

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gamtos mokslų fakultetas

Biochemijos ir biofizikos katedra

Biofizikos studijų programos magistrantas

DARIUS VARANIUS

Magistrinis darbas

Stuburo išvaržos audinio autofluorescencijos tyrimai

Darbo vadovas
doc. A. Vaitkuvienė

Konsultantas
dr. G. Terbetas

Vilnius 2010

Stuburo išvaržos audinio autofluorescencijos tyrimai

Darbas atliktas Taikomųjų Mokslų Institute

Studentas

Darius VARANIUS

Darbo vadovas:

doc. Aurelija VAITKUVIENĖ

TURINYS

IVADAS	- 4 -
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	- 6 -
1.1. STUBURAS, STUBURO TARPSLANKSTELINIS DISKAS.....	- 6 -
1.2. TARPSLANKSTELINIO DISKO ANATOMIJA IR FUNKCIJA	- 8 -
1.3. TARPSLANKSTELINIO DISKO LAŠTELĖS	- 9 -
1.4. HISTOLOGINIAI DISKO PAKITIMAI.....	- 10 -
1.5. MEDŽIAGŲ APYKAITA TARPSLANKSTELINIAME DISKE.....	- 11 -
1.6. BIOCHEMINIAI DISKO PAKITIMAI.....	- 11 -
1.7. FUNKCINIAI DISKO PAKITIMAI.....	- 12 -
1.8. DISKO STRUKTŪRINĖ DEGENERACIJA.....	- 13 -
1.9. KAS YRA STUBURO TARPSLANKSTELINIO DISKO DEGENERACIJA?	- 15 -
1.10. STUBURO TARPSLANKSTELINIO DISKO DEGENERACIJOS NUSTATYMO METODIKA	- 17 -
1.11. BIOOBJEKTŲ TYRIMAS ANALITINIAIS SPEKTROSKOPIJOS METODAIS.....	- 19 -
1.11.1. Fluorescencinės spektroskopijos dėsningumai	- 20 -
1.11.2. Lazeriai medicinoje	- 22 -
2. TYRIMO MEDŽIAGOS IR METODAI.....	- 24 -
2.1. BANDINIŲ PARINKIMAS	- 24 -
2.2. BANDINIŲ PARUOŠIMAS.....	- 25 -
2.3. EKSPERIMENTO METU NAUDOTA APARATŪRA	- 27 -
2.4. EKSPERIMENTO EIGA	- 27 -
2.5. DARBO METODIKA	- 29 -
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	- 33 -
3.1. DEGENERACINIŲ POKYČIŲ MORFOLOGINIS, STRUKTŪRINIS IR IMUNOHISTOCHEMINIS [VERTINIMAS.....	- 35 -
3.1.1. Tarpslankstelių diskų (D), išvaržų (P) ir sekvestrų (S) struktūriniai (ląstelių) ir imunohistocheminiai (matricos skaidulų ir proteoglikanų) degeneracijos požymiai	- 35 -
3.1.2. Morfologiniai ir histocheminiai degeneracijos požymiai mėginiuose iš disko gilumos.....	- 37 -
3.1.3. Morfologiniai ir histocheminiai degeneracijos požymiai tarpslankstelių diskų išvaržose.....	- 38 -
3.1.4. Morfologiniai ir histocheminiai degeneracijos požymiai nutolusiuose nuo disko sekvestruose ...	- 39 -
3.2. GRUPIŲ STATISTINIS PALYGINIMAS	- 39 -
IŠVADOS.....	- 43 -
SANTRAUKA.....	- 44 -
SUMMARY.....	- 45 -
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	- 46 -
PRIEDAI	- 50 -

IVADAS

Nugaros skausmai, varžantys mūsų įprastus judėjimus yra viena dažniausių priežasčių, dėl kurių didėja darbingo amžiaus žmonių nedarbingumas išsivysčiusiose šalyse. Yra daugybė nugaros skausmo priežasčių, tačiau manoma, kad stuburo tarpslankstelinio disko degeneraciniai pažeidimai yra viena iš pagrindinių ir dažniausiai pasitaikančių nugaros skausmo priežasčių. Nors mechanizmas, kuriuo tarpslankstelinio disko degeneracija gali lemti apatinės nugaros dalies skausmą dar nėra aiškus, tačiau, manoma, kad nervų galūnėlių įaugimas į degeneruojančio disko plyšimo vietas, disko degeneracijos procesą paverčia skausmingu - atsiranda *diskogeninių juosmens skausmų*. Segmentinis disko judesių nestabilumas, kuris išsivysto diskui netekus elastingumo, traumuoja tarpslankstelinio sąnario kapsulę, pertempia užpakalinių stuburo raiščių kompleksą (labai gerai įnervintos struktūros), tokiu būdu sukelia *nediskogeninius* juosmens skausmus. Tai atsitinka dėl progresuojančio medžiagų savybių kitimo, ir siejama su tarpslankstelinės medžiagos struktūra ir morfologija. Medžiagų pakitimai matriksė bei progresuojantys disko morfologijos pakitimai yra siejami su tarpslankstelinio disko degeneracija (Lorin M. Benneker, 2005).

Stuburo tarpslankstelinio disko degeneracija yra ilgai trunkantis, per laiką kintantis ir negrįžtamas procesas, trunkantis nuo 2 iki 88 metų. Disko išvaržos pasitaiko jauniems ir vidutinio amžiaus žmonėms, dažniausiai turintiems 2-ąją, 3-ąją disko degeneracijos stadiją.

Vienas iš tinkamų tarpslankstelinio disko degeneracijos diagnostikos metodų yra patomorfologinis diagnostikos metodas. Šis metodas yra ir patikimas, ir esant reikalui kartotinas. Biocheminiai metodai taip pat yra priimtini ir sėkmingai taikomi praktikoje. Šie metodai gerai koreliuoja tarpusavyje ir yra naudojami tiriant lavono audinį, tačiau, kadangi jų klinikinė nauda yra ribota, diagnostikai įprastai naudojamos neinvazinės tarpslankstelinio disko degeneracijos lygmenų nustatymo sistemos (Salminen et al., 1999), pvz.: branduolinis magnetinis rezonansas, kompiuterinė tomografija ir rentgeno spinduliavimas. Tačiau šie žinomi metodai negali išskirti konkrečių tarpslankstelinio disko degeneracijos stadijų sukeliančių simptomų (magnetinis rezonansas gali identifikuoti disko degeneracijos stadiją, bet nei vienas iš išvardintų metodų negali įvertinti disko degeneracijos audinio lygyje), o tai yra labai svarbu taikant gydymą, todėl buvo pasiūlytas spektroskopinis metodas, galintis suteikti papildomos informacijos, kuria naudojantis yra numatomas degeneracijos stadijų molekulinio lygio išskyrimas.

Stuburo tarpslankstelinio disko išvarža, tai $\frac{1}{3}$ atvejų: minkštasis branduolys, $\frac{1}{3}$ -minkštojo branduolio ir sausgyslinio žiedo derinys. I-os ir II-os disko degeneracijos stadijose riba tarp minkštojo branduolio ir sausgyslinio žiedo yra aiški, o jau III-ios ir IV-tos

degeneracijos stadijose minėtoji demarkacija išnyksta ir diskas tampa homogeniškas - t.y. nėra aiškiai matomos disko audinių (sausgyslinio žiedo ir minkštojo branduolio) ribos. Operuojami ligoniai, turintys *III*-os stadijos tarpslankstelinio disko degeneraciją, nes šioje stadijoje būna išvaržos fragmentų, kurie yra šalinami chirurgiškai. *IV*-os stadijos ligoniams šalinama jau nebe išvarža, o visas tarpslankstelinis diskas.

Šiame darbe mes tyrėme stuburo tarpslankstelinio disko išvaržas, nes jos yra šalinamos operacijos metu – tai yra būtent ta medžiaga, kuri savo kilme ir sudėtimi yra atrimiausia degraduojančio disko struktūroms. Palyginti su sveikais audiniais negalime dėl bioetinių aspektų. Tokio darbo tikslas yra tiriant disko išvaržą (disko audinio fragmentą), nustatyti viso disko degeneracijos laipsnį. Disko degeneracija yra ištisinis procesas, o disko išvarža yra tik tam tikro laipsnio (*II*-ojo arba *III*-ojo) degeneracijos išraiška.

Todėl šio darbo tikslas buvo atlikti pateiktų bandinių liuminescencinius tyrimus ir įvertinti jų pritaikomumą - naudą minimaliai invazyviomis intradiskinėmis procedūromis. Tiriamaoji diagnostinė operacija - minimaliai invazyvi intradiskinė procedūra turėtų minimaliai kenkti organizmui ir gydomajam objektui.

Atlikdami darbą kėlėme tokius uždavinius:

1. susipažinti su taikomomis metodikomis disko degeneracijos stadijoms nustatyti;
2. susipažinti su stuburo tarpslankstelinio disko išvaržos anatomija bei morfologija;
3. sukurti stuburo tarpslankstelinio disko degeneracijos nustatymo metodiką minimaliai invazyvia intradiskinės procedūra;
4. išmatuoti pateiktų bandinių liuminescencinius spektrus spektrometru, nustatyti spektrometrijos panaudojimo galimybes minimaliai invazyvių procedūrų metu, ir atlikti gautų spektrų charakterizavimą bei analizę;
5. sudaryti audinių autofluorescencijos duomenų bazę, pagrįstą endogenių fluoroforų fluorescencija medžiagoje;
6. įvertinti atliktų tyrimų tinkamumą tolimesnei tarpslankstelinio disko degeneracijos tyrimo metodikai.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

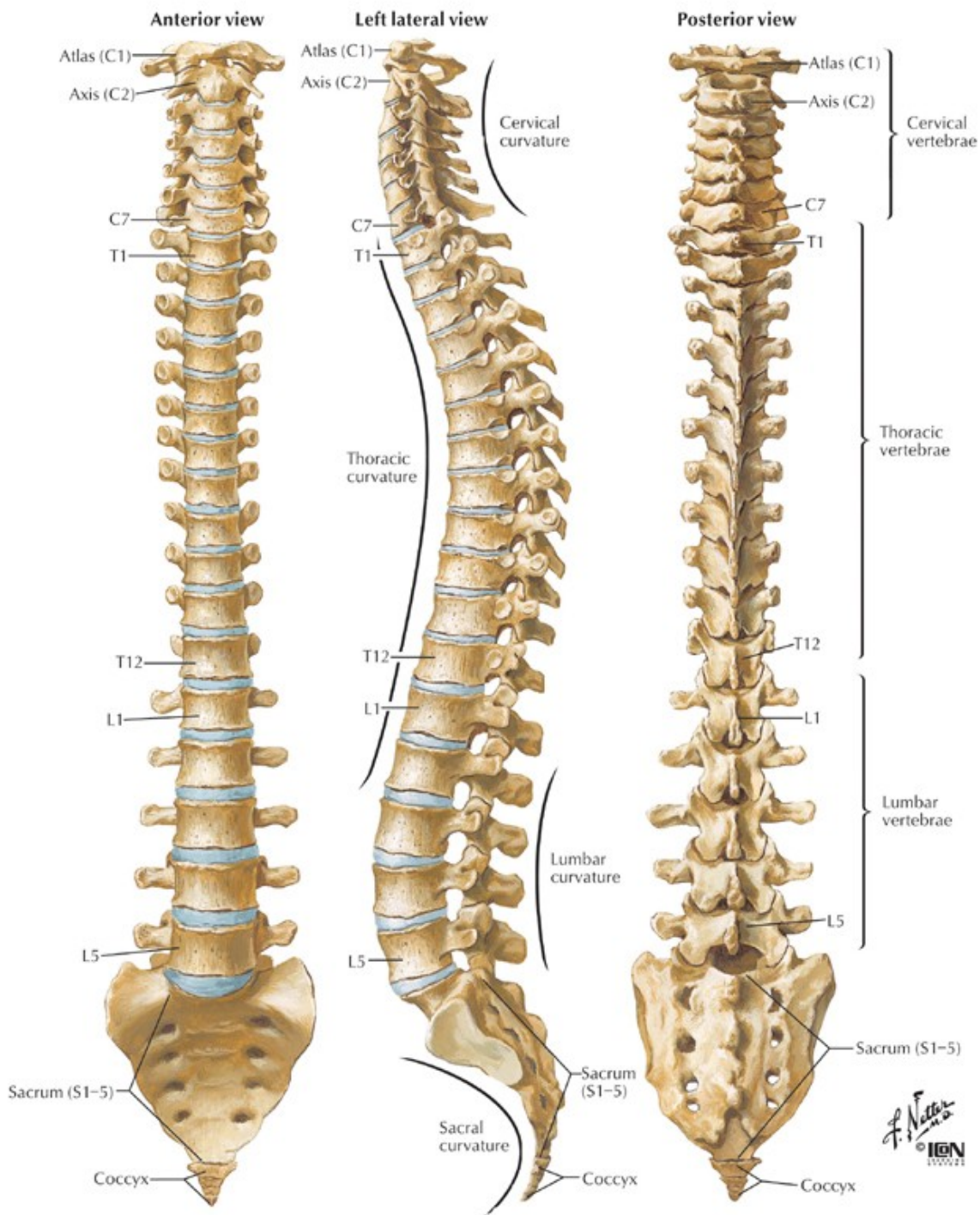
1.1. Stuburas, Stuburo Tarpslankstelinis Diskas

Nugaros judamasis aparatas yra paslanki bloką sistema (kauliniai segmentai - slanksteliai), sustatytų vienas ant kito su tarpikliais ir sutvirtintų išoriniais elementais. (*1.1 pav.*) Tokį taisyklingos struktūros palaikymą lemia tiksli raumenų ir raiščių sistema, kurios tarpusavyje sąveikauja sinergetiniais (kooperaciniais) ir opoziciniais (priešiniais) ryšiais. Tokia sudėtinga kaulų, juos jungiančių raiščių, sąnarių bei raumenų sistema visiškai apsupanti ir sauganti stuburo kanalą, kuriame yra nugaros smegenys, kartu funkcionuoja kaip lankstus pagrindas ir pagrindinė galūnių judėjimo ašis. Trisdešimt trys (trisdešimt keturi) stuburo slanksteliai yra sutvirtinti sudėtingų ryšių ir įterptų kremzlių: 7-i kaklo, 12-ka krūtinės, 5-i juosmens, 5-i kryžmens (dažnai suaugę į kryžkaulį) ir 4-5-i uodegos (dažnai 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 specifiškai pakitęs ir prisitaikęs prie savo buvimo aplinkos (Lyn Lampman, 2005).

Stuburo tarpslankstelinis diskas atlieka minkšto, bet tamprus, esančio tarp slankstelių tarpiklio, atskiriančio stuburo slankstelius vaidmenį. Stuburo tarpslanksteliniai diskai atlieka tris funkcijas (*1.2 pav.*):

1. jie veikia kaip tarpiklis, surišantis stuburo slankstelius;
2. žmogui esant vertikaloje padėtyje, jie veikia kaip amortizatorius, kuris tolygiai slankstelio paviršiuje paskirsto žemyn nukreiptą kūno masės jėgą;
3. jie veikia kaip ašinis kūno svorio taškas, kuris leidžia stuburui palinkti, pasisukti ir apsisukti.

Žmogaus stubure yra dvidešimt trys tarpslanksteliniai diskai: 6-i kaklo srityje, 12-ka krūtinės srityje ir 5-i juosmens srityje (Douglas M. Gillard, 2002).



http://www.backpain-guide.com/Chapter_Fig_folders/Ch05_Anatomy_Folder/Ch5_Images/05-4_Overall_Spine.jpg

1.1 pav. Bendras žmogaus stuburo vaizdas:
 a) vaizdas iš frontalinės pusės, b) lateralinis vaizdas, c) vaizdas iš dorzalinės pusės.

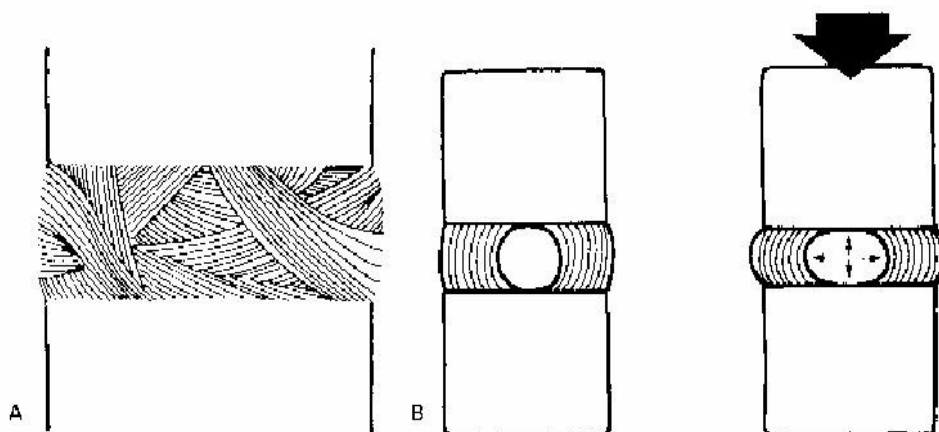
1.2. Tarpslankstelinio Disko Anatomija Ir Funkcija

Stuburo tarpslankstelinis diskas - tai minkštas tarpiklis, sudarytas iš skaidulinės kremzlės, kuri užtikrina stuburo atsparumą spaudimui, o taip pat ir judesių laisvumą. Diskas tolygiai paskirsto apkrovimą stuburo slankstelio paviršiuje net tuo atveju, jei stuburas yra spaudžiamas ar, atvirkščiai - tempiamas.

Anatomiškai, tarpslankstelinis diskas susideda iš trijų pagrindinių struktūrų: minkštojo branduolio (*nucleus pulposus*), skaidulinio žiedo (dažnai skirstomas į išorinį ir vidinį) (*annulus fibrosus*) ir slankstelių galinės plokštelės (*end-plate*). Minėtų dalių sudėtyje vyrauja trys pagrindiniai komponentai: proteoglikanai (baltymai), kolagenas (jungiamojo audinio skaidulos) ir vanduo. Kiekvienai struktūrai būdingas savitas santykinis komponentų kiekis (Douglas M. Gillard, 2002). Elastino kiekis sveikam diske vidutiniškai siekia 2-3% audinio sausos masės ir jo koncentracija nesiskiria priklausomai nuo disko vietos (minkštajame branduolyje ir skaiduliniame žiede). Esant degeneravusiam diskui, pastebėtas ženklus bendras elastino kiekio padidėjimas disko sausos masės dalyje priklausomai nuo audinio ($P < 0,001$): $6,7\% \pm 1,8\%$ išorinio skaidulinio žiedo, $9,3\% \pm 2,3\%$ vidinio skaidulinio žiedo ir $4,9 \pm 1,3\%$ minkštojo branduolio medžiagoje. Taip pat pastebėta ir stipri teigiama koreliacija tarp elastino kiekio ir degeneracijos lygmens ($r=0,66$ išoriniame skaiduliniame žiede, $r=0,72$ vidiniame skaiduliniame žiede ir $r=0,79$ minkštajame branduolyje) (Cloyd and Elliott 2007). Be šitų išvardintų, tarpslankstelinį diską taip pat sudaro dar daug kitų komponentų, tokie 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 matriksą sudarančių komponentų funkcijos iki šiol dar nėra galutinai aiškios.

Disko tampriojoje dalyje (*annulus fibrosus*) daugiausiai yra kolageno I-ojo, kurio skaidulos išsiraizgiusios tarp stuburo slankstelių ir virsta viena po kitos einančiomis kolageno plokštelėmis. Skaidulinį žiedą sudaro nuo 15-os iki 25-ių tokių į kremzlę panašių plokščių (*lamella*). Pagrindinė tokios struktūros funkcija yra sulaikyti spaudimo slegiamą minkštąjį branduolį, kuris yra linkęs išstrykšti lauk. Disko centras- *nucleus pulposus*- yra žele struktūros tarpslankstelinio disko minkštasis branduolys, sudarytas iš proteoglikanų, kuriuos gamina disko ląstelės, ir vandens - kolageno kiekis čia yra minimalus. Šis gelis yra išsidėstęs tarp kolageno II-ojo ir elastino skaidulų tinklo (Douglas M. Gillard, 2002). Pagrindinis disko proteoglikanas yra agrekanas, kuris dėl savo gausios anijoninės sudėties (chondroitino sulfato ir keratino sulfato) suteikia diskui savybę surišti vandens molekules osmozės būdu, taip

diskas tampa elastingas, išlaiko didelį hidrostatinį slėgį savo viduje sudarydamas natūralią atsvarą stuburo suspaudimui. Sveikas, nepažeistas jaunas diskas funkcionuoja kaip vandens lova, t.y., didžiąją minkštojo branduolio ir vidinės žiedo dalies dalį sudaro biochemiškai surištas vanduo, suteikiantis audiniui elastiškumą (1.2 pav.). Tik labiau nutolusi išorinė žiedo dalis veikia kaip tąsus apvalkalas, izoliuojantis bei prilaikantis branduolį. Senstant, vandens kiekis diske pradeda mažėti, ypač *nucleus* dalyje, todėl tam, kad atlaikytų visą tiesioginį spaudimą, didžioji dalis *annulus* pradeda funkcionuoti kaip tvirtas pluoštas. Fiziškai suardytuose diskuose šis tvirtas pluoštas pradeda priešintis mechaninei apkrovai visiškai atsitiktiniu būdu, o hidrofilinis *nucleus* labai sunyksta, arba jo visai nebelieka. Toks, vandens netekęs diskas, netenka savo atsparumo spaudimui – spaudimas, kurį anksčiau atlaikydavo diskas, po truputį perduodamas iš centro į išorę - skaidulinio žiedo paviršiui. Perkrautas skaidulinis žiedas gali tapti ir kitų disko destrukcinių biocheminių reakcijų priežastimi. Vandens kiekis taip pat tiesiogiai susijęs ir su disko medžiagų apykaita.



