

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gunaras Terbetas

**LAZERINIŲ METODŲ PANAUDOJIMAS
TARPSLANKSTELINIO DISKO LIGŲ DIAGNOSTIKAI IR
GYDYMUI**

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, medicina (07B)

Vilnius, 2010

Darbas atliktas 2005-2009 metais Vilniaus Universiteto Medicinos fakulteto Neurologijos ir Neurochirurgijos klinikoje.

Mokslinis vadovas:

Prof. habil. dr. Egidijus Barkauskas (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina- 07B)

Mokslinis konsultantas:

Doc. dr. Aurelija Vaitkuvienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina- 07B)

TURINYS

ĮVADAS.....	4
1. LITERATŪROS APŽVALGA	10
1.1. STUBURAS, STUBURO TARPSLANKSTELINIS DISKAS	10
1.2. TARPSLANKSTELINIO DISKO SANDARA.....	11
1.3. TARPSLANKSTELINIO DISKO DEGENERACIJA	16
1.4. DISKO IŠVARŽOS HISTOGENEZĖ	20
1.5. STUBURO TARPSLANKSTELINIO DISKO DEGENERACIJOS NUSTATYMO METODIKA.....	24
1.6. LAZERIAI MEDICINOJE.....	31
1.7. FLUORESCENCIJOS FENOMENAS.....	35
2. EKSPERIMENTINĖ DALIS	39
TARPSLANKSTELINIO DISKO MĖGINIŲ FLUORESCENCIJA.....	39
2.1. NAUJOS METODOLOGIJOS SUKŪRIMAS	40
2.2. EKSPERIMENTINĖS DALIES TYRIMO METODIKA	53
2.3. EKSPERIMENTINĖS DALIES TIRIAMOJI GRUPĖ	57
2.4. EKSPERIMENTINĖS DALIES DARBO REZULTATAI	58
2.5. EKSPERIMENTINĖS DALIES REZULTATŲ APTARIMAS.....	73
3. KLINIKINĖ DARBO DALIS	74
3.2. PLDD OPERACIJA	76
3.3. KLINIKINĖS DALIES REZULTATAI.....	77
3.4. KLINIKINĖS DALIES REZULTATŲ APTARIMAS	78
4. DISERTACIJOS IŠVADOS	80
5. DISERTACIJOS APIBENDRINIMAS.....	81
6. PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	82
Literatūros sąrašas	83
Priedas Nr. 1	92
Priedas Nr. 2.....	93
Priedas Nr. 3.....	96
Priedas Nr. 4.....	99
Priedas Nr. 5.....	100
Priedas Nr. 6.....	101

ĮVADAS

Disertacijos darbo tikslas - panaudojant lazerinę spinduliuotę ištirti degeneruojančio tarpslankstelinio disko struktūros pokyčius ir įvertinti lazerio poveikį gydant tarpslankstelinio disko išvaržą. Darbą sudaro eksperimentinė dalis - spektroskopinis tarpslankstelinio disko medžiagos tyrimas po apšvietos UV lazeriu ir klinikinė dalis – ligonių disko išvaržų gydymas lazeriu - perkutaninė lazerinė disko dekompresija (PLDD). Iš Lietuvos bioetikos komiteto buvo gautas leidimas atlikti biomedicininį tyrimą.

Nugaros skausmai yra viena dažniausių priežasčių, sąlygojančių darbingo amžiaus žmonių nedarbingumą išsivysčiusiose šalyse. Nugaros skausmų dažnis ir paplitimas išsivysčiusiose šalyse sudaro svarbią epidemiologinę problemą. 80% suaugusiųjų populiacijos patirs bent vieną nugaros skausmų epizodą per gyvenimą, 5% populiacijos vargina lėtiniai nugaros skausmai (Andersson GB, 1999; Deyo RA, 1987; Mooney V, 1987; Shvartzman L, 1992). Yra daugybė nugaros skausmo priežasčių, tačiau manoma, kad stuburo tarpslankstelinio disko degeneraciniai pakitimai yra pagrindinė nugaros skausmų priežastis (Edgar MA, 1976). Mechanizmas, kuriuo tarpslankstelinio disko degeneracija gali sąlygoti apatinės nugaros dalies skausmą dar nėra pilnai išaiškintas, tačiau, manoma, kad nervų galūnėlių įaugimas į degeneruojančio tarpslankstelinio disko plyšimo vietas, disko degeneracijos procesą paverčia skausmingu - prasideda degeneracinė disko liga (DDL) (Ito M, 1998; Saifuddin A, 1998; Moneta GB, 1994). Medžiagų pakitimai tarpslankstelinio disko matricoje bei progresuojantys disko morfologijos pakitimai yra siejami su tarpslankstelinio disko degeneracija (Benneker LM, 2005).

Tarpslankstelinio disko degeneracija yra visą gyvenimą trunkanti disko medžiagų degradacija, sinchroniškai lydima disko remodeliacijos ir gretimų slankstelių pakitimų, leidžiančių prisitaikyti prie kintančių aplinkos apkrovų. Stuburo tarpslankstelinio disko degeneracija yra ilgai trunkantis, laike kintantis ir negrįžtamas procesas, prasidedantis vaikystės ir trunkantis iki gilios senatvės. (Battie MC, 2006).

Vidutinio amžiaus žmonėms, dėl disko degeneracijos gali atsirasti tarpslankstelinio disko išvarža. Stuburo tarpslankstelinio disko išvarža, tai tarpslankstelinio disko medžiaga, atitrūkusi nuo tarpslankstelinio disko ir migravusi į nugaros smegenų kanalą. Disko išvaržą sudaro $\frac{1}{3}$ atvejų: minkštasis branduolys, $\frac{1}{3}$ - minkštojo branduolio ir sausgyslinio žiedo derinys; $\frac{1}{3}$ atvejų- sausgyslinio žiedo elementai (Yasuma T, 1986). Minėti disko audinio fragmentai ir yra šalinami disko išvaržos operacijos metu. Disko išvarža netik sukelia juosmens skausmus, bet gali suspausti greta esančią nervinę šaknelę, tuomet skausmai iš juosmens išplinta į koją pagal suspaustos nervinės šaknelės eigą- prasideda radikulopatija (Kawakami M, 1998; Wisneski RJ, 1992). Radikulopatinio skausmo paplitimas taipogi dažnas, registruojami 5 atvejai 1000 gyventojų per metus (Anderson GBJ, 1997). Radikulopatinio skausmo patofiziologiniai mechanizmai nėra iki galo išaiškinti. Svarbūs du patologiniai faktoriai: mechaninis nervinės šaknelės suspaudimas ir cheminis nervinės šaknelės dirginimas tarpslankstelinio disko minkštojo branduolio medžiagomis (Haro H, 1996; Olmarker K, 1993). Nervinės šaknelės suspaudimas koreliuoja su skausmu ir neurologinių funkcijų sutrikimu šaknelės inervuojamame dermatome (Olmarker K, 1991). Disko išvarža yra tik vienas, iš visų gyvenimą trunkančių, disko degeneracijos etapų. Dauguma disko išvaržas turinčių pacientų sveiksta taikant konservatyvų gydymą. Jei konservatyvus gydymas nesukelia pagerėjimo, pacientus tenka operuoti. Klinikinėje darbo dalyje pristatome naują Lietuvoje disko išvaržos chirurginio gydymo būdą- Perkutatinę Lazerinę Disko Dekompresiją (PLDD).

Disko degeneracijai nustatyti ir įvertinti pasiūlyta daugybė metodų. Tiksliausias disko degeneracijos įvertinimas yra patomorfologinis, kuomet makroskopiškai vertinamas gretimų slankstelių ir tarpslankstelinio disko skerspjūvis. Šis metodas yra ir patikimas, ir esant reikalui kartotinas, tačiau taikytinas tik tiriant lavono audinius, negali būti taikomas klinikinėje praktikoje (Thompson JP, 1990). Biocheminiai disko degeneracijos vertinimo metodai taip pat yra priimtini ir sėkmingai taikomi moksliniuose tyrimuose. Šie metodai gerai koreliuoja tarpusavyje ir yra naudojami moksliniuose

tyrimuose, kur tiriamas lavono audinys, bet jų klinikinė nauda yra ribota, diagnostikai įprastai naudojamos neinvazinės tarpslankstelinio disko degeneracijos nustatymo sistemos (Benneker LM, 2005; Salminen JJ, 1999), pvz.: magnetinio rezonanso tomografija (MRT), rentgeno nuotraukos. Klinikinėje praktikoje taikomi disko degeneracijos vertinimo metodai koreliuoja tarpusavyje, bet negali išskirti konkrečių tarpslankstelinio disko degeneracijos stadijų audinio lygmenyje (Horton WC, 1992), todėl eksperimentinėje darbo dalyje pritaikėme spektroskopinį disko degeneracijos vertinimo metodą, kuris galėtų suteikti papildomos informacijos apie tarpslankstelinio disko biocheminę struktūrą.

Eksperimentinė dalis:

Eksperimentinėje darbo dalyje pritaikėme spektroskopinį disko degeneracijos vertinimo metodą, kuris galėtų suteikti papildomos informacijos apie tarpslankstelinio disko matricos biocheminę struktūrą. Ištyrėme stuburo tarpslankstelinio disko išvaržas, disko fragmentus, pašalintus operacijos metu, t.y., medžiagą, kuri savo kilme ir sudėtimi yra artimiausia degeneruojančio disko struktūroms. Šios dalies darbo tikslas buvo spektroskopiškai įvertinus tarpslankstelinio disko išvaržos (disko audinio fragmento) matricos biocheminius kitimus ir jų įtaką disko degeneracijos procesui, gautas fluorescencines kreives palyginti su histologinio tyrimo radiniais ir priešoperaciniais vizualiniais tyrimais (MRT).

Eksperimentinės dalies tyrimo tikslas:

Šios dalies darbo tikslas buvo sukėlus disko medžiagų autofluorescenciją UV lazeriu, spektroskopiškai įvertinti tarpslankstelinio disko išvaržos (disko audinio fragmento) matricos biocheminius kitimus ir jų įtaką disko degeneracijos procesui. Palyginti gautas fluorescencinio spektro kreives su

histocheminio tyrimo radiniais ir priešoperaciniais vizualiniais tyrimais (MRT) bei įvertinti šių duomenų pritaikomumą rutininei klinikinei praktikai.

Ekspimentinės darbo dalies uždaviniai:

1. sukurti metodą tarpslankstelinio disko medžiagos spektroskopiniams tyrimams;
2. išmatuoti tarpslankstelinio disko bandinių fluorescencinius spektrus spektrometru, charakterizuoti, išanalizuoti ir atskirti būdingiausius spektrus visiems tarpslanksteliniais diskams, bei nustatyti spektro kitimus, priklausomus nuo biocheminės disko matricos sudėties;
3. surinkti skirtingų lokalizacijų disko fragmentų mėginius iš operuojamų ligonių, ištirti juos pagal unifikotą metodiką, lyginti fluorescencinius duomenis su MRT ir histocheminio tyrimų duomenimis bei įvertinti atliktų tyrimų pritaikomumą intradiskinių procedūrų metu klinikinėje praktikoje.

Klinikinė dalis:

Klinikinėje šio darbo dalyje, pirmą kartą Lietuvoje, pritaikėme naują minimaliai invazyvų būdą disko išvaržos gydymui lazerio spinduliu-Perkutaninę Lazerinę Disko Dekompresiją. Nustatėme indikacijas šiai lazerinei operacijai ir atrinkome pacientų grupę, atlikome operacijas, įvertinome priešoperacinius pokyčius ir sekėme pooperacinę ligonių būklę.

Klinikinės darbo dalies uždaviniai:

4. sukurti klinikinę bazę Perkutaninei Lazerinei Disko Dekompresijai (PLDD), įvertinti indikacijas, kontraindikacijas šiai operacijai.
5. atrinkti ligonius, tinkamus šiai operacijai, atlikti operacijas, įvertinti ligonių būklę prieš operaciją ir po operacijos. Įvertinti PLDD efektyvumą, pritaikymo

galimybes.

Tyrimo privalumas ir naujumas:

Tyrimė išsamiai išnagrėnėjome biocheminius, struktūrinius ir histocheminius tarpšlankstelinio disko jungiamojo audinio matricos degeneracijos kitimus. Pirmą kartą panaudojome spektroskopinį tyrimą degeneruojančio disko matricos fluorescencijos kreivėms gauti ir biocheminiams disko matricos kitimams vertinti. Sukūrėme metodą tarpšlankstelinio disko paruošimui ir ištyrimui šaldomuosiuose disko pjūviuose. Pirmą kartą nustatėme tarpšlankstelinio disko autofluorescencijos spektrus, sužadinus tarpšlankstelinį diską ultravioletinės šviesos lazeriu. Atlikome gautų spektrų analizę ir juos palyginome su histocheminėmis tarpšlankstelinio disko matricos charakteristikomis.

Klinikinėje darbo dalyje pirmą kartą Lietuvoje atlikome lazerinę tarpšlankstelinio disko išvaržos operaciją, nustatėme indikacijas ir kontraindikacijas šiai operacijai ir surinkome pacientų grupę, bei išanalizavome gydymo rezultatus.

Ginamieji teiginiai:

1. Ultravioletiniu spinduliavimu sužadinus tarpšlankstelinio disko medžiagą, sukeliama disko matricos autofluorescencija.
2. Tarpšlankstelinio disko autofluorescencijos fenomenas rodo medžiagas, sudarančias tarpšlankstelinio disko matricą.
3. Nustačius tarpšlankstelinio disko autofluorescencijos spektrus, galima spręsti apie tarpšlankstelinio disko biocheminius kitimus, būdingus disko degeneracijos procesui.
4. Ligoniai, kurių MRT rodo nervinės šaknelės pasislinkimą ar kontaktą su disko išvarža turėtų būti operuojami minimaliai invazyvine perkutanine lazerine disko dekompresija (PLDD). Ligoniai, kurių MRT rodo nervinės

šaknelės kompresiją ar kurių išvarža yra pratrūkusi, turėtų būti operuojami atviru būdu.

Darbas atliktas 2005-2009 metais Vilniaus Universiteto Medicinos fakulteto Neurologijos ir Neurochirurgijos klinikoje, bendradarbiaujant su VU Taikomųjų Mokslų Instituto pažangių technologijų skyriumi ir VU Eksperimentinės ir Klinikinės Medicinos Instituto eksperimentinių tyrimų skyriumi. Iš Lietuvos bioetikos komiteto buvo gautas leidimas atlikti biomedicininį tyrimą.

1. LITERTŪROS APŽVALGA

1.1. STUBURAS, STUBURO TARPSLANKSTELINIS DISKAS

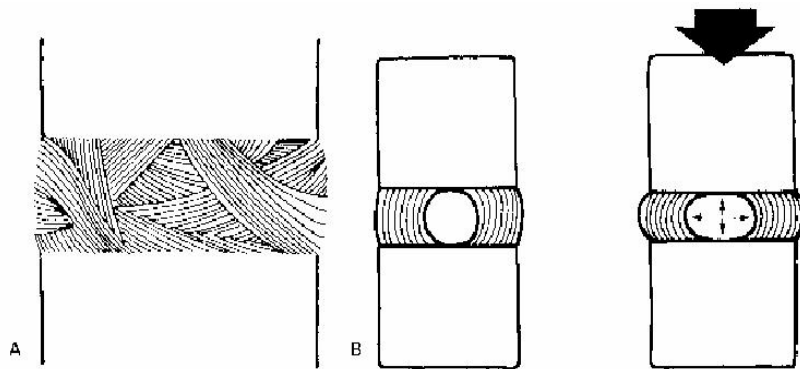
Nugaros judamasis aparatas yra paslanki kietų kaulinių segmentų sistema (kauliniai segmentai - slanksteliai), susstatytų vienas ant kito su tarpikliais (tarpiklis- tarpslankstelinis diskas) ir sutvirtintų išoriniais elementais. Už tokios taisyklingos struktūros palaikymą yra atsakinga tiksli raumenų ir raiščių sistema, kurios dalys tarpusavyje sąveikauja sinergetiniais (kooperaciniais) ir opoziciniais (priešiniais) ryšiais. Tokia sudėtinga kaulų, juos jungiančių raiščių, sąnarių bei raumenų sistema visiškai apsupa ir saugo stuburo kanale esančias nugaros smegenis, tuo pačiu funkcionuoja kaip lankstus pagrindas ir pagrindinė galūnių judėjimo ašis. Trisdešimt trys (trisdešimt keturi) stuburo slanksteliai yra sutvirtinti sudėtingų ryšių ir įterptų kremzlių: 7-ni kaklo, 12-ka krūtinės, 5-ki juosmens, 5-ki kryžmens (suaugę į kryžkaulį) ir 4-5-ki uodegos (suaugę į uodegikaulį). Kiekvienos grupės slanksteliams būdingos savitos ypatybės, kurios skiria juos nuo kitų grupių slankstelių. Jokie du slanksteliai nėra tiksliai vienodi, ir kiekvienas yra specifiskai pakitęs ir prisitaikęs prie savo buvimo aplinkos. Žmogaus stuburą sudaro 23 diskai: 6 kaklo, 12 krūtinės srities ir 5 juosmens srities. Nors visų sričių diskų sandara yra panaši, šiame darbe aptariama juosmeninė stuburo dalis. Juosmeninėje stuburo srityje diskai yra maždaug 7–10 mm pločio ir 4 cm skersmens (Twomey LT, 1987; Roberts S, 2006).

Stuburo tarpslankstelinis diskas yra sudarytas iš skaidulinio fibrozinio žiedo ir gelinio mikštojo branduolio, dengiamas iš abiejų pusių hialininės kremzlės ir sudaro vientisą hermetišką struktūrą, kuri užtikrina stuburo atsparumą spaudimui, o taip pat judesių laisvumą. Diskas tolygiai pasiskirsto ant stuburo slankstelio net tuo atveju, jei stuburas yra spaudžiamas ar, atvirkščiai- tempiamas (Adams MA, 2006).

1.2. TARPSLANKSTELINIO DISKO SANDARA

Tarpslankstelinis diskas sudarytas iš trijų pagrindinių struktūrų: minkštojo branduolio (*nucleus pulposus*), skaidulinio žiedo (*anulus fibrosus*) ir slankstelio galinių plokštelių. Disko centre yra gelinės struktūros minkštasis branduolys, kurį lateraliai supa daug kolageno savo sudėtyje turintis skaidulinis žiedas, bei žemiau ir aukščiau esančios slankstelių galinės plokštelės (Sally Roberts et al., 2006; Urban JPG, 1988).

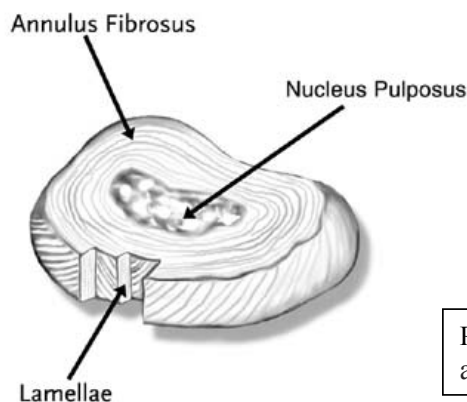
Anulus fibrosus sandara yra labiau pluoštinė-skaidulinė nei minkštojo branduolio. *Anulus* (žiedo) ląstelės yra išstętos ir kaip kolageno skaidulos panašios į fibroblastus (Adams MA, 2006). Taip pat skaidulinio žiedo sandaroje yra daugiau kolageno, bei mažiau vandens lyginant su *nucleus pulposus*. Skaidulinio žiedo funkcija yra “uždaryti” ir talpinti savyje minkštąjį branduolį, kuris yra linkęs iššokti iš *anulus fibrosus* dėl didelio jį veikiančio slėgio (1.1 pav.).



1.1 pav. Tarpslankstelinio disko struktūra (a) ir funkcija (b)

Skaidulinis žiedas geba išlaikyti *nucleus pulposus* dėl jo sandaroje esančių nuo 15 iki 25 koncentrinų kolageno lakštų, plokštelių, vadinamų *lamellae*, suklijuotų tarpusavyje proteoglikanais. *Lamellae* yra tokios formos, kuri leidžia išlaikyti didelio slėgio veikiamą *nucleus pulposus* skaiduliniame žiede (1.2 pav.). Su amžiumi plokštelių organizacija tampa sudėtingesnė vis

labiau išsišakojanti ir sutankėjusi. Išorinę *anulus* dalį papildomai sustiprina išoriniai išilginiai raiščiai (*ligamentum longitudinale anterior et posterior*). Užpakalinis išilginis raištis yra skiriamoji riba tarp disko ir lengvai pažeidžiamų stuburo smegenų, bei nervinių šaknelių.



Pav. 1.2 Tarpslankstelinio disko anatomija

Trečioji funkciškai reikšminga disko struktūra yra slankstelio galinė plokštelė (*vertebral endplate*). Tai plonas ($\frac{3}{4}$ mm), horizontalus hialininės kremzlės sluoksniu (Urban JPG, 1988). Nepaisant pavadinimo, šios plokštelės nėra tiesiogiai prijungtos prie slankstelio kūno, nes galinių plokštelių viduje esančios kolageno skaidulos (išsidėsčiusios horizontaliai ir lygiagrečiai slanksteliui) periferijoje pereina į diską (Roberts S, 2006), tiksliau, į disko *anulus fibrosus* dalį. Dėl šios priežasties galinės plokštelės yra priskiriamos diskui, o ne slanksteliui. Biocheminė galinių plokštelių struktūra yra labai panaši į paties disko: vanduo, proteoglikanai, kolagenai, kremzlinės ląstelės (chondrocitai). Medžiagų išsidėstymo tvarka yra tokia pati kaip ir diske; arčiau plokštelės centro yra daugiau vandens ir proteoglikanų, o išorėje dominuoja kolageno skaidulų pluoštai. Šis medžiagų išsidėstymas leidžia maisto medžiagoms iš subchondrinio kaulo difunduoti į diską. Hialininė kremzlė yra avaskuliari struktūra maitinama difuzijos būdu, nes milžiniškas slėgis tarpslanksteliniam diske sutrikdytų bet kokio kraujagysles turinčio audinio mitybą ir sukeltų nekrozę, tuo tarpu difuzijos būdu maitinamas audinys, gali atlaikyti intradiskinį slėgį. Labiausiai nuo centro nutolęs slankstelio kraštas nėra padengtas galine plokštele, taip kiekvieno slankstelio viršuje ir apačioje

atsiranda vietų kur kaulas nėra apsaugotas. Šios neapsaugotos vietos vadinamos žiedo apofizėmis (*ring apophysis*) dažniausiai formuoja ataugas, kurios siejamos su disko degeneracijos procesu.

1.2.1. TARPSLANKSTELINIO DISKO BIOCHEMINĖ SANDARA

Minkštasis branduolys, skaidulinis žiedas ir galinės plokštelės yra sudarytos iš trijų pagrindinių komponentų: proteoglikanų, kolageno skaidulų ir vandens, tačiau kiekvieno šių komponentų procentinė sudėtis minėtose struktūrose skiriasi. *Anulus* ląstelės, (fibrocitus primenančios ląstelės- *fibrocyte like cell*) reaguodamos į tarpslankstelinio disko deformaciją daugiausiai sintetina tvirtą kolageną I (Pritzker KP, 1977), tuo tarpu *nucleus* ląstelės (chondrocitus primenančios ląstelės, chondroidinės ląstelės- *chondrocyte like cell*), veikiamos hidrostatinio slėgio, sintetuoja kolageno II fibriles ir proteoglikanus (Adams MA, 2006). Pagrindinis minkštojo branduolio komponentas yra vanduo (80 %), kietąją *nucleus* medžiagą sudaro proteoglikanai (65 %), II tipo kolageno skaidulos (17 %) ir nedidelis kiekis elastino skaidulų. Proteoglikanai ir kolagenas II kartu yra vadinamoji branduolio matrica (*nuclear matrix*). Centre esančio *nucleus pulposus* kolageno skaidulos yra organizuotos atsitiktine tvarka (Roberts S, 1989), o elastino skaidulos (kartais siekiančios daugiau nei 150µm ilgi) yra išdėstytos radialiai; šios skaidulos yra įtvirtintos labai hidratuotame, t.y, daug agrekano turinčiame gelyje.

Anulus fibrosus cheminė sandara yra tokia pati kaip ir *Nucleus pulposus*, tik medžiagų proporcijos pasiskirstę kitaip; 65 % vandens, kolagenai I ir II sudaro 55 % sausos *anulus* masės, proteoglikanai (iš kurių net 60 % yra agrekanai) sudaro 20 % sausos *anulus* masės. 10% sausgyslinio žiedo sudaro elastingos skaidulos, kurios yra išsidėstę kontakto vietoje tarp *anulus* ir slankstelio galinių plokštelių bei tarp *lamellae*. *Lamellae* sudaro kolageno I (labai tvirto) ir kolageno II skaidulos. Išorinė *Lamellae* dalis sudaryta beveik vien tik iš I tipo kolageno, judant arčiau *nucleus*, kolageno I kiekis mažėja, o atsiranda vis daugiau kolageno II skaidulų. Egzistuoja kolagenų pasikeitimo

gradientas, judant iš periferijos į centrą, kolageno I koncentracija tolygiai mažėja, kolageno II koncentracija tolygiai auga (Guinot B, 2000). Centrinis sausgyslinio žiedo sluoksnius labai sunku atskirti nuo branduolio, nes tarp jų nėra aiškios skiriamosios ribos.

Proteoglikanai yra labai svarbūs disko funkcionavimui, nes jie yra tas komponentas, kuris sulaiko vandenį disko audinyje, juos gamina ląstelės panašios į chondrocitus. Vanduo yra pagrindinis *anulus*, tiek *nucleus* komponentas (minkštąjį branduolį sudaro 80 % vandens, o skaidulinį žiedą 65 % vandens), o jį diske sulaiko proteoglikanas agrekanas, kuris dėl savo gausios anijoninės glikozaminoglikaninės sandaros (chondroitino sulfato ir keratano sulfato) suriša vandens molekules, suteikia diskui elastiškumo savybę, padedančią priešintis stuburo suspaudimui (Adams MA, 2006; Schmidt MB, 1990). Taigi agrekanas ir yra tikroji diske “vandenį užrakinanti” molekulė. Agrekanai jungiasi į dideles struktūras, vadinamuosius agregatus, kurie suteikia jaunam sveikam diskui stiprumą ir lankstumą. Pažymėtina tai, kad daug vandens turintis diskas yra stipresnė struktūra nei pats stuburo slankstelis. Disko hidratacija taip pat yra labai svarbi diską aprūpinant maisto medžiagomis. Maisto medžiagos difunduoja pro disko audinį, taigi ši difuzija yra žymiai efektyvesnė esant normaliam vandens balansui diske (Grunhagen T, 2006; Ogata K, 1981).

Biocheminė disko analizė identifikuoja molekulinis komponentus ir pateikia daug kiekybinės informacijos, tačiau labai sunku surasti, kur yra išsidėstę šie komponentai disko audiniuose. Šiam tikslui reikia atlikti histocheminius, imunohistocheminius, ar elektroninės mikroskopijos tyrimus. Pavyzdžiui, elastinas sudaro tik 2% sauso sausgyslinio žiedo svorio, taigi akivaizdu, kad šis komponentas nėra vienas pagrindinių disko komponentų. Nepaisant to, elastino indelis disko funkcionavime yra labai didelis, nes jis yra specifiskai lokalizuotas sveikame diske dažniausiai tarp *lamellae* ir kelių kolageno skaidulų, kurios yra išdėstytos statmenai *lamellae*, čia esantis elastinas užtikrina laisvą judesį tarp atskirų plokštelių, tai yra veikia kaip liubrikantas (Yu J, 2005).

Tarpslankstelinį diską sudaro dar daug kitų komponentų, tokių kaip III, V, VI, VII, IX, X, XI, XII ir XIV tipų kolagenai; maži proteoglikanai: lumikanas, biglikanas, dekorinas ir fibromodulinas ir kiti glikoproteinai, tokie kaip fibronektinas ir amiloidas (Roberts S, 1991; Melrose J, 2001). Daugumos šių papildomų matricą sudarančių komponentų funkcijos dar iki šiol neišaiškintos. Manoma, kad kolagenas IX gali būti susijęs su susikryžiovimu tarp kolageno fibrilių formavimu, ir dėl šios savybės kolagenas IX yra svarbus palaikant kolagenų tinklo vientisumą. Matrica yra dinamiška struktūra. Jos molekulės yra skaidomos proteinazėmis, kurias sintetina disko ląstelės: matricos metaloproteinazėmis (MMPs) ir agrekanazėmis (Sztrolovics R, 1997; Roberts S, 2000). Balansas tarp sintezės, skaidymo ir matricos makromolekulių kaupimo nulemia matricos kokybę ir vientisumą, o taip pat mechaninį disko funkcionalumą. Matricos vientisumas taip pat svarbus avaskulinės sveiko disko prigimties išlaikymui.

1.2.2. TARPSLANKSTELINIO DISKO LĄSTELĖS

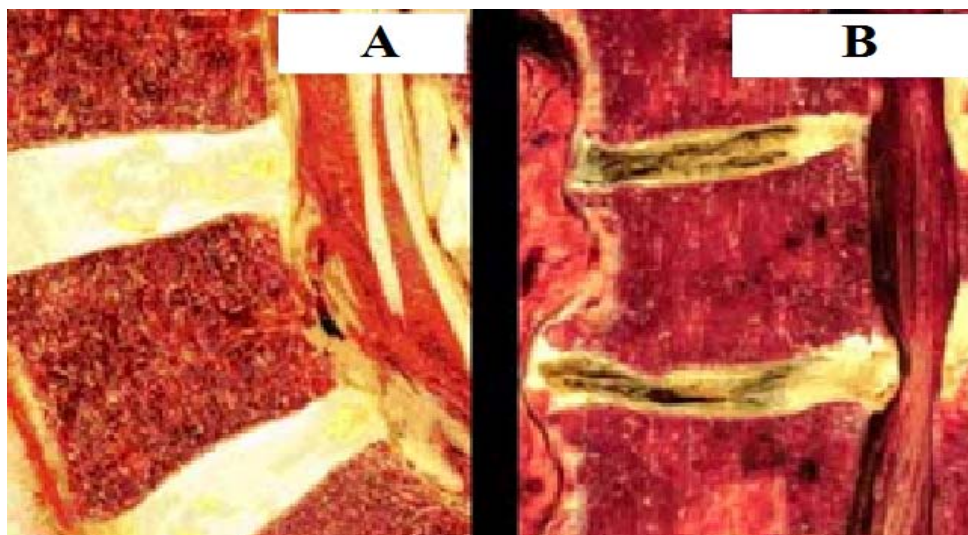
Išorinio žiedo ląstelės yra ištętos ir kaip kolageno skaidulos panašios į fibroblastus. Pradžioje minkštojo branduolio ląstelės yra notochordalinės, o vaikystės metu jos yra laipsniškai pakeičiamos į apvalines ląsteles panašias į chondrocitus sąnario hialininėje kremzlėje (Roberts S, 2006). Stuburui augant, ląstelių tankumas mažėja, o suaugusiam žmogui ląstelės tesudaro 1% disko tūrio, ypatingai praretėja *nucleus* dalis (Chelberg MK, 1995). Toks ląstelinės populiacijos nykimas siejamas su žmogaus vertikalia eiseną. Vaikui atsistojus ant kojų ir pradėjus vaikščioti (apie 2-ry metų), slėgis tarpslanksteliniam diske per trumpą laiką staiga išauga, ląstelės nyksta, nes difuzijos būdu maitinamas audinys negali išmaitinti gausios ląstelinės populiacijos. Ląstelių nykimas 2-ry metų metais sietinas ne su degeneracijos procesu, bet greičiau, su prisitaikymu prie vertikalios eisenos (Adams MA, 2002). Gimusio žmogaus dengiamosios plokštelės sudaro maždaug 50% tarpslankstelinės erdvės (suaugusio žmogaus dengiamosios plokštelės tesudaro 5% disko aukščio) ir turi didelius kraujagyslinius kanalus.

