

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Ingrida
VAIŠNORIENĖ

IN VIVO KONFOKALIOS
ATSPINDŽIO MIKROSKOPIJOS TYRIMAS
NUSTATANT MELANOCITŲ KILMĖS
APGAMO DISPLAZIJĄ

D A K T A R O D I S E R T A C I J A

BIOMEDICINOS MOKSLAI, MEDICINA (06 B)

Vilnius, 2015

Disertacija rengta ir moksliniai tyrimai atlikti Nacionaliniame vėžio institute
2008–2013 m. m. studijuojant doktorantūroje ir ginama eksternu.

Moksliniai konsultantai

prof. dr. (HP) Janina Didžiapetrienė (Nacionalinis vėžio institutas, biomedicinos
mokslai, medicina – 06 B)

prof. habil dr. Ričardas Rotomskis (Nacionalinis vėžio institutas, biomedicinos
mokslai, biofizika – 02 B)

Kalbos redaktorė

Gražina Pruskuvienė

TURINYS

SANTRUMPOS	5
1. ĮVADAS	7
1.1 Tyrimo tikslas	9
1.2 Tyrimo uždaviniai	10
1.3 Ginamieji teiginiai	10
1.4 Darbo mokslinis naujumas ir praktinė reikšmė	10
1.5 Autorės indėlis	11
2. LITERATŪROS APŽVALGA	13
2.1 Melanocitų kilmės displazinių apgamų ir odos melanomos paplitimas ir formavimasis	13
2.1.1 Displazinis apgamas	13
2.1.2 Odos melanoma	16
2.2 Melanocitų kilmės displazinių apgamų ir odos melanomos neinvazinė diagnostika: apžiūra ir dermoskopija	17
2.2.1 Displazinis apgamas	19
2.2.2 Odos melanoma	20
2.3 Melanocitų kilmės displazinių apgamų ir odos melanomos invazinė diagnostika: biopsija ir histologinis tyrimas	22
2.3.1 Displazinis apgamas	22
2.3.2 Odos melanoma	23
2.4 <i>In vivo</i> konfokali atspindžio mikroskopija	24
2.4.1 Displazinis apgamas	25
2.4.2 Odos melanoma	26

3. TIRIAMIEJI IR TYRIMO METODAI	28
3.1 Tiriamųjų atranka, jų charakteristika ir tyrimo eiga	28
3.2 Bendra tiriamųjų charakteristika	29
3.3 Tyrimo metodai	30
3.3.1 Dermoskopijos tyrimas	30
3.3.2 <i>In vivo</i> konfokali atspindžio mikroskopija	31
3.3.3 Odos navikų histologiniai tyrimai, galutinės patologijos diagnozės nustatymas ir histologinių preparatų skenavimas	34
3.3.4 <i>In vivo</i> konfokali atspindžio mikroskopijos vaizdų ir histologinių mikropreparatų vaizdų analizė	35
3.3.5 Histologinių pjūvių konfokali atspindžio mikroskopijos tyrimas (<i>ex vivo</i>)	36
3.3.6 Statistinė duomenų analizė	37
4. REZULTATAI	39
4.1 <i>In vivo</i> konfokali atspindžio mikroskopijos tyrimu nustatytų displazinių apgamų ir odos melanomos požymių atitiktis histologiniams požymiams	41
4.2 <i>In vivo</i> konfokali atspindžio mikroskopijos tyrimu nustatytų displazinių apgamų ir odos melanomos požymių diagnostinė reikšmė	50
4.3 Odos melanomos diagnostika pagal atskirus <i>in vivo</i> konfokali atspindžio mikroskopijos tyrimu nustatomų požymių derinius	56
4.4 Darbinės hipotezės iškelimas ir odos melanomos klinikinio atvejo analizė	57
4.5 Histologinių pjūvių konfokali atspindžio mikroskopija (<i>ex vivo</i>)	60
5. REZULTATŲ APTARIMAS	63
6. IŠVADOS	70
7. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS	71
8. LITERATŪROS SĄRAŠAS	72
9. PUBLIKACIJOS IR PRANEŠIMAI	83
10. PRIEDAI	84
PADĖKA	90

SANTRUMPOS

ABCD(E)	odos melanomos požymiai: A – asimetrija (angl. <i>asymetry</i>), B – nelygūs kraštai (angl. <i>borders</i>), C – įvairios spalvos navike (angl. <i>colour</i>) D – didesnis kaip 6 mm skersmuo (angl. <i>diameter</i>), E – evoliucija, keitimasis (angl. <i>evolving</i>)
Ak	antikūnas
DNR	deoksiribonukleorūgštis
<i>de novo</i>	naujas
EDJ	epidermio ir dermos jungtis
EUROCARE	tyrimai vydomi Europos šalių vėžio registrų duomenimis (angl. <i>European cancer registry-based study of cancer patients' survival and care</i>)
<i>ex vivo</i>	iš gyvo organizmo
GLOBOCAN	sergamumo ir mirtingumo vėžiu pasaulyje duomenų bazė
GS	galimybių santykis
	H+E hematoksilinas ir eozinas
HMB 45	melanomos imunohistocheminis žymuo (angl. <i>human melanoma black 45</i>)
<i>in situ</i>	melanoma <i>in situ</i> , t.y. 0 ligos stadija
<i>in vivo</i>	gyvame organizme
IHC	imunohistocheminis tyrimas
Melan-A	melanomos imunohistocheminis žymuo (angl. <i>melanoma antigen recognized by T cells</i>)
NIH	JAV Nacionaliniai sveikatos institutai
NPV	neigiama prognozinė vertė
NVI	Nacionalinis vėžio institutas
<i>p</i>	reikšmingumo lygmuo
PI	pasikliautinasis intervalas
PSO	Pasaulio sveikatos organizacija

RGB	raudona, žalia, mėlyna (angl. <i>red, green, blue</i>)
TNM	Piktybinių navikų išplitimo vertinimo sistema (angl. <i>Tumor, Nodes, Metastasis</i>)
TPV	teigiama prognozinė vertė
UVS	ultravioletiniai spinduliai
χ^2	chi kvadrato kriterijus

1. ĮVADAS

Lietuvoje, kaip ir visame pasaulyje, didėja sergamumas odos melanoma. Nors melanoma yra rečiausia iš piktybinių odos ligų, tačiau būtent ji yra dažniausia mirties nuo odos vėžio priežastis [1]. Nacionalinio vėžio instituto (NVI) duomenimis, mūsų šalyje kasmet diagnozuojama 200–300 ir daugiau naujų odos melanomos atvejų. Kasmetis susirgimų prieaugis yra apie 6 procentai. 2012 metais sergamumas odos melanoma Lietuvoje sudarė 10,5 atvejo 100 000 gyventojų. Remiantis Europos šalių vėžio registrų tyrimo EUROCARE-5 (angl. *European cancer registry-based study of cancer patients' survival and care*) duomenimis, susirgusiųjų odos melanoma penkerių metų reliatyvusis išgyvenamumas Lietuvoje sudaro 69,19 proc., o vidutinis išgyvenamumas Europos šalyse – 83,22 proc. [2]. Išanalizavus Lietuvos žmonių, susirgusių odos melanoma, išgyvenamumo rodiklius paaiškėjo, kad geresnis išgyvenamumas yra moterų, jaunesnių pacientų ir miesto gyventojų [3]. Nustatyta sergamumo odos melanoma pasaulyje ir Lietuvoje didėjimo tendencija ir minėti išgyvenamumo skirtumai skatina gerinti ankstyvąją odos melanomos diagnostiką ir profilaktiką Lietuvoje.

Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) duomenimis, dažniausiai odos melanoma serga asmenys, turintys šviesią, saulei jautrią odą ir daug atipinių apgamų. Atipinis apgamas yra svarbiausias melanomos rizikos veiksnys, o jo diagnostika ir gydymas yra vienas aktualiausių uždavinių gerinant išgyvenamumą susirgus odos melanoma.

1978 metais dermatopatologas *W. Clark* ir bendraautorai pastebėjo ir aprašė atipinį apgamą tyrinėdami melanoma sergančių pacientų šeimos narių apgamus [4]. Remiantis histologiniu apibrėžimu, nevocitinis navikas, pasižymintis ląstelių ir architektūros atipijomis požymiais bei kartu pasireiškiančiais organizmo reakcijos požymiais, vadinamas displaziniu apgamu. Klinikinių tyrimų duomenimis, displazinis apgamas susijęs su padidėjusia melanomos tikimybe trimis aspektais: dėl panašumo į melanomą, kaip melanomos rizikos žymuo, kaip galimas melanomos pirmtakas [5–9].

Remiantis *W. Clark* pasiūlyta melanocitų kilmės odos navikų histologine klasifikacija, morfologiškai progresuojanti atipija laipsniuojama išskiriant displazinį apgamą kaip įprastinių apgamų ir odos melanomos tarpinę stadiją. Manoma, kad melanocitų kilmės navikams būdinga nuosekli progresija: įprastinis apgamas → displazinis apgamas → melanoma *in situ* → invazinė melanoma [10]. Įvairių tyrimų duomenimis, 20–30 proc. melanomų atsiranda iš apgamų [11–13], todėl siekiant įvertinti apgamo tikimybę supiktybėti tikslinga atpažinti displazinio apgamo požymius.

Melanocitų kilmės odos navikų – įprastinio apgamo, atipinio apgamo ir odos melanomos – diferencinės diagnostikos iššūkius lemia atipinių apgamų ir odos melanomos panašumas bei didelė odos melanomos požymių įvairovė.

Dažniausiai minimuose apibrėžimuose atipinis apgamas apibūdinamas kaip didesnis nei 6 mm skersmens, įvairių spalvų ir nelygių kraštų navikas. Tai atitinka odos melanomos ABCD požymius: A – asimetrija (angl. *asymetry*), B – nelygūs kraštai (angl. *borders*), C – įvairios spalvos navike (angl. *colour*) bei D – didesnis kaip 6 mm skersmuo (angl. *diameter*). Apžiūros plika akimi tikslumas melanocitų kilmės odos navikų diagnostikoje yra apie 60 proc. [14; 15].

Klinikinėje praktikoje naudojami neinvaziniai optiniai tyrimai padeda tiksliau nustatyti apgamo atipiją ir odos melanomą. Svarbiausias iš jų – dermoskopija, kitaip epiliuminescencinė odos mikroskopija. Palyginti su apžiūra plika akimi, dermoskopija leidžia pagerinti tyrėjo diagnostinį tikslumą nuo 5 proc. iki 30 proc. [16–18]. Nustačius atipijos požymius rekomenduojama atlikti odos naviko biopsiją ir displazinio apgamo ar odos melanomos diagnozė patvirtinama morfologiškai.

Neinvazinės diagnostikos tikslumas ypač svarbus displazinių apgamų sindromo atveju, kai visų atipinių apgamų iš karto pašalinti nėra galimybių. Tiksli neinvazinė diagnostika padeda atrinkti apgamus, pasižyminčius didžiausia atipija (melanomos rizika) ir juos pašalinti anksčiausiai.

Neinvazinės diagnostikos tikslumas svarbus ir parenkant optimalų gydymą. Atipiniai apgamai šalinami tik chirurginiu būdu pjūvį atliekant per sveikus audinius. Ryškios displazijos apgamus rekomenduojama pašalinti kartu su 0,5 cm sveikos odos kraštais. Chirurginio odos melanomos gydymo rekomendacijos skiriasi priklausomai nuo ligos stadijos: I stadijos odos melanomos atveju rekomenduojama pašalinti 1,0 cm, II – 2,0 cm, III–IV – 2,5 cm ir daugiau sveikos aplinkinės odos [19]. Taigi

atipinių apgamų ir odos melanomos gydymo skirtumai yra dar viena tikslios neinvazinės diagnostikos būtinybės priežastis.

Tobulėjant medicininių tyrimų technologijoms atsiranda naujų neinvazinės diagnostikos galimybių. Atipinių apgamų diagnostika gali būti tikslinama naudojant aukšto dažnio ultragarsą, optinę koherencinę tomografiją, optinę spektroskopiją, paviršiaus magnetinį rezonansinį vaizdinimą, *in vivo* konfokalią atspindžio mikroskopiją.

Konfokali atspindžio mikroskopija leidžia matyti odos morfologinius pokyčius *in vivo* ląsteliniu lygiu [20; 21]. Šio tyrimo metu oda vaizdinama be invazijos į organizmą ar pažeidimo tiriamiems audiniams ir gali būti neribotai kartojama. Šiuo metu yra tiriamos *in vivo* konfokali atspindžio mikroskopijos pritaikymo galimybės diagnozuoti ne tik melanocitų kilmės odos navikams, bet ir kitoms odos ligoms [22–24]. Preliminarių tyrimų duomenimis, *in vivo* konfokali atspindžio mikroskopijos tyrimų rezultatai atitinka histologinių tyrimų rezultatus [25], o *in vivo* konfokali atspindžio mikroskopijos tyrimo specifiškumas diagnozuojant melanocitų kilmės odos navikus siekia 95 proc. [26].

Tiksliai nustatyti apgamo displaziją ir odos melanomą esant ankstyvajai ligos stadijai būtų galima, jei *in vivo* konfokali atspindžio mikroskopijos tyrimo diagnostinis tikslumas būtų artimas auksinio diagnostikos standarto – histologinio tyrimo diagnostiniam tikslumui.

Atsižvelgiant į tai, kad lyginamuosiuose dermoskopijos ir *in vivo* konfokali atspindžio mikroskopijos klinikiniuose tyrimuose konfokali atspindžio mikroskopija pagerina nepiktybinių melanocitų kilmės odos navikų diagnostiką, tačiau jos galimybės nustatant apgamo displaziją nėra pakankamai ištirtos, yra aktualūs tyrimai siekiant išsiaiškinti *in vivo* konfokali atspindžio mikroskopijos tyrimo vertę diferencinėje įprastinių apgamų, displazinių apgamų bei odos melanomos diagnostikoje, lyginant rezultatus su histologinių tyrimų rezultatais.

1.1 Tyrimo tikslas

Įvertinti *in vivo* konfokali atspindžio mikroskopijos tyrimo tikslumą diagnozuojant melanocitų kilmės displazinius apgamus.

1.2 Tyrimo uždaviniai

1. Ištirti, ar *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimu nustatyti melanocitų kilmės displazinių apgamų ir odos melanomos požymiai – epidermio netaisyklumas, pedžetoidinės ląstelės, diskoheziniai arba pavienių ląstelių lizdai, nehomogeniški lizdai, tankių ląstelių lizdai – atitinka ląstelių atipijos požymius, nustatytus histologiniais tyrimais.
2. Nustatyti *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimo jautrumą ir specifiškumą diagnozuojant melanocitų kilmės displazinius apgamus.
3. Nustatyti *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimo jautrumą ir specifiškumą diagnozuojant odos melanomą.

1.3 Ginamieji teiginiai

1. *In vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimu nustatyti melanocitų kilmės displazinių apgamų ir odos melanomos požymiai atitinka ląstelių atipijos požymius, nustatytus histologiniais tyrimais.
2. *In vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimas padeda atskirti melanocitų kilmės displazinius apgamus nuo įprastinių apgamų ir nuo odos melanomos.

1.4 Darbo mokslinis naujumas ir praktinė reikšmė

Bendradarbiaujant NVI mokslininkams, medicinos fizikams ir gydytojams buvo įgyvendintas mokslinis projektas, kuriam vykdyti įsigyta *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos aparatūra.

Duomenų apie *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimo pritaikymą melanocitų kilmės displazinių apgamų diagnostikoje nėra daug. Pavienių autorių tyrimų rezultatai rodo, kad histologiniais tyrimais nustatyti displazinių apgamų atipijos požymiai koreliuoja su *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos būdu nustatytais požymiais, o nehomogenišku lizdų požymis padeda atskirti displazinius apgamus nuo įprastinių apgamų. Mūsų gauti rezultatai nepatvirtino

nehomogeniškų lizdų požymio diagnostinės reikšmės. Kiti tirtieji požymiai (epidermio netaisyklingumas, pedžetoidinės ląstelės, diskoheziniai arba pavienių ląstelių lizdai, tankių ląstelių lizdai) taip pat nebuvo reikšmingi diagnozuojant displazinius apgamus.

Ieškodami galimybių išskirti naujus displazinių apgamų požymius atlikome odos bei jos navikų histologinių pjūvių konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimą kartu su imunohistocheminiais melanocitų žymenų (Melan-A, HMB 45) tyrimais. Literatūroje nerasta publikacijų apie anksčiau histologiniuose odos pjūviuose atliktus melanocitų tyrimus konfokalių atspindžio mikroskopijos metodu, todėl tyrimo metodika buvo patentuota (pateikta nacionalinė paraiška „Melanocitų vaizdinimas konfokalių atspindžio mikroskopijos būdu histologiniuose odos pjūviuose“ Nr. 2014-100) ir pateikta tarptautinės paieškos paraiška „*Melanocyte imaging by using reflectance confocal microscopy in histological skin sections*“ Nr. PCT/IB2014/067441.

