiškumą. Po trijų nuoseklių plovimų 0,1 M PBS tirpalu (po 10 min.) mėginiai 48 valandas buvo inkubuoti 4 °C temperatūroje drėgnoje ir tamsioje kameroje naudojant pirminių antikūnų mišinius, nurodytus 2.2.2.1 lentelėje. Po inkubacijos preparatai dar tris kartus po 10 minučių buvo plauti

0,1 M PBS tirpalu, o vėliau 4 valandas inkubuoti kambario temperatūroje laboratoriniame kratytuve tamsoje su atitinkamais antriniais antikūnais (2.2.2.1 lentelė). Tiek pirminiai, tiek antriniai antikūnai buvo skiedžiami naudojant ADRS reagentą (Life Technologies™, Frederick, JAV). Po inkubacijos mėginiai buvo dar kartą plauti 0,1 M PBS tirpalu ir atsargiai uždėti ant mikroskopinių stiklelių. Išskleisti skilvelių preparatai buvo dengti Vectashield nefluorescuojančia terpe (Vector Laboratories, Kalifornija, JAV) ir užsandarinti bespalviu nagų laku siekiant išvengti preparato pasislinkimo ir išlaikant audinių skaidrumą. Komercinių antikūnų specifiškumas patikrintas naudojant audinius, kuriuose atitinkami antigenai yra gausiai ekspresuojami (2.2.2.1 lentelė). Fluorescencijos nebuvimas neigiamose kontrolėse, kuriose pirminiai antikūnai nebuvo naudojami, patvirtino antikūnų specifiškumą. Šios validacijos procedūros patvirtino, kad kiekvienas antikūnas specifiškai atpažįsta tikslinį antigeną ir taip užtikrina imunohistocheminio žymėjimo patikimumą.

***2.2.2.1 lentelė**. Tyrime naudoti pirminiai ir antriniai antikūnai*

Antigenas	Šeimininkas	Skiedimas	Katalogo Nr.	Teigiamos kontrolės audiniai (nuoroda)
Pirminiai				
nNOS	Pelė	1:500	sc-5302[a]	Vidurinių smegenų tarpkojytinio branduolio (angl. *Interpeduncular nucleus*, IPN) neuronai [206].
ChAT	Ožka	1:100	AB144P[b]	Nugaros smegenų priekinio rago motoriniai neuronai [207].
CGRP	Pelė	1:500	ab81887 [c]	Žiurkės nugarinis mazgas [208].
SP	Jūrų kiaulytė	1:500	ab10353[c]	Nugarinis mazgas [209].
PGP 9,5	Triušis	1:500	38-1000[d]	Periferinės nervinės skaidulos ir neuronų kūnai žiurkės nugariniame mazge [210].
PGP 9,5	Triušis	1:500	7863-0504[e]	Periferinės nervinės skaidulos ir neuronų kūnai žiurkės nugariniame mazge [210].

2.2.2.1 lentelės tęsinys

Antigenas	Šeimininkas	Skiedimas	Katalogo Nr.	Teigiamos kontrolės audiniai (nuoroda)
Pirminiai (*tęsinys*)				
PGP 9,5	Pelė	1:500	7863-1004[e]	Periferinės nervinės skaidulos ir neuronų kūnai žiurkės nugariniame mazge [210].
PGP 9,5	Pelė	1:500	480012[d]	Periferinės nervinės skaidulos ir neuronų kūnai žiurkės nugariniame mazge [210].
TH	Triušis	1:500	AB152[f]	Chromafininės ląstelės žiurkės antinksčių šerdyje [211].
TH	Avis	1:500	Ab113[c]	Chromafininės ląstelės žiurkės antinksčių šerdyje [211].
HuC/HuD	Pelė	1:500	A-21271[d]	Mienteriniai neuronai [212].
Antriniai antikūnai prieš:				
Pelę konjuguoti su Cy3	Asilas	1:500	AP192C[b]	
Ožką konjuguoti su Cy3	Asilas	1:500	AP180C[b]	
Triušį konjuguoti su Cy3	Asilas	1:500	AP182C[b]	
Jūrų kiaulytę konjuguoti su Cy3	Asilas	1:500	AP193C[b]	
Triušį konjuguoti su AF488	Asilas	1:500	ab150065[c]	
Avį konjuguoti su AF488	Asilas	1:500	AP184F[b]	
Ožką konjuguoti su Cy5	Asilas	1:500	AP180S[b]	
Triušį konjuguoti su Cy5	Asilas	1:500	AP182S[f]	

Gamintojai: [a] Santa Cruz Biotechnology, Dalasas, Teksasas, JAV; [b] Merck Millipore, Berlingtonas, Masačusetsas, JAV; [c] Abcam, Kembridžas, Jungtinė Karalystė; [d] Thermo Fisher Scientific, Rokfordas, Ilinojus, JAV; [e] AbD Serotec, Kidlingtonas, Jungtinė Karalystė; [f] Chemicon International, Temekula, Kalifornija, JAV.

2.2.3. Širdies vidusieninių kraujagyslių vizualizacija

Siekiant vizualizuoti širdies vidusienines kraujagysles MIF ląstelių sankaupų srityse, buvo naudojamas pomidorų lektinas – LEL, DyLight™ 594 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA JAV), plačiai taikomas laboratorinių gyvūnų kraujagyslių endotelio ląstelėms žymėti. Po prefiksacijos abiejų vainikinių arterijų šaknys buvo atsargiai perrištos plonu chirurginiu siūlu. Pomidorų lektino tirpalas (santykiu 1:1 su 0,1 M PBS) buvo sušvirkštas

kiek toliau nuo perrišimo vietų sudarant sąlygas jo anterogradiniam pasklidimui vainikinėmis arterijomis.

2.2.4. Visos širdies preparatai

Miniatiūrinių kiaulių širdys buvo gautos iškart po jų išėmimo iš krūtinės ląstos ir panardintos į 0,1 M fosfatinį buferį (PB). Vėliau jos buvo išplautos švirkštu perfuzuojant šviežiu 0,1 M PB (pH 7,4) per kairiąją ir dešiniąją vainikines arterijas. Per viršutinę tuščiąją veną ir kairiąją plaučių veną į prieširdžių ertmes buvo įvesti balioniniai kateteriai siekiant išplėsti prieširdžių sieneles. Perikardas, plaučių arterijos ir tarpuplaučio riebalinis audinys atsargiai buvo pašalinti nuo širdies pagrindo, kad būtų atidengtas nervinis rezginys ir aksonų galūnės. Vėliau širdys 30 minučių buvo fiksuojamos 4 proc. paraformaldehido tirpale 0,1 M PB. Po fiksacijos širdys 1 valandą 4 °C temperatūroje plautos izotoniniu tirpalu, kuriame buvo hialuronidazės (0,5 mg/ 100 ml, Sigma) ir tetraisopropilfosforamido (Iso-OMPA, 0,5 mM, Sigma) – selektyvaus pseudocholinesterazės inhibitoriaus.

Nervinių skaidulų ir jų galūnių vizualizacijai visos širdies preparatuose buvo taikyta acetilcholinesterazės (AChE) histocheminė reakcija. Širdys 30–60 minučių buvo inkubuotos 4 °C temperatūroje dažymo terpėje, paruoštoje pagal Karnovsky ir Roots [213] metodiką, vėliau modifikuotą Paužos ir bendraautorių [214]. Dėl širdies pamate esančių riebalinio audinio sankaupų, apsunkinusių dažymo terpės įsiskverbimą, inkubacijos metu papildomai buvo atliekamas kruopštus šių audinių preparavimas siekiant pagerinti optimalią terpės difuziją į nervines struktūras. Po dažymo preparatai fiksuoti 4 proc. paraformaldehido tirpale, paruoštame PB. Ilgalaikiam saugojimui preparatai buvo laikyti 4 proc. PFA tirpale 0,1 M PB nenustatant jokių morfologinių pokyčių.

Smulkios, AChE reakcijai teigiamos nervinės skaidulos ir jų galūnės buvo tiriamos naudojant 2× ir 6× didinimą Stemi 2000CS stereomikroskopu (Zeiss, Göttingen, Vokietija), sukomplektuotu su KL 2500 LCD šviesolaidiniu šviesos šaltiniu (Schott AG, Maincas, Vokietija). Vaizdai fiksuoti skaitmenine kamera AxioCam MRc5 (Zeiss, Göttingen, Vokietija) ir apdoroti naudojant AxioVision programinę įrangą (Rel. 4.8.2, Zeiss, Jena, Vokietija). Tais atvejais, kai dažytų nervinių struktūrų nepavyko aiškiai identifikuoti stereomikroskopu, audinio fragmentai su numanomomis nervinėmis galūnėmis buvo išpjauti iš visos širdies preparatų naudojant smulkų deimantinį skalpelį, uždėti ant mikroskopinių stiklelių, uždengti dengiamaisiais stikleliais ir analizuoti Imager M1 mikroskopu (Zeiss, Göttingen, Vokietija), turinčiu skaitmeninę kamerą AxioCam MRC (Zeiss, Göttingen, Vokietija). Vaizdai buvo analizuojami 10× ir 20× didinimu bei apdoroti AxioVision

programine įranga (Rel. 4.8, Zeiss, Jena, Vokietija). Iliustracijos sumontuotos naudojant Adobe Photoshop 2020 programą (Adobe Systems Incorporated, JAV).

2.3. Mikroskopavimas ir duomenų rinkimas

2.3.1. Konfokalinė lazerinė skenuojančioji mikroskopija

Išskleisti visos širdies preparatai buvo fotografuojami naudojant konfokalinį lazerinį skenuojantį mikroskopą LSM 700 su ZEN 2010B SP1 (Carl Zeiss, Jena, Vokietija) programinės įrangos paketu. Panoraminių vaizdų fiksavimui taikytas 10× didinimas, o išsamesnei struktūrų analizei – 20× ir 63× didinimai. Kiekvieno vaizdo raiška buvo 2024 × 2024 pikseliai. Siekiant užtikrinti maksimalų signalo ir triukšmo santykį bei išvengti preparatų fotobalinimo rizikos, vaizdinimo nustatymai (apertūros dydis, signalo stiprinimas ir lazerio intensyvumas) buvo optimizuoti. Taip pat buvo atliktas Z kaladžių skenavimas, leidęs sudaryti trimačius rekonstrukcinius vaizdus ir tiksliai įvertinti tiriamų struktūrų vietą. Mikroskopo skenavimo nustatymai buvo individualiai koreguojami kiekvienam su antriniais antikūnais naudotam fluoroforui (žr. 2.2.2.1 lentelę). Galutinės iliustracijos parengtos naudojant Adobe Photoshop 2020 (Adobe Systems Incorporated, JAV).

2.3.2. MIF ląstelių analizė

Išskleisti žiurkių prieširdžių preparatai buvo apžiūrėti, o išsamiai išanalizuota 1230 MIF ląstelių sankaupų. Ląstelių skaičiavimai atlikti rankiniu būdu analizuojant skaitmeninius prieširdžių preparatų vaizdus. Kiekybiniai duomenys pateikti 2.3.2.1 lentelėje: matavimų skaičius (N), vidurkis (M) ± standartinė paklaida (SE) bei mediana su minimalia ir maksimalia (Min–Max) reikšmėmis.

2.3.2.1 lentelė. *Kiekybiniai duomenys apie MIF ląstelių sankaupas tirtuose žiurkių prieširdžiuose*

Bendras ištirtų MIF ląstelių skaičius	11316
Vidutinis ląstelių skaičius vienoje sankaupoje ± standartinė paklaida	9,2 ± 0,40
Mediana (Min–Max) ląstelių skaičiaus sankaupoje	4 (2–146)
Bendras ištirtų MIF ląstelių sankaupų skaičius	1230
Vidutinis MIF ląstelių sankaupų skaičius viename prieširdyje ± standartinė paklaida	410 ± 143
Mediana (Min–Max) MIF ląstelių sankaupų skaičiaus viename prieširdyje	341 (204–685)

2.3.3. MIF ląstelių sankaupų identifikavimas

MIF ląstelės buvo laikomos sudarančiomis sankaupą, jeigu jos tarpusavyje buvo sujungtos ataugomis arba kai jų kūnai tiesiogiai kontaktavo. Naudojant ImageJ programos (versija 1.54) daugtaškį (angl. *multi-point*) įrankį, kiekviena MIF ląstelė buvo skaičiuojama rankiniu būdu žymint jų branduolius visame Z kaladės vaizdų rinkinyje.

2.3.4. Nervinių galūnių kiekybinis įvertinimas ir schematizavimas

Dažytos puokščių tipo nervinės galūnės, pavadintos juntamosiomis nervinėmis galūnėmis (JNG), buvo vertinamos matuojant jų užimamą plotą ir atsižvelgiant į tai, kad viena JNG kyla iš vienos nervinės skaidulos (žr. 3.2.1 pav. A', B', 3.2.2 pav. A', 3.2.3 pav. A', B'). Tiksliems JNG plotams nustatyti buvo naudojami fluorescenciniai didelės raiškos vaizdai (maksimalaus intensyvumo projekcijos), gauti iš išskleistų žiurkių prieširdžių preparatų arba iš acetilcholinesteraze dažytų visos širdies preparatų. Matavimams buvo atrinktos tik aiškiai atskiriamo ploto JNG, naudojant ImageJ programą (versija 1.54), o vaizdai, kuriuose galūnių plotai buvo neaiškūs ar persidengiantys, buvo atmesti. Visi nervinių galūnių matavimai buvo atlikti kelis kartus vieno tyrėjo, kuris, matuodamas tas pačias nervines galūnes, gavo nuoseklius rezultatus, o nustatyti nuokrypiai buvo nereikšmingi.

Konfokaliniai Z kaladžių vaizdai (išsaugoti kaip neapdoroti Z kaladžių duomenų rinkiniai trimatėms vizualizacijoms) buvo gauti dideliu didinimu, naudojant 63× objektyvą, ir leido nustatyti krepšelio tipo nervines galūnes (angl. *basket type nerve endings*, K-NG) ant vidusieninių cholinerginių neuronų kūnų. Naudojant maksimalaus intensyvumo projekcijas, vaizdai eksportuoti į Adobe Photoshop 2020 programą, kurioje buvo koreguojamas jų skaidrumas siekiant aiškiai nustatyti nervines galūnes ir jas schematizuoti rankiniu būdu (žr. 3.2.6, 3.2.7 pav.). Tuo pačiu metu trimatės Z kaladžių projekcijos buvo analizuojamos naudojant ZEN 2010B SP1 programinę įrangą siekiant užtikrinti visų struktūrinių detalių tikslų įvertinimą.

2.3.5. Puokščių tipo (JNG) nervinių galūnių statistinė analizė

Tyrimo duomenys buvo apdoroti naudojant kompiuterinę programą IBM SPSS Statistics (26 versija, IBM Corp., Armonk, NY, JAV). Buvo apskaičiuoti rodiklių aritmetiniai vidurkiai (x) ir vidutiniai standartiniai nuokrypiai (±SN). Duomenų pasiskirstymo normalumas tikrintas Kolmogorovo-Smirnovo testu. Kadangi ne visi skirstiniai atitiko buvo normalūs, duomenims analizuoti buvo taikytas neparametrinis metodas – Kruskalio-Walliso H testas. Nustačius statistiškai reikšmingą Kruskalio-Walliso testo rezultatą, buvo atlikti poriniai *post hoc* palyginimai taikant visų porų daugybinių palyginimų metodą ir siekiant nustatyti skirtumus tarp grupių. Skirtumas laikytas statistiškai reikšmingu, jei patikimumo lygmuo buvo $p < 0,05$. Grafikai parengti naudojant Origin 6.1 programą (OriginLab Corporation, Northampton, Masačusetsas, JAV).

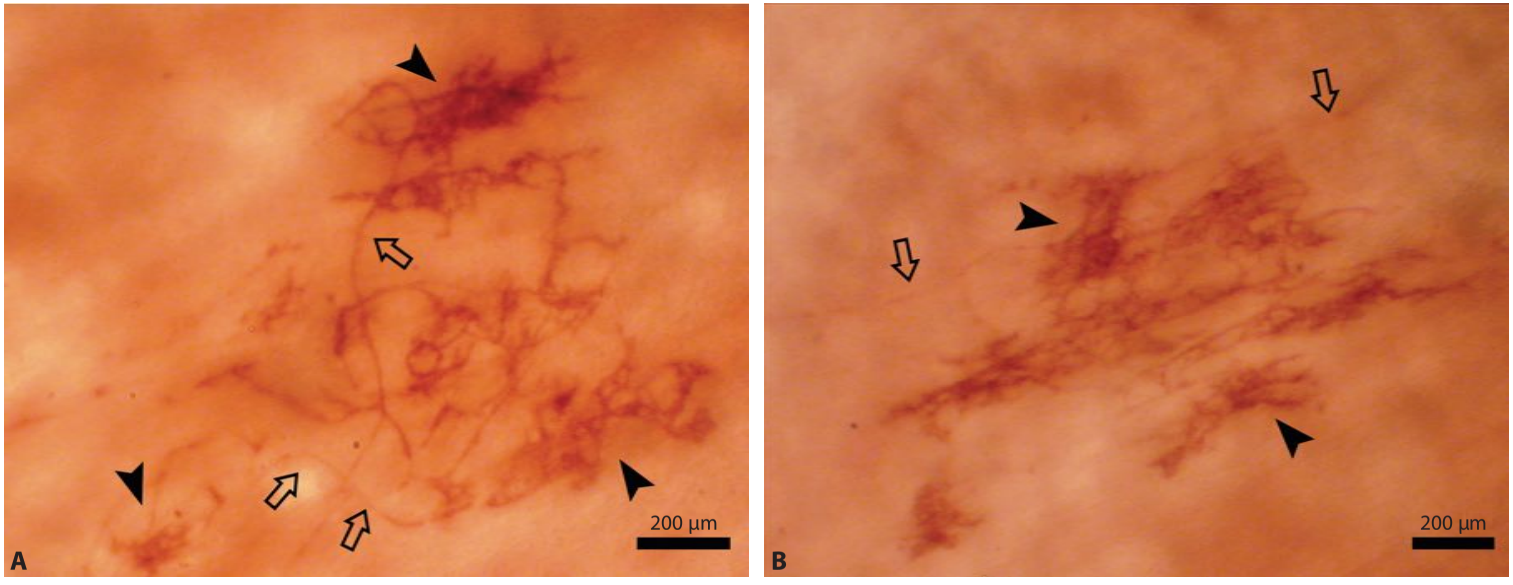
3. REZULTATAI

3.1. Visos širdies preparatuose histocheminiu acetilcholinesterazės (AChE) metodu nustatytos nervinės galūnės

Tyrimo metu ištirtuose preparatuose nervinės galūnės, kurias remdamiesi iki šiol sukauptomis žiniomis pavadinome juntamosiomis nervinėmis galūnėmis (JNG), buvo nustatytos tik žmogaus ir miniatiūrinės kiaulės širdyse. Nors šiuo metodu išryškintos žmogaus ir kiaulės JNG buvo lokalizuotos skirtingose širdies vietose, visgi jų morfologinė struktūra buvo labai panaši (3.1.1, 3.1.2 pav.). Žmogaus širdyje AChE pozityvios JNG buvo nustatytos tik endokarde ties plautinių venų žiotimis. Šias galūnes visada sudarydavo viena nervinė skaidula, atsišakojanti nuo stambesnio nervinių skaidulų pluošto, kuri endokardo paviršiuje suformuodavo gan kompaktišką struktūrą – literatūroje plačiai ir dažnai minimą puokštę (3.1.1 pav.).

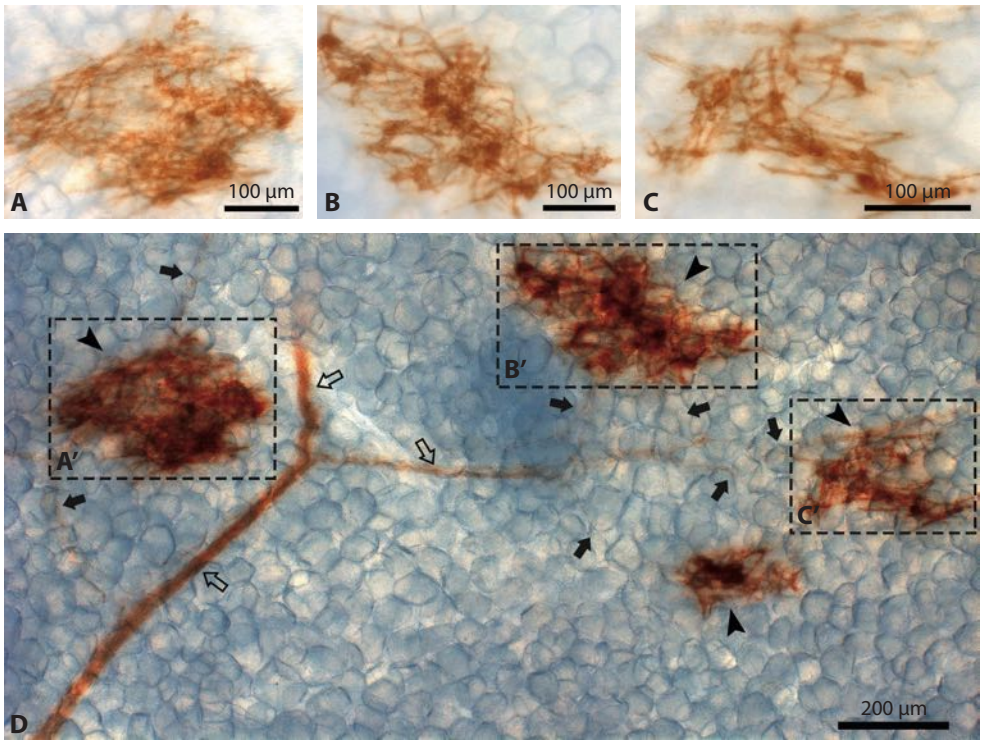
Miniatiūrinės kiaulės širdyje analogiškos sandaros JNG buvo nustatytos tik tarp ir ant epikardo riebalinių ląstelių, kurių daugiausia buvo aplink vainikinę vagą (3.1.2 pav. A–C). Nepaisant to, žmogaus endokarde nustatytos JNG buvo vidutiniškai 133 kartus didesnės nei miniatiūrinių kiaulių panašios struktūros galūnės (3.1.1, 3.1.2 pav.). 45 žmogaus endokarde išmatuotų JNG vidurkis siekė 6,7 ± 1,3 mm^2, o miniatiūrinėse kiaulėse jų dydis buvo 0,03 ± 0,003 mm^2 (3.1.1 lentelė). Atsižvelgiant į žymiai didesnį žmogaus endokarde nustatytų JNG dydį, šios struktūros nebuvo įtrauktos į bendrą lyginamąją nervinių galūnių morfometrinę analizę. Tikėtina, kad nustatytas epikardinių ir endokardinių JNG dydžių skirtumas priklauso nuo širdies sienos sluoksnio ir reikalauja tolesnių tyrimų taikant imunohistocheminius metodus endokardo nervinėms galūnėms tirti.

Kitų tyrinėtų gyvūnų širdyse AChE reakcijai pozityvios puokštės nebuvo nustatytos.



3.1.1 pav. *Nervai (permatomos rodyklės) ir puokštės tipo JNG (rodyklių galvutės), nudažytos acetilcholinesterazės (AChE) histocheminiu metodu žmogaus endokarde*

(A, B) – endokardinės nervinės galūnės, esančios žmogaus prieširdyje ties plaučių venų žiotimis. Adaptuota pagal [33]. Panaudota pagal „Elsevier“ autorių pakartotinio naudojimo politiką.



3.1.2 pav. *Nervai (permatomos rodyklės), nervinės skaidulos (juodos rodyklės) ir JNG tipo nervinės galūnės (juodos rodyklių galvutės), nudažytos acetilcholinesterazės histocheminiu metodu miniatiūrinės kiaulės epikarde*

(A–C) – didesnio padidinimo epikardinių nervinių galūnių, nustatytų ties vainikiniu ančiu, vaizdai; šios sritys atitinkamai pažymėtos kaip **A'–C'** mažesnio padidinimo vaizde **(D)**. Padidintuose vaizduose **(A–C)** matyti, kad tiek epikardinės, tiek endokardinės nervinės galūnės pasižymi panašia morfologija ir yra sudarytos iš netaisyklingo tinklo bei įvairaus tankio AChE-teigiamų nervinių skaidulų ar aksonų, lokalizuotų po endotelinių arba mezotelinių ląstelių sluoksniu. Atkreipiame dėmesį į akivaizdžiai didesnį žmogaus endokardinių nervinių galūnių dydį lyginant su miniatiūrinės kiaulės epikardinėmis galūnėmis (žr. 3.1.1, 3.1.2 pav.). Adaptuota pagal [33]. Panaudota pagal „Elsevier" autorių pakartotinio naudojimo politiką.

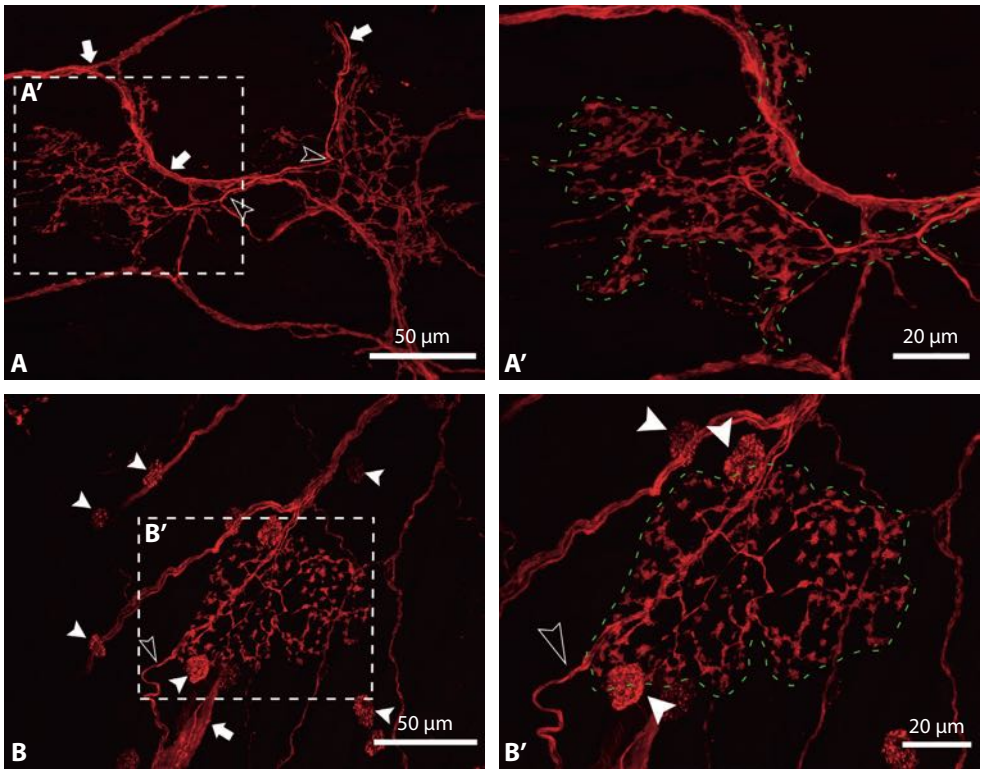
3.1.1 lentelė. *Penkių rūšių žinduolių ir žmogaus širdyse nustatytų puokštės tipo nervinių galūnių (JNG) apskaičiuotų struktūrų skaičius (n), vidutinis dydis (± standartinė paklaida) ir mediana (minimumas–maksimumas) (µm²)*

Rūšis	n	Vidurkis ± standartinė paklaida	Mediana (Min–Max) (µm²)
Žmogus	45	6705103,6 ± 1249103,6	2424299,6 (92859,2–30853574,3)
Miniatiūrinė kiaulė	100	30035,8 ± 2997,5	18268,6 (3144,2–161888,7)
Žiurkė	14	4687,2 ± 527,2	4211,3 (1927,3–8583,8)
Brandto pelėausis	32	2947,8 ± 367,6	2891,1 (64,4–8515,9)
Vandeninis pelėausis	13	2804,2 ± 696,0	2124,5 (382,6–9075,1)
Pelė	19	756,6 ± 190,2	414,5 (718–2744,7)

3.2. Širdies išklotinės preparatuose imunohistochemiškai nustatytos juntamosios nervinės galūnės

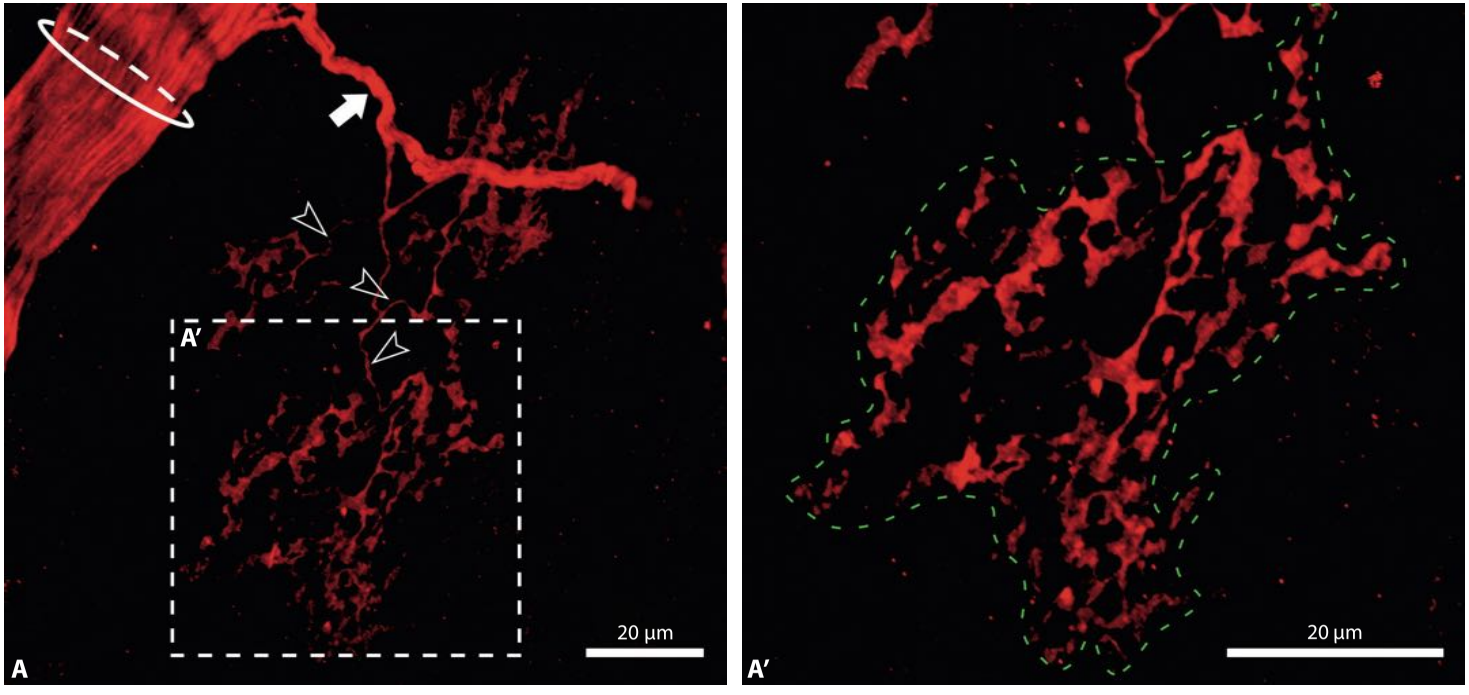
Žiurkės, pelės ir šikšnosparnio širdies išklotinės preparatuose identifikavome dviejų tipų nervines galūnes. Pirmas nervinių galūnių tipas buvo morfologiškai identiškas JNG, anksčiau nustatytoms visos širdies preparatuose, histochemiškai nudažytose AChE (3.2.1–3.2.3 pav.). Kadangi JNG lokalizavosi iškart po mezoteliniu ląstelių sluoksniu, jas pavadinome submezotelinėmis. Dauguma nustatytų submezotelinių JNG buvo pasiskirsčiusios pirmuose trijuose penktadaliuose skilvelių sienos ir krūtinkauliniame, ir diafragminiame paviršiuose. JNG taip pat buvo nustatytos kylančiosios aortos stormenyje žiurkės preparate (3.2.4 pav.).

Pelių, žiurkių ir tirtų šikšnosparnių rūšių širdyse nervinės skaidulos, iš kurių formavosi JNG, atsišakodavo iš plonų epikardinių nervų ir pasižymėjo būdingu puokštės tipo morfologiniu pavidalu (3.2.1–3.2.4 pav.). Tačiau jų dydis ir kompaktiškumas tarp rūšių labai skyrėsi (žr. 3.1.1, 3.1.2, 3.2.1–3.2.3 pav.; 3.1.1 lentelė). Mažiausios ir mažiausiai varijuojančios JNG buvo nustatytos pelių, o didžiausios – miniatiūrinių kiaulių širdyse (žr. 3.1.2, 3.2.2, 3.2.5 pav.; 3.1.1 lentelė). Žiurkių epikardinės JNG pasižymėjo vidutiniu dydžio variabilumu, tačiau buvo statistiškai reikšmingai didesnės nei pelių ir šikšnosparnių nustatytos struktūros. Vidutinis žiurkių JNG plotas buvo 2–6 kartus didesnis nei mažesnių žinduolių rūšių (žr. 3.2.5 pav.; 3.1.1 lentelė). Lyginant dvi šikšnosparnių rūšis, buvo nustatyta, kad submezotelinės JNG šiek tiek skyrėsi morfologija, o jų dydžio variabilumas buvo didesnis Vandeninio pelėausio širdies preparate nei Brandto pelėausio (žr. 3.2.3, 3.2.5 pav.; 3.1.1 lentelė). Miniatiūrinių kiaulių širdies preparatuose epikardinės JNG buvo akivaizdžiai didesnės ir labiau varijuojančio dydžio nei graužikų ir šikšnosparnių grupėse nustatytos galūnės (žr. 3.1.2, 3.2.5 pav.; 3.1.1 lentelė).