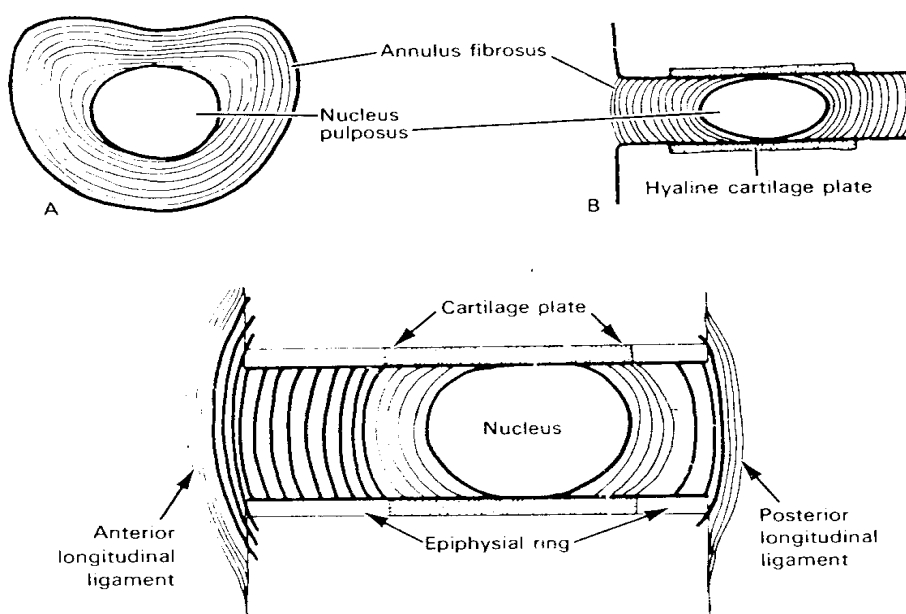
1.2 pav. Tarpslankstelinio disko struktūra (a) ir funkcija (b)

Galinė plokštelė yra kremzlinis darinys, kuris pritvirtina tarpslankstelinį diską prie slankstelio kūno ir teikia maisto medžiagas skaiduliniam žiedui bei minkštajam branduoliui, kurie jas gauna jau difuziškai.

1. 3. 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 sąnarinėje kremzlėje.

Daugiausia *annulus* ląstelės produkuoja kolageną *I*-ąjį, taip atsakydamos į deformaciją, tuo tarpu *nucleus* ląstelės atsakydamos į hidrostatinį slėgį, sintezuoja proteoglikanus ir tvirtas kolageno *II*-ojo fibriles. Ląstelei augant, jos tankumas mažėja, o suaugus žmogui ypatingai praretėja *nucleus* dalyje esančios ląstelės.



1.3 pav. Tarpšlankstelinio disko anatomija: a) lateralinis pjūvis, b) ašinis pjūvis

1. 4. Histologiniai Disko Pakitimai

Ankstyvos vaikystės metu slankstelių subchondrinėse plokštelėse sumažėja aprūpinimas krauju, todėl mikrostruktūriniai įplyšimai bei įtrūkimai, ypatingai *nucleus pulposus* dalyje, ir subchondrinėje plokštelėje 15-os metų amžiuje būna gana dažni. Augant diskui, ląstelių tankumas mažėja. Tai priklauso ir nuo žmogaus griaučių brandos, dėl kurios didėja struktūriniai *annulus fibrosus* defektai – čia lemiamą vaidmenį vaidina genetiniai faktoriai. *Nucleus pulposus* linkęs kondensuotis į keletą tirštesnių, tankesnių skaidulinių gniužulų, kurie minkštesne, takesne medžiaga yra atskirti vienas nuo kito ir nuo kremzlinės

subchondrinės plokštelės. Nuoseklūs histologiniai pasikeitimai per devynis dešimtmečius buvo suklasifikuoti. Apibendrinant, pasikeitimai pirmiausia paveikia subchondrinę plokštelę, tada *nucleus pulposus*, o paskutinis yra paveikiamas *annulus fibrosus* audinys.

1. 5. Medžiagų Apykaita Tarpslanksteliniame Diske

Stuburo tarpslankstelinis diskas yra didžiausia avaskuliari struktūra žmogaus organizme, nes, skirtingai nei dauguma kitų kūno audinių, diskas neturi tiesioginio kraujotakos šaltinio. Suaugusiųjų stuburo tarpslanksteliniuose diskuose kraujagyslės dažniausiai išsidėsto siaurame išorinio žiedo (*annulus fibrosus*) sluoksnyje, ir subchondrinėje plokštelėje, kuri yra iškart už galinės plokštelės. 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. Pagrindinės medžiagos, reikalingos disko normalioms funkcijoms ir atsistatymui užtikrinti, yra deguonis, gliukozė ir amino rūgštys. Mažas deguonies kiekis disko centre yra anaerobinio metabolizmo priežastis, kurio rezultatas - didelė pieno rūgšties koncentracija ir žemas *pH* (Douglas M. Gillard, 2002).

In vitro eksperimentai parodė, kad nuolatinis deguonies stygius lemia *nucleus pulposus* nejudrumą, nepaslankumą. Tuo tarpu, chroniškas gliukozės trūkumas veda prie negrįžtamų disko pokyčių. Taigi medžiagų apykaitos nepakankamumas mažina medžiagų takumą tarp disko elementų ir metabolinį aktyvumą disko ląstelėse, todėl diskas po mechaninio ir metabolinio pažeidimo turi tik ribotą galimybę atstatyti savo pradinę būseną. Organizmui augant ir senstant, galinės plokštelės pralaidumas mažėja, taigi ir disko medžiagų apykaita paprastai mažėja, o disko degeneracijos metu, atvirkščiai - medžiagų apykaita suaktyvėja, tačiau, vistiek subchondrinė plokštelė yra pažeidžiama. Tai yra esminis skirtumas tarp senėjimo ir disko degeneracijos.

1. 6. Biocheminiai Disko Pakitimai

Proteoglikanų irimas yra labiausiai pastebimas biocheminis disko pakitimas, atsirandantis dėl disko degeneracijos. Degraduojant agrekano molekulėms greičiausiai pasišalina mažesni fragmentai, vėliau didesni Proteoglikanų irimas ir vandens netekimas prasideda dar vaikystėje, šis procesas ypač aktyvus disko branduolyje (*nucleus pulposus* srityje) (Buckwalter J. A., 1995). Senstant organizmui, taip pat atitinkamai didėja kolageno

kiekis diske - tvirtos kolageno *II*-ojo skaidulos išoriniame žiede (*inner annulus* dalyje) yra pakeičiamos kolageno *I*-ojo skaidulomis. Taigi žiedo ir minkštojo branduolio demarkacija nyksta, substancijos susimaišo (žiedo audiniai pakeičia branduolio audinį), dėl to diskas praranda elastingumą. Be to, dėl nežinomų priežasčių dar pirmajame dešimtmetyje disko branduoliui gyvybiškai būtinas kraujotakos šaltinis nuolat mažėja (Boos N, et al., 2002). Be maisto medžiagų šaltinio (sumažėjusi kraujotaka) disko ląstelės apmiršta ir diskas, ypač jo branduolys, netenka didelio vandens kiekio.

Proteoglikanų irimas ir vandens kiekio mažėjimas diske yra lėtas ir negrįžtamas procesas. Dėl šio proceso *nucleus pulposus* dalis diske yra pakeičiama skaiduline *annulus fibrosus* dalimi ir kremzlinėmis slankstelio galinės plokštelės dalimis. 1982m. Trout ir Buckwalter aptiko, kad su amžiumi, daugiau nei 50% disko ląstelių tampa negyvos (Trout J. J., et al., 1982).

Nesuirusio proteoglikano funkcijas diske taip pat gerai gali vykdyti ir proteoglikano fragmentai, kol jie dar nėra visiškai sunykę. Senesniuose diskuose sumažėjusi tarpląstelinės medžiagos apykaita skatina kolageno molekulių ir skaidulų vis didesnę tarpusavio susikryžiovimą, dėl ko diskas tampa vis mažiau elastingas.

Biocheminės reakcijos avaskulijoje aplinkoje tarp baltymų (kolageno) ir redukuoto cukraus molekulių (laisvai difunduojančios gliukozės) yra vadinamos neenziminėmis glikacijomis, kuomet papildomi kolageno skaidulų susikryžiovimai tampa priežastimi, dėl kurios seni diskai įgauna jiems būdingą gelsvai-rusvą spalvą – taip įvyksta potransliacinė baltymų modifikacija (Nerlich A. G., et al., 1997).

Kuo labiau disko aplinka yra avaskuliari, tuo neenziminės glikacijos yra dažnesnės. Padidėjęs skaidulų susikryžiovimas sulėtina disko tarpląstelinės medžiagos apykaitą ir stabdo senų diskų regeneraciją, skatindamas žalingų makromolekulių užlaikymą diske ir tai, manoma, lemia audinio tvirtumo sumažėjimą, kas skatina stuburo tarpslankstelinio disko degeneracijos procesą (Banks R. A., et al., 1998).

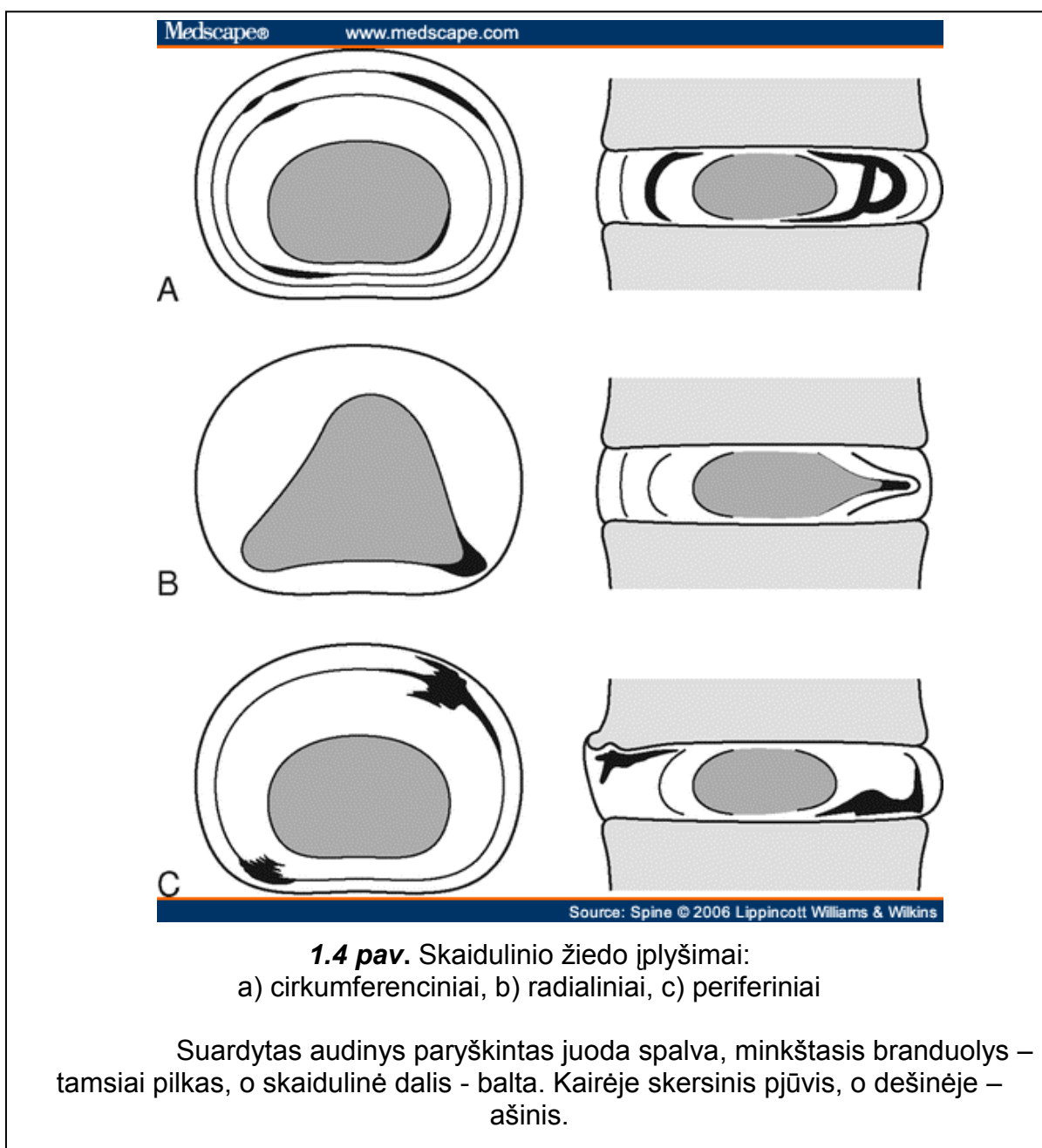
1. 7. Funkciniai Disko Pakitimai

Hidrostatinės minkštojo branduolio savybės su amžiumi prarandamos ir jis nebėra toks tankus - vis didesnė spaudimo našta tenka pluoštiniam žiedui. Kad būtų galima patenkinti šią atraminę funkciją, jauno organizmo vidiniuose *annulu fibrosus* sluoksniuose padaugėja proteoglikanų. Tačiau, su amžiumi, proteoglikanai pradeda irti dėl to sausgyslinis žiedas tampa stangresnis ir silpnesnis. Stuburo tarpslankstelinio disko aukščio pakitimai nenusako

amžinės degeneracijos laipsnio, nors kitą vertus – disko aukščio sumažėjimas didina viso segmento judesių amplitudę, sukelia segmentinį nestabilumą, todėl traumuojamas tarpslankstelinis sąnarys (vystosi jo artrozė) bei išveša užpakaliniai tarpslanksteliniai raiščiai (geltonųjų raiščių hipertrofija) - pastarieji požymiai yra netiesioginiai disko degeneracijos žymenys.

1. 8. Disko Struktūrinė Degeneracija

Annulus fibrosus įplyšimai būna 3-ų tipų (1.4 pav): cirkumferenciniai (Circumferential clefts or delamination), periferiniai (Peripheral rim lesion) ir radialiniai (Radial fissure)



(Adams et al., 2002). Šių įplyšimų atsiradimo tikimybė labai išauga po pirmojo gyvenimo dešimtmečio. Įplyšimai ypač būdingi apatinei juosmeninei stuburo daliai.



Disko prolapsas - tai reiškinys, kai dėl radialinių žiedo įplyšimų branduolio medžiaga migruoja išorinio žiedo link. Priklausomai nuo disko periferijos paveikimo laipsnio, galima teigti, kad įvyko disko prolapsas arba disko išvarža (Adams et al., 1982 / 2000).

Hialininė kremzlė yra avaskuliari struktūra maitinama difuzijos būdu, toks audinys reikalingas dėl milžiniško slėgio disko viduje. Joks kraujotaką turintis audinys neatlaikytų disko viduje esančio slėgio, nes dėl slėgio nutrūktų kraujotaka ir išsivystytų audinio nekrozė. Jei įvyksta hialininės kremzlės įtrūkimas, slėgis disko viduje sutrikdo už kremzlės esančios subchondrinės plokštelės

mitybą (sustoja kraujotaka), išsivysto kaulo nekrozė ir lyzė; subchondriniame kaule atsiranda ertmė, į kurią išsiveržia minkštasis branduolys - tai vadinama Schmorl išvarža.

Subchondrinės plokštelės pažaidos ir Schmorl mazgeliai – slankstelio subchondrinė plokštelė yra stuburo gniuždymo jungtis ir čia susikaupusios mikropazaidos paaiškina kodėl vėlesniuose etapuose minkštasis branduolys išsikiša/iškrenta į slankstelio kūną. Subchondrinės plokštelės pažaida akimirksniu atpalaiduoja gretimą minkštąjį branduolį ir taip perduoda visą atsiradusį spaudimą minkštajam branduoliui, kuris išsikiša į sausgyslinio žiedo vietą (Holm et al., 2004).

Tarpslankstelinio disko aukščio mažėjimas, radialinis ištišimas ir osteofitų atsiradimas (kremzlinių slankstelio darinių kalcifikacija) yra tarpusavyje artimai susiję (1.5 pav). Su amžiumi, minkštasis branduolys linkęs ištišti į slankstelio kūną – tokiu atveju spaudimas į branduolį sumažėja ir padidėja statinis krūvis sausgysliniam žiedui, sąlygojantis jo radialinį

išsikišimą į išorę (retais atvejais į vidų). Dėl to diskas funkcionuoja kaip tuščia automobilio padanga – t. y., žiedas, kuris sąlygoja atstumą tarp gretimų nervinių šaknelių, subliūkšta, susiploja ir ištįsta taip, kad gali sukelti daugiau kaip 50%-ties spaudimo jėgą į nervinę šaknelę. Toks efektas geriausiai paaiškina, kodėl susispaudę diskai yra susiję su osteoartritu ir osteofitų atsiradimu ant stuburo slankstelių kūnų kraštų (Pollintine et al., 2004;).

Disko prolapsas, susiaurėjimas, radialiniai įtrūkimai, ypač kai jie yra susiję su disko ištįsimu, yra susiję su nugaros skausmais (Videman et al., 2003).

1. 9. Kas Yra Stuburo Tarpslankstelinio Disko Degeneracija?

Yra dvi vyraujančios stuburo tarpslankstelinio disko degeneracijos teorijos: ankstesnė teigia, jog diskai tiesiog susidėvi nuo per didelės apkrovos dažnai sportuojant ar dirbant sunkų fizinį darbą (Bogduk N., Adams M., et al., 2002), tačiau naujoji teorija teigia, jog tarpslankstelinio disko degeneracija yra apspręsta genetiškai ir gali būti paveldima (Videman T., et al., 1998), todėl yra pradėti įvairūs tyrimai, kurių pagalba galima būtų nustatyti ne tik morfologinius tarpslankstelinio disko degeneracinius pakitimus, bet ir jų genetines determinantes. Manoma, kad tai gali padėti užkirsti kelią degeneracijai, kuri gresia ateityje.

Tarpslankstelinio disko degeneracija yra visą gyvenimą trunkanti disko medžiagų degradacija, sinchroniškai lydima disko remodeliacijos ir gretimų slankstelių pakitimų, leidžiančių prisitaikyti prie kintančių aplinkos sąlygų: asmens laisvų judesių amplitudės, darbinų drabužių, darbo įrankių, sporto, imobilizacijos, masažo, hormoniniu pokyčių. Tokie procesai organizme vyksta dėl natūralių aplinkybių: fizinio krūvio, genetinio paveldimumo, sumažėjusio metabolitų transporto, pakitusio enzymų aktyvumo, ląstelių senėjimo ar mirties, terpės ar vandens kiekio pakitimų ir kraujagyslinio tinklo sutankėjimo. Visi šie faktoriai tiesiogiai susiję su funkcijų sutrikimu ir skausmu. Netinkamas metabolitų transportas yra neišvengiamas augimo padarinys ir mediciniškai, tikriausiai, mažiausiai aktualus, nes daugiausiai apsprendžia minkštojo branduolio gyvavimą, kuris turi mažiausiai nervinių galūnių ir degeneravusiame plote pažeistas mažiausiai. Subchondrinės plokštelės pažeidimas veda prie tarpslankstelinio disko degeneracijos, net jei tuo metu metabolitų transportas į diską padidėja, struktūrinis pažeidimas turi lemiamą įtaką degeneracijos procesui. Natūralus senėjimas sąlygoja neišvengiamus ir progresuojančius pakitimus disko kompozicijoje, panašius kaip ir kituose senstančiuose audiniuose, savo sudėtyje turinčiuose kolageno ir elastino (kosmetologijos problemos - vystanti oda). Kai kurie tarpslankstelinio disko pakitimai aptinkami neinvaziniais tyrimo metodais, tokiais kaip: branduolinio magnetinio

rezonanso tomografija, kopmiuterinė tomografija ir rentgeno spinduliuotė. Visgi, nuo amžiaus priklausantys pakitimai yra neišvengiami nuo pat gimimo ir nėra susiję su skausmu. Nuo amžiaus priklausantis tarpslankstelinio disko aukščio mažėjimas, subchondrinės plokštelės vaskuliarizacija ir disko takumos yra susiję su būtinu prisitaikymu didėjančiam mechaniniam krūviui, susijusiu su vaikščiojimu stačiomis ir sumažėjusiu metabolitų transportu į didėjančią (besiplečiantį į šonus) diską. Mikrostruktūriniai žiedo įplyšimai ir išsikišimai, kurie neišvengiamai pasirodo su amžiumi, ateityje gali labiau pasireikšti savo neigiama įtaka išorinės mechaninės tarpslankstelinio disko funkcijoms. Padidėjęs nervinių ir kraujagyslinių audinių kiekis (avaskulinis audinys vaskuliarizuojasi) yra svarbus disko struktūrą ardantis faktorius, tiesiogiai susijęs su skausmu (Freemont et al., 1997).