1.5 Autorės indėlis

Šio tyrimo autorė parengė tyrimo protokolą bei visus reikalingus dokumentus gauti Biomedicininį tyrimų etikos komiteto leidimą. Disertantė dalyvavo moksliniame projekte „Optinių diagnostikos technologijų taikymas neinfekcinių ligų diagnostikai“, vykdytame pagal Lietuvos mokslo tarybos finansuojamą programą „Lėtinės neinfekcinės ligos“, bei mokymuose, skirtuose *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos taikymui odos ligų diagnostikoje. Stažavosi Modenos ir *Reggio Emilia* universiteto (Italija) Dermatologijos klinikoje (vadovas – prof. *G. Pellacani*). Stažuotės tema: *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos įvadinis kursas, skirtas melanocitų pakitimams, odos navikams, uždegiminėms odos ligoms įvertinti ir pritaikyti kosmetologijoje. Disertantė atrinko pacientus, kuriems buvo įtarta displaziniai apgamai arba odos melanoma. Vadovaudamasi darbo protokole numatyta tyrimų atlikimo tvarka, autorė atliko dermoskopijos bei *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimus bei ekscizines odos navikų biopsijas, susipažino su melanocitų kilmės odos navikų histologiniais ir imunohistocheminiais tyrimais. Atliko *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos požymių bei histologinių požymių analizę, odos bei jos navikų histologinių pjūvių konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimą

kartu su imunohistocheminiais melanocitų žymenų (Melan-A, HMB 45) tyrimais; interpretavo gautus rezultatus. Dalyvavo atliekant statistinę tyrimo duomenų analizę. Kartu su bendraautoriais rengė mokslinius straipsnius. Vykdomą mokslo darbą disertantė viešino stendiniais ir žodiniiais pranešimais Lietuvos ir tarptautinėse mokslinėse konferencijose.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1 Melanocitų kilmės displazinių apgamų ir odos melanomos paplitimas ir formavimasis

Kiekvienas suaugęs žmogus gali turėti vidutiniškai apie 25–30 apgamų. Tik nedidelė jų dalis būna įgimti arba atsiradę ankstyvoje vaikystėje. Kasmet odoje atsiranda vis daugiau apgamų. Daugiausia jų turime būdami 30 metų amžiaus. Literatūros duomenimis, atipinių apgamų paplitimas svyruoja nuo 2 iki 59 proc. populiacijoje, priklausomai nuo diagnostikos kriterijų [27]. *J. Naeyaert* tyrimo duomenimis, tarp šviesią odą turinčių jaunų (iki 30–40 metų) žmonių atipinių apgamų paplitimas yra 2–8 proc., o tarp melanoma sirgusių asmenų šių apgamų paplitimas yra 34–59 proc. [28].

2.1.1 Displazinis apgamas

Sinonimas: *Clark* nevasas

Pirmą kartą displazinio apgamo terminą pavartojo *D. Elder* su bendraautoriais, apibūdindamas sporadinių melanocitinių nevusą, kuris kliniškai buvo netaisyklingas ir didesnis nei įprastiniai apgamai bei pasižymėjo daugybiniais histologiniais požymiais, leidžiančiais jį atskirti nuo įprastinių apgamų [29]. Trimis metais anksčiau *W. Clark* su bendraautoriais [9] ir *H. Lynch* su bendraautoriais [30] atskirai, tačiau beveik vienu metu aprašė šeimas, kuriose daugybinės pirminės odos melanomos buvo dažnesnės nei įprasta ir kuriose taip pat buvo didelis skaičius neįpastų apgamų – B-K apgamų sindromas arba FAMM sindromas (angl. *familial atypical multiple mole melanoma syndrome*).

Klasikiniame displazinio apgamo apibrėžime nurodyti klinikiniai displazinio apgamo požymiai (didesnis nei 6 mm, nelygių kraštų, netaisyklingos pigmentacijos, uždegimo požymių turintis odos navikas) neatitinka histologiniams displazinio apgamo požymiams. Todėl tyrėjų apgamų atipijos vertinimas dažnai skiriasi, o tarp pašalintų atipinių apgamų dažni yra apgamai, neturintys histologinių atipijos požymių [31]. Dėl prastos klinikinės ir histologinės koreliacijos rekomenduojama naudoti terminą „kliniškai atipinis“ apgamas klinikiniam atvejui apibūdinti [32] ir terminą „displazinis“ apgamas, kai yra nustatyti būdingi klinikiniai ir histologiniai displazinio apgamo požymiai.

Atipiniai apgamai, taip pat dauginiai apgamai, kai jų odoje yra 50 ir daugiau, rodo didesnę tikimybę susirgti melanoma [33–35]. *M. Arumi-Uria* su bendraautoriais retrospektyviai ištyrę 6275 displazinių apgamų atvejus nustatė, kad melanomos rizika yra susijusi ir su šių apgamų ląstelių atipijos laipsniu: ji didesnė esant displazinių apgamų ryškiai ląstelių atipijai (19,7 proc.) palyginti su vidutine (8,1 proc.) bei lengva (5,7 proc.) ląstelių atipija [36].

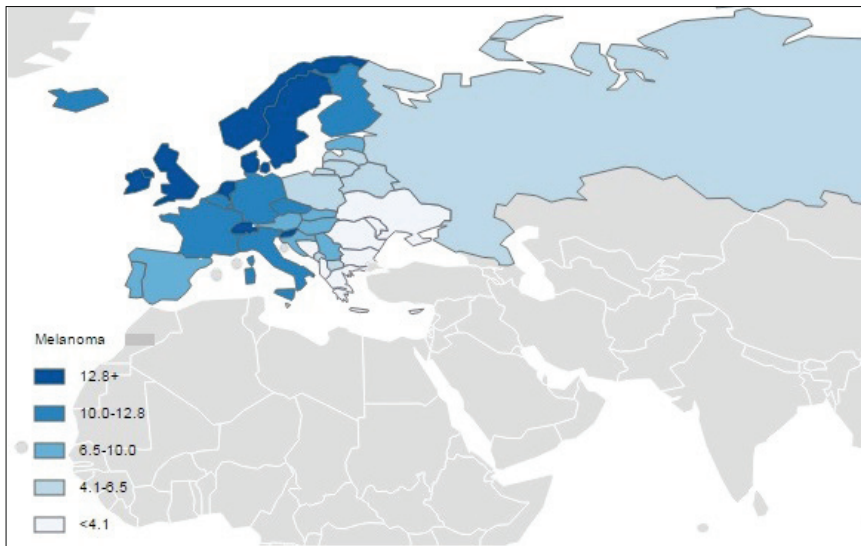
1984 metais JAV Nacionalinių sveikatos institutų (angl. *National Institutes of Health* – NIH) sutarimo konferencijoje [37] pasiūlyta displazinių apgamų turinčius pacientus suskirstyti į keturias (A–D) grupes pagal asmeninę bei šeimos anamnezę (1 lentelė).

1 lentelė. JAV Nacionalinių sveikatos institutų sutarimo konferencijos displazinių apgamų turinčių pacientų klasifikacija

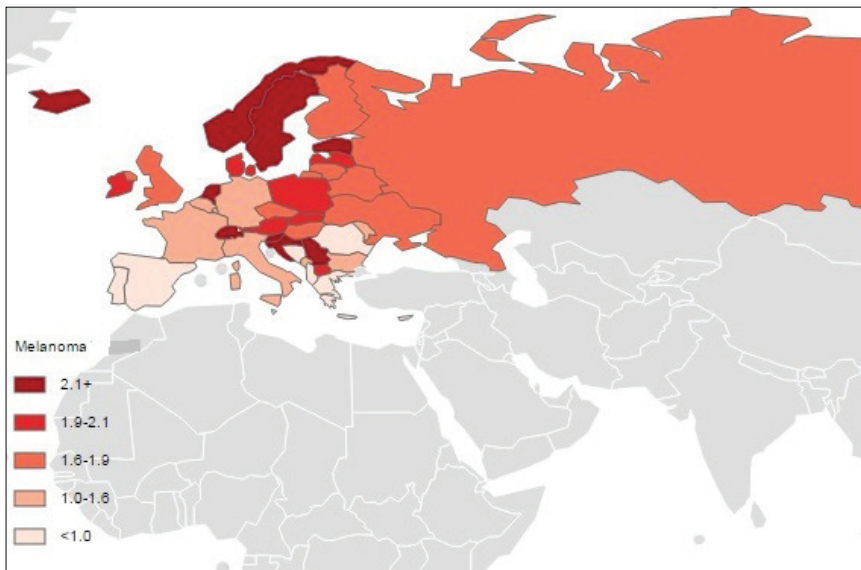
Pacientų grupė		Asmeninė melanomos anamnezė	Šeiminė dauginių apgamų anamnezė	Šeiminė melanomos anamnezė
A	Dauginiai displaziniai apgamai	Nėra	Nėra	Nėra
B		Nėra	Yra	Nėra
C		Yra	Nėra	Nėra
D		Yra	Yra	Yra

1 lentelėje pateikta darbinė displazinių apgamų turinčių pacientų klasifikacija naudinga nustatant riziką susirgti melanoma: A ir B grupių pacientų melanomos rizika padidėjusi 90 kartų, o D grupės – 400–500 kartų [38]. *K. Kraemer* ir bendraautorių duomenimis [39], galimi penki skirtingi displazinio apgamo sindromo variantai, kai, be NIH aprašytų A–C grupių, išskiriami dar du D pogrupiai: D-1 tipo – šeiminiai displaziniai apgamai esant vienam melanoma sirgusiam šeimos nariui ir D-2 tipo – šeiminiai displaziniai apgamai esant dviem ar daugiau melanoma sirgusiems šeimos nariams. Pastaruoju atveju melanomos tikimybė padidėja 500–1000 kartų.

Displazinis apgamas yra susijęs su padidėjusia melanomos atsiradimo rizika bei displazinių apgamų sindromu [40]. Displazinių apgamų sindromas gali būti paveldimas autosominiu dominantiniu būdu [41; 42]. Displazinių apgamų bei melanomos patogenezėi svarbūs DNR pažeidžiantys ultravioletiniai saulės spinduliai (UVS). Tokiems pacientams būdinga sutrikusi DNR reparacija.



1 pav. Sergamumo odos melanoma Europoje rodikliai (modifikuota pagal GLOBOCAN duomenis [44])



2 pav. Mirtingumo dėl odos melanomos rodikliai Europoje (modifikuota pagal GLOBOCAN duomenis [44])

Displazinių apgamų sindromo diagnostikos kriterijai yra: daugiau nei 100 melanocitų kilmės apgamų, tarp kurių nors keletas yra didesni nei 8 mm skersmens ir keletas – atipinių apgamų.

Daugybiniiai dideli nelygiais kraštais apgamai dažniausiai susiję su melanomos atsiradimu jauname amžiuje, daugybinių melanomų galimybe bei kai kuriais atvejais – dažnesnėmis ne odos piktybinėmis ligomis, pavyzdžiui, kasos, skrandžio ir žarnyno, plaučių, krūtų, gerklų bei akių melanoma ir galvos–kaklo odos plokščialąsteline karcinoma. Dažniausiai šie atvejai susiję su *CDKN2A* mutacija 9p21 lokuse [43].

Taigi sukaupta pakankamai duomenų apie displazinio apgamo kaip melanomos pirmtako reikšmę, todėl tiksli displazinio apgamo diagnostika ir jo gydymas aktualūs siekiant sumažinti sergamumą odos melanoma.

2.1.2 Odos melanoma

Piktybinis melanocitų kilmės navikas yra vadinamas piktybine melanoma (*melanoma malignum*). Kaip ir mūsų šalies kaimynės (Lenkija, Latvija, Estija), Lietuva nepriskiriama prie tokių šalių, kuriose sergamumas melanoma ypač didelis. Tikėtina, kad taip yra dėl nedidelės insoliacijos. Tarptautinės vėžio tyrimų agentūros (angl. *International Agency for Research of Cancer* – IARC) GLOBOCAN duomenimis, odos melanomos Lietuvoje sergamumo ir mirtingumo rodikliai atitinkamai yra 5,15/100 000 ir 1,76/100 000 gyventojų (1, 2 pav.).

Pagrindinė problema, apie kurią byloja epidemiologiniai duomenys, yra vėlyva melanomos diagnostika Lietuvoje. 2012 metų duomenimis, I stadijos odos melanoma sudaro 41,1 proc. visų naujų ligos atvejų mūsų šalyje [45]. Dažniau ši liga diagnozuojama vėlyvesnių, t. y. II–IV stadijų.

Melanoma yra greitai augantis ir plintantis piktybinis navikas [46–48], todėl pagrindinis pacientų išgyvenamumą lemiantis veiksnys yra ankstyva ligos diagnostika ir gydymas. Svarbiausias melanomos klinikinis prognozės rodiklis yra pagal TNM sistemą (piktybinių navikų išplitimo įvertinimas) įvertinta melanomos stadija. Ji nustatoma pagal pirminio naviko patologinę stadiją (pT), ligos išplitimą į regioninius limfmazgius (N) ir susidariusias atokiausias metastazes (M). Melanoma *in situ* (pTis) atitinka 0 stadiją, iki 1 mm storio melanoma (pT1) – I stadiją, 1–2 mm (pT2) – II stadiją, 2–4 mm (pT3) – III stadiją, didesnė kaip 4 mm storio melanoma (pT4) – IV TNM stadiją. Nepriklausomai nuo pirminio naviko storio, nustačius metastazių

regioniniuose limfmazgiuose (N), diagnozuojama III TNM melanomos stadija, o esant atokiųjų metastazių (M) – IV stadija. Nustatyta iki 1 mm storio odos melanoma vertinama kaip ankstyvoji.

Ankstyvąją melanomos diagnostiką gali pagerinti profilaktinės priemonės – reguliariai atliekami apgamų patikrinimai bei atipinių apgamų šalinimas. Tokių profilaktinių odos patikrinimų metu yra nustatomos paciento nepastebėtos ankstyvosios, t. y. 0–I stadijos odos melanomos. Pašalinus ankstyvųjų stadijų iki 1 mm storio odos melanomos naviką pacientų išgyvenamumo prognozė gera: 10 metų išgyvenamumas sudaro 90–97 proc. [49; 50]. Siekiant pagerinti ankstyvąją odos melanomos diagnostiką svarbu tiksliai atskirti gerybinius melanocitų kilmės navikus nuo melanomos ir identifikuoti apgamus, turinčius didelę melanomos išsivystymo riziką.

Histologinių tyrimų duomenimis, apie 20–30 proc. melanomų turi išlikusių apgamo elementų [16–18; 51]. Kitų autorių publikacijose šis procentas gali siekti 42 proc. [52]. Todėl manoma, kad dažniau (>50 proc. atvejų) melanoma *ab initio* susiformuoja ant sveikos odos kaip pirminis odos navikas. Apgamų turime kiekvienas, ir ne po vieną, o naujausiais duomenimis, odos melanoma Lietuvoje kasmet susergera 10,5 iš 100 000 gyventojų (2012 m. NVI duomenys), taigi statistiškai apgamo tikimybė supiktybėti nėra didelė. Tačiau kiekvienam apgamus tiriančiam gydytojui svarbu įvertinti konkretaus apgamo išsivystymo į melanomą riziką.

Siekiant sumažinti mirtingumą nuo odos melanomos tikslinga gerinti ankstyvosios melanomos diagnostiką. Tolesniuose skyriuose apžvelgsime melanocitų kilmės displazinio apgamo ir odos melanomos diagnostikos galimybes ir trūkumus.

2.2 Melanocitų kilmės displazinių apgamų ir odos melanomos neinvazinė diagnostika: apžiūra ir dermoskopija

Pirmiausia tyrėjas apžiūri paciento apgamus plika akimi. Specializuotuose onkologijos centruose dirbančių gydytojų apžiūros plika akimi diagnostinis tikslumas yra apie 60 proc. [4; 5]. Kadangi apžiūros tikslumas yra ribotas, esant galimybei rekomenduojama atlikti tikslesnius odos navikų tyrimus.

Dermoskopija (sin. dermatoskopija; epiliuminescencinė odos mikroskopija) fizikiniu požiūriu gali būti kontaktinė imersinė arba poliarizacinė. Dermoskopijos tyrimo metu oda apšviečiama šviesos šaltiniais, o atspindžiai nuo raginio epidermio sluoksnio mažinami atliekant kontaktinę imersiją (užlašinus skysčio ant odos,

priglaudžiamas lęšis) arba specialiais poliarizaciniais filtrais (poliarizacinė dermoskopija). Rankiniai dermoskopai padidina tiriamą objektą 10–20 kartų. Paviršinis odos sluoksnis (epidermis) yra skaidrus, todėl, sumažinus nuo odos paviršiaus atspindėtos šviesos kiekį, dermatoskopu galima apžiūrėti gilesnius odos sluoksnius. Dėl būdingų optinių odos savybių skirtingomis šviesos sugerties ir atspindėjimo savybėmis pasižymintios odos struktūros dermoskopiškai gali būti atskiriamos epidermio, epidermio ir dermos jungties (EDJ) bei paviršinės dermos sluoksniuose.

Melaninas, kolagenas ir hemoglobinas yra svarbiausi odos chromoforai. Tiriant dermoskopiškai pirmiausia vertinama spalva, specifinės struktūros, odos architektūra, kraujagyslės, kolagenas. Melaninas priklausomai nuo jo išsidėstymo (gylis) odoje dermoskopiškai gali būti juodos, rudos arba mėlynos spalvos. Pigmento sancaupos odoje sudaro specifines struktūras – vieną svarbiausių dermoskopinio vertinimo kriterijų. Dermoskopinio tyrimo metu matomos atskiros pigmentinės struktūros – globulės, tinklas, homogeniškos struktūros – leidžia vertinti pigmento lokalizaciją bei odos architektūrą. Odos architektūra pakinta esant apgamo displazijai bei suardoma esant melanomai. Dėl raudonos hemoglobino spalvos tiriant dermoskopu galima vertinti išsiplėtusias bei atipines kraujagysles. Pigmento regresijos (išnykimo) arba randėjimo plotuose dėl gausių kolageno skaidulų oda tiriant dermoskopiškai yra baltos spalvos.

Skaitmeninė dermoskopija padeda išsaugoti dermoskopijos vaizdus bei lyginti juos kartojant odos dermoskopijos tyrimus ir vertinant jų pokyčius. Skaitmeninės dermoskopijos vaizdai kol kas neprilygsta dermoskopijos tyrimui, o skaitmeninių vaizdų kokybė yra svarbiausias dermatoskopo vertinimo kriterijus. Profesionalūs skaitmeniniai dermatoskopai, be vaizdų archyvavimo funkcijos, dažnai turi ir kompiuterinės skaitmeninių dermoskopijos vaizdų analizės programas, paremtas vienu ar keliais diagnostiniais dermoskopijos algoritmais. Šių programų išvados yra „antroji nuomonė“ arba dar viena pagalba neprityrusiems dermoskopuotojams. Gamintojai pabrėžia, kad kompiuterinės dermoskopinių vaizdų analizės vaidmuo diagnozuojant melanomą yra tik pagalbinis.

Šiuo metu sparčiai populiarėja teledermoskopija, nes atsiradę išmaniųjų telefonų dermoskopijos priedai padeda greitai ir kokybiškai išsaugoti dermoskopinius vaizdus bei išsiųsti juos norint pasikonsultuoti su kolegomis.