Jauno žmogaus tarpslankstelinis diskas taip pat turi šiek tiek kraujagyslių, kurios yra išsidėčiusios tarp išorinių skaidulinio žiedo plokštelių, penetruoja į diską iki 2mm., kur dažniausiai randami nervai. Greitai po gimimo dengiamosios plokštelės, bei sausgyslinio žiedo kraujagyslių kanalai prisipildo ekstraląsteline matrica ir kraujagyslinių kanalų diske nebelieka jau per pirmąjį gyvenimo dešimtmetį. Dėl šios priežasties suaugusio individo tarpslankstelinis diskas dažnai yra vadinamas didžiausiu avaskuliniu audiniu žmogaus kūne (Roberts S, 2006), diskas neturi tiesioginio kraujotakos šaltinio. Suaugusiųjų stuburo tarpslankstelinuose diskuose kraujagyslės dažniausiai išsidėsto siaurame išorinio žiedo (*anulus fibrosus*) sluoksnyje, ir subchondrinėje plokštelėje, kuri guli iškart po galine hialinine plokštele. Metabolitų ir maisto medžiagų transportas vyksta visų pirma dėl difuzijos, tai yra svarbu mažoms molekulėms, o kita metabolizmo grandis - gelinė disko struktūra (svarbus takumas), ji svarbi stambių molekulių judėjimui. (Grunhagen T, 2006). Avaskulinė disko audinių prigimtis lemia disko ląstelių medžiagų apykaitos būdą. Energetinis ląstelių metabolizmas daugiausia vyksta dėl glikolizės, todėl tam, kad būtų galima palaikyti aukštą pieno rūgšties lygį disko ląstelėms yra reikalinga gliukozė. Deguonis yra taip pat būtinas elementas ląstelių gyvybingumui palaikyti, o jo utilizacijos kelias yra iki šiol neišaiškintas. Dėl to, kad disko audiniai yra avaskuliarūs, disko ląstelės yra priklausomos nuo disko aplinkos struktūrų kraujo aprūpinimo. Vystantis subchondrinei sklerozei (spongiozinio kaulo, esančio iškart po hialinine kremzle sutankėjimui) kraujo pristatymas sutrinka, blogėja disko ląstelių mityba, sutrinka ir kolagenų sintezė (Grunhagen T, 2006).

1.3. TARPSLANKSTELINIO DISKO DEGENERACIJA

Tarpslankstelinio disko degeneracija yra visą gyvenimą trunkanti disko medžiagų degradacija, sinchroniškai lydima disko remodeliacijos ir gretimų slankstelių pakitimų, leidžiančių prisitaikyti prie kintančių aplinkos apkrovų. Stuburo tarpslankstelinio disko degeneracija yra ilgai trunkantis, laike kintantis ir negrįžtamas procesas, kuris prasideda vaikystėje ir trunka iki gilios

senatvės.(Pav. 1.3.0)(Battie MC, 2006).



Pav. 1.3.0 Tarpslankstelinio disko degeneracija: A- sveikas tarpslankstelinis diskas; B- degeneravęs tarpslankstelinis diskas

Tradiciškai manoma, kad disko degeneracija prasideda dėl mechaninio poveikio, tačiau dabartiniai tyrimai parodo, kad genetiniai ir biocheminiai mechanizmai gali turėti žymiai didesnę įtaką disko degeneracijai, nei buvo manyta anksčiau. Yra dvi vyraujančio stuburo tarpslankstelinio disko degeneracijos teorijos: ankstesnė teigia, jog diskai tiesiog susidėvi nuo per didelės apkrovos dažnai sportuojant ar dirbant sunkų fizini darbą (Adams MA, 2002), tačiau naujoji teorija teigia, jog tarpslankstelinio disko degeneracija yra apspręsta genetiškai ir gali būti paveldima (Videman T, 1998), todėl yra pradėti įvairūs tyrimai, kurių pagalba galima būtų nustatyti ne tik morfologinius tarpslankstelinio disko degeneracinius pakitimus, bet ir jų genetinius determinantus. Manoma, kad tai gali padėti užkirsti kelią degeneracijai, kuri gresia ateityje.

Disko degeneraciją iš esmės apsprendžia šie faktoriai:

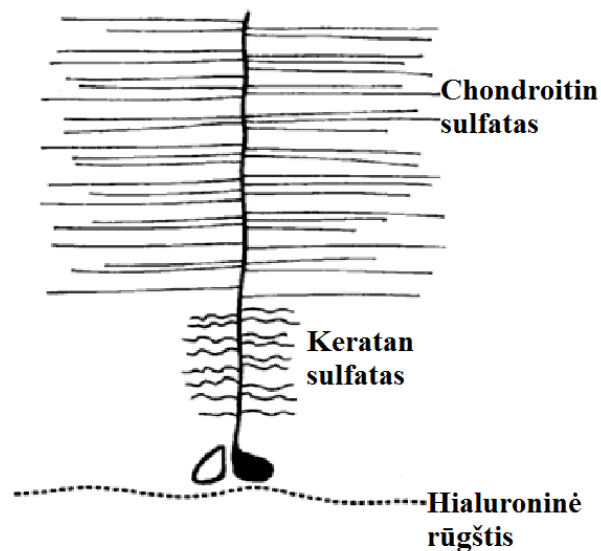
- nebegaminami degeneravę proteoglikanai, nyksta *nucleus pulposus* - mažėja vandens kiekis branduolyje;
- silpsta kolageniniai ryšiai - silpsta *anulus fibrosus* kolageninės plokštelės;

- branduolys sutirštėja;
- žiedas įplyšta;
- gretimų slankstelių judesiai tampa netolygūs, amplitudė pasidaro per didelė - atsiranda segmentinis nestabilumas;
- traumuojamas tarpslankstelinis sąnarys, vystosi jo artrozė, hipertrofija, bei geltonųjų raiščių hipertrofija
- disko aukštis sumažėja, išveša kraštiniai spondilofitai, kurie ilgainiui suauga ir diskas nebetenka judrumo (Adams MA, 2002).

Dažniausiai degeneracija yra nežalinga ir vertinama kaip natūralaus senėjimo proceso dalis, tačiau kai kuriems žmonėms degeneracijos procesas vyksta labai anksti, ir sukelia juosmens skausmus. Toks patologinis disko senėjimas vadinamas degeneracine disko liga (DDL). DDL yra skausminga disko degeneracija (Nachemson AL, 1976; Deyo RA, 2001). Degeneracijos paveiktuose diskuose pastebima padidėjusi vaskuliarizacija ir nervinių galūnėlių įaugimas, tai gali būti lėtinio nugaros skausmo priežastimi (Freemont AJ, 1997). Skausmą DDL atveju sukelia: *anulus* įplyšimai ir nervinių galūnėlių įaugimas į disko įplyšimo vietas, užpakalinių stuburo raiščių pertempimas, tarpslankstelinio sąnario kapsulės tempimas padidėjus disko judesių amplitudei. Disko pasipūtimas, stuburo kanalo susiaurėjimas, sukelia nervinių šaknelių užspaudimą ir šaknelių dirginimo skausmus.

1.3.1. DEGENERUOJANČIO DISKO BIOCHEMINIAI PAKITIMAI

Labiausiai pastebimas biocheminis disko pakitimas, atsirandantis dėl disko degeneracijos, yra proteoglikanų irimas (Lipson SJ, 1981). Degraduojant agrekano molekulėms greičiausiai pasišalina mažesni fragmentai, vėliau didesni (Pav.1.3.1)(Pearce RH, 1987).



Pav. 1.3.1 Disko degeneracijos metu vyksta proteoglikanų degradacija: chondritinsulfato grandinė pakeičiama trumpesne keratansulfato grandine

Proteoglikanų irimas ir vandens netekimas prasideda dar vaikystėje. Šis procesas ypač aktyvus disko *nucleus* srityje. Proteoglikanų kiekio sumažėjimas ir jų kokybės kitimas yra labai ankstyvas disko degeneracijos požymis. Chondritinsulfatas, turintis ilgesnę grandinę yra keičiamas keratansulfatu (Stevens RL, 1982). Proteoglikanų kiekio ir kokybės pokyčiai prasideda žymiai anksčiau, nei atsiranda pirmieji morfologiniai degeneracijos požymiai (disko įplyšimai).

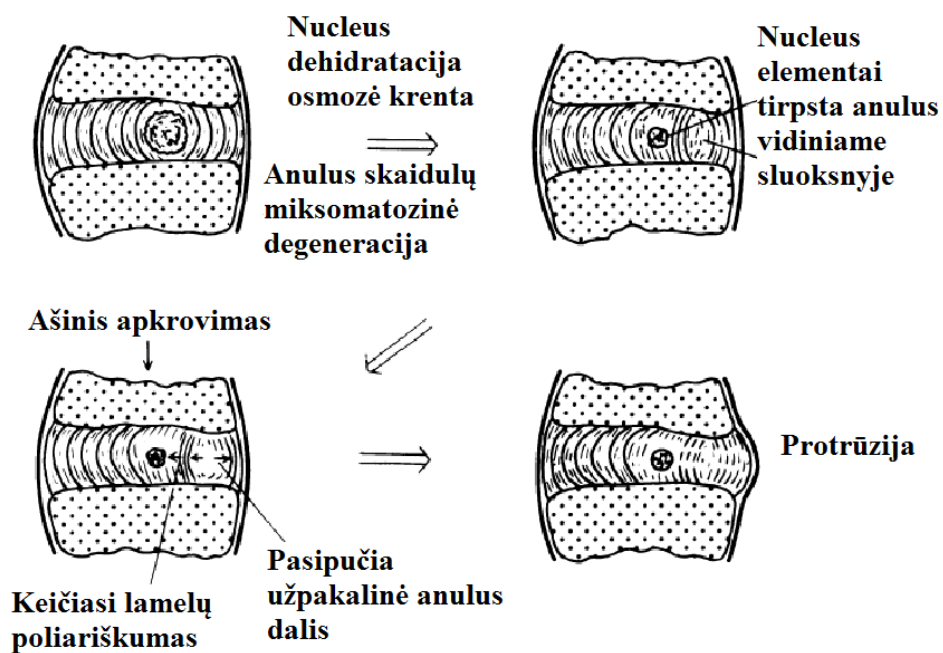
Prarandami glikozaminoglikanai, dėl šios netekties sumažėja matricos osmosinis slėgis, minkštasis branduolys nebetenka vandenį surišančios savybės, diskas dehidratuoja (MRT tyrime stebimas disko signalo sumažėjimas T2 režime). Degeneruojant matricai, kolagenai taip pat kinta, tačiau tas kitimas nėra toks akivaizdus kaip proteoglikanų. Kolageno skaidulų kiekybiniai pokyčiai beveik nežymūs, bet jas sudarančių kolagenų tipai ir pačių skaidulų išsidėstymas degeneracijos metu gali reikšmingai kisti. Diskui degeneruojant, kolagenas II denatūruojasi, matyt dėl fermentinio aktyvumo. Denatūruoto kolageno II daugėja proporcingai disko degeneracijai (Antoniou J, 1998). Senstant organizmui, taip pat atitinkamai daugėja kolageno diske, kolageno II-

ojo skaidulos vidinėje *anulus* dalyje yra pakeičiamos kolageno I-ojo tvirtomis skaidulomis (Takaishi H, 1997). Taigi žiedo ir minkštojo branduolio demarkacija nyksta, substancijos susimaišo (skaidulinio žiedo audiniai pakeičia branduolio audinį), diskas tampa neelastingas.

1.4. DISKO IŠVARŽOS HISTOGENEZĖ

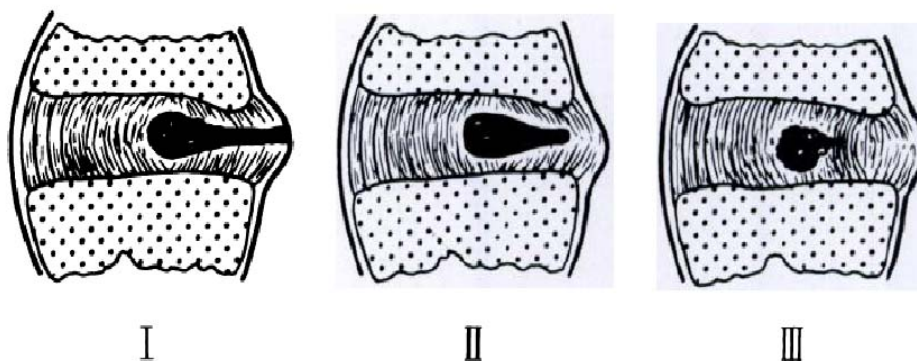
Disko išvaržos pagal savo struktūrą galėtų būti skirstomos į protrūzijas (disko išsipūtimas) ir ekstrūzijas (disko fragmento atplyšimas). Protrūzija- tai disko išsipūtimas, stebimas disko lygyje, kuomet užpakalinis išilginis raištis išlieka nesužalotas (nepratrūkusi disko išvarža). Ekstrūzija- disko fragmentas pakenkia užpakalinį išilginį raištį, kartais pilnai atitrūksta nuo disko ir migruoja į stuburo kanalą (laisvas sekvestras) (Milette PC, 1997). Klasikinę disko išvaržą apibrėžia minkštasis branduolys, migravęs per plyšusį sausgyslinį žiedą, tačiau operacijos metu dauguma šalinamų išvaržų yra kietos konsistencijos (su sausgyslinio žiedo ir galinės plokštelės elementais). Klasikinis disko išvaržos apibrėžimas nepaaiškina sausgyslinio žiedo ir galinės plokštelės radimo disko išvaržos biopsijose (Yasuma T, 1986). Protrūzijos ir ekstrūzijos skiriasi savo histogeneze, bet abu išvaržų tipai yra tiesioginė disko degeneracijos pasekmė (išimtį nebent sudaro išvaržos dėl trauminio galinės plokštelės kremzlės atplyšimo, randamos jauniems pacientams). Kaip jau minėjome, disko išvaržos sudėtis $\frac{1}{3}$ atvejų: minkštasis branduolys, $\frac{1}{3}$ - minkštojo branduolio ir sausgyslinio žiedo derinys; $\frac{1}{3}$ atvejų- sausgyslinio žiedo elementai (Yasuma T, 1986). Disko išvaržos formavimąsi nulemia sausgyslinio žiedo skaidulų denatūracija (sukeliama metaloproteinazių) ir minkštojo branduolio proteoglikanų degradacija. Krentant minkštojo branduolio osmosiniam slėgiui, demarkacija tarp minkštojo branduolio ir sausgyslinio žiedo nyksta, minkštasis branduolys tirpsta vidiniame sausgyslinio žiedo sluoksnyje, *anulus* pluoštinė struktūra brinksta (*lamella* brinksta) ir keičia savo poliariškumą (pav. 1.4.1.)(Yasuma T, 1990). Suteikus tokiam

diskui ašini apkrovimą, visa užpakalinė sausgyslinio žiedo dalis pasislenka į stuburo kanalą, formuojasi protrūzija (Yasuma T, 1986).



Pav.1.4.1. Principinė protrūzijos formavimosi schema (paaiškinimas tekste).

Skiriami trys disko išvaržos formavimosi variantai (pav.1.4.2).



Pav.1.4.2. Trys išvaržos formavimosi histogenezės variantai (paaiškinimas tekste).

Pirmas variantas: kuomet pro sausgyslinio žiedo plyšimą, minkštojo branduolio elementai migruoja link disko periferijos. Tokios išvaržos bus sudarytos tik iš minkštojo branduolio elementų, jos bus minkštos konsistencijos, operacijos metu jos randamos retai, nes dauguma tokių ligonių greitai sveiksta nuo konservatyvaus gydymo. Trečias variantas: kuomet išvaržą sudaro užpakalinė sausgyslinio žiedo dalis, tokia išvarža yra kietos konsistencijos, operacijos metu randama dažnai, nes išvaržos rezorbcija vyksta lėtai, ligonis nesveiksta ir dažnai gydomas chirurgiškai. Antras variantas: mišrus, kuomet protrūzijos fone plyšta sausgyslinis žiedas ir minkštojo branduolio elementai kartu su *anulus* dalimis migruoja link stuburo kanalo (Yasuma T, 1986).

Eksperimentinės dalies tyrime mes radome visus tris išvaržų variantus. Klinikinėje dalyje, lazerinės stuburo operacijos turėtų būti atliekamos tik toms išvaržoms, kurios formuojasi pagal trečią histogenezės variantą.

1.4.1. DISKO IŠVARŽOS NATŪRALI EIGA, INDIKACIJOS OPERACIJAI

Tarpslankstelinio disko išvarža yra dažna juosmens skausmo ir radikulopatinio kojos skausmo priežastis. Juosmens skausmai kyla dėl degeneracinių pakitimų tarpslanksteliniam diske ir yra labai paplitę: 80% suaugusiųjų populiacijos patiria bent vieną juosmens skausmų epizodą per gyvenimą, o 5% populiacijos yra kamuojami lėtinių juosmens skausmų (Shvartzman L, 1992). Radikulopatinio skausmo paplitimas taipogi dažnas, registruojami 5 atvejai 1000 gyventojų per metus (Anderson GBJ, 1997). Radikulopatinio skausmo patofiziologiniai mechanizmai nėra iki galo išaiškinti. Svarbūs du patologiniai faktoriai: mechaninis nervinės šaknelės suspaudimas ir cheminis nervinės šaknelės dirginimas tarpslankstelinio disko minkštojo branduolio medžiagomis (Olmarker K, 1993). Nervinės šaknelės suspaudimas koreliuoja su skausmu ir neurologinių funkcijų sutrikimu šaknelės inervuojamame dermatome (Olmarker K, 1991). Išorinė nervinės šaknelės kompresija trikdo medžiagų

transportą nervinės šaknelės viduje. Daugumoje atvejų tarpslankstelinio disko išvaržos sukeltų simptomų natūrali eiga yra gerybinė dėl disko išvaržos spontaninės rezorbcijos (Teplick JG, 1985; Saal JA, 1990; Mochida K, 1998). Disko išvaržos rezorbcija tiesiogiai koreliuoja su klinikinių simptomų gerėjimu (Saal JA, 1990; Takada E, 2001; Autio RA, 2006). Disko išvaržos rezorbcija vyksta dėl uždegiminės infiltracijos išoriniame išvaržos sluoksnyje (Arai Y, 2000; Doita M, 1996; Ikeda T, 1996), pagrindinės ląstelės, atsakingos už rezorbciją, yra makrofagai (Haro H, 2000; Rothoerl R, 1998; Virri J, 2001). Nustatyta daugybė faktorių, susijusių su disko išvaržos rezorbcija: išvaržos penetracija pro užpakalinį išilginį raištį (Ahn SH, 2000), išvaržos dydis (Komori H, 1996; Delauche-Cavallier MC, 1992), kremzlės ir sausgyslinio žiedo elementų buvimas išvaržos sudėtyje (Carreon LY, 1997; Kokubun S, 1996). Pratrūkusios pro užpakalinį išilginį raištį ir migravusios disko išvaržos (disko sekvestrai) turi didesnę tendenciją rezorbuotis (Ahn SH, 2000; Komori H, 1996), nežiūrint į tai, disko sekvestrai tiesiogiai kontaktuoja ir spaudžia nervines šakneles, todėl gali sukelti išeminius pakitimus nervinėje šaknelėje, ir tuomet neurologinis deficitas tampa negrįžtamas (Kokubun S, 1996). Pacientai, kuriems nustatytas disko sekvestras, turėtų būti atidžiai sekami, jei progresuotų pakenktos šaknelės motorinės funkcijos deficitas, tokie pacientai turėtų būti skubiai operuojami. Nepratrūkusios (subligamentinės) disko išvaržos nesiliečia su sisteminė kraujotaka, jose nekyla uždegiminė makrofagų infiltracija dėl to išvarža mažėja lėtai. Subligamentinės išvaržos mažėjimas siejamas su išvaržos substancijos dehidratacija ir baltymų degeneracija (Saal JA, 1990). Subligamentinės disko išvaržos tiesiogiai nekontaktuoja su nervine šaknele, todėl mažai tikėtina, kad jos sukeltų išeminius šaknelės pakitimus, bet savaiminės rezorbcijos prognozė yra bloga. Dauguma disko išvaržas turinčių pacientų sveiksta taikant konservatyvų gydymą. Jei konservatyvus gydymas nesukelia pagerėjimo, pacientus tenka operuoti.

Kriterijai disko išvaržos chirurginiam gydymui nėra galutinai nustatyti, tebevyksta diskusija apie chirurginio gydymo privalumus ir trūkumus (Greenfield K, 2003; Weber H, 1983; Weinstein JN, 2006). Disko išvaržos

chirurginis gydymas sukelia greitesnį simptomų regresą, leidžia greitesnę reabilitaciją ir greitesnį darbingumo atstatymą, bet sudaro tam tikrą vėlyvų komplikacijų riziką (Gibson JNA, 2007).

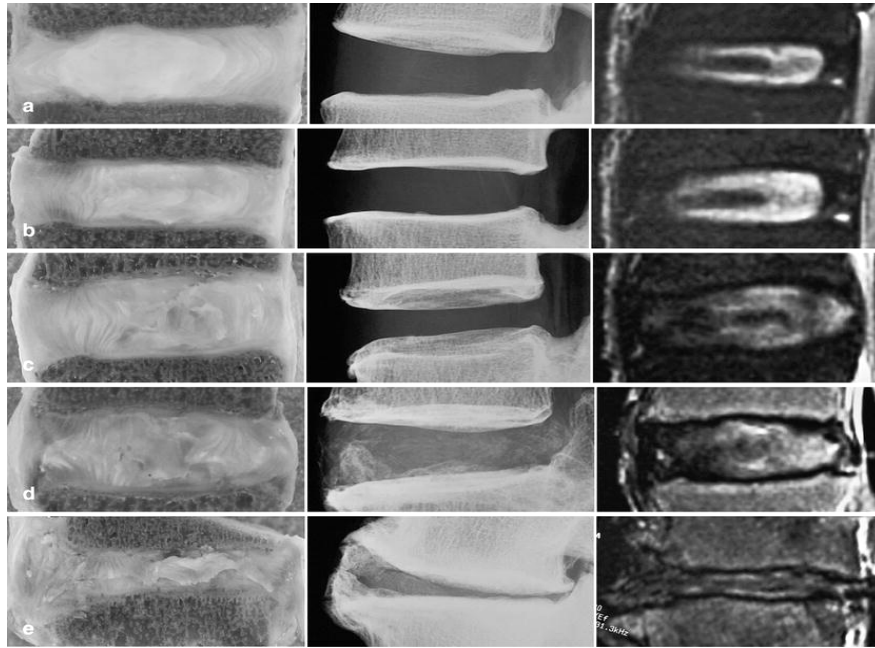
1.5. STUBURO TARPSLANKSTELINIO DISKO DEGENERACIJOS NUSTATYMO METODIKA

Pirmą kartą tarpslankstelinio disko punkcija tiriamaisiais tikslais buvo atlikta Skandinavijoje. Tada Lindblom, 1941m. palygino normalų diską su pažeistu (Lindblom K, 1948). Pirmą kartą rentgenografinius duomenis stuburo išvaržai aptikti Lindblom panaudojo tik 1948m., remdamasis Hirsch darbais (Hirsch C, 1948).

Medžiagų pakitimai matricoje bei progresuojantys disko morfologijos pakitimai yra siejami su tarpslanksteline disko degeneracija (Benneker LM, 2005). Dažniausiai šie pakitimai yra charakterizuojami makroskopiškai (Thompson JP, 1990), histologiškai (Boos N, 2002), ir naudojant daug skirtingų vaizdavimo metodų, tokių kaip rentgenologija (Resnick D, 1985), diskografija (Adams MA, 1986), kompiuterinė tomografija (Fletcher G, 1990) ar magnetinio rezonanso tomografija (MRT) (Yu S, 1989). Visi šie vaizdavimo būdai yra lyginami tarpusavyje, kad optimaliai įvertinti tarpslankstelinio disko degeneracijos lygį. Disko degeneracija turėtų būti graduojama, kad galima būtų nustatyti sąryšį tarp disko morfologijos ir jo klinikinių pakitimų (pavyzdžiui, juosmens skausmo, nestabilumo). Tarpslankstelinio disko pokyčiai gali būti stebimi įvairių modalumų pagalba. Pradinėse disko degeneracijos stadijose, kremzlinės plokštelės struktūra jau kinta ir šios plokštelės tokie pokyčiai kaip sklerozė, Schmorl'io mazgeliai ir kalcifikatai, gali būti nustatomi paprasta rentgenograma ir magnetinio rezonanso metodu (Salminen JJ, 1999). Pirmosios disko degeneracijos stadijos metu vykstantis proteoglikanų ir kolageno II-ojo nykimas gali būti lengvai užfiksuojami (Antonίου J, 1998) magnetinio rezonanso tomografija (MRT), nes magnetinio rezonanso metodika paremta protonų tankio, vandens kiekio ir cheminės protonų aplinkos (Panagiotacopoulos ND, 1987) įvertinimu, t.y., magnetinis rezonansas gali

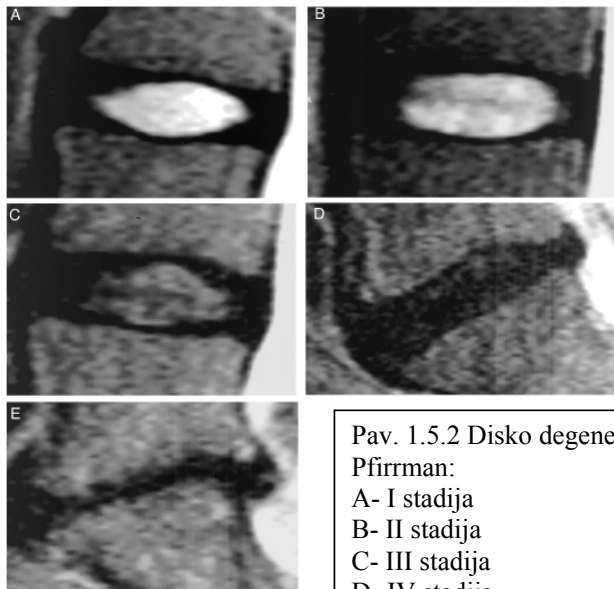
fiksuoti asocijuotą dehidrataciją kaip disko signalo netekimą T2 režime. Šis metodas tiksliausiai vizualiai suklasifikuoja degeneraciją (Tertti M, 1991). Deja, vandens ir proteoglikanų kiekio kitimas visuose trijuose T2 lygiuose nelabai skiriasi tarpusavyje. Žinoma, kad *nucleus pulposus* ryškumas gerai koreliuoja su proteoglikanų koncentracija diske, bet ne su kolagenuose esančiu vandens kiekiu (Pearce RH, 1991). Todėl MRT būdu galima nustatyti tik pirmąsias ligos stadijas. Iš esmės MRT pagalba galima tik nusakyti ar diskas yra visiškai sveikas ar jau pažeistas, šiuo metodu preciziškai išskirti pažaidos stadijas yra sudėtinga. Progresuojantys matricos bei morfologiniai pokyčiai taip pat gali būti stebimi ir rentgenologiškai. Šiuo būdu yra klasifikuojamas disko aukštis, galinės plokštelės sklerozė, osteofitai, Schmorl mazgeliai, intradiskiniai kalcinatai ir galinės plokštelės forma. MRT metodu įvertinamas bendras viso disko vaizdas, o rentgenografiškai yra įvertinamos tik kaulinės struktūros, matomi tik grubūs pakitimai, kuomet diskas yra stipriai pažeistas. Kompiuterinė tomografija (KT) naudojama tik išvaržų diagnostikai, kuomet yra radikulopatiniai skausmai, o pačios disko degeneracijos vertinti negalima, be to KT tyrimas padeda atmesti kitas juosmens skausmo priežastis (trauma, navikas).

Magnetinio rezonanso tomografija (MRT) yra geriausias neinvazinis disko degeneracijos stadijų *in vivo* diagnozavimo būdas. Apjungiant MRT duomenis su rentgenologiniais duomenimis, bei vertinant morfologinius ir biocheminius pokyčius, galima optimaliai įvertinti disko degeneracijos stadiją. Beje, pastebėta, kad rentgenologiniai bei MRT tyrimai, nustatinėjant disko degeneracijos stadijas gerai koreliuoja (pav.1.5.1)(Fletcher G, 1990; Yu S, 1989).



Pav.1.5.1 Makroskopinės (Thompson JP, 1990), rentgenologinės (Resnick D, 1985) ir MRT (Pfirrmann CW, 2001) disko degeneracijos klasifikacijos ir jų koreliacija: a-e degeneracijos stadijos.

Šio tyrimo metu naudojome Christian W. A. Pfirrmann (Pfirrmann CW, 2001) sukurtą disko degeneracijos MRT vertinimo skalę. Skiriamos penkios degeneracijos stadijos (pav.1.5.2).



Pav. 1.5.2 Disko degeneracijos stadijos pagal Pfirrmann:
 A- I stadija
 B- II stadija
 C- III stadija
 D- IV stadija
 E- V stadija

I-a stadija:

Nucleus pulposus yra gelinės struktūros, jo forma ovali arba apvali. *Annulus fibrosus* - atskiros kolageno plokštelės (*lamella*). Galinė plokštelė ištisinės formos, kremzlės storis tolygus. Slankstelio kūnas apvaliais kraštais, be Schmorl išvaržų ar sklerozės požymių.

II-a stadija:

Nucleus pulposus - periferijoje matomas fibrozinis audinys. *Annulus fibrosus* vietoje – mucinis skystis tarp kolageno skaidulų. Subchondrinės plokštelės srityje kremzlė nevientisa.

III-ia stadija:

Fibrozinis audinys *nucleus pulposus*, demarkacija tarp *nucleus* ir *annulus* nyksta. *Nucleus* plokštėja ir išplinta iki *annulus* vidinės dalies. Atsiranda osteofitai, subchondrinė sklerozė. Subchondrinės plokštelės defektai ir koncentriniai žiedo įplyšimai.

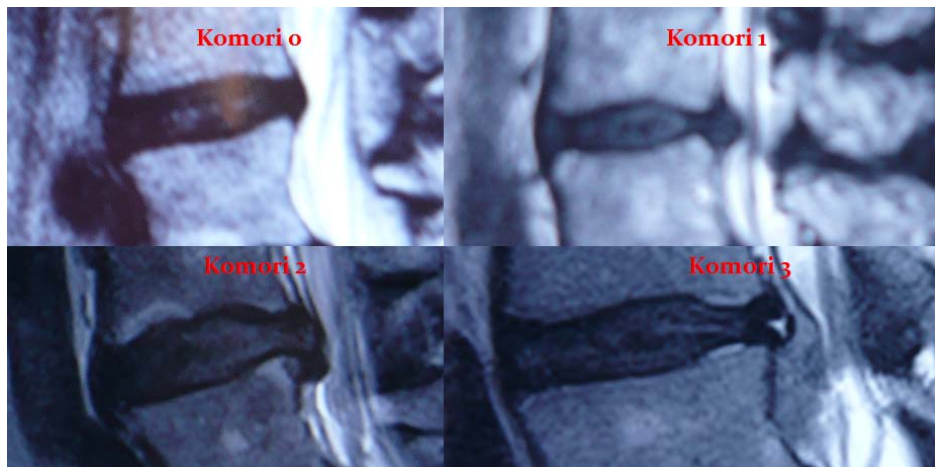
IV-ta stadija:

Makroskopiškai stebimi horizontalūs įplyšimai (lygiagretūs Subchondrinei plokštei). Osteofitai. *Nucleus* medžiaga išplinta iki išorinių *annulus* ribų

V-ta stadija:

Disko aukštis sumažėjęs. *Nucleus* nebėra. Dideli susilieję osteofitai, Schmorl mazgeliai, difuzinė sklerozė ir kalcifikacija.

Siekdami suklasifikuoti disko išvaržas pagal jų atitrūkimą nuo disko ir migraciją, papildomai naudojome Komori klasifikaciją (Komori H, 1996). Komori klasifikacija, naudojama įvertinti, kaip stipriai išvaržos medžiaga yra atitolusi nuo motininio disko, kaip toli migravo disko sekvestras (pav. 1.5.3).