Disko degeneraciją iš esmės apsprendžia šie faktoriai:

Nuo senėjimo arba/ir kartotinių mikrotraumų bei infekcijų:

- nebegaminami degeneravę proteoglikanai, nyksta *nucleus pulposus* - mažėja vandens kiekis branduolyje;
- silpsta kolageniniai ryšiai - silpsta *annulus fibrosus* kolageninės plokštelės;
- branduolys sutirštėja;
- žiedas įplyšta;
- gretimų slankstelių judesiai tampa netolygūs, amplitudė pasidaro perdidelė - 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 M. A., et al., 1996).

Šio tyrimo metu buvo naudotasi Christian W. A. Pfirrmann sukurtu branduolinio magnetinio rezonanso atvaizdų tarpslankstelinės stuburo išvaržos degeneracijos gradavimo metodu. Pagal autorių skiriamos penkios degeneracijos stadijos (1.6 pav):

I-a stadija:

Nucleus pulposus yra gelinės struktūros, jo forma ovali arba apvali. *Annulus fibrosus* - atskiros kolageno plokštelės (*lamella*). *End-plate* 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 - mucinas tarp kolageno skaidulų. Subchondrinės plokštelės srityje kremzlė nevientisa.

III-ia stadija:

Fibrozinis audinys *nucleus pulposus*, demarkacija tarp *nucleus* ir *annulus* nyksta.

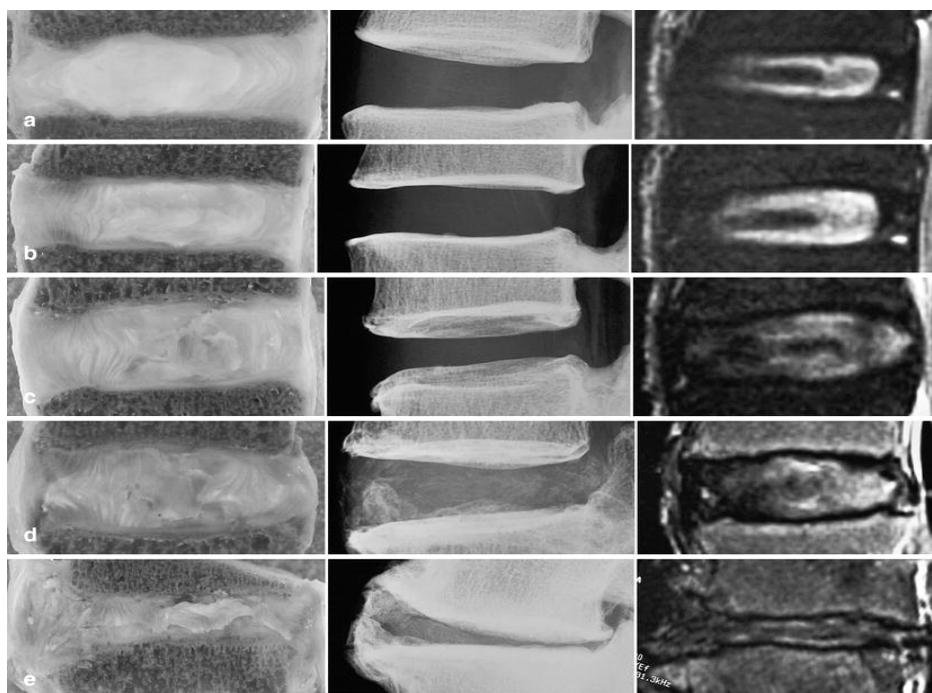
Nucleus plokštėja ir išplinta iki *annulus* vidinės dalies. Atsiranda osteofitai, subchondrinė sklerozė. Subchondrinės plokštelės defektai ir koncentriniai žiedo įplyšimai.

IV-ta stadija:

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

V-ta stadija:

Disko aukštis sumažėjęs. *Nucleus* nebėra. Dideli susiliejęs osteofitai, Schmorl mazgeliai, difuzinė sklerozė- kolagenas I ir kalcifikacija.



1.6 pav. Tarpslankstelinio disko degeneracijos ir jų koreliacija: Makroskopinė (Thompson JP, 1990), rentgenologinė (Resnick D, 1985) ir MRT (Pfirrmann CW, 2001)

- (a) pirma stadija. 19m. amžiaus moters L4–L5 segmentai;
- (b) antra stadija. 53m. amžiaus moters L2–L3 segmentai;
- (c) trečia stadija. 53m. amžiaus moters L3–L4 segmentai;
- (d) ketvirta stadija. 86m. amžiaus moters L3–L4 segmentai;
- (e) penkta stadija. 64m. amžiaus vyro L4–L5 segmentai.

1.10. Stuburo Tarpslankstelinio Disko Degeneracijos Nustatymo Metodika

Pirmą kartą tarpslankstelinio disko punkcija tiriamaisiais tikslais buvo atlikta Skandinavijoje. Tada Lindgren, 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).

Tik nuo 1980-ųjų metų branduolinio magnetinio rezonanso tyrimus imta taikyti tarpšlankstelinio disko pažaidoms aptikti ir apibūdinti (Saifuddin A. et al., 1998). Tai yra saugus, neinvazinis ir skausmo nesukeliantis tyrimo metodas. Tęsiant tyrimus buvo įsitikinta, kad tai yra pakankamai jautrus metodas tarpšlankstelinio disko pažaidoms aptikti (Resnick et al., 2002). Nors paprastas rentgeno aparatas, kompiuterinis tomografas ir magnetinio rezonanso tomografo duomenys pakankamai gerai atspindi tarpšlankstelinio disko patologinius degeneracinius pakitimus, bet nei vienas šių metodų, net ir derinant juos tarpusavyje, nesuteikia galimybės tiesiogiai nustatyti kuris diskas sukelia pacientui skausmą – t. y. neįmanoma nustatyti kurio disko degeneracija yra patloginė, o kurio tik natūralus organizmo senėjimas.

Bendri disko degeneracijos bruožai (*DDD- Degenerative Disc Disease*) yra aptinkami branduolinio magnetinio rezonanso tyrimu ir Rentgeno spinduliuotės pagalba, bet jų koreliacija su morfologiniais ir biocheminiais pakitimais nėra nustatyta (Lorin M. Benneker et al., 2005).

Aiškūs tarpšlankstelinio disko morfologiniai ir matrikso struktūros pakitimai yra pastebimi įvairiomis neinvazinėmis vaizdinėmis priemonėmis. Manoma, kad netgi esant asimptominei, neskausmingai disko degeneracijai, gali įvykti galinės plokštelės pakitimų, taip pat subchondrinės plokštelės pakitimų – sklerozė, Schmorl išvaržos, subchondrinės plokštelės formos pokyčiai ir kalcifikacija. Minėti pakitimai gali būti matomi paprasta rentgenograma arba branduolinio magnetinio rezonanso tyrimu (Lorin M. et al., 2005). Tačiau nežymūs degeneraciniai disko pakitimai gali būti skausmingi dėl segmento hiperomobilumo, kuris sunkiai diagnozuojamas standartiniais tyrimais ar disko peraugimo įnervintais neovaskulizatais.

Pirmos tarpšlankstelinio disko degeneracijos fazės metu yra pastebimas proteoglikanų ir II-ojo tipo kolageno netekimas. Kadangi branduolinio magnetinio rezonanso tyrimo metodas yra paremtas protonų tankiu medžiagoje – vandens kiekiu ir chemine protonų aplinka, tai magnetinis rezonansas gali aptikti kartu su proteoglikanų denatūracija susijusią dehidrataciją, kaip T2 signalo susilpnėjimą. Šis metodas paprastai taikomas ir tinka vaizdinei klasifikacijai. Papildomai nusakyti pokyčiams diske, naudojami *Modic* pakitimai - tai signalo intensyvumo kitimas slankstelio kūne, gretimai subchondrinei plokštelei. Minėti pakitimai stipriai koreliuoja su klinikiniais simptomais (skausmais) susijusiais su to paties lygmens tarpšlankstelinio disko degeneraciniais pokyčiais (Antoniou J. 1996).

Nepaisant to, netgi esant tokiems pakitimams, branduolinio magnetinio rezonanso tomografija vis dar lieka informatyviausias metodas pavaizduojant disko morfologiją kartu su subchondrine plokštele. Ašinė disko deformacija – disko ištišimas už erdvės (disko išvarža) – yra klasifikuojamas Jansen ir kt. į 5-ias kategorijas: (1) sveikas (*intact*), (2) išsipūtęs (*bulge*), (3) išsikišęs (*protrusion*), (4) išstumtas (*extrusion*) ir (5) izoliuotas (*sequestration*) (Jensen et al., 1994). Viikkari ir kt., naudodamasis sagitaliniais magnetinio rezonanso atvaizdais, suskirstė branduolio formas į 4-ias klases: (1) apvalus/ovalus (*round/oval*), (2) ištišęs į vidinį žiedą (*extension into inner annulus*), (3) ištišęs į išorinį žiedą (*extension into outer annulus*) ir (4) ištišęs už išorinio žiedo (*extension beyond outer annulus*) (Viikari - Juntura et al. 1989). Yu ir kt. suskirstė žiedinius įplyšimus į 3-ias laipsnius: (1) koncentriniai įplyšimai (*concentric tears*) skysčiu užpildytu tarpu tarp žiedinių plokštelių; (2) radialiniai įplyšimai (*radial tears*): ekstazė visų žiedinių sluoksnių (*rapture o all annular layers*) ir (3) skersiniai įplyšimai (*transversal tears, plus rapture of Sharpey fibers*). 2-asis ir 3-asis tipai yra atvaizduojami magnetinio rezonanso tomografu kaip aukšto intensyvumo $T2$ - nulemiančių zonų atvaizdai (Yu S. W. et al. 1988).

Dauguma šių pavienių parametrų yra siejama su tarpslankstelinio disko degeneracijos laipsniu, todėl yra kombinuojamas ir kuriamas neinvazinis gradavimo metodas atvaizdams formuoti. Kolkas dauguma šių tyrimų atliekami naudojant klinikinius duomenis ir negali būti lyginami su nustatytom tarpslankstelinio disko histologinėmis degeneracijų gradacijomis.

1. 11. Bioobjektų Tyrimas Analitiniais Spektroskopijos Metodais

Biologinių audinių būklei vertinti naudojami tokie analitiniai spektroskopijos metodai kaip branduolinio magnetinio rezonanso spektrometrija, fluorescencinė spektroskopija, infraraudonosios srities šviesos (*AIR*) sugerties spektroskopija, *AIR* atspindžio ir difuzinio atspindžio spektroskopija, *AIR* Ramano sklaidos spektroskopija, Relėjaus šviesos sklaidos spektroskopija ir kt.. Kiekvienas jų turi savo privalumų ir trūkumų. Išsamiausią informaciją teikia ir perspektyviausias yra *AIR* Ramano sklaidos metodas (Hanlon, E. B., et al., 2000). Ramano sklaidą sukelia visos medžiagoje esančios molekulės todėl jo spektruose esanti informacija yra pilna, išsami ir atspindi realius pokyčius medžiagoje. Didžiausias Ramano sklaidos metodo trūkumas yra silpnas sklaidos signalas registruojamas kartu su stipriu žadinančios spinduliuotės lazerio signalu. Silpnas atsako signalas dažnai dar maišosi su fluorescencijos signalu. Silpnas signalas turi būti registruojamas jautriais prietaisais (pvz. šaldomos *CCD* kameros). *AIR* sugerties spektroskopija taikoma didesniems bandinio tūriams

tirti (B. Chance, 1998). Bene plačiausiai naudojama fluorescencinė spektroskopija (Nirmala Ramanujam, 2000). Fluorescencinė spektroskopija pasižymi stipriu fluorescencijos signalu ir nereikalauja ypatingų registravimo sąlygų. Aparatūra yra paprastesnė ir mažesnių matmenų palyginus su Ramano sklaidos spektroskopijos aparatūra. Fluorescencinės spektroskopijos (FS) metodas yra plačiai taikomas žmogaus audinių spektrinei analizei. Audinio fluorescencija priklauso nuo ląstelės biocheminės ir biofizikinės struktūros ir ją sukelia natūraliai ląstelėje egzistuojančios biomolekulės – endogeniniai fluoroforai: amino rūgštys, struktūriniai baltymai, fermentai ir ko-fermentai, vitaminai, lipidai ir porfirinai. FS metodu tyrinėjami audiniai nėra pažeidžiami, o tai svarbu atliekant biologinio audinio tyrimus ir diagnostiką *in vivo*. Be to, FS gali būti naudojama tyrinėjant ląstelės metabolinį procesą, vaskuliarumą, intravaskuliarinę oksidaciją ir audinio morfologinius pokyčius. Dar viena FS būdinga savybė yra ta, kad fluorescencijos procesas vyksta tik ten, kur pasiekia šviesa - neskaidrios medžiagos paviršiuje, o ne didesniame tūryje. Fluoroforų sužadavimo maksimumai yra 250 – 450 nm. srityje, o emisijos maksimumai 280 – 700 nm. srityje. Fluoroforai, kurių, kaip manoma, koncentracija kinta kintant audinio histopatologijai, yra amino rūgštys - triptofanas ir tirozinas, struktūriniai baltymai - kolagenas ir elastinas, kofermentai - NADH ir FAD (Joseph R. Lakowicz, 2006).

Minėti spektroskopiniai metodai dažnai yra kombinuojami siekiant gauti tikslesnę ir pilnesnę informaciją apie tyrinėjamą audinį. Pavyzdžiui norint gauti informaciją apie audinio struktūrinių elementų dydį (audinio morfologiją), biocheminę sudėtį ir pan. (Irene Georgakoudi *et al.*, 2001). Derinti įvairius metodus kartais yra būtina, tarkim, siekiant pakoreguoti iškraipytus audinio savosios fluorescencijos spektrus dėl audinyje vykstančios fluorescencijos absorbcijos ir elastinio išsklaidymo. Pasitelkus difuzinio atspindžio spektroskopijos metodą, kurio būdu gaunama informacija apie audinio optines savybes leidžia pašalinti fluorescencijos spektrų iškraipymą (G. Zonios *et al.*, 1999).

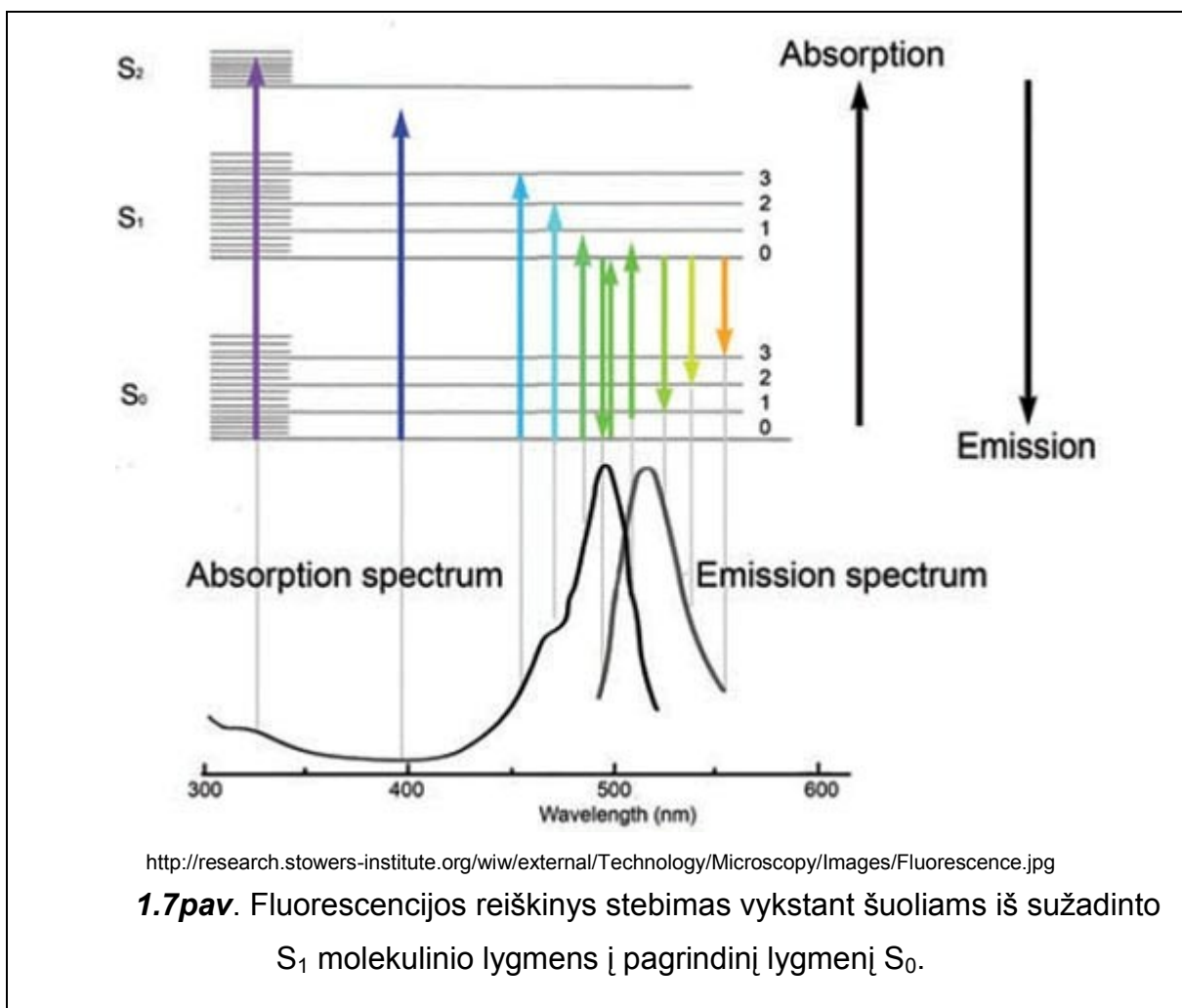
1. 11. 1. Fluorescencinės spektroskopijos dėsningumai

Liuminescencija – tai optinis spinduliavimas, kurį sukelia medžiagoje sužadinti elektronai, jei tik tas sužadimas nėra šiluminis. Liuminescencijos rūšys dažnai skiriamos pagal sužadinančios energijos tipą:

1. fotoluminescencija, kai sužadina optinis spinduliavimas;
2. katodinė liuminescencija, kai sužadina elektronų srautas;

3. radioluminescencija, kai sužadina greitosios dalelės ar aukštųjų energijų spinduliavimas;
4. elektroluminescencija, kai sužadina elektrinis laukas ar srovė.

Fotonai saveikauja su atomų ir molekulių elektroniniais apvalkalais (debesėliais). Sugerties (absorbcijos) vyksmo metu fotonas atiduoda savo energiją molekulei, ir ši tampa elektroniškai sužadinta. Tokio sužadinimo prigimtis yra optinė. Sugerties metu fotonas perduoda energiją molekulės elektronui, kuris peršoka iš pagrindinio atomo lygmens į aukštesnės energijos lygmenį. Taip atomas tampa sužadintas – įvyksta šviesos sugertis. Molekulei sugeriant šviesą, vyksta elektronų šuoliai iš pagrindinės būsenos į sužadintus aukštesnius energetinius lygmenis ($S_n, n \in \mathbb{N}$). Sužadintoji atomo būseną yra nestabili - sparčiai vyksta vibracinė (nospindulinė) relaksacija iki S_1 lygmens, todėl elektronas grįžta į pagrindinę būseną, atiduodamas energijos perteklių aplinkai arba išspinduliuodamas šviesos kvantą – įvyksta fluorescencija. Fluorescencija paprastai stebima vykstant šuoliams iš sužadinto S_1 molekulinio lygmens į pagrindinį lygmenį S_0 arba jo virpesinius pakartojimus (1.7 pav.) (R.Rotomskis, G.Streckytė, 2007).



