

Pelės ir žiurkės širdies skilvelių inervacijos neurohistocheminė analizė

Studentė: Ieva Navickaitė

Darbo vadovė: prof. dr. Neringa Paužienė

Įvadas

Šio projekto tema – širdies skilvelių intrakardinės nervų sistemos tyrimas. Tai tiek nacionaliniu, tiek tarptautiniu lygmeniu aktuali tema, kadangi širdies ir kraujagyslių sistemos ligos yra pagrindinė mirties priežastis Lietuvoje bei kitose išsivysčiusiose šalyse. Daugelio jų patogenezei reikšmingi intrakardinės nervų sistemos, kuri yra svarbi širdies ritmo, miokardo laidumo ir susitraukimo jėgos reguliacijai, pokyčiai. Pavyzdžiui, įvykus miokardo infarktui, iš žūstančių kardiomiocitų išsiskyrusios biologiškai aktyvios medžiagos dirgina juntamąsias nervines galūnes ir taip aktyvuojami intrakardiniai refleksai, sužadinama simpatinė nervų sistema, kurios padidėjęs tonusas gali lemti gyvybei pavojingų skilvelinių aritmijų atsiradimą. Darni širdies parasimpatinės bei simpatinės nervų sistemos veikla taip pat svarbi širdies ritmo reguliacijai, kurios sutrikimai gali būti gydomi selektyviai abliuojant arba elektriškai stimuliuojant skilvelių nervines struktūras. Be to, yra sukurta daug transgeninių graužikų linijų – įvairių širdies ir kraujagyslių ligų modelių, padedančių tirti šių patologijų patogenezę, ieškoti naujų diagnostikos bei gydymo metodų. Tokiems tyrimams vystyti bei kardiochirurginėms intervencijoms atlikti yra būtinos išsamios neuroanatominės širdies skilvelių inervacijos žinios. Daugelis iki šiol atliktų mokslinių žmogaus ir eksperimentinių gyvūnų intrakardinės nervų sistemos tyrimų buvo orientuoti į prieširdžių nervinių struktūrų analizę ir tik pavieniai darbai išsamiau tyrė širdies skilvelių inervacijos ypatybes bei neurohistocheminę sudėtį. Tokie tyrimai buvo vykdyti LSMU Medicinos fakulteto Anatomijos institute, kur, ištyrus vidutinio dydžio ir didelių eksperimentiniuose tyrimuose naudojamų gyvūnų (triušio, avies ir kiaulės) širdies skilvelių nervines struktūras, buvo nustatyti tarprūšiniai skirtumai ir, remiantis gautais rezultatais, iškelta hipotezė, jog galimas ryšys tarp skilvelių inervacijos tankumo bei neurohistocheminės charakteristikos ir širdies veiklos parametrų. Siekiant patikrinti šią hipotezę, nuspręsta atlikti mažų laboratorinių gyvūnų – pelės ir žiurkės – skilvelių neuroanatominius tyrimus. Remiantis literatūros duomenimis, panašių darbų, kurie būtų ta pačia metodika analizavę ir lyginę skirtingo dydžio gyvūnų intrakardinės nervų sistemos neurohistochemines savybes bei jų sąryšį su širdies veiklos parametrais, iki šiol nėra atlikta.

Projekto tikslas

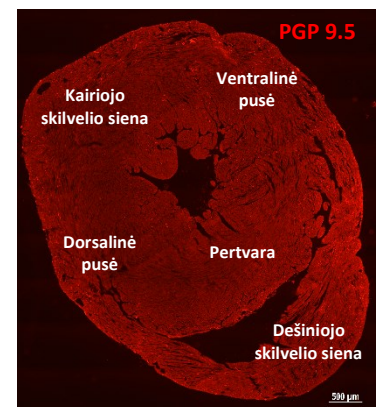
Ištirti pelės ir žiurkės širdies skilvelių inervacijos neurohistocheminę sudėtį

Tyrimo metodika

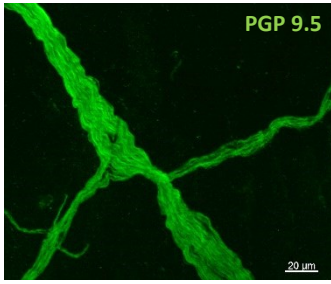
Tyrimui naudojamos suaugusios BALB/c veislės laboratorinės pelės ir Wistar veislės žiurkės.

Širdies skilvelių histologinių pjūvių preparatai

Paruošta medžiaga šaldomuoju mikrotomu supjaustoma 20 μm storio pjūviais ir pagal specialų protokolą atliekamos imunohistocheminės reakcijos, naudojant pirminius antikūnus prieš bendrąjį nervinių struktūrų žymenį proteino geno produktą 9,5 (PGP 9,5), simpatinių (adrenerginių) – tirozino hidroksilazę (TH), juntamųjų – substanciją P (SP) ir su kalcitonino genu susijusį baltymą (CGRP). Preparatai analizuojami bei fotografuojami 20x ir 40x padidinimais fluorescenciniu mikroskopu Zeiss AxioImager Z1. Vaizdų analizė atliekama naudojant AxioVision 4.8.2 programinę įrangą. Epikardinių nervų neurohistocheminė sudėtis kiekybiškai vertinama skaičiuojant išsegmentuotų nervinių skaidulų ploto santykį su rankiniu būdu apriboto nervo skerspjuvio plotu. Miokardinių nervinių skaidulų tankis atsitiktinai pasirinktų miokardo plotų nuotraukose nustatomas skaičiuojant išsegmentuotų skaidulų ploto ir visos nuotraukos ploto santykį.



Pav. 1 Pelės širdies skilvelių pjūvis ties skilvelių pamatine dalimi



Pav. 2 Pelės epikardinis nervas ir jo šakos skilvelių pamatinėje dalyje

Totalūs (angl. whole-mount) širdies skilvelių preparatai

Kairiojo ir dešiniojo skilvelių sienų epikardas disekcinėmis žirklutėmis atskiriamas nuo didžiosios miokardo dalies. Atliekamos imunohistocheminės reakcijos naudojant anksčiau minėtus pirminius antikūnus. Paruošti preparatai analizuojami fluorescenciniu mikroskopu Zeiss AxioImager Z1. Kokybiškai tiriamas epikardinių nervų, neuronų ir mažų intensyviai fluorescuojančių ląstelių (MIF) išsidėstymas širdies skilveliuose. Kiekybiškai vertinamas epikardinių nervų storis pamatinėje, vidurinėje skilvelių dalyje ir širdies viršūnėje.

Projektas finansuojamas Lietuvos mokslo tarybos pagal 2014–2020 metų Europos Sąjungos fondų investicijų veiksmų programos 09.3.3-LMT-K-712 priemonės „Mokslininkų, kitų tyrėjų, studentų mokslinės kompetencijos ugdymas per praktinę mokslinę veiklą“ veiklos „Studentų gebėjimų vykdyti MTEP veiklą ugdymas“ poveiklę „Studentų gebėjimų ugdymas vykdant tyrimus semestro metu“.