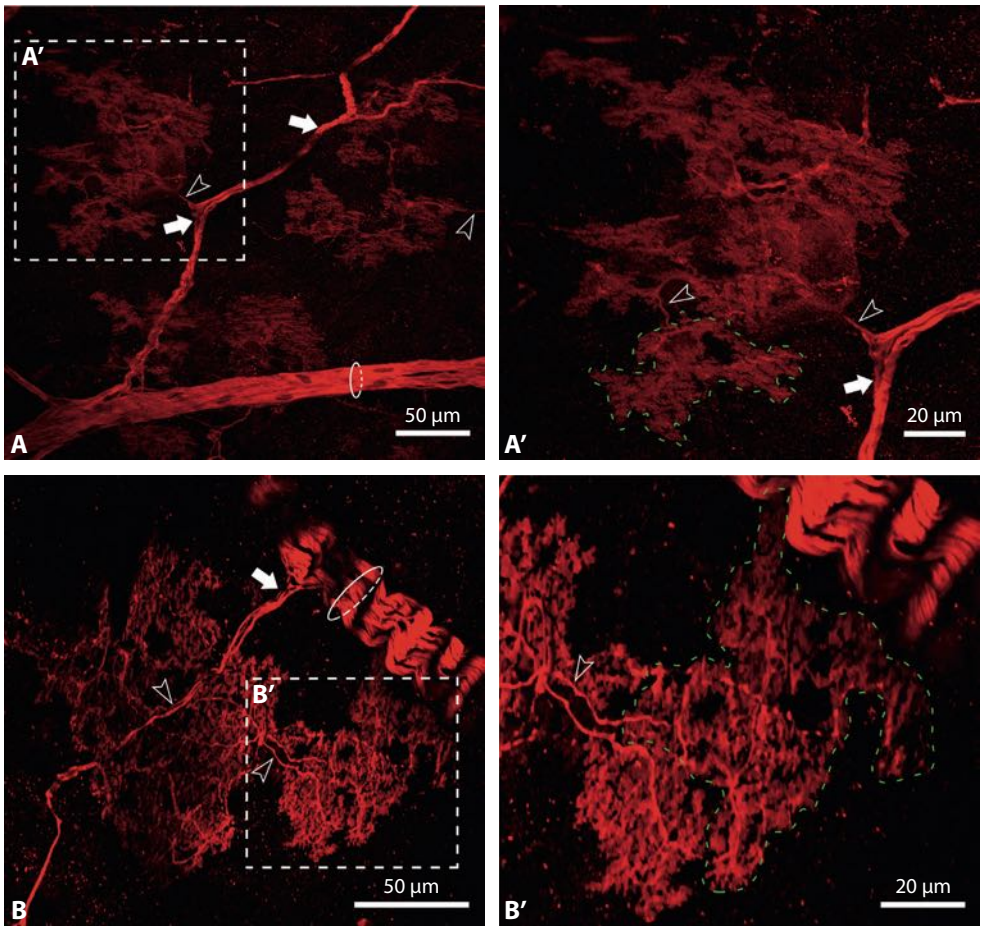
3.2.1 pav. *Epikardiniai nervinių skaidulų pluoštai (baltos rodyklės) ir jų šakos su nervinėmis galūnėmis (permatomos rodyklių galvutės) imunohistochemiškai vizualizuoti naudojant antikūnus prieš bendrą neuroninį žymenį PGP 9,5 žiurkės visos širdies preparatuose*

A – dvi puokštės tipo JNG, iš kurių viena (pažymėta punktyriniu kvadratu) padidinta **A'** vaizde. **B** – viena puokštės tipo JNG (padidinta **B'** vaizde), prasidedanti iš santykinai storos aksono šakos (balta rodyklė). Šalia šios nervinės galūnės matomos pavienės neidentifikuotos epikardinės ląstelės arba jų branduoliai, taip pat pasižymintys PGP 9,5 imunopozityvumu (baltos rodyklių galvutės). Žalia punktyrinė linija **A'** ir **B'** vaizduose apibrėžia plotą, kuris morfometrinių matavimų ir skaičiavimų metu buvo laikomas viena puokštės tipo JNG. Adaptuota pagal [33]. Panaudota pagal „Elsevier" autorių pakartotinio naudojimo politiką.



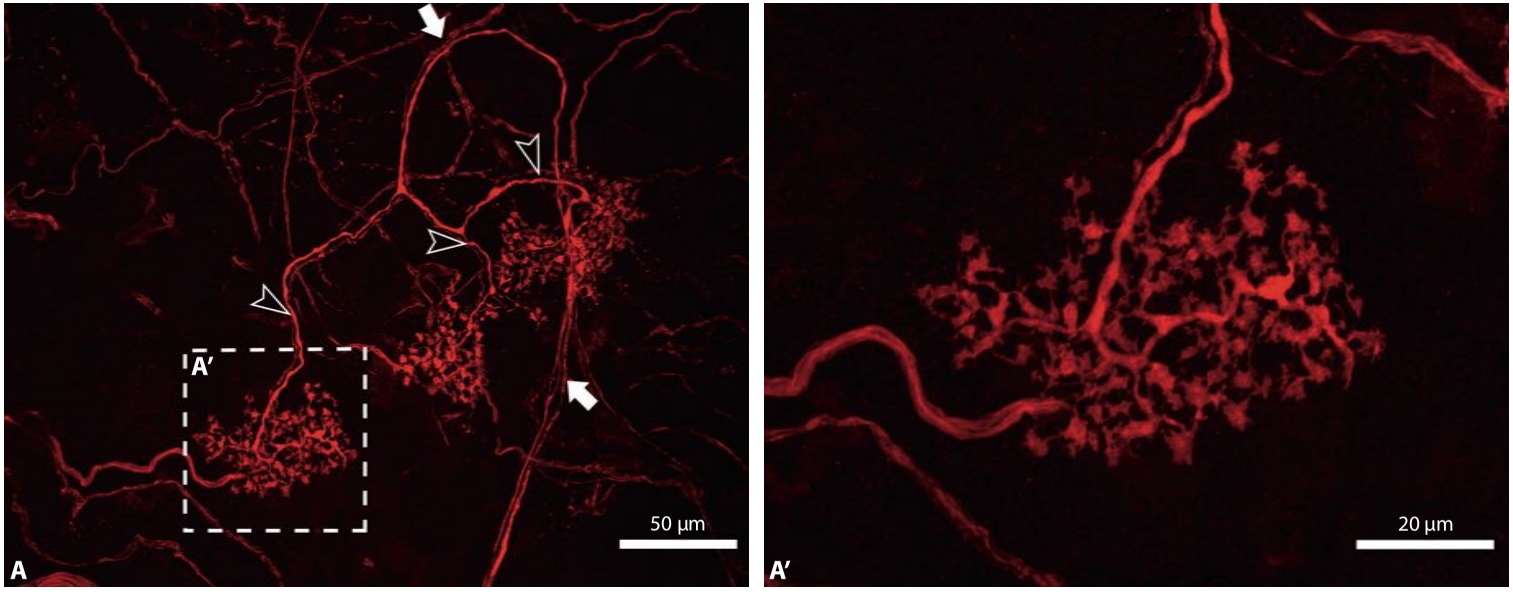
3.2.2 pav. *Epikardiniai nervai (balta elipsė), nervinių skaidulų pluoštai (baltos rodyklės) ir jų šakos su nervinėmis galūnėmis (rodyklių galvutės) imunohistochemiškai pažymėti bendru neuroniniu žymeniu PGP 9,5 pelių širdies išklotinių preparatuose*

Nervinės galūnės, pažymėtos punktyriniu rėmeliu **A** vaizde, yra padidintos atitinkamai **A'** vaizde. Pateiktos puokštės tipo JNG skiriasi tarp rūšių: pelės epikarde jos yra mažesnės ir struktūriškai paprastesnės nei analogiškos struktūros šikšnosparnių, žiurkių, miniatiūrinių kiaulių ir žmogaus širdyse. Žalia punktyrinė linija **A'** ir **B'** vaizduose žymi ribą, pagal kurią buvo apibrėžtas ir kiekybiškai išmatuotas vienos puokštės tipo JNG plotas.
Adaptuota pagal [33]. Panaudota pagal „Elsevier" autorių pakartotinio naudojimo politiką.



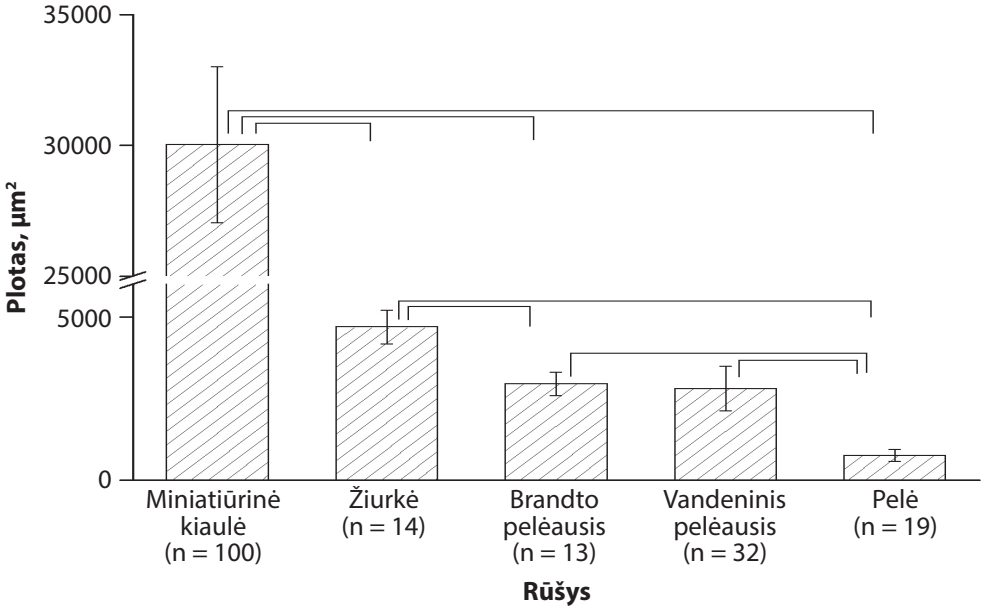
3.2.3 pav. *Epikardiniai nervai (balta elipsė), nervinių skaidulų pluoštai (baltos rodyklės) ir jų šakos su nervinėmis galūnėmis (rodyklių galvutės) imunohistochemiškai pažymėti bendru neuroniniu žymeniu PGP 9,5 Brandto pelėausio* ***(A, A')*** *ir Vandeninio pelėausio* ***(B, B')*** *širdies išklotinių preparatuose*

Nervinės galūnės, pažymėtos punktyriniais rėmeliais **A**, **B** vaizduose, yra padidintos atitinkamai **A'**, **B'** vaizduose. Žalia punktyrinė linija **A'** ir **B'** vaizduose žymi ribą, pagal kurią buvo apibrėžtas ir kiekybiškai išmatuotas vienos puokštės tipo JNG plotas.
Adaptuota pagal [33]. Panaudota pagal „Elsevier" autorių pakartotinio naudojimo politiką.



3.2.4 pav. *Nervinių skaidulų pluoštai (baltos rodyklės) ir jų šakos su nervinėmis galūnėmis (permatomos rodyklių galvutės) imunohistochemiškai vizualizuoti naudojant antikūnus prieš bendrą neuroninį žymenį PGP 9,5 žiurkės visos širdies preparate*

A – trys puokštės tipo JNG, nustatytos aortos šaknies sienoje; viena iš jų (pažymėta punktyriniu kvadratu) padidinta **A'** vaizde. Adaptuota pagal [33]. Panaudota pagal „Elsevier" autorių pakartotinio naudojimo politiką.

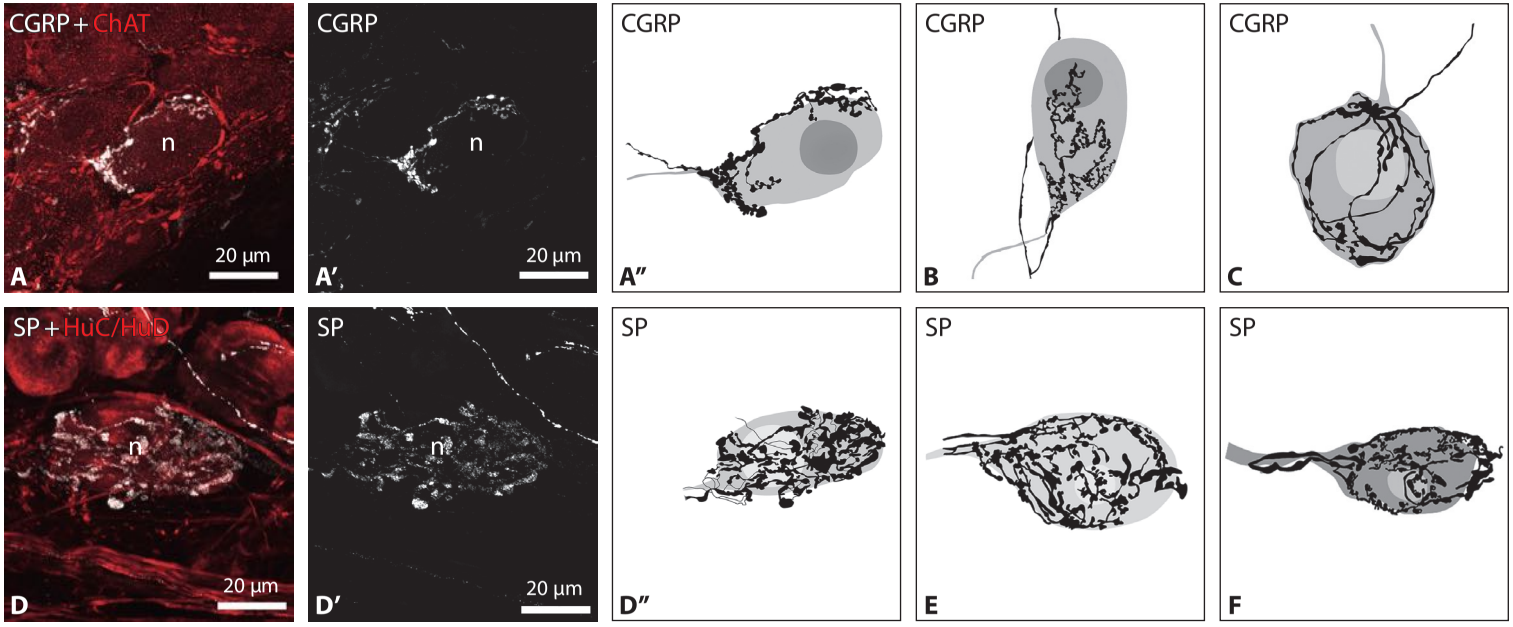


3.2.5 pav. *Penkių žinduolių rūšių puokštės tipo JNG vidutiniai plotai*

Ištirtų nervinių galūnių skaičius (n) nurodytas po atitinkamų rūšių pavadinimais. Y ašies lūžis leidžia vizualizuoti tiek mažas, tiek dideles reikšmes. Juostos, jungiančios stulpelius, žymi statistiškai reikšmingus skirtumus tarp rūšių ($p < 0,05$). Miniatiūrinės kiaulės vidutinis puokštės tipo JNG plotas siekė 30035,8 ± 2997,5 µm, žiurkės – 4687,2 ± 527,2 µm, Brandto pelėausio – 2947,8 ± 367,6 µm, Vandeninio pelėausio – 2804,2 ± 696,0 µm, pelės – 756,6 ± 190,2 µm.

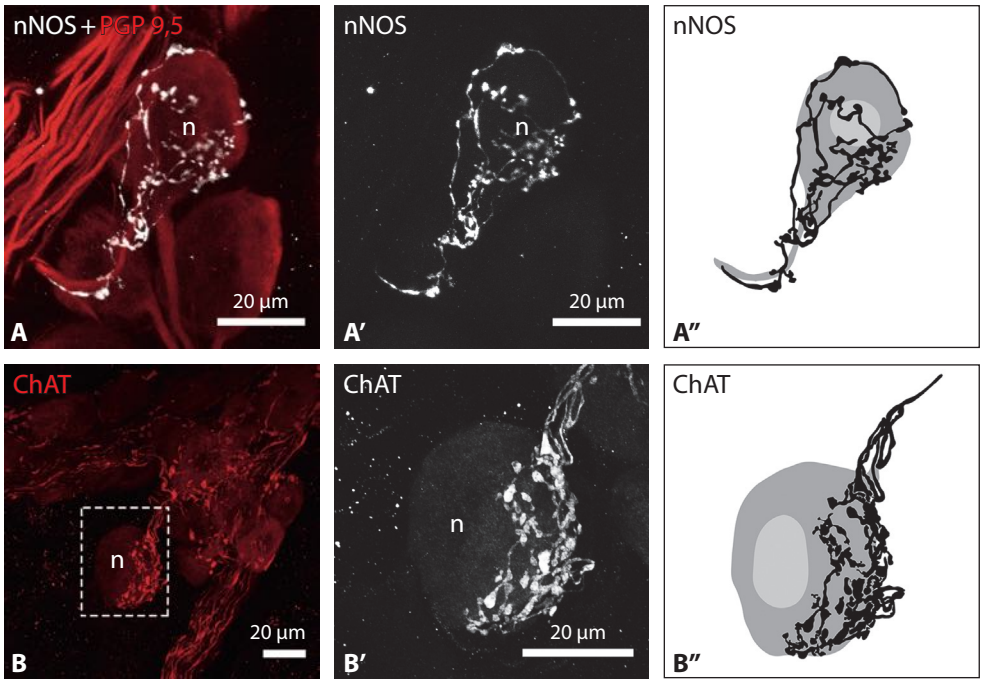
Adaptuota pagal [33]. Panaudota pagal „Elsevier“ autorių pakartotinio naudojimo politiką.

Imunohistocheminė žiurkių širdžių analizė, naudojant antikūnus prieš nNOS, cholino acetiltransferazę (ChAT) bei juntamiesiems neuronams specifinius neurožymenis – medžiaga P (SP) ir su kalcitonino genu susijusį peptidą (CGRP) – leido identifikuoti antrą morfologinį nervinių galūnių tipą. Šis tipas skyrėsi nuo puokštės tipo JNG, nustatytų naudojant bendrą neuroninį žymenį PGP 9,5. Kaip pavaizduota 3.2.6 pav., šias nervines galūnes daugiausia sudarė CGRP ir SP imunopozityvūs aksonai, kurie baigdavosi ant neuronų kūnų suformuodami krepšelio tipo nervines galūnes (K-NG). Be to, nNOS imunopozityvios aksonų galūnės taip pat formavo nervines galūnes, kurių morfologija buvo tokia pati kaip K-NG, susidarančias ant vidusieninių neuronų kūnų (3.2.7 pav. A). Svarbu pabrėžti, kad eferentinės ChAT pozityvios aksonų galūnės vidusieniniuose mazguose turėjo panašią struktūrinę organizaciją, tačiau cholinerginės galūnės nesuformuodavo krepšelio tipo išsidėstymo aplink neuronų kūnus (3.2.7 pav. B).



3.2.6 pav. *Neuronų kūnai (n), aksonai ir jų galūnės, lydinčios epikardinių mazgų ląsteles, imunohistochemiškai pažymėtos žiurkės širdies išklotinių preparatuose*

Kairiame stulpelyje **A**, **D** dvigubu imunohistocheminiu žymėjimu pažymėtos nervinės struktūros atskleidžia ryšius tarp specifiškai imunoreaktyvių aksonų galūnių ir epikardinių neuronų kūnų, teigiamų cholino acetiltransferazei (ChAT), bendrajam neuroniniam žymeniui HuC/HuD. **A'** ir **D'** stulpelio vaizdai parodo nervinių galūnių struktūrinę įvairovę, išskirtą iš dvigubai pažymėtų vaizdų kairiame stulpelyje. Tos pačios nervinės galūnės schematiškai pavaizduotos dešinio stulpelio vaizduose **(A", D")**, kur aiškiai matoma didelė krepšelio tipo galūnių struktūrinė ir kompleksinė įvairovė. Be to, **B**, **C**, **E**, **F** pateikiami vaizdai, kuriuose parodytos tam pačiam neuroniniam žymeniui imunopozityvios galūnės, susijusios su kitais neuronų kūnais.
Adaptuota pagal [33]. Panaudota pagal „Elsevier" autorių pakartotinio naudojimo politiką.

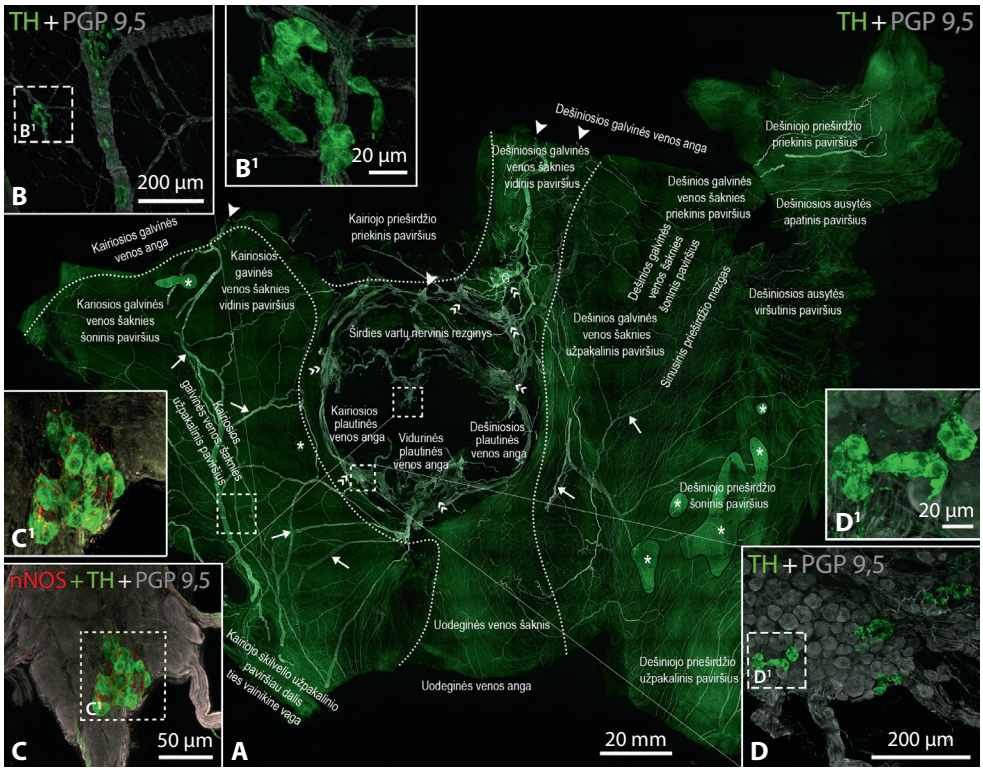


3.2.7 pav. *Neuronų kūnai (n), aksonai ir jų galūnės, lydinčios epikardinių mazgų ląsteles, imunohistochemiškai pažymėtos žiurkės širdies išklotinių preparatuose*

Kairiame stulpelyje **(A, B)** viengubu arba dvigubu imunohistocheminiu žymėjimu pažymėtos nervinės struktūros atskleidžia ryšius tarp specifiškai imunoreaktyvių aksonų galūnių ir epikardinių neuronų kūnų, teigiamų cholino acetiltransferazei (ChAT) ir bendrajam neuroniniam žymeniui PGP 9,5.Vidurinio stulpelio vaizdai **(A', B')** parodo nervinių galūnių struktūrinę įvairovę, išskirtą iš dvigubai ir viengubai pažymėtų vaizdų kairiame stulpelyje. Tos pačios nervinės galūnės schematiškai pavaizduotos dešinio stulpelio vaizduose **(A", B")**, kur aiškiai matoma didelė krepšelio tipo galūnių struktūrinė ir kompleksinė įvairovė. **B** – pažymėta sritis pateikta didesniu padidinimu (**B'**). Pažymėtina, kad tiek aksonų galūnės, imunoreaktyvios tipiniam eferentiniam (ikimazginiam) neuronų žymeniui – cholino acetiltransferazei **(B, B', B")**, tiek galūnės, imunopozityvios specifiniams aferentinių neuronų žymenims – medžiagai P ir su kalcitonino genu susijusiam peptidui (CGRP) (žr. 3.2.6 pav.) bei nitrerginiai aksonai, teigiami nNOS. **(A, A', A")**, sudaro stebėtinai panašias, tačiau kompleksinės sandaros požiūriu įvairias krepšelio tipo nervines galūnes, susijusias su epikardiniais neuronų kūnais.
Adaptuota pagal [33]. Panaudota pagal „Elsevier" autorių pakartotinio naudojimo politiką.

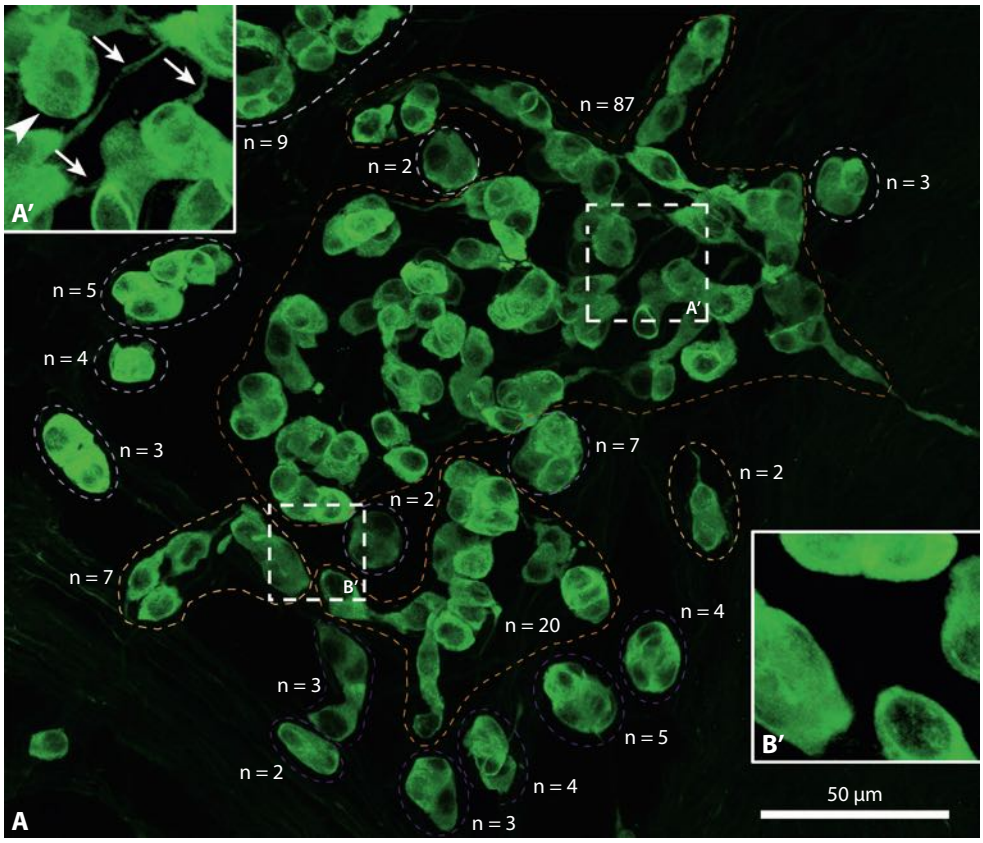
3.3. MIF ląstelių morfologiniai tipai, jų pasiskirstymas ir inervacija

Išanalizuotos MIF ląstelės žiurkių prieširdžiuose pasižymėjo intensyviu tirozino hidroksilazės (TH) imunoreaktyvumu, o dauguma jų buvo išsidėsčiusios veninėje širdies vartų dalyje, ties plautinių venų šaknimis bei kairiosios galvinės venos šaknies užpakalinėje dalyje (3.3.1 pav.). Širdies vartų nervinio rezginio anatomija anksčiau buvo išsamiai apibūdinta, tačiau verta paminėti, kad MIF ląstelių ir epikardinių mazgų nebuvo rasta šalia žiurkių sinusinio prieširdžio ar prieširdinio skilvelio mazgų [15, 23, 215, 216]. MIF ląstelių kūnų skersmuo svyruoja nuo 8 iki 15 μm, o jų forma yra verpstinė, ovali arba netaisyklinga. Iš viso buvo išanalizuota 11316 MIF ląstelių, kurios buvo suskirstytos į 1230 sankaupų, kurių dydis labai įvairus – nuo kelių iki 146 MIF ląstelių (žr. 2.3.2.1 lentelė). Išskyrėme du MIF ląstelių morfologinius tipus (3.3.2 pav.). I tipo MIF ląstelės (3.3.3 pav. A, B) turėjo aiškiai matomas ataugas, jų kūnai dažniausiai buvo verpstės formos arba netaisyklingos. Paprastai šio tipo MIF ląstelės buvo išsidėsčiusios išilgai epikardinių nervų arba juose (3.3.3 pav. A, B). II tipo MIF ląstelės buvo be ataugų, o jų ovalūs kūnai visada sudarydavo glaudžias įvairaus dydžio sankaupas (3.3.3 pav. C, D). Kiekybinė analizė parodė, kad 35,3 proc. sankaupų daugiausia sudarė I tipo MIF ląstelės, 17,8 proc. – II tipo, o 46,9 proc. sankaupų buvo mišrios, t. y. sudarytos iš abiejų morfologinių tipų ląstelių (3.3.4 pav.). Kaip matoma 3.3.5 ir 3.3.6 pav., MIF ląstelių sankaupų vieta buvo įvairi ir nepastovi: jos buvo lokalizuotos epikardiniuose nervuose arba jų aplinkoje (atitinkamai 43,5 proc. ir 21,5 proc.), epikardiniuose mazguose ir šalia jų (12,7 proc. ir 13,4 proc.) bei vietose, kuriose nebuvo nervinių struktūrų (8,9 proc.). Dauguma MIF ląstelių sankaupų buvo išsidėsčiusios šalia kraujagyslių (3.3.7 pav.).



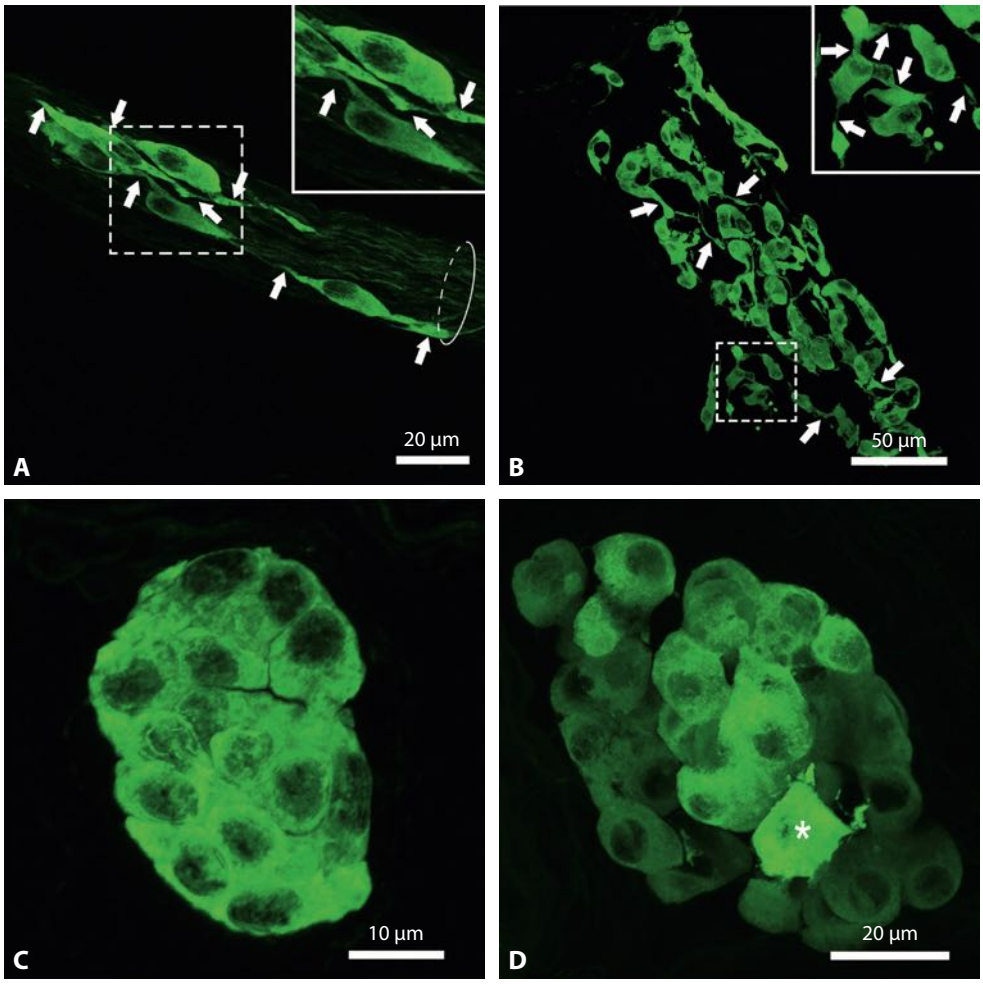
3.3.1 pav. *Žiurkės priešdžių išklotinės preparatas, vaizduojantis MIF ląstelių sankaupų pasiskirstymą ir jų sąsajas su neuroninės azoto oksido sintazės (nNOS) teigiamomis nervinėmis galūnėmis*

(A) MIF ląstelių sankaupų pasiskirstymas širdies vartų nerviniame rezginyje (pažymėtame punktyrine balta linija), ant plautinių venų ančių bei kairiosios galvinės venos ančio užpakalinės dalies. A vaizde punktyrine linija pažymėtos sritys atitinkamai padidintos **B–D** vaizduose, o šiuose vaizduose punktyru apibrėžtos vietos papildomai padidintos **B¹–D¹** vaizduose. Pažymėtina, kad MIF ląstelių sankaupų sinusinio priešdžio mazgo srityje nebuvo nustatyta. Strėlių antgaliai žymi ikimazginius nervus, pasiekiančius širdies vartus, strėlės – užmazginius epikardinius nervus, o dvigubi antgaliai – vidusieninių nervinių mazgų vietą širdies vartų ribose. Žvaigždutėmis (*) pažymėti atsitiktiniai oro burbulai, susidarę po visą preparatą dengiančiu dengiamuoju stikleliu. PGP 9,5 pozityvios struktūros žymėtos pilka spalva, nNOS – raudona, o TH – žalia spalva.
Adaptuota pagal [34]. Panaudota pagal „Elsevier“ autorių pakartotinio naudojimo politiką.



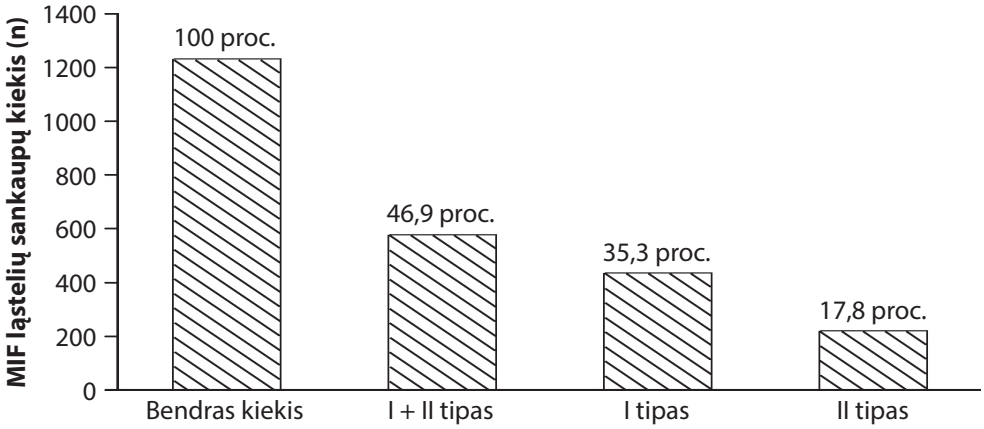
3.3.2 pav. *MIF ląstelių morfologinė įvairovė žiurkių prieširdžių sienoje*

(A) Dažniausiai nustatomos MIF ląstelių sankaupos sudarytos iš dviejų tipų ląstelių. Didžiausia sankaupa (apibrėžta tamsiai rudos spalvos punktyrine linija) apima 87 abiejų tipų MIF ląsteles. I tipo MIF ląstelių kūnai yra verpstės formos, su aiškiomis, pailgomis ataugomis (rodyklės), kurios gerai matomos rėmelio srityje **A'**, padidintame viršutiniame vaizde **A'**. To paties vaizdo **A'** srityje rodyklių antgaliais pažymėtos II tipo MIF ląstelės – jos yra ovalios formos ir neturi ataugų. Rėmeliu pažymėta vieta **B'** padidinta apatiniame vaizde **B'** siekiant parodyti plačius tarpląstelinius tarpus, dėl kurių MIF ląstelės susiskirsto į atskiras sankaupas. Baltai mėlyna punktyrinė linija apibrėžia mažesnes sankaupas, sudarytas tik iš II tipo MIF ląstelių. Raidė n prie atitinkamos sankaupos nurodo nustatytą MIF ląstelių skaičių.
Adaptuota pagal [34]. Panaudota pagal „Elsevier“ autorių pakartotinio naudojimo politiką.