Pav. 1.5.3. Komori disko išvaržos migravimo klasifikacija (Komori H, 1996):
 Komori 0- protrūzija disko lygyje
 Komori 1- ekstrūzija disko lygyje
 Komori 2- ekstrūzija pasislinkusi nuo disko lygio mažiau nei 33% slankstelio aukščio
 Komori 3- sekvestras, pasislinkęs nuo disko lygio daugiau nei 33% slankstelio aukščio.

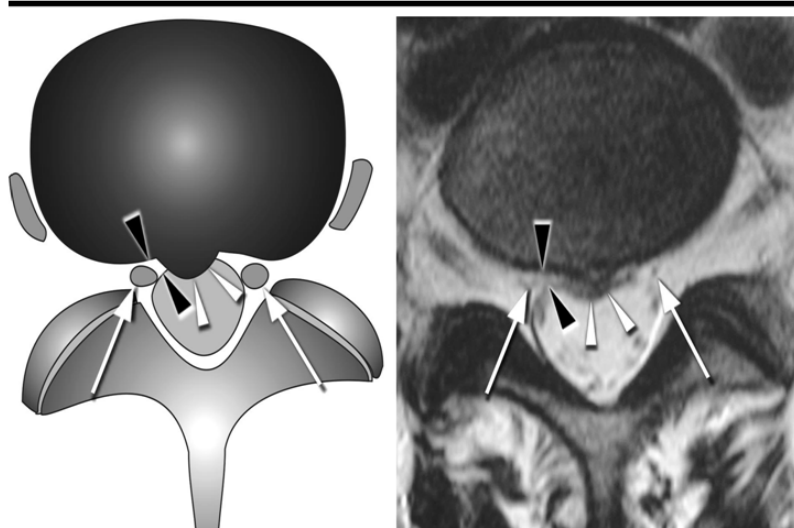
Komori klasifikacija gali būti naudojama klinikinėje praktikoje, kaip prognostinis rodiklis, nes Komori 0-1 išvaržos turi blogą prognozę savaiminei išvaržos rezorbcijai, Komori 2-3, turi geresnę prognozę savaiminei rezorbcijai, nes išvarža būna pažeidusi užpakalinį išilginį raištį ir yra atakuojama makrofagų (Autio RA, 2006).

Ekspirimentinės dalies tyrime mes nustatėme Komori 1- dvidešimčiai ligonių, Komori 2- keturiems ligoniams, Komori 3- penkiems ligoniams. Klinikinėje dalyje, lazerinės stuburo operacijos turėtų būti atliekamos tik toms išvaržoms, kurios klasifikuojamos pagal Komori 0.

Disko išvaržos vertinamos kaip protrūzija ir ekstrūzija neatspindi realaus išvaržos santykio su nervine šaknele. Tokio paties dydžio išvarža vienam pacientui gali būti visiškai asimptominė, o kitam sukelti intensyvią radikulopatiją (Boos N, 1997). MRT aprašymuose akcentuojamas dėmesys į disko išvaros dydį, lokalizaciją ir morfologiją (Fardon DF, 2002). Disko išvaržos poveikis išties priklauso nuo disko išvaržos santykio su nervine šaknele (Porter RW, 1978; Heliövaara M, 1986). Disko išvaržos pagal

nervinės šaknelės suspaudimą gali būti skirstomos į: nekontaktuojančias su nervine šaknele (pav. 1.5.4.), kontaktuojančias su šaknele (pav. 1.5.5.), sukeliančias nervinės šaknelės pasislinkimą (pav.1.5.6.) ir sukeliančias nervinės šaknelės kompresiją (pav.1.5.7.)(Pfirrmann Ch, 2004).

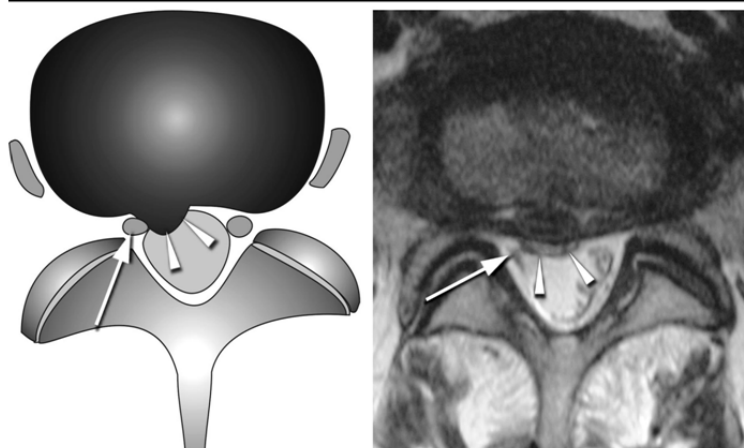
Neliečia šaknelės



Pav.1.5.4. Disko išvarža neliečia nervinės šaknelės (schema ir MRT nuotrauka, baltos strėlės- nervinės šaknelės, balti trikampiai- disko išvarža, juodi trikampiai- išlikęs riebalinis audinys aplink nervinę šaknelę)

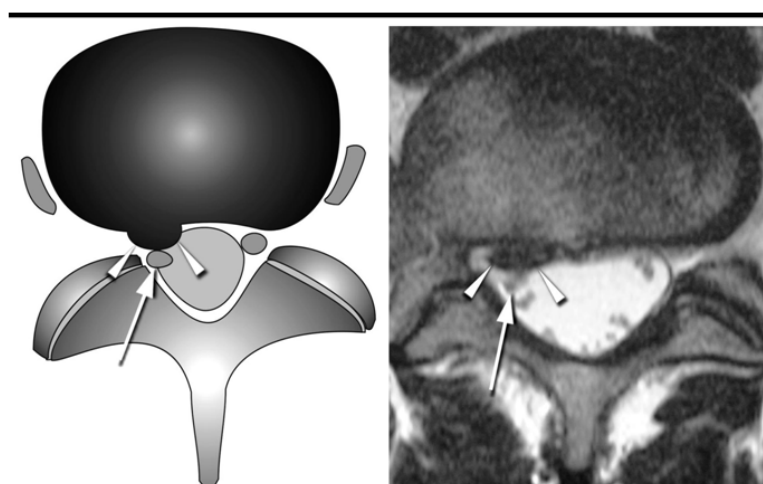
MRT duomenys apie šaknelės ir išvaržos santykį koreliuoja su operacijos radiniais (Pfirrmann Ch, 2004), į juos būtina atsižvelgti pasirenkant gydymo metodą. Išvaržos nekontaktuojančios su nervine šaknele neturėtų būti operuojamos.

Kontaktas su nervine šaknele



Pav.1.5.5. Disko išvarža kontaktuoja su nervine šaknele (schema ir MRT nuotrauka, balta strėlė- nervinė šaknelė, balti trikampiai- disko išvarža, išnykęs riebalinis audinys aplink nervinę šaknelę)

Nervinės šaknelės deviacija

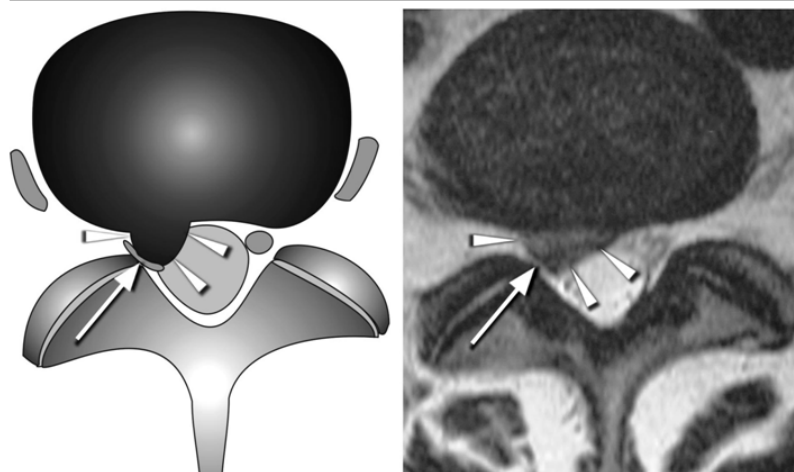


Pav.1.5.6. Disko išvarža sukelia nervinės šaknelės deviaciją (pasislinkimą dorsaliau) (schema ir MRT nuotrauka, balta strėlė- nervinė šaknelė, balti trikampiai- disko išvarža, nesuspausta šaknelė dislokuota dorsaliau lyginant su sveika puse)

Išvaržos kontaktuojančios su nervine šaknele, ar sukeliančios nervinės šaknelės deviaciją gali būti operuojamos lazerine operacija. Išvaržos,

sukeliančios nervinės šaknelės kompresiją turėtų būti operuojamos atvira operacija.

Nervinės šaknelės kompresija



Pav.1.5.7. Disko išvarža sukelia nervinės šaknelės kompresiją (schema ir MRT nuotrauka, balta strėlė- nervinė šaknelė, balti trikampiai- disko išvarža, suspausta tarp išvaržos ir sąnario, šaknelė blogai vizualizuojama MRT)

MRT vaizdas gerai koreliuoja su operacijos radiniais, tačiau MRT vaizdas nekoreliuoja su klinicine ligos išraiška (Rothoel R, 1998). MRT pakitimai neatspindi radikulopatijos intensyvumo. Ligoniai su akivaizdžia nervinės šaknelės kompresija gali neturėti simptomų, o ligoniai su nežymia nervinės šaknelės deviacija gali kentėti nuo intensyvios radikulopatijos. Sprendimą operuoti disko išvaržą nulemia ligos simptomų intensyvumas, o ne MRT pakitimai (Boos N, 1997).

1.6. LAZERIAI MEDICINOJE

Lazeris - tai žemo dažnio kvantinis generatorius, kuris įvairias energijos rūšis priverstinio spinduliavimo pagalba paverčia į optinio diapazono monochromatinės koherentines elektromagnetines bangas. Lazerio spinduliams analogų gamtoje nėra. Tai gamtoje naujas fenomenas. Pagrindinės lazerio spindulių ypatybės yra:

1. Monochromatiškumas, t. y. pastovus kiekvienam lazeriui griežtai apibrėžtas vienos bangos ilgis,
2. Koherentiškumas - visu šviesos bangu fazių sutapimas erdvėje ir laike,
3. Poliariškumas - šviesos bangų skersumas spindulio krypties atžvilgiu. Šios savybės leidžia gauti praktiškai paralelinį šviesos pluoštą, kuris gali būti sufokusuotas į tašką diametru, atitinkančiu spinduliuojamos šviesos bangos ilgį (Karenauskaite V, 2002).

Šviesos monochromatiškumas, kryptingumas ir koherentiškumas, o taip pat didelės šviesos energijos mažuose erdvės ir laiko intervaluose koncentracijos galimybė leidžia selektyviai paveikti biologinius audinius ir parinkti šio poveikio dozę nuo koaguliacijos iki išgarinimo ir praskrodimo (Baltramiejūnas R, 1986).

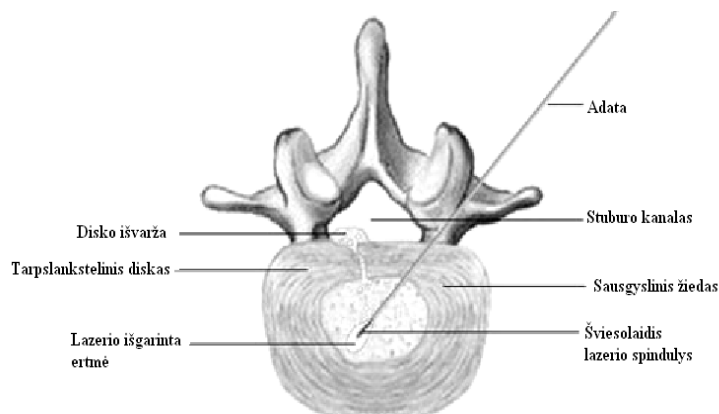
Lazeriai medicinoje pagal galią skirstomi :

- **mažos galios** (iki 5mW). Tokia spinduliuotė inicijuoja fotocheminius vyksmus. Dažniausiai pastebimas biostimuliacinis poveikis. Todėl tokie lazeriai (pvz., He-Ne, GaAl, GaAs) naudojami mažo intensyvumo lazerių terapijoje.
- **vidutinės galios** (nuo 6 iki 500mW). Naudojami diagnostikai (pvz., lazerinė fluorescencinė diagnostika, optinė kompiuterinė tomografija) ir gydymui (fotosensibilizuota terapija).
- **didelės galios** (> 500mW). Pasireiškia fototerminis poveikis – audinių koaguliacija, garinimas ir kiti netiesiniai spinduliuotės sąveikos su biologiniu objektu vyksmai (Rotomskis R, 2007).

Eksperimentinėje dalyje naudotas „Standa“ monolitinis diodais kaupinamas trečios harmonikos lazeris, bangos ilgis 355nm, galia 11mW, 10KHz, pulso ilgis 0,5ns. Klinikinėje dalyje naudotas “Dornier” Diodinis 940nm lazeris, galia 12W, pulso ilgis 500ms

1.6.1. LAZERINĖ DISKO IŠVARŽOS OPERACIJA

Mintis panaudoti lazerio spindulį disko išvaržos gydymui kilo 1980m. Profesorius Choy, po keleto *in vitro* eksperimentų, 1986m. atliko pirmą PLDD žmogui (Choy DSJ, 1992). Iki 2002m. pasaulyje jau atlikta 35000 PLDD procedūrų (Choy DSJ, 2003). PLDD principas pagrįstas teiginiu, kad tarpšlankstelinis diskas yra uždara hidraulinė sistema, susidedanti iš daug vandens turinčio minkštojo branduolio ir netampraus sausgyslinio žiedo. Vandens kiekio padidėjimas minkštajame branduolyje sukelia neproporcingai didelį slėgio kilimą tarpšlanksteliniam diske. *In vitro* eksperimentuose nustatyta, kad suleidus į minkštąjį branduolį 1ml vandens, intradiskinis slėgis pakyla 312 kPa (2340 mm Hg)(Choy DSJ, 1992). Kita vertus, net nedidelis disko tūrio sumažėjimas sukelia ženklų slėgio kritimą tarpšlanksteliniam diske. Esant nepratrūkusiai disko išvaržai radikulopatiniai skausmai kyla dėl disko išvaržos spaudimo į nervinę šaknelę. Disko slėgio kritimas sumažina disko išvaržos spaudimą į nervinę šaknelę, dėl ko radikulopatiniai skausmai rimsta. PLDD metu šis mechanizmas įgyvendinamas panaudojant lazerio spindulį, kuris išgarina nedidelę minkštojo branduolio dalį. Vietinėje neįtaroje, rentgenoskopo kontrolėje, plona adata įduriama į tarpšlankstelinį diską, pro adatą, į diską įvedamas šviesolaidis (pav.1.6.1). Šviesolaidžiu lazerio spindulys nukreipiamas į minkštąjį branduolį. Lazerio spindulys ne tik išgarina vandenį, bet ir pakelia disko temperatūrą, sukelia baltymų denaturaciją, struktūriniai disko baltymai nebetenka savybės surišti vandenį, disko slėgio kritimas tampa ilgalaikis (Choy DSJ, 1992), PLDD efektas taipogi tampa ilgalaikis.



Pav.1.6.1. PLDD operacijos schema (paaiškinimas tekste).

Iki 2006 metų medicininėje spaudoje publikuota šešiolika mokslinių studijų, apžvelgiančių PLDD rezultatus (Schenk B, 2006). Viso įvertintas 1579 pacientų gydymas. Pagrindinis PLDD principas yra panašus visuose publikacijose, operacija atliekama vietinėje nejautroje, nuskausminus odą ir giliau esančius raumenis. Rentgeno aparatu nustatomas reikiamas disko išvaržos lygis, plona adata įduriama į pakenkštą diską, taikoma į disko centrą. Kuomet adata atsiduria reikiamoje vietoje, atliekama dviejų krypčių rentgeno kontrolė, įsitikinama, kad adata nukreipta į disko minkštąjį branduolį (kartais taikoma KT kontrolė). Pro adatos skylutę į disko ertmę įkišamas šviesolaidis ir leidžiamas lazerio spindulys. Lazeris išgarina (vaporizuoja) nedidelį minkštojo branduolio kiekį, aplinkiniai minkštojo branduolio baltymai yra koaguluojami, tai sukelia intradiskinio slėgio kritimą vid. 179 ± 80 kPa (55.6%)(Choy DS, 1995). Nors esminis PLDD principas išliko nekintantis, skyrėsi skirtingų autorių operacijos atlikimo metodika. Dauguma autorių naudojo rentgeno kontrolę adatos įdūrimui į diską, išimtis- (Steiner P, 1998), kur buvo naudojama MRT kontrolė tiek adatos įdūrimui, tiek disko vaporizacijos sekimui. Dvi studijos (Gevargez A, 2000; Gangi A, 1998) papildomai naudojo KT kontrolę, sekė disko vaporizaciją. Autoriai, naudojantys rentgeno kontrolę, sunaudotos lazerinės energijos kiekį apsprendžia iš anksto, tuo tarpu, tiesioginė KT arba MRT kontrolė leidžia individualiai parinkti lazerinės energijos kiekį konkrečiam pacientui, tiesiogiai kontroliuojant disko vaporizacijos efektą. Gydymo sėkmės tikimybė taipogi varijuoja nuo 75% (Ascher PW, 1991) iki 87% (Casper GD, 1996). Dėl nepakankamo gydymo efekto ar atsinaujinusių simptomų teko operuoti nuo 4,4% (Casper GD, 1996) iki 25% (Ascher

PW, 1991) pacientų. Dažniausia nesėkmingo gydymo PLDD priežastis buvo laisvas disko fragmentas, kuris buvo randamas operuojant atvirai.

1.7. FLUORESCENCIJOS FENOMENAS

Optiškai sužadinta molekulė gali prarasti energiją išspinduliuodama šviesą, ir to fotono energija yra lygi energijos skirtumui tarp dviejų šios molekulės lygmenų. Tokios, galinčios efektingai spinduliuoti šviesą molekulės, vadinamos chromoforais. Molekulei sugeriant šviesą, vyksta elektronų šuoliai iš pagrindinės būsenos į sužadintus aukštesnius energetinius lygmenis (S2). Po fotono sugerties, sparčiai vyksta vibracinė (nespindulinė) relaksacija iki S1 lygmens. Fluorescencija paprastai stebima vykstant šuoliams iš sužadinto S1 molekulinio lygmens į pagrindinį lygmenį S0 arba jo virpesinius pakartojimus. Fluorescencijos reiškiniu pagrįstos įvairios medicininės diagnostikos metodikos (Rotomskis R, 2007). Liuminescencija – tai šviesa, spinduliuojama bet kokios medžiagos, dėl jos elektronų grįžimo iš ne terminiu būdu sužadintų būsenų į pagrindines būsenas. Molekulių liuminescencija formaliai yra skirstoma į dvi kategorijas: fluorescenciją ir fosforescenciją, priklausomai nuo sužadintų būsenų prigimties. Fluorescencija yra spinduliuojantis šuolis tarp vienodo daugialypumo molekulės elektroninių būsenų. Paprastai elektronai orbitales užpildo taip, kad energija būtų kuo mažesnė – į kiekvieną orbitale telpa du elektronai su priešingais sukiniiais taip, kad bendras sistemos sukiny būtų lygus nuliui (Hundo taisyklė). Molekulių sužadintose singletinėse būsenose elektronas sužadintoje orbitoje yra suporuotas su antru elektronu pagrindinės būsenos orbitoje (sukiniai priešingi). Todėl elektrono šuolis į pagrindinę būseną yra leistinas (dėl skirtingų sukinių) ir spinduliuotės sparta yra didelė. Fluorescencijos sparta yra apie $10^6 - 10^{10} \text{ s}^{-1}$, o gyvavimo trukmė yra atitinkamai apie 0,1 ns iki 1 μs . Tipinė fluorescencijos trukmė yra apie 10 ns. Fluorescencijos gyvavimo trukmė yra vidutinė laiko trukmė tarp sužadinimo ir relaksavimo (grįžimo) į pagrindinę būseną. Daugumai fluoroforų būdingos subnanosekundinės gyvavimo trukmės (pvz. Kofaktorius redukuotas

nikotinamido adenino dinukleotidas). Taigi, dėl trumpos fluorescencijos trukmės emisijos matavimams reikalinga moderni optika ir elektronika (Lakowicz JR, 2006). Vienas iš plačiausiai žinomų fluoroforų yra chininas, kuris gali būti aptinkamas netgi tonike (gaivusis gėrimas). Jei toniko stiklinę pastatysime prieš saulę, tai atitinkamu kampu galėsime stebėti silpną melsvą atspalvį dėl saulės UV spindulių sužadintos chinino fluorescencijos mėlynoje spektro srityje. Reikia pažymėti, kad 1950 metais buvo sukurtas pirmas pramoninis spektrinis fluorimetras, skirtas chinino fluorescencijai registruoti. Šis įrenginys buvo naudojamas vaistų nuo maliarijos (kurių sudėtyje yra chinino) kontrolei.

Kodėl stebima fluorescencija?

1. Molekulės sugeria iš pagrindinės būsenos apatinio vibracinio lygmens;
2. Molekulės spinduliuoja iš pirmosios sužadintos būsenos apatinio vibracinio lygmens (Kasha taisyklė)

Dalis sužadavimo energijos per vibracinę relaksaciją virsta šiluma, todėl molekulių fluorescencijos juosta sugerties juostos atžvilgiu yra pasislinkusi į mažų energijų pusę. Toks fluorescencijos spektro poslinkis į ilgesnių bangų pusę bei atstumas tarp sugerties ir fluorescencijos spektrų maksimumų vadinamas Stokso poslinkiu. Remiantis Franko Condono principu (teigiančiu, kad dėl didelio branduolių ir elektronų masių skirtumo, elektrono šuolis į sužadintą būseną vyksta taip sparčiai, kad branduoliai nespėja pajudėti) ir Kasha taisyklės gauname veidrodinės simetrijos taisyklę: sugerties ir fluorescencijos spektrai pasižymi veidrodine simetrija, atitinkamai fluorescencijos spektras – tai veidrodinis sugerties spektro atspindys.

1.7.1. BIOLIGINIŲ OBJEKTŲ FLUORESCENCIJA

Fluorescuojančios molekulės vadinamos fluorofortais, yra žinoma tūkstančiai fluoroforų. Fluoroforai gali būti padalinti į dvi pagrindines grupes: vidinius (*intrinsic*) ir išorinius (*extrinsic*) (Lakowicz JR, 2006). Vidiniai fluorofortai dar vadinami natūraliais. Svarbiausi natūralūs fluoroforai yra baltymų aromatinės

amino rūgštys (triptofanas, tirozinas, fenilalaninas), kofaktoriai (redukuotas nikotinamido adenino dinukleotidas, flavinai), struktūriniai baltymai (kolagenas, elastinas), vitaminai (retinolis, piridoksinas, riboflavinai), lipidai (lipofuscinai, ceroidai) ir tetrapirrolai (porfirinai ir chlorofilai). Bet ne visada molekulės fluorescuoja arba jų natūralios fluorescencijos intensyvumas yra labai silpnas. Tada į bandinį įvedamas išorinis specifinis fluoroforas (žymeklis, pvz. danzilchloridas, fluoresceinas, rodominas ir t.t.), kuris suteikia informaciją apie tiriamąją molekulę ir ją supančią aplinką. Audinio fluorescencija dažniausiai apibrėžta ne vienu natūraliu fluoroforu, o keliais. Atpažinti tam tikrą fluoroforą yra sunku, nes fluoroforų fluorescencijos spektrų juostos yra plačios ir tarpusavyje persikloja. Šios problemos sprendimui padeda selektyvus sužadavinimas, kai tam tikram fluoroforui parenkamas specialus sužadavimo bangos ilgis.

1.7.2. TARPSLANKSTELINIO DISKO AUTOFLUORESCENCIJA

Tarpslankstelinis diskas fluorescuoja apšviestas ultravioletinio (UV) spektro šviesa be papildomų iš išorės įvestų fluoroforų- pasižymi autofluorescencijos savybe (Kasten F, 1993). Kolageno, elastino ir kitų skaidulinių baltymų autofluorescencija pirmą kartą pastebėta išradus stiprų UV šviesos šaltinį praeito šimtmečio pradžioje (Hoell T, 2006). Tarpslanksteliniam diske fluorescuoja skirtingų tipų kolagenai, elastinas. Fluorescencija sukeliama apšvietus tarpslankstelinio disko medžiagą UV šviesa. Fluorescencijos emisija stebima plika akimi, regimos šviesos diapazone nuo geltonai-žalios iki mėlynai žalios spalvos. Molekulinis fluorescencijos reiškinys pagrindas yra specifinės aminorūgštys esančios kolageno molekulės sudėtyje (Eyre D, 1984). Visos kolageno molekulės, visuose audiniuose pasižymi fluorescencija, apšvietus UV šviesa. Hemoglobinas slopina fluorescenciją. Stipri absorbcinė hemoglobino molekulės jungtis (taip vadinama Soret jungtis) atsakinga už fluorescencijos slopinimą. Audiniai įsotinti hemoglobinu (raumuo, kaulas, gleivinė) nedemonstruoja fluorescencijos reiškinio, tai taipogi taikytina mėginams,

užterštiems krauju. Tarplankstelinis diskas yra kraujagyslių neturintis, difuzijos būdu maitinamas audinys, todėl fluorescencijos tyrimai jame galimi, jei mėginys yra neužterštas ar išvalytas nuo kraujo. Tarplankstelinio disko proteoglikanai ir skystieji disko komponentai nepasižymi fluorescencijos savybe (Hoell T, 2006).

2. EKSPERIMENTINĖ DALIS

TARPSLANKSTELINIO DISKO MĖGINIŲ FLUORESCENCIJA

Tarpslankstelinio disko autofluorescencijos fenomenas žinomas nuo 1964m. (Kasten F, 1993). Tačiau literatūroje pavyko rasti tik vieną publikaciją, kuri nagrinėtų disko autofluorescencijos diagnostinę vertę ir galimybes pritaikyti praktikoje (Hoell T, 2006). Straipsnio autoriai nagrinėja kaklinio stuburo tarpslankstelinio disko autofluorescenciją, apšviesdami disko medžiagą mikroskope įmontuota ultravioletine lempa. Autofluorescencijos fenomenas minėtame tyrime yra panaudotas ne disko medžiagos analizei, o atskirų disko struktūrų atskyrimui operacijos metu. Straipsnio autoriai neakcentavo galimybės tyrinėti juosmens tarpslankstelinį diską, dėl didelio užterštumo krauju. Mūsų tyrimo tikslas, naudojant autofluorescencijos fenomeną, nustatyti biocheminius juosmeninio tarpslankstelinio disko medžiagos kitimus ir sieti juos su degeneraciniais pakitimais tarpslanksteliniame diske. Tarpslankstelinio disko autofluorescenciją sukelia skirtingų kolagenų molekulės bei elastinas, esantis tarpslanksteliniame diske. Kolagenų santykio pasikeitimas ir kolageno II migracija į disko periferiją, bei kolageno I radimas centrinėje disko dalyje atspindi disko degeneracijos procesą (žr. skyrių 1.3.1. Degeneruojančio disko biocheminiai pakitimai).

Eksperimentinėje darbo dalyje pritaikėme spektroskopinį disko degeneracijos vertinimo metodą, kuris galėtų suteikti papildomos informacijos apie tarpslankstelinio disko matricos biocheminę struktūrą. Ištyrėme stuburo tarpslankstelinio disko išvaržas, disko fragmentus, pašalintus operacijos metu, t.y., medžiagą, kuri savo kilme ir sudėtimi yra artimiausia degeneruojančio disko struktūroms. Šios dalies darbo tikslas buvo spektroskopiškai įvertinus tarpslankstelinio disko išvaržos (disko audinio fragmento) matricos biocheminius kitimus ir jų įtaką disko degeneracijos procesui, gautas fluorescencines kreives palyginti su histologinio tyrimo radiniais ir priešoperaciniais vizualiniais tyrimais (MRT).

Eksperimentinės dalies tyrimo tikslas:

Šio darbo eksperimentinės dalies tikslas- panaudojant lazerinę spinduliuotę, kaip sužadavimo šaltinį, atlikti tarpslankstelinio disko bandinių fluorescencinius tyrimus, įvertinti gautų fluorescencijos spektrų sąryšį su biocheminiais kitimais tarpslanksteliniam diske ir įvertinti šių duomenų pritaikomumą rutininei klinikinei praktikai.

Eksperimentinės darbo dalies uždaviniai:

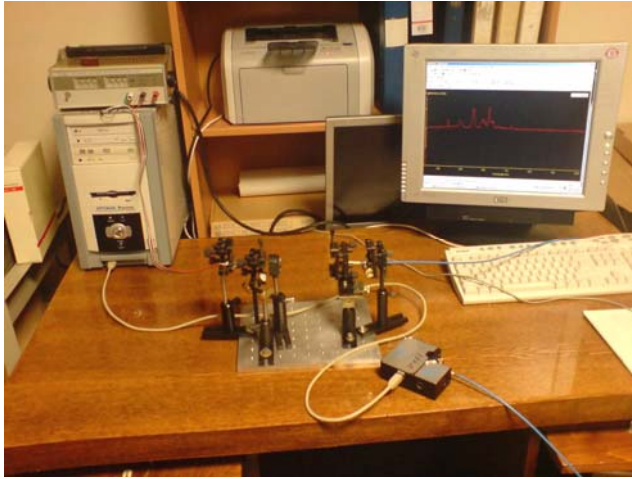
1. sukurti metodą tarpslankstelinio disko medžiagos spektroskopiniams tyrimams;
2. išmatuoti tarpslankstelinio disko matricos bandinių liuminescencinius spektrus spektrometru, charakterizuoti, išanalizuoti ir įvertinti gautus liuminescencinius spektrus, būdingus visiems tarpslanksteliniam diskams ir nustatyti spektro kitimus, priklausomus nuo biocheminės disko matricos sudėties;
3. surinkti skirtingų lokalizacijų disko fragmentų mėginių, iširti juos pagal unifikuotą metodiką, lyginti liuminescencinius duomenis su MRT ir histologinio tyrimo duomenimis bei įvertinti atliktų tyrimų pritaikomumą intradiskinių procedūrų metu klinikinėje praktikoje.

2.1. NAUJOS METODOLOGIJOS SUKŪRIMAS

Vienas iš darbo uždavinių yra sukurti stuburo išvaržų paruošimo, bei jų autofluorescencijos spektrų matavimo metodiką. Ruošiant metodiką reikia atsakyti į svarbiausius klausimus: kokio pavidalo bandiniai turi būti pateikiami eksperimentams, ar bandinių mikrotominių pjūvių spektrai yra artimi natyvių bandinių spektrams, ar kinta tarpslankstelinio disko audinių autofluorescencijos spektrai praėjus laikui ir kokio dydžio mikrotominių bandinių pjūvių reikėtų pasirinkti matavimams. Taipogi ruošiant metodiką reikia parinkti optimalų šviesos šaltinį autofluorescencijai išgauti, nustatyti spektrų nuskaitymo ir analizės parametrus.