Molekulių liuminescencija, priklausomai nuo sužadintų būsenų prigimties, salyginai yra skirstoma yra fluorescenciją ir fosforescenciją. Fluorescencija yra spinduliuojantis šuolis tarp vienodo daugialypumo molekulės elektroninių būsenų. 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 sužadavimo ir relaksavimo (grįžimo) į pagrindinę būseną (*Joseph R. Lakowicz, 2006*).

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*.

1. 11. 2. Lazeriai medicinoje

Lazeris - tai žemo dažnio kvantinis generatorius, kuris įvairias energijos rūšis priverstinio spinduliavimo pagalba paverčia į monochromatines koherentes elektromagnetines bangas. Lazerio spinduliavimui analogų gamtoje nėra – gamtoje tai naujas fenomenas. Pagrindinės lazerinio spinduliavimo ypatybės:

1. monochromatiškumas - pastovus, griežtai apibrėžtas bangos ilgis;
2. koherentiškumas - visų spinduliuotės bangų fazių sutapimas erdvėje ir laike;
3. poliarizacija - spinduliuotės bangų skersumas spindulio krypties atžvilgiu.

Šios savybės leidžia gauti praktiškai lygiagretų šviesos pluoštą, kuris gali būti sufokusuotas į tašką, diametru, atitinkančiu spinduliuojamos šviesos bangos ilgi (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 į :

- **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** ($> 500\text{mW}$). Pasireiškia fototerminis poveikis – audinių koaguliacija, garinimas ir kiti netiesiniai spinduliuotės sąveikos su biologiniu objektu vyksmai (Rotomskis R, 2007).

2. TYRIMO MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Bandinių Parinkimas

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:

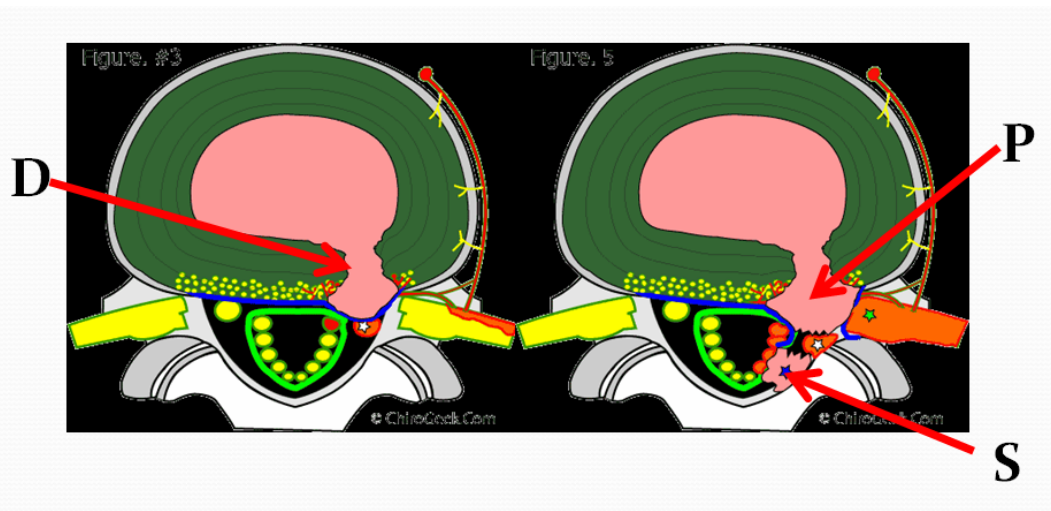
1. pacientas sutinka dalyvauti tyrime, pasirašo sutikimo formą (priedas 1), užpildo klausimyno formą (priedas 2);
2. pacientas planine tvarka pirmą kartą operuojamas dėl juosmeninio disko išvaržos;
3. operacijos metu pašalinamas pakankamas tarpslankstelinio disko fragmentas, kad galima būtų atlikti fluorescencinius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

Operuojamo ligonio *MRT* vaizdas buvo įvertintas pagal Pfirrmann disko degeneracijos klasifikaciją ir pagal Komori disko išvaržų gradaciją. 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).

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 (2.1 pav.).

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



2.1 pav. Mėginių paėmimo vietas: *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.

2.2. Bandinių Paruošimas

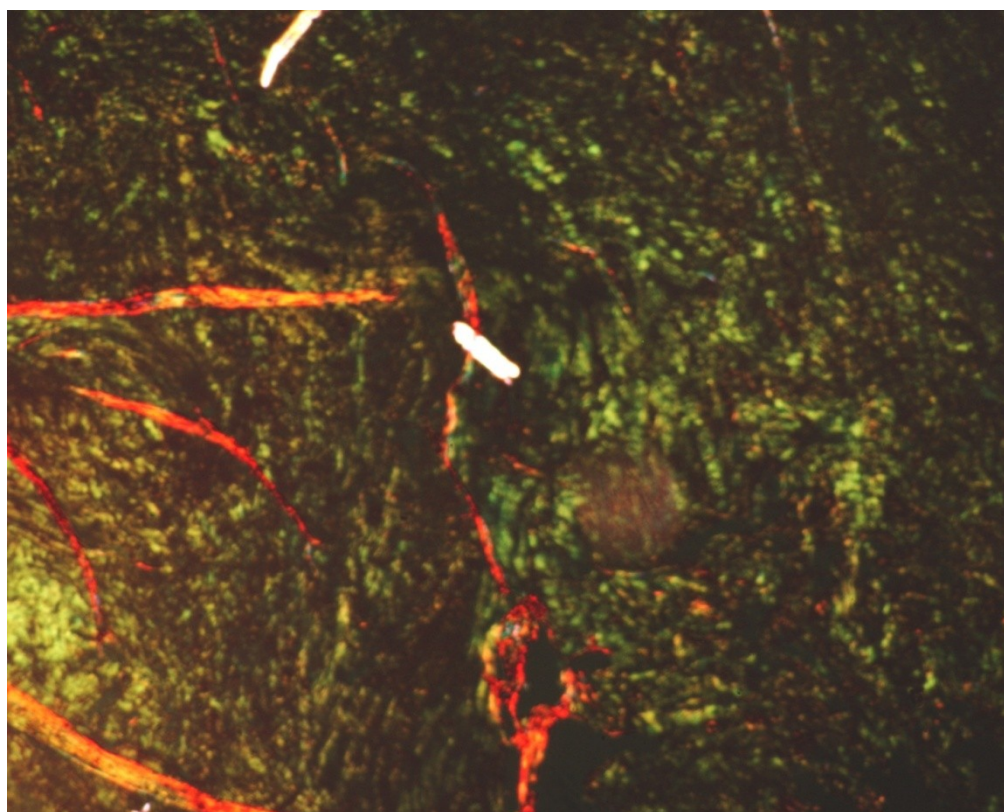
Stuburo tarpslankstelinio disko išvaržos audinių liuminescencijos spektrai buvo išmatuoti *Vilniaus Universiteto taikomųjų mokslų institute (VU TMI)* bendradarbiaujant su *Vilniaus greitosios pagalbos universitetine ligonine (VGPUL)* ir *Valstybinio mokslinių tyrimo instituto inovatyvios medicinos centru (VMTI IMC)*. Šiame darbe buvo tirti stuburo tarpslankstelinio disko išvaržos fragmentai, pašalinti atviros operacijos metu, t.y., medžiaga, kuri savo kilme ir sudėtimi yra artimiausia degeneruojančio disko struktūroms. Operuojamo ligonio *MRT* vaizdas buvo įvertintas pagal *Pfirrmann* disko degeneracijos klasifikaciją ir pagal *Komori* disko išvaržų gradaciją. Visi tarpslanksteliniai diskai kliniškai buvo įvardinti kaip *III*-ios disko degeneracijos stadijos. Sveikų audinių palyginimui neturime.

Visam tyrimui yra gautas Lietuvos bioetikos komiteto leidimas. Disko biopsijų operacinė medžiaga morfologiškai ir histochemiškai iširta *Valstybinio mokslinių tyrimo instituto Inovatyvios medicinos centro Eksperimentinių tyrimų skyriaus Patologijos padalinyje* (tyrėja dr. Vida Gražienė, vyr.laborantė- histologė Salomėja Stanaitienė).

Tiriamoji medžiaga *Zeiss*'o mikrokriotomu (*Leica CM1100*) buvo dalinama į dvi dalis: viena dalis bandinių buvo paruošta po šaldomųjų 20 μm. storio pjūvių ant mikroskopinių objektinių stiklelių ir buvo tirta spektrofotometriškai per 48 val. po operacijos. Bandiniai buvo apšvitinti UV srities žadinančiąja lazerine spinduliuote (*Nd-YAG* mikrolazeris *STA-01-TH 355nm.*) autofluorescencijos spektrams gauti. Visi su bandiniu kontaktuojantys

daiktai buvo dezinfekuoti, nuriebalinti prieš pradėdant bandymą (riebalai ir bet koks kitoks užterštumas iš aplinkos, ypač organinės kilmės, smarkiai paveiktų liuminescencinius spektrus).

Kita medžiagos dalis buvo fiksuojama spirito- formolo fiksatoriuje ir po dehidratacijos, liejama parafinu audinių morfologijai tirti. 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 raudonu (PS) (Puchtler H, 1973; Junqueira LCU, 1979) – skaidulinių komponentų (II/III/ kitų kolagenų) santykiui įvertinti (2.2 pav.) ir Kongo raudonu (KR) - amiloido (Eastwood H, 1971) įvertinimui poliarizuotoje šviesoje. Preparatai, dažyti HE, TW, SO ir AM-PAS buvo tiriami šviesos, o PS ir KR Olympus BX51 mikroskopo poliarizacinėje šviesoje. Nudažyti preparatai buvo vertinami



2.2 pav. Įvairių kolageno skaidulų lokalizacija, nudažytų pikrosirijum raudonu: žalias- kolagenas II, raudonas- kolagenas I, geltonas- kiti kolagenai. PS x 200.

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 (priedas 3), siekdami juos susieti su spektroskopinio tyrimo fluorescenciniais spektrais, galinčiais išryškinti skirtingus disko cheminius komponentus po bandinių sužadavimo lazerine spinduliuote.

2.3. Eksperimento Metu Naudota Aparatūra

Visa tiriamoji medžiaga tiek spektrofotometriniams, tiek ir histologiniams tyrimams buvo paruošta *Zeiss* mikrokriotomu *Leica CM1100*. Spektrofotometrinių eksperimentų metu naudotas „*Avantes*“ stalinis „*AvaSpec-2048TEC*“ (2.3 pav.) spektrometras su asmeniniu kompiuteriu sujungtas *USB* jungtimi. Jo *CCD* matricos registravimo diapozonas 200 – 1100 nm.



2.3 pav. „*Avantes*“ spektrometras

Lazeriu indukuotos fluorescencijos matavimai buvo atlikti su lietuvišku naujos konstrukcijos monolitiniu diodinio kaupinimo mikrolazeriu *STA-01* (2.4 pav.). Žadinamas *Nd(YAG)* trečios harmonikos generatorius - bangos ilgis 355nm., galia 11mW, 10KHz, pulso ilgis 0,5ns. (*UAB „STANDA“*).



2.4 pav. „*STA-01*“ mikrolazeris

Esant būtinybei, abu prietaisai, dėl savo mažų gabaritų yra lengvai ir patogiai transportuojami ir nesudaro kliūčių eksperimentams kitoje aplinkoje.

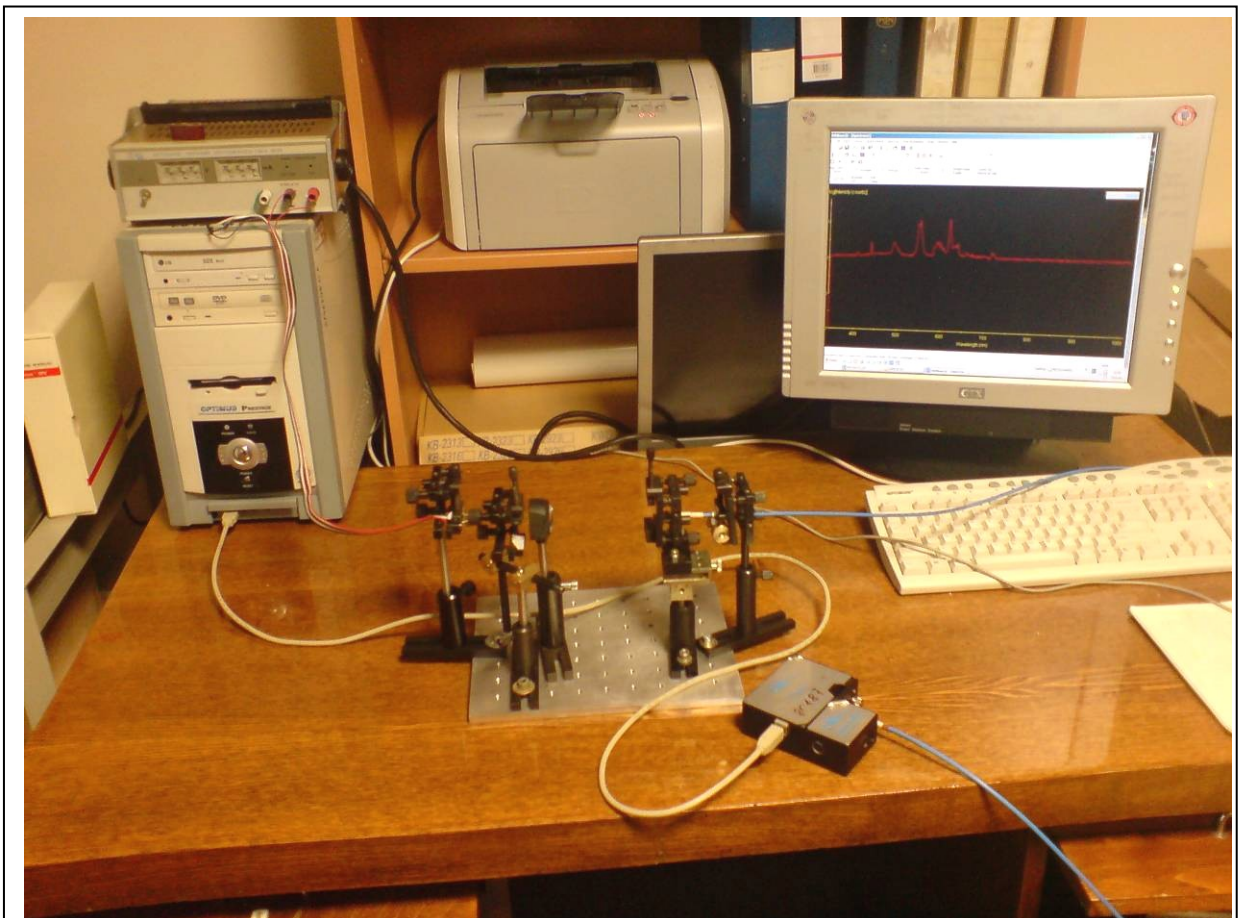
2.4. Eksperimento Eiga

Suderinama optinė tyrimo sistema (2.5 pav.):

- 1) Monochromatorius gali registruoti liuminescencijos šviesą iš betkokių erdvinio kampo (bandinio liuminescencijos spektrų surinkimui naudojamas šviesolaidis) - nuo apšviesto bandinio fluorescuojanti šviesa sklinda visomis kryptimis, tačiau tam, kad padidintume santykį signalas/triukšmas, registravimo sistema nustatoma taip, kad

- rezultatui būtų minimalus žadinančios šviesos šaltinio atspindžių indelis nuo tiriamojo objekto;
- 2) Jei šviesolaidžiu šviesa sklinda dviem kryptim: iš šviesos šaltinio į bandinį ir nuo bandinio į monochromatorių, tai šviesolaidis tiesiog nukreipiamas taip, kad nesusidarytų visiškas atspindys nuo tiriamosios medžiagos;
 - 3) Nuo bandinio sklindanti fluorescencija surenkama šviesolaidžiu ir registruojama monochromatoriuje su *CCD* kamera;
 - 4) Surinkti monochromatoriuje duomenys analizuojami kompiuteriu.

Visi tyrimai buvo atlikti specialiai pritaikytoje ir paruoštoje optinių tyrimų laboratorijoje. Laboratorijos langai ir durys uždengti specialia, šviesos nepraleidžiančia medžiaga, siekiant išvengti matavimo metu papildomų triukšmų iš aplinkos. Taip pat, siekiant papildomai pašalinti atsiradusių triukšmų lygį iš aplinkos, visas bandymų stendas, kuriame buvo atliekami tyrimai, papildomai buvo apgaubtas specialia juoda, šviesos nepraleidžiančia medžiaga (Vaitkuvienė at al., 2007).



2.5 pav. Optinė tyrimų schema

Programinė įranga: Signalų registravimas ir pradinės informacijos apdorojimas vyksta su spektrofotometro gamintojų programine įranga: „Avantes“ programa *AvaSoft-Basic*. Surinkti duomenys apdoroti *Origin*, *MS Office Excel*, *Statistica 6.0* ir *PAST* programomis.

2.5. Darbo Metodika

Bandiniai buvo ruošti kelių tipų eksperimentams: po operacijos pašalinti disko fragmentai buvo pakuojami ir iš *Vilniaus Universiteto greitosios pagalbos liginės, neurochirurgijos skyriaus* transportuojami į *Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Inovatyvios medicinos centrą (VMTI IMC)*, kur šaldomuoju mikrotomu buvo pjaustomi – ruošiami histologinei analizei ir fluorescencinei spektroskopijai. Ir vieno ir kito tipo eksperimentams labai svarbi sąlyga yra kuo skubesis bandinio tyrimas, todėl visi bandiniai yra tiriami po operacijos praėjus ne daugiau nei 48val. Šaldomuoju mikrotomu yra daromi 20µm. storio medžiagos pjūviai. Šalia esanys fragmentai yra atskiriami histologinei ir fluorescencinei analizei tam, kad gautus duomenis ateityje galima būtų lyginti tarpusavyje (Kozlovskaja at al. 2008).

Pradedant darbą, pirmas yra registruojamas aparatūros tamsinis spektras (2.6 pav.). Tamsinio spektro registracija yra atliekama be fotosužadavimo – tai yra aplinkos fono

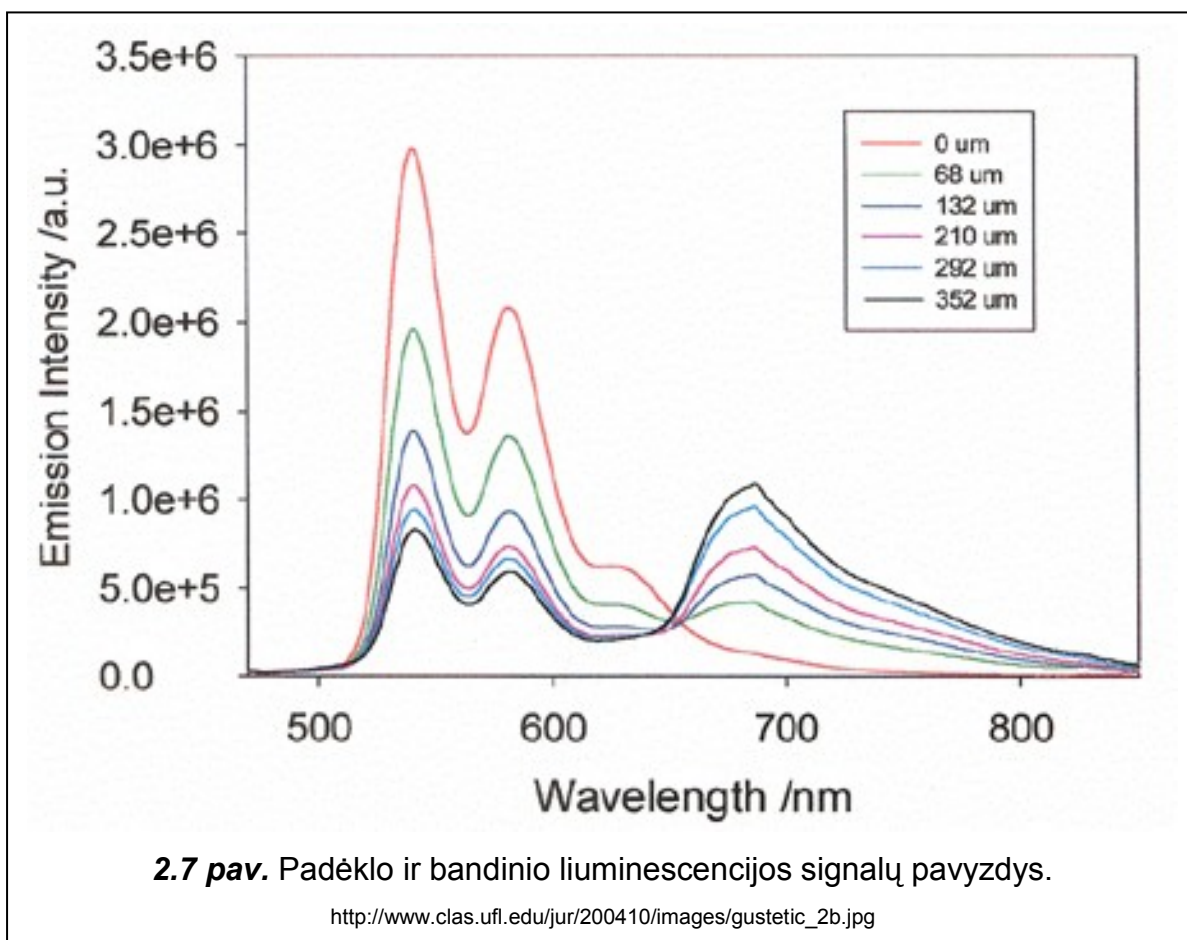


spinduliavimo registracija, kuri vėliau, registruojant bandinių liuminescencijos spektrus, bus eliminuojama, siekiant gautų duomenų korektiškumo. Tamsinio spektro registracijai prieš pradedant registruoti bandinio liuminescenciją

pasirenkama *Save Dark* komanda iš komandinės eilutės arba *Spectrum | Dark* komanda iš užduočių juostos.