3.3.3 pav. *I ir II tipo MIF ląstelių morfologija*

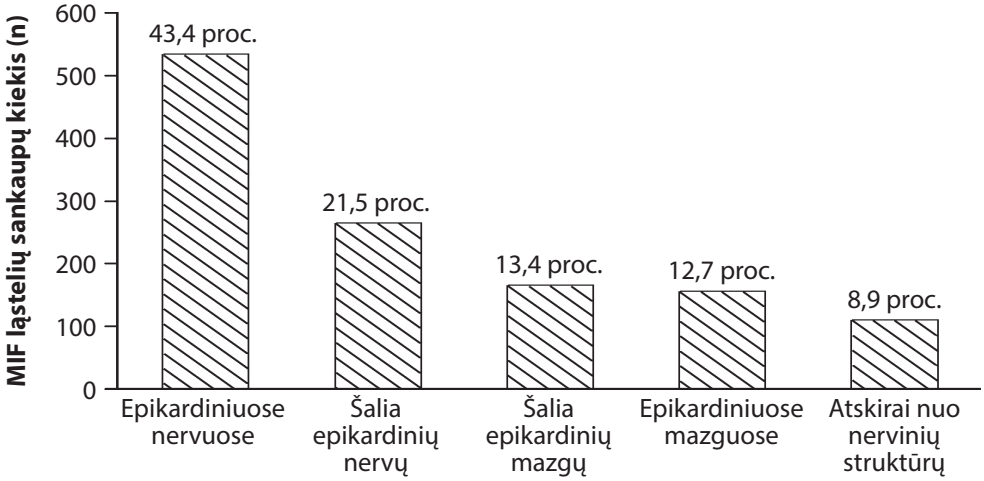
(A) Sankaupa, sudaryta iš I tipo MIF ląstelių (jų ryškios ataugos pažymėtos rodyklėmis), lokalizuota epikardiniame nerve (apvesta punktyrine linija), kuriame taip pat aiškiai matomos adrenerginės nervinės skaidulos. **(B)** Netaisyklingai išsidėsčiusi I tipo MIF ląstelių sankaupa nesusijusi su jokiu nervu, tačiau gausios šių ląstelių ataugos (rodyklės) jas jungia tarpusavyje. **(C, D)** II tipo MIF ląstelių sankaupos, pasižyminčios ovaliais kūneliais ir neturinčios ataugų, suformuoja glaudžiai išsidėsčiusias sankaupas. Pažymėtina, kad II tipo MIF ląstelių sankaupų kompaktiškumas gali skirtis. Be to, kai kurios ląstelės (žvaigždutė, **D**) pasižymi intensyvesne TH ekspresija; tai leidžia teigti, kad šiose ląstelėse yra didesnė katecholaminų koncentracija.
Adaptuota pagal [34]. Panaudota pagal „Elsevier“ autorių pakartotinio naudojimo politiką.



3.3.4 pav. *MIF ląstelių morfotipų pasiskirstymas bendrame ištirtų sankaupų skaičiuje (n = 1230, 100 proc.)*

Mišrios sankaupos, turinčios abiejų morfotipų MIF ląsteles (I + II tipas), sudarė didžiausią dalį visų nustatytų sankaupų (n = 577, 46,9 proc.). Sankaupose, kuriose nustatytos tik I tipo MIF ląstelės (su aiškiai išreikštomis ataugomis), sudarė 434 atvejus (35,3 proc.), o 219 sankaupų (17,8 proc.) sudarė vien tik II tipo MIF ląstelės (be ataugų).

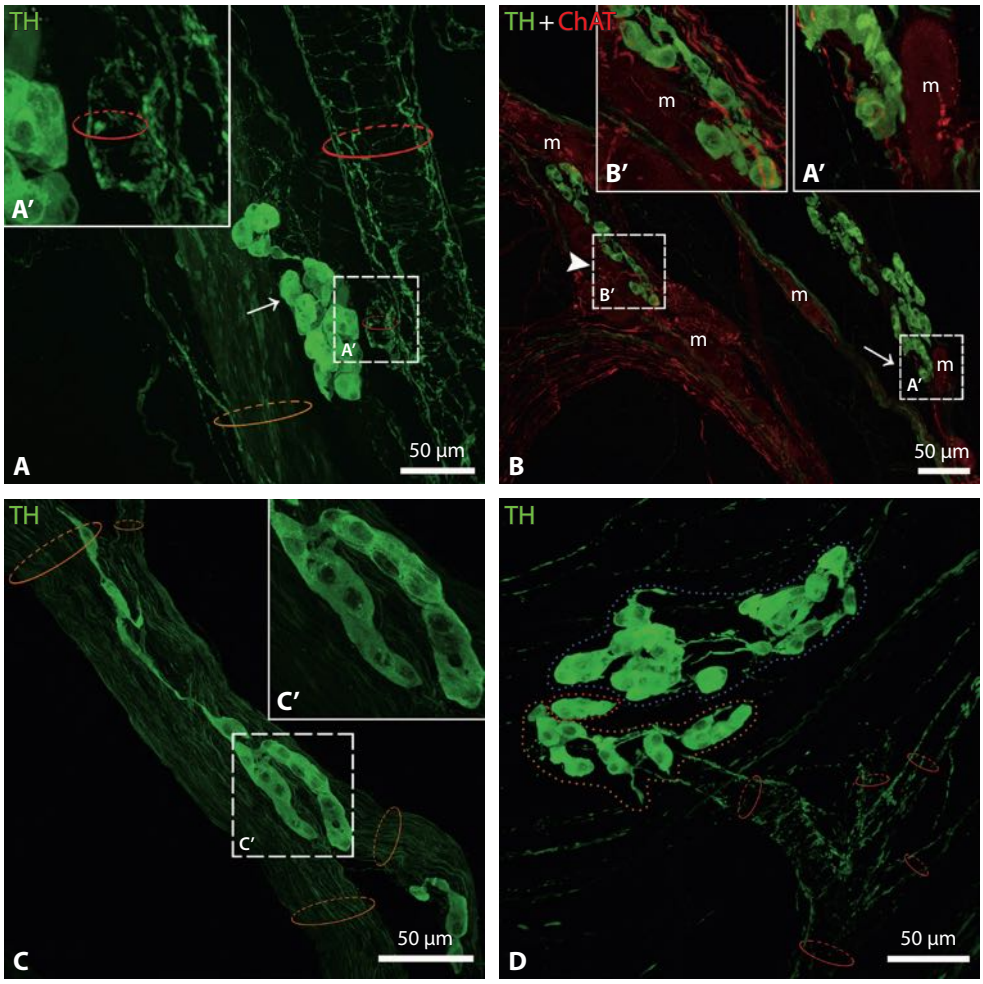
Adaptuota pagal [34]. Panaudota pagal „Elsevier“ autorių pakartotinio naudojimo politiką.



3.3.5 pav. *MIF ląstelių sankaupų vieta žiurkių prieširdžiuose*

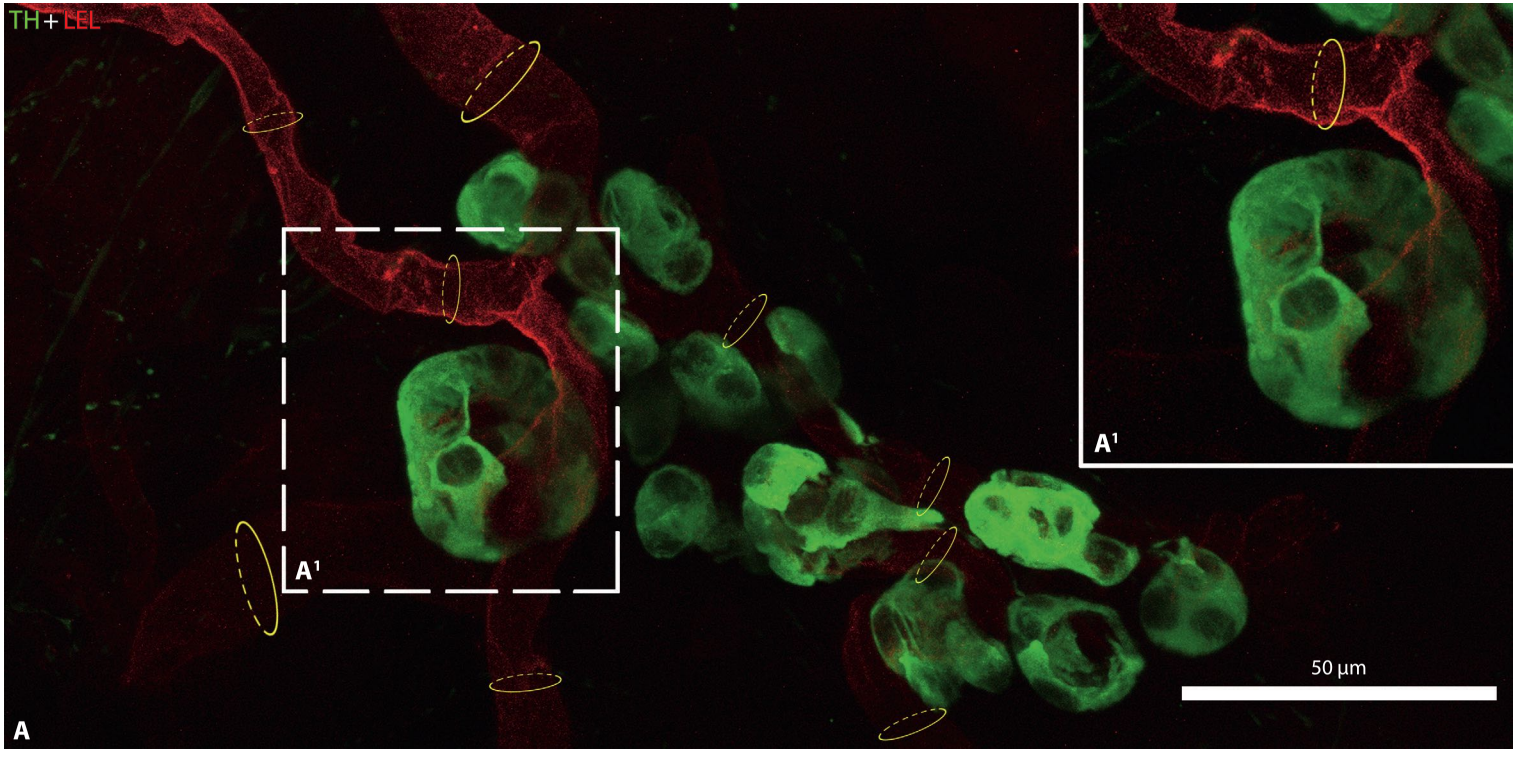
Sankaupos nustatytos epikardiniuose nervuose (n = 534, 43,4 proc.), šalia epikardinių nervų (n = 265, 21,5 proc.), šalia epikardinių mazgų (n = 165, 13,4 proc.), epikardiniuose mazguose (n = 156, 12,7 proc.) bei srityse, kuriose nėra greta esančių nervinių struktūrų (n = 110, 8,9 proc.).

Adaptuota pagal [34]. Panaudota pagal „Elsevier“ autorių pakartotinio naudojimo politiką.



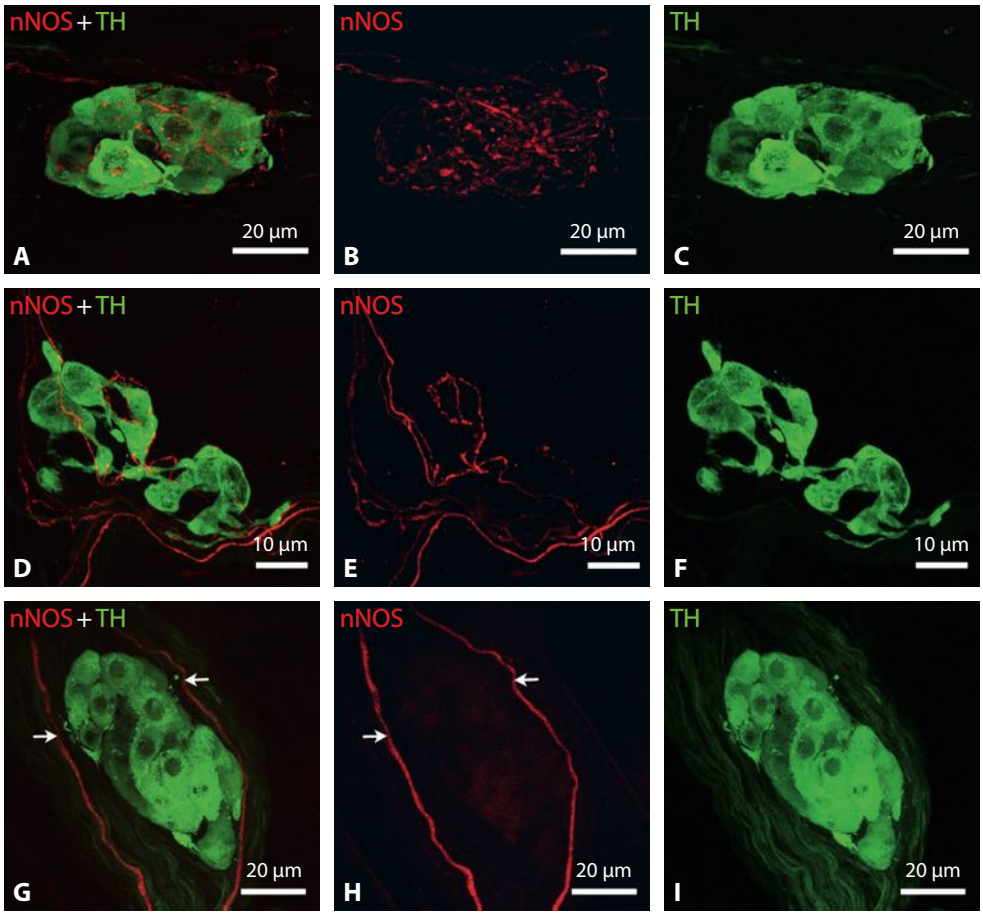
3.3.6 pav. *MIF ląstelių išsidėstymas žiurkių prieširdžiuose juos imunohistochemiškai pažymėjus tirozino hidroksilaze (TH, žalia spalva), cholino acetiltransferaze (ChAT, raudona spalva)*

(A) MIF ląstelių sankaupa (balta rodyklė), lokalizuota šalia epikardinio nervo (pažymėto oranžine elipse) ir kraujagyslių (pažymėtų raudonomis elipsėmis). **(B)** MIF ląstelių sankaupos, esančios šalia (balta rodyklė) ir viduje (balta rodyklės galvutė) cholinerginių epikardinių mazgų (m). **(C)** MIF ląstelės, išsibarsčiusios epikardiniame nerve. **(D)** Trys MIF ląstelių sankaupos (apibrėžtos skirtingų spalvų punktyrinėmis linijomis), išsidėsčiusios prieširdžio epikarde, toliau nuo mazgų, rezginių ar nervinių skaidulų, tačiau šalia kraujagyslių (pažymėtų raudonomis elipsėmis), kurios apsuptos perivaskulinių TH teigiamų nervinių skaidulų. Adaptuota pagal [34]. Panaudota pagal „Elsevier“ autorių pakartotinio naudojimo politiką.



3.3.7 pav. *MIF ląstelių išsidėstymas žiurkių prieširdžiuose juos imunohistochemiškai pažymėjus TH (žalia spalva) ir kraujagysles pažymėjus pomidorų lektinu (LEL)*

Tipinis labai TH teigiamų MIF ląstelių sankaupų išsidėstymas šalia epikardinių kraujagyslių (apibrėžtų geltonomis elipsėmis), pažymėtų LEL (raudona spalva). **A** iliustracijoje punktyrine linija pažymėta sritis parodyta didesniu padidinimu atitinkamame **A¹** intarpe.
Adaptuota pagal [34]. Panaudota pagal „Elsevier“ autorių pakartotinio naudojimo politiką.

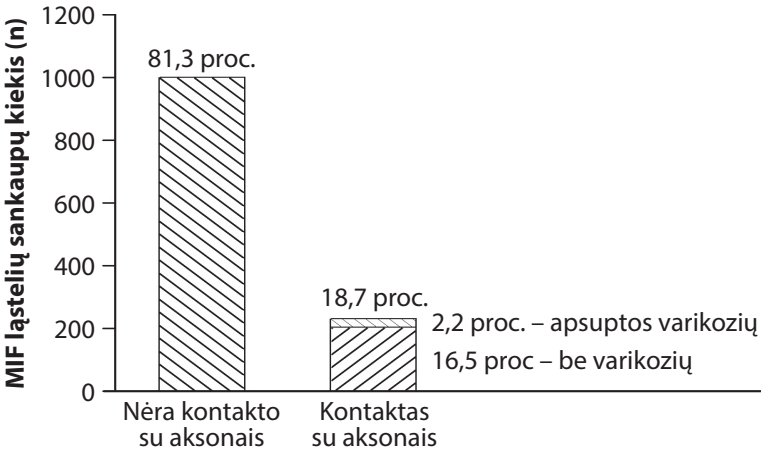


3.3.8 pav. *Trys aksonų morfologiniai tipai: imunopozityvūs nNOS, susiję su MIF ląstelėmis žiurkių prieširdžiuose*

Pirmojo tipo nitrerginės terminalės **(A–C)** turi gausių varikozių ir sudaro krepšelį aplink kontaktuojančias MIF ląsteles. Antrojo tipo aksonai **(D–F)** apgaubia tam tikras MIF ląsteles keliose vietose, tačiau neturi varikozių. Trečio tipo nitrerginiai aksonai **(G–I)** taip pat neturi varikozių, tačiau yra nutolę nuo MIF ląstelių (baltos rodyklės) lyginant su pirmų dviejų tipų aksonais. Trečio tipo aksonai parodo aiškų aksoninių kontaktų su MIF ląstelėmis nebuvimą. Adaptuota pagal [34]. Panaudota pagal „Elsevier“ autorių pakartotinio naudojimo politiką.

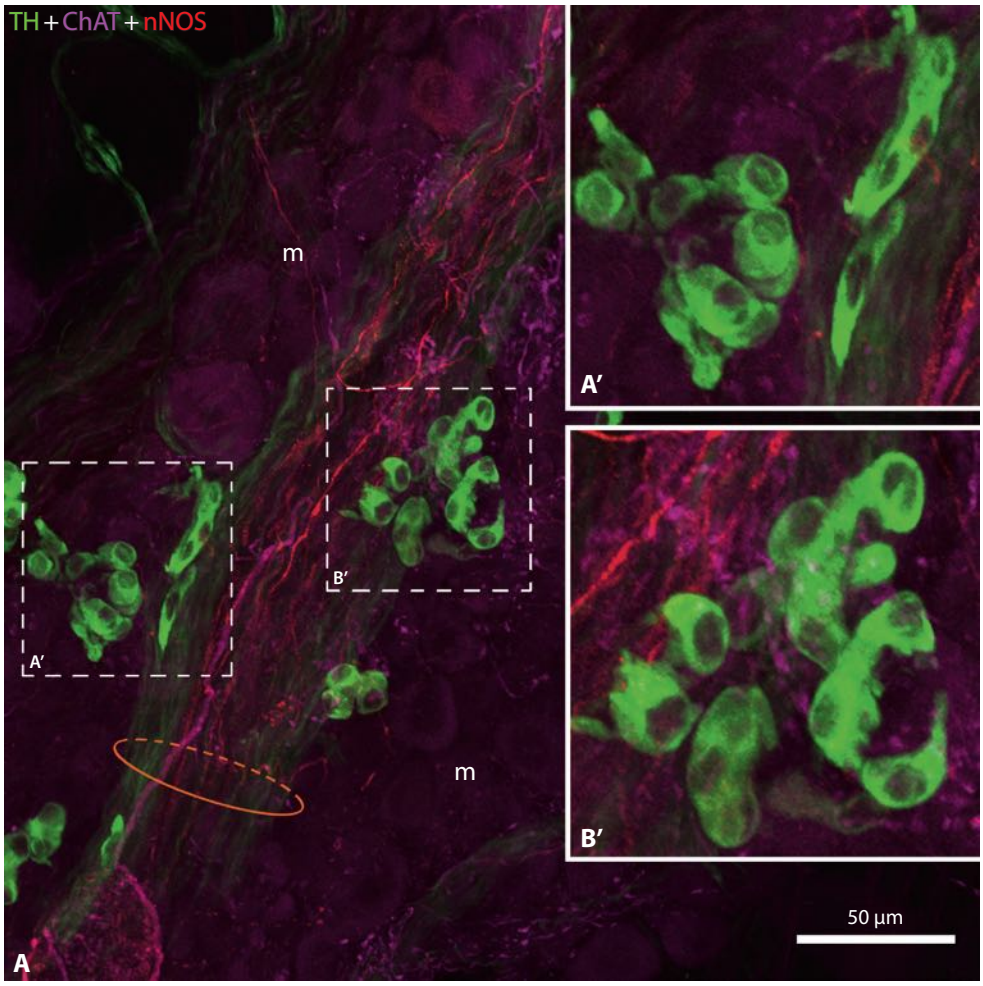
Nepriklausomai nuo imunohistochemiškai taikyto neuroninio žymens, dauguma žiurkių širdyse analizuotų MIF ląstelių sankaupų (~80 proc.) neturėjo tiesiogiai su šiomis adrenerginėmis ląstelėmis susijusių nervinių skaidulų (NS). Tačiau apie 20 proc. identifikuotų MIF ląstelių sankaupų turėjo nedidelį skaičių NS, glaudžiai susijusių su šiomis ląstelėmis, ir jos NS buvo nitrerginės, t. y. teigiamos tik neuroninei azoto oksido sintazei (nNOS) (3.3.8 pav. A–F). Mes nustatėme du šių NS tinklinės struktūros modelius, apimančius

MIF ląstelių sankaupas. Pirmas tipas (nustatytas ~2 proc. visų tirtų sankaupų) buvo retas – nitrerginės skaidulos glaudžiai apsupo MIF ląsteles, jų aksonuose buvo gausu varikozių, rodančių galimą tiesioginį jų dalyvavimą NO kontaktuose (3.3.8 pav. A–C, 3.3.9 pav.). Antras tipas buvo žymiai dažnesnis (~18 proc. visų tirtų sankaupų) – nitrerginių aksonų galuose varikozių buvo mažiau arba visai nebuvo (3.3.8 pav. D–F, 3.3.9 pav.). Šių aksonų tinklinis išsidėstymas konkrečių MIF ląstelių sankaupose leidžia teigti, kad jie gali būti funkciškai susiję su tomis MIF ląstelėmis, kurias pasiekia. Dauguma MIF ląstelių sankaupų (81,3 proc.) šiame tyrime neturėjo jokių NS, įskaitant nNOS teigiamas (3.3.8 pav. G–I, 3.3.9 pav.). Svarbu paminėti, kad visų tirtų žiurkių prieširdžių preparatuose neradome nė vienos MIF ląstelių sankaupos, prie kurios būtų priartėjusios cholinerginės skaidulos ar aksonai (3.3.10 pav.). Be to, mums pavyko identifikuoti kelis vidinius širdies nitrerginius neuronus žiurkių prieširdžiuose, kurių ataugos tęsėsi nuo neuronų kūnų iki MIF ląstelių sankaupų (3.3.11 pav.).



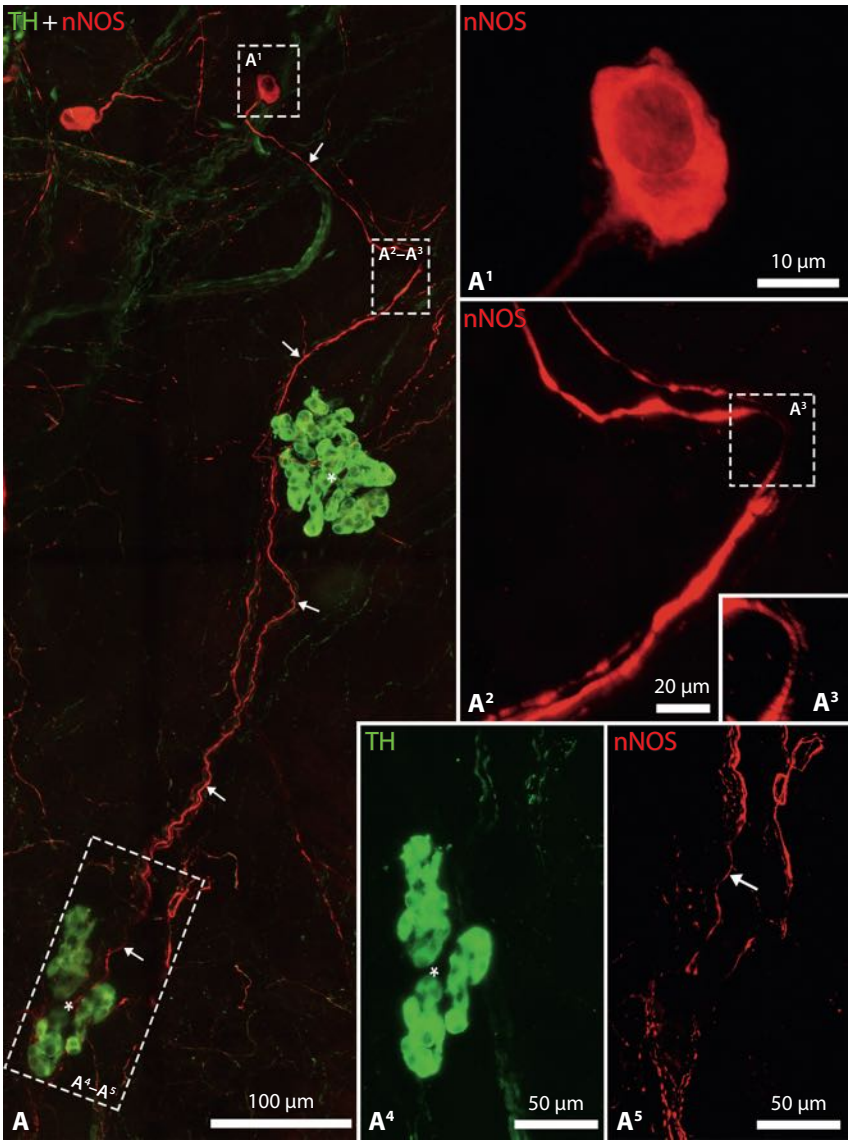
***3.3.9 pav**. MIF ląstelių sankaupų inervacija nitrerginiais aksonais*

Dauguma sankaupų (n = 1000) nebuvo susijusios su nervinėmis skaidulomis. Nedidelė dalis (n = 230) turėjo tiesioginius kontaktus su nNOS teigiamais aksonais, iš kurių 27 sankaupos buvo apsuptos varikozių turinčių aksonų, o 203 sankaupos kontaktavo su aksonais be varikozių. Skaičiai virš diagramų stulpelių rodo reikšmes procentais.
Adaptuota pagal [34]. Panaudota pagal „Elsevier“ autorių pakartotinio naudojimo politiką.



3.3.10 pav. *Mikrofotografija, iliustruojanti, kad cholinerginės nervinės skaidulos yra nesusijusios su MIF ląstelėmis žiurkių prieširdžių preparate, imunohistochemiškai pažymėtame tirozino hidroksilaze (TH), cholinio acetiltransferaze (ChAT) ir neuronine azoto oksido sintaze (nNOS)*

Rėmeliais pažymėtos vietos **(A', B')** padidintos atskiruose vaizduose rodo, jog šalia MIF ląstelių nėra ChAT teigiamų nervinių skaidulų su varikozėmis. m – žymi epikardinius mazgus, oranžinė elipsė – epikardinį nervą.
Adaptuota pagal [34]. Panaudota pagal „Elsevier" autorių pakartotinio naudojimo politiką.



3.3.11 pav. *Nitrerginė inervacija mažų intensyviai fluorescuojančių (MIF) ląstelių sankaupoje, esančioje vidusieninėje širdies vartų dalyje*

(A) Mikrovaizdų išklotinė, vaizduojanti imunohistochemiškai pažymėtą širdies vartų nervinį rezginį: MIF ląstelės, pažymėtos tirozino hidroksilaze (TH žalia, žvaigždutėmis), ir du gretimi neuronai, pažymėti neuronine azoto oksido sintaze (nNOS, raudona). Pažymėtas nitrerginis aksonas (rodyklės), kilęs iš vieno nitrerginio neurono **(A^1)**, tęsiasi link apatinės MIF ląstelių sankaupos **(A^4–A^5)** ir „apgaubia" ją. Rėmeliais pažymėtos **(A)** vietos padidintos **A^1–A^5** intarpuose siekiant parodyti skirtingas nitrerginio neurono vietas ir MIF ląsteles, aprūpinamas nitrerginėmis terminalėmis.
Adaptuota pagal [34]. Panaudota pagal „Elsevier" autorių pakartotinio naudojimo politiką.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

4.1. Širdies nervinių galūnių morfologiniai tipai, jų sandara, pasiskirstymas ir galima funkcinė reikšmė

Per kelis dešimtmečius sukaupti duomenys apie vidusienines nervines galūnes ir ankstesni stebėjimai, atlikti taikant metileno mėlio dažymą, sidabro impregnavimą ir imunohistochemiją [26, 132, 133, 138, 217], leidžia teigti, kad puokštės tipo JNG širdyje yra gana retos ir išsidėsčiusios lokaliai. Dėl šios priežasties jas dažniausiai pavyksta nustatyti tik tiriant visos širdies preparatus arba širdies išklotines. Iki šiol nervinių galūnių nepavyko nustatyti nei skersiniuose, nei išilginiuose širdies pjūviuose, nes jų savita (plona ir plati) struktūra sunkina atpažinimą ir interpretavimą audinių pjūviuose. Dauguma nervinių galūnių buvo nustatytos skilvelių epikarde, ypač vainikinės vagos srityje ir žemiau jos bei prieširdžių endokarde ties didžiųjų venų ančiais.

Iki šiol dar trūksta patikimų anatominių duomenų, leidžiančių apibūdinti mūsų išryškintų ir analizuotų nervinių galūnių kilmę ir įvertinti jų funkcinę reikšmę. Tačiau naudojant palyginamąjį metodą, galima daryti prielaidą, kad mūsų identifikuotos epikardinės puokštės tipo galūnės tikėtina yra labai panašios arba net identiškos toms nervinėms galūnėms, kurios buvo išryškintos aortos lanko sienoje ir prieširdžių endokarde, taikant DiI dažo grįžtamosios (retrogradinės) ir anterogradinės pernašos pelės klajoklio nervo apatinio mazgo juntamųjų neuronų aksonais metodą ir konfokalinę išskleistos širdies bei aortos lanko sienos mikroskopiją [26, 133]. Pastarųjų darbų autoriai teigia, kad puokštės tipo išsišakojančios galūnės atlieka baroreceptinę funkciją, t. y. reaguoja į kraujagyslių ir širdies sienelių mechaninį tempimą. Perduodamos tiesioginius juntamuosius impulsus į smegenų kamieno atskirojo laido branduolį per klajoklio nervo apatinio mazgo ląsteles, puokštės tipo aferentinės skaidulos, tikėtina, dalyvauja barorefleksinės arterinio kraujospūdžio ir širdies susitraukimų dažnio reguliacijos procesuose [219].

Prielaidą, kad puokštės tipo nervinės galūnės yra klajoklio nervo pirminių juntamųjų neuronų periferinių aksonų galūnės taip pat pateikė Kazci ir bendraautoriai [135], kurie panaudojo transgenines peles, ekspresuojančias Phox2b-Cre-tomato fluorescencinį nešiklį, specifiškai būdingą klajoklio nervo apatinio mazgo visceraliniams juntamiesiems neuronams. Kazci su bendraautoriais, mikroskopuodami prieširdžių išklotinių preparatus didelės skiriamosios gebos konfokaliniu mikroskopu, pateikė klajoklio nervo aferentų lokalizacijos širdilapį. Nustatyta, kad rastos puokščių tipo nervinės galūnės visada buvo susijusios su Phox2b ekspresuojančiomis nervinėmis skaidulo-

mis ir taip patvirtino jų klajoklio nervo juntamąją kilmę. Be to, Hirakawa ir bendraautoriai [220] pateikė patikimų morfologinių ir funkcinių įrodymų apie atskirą žiurkės skrandžio prievarčio urvo serozinio dangalo klajoklio nervo aferentinių nervinių galūnių klasę . Šios struktūros, pasižyminčios stipriu P2X3 imunoreaktyvumu, yra akivaizdžiai panašios į mūsų tirtų gyvūnų rūšių širdyse nustatytas puokštės tipo nervines galūnes. Tačiau Shenton ir bendraautoriai [134], sudarydami žiurkės endokardinio nervinio rezginio širdilapį ties tuščiųjų venų ir prieširdžio sritimi, pateikė gana kritiškų įžvalgų dėl šių nervinių galūnių klajoklio nervo kilmės. Svarbu pažymėti, kad Murakami ir bendraautoriai. [136], taikydami didelės skiriamosios gebos nuoseklių pjūvių atgalinės sklaidos (angl. *backscatter*) elektronų skenuojamąją mikroskopiją ir trimatę rekonstrukciją, pateikė šių nervinių galūnių ultrastruktūrinę charakteristiką. Pasak autorių, elektroninės mikroskopijos kriterijai, leidžiantys identifikuoti puokščių tipo galūnes, yra šie: 1) suplokštėjusios, netaisyklingų kontūrų, vienasluoksnės aksonų nervinės galūnės; 2) dalinis jų apgaubimas Švano ląstelių ataugomis; 3) gausios skaidrios sekrecinės pūslelės, susitelkusios Švano ląstelėmis nepadengtose srityse; 4) gausus mitochondrijų ir į glikogeną panašių granulių kiekis; 5) aplink esanti daugiasluoksnė pamatinė membrana ir fibroblastų turintis tarpląstelinis užpildas. Nervinių galūnių dalys paprastai yra plonesnės nei 1 μm ir glaudžiai susijusios su nemielinizuojančių Švano ląstelių citoplazminėmis ataugomis, kurios tik iš dalies apgaubia aksolemą. Toks dalinis apgaubimas yra svarbus morfologinis požymis, nes sudaro sąlygas tiesioginei aksono membranos sąveikai su tarpląsteliniu užpildu, ypač srityse, kuriose kaupiasi sekrecinės pūslelės. Apskritai šie požymiai pagrindžia puokščių tipo nervinių galūnių priskyrimą mechanosensoriniams baroreceptoriams, kurie dalyvauja autokrininės glutamaterginės moduliacijos procesuose ir gali būti veikiami simpatinių neuroefektorinių signalų. Funkciniu požiūriu šios galūnės galbūt yra mechaniniams dirgikliams jautrios struktūros, galinčios reaguoti į prieširdžio sienelės įsitempimą ar deformaciją. Jų topografinis susitelkimas ties venų ir prieširdžio jungtimis – vietose, patiriančiose dinaminį tempimą širdies ciklo metu – dar labiau pagrindžia jų galimą įtaką reaguojant į širdies kamerų tūrio pokyčius ir sukeliant autonominius refleksus [136].