Bandiniai pašalinti atviros disko išvaržos operacijos metu. Po operacijos laikyti dezinfekuotuose induose natyvioje formoje, t.y., netalpinti į jokias terpes. Bandinio patalpymas į konservuojančią terpę (pvz.: formaliną) iškraipytų spektrinės analizės rezultatus, nes kartu būtų registruojamas ir terpės spektras. Visi su bandiniu kontaktuojantys daiktai buvo dezinfekuoti, nuriebalinti prieš pradedant bandymą (riebalai ir bet koks kitoks užterštumas iš aplinkos, ypač organinės kilmės, smarkiai paveiktų liuminescencinius spektrus). Prieš pradedant vykdyti eksperimentus, visi bandiniai buvo laikomi šaldytuve +4 °C temperatūroje. Po operacijos, per 48val., buvo nustatyti bandinių autofluorescencijos spektrai žadinant juos skirtingo bangos ilgio žadinančiąja spinduliuote. Buvo tirti natyvūs bandiniai (vientisas disko fragmentas ir vientisas disko fragmentas patalpintas į fiziologinį tirpalą) ir bandinių pjūviai. Bandinių pjūviams paruošti, disko fragmentas buvo užšaldomas iki -20°C ir supjaustomas šaldomuoju mikrotomu - atlikti 5µm, 10µm, 15µm ir 20µm. storio pjūviai ant objektinių stiklelių. Tiriant natyvius bandinius (vientisas disko fragmentas):

1. Pincetu iš indo išimta išvarža uždinama ant stiklo;
2. Stiklas su bandiniu tvirtinamas stacionariame stove;
3. Visi su bandiniu kontaktuojantys daiktai dezinfekuojami, nuriebalinami prieš prasidedant eksperimentui (riebalai ir bet koks kitoks užterštumas paveiktų, t.y., pastumtų tiriamos medžiagos spektrą);
4. Suderinama optinė tyrimo sistema;
5. Lazerio arba diodinio šviestuko šviesa lęšio pagalba sufokusuojama į natyvų bandinį;
6. Spektrometras gali registruoti liuminescencijos šviesą iš bet kokio erdvinio kampo, tačiau tam, kad padidintume santykį signalas/-triukšmas, registravimo sistema statoma taip, kad būtų minimalūs žadinančios šviesos šaltinio atspindžiai nuo tiriamo objekto;
7. Kompiuteriu analizuojame duomenis surinktus spektrometre (pav.2.1.1.).



Pav. 2.1.1 Bandinių liuminescencijos matavimo struktūrinė schema.

Tiriant bandinio pjūvius ($5\mu\text{m}$, $10\mu\text{m}$, $15\mu\text{m}$ ir $20\mu\text{m}$. storio pjūviai):

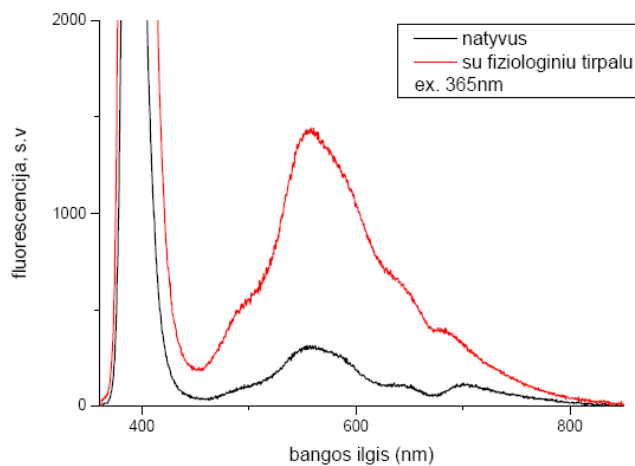
1. Pincetu iš indo išimtas natyvus bandinys dedamas į Leica CM 1100 kriostatą;
2. Nativus bandinys laikomas -20°C temperatūroje maždaug 20min;
3. Sušaldytas bandinys pritvirtinamas mikrotome ir pjaustomas į nustatyto dydžio pjūvius;
4. Pjūvis dedamas ant stiklo ir talpinamas į Petri lėkštelę;
5. Visi su bandiniu kontaktuojantys daiktai dezinfekuojami, nuriebalinami prieš prasidedant eksperimentui;
6. Suderinama optinė tyrimo sistema;
7. Lazero/šviestuko šviesa lęšio pagalba sufokusuojama į pjūvį (pav.2.1.2.);
8. Spektrometras gali registruoti liuminescencijos šviesą iš bet kokio erdvinio kampo, tačiau tam, kad padidintume santykį signalas/-triukšmas, registravimo sistema statoma taip, kad būtų minimalūs žadinančios šviesos šaltinio atspindžiai nuo tiriamo objekto;
9. Kompiuteriu analizuojame duomenis surinktus spektrometre.



Pav. 2.1.2. Bandinių pjūvių fluorescencijos nuotraukos; kairėje, šviečiant 280nm šviestuku, dešinėje, šviečiant 355nm lazeriu.

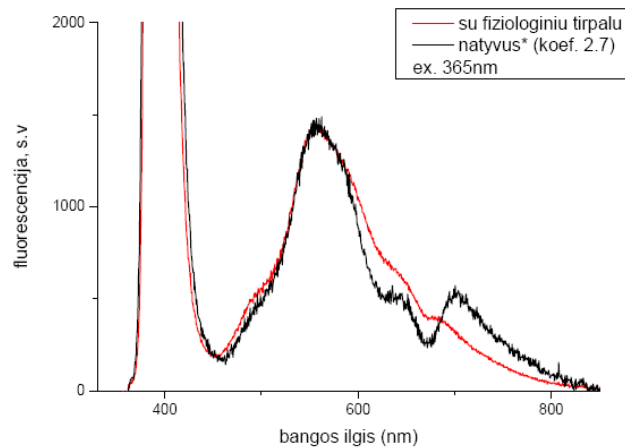
Eksperimento sąlygų parinkimas

Kuriant stuburo išvaržos audinio autofluorescencijos spektrų matavimo metodiką visų pirma reikėjo išsiaiškinti kokio pavidalo bandiniai turi būti pateikiami eksperimentams. Disko išvaržos fragmentai pašalinti operacijos metu buvo laikomi natyvioje formoje arba buvo patalpinami į fiziologinį tirpalą, vėliau abiem atvejais buvo matuojami natyvaus bandinio spektrai (pav.2.1.3; pav.2.1.4):



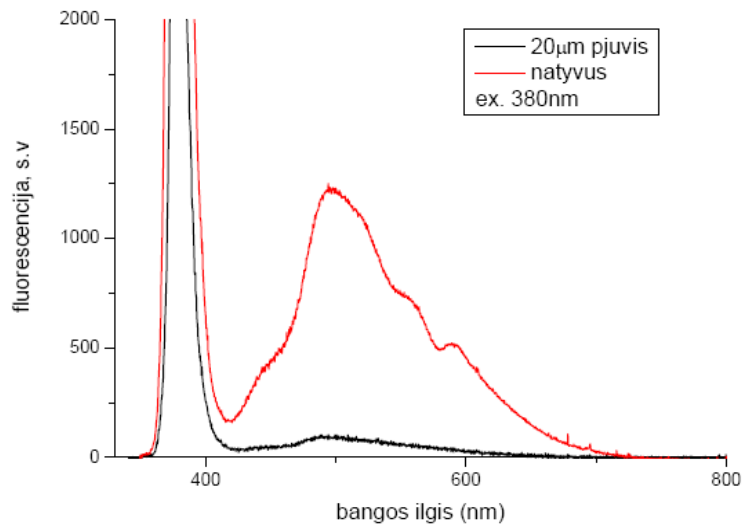
Pav. 2.1.3. Bandinio autofluorescenciniai spektrai gauti žadinant 365nm diodu: raudona spalva pažymėtas bandinio patalpinto fiziologiniame tirpale spektras, juoda spalva pažymėtas natyvaus bandinio spektras.

Iš 2.1.3 ir 2.1.4 paveikslų matyti, kad bandinio patalpinto fiziologiniame tirpale autofluorescencijos spektras yra didesnio intensyvumo, tačiau natyvaus bandinio spektras turi daugiau smailių, kurių dėl fiziologinio tirpalo galbūt nematome. Taigi, tolimesniems eksperimentams yra pasirinkti natyvūs bandiniai.

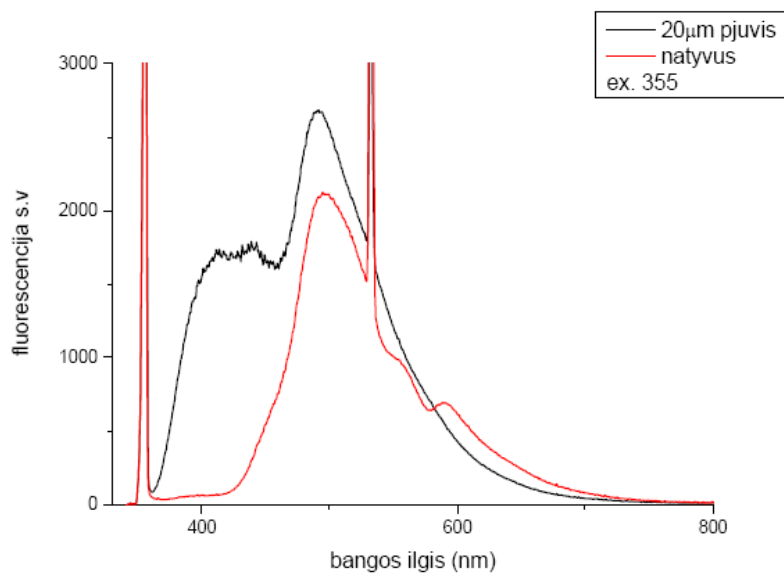


Pav. 2.1.4. Bandinio autofluorescenciniai spektrai gauti žadinant 365nm diodu: raudona spalva pažymėtas bandinio patalpinto fiziologiniame tirpale spektras, juoda spalva pažymėtas natyvaus bandinio spektras, padaugintas iš koeficiento

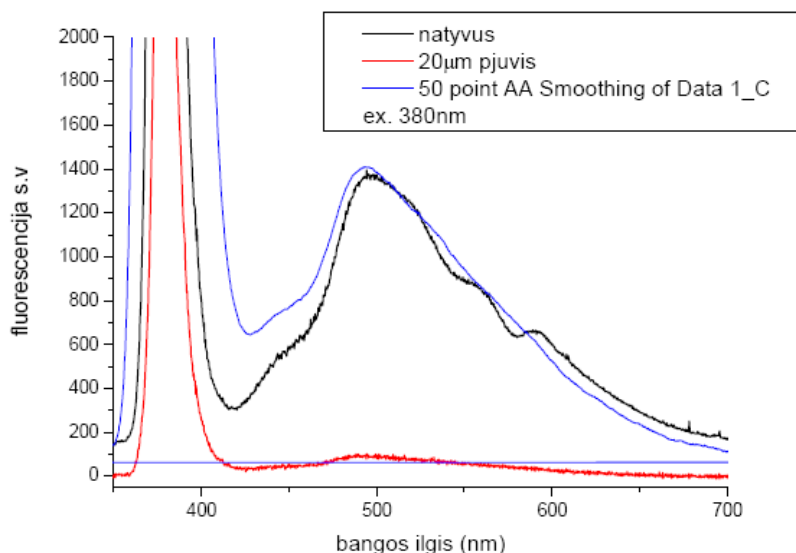
Sekančiame metodikos kūrimo etape siekėme išsiaiškinti ar žadinant natyvaus bandinio mikrotominius pjūvius galima gauti autofluorescencinius spektrus, artimus natyvaus bandinio spektrams (pav.2.1.5; pav.2.1.6; pav.2.1.7.) ir koks šviesos šaltinis fluorescencijai sukelti būtų optimalus tolesniuose tyrimuose.



Pav. 2.1.5. Natyvios formos bandinio (raudona spalva) ir 20µm bandinio (juoda spalva) pjūvio spektrai, žadinant 380nm šviesos diodu.



Pav. 2.1.6. Natyvios formos bandinio (raudona spalva) ir 20µm bandinio (juoda spalva) pjūvio spektrai, žadinant 355nm lazeriu.

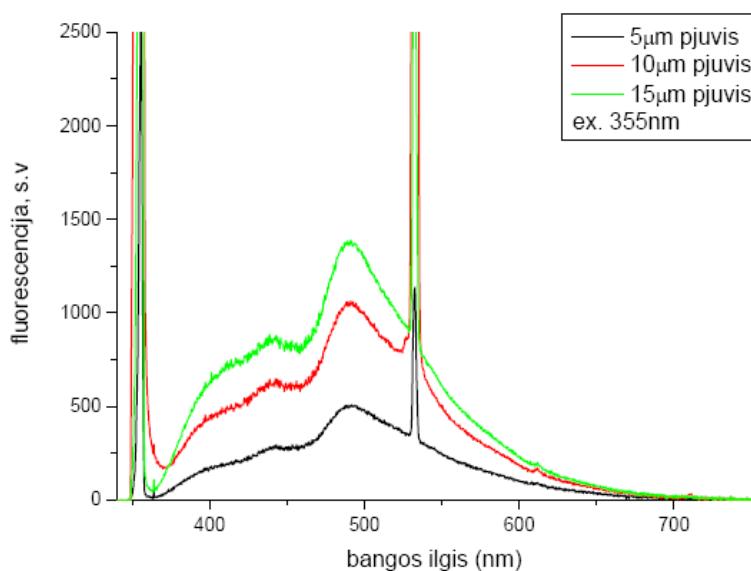


Pav. 2.1.7 pav. Apytikriai sunormuoti natyvaus bandinio ir 20µm pjūvio spektrai.

Iš 2.1.5 paveikslo matyti, kad žadinant bandinio 20µm pjūvį 380nm diodu gaunamas signalas yra mažo intensyvumo; jį sunkiau analizuoti, nei žadintą tuo pačiu diodu, natyvaus bandinio autofluorescencinį spektrą. Tačiau 20µm bandinio pjūvį žadinant 355nm lazerio šviesa (pav. 2.1.6) gaunamas rezultatas yra priešingas, pjūvio autofluorescencijos spektro amplitudė didesnė, nei natyvaus bandinio. Tokį rezultatą gali paaiškinti tai, kad lazerio ir diodo šviesos sklaidimo audiniu savybės skiriasi. Tolesniems tyrimams buvo pasirinktas 355nm lazerio šviesos sužadimas. Kitas lazerio šviesos šaltinio privalumas yra šviesos monochromatiškumas, leidžiantis atskirti šviesos šaltinio signalą nuo fluorescencijos signalo analizuojant spektrus. Apytikriai sunormavus natyvaus bandinio ir pjūvio spektrus (pav.2.1.7.) matyti, kad pagrindinė spektro forma išlieka, tik storame bandinyje esanti struktūra labiau išreikšta, greičiausiai dėl to, kad zonduojamas storesnis bandinio tūris, kuriame yra daugiau skirtingų darinių. Iš spektrų matyti, kad buvo sužadintos labai skirtingos bandinio vietos, o jis šiuo atveju buvo nevienalytis. Siekiant standartizuoti visų disko mėginių ištyrimą, buvo pasirinktas bandinių pjūvių tyrimas, nes standartiniai 20µm bandinių pjūviai turi panašų fluorescuojančių

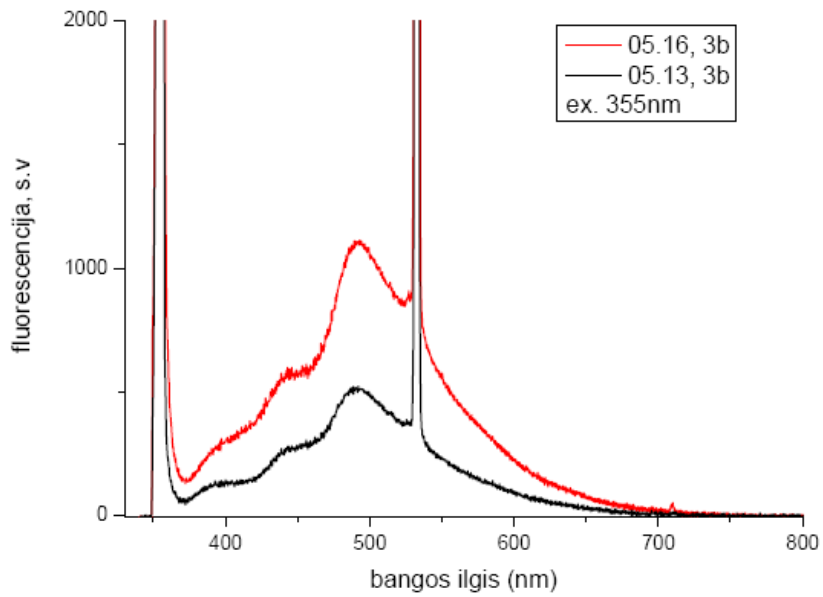
medžiagų kiekį, todėl skirtingų disko mėginių tyrimo sąlygos suvienodinamos. Tiriant natyvų preparatą, registruojamas spektras labai priklauso nuo tikslios vietos, į kurią nukreiptas šviesos šaltinis, disko fragmentas yra nevienalytis, todėl natyvių preparatų tyrimo sąlygų suvienodinti negalima. Išvada: tolesniems tyrimams buvo pasirinktas 355nm lazerio šviesos sužadimas, tiriami disko mėginių mikrotominiai pjūviai.

Kokio dydžio mikrotominius bandinių pjūvius reikėtų pasirinkti matavimams, matyti iš 2.1.8 paveikslo. Kuo mažesnis bandinio mikrotominis pjūvis, tuo mažesnio intensyvumo spektras gaunamas. Tačiau, intensyvumų skirtumas nėra toks didelis, kad galima būtų teigti, jog kažkuris iš pjūvių nėra tinkamas autofluorescencijos spektrų matavimui. Savo tolimesniuose tyrimuose pasirinkome 20 μ m bandinių pjūvius.

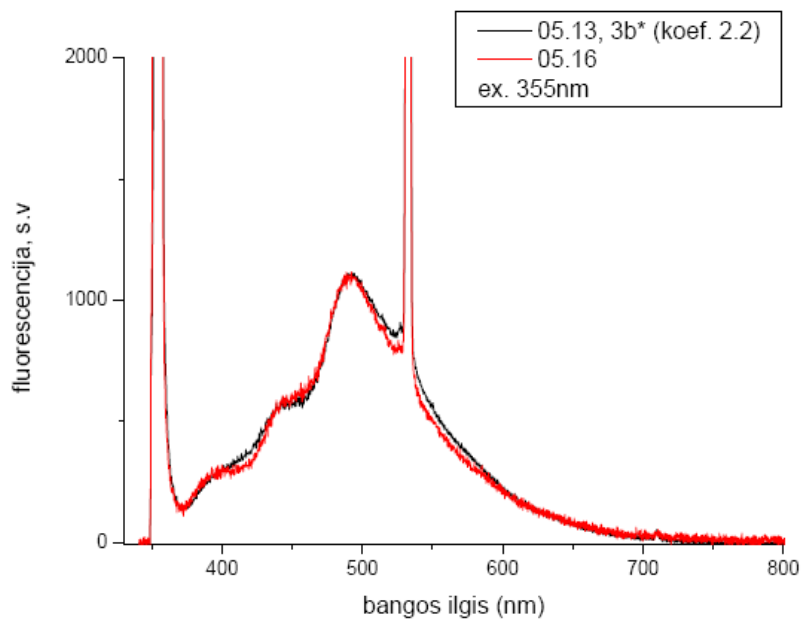


Pav. 2.1.8. 5 μ m (juoda spalva), 10 μ m (raudona spalva), 15 μ m (žalia spalva) pjūvių spektrai, žadinant 355nm lazeriu.

Kuriant tarpplankstelinio disko audinio autofluorescencijos spektrų matavimo metodiką, buvo norėta išsiaiškinti ar praėjus laikui kinta bandinių spektrai (pav.2.1.9; pav.2.1.10).



Pav. 2.1.9. (mėginys 3b) 20 μ m bandinio pjūvio spektrai, žadinant 355nm lazeriu. Raudona spalva pažymėtas spektras yra gautas 2008.05.13, juoda spalva pažymėtas spektras gautas 2008.05.16.



Pav. 2.1.10. (mėginys 3b) 05.13 dienos 20 μ m bandinio pjūvio spektras padaugintas iš koeficiento 2.2 (juoda spalva) ir 05.16 dienos spektras (raudona spalva); žadinta 355nm.

2.1.9 ir 2.1.10 paveiksluose pavaizduoti spektrai iš kurių daromos išvados apie audinių senėjimo įtaką jų autofluorescencijos spektrams. 2.1.9 paveiksle pavaizduoti 20µm bandinio pjūvio spektrai, žadinant 355nm lazeriu (vienas iš spektrų registruotas tą pačią dieną, kai bandinys buvo gautas, o kitas- praėjus trims dienoms). Iš rezultatų matyti, kad 05.16 dienos spektrai yra didesnio intensyvumo, nei 05.13 dieną gauti spektrai. Tačiau visus spektrus sunormavus pagal pagrindinio piko amplitudę, skirtumų tarp abiejų dienų spektrų formų beveik nematyti (2.1.10 pav.). Spektro intensyvumo kitimas gali būti susietas su bandinio džiuvimu, fluorescuojančių medžiagų koncentracijos didėjimu, bei eksperimento sąlygų neatsikartojimu. Mėginio džiuvimas gali įtakoti spektro amplitudę, bet minimaliai įtakoja spektro formą.

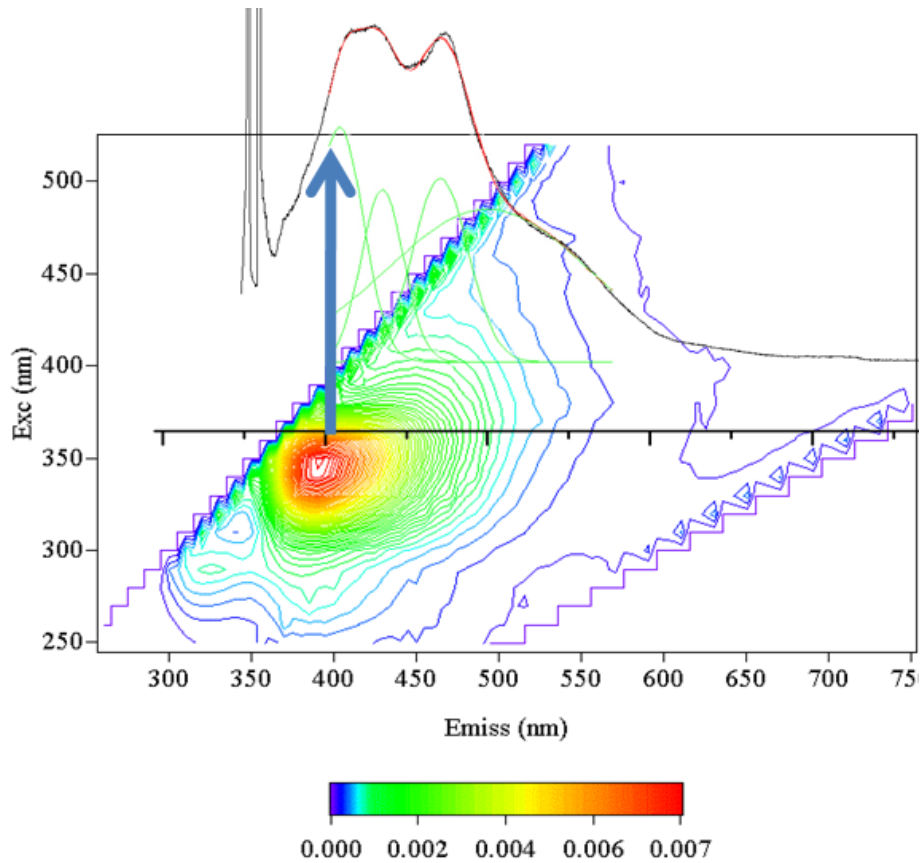
Atsižvelgiant į minėtus parametrus, buvo nustatyta tokia galutinė tarpslankstelinio disko mėginių tyrimo metodika:

1. Disko fragmentas pašalinamas disko išvaržos operacijos metu;
2. Pašalintas fragmentas talpinamas į sterilų indą, išplaunamas steriliu fiziologiniu tirpalu iki nebus kraujo priemaišos, perteklinis tirpalas nulašinamas;
3. Indas su mėginiu laikomas šaldytuve 4°C temperatūroje, fluorescenciniai matavimai atliekami per 48h po mėginio paėmimo;
4. Pincetu iš indo išimtas natyvus bandinys dedamas į Leica CM 1100 kriostatą;
5. Nativus bandinys laikomas -20°C temperatūroje maždaug 20min;
6. Sušaldytas bandinys pritvirtinamas mikrotome ir pjaustomas į 20µm dydžio pjūvius;
7. Pjūvis dedamas ant kvarcinio stikliuko ir talpinamas į Petri lėkštelę, iš kiekvieno disko mėginio paruošiami trys stikliukai, gretimi pjūviai paimami histologiniam ištyrimui;
8. Visi su bandiniu kontaktuojantys daiktai dezinfekuojami, nuriebalinami prieš prasidedant eksperimentui, fluorescencija matuojama kambario temperatūroje;

9. Suderinama optinė tyrimo sistema;
10. Lazerio šviesa sufokusuojama į pjūvį, sužadimui naudojamas lietuviškas naujos konstrukcijos „Standa“ monolitinis diodais kaupinamas trečios harmonikos lazeris. Sužadimo bangos ilgis-355nm.;
11. Spektrometras gali registruoti liuminescencijos šviesą iš bet kokio erdvinio kampo, tačiau tam, kad padidintume santykį signalas/-triukšmas, registravimo sistema statoma taip, kad būtų minimalūs žadinančios šviesos šaltinio atspindžiai nuo tiriamo objekto;
12. Kompiuteriu analizuojami duomenys surinkti spektrometre.

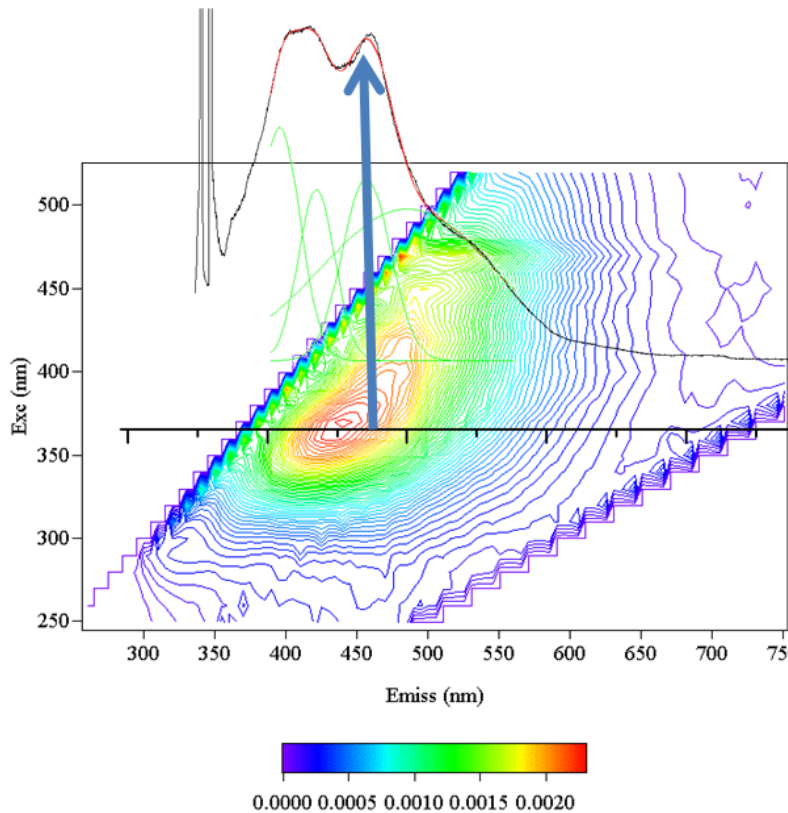
2.1.1. SPEKTRŲ PALYGINIMAS SU EEM

Tarpslankstelinis diskas yra sudarytas iš daugybės medžiagų, mes palyginome mūsų gautus spektrus su standartinėmis eksitacijos/emisijos-sužadimo/švytėjimo matricomis tų medžiagų, kurios sudaro tarpslankstelinių diską. Standartinės eksitacijos/emisijos matricos (EEM) yra publikuojamos duomenų bazėse (Characterization of the Excitation and Emission Matrices of Possible Fluorophores in Human Tissues and Cells [duomenų bazė internete]. Toronto, Ontario (Kanada): The Photochemistry and Photobiology. Sukurta 2003. Adresas: <http://eemdb.uhnres.utoronto.ca/cgi-bin/WebObjects/WebFluor>), jos sudaromos išskyrus gryną medžiagą, sužadinant ją įvairiais šviesos šaltiniais ir registruojant fluorescencijos intensyvumą. Palyginę mūsų gautus spektrus su standartinėmis eksitacijos/emisijos matrica nustatėme (pav. 2.1.11), kad kolageno I maksimalus eksitacijos pikas sutampa su mūsų spektro kylančiąja dalimi ir gali sudaryti pirmą Gausinę dedamąją.



Pav. 2.1.11. Kolageno I standartinė EEM, palyginta su mūsų išmatuotu spektru: rodyklė- Kolageno I eksitacijos pikas sutampa su spektro kylančiąja dalimi, pirma Gausine dedamąja.

Palyginę elastino EEM su mūsų išmatuotu spektru, nustatėme, kad elastino eksitacijos maksimumas sutampa su mūsų spektro trečia Gausine dedamąja ir gali formuoti antrą spektro piką (pav. 2.1.12). Panaši paralelė stebėta kolagenui VII, bet jo koncentracija tarpšlanksteliniame diske yra nedidelė. Kolageno II standartinė EEM nėra nustatyta, mes išmatavome gryno sauso kolageno II („Sigma“ kompanija, JAV) fluorescenciją pagal mūsų metodiką ir nustatėme, kad kolagenas II sužadinus 355nm. lazeriu, fluorescuoja diapazone nuo 370nm iki 590nm, fluorescencijos maksimumas ties 412nm.



Pav. 2.1.12. Elastino standartinė EEM, palyginta su mūsų išmatuotu spektru: rodyklė-Elastino eksitacijos pikas sutampa su spektro trečia Gausine dedamąja ir gali formuoti antrą piką.

Nustatėme, kad kolageno I, kolageno II, kolageno VII ir elastino eksitacijos fluorescencijos spektrai atitinka mūsų išmatuotą diapazoną. Remdamiesi žinytais ir savais matavimais (kolagenas II) nustatėme kad kolageno I, kolageno II, kolageno VII ir elastino fluorescencija randama mūsų tirtoje emisijos juostoje. Mūsų išmatuoti spektrai atspindi daugelio fluorescuojančių medžiagų buvimą tarpslanksteliniam diske ir jų spektrų persiklojimą. Fotodiagnostiniam algoritmui svarbus spektro komponentų patikimas statistinis skirtumas lyginamose audinių grupėse, o ne jų įvardinimas.

Ekspimento metu naudota aparatūra

Ekspimentų metu, bandiniai buvo pjaustomi Leica CM 1100 kriostatu, esančiu VU Ekspimentinės ir klinikinės medicinos institute, ekpimentinių

tyrimų skyriuje.

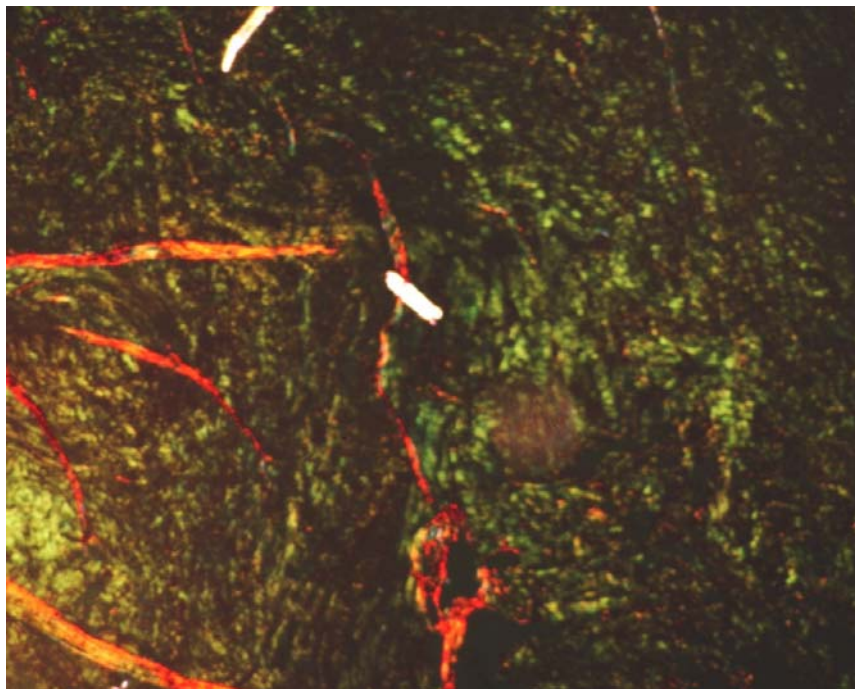
Eksperimento metu naudotas: „*Avantes*“ stalinis „AvaSpec-2048TEC“ spektrometras sujungtas su asmeniniu kompiuteriu. Spektrofotometras su kompiuteriu sujungiamas USB jungtimi. Jo matricos registravimo diapazonas 340 – 1000nm. Lazeriu indukuotos fluorescencijos matavimai buvo atlikti su lietuvišku naujos konstrukcijos monolitiniu diodinio kaupinimo mikrolazeriu STA-01. Žadinamas Nd(YAG) trečios harmonikos generatorius (355nm.) (UAB „STANDA“).