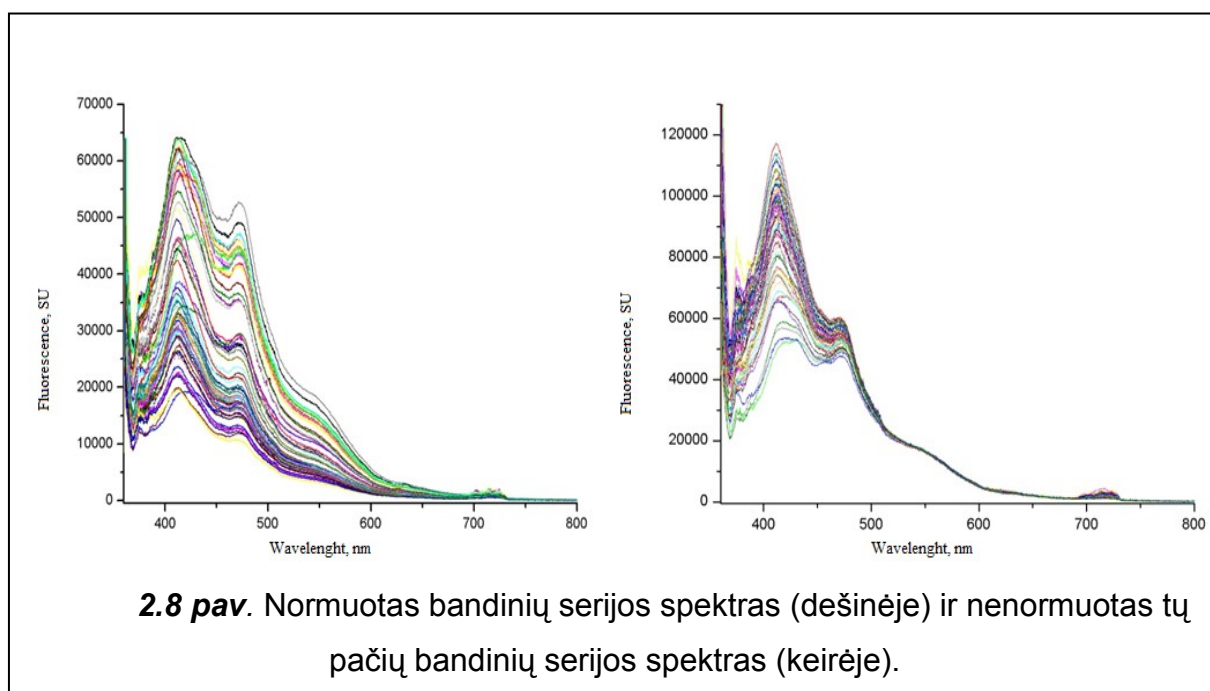
Užregistruotas tamsinis spektras yra būtinas prieš pradedant registruoti duomenų liuminescencijos spektrus – tokiu būdu yra pasirenkamas standartinis tyrimų spektras, kuris atimamas iš registruojamo bandinio spektro. Tamsinio spektro atėmimas iš bandinio registruojamo spektro vyksta jau esant fotosužaditimui ir nekeičiant kitų aplinkos sąlygų - pasirenkant *Store Dark* komandą iš komandinės eilutės arba *Spectrum | Store Dark* komandą iš užduočių eilutės. Tamsinio aplinkos spektro registravimo procedūra plačiau yra aprašyta gamintojo teikiamame aparatūros ir programinės įrangos aprašyme.

Užregistravus tamsinį aplinkos spektrą yra registruojamas bandinio padėklo liuminescencijos spektras, kuris po to yra atimamas iš pačio bandinio liuminescencijos spektro. Dabar yra nustatomi registracijos parametrai (integravimo laikas – *Integ. Time* (*msec.*) ir vidurkinimas - *Average*), atsižvelgiant į bandinio spektrą. Nustatyti parametrai tamsiniam spektrui ir bandinio liuminescencijos spektrui turi būti vienodi, priešingu atveju liuminescencijos spektrai bus užregistruoti nekorektiškai. Atlikus aprašytus nurodymus yra užregistruojamas pradinis liuminescencijos spektras (2.7 pav.).

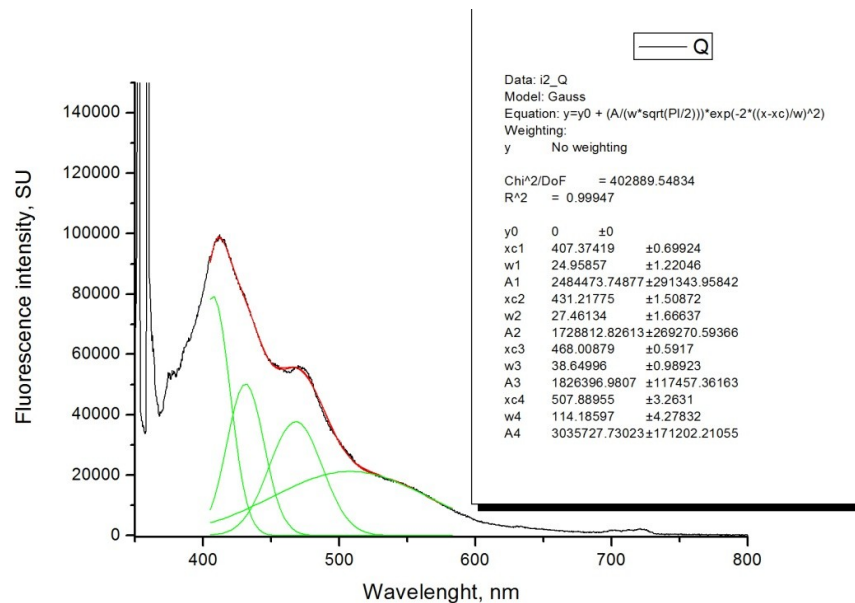


Liuminescencijos spektrai buvo išmatuoti diapazone nuo 340nm iki 1000nm. Turimi bandinių spektrai yra normuojami pagal ilgabangės srities petį taip, kad toliausiai į ilgabangę sritį nutolęs smailės petis sutaptų per visą intensyvumą (2.8 pav.). Šių bandinių spektrai buvo sunormuoti pagal visiems bandiniams pastovią formą išlaikančią ilgabangę sritį (λ).

=540,01nm.) – 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 ($\lambda=540,01$ 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. Jokios įtakos kokybinei analizei toks matematinis veiksmas nedaro. Spektų normavimas pagal ilgabangę petį šiame darbe buvo atliekamas naudojantis *Origin 7.0* programa. Prelimenariai matomos pagrindinės signalų smailės – matyti, kad sudėtingas signalas susideda iš kelių paprastų komponentų, todėl sekanti procedūra yra kiekvieno atskiro spektro aprašymas normaliaja kreive (gausoide). Pagal spektro smailes, spektrai yra aprašomi keturiomis gausoidėmis – išryškintos keturios pagrindinės spektrinių smailių grupės, kurios gana tiksliai aprašo turimus spektrus 370-600nm. srityje (2.9 pav.). Detalesnė spektrų dedamųjų analizė atliekama norint gautus duomenis sieti su histologinių tyrimų išvadomis.



Gauti duomenys saugomi kompiuteryje, kur analizuojami *Origin 7.0* ir *Excel* programiniais paketais. Duomenims analizuoti naudojome žinomas fluoroforų, esančiuose mūsų tiriamoje medžiagoje, sužadavimo/emisijos išklotines (*Characterization of the Excitation and Emission Matrices of Possible Fluorophores in Human Tissues and Cells, 2003*), kurie, kaip manome, sukelia fluorescenciją nagrinėtuose bandiniuose (žiūrėti priedus: 1-3 pav.).



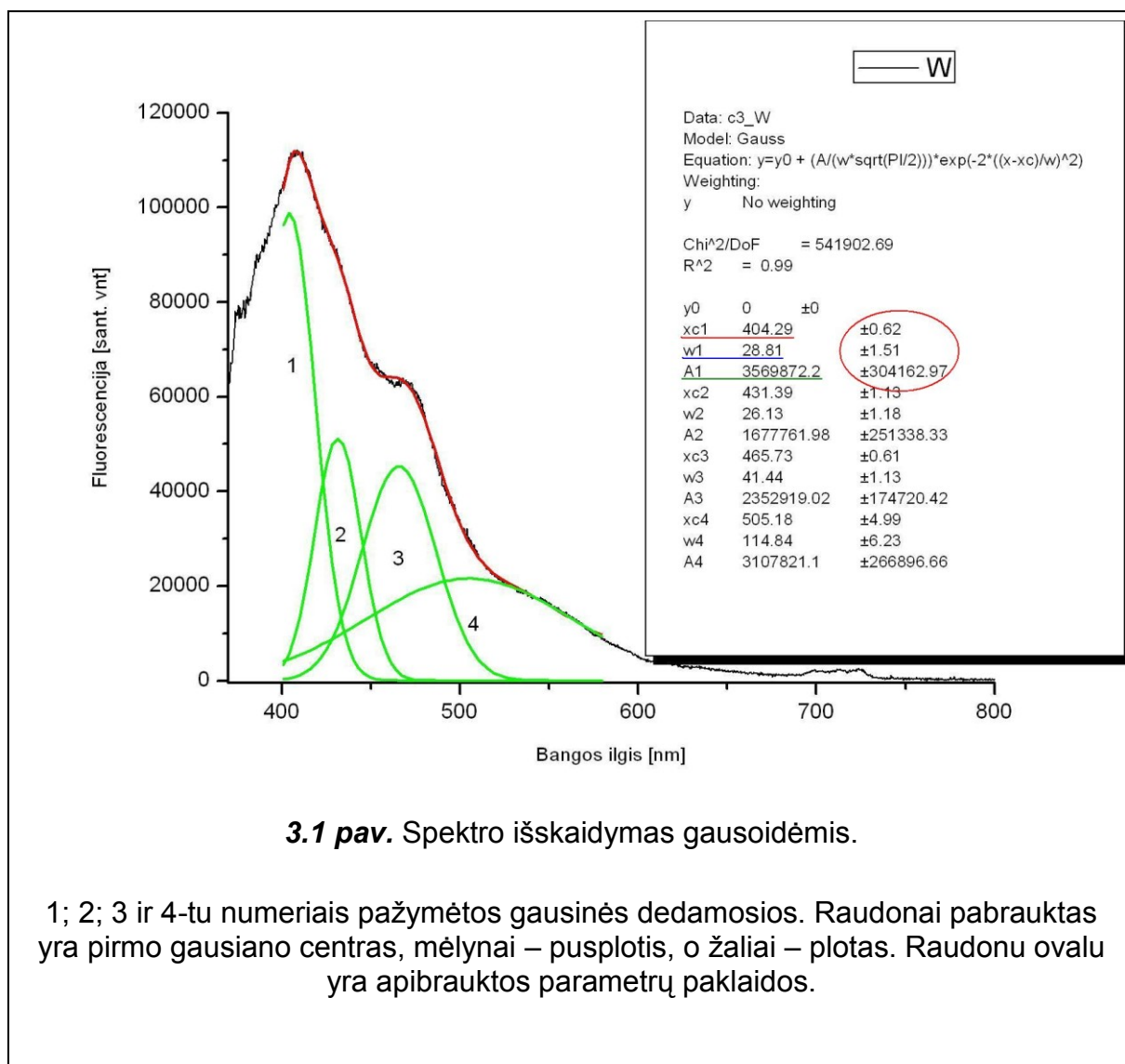
2.9 pav. Spektras (juoda linija) ir pagrindiniai spektro gausiniai komponentai (žalia linija)

Spektrų dedamųjų statistinė analizė atlikta naudojant *Stjudento t* kriterijų. Pasirinktas reikšmingumo lygmuo $p < 0,05$, kuriame rezultatai laikyti statistiškai patikimais.

Gausinis skirstinys rezultatų aprašymui pasirinktas ne kaip analitinis, o matematinis metodas, todėl gautus rezultatus negalime priskirti konkrečioms biocheminėms medžiagoms, esančioms tirtoje medžiagoje. Gausinis skirstinys, kaip metodas, pasirinktas dėl standartizuotų programų ir pasirinkto tikslo sukurti audinių kitimų atpažinimo algoritmą, kurį galima būtų diegti klinikoje. Analitinę schemą numatoma toliau tobulinti išsiaiškinant pagrindinių komponentų spektrus ir juos įjungiant į analizės procedūrą, tačiau tam dar trūksta daugelio parametru, o šiame darbe gautos išvados pasitarnaus tolesniam metodikos tobulinimui.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Šiame darbe buvo išskirti stuburo tarpšlankstelinio disko *III*-čios degeneracijos stadijos išvaržų liuminescencijos spektrų skirtumai ir gauti duomenys palyginti su degeneracinių pokyčių morfologiniu, struktūriniu bei imunohistocheminiu įvertinimu. Tirti bandiniai buvo suskirstyti į grupes pagal lokalizaciją atliktos atviros chirurginės operacijos metu. Gauti liuminescenciniai spektrai buvo analizuojami *Origin multi-peaks analysis* programiniu paketu, kuris išryškina vyraujančios autofluorescencijos bangos ilgio santykinę intensyvumą. Gauti duomenys, buvo analizuojami naudojantis *Excel* statistinės analizės paketu ir lyginami su gautom histologinėmis išvadomis.



Buvo kaupiama visų gautų bandinių duomenų bazė. Siekiant kuo didesnės duomenų įvairovės iš turimos tyrimo medžiagos, kiekvienas didesnis disko nuopjovos fragmentas buvo

tirtas keliuose atskiruose taškuose (lazerinės spinduliuotės indukuojamas fluorescencijos plotas kelis kartus mažesnis nei bandinys), nes buvo pastebėta, kad kiekvienas fragmentas ne tik skiriasi tarpusavyje (net ir to pačio paciento), bet ir pats pasižymi skirtinga struktūra, kuri gali atsispindėti fluorescencijos spektriniuose duomenyse.

Kiekvienas gautas spektras buvo aproksimuotas keturiomis gausoidėmis, ką atspindėjo pagrindinės spektrų charakteristikos ir taip išskirtos pagrindinės keturios dedamosios, kurių parametrai buvo reikšmingi tolimesnėje statistinėje analizėje: gausiano centras, plotas ir pusplotis (3.1 pav.).

Spėjama, kad pagal liuminescencijos spektro formą ir intensyvumą galima būtų spręsti apie duoto bandinio sandarą. Žinoma, kad skirtinga kalogeno rūšis liuminescuoja skirtingai ir tai gali būti vienas iš atraminių taškų stuburo išvaržos degeneracijos stadijai nustatyti. Be to stuburo tarpslankstelinio disko audinyje be kolagenų yra ir kitų fluoroforų (kraujo, elastino), kurie gali turėti lemiamos įtakos fluorescencijos spektrų formai.

Detaliau analizuojant gautus spektrus, pastebėti santykiniai vyraujančių smailių aukščio skirtumai, kurie galėtų būti siejami su esamų fluoroforų kiekybine dinamika, kas yra labai svarbu diagnozuojant stuburo tarpslankstelinio disko degeneraciją atskiruose regionuose ar net taškuose, priklausomai nuo aparatūros galimybių ir matavimo sąlygų.

Tarpslankstelinis diskas yra sudarytas iš daugybės medžiagų, mes palyginome mūsų gautus spektrus su standartinėmis sužadavimo/emisijos išklotinėmis tų medžiagų, kurios sudaro tarpslankstelinį diską. Standartinės sužadavimo/emisijos išklotinės (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 plačiame diapozone. Mūsų tyrimuose labai svarbaus fluoroforo kolageno II-ojo standartinės sužadavimo/emisijos išklotinės mums rasti nepavyko, bet taikydami tą pačią metodiką, mes išmatavome sauso kolageno II-ojo („Sigma“ kompanija, JAV) fluorescenciją esant 355nm. fotosužadavimui ir nustatėme, kad jo fluorescencija vyrauja mūsų nagrinėjamame diapozone: 370-590nm. (žiūrėti priedus: 4 pav.).

3.1. 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*) pusiau kiekybinis 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 lazerinės spinduliuotės fotosužadinimo.

3.1.1. 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 (3.1.1 pav.), o Safraninu O - oranžine spalva arba rūgštūs mucininio tipo baltymai (nusidažę Alciano mėliu melsvai - žiūrėti priedus: 3.1.2 pav.) - mucininė degeneracija arba II-ojo tipo kolageno baltymai, formuojantys II-ojo tipo kolageno fibriles (žiūrėti priedus: 3.1.4 pav.). 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 (žiūrėti priedus: 3.1.1 pav.) ir ląstelės mirtį (apoptozę) kai ląstelės branduolys subyra į chromatino fragmentus. Gilėjant disko degeneracijai abu ląstelių tipai buvo įtraukiami į mažesnius po 2 ląsteles (žiūrėti priedus: 3.1.1 pav.), vidutinius iki 8 ląstelių (žiūrėti priedus: 3.1.2 pav.) ir stambius iki 15 ląstelių klasterius (žiūrėti priedus: 3.1.3 pav.), 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 (žiūrėti priedus: 3.1.6 pav.). Mažiau degeneruotoje matricoje dažniausiai vyravo II-ojo tipo kolageno skaidulos (žiūrėti priedus: 3.1.4 pav.), PS nusidažiusios raudonai ir mikroskopo tamsiame lauke poliarizuojančios žalia spalva (2.2 pav.). Labiau degeneruotuose pavyzdžiuose mažėjo II-o tipo kolageno fibrilių, atsirado vis daugiau I tipo kolageno skaidulų nusidažiusių geltonai ir poliarizavusių oranžine-raudona spalva ir kitų kolagenų grupė, kurie dažėsi rausvai ir poliarizavo gelsva spalva (2.2 pav.). Imunohistochemiškai identifikavome tik II-ojo kolageno baltymų sankaupas ir II-ojo 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). Disko (D), išvaržos (P) ir sekvestrų (S) audinių preparatuose, dažytuose AM-PAS gerai išryškėjo maži ir stambūs plyšiai (žiūrėti priedus: 3.1.5 pav. ir 3.1.6 pav.) pripildyti rūgštaus mucininio skysčio, kuris taip pat persunkė disko baltyminę matricą ir kolageno skaidulas (žiūrėti priedus: 3.1.8 pav.), sukeldami ryškia jungiamojo audinio edemą. Terminalinę kolageno skaidulų destrukciją atspindėjo skaidulų ir jų pluoštų fragmentacija į židines granulių sankaupas (žiūrėti priedus: 3.1.7 pav.) - granuliacinė degeneracija arba skaidulų lyzė. 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 tarpslankstelinis 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.

1 lentelė. MORFOLOGINIAI IR HISTOCHEMINIAI STUBURO DEGENERACINIŲ DISKŲ, IŠVARŽŲ IR SEKVESTRŲ DEGENERACIJOS POŽYMIAI

Bandinio numeris	Struktūrinių pokyčių išreikštumas (Boos N., balais)	Histocheminiai pokyčiai			II/I/kiti kolagenai
		TW	Safr. O	Alc.m-PAS	
18-D ₁	18	L+3	Mx+2	+3	80/0/20
19-D ₂	22	L+1	Mx+2	+3	40/40/20
23-D ₃	14	L+3	Mx+2	+2,5	10/40/50
28-D ₄	15	L+3	Mx+1	+2,5	60/10/30
29-D ₅	17	L+3	Mx+1	+3	60/40/0
30-D ₆	17	L+0	Mx+0	+2	30/70/0
38-D ₇	14	L+0	Mx+3	+2	50/20/30
40-D ₉	15	L+2	Mx+1	+3	30/60/10
42-D ₁₀	16	L+3	Mx+2	+3	70/0/30
14-P ₁	9	L+2	Mx+2	+2	30/20/50
15-P ₂	16	L+2	Mx+1	+1,5	40/30/30
17-P ₃	14	L+2	Mx+2	+2	20/40/40
21-P ₄	11	L+1	Mx+1	0	10/80/10
22-P ₅	13	L+1	Mx+2	+2	60/30/10
24-P ₅	13	L+1	Mx+1	+2	60/30/10
25-P ₆	15	L+2	Mx+0	+2	20/60/20
32-P ₈	16	L+0	Mx+2	+2	70/10/20
34-P ₉	14	L+0	Mx+2	+1	50/10/40
35-P ₁₀	13	L+2	Mx+2	+2	85/5/10
36-P ₁₁	15	L+2	Mx+2	+2	20/40/40
43-P ₁₂	20	L+1	Mx+0	+2	70/0/30
16-S ₃	17	L+1	Mx+2	+2	20/30/50
26-S ₅	22	L+0	Mx+1	+3	50/0/50
27-S ₆	14	L+2	Mx+3	+2	50/10/40
31-S ₇	18	L+2	Mx+3	+3	60/10/30
38-S ₈	19	L+2	Mx+3	+3	60/10/30
41-S ₉	21	L+2	Mx+2	+2	40/10/50
44-S ₁₀	22	L+2	Mx+2	+3	20/50/30
45-S ₁₁	21	L+2	Mx+2	+3	40/40/20

3. 1. 2. Morfoliginiai 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*-ojo tipo kolageno skaidulos, dengiančios iki 80% (žiūrėti priedus: 3.1.8 pav.) pjūvio ploto.