Dėl didelio informatyvumo ir lengvo pritaikomumo kasdienėje praktikoje dermoskopija tapo nepakeičiamu, greitai atliekamu tyrimu, kuris, palyginti su apžiūra,

padededa tiksliau nustatyti tiek displazinius apgamus, tiek odos melanomą [53–56]. Toliau apžvelgsime displazinių apgamų bei odos melanomos klinikinius požymius ir jų neinvazinės diagnostikos galimybes.

2.2.1 Displazinis apgamas

Apžiūra. Apžiūrint plika akimi displaziniai apgamai gali būti plokšti arba pakilę virš odos, arba turintys šiek tiek papiliarizuotą paviršių. Dažniausia displazinių apgamų lokalizacija – saulės apšviečiamos vietos, pavyzdžiui, liemens bei galūnių oda [57; 58]. Tačiau jų gali būti sėdmenų, lytinių organų arba padų odoje.

Displazinių apgamų odoje gali būti nuo vieno iki kelių šimtų. Dažniausiai šie apgamai kūno odoje išsidėsto pavieniui, nors *A. Marhoob* su bendraautoriais aprašo ir grupėmis išsidėsčiusius displazinius apgamus [59]. Dažniausi atipinių apgamų klinikiniai variantai yra: „lentiginio tipo“ – lygaus paviršiaus ir homogeniškos tamsiai rudos arba rudai juodos spalvos; „kepto kiaušinio“ tipo – būdinga centrinė papulė bei makulinis apvadas periferijoje; „taikinio“ tipo, pasižymintis skirtingos pigmentacijos koncentrinėmis žiedinėmis zonomis; „seborėjinės keratozės“ tipo – būdinga papiliarizuotas paviršius, dažniausiai tamsiai ruda spalva, ir „eriteminis“ tipas – rausvos spalvos su pigmento liekanomis.

Dažniausiai displaziniai apgamai yra įvairaus atspalvio rudos spalvos, tačiau gali būti matomi ir rožinės, raudonos, pilkai mėlynos spalvos šešėliai.

Dermoskopija. *R. Hofmann-Wellenhof* ir bendraautoriai, dermoskopiškai ištyrę 829 atipinius apgamus, nustatė, kad remiantis vyraujančios struktūros tipu galima išskirti tris pagrindinius dermoskopu nustatomus atipinių apgamų variantus: (a) tinklinės struktūros; (b) globulių struktūros; (c) homogeniškus, be to, atipiniuose apgamuose dažnai matomi šių pagrindinių struktūrų deriniai, t. y. (d) tinklinė-globulinė; (e) tinklinė-homogeniška ir (f) globulinė-homogeniška [60; 61].

Dažniausiai pasitaikantiems tinklinės struktūros apgamams būdingas daugiau ar mažiau pigmento turintis tinklas, sudarytas iš plonų linijų ir taisyklingų kilpų. Pigmentinis tinklas dažniausiai yra taisyklingas visame naviko plote ir blykšta periferijoje.

Globuliniai apgamai turi būdingą struktūrą, sudarytą iš įvairaus dydžio ir formos (ovalių, apvalių arba stačiakampių) taškų ir (ar) globulių, daugiau ar mažiau tolygiai pasiskirsčiusių visame naviko plote.

Rečiausi iš trijų pagrindinių dermoskopinių variantų yra homogeniškos struktūros apgamai, kuriems būdinga difuzinė įvairaus atspalvio rudos spalvos pigmentacija esant lokaliems tinklo ir (ar) globulių plotams.

Be šių trijų pagrindinių dermoskopinių struktūrų, displaziniuose apgamuose matomi įvairūs pigmentacijos variantai, pagal kuriuos išskiriami keturi būdingi potipiai: (a) atipiniai apgamai esant centrinei hipopigmentacijai; (b) atipiniai apgamai esant centrinei hiperpigmentacijai; (c) atipiniai apgamai esant daugiažidininei hipoar hiperpigmentacijai ir (d) atipiniai apgamai esant ekscentrinei hiperpigmentacijai [62–64].

Be trijų pagrindinių struktūrinių tipų ir anksčiau įvardytų pigmentacijos atspalvių potipių, atipiniuose apgamuose gali būti matomi kiti dermatoskopu nustatomi požymiai, pavyzdžiui, miliarinės cistos, komedo tipo kamščiai. Neryškus kraujagyslinis tinklas, kuriame yra kablelio formos arba taškinių kraujagyslių, taip pat dermatoskopu dažnai nustatomas atipiniuose apgamuose.

Seborėjinės keratozės taip pat gali būti diferencijuotinos nuo atipinių apgamų ir tai padaryti padeda joms būdingi požymiai – miliarinės cistos, matinis paviršius ir hiperkeratozė [65; 66].

Daugumos pacientų dauginius atipinius apgamus galima priskirti vienam arba dviem pagrindiniams dermatoskopu nustatomiems apgamų tipams. Apgamai, kurie nepriklauso šiai daugumai, turėtų būti tiriami ypač atidžiai, nes tai gali būti klinikinis melanomos požymis.

2.2.2 Odos melanoma

Apžiūra. Dar 1960–1970 metais melanoma buvo diagnozuojama pagal tokius požymius kaip kraujavimas, niežėjimas ir išopėjimas. Šie požymiai diagnozuojant melanomą yra susiję su bloga prognoze, nes jie pasireiškia jau esant vėlyvosios ligos stadijoms. 1980 metais buvo suformuluota anksčiau minėta ABCD taisyklė. Ši paprasta plačiai pasaulyje tebenaudojama taisyklė padeda įtartai melanomą anksčiau.

Dažniausiai melanoma yra pigmentinė, tamsesnė už sveiką odą, kliniškai panaši į apgamą. Retai ji gali būti amelanozinė – odos spalvos arba šviesesnė už sveiką odą. Beveik 70 proc. atvejų sudaro paviršiumi plintanti melanoma, kuriai būdingi ABCD požymiai. Melanomos diagnostika pagal ABCD požymius efektyvi nustatant negilias, paviršiumi plintančias melanomas, tačiau mažai naudinga nustatant vertikaliu augimu pasižyminčias mazgines melanomas. Be to, D (skersmuo, didesnis kaip

6 mm) kriterijus trukdo diagnozuoti mažas (iki 6 mm skersmens) ankstyvosios stadijos melanomas, kurios dažnai dar turi lygius kraštus ir tolygią spalvą. Agresyviausia melanomos forma – mazginė odos melanoma – dažniausiai neatitinka ABCD kriterijų, nes turi lygius kraštus, vieną spalvą ir primena apgamą net būdama vėlyvųjų stadijų. Svarbiausias odos melanomai būdingas požymis – greitas kitimas, kai per kelis mėnesius navikas kelis kartus pakeičia išvaizdą. Todėl vėliau ABCD požymius papildė dar vienas E kriterijus, reiškiantis kitimą, keitimąsi laiko atžvilgiu (angl. *evolving*). Šiuo metuABCDE taisyklė yra diagnostikos pagrindas, ir ją sėkmingai naudoja tiek gydytojai, tiek pacientai [67]. Siekiant tikslinės melanomos diagnostikos, atliekami dermoskopijos tyrimai [68].

Dermoskopija. Remiantis skirtingais dermoskopinio vertinimo kriterijais (požymiais) ir jų deriniais sukurta keletas odos melanomos diagnostikos algoritmų. 2002 metais paskelbtos 27 klinikinių tyrimų metaanalizės duomenimis, dermoskopijos tyrimas, palyginti su apžiūra, pagerina tyrėjo diagnostinį tikslumą priklausomai nuo tyrėjo patirties ir nepriklausomai nuo naudojamo diagnostinio algoritmo [69].

Struktūrinės analizės algoritmas yra sudėtingiausias ir tiksliausias iš visų dermoskopijos algoritmų, tačiau reikalauja nemažos tyrėjo patirties [54]. Siekiant palengvinti dermoskopinių vaizdų vertinimą, pradedantiesiems tyrėjams sukurti supaprastinti diagnostiniai algoritmai, iš kurių dažniausiai naudojama yra ABCD dermoskopijos taisyklė pagal *W. Stolz* [70] bei 7 kriterijų algoritmas [71]. Dėl padų ir delnų odos struktūros ypatybių šių odos sričių pigmentiniams odos dariniams vertinti taikomi atskiri *T. Saida* [72] pasiūlyti dermoskopijos vertinimo kriterijai, išskiriant lygiagrečių keterų, kaip skiriamąjį akralinės melanomos požymio, reikšmę.

G. Argenziano su bendraautoriais paskelbto daugiacentrio tyrimo duomenimis, dermoskopijos tyrimo tikslumas odos melanomos diagnostikoje priklauso nuo tyrėjo patirties ir taikomo diagnostikos algoritmo: jautrumas yra 80–98 proc., specifiskumas – 70–80 proc. [73]. *G. Annessi* su bendraautoriais, ištyrę 198 atipinius melanocitų kilmės odos navikus (102 displazinius apgamus ir 96 anktyvąsias odos melanomas), palygino trijų skirtingų dermoskopijos algoritmų tikslumą. Jų tyrimo duomenimis, tiksliausia diagnostika yra naudojant struktūrinės analizės algoritmą (jautrumas – 85,4 proc., specifiskumas – 79,4 proc.), palyginti su dermoskopijos ABCD taisykle (jautrumas – 84,4 proc., specifiskumas – 74,5 proc.) ir 7-ių kriterijų algoritmu (jautrumas – 78,1 proc., specifiskumas – 64,7 proc.) [74].

Displazinių apgamų klinikinių ir dermoskopijos požymių įvairovė bei panašumas į odos melanomą skatina ieškoti tikslesnių neinvazinės diagnostikos metodų, kurie galėtų prilygti displazinių apgamų ir odos melanomos auksiniam diagnostikos standartui – histologiniam tyrimui.

2.3 Melanocitų kilmės displazinių apgamų ir odos melanomos invazinė diagnostika: biopsija ir histologinis tyrimas

Pagrindinė odos ligų diagnostikos procedūra yra odos biopsija ir histologiniai tyrimai. Specialiomis biopsijos adatomis arba skalpeliu paimama odos ir poodžio dalis. Odos biopsija gali būti incizinė arba ekscizinė. Atipinių bei piktybinių odos navikų atvejais rekomenduojama atlikti ekscizinę biopsiją – visiškai pašalinti odos darinį odos pjūvį atliekant per sveikus audinius ir vengiant pjūvio per naviką. Tokia biopsija yra saugi – ji nepadidina naviko išplitimo rizikos.

Pagrindiniai odos biopsijos ir biopsinės medžiagos histologinio tyrimo trūkumai – invaziškumas bei tyrimo trukmė. Invazinis odos biopsijos tyrimas yra susijęs su randėjimo, infekcijos bei skausmui malšinti vartojamų medikamentų sukeltos anafilaksijos rizika. Odos biopsijos histologinis tyrimas kartais gali trukti iki 10 dienų.

Tinkamai atlikta odos biopsija yra vienas iš svarbiausių veiksnių, nulemiančių patologinės diagnozės tikslumą. Estetinėje medicinoje siekiant išvengti gilių odos pjūvių ir ryškių randų dažnai atliekama dalinė (šeivinė) odos biopsija, kuri neturėtų būti taikoma nei piktybinių, nei displazinių odos navikų atveju. Tiek atliekant incizinę, tiek šeivinę odos biopsiją, pašalinama tik dalis naviko, todėl histologinio tyrimo vertė yra ribota.

2.3.1 Displazinis apgamas

Histologiškai pagal ląstelių atipijos laipsnį – vertinant jų branduolių ir branduolėlių dydį, formą, dažymosi intensyvumą, branduolio ir citoplazmos santykį – displaziniai apgamai skirstomi į lengvos, vidutinės ir ryškios displazijos [75].

Pagrindinis displaziniam apgamui būdingas architektonikos požymis yra sutrikusi intraepiderminė melanocitų proliferacija, kuri gali pasireikšti kaip lentiginė melanocitų proliferacija ir (ar) gretimus akantozinius pluoštus jungiantys nevocitų lizdai. Nors vienas iš šių požymių yra būtinas displazinio apgamo diagnozei nustatyti [76–78].

Trečias displazinio apgamo požymis susijęs su organizmo reakcija. Limfocitinė infiltracija, spenelinės (papilinės) dermos kolageno fibroplazija, dermos hipervaskuliarizacija yra būdingi displaziniam apgamui.

2.3.2. *Odos melanoma*

Diagnozuojama histologiškai nustatčius nekontroliuojamą atipinių melanocitų proliferaciją odoje. Melanomos radialinės augimo fazės metu atipiniai melanocitai matomi tik paviršiniame odos sluoksnyje (epidermyje). Šios fazės melanoma vadinama *in situ*, tai atitinka 0 ligos stadiją. Epidermyje proliferuojantys atipiniai melanocitai ilgainiui įgyja invazinių savybių ir pradeda plisti gilyn į spenelinę, vėliau ir tinklinę dermą. Vertikalios augimo fazės melanoma, kuri vadinama invazine, jau turi metastazavimo tikimybę. Galutinėje patologijos diagnozėje nurodoma melanomos tipas, stadija nustatoma pagal giliausiai matomus atipinius melanocitus (naviko storį), matuojant milimetrais nuo odos paviršiaus (*Breslow* gylis) bei vertinant pagal odos struktūrinius sluoksnius (*Clark* invazijos lygis), kiti ligos prognozei svarbūs požymiai – mitozijų skaičius, išopėjimas [79].

Dėl didelės nepiktybinių melanocitų kilmės odos navikų ir melanomos formų įvairovės pasitaiko klinikinių atvejų, kai netgi patyrę dermatopatologai negali atsakyti, ar gerybinis, ar piktybinis yra navikas. Imunohistocheminiai tyrimai naudojant melanomos žymenis Melan-A (angl. *melanoma antigen recognized by T cells*), HMB 45 (angl. *human melanoma black 45*) bei baltymas S-100 suteikia papildomos informacijos apie melanocitų brandumą ir padeda tiksliau nustatyti melanocitinę displaziją [80–81]. Neaiškios reikšmės paviršinių atipinių melanocitų proliferacijoms apibūdinti vartojamas SAMPUS (angl. *superficial atypical melanocytic proliferation of uncertain significance*) trumpinys, o neapibrėžto piktybiškumo melanocitų kilmės navikai apibūdinami trumpiniu MELTUMP (angl. *melanocytic tumor of uncertain malignant potential*).

Siekiant neinvazinės diagnostikos tikslumą prilyginti histologinių ir imunohistocheminių tyrimų tikslumui reikalingi metodai, vaizdinantys žmogaus audinius *in vivo*. Tarp tokių metodų yra *in vivo* atliekama konfokali atspindžio mikroskopija.

2.4 *In vivo* konfokali atspindžio mikroskopija

Konfokali mikroskopija, kurią atrado ir patentavo *M. Minsky* 1961 metais, yra naudojama gyvų audinių giliems (virtualiems) pjūviams vaizdinti [82; 83]. Palaipsniui konfokali mikroskopija buvo pritaikyta vaizdinti žmogaus audinius *in vivo*. *Lucid* (JAV) kompanija 1997 metais pagamino pirmąją *in vivo* konfokali atspindžio mikroskopijos aparatą – *VivaScope 1000*.

Vaizdinant odą *in vivo* konfokali atspindžio mikroskopijos metu matomas vaizdas atitinka histologinius vaizdus horizontalioje plokštumoje. Palyginti su įprastine (šviesos) mikroskopija, konfokali atspindžio mikroskopijos vaizdai yra aukštos kokybės, detalūs ir pasižymi geru kontrastu.

Atspindėta šviesa yra naudojama audiniams vaizdinti konfokali atspindžio mikroskopijos tyrimuose: atspindžio nuo įvairių odos ląstelių ir struktūrų skirtumai sukuria kontrastą, leidžiantį atskirti įvairias struktūras tiriamuose audiniuose. Melaninas yra natūrali kontrastinė medžiaga. Be melanino, odoje šviesą atspindi keratinas bei kolagenas. Didelį atspindžio koeficientą turinčios odos struktūros (melanino, keratino turinčios ląstelės bei struktūros) konfokali atspindžio mikroskopijos vaizduose yra ryškios ir šviesios, o mažo atspindžio struktūros (ląstelių branduoliai, eritrocitai, limfocitai) – tamsios [84]. Tyrimo metodika plačiau aprašyta 3.3.2 skyriuje.

In vivo konfokali atspindžio mikroskopijos tyrimas medicinos praktikoje pradėtas naudoti nuo 1995 metų, o jo klinikinių tyrimų duomenys kasmet papildomi naujais kai kurių odos ligų požymiais bei diagnostikos kriterijais. *In vivo* konfokali atspindžio mikroskopijos tyrimo tikslumas odos ligų diagnostikoje apibendrintas 2 lentelėje.

Iš 2 lentelėje pateiktų duomenų matyti, kad tiriami įvairios kilmės odos navikai (bazaląstelinės karcinomos, aktininės keratozės ir kt.), tačiau daugiausia atlikta odos melanomos tyrimų. *A. Gerger*, *G. Pellacani*, *P. Guitera* atliekami odos melanomos diagnostikos *in vivo* konfokali atspindžio mikroskopijos tyrimai yra tęsiami daugiau nei 10 metų, siekiant išskirti tiksliausius ligos požymius ir pagerinti tyrimo diagnostinį tikslumą [87–91].

2 lentelė. *In vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos tyrimo jautrumas ir specifiskumas odos ligų diagnostikoje

Liga	Literatūros šaltinis (autorius, metai, Nr.)	Atvejų skaičius	Jautrumas (proc.)	Specifiškumas (proc.)
Bazinių ląstelių karcinoma	S. Nori ir bendraautoriai (2004) [85]	152	95,7	82,9
Aktininė keratozė	M. Ulrich ir bendraautoriai (2007) [86]	44	97 (tikslumas)	
Melanoma	A. Gerger ir bendraautoriai (2005) [87]	117	98,2	98,9
	G. Pellacani ir bendraautoriai (2005) [26]	102	97,3	72,3
	A. Gerger ir bendraautoriai (2006) [88]	162	90,7	98,9
	G. Pellacani, S. Menzies ir bendraautoriai (2007) [89]	351	91,9	69,3
	P. Guitera ir bendraautoriai (2009) [90]	326	91	68
Bazoląstelinė karcinoma	P. Guitera ir bendraautoriai (2012) [91]	710	100	88,5
	R. Castro ir bendraautoriai (2014) [92]	54	100	78
Melanoma	L. Lovatto ir bendraautoriai (2015) [93]	64	100	69

2.4.1 Displazinis apgamas

In vivo konfokaliuos atspindžio mikroskopijos tyrimas leidžia apžiūrėti paviršinius odos sluoksnius ląstelių lygiu ir įvertinti apgamo displazijos požymius: melanocitų ir architektonikos atipiją bei organizmo reakciją.