Taikydami imunohistocheminius nervinių struktūrų žymėjimo metodus, skirtus specifiniams juntamųjų neuronų žymenims identifikuoti, nustatėme, kad nervinių galūnių randama ir širdies vidusieniniuose nerviniuose mazguose. Juose nervinės galūnės apraizgo pavienes ląsteles, į kurias ir per kurias, tikėtina, gali būti veikiama širdies eferentinė nervinė reguliacija. Be to, širdies nervinių galūnių morfotipai pasižymi rūšiai būdingais skirtumais. Šių skirtumų reikšmei paaiškinti reikalingi tolesni tyrimai, nes net vienodo dydžio skirtingų rūšių širdys turi aiškiai besiskiriančias nervines galūnes.

Tirtose žiurkių širdyse aksonų galūnės, ekspresuojančios tipinius nugarinių mazgų juntamųjų neuronų žymenis – medžiagą P (SP) ir su kalcitonino genu susijusį peptidą (CGRP) – aplink širdies nervinių mazgų neuronų kūnus suformuoja krepšelio tipo struktūras. Pažymėtina, kad nNOS-teigiami aksonai taip pat formuoja identiškas ar labai panašias krepšelio tipo galūnių struktūras aplink širdies vidusieninių mazgų cholinerginių neuronų kūnus. Ankstesnių tyrimų rezultatai [221] parodė, kad žiurkės klajoklio nervo juntamieji mazgai daugiausia yra nitrerginiai. Dėl šios priežasties galima teigti, jog krepšelio tipo struktūras ant širdies vidusieninių neuronų formuojantys nitrerginiai aksonai yra šios rūšies klajoklio nervo juntamųjų neuronų periferinių aksonų galūnės. Širdies vidusieniniai juntamieji neuronai, turintys tipinį pirminių juntamųjų neuronų fenotipą (imunopozityvūs SP ir CGRP), iki šiol nėra nustatyti ar patvirtinti. Todėl keliame hipotezę, kad ir nugarinių mazgų, ir klajoklio nervo juntamųjų mazgų kilmės visceraliniai juntamieji neuronai gali tiesiogiai moduliuoti užmazginius parasimpatinius cholinerginius neuronus širdies vidusieniniuose nerviniuose mazguose per savo krepšelio tipo galūnes. Šiose struktūrose nustatomos su SP, CGRP ir nNOS susijusios signalinės (transdukcinės) molekulės. Norint išsamiau suprasti, kaip šios krepšelio tipo galūnės, imunoreaktyvios antikūnams prieš SP, CGRP ir nNOS, sąveikauja su neapgaubtais širdies vidiniais cholinerginiais neuronais, būtini tolesni tyrimai. Ypač reikalingi imunoelektroninės mikroskopijos tyrimai, kurie leistų nustatyti šių galūnių ultrastruktūrinius požymius ir atskirti jas nuo gausių klajoklio nervo ikimazginių cholinerginių aksonų, kontaktuojančių su širdies mazgų neuronų kūnais. Šiuo metu vis dar neaišku, ar patys širdies vidusieniniai nitrerginiai neuronai gali formuoti krepšelio tipo galūnes aplink tipinių cholinerginių užmazginių klajoklio nervo neuronų kūnus. Jeigu vėlesniais tyrimais būtų patvirtinta, kad širdies vidusieninių nitrerginių neuronų aksonai formuoja krepšelio tipo galūnes, tai patvirtintų ir mūsų hipotezę apie galimą vietinę (vidusieninę) vidinių širdies neuronų cheminio fenotipo juntamąją funkciją.

4.2. Širdies MIF ląstelių inervacija

Mūsų atliktų tyrimų duomenys patvirtina ankstesnius stebėjimus, rodančius, kad vidusieninių MIF ląstelių sankaupose nervinių skaidulų dažniausiai nėra. Absoliuti dauguma šiame tyrime analizuotų TH labai imunoreaktyvių MIF ląstelių nebuvo tiesiogiai apsuptos nervų. Ankstesniuose tyrimuose cholinerginė (parasimpatinė) širdies MIF ląstelių inervacija, tikėtina, buvo interpretuota klaidingai, nes šios ląstelės gausiai išsidėsčiusios vidusieniniuose širdies nervuose ir mazguose, kuriuose cholinerginio bei kitų chemi-

nių fenotipų nervinės skaidulos pasiskirsčiusios tam tikru atstumu nuo pačių MIF ląstelių kūnų [222, 223]. Tačiau šis tyrimas pirmą kartą pateikia anatominių įrodymų, kad beveik penktadalis (18,7 proc.) visų identifikuotų MIF ląstelių buvo glaudžiai ir įvairiai apsuptos smulkių nervinių skaidulų, imunopozityvių išimtinai nNOS. Be to, buvo nustatyta, kad tik nedidelė dalis žiurkės širdies (2,2 proc.) tirtų MIF ląstelių buvo tankiai apipintos nNOS teigiamaisiais, varikozių turinčiais aksonais. Tai leidžia teigti, kad gali egzistuoti nerviniai kontaktai su tam tikra MIF ląstelių populiacija, galinčia dalyvauti katecholaminų endokrininio išskyrimo procese. Atsižvelgiant į ankstesnius duomenis apie vyraujančius žiurkės klajoklio nervo juntamuosiuose mazguose nitrerginius neuronų kūnus ir gausias nitrerginių neuronų populiacijas vidusieniniuose širdies mazguose [221], galima teigti – MIF ląsteles apipinantys nitrerginiai aksonai gali būti klajoklio nervo juntamųjų neuronų projekcijos. Šiai prielaidai patvirtinti būtini tolesni kitų gyvūnų rūšių, turinčių didesnį širdies MIF ląstelių skaičių, neuroanatominiai tyrimai ir žmogaus širdies tyrimai. Be to, šiame tyrime nustatyta, kad vidusieniniai nitrerginiai neuronai žiurkės širdyje siunčia aksonus į gretimas MIF ląstelių sankaupas. Tai leidžia teigti, kad MIF ląstelių nitrerginė nervinė moduliacija gali būti palaikoma ne tik už širdies ribų esančiomis, bet ir vidusieninėmis širdies nitrerginėmis neuroninėmis grandimis.

Prielaidą, kad žiurkės vidusienines MIF ląsteles glaudžiai apipinantys nitrerginiai aksonai yra juntamosios kilmės, iš dalies patvirtina Cheng ir bendraautorių [26] tyrimas. Tame tyrime, taikant intrakranijinę klajoklio nervo judinamųjų šaknelių rizotomiją eferentinėms klajoklio nervo skaiduloms pašalinti ir didelės skiriamosios gebos konfokalinę lazerinę skenuojamąją mikroskopiją, buvo nustatyti juntamieji klajoklio nervo aksonai. Jie buvo pažymėti DiI atsekamuoju žymeniu, suleistu į klajoklio nervo apatinį mazgą ties MIF ląstelėmis aortos lanko, bendrųjų miego arterijų ir poraktinių arterijų sienelėse. Cheng ir bendraautoriai [26] šiuos pažymėtus periferinius klajoklio nervo aksonus, kurie baigėsi ties MIF ląstelėmis, laikė chemoreceptoriais. Anatomiškai jie buvo tapatūs šiame tyrime žiurkės vidusieninėse MIF ląstelėse nustatytiems ląsteles supantiems nitrerginių aksonų krepšeliams. Taikydama tuos pačius tyrimo metodus, Cheng grupė [133] taip pat nustatė klajoklio nervo aferentines ląsteles supančias galūnes aplink MIF ląsteles žiurkės prieširdžių sienelėse. Šių autorių aprašytos klajoklio nervo aferentinės galūnės MIF ląstelių aplinkoje atitiko antrą šiame tyrime nustatytų nitrerginių aksonų tipą. Be to, naujausi Ma ir bendraautorių [32] tyrimų duomenys įrodo, kad aprašytos ląsteles supančios nitrerginės nervinės skaidulos prie vidusieninių širdies MIF ląstelių greičiausiai nėra nugarinių juntamųjų neuronų periferiniai aksonai, nes jie žiurkės prieširdžiuose pasižymi savitais

morfologiniais ir neurocheminiais požymiais bei išsidėsto toliau nuo MIF ląstelių.

Jeigu būtų patvirtinta, kad specifines širdies MIF ląsteles apipinantys nitrerginiai aksonai yra juntamosios kilmės, tai galėtų suteikti naujų įžvalgų aiškinant paradoksinį širdies susitraukimo dažnio padidėjimą po klajoklio nervo stimuliacijos, sužadinančios adrenerginį atsaką širdyje [224, 225]. Kalbant apie širdies MIF ląsteles, mūsų duomenys leidžia teigti, kad funkcinis jų vaidmuo yra dvejopas: daugelis jų apskritai neturi nervinės reguliacijos, o nedidelė jų populiacija yra tiesiogiai reguliuojama klajoklio nervo arba net vidusieninių nitrerginių neuronų, kurių įtaka nervinei širdies veiklos kontrolei iki šiol nėra išaiškinta. Tolesni tyrimai būtini siekiant atskleisti anatominę inervuotų ir neinervuotų MIF ląstelių įvairovę bei galimą jų funkcinį poveikį širdies veiklai.

Nitrerginės širdies MIF ląstelių inervacijos nustatymas gali padėti geriau suprasti širdies susitraukimo dažnio padidėjimo mechanizmą, pasireiškiantį po elektrinės klajoklio nervo stimuliacijos [224, 225]. Tikėtina, kad klajoklio nervo stimuliacijos sukelta tachikardija nėra susijusi su tiesioginiu klajoklio nervo eferentinių skaidulų sužadinimu ir dėl šios priežasties vykstančiu katecholaminų išsiskyrimu iš MIF ląstelių, kaip buvo manoma seniau [226–228]. Labiau tikėtina, kad minėtas simpatinės kilmės širdies aktyvacijos mechanizmas apima klajoklio nervo aferentines skaidulas, kadangi tipinė parasimpatinė užmazginė cholinerginė vidusieninių MIF ląstelių inervacija iki šiol nėra įrodyta. Remdamiesi šiuo anatominiu faktu, keliame hipotezę, kad elektrinė klajoklio nervo aferentų stimuliacija sužadina neuronų signalus iš atskirojo laido branduolio, o iš jo nerviniai impulsai per nusileidžiančias tinklinio darinio skaidulas aktyvina simpatinius ikimazginius neuronus. Tačiau lieka neaiškus galimas periferinių klajoklio nervo aferentų, pasižyminčių nitrerginiu cheminiu fenotipu ir inervuojančių tyrime nustatytas negausias vidusienines MIF ląsteles, vaidmuo. Viena iš galimų šių nitrerginių aksonų funkcijų galėtų būti chemorecepcija MIF ląstelių sankaupose, per kurią būtų reguliuojama vidusieninė MIF ląstelių endokrininė funkcija. Tačiau minėtas padidėjęs širdies susitraukimų dažnis, sukeltas klajoklio nervo stimuliacijos, gali būti aiškinamas ir remiantis neseniai nustatytu anatominiu faktu, kad klajoklio nervo kaklinės ir krūtininės šakos kartu su nervais, išeinančiais iš simpatinio kamieno kaklinių ir krūtininių mazgų, aprūpina žmogaus širdį gausybe užmazginių simpatinių skaidulų [229–231].

4.3. Galima audinių paruošimo įtaka tyrimo rezultatams ir jų vertinimui

Remdamiesi mūsų sukauptais duomenimis, manome, kad širdies nervinių galūnių vizualizacija tikėtina priklauso ne tik nuo taikomo nervinio rezginio dažymo metodo ir prieš dažymą atliktos audinių cheminės fiksacijos, bet ir nuo laiko, praėjusio po organizmo mirties (lot. *post-mortem*). Juo šis laikas trumpesnis, juo didesnė tikimybė kontrastingai išryškinti šias struktūras.

Mūsų atliktame prieširdžių išklotinių preparatų tyrime buvo išsamiai analizuota ne tik širdies inervacija, bet ir kitų širdies ląstelių, pvz., MIF, morfologiniai fenotipai ir jų pasiskirstymas. Manome, kad taikytas audinių paruošimo protokolas, apėmęs cheminę fiksaciją, dehidrataciją ir rehidrataciją, neturėjo reikšmingos įtakos nei analizuotoms nervinėms struktūroms, nei su jomis susijusioms kitoms ląstelėms (jų dydžiui ir pasiskirstymui širdies sienose) arba ši įtaka buvo minimali. Yra tikimybė, kad ir pradinė prefiksacija 4 proc. paraformaldehido tirpalu, ir vėlesnė dehidratacija etanoliu bei Dento tirpalu galėjo sukelti neryškų audinių ir ląstelių susitraukimą. Teoriškai dehidratacijos etapas galėjo sukelti nedidelį MIF ląstelių tankio padidėjimą. Tačiau vėliau atlikta audinių rehidratacija turėjo atkurti pradinį MIF ląstelių pasiskirstymo tankį, jeigu audiniai į visus taikytus paruošimo etapus reagavo vienodai. Didesnę įtaką rezultatų interpretacijai galėjo turėti pats prieširdžių išklotinių preparatų paruošimas. Šią procedūrą sudarė: tikslių pjūvių atlikimas, audinių karpymas, prieširdžių sienelių ištempimas ir jų išlyginimas ant silikoninio pagrindo prieš atliekant nervinių struktūrų ir MIF ląstelių imunohistocheminį žymėjimą. Ši procedūra gali būti vienas iš šio tyrimo metodinių trūkumų. Prieširdžių išklotinių preparatų išskleidimas natūraliai sukėlė mechaninį prieširdžių sienelių tempimą, dėl kurio MIF ląstelių sankaupos galėjo būti matomos kaip labiau viena nuo kitos nutolusios. Dėl šios priežasties galbūt tikrasis MIF ląstelių sankaupų skaičius buvo mažesnis nei tas, kuris buvo išanalizuotas šiame tyrime.

IŠVADOS

1. Taikant visos širdies ir išskleistos širdies preparatų gamybos technikas ir histocheminį AChE dažymą bei specifinius aferentinių nervinių struktūrų imunohistocheminius vizualizavimo metodus, žmogaus ir tirtų penkių rūšių žinduolių (miniatiūrinės kiaulės, žiurkės, dviejų šikšnosparnių ir pelės) širdies sienose yra nustatytos dviejų morfologinių tipų nervinės galūnės – puokštės ir krepšelio.
   1.1. Endokardinės puokštės tipo galūnės yra būdingos tik žmogui, nes kitų tirtų gyvūnų endokarde nei puokštės, nei krepšelio tipo nervinių galūnių nenustatyta.
   1.2. Mūsų tirtų gyvūnų rūšių epikarde yra paplitusios abiejų tipų galūnės, kurių žmogaus epikarde nebuvo nustatyta.
   1.3. Puokštės tipo nervinės galūnės lokalizuojasi po mezotelio ląstelių sluoksniu, todėl tikslinga jas vadinti submezotelinėmis. Didžioji dauguma submezotelinių galūnių pasiskirsto širdies skilvelių epikarde – tiek krūtinkauliniame, tiek diafragminiame, tiek ir šoniniuose skilvelių paviršiuose.
   1.4. Krepšelio tipo nervinės galūnės nustatomos ir tikėtina yra susijusios su širdies vidusieninių mazgų neuronų kūnais.
   1.5. Puokštės tipo nervinės galūnės yra imunoreaktyvios tik bendrajam neuroniniam baltymui PGP 9,5. Krepšelio tipo nervinės galūnės yra imunoreaktyvios PGP 9,5 bei SP, CGRP ir nNOS neuroniniams žymenims.
2. Puokštės tipo nervinės galūnės pasižymi ryškiais rūšiniais morfometriniais skirtumais. Didžiausios šio tipo nervinės galūnės nustatytos žmogaus širdies endokarde ir miniatiūrinės kiaulės epikarde. Žiurkės epikardinės puokštės tipo nervinės galūnės yra didesnės, negu šio tipo galūnės šikšnosparnių ir pelės epikarde. Pastarosios rūšies epikardinės puokštės tipo galūnės yra pačios smulkiausios.
3. Absoliuti dauguma širdies mažų intensyviai fluorescuojančių ląstelių savo aplinkoje neturi jokių nervinių skaidulų ir pasižymi netolygiu topografiniu pasiskirstymu, tačiau jos yra dviejų morfologinių tipų (I tipo ląstelės – su ataugomis, o II tipo ląstelės – be ataugų); nedidelis jų kiekis (iki 19 proc.) žiurkės širdyje yra apgaubtos plonomis nitrerginėmis skaidulomis. Specifiniams aferentinių neuronų žymenims (SP, CGRP ir nNOS) imunoreaktyvios nervinės skaidulos ir nervinės galūnės sudaro krepšelius apie vidusieninių mazgų neuronų kūnus, kurių egzistavimas yra įrodytas tik žiurkės širdyje. Ateityje reikia ištirti, ar kitų rūšių gyvūnų

širdyje yra tipiškų aferentinių neurožymenų turinčių nervinių skaidulų bei galūnių. Jas patvirtinus yra prielaida manyti, kad ir nugariniai, ir klajoklio nervo aferentiniai neuronai per savo periferinius aksonus, bet ne per vidusieninius aferentinius neuronus (kurių egzistavimas iki šiol anatomiškai neįrodytas), galbūt tiesiogiai moduliuoja širdies vidusieninių nervinių mazgų eferentinius neuronus.

SUMMARY

ABBREVIATIONS

AChE	–	acetylcholinesterase
ADRS	–	antibody diluent reagent solution
AF488	–	alexa fluor 488 green-fluorescent dye
B-NEs	–	basket type nerve endings
CGRP	–	calcitonin gene-related peptide
ChAT	–	choline acetyltransferase
Cy3	–	cyanine3 orange-fluorescent dye
Cy5	–	cyanine5 far-red-fluorescent dye
DMSO	–	dimethylsulfoxide
FS-NEs	–	flower-spray-type nerve endings
HuC/HuD	–	HuC and HuD neuronal RNA-binding proteins
IPN	–	interpeduncular nucleus
LEL	–	tomato lectin
NDS	–	normal donkey serum
NF	–	nerve fibres
NO	–	nitric oxide
PB	–	phosphate buffer
PBS	–	phosphate-buffered saline
PFA	–	paraformaldehyde
PGP 9.5	–	protein gene product 9.5
SIF cells	–	small intensely fluorescent cells
SP	–	substance P
TH	–	tyrosine hydroxylase
nNOS	–	neuronal nitric oxide synthase

1. INTRODUCTION

The neural regulation of cardiac function is mediated by a hierarchically organised system of neurons, in which central, extracardiac, and intrinsic cardiac neural structures operate as a functionally integrated neuronal network [1–6]. A particularly important component of this network is the intrinsic cardiac nervous system (ICNS), a plexus of neuronal cell bodies and nerve fibres located within the heart. This system participates in the reception, processing, and transmission of local neural signals to higher-order neurons and thereby contributes to the regulation of cardiovascular responses to changing haemodynamic and metabolic demands [1, 2, 4, 5, 7–10]. Although the ICNS does not function in isolation and is anatomically and functionally connected with thoracic and cervical extracardiac ganglia as well as with the central nervous system, it also constitutes the principal substrate of local cardiac neural control. In the human heart, this system is primarily associated

with the epicardial neural plexus, whereas the extracardiac nerves supplying the heart converge near the sinuses of the great vessels, in the so-called heart hilum [11–14].

The intrinsic cardiac neural plexus is composed not only of nerve fibres with different functional properties, but also of epicardial ganglia, whose localisation, shape, size, and number vary among the hearts of different animal species. Epicardial ganglia are concentrated only in specific regions of the cardiac walls, and the neurons contained within them form a network that includes parasympathetic, sympathetic, and possibly intrinsic sensory (afferent) nerve fibres [12, 15–21]. The structural and functional phenotypic diversity of the epicardial neural plexus, which has been demonstrated and confirmed by numerous investigators, indicates that both efferent and afferent neural structures participate in intracardiac neural regulation [12, 22–24]. Therefore, a comprehensive understanding of cardiac neural regulation requires in-depth knowledge of the structural organisation and heterogeneity of intrinsic cardiac neurons, as well as of their capacity for remodelling during ageing, myocardial infarction, and other pathological conditions.

Cardiac sensory (afferent) neurons constitute an essential component of the neural regulation of the heart. Afferent signals arising within the heart initiate local and central neural reflexes that involve nerve fibres, nerve endings, and neuronal cell bodies located in ganglia situated in different regions of the cardiac wall [5, 25–31]. Therefore, the anatomy of cardiac reflexogenic zones should be analysed by examining both extracardiac and intracardiac, or intrinsic afferent structures. Of particular importance are sensory nerve endings distributed among neuronal cell bodies in epicardial ganglia, which are currently being investigated in only a few laboratories and may directly modulate the function of intrinsic efferent neurons in the heart [24, 32].

Recent studies have shown that morphologically distinct nerve endings are distributed in the epicardium and endocardium. These structures may initiate afferent signals in the heart, which are subsequently transmitted to second-order afferent neurons located both in the spinal cord and in the sensory nuclei of the brainstem tegmentum. These nerve endings may represent peripheral axon terminals of dorsal root ganglion neurons, vagal sensory neurons, or intrinsic first-order afferent neurons. To date, two morphological types of such nerve endings have been described. The first type, referred to as flower-spray nerve endings, is found in the endocardium and epicardium, whereas the second type, referred to as basket-type nerve endings, contains typical sensory neuropeptides, including substance P and calcitonin gene-related peptide (CGRP), and is distributed around selected neurons within intrinsic cardiac ganglia [33].

It should also be emphasised that, in addition to the neural structures mentioned above, small intensely fluorescent cells may also participate in the neural regulation of cardiac function. Their morphology, distribution, and neural relationships may be important for understanding both local and extrinsic mechanisms of cardiac regulation [34]. The pattern of SIF cell innervation observed in our studies suggests that cardiac sensory and autonomic control may be closely associated not only with extrinsic, but also potentially with local afferent neurons [34].

If the existence of intracardiac afferent neurons is confirmed in the human heart in the future, knowledge of their anatomy would primarily enable substantial improvements in clinical heart transplantation approaches. The preservation of viable neurons belonging to this functional group in the transplanted heart could help maintain intracardiac neural reflexes in implanted hearts, because heart transplantation disrupts the connection of the organ with both sympathetic and parasympathetic afferent nerve fibres, potentially resulting in deafferentation of the intrinsic cardiac neural plexus [35–37]. Similar structural consequences may also be caused, and most likely are caused, by other cardiac surgical interventions, myocardial infarction, heart failure, and other pathological conditions, which can damage intrinsic cardiac nerves and ganglia or induce their structural and functional remodelling, particularly contributing to the development of cardiac arrhythmias.

Therefore, this dissertation presents and analyses the most recent data obtained by our group and other investigators on cardiac neural receptors, the pathways of afferent nerve fibre distribution, and the localization of putative cardiac afferent neuronal cell bodies. These structures represent anatomical components of cardiac neural reflexes that underlie the neural regulation of cardiac function under both normal and pathological conditions.

Aim of the study

To determine the anatomy of intrinsic cardiac afferent structures by characterising their distribution, organisation, chemical phenotype, and possible neural relationship with intrinsic cardiac neurons and small intensely fluorescent cells.

Objectives:

1. To determine the morphological and chemical types of cardiac nerve endings and their distribution in the hearts of humans and different animal species using various methods for visualising nerve endings.

2. To perform a morphometric analysis of nerve endings distributed in different cardiac regions in humans and various animal species, with emphasis on their interspecies differences.
3. To investigate the relationship of nerve endings with cardiac small intensely fluorescent cells and with neuronal cell bodies of intrinsic cardiac ganglia, highlighting their possible significance for intrinsic neuroregulatory mechanisms.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Research material

2.1.1. Laboratory animals

The study included 24 Wistar rats aged 2–3 months (12 males and 12 females), adult BALB/c mice aged 6–8 weeks (6 males and 6 females), and adult mini pigs (4 males and 4 females). All laboratory animals were maintained and euthanised at the Laboratory Animal Centre of the Lithuanian University of Health Sciences in compliance with national and institutional regulations governing the care and use of laboratory animals (Permission No. LT-61-19-004). In addition, adult bats from two native species – Brandt's bat (*Myotis brandtii*) and Daubenton's bat (*Myotis daubentonii*) – were included in the study (2 males and 2 females per species). Hearts from mature mini pigs (4 males and 4 females) were obtained through collaboration with other investigators, in accordance with the 3R principles (Replacement, Reduction, and Refinement). Neuroanatomical data and imaging material from bat hearts were retrieved from the archive of the Institute of Anatomy, Lithuanian University of Health Sciences (Kaunas, Lithuania). This archive was established during previous research projects conducted under permits No. 16 and 57 issued by the Lithuanian Department of Environmental Protection in 1995 and 1997.

2.1.2. Human material

This study was conducted using previously prepared whole human heart specimens processed with the histochemical acetylcholinesterase staining technique (*section 2.2.4 Whole-heart preparations*). The collection of acetylcholinesterase-stained human hearts is preserved in 4% buffered formalin at the Institute of Anatomy, Lithuanian University of Health Sciences. The specimens originate from the institute's collection and autopsy cases without diagnosed cardiac pathology and were collected at the morgue of the Institute of Forensic Medicine within 12–24 hours *post-mortem*. The material was

obtained under approval No. BE-2-62 issued by the Kaunas Bioethics Committee and was collected between 2004 and 2008 as part of previous research projects. In total, hearts from 3 women (26–33 years), 3 adolescent males, and 8 adult males (18–36 years) were examined.

2.2. Morphological analysis

2.2.1. Dissection and tissue processing

Following carbon dioxide euthanasia and confirmation of death (absence of cardiac activity as well as pedal and corneal reflexes), animals were positioned supine on a silicone surgical pad. A midline thoracic incision was performed with surgical scissors to open the chest cavity. The diaphragm and pericardium were carefully separated to provide adequate access to the heart. The exposed heart was cannulated through the left ventricular cavity to allow perfusion of the cardiac tissues with 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS). *In situ* perfusion was carried out at a controlled pressure of 110–120 mmHg. Subsequently, tissues were chemically prefixed using 4% paraformaldehyde (PFA) prepared in 0.1 M PBS (pH 7.4). The hearts were then excised and immersed in freshly prepared 4% PFA for an additional 40 minutes of postfixation. After two rinses in PBS, the atria were meticulously separated from the ventricles and the interatrial septum. Both atrial and ventricular tissues were then flattened and secured with pins onto the silicone base of a Petri dish containing chilled PBS. The mounted preparations underwent graded dehydration in ascending ethanol concentrations (30%, 50%, 70%, 90%, 96%, and three changes of 100%), with each step lasting 10 minutes. This was followed by a 2-hour incubation in Dent's solution (dimethyl sulfoxide (DMSO) and 100% ethanol, 1:4 v/v) to enhance antibody penetration. To improve fluorescence contrast, specimens were bleached overnight in Dent's solution supplemented with 30% hydrogen peroxide (1:4 v/v). Rehydration was subsequently performed by reversing the ethanol gradient. Finally, samples were rinsed twice for 10 minutes each in 0.1 M PBS and incubated for 30 minutes in 1% Triton X-100 (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) prepared in 0.1 M PBS.

2.2.2. Immunohistochemistry

Flattened whole-mount heart preparations were incubated for 2 hours at room temperature in a blocking solution consisting of 5% normal donkey serum (NDS; Chemicon International, Temecula, California, USA) diluted in Antibody Diluent Reagent Solution (ADRS; Life Technologies™, Frederick, USA). This blocking step was performed to minimise non-specific antibody

binding and thereby increase the specificity of subsequent immunohistochemical labelling. Following three washes in 0.1 M PBS (10 minutes each), the samples were incubated for 48 hours at 4 °C in a humidified, light-protected chamber with primary antibody mixtures listed in Table 2.2.2.1. After incubation, tissues were washed three additional times (10 minutes each) in 0.1 M PBS and then exposed to the appropriate secondary antibodies (Table 2.2.2.1) for 4 hours at room temperature on a laboratory shaker in the dark. Both primary and secondary antibodies were diluted in ADRS (Life Technologies™, Frederick, USA). Subsequently, samples were rinsed again in 0.1 M PBS and carefully mounted onto microscope slides. Flattened ventricular preparations were coverslipped using non-fluorescent Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, California, USA) and sealed with clear nail polish to prevent movement and preserve tissue transparency. Antibody specificity was validated using control tissues known to exhibit strong expression of the target antigens (Table 2.2.2.1). Negative controls, in which primary antibodies were omitted, showed no detectable fluorescence, confirming the specificity of the staining. These validation steps verified that each antibody selectively recognised its intended antigen, ensuring the reliability of the immunohistochemical analysis.

Table 2.2.2.1. *Primary and secondary antisera used in the study*

Antigen	Host	Dilution	Catal. number	Positive control tissues (reference)
Primary				
nNOS	Mouse	1:500	sc-5302[a]	Midbrain neurons in the interpeduncular nucleus (IPN) [206]
ChAT	Goat	1:100	AB144P[b]	Motor neurons in the ventral horn of the spinal cord [207]
CGRP	Mouse	1:500	ab81887 [c]	Neurons of rat dorsal root ganglia [208]
SP	Guinea pig	1:500	ab10353[c]	Dorsal root ganglion [209]
PGP 9.5	Rabbit	1:500	38-1000[d]	Peripheral nerve fibres and neuronal cell bodies in the rat's dorsal root ganglia (DRG) [210]
PGP 9.5	Rabbit	1:500	7863-0504[e]	Peripheral nerve fibres and neuronal cell bodies in the rat's dorsal root ganglia (DRG) [210]

Table 2.2.2.1. *Continued*

Antigen	Host	Dilution	Catal. number	Positive control tissues (reference)
Primary (*continued*)				
PGP 9.5	Mouse	1:500	7863-1004[e]	Peripheral nerve fibres and neuronal cell bodies in the rat's dorsal root ganglia (DRG) [210]
PGP 9.5	Mouse	1:500	480012[d]	Peripheral nerve fibres and neuronal cell bodies in the rat's dorsal root ganglia (DRG) [210]
TH	Rabbit	1:500	AB152[f]	Chromaffin cells in the medulla of the rat suprarenal gland [211]
TH	Sheep	1:500	Ab113[c]	Chromaffin cells in the medulla of the rat suprarenal gland [211]
HuC/HuD	Mouse	1:500	A-21271[d]	Myenteric neurones [212]
Secondary				
Cy3 anti Mouse	Donkey	1:500	AP192C[b]	
Cy3 anti Goat	Donkey	1:500	AP180C[b]	
Cy3 anti Rabbit	Donkey	1:500	AP182C[b]	
Cy3 anti Guinea Pig	Donkey	1:500	AP193C[b]	
AF488 anti Rabbit	Donkey	1:500	ab150065[c]	
AF488 anti Sheep	Donkey	1:500	AP184F[b]	
Cy5 anti Goat	Donkey	1:500	AP180S[b]	
Cy5 anti Rabbit	Donkey	1:500	AP182S[f]	

Manufacturers: [a]Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA; [b]Merck Milipore, Burlington, Massachusetts, USA; [c]Abcam, Cambridge, UK; [d]Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL; [e]AbD Serotec, Kidlington, UK; [f]Chemicon International, Temecula, California, USA.

2.2.3. Visualisation of intrinsic cardiac blood vessels

To visualise intrinsic cardiac vasculature within SIF cell clusters, Tomato Lectin – LEL, DyLight™ 594 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) was applied, as it is commonly used as an endothelial marker of blood vessels in laboratory animals. After prefixation, the roots of both coronary arteries were carefully tied with fine surgical suture material. The Tomato Lectin solution (mixed 1:1 with 0.1 M PBS) was then injected slightly distal to the ligation points, enabling its anterograde distribution throughout the coronary arterial system.

2.2.4. Whole-heart preparations

Whole hearts from mini pigs were collected immediately after removal from the thoracic cavity and immersed in 0.1 M phosphate buffer (PB). The specimens were subsequently rinsed and perfused through both the left and right coronary arteries using a syringe filled with fresh 0.1 M PB (pH 7.4). Balloon-tip catheters were inserted into the atrial chambers via the superior vena cava and the left pulmonary vein to expand the atrial walls. The pericarpdium, pulmonary arteries, and mediastinal adipose tissue were carefully removed from the cardiac base to expose the neural plexus and axonal terminals. The hearts were then fixed for 30 minutes in 4% paraformaldehyde prepared in 0.1 M PB. Following fixation, the specimens were rinsed for 1 hour at 4 °C in an isotonic solution containing hyaluronidase (0.5 mg/ 100 mL, Sigma) and tetraisopropylphosphoramide (Iso-OMPA, 0.5 mM, Sigma), a selective pseudocholinesterase inhibitor.

Acetylcholinesterase (AChE) histochemistry was applied to visualise nerve fibres and their terminals in whole-heart preparations. Hearts were incubated for 30–60 minutes at 4 °C in staining medium prepared according to Karnovsky and Roots [213] and later modified by Pauza et al. [214]. Because adipose tissue accumulations at the heart base hindered penetration of the staining solution, additional careful dissection of these fat pads was performed during incubation to improve reagent diffusion into neural structures. After staining, preparations were refixed in 4% paraformaldehyde in PB and subsequently stored long term in 4% PFA in 0.1 M PB without detectable morphological alterations.

Fine AChE-positive nerve fibres and their endings were examined under 2× and 6× magnification using a Stemi 2000CS stereomicroscope (Zeiss, Göttingen, Germany) equipped with a KL 2500 LCD fibre-optic illumination system (Schott AG, Mainz, Germany). Images were acquired with an AxioCam MRc5 digital camera (Zeiss, Göttingen, Germany) and processed using AxioVision software (Rel. 4.8.2, Zeiss, Jena, Germany). In cases where neural structures could not be confidently identified under stereomicroscopy, tissue fragments containing presumed nerve endings were excised from whole-heart preparations with a fine diamond scalpel, mounted on microscope slides, coverslipped, and analysed using an Imager M1 microscope (Zeiss, Göttingen, Germany) equipped with an AxioCam MRC digital camera. Images were captured at 10× and 20× magnifications and processed using AxioVision software (Rel. 4.8; Zeiss, Jena, Germany). Final figure panels were assembled using Adobe Photoshop 2020 (Adobe Systems Incorporated, USA).