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

3. 1. 3. Morfolginiai ir histocheminiai degeneracijos požymiai tarpslankstelių diskų išvaržose (P grupė; n=12)

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

Skaidulinį išvaržos komponentą sudarė vyraujančios *I*-ojo 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 (žiūrėti priedus: 3.1.9 pav.) Židininės smulkios *PG* sankaupos, 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 skoru (<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 (žiūrėti priedus: 3.1.10 pav.), tai patvirtina teoriją, kad autoimuninė disko rezorbcija prasideda tik plyšus užpakaliniam išilginiam raiščiui ir disko medžiagai susilietus su peridurinėmis kraujagyslėmis.

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

Tuo būdu, disko jungiamasis audinys pasižymėjo degeneracijos požymių įvairove be nurodytų protokole, pasipildė, jame nenurodytais, tokiais kaip kremzliniai fragmentai, išvaržos kraštų fragmentų atskilimas, didesnis matricos baltymų ir skaidulų degeneracijos laipsnis.

3. 1. 4. Morfolginiai 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 židinės stambios granulių sankaupos, totaliai mirusiomis mažomis chodroidinėmis ląstelėmis arba klasterių detritas. *II*-ojo tipo kolageno skaidulų mažėjo iki 20% daugėjant kitų tipų kolageno skaiduloms net iki 50- 80% (žiūrėti priedus: 3.1.11 pav.). Rūgščių mucininio tipo skysčių padaugėjo labiausiai iki 2 balų tiek matricoje ir stambiuose plyšiuose.

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

3. 2. Grupių Statistinis Palyginimas

Analizuojant *D*, *P* ir *S* grupes 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 indeksą $D < P < S$ ($p=0,001$), 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.

Buvo atlikta visų trijų mėginių grupių (*D*, *P* ir *S*) gausinių komponentų koreliacinė analizė su bendru degeneracijos indeksu (*Boos N.*) grupės mėginiuose (žiūrėti priedus - **2 lentelė**). Rezultatai parodė, kad iš visų keturių dedamųjų, su degeneracijos indeksu geriausiai koreliavo būtent išvaržos mėginiai (*P* grupė) (**3 lentelė**).

3 lentelė. Degeneracijos Ingeksio Koreliacija Su Spektrų Komponentais*

Grupė/kausoidė	1	2	3	4
D	-0,03	0,24	-0,13	0,43
P	-0,35	0,29	-0,48	0,66
S	0,02	0,02	-0,08	0,5

* išreikšta % ir apvalinta šimtųjų tikslumu

Iš lentelėje pateiktų duomenų matome tokias tendencijas:

- su degeneracijos indeksu geriausiai koreliuoja 4-ta gausoidė (dešinysis stulpelis);
- didžiausią koreliacijos koeficientą atitinką labiausiai histologiškai degeneravusių mėginių grupė (*P*), mažiausia degeneracijos ir histologijos koreliacija pasižymi mažiausiai degeneravusi grupė (*D*) (**1 lentelė**);
- *P* grupės mėginių koreliacija su gausoidėmis yra stipriausia: su 1 ir 3 atvirkštinė koreliacija, o su 2 ir 4 - tiesioginė.

Koreliacijos koeficientas, dėl ribotos grupės mėginių imties (12 mėginių *P* grupėje), šiuo atveju rodytų ne tiesioginę priklausomybę tarp pasirinktų parametrų, bet tendencijas, kurias ateityje, esant pakankamai imčiai galima būtų patvirtinti arba paneigti naujais statistiniais skaičiavimais.

P mėginių grupė, pagal bendrą degeneracijos indeksą buvo sąlyginai padalinta į dvi grupes – su mažesniu (mažiau nei 15) ir didesniu (daugiau arba lygu 15) degeneracijos indeksu (*3.2.1 pav.*).

x<14			x>=14		
band nr/data	deg/ laipsn	4 plotas	band nr/data	deg/ laipsn	4 plotas
P1 04.09	9	1733247	P11 09.01	15	3638069
P10 09.01	13	2060704	P2 04.09	16	4657228
P4 06.11	11	2539684	P3 04.22/04.23	14	3111362
P5 06.11	13	931301	P6	15	3005087
P5'	13	2444170	P8 08.11	16	2861342
			P9 09.01	14	3506768
			P12	20	3864316

3.2.1 pav. P grupės mėginių suskirstymas į dvi grupes: mažesnės degeneracijos(kairėje) ir didesnės degeneracijos (dešinėje).

Pirmas stulpelis kairėje – bandinio numeris ir tyrimo data; antras – degeneracijos indeksas; trečias – ketvirtosios gausios plotas.

Gautų dviejų grupių statistinė analizė atlikta naudojant *Stjudento t* kriterijų. Pasirinktas reikšmingumo lygmuo $p < 0,05$, kuriame rezultatai laikyti statistiškai patikimais. Testas parodė, kad pagal degeneracijos indeksą suskirstytų grupių 4-tosios gausinės dedamosios plotai patikimai skyrėsi ($p=0,001$) (**4 lentelė**).

t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	Variable 1	Variable 2
Mean	1941821	15,71429
Variance	4,22E+11	4,238095
Observations	5	7
Hypothesized Mean Difference	0	
df	4	
t Stat	6,682819	
P(T<=t) one-tail	0,001303	
t Critical one-tail	2,131847	
P(T<=t) two-tail	0,002607	
t Critical two-tail	2,776445	

4 lentelė. Gautų dviejų *P* grupių statistinė analizė atlikta naudojant *Stjudento t* kriterijų.

Tirtas grupes sudarė pakankamai maža imtis (viso 12 atviejų), tai galėjo įtakoti tokį didelį reikšmingumo lygmenį tarp tirtų grupių. Nepaisant to, minėtieji skaičiavimai, nors ir neparodo tiesioginio tikslaus duomenų pasiskirstymo skirtumo, bet yra pakankami nustatyti spektrinių duomenų tendencijas. Remiantis minėtais skaičiavimais (ketvirto gausinio komponento koreliacija su *P* grupės duomenimis ir pakankamai didelis reikšmingumo lygmuo atskyrus grupes pagal degeneraciją), galime numanyti, jog tirtame sausgysliniame žiede (*P*

grupė) galima būtų įvertinti degeneracijos laipsnį, priklausantį nuo spektroskopiniu metodu gautų duomenų.

Nustatėme, kad pagrindinių tarpslankstelinio disko fluoroforų: kolageno *I*, kolageno *II* ir elastino sužadavimo fluorescencijos spektrai atitinka mūsų išmatuotą diapazoną.

Remdamiesi žinynais ir savais matavimais (kolagenas *II*) nustatėme, kad kolageno *I*, kolageno *II* ir elastino fluorescencija randama mūsų tirtoje emisijos juostoje (žiūrėti priedus: 1-4 pav.).

Mūsų išmatuoti spektrai atspindi daugelio endogeninių fluoroforų buvimą tarpslanksteliniam diske ir jų spektrų persiklojimą. Be to fluorescencijos spektrų dėsningumai 470-540nm. ruože dažniausiai gali atspindėti įvairius metabolinius kitimus ląstelėse – tai galėtų būti tolimesnio biocheminio tyrimo kryptis. Tuo tarpu fotodiagnostiniam algoritmui svarbus spektro komponentų patikimas, statistinis skirtumas lyginamose audinių grupėse, o ne jų įvardinimas.

IŠVADOS

1. Metodiškai atlikta spektroskopinė stuburo tarpšlankstelinio disko tyrimo *in vitro* analizė parodė liuminescencijos spektrų ir bendro degeneracijos indekso (*Boos N.*) koreliacijos tendenciją;
2. Iš gautų fluorescencijos spektrų galima netiesiogiai spręsti apie disko degeneracijos laipsnį – 4-tas gausinis spektro komponentas koreliuoja su bendru degeneracijos indeksu ($P>S>D$);
3. Stuburo tarpšlankstelinio disko sausgysliniame žiede (*P grupė*), naudojantis spektroskopiniais metodais, netiesiogiai galima įvertinti bendrą degeneracijos indeksą (*Boos N.*) – skirtingo bendro degeneracijos indekso mėginiai patikimai skiriasi tarpusavyje pagal spektroskopinius parametrus
4. Autofluorescenciniai *in vitro* tyrimo rezultatai leidžia tikėtis spektroskopinio degeneracijos laipsnio nustatymo disko išvarzoje (*P grupė*), perkutaninės lazerinės disko dekompresijos procedūros metu ir planuoti gydymą pagal spektroskopinius duomenis.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GAMTOS MOKSLŲ FAKULTETAS
BIOCHEMIJOS IR BIOFIZIKOS KATEDRA

Darius Varanius

STUBURO IŠVARŽOS AUDINIO AUTOFLUORESCENCIJOS TYRIMAI

Magistrinis darbas

Santrauka

Atlikta klinikinės medžiagos spektroskopinė analizė indukuojant autofluorescenciją lazerine spinduliuote. Eksperimento metu naudotas nešiojamas trečios harmonikos generatorius (355nm.). Tiriamoji medžiaga atviros stuburo išvaržos pašalinimo operacijos metu buvo imta iš skirtingų vietų: D- iš disko gilumos, P – išvarža iš po raiščio ir S – laisvas sekvestras. Viso buvo surinkta 29 bandiniai: 9 - D, 12 – P ir 8 S. Eksperimentų metų gauti rezultatai buvo lyginami su histologinėmis tos pašios medžiagos išvadomis.

Mūsų atliktų tyrimų rezultatai rodo, kad sukkeltoji autofluorescencija rodo skirtingas medžiagas sudarančias tarpšlankstelinį diską. Manome, kad pritaikius spektroskopinę analizę galima nustatyti disko biocheminės struktūros kitimus, taipogi, netiesiogiai spręsti apie disko degeneracijos procesą. Iš spektro sudedamųjų komponentų galima preliminariai nustatyti tarpšlankstelinio disko išvaržos sausgyslinio žiedo (P grupė) degeneracijos lygmenį, kuris neatsispindi kitais, neinvaziniais atvaizdavimo metodais.

Pašalintų tarpšlankstelinio disko mėginių spektrinis tyrimas sudaro pagrindą tolimesniems degeneruojančio disko biocheminiams ir spektriniais tyrimams.

VILNIUS UNIVERSITY
FACULTY OF NATURAL SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS

Darius Varanius

**INVESTIGATION OF SPINAL HERNIA TISSUE AUTOFLUORESCENCE
SPECTRUM**

Master thesis

Summary

The analysis of material of clinical state was made inducing the autofluorescence using the third harmonic 355 nm. laser radiation generator. Experimental material was taken during open vertebral hernia removal procedure. Accordingly to intraoperative findings, all the samples were divided into three groups: D group- disc specimen gathered from inside the disc space; P group- herniation removed from subligamentous space; S group- free sequester in direct contact with epidural vessels. For the final assessment 29 disc specimens were collected. Stained disc sections were evaluated also histologically.

The results indicate that auto fluorescence refers to different substances constituting intervertebral disc. Spectral analysis can be used to determine biochemical changes content of intervertebral disc matrix, and signs of disc degeneration can be identified indirectly. According to the spectral gaussian components in spectra, degeneration in intervertebral disc (P group) may be determined indirectly. Moreover, spectroscopy may be a new very sensitive tool in determining intervertebral disc degeneration where other non-invasive methods are helpful.

Spectroscopic analysis of intervertebral disc removed during open surgery, creates background for further investigation on degenerating intervertebral disc spectral features and biochemical changes.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

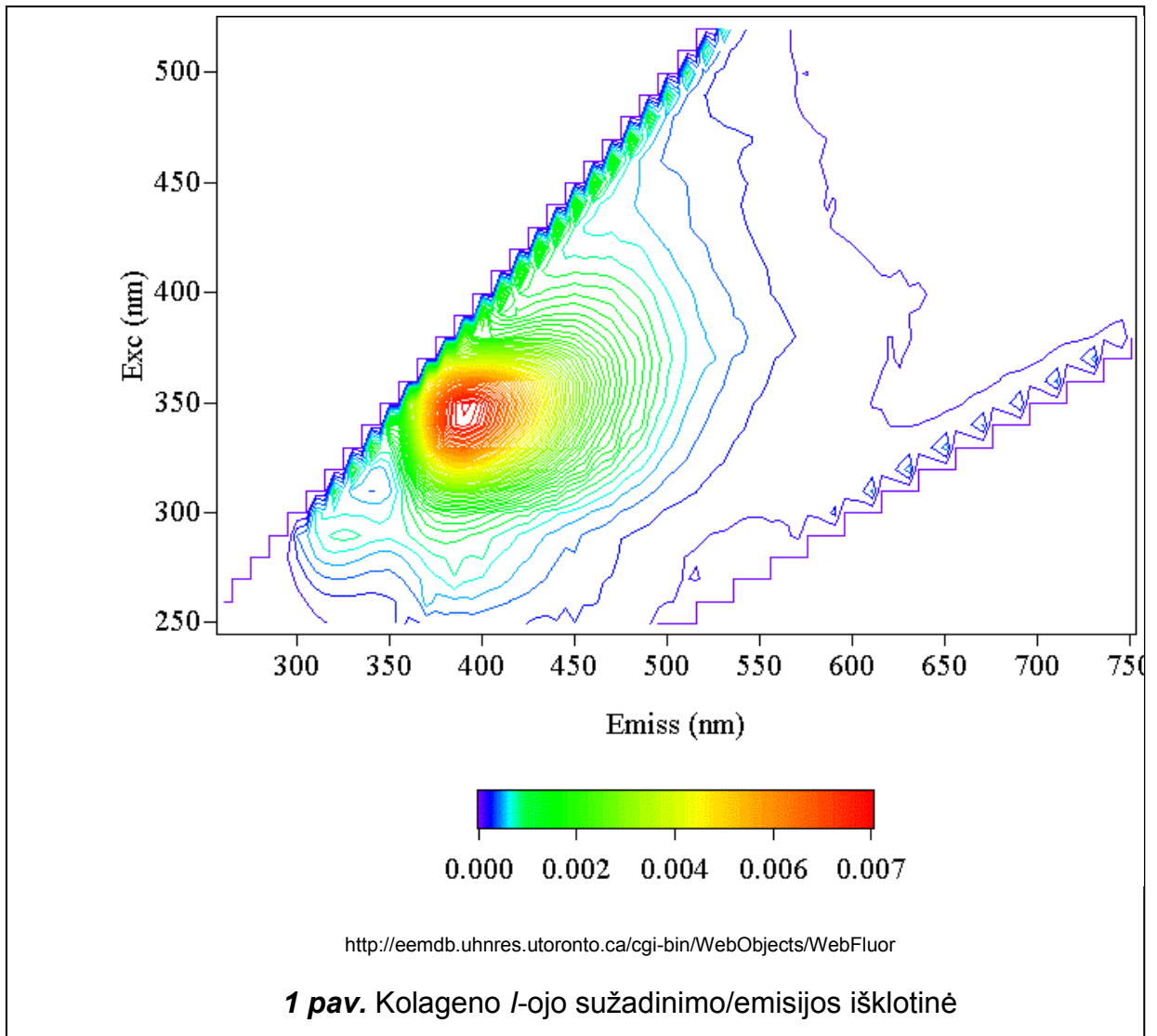
1. Adams et al., Mechanical initiation of intervertebral disc degeneration. 2000
2. Adams et al., Prolapsed intervertebral disc. A hyperflexion injury 1981 Volvo Award in Basic Science. 1982
3. Adams M. A., Bogduk N., Burton K., et al., *The Biomechanics of Back Pain*. Edinburgh, UK: Churchill Livingstone, 2002
4. Adams M. A., et al. "Stress distributions inside intervertebral discs: The effects of age and degeneration". J Bone Joint Surg [Br] 1996 ;78:965 -72, 1996
5. Annette Kettler Hans - Joachim Wilke, Review of existing grading systems for cervical or lumbar disc and facet joint degeneration. Eur Spine J (2006) 15:705- 718, 2006
6. Antoniou J., Steffen T., Nelson F., Winterbottom N., Hollander A. P., Poole R. A., Aebi M., Alini M., 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 98:996–1003, 1996
7. Banks R. A., et al. Ageing and zonal variation in post-translational modification of collagen in normal human articular cartilage. Biochem J 1998; 330:345-51, 1998
8. Bogduk N., Adams M., et al., *The Biomechanics of back pain*. Churchill Livingstone; London : 1 st edition: 62-71, 2002
9. Boos N, et al., *Classification of Age-Related Changes in Lumbar Intervertebral Discs 2002 Volvo Award in Basic Science*"; Volume 27, Number 23, pp 2631-2644, Spine 2002
10. Buckwalter J. A. *Spine update: Aging and degeneration of the human intervertebral disc*. Spine 1995; 20:1307-14
11. 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 [cituota 2007 06 19]. Adresas: <http://eemdb.uhnres.utoronto.ca/cgi-bin/WebObjects/WebFluor>
12. Christian W. A. Pfirrmann, MD, Alexander Metzendorf, MD, Marco Zanetti, MD,
13. Cloyd Jordan M. BA. and Elliott Dawn M. Elastin Correlates With Human Disc Degeneration in the Anulus Fibrosus and Nucleus Pulposus. Spine Volume 32, Number 17 pp 1826-1831. 2007
14. Čekanavičius V., Murauskas G. Statistika ir jos taikymai 1, 2. TEV. 2003. Vilnius
15. D. M. Spengler, EA Ouellette, M. Battie and J. Zeh, Elective discectomy for herniation of a lumbar disc. Additional experience with an objective method. *J Bone Joint Surg Am*. 1990;72:230-237, 1990
16. Dapšys K., Galvos smegenų struktūrų ir funkcijų vaizdavimo metodai, Vilnius, 1998
17. Douglas M. Gillard, *Basic Disc Anatomy*. San Jose; 2002
18. Eiichi Takada and Masaya Takahashi, Kimio Shimada, Natural history of lumbar disc hernia with radicular leg pain: Spontaneous MRI changes of the herniated mass and correlation with clinical outcome. Journal of Orthopaedic Surgery 2001, 9(1): 1–7, 2001
19. Freemont A. J., Peacock T. E, Goupille P., et al., Nerve ingrowth into diseased intervertebral disc in chronic back pain. *Lancet*;350:178-81, 1997
20. Freemont et al., Nerve ingrowth into diseased intervertebral disc in chronic back pain. *Lancet* 1997
21. G. Zonios, L.T. Perelman, V. Backman, R. Manoharan, M. Fitzmaurice, J. Van Dam, and M. S. Feld, Appl. Opt. 38, 6628,1999
22. Guinot B, Fessler RG (2000). Molecular biology of degenerative disc disease // Neurosurgery. - 2000, vol. 47, no. 5, p. 1034-1040