Remiantis klinikinių tyrimų duomenimis, displaziniam apgamui būdingi *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos tyrimu nustatyti požymiai ir jų atitikmenys histologiniame tyrime yra: (a) dermos papilės jungiantys lizdai („tiltai“) atitinka greitimus akantotinius pluoštus sujungiančių ląstelių lizdų histologinį požymį; (b) pamatinio sluoksnio ląstelių proliferacija yra „lentiginė melanocitų proliferacija“; (c) melanocitų ir jų lizdų atipija epidermyje matoma kaip pavienės atipinės dendritinės arba apvaliosios ląstelės („pedžetoidinė infiltracija“) bei nehomogeniški lizdai; (d) organizmo reakcija į apgamo ląsteles matoma kaip šviesių smulkių ląstelių infiltracija

spenelinėje dermoje („limfocitinė infiltracija“); (e) taip pat matomos proliferuojančios kolageno skaidulos spenelinėje dermoje bei suaktyvėjusi kraujotaka dermos papilėse [94–96].

Reikia pažymėti, kad publikacijų apie displazinių apgamų tyrimus naudojant *in vivo* konfokalią atspindžio mikroskopiją nėra daug. Vienintelė publikacija apie *in vivo* konfokalią atspindžio mikroskopijos panaudojimą displazinių apgamų diagnostikoje yra paskelbta 2012 metais G. Pellacani ir bendraautorų: ištyrus 19 nepiktybinių apgamų, 27 displazinių apgamų ir 14 melanomų architektonikos ir citologinius požymius buvo nustatyta, kad histologiniai atipijos požymiai statistiškai reikšmingai koreliuoja su *in vivo* konfokalią atspindžio mikroskopijos tyrimu nustatytais požymiais; displaziniai apgamai gali būti atskiriami nuo įprastinių apgamų; nehomogeniški lizdai yra vienas iš skiriamųjų displazinio apgamo požymių [97]. Remiantis klinikinių tyrimų duomenimis, *in vivo* konfokali atspindžio mikroskopija yra reikšminga nustatant apgamo atipiją ir stebint jos dinamiką [98].

Siekiant stebėti atipijos požymių turinčius apgamus svarbu nustatyti, kokie požymiai atsiranda apgame vystantis odos melanomai.

2.4.2 Odos melanoma

Palyginti su dermoskopija, didesnis diagnostikos naudojant *in vivo* konfokalią atspindžio mikroskopiją tikslumas nustatytas tiek pigmentinės, tiek hipomelanotinės, tiek ir amelanozinės melanomos atvejais [99].

Atliekant *in vivo* konfokalią atspindžio mikroskopiją, vertinami tokie pat melanomai būdingi požymiai kaip ir atliekant histologinį tyrimą. Melanomai būdingas melanocitų pleomorfizmas bei ryški ląstelių atipija *in vivo* konfokalią atspindžio mikroskopijos vaizduose matoma kaip pleomorfiška ląstelių populiacija su būdingomis stambiomis apvaliomis bei dendritinėmis ląstelėmis paviršiniuose epidermio sluoksniuose (pedžetoidinės ląstelės) arba jos matomos kaip atipiniai nehomogeniški pavienių ląstelių arba cerebriforminiai lizdai [100; 101]. Architektonikos atipija nustatoma pagal pakitusius dermos papilų kontūrus epidermio ir dermos jungties (EDJ) lygyje.

Skirtingų tyrėjų duomenimis, *in vivo* konfokalią atspindžio mikroskopijos tyrimo jautrumas diagnozuojant odos melanomą sudaro 90–100 proc., specifiskumas – 69–98 proc. [87; 88; 102; 103].

A. *Stevenson* ir bendraautoriai atliko *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos tyrimo tikslumo odos navikų diagnostikoje klinikinių tyrimų metaanalizę. Apibendrinę 5 tyrimų duomenis (iš viso 900 klinikinių atvejų, iš kurių vieną trečdalį sudarė odos melanomos) jie nustatė, kad *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos tyrimo jautrumas yra 93 proc. (95 proc. PI 91–97), specifiskumas 76 proc. (95 proc. PI 68–86) [104].

Taigi iš literatūros apžvalgoje pateiktų duomenų matyti, kad *in vivo* konfokali atspindžio mikroskopija gali būti naudojama melanocitų kilmės displaziniams apgamams ir odos melanomai diagnozuoti, o jos svarba diferencijuojant įprastinius apgamus, displazinius apgamus ir odos melanomas nėra tiksliai nustatyta, todėl tikslingi šio pobūdžio tyrimai.

3. TIRIAMIEJI IR TYRIMO METODAI

3.1 Tiriamųjų atranka, jų charakteristika ir tyrimo eiga

Perspektyvinis žvalgomasis tyrimas atliktas VU Onkologijos institute (dabar – Nacionalinis vėžio institutas – NVI) 2010–2013 metais. Prieš pradėdant tyrimą iš Vilniaus regioninio biomedicininių tyrimų etikos komiteto 2010 metais lapkričio 5 d. gautas leidimas (protokolas ADT-01 Nr. 158200-11-256-59) šį tyrimą atlikti (1 priedas).

Į tyrimą įtraukti 138 pacientai pagal šiuos kriterijus:

- vyresni nei 18 metų amžiaus;
- dermoskopinio tyrimo metu įtarta apgamo displazija arba odos melanoma.

Į tyrimą negalėjo būti įtraukti pacientai:

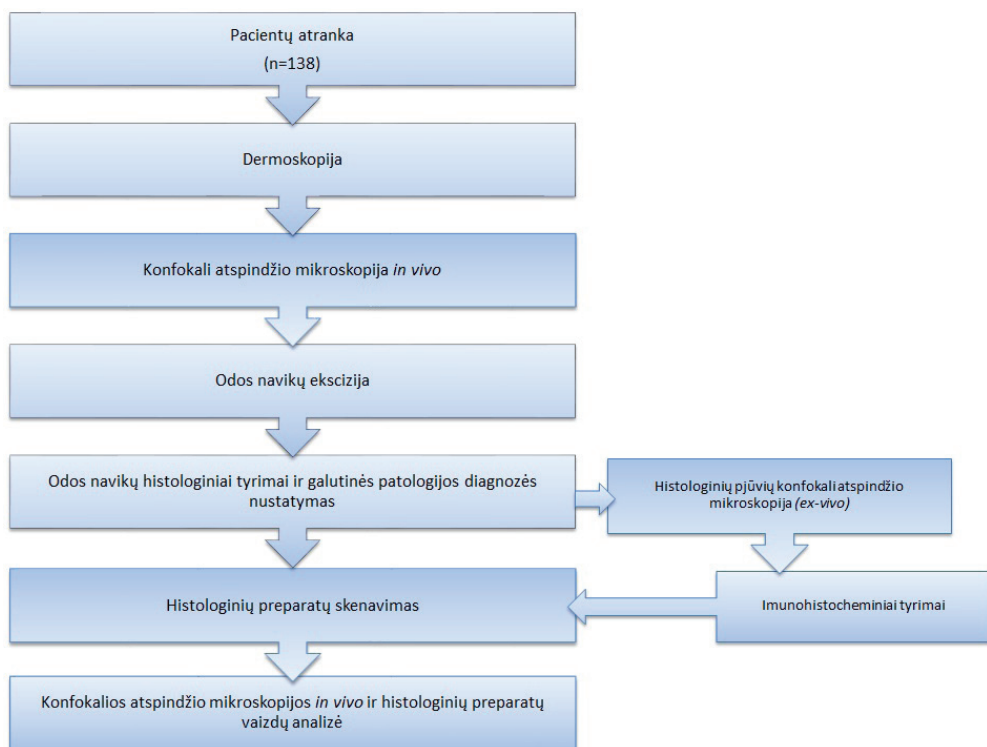
- jaunesni nei 18 metų amžiaus;
- alergiški vietiškai veikiantiems vaistams nuo skausmo.

Visiems į tyrimą įtrauktiems pacientams atlikta ekscizinė biopsija ir histologiniais tyrimais nustatyta melanocitų kilmės odos naviko diagnozė.

Prieš pradėdant tyrimą pacientai supažindinti su tyrimo tikslu ir eiga. Visi tyrimo dalyvavę pacientai pasirašė Asmens informavimo ir Informuoto asmens sutikimo dalyvauti tyrime formas (2 ir 3 priedai).

3 paveiksle pateikiama atlikto tyrimo eiga.

Pacientų atranka, odos navikų dermoskopija bei *in vivo* konfokali atspindžio mikroskopija, navikų ekscizija, histologinių odos navikų pjūvių konfokali atspindžio mikroskopija, gautų *in vivo* konfokali atspindžio mikroskopijos bei histologinių preparatų vaizdų analizė atlikta NVI. Odos navikų histologiniai tyrimai, galutinės patologinės diagnozės nustatymas, histologinių preparatų skenavimas, taip pat odos navikų histologinių pjūvių paruošimas konfokali atspindžio mikroskopijos tyrimams bei jų imunohistocheminiai tyrimai atlikti Valstybiniame patologijos centre, viešosios įstaigos VU ligoninės Santariškių klinikos filiale. Tyrimo duomenų statistinė analizė atlikta VU Matematikos ir informatikos fakultete.



3 pav. Tyrimo eiga

3.2 Bendra tiriamųjų charakteristika

Į tyrimą įtraukta 138 pacientai: 90 moterų ir 48 vyrai. Vidutinis pacientų amžius – 42 metai, standartinis nuokrypis (SD) – 16, jauniausiam pacientui – 18 metų, vyriausiam – 78 metai.

Imties dydis skaičiuotas pagal metodiką, naudojamą apskaičiuoti imties dydį dviem proporcijoms palyginti. Pasirinktas reikšmingumo lygmuo – 0,05; tyrimo statistinis pajėgumas – 0,8. Literatūros duomenimis, maksimalus standartinio testo (dermoskopijos tyrimo) specifiškumas – 80 proc. Naudojant naująjį diagnostikos testą (*in vivo* konfokali atspindžio mikroskopijos tyrimą) specifiškumą planuojama padidinti iki 98 proc. Tokio dydžio specifiškumo skirtumui tarp dviejų diagnostikos testų nustatyti apskaičiuotas imties dydis – 44 atvejai [105].

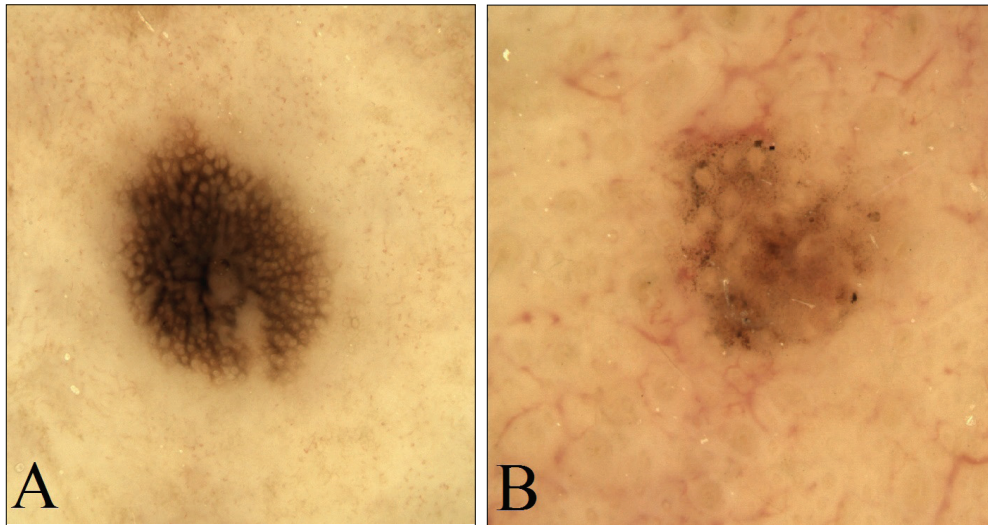
Po chirurginio gydymo – ekscizinės biopsijos ir odos naviko histologinio ištyrimo tiriamieji, pagal galutinę patologinę diagnozę, suskirstyti į tris grupes: I grupę

sudarė pacientai, kuriems diagnozuotas melanocitų kilmės apgamas, neturintis citologinės atipijos požymių (n=25), II grupė – pacientai, kuriems diagnozuotas displazinis apgamas (n=69), ir III grupė – pacientai, kuriems diagnozuota odos melanoma (n=44). Remiantis piktybinių navikų išplitimo vertinimo sistemos (TNM; angl. *Tumor, Nodes, Metastasis*) klasifikacija, 9 iš 44 odos melanomų buvo 0 stadijos (melanoma *in situ*), 35 – invazinės, t. y. I–IV stadijos; vidutinis odos melanomų storis pagal *Breslow* – 1,35 mm.

3.3 Tyrimo metodai

3.3.1 Dermoskopijos tyrimas

138 pacientų apgamo atipijos arba odos melanomos požymiai buvo nustatyti NVI atliekant apžiūrą ir dermoskopijos tyrimą 2010–2013 metų laikotarpiu. Dermoskopijos tyrimas atliktas naudojant rankinį *Heine Delta 20* (*Heine Optotechnik*, Vokietija) kontaktinį dermatoskopą. Nustatyti dermoskopiniai atipijos požymiai vertinti pagal struktūrinės analizės algoritmą. Tyrimui atrinktų atipijos požymių turinčių odos navikų skaitmeniniai dermoskopijos vaizdai išsaugoti naudojant *VivaCam* skaitmeninę kamerą (*Lucid*, JAV). Tirtų melanocitų kilmės odos navikų dermoskopijos vaizdų pavyzdžiai pateikiami 4 paveiksle.



4 pav. Melanocitų kilmės odos navikų dermoskopiniai vaizdai

4 paveiksle A – pigmentinio apgamo dermoskopinis vaizdas, kuriame matoma taisyklinga homogeniška periferijos kryptimi vis blyškesnė tinklinė hiperpigmentacijos struktūra, būdinga dėmės tipo apgamams (navikas yra liemens odoje; klinikinė diagnozė – įprastinis apgamas); B – asimetriškas, atipinis, netolygios pigmentacijos navikas, kurio periferijoje matomi nevienodo dydžio pigmento taškai (navikas yra veido odoje; histopatologinė diagnozė – *lentigo maligna*).

3.3.2 In vivo konfokali atspindžio mikroskopija

In vivo konfokali osos atspindžio mikroskopijos tyrimai atlikti naudojant osos vaizdinimo sistemą *VivaScope 1500* (*Lucid Inc.*, JAV) (5 pav.).

Konfokali os atspindžio mikroskopijos tyrimas geriausiai tinka pigmentiniams os dariniams tirti, nes melaninas yra labiausiai kontrastuojanti medžiaga tiriant odą konfokalia atspindžio mikroskopijos sistema. Tyrimo metu diagnostiniu (830 nm bangos ilgio iki 10 mW galios) os nežalojančiu lazeriu apšviečiama oda, o šviesos atspindys, sklindantis nuo os mikrostruktūrų, registruojamas pasirinktame os gylyje 500 μm^2 plote naudojant sudėtingą optinę sistemą (6 pav.).

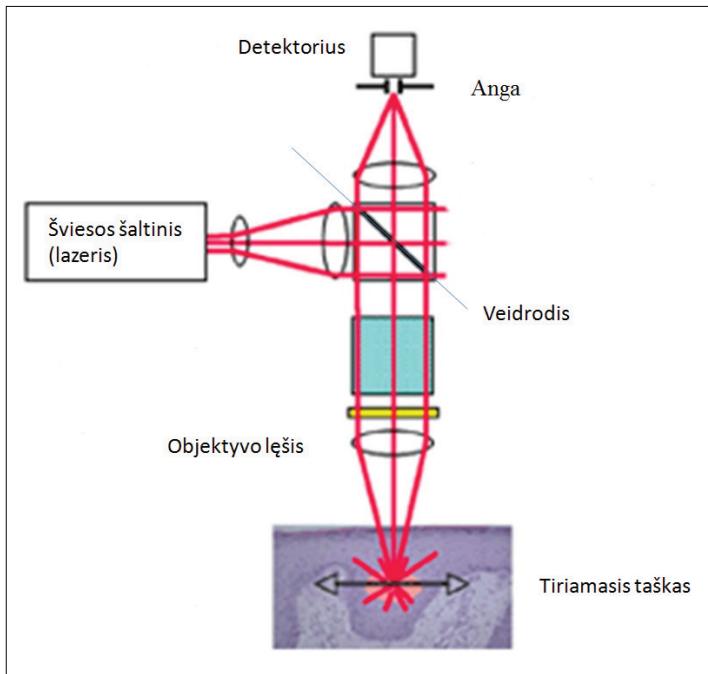
Programinė įranga leidžia iš tokių nuske-
nuotų os mikrovaizdų sudėti mozaikišką os mikrovaizdą, pagal kurį detalai galima vertinti iki 8 mm^2 ploto horizontalaus os paviršiaus struktūrą. Naudojant konfokalią os vaizdinimo sistemą oda gali būti vaizdinama iki 250 μm gylį nuo os paviršiaus (7 pav.).

Vaizdinimo gylis yra ribotas dėl šviesos sklaidos ir sugerties os audiniuose. Prie švarios sausos os centruojant tiriamąjį os naviką specialiais klizais prilipinamas kontaktinis prietaisas, kurį sudaro metalinis žiedas ir dengiamasis stikliukas.