2.2. EKSPERIMENTINĖS DALIES TYRIMO METODIKA

Tarpslankstelinio disko bandiniai buvo pašalinti atviros disko išvaržos operacijos metu. Operuojamo ligozino MRT vaizdas buvo įvertintas pagal Pfirrmann disko degeneracijos klasifikaciją ir pagal Komori disko išvaržų gradaciją (žr. skyrių 1.5.0. Stuburo tarpslankstelinio disko degeneracijos nustatymo metodika).

Disko biopsijų operacinė medžiaga, morfologiškai ir histochemiškai ištirta VU Eksperimentinės ir klinikinės medicinos instituto Eksperimentinių tyrimų skyriaus Patologijos padalinyje (tyrėja dr. Vida Gražienė, vyr.laborantė-histologė Salomėja Stanaitienė). Medžiaga buvo dalinama į dvi dalis: viena jos dalis po šaldymo Zeiss'o kriomikrotomu (Leica CM1100), šaldomųjų pjūvių gavimo ir jų apšvietos mikrolazeriu Nd-YAG (STA--01-TH 355nm spinduliu) buvo tiriama spektrofotometriškai fluorescencinėms kreivėms gauti. Kita medžiagos dalis buvo fiksuojama spirito-formolo fiksiatoriuje ir po dehidratacijos, liejama parafinu audinių morfologijai. Parafino pjūviai buvo dažomi Hematoksilinu-eozinu (HE) - bendrai histologijai ir struktūrinių ląstelių pokyčių įvertinimui; Toluidino-mėliu prie pH 2.0 (TW) ir Safraninu O (SO) - ląstelių ir matricos gaminamų proteoglikanų įvertinimui; Alciano mėliu - PAS (AM-PAS) - rūgščių mucinų (AM) ir mukopolisacharidų (PAS) įvertinimui; Pikrosirijum raudonuoju (PS) (Puchtler H, 1973; Junqueira LCU, 1979) – skaidulinių komponentų (II/I/ kitų kolagenų) santykiui įvertinti (pav. 2.2.1). Preparatai, dažyti HE, TW, SO ir AM-PAS buvo tiriami šviesos, o PS-

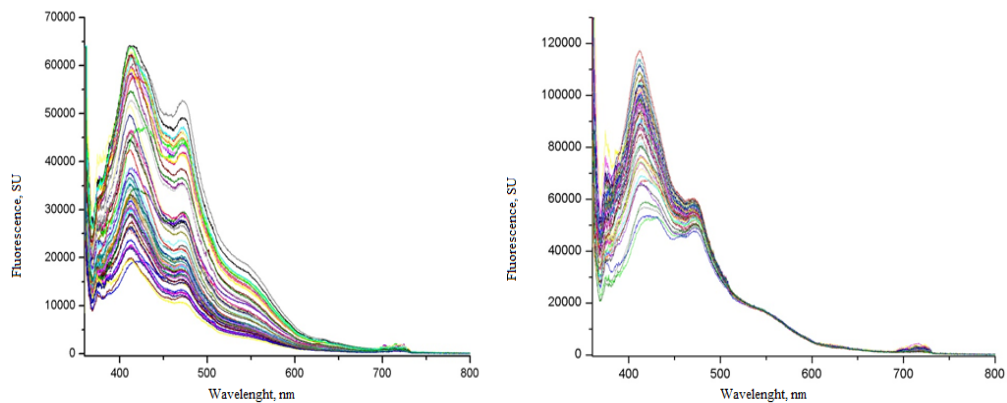
Olympus BX51 mikroskopo poliarizacinėje šviesoje. Nudažyti preparatai buvo vertinami balais pagal Boos N. ir autorių protokolą (Boos N, 2002), skirtą tarslankstelių diskų amžiaus sąlygotiems degeneraciniams pokyčiams. Protokolą papildėme matricos baltymų ir kolageno skaidulų histocheminiais kokybiniais ir pusiau kiekybiniais tyrimais, siekdami juos susieti su spektroskopinio tyrimo fluorescencinėmis kreivėmis, išryškinančiomis skirtingus disko cheminius komponentus po pjūvių apšvietos lazeriu (priedas 1).



Pav.2.2.1 . Įvairių kolageno skaidulų lokalizacija, nudažytų pikrosirijum raudonuoju: žalias- kolagenas II, raudonas- kolagenas I, geltonas- kiti kolagenai. PS x 200.

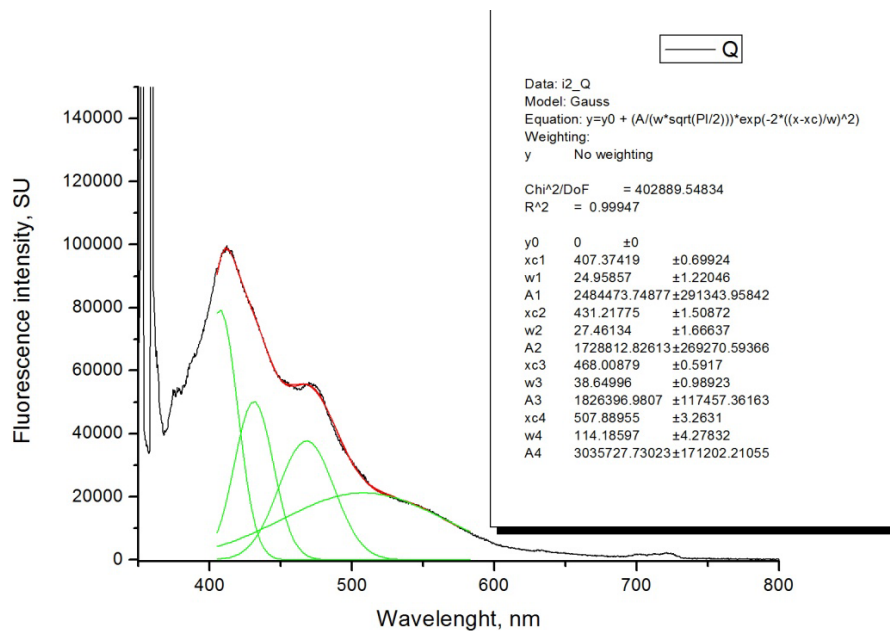
Liuminescencijos spektrai buvo išmatuoti diapazone nuo 340nm iki 1000nm. Žadinimo šviesos šaltinis- Standa mikrolazeris STA-01-TH 355nm. Nustatyta, kad disko matrica fluorescavo diapazone nuo 370nm iki 700nm. Gauti duomenys buvo saugomi kompiuteryje ir analizuoti *Origin 7.0* programiniu paketu. Turimi bandinių spektrai buvo normuojami pagal ilgabangės srities petį taip, kad toliausiai į ilgabangę sritį nutolęs smailės petys sutaptų per visą intensyvumą. Šių bandinių spektrai buvo sunormuoti pagal

visiems bandiniams pastovią formą išlaikančią ilgabangę sritį ($\lambda=540,01\text{nm.}$) – tai reiškia kad absoliučiai visų bandinių amplitudė ties pasirinktu bangos ilgiu λ turi būti vienoda ($A=17944$ sant.vnt.). Tam, ties pasirinktu bangos ilgiu, yra nustatoma spektro fluorescencijos intensyvumo vertė. Gautą vertę daliname iš nustatyto 17944 intensyvumo ir gauname norimą daugiklį iš kurio dabar galime padauginti visą spektrą, tam kad pasirinktame taške λ ($\lambda=540,01\text{nm.}$) jo intensyvumas būtų toks, koks yra nustatytas. Atlikus šį paprastą matematinį veiksmą, galime plika akimi matyti spektrinius skirtumus ir panašumus – panaikiname galimus matavimo artefaktus dėl šviesos šaltinio ar spektro amplitudės (pav.2.2.2). Jokios įtakos kokybinei analizei toks matematinis veiksmas nedaro. Spektų normavimas pagal ilgabangę petį šiame darbe buvo atliekamas naudojantis *Origin 7.0* programa.



Pav.2.2.2 Kairėje- spektras surinktas iš spektrometro, dešinėje- spektras, normuotas pagal ilgabangę sritį (amplitudės ir šviesos šaltinio artefaktai pašalinti).

Preliminariai matomos pagrindinės signalų smailės – matyti, kad sudėtingas signalas susideda iš kelių paprastų komponentų, todėl sekanti procedūra yra kiekvieno atskiro spektro aprašymas normaliąja kreive (gausoide). Pagal spektro smailes, spektrai buvo skirstomi pagal Gausinės dedamąsias, nustatomi spektro komponentai (pav.2.2.3.). Iš kiekvieno mėginio spektrų visumos atrinkome dešimt būdingiausių formos spektrų ir juos suskirstėme į Gausinės dedamąsias.



Pav. 2.2.3. Spektas (juoda linija) ir pagrindiniai spektro komponentai (žalia linija).

Spektrų duomenys apdoroti *Origin7.0*, *MS Office Excel*, *Statistica 6.0* ir *PAST* programomis. Spektrų dedamųjų statistinė analizė atlikta naudojant Stjudento *t* kriterijų. Pasirinktas reikšmingumo lygmuo $p < 0,05$, kuriame rezultatai laikyti statistiškai patikimais.

Eksperimentinės tyrimo dalies grupių palyginimo statistinė duomenų analizė bei grafinis vaizdavimas atlikti taikant kompiuterinės statistikos programą *SPSS for Windows* (versija 12.0). Naudota statistikos metodine medžiaga. Apskaičiuoti normalių parametrų reikšmių vidurkiai (*V*) su standartiniais nuokrypiais (*SN*). Nominalių duomenų skirtumo statistinis reikšmingumas nustatytas pagal Chi kvadratu (χ^2) kriterijų, normalių kiekybinių duomenų vidurkių skirtumas dviem nepriklausomoms imtims – naudojant Stjudento *t* kriterijų, normalių kiekybinių duomenų vidurkių skirtumas trimis nepriklausomoms imtims – vienfaktorinę dispersinę analizę ANOVA. Ranginių duomenų skirtumo statistinis reikšmingumas esant dviem nepriklausomoms imtims nustatytas naudojant Mano – Vitnio - Vilkoksono (Mann-Whitney – Wilcoxon) kriterijų, esant trimis nepriklausomoms imtims -

naudojant Kruskalo – Voliso (Kruskal – Wallis) kriterijų. Pasirinktas reikšmingumo lygmuo $p < 0,05$, kuriame rezultatai laikyti statistiškai patikimais.

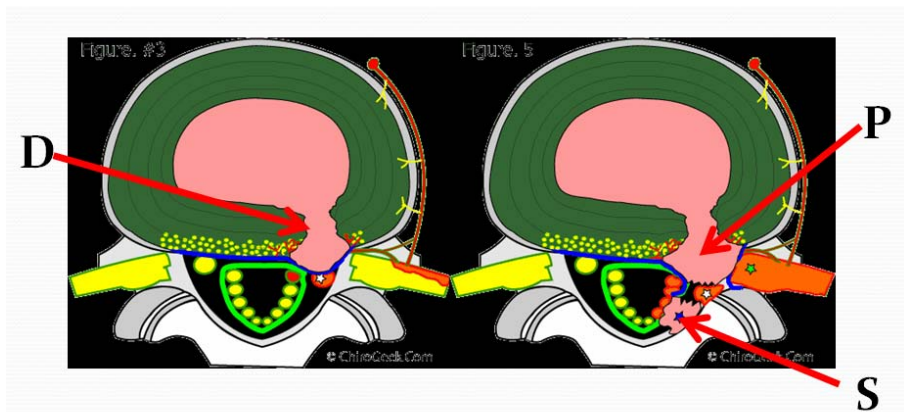
2.3. EKSPERIMENTINĖS DALIES TIRIAMOJI GRUPĖ

Tiriamosios grupės disko mėginiai buvo paimti standartinės disko išvaržos operacijos metu VU greitosios pagalbos ligoninėje, neurochirurgijos skyriuje, nuo 2009 02 02 iki 2009 09 11.

Atrinkimo kriterijai:

1. pacientas sutinka dalyvauti tyrime, pasirašo sutikimo formą (priedas 2), užpildo klausimyno formą (priedas 3);
2. pacientas planine tvarka pirmą kartą operuojamas dėl juosmeninio disko išvaržos;
3. operacijos metu pašalinamas pakankamas tarpslankstelinio disko fragmentas, kad galima būtų atlikti fluorescencinius ir histologinius tyrimus;
4. prieš operaciją pacientas iširtas magnetinio rezonanso tomografija, nustatyta tarpslankstelinio disko išvarža;
5. operacijos momentu nėra sisteminio ar lokalaus uždegimo požymių (reumatinių ligų, spondilodiscito ir kt.).

Mėginiai suskirstyti į tris grupes pagal mėginio paėmimo vietą operacijos metu. Išskirtos trys disko mėginių grupės: D- išvarža pašalinta iš disko gilumos, esant nepažeistam užpakaliniam išilginiam raiščiui; P- išvarža pašalinta iš po raiščio, esant pažeistam užpakaliniam išilginiam raiščiui; S- laisvas sekvestras, tiesiogiai kontaktuojantis su peridurinėmis kraujagyslėmis (pav.2.3.1).



Pav. 2.3.1. Mėginių paėmimo vietos: D- išvarža pašalinta iš disko gilumos; P- išvarža pašalinta iš po raiščio, esant pažeistam užpakaliniam išilginiam raiščiui; S- laisvas sekvestras, tiesiogiai kontaktuojantis su peridurinėmis kraujagyslėmis.

Galutiniam įvertinimui atrinkome 29 disko mėginius: devynis D grupės, dvylika P grupės, aštuonis S grupės; išanalizavome 290 spektrų.

2.4. EKSPERIMENTINĖS DALIES DARBO REZULTATAI

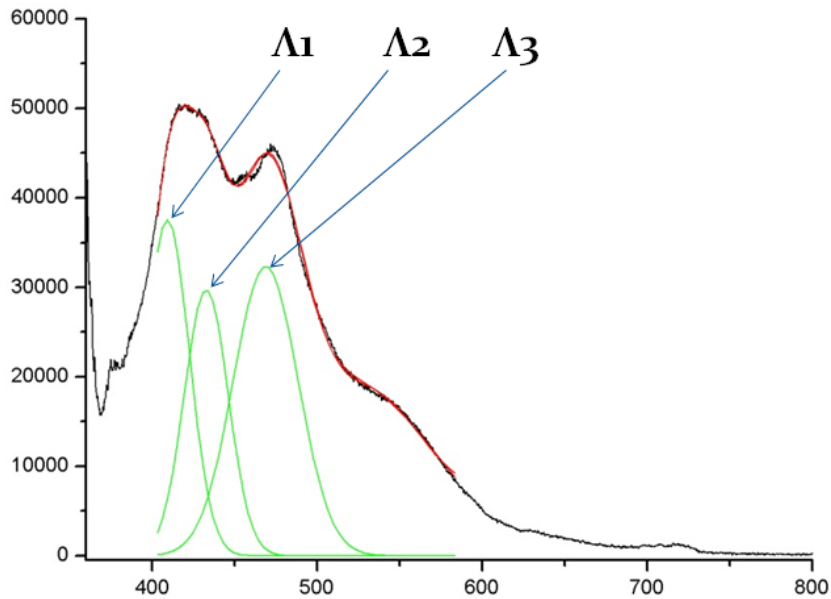
2.4.1. PRIEŠOPERACINIS MRT ĮVERTINIMAS

Operuojamo ligoonio MRT vaizdas buvo įvertintas pagal Pfirrmann disko degeneracijos klasifikaciją ir pagal Komori disko išvaržų gradaciją (žr. skyrių 1.5.0. Stuburo tarpslankstelinio disko degeneracijos nustatymo metodika). 21 operuojamas diskas buvo įvertintas trečiu degeneracijos laipsniu pagal Pfirrmann, 8- ketvirtu degeneracijos laipsniu. Pagal Komori disko išvaržos migracijos skalę, dvidešimt išvaržų įvertinta Komori 1, keturios išvaržos Komori 2, penkios išvaržos Komori 3 (migravę sekvestrai).

2.4.2. GAUTI SPEKTRAI, SPEKTRŲ ANALIZĖ

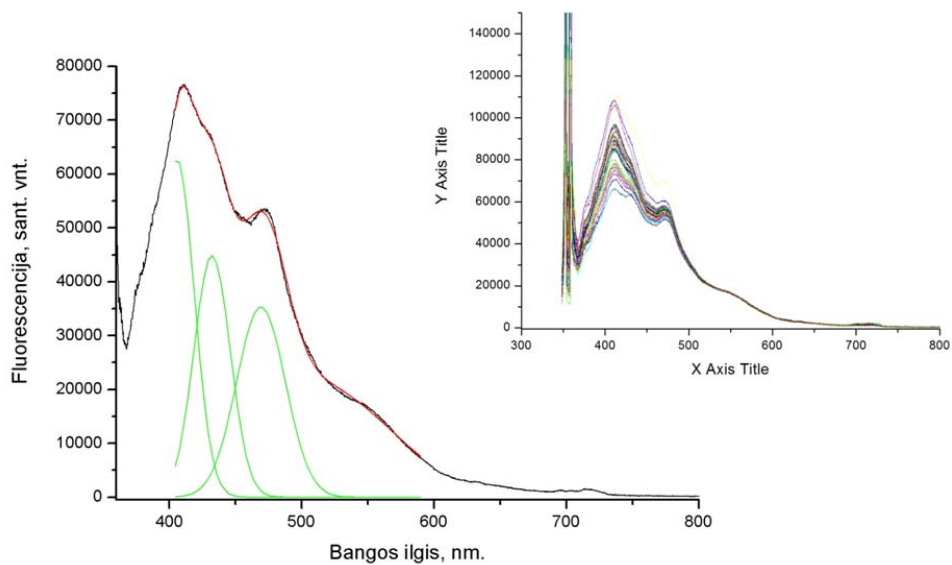
Analizuojant disko mėginių spektrus, visi iš mėginio gauti spektrai buvo normuojami ir apdorojami *Origin 7.0* programiniu paketu. Spektrai buvo apdorojami panaudojant Gausinės dedamąsias-spektrų komponentus. Aprašyti spektrams buvo naudojamos keturios Gausinės dedamosios. Nustatyta, kad

visų mėginių spektrams būdingos trys Gausinės dedamosios, kurių pikai-viršūnės yra pastovūs ir jų bangos ilgis statistiškai patikimai skyrėsi vienas nuo kito: Λ_1 - $406,9 \pm 2,97$; Λ_2 - $431,9 \pm 7,63$; Λ_3 - $467,5 \pm 5,03$ ($p < 0,0001$)(Pav.2.4.1.). Ketvirta Gausinė dedamoji svyravo skirtinguose mėginiuose tiek savo amplitudė tiek piko reikšmė, į ją neatsižvelgta, atliekant galutinius skaičiavimus. Gausinių dedamųjų pikų statistinė analizė pateikta priede Nr. 4.

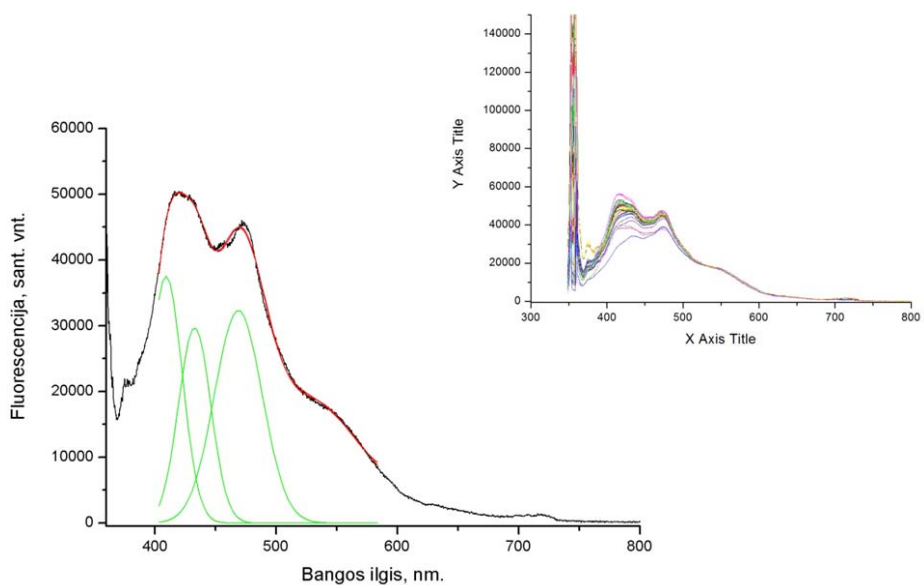


Pav. 2.4.1. Trys Gausinės dedamosios, kurių pikai-viršūnės yra pastovūs ir jų bangos ilgis statistiškai patikimai skyrėsi vienas nuo kito: Λ_1 - $406,9 \pm 2,97$; Λ_2 - $431,9 \pm 7,63$; Λ_3 - $467,5 \pm 5,03$ ($p < 0,0001$).

Pagal spektrų formas skirtumus išskyreme dvi spektrines grupes: λ (pav.2.4.2) ir μ (pav.2.4.3).

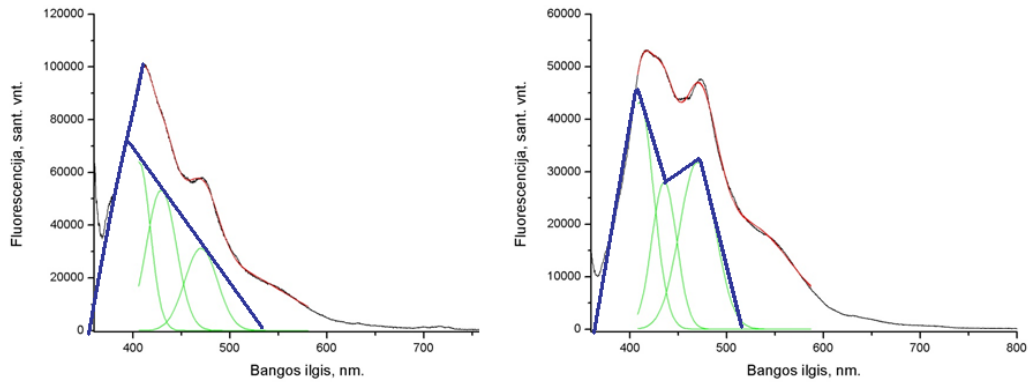


Pav.2.4.2. λ spektro pavyzdys: dešinėje spektras, kairėje Gausinės dedamosios.



Pav.2.4.3. μ spektro pavyzdys: dešinėje spektras, kairėje Gausinės dedamosios.

λ grupėje pagal Gausinių dedamųjų piko amplitudę $\Lambda_1 > \Lambda_2 > \Lambda_3$; o μ grupėje pagal Gausinių dedamųjų piko amplitudę $\Lambda_1 > \Lambda_2 < \Lambda_3$ (pav.2.4.4).



A

B

Pav.2.4.4. Dvi spektrų grupės: A- λ grupė (Gausinės dedamosios primena graikišką λ -mėlyna linija), B- μ grupė (Gausinės dedamosios primena graikišką μ -mėlyna linija).

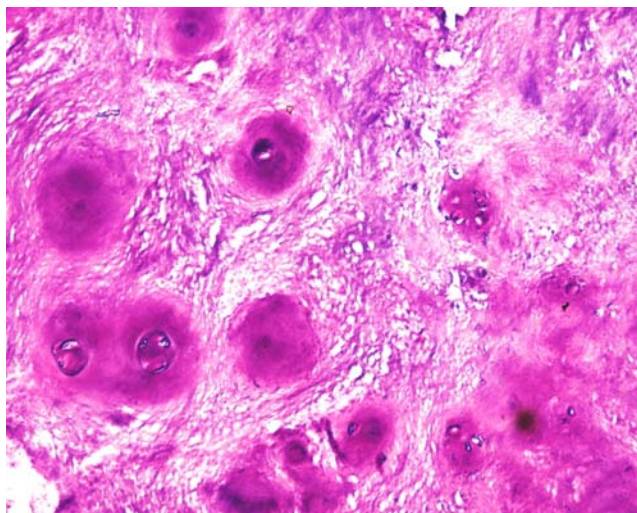
λ spektrų pavyzdžiai pateikti priede Nr.5; μ spektrų pavyzdžiai pateikti priede Nr.6.

2.4.3. DEGENERACINIŲ POKYČIŲ MORFOLOGINIS STRUKTŪRINIS IR IMUNOHISTOCHEMINIS ĮVERTINIMAS

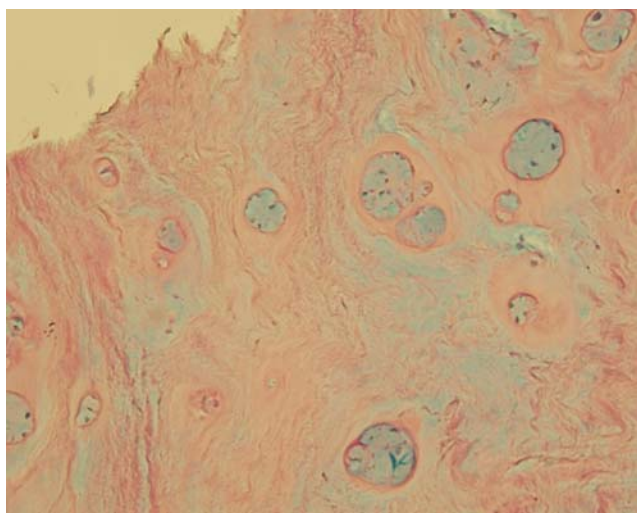
Nors disko audinys patiria dramatiškus amžinius degeneracinius pokyčius, manome, kad disko (D), išvaržos (P) ir nutolusių sekvestrų (S) pusiaukiekybinis morfologinis struktūrinis ir histocheminis tyrimas leidžia palyginti atskirų audinių sudarančių komponentų (ląstelių, kolageno skaidulų ir matricos baltymų) degeneracijos laipsnį, atskirti juos nuo amžinių pokyčių ir palyginti su spektroskopinėmis kreivėmis, gautomis po lazerio apšvietos, tikintis pritaikyti fluorescencinę diagnostiką DDL ligai operacijos metu.

Tarpslankstelių diskų (D), išvaržų (P) ir sekvestrų (S) struktūriniai (ląstelių) ir imunohistocheminiai (matricos skaidulų ir proteoglikanų) degeneracijos požymiai. Pagrindinės tarpslankstelinio disko ląstelės buvo: vienuose diskuose maži chondrocitai ir retos stambios chondroidinio tipo ląstelės apsuptos mukopolisacharidine kapsule, bet vyravo arba pirmos arba antros, arba buvo diskai su mišriomis ląstelėmis. Tarp kapsulės supančios chondroidines ląsteles buvo jų gaminami proteoglikanai (PG), nusidažantys

TW metachromatiškai (pav.2.4.5), o Safraninu O oranžine spalva



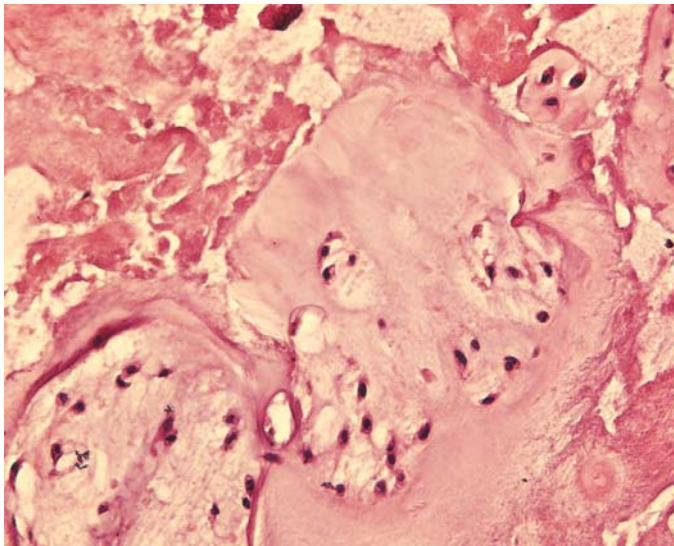
Pav.2.4.5 Maži chondroidinių ląstelių klasteriai ir juose gaminami proteoglikanai ryškiai metachromatiškai dažant TW. Ląstelių klasteriai, įsiterpę tarp disko kolageninių skaidulų patyrusių ryškia fibriliaciją su išplautais proteoglikanais iš matricos sekvestro pjūvyje. TW x 400.



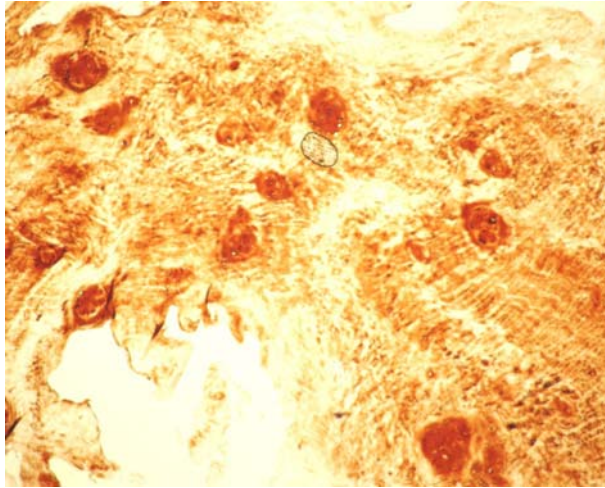
Pav. 2.4.6 Rūgštūs mucininio tipo skysčiai (Alciano mėlis+) vidutinio dydžio chondroidinių ląstelių klasteriuose, apsupti mukopolisacharidine kapsule (PAS+) ir chondroidinių ląstelių branduolių piknozė. Skysčiai persunkia skaidulinį

arba rūgštūs mucininio tipo baltymai (nusidažę Alciano mėliu melsvai, pav. 2.4.6) - mucininė degeneracija arba II-o tipo kolageno baltymai, formuojantys II-o tipo kolageno fibriles (pav.2.4.8). Neatmetame galimybės, kad sutrikus PG

gamybai, chondroidinės ląstelės ima gaminti fermentus, ardančius save pačią ir matricą, kaip kad yra sąnario hialininėje kremzlėje, nes chondrocitai ypač jautrūs bet kokiems PG ir fermentų santykio pasikeitimams matricoje. Deja, neturėjome galimybės imunohistochemiškai ištirti kolagenazės ir metaloproteinazių. Apie chondrocitų ir chondroidinių ląstelių degeneraciją sprendėme pagal jų hipertrofiją ir ryškia proliferaciją, gaminamų pirmtakinių baltymų skirtingą rūšį, kapsulės turinio vakuolizaciją ir ląstelių branduolio piknozę (pav.2.4.7) ir ląstelės mirtį (apoptozę), kada ląstelės branduolys subyra į chromatino fragmentus. Gilėjant disko degeneracijai abu ląstelių tipai buvo įtraukiami į mažesnius po 2 ląsteles (pav.2.4.5), vidutinius iki 8 ląstelių (pav.2.4.6) ir stambius iki 15 ląstelių klasterius (pav.2.4.7), apribotus viena mukopolisacharidine kapsule, kurioje, po branduolio apoptozės, ląstelės turinys vakuolizavo, keitėsi gaminamų baltymų pobūdis kol ląstelė visiškai nustojo funkcionuoti. Ištirpus kapsulei, žuvusių chondroidinių ląstelių gaminami baltymai disko matricoje sudarė židines jų sankaupas, hialinizavo, sutrikdė kolageno skaidulų normalią fibrilogenę ląstelių išorėje ir sudarė randus (pav.2.4.11).