2.3. Microscopy and data collection

2.3.1. Confocal laser scanning microscopy

All whole-mount preparations were imaged using a confocal laser scanning microscope (LSM 700) equipped with the ZEN 2010B SP1 software package (Carl Zeiss, Jena, Germany). Panoramic images were acquired at 10× magnification, whereas detailed structural observations were performed at 20× and 63× magnifications. Each image was captured at a resolution of 2024 × 2024 pixels. Imaging parameters, including pinhole aperture, detector gain, and laser power, were carefully optimised to maximise the signal-to-noise ratio while minimising photobleaching of the specimens. Z-stack acquisition was performed when appropriate to generate three-dimensional reconstructions and enable precise assessment of antigen localisation. Scanning settings were individually adjusted for each fluorophore used with secondary antibodies (see Table 2.2.2.1). Final figure layouts were assembled using Adobe Photoshop 2020 (Adobe Systems Incorporated, USA).

2.3.2. Analysis of SIF cells

Flattened whole-mount preparations of rat atria were examined, and a total of 1,230 SIF cell clusters were subjected to detailed analysis. Cell counts were performed manually using digital images obtained from the atrial preparations. Quantitative results presented in Table 2.3.2.1 include the number of observations (N), mean values (M) ± standard error (SE), as well as median values accompanied by minimum and maximum (Min–Max) ranges.

Table 2.3.2.1. *Quantitative data on SIF cells clustered in the examined rat atria*

Overall number of analysed SIF cells	11316
Mean number of cells per cluster ± standard error	9.2 ± 0.40
Median, (min-max) number of cells per cluster	4 (2–146)
Overall number of analysed SIF cells' clusters	1230
Mean number of SIF cells' clusters per atria ± standard error	410 ± 143
Median, (min-max) number of SIF cells' clusters per atria	341 (204–685)

2.3.3. Identification of SIF cells' cluster

SIF cells were defined as forming a cluster when individual cells were interconnected by cellular processes or when their somata were in direct physical contact. Each SIF cell was manually counted using the multi-point tool

in ImageJ software (version 1.54), with nuclei marked throughout the entire Z-stack image series.

2.3.4. Quantitative assessment and schematisation of nerve endings

Flower-spray type nerve endings (FS-NEs) were quantitatively evaluated by measuring the surface area occupied by individual endings, assuming that each FS-NE originates from a single nerve fibre (see Figs. 3.2.1 A', B', 3.2.2 A', 3.2.3 A', B'). Area measurements were carried out using high-resolution fluorescent images presented as maximum-intensity projections derived either from whole-mount atrial preparations or from acetylcholinesterase-stained whole-heart specimens. Only FS-NEs with clearly distinguishable boundaries were included in the analysis using ImageJ software (version 1.54), whereas images containing indistinct or overlapping nerve endings were excluded from measurements. All measurements of NEs were performed several times by a single observer, who obtained consistent results, with only insignificant deviances when measuring the same NEs repeatedly.

Confocal Z-stack image series, preserved as raw datasets for three-dimensional visualisation, were acquired at high magnification with a 63× objective to identify basket-type nerve endings (B-NEs) located on intrinsic cardiac cholinergic neuronal somata. Maximum-intensity projection images were exported to Adobe Photoshop 2020, where image transparency was adjusted to facilitate tracing and manual schematisation of nerve endings (see Figs. 3.2.6, 3.2.7). During this procedure, three-dimensional Z-stack datasets were simultaneously examined using ZEN 2010B SP1 software to ensure accurate interpretation of all structural features.

2.3.5. FS-NEs statistical analysis

All statistical analyses were conducted using IBM SPSS Statistics (version 26; IBM Corp., Armonk, NY, USA). Descriptive data are presented as arithmetic means ($\bar{x}$) with corresponding standard errors (SE). The normality of data distributions was evaluated using the Kolmogorov–Smirnov test. As normal distribution was not confirmed for all variables, nonparametric methods were applied, specifically the Kruskal–Wallis H test. In cases where the Kruskal–Wallis test indicated statistically significant differences, *post hoc* pairwise comparisons were performed using an all-pairs multiple comparison approach to determine intergroup differences. A significance threshold of $p < 0.05$ was adopted. Graphical representations were generated using Origin 6.1 (OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts, USA).

3. RESULTS

3.1. Nerve endings revealed in whole heart preparations applying the histochemical acetylcholinesterase (AChE) approach

Among the examined preparations, nerve endings classified as flower spray-type nerve endings (FS-NEs), according to current concepts of sensory nerve terminal morphology, were identified exclusively in human and mini pig hearts. Although FS-NEs visualised with this staining method were located in different cardiac regions in these two species, their overall morphological organisation was highly comparable (Figs. 3.1.1, 3.1.2). In the human heart, AChE-positive FS-NEs were observed solely within the endocardium at the orifice of the pulmonary veins. Each ending originated from a single nerve fibre branching off a larger nerve bundle and formed a compact network of fine fibres within the superficial endocardial layer, producing a characteristic flower-spray configuration (Fig. 3.1.1).

In mini pig hearts, morphologically similar FS-NEs were detected within and on the surface of epicardial adipose tissue, most prominently in the region of the coronary groove (Fig. 3.1.2 A–C). Despite their structural similarity, FS-NEs identified in the human endocardium were markedly larger, averaging approximately 133 times the size of those found in mini pigs (Figs. 3.1.1, 3.1.2). The mean area of 45 human endocardial FS-NEs was 6.7 ± 1.3 mm², whereas corresponding structures in mini pigs measured 0.03 ± 0.003 mm² on average (Table 3.1.1). Due to this substantial size disparity, human endocardial FS-NEs were excluded from the overall comparative morphometric analysis of nerve endings. The pronounced difference between epicardial and endocardial FS-NE dimensions likely reflects variations related to cardiac wall layers and warrants further investigation using immunohistochemical approaches specifically targeting endocardial nerve endings.

No AChE-positive FS-NEs were detected in the hearts of the other examined animal species, despite extensive efforts to identify such structures.

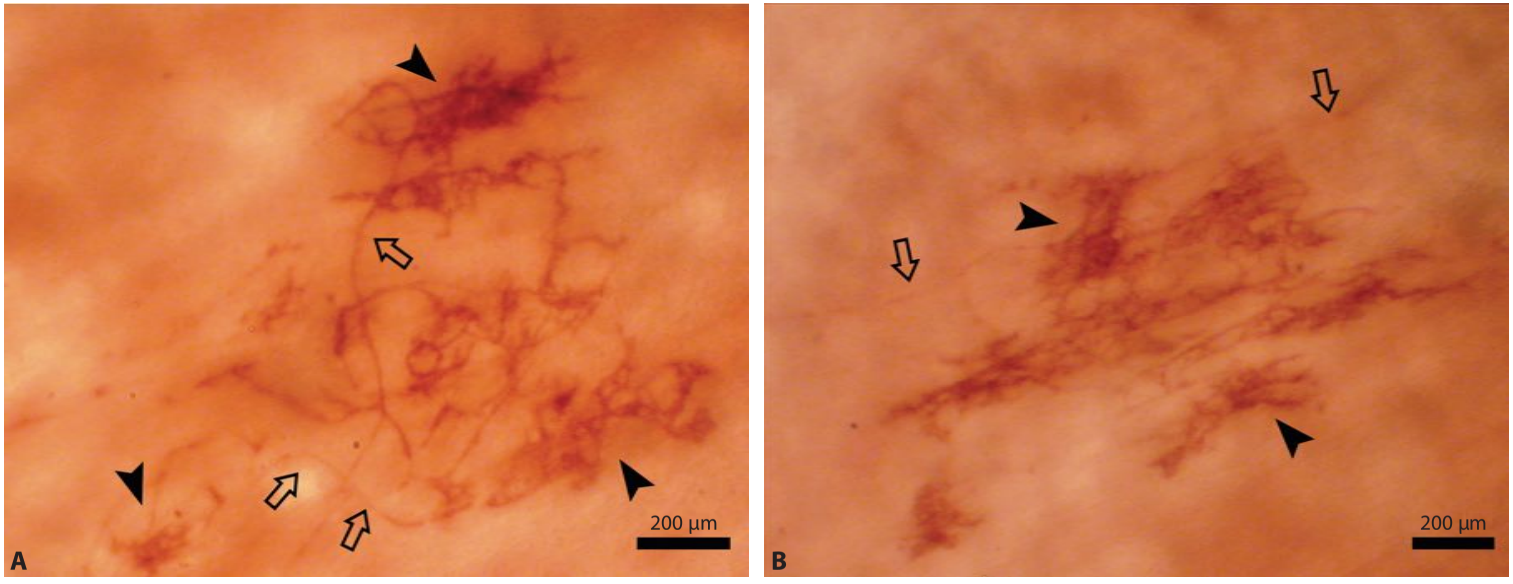


Fig. 3.1.1. *Nerves (clear arrows) and FS-NEs (arrowheads) visualised by the acetylcholinesterase (AChE) histochemical method in the human endocardium*

(A, B) Endocardial nerve endings located in the human atrium near the orifice of a pulmonary vein.
Adapted from [33]. Reused under Elsevier's author reuse policy.

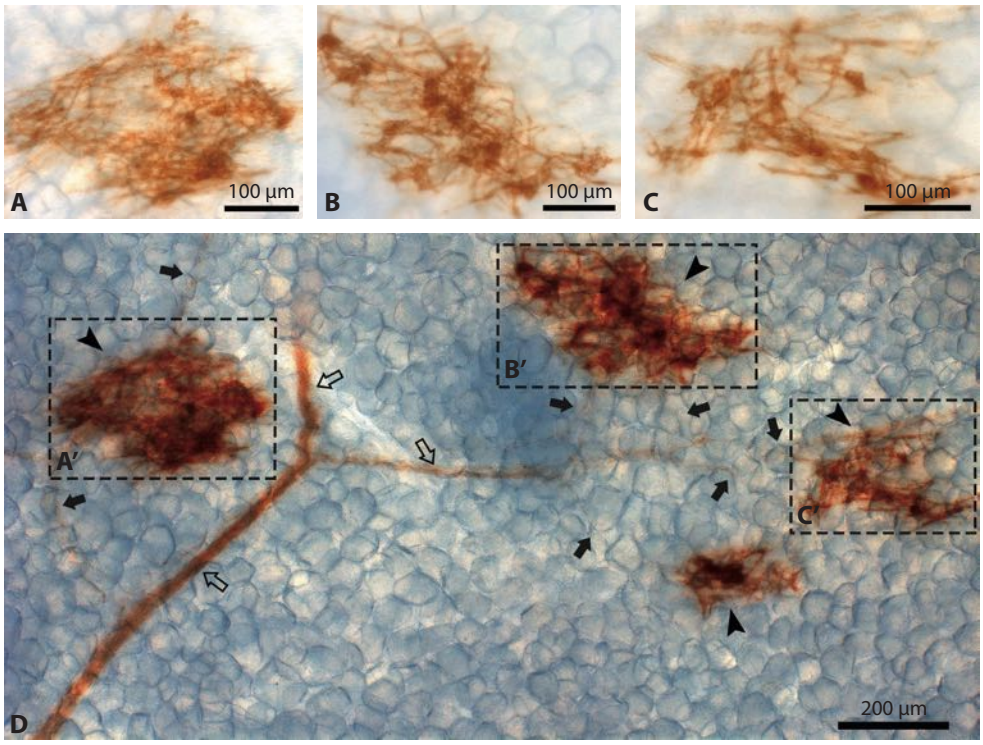


Fig. 3.1.2. *Nerves (clear arrows), nerve fibres (black arrows), and FS-NEs (black arrowheads) visualised by the acetylcholinesterase (AChE) histochemical method in the mini pig epicardium*

(A–C) Higher-magnification views of epicardial nerve endings identified at the coronary sinus; these correspond to the boxed regions **A'**, **B'**, and **C'** in the low-magnification image **(D)**. The enlarged panels **(A–C)** demonstrate that both epicardial and endocardial nerve endings share a similar morphological organisation, consisting of an irregular meshwork with variable density of AChE-positive nerve fibres or axons situated beneath the endothelial or mesothelial layers. Note the larger size of the human endocardial nerve endings compared with the epicardial NEs in the mini pig, as shown in Figs. 3.1.1, 3.1.2.
Adapted from [33]. Reused under Elsevier's author reuse policy.

Table 3.1.1. *Mean (± standard error, SE), median (minimum–maximum) size (µm²), and number of measured flower spray-type nerve endings (n) in five mammalian species and human hearts*

Species	n	Mean ± SE (µm²)	Median (Min–Max) (µm²)
Human	45	6705103.6 ± 1249103.6	2424299.6 (92859.2–30853574.3)
Mini pig	100	30035.8 ± 2997.5	18268.6 (3144.2–161888.7)
Rat	14	4687.2 ± 527.2	4211.3 (1927.3–8583.8)
Brandt's bat	32	2947.8 ± 367.6	2891.1 (64.4–8515.9)
Daubenton's bat	13	2804.2 ± 696.0	2124.5 (382.6–9075.1)
Mouse	19	756.6 ± 190.2	414.5 (718–2744.7)

3.2. Immunohistochemically identified nerve endings in whole-mount heart preparations

In flattened cardiac preparations from rats, mice, and bats, two distinct types of nerve endings were identified. The first type corresponded morphologically to the FS-NEs previously described in whole-heart preparations stained histochemically for AChE (Figs. 3.2.1–3.2.3). Because these endings were situated immediately beneath the mesothelial layer, they were designated as submesothelial FS-NEs. Most of these submesothelial endings were distributed within the proximal three-fifths of the ventricular wall on both the sternocostal and diaphragmatic surfaces. In addition, FS-NEs were detected at the bulb of the ascending aorta in the rat preparation (Fig. 3.2.4).

In mice, rats, and both bat species, the nerve fibres forming FS-NEs originated from thinner epicardial nerves and displayed the characteristic flower-spray morphology (Figs. 3.2.1–3.2.4). Nevertheless, clear interspecies differences were evident in both size and structural compactness (see Figs. 3.1.1, 3.1.2, 3.2.1–3.2.3; Table 3.1.1). The smallest and least variable FS-NEs were recorded in mice, whereas the largest structures were observed in mini pigs (see Figs. 3.1.2, 3.2.2, 3.2.5; Table 3.1.1). In rat hearts, epicardial FS-NEs demonstrated moderate size variability but were significantly larger than those found in mice and bats. On average, the FS-NE area in rats exceeded that of smaller mammalian species by approximately two- to six-fold (see Fig. 3.2.5; Table 3.1.1). Comparison between the two bat species revealed subtle morphological differences in submesothelial FS-NEs, with greater dimensional variability observed in Daubenton's bat compared with Brandt's bat (see Figs. 3.2.3, 3.2.5; Table 3.1.1). In mini pigs, epicardial FS-NEs were distinctly larger and exhibited greater variability than those identified in rodents and bats (see Figs. 3.1.2, 3.2.5; Table 3.1.1).

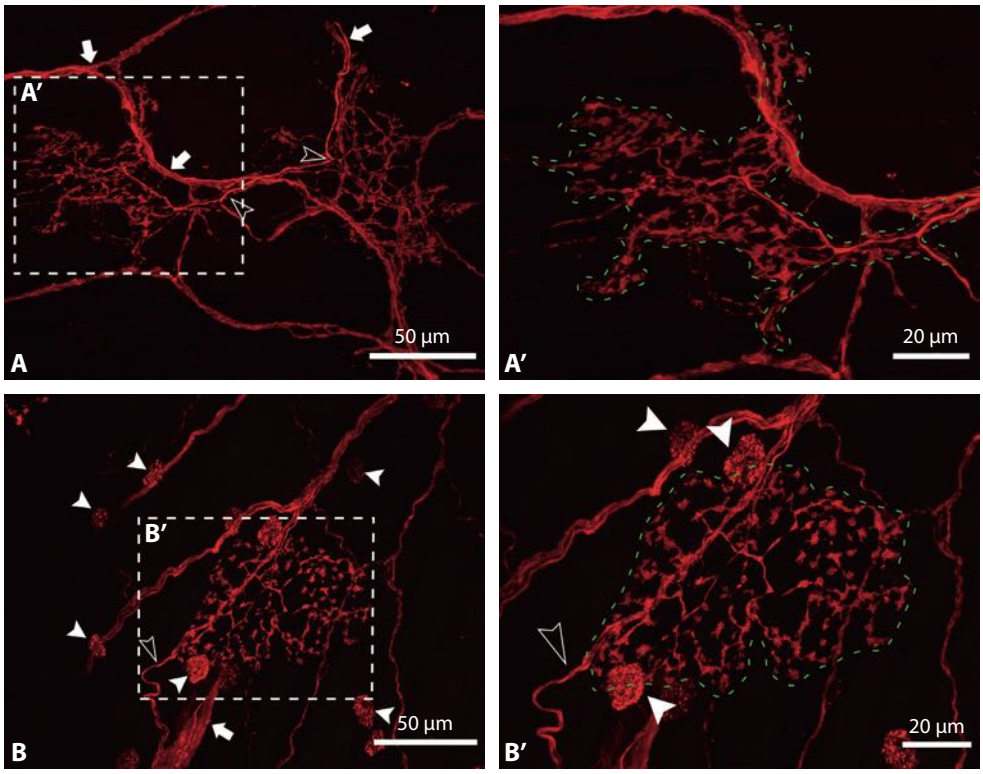


Fig. 3.2.1. *Epicardial nerve fibre bundles (white arrows) and their branching nerve endings (clear arrowheads) visualised immunohistochemically using antibodies against the pan-neuronal marker PGP 9.5 in rat whole-mount heart preparations*

A – two FS-NEs are shown; one (outlined with a dashed square) is enlarged in panel **A'**. **B** – single FS-NE (enlarged in panel **B'**) originating from a relatively thick axon (white arrow). In proximity to this ending, individual unidentified epicardial cells or their nuclei also exhibit PGP 9.5 immunopositivity (white arrowheads). In panels **A'**, **B'**, the green dashed line delineates the area defined as a single FS-NE for morphometric measurements and quantitative analysis.
Adapted from [33]. Reused under Elsevier's author reuse policy.

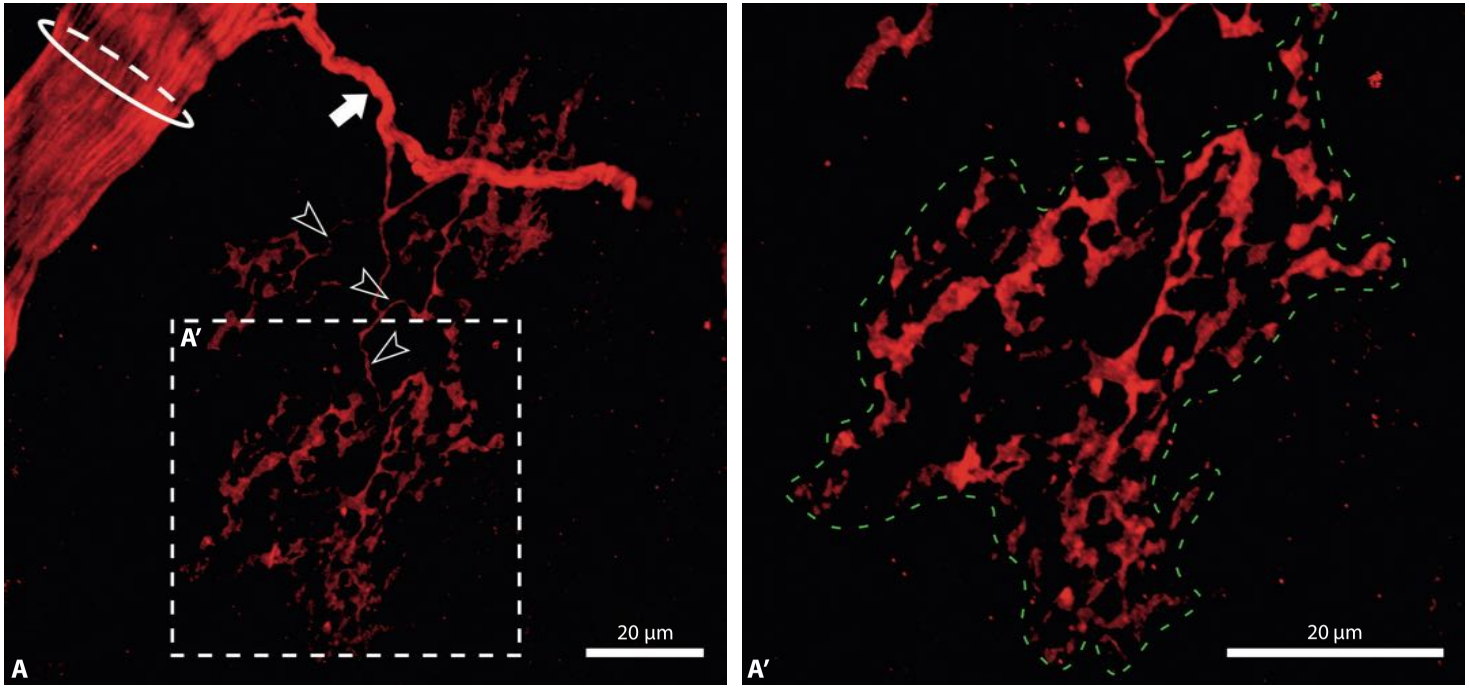


Fig. 3.2.2. *Epicardial nerves (white ellipse), bundles of nerve fibres (white arrows), and their branching nerve endings (arrowheads) immunohistochemically labelled with the pan-neuronal marker PGP 9.5 in whole-mount heart preparations of mice*

Nerve endings outlined with a dashed box in panel **A** are shown at higher magnification in the corresponding panel **A'**. The illustrated FS-NEs exhibit interspecies differences. In the mouse epicardium, these endings are smaller and structurally less complex compared with those identified in the hearts of bats, rats, mini pigs, and humans. The green dashed line in panel **A'** delineates the boundary used to define and quantitatively measure the area of a single FS-NEs.
Adapted from [33]. Reused under Elsevier's author reuse policy.

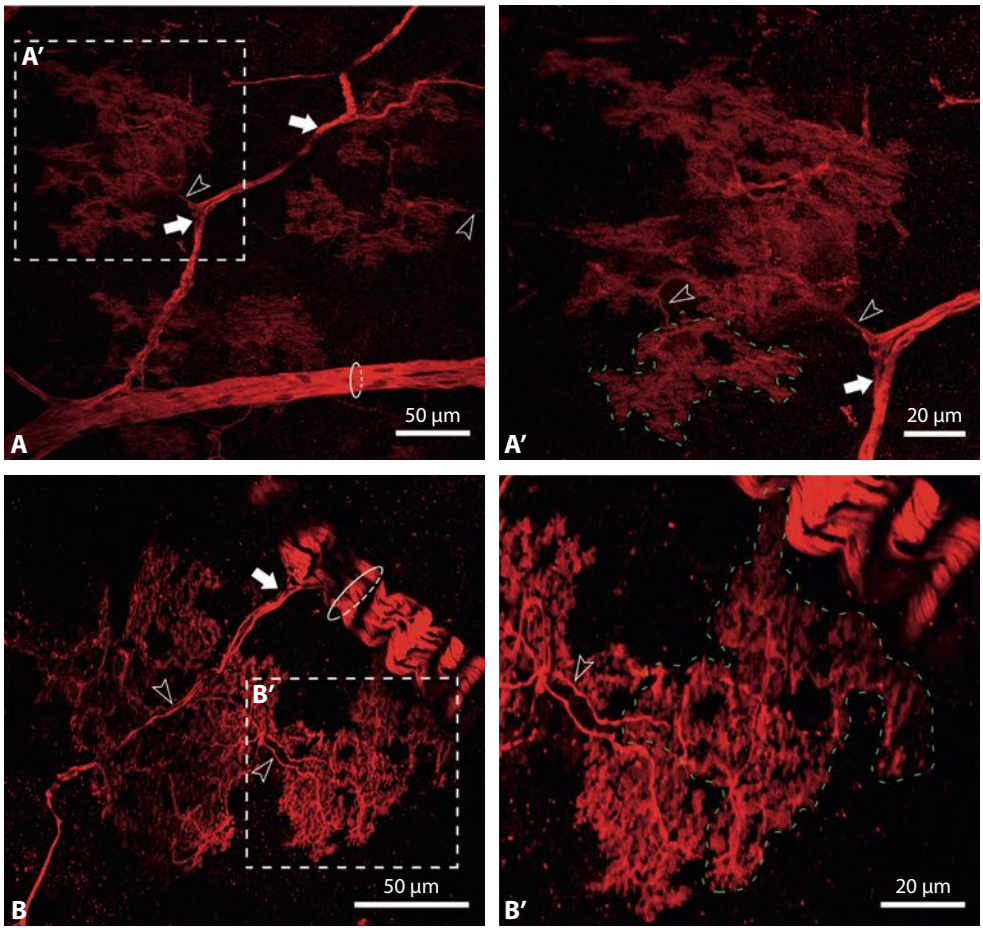


Fig. 3.2.3. *Epicardial nerves (white ellipse), bundles of nerve fibres (white arrows), and their branching nerve endings (arrowheads) immunohistochemically labelled with the pan-neuronal marker PGP 9.5 in whole-mount heart preparations of Brandt's* ***(A, A')****, and Daubenton's bat* ***(B, B')***

Nerve endings outlined with dashed boxes in panels **A**, **B** are shown at higher magnification in the corresponding panels **A'**, **B'**. The green dashed lines in panels **A', B'** delineate the boundary used to define and quantitatively measure the area of a single FS-NEs.
Adapted from [33]. Reused under Elsevier's author reuse policy.

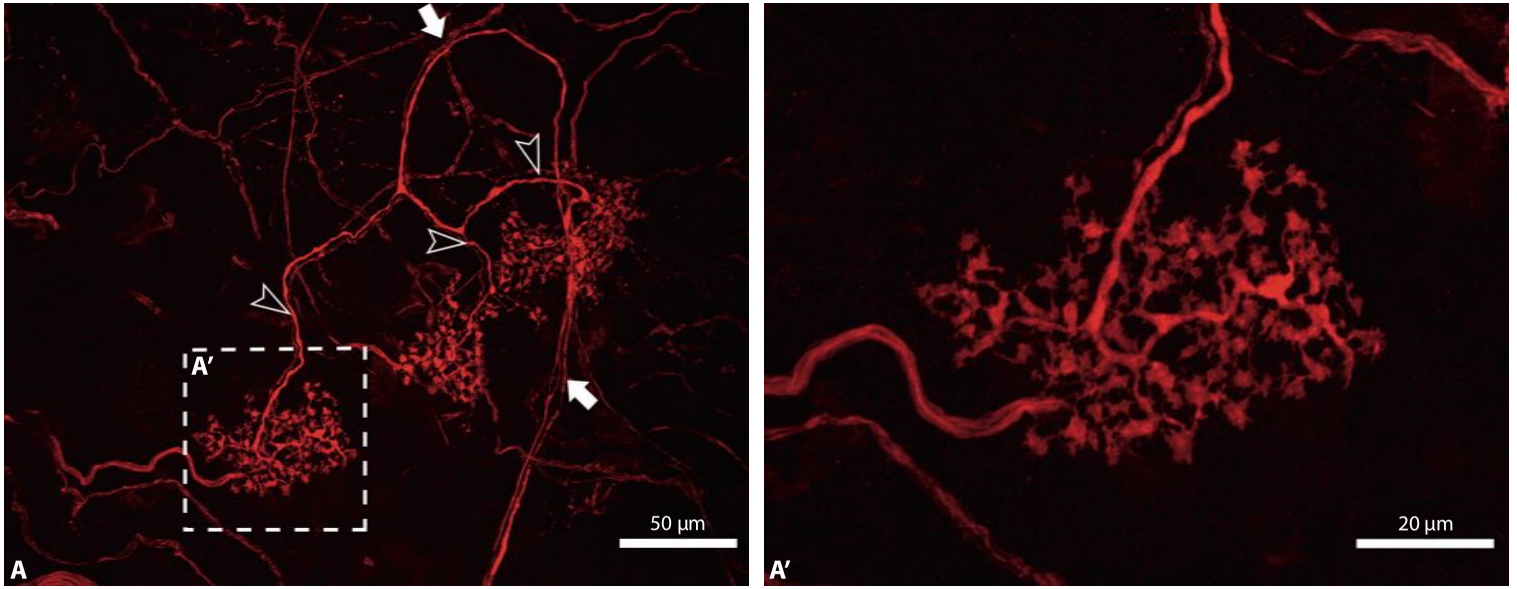


Fig. 3.2.4. *Nerve fibre bundles (white arrows) and their branching nerve endings (clear arrowheads) visualised immunohistochemically using antibodies against the pan-neuronal marker PGP 9.5 in rat whole-mount heart preparations*

A – three flower-spray nerve endings located on the wall of the aortic root; one (outlined with a dashed square) is enlarged in panel **A'**. Adapted from [33]. Reused under Elsevier's author reuse policy.

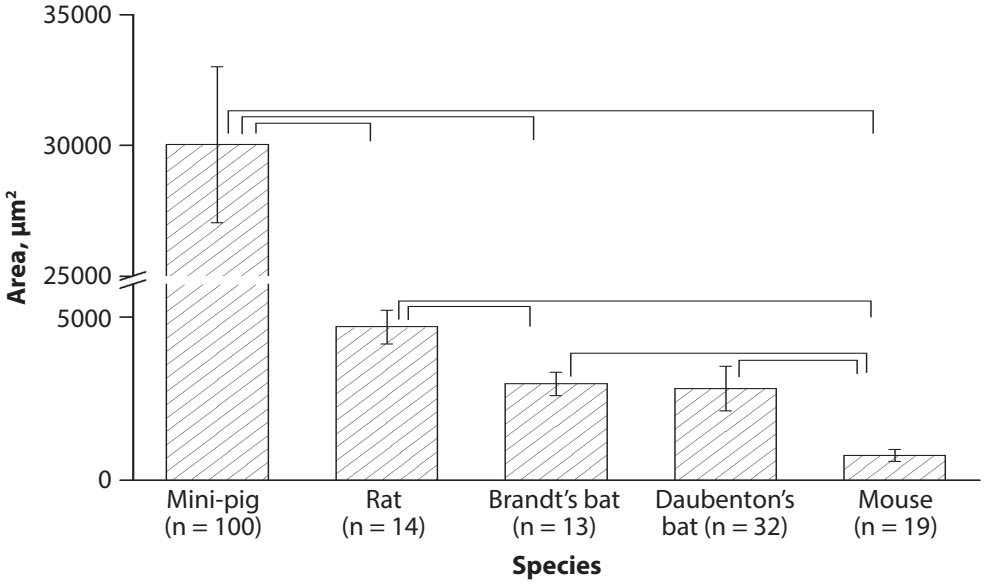


Fig. 3.2.5. *Mean areas of FS-NE in five mammalian species*

The number of analysed nerve endings (n) is indicated below each species name. A break in the Y-axis enables simultaneous visualisation of both small and large values. Connecting lines between bars represent statistically significant differences between species ($p < 0.05$). In mini-pig, the mean area of FS-NE was 30035.8 ± 2997.5 µm, rat – 4687.2 ± 527.2 µm, Brandt's bat – 2947.8 ± 367.6 µm, Daubenton's bat – 2804.2 ± 696.0 µm, mouse – 756.6 ± 190.2 µm.
Adapted from [33]. Reused under Elsevier's author reuse policy.

Immunohistochemical analysis of rat hearts using antibodies against nNOS, ChAT, and the sensory neuron–associated markers substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) revealed a second morphological category of nerve endings. This type was clearly distinguishable from submesothelial FS-NEs identified with the pan-neuronal marker PGP 9.5. As illustrated in Fig. 3.2.6, these endings were predominantly composed of CGRP- and SP-immunopositive axons terminating on neuronal somata and forming B-NEs. Furthermore, nNOS-immunoreactive axonal terminals were also observed to form endings morphologically identical to B-NEs on intrinsic cardiac neuronal cell bodies (Fig. 3.2.7 A). Although efferent ChAT-positive terminals within intrinsic cardiac ganglia exhibited a comparable structural organisation, cholinergic terminals did not arrange themselves in basket-like configurations around ganglionic neuronal somata (Fig. 3.2.7 B).

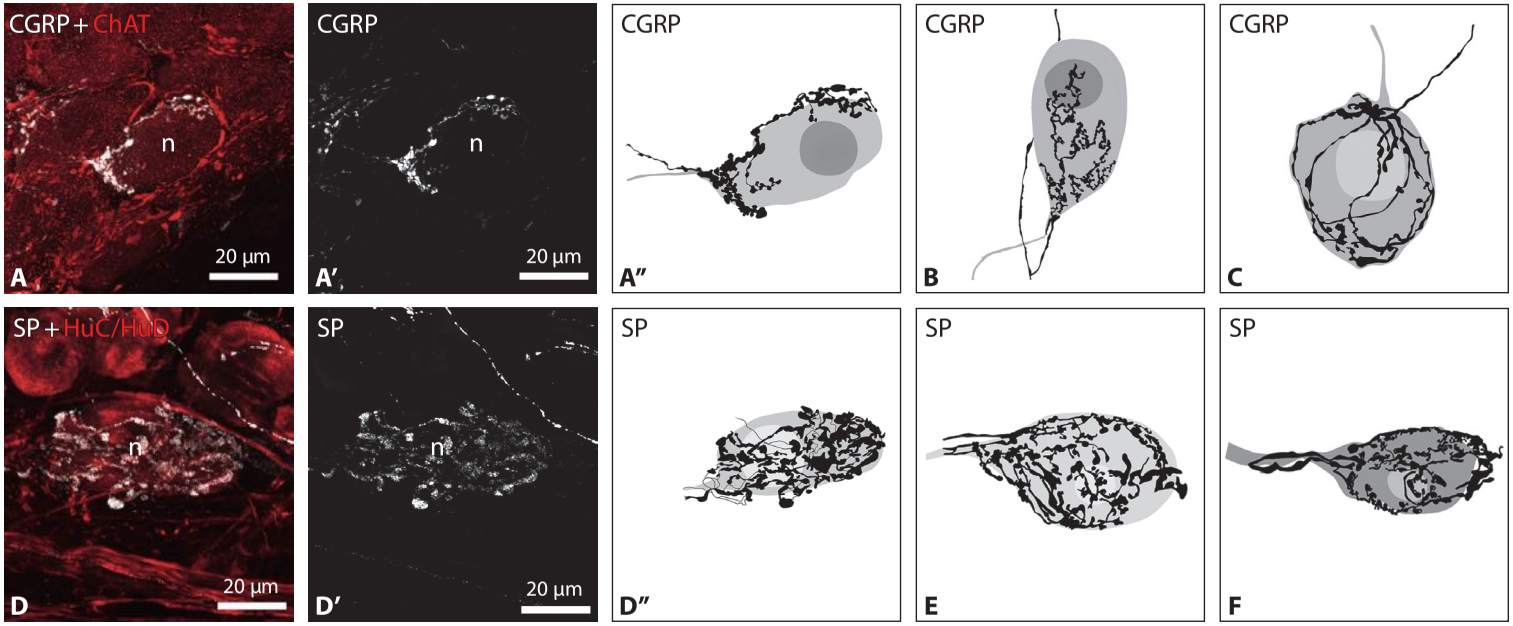


Fig. 3.2.6. *Neuronal cell bodies (n), axons, and their terminals associated with epicardial ganglionic neurons immunohistochemically labelled in whole-mount preparations of rat hearts*

In the left column (panels **A**, **D**), single or double immunolabelled neural structures illustrate the relationships between specifically immunoreactive axonal terminals and epicardial neuronal somata positive for choline acetyltransferase (ChAT) and the pan-neuronal marker HuC/HuD. **A'** and **D'** columns present views of selected nerve terminals extracted from the double-labelled images in the left column, highlighting the structural diversity of these terminals. The same neural terminals are schematically represented in the columns (**A''**, **D''**), where the pronounced morphological variability of the B-NEs can be clearly appreciated. In addition, columns **B**, **C**, **E**, **F** include examples of terminals immunopositive for the same neuronal markers but associated with different neuronal cell bodies.
Adapted from [33]. Reused under Elsevier's author reuse policy.