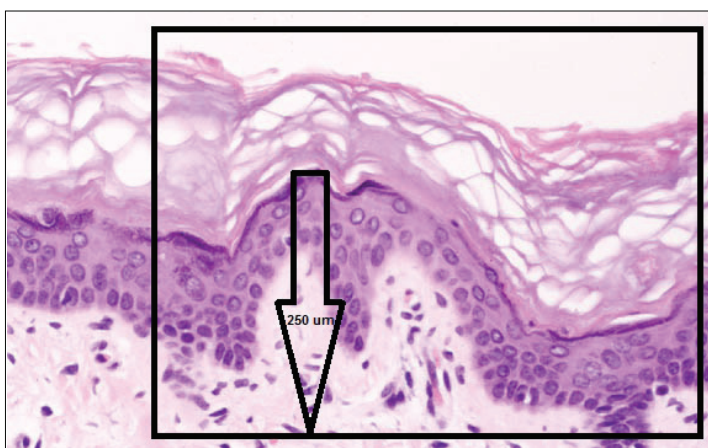


5 pav. *In vivo* konfokali os atspindžio mikroskopijos sistema *Vivascope 1500* (*Lucid*, JAV), pritaikyta os apžiūrai

Šis prietaisas prie odos prilipinamas užlašinus lašą dėl imersijos naudojamo aliejaus (*Crodamol STS oil*; JAV). Prie kontaktinio prietaiso tvirtinamas x30 objektinis lęšis (kontaktinė terpė – *Aquasonic gel 100*, JAV) (8 pav.).



6 pav. *In vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos schema

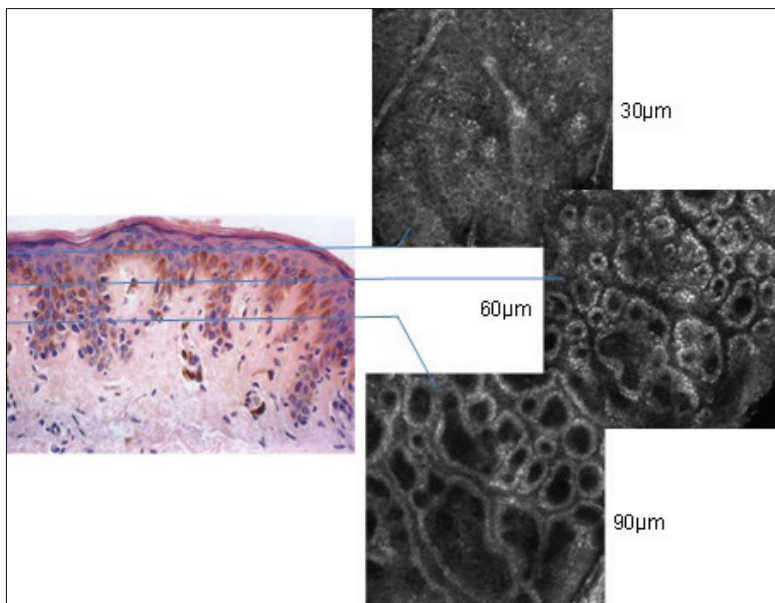


7 pav. *In vivo* konfokalių mikroskopijos metodu oda vaizdinama nuo odos paviršiaus iki 250 μm gylio



8 pav. *In vivo* konfokališkos atspindžio mikroskopijos aparatinės tvirtinimas prie odos

Konfokalia odos atspindžio sistema galima fotografuoti horizontalius audinio vaizdus šiais parametrais: $500 \times 500 \mu\text{m}$, 1024×1024 pikselių. Automatinis skaitytuvas skenuoja iki $8 \times 8 \text{ mm}$ matymo lauką, iš šių vaizdų sudedamas mozaikiškas horizontalaus audinio pjūvio vaizdas. Tyrimo metu konfokališkos atspindžio mikroskopijos vaizdai skenuoti 30 , 60 ir $90 \mu\text{m}$ odos gylyje (9 pav.).



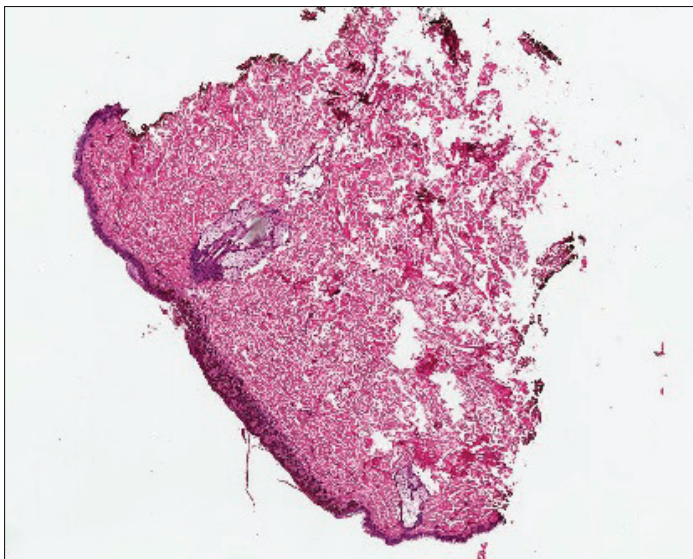
9 pav. Tyrimo metu odos vaizdai skenuoti 30 , 60 ir $90 \mu\text{m}$ odos gyliuose

Apgamo displazijai būdingi odos struktūros minėtame odos gylyje pakitimai matomi atliekant *in vivo* konfokalią atspindžio mikroskopiją, analizuoti ir vertinti skaitmeniniuose mozaikiškuose (*Vivablock*) vaizduose. Normaliam epidermiui būdinga “medaus korio” vaizdą primenanti struktūra vertinta 30 μm odos gylyje (žemiau *stratum corneum*). Jos nebuvimas, t. y. netvarkingas ląstelių išsidėstymas, kai nelieka aiškių ląstelių ribų, buvo vertinamas kaip “būdingos epidermio struktūros praradimas”. Tame pačiame gylyje, t. y. 30 μm žemiau *stratum corneum*, matomos šviesios atipinės ląstelės, šakotos ar stambios (didesnės nei 20 μm), vertintos kaip “pedžetoidinė infiltracija”. Epidermio ir dermos jungties lygyje – 60 ir 90 μm žemiau *stratum corneum* – vertinti ląstelių lizdai, jų homogeniškumas bei ribos. Toliau pateikiami atliekant *in vivo* konfokalią atspindžio mikroskopiją matomų displazinių apgamų ir odos melanomos požymių aprašymai:

- tankių ląstelių lizdai (angl. *dense clusters*) – kompaktiškos, aiškias ribas turinčios sankaupos, sudarytos iš gerai šviesą atspindinčių ląstelių;
- nehomogeniški lizdai (angl. *nonhomogenous clusters*) – sankaupos ląstelių, kurių skirtingas atspindys ir netaisyklingos arba sunkiai atskiriamos ląstelių ribos;
- netaisyklingi diskoheziniai arba pavienių ląstelių lizdai (angl. *irregular discohesive and sparse cells clusters*) – aiškias ribas turinčios tamsios iki 300 μm struktūros, kuriose lengva atskirti pavienes ląsteles, turinčias kontrastuojančią citoplazmą ir hipokontrastinį branduolį;
- pedžetoidinės ląstelės (angl. *pagetoid cells*) – atipinės šviesios šakotos arba apvalios ląstelės, matomos paviršiniuose epidermio sluoksniuose.
- epidermio netaisyklingumas (angl. *epidermal disarray*). Jeigu, atliekant *in vivo* konfokalią atspindžio mikroskopiją grūdėtojo epidermio sluoksnio gylyje, nematoma taisyklingo medaus korio vaizdo, tai vadinama epidermio netaisyklingumu.

3.3.3 Odos navikų histologiniai tyrimai, galutinės patologijos diagnozės nustatymas ir histologinių preparatų skenavimas

Atlikus navikų ekscizinę biopsiją mėginiai fiksuoti 10 proc. buferiniame formalino tirpale. Atlikti įprastiniai histologiniai ir imunohistocheminiai tyrimai, reikalingi histopatologijos diagnozei nustatyti (H+E, IHC tyrimai naudojant melanomos žymenis Melan-A, HMB 45, S-100 baltymą).



10 pav. Hematoksilino-eozino (H+E) histocheminiu metodu dažyto mikropreparato skenuotas vaizdas. Matomas odos ir poodžio fragmentas esant odos navikui (centre) ir sveikos odos kraštams (abipus)

Histologinių preparatų 20x padidinti vaizdai skenuoti *Aperio ScanScope GL* objektyviųjų stiklelių skeneriu (*Aperio Technologies, Vista, Kanada*) (10 pav.).

3.3.4 In vivo konfokalinės atspindžio mikroskopijos vaizdų ir histologinių mikropreparatų vaizdų analizė

Greitinant *in vivo* konfokalinės atspindžio mikroskopijos vaizdus ir tų pačių navikų mikropreparatų H+E dažytus vaizdus buvo vertinami melanocitų kilmės odos navikų *in vivo* konfokalinės atspindžio mikroskopijos požymiai, kuriais apibūdinama citologinė atipija: epidermio netolygumas, pedžetoidinė infiltracija, tankių ląstelių lizdai, nehomogeniški lizdai, netaisyklingi diskoheziški ir pavienių ląstelių lizdai. Remiantis nuo lokalizacijos priklausomais požymių skirtumais (pvz., navikai, kuriuose lizdų atipijos požymiai yra matomi lokaliai naviko periferijoje), ieškota jų atitikmens histologinių / imunohistocheminių tyrimų rezultatuose pagal žinomą *in vivo* konfokalinės atspindžio mikroskopijos vaizdų gylį nuo odos paviršiaus.

3.3.5 *Histologinių pjūvių konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimas (ex vivo)*

Siekiant nustatyti konfokalių atspindžio mikroskopijos būdu vaizdinamų odos melanocitų atspindį sveikoje odoje, melanocitų kilmės apgamuose ir odos melanomose, buvo atliktas odos bei jos navikų histologinių pjūvių konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimas kartu su imunohistocheminiais melanocitų žymenų (Melan-A, HMB 45) tyrimais. Ištyrėme navikus, kurie prieš tai buvo ištirti *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos būdu. Po naviko ekscizijos mėginiai fiksuoti 10 proc. buferiniame formalino tirpale. Atlikti įprastiniai histologiniai tyrimai, reikalingi histopatologinei diagnozei nustatyti. Vėliau atlikti papildomi navikų pjūviai, jų tyrimai konfokalių atspindžio mikroskopijos būdu ir imunohistocheminiai tyrimai melanocitams pažymėti.

Histologinių odos pjūvių paruošimas. Parafininis formalinu fiksuoto audinio stulpelis buvo pjaustomas 5 µm storio pjūviais mikrotomu. Tada pjūviai buvo panardinami į karšto vandens vonelę, perkeliama ant mikroskopavimo stikliuko ir išdžiovinami 80–90°C temperatūroje. Taip paruošti melanocitinių navikų pjūviai tirti konfokalių atspindžio mikroskopijos metodu.

Histologinių pjūvių konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimas (ex vivo). Konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimui atlikti naudoti, kaip jau minėta, paruošti histologiniai odos pjūviai, kurie buvo tiriami Nikon „Eclipse TE2000“ (Japonija) mikroskopu, turinčiu *CiSi* konfokalią skenavimo sistemą (objektyvas – *x60 Plan Apo VC* aliejus, 1.4 skaitinė apertūra). Apšvietimui buvo naudojamas 515 nm bangos ilgio argono jonų lazeris, atspindžiui aptikti – standartinis 12 bitų trijų spalvų RGB detektorius ir 500–530 nm praeinamumo filtras. Vaizdas buvo apdorojamas programine įranga *Nikon EZ-C1 Bronze version 3.80* ir *ImageJ 1.45* (Japonija).

Imunohistocheminiai tyrimai. Gavus histologinių pjūvių konfokalių atspindžio mikroskopijos vaizdus buvo atliekami parafininių pjūvių imunohistocheminiai (IHC) tyrimai panaudojant melanocitams specifinius žymenis – Melan-A ir HMB 45. Biologinių žymenų baltymų raiškos analizei naudotas *Ventana BenchMark Ultra* dažymo automatas (*Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, JAV*). Antigenų epitopams atkurti naudotas *Ventanos* ląstelių kondicionavimo tirpalas CC1 (pH 8,5) – 95°C (Melan-A – 36 min., HMB 45 – 64 min.). Vėliau pjūviai inkubuoti su monokloniniais antikūnais (37°C 32 min., tirpalo skiedimo santykis 1:100) naudojant

Ventana Ultraview DAB detekcijos sistemą. Tyrime naudoti šie monokloniniai antikūnai (Ak): HMB 45 melanosomai (klonas HMB 45; *DAKO Diagnostics, Glostrupas, Danija*) ir Melan-A (klonas A103; (*DAKO Diagnostics, Glostrupas, Danija*)).

Histologinių pjūvių konfokalių atspindžio mikroskopijos vaizdų ir histologijos preparatų imunohistocheminių vaizdų analizė. Atlikus sveikos odos, *Spitz* apgamo ir odos melanomos histologinių pjūvių konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimus ir gavus jų vaizdus, atlikti tų pačių histologijos preparatų imunohistocheminiai tyrimai panaudojant melanocitams specifinius žymenis. Histologijos preparatų 20x padidinti vaizdai skenuoti *Aperio ScanScope GL* objektinių stiklelių skeneriu (*Aperio Technologies, Vista, Kanada*). Gauti histologinių pjūvių konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimo vaizdai buvo lyginami su imunohistocheminių tyrimų vaizdais. Vertintas melanocitų branduolio ir citoplazmos kontrastas, lyginant jį su aplinkinių ląstelių bei struktūrų kontrastu. Melanocitų atspindys vertintas atsižvelgiant į imunohistocheminių tyrimų būdu nustatomą ląstelių brandumą.

3.3.6 Statistinė duomenų analizė

Siekiant nustatyti *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimo tikslumą displazinių apgamų ir odos melanomos diagnostikoje, apskaičiuoti rodikliai: tikslumas, jautrumas, specifiškumas, teigiama ir neigiama prognozė.

Tikslumas (angl. *accuracy*) – rodiklis, apibūdinantis diagnostikos metodo tikslumą ir rodantis teisingai identifikuotų atvejų santykį su visais tiriamaisiais atvejais.

Jautrumas (angl. *sensitivity*) – rodiklis, apibūdinantis diagnostikos metodo tikslumą ir rodantis tikimybę, kad sergančio žmogaus tyrimo duomenys patvirtina ligą.

Specifiškumas (angl. *specificity*) – rodiklis, apibūdinantis diagnostikos metodo tikslumą ir rodantis tikimybę, kad sveiko žmogaus tyrimo duomenys patvirtina jį esant tikrai sveiką.

Teigiama prognozė (angl. *positive predictive value*) – rodiklis, apibūdinantis diagnostikos metodo tikslumą ir rodantis tikimybę, kad žmogus serga, jei diagnostinis testas yra teigiamas.

Neigiama prognozė (angl. *negative predictive value*) – rodiklis, apibūdinantis diagnostikos metodo tikslumą ir rodantis tikimybę, kad žmogus sveikas, jei diagnostinis testas yra neigiamas.

Tikslumo pagal atskirus požymius rodikliai apskaičiuoti naudojant formules:

$$\text{Tikslumas} = \frac{\#(\text{teisingai teigiami} + \text{teisingai neigiami})}{\#(\text{teisingai teigiami} + \text{teisingai neigiami} + \text{neteisingai teigiami} + \text{neteisingai neigiami})}$$

$$\text{Jautrumas} = \frac{\# \text{teisingai teigiami}}{\#(\text{teisingai teigiami} + \text{neteisingai neigiami})}$$

$$\text{Specifiškumas} = \frac{\# \text{teisingai neigiami}}{\#(\text{teisingai neigiami} + \text{neteisingai teigiami})}$$

$$\text{Teigiama prognozė} = \frac{\# \text{teisingai teigiami}}{\#(\text{teisingai teigiami} + \text{neteisingai teigiami})}$$

$$\text{Neigiama prognozė} = \frac{\# \text{teisingai neigiami}}{\#(\text{teisingai neigiami} + \text{neteisingai neigiami})}$$

Teisingai / neteisingai teigiami / neigiami rezultatai nustatyti atsižvelgiant į histologinį tyrimą, kaip auksinį diagnostikos standartą.

Dvinarė logistinė regresija naudota skirtingų *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimu nustatytų požymių diagnostinei vertei nustatyti pagal diagnostinių galimybių santykį bei jų pasikliautinusius intervalus, ROC (angl. *receiver operator characteristic*) kreives bei apskaičiuojant plotą po kreive esantį plotą (angl. *area under the curve*, AUC).

Tyrimo diagnostinis tikslumas pagal plotą po kreive (AUC) vertinamas taip: kai plotas po kreive yra 0,9–1,0 – puikus, 0,8–0,9 – labai geras, 0,7–0,8 – geras, 0,6–0,7 – patenkinamas, 0,5–0,6 – nepakankamas, <0,5 – tyrimas nenaudingas.

Įvertinta melanomos diagnostika pagal atskirus *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimu nustatytus požymių derinius. Kokybinių požymių tarpusavio priklausomumas vertintas taikant chi kvadrato (χ^2) kriterijų. Tikrinant statistines hipotezes naudotas 0,05 reikšmingumo lygmuo. Modeliai lentelėse surūšiuoti pagal tikėtumo (χ^2) statistikos reikšmes. Duomenų statistinei analizei atlikti naudotas SAS 9.3 statistinis paketas.

4. REZULTATAI

Ištirti 138 melanocitų kilmės apgamai ir odos melanomos pagal galutinę histopatologinę diagnozę suskirstyti į tris grupes:

- įprastiniai apgamai (n=25);
- displaziniai apgamai (n=69);
- odos melanomos (n=44).