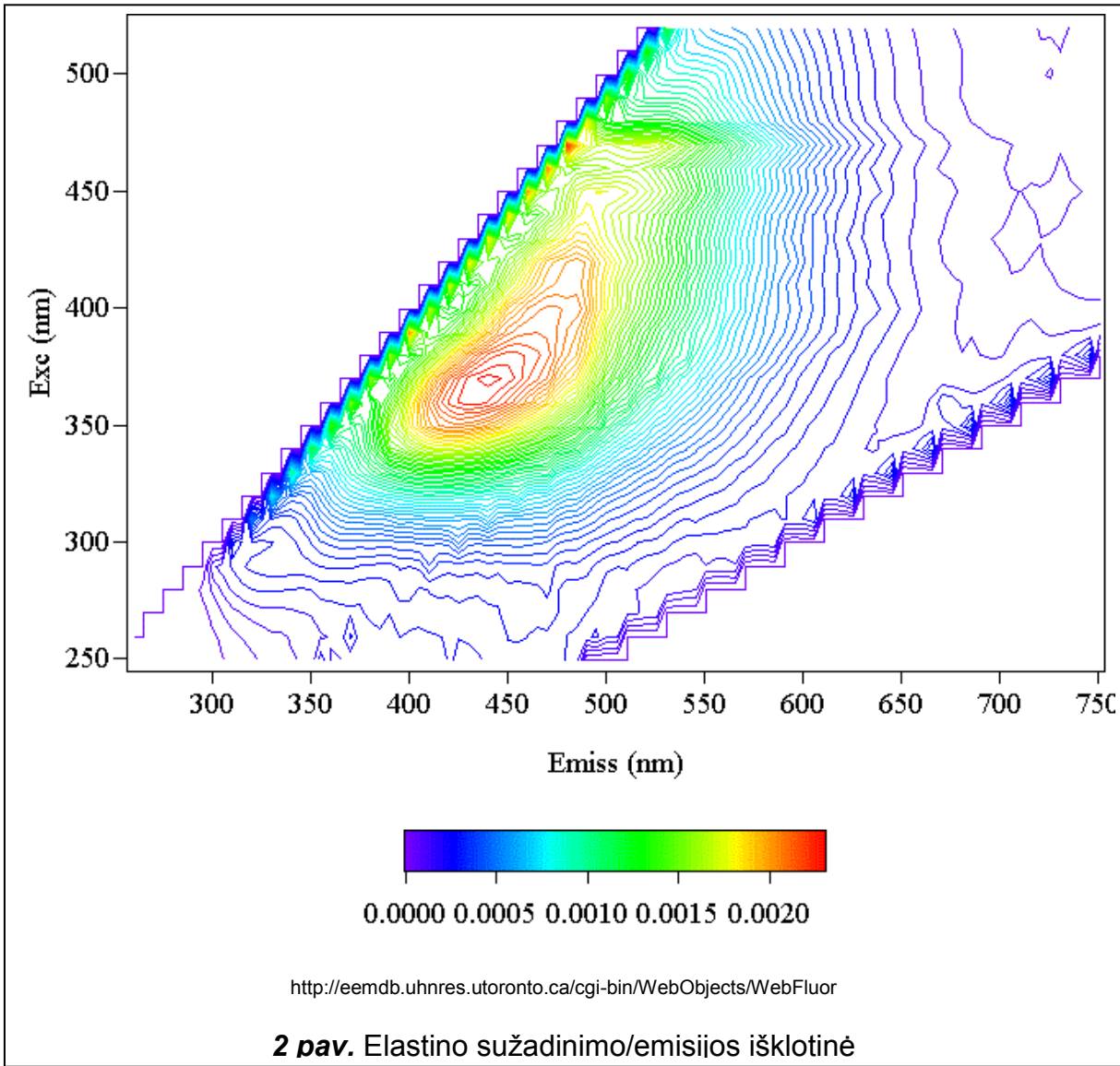
23. Hanlon, E. B., Manoharan, R., Koo, T. W., Shafer, K. E., Motz, J. T., Fitzmaurice, M., Kramer, J. R., Itzkan, I., Dasari, R. R., and Feld, M. S., *Phys. Med. Biol.* 45, R1 – R59, 2000
24. Henry H. Sherk, C. Thomas Vangness, George Thabit, III and Robert W. Jackson, *Electromagnetic Surgical Devices in Orthopaedics : Lasers and Radiofrequency. J. Bone Joint Surg. Am.* 84:675-681, 2002
25. Hirsch C., *An attempt to diagnose the level of a disc lesion clinically by disc puncture. Acta Orthop* 18:132-140, 1948
26. Holm et al., *Experimental disc degeneration due to endplate injury.* 2004
27. Holm S., Holm A. K., Ekstrom L., et al., *Experimental disc degeneration due to endplate injury. J Spinal Disord Tech*;17:64-71, 2004
28. Irene Georgakoudi *et al*, *SPIE Vol.* 4432, 1-7, 2001
29. Yasuma T., E. Makino, S. Saito and M. Inui, *Histological development of intrvertebral disc herniation. J. Bone Joint Surg. Am* 68:1066- 1072, 1986
30. Yu SW, Sether L. A., Ho P. S., Wagner M., Houghton V. M., *Tears of the annulus fibrosus: correlation between MR and pathologic findings in cadavers. AJNR Am J Neuroradiol* 9:367– 370, 1988
31. James N. Weinstein, DO, MSc Jon D. Lurie, MD, MS Tor D. Tosteson, ScD, Jonathan S. Skinner, PhD, Brett Hanscom, MS, *Surgical vs Nonoperative Treatment for Lumbar Disk Herniation. (Reprinted) JAMA, November 22/29, 2006—Vol 296, No. 20, 2006*
32. Jeffrey C. Lotz and Jill A. Ulrich, *Innervation, Inflammation, and Hypermobility May Characterize Pathologic Disc Degeneration: Review of Animal Model Data. J. Bone Joint Surg. Am.* 88:76-82, 2006. doi:10.2106/JBJS.E.01448, 2006
33. Jensen M. C., Kelly A. P., Brant-Zawadzki M. N., *MRI of degenerative disease of the lumbar spine. Magn Reson Q* 10:173–190, 1994
34. John S. Thalgott, MDa, Todd J. Albert, MDb, Alexander R. Vaccaro, MDb, Charles N. Aprill, MDc, James M. Giuffre, BAa, John S. Drake, MSa,* , Jonathan P. Henke, MPH, PA-Ca, *A new classification system for degenerative disc disease of the lumbar spine based on magnetic resonance imaging, provocative discography, plain radiographs and anatomic considerations. The Spine Journal* 4 (2004) 167S–172S, 2004
35. Joseph R. Lakowicz. *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3rd ed. Springer; 2006
36. Juerg Hodler, MD, and Norbert Boos, MD, *Magnetic Resonance Classification of Lumbar Intervertebral Disc Degeneration. SPINE Volume 26, Number 17, pp 1873-1878, 2001*
37. Julian M. Menter. *Temperature dependence of collagen fluorescence. Photochemical & Photobiological Sciences.* 2006, 5, 403-410
38. Kozlovskaja A., Varanius D., Terbetas G., Vaitkuvienė A., Kurilčik G. *Luminescence characterization of degenerative disc disease level. Proceedings of IALMS 2007 conference: Laser Florence the laser medicine world, Florence, Italy, 8-10th November, 2007 / editor: Leonardo Longo. ISBN 9788073993801 p. 24-32.*
39. Kublickienė O., *Histologinė technika ir praktinė histochemija. Mokslas.* 1978
40. Li Cao, Farshid Guilak and Lori A. Setton. *Three- dimensional morphology of the pericellular matrix of intervertebral disc cells in the rat. Anatomical Society of Great Britain and Ireland.* 2007
41. Li Kauppila, *Ingrowth of blood vessels in disc degeneration. Angiographic and histological studies of cadaveric spines. J. Bone Joint Surg. Am* 77:26- 31, 1995
42. Lindblom K., *Diagnostic puncture of intervertebral discs in sciatica Acta. Orthop. Scand* 17:231-239, 1948
43. Lyn Lampman, *A simplified understanding of low back pain.* M.R.T, 2005

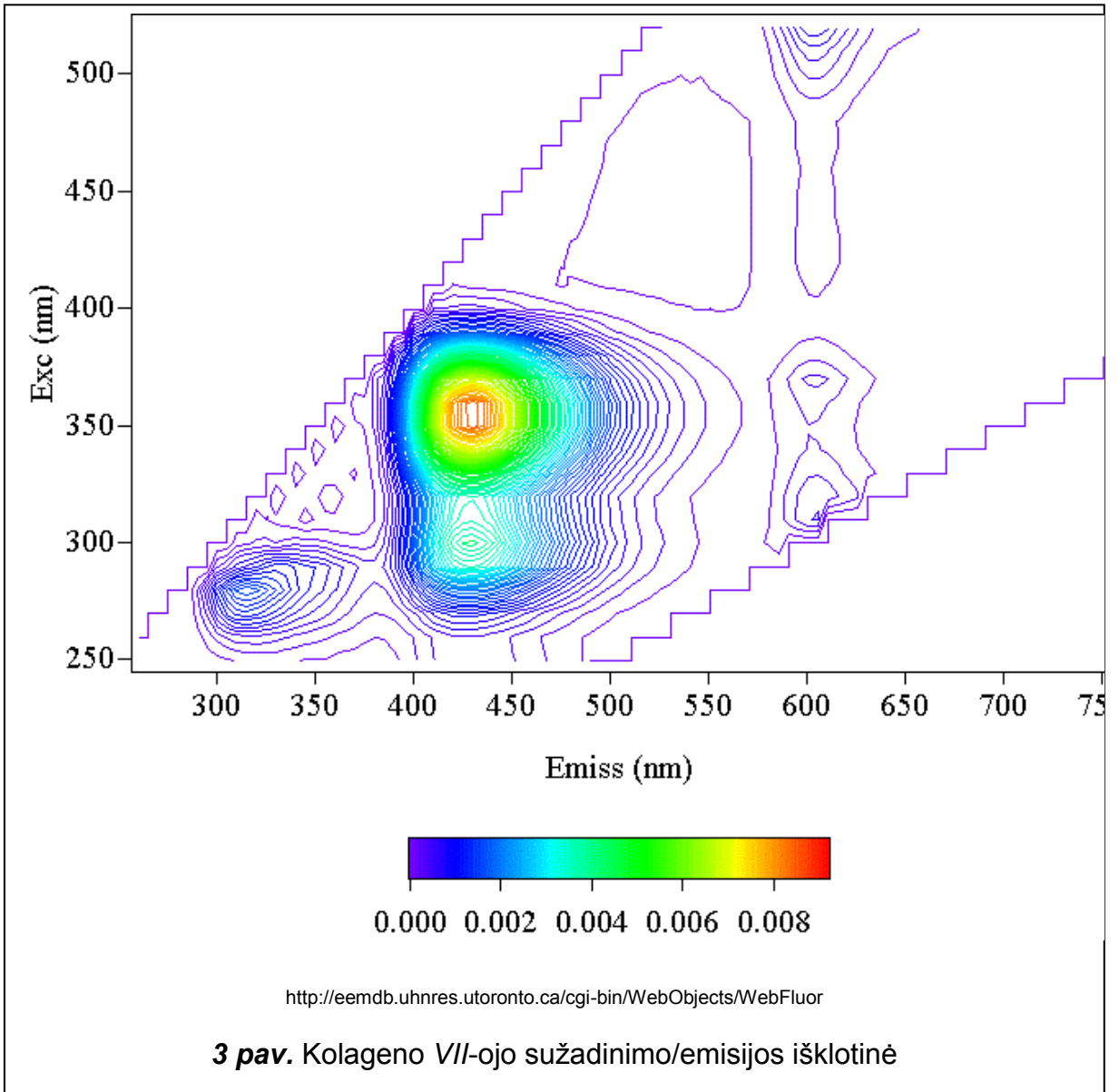
44. Lori A. Setton and Jun Chen, Mechanobiology of the Intervertebral Disc and Relevance to Disc Degeneration. *J. Bone Joint Surg. Am.* 88:52-57, 2006. doi:10.2106/JBJS.F.00001, 2006
45. Lorin M. Benneker, Paul F. Heini, Suzanne E. Anderson, Mauro Alini, Keita Ito, Correlation of radiographic and MRI parameters to morphological and biochemical assessment of intervertebral disc degeneration. *Eur Spine J* (2005) 14 : 27–35, 2005
46. 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
47. Michael A. Adams, PhD, and Peter J. Roughley, PhD, What is intervertebral disc degeneration and what causes it?, 2006
48. Nerlich A. G., Boos N., " Immunohistologic markers for age-related changes of human lumbar intervertebral discs." *Spine* 1997; 22:2781-95, 1997
49. Nirmala Ramanujam, Encyclopedia of Analytical Chemistry, R.A. Meyers (Ed.), John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 20–56, 2000
50. Pollintine et al., Neural arch load-bearing in old and degenerated spines. *J Biomech* 2004
51. Pollintine P, Przybyla AS, Dolan P, et al., Neural arch load-bearing in old and degenerated spines. *J Biomech*;37:197-204, 2004
52. Reijo A. Autio, MD, Jaro Karppinen, MD, DMSc, Jaakko Niinimäki, MD,
53. Resnick D. K., Malone D. G., Ryken T. C., Guidelines for the Use of Discography for the Diagnosis of Painful Degenerative Lumbar Disc Disease. *Neurosurg Focus* 13(2):Article 12, 2002
54. Risto Ojala, MD, DMSc, Mauno Kurunlahti, MD, DMSc, Marianne Haapea, MSc, Heikki Vanharanta, MD, DMSc, and Osmo Tervonen, MD, DMSc, Determinants of Spontaneous Resorption of Intervertebral Disc Herniations. *SPINE* Volume 31, Number 11, pp 1247–1252, 2006
55. Robert Gilles, George Zonios, R. Rox Anderson, and Nikiforos Kollias, Fluorescence excitation spectroscopy provides information about human skin *in vivo*, 2000
56. 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. 10301038
57. Rotomskis R., Bagdonas S., Valančiūnaitė J. *Biofotonika*. Vilniaus universiteto leidykla. 2007. Vilnius
58. Rotomskis R., Karabanovas V., Poderys V., Bagdonas S., Didžiapetrienė J. Įvadas į nanomediciną. Aušra. 2008. Kaunas
59. Rotomskis R., Streckytė G. Fluorescencinė diagnostika biomedicinoje. Vilniaus universiteto leidykla. 2007. Vilnius
60. Rotomskis R., Streckytė G., Bagdonas S., Venius J. Optinės diagnostikos technologijos (optinė biopsija). Vilniaus universiteto leidykla. 2008. Vilnius
61. Rotomskis R., Streckytė G., Gričiūtė L. Fotosensibilizuota navikų terapija: pirminiai vyksmai. Lietuvos mokslas. 2002. Vilnius
62. Rotomskis R., Žurauskas E., Žurauskienė E., Bagdonas S., Žalgevičienė V. Fluorescencinis vaizdinimas biomedicinoje. Aušra. 2008. Kaunas
63. Saifuddin A, Braithwaite I, White J, et al., The value of lumbar spine magnetic resonance imaging in the demonstration of anular tears. *Spine* 23:453-457, 1998
64. Sally Roberts, Helena Evans, Jayesh Trivedi and Janis Manage, Histology and Pathology of the human intervertebral disc. *J. Bone Joint Surg. Am* 88:10- 14, 2006

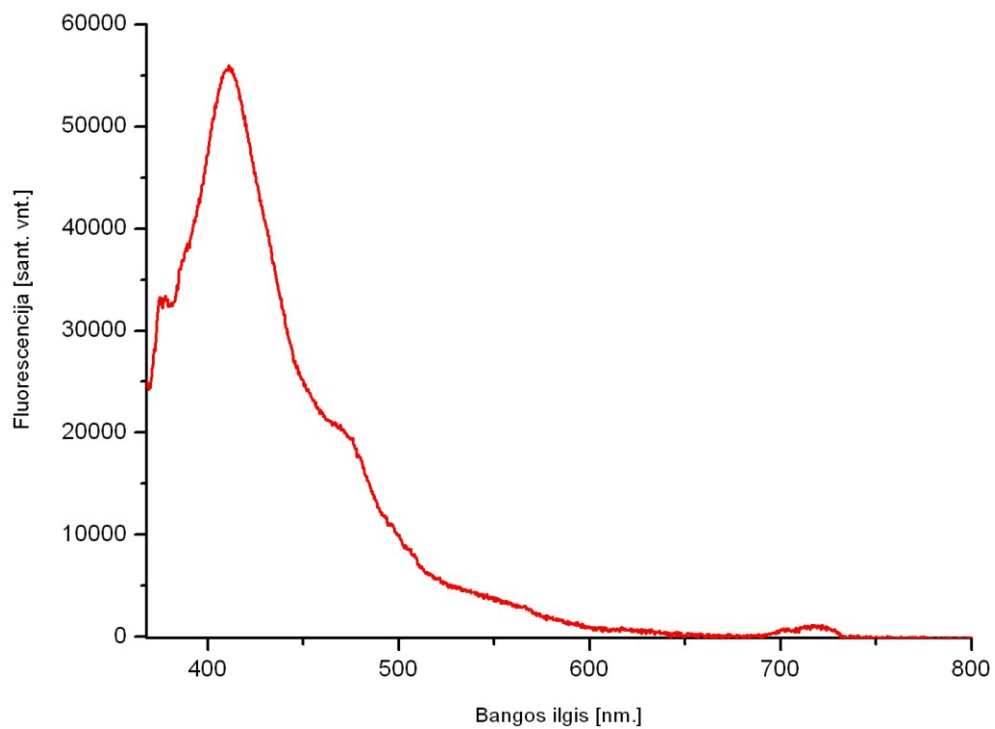
65. Salminen et al., Recurrent low back pain and early disc degeneration in the young, 1999
66. Salminen J. J., Erkintalo M. O, Pentti J., Recurrent low back pain and early disc degeneration in the young. *Spine* 24:1316–1321, 1999
67. Seiji Ohtori, MD, PhD, Gen Inoue, MD, Toshinori Ito, MD, Takana Koshi, MD,
68. Streckytė G., Didžiapetrienė J., Kirvelienė V., Bagdonas S., Rotomskis R. Fotosensibilizacija biosistemose: taikymas ir perspektyvos. ProgreTus. 2008. Vilnius
69. T Yasuma, S Koh, T Okamura and Y Yamauchi, Histological changes in aging lumbar intervertebral discs. Their role in protrusions and prolapses. *J Bone Joint Surg Am.* 1990;72:220-229, 1990
70. Terbetas G., Kozlovskaja A., Varanius D., Gražienė V., Vaitkus J. V., 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. Book Series: AIP Conference Proceedings, Vol. 1142. ISBN 9780 p. 15-20.
71. Terbetas G. Lazerinių metodų panaudojimas tarpslankstelinio disko ligų diagnostikai ir gydymui [daktaro disertacija]. Vilnius: Vilniaus universitetas; 2010
72. Tomoyuki Ozawa, MD, Hideo Doya, MD, Tomoko Saito, MD, Hideshige Moriya, PhD, MD, and Kazuhisa Takahashi, PhD, MD, Tumor Necrosis Factor-Immunoreactive Cells and PGP 9.5-Immunoreactive Nerve Fibers in Vertebral Endplates of Patients With Discogenic Low Back Pain and Modic Type 1 or Type 2 Changes on MRI. *SPINE* Volume 31, Number 9, pp 1026- 1031, 2006
73. Trout J. J., Buckwalter J. A., Moore K. C., "*Ultrastructure of the human intervertebral disc: II. Cells of the nucleus pulposus.*" *Anat Rec* 1982; 204:307-314, 1982
74. Vaitkuvienė A., Lazerinės chirurgijos pradmenys: mokomoji priemonė. 35 pusl. ISBN 9986-19-065-7 Vilniaus universiteto leidykla. 1994. Vilnius
75. Videman et al., Associations between back pain history and lumbar MRI findings. *Spine* 2003
76. Videman T, Battie MC, Gibbons L. E., et al., Associations between back pain history and lumbar MRI findings. *Spine*;28:582-8, 2003
77. Videman T., et al., 1998 Volvo Award winner: *Intragenic polymorphisms of the vitamin D receptor gene associated with intervertebral disc degeneration.* 23:2477-85, *Spine* – 1998
78. Viikari-Juntura E., Raininko R., Videman T., Porkka L., Evaluation of cervical disc degeneration with ultralow field MRI and discography. An experimental study on cadavers. *Spine* 14:616–619, 1989