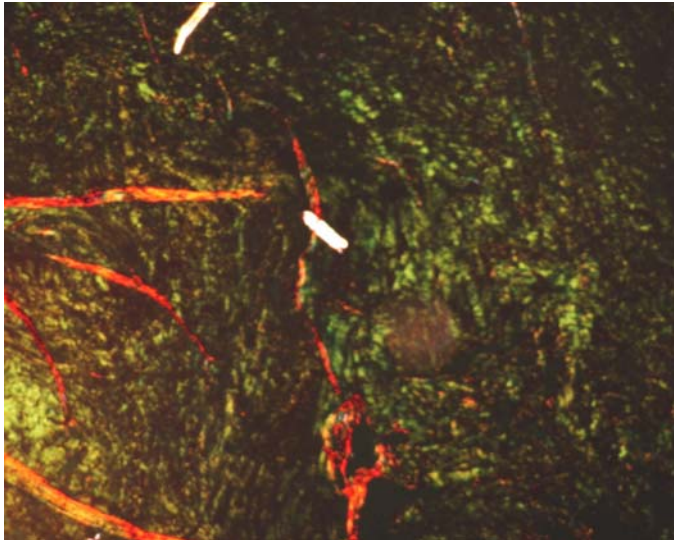


Pav. 2.4.7. Stambūs (iki 15 ląstelių) chondroidinių ląstelių klasteriai labai piknoziškais branduoliais, vakuoliška citoplazma ir ištirpusiomis kapsulėmis arba jų likučiais ryškiai degeneruotame sekvestre. HE x 400.



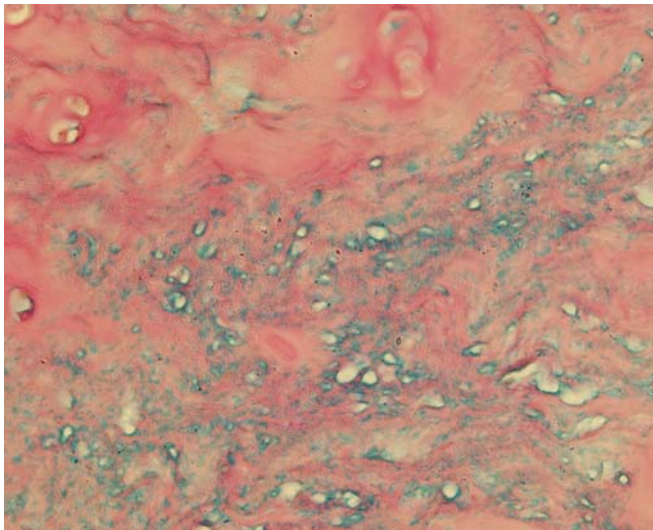
Pav. 2.4.8. II-o tipo kolageno imunohistocheminis žymuo chondroidinių ląstelių vidutiniuose klasteriuose ir skaidulinėje sekvestro matricoje. Imunohistocheminis dažymas panaudojus antikūnus prieš II-o tipo kolageną, žvmėtus krienu neroksidaze. IHC x 400

Mažiau degeneruotoje matricoje dažniausiai vyravo II tipo kolageno skaidulos (pav.2.4.8), PS nusidažiusios raudonai ir mikroskopo tamsiame lauke poliarizuojančios žalia spalva (pav.2.4.9). Labiau degeneruotuose pavyzdžiuose mažėjo II-o tipo kolageno fibrilių, atsirado vis daugiau I tipo kolageno skaidulų nusidažusių geltonai ir poliarizavusių oranžine-raudona spalva ir kitų kolagenų grupė, kurie dažėsi rausvai ir poliarizavo gelsva spalva. (pav.2.4.9). Imunohistochemiškai identifikavome tik II kolageno baltymų sankaupas ir II-o tipo fibriles. Imunohistochemiškai jos dažėsi ryškiai ruda spalva (diaminobenzidinas) ir jų lokalizacija sutapo su žaliu poliarizaciniu švytėjimu matricoje ir chondroidinių ląstelių klasteriuose nudažius pjūvius PS. Histocheminis audinio pjūvių nudažymas PS leido nustatyti ne tik disko skirtingų kolageno skaidulų kokybinį sąstatą, bet ir pusiaukiekybiškai įvertinti jų pasiskirstymą audinyje (II/I/kiti).

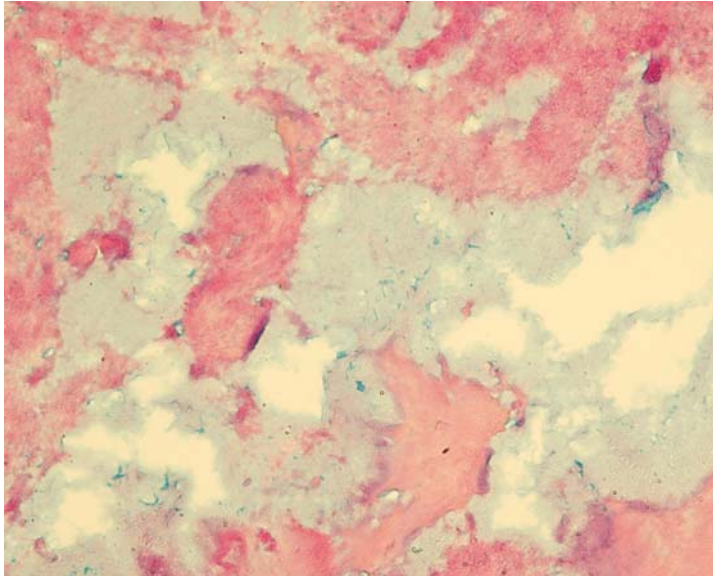


Pav.2.4.9. Įvairių kolageno skaidulų lokalizacija, nudažytų pikrosirijum raudonuoju: žalias- kolagenas II, raudonas- kolagenas I, geltonas- kiti kolagenai. PS

Disko (D), išvaržos (P) ir sekvestrų (S) audinių preparatuose, dažytuose AM-PAS gerai išryškėjo maži ir stambūs plyšiai (pav.2.4.10 ir pav.2.4.11) pripildyti rūgštaus mucininio skysčio, kuris taip pat persunkė disko baltyminę matricą ir kolageno skaidulas (pav.2.4.13), sukeldami ryškią jungiamojo audinio edemą.

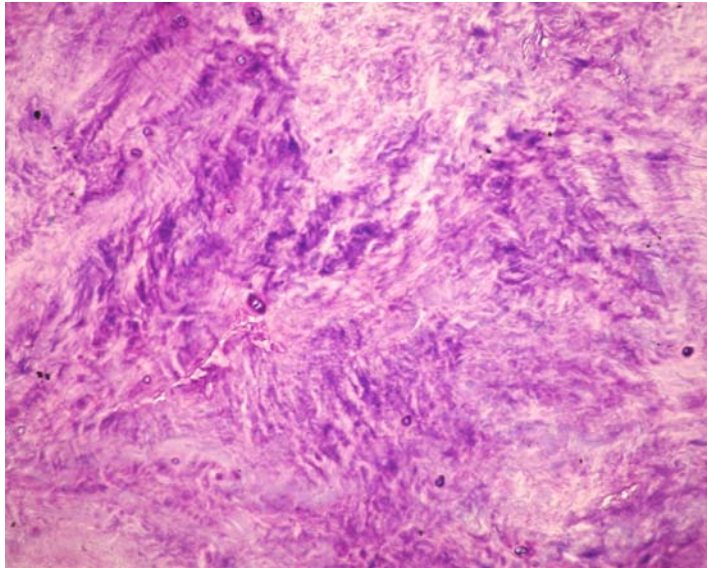


Pav.2.4.10. Smulkūs plyšiai sekvestro skaidulinėje matricoje ir tarp degeneruojančių chondroidinių ląstelių klasterių. Alciano mėlis-PAS x 400.



Pav.2.4.11. Stambūs plyšiai pripildyti rūgščių mucininių baltymų įsiterpę tarp ryškiai degeneruoto disko skaidulių pluoštų ir jas fragmentuoja. Alciano mėlis-PAS x 400.

Terminalinę kolageno skaidulų destrukciją atspindėjo skaidulų ir jų pluoštų fragmentacija į židininis granulių sankaupas (pav.2.4.12) - granuliacinė degeneracija arba skaidulų lyzė.



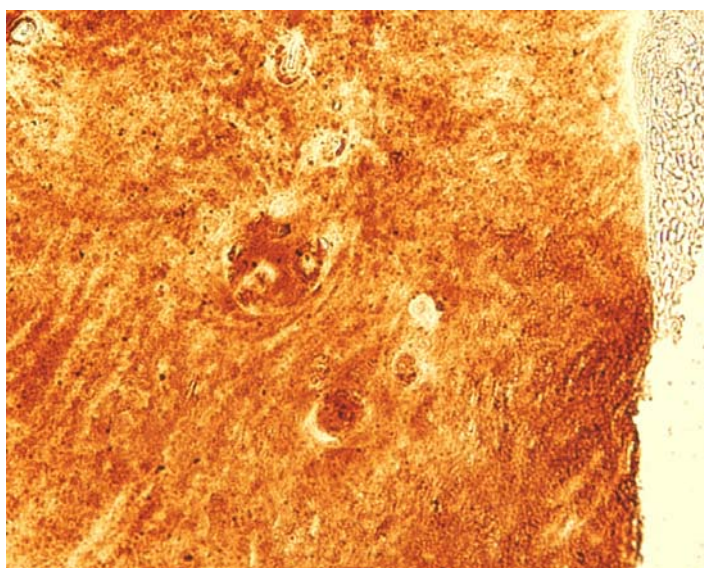
Pav.2.4.12. Granulinė kolageno skaidulų fragmentacija nutolusiame sekvestre su pavienėmis degeneruotomis chondroidinėmis ląstelėmis. TW x 200.

Morfologinį ir histocheminį diskų, jų išvaržų ir nutolusių sekvestrų degeneracijos laipsnį rodo 1 lentelė. Ji rodo, kad ryškiausią degeneraciją patyrė išvaržos (P), antroje vietoje buvo nutolę sekvestrai (S) ir galiausiai traplankstelinis diskas (D). Bet tiek diskai, tiek išvaržos, tiek sekvestrai turėjo įvairaus lygio struktūrinius ir histocheminius - cheminio sąstato degeneracijos pokyčius, kurių Boos N. nefiksavo savo protokole. Jie galėjo labiausiai atsispindėti fluorescencinėse kreivėse, nes skaiduliniai komponentai turi tikslią tvarkingą kristalinę struktūrą, kuri faktiškai ir sukelia skirtingą poliarizacinę spalvą skirtingus cheminius komponentus turinčios kolageno skaidulos, nudažytos PS ir skirtingai poliarizuojančios.

Pirma lentelė. MORFOLOGINIAI IR HISTOCHEMINIAI STUBURO DEGENERACINIŲ DISKŲ, IŠVARŽŲ ir SEKVESTRŲ DEGENERACIJOS POŽYMAI

Mėginiai	Atv. N. Struktūrinių pokyčių išreikštumas (Boos N, balais),	Histocheminių pokyčiai TW, Safr.O Alc.m.-PAS	Ps Spektro forma II/I/kiti kol.	
D	18-D ₁	18	L+3, Mx+2 +3 80/0/20 μ	
	19-D ₂	22	L+1, Mx+2 +3 40/40/60 λ	
	N=9	23-D ₃	14	L+3, Mx+2 +2.5 10/40/50 μ
		28-D ₄	15	L+3, Mx+1 +2.5 60/10/30 λ
	29-D ₅	17	L+3, Mx+1 +3 60/40/0 μ	
	30-D ₆	17	L+0, Mx+0 +2 30/70//0 μ	
	38-D ₇	14	L+0, Mx+3 +2 50/20/30 μ	
	40-D ₉	15	L+2, Mx+1 +3 30/60/10 λ	
	42-D ₁₀	16	L+3, Mx+2 +3 70/0/30 λ	
	P	14-P1	9	L+2, Mx+2 +2 30/20/50 μ
N=12		15-P2	16	L+2, Mx+1 +1.5 40/30/30 λ
		17-P3	14	L+2, Mx+2 +2 20/40/40 μ
21-P4		11	L+1 Mx+1 0 10/80/10 μ	
22-P5		13	L+1 Mx+2 +2 60/30/10 μ	
24-P5'		13	L+1, Mx+1 +2 60/30/10 λ	
25-P6		15	L+2, Mx+0 +2 20/60/20 μ	
32-P8		16	L+0, Mx+2 +2 70/10/20 μ	
34-P9		14	LO, Mx+2 +1 50/10/40 λ	
35-P10		13	L+2, Mx+2 +2 85/5/10 λ	
36-P11		15	L+2, Mx+2 +2 20/40/40 λ	
43-P12		20	L+1, Mx+0 +2 70/0/340 λ	
S	16-S3	17	L+1, Mx+2 +2 20/30/50 λ	
	N=8	26-S5	22	L+0, Mx+1 +3 50/0/50 λ
		27-S6	14	L+2, Mx+3 +2 50/10/40 μ
	31-S7	18	L+2, Mx+3 +3 60/10/30 λ	
	37-S8	19	L+2, Mx+3 +3 60/10/30 λ	
	41-S9	21	L+2, Mx+2 +2 40/10/50 λ	
	44-S10	22	L+2, Mx+2 +3 20/50/30 μ	
	45-ST	21	L+2, Mx+2 +3 40/40/20 λ	

Morfologiniai ir histocheminiai degeneracijos požymiai mėginiuose iš disko gilumos (D grupė, n=9). Mūsų gautoje medžiagoje diskuose vyravo chondroidinių ląstelių hiperplazija, hipertrofija ir proliferacija, vidutiniai ir stambūs chondroidinių ląstelių klasteriai su totalia ląstelių branduolių piknoze ir apoptoze, vidutinišku ir gausiu skysčių kiekiu tarp klasterius sudarančių ląstelių ir kapsulės, skysčiai smulkiuose ir stambiuose plyšiuose ir matricos baltymų persunkimas skysčiais. Penkiuose diskuose dar vyravo II tipo kolageno skaidulos, dengiančios iki 80% (pav.2.4.13) pjūvio ploto.



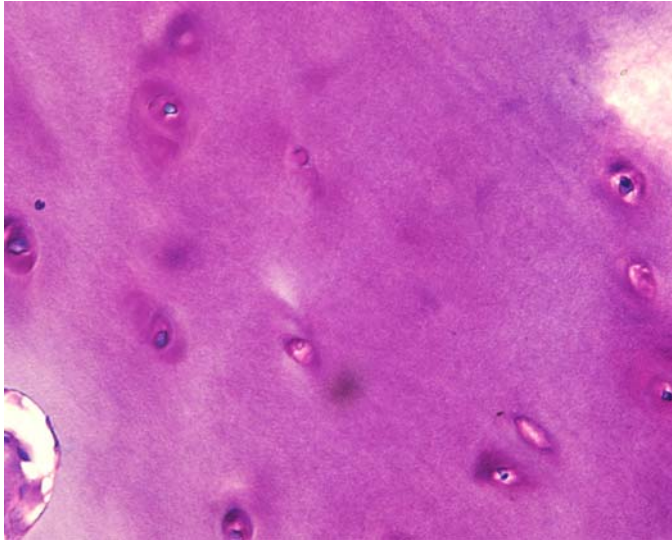
Pav.2.4.13. Vyraujantis II-o tipo kolageno žymuo disko (D grupė) audinyje (ryškiai ruda spalva) ir chondroidinėse ląstelėse. Ląstelių branduolio chromatininiai fragmentai (apoptozė) matomi ir matricoje ant II-o tipo skaidulų.

Šešių diskų chondroidinės ląstelės gamino (L+3) ir matrica turėjo (Mx+3) gausias PG sandaugas, dažniausiai disko centre *nucleus pulposus* arba jo likučiuose. Esant sveikesnėms chondroidinėms ląstelėms PG buvo žymiai daugiau *nucleus pulposus* zonoje, tuo tarpu *annulus fibrosus* zonos randinis audinys turėjo tik destruktinius ląstelių klasterius, židines PG sandaugas ir randus.

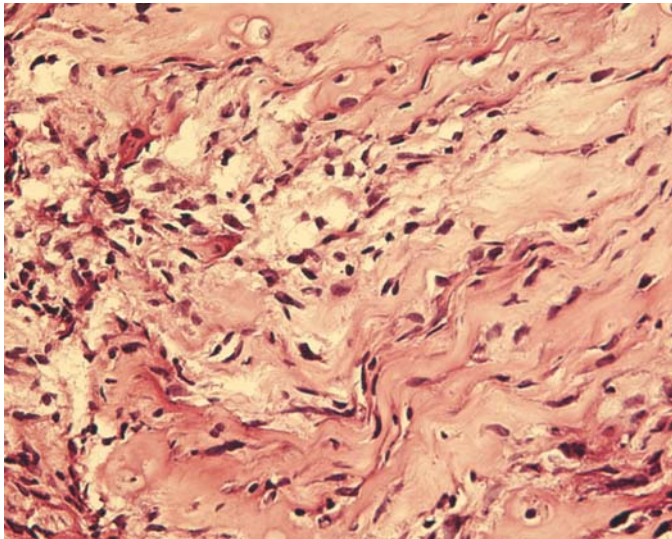
Morfologiniai ir histocheminiai degeneracijos požymiai tarpslankstelių diskų išvaržose (P grupė, n= 12). Kaip matome 1-oje lentelėje P grupės išvaržų degeneracijos laipsnis buvo didesnis už tarpslankstelių diskų (D-grupė) ir didžiausias trijuose audiniuose. 4 –iose išvaržose vyravo mažos chondrocitų ląstelės, likusiose 8-iose vidutiniškai ir stambūs mažų ir didelių chondroidinių ląstelių klasteriai su totalia branduolio apoptoze ir PG židininėmis sankauptomis išvaržos jungiamajame audinyje. Labiausiai degeneruotos ląstelės išsidėstė išvaržos kraštuose, kaip ir disko pjūviuose.

Skaidulinį išvaržos komponentą sudarė vyraujančios I-o kolageno tipo skaidulos iki 50%, II-o tipo kolageno skaidulų sumažėjimo sąskaita ir padidėjęs kitų kolagenų skaidulinis komponentas, siekiantis net iki 50% keliose išvaržose. Dažnos išvaržos turėjo hialininės kremzlės fragmentus centre arba kraštuose (pav.2.4.15) Židininės smulkios PG sankauptos, pasklidusios difuziškai po visą išvaržą. Matomi atskilę nuo kraštų audinio fragmentai ir reti smulkūs granuliacinio audinio židiniai išvaržos kraštuose. Trys diskai kraštuose turėjo 2 ir 3-jų skorų (<50 ląstelių židinyje) perivaskulinius uždegiminius židinius, dažniausiai iš fibroblastų, histiocitų, limfocitų, nesubrendusių plazminių ląstelių su sensorinių ląstelių su ilgomis citoplazminėmis išaugomis priemaiša, čia buvo matomi ir keliolika smulkių kraujagyslių plyšių (pav.2.4.16), tai patvirtina teoriją, kad autoimuninė disko rezorbcija prasideda tik plyšus užpakaliniam išilginiam raiščiui ir disko medžiagai susilietus su peridurinėm kraujagyslėm.

Matėme kolageno skaidulų fragmentaciją ir židininės smulkias granulių sankauptas, sumažėjusius PG kiekius, kai kuriose išvaržose ląstelės visai nustojo juos gaminti, bet padaugėjo ląstelių su Alciano mėliui teigiamais mucininio tipo skysčiais.



Pav. 2.4.15. Diskogeninės kilmės kremzlės fragmentas su destruktiniais chondrocitais įsiterpęs į išvaržą riboje su išvaržos vakuolišku chondroidinių ląstelių klasteriu. TW x 400.

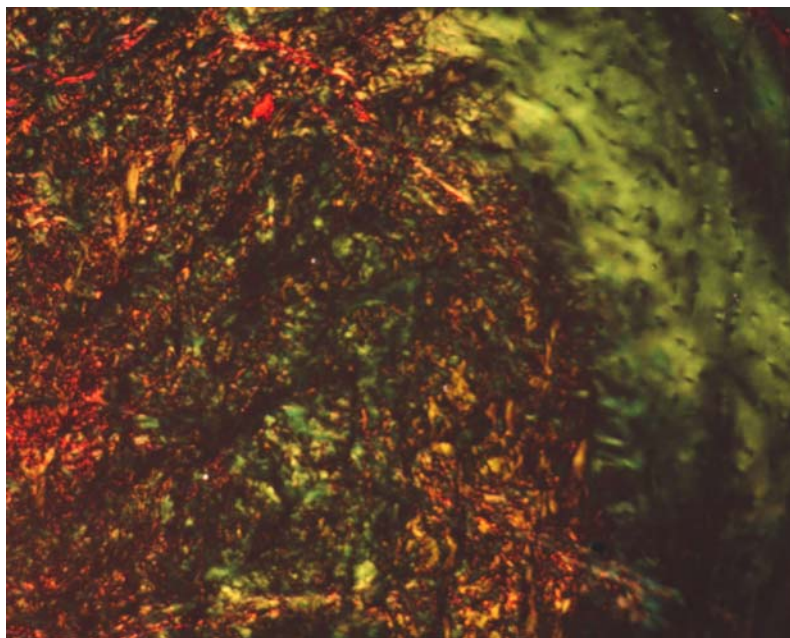


Pav. 2.4.16. Granuliacinio audinio židinys su limfocitais, histiocitais, fibroblastais ir sensorinėmis ląstelėmis ilgomis citoplazminėmis ataugomis išvaržos kraštuose. H-eo x 200.

Tuo būdu, disko jungiamasis audinys pasižymėjo degeneracijos požymių įvairove be nurodytų Protokole, papildė, jame nurodytais, tokiais kaip

kremzliniai fragmentai, išvaržos kraštų fragmentų atskilimas, didesnis matricos baltymų ir skaidulų degeneracijos laipsnis.

Morfologiniai ir histocheminiai degeneracijos požymiai nutolusiuose nuo disko sekvestruose (S grupė, n= 8). Sekvestrų degeneracijos laipsnis kiek mažesnis, nei išvaržos, bet didesnis, nei disko. Sekvestrų pjūviuose vyravo ryškiai edemiškas skaidulinis substratas dalinai ar visiškai fragmentuotos retos kolageno skaidulos ir židininės stambios granulių sankaupos, totaliai mirusiomis mažomis chodroidinėmis ląstelėmis arba klasterių detritas. II-tipo kolageno skaidulų mažėjo iki 20% daugėjant kitų tipų kolageno skaiduloms net iki 50- 80% (pav. 2.4.17). Rūgščių mucininio tipo skysčių padaugėjo labiausiai iki 2 balų tiek matricoje ir stambiuose plyšiuose.



Pav. 2.4.17. Sekvestras su degeneravusio skaidulinio žiedo elementais, sekvestro skaidulinį substratą sudaro vyraujančios kitų ir I-o kolagenų sankaupos su žaliai poliarizuojančio II-o kolageno smulkiais židinėliais. PS x 200.

Sekvestrų kraštuose pasitaikė retų uždegiminių ląstelių, tik viename gausesnis 3 skurų uždegimo židinis (limfocitai, plazminės ląstelės, histiocitai, fibroblastai). Viename sekvestre stebėjome į kraštą įaugusias nervines ataugėles, rodančias sekvestro lokalizaciją šalia nervinių šaknelių.

2.4.4. GRUPIŲ PALYGINIMAS

Analizuojant D, P ir S grupės pagal mėginio paėmimo vietą, nustatėme, kad grupės skyrėsi pagal bendrą degeneracijos (Boos N.) indeksą $D < P < S$ ($p=0.002$). Mėginiai, paimti iš disko gilumos, turėjo mažiausią degeneracijos laipsnį, laisvi sekvestrai- didžiausią. Grupės nesiskyrė pagal amžių, kolagenų koncentraciją. Grupės skyrėsi pagal Komori ind. $D < P < S$ ($p=0,001$), laisvi sekvestrai buvo toliausiai migravę nuo motininio disko. Grupės skyrėsi pagal proteoglikanų radimą $D > S > P$ ($p < 0.0001$). Grupės skyrėsi pagal mucininių skysčių radimą $D > S > P$ ($p=0,001$). Mėginiai iš disko gilumos turėjo didžiausią proteoglikanų ir mucininių skysčių kiekį. Grupės nesiskyrė pagal Pfirrmann (MRT) degeneracijos laipsnį. Magnetinis rezonansas neatspindėjo disko išvaržos biocheminės struktūros sandaros.

Pagal spektrų formos skirtumus išskyrėme dvi spektrines grupes (λ ir μ), kur λ grupėje pagal Gausinių dedamųjų piko amplitudę $\Lambda_1 > \Lambda_2 > \Lambda_3$; o μ grupėje pagal Gausinių dedamųjų piko amplitudę $\Lambda_1 > \Lambda_2 < \Lambda_3$. Į lambda grupę pateko 5 diskų (D), 7 išvaržų (P) ir 6 sekvestrų (S) fluorescencinės kreivės. Miu grupei priskyrėme 4 diskus (D), 5 išvaržas (P) ir 2 sekvestrus (S). Lambda fluorescencinę grupę sudarė diskai, išvaržos ir sekvestrai, kurių sudėtyje buvo mažai II tipo kolageno skaidulų iki 10-20%, su išimtimis iki 70% dviejuose diskuose, vienoje išvaržoje ir dviejuose sekvestruose. Bet daugėjo I ir kitų tipų kolageno skaidulų. Į miu fluorescencinę grupę pateko tie diskai, išvaržos ir sekvestrai, kuriuose iki 80% sudarė II-o tipo, ir kitų tipų kolageno skaidulos, I-o tipo skaidulas sudarė apie 10%. Analizuojant grupes pagal spektro formą nustatėme, kad grupės skyrėsi pagal kolagenų koncentraciją: kolageno I - $\lambda > \mu$ ($p=0.005$); kolageno II - $\lambda \ll \mu$ ($p < 0.0001$); kitų kolagenų - $\lambda > \mu$ ($p=0.002$). Taigi, spektro forma atspindėjo kokybinį kolagenų sąstatą disko mėginyje. Spektrinės grupės nesiskyrė pagal amžių ir pagal bendrą degeneracijos indeksą. Grupės taip pat nesiskyrė pagal Komori

indeksą, pagal randamą proteoglikanų ir pagal mucininių skysčių kiekį, pagal Pfirrmann MRT degeneracijos laipsnį.

2.5. EKSPERIMENTINĖS DALIES REZULTATŲ APITARIMAS

Kolagenai, sudarantys tarpslankstelinio disko matricą fluorescuoja apšvietus UV šviesa, skirtingų kolagenų fluorescencinės savybės skiriasi. Mūsų nustatytas λ tipo spektras būdingas mėginiams, turintiems daugiau kolageno I ir kitų kolagenų, μ spektras būdingas mėginiams, turintiems daugiau kolageno II. Kolagenas I randamas sveiko disko periferijoje arba degeneravusio disko centre. Kolagenas II randamas disko centre. λ spektras pasižymi didesne fluorescencijos amplitude, nei μ spektras. Šį reiškinį galima būtų paaiškinti tuo, kad kolageno I skaidulos yra mažiau padengtos proteoglikanais (proteoglikanai nefluorescuoja). Mažiau degeneravusiame diske, kolageno II skaidulos gausiai padengtos proteoglikanais, kurie „užmaskuoja“ fluorescenciją, todėl μ spektrai yra nuožulnesni ir mažesnės amplitudės.

Tiesioginės priklausomybės tarp spektro formos ir disko degeneracijos indekso negauta, nes sveiko disko periferijoje ir degeneravusio disko centre tikėtina gauti tokį patį λ spektrą. μ spektras labiau būdingas mėginiams kuriuose gausu kolageno antro- disko centras, mažiau degeneravęs diskas. Iš spektro formos galima tik netiesiogiai spręsti apie disko degeneraciją- nustatčius λ spektrą disko centre.

3. KLINIKINĖ DARBO DALIS

Klinikinėje šio darbo dalyje, pirmą kartą Lietuvoje, pritaikėme naują minimaliai invazyvų būdą disko išvaržos gydymui lazerio spinduliu Perkutaninę Lazerinę Disko Dekompresiją. Atrinkome pacientų grupę, tinkamą šiam gydymo metodui, atlikome operacijas, įvertinome priešoperacinius pokyčius ir sekėme pooperacinę ligonio būklę.

Klinikinės darbo dalies uždaviniai:

1. Sukurti klinikinę bazę Perkutaninei Lazerinei Disko Dekompresijai (PLDD), įvertinti indikacijas, kontraindikacijos šiai operacijai.
2. Atrinkti ligonius, tinkamus šiai operacijai, atlikti operacijas, įvertinti ligonių būklę prieš operaciją ir po operacijos. Įvertinti PLDD efektyvumą, pritaikymo galimybes.

3.1.1. PACIENTŲ ATRANKA

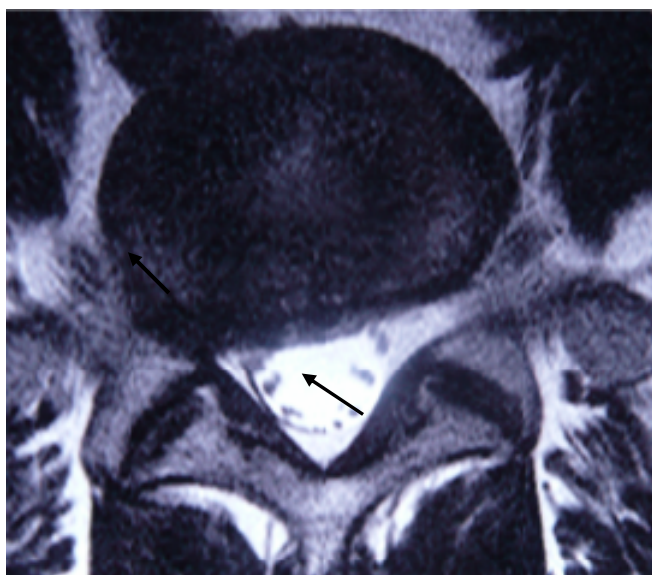
PLDD procedūrai atrenkami pacientai besiskundžiantys radikulopatiniu kojos skausmu, negavę efekto taikant konservatyvų gydymą 2 mėnesius nuo simptomų pradžios ir turintys rentgenologiškai patvirtintą disko išvaržą, atitinkančią pakenktos šaknelės lygmenį (Gangi A, 1998; Ascher PW, 1991). PLDD veikimo principas pagrįstas slėgio sumažinimu uždaroje hidraulinėje sistemoje- tarpslanksteliniam diske, todėl šiai procedūrai tinka tik pacientai, turintys nepratrūkusias ir neatsidalinusias disko išvaržas (disko protrūzijas). Sekvestro radimas yra kontraindikacija PLDD procedūrai (Liebler WA, 1995). Lazerio išgarinamas disko tūris yra nedidelis, todėl PLDD procedūroms atrenkami pacientai, kurių magnetinio rezonanso tomogramoje (MRT) stebima nežymi nervinės šaknelės kompresija, ar nervinė šaknelės kontaktas su disko išvarža. Kuomet MRT stebima išreikšta nervinės šaknelės kompresija pacientui tikslingesnė atvira disko išvaržos operacija, nes atviros operacijos metu galima

pašalinti didesnę išvaržos tūrį. Disko tarpo susėdimas >50%, segmento nestabilumas, spondilolistezė, užpakalinė kaulinė stenozė bei buvusi disko operacija taipogi yra kontraindikacijos PLDD operacijai. PLDD netinka pacientai, turintys ženklų neurologinį deficitą, *cauda equina* kompresijos sindromą, išreikštą motorinės funkcijos silpnumą ir kitas būkles, reikalaujančias neatidėliotino chirurginio gydymo, bei pacientai, turintys sisteminės uždegimines ligas, spondiloartrozę (Simons P, 1994).