Displazinių apgamų grupėje apgamai suskirstyti pagal histologiškai nustatytą ląstelių atipijos laipsnį:

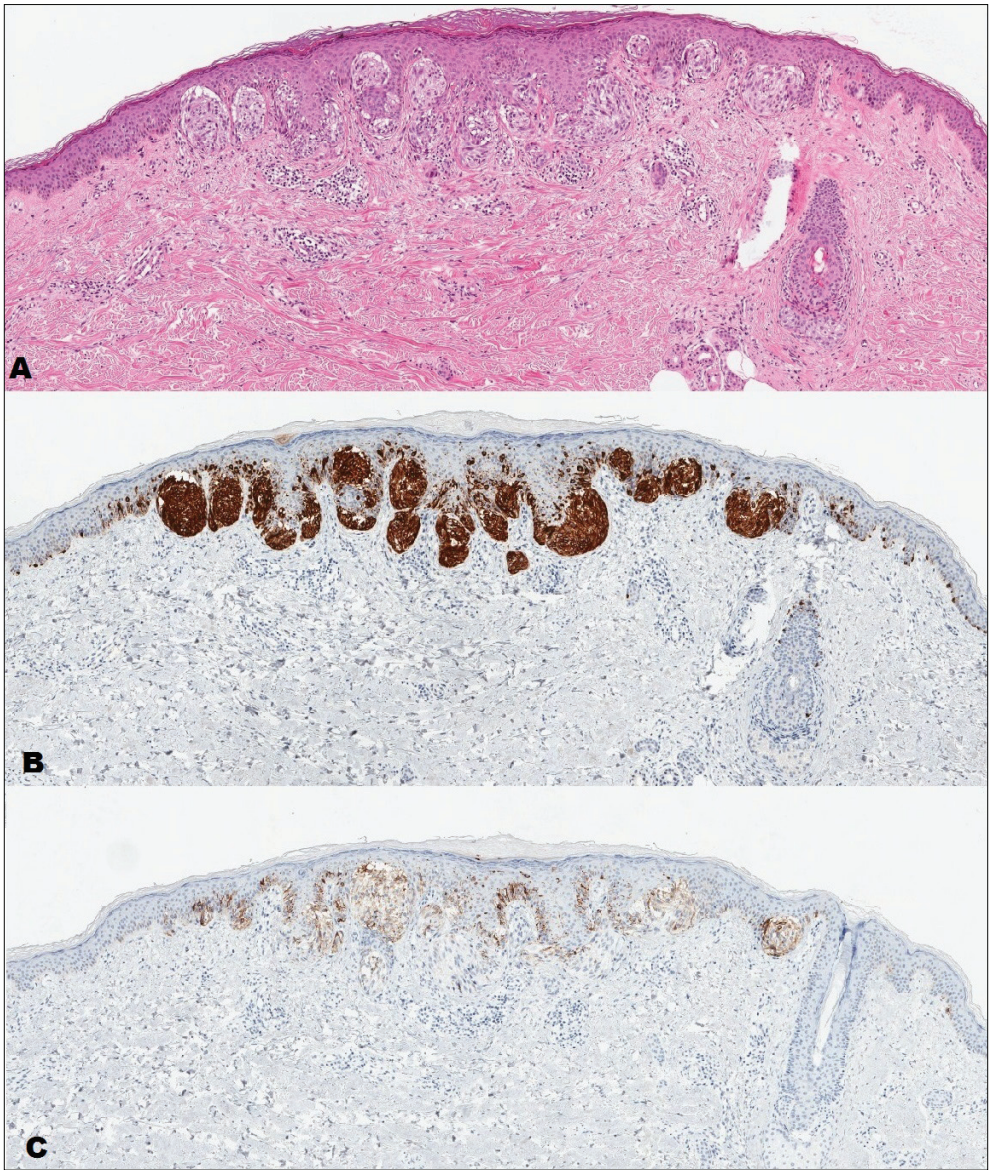
- silpna citologinė atipija (n=7);
- vidutinė citologinė atipija (n=42);
- ryški citologinė atipija (n=20).

Odos melanomų grupėje 9 navikai buvo 0 stadijos (melanoma *in situ*), kiti – I–IV stadijos. Vidutinis naviko storis pagal *Breslow* klasifikaciją – 1,35 mm, didžiausias – 9 mm.

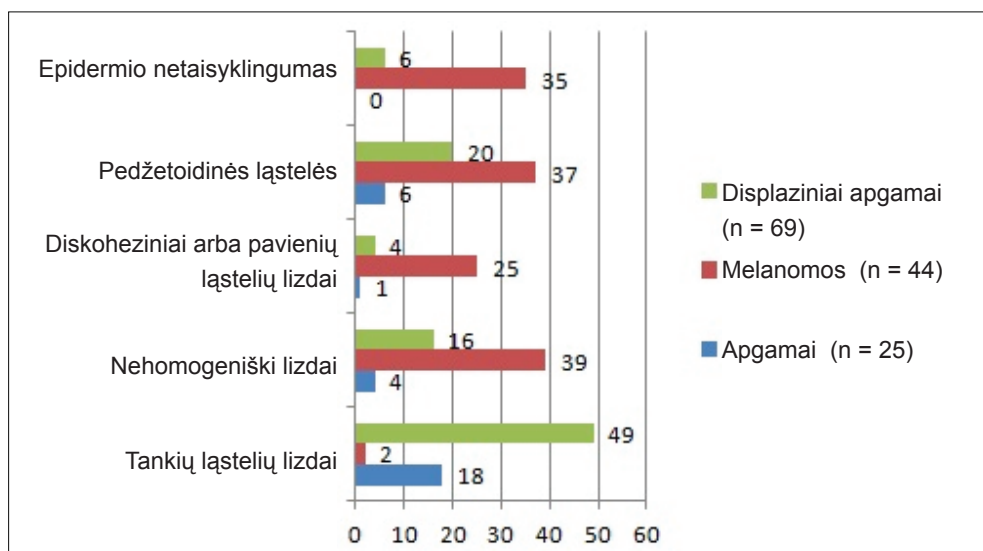
Atlikti papildomi histologiniai tyrimai melanocitų kilmės odos navikų, kurių *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos vaizduose matyti būdingi tiriamieji displazinių apgamų ir odos melanomos požymiai. Šių odos navikų histologinių preparatų gretimi pjūviai dažyti H+E, Melan-A ir HMB 45, siekiant nustatyti ryšį tarp *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos tyrime matomų požymių ir histologinių / imunohistocheminių melanocitų požymių (11 pav.).

12 paveiksle pateikiama melanocitų kilmės odos navikų charakteristika pagal *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos tyrimu nustatytus požymius.

Ištirus 138 melanocitų kilmės odos navikų *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos vaizdus, netaisyklingo epidermio nenustatyta nė viename įprastiniame apgame. Šis požymis buvo teigiamas 35 iš 44 melanomų. Pedžetoidinės ląstelės taip pat buvo dažnai matomos melanomose: požymis teigiamas 37 iš 44 melanomų. Diskoheziniai arba pavienių ląstelių lizdai retai matyti įprastiniuose apgamuose ir displaziniuose apgamuose, tačiau šis požymis buvo teigiamas 25 iš 44 melanomų. Nehomogeniški lizdai buvo 16 iš 69 displazinių apgamų, 39 iš 44 melanomų bei 4 iš 25 įprastinių apgamų. Tankių ląstelių lizdai apgamuose dažnesni, t. y. 18 iš 25 įprastinių apgamų buvo sudaryti iš tankių ląstelių lizdų.



11 pav. Melanocitų kilmės displazinio apgamo mikropreparatų histologinių ir imunohistocheminių tyrimų rezultatų vaizdai: H+E dažymas (A), imunohistocheminiai tyrimai naudojant Melan-A (B) ir HMB 45 (C) žymenis.



12 pav. Tirtų melanocitų kilmės odos navikų charakteristika pagal *in vivo* konfokalinio atspindžio mikroskopijos tyrimu nustatytus požymius (n – navikų, kuriuose požymis yra teigiamas, skaičius).

4.1 *In vivo* konfokalinio atspindžio mikroskopijos tyrimu nustatytų displazinių apgamų ir odos melanomos požymių atitiktis histologiniams požymiams

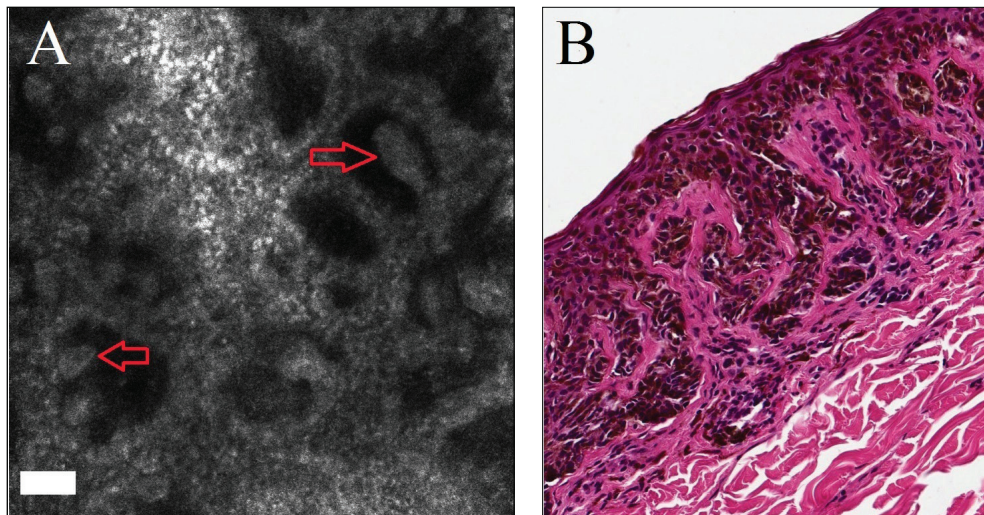
Toliau pateikiami melanocitinių odos navikų – displazinių apgamų ir odos melanomų – *in vivo* konfokalinio atspindžio mikroskopijos būdu gauti vaizdai aprašant juos pagal minėtus tiriamuosius požymius. Pateikiami tų pačių navikų *in vivo* konfokalinio atspindžio mikroskopijos ir H+E (hematoksilinu ir eozinu) dažytų mikropreparatų vaizdai analizuojant *in vivo* konfokalinio atspindžio mikroskopijos displazinių apgamų ir odos melanomos požymių atitiktį histologiniams melanocitų atipijos požymiams.

Tankių ląstelių lizdai

Vertinant *in vivo* konfokalinio atspindžio mikroskopijos vaizdus tankių ląstelių lizdų požymis atitiko histologinį atipinių melanocitų / nevocitų įvertinimą 51 iš 69 tirtų odos navikų (73,91 proc.; 95 proc. PI 62,42–82,89).

Analizuojant melanocitų kilmės odos navikų *in vivo* konfokalinio atspindžio mikroskopijos bei H+E nudažytus tų pačių navikų mikropreparatų histologinius vaizdus

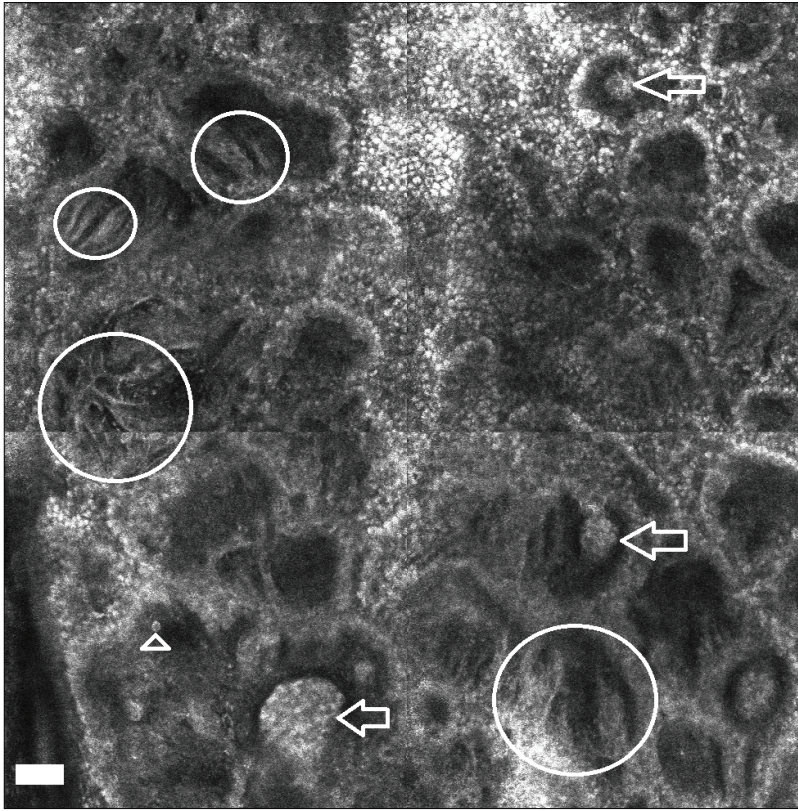
nustatyta, kad tankių ląstelių lizdai atitinka pigmento melanino turinčių ląstelių lizdus bei sankaupas. Ląstelės, kurių citoplazmoje buvo pigmento melanino, pasižymėjo ryškiu kontrastu tiriant *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos metodu (13 pav.).



13 pav. Displazinio apgamo, esant vidutinio laipsnio citologinei atipijai, *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos vaizdas (A), kuriame matomas navikas 30 μm žemiau *stratum corneum*, t. y. paviršiniame epidermio ir dermos jungties (EDJ) lygyje (0,5 mm x 0,5 mm, skalė = 50 μm). Visame plote matomi tankių ląstelių lizdai, deformuojantys EDJ būdingą odos architektūną (raudonos rodyklės). To paties naviko mikropreparato histologinis vaizdas (H+E dažymas, 20x) (B)

Iš 13 paveikslė pateiktų vaizdų matyti atipinių melanocitų lizdai, atliekant *in vivo* konfokalią atspindžio mikroskopiją atrodantys kaip monomorfiškų šviesą atspindinčių ląstelių sankaupos, deformuojančios būdingą odos architektūną (13 pav., A). Histologiniame tyrime (13 pav., B) matomi tie patys lizdai yra sudaryti iš melanocitų kilmės ląstelių (nevocitų), citoplazmoje turinčių pigmento melanino granulių.

Toliau pateikiamas mozaikiškas *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos būdu gautas tankių ląstelių lizdų displazinio apgamo vaizdas esant ryškiai citologinei atipijai (14 pav.). Displazinio apgamo vaizde matomi įvairiai išsidėstę lizdai.



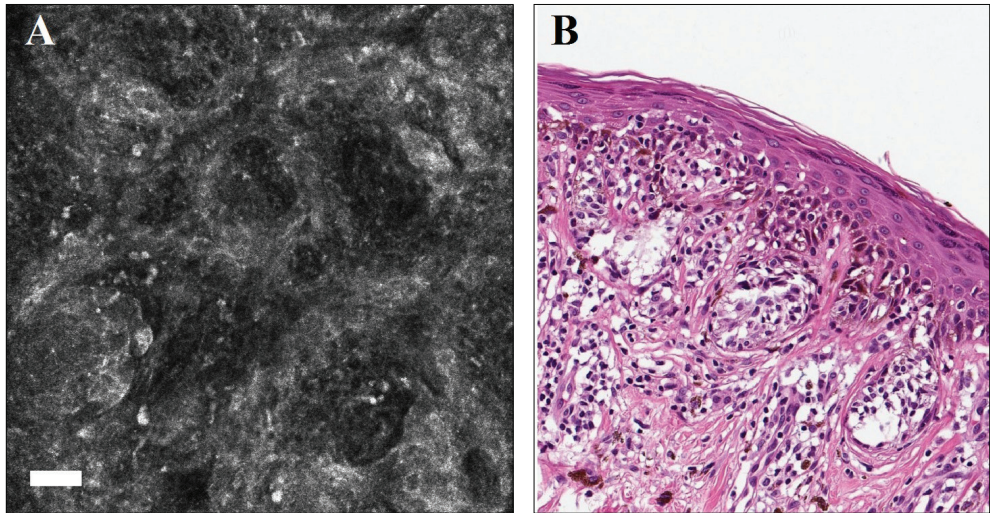
14 pav. Displazinio apgamo, esant ryškiai citologinei atipijai, *in vivo* konfokališios atspindžio mikroskopijos mozaikinis vaizdas, kuriame matomas navikas 30 μm žemiau *stratum corneum* (1 mm x 1 mm, skalė = 50 μm)

Iš 14 paveiksle pateikto vaizdo matyti, kad epidermio ir dermos jungties lygyje matomi būdingi tankių ląstelių lizdai išsidėstę netaisyklingai, deformuoja būdingą odos architektoną (rodyklės). Apskritimuose pažymėti tankių ląstelių lizdai kaip tiltai jungia gretimus akantozinius pluoštus. Toks lizdų išsidėstymas – būdingas displazinio apgamo histologinis požymis. Trikampiu pažymėta pakitusi ląstelė su stambiu hipokonstrastiniu branduoliu bei kontrastuojančia citoplazma tikėtina yra atipinis melanocitas.

Nehomogeniški lizdai

In vivo konfokališios atspindžio mikroskopijos vaizduose matomas nehomogeniš-
kų lizdų požymis atitinka histologinį atipinių melanocitų / nevocitų įvertinimą 55 iš
59 tirtų odos navikų (93,22 proc.; 95 proc. PI 83,36–97,80).

Analizuojant melanocitinių odos navikų *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos vaizdus bei H+E nudažytus tų pačių navikų mikropreparatų histologinius vaizdus nustatyta, kad nehomogeniški lizdai atitinka susiliejančius, netaisyklingos formos epidermio ir dermos jungties lizdus, kurių pavienės ląstelės turi pigmento melanino (15 pav.).



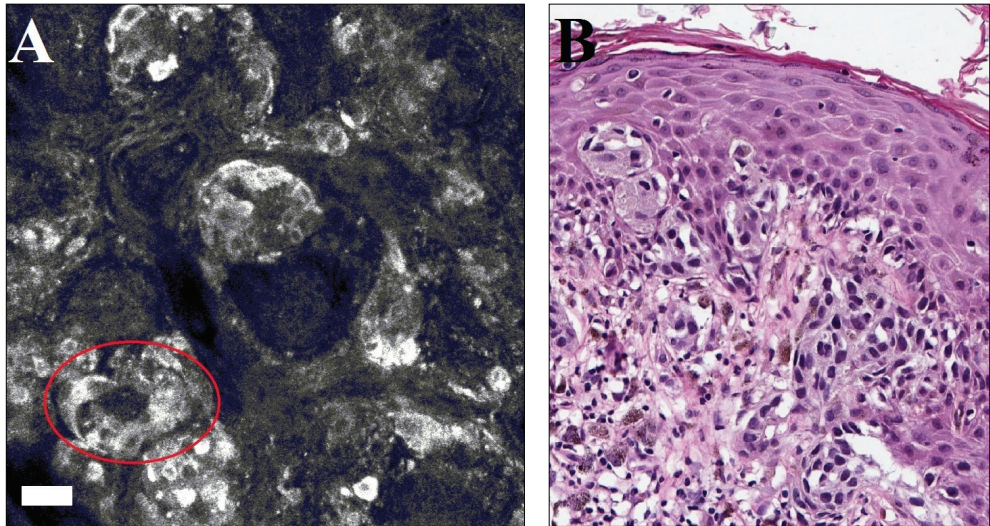
15 pav. Displazinio apgamo, esant ryškiai citologinei atipijai, *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos vaizdas (A), kuriame matomas navikas 60 μm žemiau *stratum corneum* EDJ lygyje (0,5 mm x 0,5 mm, skalė = 50 μm); to paties naviko mikropreparato histologinis vaizdas (H+E dažymas, 20x) (B)

15 paveiksle pateiktame *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos vaizde matomi nehomogeniški ląstelių lizdai vietomis sujungia gretimus akantozinius pluoštus sudarydami „tiltus“, deformuojančius būdingą odos architektūrą, taip pat matomi kiti displaziniam apgamui būdingi požymiai – fibrozė bei uždegiminė infiltracija spenelinėje dermoje. Palyginti su histologiniu to paties naviko mikropreparato vaizdu (15 pav., B), lizdus sudarančios ląstelės (nevocitai) yra polimorfiški: pavieniai turi pigmento melanino granuliu, kiti – epitelioidiniai, neturintys pigmento.