PRIEDAI

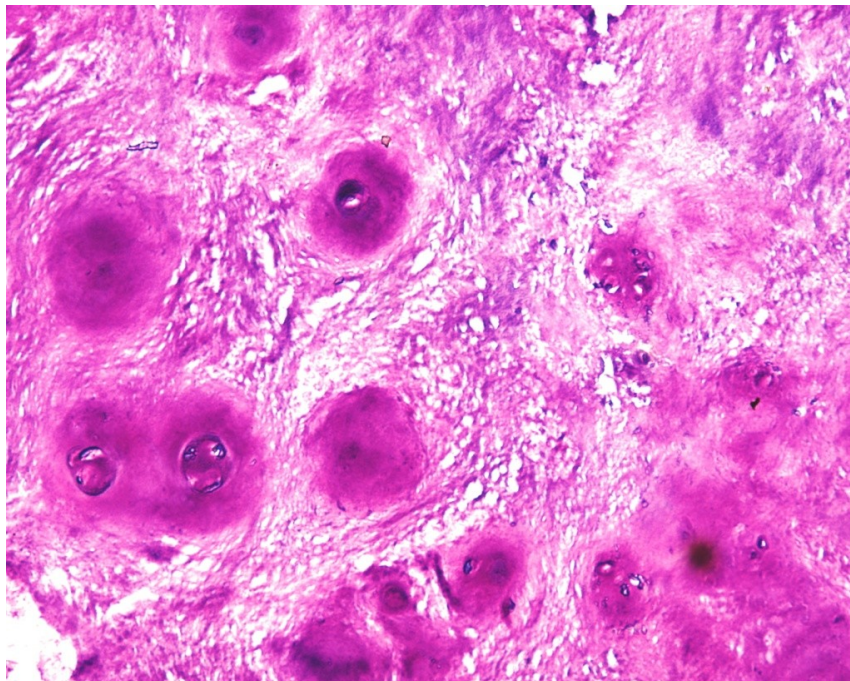




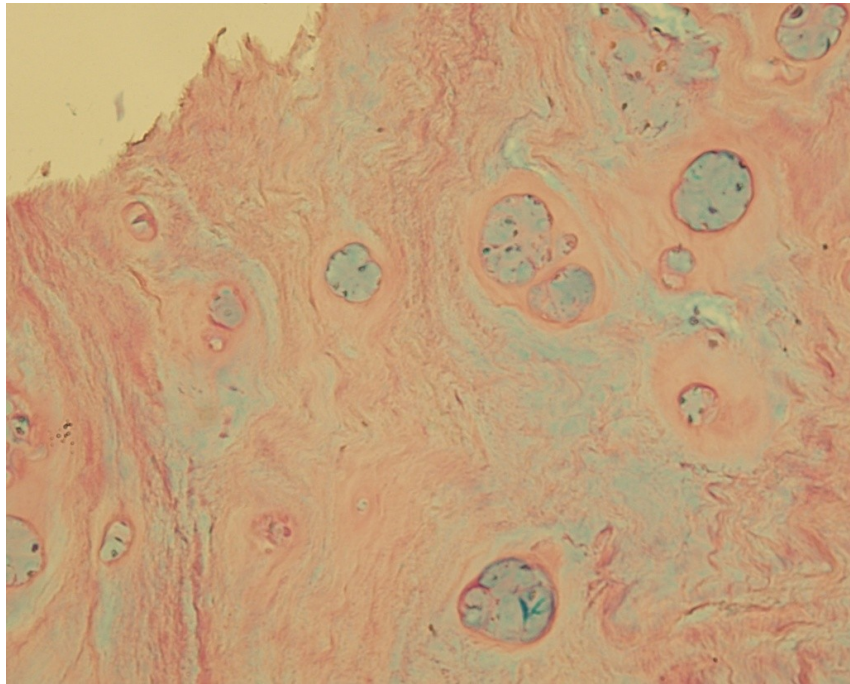




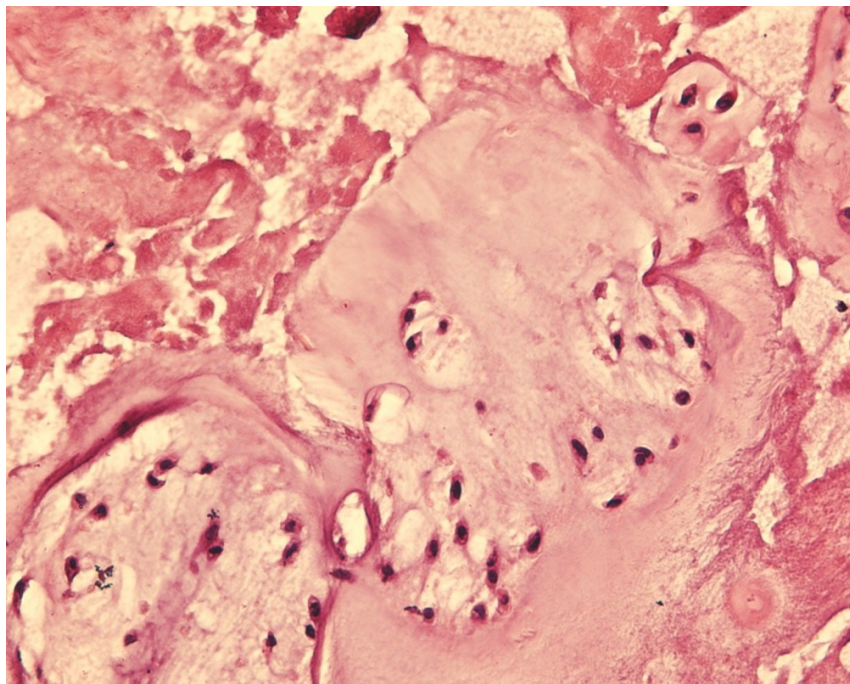
4 pav. Sauso kolageno II-ojo fluorescencija esant 355nm. fotosužadimui



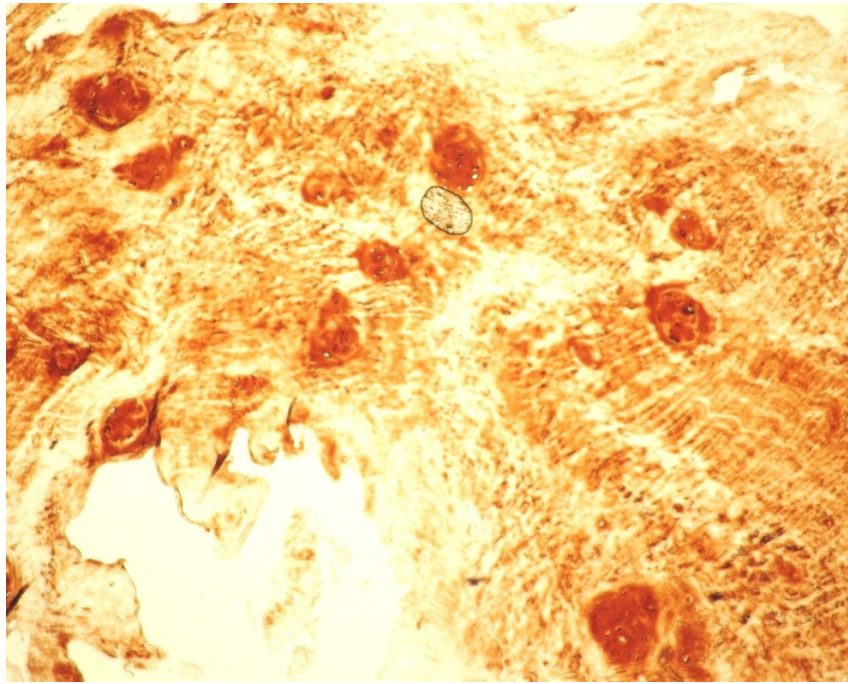
3.1.1 pav. Maži chondroidinių ląstelių klasteriai ir juose gaminami proteoglikanai ryškiai metachromatiškai dažant TW. Ląstelių klasteriai, įsiterpę tarp disko kolageninių skaidulų patyrusių ryškia fibriliaciją su išplautais proteoglikanais iš matricos sekvestro pjūvyje. TW x 400.



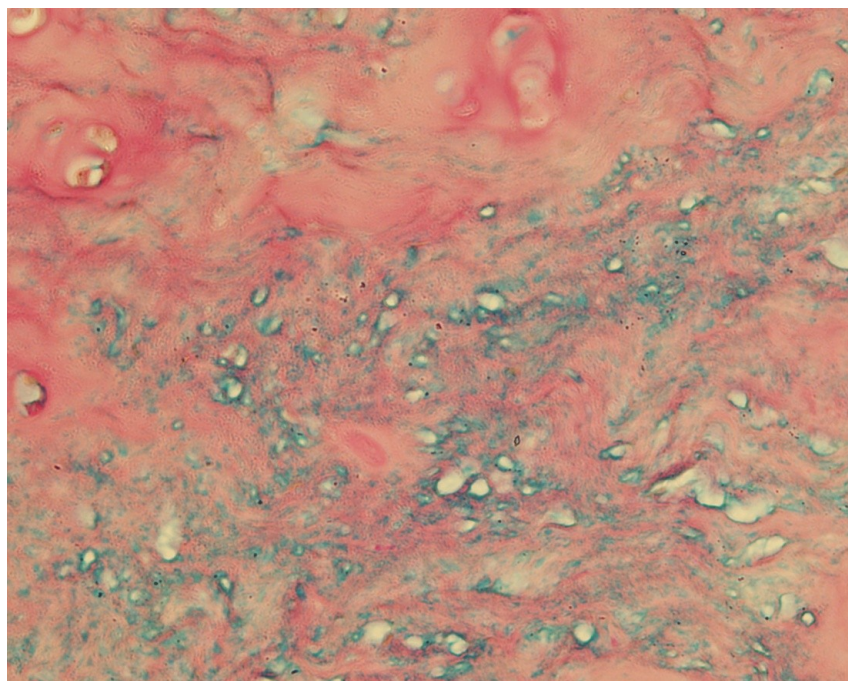
3.1.2 pav. Rūgštūs mucininio tipo skysčiai (Alciano mėlis+) vidutinio dydžio chondroidinių ląstelių klasteriuose, apsupti mukopolisacharidine kapsule (PAS+) ir chondroidinių ląstelių branduolių piknozė. Skysčiai persunkia skaidulinę matricą. Alciano mėlis-PAS x 200.



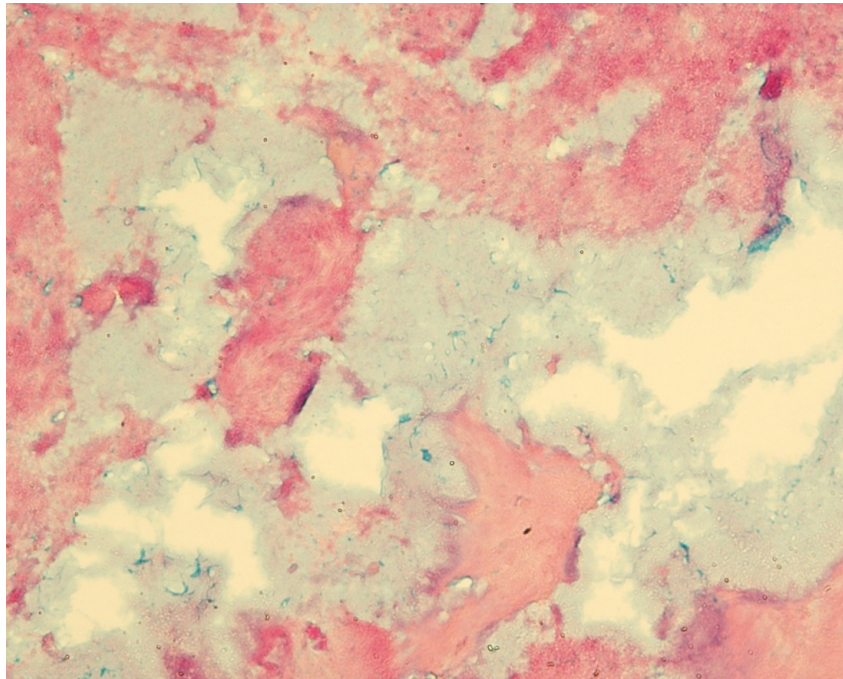
3.1.3 pav. Stambūs (iki 15 ląstelių) chondroidinių ląstelių klasteriai labai piknoziškais branduoliais, vakuoliška citoplazma ir ištirpusiomis kapsulėmis arba jų likučiais ryškiai degeneruotame sekvestre. HE x 400.



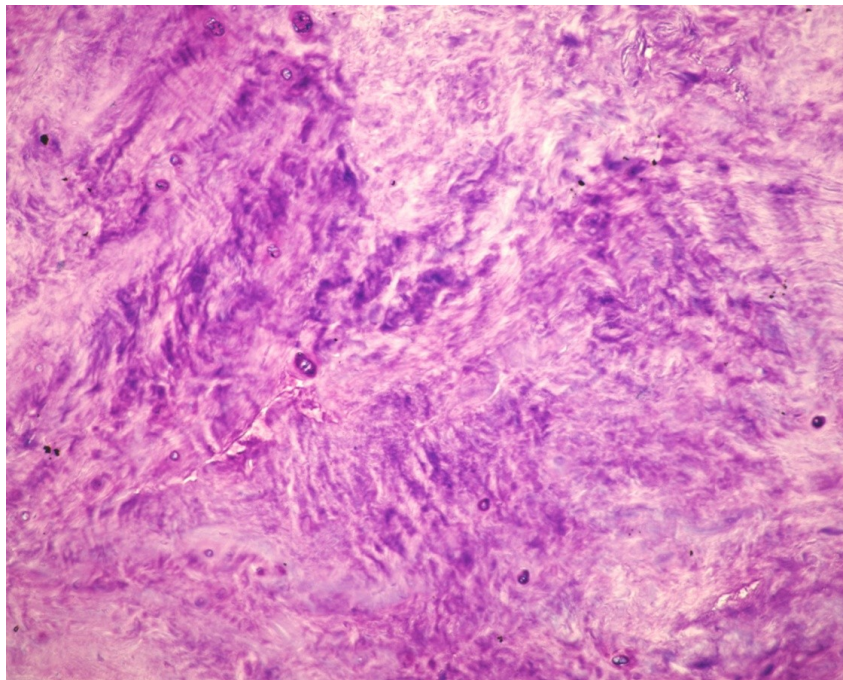
3.1.4 pav. II-ojo tipo kolageno imunohistocheminis žymuo chondroidinių ląstelių vidutiniuose klasteriuose ir skaidulinėje sekvestro matricoje. Imunohistocheminis dažymas panaudojus antikūnus prieš II-ojo tipo kolageną, žymėtus krienų peroksidaze. IHC x 400.



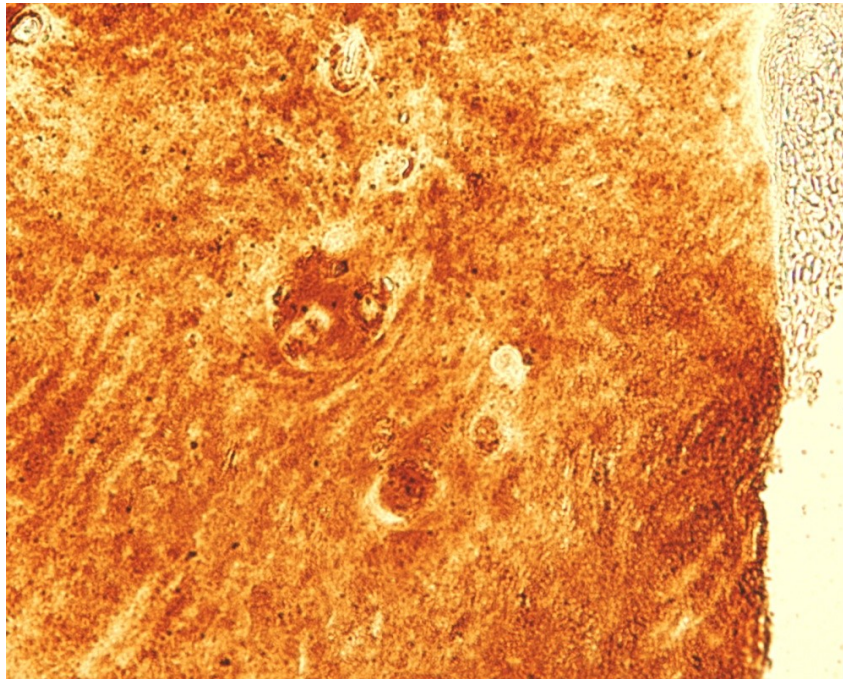
3.1.5 pav. Smulkūs plyšiai sekvestro skaidulinėje matricoje ir tarp degeneruojančių chondroidinių ląstelių klasterių. Alciano mėlis-PAS x 400.



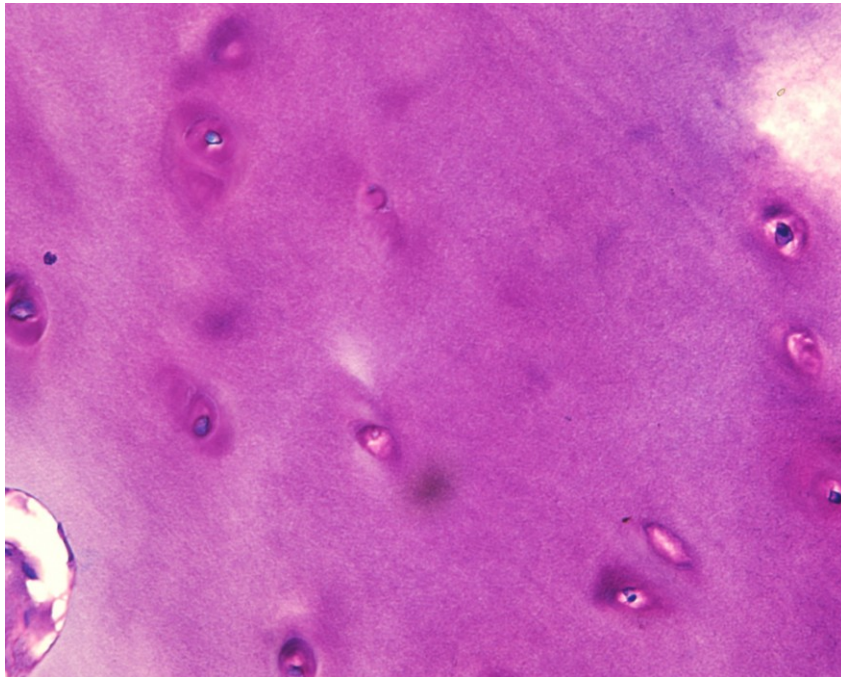
3.1.6 pav. Stambūs plyšiai pripildyti rūgščių mucininių baltymų įsiterpę tarp ryškiai degeneruoto disko skaidulių pluoštų ir jas fragmentuoja. Alciano mėlis-PAS x 400.



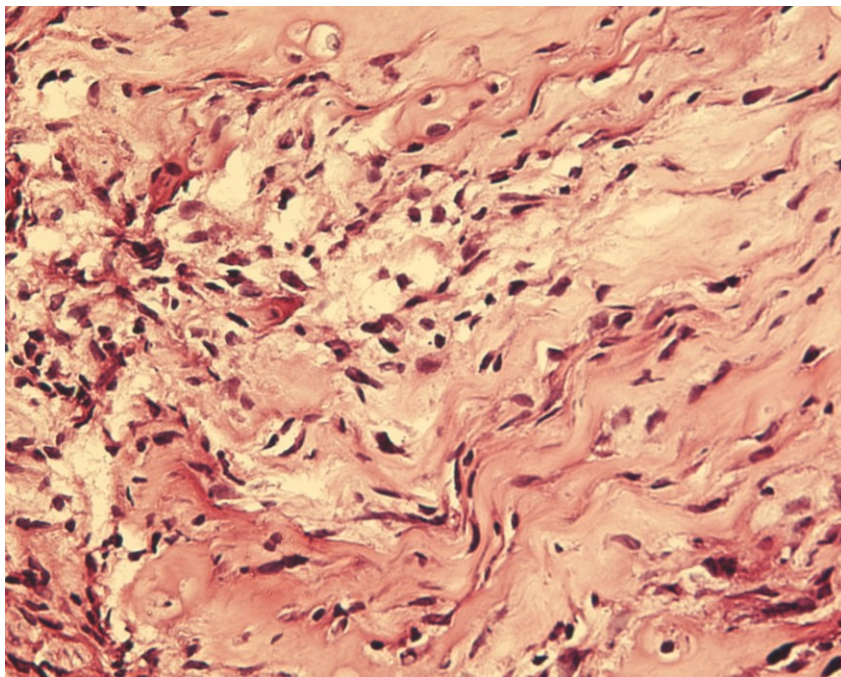
3.1.7 pav. Granulinė kolageno skaidulų fragmentacija nutolusiame sekvestre su pavienėmis degeneruotomis chondroidinėmis ląstelėmis. TW x 200.



3.1.8 pav. 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-ojo tipo skaidulų. IHC x 400.



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



3.1.10 pav. Granuliacinio audinio židinyje su limfocitais, histiocitais, fibroblastais ir sensorinėmis ląstelėmis ilgomis citoplazminėmis ataugomis išvaržos kraštuose. H-eo x 200.



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

Gausai Grupės	1		2		3		4	
	Column 1	Column 2	Column 1	Column 2	Column 1	Column 2	Column 1	Column 2
D	Column 1	1	Column 1	1	Column 1	1	Column 1	1
	Column 2	-0,03166	Column 2	0,241763	Column 2	-0,1347	Column 2	0,434455
P	Column 1	1	Column 1	1	Column 1	1	Column 1	1
	Column 2	-0,34909	Column 2	0,292423	Column 2	-0,47896	Column 2	0,664057
S	Column 1	1	Column 1	1	Column 1	1	Column 1	1
	Column 2	0,020697	Column 2	0,015989	Column 2	-0,08128	Column 2	0,49899

2 lentelė. Mėginių grupių (*stulpelis*) gausinių komponentų (*eilutė*) koreliacinė analizė su bendru degeneracijos indeksu grupės mėginiuose (*Boos N.*).