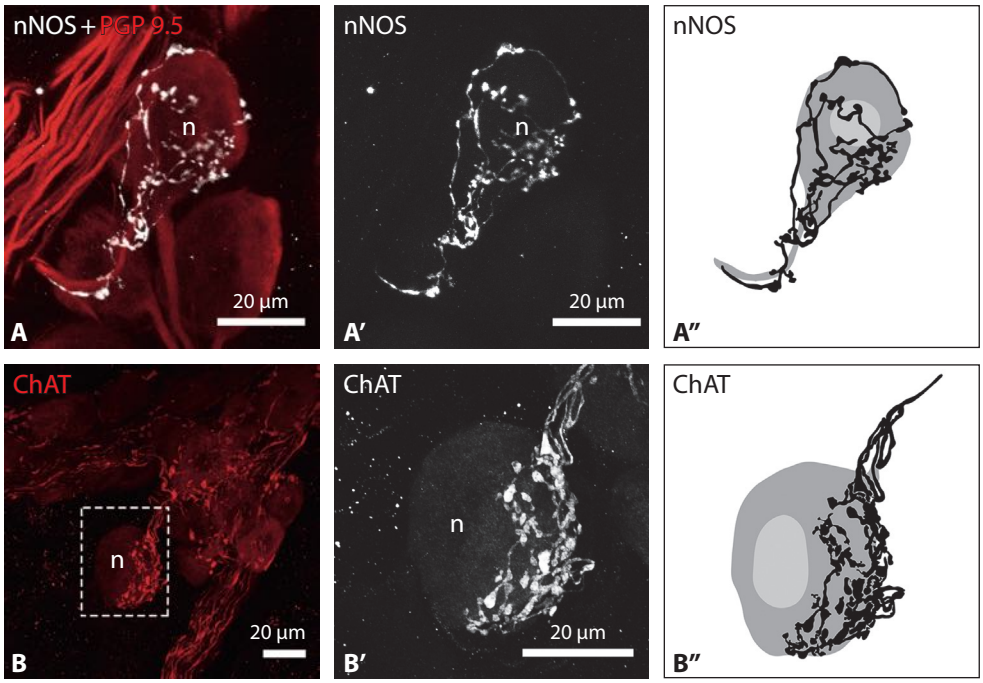


Fig. 3.2.7. *Neuronal cell bodies (n), axons, and their terminals associated with epicardial ganglionic neurons immunohistochemically labelled in whole-mount preparations of rat hearts*

In the left column (panels **A** and **B**), single- or double-immunolabelled neural structures illustrate the relationships between specifically immunoreactive axonal terminals and epicardial neuronal somata positive for choline acetyltransferase (ChAT), the pan-neuronal marker PGP 9.5. The middle column (panels **A'**, **B'**) presents enlarged views of selected nerve terminals extracted from the single- and double-labelled images in the left column, highlighting the structural diversity of these terminals. The same neural terminals are schematically represented in the right column (panels **A"**, **B"**), where the pronounced morphological variability of the B-NEs can be clearly appreciated. In panel **B**, the boxed region is enlarged in panel **B'**. Notably, axonal terminals immunoreactive for the classical efferent (preganglionic) marker ChAT (panels **B**, **B'**, **B**"), as well as terminals positive for sensory neuronal markers – substance SP and calcitonin gene-related peptide (CGRP) (see Fig. 3.2.6) – and nitrergic axons expressing neuronal nitric oxide synthase (nNOS) (panels **A**, **A'**, **A"**) form structurally comparable yet variably complex B-NEs surrounding epicardial neuronal somata.

Adapted from [33]. Reused under Elsevier's author reuse policy

3.3. Morphological patterns, distribution and innervation of SIF cells

SIF cells identified in the rat atria exhibited strong tyrosine hydroxylase (TH) immunoreactivity. The majority were localised within the venous pole of the heart hilum, particularly around the roots of the pulmonary veins and along the posterior aspect of the left cranial vein root (Fig. 3.3.1). Although the neural plexus of the heart hilum has previously been described in detail, it is noteworthy that neither SIF cells nor epicardiac ganglia were detected in the vicinity of the sinoatrial or atrioventricular nodes in rats [15, 23, 215, 216]. The diameter of SIF cell bodies ranged between 8 and 15 μm, and their morphology varied from spindle-shaped and oval to irregular forms. A total of 11,316 SIF cells were analysed and grouped into 1,230 clusters containing from only a few cells up to 146 cells (see Table 2.3.2.1). Two distinct morphotypes of SIF cells were identified (Fig. 3.3.2). Type I SIF cells (Fig. 3.3.3 A, B) possessed clearly visible processes and typically displayed spindle-shaped or irregular somata. These cells were commonly arranged linearly within epicardial nerves or distributed in close association with them (Fig. 3.3.3 A, B). In contrast, type II SIF cells lacked processes and exhibited oval-shaped cell bodies that consistently formed densely packed clusters of varying size (Fig. 3.3.3 C, D). Quantitative evaluation showed that 35.3% of clusters were predominantly composed of type I SIF cells, 17.8% mainly contained type II cells, and 46.9% represented mixed clusters comprising both morphotypes (Fig. 3.3.4). As illustrated in Figs. 3.3.5 and 3.3.6, the spatial distribution of SIF cell clusters was heterogeneous rather than fixed. Clusters were identified within epicardial nerves (43.5%) or adjacent to them (21.5%), within epicardial ganglia (12.7%) or in their proximity (13.4%), as well as in regions lacking nearby neural structures (8.9%). The majority of SIF cell clusters were located adjacent to blood vessels (Fig. 3.3.7).

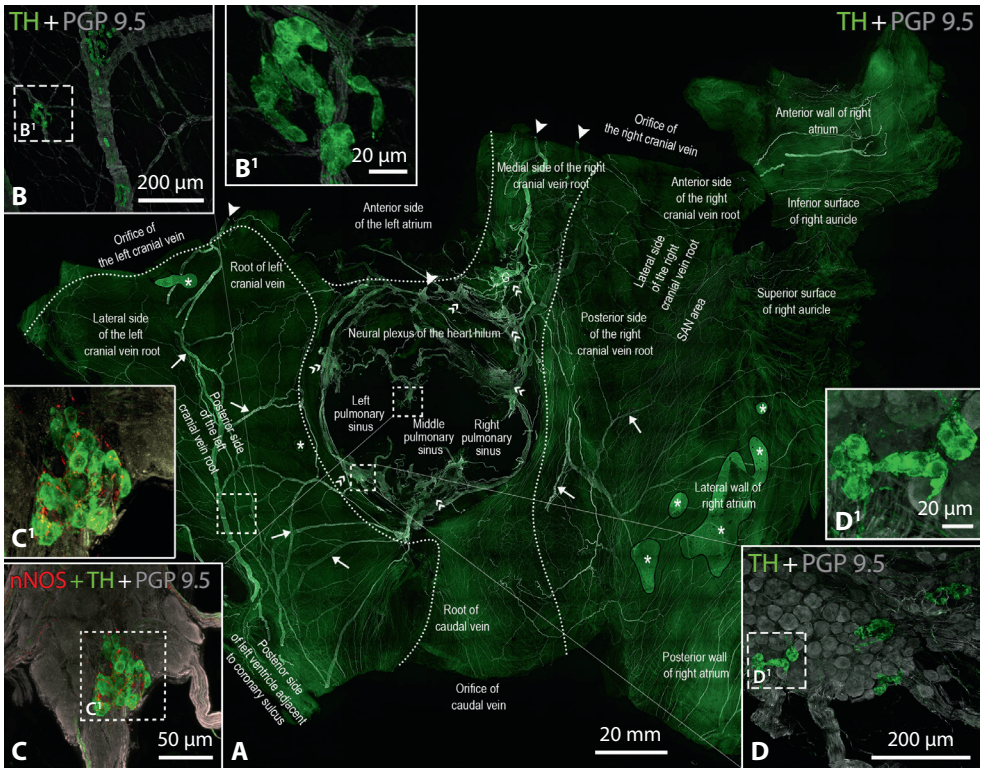


Fig. 3.3.1. *Whole-mount preparation of rat atria demonstrating the distribution of SIF cell clusters and their relationship with neuronal nitric oxide synthase (nNOS)-positive nerve terminals*

(A) SIF cell clusters are shown within the neural plexus of the heart hilum (outlined by a dotted white line), particularly at the roots of the pulmonary veins and along the posterior aspect of the left cranial vein root. The boxed regions in panel **A** are magnified in panels **B**, **C**, and **D**, and the boxed areas within these panels are further enlarged in **B¹**, **C¹**, and **D¹**, respectively. Notably, SIF cells are absent in the vicinity of the sinoatrial node. Arrowheads indicate preganglionic nerves entering the heart hilum; arrows denote postganglionic epicardial nerves; double arrowheads mark the locations of intrinsic ganglia within the boundaries of the heart hilum. Asterisks (*) represent incidental air bubbles trapped beneath the whole-mount preparation during coverslipping. PGP 9.5 immunoreactivity is shown in grey, nNOS in red, and tyrosine hydroxylase (TH) in green.
Adapted from [34]. Reused under Elsevier's author reuse policy.

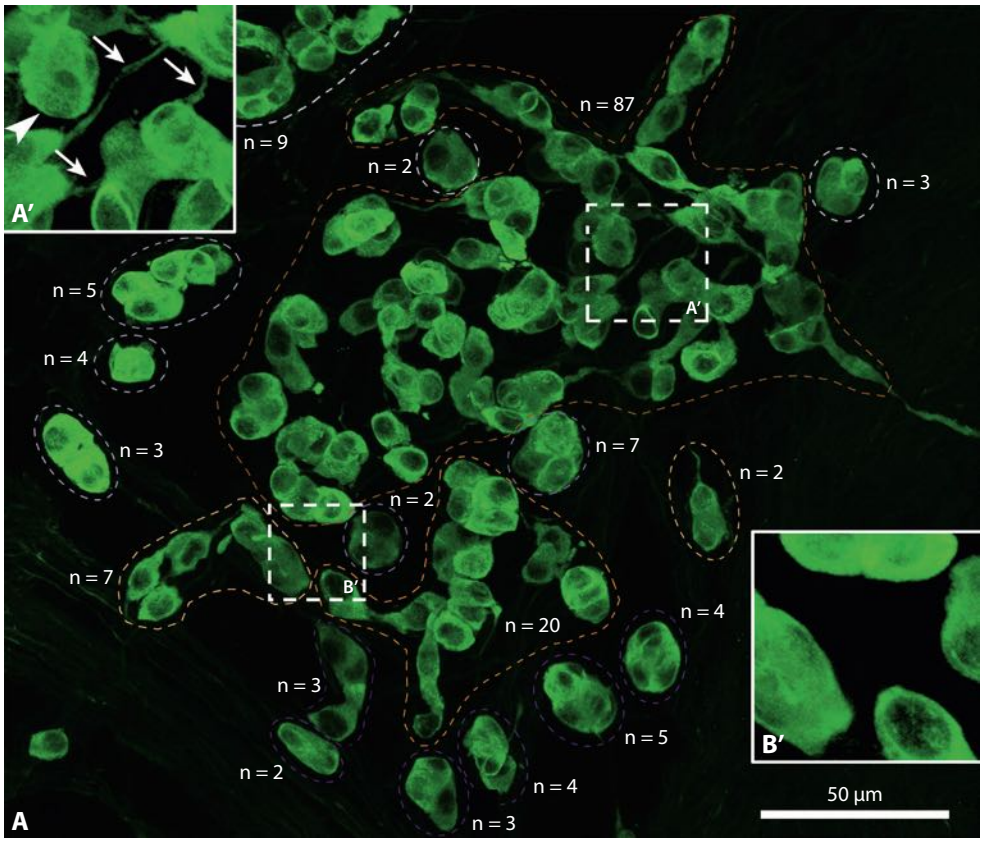


Fig. 3.3.2. *Morphological diversity of SIF cell clusters in the rat atrial wall*

(A) Typical SIF cell clusters consist of two morphologically distinct cell types. The largest cluster (outlined with a dark brown dashed line) contains 87 SIF cells of both types. Type I SIF cells display spindle-shaped somata and prominent elongated processes (arrows), clearly visible in the boxed region **A'**, shown at higher magnification in the upper inset. In the same inset **(A')**, arrowheads indicate type II SIF cells, characterised by oval cell bodies and absence of processes. The boxed region **B'** is enlarged in the lower inset to illustrate the wide intercellular spaces that separate SIF cells into distinct clusters. Smaller clusters composed exclusively of type II SIF cells are outlined by white-to-blue dashed lines. The letter n adjacent to each outlined cluster denotes the counted number of SIF cells.
Adapted from [34]. Reused under Elsevier's author reuse policy.

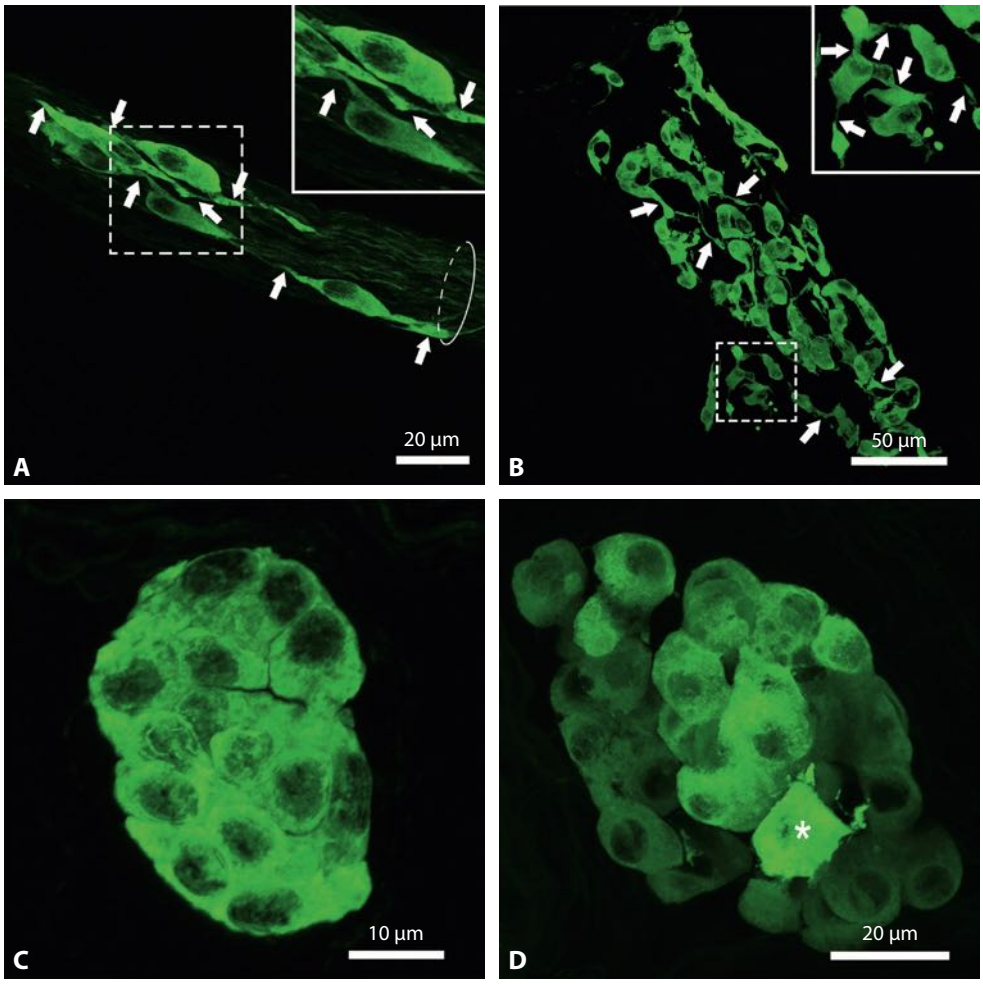


Fig. 3.3.3. *Type I and type II SIF cell morphology*

(A) A cluster composed of type I SIF cells (arrows indicate their well-developed processes) located within a circled epicardial nerve containing clearly identifiable adrenergic nerve fibres. **(B)** An irregularly arranged cluster of type I SIF cells not directly associated with a nerve; however, numerous cellular processes (arrows) interconnect the cells. Boxed areas in panels **A** and **B** are shown at higher magnification in the corresponding upper insets. **(C, D)** Clusters consisting of type II SIF cells with oval-shaped somata, lacking processes and arranged in compact, globular formations. The density of type II cell aggregation varies between clusters. Additionally, certain SIF cells (asterisk in **D**) exhibit stronger tyrosine hydroxylase (TH) immunoreactivity, suggesting a relatively higher intracellular catecholamine content.
Adapted from [34]. Reused under Elsevier's author reuse policy.

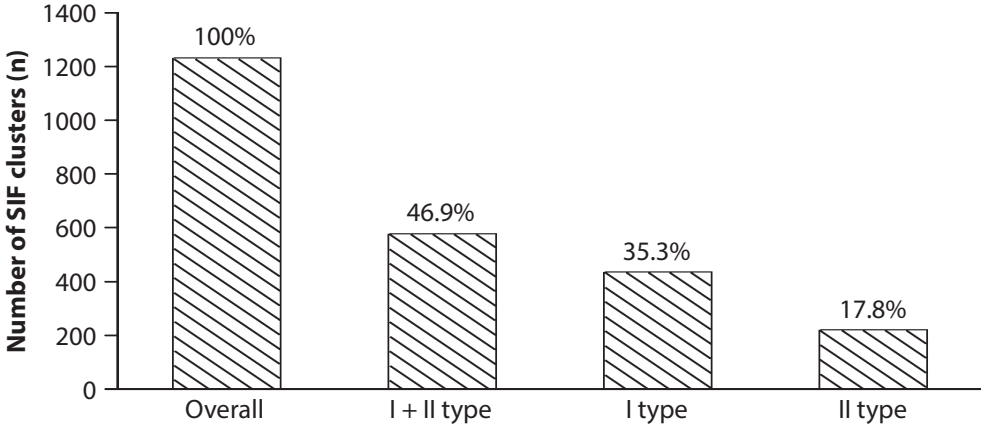


Fig. 3.3.4. *Proportional distribution of SIF cell morphotypes among all analysed clusters (n = 1230, 100%)*

Mixed clusters containing both morphotypes (type I + type II) were the most frequent (n = 577, 46.9%). Clusters composed exclusively of type I SIF cells (with evident processes) accounted for 434 cases (35.3%), whereas 219 clusters (17.8%) consisted solely of type II SIF cells (without processes).
Adapted from [34]. Reused under Elsevier's author reuse policy.

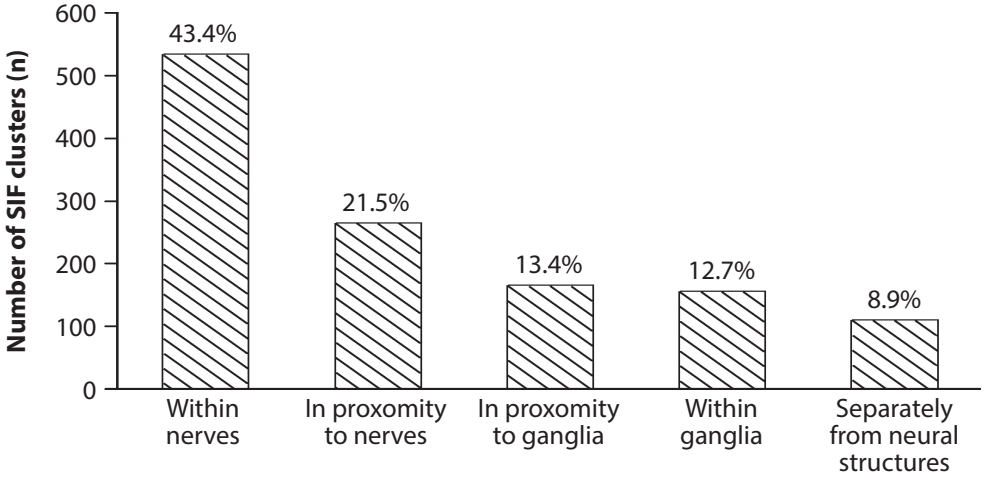


Fig. 3.3.5. *Topographical distribution of SIF cell clusters within the rat atria*

Clusters were identified within epicardiac nerves (n = 534, 43.3%) or in proximity to them (n = 265, 21.5%), within epicardial ganglia (n = 156, 12.7%) or in their proximity (n = 165, 13.4%), as well as in regions lacking nearby neural structures (n = 110, 8.9%).
Adapted from [34]. Reused under Elsevier's author reuse policy.

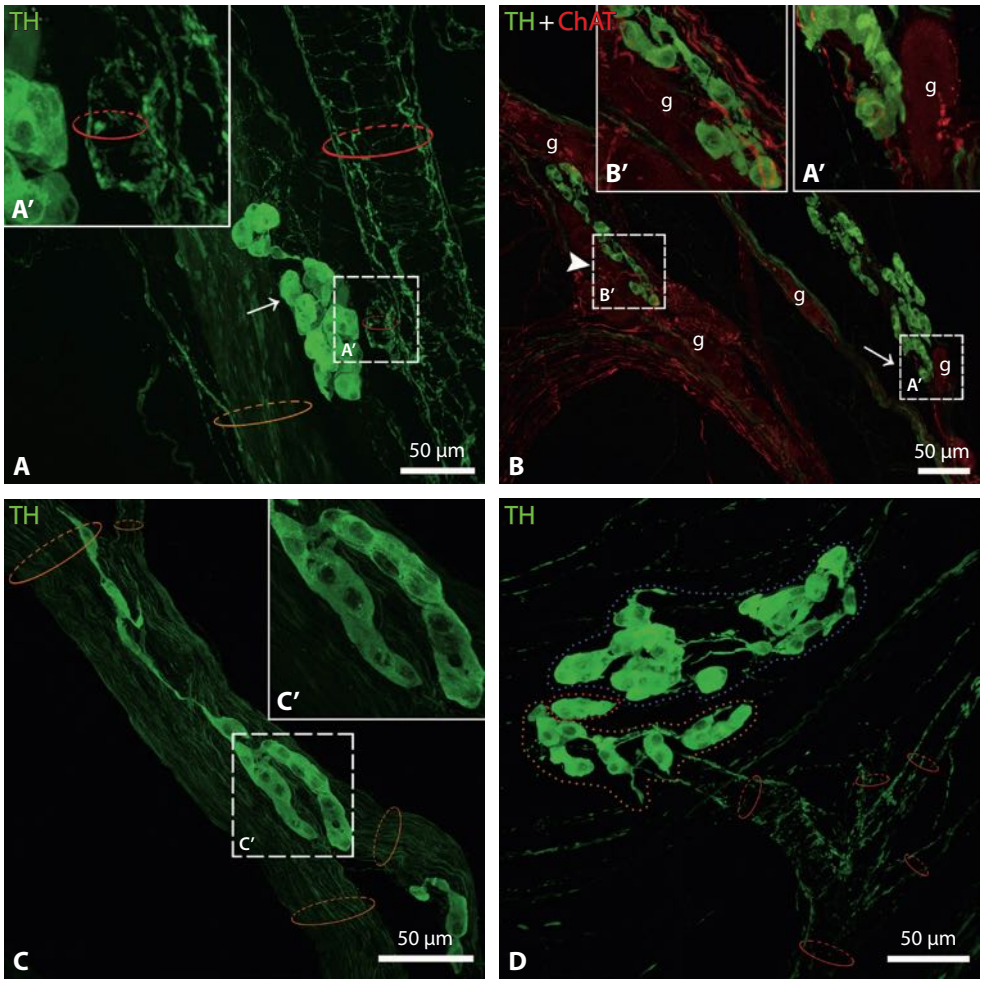


Fig. 3.3.6. *Distribution of SIF cells in the rat atria following immunohistochemical staining for tyrosine hydroxylase (TH, green), choline acetyltransferase (ChAT, red)*

(A) A cluster of SIF cells (white arrow) near an epicardial nerve (outlined by an orange ellipse) and nearby blood vessels (indicated by red ellipses). **(B)** SIF cell clusters located either in proximity (white arrow) or within (white arrowhead) cholinergic epicardial ganglia (g). **(C)** SIF cells are dispersed along the course of an epicardial nerve. **(D)** Three distinct SIF cell clusters (each outlined with differently coloured dashed lines) are situated within the atrial epicardium, spatially separated from ganglionated plexuses and nerve fibres, yet positioned near blood vessels (red ellipses) surrounded by perivascular TH-positive nerve fibres. Adapted from [34]. Reused under Elsevier's author reuse policy.

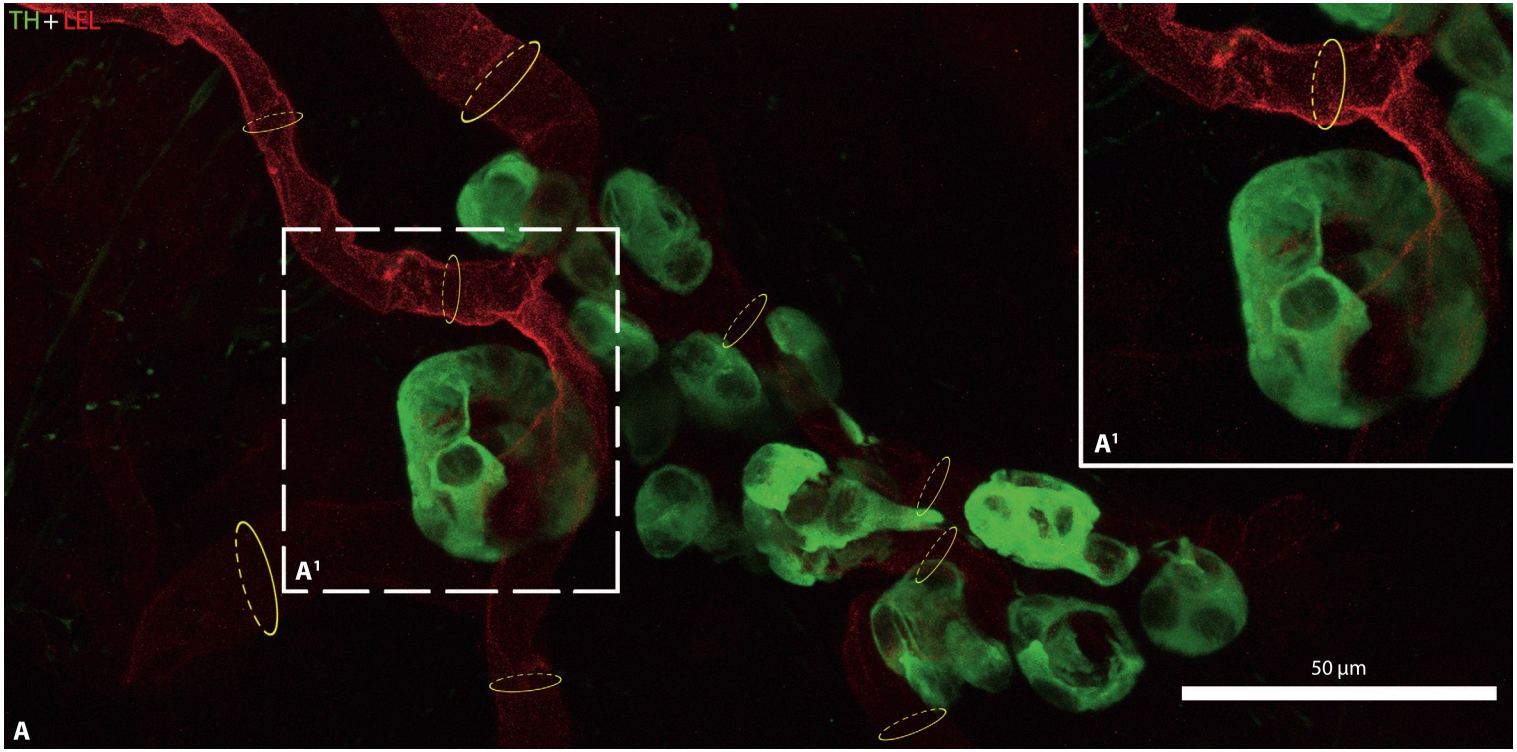


Fig. 3.3.7. *Distribution of SIF cells in the rat atria following immunohistochemical staining for tyrosine hydroxylase (TH, green) and vascular labelling with tomato lectin (LEL)*

(A) Representative arrangement of strongly TH-immunoreactive SIF cell clusters located adjacent to epicardial blood vessels (yellow ellipses), which are visualised by LEL staining (red). The boxed dashed line area in **A** is shown at higher magnification in the corresponding inset **A¹**. Adapted from [34]. Reused under Elsevier's author reuse policy.

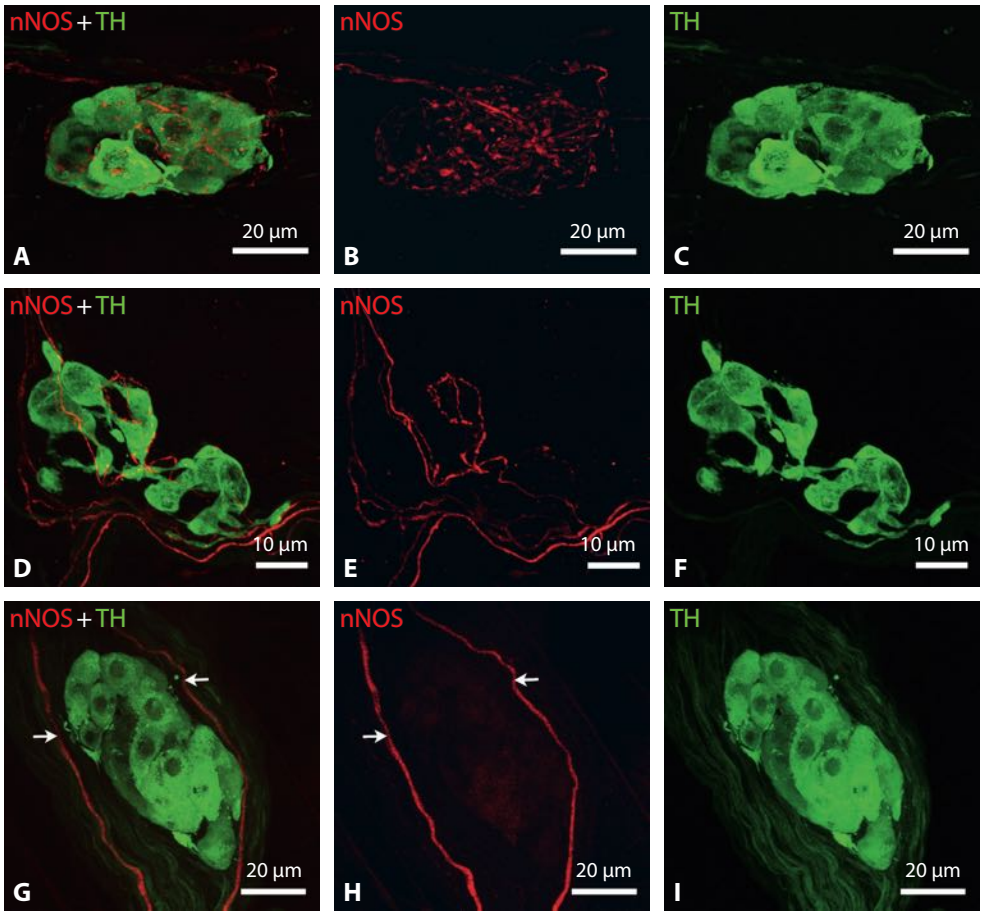


Fig. 3.3.8. *Three morphological types of nNOS-immunopositive axons associated with SIF cells in the rat atria*

The first morphotype of nitrergic terminals **(A–C)** is characterised by numerous varicosities and forms basket-like structures enveloping the contacted SIF cells. The second morphotype **(D–F)** partially surrounds selected SIF cells at multiple contact points but lacks varicosities. The third morphotype **(G–I)** also shows no varicosities and is positioned at a greater distance from SIF cells (white arrows) compared with the first two types. This third axonal pattern clearly demonstrates the absence of direct axonal contacts with SIF cells.
Adapted from [34]. Reused under Elsevier's author reuse policy.

Regardless of the neuronal marker applied for immunohistochemical labelling, the majority of SIF cell clusters identified in rat hearts (approximately 80%) showed no direct association with nerve fibres (NFs). In contrast, roughly 20% of clusters were accompanied by a limited number of closely linked NFs, which displayed a nitrergic phenotype, being positive exclusively for neuronal nitric oxide synthase (nNOS) (Fig. 3.3.8 A–F). Two

distinct structural patterns of nitrergic innervation were observed in relation to SIF cell clusters. The first pattern, detected in approximately 2% of all analysed clusters, was relatively rare and characterised by tightly enveloping nitrergic fibres whose axons exhibited numerous varicosities, suggesting potential direct involvement in nitric oxide (NO) signalling (Figs. 3.3.8 A–C, 3.3.9). The second, more prevalent pattern (approximately 18% of clusters) consisted of nitrergic axons with sparse or absent varicosities at their terminals (Figs. 3.3.8 D–F; 3.3.9). The mesh-like arrangement of these axons around specific SIF cells within clusters suggests a possible functional association with their target cells. Overall, 81.3% of SIF cell clusters examined in this study lacked any associated nerve fibres, including nNOS-positive fibres (Figs. 3.3.8 G–I, 3.3.9). Importantly, no cholinergic nerve fibres or axons were observed in proximity to SIF cell clusters throughout the analysed whole-mount atrial preparations (Fig. 3.3.10). Additionally, several intrinsic cardiac nitrergic neurons were identified in the rat atria, with processes extending from their somata toward SIF cell clusters (Fig. 3.3.11).