3.1.2. KLINIKINĖS DALIES PACIENTŲ GRUPĖ

Pirmoji Lietuvoje Perkutaninė Lazerinė Disko Dekompresija atlikta Vilniaus Universiteto Vaikų ligoninėje 2007 gegužės 29d., operuota 14 metų pacientė dėl nepratrūkusios L4-L5 disko išvaržos. Nuo 2007 gegužės iki 2009 birželio mėn. 20 pacientų atrinkta PLDD operacijai, atliktos 24 operacijos. Operacijos atliktos VU Vaikų ligoninėje, VU Greitosios Pagalbos ligoninėje ir VU Antakalnio ligoninėje. Tarp pacientų 9 moterys, 11 vyrų, amžius nuo 14 iki 73 metų, vidutinis amžius 38,1 metų. Visi pacientai skundėsi radikulopatiniu kojos skausmu, taikytas konservatyvus gydymas nedavė efekto. Simptomų trukmė nuo 2 iki 36 mėn. vidutinė trukmė 6,75 mėn. Klinikinis ligonių ištyrimas atskleidė jutimų sutrikimus pakenktame dermatome 15 pacientų (75%), motorikos silpnumas rastas 4 pacientams (20%), Achilo reflekso nebuvimas 14 pacientų (70%). Skausmo intensyvumas prieš operaciją įvertintas pagal VAS (*Visual Assessment Analogue Scale*) skalę, gyvenimo kokybė ir neįgalumo laipsnis- pagal ODI (*Oswestry Disability Index*) klausimyną (priedas 3). VAS skausmo indeksas prieš operaciją svyravo nuo 3 iki 7 balų ramybės būsenoje (vid.- 5.0), judesio metu- nuo 5 iki 9 balų (vid.- 6.75). ODI neįgalumo indeksas svyravo nuo 20% iki 60% (vid. 47.5%). Priešoperacinis MRT ištyrimas rodė nepratrūkusią disko išvaržą, atitinkančią pakenktos nervinės šaknelės lygmenį (pav.3.1). MRT nebuvo stebėta disko sekvestracijos, kaulinės stenozės, disko tarpo susiaurėjimo požymių (atmetimo

kriterijai). Pacientams nerekomenduota PLDD, jei MRT tyrime stebima akivaizdi nervinės šaknelės kompresija, ar disko išvarža yra masyvi.



Pav.3.1. Priešoperacinė paciento MRT: nepratrūkusi disko išvarža L5-S1 lygyje, sukelia nervinės šaknelės poslinkį (strėlė), nėra ryškios nervinės šaknelės kompresijos.

3.2. PLDD OPERACIJA

Operacijoms naudota bendra priešoperacinė sedacija: *midazolam* 5 mg, injekcija į raumenis, bei vietinė punkcijos vietos nejautra, atliekama *lidocaini* 5 cm³, 0,5%. Rentgenoskopo kontrolėje L4-L5 diskas punktuotas posterolateraliniu priėjimu, L5-S1 diskas punktuotas dorsaliai šalia *dura mater* maišo. Adatos padėtis verifikuota dviejų krypčių Rentgeno kontrole. Operacijai naudotas Dornier 940 nm diodinis lazeris. Siekiant išvengti tarpslankstelinio disko perkaitimo, naudotas impulsinis režimas: impulsas 0,5s., pauzė 1,0s. Bendra sunaudota lazerio energija svyravo nuo 700 iki 1200 J, priklausomai nuo tarpslankstelinio disko dydžio (pav.3.2).

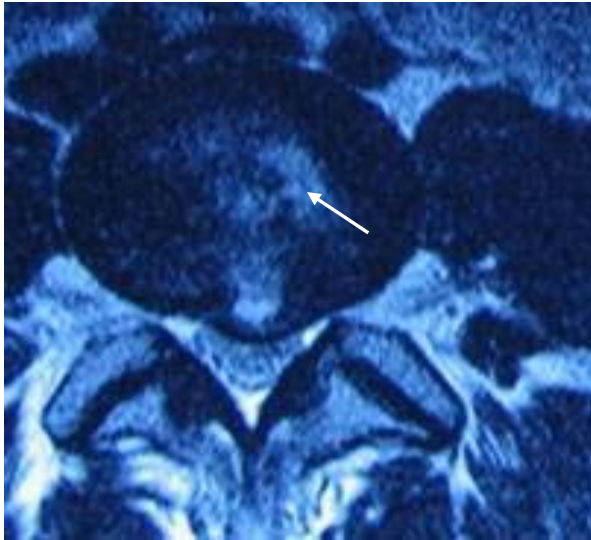


Pav.3.2. Vyksta PLDD operacija.

Vykstant operaciją, įvyko viena komplikacija, neplanuotai pradurtas *dura mater* maišas, kitų perioperacinių komplikacijų nestebėta. Hospitalizacijos laikas svyravo nuo 1 iki 5 dienų (vid. 2 dienos). Pooperacinio sekimo trukmė nuo 2 mėn. iki 27 mėn., vidutinė sekimo trukmė 12 mėn. Pooperacinis MRT ištyrimas atliktas antrą ir šėštą mėnesį po operacijos.

3.3. KLINIKINĖS DALIES REZULTATAI

Geras, ilgai trunkantis, efektas stebėtas 14 pacientų (70%), 2 pacientams (10%) negauta efekto, 1 pacientui (5%) gautas trumpalaikis efektas (truko 6 mėn.), vėliau simptomai atsinaujino, pacientas operuotas pakartotinai. 3 pacientai (15%) pajautė pagerėjimą, bet negrįžo į pilnavertį gyvenimą, neatstatė darbingumo. Po 6 mėn. - VAS ramybėje svyravo nuo 1 iki 5 (vid.1,75), judesio metu nuo 1 iki 7 balų (vid.2,6). Vidutinis VAS kritimas: ramybėje- 3.25; judesio metu- 4.15. ODI po 6 mėn. svyravo nuo 2% iki 48% (vid.ODI-18.8%); vidutinis ODI kritimas- 28.7%. Pooperaciniuose MRT tyrimuose nestebėta disko sekvestracijos ar uždegimo požymių, nestebėta ir ženklesnės rentgenologinės dinamikos (pav.3.3).



Pav. 3.3. Pooperacinis MRT vaizdas (2mėn. po operacijos) stebimas lazerio destrucijos židinis (strėlė), nėra sekvestracijų ar uždegimo požymių

3.4. KLINIKINĖS DALIES REZULTATŲ APTARIMAS

Kriterijai disko išvaržos chirurginiam gydymui nėra galutinai nustatyti, tebevyksta diskusija apie chirurginio gydymo privalumus ir trūkumus. Disko išvaržos chirurginis gydymas sukelia greitesnį simptomų regresą, leidžia greitesnę reabilitaciją ir greitesnį darbingumo atstatymą, bet sudaro tam tikrą vėlyvų komplikacijų riziką (Gibson JNA, 2007). Perkutaninė Lazerinė Disko Dekompresija (PLDD) pastaruoju metu pripažystama, kaip efektyvus, minimaliai invazyvus, chirurginis disko išvaržos gydymo būdas, taikytinas kai kurioms disko išvaržoms. Publikuota daugybė studijų apie PLDD indikacijas, lazerio tipą, sugeriamos energijos kiekį ir kt. (Schenk B, 2006). Dvi studijos yra įtrauktos į „Cochrane Collaboration“ apžvalgą, nagrinėjančią įrodymais pagrįstas publikacijas apie disko išvaržos chirurginio gydymo privalumus (Paul M, 2000; Schenk B, 2006).

Atvira disko išvaržos operacija (mikrodiskektomija) ir PLDD neturėtų būti vertinami kaip du alternatyvūs metodai gydyti tą patį pacientą, nes įtraukimo kriterijai PLDD ir atvirai operacijai skiriasi. Gydymo metodo

pasirinkimą lemia išvaržos morfologija, nustatoma MRT tyrimu. Abu metodai tūrėtų būti prieinami ir gyvuoti greta ligoninėse, kur operuojama stuburo patologija.

4. DISERTACIJOS IŠVADOS

1. Sukūrėme metodą tarpšlankstelinio disko spektroskopiniams tyrimams. Tarpšlankstelinio disko matricos fluorescencija sukeliama, sužadinus ją 355nm bangos ilgio UV lazerio šviesa. Disko matricos fluorescencija registruojama bangos ilgiuose nuo 370 - 700nm. Pagrindiniai spektro komponentai yra λ_1 - 406,9± 2,97; λ_2 - 431,9± 7,63; λ_3 - 467,5± 5,03 (Gausinio komponento pikų padėtis nm., $p < 0,0001$).
2. Tarpšlankstelinio disko autofluorescencijos fenomenas rodo medžiagas, sudarančias tarpšlankstelinio disko matricą. Skirtingos fluorescencinio spektro formos, atspindi skirtingą diskų matricų biocheminį kolagenų sąstatą ir jo kitimus degeneruojant diskui, kurie nebūtinai atitinka MRT vaizdą.
3. Pagal spektro formą galima spręsti apie kolagenų sąstatą disko mėginyje, biocheminiai kitimai tarpšlanksteliniam diske gali būti identifikuoti taikant spektrinę analizę. Pagal kolagenų sąstatą kitimą tarpšlanksteliniam diske, galima netiesiogiai spręsti apie disko degeneracijos procesą, galima sukurti diagnostinį algoritmą diagnostikai operacijos metu.
4. Lazeris gali būti naudojamas disko išvaržų gydyme. Ligoniai, turintys disko sekvestrą, pratrūkusią disko išvaržą ar masyvią subligamentinę disko išvaržą, turėtų būti operuojami atvira operacija; ligoniai, turintys nepratrūkusią disko išvaržą, nesukeliančią žymios nervinės šaknelės kompresijos, turėtų būti operuojami minimaliai invazyvine tausojamąja perkutanine lazerine disko dekompresija.

5. DISERTACIJOS APIBENDRINIMAS

Rezultatai rodo, kad autofluorescencija rodo skirtingas medžiagas sudarančias tarpslankstelinį diską. Spektrinė analizė gali nustatyti disko biocheminės struktūros kitimus, taipogi, leidžia netiesiogiai spręsti apie disko degeneracijos procesą. Pagal spektro formą galima nustatyti skirtingas kolagenų rūšis, todėl spektrinė analizė galėtų nustatyti skirtingas anatomines disko vietas.

Šalia klasikinės disko išvaržos operacijos, atsiranda naujų minimaliai invazyvių disko išvaržos gydymo būdų. Perkutaninė Lazerinė Disko Dekompresija (PLDD) pastaruoju metu pripažįstama, kaip efektyvus, minimaliai invazyvus, chirurginis disko išvaržos gydymo būdas, taikytinas kai kurioms disko išvaržoms. Atvira disko išvaržos operacija ir PLDD neturėtų būti vertinami kaip du alternatyvūs metodai gydyti tą patį pacientą, nes įtraukimo kriterijai PLDD ir atvirai operacijai skiriasi. Gydymo metodo pasirinkimą lemia išvaržos morfologija, nustatoma MRT tyrimu. Lazerinės operacijos metu tarpslankstelinis diskas pasiekiamas per adatą, histologinio tyrimo paimti negalima. Spektroskopinis ištyrimas atliktas per šviesolaidį adatoje, įvestoje į tarpslankstelinį diską, galėtų suteikti papildomos informacijos apie adatos padėtį ir užtikrinti, kad adatos galas nukreiptas į tarpslankstelinio disko substanciją.

Pašalintų tarpslankstelinio disko mėginių spektrinis tyrimas sudaro pagrindą tolimesniems degeneruojančio disko biocheminiams ir spektriniams tyrimams.

6. PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Originalios publikacijos

1. Terbetas G., Vaitkuvienė A. Perkutaninė lazerinė liumbalinio tarpšlankstelinio disko dekompresija. // Lietuvos chirurgija 2009, vol. 7(1–2), p. 35–40. ISSN 1392–0995, ISSN 1648–9942 (online).
2. Terbetas G., Kozlovskaja A., Varanius D., Graziene V., Vaitkus J., Vaitkuvienė A. Spectroscopic parameters of lumbar intervertebral disc material. // LASER FLORENCE 2008: Selected Presentations at the International Laser Medicine Congress Florence (Italy), 31 October–1 November 2008./ Proceedings of AIP Conference, vol. 1142, p. 15-20.

Publikacijos disertacijos tema

3. Terbetas G., Saniukas K., Pošiunas G, Jarzemas E. Percutaneous laser disc decompression on pediatric patient // Lasers in Medical Science. – 2008, vol. 23, no 1: Laser Florence 2007: 17th ISLSM & 22 IALMS International congress laser medicine, Florence, November 8-10, 2007: abstracts, p. 95.
4. Kozlovskaja A., Varanius D., Terbetas G., Vaitkuvienė A., Kurilčik G. Luminescence characterization of degenerative disc disease level // Lasers in Medical Science. – 2008, vol. 23, no 1: Laser Florence 2007: 17th ISLSM & 22 IALMS International congress laser medicine, Florence, November 8-10, 2007: abstracts, p. 96.

Literatūros sąrašas

1. Adams MA, Dolan P, Hutton WC (1986). The stages of disc degeneration as revealed by discograms // *J Bone Joint Surg Br.* - 1986, vol. 68, no. 1, p. 36–41.
2. Adams M A, Bogduk N, Burton K (2002). *The Biomechanics of back pain.* - Edinburgh; New York: Churchill Livingstone, 2002. - 238 p.: ill.
3. Ahn SH, Ahn MW, Byun WM (2000). Effect of the transligamentous extension of lumbar disc herniations on their regression and the clinical outcome of sciatica // *Spine.* - 2000, vol. 25, no. 4, p. 475–80.
4. Andersson GB (1999) Epidemiology of low back pain. // *Acta Orthop Scand Suppl*; vol. 69: p. 28–31.
5. Anderson GBJ (1997). The epidemiology of spinal disorders // Frymoyer JW. *The adult spine: principles and practice* / ed. T.B. Ducker et al. - 2nd. - Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997.
6. Ascher PW (1991) Laser trends in minimally invasive treatment: atherosclerosis, disk herniations// *J Clin Laser Med Surg*; vol. 9 p. 49–57.
7. Antoniou J, Steffen T, Nelson F, Winterbottom N, Hollander AP, Poole RA, Aebi M, Alini M (1996). The human lumbar intervertebral disc: evidence for changes in the biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing, and degeneration // *J Clin Invest.* - 1996, vol. 98, issue 4, p. 996–1003.
8. Arai Y, Yasuma T, Shitoto K, et al. (2000) Immunohistological study of intervertebral disc herniation of lumbar spine. // *J Orthop Sci* vol. 5, p. 229–31.
9. Autio RA, Karppinen J, Niinimäki J, Ojala R, Kurunlahti M, Haapea M, Vanharanta H, Tervonen O (2006). Determinants of spontaneous resorption of intervertebral disc herniations // *Spine.* - 2006, vol. 31, no. 11, p. 1247–1252.
10. Baltramiejūnas R (1986). *Lazeriai ir jų „profesijos“.* – V.: Mokslas, p.1986.– 88.
11. Battie MC, Videman T (2006). Lumbar disc degeneration: epidemiology and genetics // *J Bone Joint Surg Am.* - 2006, vol. 88, no. 1, p. 3-9.
12. Benneker LM, Heini PF, Anderson SE, Alini M, Ito K(2005). Correlation of radiographic and MRI parameters to morphological and biochemical assessment of intervertebral disc degeneration // *Eur Spine J.* - 2005, vol. 14, no. 1, p. 27.
13. Boos N, Dreier D, Hilfiker E, et al. (1997). Tissue characterization of symptomatic and asymptomatic disk herniations by quantitative magnetic resonance imaging // *J Orthop Res.* -1997, vol. 15, no. 1, p. 141–149.

14. Boos N, Weissbach S, Rohrbach H, Weiler C, Spratt KF, Nerlich AG (2002). Classification of age-related changes in lumbar intervertebral discs: 2002 Volvo Award in basic science // *Spine*. - 2002, vol. 27, no. 23, p. 2631–2644.
15. Carreon LY, Ito T, Yamada M, et al. (1997). Neovascularization induced by annulus and its inhibition by cartilaginous endplate. Its role in disc absorption // *Spine*. - 1997, vol. 22, no. 13, p. 1429–1434.
16. Casper GD, Hartman VL, Mullins LL.(1996) Results of a clinical trial of the holmium: YAG laser in disc decompression utilizing a side-firing fiber: a two-year follow-up. // *Lasers Surg Med* vol. 19, p. 90–96.
17. Chelberg MK, Banks GM, Geiger DF, Oegema TR Jr (1995). Identification of heterogeneous cell populations in normal human intervertebral disc // *J Anat*. - 1995, vol. 186, no. 1, p. 43-53.
18. Choy DS, Altman P (1995) Fall of intradiscal pressure with laser ablation. // *J Clin Laser Med Surg* vol. 13(3), p. 149–151
19. Choy DSJ. (2003) Percutaneous laser disc decompression: a practical guide. New York: Springer-Verlag.
20. Choy DSJ, Michelsen J, Getrajdman D, et al. (1992) Percutaneous laser disc decompression: an update: spring 1992.// *J Clin Laser Med Surg*; vol. 10 p.177–84.
21. Delauche-Cavallier MC, Budet C, Laredo JD, et al. (1992). Lumbar disc herniation. Computed tomography scan changes after conservative treatment of nerve root compression // *Spine*. - 1992, vol.17, no. 8, p. 927–933.
22. Deyo RA, Weinstein JN.(2001) Low back pain. // *N Engl J Med* vol. 344, p. 363–70.
23. Deyo RA, Tsui-Wu YJ. (1987) Descriptive epidemiology of low-back pain and its related medical care in the United States.// *Spine* vol. 12, p. 264–268.
24. Doita M, Kanatani T, Harada T, et al. (1996) Immunohistologic study of the ruptured intervertebral disc of the lumbar spine. // *Spine* vol. 21, p. 235–41.
25. Eastwood H, Cole KR. (1971). Staining of amyloid by buffered Congo red in 50% ethanol. // *Stain Technology* 1971; vol. 46, p. 208-09.
26. Edgar MA, Ghadially JA. (1976) Innervation of the lumbar spine. // *Clin Orthop Res* vol. 115, p. 35–41.
27. Eyre D, Paz M, Gallop P (1984). Cross-linking in collagen and elastin // *Annu Rev Biochem*. - 1984, vol. 53, p. 717–748.

28. Fardon DF, Milette PC (2001). Nomenclature and classification of lumbar disk pathology: recommendations of the combined task forces of the North American Spine society, American society of spine radiology, and American society of neuroradiology // *Spine*. - 2001, vol. 26, no. 5, p. E93–E113.
29. Fletcher G, Haughton VM, Ho KC, Yu SW (1990). Agerelated changes in the cervical facet joints: studies with cryomicrotomy, MR, and CT // *Am J Roentgenol*. - 1990, vol. 154, no 4, p. 817–820.
30. Freemont AJ, Peacock TE, Goupille P, Hoyland JA, O'Brien J, Jayson MIV (1997). Nerve ingrowth into diseased intervertebral disc in chronic back pain // *Lancet*. - 1997, vol. 350, no. 9072, p. 178-181.
31. Gangi A, Guth S, Dietemann J-L, et al. (1998) Interventional radiology with laser in bone and joint// *Radiol Clin North Am*; vol.36, p. 547–56.
32. Gevargez A, Groenemeyer DW, Czerwinski F, et al. (2000) CT-guided percutaneous laser disc decompression with Ceralas D, a diode laser with 980-nm wavelength and 200-microm fiber optics. // *Eur Radiol* vol. 10, p. 1239–41.
33. Gibson JNA, Waddell G (2007). Surgical interventions for lumbar disc prolapse: updated cochrane review // *Spine*. - 2007, vol. 32, no. 16, p. 1735-1747.
34. Greenfield K, Nelson RJ, Findlay GD, Egger M, Sanford E.(2003) Microdiscectomy and conservative treatment for lumbar disc herniation with back pain and sciatica: a randomised clinical trial. // *Proceedings of the International Society for the Study of the Lumbar Spine*. 2003: 245.
35. Grunhagen T, Wilde G, Soukane DM, Shirazi-Adl SA, Urban JPG (2006). Nutrient supply and intervertebral disc metabolism // *J Bone Joint Surg Am*. - 2006, vol. 88, suppl. 2, p. 30-35.
36. Guinot B, Fessler RG (2000). Molecular biology of degenerative disc disease // *Neurosurgery*. - 2000, vol. 47, no. 5, p. 1034-1040.
37. Haro H, Crawford HC, Fingleton B, MacDougall JR, Shinomiya K, Spengler DM. et al.(2000) Matrix metalloproteinase-3-dependent generation of a macrophage chemoattractant in a model of herniated disc resorption. // *J Clin Invest* vol. 105, p. 133- 41.
38. Haro H, Crawford HC, Fingleton B, Shinomiya K, Spengler DM, Matrisian LM. (2000) Matrix metalloproteinase-7-dependent release of tumor necrosis factor-? in a model of herniated disc resorption. // *J Clin Invest* vol. 105, p. 143-50.
39. Haro H, Shinomiya K, Komori H, Okawa A, Saito I, Miyasaka N, et al. (1996) Upregulated expression of chemokines in herniated nucleus pulposus resorption. // *Spine* vol. 21, p. 647-52.

40. Heliövaara M, Vanharanta H, Korpi J, Troup JD (1986). Herniated lumbar disk syndrome and vertebral canals // *Spine*. - 1986, vol. 11, no 5, p. 433–435.
41. Hirsch C.(1948). An attempt to diagnose the level of a disc lesion clinically by disc puncture // *Acta Orthop*. - 1948, vol. 18, p. 132-140.
42. Hoell T, Huschak G, Beier A, Huttmann G, Minkus Y, Holzhausen HJ, Meisel HJ (2006). Auto fluorescence of intervertebral disc tissue: a new diagnostic tool // *Eur Spine J*. - 2006, vol. 15, suppl. 3, p. S345–S353.
43. Horton WC, Daftari TK. (1992) Which disc as visualized by magnetic resonance imaging is actually a source of pain? A correlation between magnetic resonance imaging and discography. // *Spine* vol.17, p. 164–71.
44. Ikeda T, Nakamura T, Kikuchi T, et al. (1996) Pathomechanism of spontaneous regression of the herniated lumbar disc: histologic and immunohistochemical study. // *J Spinal Disord* vol. 9, p. 136–40.
45. Ito M, Incorvaia KM, Yu SF, et al.(1998) Predictive signs of discogenic lumbar pain on magnetic resonance imaging with discography correlation. // *Spine*; vol. 23, p.1252–60.
46. Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR (1979). Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections// *Histochem J*-1979; vol. 11, p. 447-55.
47. Karenauskaitė V, Bagdonas S, Streckytė G, Butrimaitė J, Rotomskis R (2002) Biomedicinos fizika kolegijų studentams. // Vilnius: Vilniaus kolegija, 2002. p. 114-118 p.
48. Kasten F (1993). Introduction of fluorescent probes: properties, history and applications // *Fluorescent and luminescent probes for biological activity* i ed by W Mason. – [S.l.]: Elsevier, 1993. - P. 12–34.
49. Kawakami M, Tamaki T, Hayashi N, Hashizume H, Nishi H. (1998) A possible mechanism of painful radiculopathy in lumbar disc herniation. // *Clin Orthop* vol. 351, p. 241-51.
50. Komori H, Shinomiya K, Nakai O, et al. (1996). The natural history of herniated nucleus pulposus with radiculopathy // *Spine*. - 1996, vol. 21, no. 2, p. 225–229.
51. Lakowicz JR (2006). Principles of fluorescence spectroscopy. - 3rd ed. - New York: Springer, 2006. - 954 p.
52. Liebler WA (1995) Percutaneous laser disc nucleotomy// *Clin Orthop*; vol. 310 p.58–66.
53. Lindblom K. (1948) Diagnostic puncture of intervertebral discs in sciatica // *Acta Orthop Scand*. - 1948, vol. 17, no. 3-4, p. 231-239.

54. Lipson SJ, Muir H. (1981) 1980 Volvo award in basic science: Proteoglycans in experimental intervertebral disc degeneration. // *Spine* vol. 6, p. 194–210.
55. Melrose J, Ghosh P, Taylor TK (2001). A comparative analysis of the differential spatial and temporal distributions of the large (aggrecan, versican) and small (decorin, biglycan, fibromodulin) proteoglycans of the intervertebral disc // *J Anat.* - 2001, vol. 198, pt. 1, p. 315.
56. Milette PC. (1997) The proper terminology for reporting lumbar intervertebral disk disorders. // *AJNR Am J Neuroradiol* vol. 18, p. 1859–1866.
57. Mochida K, Komori H, Okawa A, et al. (1998). Regression of cervical disc herniation observed on magnetic resonance images // *Spine.* - 1998, vol. 23, no. 9, p. 990–997.
58. Moneta GB, Videman T, Kaivanto K, et al. (1994) Reported pain during lumbar discography as a function of annular ruptures and disc degeneration: A reanalysis of 833 discograms. // *Spine* vol. 19, p. 1968–74.
59. Mooney V. (1987) Where is the pain coming from? // *Spine*; vol. 12 p. 754–9.
60. Nachemson AL. (1976) The lumbar spine an orthopedic challenge. *Spine* vol. 1 p. 59–71.
61. Ogata K, Whiteside LA. (1981) 1980 Volvo award winner in basic science: Nutritional pathways of the intervertebral disc—An experimental study using hydrogen washout technique. // *Spine* vol. 6, p. 211–216.
62. Olmarker K, Rydevik B (1991). Pathophysiology of sciatica // *Orthop Clin North Am.* - 1991, vol. 22, no. 2, p. 223–234.
63. Olmarker K, Rydevik B, Nordborg C.(1993) Autologous nucleus pulposus induces neurophysiologic and histologic changes in porcine cauda equina nerve roots. // *Spine* vol. 18, p. 1425–1432.
64. Panagiotacopoulos ND, Pope MH, Krag MH, Block R (1987). Water content in human intervertebral discs. Part I. Measurement by magnetic resonance imaging // *Spine.* - 1987, vol. 12, no. 9, p. 918–924.
65. Paul M, Hellinger J (2000) Nd-YAG (1064nm) versus diode (940nm) PLDN: a prospective randomised blinded study.// *Proceedings of the First Interdisciplinary World Congress on Spinal Surgery and related disciplines.* 2000 p. 555-558.
66. Pearce RH, Grimmer BJ, Adams ME. (1987) Degeneration and the chemical composition of the human lumbar intervertebral disc. // *J Orthop Res* vol. 5, p. 198–205.

67. Pearce RH, Thompson JP, Bebault GM (1991). Magnetic resonance imaging reflects the chemical changes of aging degeneration in the human intervertebral disk // *J Rheumatol Suppl.* - 1991, vol. 27, p. 42–3.
68. Pfirrmann Ch, Dora C, Schmid M, Zanetti M, Hodler J, Boos N. (2004). MR Image-based Grading of Lumbar Nerve Root Compromise due to Disk Herniation: Reliability Study with Surgical Correlation // *Radiology.* - 2004, vol. 230, no. 2, p. 583–588.
69. Pfirrmann CW, Metzdorf A, Zanetti M, Hodler J, Boos N (2001) Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration // *Spine.* - vol. 26, no. 17, p. 1873–1878.
70. Porter RW, Hibbert CS, Wicks M. (1978) The spinal canal in symptomatic lumbar disk lesions // *J Bone Joint Surg Br.* - 1978, vol. 60-B, no. 4, p. 485–487.
71. Pritzker KP. (1977) Aging and degeneration in the lumbar intervertebral disc. // *Orthop Clin North Am* vol. 8, p. 66–77.
72. Puchtler H, Waldrop FS, Valentine LS (1973). Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red FBA// *Beitr Path* 1973; vol. 150, p.174-87.
73. Resnick D (1985). Degenerative diseases of the vertebral column // *Radiology.* - 1985, vol. 156, no. 1, p. 3–14.
74. Roberts S, Evans H, Trivedi J, Manage J (2006). Histology and pathology of the human intervertebral disc // *J. Bone Joint Surg Am.* - 2006, vol. 88, suppl. 2, p. 10- 14.
75. Roberts S, Menage J, Urban JPG (1989). Biochemical and structural properties of the cartilage endplate and its relation to the intervertebral disc // *Spine.* - 1989, vol. 14, no. 2, p. 166174.
76. Roberts S, Menage J, Duance V, Wotton S, Ayad S (1991). Volvo award in basic sciences: Collagen types around the cells of the intervertebral disc and cartilage end plate: An immunolocalization study // *Spine.* - 1991, vol. 16, no. 9, p. 1030-1038.
77. Roberts S, Caterson B, Menage J, Evans EH, Jaffray DC, Eisenstein SM (2000). Matrix metalloproteinases and aggrecanase: their role in disorders of the human intervertebral disc // *Spine.* - 2000, vol. 25, no. 23, p. 30053013.
78. Rothoerl R, Woertgen C, Holzschuh M, et al. (1998) Macrophage tissue infiltration, clinical symptoms, and signs in patients with lumbar disc herniation. A clinicopathological study on 179 patients // *Acta Neurochir (Wien).* - 1998, vol. 140, p. 1245–1248.

79. Rotomskis R, Bagdonas S, Valančiūnaitė J (2007) Biofotonika. 2007 Vilnius Universiteto leidykla. ISBN: 978-9955-33-072-1, p.166
80. Rotomskis R, Streckytė G (2007). Fluorescencinė diagnostika medicinoje. - Vilnius: Vilniaus universiteto leidykla, 2007. - 182 p.: iliustr.
81. Saal JA, Saal JS, Herzog RJ (1990). The natural history of lumbar intervertebral disc extrusions treated nonoperatively // Spine. - 1990, vol. 15, no. 7, p. 683–6.
82. Saifuddin A, Braithwaite I, White J, et al. (1998) The value of lumbar spine magnetic resonance imaging in the demonstration of anular tears. // Spine vol. 23, p. 453–7.
83. Salminen JJ, Erkintalo MO, Pentti J (1999). Recurrent low back pain and early disc degeneration in the young. // Spine. - 1999, vol. 24, no. 13, p. 1316–1321.
84. Schenk B (2006) Percutaneous laser disc decompression is more cost-effective than conventional surgical treatment for lumbar disc herniation and allows faster patient rehabilitation, while long-term results are comparable. ISRCTNR25884790.
85. Schenk B, Brouwer PA, Peul WC, van Buchem MA (2006) Percutaneous Laser Disk Dekompression: A Review of the Literature // Am J Neuroradiol vol. 27 p. 232-235.
86. Schmidt MB, Mow VC, Chun LE, Eyre DR. (1990) Effects of proteoglycan extraction on the tensile behavior of articular cartilage.// J Orthop Res vol. 8, p. 353–363.
87. Shvartzman L, Weingarten E, Sherry H, Levin S, Persaud A(1992). Cost-effectiveness analysis of extended conservative therapy versus surgical intervention in the management of herniated lumbar intervertebral disc // Spine. - 1992, vol. 17, no. 2, p. 176–182.
88. Simons P, Lensker E, von Wild K (1994) Percutaneous nucleus pulposus denaturation in treatment of lumbar disc protrusions: a prospective study of 50 neurosurgical patients// Eur Spine J; vol. 3 p.219–21.
89. Steiner P, Zweifel K, Botnar R, et al. (1998) MR guidance of laser disc decompression: preliminary in vivo experience. // Eur Radiol vol. 8, p. 592–97.
90. Stevens RL, Ryvar R, Robertson WR, O'Brien JP, Beard HK (1982). Biological changes in the annulus fibrosus in patients with lowback pain // Spine. - 1982, vol. 7, p. 223–233, 1982.
91. Sztrolovics R, Alini M, Roughley PJ, Mort JS (1997). Aggrecan degradation in human intervertebral disc and articular cartilage // Biochem J. - 1997, vol. 326, pt. 1, p. 235-241.