Netaisyklingi diskoheziniai arba pavienių ląstelių lizdai

Sankaupos vadintos netaisyklingais diskoheziniais arba pavienių ląstelių lizdais, kai epidermio ir dermos jungties lygyje 30–60 μm žemiau *stratum corneum* buvo matomos diskohezių ląstelių sankaupos esant netaisyklingoms ląstelių riboms

(16 pav.) arba tamsios (šviesos neatspindinčios) struktūros su pavienėmis šviesą atspindinčiomis ląstelėmis bei aiškiais ribomis (17 pav.). *In vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos vaizduose matomas netaisyklingų diskohezinųjų arba pavienių ląstelių lizdų požymis atitinka histologinį atipinių melanocitų / nevocitų įvertinimą 29 iš 30 tirtų odos navikų (96,67 proc.; 95 proc. PI 81,91–99,99).

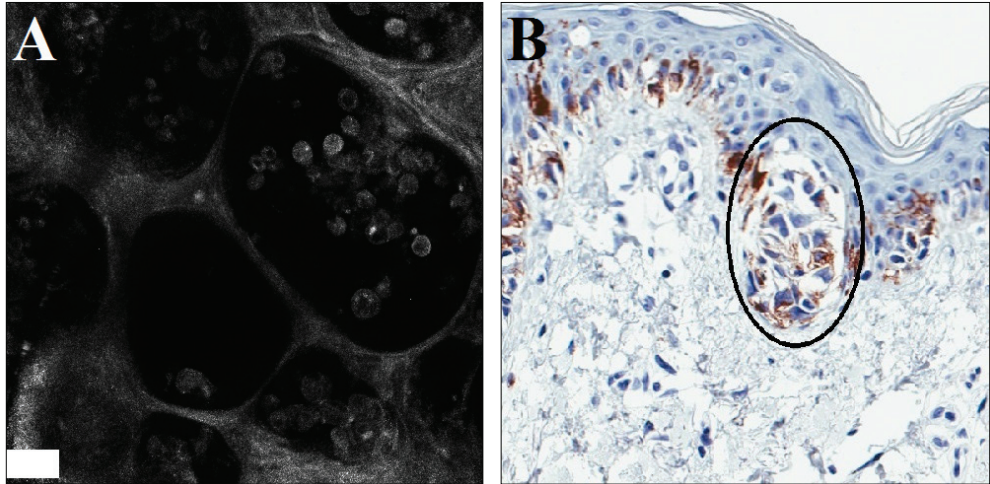


16 pav. Paviršiumi plintančios odos melanomos (0,9 mm storis pagal *Breslow* klasifikaciją) *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos vaizdas (A), kuriame matomas navikas 50 μm žemiau *stratum corneum* EDJ lygyje (0,5 mm x 0,5 mm, skalė = 50 μm); to paties naviko histopatologijos mikropreparato vaizdas (H+E dažymas, 20x) (B)

Iš 16 paveiksle pateiktų vaizdų matyti, kad netaisyklingi diskoheziniai (raudona-me apskritime) lizdai matomi EDJ lygyje: dauguma lizdus sudarančių ląstelių turi kontrastuojančią citoplazmą ir hipokonstrastinį branduolį, tarp kontrastuojančių ląstelių matomi tamsūs plotai iki 30–100 μm , šiuose plotuose – smulkios – iki 10 μm – kontrastuojančios struktūros. Histologiškai (16 pav., B) netaisyklingi diskoheziniai lizdai atitinka atipinių epitelioidinių ląstelių lizdus, kurių dauguma turi pigmento melanino.

17 paveiksle pateiktame *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos vaizde (A) visame naviko plote matomi pavienių ląstelių lizdai, t. y. aiškias ribas turinčios tamsios iki 300 μm struktūros, kuriose lengva atskirti pavienes ląsteles, turinčias kontrastuojančią citoplazmą ir hipokonstrastinį branduolį. Tiriant histologiškai šie lizdai

atitinka netaisyklingus diskohezinius (17 pav., B; juodas apskritimas) intraepidermi-
nius lizdus, sudarytus iš nebrandžias melanosomas (HMB 45 teigiamos ląstelės) tu-
rinčių ląstelių. Tiriant *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos metodu šie lizdai
tęsiasi nuo 20 μm iki 75 μm žemiau *stratum corneum* (žr. 4.3 skyrelį „Odos melano-
mos klinikinio atvejo analizė“).

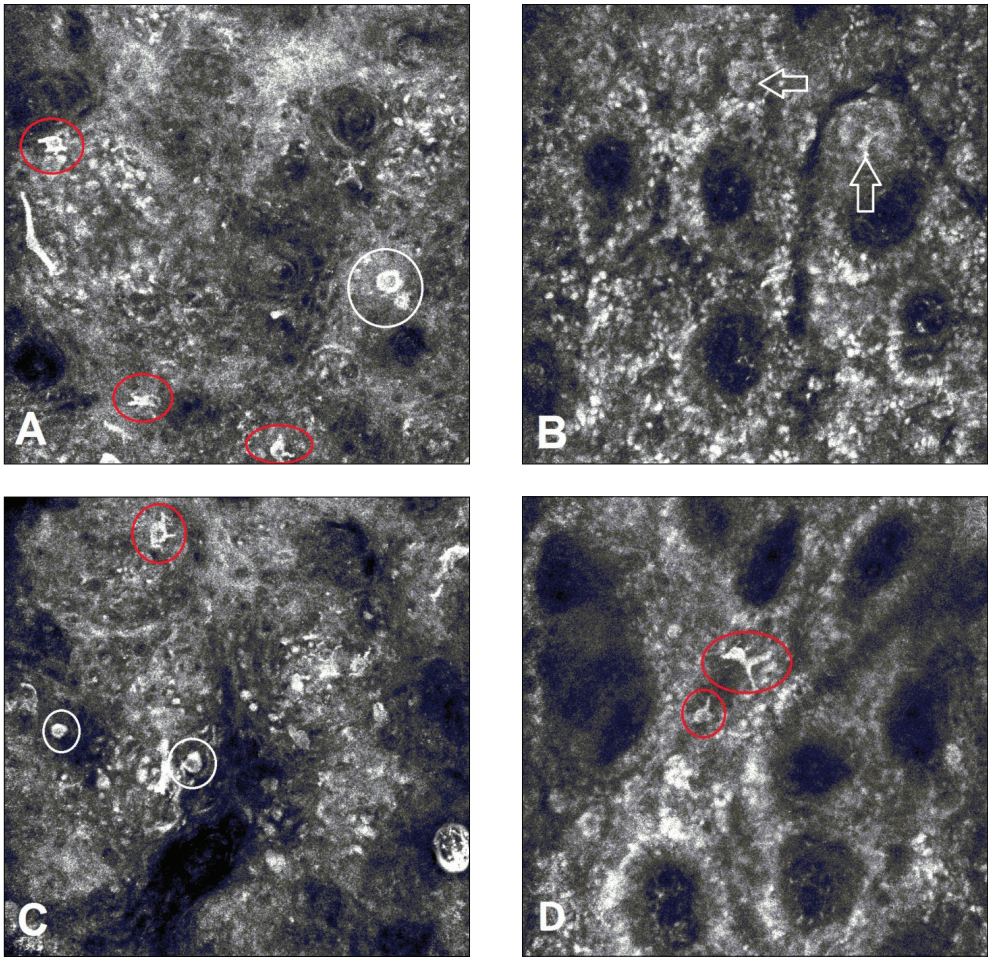


17 pav. Paviršiumi plintančios odos melanomos naviko (0,9 mm storis pagal *Breslow* klasifi-
kaciją) *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos vaizdas (A), kuriame navikas matomas
50 μm žemiau *stratum corneum* EDJ lygyje (0,5 mm x 0,5 mm, skalė = 50 μm); to paties na-
viko histologinio mikropreparato vaizdas (imunohistocheminis tyrimas naudojant HMB 45
žymenis, 20x) (B)

Pedžetoidinės ląstelės

Tiriant odą *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos būdu matomos šviesios
šakotos arba apvalios, hipokonstrastinius branduolius turinčios ląstelės, vertinamos
kaip atipiniai melanocitai (18, 19 pav.). *In vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos
vaizduose nustatomas pedžetoidinių ląstelių požymis atitinka histologinį atipinių me-
lanocitų / nevocitų įvertinimą 57 iš 63 tirtų melanocitinių odos navikų (90,48 proc.;
95 proc. PI 80,40–95,90).

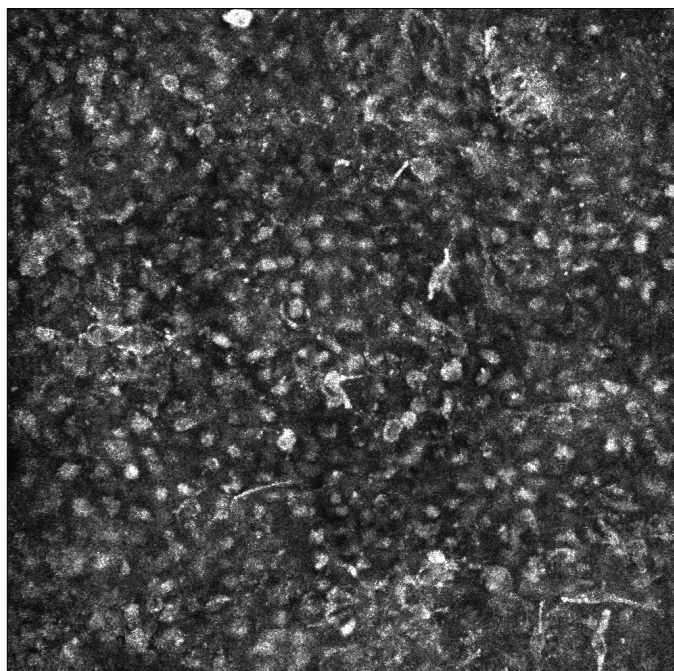
Iš 18 paveiksle pateiktų vaizdų matyti, kad atipinės šviesios šakotos arba apvalios
ląstelės (apvestos apskritimais) yra aiškiai matomos paviršiniuose odos sluoksniuose
(A–D). Šios ląstelės atitinka atipinio melanocito paviršiniuose epidermio sluoksniuose
(arba pedžetoidinės ląstelės) apibūdinimą.



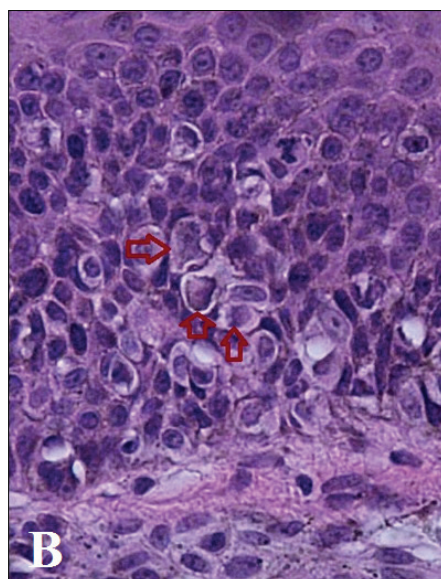
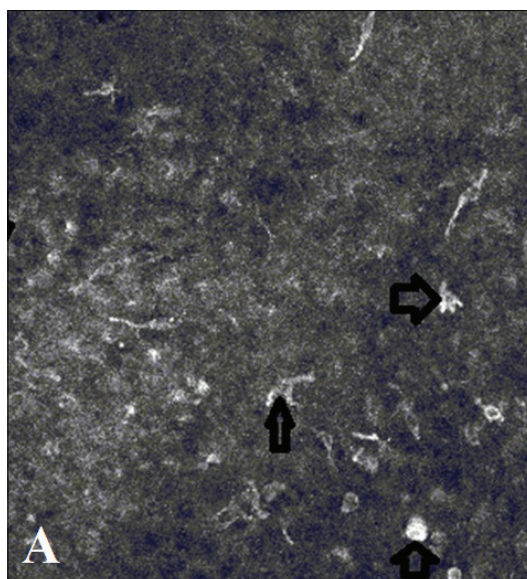
18 pav. Odos melanomos *in vivo* konfokališkos atspindžio mikroskopijos vaizdai (0,5 mm x 0,5 mm) matomi grūdėtajame epidermio sluoksnyje (A) bei įvairiuose gyliuose paviršinės EDJ lygyje (B–D)

Iš 19 paveiksle pateikto displazinio apgamo *in vivo* konfokališkos atspindžio mikroskopijos vaizdo matyti, kad atipinės ryškiai kontrastuojančios apvalios arba šakotos ląstelės išsiskiria tarp pigmento turinčių monomorfiškų epidermio keratinocitų. Pedžetoidinių ląstelių palyginimas odos melanomos *in vivo* konfokališkos atspindžio mikroskopijos vaizde ir to paties preparato histologiniame vaizde pateikiamas 20 paveiksle.

Iš 20 paveiksle pateiktų vaizdų matyti, kad rodyklėmis pažymėti atipiniai melanocitai, esantys viduriniuose epidermio sluoksniuose (vadinamosios pedžetoidinės ląstelės), yra matomi tiek atliekant *in vivo* konfokalią atspindžio mikroskopiją, tiek ir tiriant odos melanomos naviką histologiškai.



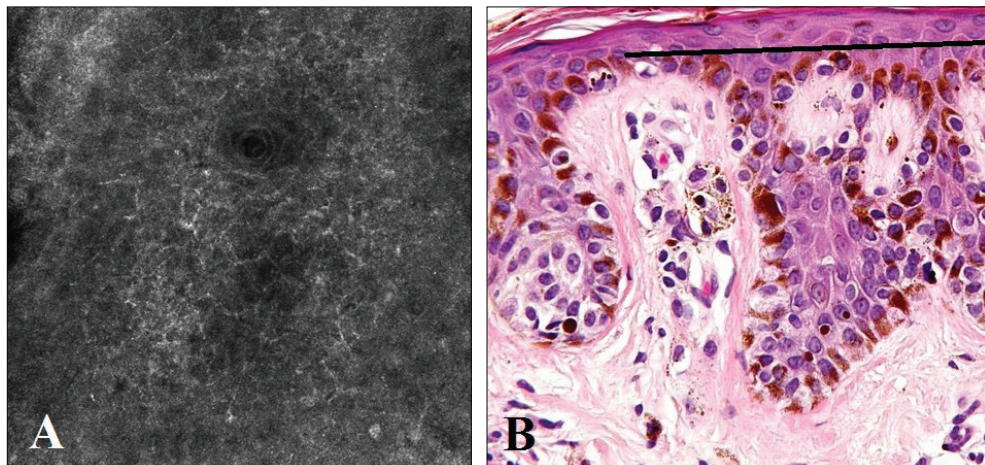
19 pav. Displazinio apgamo, esant ryškiai citologinei atipijai, *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos vaizdas, kuriame matomas navikas viduriniuose epidermio sluoksniuose (0,5 mm x 0,5 mm)



20 pav. Odos melanomos *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos vaizdas (A), kuriame navikas yra viduriniuose epidermio sluoksniuose (0,5 mm x 0,5 mm), bei to paties naviko histologinio mikropreparato vaizdas (B)

Epidermio netaisyklingumas

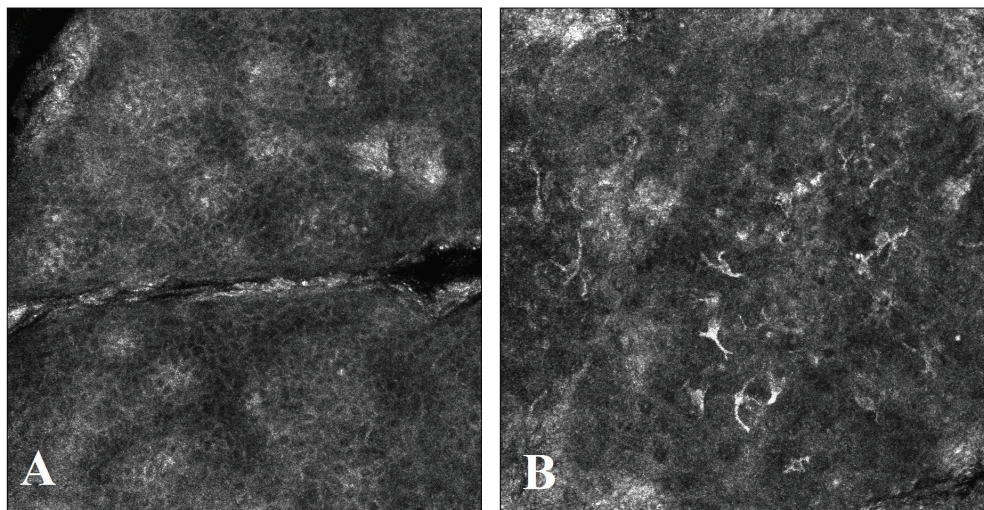
Atliekant *in vivo* konfokalią atspindžio mikroskopiją grūdėtajame epidermio sluoksnyje, t. y. 10–20 μm žemiau *stratum corneum*, matomas būdingas medaus korio vaizdas (21 pav.). *In vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos tyrimu nustatytas epidermio netaisyklingumo požymis atitinka histologinį atipinių melanocitų / nevocitų įvertinimą. Atitikimas buvo būdingas 41 iš 41 tirtų odos navikų (100 proc.; 95 proc. PI 89,79–100,00).