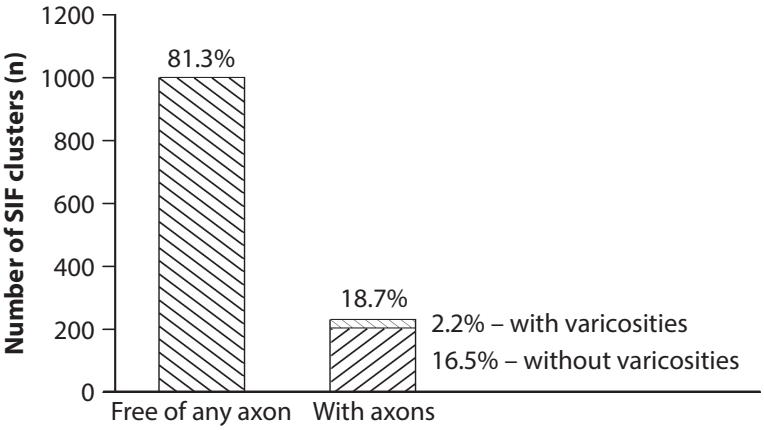


Fig. 3.3.9. *Nitrergic innervation of SIF cell clusters*

The majority of clusters (n = 1000) showed no association with nerve fibres. However, 230 clusters exhibited direct contacts with nNOS-positive axons; among these, 27 clusters were surrounded by varicose axons, while 203 were contacted by axons lacking varicosities. Percent values are indicated above the bars in each chart.
Adapted from [34]. Reused under Elsevier's author reuse policy.

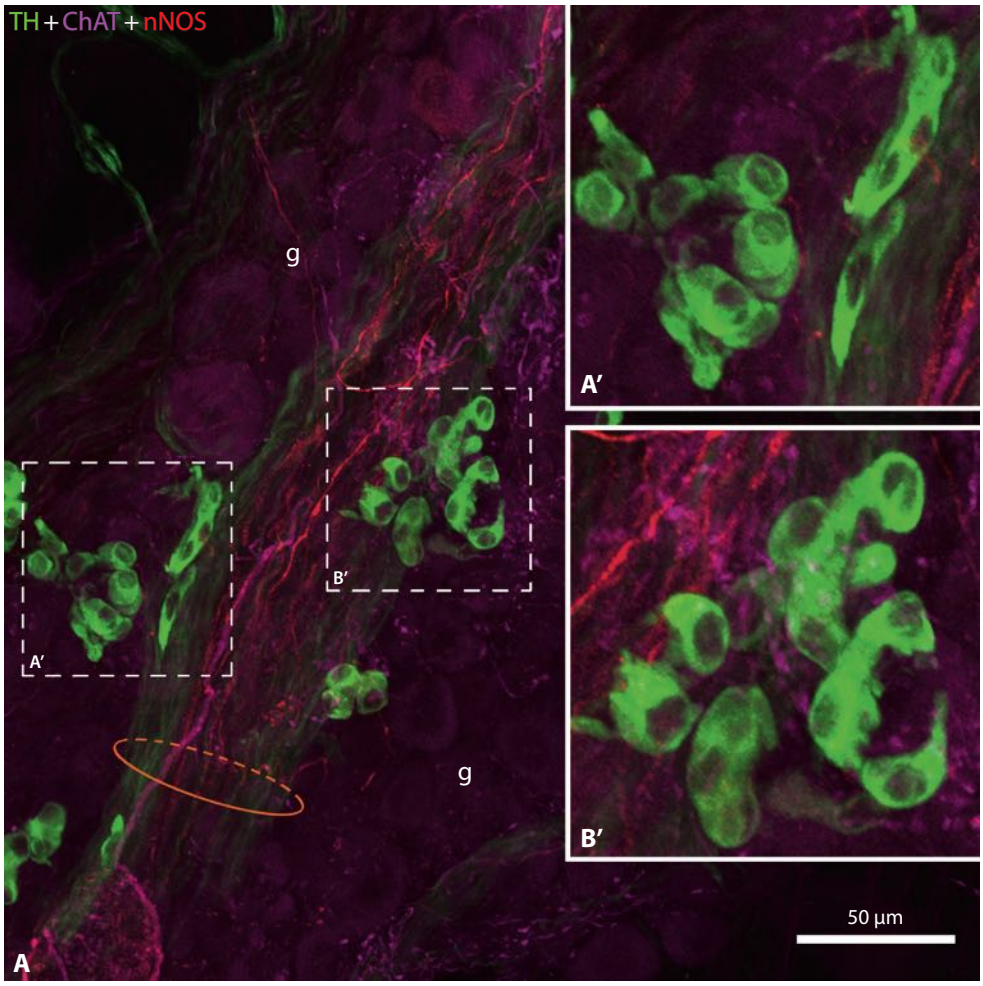


Fig. 3.3.10. *Representative micrograph demonstrating the absence of cholinergic nerve fibres associated with SIF cells in rat atrial preparations immunostained for tyrosine hydroxylase (TH), choline acetyltransferase (ChAT), and neuronal nitric oxide synthase (nNOS)*

The boxed regions **(A', B')** are shown at higher magnification in the corresponding insets and confirm the lack of ChAT-positive varicose nerve fibres near SIF cells. g – indicates epicardial ganglia, orange ellipse – epicardial nerve.
Adapted from [34]. Reused under Elsevier's author reuse policy.

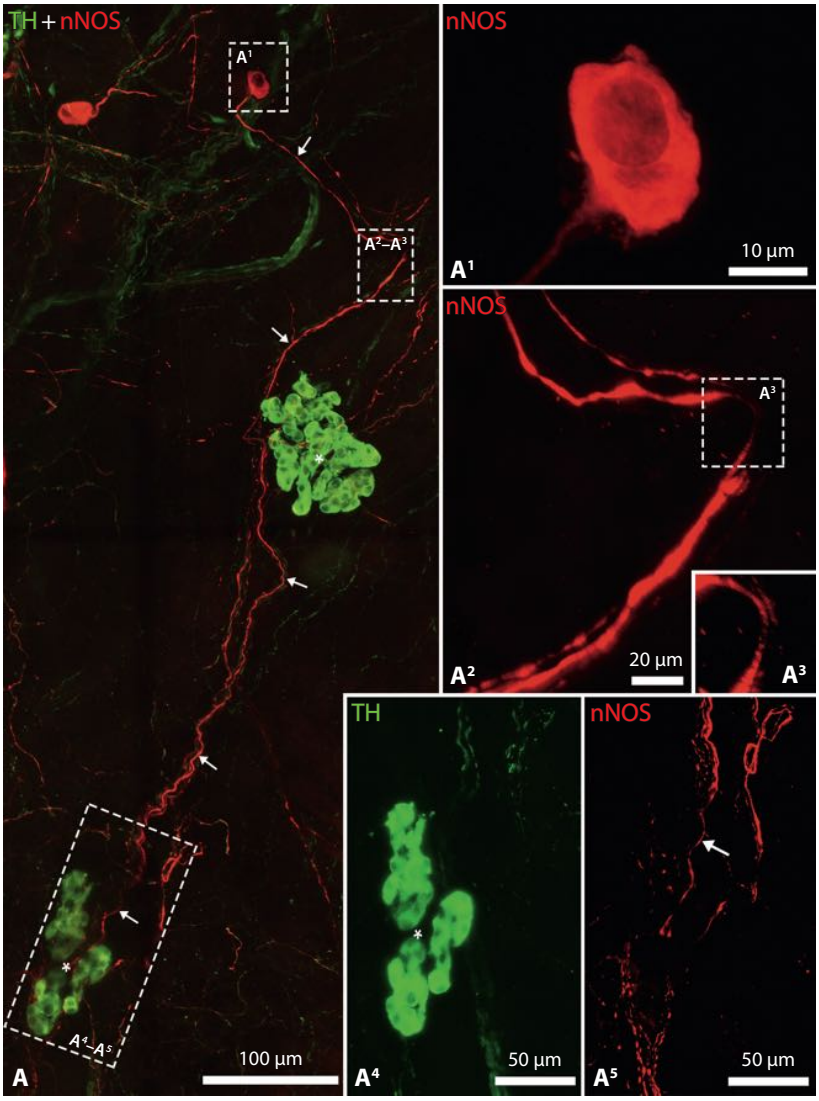


Fig. 3.3.11. *Nitrergic innervation of a small intensely fluorescent (SIF) cell cluster situated within the neural plexus at the venous pole of the rat heart hilum*

(A) Mosaic micrograph illustrating the immunohistochemically labelled neural plexus of the heart hilum. SIF cells are identified by tyrosine hydroxylase (TH) immunoreactivity in green (marked by asterisks), while two neighbouring intrinsic neurons are labelled for neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in red. A nitrergic axon (indicated by arrows), arising from one of the nNOS-positive neurons **(A^1)**, extends toward the lower SIF cell cluster **(A^4–A^5)** and forms basket-like contacts around these cells. The boxed regions in panel A are shown at higher magnification in panels **A^1–A^5**, highlighting different portions of the indicated nitrergic neuron and the SIF cells receiving nitrergic terminal input.
Adapted from [34]. Reused under Elsevier's author reuse policy.

CONCLUSIONS

1. Using whole-heart and flattened whole-mount preparation techniques, histochemical acetylcholinesterase (AChE) staining, and specific immunohistochemical methods for visualizing afferent neural structures, two morphological types of nerve endings can be identified in the cardiac walls of humans and five investigated mammalian species (mini pig, rat, two bats and mice): flower-spray and basket-type nerve endings.
   1.1. Endocardial flower-spray nerve endings are characteristic only of humans, as neither flower-spray nor basket-type nerve endings were detected in the endocardium of the other investigated animal species.
   1.2. Both types of nerve endings are distributed in the epicardium of our investigated animal species, whereas they have not been detected in the human epicardium.
   1.3. Flower-spray nerve endings are located immediately beneath the mesothelial cell layer; therefore, it is appropriate to refer to them as submesothelial nerve endings. The vast majority of submesothelial nerve endings are distributed in the ventricular epicardium, on the sternocostal, diaphragmatic, and lateral ventricular surfaces.
   1.4. Basket-type nerve endings are detected and may be associated with the neuronal cell bodies of intracardiac ganglia.
   1.5. Flower-spray nerve endings are immunoreactive only for the general neuronal marker PGP 9.5. Basket-type nerve endings are also immunoreactive for PGP 9.5 and for the neuronal markers substance P (SP), calcitonin gene-related peptide (CGRP), and neuronal nitric oxide synthase (nNOS).

2. Flower-spray nerve endings exhibit pronounced interspecies morphometric differences. The largest nerve endings of this type were detected in the human cardiac endocardium and in the epicardium of the mini pig. Rat epicardial flower-spray nerve endings are larger than those found in the epicardium of bats and mice. The epicardial flower-spray nerve endings in mice are the smallest among the investigated species.

3. Although the absolute majority of cardiac small intensely fluorescent cells have no nerve fibres in their immediate surroundings and show an uneven topographical distribution, they comprise two morphological types: type I cells, which possess processes, and type II cells, which lack processes. A small proportion of these cells in the rat heart, up to 19%, are surrounded by thin nitrergic fibres. Nerve fibres and nerve endings immunoreactive for specific markers of afferent neurons, including SP, CGRP, and nNOS, form basket-like arrangements around neuronal cell

bodies in intracardiac ganglia; such structures have so far been demonstrated only in the rat heart. If nerve fibres and endings containing typical afferent neuromarkers are confirmed in the hearts of other animal species in the future, it may be assumed that dorsal root ganglion and vagal afferent neurons, through their peripheral axons, rather than intracardiac afferent neurons whose existence still remains anatomically unproven, may directly modulate efferent neurons of the intracardiac ganglia.

BIBLIOGRAFIJOS SĄRAŠAS

1. Armour JA. Cardiac neuronal hierarchy in health and disease. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2004 Aug;287(2):R262–71.
2. Armour JA. Potential clinical relevance of the 'little brain' on the mammalian heart. Exp Physiol. 2008 Feb;93(2):165–76.
3. Durães Campos I, Pinto V, Sousa N, Pereira VH. A brain within the heart: A review on the intracardiac nervous system. J Mol Cell Cardiol. 2018 Jun;119:1–9.
4. Fedele L, Brand T. The Intrinsic Cardiac Nervous System and Its Role in Cardiac Pacemaking and Conduction. J Cardiovasc Dev Dis. 2020 Nov 24;7(4):54.
5. Hanna P, Rajendran PS, Ajijola OA, Vaseghi M, Andrew Armour J, Ardell JL, Shivkumar K. Cardiac neuroanatomy – Imaging nerves to define functional control. Auton Neurosci. 2017 Nov;207:48–58. doi: 10.1016/j.autneu.2017.07.008.
6. Pascale A, Govoni S. Brain-heart communication: Hardware and software strategies through nerves and humoral factors. In: Brain and Heart Dynamics. Springer, 2019.
7. Armour JA. Intrinsic cardiac neurons. Journal of Cardiovascular Electrophysiology. 1991;2:331–41.
8. Ardell JL, Andresen MC, Armour JA, Billman GE, Chen PS, Foreman RD, Herring N, O'Leary DS, Sabbah HN, Schultz HD, Sunagawa K, Zucker IH. Translational neurocardiology: preclinical models and cardioneural integrative aspects. J Physiol. 2016 Jul 15;594(14):3877–909.
9. Elia A, Fossati S. Autonomic nervous system and cardiac neuro-signaling pathway modulation in cardiovascular disorders and Alzheimer's disease. Front Physiol. 2023 Jan 30;14:1060666.
10. Wake E, Brack K. Characterization of the intrinsic cardiac nervous system. Auton Neurosci. 2016 Aug;199:3–16.
11. Armour JA, Murphy DA, Yuan BX, Macdonald S, Hopkins DA. Gross and microscopic anatomy of the human intrinsic cardiac nervous system. Anat Rec. 1997 Feb;247(2): 289–98.
12. Pauza DH, Skripka V, Pauziene N, Stropus R. Morphology, distribution, and variability of the epicardiac neural ganglionated subplexuses in the human heart. Anat Rec. 2000 Aug 1;259(4):353–82.
13. Petraitiene V, Pauza DH, Benetis R. Distribution of adrenergic and cholinergic nerve fibres within intrinsic nerves at the level of the human heart hilum. Eur J Cardiothorac Surg. 2014 Jun;45(6):1097–105.
14. Pauza DH, Pauziene N, Tamasauskas KA, Stropus R. Hilum of the heart. Anat Rec. 1997 Jul;248(3):322–4.
15. Batulevicius D, Pauziene N, Pauza DH. Topographic morphology and age-related analysis of the neuronal number of the rat intracardiac nerve plexus. Ann Anat. 2003; 185(5):449–59.
16. Batulevicius D, Pauziene N, Pauza DH. Architecture and age-related analysis of the neuronal number of the guinea pig intrinsic cardiac nerve plexus. Ann Anat. 2005 Sep;187(3):225–43.
17. Pauza DH, Skripka V, Pauziene N, Stropus R. Anatomical study of the neural ganglionated plexus in the canine right atrium: implications for selective denervation and electrophysiology of the sinoatrial node in dog. Anat Rec. 1999 Jun 1;255(3):271–94.

18. Pauza DH, Pauziene N, Pakeltyte G, Stropus R. Comparative quantitative study of the intrinsic cardiac ganglia and neurons in the rat, guinea pig, dog and human as revealed by histochemical staining for acetylcholinesterase. Ann Anat. 2002 Mar;184(2):125–36.
19. Pauziene N, Pauza DH, Stropus R. Morphological study of the heart innervation of bats Myotis daubentonii and Eptesicus serotinus (Microchiroptera: Vespertilionidae) during hibernation. Eur J Morphol. 2000 Aug;38(3):195–205.
20. Rysevaite K, Saburkina I, Pauziene N, Vaitkevicius R, Noujaim SF, Jalife J, Pauza DH. Morphologic pattern of the intrinsic ganglionated nerve plexus in mouse heart. Heart Rhythm. 2011 Mar;8(3):448–54.
21. Saburkina I, Gukauskiene L, Rysevaite K, Brack KE, Pauza AG, Pauziene N, Pauza DH. Morphological pattern of intrinsic nerve plexus distributed on the rabbit heart and interatrial septum. J Anat. 2014 May;224(5):583–93.
22. Hoover DB, Isaacs ER, Jacques F, Hoard JL, Pagé P, Armour JA. Localization of multiple neurotransmitters in surgically derived specimens of human atrial ganglia. Neuroscience. 2009 Nov 24;164(3):1170–9.
23. Rysevaite K, Saburkina I, Pauziene N, Vaitkevicius R, Noujaim SF, Jalife J, Pauza DH. Immunohistochemical characterization of the intrinsic cardiac neural plexus in whole-mount mouse heart preparations. Heart Rhythm. 2011 May;8(5):731–8.
24. Chen J, Bendowski KT, Bizanti A, Zhang Y, Ma J, Hoover DB, Gozal D, Shivkumar K, Cheng ZJ. Distribution and morphology of calcitonin gene-related peptide (CGRP) innervation in flat mounts of whole rat atria and ventricles. Auton Neurosci. 2024; 251:103127.
25. Ardell JL, Armour JA. Neurocardiology: Structure-Based Function. Compr Physiol. 2016 Sep 15;6(4):1635–53.
26. Cheng Z, Powley TL, Schwaber JS, Doyle FJ 3rd. Vagal afferent innervation of the atria of the rat heart reconstructed with confocal microscopy. J Comp Neurol. 1997 Apr 28;381(1):1–17.
27. Giannino G, Braia V, Griffith Brookles C, Giacobbe F, D'Ascenzo F, Angelini F, Saglietto A, De Ferrari GM, Dusi V. The Intrinsic Cardiac Nervous System: From Pathophysiology to Therapeutic Implications. Biology (Basel). 2024 Feb 7;13(2):105.
28. Hoover DB, Shepherd AV, Southerland EM, Armour JA, Ardell JL. Neurochemical diversity of afferent neurons that transduce sensory signals from dog ventricular myocardium. Auton Neurosci. 2008 Aug 18;141(1-2):38–45.
29. Ludbrook J. Cardiovascular reflexes from cardiac sensory receptors. Aust N Z J Med. 1990 Aug;20(4):597–606.
30. Pickard JMJ, Burke N, Davidson SM, Yellon DM. Intrinsic cardiac ganglia and acetylcholine are important in the mechanism of ischaemic preconditioning. Basic Res Cardiol. 2017 Mar;112(2):11.
31. Thompson GW, Collier K, Ardell JL, Kember G, Armour JA. Functional interdependence of neurons in a single canine intrinsic cardiac ganglionated plexus. J Physiol. 2000 Nov 1;528(Pt 3):561–71.
32. Ma J, Bizanti A, Kwiat AM, Barton K, Nguyen D, Madas J, Toledo Z, Bendowski K, Chen J, Cheng ZJ. Spinal Afferent Innervation From Left Dorsal Root Ganglia in the Flat-Mounts of Whole Atria of Rats: Anterograde Tracing. J Comp Neurol. 2024 Dec;532(12):e25681.

33. Sabeckis I, Pauza AG, Rysevaite-Kyguoliene K, Sabeckiene D, Drozdova-Statkeviciene M, Onashko Y, Pauziene N, Pauza DH. Morphologic pattern of nerve endings in the hearts of five mammalian species and humans. Ann Anat. 2026 Apr 23;266:152847.
34. Sabeckis I, Rysevaite-Kyguoliene K, Sabeckiene D, Onashko Y, Pauziene N, Pauza DH. Nitrergic innervation of the cardiac small intensely fluorescent cells in rats. Ann Anat. 2025 Jun;260:152675.
35. Awad M, Czer LS, Hou M, Golshani SS, Goltche M, De Robertis M, Kittleson M, Patel J, Azarbal B, Kransdorf E, Esmailian F, Trento A, Kobashigawa JA. Early Denervation and Later Reinnervation of the Heart Following Cardiac Transplantation: A Review. J Am Heart Assoc. 2016 Nov 1;5(11):e004070
36. Grupper A, Gewirtz H, Kushwaha S. Reinnervation post-heart transplantation. Eur Heart J. 2018 May 21;39(20):1799–806.
37. Singh S, Johnson PI, Lee RE, Orfei E, Lonchyna VA, Sullivan HJ, Montoya A, Tran H, Wehrmacher WH, Wurster RD. Topography of cardiac ganglia in the adult human heart. J Thorac Cardiovasc Surg. 1996 Oct;112(4):943–53.
38. Coote JH, Chauhan RA. The sympathetic innervation of the heart: Important new insights. Auton Neurosci. 2016 Aug;199:17–23.
39. Ernsberger U. The development of postganglionic sympathetic neurons: coordinating neuronal differentiation and diversification. Auton Neurosci. 2001 Dec 10;94(1–2):1–13.
40. Hasan W. Autonomic cardiac innervation. Organogenesis 2013;9:176–93.
41. Kuder T, Nowak E. Autonomic cardiac nerves: literature review. Folia Morphol (Warsz). 2015;74(1):1–8.
42. Protas L, Qu J, Robinson RB. Neuropeptide y: neurotransmitter or trophic factor in the heart? News Physiol Sci. 2003 Oct;18:181–5.
43. Wengrowski AM, Wang X, Tapa S, Posnack NG, Mendelowitz D, Kay MW. Optogenetic release of norepinephrine from cardiac sympathetic neurons alters mechanical and electrical function. Cardiovasc Res. 2015 Feb 1;105(2):143–50.
44. Bucchi A, Baruscotti M, Robinson RB, DiFrancesco D. Modulation of rate by autonomic agonists in SAN cells involves changes in diastolic depolarization and the pacemaker current. J Mol Cell Cardiol. 2007 Jul;43(1):39–48.
45. Berntson GG, Cacioppo JT, Quigley KS. The metrics of cardiac chronotropism: biometric perspectives. Psychophysiology. 1995 Mar;32(2):162–71.
46. Herring N, Lokale MN, Danson EJ, Heaton DA, Paterson DJ. Neuropeptide Y reduces acetylcholine release and vagal bradycardia via a Y2 receptor-mediated, protein kinase C-dependent pathway. J Mol Cell Cardiol. 2008 Mar;44(3):477–85.
47. Oh Y, Cho GS, Li Z, Hong I, Zhu R, Kim MJ, Kim YJ, Tampakakis E, Tung L, Huganir R, Dong X, Kwon C, Lee G. Functional Coupling with Cardiac Muscle Promotes Maturation of hPSC-Derived Sympathetic Neurons. Cell Stem Cell. 2016 Jul 7;19(1):95–106.
48. Yang T, Levy MN. Sequence of excitation as a factor in sympathetic-parasympathetic interactions in the heart. Circ Res. 1992 Oct;71(4):898–905.
49. Shanks J, Herring N. Peripheral cardiac sympathetic hyperactivity in cardiovascular disease: role of neuropeptides. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2013 Dec 15;305(12):R1411–20.
50. Mitsumoto H, Schwartzman MJ, Estes ML, Chou SM, La Franchise EF, De Camilli P, Solimena M. Sudden death and paroxysmal autonomic dysfunction in stiff-man syndrome. J Neurol. 1991 Apr;238(2):91–6.

51. Montagna P, Lugaresi E. Agrypnia Excitata: a generalized overactivity syndrome and a useful concept in the neurophysiopathology of sleep. Clin Neurophysiol. 2002 Apr;113(4):552–60.
52. Norcliffe-Kaufmann L, Kaufmann H. Familial dysautonomia (Riley-Day syndrome): when baroreceptor feedback fails. Auton Neurosci. 2012 Dec 24;172(1–2):26–30.
53. Olshansky B, Sabbah HN, Hauptman PJ, Colucci WS. Parasympathetic nervous system and heart failure: pathophysiology and potential implications for therapy. Circulation. 2008 Aug 19;118(8):863–71.
54. Vaseghi M, Shivkumar K. The role of the autonomic nervous system in sudden cardiac death. Prog Cardiovasc Dis. 2008 May-Jun;50(6):404–19.
55. Ursino M. Interaction between carotid baroregulation and the pulsating heart: a mathematical model. Am J Physiol. 1998 Nov;275(5):H1733–47.
56. Silvani A, Calandra-Buonaura G, Dampney RA, Cortelli P. Brain-heart interactions: physiology and clinical implications. Philos Trans A Math Phys Eng Sci. 2016 May 13;374(2067):20150181.
57. Nakamura K, Ajijola OA, Aliotta E, Armour JA, Ardell JL, Shivkumar K. Pathological effects of chronic myocardial infarction on peripheral neurons mediating cardiac neurotransmission. Auton Neurosci. 2016 May;197:34–40.
58. Arora RC, Waldmann M, Hopkins DA, Armour JA. Porcine intrinsic cardiac ganglia. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. 2003 Mar;271(1):249–58.
59. Pardini BJ, Patel KP, Schmid PG, Lund DD. Location, distribution and projections of intracardiac ganglion cells in the rat. J Auton Nerv Syst. 1987 Aug;20(2):91–101.
60. Pauza DH, Skripka V, Pauziene N. Morphology of the intrinsic cardiac nervous system in the dog: a whole-mount study employing histochemical staining with acetylcholinesterase. Cells Tissues Organs. 2002;172(4):297–320.
61. Pauza DH, Skripkiene G, Skripka V, Pauziene N, Stropus R. Morphological study of neurons in the nerve plexus on heart base of rats and guinea pigs. J Auton Nerv Syst. 1997 Jan 12;62(1–2):1–12.
62. Randall DC. Towards an understanding of the function of the intrinsic cardiac ganglia. J Physiol. 2000 Nov 1;528(Pt 3):406.
63. Shen MJ, Zipes DP. Role of the autonomic nervous system in modulating cardiac arrhythmias. Circ Res. 2014 Mar 14;114(6):1004–21.
64. Rajendran PS, Nakamura K, Ajijola OA, Vaseghi M, Armour JA, Ardell JL, Shivkumar K. Myocardial infarction induces structural and functional remodelling of the intrinsic cardiac nervous system. J Physiol. 2016 Jan 15;594(2):321–41.
65. Beaumont E, Salavatian S, Southerland EM, Vinet A, Jacquemet V, Armour JA, Ardell JL. Network interactions within the canine intrinsic cardiac nervous system: implications for reflex control of regional cardiac function. J Physiol. 2013 Sep 15;591(18):4515–33.
66. Brack KE. The heart's 'little brain' controlling cardiac function in the rabbit. Exp Physiol. 2015 Apr 1;100(4):348–53.
67. Horackova M, Croll RP, Hopkins DA, Losier AM, Armour JA. Morphological and immunohistochemical properties of primary long-term cultures of adult guinea-pig ventricular cardiomyocytes with peripheral cardiac neurons. Tissue & Cell 1996;28:411–25.
68. Horackova M, Croll RP, Hopkins DA, Losier AM, Armour JA. Morphological and immunohistochemical properties of primary long-term cultures of adult guinea-pig ventricular cardiomyocytes with peripheral cardiac neurons. Tissue & Cell 1996;28:411–25.

69. Amorim DS, Olsen EG. Age-associated changes in the number of neurons in the right atrium. Braz J Med Biol Res. 1990;23(1):21–8.
70. Jurgaitiene R, Pauziene N, Azelis V, Zurauskas E. Morphometric study of age-related changes in the human intracardiac ganglia. Medicina (Kaunas). 2004;40(6):574-81.
71. Hancock JC, Hoover DB, Hougland MW. Distribution of muscarinic receptors and acetylcholinesterase in the rat heart. J Auton Nerv Syst. 1987 Apr;19(1):59-66.
72. Hardwick JC, Mawe GM, Parsons RL. Evidence for afferent fiber innervation of parasympathetic neurons of the guinea-pig cardiac ganglion. J Auton Nerv Syst. 1995 Jun 25;53(2–3):166–74.
73. Horackova M, Armour JA, Byczko Z. Distribution of intrinsic cardiac neurons in whole-mount guinea pig atria identified by multiple neurochemical coding. A confocal microscope study. Cell Tissue Res. 1999 Sep;297(3):409–21.
74. Weihe E, Schütz B, Hartschuh W, Anlauf M, Schäfer MK, Eiden LE. Coexpression of cholinergic and noradrenergic phenotypes in human and nonhuman autonomic nervous system. J Comp Neurol. 2005 Nov 21;492(3):370–9.
75. Furshpan EJ, MacLeish PR, O'Lague PH, Potter DD. Chemical transmission between rat sympathetic neurons and cardiac myocytes developing in microcultures: evidence for cholinergic, adrenergic, and dual-function neurons. Proc Natl Acad Sci U S A. 1976 Nov;73(11):4225–9.
76. Kimura K, Ieda M, Fukuda K. Development, maturation, and transdifferentiation of cardiac sympathetic nerves. Circ Res. 2012 Jan 20;110(2):325–36.
77. Turrigiano G, Abbott LF, Marder E. Activity-dependent changes in the intrinsic properties of cultured neurons. Science. 1994 May 13;264(5161):974–7.
78. Malpas SC. Sympathetic nervous system overactivity and its role in the development of cardiovascular disease. Physiol Rev. 2010 Apr;90(2):513–57.
79. Parati G, Esler M. The human sympathetic nervous system: its relevance in hypertension and heart failure. Eur Heart J. 2012 May;33(9):1058–66.
80. Cao JM, Fishbein MC, Han JB, Lai WW, Lai AC, Wu TJ, Czer L, Wolf PL, Denton TA, Shintaku IP, Chen PS, Chen LS. Relationship between regional cardiac hyperinnervation and ventricular arrhythmia. Circulation. 2000 Apr 25;101(16):1960–9.
81. Hucker WJ, Singh JP, Parks K, Armoundas AA. Device-Based Approaches to Modulate the Autonomic Nervous System and Cardiac Electrophysiology. Arrhythm Electrophysiol Rev. 2014 May;3(1):30–5.
82. Thackeray JT, Bengel FM. PET imaging of the autonomic nervous system. The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging : Official Publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN) [and] the International Association of Radiopharmacology (IAR), [and] Section of the Society Of. 2016;60:362–82.
83. Jungen C, Scherschel K, Eickholt C, Kuklik P, Klatt N, Bork N, Salzbrunn T, Alken F, Angendohr S, Klene C, Mester J, Klöcker N, Veldkamp MW, Schumacher U, Willems S, Nikolaev VO, Meyer C. Disruption of cardiac cholinergic neurons enhances susceptibility to ventricular arrhythmias. Nat Commun. 2017 Jan 27;8:14155.
84. Krul SPJ, Berger WR, Veldkamp MW, Driessen AHG, Wilde AAM, Deneke T, de Bakker JMT, Coronel R, de Groot JR. Treatment of Atrial and Ventricular Arrhythmias Through Autonomic Modulation. JACC Clin Electrophysiol. 2015 Dec;1(6):496–508.
85. Olivas A, Gardner RT, Wang L, Ripplinger CM, Woodward WR, Habecker BA. Myocardial Infarction Causes Transient Cholinergic Transdifferentiation of Cardiac Sympathetic Nerves via gp130. J Neurosci. 2016 Jan 13;36(2):479–88.
86. Hopkins DA, Macdonald SE, Murphy DA, Armour JA. Pathology of intrinsic cardiac neurons from ischemic human hearts. Anat Rec. 2000 Aug 1;259(4):424–36.

87. Hardwick JC, Ryan SE, Beaumont E, Ardell JL, Southerland EM. Dynamic remodeling of the guinea pig intrinsic cardiac plexus induced by chronic myocardial infarction. Auton Neurosci. 2014 Apr;181:4–12.
88. Hardwick JC, Southerland EM, Ardell JL. Chronic myocardial infarction induces phenotypic and functional remodeling in the guinea pig cardiac plexus. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2008 Dec;295(6):R1926–33.
89. Baptista CA, Kirby ML. The cardiac ganglia: cellular and molecular aspects. Kaohsiung J Med Sci. 1997 Jan;13(1):42–54.
90. Arora RC, Cardinal R, Smith FM, Ardell JL, Dell'Italia LJ, Armour JA. Intrinsic cardiac nervous system in tachycardia induced heart failure. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2003 Nov;285(5):R1212–23.
91. Charles CA, Braunwald E. Morrow AG. Catecholamine excretion and cardiac stores of norepinephrine in congestive heart failure. The American Journal of Medicine 1965; 39:442–51.
92. Chidsey CA, Braunwald E, Morrow AG. Catecholamine excretion and cardiac stores of norepinephrine in congestive heart failure. Am J Med. 1965 Sep;39:442–51.
93. Singh S, Sayers S, Walter JS, Thomas D, Dieter RS, Nee LM, Wurster RD. Hypertrophy of neurons within cardiac ganglia in human, canine, and rat heart failure: the potential role of nerve growth factor. J Am Heart Assoc. 2013 Aug 19;2(4):e000210.
94. Amorim DS, Olsen EG. Assessment of heart neurons in dilated (congestive) cardiomyopathy. Br Heart J. 1982 Jan;47(1):11–8.
95. Eisner DA, Dibb KM, Trafford AW. The mechanism and significance of the slow changes of ventricular action potential duration following a change of heart rate. Exp Physiol. 2009 May;94(5):520–8.
96. Zhang D, Tu H, Cao L, Zheng H, Muelleman RL, Wadman MC, Li YL. Reduced N-Type Ca^{2+} Channels in Atrioventricular Ganglion Neurons Are Involved in Ventricular Arrhythmogenesis. J Am Heart Assoc. 2018 Jan 15;7(2):e007457.
97. Buendia-Fuentes F, Almenar L, Ruiz C, Vercher JL, Sánchez-Lázaro I, Martínez-Dolz L, Navarro J, Bello P, Salvador A. Sympathetic reinnervation 1 year after heart transplantation, assessed using iodine-123 metaiodobenzylguanidine imaging. Transplant Proc. 2011 Jul-Aug;43(6):2247–8.
98. Murphy DA, O'Blenes S, Hanna BD, Armour JA. Capacity of intrinsic cardiac neurons to modify the acutely autotransplanted mammalian heart. J Heart Lung Transplant. 1994 Sep-Oct;13(5):847–56.
99. Smith FM, McGuirt AS, Leger J, Armour JA, Ardell JL. Effects of chronic cardiac decentralization on functional properties of canine intracardiac neurons in vitro. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2001 Nov;281(5):R1474–82.
100. Amorim DS, Manço JC, Gallo L Jr, Marin Neto JA. Chagas' heart disease as an experimental model for studies of cardiac autonomic function in man. Mayo Clin Proc. 1982 Jul;57 Suppl:48–60.
101. Tsujimura T, Nunotani H, Fushimi H, Inoue T. Morphological changes in autonomic ganglionic cells of the heart in diabetic patients. Diabetes Res Clin Pract. 1986 Jun; 2(3):133–7.
102. Meng X, Huang S, He L, Liu T, Chen Y, Li H, Huang X. Catheter Ablation for Frequent Premature Ventricular Contractions or Paroxysmal Supraventricular Tachycardia With Vagal Bradycardia: A New Clinical Application of Superior Vena Cava-Aorta Ganglionated Plexus Modification. Clin Cardiol. 2026 Apr;49(4):e70282.