92. Takada E, Takahashi M, Shimada K (2001). Natural history of lumbar disc hernia with radicular leg pain: Spontaneous MRI changes of the herniated mass and correlation with clinical outcome // *J Orthopaed Surg.* - 2001, vol. 9, no. 1, p. 1–7.
93. Takaishi H, Nemoto O, Shiota M, Kikuchi T, Yamada H, Yamagishi M, Yabe Y (1997). Type-II collagen gene expression is transiently up-regulated in experimentally induced degeneration of rabbit intervertebral disc // *J Orthop Res.* - 1997, vol. 15, no. 4, p. 528–538.
94. Teplick JG, Haskin ME(1985). Spontaneous regression of herniated nucleus pulposus // *Am J Roentgenol.* - 1985, vol. 145, no. 2, p. 371–375.
95. Terti M, PaaJanen H, Laato M, Aho H, Komu M, Kormanc M (1991). Disc degeneration in magnetic resonance imaging. A comparative biochemical, histologic, and radiologic study in cadaver spines // *Spine.* - 1991, vol. 16, no 6, p. 629–634.
96. Thompson JP, Pearce RH, Schechter MT, et al.(1990) Preliminary evaluation of a scheme for grading the gross morphology of the human intervertebral disc // *Spine.* - 1990, vol. 15, no. 5, p. 411–415.
97. Twomey LT, Taylor JR (1987). Age changes in lumbar vertebrae and intervertebral discs // *Clin Orthop Relat Res.* - 1987, vol. 224, p. 97-104.
98. Urban JP, McMullin JF (1988). Swelling pressure of the lumbar intervertebral discs: influence of age, spinal level, composition and degeneration // *Spine.* - 1988, vol. 13, no. 2, p. 179-187.
99. Videman T., et al. (1998). Intragenic polymorphisms of the vitamin D receptor gene associated with intervertebral disc degeneration // *Spine.* - 1998, vol. 23, no. 23, p. 2477-2485.
100. Virri J, Gronblad M, Seitsalo S, et al. (2001). Comparison of the prevalence of inflammatory cells in subtypes of disc herniations and associations with straight leg raising // *Spine.* - 2001, vol. 26, no. 21, p. 2311–2315.
101. Weber H. (1983) Lumbar disc herniation. A controlled, prospective study with ten years of observation. *Spine* vol. 8(2), p. 131-40.
102. Weinstein JN, Tosteson TD, Lurie JD, Tosteson ANA, Hanscom B, Skinner JS, et al. (2006) Surgical vs nonoperative treatment for lumbar disk herniation. The Spine patient outcomes research trial (SPORT): a randomized trial. // *JAMA* vol. 296(20), p. 2451-9.
103. Wisneski RJ, Garfin SR, Rothman RH.(1992) Lumbar disc disease. In: Rothman RH, Simeone FA, editors. *The spine*, vol. 671. Philadelphia,PA: Saunders.
104. Yasuma T, Makino E, Saito S, Inui M (1986). Histological development of intervertebral disc herniation // *J Bone Joint Surg Am.* - 1986, vol. 68, no. 7, p. 1066-1072.

105. Yasuma T, Koh S, Okamura T and Yamauchi Y. (1990) Histological changes in aging lumbar intervertebral discs. Their role in protrusions and prolapses // *J Bone Joint Surg Am*. Vol. 72 p. 220-229.
106. Yu S, Houghton VM, Sether LA, Ho KC, Wagner M (1989). Criteria for classifying normal and degenerated lumbar intervertebral disks // *Radiology*. - 1989, vol. 170, no. 2, p. 523–536.
107. Yu SW, Sether L. A., Ho P. S., Wagner M., Houghton V. M. (2005). Tears of the annulus fibrosus: correlation between MR and pathologic findings in cadavers // *Am J Neuroradiol*. – 1998, vol. 9, no. 2, p. 367– 370.

Priedas Nr. 1

MODIFIKUOTAS LUMBARINIŲ DISKŲ DEGENERACIJOS HISTOLOGINIO GRADAVIMO PROTOKOLAS

Sagitaliniuose parafino pjūviuose dažytuose HE, Toluidino mėliu, Safraninu O, Alciano mėliu-PAS, Pikrosirium, Kongo raudonuoju*

Intervertebrarinis (slankstelinis) diskas	Gama-met+	Alc.m.-PAS	PS
Kongo r. (n.pulposus/ann.fibrosus) plyš.) (II/I/kiti kol.)		(L, Mx)	(L, Mx)

Ląstelės (chondrocitų proliferacija)

- 0 = proliferacijos nėra
- 1 = padidėjęs ląstelių tankis
- 2 = ryšys tarp 2-jų chondrocitų
- 3 = mažų ląstelių klonai (kelios chondrocitų
- 4 = vidut.dydžio klonai (>8 ląstelių)
- 5 = stambūs klonai (15 ląstelių)
- 6 = randai/audinio defektai

Gleivinė degeneracija

- 0 = nėra
- 1 = retai pasitaiko
- 2 = yra vidut.kiekiu
- 3 = yra gausiai
- 4 = randai/audinio defektai

Ląstelių mirtis

- 0 = nėra
- 1 = pasitaiko retai
- 2 = yra vidut.kiekiu
- 3 = gausi
- 4 = randai/audinio defektai

Skysčiai ir plyšiai

- 0 = nėra
- 1 = pasitaiko retai
- 2 = yra vidutiškai
- 3 = yra gausiai
- 4 = randai/plyšiai

Granuliaciniai pokyčiai

- 0 = nėra
- 1 = pasitaiko retai
- 2 = yra vidut.kiekiu
- 3 = yra gausiai
- 4 = randai/

Maximum: 22 balai

*Boos N, Wessbach S, Rohrbach H, Weiler C, Spratt KF, Nerlich AG (2002)
Classification of age related changes in lumbar intervertebral discs: 2002 Volvo
Award in basic science. Spine 27(23): 2631-2644.

ASMENS INFORMAVIMO FORMA

Biomedicininio tyrimo pavadinimas Stuburo tarpslankstelinio disko degeneracijos spektrofotometriniu tyrimas

Protokolo numeris, versija DDS1, versija 2

Paciento vardas, pavardė

Paciento numeris

Tyrėjo vardas, pavardė

Gerbiami pacientai. Norėtume pakviesti Jus dalyvauti tyrime: „**Stuburo tarpslankstelinio disko degeneracijos spektrofotometriniu tyrimas**“. Dalyvavimas tyrime yra visiškai savanoriškas. Svarbu, kad prieš apsisprendami, suprastumėte, kodėl ir kaip šis tyrimas atliekamas. Tyrimo rezultatai bus labai svarbūs gydytojams, padės geriau suprasti tarpslankstelinio disko vykstančius pokyčius. Prašome Jūsų atidžiai perskaityti šią informaciją. Kai gydytojas paaiškins Jums apie tyrimą ir Jūs nuspręsite jame dalyvauti, paprašysime Jūsų pasirašyti sutikimo formą. Jūs turite teisę atsisakyti dalyvauti arba pasitraukti iš tyrimo bet kuriuo metu, ir šis atsisakymas niekaip neįtakos Jūsų tolimesnės medicininės priežiūros. Šiam tyrimui pritarė **Lietuvos bioetikos komitetas**.

Tyrimo tikslai: 1) ištirti paciento klinikinę būklę prieš tarpslankstelinio disko operaciją, ištirti tarpslankstelinio disko rentgenologinį vaizdą (rentgeno nuotraukos, magnetinio rezonanso tomografija); 2) ištirti operacijos metu pašalinto tarpslankstelinio disko savybes (spektrofotometriniu ir histologiniu tyrimais).

Tyrimė gali dalyvauti visi pacientai, kuriems konsultacijos metu gydytojas neurochirurgas nustatė tarpslankstelinio disko patologiją ir atrinko Jus gydyti operaciniu būdu. Į tyrimą numatoma įtraukti 100 abiejų lyčių asmenų.

Kviečiame Jus dalyvauti šiame tyrime.

Tyrimo metu:

1. Jūsų ligos trukmė, būklė prieš operaciją bus vertinama pagal jums pateiktą klausimyną. Pildydami klausimyną užtruksite 10-20min.
2. Bus atliktos jūsų stuburo rentgeno nuotraukų ir magnetinio rezonanso tomogramų kopijos, bei atliktas jų vertinimas.
3. Iš operacijos protokolo bus nustatyta tiksli jūsų disko išvaržos anatomicinė padėtis.
4. Operacijos metu pašalintas tarpslankstelinio disko fragmentas bus tiriamas spektrofotometrijos (apšviečiant audinį tam tikra šviesa) ir histologijos (stebint audinį per mikroskopą) būdu.

Tyrimo nauda

Dalyvavimas tyrime yra naudingas, nes Jūsų operacijos metu pašalinta disko išvarža bus tiriama visiškai naujais tyrimo metodais (spektrofotometriškai), kuriuos artimiausiu metu ruošiamės pritaikyti kasdieninėje gydymo praktikoje. Papildomas jūsų disko išvaržos ištyrimas padės mums geriau suprasti patologinius pakitimus tarpšlanksteliniam diske ir jų atitikimą ligos simptomams.

Galimi tyrimo nepatogumai: Sugaištas laikas 10-20min.

Galima rizika bei žala

Šio tyrimo objektas yra Jūsų gyvenimo kokybė ir stuburo būklė prieš operaciją, bei tarpšlankstelinio disko kurį jums numatoma šalinti medžiaga. Šiems pokyčiams tirti bus naudojami tiksliai neinvaziniai metodai (apklausa, jūsų rentgeno nuotraukos, branduolinio magnetinio rezonanso tomograma, operacijos metu pašalintos medžiagos papildomas ištyrimas). Jums nebus skirtas papildomas medikamentinis, operacinis ar kitas invazinis gydymas, todėl dalyvaujant tyrime rizikos ir žalos nenumatoma. Jūs galite bet koku metu pasitraukti iš tyrimo ir šis atsisakymas neįtakos tolimesnės medicininės priežiūros.

Jūsų konfidencialumo užtikrinimas

Jūsų konfidencialumas garantuojamas. Jokiuose biomedicininio tyrimo dokumentuose (išskyrus Informuoto asmens sutikimo formą) Jūsų vardas ir pavardė nebus nurodomi. Tyrimui naudojamose anketose Jūs būsite identifikuojamas tik specialiu numeriu, pagal kurį asmens tapatybę galės nustatyti tik tyrime dalyvaujantis pagrindinis tyrėjas. Koduota informacija apie asmens sveikatą nebus teikiama kitiems asmenims. Publikuojant tyrimo rezultatus, bus pateikiama tik apibendrinta informacija, nebus skelbiama jokia konfidenciali informacija apie tiriamuosius asmenis. Iš mokslinių publikacijų ar skelbiamų biomedicininio tyrimo duomenų nebus galima identifikuoti tiriamųjų asmenų. Tyrimo dokumentai bus saugomi 5 metus, už jų saugojimą atsakingas pagrindinis tyrėjas.

Kompensacija ar užmokestis už dalyvavimą tyrime

Už dalyvavimą tyrime mokama nebus.

Tyrimo nauda tyrėjams **bus tik mokslinė**. Jokios finansinės naudos už tyrimą tyrėjai negaus.

Papildomos informacijos teikimas

Už šį tyrimą atsakingas tyrėjas yra gyd. Gunaras Terbetas. Jei Jums iškiltų bet kokių klausimų dėl šio tyrimo, prašome susisiekti su juo telefonu: +370-5-2362128, arba +370-687-43481.

Jūs taip pat galite kreiptis į nešališkus trečiuosius asmenis:

Dr. E. Gefeną, Lietuvos bioetikos komiteto pirmininką, tel./faks.: 8-5-2124565, Vilniuje.

INFORMUOTO ASMENS SUTIKIMAS

Perskaičiau šią informaciją ir supratau tyrimo „**Stuburo tarpšlankstelinio disko degeneracijos spektrofotometrinis tyrimas**“ tikslus ir metodus. Turėjau galimybę

pateikti klausimus; į visus klausimus man buvo suprantamai atsakyta. Pasirašydamas šią formą, aš duodu sutikimą dalyvauti šiame tyrime.

Man bus duota šios informacijos ir pasirašytos sutikimo formos kopija. Pasirašydamas šią sutikimo formą, aš neatsisakau jokių savo įstatymais numatytų teisių.

Paciento vardas, pavardė (didžiosiomis raidėmis) ir parašas:

Data _____

Tyrėjo vardas, pavardė (didžiosiomis raidėmis) ir parašas:

GUNARAS
TERBETAS _____

Data

Priedas Nr. 3

KLAUSIMYNAS (Pildo Pacientas) Įrašykite ar pažymėkite teisingą atsakymą (→)

Jūsų gimimo data..... **Amžius**.....
Lytis Vyras Moteris **Ar rūkote (rūkėte ankščiau)?** Taip
 Ne

Kiek laiko jums skauda juosmenį?(metai, mėnesiai, savaitės)

Kiek laiko jums skauda koją?(metai, mėnesiai, savaitės)

Kokį darbą dirbote iki susirgdamas?

sėdimas nefizinis lengvas fizinis sunkus fizinis labai sunkus fizinis darbas

Ar jūsų pirmos eilės giminės sirgo stuburo ligomis (tėvai, broliai, seserys)?

Taip Ne Nežinau

VAS Skalė

Tarkime, kad skausmas sugraduotas 10 balų sistema, kuomet 1balas- tai tik nemalonus pojūtis, 10balų- tai baisiausias skausmas kurį galima įsivaizduoti. Kaip stipriai jums skauda?

Ramybės būsenoje 1b 2b 3b 4b 5b 6b 7b 8b 9b 10b

Judesio būsenoje 1b 2b 3b 4b 5b 6b 7b 8b 9b 10b

Gyvenimo kokybės įvertinimas

Pagal Oswestry Disability Index 2.0

Prašome užpildyti šį klausimyną, jis suteiks mums informacijos, kaip jūsų juosmens (kojos) skausmai paveikė jūsų kasdieninį gyvenimą ir galimybę apsitarnauti. Atsakykite kiekvieną klausimą, apibraukite **vieną atsakymą** kuris labiausiai atspindi jūsų savijautą **šiandien**.

1. Skausmo intensyvumas

- Man šiuo metu neskauda
- Skausmas labai lengvas
- Vidutiniškai skauda
- Skauda intensyviai
- Labai stipriai skauda
- Baisiausias skausmas, kurį galima įsivaizduoti

2. Asmeninė priežiūra (nusiprausti, apsirengti ir kt.)

- Aš galiu save prižiūrėti nesukeldamas papildomo skausmo
- Aš galiu save prižiūrėti, bet tai sukelia skausmus
- Man skausminga save prižiūrėti, todėl atlieku viską lėtai ir atsargiai
- Man reikia pagalbos, bet daugumą asmeninės priežiūros atlieku pats
- Man reikia pagalbos kasdien užtikrinant asmeninę priežiūrą
- Aš negaliu apsirengti, sunku nusiprausti, guliu lovoje

3. Svorio kėlimas

- Aš galiu kelti sunkius daiktus, tai nesukelia papildomo skausmo
- Aš galiu kelti sunkius daiktus, bet tai sukelia skausmą
- Dėl skausmo negaliu kelti sunkių daiktų nuo grindų, bet galiu kelti sunkumą patogame aukštyje (pvz.: nuo stalo)
- Dėl skausmo negaliu kelti sunkių daiktų, bet galiu kelti lengvus ir vidutinio svorio daiktus patogiam aukštyje
- Galiu kelti tik lengvus daiktus
- Negaliu kelti ar nešti jokių daiktų

4. Vaikščiojimas (ėjimas)

- Skausmas netrukdo eiti bet kokią distanciją
- Skausmas neleidžia nueiti daugiau nei 1,5km.
- Skausmas neleidžia nueiti daugiau nei 400m.

- Skausmas neleidžia nueiti daugiau nei 100m.
 - Galiu vaikščioti tik pasiremdamas lazdele ar ramentais
 - Daugumą laiko guliu lovoje, sunkiai nusigaunu iki tualetu
- 5. Sėdėjimas**
- Galiu sėdėti betkokioje kėdėje kiek tik noriu
 - Galiu sėdėti savo mėgstamoje kėdėje kiek tik noriu
 - Dėl skausmo negaliu sėdėti ilgiau nei 1valandą
 - Dėl skausmo negaliu sėdėti ilgiau nei pusę valandos
 - Dėl skausmo negaliu sėdėti ilgiau nei 10min.
 - Dėl skausmo išvis negaliu sėdėti
- 6. Stovėjimas**
- Galiu stovėti kiek tik noriu, tai nesukelia skausmo
 - Galiu stovėti kiek tik noriu, bet tai sukelia skausmą
 - Dėl skausmo negaliu stovėti ilgiau nei 1valandą
 - Dėl skausmo negaliu stovėti ilgiau nei pusę valandos
 - Dėl skausmo negaliu stovėti ilgiau nei 10min.
 - Dėl skausmo išvis negaliu stovėti
-
- Dėl skausmo miegu mažiau nei 6val.
 - Dėl skausmo miegu mažiau nei 4val.
 - Dėl skausmo miegu mažiau nei 2val.
 - Dėl skausmo išvis negaliu miegoti
- 8. Lytinis gyvenimas (jei pritaikoma)**
- Mano lytinis gyvenimas normalus, papildomo skausmo nesukelia
 - Mano lytinis gyvenimas normalus, bet sukelia papildomą skausmą
 - Mano lytinis gyvenimas beveik normalus, bet sukelia stiprų skausmą
 - Mano lytinis gyvenimas ženkliai suvaržytas skausmo
 - Mano lytinis gyvenimas beveik nevyksta dėl skausmo
 - Skausmas išvis neleidžia turėti lytinių santykių
- 9. Socealinis gyvenimas**
- Mano socealinis gyvenimas yra normalus, papildomo skausmo nesukelia
 - Mano socealinis gyvenimas yra normalus, bet sukelia papildomą skausmą
 - Skausmas neriboja mano socealinio gyvenimo, išskyrus veiklą susijusią su fiziniu aktyvumu, pvz.:sportas
 - Skausmas apribojo mano socealinį gyvenimą ir aš neišeinu iš namų taip dažnai, kaip iki susirgdamas
 - Skausmas apribojo mano socealinį gyvenimą, aš būnu tik namuose
 - Dėl skausmo neturiu jokio socealinio gyvenimo
- 10. Keliavimas**
- Galiu keliauti bet kur be skausmo
 - Galiu keliauti bet kur, bet tai sukelia papildomą skausmą
 - Skausmas trukdo, bet galiu keliauti ilgiau nei 2val.
 - Dėl skausmo negaliu keliauti ilgiau nei 1val.
 - Dėl skausmo galiu keliauti tik būtiniais reikalais ne ilgiau nei 30min.
 - Dėl skausmo visai negaliu keliauti, nuvykstu gydytis.

AČIŲ UŽ BENDRADARBIAVIMA

TOLIAU PILDO TYRĖJAS

VAS

ODI

Lydinti patologija: CD Podagra Reumatines ligos Lėtinės uždegiminės lig Uždegimas
kraujo tyrime

Refleksai: Pateliarinis D S Pat Achil Achilo D S

Motorika: Šlaunis D S Pėdos ekstenzija D S Nykščio ekstenzija D S Pėdos dorzofleksija D S Blauzda D S

SLR testas Neigiamas SLR>30 SLR<30 Šlaunies tempimas+

RENTGENOGRAMOS Makronestabilumas

MRT (Pfirrmann) I II III IV V Komori 0 1 2 3

Operacijos radiniai: Subligamentinė Subligament. Plyšes raištis Transligamentinė

Sekvestras

Pastabos _____

Priedas Nr. 4

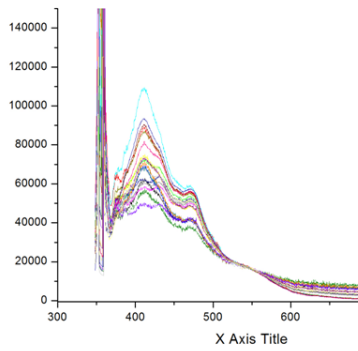
Gausinių dedamųjų palyginimo statistinės lentelės:

Lyginama Λ_1 su Λ_2 , Λ_1 su Λ_3 ir Λ_2 su Λ_3 Gausinių dedamųjų pikų (bangos ilgis nm.) variacijos.

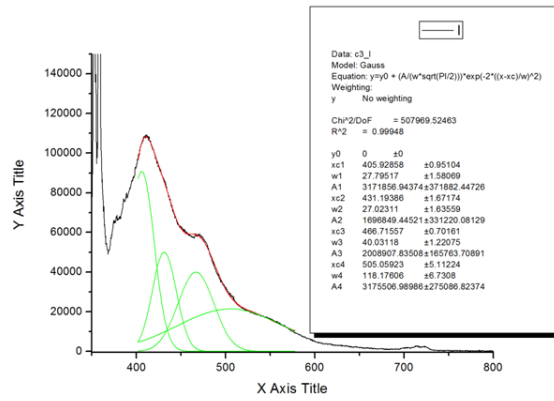
t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		Λ_1 ir Λ_2	
	Variable 1	Variable 2	
Mean	406,9827586	431,9655	
Variance	2,970763547	7,638054	
Observations	29	29	
Hypothesized Mean Difference	0		
df	47		
t Stat	-41,30531104		
P(T<=t) one-tail	6,80587E-39		
t Critical one-tail	1,677926722		
P(T<=t) two-tail	1,36117E-38		
t Critical two-tail	2,01174048		
t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		Λ_1 ir Λ_3	
	Variable 1	Variable 2	
Mean	406,9827586	467,5724	
Variance	2,970763547	5,036355	
Observations	29	29	
Hypothesized Mean Difference	0		
df	53		
t Stat	-115,3079787		
P(T<=t) one-tail	1,27801E-65		
t Critical one-tail	1,674116237		
P(T<=t) two-tail	2,55603E-65		
t Critical two-tail	2,005745949		
t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		Λ_2 ir Λ_3	
	Variable 1	Variable 2	
Mean	431,9655172	467,5724	
Variance	7,638054187	5,036355	
Observations	29	29	
Hypothesized Mean Difference	0		
df	54		
t Stat	-53,86036166		
P(T<=t) one-tail	6,40305E-49		
t Critical one-tail	1,673564907		
P(T<=t) two-tail	1,28061E-48		
t Critical two-tail	2,004879275		

Priedas Nr. 5

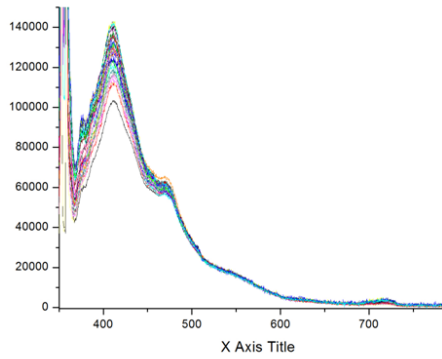
λ spektrų pavyzdžiai



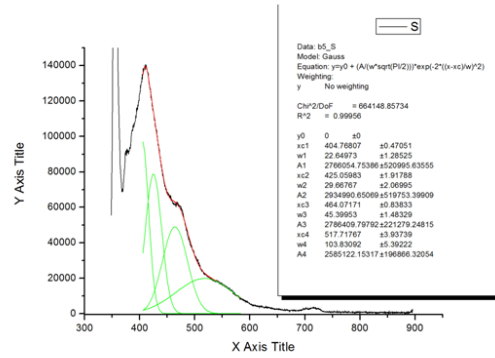
P2 spektras



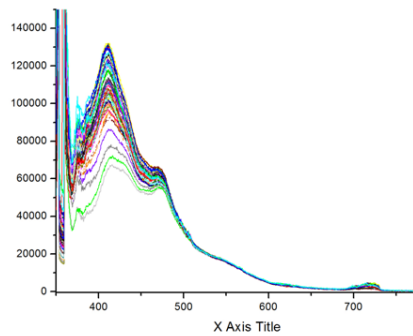
P2 Gausinės dedamosios



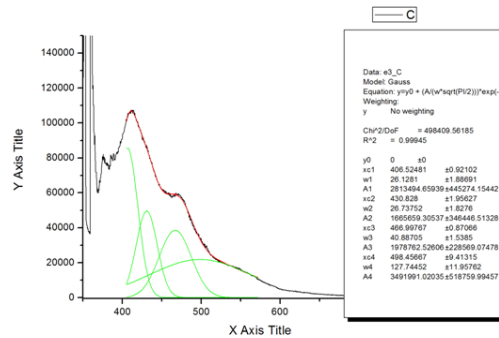
S8 spektras



S8 Gausinės dedamosios

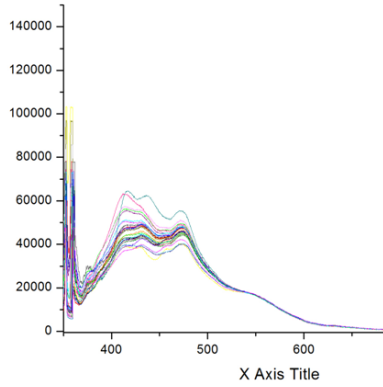


D2 spektras

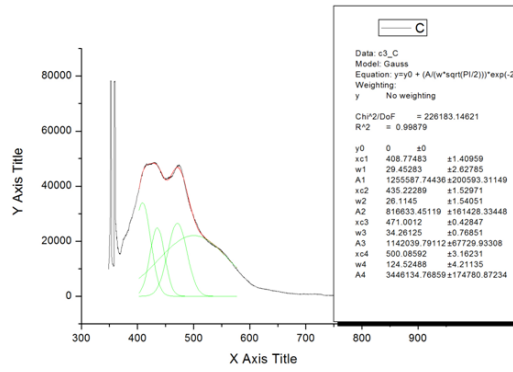


D2 Gausinės dedamosios

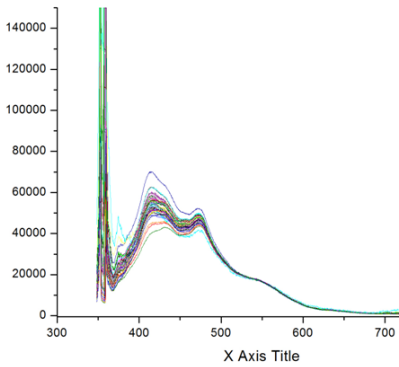
Priedas Nr. 6
μ spektrų pavyzdžiai



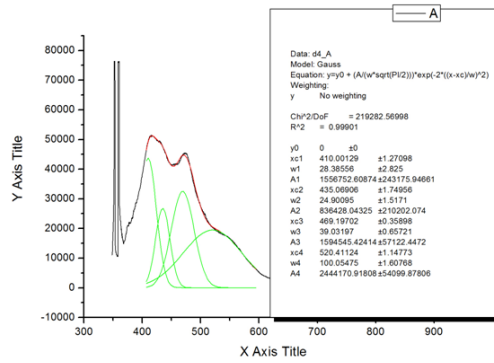
D5 spektras



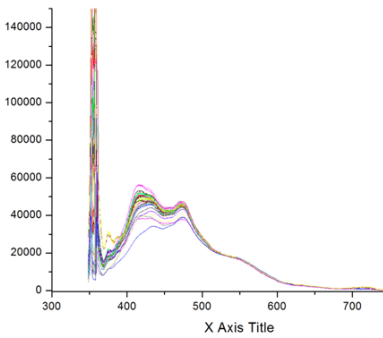
D5 Gausinės dedamosios



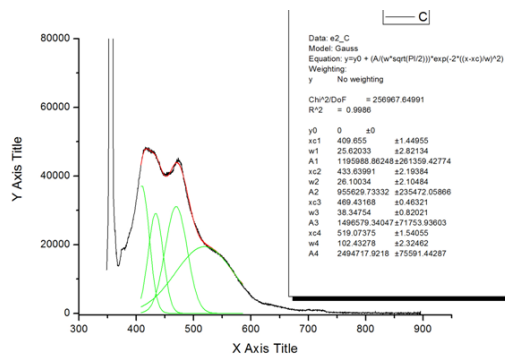
P5' spektras



P5' Gausinės dedamosios



P6 spektras



P6 Gausinės dedamosios

VILNIUS UNIVERSITY

Gunaras Terbetas

APPLICATION OF LASER METHODS FOR DIAGNOSTICS AND
TREATMENT OF THE INTERVERTEBRAL DISC DISEASES

Summary of doctoral dissertation
Biomedical sciences, medicine (07B)

Vilnius, 2010

The aim of this investigation is to apply laser light to investigate intervertebral disc material and to use laser light for treating intervertebral disc herniations. Our investigation consists of experimental part- spectroscopic study of intervertebral disc material; and clinical part- percutaneous laser disc decompression, introduction of the treatment method and case series analysis.

Study analyses biochemical, structural and histological/histochemical changes of intervertebral disc, happening during degeneration process. We applied luminescence investigation of disc tissue auto fluorescence to investigate biochemical change in disc matrix. We created methodology for preparing and investigating intervertebral disc specimen. For the first time, we recorded disc auto fluorescence spectra, gathered by irradiation of disc material by UV laser. We compared collected spectra with histological/histochemical and biochemical changes in disc specimens.

In clinical part of our study, for the first time in Lithuania, we performed laser surgery (PLDD) for intervertebral disc herniation. We collected group of the patients, evaluated indications and contraindication for the laser surgery, analyzed efficiency of the procedure.

The results indicate that auto fluorescence refers to different substances constituting intervertebral disc. Spectral analysis can be used to determine biochemical changes in collagen types content of intervertebral disc matrix, and signs of disc degeneration can be identified indirectly. Spectroscopic investigation of degenerated disc according to the shape of spectra and spectroscopy may be a new very sensitive tool in determining different collagen types in different anatomical parts of intervertebral disc. Spectroscopic analysis of intervertebral disc removed during open surgery, creates background for further investigation on degenerating intervertebral disc spectral features and biochemical changes.

Laser application can be used in treating intervertebral disc herniation. Patients having sequestration, transligamentous or extensive subligamentous extrusion are poor candidates for laser surgery and should go for open surgery; patients having moderate or mild protrusion of intervertebral disc without obvious compression of nerve roots are good candidates for laser surgery.

CURRICULUM VITAE

Gunaras Terbetas

Gimimo data: 1975 m. balandžio 16d.

Gyvenamoji vieta: Baltupio 99-17, Vilnius

Telefono numeris: +370 687 43481

Šeimyninė padėtis: vedęs, du vaikai.

Išsilavinimas ir kvalifikacija: 1982 - 1993 Vilniaus m. 7- oji vidurinė mokykla (dabar Žirmūnų gimnazija), baigiau su pagyrimu. 1993-1999 Vilniaus Universiteto, Medicinos fakultetas, medicinos gydytojo studijos, baigiau su pagyrimu. 1999-2000 Vilniaus Universiteto, Medicinos fakultetas, pirminė rezidentūra- atlikau Vilniaus Raudonojo Kryžiaus ligoninėje (dabar VU Santariškių klinikos, centro filialas). 2000-2005 Vilniaus Universiteto, Medicinos fakultetas, Neurochirurgijos rezidentūra- atlikau Neurologijos ir Neurochirurgijos klinikoje, VšĮ VGPUL bazėje. 2005-2009 VU Neurologijos ir Neurochirurgijos klinikos doktorantas.

Darbo patirtis: 2000-2005 VšĮ VGPUL, Neurochirurgijos skyrius, gydytojas asistentas. Nuo 2005 iki dabar, VšĮ VGPUL, Neurochirurgijos skyrius, gydytojas neurochirurgas.

Podiplominės studijos: 2004-2007 Europos Neurochirurgų Asociacijos (EANS) tarptautiniai rezidentų ruošimo kursai. 2007 išlaikytas Europos Neurochirurgų Asociacijos egzaminas. 2006, 2007, 2009 Europos Spinalinės Draugijos (SSE) kursai skirti stuburo patologijai. 2008, 2009 Europos Neurochirurgų Asociacijos (EANS), stuburo patologijos kursa. 2004, 2006, 2007, 2008 tarptautinės lazerinės medicinos draugijos (IALMS) mokymo kursai LaserFlorence.

Papildoma veikla: dalyvavau ruošiant tinklapius skirtus neurochirurginei problematikai- www.neurosurgery.lt; www.spine.lt, dalyvavau Galvos Smegenų Traumos (TBI-track) ir Nestabilaus Stuburo Programoje (NSP).