103. Suenaga H, Murakami M, Tani T, Saito S. Frequent neurally mediated reflex syncope in a young patient with dextrocardia: Efficacy of catheter ablation of the superior vena cava-aorta ganglionated plexus. J Arrhythm. 2015 Jun;31(3):172–6.
104. Chiou CW, Eble JN, Zipes DP. Efferent vagal innervation of the canine atria and sinus and atrioventricular nodes. The third fat pad. Circulation. 1997 Jun 3;95(11):2573–84.
105. Rebecchi M, de Ruvo E, Strano S, Sciarra L, Golia P, Martino A, Calò L. Ganglionated plexi ablation in right atrium to treat cardioinhibitory neurocardiogenic syncope. J Interv Card Electrophysiol. 2012 Sep;34(3):231–5.
106. Calo L, Rebecchi M, Sette A, Sciarra L, Borrelli A, Scara A, Grieco D, Politano A, Sgueglia M, De Luca L, Martino A, Panattoni G, Golia P, Turrisi OV, Knowles M, Strano S, de Ruvo E. Catheter ablation of right atrial ganglionated plexi to treat cardioinhibitory neurocardiogenic syncope: a long-term follow-up prospective study. J Interv Card Electrophysiol. 2021 Sep;61(3):499–510.
107. Aksu T, Golcuk E, Yalin K, Guler TE, Erden I. Simplified Cardioneuroablation in the Treatment of Reflex Syncope, Functional AV Block, and Sinus Node Dysfunction. Pacing Clin Electrophysiol. 2016 Jan;39(1):42–53.
108. Qin M, Zhang Y, Liu X, Jiang WF, Wu SH, Po S. Atrial Ganglionated Plexus Modification: A Novel Approach to Treat Symptomatic Sinus Bradycardia. JACC Clin Electrophysiol. 2017 Sep;3(9):950–9.
109. Eränkö O. SIF cells: structure and function of the small, intensively fluorescent sympathetic cells. DHEW Publication (NIH). 1976;76-943:1–20.
110. Matthews MR. Small, intensely fluorescent cells and the paraneuron concept. J Electron Microsc Tech. 1989 Aug;12(4):408-16.
111. Fujita T. Concept of paraneurons. Arch Histol Jpn. 1977;40 Suppl:1–12.
112. Libet B. Functional roles of SIF cells in slow synaptic actions. In: Eränkö O, Soinila S, Päivärinta H, editors. Histochemistry and Cell Biology of Autonomic Neurons, SIF Cells, and Paraneurons. New York: Raven Press; 1980. p. 111–118.
113. Libet B. Introduction to slow synaptic potentials and their neuromodulation by dopamine. Can J Physiol Pharmacol. 1992;70 Suppl:S3–11.
114. Szurszewski JH, King BF. Physiology of prevertebral ganglia in mammals with special reference to inferior mesenteric ganglion. In: Schultz SG, Wood JD and Rauner BB editors. Handbook of Physiology: The Gastrointestinal System, Section 6, Vol. 1, Motility and Circulation, Part 1. New York: Oxford University Press; 1989. p. 519–592.
115. McKeon TW, Parsons RL. Galanin immunoreactivity in the mudpuppy cardiac ganglion. J Auton Nerv Syst. 1990 Nov;31(2):135–40.
116. Kriebel RM, Angel A, Parsons RL. Biogenic amine localization in cardiac ganglion intrinsic neurons: electron microscopic histochemistry of SIF cells. Brain Res Bull. 1991 Aug;27(2):175–9.
117. Parsons RL, Konopka LM. Analysis of the galanin-induced decrease in membrane excitability in mudpuppy parasympathetic neurons. Neuroscience. 1991;43(2–3):647–60.
118. Gabella G. Autonomic nervous system. In: Paxinos G, editor. The Rat Nervous System. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 1994. p. 81–103.
119. Mulvaney JM, Parsons RL. Arachidonic acid may mediate the galanin-induced hyperpolarization in parasympathetic neurons from Necturus maculosus. Neurosci Lett. 1995 Mar 3;187(2):95–8.

120. Végh AMD, Duim SN, Smits AM, Poelmann RE, Ten Harkel ADJ, DeRuiter MC, Goumans MJ, Jongbloed MRM. Part and Parcel of the Cardiac Autonomic Nerve System: Unravelling Its Cellular Building Blocks during Development. J Cardiovasc Dev Dis. 2016 Sep 12;3(3):28.
121. Slavíková J, Kuncová J, Reischig J, Dvoráková M. Catecholaminergic neurons in the rat intrinsic cardiac nervous system. Neurochem Res. 2003 Apr;28(3–4):593–8.
122. Ouadid H, Seguin J, Dumuis A, Bockaert J, Nargeot J. Serotonin increases calcium current in human atrial myocytes via the newly described 5-hydroxytryp-tamine4 receptors. Mol. Pharm. 1992;41(2):346–51.
123. Yildiz O, Smith JR, Purdy RE. Serotonin and vasoconstrictor synergism. Life Sci. 1998;62(19):1723–32.
124. Nilsson T, Longmore J, Shaw D, Pantev E, Bard JA, Branchek T, Edvinsson L. Characterisation of 5-HT receptors in human coronary arteries by molecular and pharmacological techniques. Eur J Pharmacol. 1999 May 7;372(1):49–56.
125. Côté F, Fligny C, Fromes Y, Mallet J, Vodjdani G. Recent advances in understanding serotonin regulation of cardiovascular function. Trends Mol Med. 2004 May;10(5): 232–8.
126. Hoshi H, Sakagami H, Owada Y, Kondo H. Localization of Ca/calmodulin-dependent protein kinase I in the carotid body chief cells and the ganglionic small intensely fluorescent (SIF) cells of adult rats. Adv Exp Med Biol. 2006;580:87–92.
127. Atanasova DY, Iliev ME, Lazarov NE. Morphology of the rat carotid body. Biomed Rev. 2011;22:41–55.
128. Chiba T, Williams TH. Histofluorescence characteristics and quantification of small intensely fluorescent (SIF) cells in sympathetic ganglia of several species. Cell Tissue Res. 1975 Oct 13;162(3):331–41.
129. Weight FF, Weitsen HA. Identification of small intensely fluorescent (SIF) cells as chromaffin cells in bullfrog sympathetic ganglia. Brain Res. 1977;128(2):213–26.
130. Taxi J, Mikulajova M. Some cytochemical and cytological features of the so-called SIF cells of the superior cervical ganglion of the rat. J Neurocytol. 1976 Jun;5(3):283–95.
131. Tanaka K, Chiba T. Microvascular organization of sympathetic ganglia, with special reference to small intensely-fluorescent cells. Microsc Res Tech. 1996 Oct 1;35(2): 137–45.
132. Miller MR, Kasahara M. Studies on the nerve endings in the heart. Am J Anat. 1964 Sep;115:217–33.
133. Cheng Z, Powley TL, Schwaber JS, Doyle FJ 3rd. A laser confocal microscopic study of vagal afferent innervation of rat aortic arch: chemoreceptors as well as baroreceptors. J Auton Nerv Syst. 1997 Dec 3;67(1–2):1–14.
134. Shenton FC, Campbell T, Jones JFX, Pyner S. Distribution and morphology of sensory and autonomic fibres in the subendocardial plexus of the rat heart. J Anat. 2021 Jan;238(1):36–52.
135. Kazci YE, Sahoglu Goktas S, Aydin MS, Karadogan B, Nebol A, Turhan MU, Ozturk G, Cagavi E. Anatomical characterization of vagal nodose afferent innervation and ending morphologies at the murine heart using a transgenic approach. Auton Neurosci. 2022 Nov;242:103019.
136. Murakami Y, Sasaki K, Komuro M, Yokoyama T, Abdali SS, Nakamuta N, Yamamoto Y. Three-Dimensional Ultrastructure of Flower-Spray Nerve Endings in the Rat Carotid Sinus. J Comp Neurol. 2024 Jul;532(7):e25654.

137. Zhao Q, Yu CD, Wang R, Xu QJ, Dai Pra R, Zhang L, Chang RB. A multidimensional coding architecture of the vagal interoceptive system. Nature. 2022 Mar;603(7903): 878–84.
138. Coleridge JC, 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.
139. Coleridge HM, Coleridge JC, 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(3):323–39.
140. Donald DE, Shepherd JT. Cardiac receptors: Normal and disturbed function. The American Journal of Cardiology, 1979;44(5):873–8.
141. Shepherd JT. The heart as a sensory organ. J Am Coll Cardiol. 1985 Jun;5(6 Suppl): 83B–87B.
142. Pavlyuchenko VB. The heart as a reflexogenic zone. Neurophysiology. 1999;31:413–21.
143. 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 Oct 15;92(8):2343–51.
144. Moore JP, Simpson LL, Drinkhill MJ. Differential contributions of cardiac, coronary and pulmonary artery vagal mechanoreceptors to reflex control of the circulation. J Physiol. 2022 Sep;600(18):4069–87.
145. van Weperen VYH, Vaseghi M. Cardiac vagal afferent neurotransmission in health and disease: review and knowledge gaps. Front Neurosci. 2023 Jun 7;17:1192188.
146. Liu Z, Lu S, Haskell IA, Schappe MS, Josipović M, Min S, Alabi AA, Chi J, Kim M, Liberles SD. Vagal blood volume receptors compensate for haemorrhage and posture change. Nature. 2026 Mar;651(8107):1068–76.
147. Forssmann WG. The endocrine heart. Prog Clin Biol Res. 1989;295:401–17.
148. Forssmann WG, Nokihara K, Gagelmann M, Hock D, Feller S, Schulz-Knappe P, Herbst F. The heart is the center of a new endocrine, paracrine, and neuroendocrine system. Arch Histol Cytol. 1989;52 Suppl:293–315.
149. Hansson M, Kjörell U, Forsgren S. Ingrowth of sympathetic innervation occurs concomitantly with a decrease of ANP in the growing rat cardiac ventricles. Anat Embryol (Berl). 2001 Jan;203(1):35–44.
150. Baxter GF. The natriuretic peptides. Basic Res Cardiol. 2004 Mar;99(2):71–5.
151. D'Souza SP, Davis M, Baxter GF. Autocrine and paracrine actions of natriuretic peptides in the heart. Pharmacol Ther. 2004 Feb;101(2):113–29.
152. Wang TJ, Larson MG, Levy D, Benjamin EJ, Leip EP, Omland T, Wolf PA, Vasan RS. Plasma natriuretic peptide levels and the risk of cardiovascular events and death. N Engl J Med. 2004 Feb 12;350(7):655–63.
153. Jiao JH, Baertschi AJ. Neural control of the endocrine rat heart. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Aug 15;90(16):7799–803.
154. Uberfuhr P, Frey AW, Ziegler S, Reichart B, Schwaiger M. Sympathetic reinnervation of sinus node and left ventricle after heart transplantation in humans: regional differences assessed by heart rate variability and positron emission tomography. J Heart Lung Transplant. 2000 Apr;19(4):317–23.

155. Perrault H, Melin B, Jimenez C, Dureau G, Dureau P, Allevard AM, Cottet-Emard JM, Gauquelin G, Gharib C. Fluid-regulating and sympathoadrenal hormonal responses to peak exercise following cardiac transplantation. J Appl Physiol (1985). 1994 Jan;76(1): 230–5.
156. Braith RW, Wood CE, Limacher MC, Pollock ML, Lowenthal DT, Phillips MI, Staples ED. Abnormal neuroendocrine responses during exercise in heart transplant recipients. Circulation. 1992 Nov;86(5):1453–63.
157. Braith RW, Mills RM Jr, Wilcox CS, Davis GL, Wood CE. Breakdown of blood pressure and body fluid homeostasis in heart transplant recipients. J Am Coll Cardiol. 1996 Feb;27(2):375–83.
158. Deray G, Maistre G, Desruenne M, Eurin J, Barthelemy C, Masson F, Baumelou A, Leger P, Cabrol C, Legrand JC. Atrial natriuretic peptide level and intracardiac pressure in cardiac transplant recipients. Eur J Clin Pharmacol. 1990;38(3):219–21.
159. Mertes PM, de Talancé N, Pinelli G, Peiffert B, Carteaux JP, Mattei MF, Burlet C, Boulangé M, Villemot JP. Facteur atrial natriurétique après transplantation cardio-pulmonaire. Conséquences de la dénervation cardiaque [Atrial natriuretic factor after heart-lung transplantation. Consequences of cardiac denervation]. Presse Med. 1991 Nov 27;20(40):2055–7.
160. Burch M, Carter N, Smith A, Kelsall A, de Leval M, Ationu A. Ventricular expression of atrial natriuretic peptide after orthotopic cardiac transplantation. Transplantation. 1993 Aug;56(2):433–6.
161. Pepke-Zaba J, Higenbottam TW, Morice A, Dinh-Xuan AT, Raine AE, Wallwork J. Exercise increases the release of atrial natriuretic peptide in heart transplant recipients. Eur J Clin Pharmacol. 1992;42(1):21–4.
162. Geny B, Piquard F, Follenius M, Mettauer B, Schaefer A, Canguilhem B, Eisenmann B, Haberey P. Role of cardiac innervation in atrial natriuretic peptide secretion in transplanted heart recipients. Am J Physiol. 1993 Jul;265(1 Pt 2):F112–8.
163. Pepino P, Volpe M, Rose EA, Panza A, Lembo G, Pignalosa S, Barr ML, Covino E, Condorelli M, Smith CR. Effect of complete cardiac denervation on atrial natriuretic factor release in baboons. J Surg Res. 1992 Jul;53(1):43–7.
164. Braith RW, Mills RM Jr, Wilcox CS, Convertino VA, Davis GL, Limacher MC, Wood CE. Fluid homeostasis after heart transplantation: the role of cardiac denervation. J Heart Lung Transplant. 1996 Sep; 15(9):872–80.
165. Mertes, PM, de Talance N, Pinelli G, Villemot JP, Burlet, C, Boulange M. Changes in endocrine control of electrolyte homeostasis and blood pressure following heart and heart-lung transplantation. A comparative study. Chest. 1992 Apr; 101(4):1050–5.
166. Wharton J, Polak JM, Gordon L, Banner NR, Springall DR, Rose M, Khagani A, Wallwork J, Yacoub MH. Immunohistochemical demonstration of human cardiac innervation before and after transplantation. Circ Res. 1990 Apr;66(4):900–12.
167. Tio RA, Reyners AK, van Veldhuisen DJ, van den Berg MP, Brouwer RM, Haaksma J, Smit AJ, Crijns HJ. Evidence for differential sympathetic and parasympathetic reinnervation after heart transplantation in humans. J Auton Nerv Syst. 1997 Dec 11;67(3):176–83.
168. Ramaekers D, Ector H, Vanhaecke J, van Cleemput J, van de Werf F. Heart rate variability after cardiac transplantation in humans. Pacing Clin Electrophysiol. 1996 Dec; 19(12 Pt 1):2112–9.
169. Sieurat, P, Roquebrune JP, Grinneiser D, Bourlon F, Elbeze JP, Jourdan J, Dor V. Monitoring and rehabilitation of heterotopic cardiac transplantation patients during the period of convalescence. Arch Mal Coeur Vaiss. 1986 Feb;79(2):210–6.

170. Rowan RA, Billingham ME. Myocardial innervation in long-term heart transplant survivors: a quantitative ultrastructural survey. J Heart Transplant. 1988 Nov-Dec; 7(6):448–52.
171. Quigg RJ, Rocco MB, Gauthier DF, Creager MA, Hartley LH, Colucci WS. Mechanism of the attenuated peak heart rate response to exercise after orthotopic cardiac transplantation. J Am Coll Cardiol. 1989 Aug;14(2):338–44.
172. Givertz MM, Hartley LH, Colucci WS. Long-term sequential changes in exercise capacity and chronotropic responsiveness after cardiac transplantation. Circulation. 1997 Jul 1;96(1):232–7.
173. Bengel FM, Ueberfuhr P, Schiepel N, Nekolla SG, Reichart B, Schwaiger M. Effect of sympathetic reinnervation on cardiac performance after heart transplantation. N Engl J Med. 2001 Sep 6;345(10):731–8.
174. Bengel FM, Ueberfuhr P, Hesse T, Schiepel N, Ziegler SI, Scholz S, Nekolla SG, Reichart B, Schwaiger M. Clinical determinants of ventricular sympathetic reinnervation after orthotopic heart transplantation. Circulation. 2002 Aug 13;106(7):831–5.
175. Huang MH, Ewy GA. Sympathetic reinnervation of the transplanted heart. N Engl J Med. 2001 Dec 27;345(26):1914–5.
176. Ferretti G, Marconi C, Achilli G, Caspani E, Fiocchi R, Mamprin F, Gamba A, Ferrazzi P, Cerretelli P. The heart rate response to exercise and circulating catecholamines in heart transplant recipients. Pflugers Arch. 2002 Jan;443(3):370–6.
177. Sanatani S, Chiu C, Nykanen D, Coles J, West L, Hamilton R. Evolution of heart rate control after transplantation: conduction versus autonomic innervation. Pediatr Cardiol. 2004 Mar-Apr;25(2):113–8.
178. Murphy DA, Thompson GW, Ardell JL, McCraty R, Stevenson RS, Sangalang VE, Cardinal R, Wilkinson M, Craig S, Smith FM, Kingma JG, Armour JA. The heart reinnervates after transplantation. Ann Thorac Surg. 2000 Jun;69(6):1769–81.
179. Cinca J, Rodríguez-Sinovas A. Cardiovascular reflex responses induced by epicardial chemoreceptor stimulation. Cardiovasc Res. 2000 Jan 1;45(1):163–71.
180. Waldmann M, Chen RP, Armour JA. Surgery modifies cardiac sensory transduction. J Thorac Cardiovasc Surg. 2003 Dec;126(6):1792–7.
181. Banner NR, Patel N, Cox AP, Patton HE, Lachno DR, Yacoub MH. Altered sympathoadrenal response to dynamic exercise in cardiac transplant recipients. Cardiovasc Res. 1989 Nov;23(11):965–72.
182. Parent R, Stanley P, Chartrand C. Long-term daily study of blood volume in cardiac autotransplanted dogs. Eur Surg Res. 1987;19(4):193–9.
183. von Scheidt W, Böhm M, Schneider B, Autenrieth G, Erdmann E. Cholinergic baroreflex vasodilatation: defect in heart transplant recipients due to denervation of the ventricular baroreceptor. Am J Cardiol. 1992 Jan 15;69(3):247–52.
184. Rudas L, Pflugfelder PW, Kostuk WJ. Immediate cardiovascular responses to orthostasis in the early and late months after cardiac transplantation. Int J Cardiol. 1993 Feb;38(2):141–50.
185. Mohanty PK, Thames MD, Arrowood JA, Sowers JR, McNamara C, Szentpetery S. Impairment of cardiopulmonary baroreflex after cardiac transplantation in humans. Circulation. 1987 May;75(5):914–21.
186. Jacobsen TN, Lange RA, Olivari MT, Yancy CW, Horn VP, Ring WS, Baldwin BJ, Cooley RA, Victor RG. Differential reflex control of forearm and calf resistance vessels by chemosensitive cardiac afferent activation. J Appl Physiol (1985). 1994 Mar;76(3): 1123–9.

187. Akosah K, Olsovsky M, Mohanty PK. Dobutamine stress-induced angina in patients with denervated cardiac transplants. Clinical and angiographic correlates. Chest. 1995 Sep;108(3):695–700.
188. Stark RP, McGinn AL, Wilson RF. Chest pain in cardiac-transplant recipients. Evidence of sensory reinnervation after cardiac transplantation. N Engl J Med. 1991 Jun 20; 324(25):1791–4.
189. Mohanty PK, Thames MD, Capehart JR, Kawaguchi A, Ballon B, Lower RR. Afferent reinnervation of the autotransplanted heart in dogs. J Am Coll Cardiol. 1986 Feb; 7(2):414–8.
190. Waxman MB, Cameron DA, Wald RW. Role of ventricular vagal afferents in the vasovagal reaction. J Am Coll Cardiol. 1993 Apr;21(5):1138-41.
191. Arrowood JA, Goudreau E, Minisi AJ, Davis AB, Mohanty PK. Evidence against reinnervation of cardiac vagal afferents after human orthotopic cardiac transplantation. Circulation. 1995 Aug 1;92(3):402–8.
192. Arora RC, Ardell JL, Armour JA. Cardiac Denervation and Cardiac Function. Curr Interv Cardiol Rep. 2000 Aug;2(3):188–95.
193. Nguyen DHH. Mechanosensory Silence During Cardiac Stress. Compr Physiol. 2026 Apr;16(2):e70122.
194. Foreman RD, Garrett KM, Blair RW. Mechanisms of cardiac pain. Compr Physiol. 2015 Apr;5(2):929–60.
195. Pan HL, Longhurst JC, Eisenach JC, Chen SR. Role of protons in activation of cardiac sympathetic C-fibre afferents during ischaemia in cats. J Physiol. 1999 Aug 1;518 (Pt 3)(Pt 3):857–66.
196. Pan HL, Chen SR. Myocardial ischemia recruits mechanically insensitive cardiac sympathetic afferents in cats. J Neurophysiol. 2002 Feb;87(2):660–8.
197. Wang Y, Jordan D, Ramage AG. Both GABAA and GABAB receptors mediate vagal inhibition in nucleus tractus solitarii neurones in anaesthetized rats. Auton Neurosci. 2010 Jan 15;152(1–2):75–83.
198. Page AJ, Blackshaw LA. GABA(B) receptors inhibit mechanosensitivity of primary afferent endings. J Neurosci. 1999 Oct 1;19(19):8597–602.
199. Kumamoto E. Inhibition of Fast Nerve Conduction Produced by Analgesics and Analgesic Adjuvants-Possible Involvement in Pain Alleviation. Pharmaceuticals (Basel). 2020 Apr 5;13(4):62.
200. Jiang F, Yin K, Wu K, Zhang M, Wang S, Cheng H, Zhou Z, Xiao B. The mechanosensitive Piezo1 channel mediates heart mechano-chemo transduction. Nat Commun. 2021 Feb 8;12(1):869.
201. Mifflin SW, Felder RB. Synaptic mechanisms regulating cardiovascular afferent inputs to solitary tract nucleus. Am J Physiol. 1990 Sep;259(3 Pt 2):H653–61.
202. Guo ZL, Longhurst JC, Tjen-A-Looi SC, Fu LW. elPBN neurons regulate rVLM activity through elPBN-rVLM projections during activation of cardiac sympathetic afferent nerves. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2016 Aug 1;311(2):R410–25.
203. Guo ZL, Moazzami AR, Longhurst JC. Stimulation of cardiac sympathetic afferents activates glutamatergic neurons in the parabrachial nucleus: relation to neurons containing nNOS. Brain Res. 2005 Aug 16;1053(1–2):97–107.
204. Foreman RD. Mechanisms of cardiac pain. Annu Rev Physiol. 1999;61:143–67.
205. Kapa S, DeSimone CV, Asirvatham SJ. Innervation of the heart: An invisible grid within a black box. Trends Cardiovasc Med. 2016 Apr;26(3):245–57.

206. Paul EJ, Kalk E, Tossell K, Irvine EE, Franks NP, Wisden W, Withers DJ, Leiper J, Ungless MA. nNOS-Expressing Neurons in the Ventral Tegmental Area and Substantia Nigra Pars Compacta. eNeuro. 2018 Nov 16;5(5):ENEURO.0381-18.2018.
207. Barber RP, Phelps PE, Houser CR, Crawford GD, Salvaterra PM, Vaughn JE. The morphology and distribution of neurons containing choline acetyltransferase in the adult rat spinal cord: an immunocytochemical study. J Comp Neurol. 1984;1;229(3):329–46.
208. Réthelyi M, Metz CB, Lund PK. Distribution of neurons expressing calcitonin gene-related peptide mRNAs in the brain stem, spinal cord and dorsal root ganglia of rat and guinea-pig. Neuroscience. 1989;29(1):225–39.
209. Weissner W, Winterson BJ, Stuart-Tilley A, Devor M, Bove GM, 2006. Time course of substance P expression in dorsal root ganglia following complete spinal nerve transection. J Comp Neurol. 2006;497(1):78–87.
210. Calzada B, Naves FJ, Del Valle ME, Vega JA. Distribution of protein gene product 9.5 (PGP 9.5) immunoreactivity in the dorsal root ganglia of adult rat. Ann Anat. 1994;176(5):437-41.
211. Al-Fayez MA, Atteya M, Mohamed RA, Ahmed AM, Alroalle AH, Salah Khalil M, Al-Ahmed M, Payne A. Adrenal medulla of AS/AGU rats: a histological and immuno-histochemical study. Folia Morphol (Warsz). 2017;76(1):28–37.
212. Lin Z, Gao N, Hu HZ, Liu S, Gao C, Kim G, Ren J, Xia Y, Peck OC, Wood JD. Immunoreactivity of Hu proteins facilitates identification of myenteric neurones in guinea-pig small intestine. Neurogastroenterol Motil. 2002;14(2):197–204.
213. Karnovsky MJ, Roots L. A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases. J Histochem Cytochem. 1964;12(3):219–21.
214. Pauza DH, Rysevaite-Kyguoliene K, Vismantaite J, Brack KE, Inokaitis H, Pauza AG, Rimasauskaite-Petraitienė V, Pauzaite JI, Pauziene N. A combined acetylcholinesterase and immunohistochemical method for precise anatomical analysis of intrinsic cardiac neural structures. Ann Anat. 2014;196(6):430–40.
215. Pauza DH, Saburkina I, Rysevaite K, Inokaitis H, Jokubauskas M, Jalife J, Pauziene N. Neuroanatomy of the murine cardiac conduction system: a combined stereomicroscopic and fluorescence immunohistochemical study. Auton Neurosci. 2013;176(1–2):32–47.
216. Pauza DH, Rysevaite K, Inokaitis H, Jokubauskas M, Pauza AG, Brack KE, Pauziene N. Innervation of sinoatrial nodal cardiomyocytes in mouse. A combined approach using immunofluorescent and electron microscopy. J Mol Cell Cardiol. 2014;75:188–97.
217. Linden RJ, Kappagoda CT. Atrial receptors. Monogr Physiol Soc. 1982;39:1–363.
218. de Castro F. Towards the sensory nature of the carotid body: hering, de castro and heymansdagger. Front Neuroanat. 2009;3:23.
219. Ciriello J, Hochstenbach SL, Roder S. Central projections of baroreceptor and chemoreceptor afferent fibers in the rat. In: Barraco IRA (Ed.), Nucleus of the solitary tract. CRC Press, Boca Raton, 1994. pp. 35–50.
220. Hirakawa M, Yokoyama T, Yamamoto Y, Saino T. Distribution and morphology of P2X3-immunoreactive subserosal afferent nerve endings in the rat gastric antrum. J Comp Neurol. 2021;529(8):2014–28.
221. Navickaite I, Pauziene N, Pauza DH. Anatomical evidence of non-parasympathetic cardiac nitrergic nerve fibres in rat. J Anat. 2021;238(1):20–35.
222. Leger J, Croll RP, Smith FM. Regional distribution and extrinsic innervation of intrinsic cardiac neurons in the guinea pig. J Comp Neurol. 1999 May 10;407(3):303–17.

223. Ashton JL, Burton RAB, Bub G, Smaill BH, Montgomery JM. Synaptic Plasticity in Cardiac Innervation and Its Potential Role in Atrial Fibrillation. Front Physiol. 2018 Mar 20;9:240.
224. Henning RJ, Feliciano L, Coers CM. Vagal nerve stimulation increases right ventricular contraction and relaxation and heart rate. Cardiovasc Res. 1996 Nov;32(5):846–53.
225. Onkka P, Maskoun W, Rhee KS, Hellyer J, Patel J, Tan J, Chen LS, Vinters HV, Fishbein MC, Chen PS. Sympathetic nerve fibers and ganglia in canine cervical vagus nerves: localization and quantitation. Heart Rhythm. 2013 Apr;10(4):585–91.
226. Cheng Z, Powley TL, Schwaber JS, Doyle FJ 3rd. Projections of the dorsal motor nucleus of the vagus to cardiac ganglia of rat atria: an anterograde tracing study. J Comp Neurol. 1999 Jul 26;410(2):320–41.
227. Paton JF, Boscan P, Pickering AE, Nalivaiko E. The yin and yang of cardiac autonomic control: vago-sympathetic interactions revisited. Brain Res Brain Res Rev. 2005 Nov; 49(3):555–65.
228. Singhal P, Senecal JMM, Nagy JI. Expression of the gap junction protein connexin36 in small intensely fluorescent (SIF) cells in cardiac parasympathetic ganglia of rodents. Neurosci Lett. 2023 Jan 10;793:136989.
229. Seki A, Green HR, Lee TD, Hong L, Tan J, Vinters HV, Chen PS, Fishbein MC. Sympathetic nerve fibers in human cervical and thoracic vagus nerves. Heart Rhythm. 2014 Aug;11(8):1411–7.
230. Kharbanda RK, van der Does WFB, van Staveren LN, Taverne YJHJ, Bogers AJJC, de Groot NMS. Vagus Nerve Stimulation and Atrial Fibrillation: Revealing the Paradox. Neuromodulation. 2022 Apr;25(3):356–65.
231. Kronsteiner B, Carrero-Rojas G, Reissig LF, Moghaddam AS, Schwendt KM, Gerges S, Maierhofer U, Aszmann OC, Pastor AM, Kiss A, Podesser BK, Birkfellner W, Moscato F, Blumer R, Weninger WJ. Characterization, number, and spatial organization of nerve fibers in the human cervical vagus nerve and its superior cardiac branch. Brain Stimul. 2024 May-Jun;17(3):510–24.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Straipsnių, kuriuose buvo paskelbti disertacijos tyrimų rezultatai, sąrašas

1. **Sabeckis I**, Rysevaite-Kyguoliene K, Sabeckiene D, Onashko Y, Pauziene N, Pauza DH. Nitrergic innervation of the cardiac small intensely fluorescent cells in rats. Ann Anat. 2025 Jun;260:152675. doi: 10.1016/j.aanat.2025.152675.
2. **Sabeckis I,** Pauza AG, Rysevaite-Kyguoliene K, Sabeckiene D, Drozdova-Statkeviciene M, Onashko Y, Pauziene N, Pauza DH. Morphologic pattern of nerve endings in the hearts of five mammalian species and humans. Ann Anat. 2026 Apr 23;266:152847.

Mokslinių konferencijų, kuriose buvo paskelbti disertacijos tyrimų rezultatai, sąrašas

1. **Sabeckis I**, Sabeckienė D, Pauža DH. The cardiac neural receptors in Wistar rats. *Health for All: 2023-International Conference Health for All "Rare diseases". LSMU MA Farmacijos fakultetas, Sukilelių 13, Kaunas, Lietuva, 2023 Balandžio 19–20.* Pristatytas žodinis pranešimas.
2. **Sabeckis I**, Pauža AG, Pauža DH. Comparative Anatomy of Submesothelial Neuronal Receptor on Cardiac Ventricles in Some Species of Bats and Rodents. *The 6th international conference "Evolutionary medicine: How evolutionary thinking can contribute to the medical and health sciences" : 18th–21st of June, 2024, Vilnius University, Lithuania*. Pristatytas e-posteris.
3. **Sabeckis I**, Rysevaitė-Kyguolienė K, Pauža DH. Abundance, morphology and innervation of cardiac small intensely fluorescent cells, *11th Baltic Morphology Meeting 13–15 November 2024, Institute of Anatomy and Anthropology (Anatomicum), Rīga Stradiņš University. Abstract Book, 2024-11-13, p. 89–89*. Pristatytas stendinis pranešimas (The best poster prize award).

CURRICULUM VITAE

Name, Surname:	**Ignas Sabeckis**
Address:	A. Mickevičiaus St. 9, LT-44307 Kaunas, Lithuania
E-mail:	ignas.sabeckis@lsmu.lt
Phone:	+370 639 96626

Education

2021–2025	PhD studies of Biology, Lithuanian University of Health Sciences, Faculty of Medicine, Institute of Anatomy
2017–2019	Master's degree, Applied Biotechnology, Vytautas Magnus University
2013–2017	Bachelor's degree, Biotechnology, Vytautas Magnus University

Work experience

2024/09–current	Junior Assistant, Lithuanian University of Health Sciences, Faculty of Medicine, Institute of Anatomy
2021/09–current	Electron microscopy specialist, Lithuanian University of Health Sciences, Faculty of Medicine, Institute of Anatomy
2020/01–2021/09	Head of Electron Microscope Laboratory, University of Health Sciences, Faculty of Medicine, Institute of Anatomy

Projects

2019/05/01– 2022/04/30	The role of neuronal networks in the superior colliculus in rapid recognition of complex images Project: P-MIP-19-138. (Participated as a junior researcher).

Courses

2022/01/06– 2022/03/03	Keeping, care and usage requirements for animals used for scientific and educational purposes, No. PK 27418; (80 h).

Honours and awards

2025/11/13– 2025/11/15	Best Poster Prize award in 11th Baltic Morphology Meeting 13–15 November 2024, Institute of Anatomy and Anthropology (Anatomicum), Rīga Stradiņš University
2018	Winner of the Presidential Scholarship of The Republic of Lithuania

Memberships	Kaunas Region Anatomy Society Lithuanian Society of Morphologists
Languages	Lithuanian (native) English C1/C2 (professional working)

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju visiems, kurie vienaip ar kitaip prisidėjo prie šios disertacijos rengimo ir mane palaikė viso šio kelio metu.

Labiausiai noriu padėkoti savo darbo vadovui prof. dr. Dainiui Haroldui Paužai ne tik už pagalbą vykdant tyrimus, rengiant straipsnius ir rašant disertaciją, bet ir už visuomet skirtą laiką atsakant į man iškilusius klausimus, už moralinį palaikymą bei perduotas gyvenimiškas ir mokslines žinias.

Nuoširdžiai dėkoju Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos, Medicinos fakulteto Anatomijos instituto profesorei Neringai Paužienei už neįkainojamą konsultacijų gausą, palaikymą ir pagalbą vykdant tyrimus.

Taip pat dėkoju Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos, Medicinos fakulteto Anatomijos instituto lektorei, laboratorijos vedėjai dr. Kristinai Rysevaitei Kyguolienei už nuolatinį motyvavimą ir pagalbą ruošiant preparatus.

Nuoširdžiai dėkoju savo žmonai Deimantei Sabeckienei už jos kantrybę, stiprybę ir nuolatinį palaikymą, kurie buvo ypač svarbūs šio darbo rengimo metu, taip pat už rūpinimąsi mūsų sūnumi, kai man tekdavo vakarus praleisti institute.

Dėkoju visiems Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Medicinos fakulteto Anatomijos instituto kolegoms už visokeriopą pagalbą tyrimų metu ir visą palaikymą jų eigoje.

Taip pat dėkoju savo tėvams, sesei bei draugams už palaikymą, tikėjimą manimi, rūpestį ir motyvaciją siekti mokslo.