21 pav. Displazinio apgamo *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos vaizdas (A), kuriame matomas navikas 30 μm žemiau *stratum corneum* epidermio viduriniuose sluoksniuose (0,5 mm x 0,5 mm); to paties naviko histopatologinis mikropreparato vaizdas (H+E dažymas, 20x) (B)

Kaip matoma iš 21 paveiksle pateikto vaizdo, gauto atliekant displazinio apgamo *in vivo* konfokalią atspindžio mikroskopiją, viduriniuose epidermio sluoksniuose, t. y. grūdėtajame sluoksnyje, išryškėja medaus korio vaizdas, būdingas epidermiui esant taisyklingam nepakitusių keratinocitų išsidėstymui. Grūdėtasis sluoksnis (*stratum granulosum*) yra sudarytas iš suplokštėjusių keratinocitų (skersmuo – 25–35 μm), turinčių stambius ovalius branduolius. Ląstelių branduoliai yra tamsūs centriniai ląstelių dariniai. Citoplazminis kraštelis yra šviesesnis, grūdėtas dėl keratohialino grūnelių. Dėl taisyklingo keratinocitų išsidėstymo grūdėtajame epidermio sluoksnyje matomas vaizdas primena medaus korį.

Atliekant odos melanomos *in vivo* konfokalią atspindžio mikroskopiją grūdėtojo epidermio sluoksnio gylyje nematyti būdingo medaus korio vaizdo (vad. epidermio netaisyklingumas (22 pav., B).



22 pav. Sveikos odos (A) ir odos melanomos (B) *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos vaizdai, matomi grūdėtajame epidermio sluoksnyje (0,5 mm x 0,5 mm; gylis – 20–30 μm žemiau *stratum corneum*)

Iš 22 paveiksle pateiktų vaizdų matyti, kad, atliekant *in vivo* konfokalią atspindžio mikroskopiją, gautuose vaizduose sveikos odos taisyklingas epidermis skiriasi nuo odos melanomoje matomo netaisyklingo epidermio esant pedžetoidinei infiltracijai (atipiniai melanocitai – didelės šviesios šakotos ląstelės). Melanocitiniuose odos navikuose pasireiškiantis netaisyklingo epidermio požymis sutampa su tais pačiais požymiais, matomais histologiniuose naviko vaizduose.

4.2 *In vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimu nustatytų displazinių apgamų ir odos melanomos požymių diagnostinė reikšmė

Toliau pateikiamas *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos diagnostikos tikslumas pagal atskirus požymius, siekiant diferencijuoti įprastinius apgamus, displazinius apgamus ir odos melanomą. Konfokalių atspindžio mikroskopijos *in vivo* tikslumas, jautrumas, specifiskumas, teigiamos ir neigiamos prognozinės vertės pagal atskirus požymius displazinių apgamų ir odos melanomos diagnostikoje pateikti atitinkamai 3 ir 4 lentelėse.

3 lentelė. *In vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimo tikslumas, teigiama ir neigiama prognozinė vertė diagnozuojant displazinius apgamus (pagal pateiktus požymius analizuojant nepiktybinius melanocitų kilmės odos navikus – įpastinius apgamus ir displazinius apgamus, n=94)

Požymis	Tikslumas, proc. (95 proc. PI)	TPV	NPV
Tankių ląstelių lizdai	59,58 (49,46–68,94)	73,13	25,93
Nehomogeniški lizdai	39,36 (30,08–49,48)	80,00	28,38
Diskoheziniai arba pavienių ląstelių lizdai	29,79 (21,45–39,71)	80,00	26,97
Pedžetoidinės ląstelės	41,49 (32,05–51,60)	76,92	27,94
Epidermio netaisyklumas	32,98 (24,28–43,01)	100,00	22,12

PI – pasikliautinis intervalas; TPV – teigiama prognozinė vertė; NPV – neigiama prognozinė vertė.

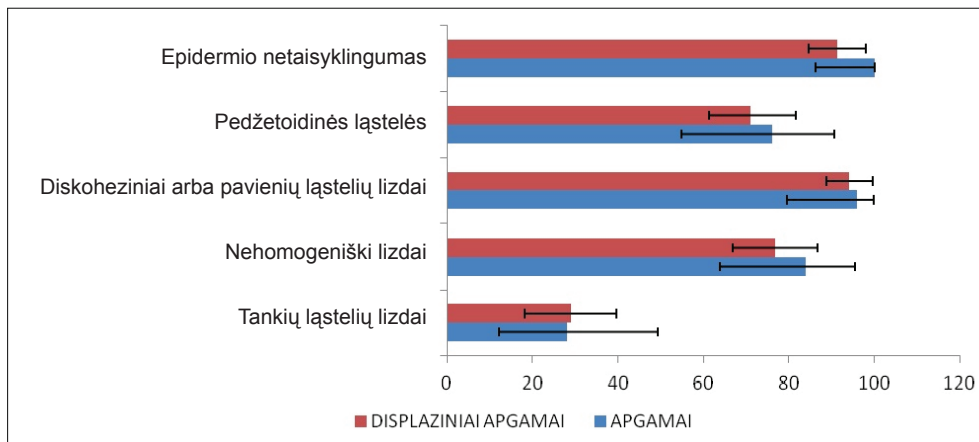
4 lentelė. *In vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimo tikslumas, teigiama ir neigiama prognozinė vertė diagnozuojant odos melanomą (pagal pateiktus požymius analizuojant visus tirtuosius melanocitų kilmės odos navikus, n=138)

Požymis	Tikslumas, proc. (95 proc. PI)	TPV	NPV
Tankių ląstelių lizdai	21,01 (15,00–28,59)	2,9	39,13
Nehomogeniški lizdai	81,88 (74,57–87,47)	66,10	93,67
Diskoheziniai arba pavienių ląstelių lizdai	82,61 (75,37–88,09)	83,33	82,41
Pedžetoidinės ląstelės	76,09 (68,29–82,47)	58,73	90,67
Epidermio netaisyklumas	89,13 (82,74–93,43)	85,37	90,72

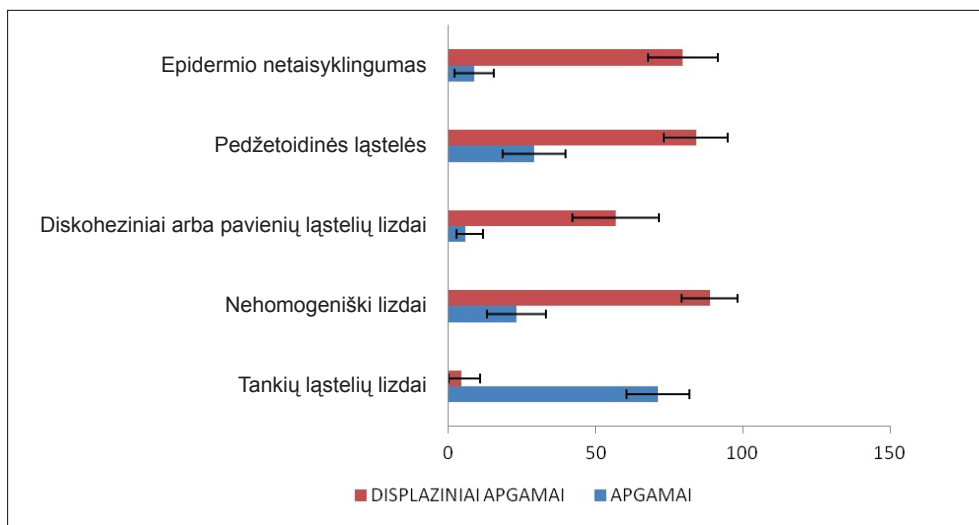
PI – pasikliautinis intervalas; TPV – teigiama prognozinė vertė; NPV – neigiama prognozinė vertė.

Iš šiose lentelėse pateiktų duomenų matyti, kad *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimo tikslumas diagnozuojant odos melanomą yra didesnis nei nustatant melanocitų kilmės displazinius apgamus. Tankių ląstelių lizdai yra tiksliausias *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos displazinių apgamų požymis.

In vivo konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimo specifiškumas yra pateiktas 23 paveiksle, o *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimo jautrumas diagnozuojant displazinius apgamus ir odos melanomą – 24 paveiksle.



23 pav. *In vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimo specifiškumas (proc.)



24 pav. *In vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimo jautrumas (proc.) melanocitų kilmės displazinių apgamų ir odos melanomos diagnostikoje

Iš 23, 24 paveiksluose pateiktų duomenų matyti, kad *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos specifiškumas yra pakankamai didelis tiek melanocitų kilmės įprastinių apgamų, tiek displazinių apgamų diagnostikoje pagal visus požymius, išimtis yra tik tankių ląstelių lizdų atveju. Taigi tankių ląstelių lizdai yra mažai specifiskas *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos displazinių apgamų požymis.

Atlikus *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos duomenų logistinės regresijos analizę nė vienas iš tirtų požymių nebuvo statistiškai reikšmingas diagnozuojant displazinius apgamus. Tačiau tiek visi kartu, tiek kiekvienas atskirai jie yra statistiškai reikšmingi diagnozuojant odos melanomą. Statistinės analizės rezultatai, t. y. *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos požymių galimybių santykis ir *p* reikšmės diagnozuojant odos melanomą, pateikiami 5 lentelėje.

5 lentelė. *In vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos būdu nustatomų požymių panaudojimas diagnozuojant odos melanomą

Požymis	GS (95 proc. PI)	<i>p</i> reikšmė
Epidermio netaisyklingumas	57,037 (18,896–172,165)	<0,0001
Nehomogeniški lizdai	28,857 (10,059–82,787)	<0,0001
Tankių ląstelių lizdai	0,019 (0,004–0,085)	<0,0001
Netaisyklingi diskoheziniai arba pavienių ląstelių lizdai	23,421 (7,95–68,995)	<0,0001
Pedžetoidinės ląstelės	13,824 (5,478–34,886)	<0,0001

GS – galimybių santykis; PI – pasikliautinasis intervalas.

Iš šios lentelės duomenų matyti, kad epidermio netaisyklingumas yra statistiškai reikšmingiausias *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimu nustatomas odos melanomos požymis. Toliau pateikiama *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos melanocitų kilmės displazinių apgamų ir odos melanomos požymių analizė.

Tankių ląstelių lizdai

In vivo konfokalių atspindžio mikroskopijos tikslumas displazinio apgamo diagnostikoje pagal tankių ląstelių lizdų požymį yra 59,58 proc., jautrumas – 71,02 proc., specifiškumas – 28,00 proc., TPV – 73,13 proc., NPV – 25,93 proc. Nors šis požymis yra diagnozuojant melanocitų kilmės displazinius apgamus *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos būdu yra tiksliausias iš visų tirtųjų, dėl mažo specifiškumo

jis yra nepakankamai informatyvus siekiant diferencijuoti melanocitų kilmės displazinius apgamus nuo įprastinių apgamų.

In vivo konfokaliuos atspindžio mikroskopijos tyrimu nustatomo tankių ląstelių lizdų požymio tikslumas odos melanomos diagnostikoje yra 21,01 proc., jautrumas yra 4,55 proc., specifiškumas – 28,72 proc., TPV – 2,90 proc., NPV – 39,13 proc. Tankių ląstelių lizdų požymio galimybių santykis (GS) yra 0,019, *p* reikšmė <0,0001. Iš pateiktų duomenų matyti, kad *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos tyrimuose tankių ląstelių lizdai yra statistiškai reikšmingas (*p* <0,0001) požymis, būdingas melanocitų kilmės įprastiniams ir displaziniams apgamams.

Taigi, tankių ląstelių lizdai yra informatyvus melanocitinių odos navikų *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos tyrimo nepiktybiniais apgamams būdingas požymis ir mažai informatyvus diagnozuojant displazinius apgamus.

Nehomogeniški lizdai

In vivo konfokaliuos atspindžio mikroskopijos tikslumas diagnozuojant melanocitų kilmės displazinį apgamą pagal nehomogeniškus lizdų požymį yra 39,36 proc., jautrumas – 23,19 proc., specifiškumas – 84,00 proc., TPV – 80,00 proc., NPV – 28,38 proc. Taigi šis požymis yra mažai informatyvus diferencinėje melanocitų kilmės displazinio apgamo ir įprastinio apgamo diagnostikoje.

In vivo konfokaliuos atspindžio mikroskopijos tikslumas diagnozuojant odos melanomą pagal nehomogeniškus lizdų požymį yra 81,88 proc., jautrumas – 88,64 proc., specifiškumas – 78,72 proc., TPV – 66,10 proc., NPV – 93,67 proc. Nehomogeniškus lizdų požymio GS yra 28,857, *p* reikšmė <0,0001. Remiantis pateiktais rodikliais galima teigti, kad *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos būdu nustatomi nehomogeniški lizdai požymis yra statistiškai reikšmingas odos melanomos požymis.

Taigi, nehomogeniški lizdai yra svarbus *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos odos melanomos požymis ir mažai informatyvus diagnozuojant displazinius apgamus.

Netaisyklingi diskoheziniai arba pavienių ląstelių lizdai

In vivo konfokaliuos atspindžio mikroskopijos tikslumas displazinio apgamo diagnostikoje pagal netaisyklingų diskohezinių arba pavienių ląstelių lizdų požymį yra 29,79 proc., jautrumas – 5,80 proc., specifiškumas – 96,00 proc., TPV – 80,00 proc., NPV – 26,97 proc. Taigi šis požymis yra mažai informatyvus siekiant diferencijuoti displazinius apgamus nuo įprastinių apgamų.

Netaisyklingų diskohezinių arba pavienių ląstelių lizdų požymio tikslumas diferencinėje odos melanomos ir displazinio apgamo diagnostikoje yra 82,61 proc., jautrumas – 56,82 proc., TPV – 83,33 proc., NPV – 82,41 proc. Netaisyklingų diskohezinių arba pavienių ląstelių lizdų požymio GS yra 23,421, p reikšmė $<0,0001$. Iš pateiktų duomenų matyti, kad netaisyklingi diskoheziniai arba pavienių ląstelių lizdai yra statistiškai reikšmingas *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos būdu nustatomas odos melanomos požymis.

Taigi, netaisyklingi diskoheziniai arba pavienių ląstelių lizdai yra specifiskas melanomai *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos požymis ir mažai informatyvus diagnozuojant displazinius apgamus.

Pedžetoidinės ląstelės

In vivo konfokalių atspindžio mikroskopijos tikslumas displazinio apgamo diagnostikoje pagal pedžetoidinių ląstelių požymį yra 41,49 proc., jautrumas – 28,99 proc., specifiškumas – 76,00 proc., TPV – 76,92 proc., NPV – 27,94 proc. Taigi šis požymis yra mažai informatyvus siekiant diferencijuoti displazinius apgamus nuo įprastinių apgamų.

Pedžetoidinių ląstelių požymio tikslumas diferencinėje odos melanomos ir displazinio apgamo diagnostikoje yra 76,09 proc., jautrumas – 84,09 proc., specifiškumas – 72,34 proc., TPV – 58,73 proc., NPV – 90,67 proc. Pedžetoidinių ląstelių požymio GS yra 13,824, p reikšmė $<0,0001$. Iš pateiktų duomenų matyti, kad pedžetoidinės ląstelės yra patikimas *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos odos melanomos požymis nustatomas atliekant *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimą.

Taigi, pedžetoidinės ląstelės yra svarbus *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos odos melanomos požymis ir mažai informatyvus diagnozuojant displazinius apgamus.

Epidermio netaisyklingumas

In vivo konfokalių atspindžio mikroskopijos tikslumas displazinio apgamo diagnostikoje pagal epidermio netaisyklingumo požymį yra 32,98 proc., jautrumas – 8,70 proc., specifiškumas – 100,00 proc., TPV – 100,00 proc., NPV – 22,12 proc. Taigi dėl mažo jautrumo šis požymis yra mažai informatyvus siekiant diferencijuoti displazinius apgamus nuo įprastinių apgamų.

In vivo konfokalių atspindžio mikroskopijos tikslumas odos melanomos diagnostikoje pagal epidermio netaisyklingumo požymį yra 89,13 proc., jautrumas – 79,55 proc.,

specifiškumas – 93,62 proc., TPV – 85,37 proc., NPV – 90,72 proc. Epidermio netaisyklingumo požymio GS yra 57,037, p reikšmė $<0,0001$. Iš pateiktų duomenų matyti, kad epidermio netaisyklingumas yra statistiškai reikšmingas *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimu nustatomas odos melanomos požymis.

Taigi, epidermio netaisyklingumas yra svarbus *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos odos melanomos požymis, tiksliausias iš visų tirtųjų požymių, tačiau mažai informatyvus diagnozuojant displazinius apgamus.

Siekiant detaliau įvertinti *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimo tikslumą odos melanomos diagnostikoje atlikta prognozinės reikšmės pagal atskirus *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos (tyrimu nustatomų požymių derinius analizė.

4.3 Odos melanomos diagnostika pagal atskirus *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimu nustatomų požymių derinius

Melanomos diagnostikos pagal du *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimu nustatomų požymių derinius tikslumo rodikliai pateikiami 6 lentelėje. Modeliai lentelėje išdėstyti pagal chi kvadrato (χ^2) kriterijų. Netaisyklingas epidermis, kaip tiksliausias odos melanomai būdingas požymis, analizuojamas deriniuose su kitais *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimu nustatomais tirtaisiais požymiais.

6 lentelė. Melanomos diagnostikos tikslumas pagal atskirus *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimu nustatytus požymių derinius

Požymių deriniai	Plotas po kreive (AUC)	GS (95 proc. PI)	p reikšmė
Nehomogeniški lizdai ir epidermio netaisyklingumas	0,9125	8,761 (2,553–30,064)	0,0006
		22,534 (6,824–74,407)	$<0,0001$
Tankių ląstelių lizdai ir epidermio netaisyklingumas	0,9206	0,075 (0,015–0,376)	0,0017
		19,254 (5,84–63,48)	$<0,0001$
Netaisyklingi diskoheziniai arba pavienių ląstelių lizdai ir epidermio netaisyklingumas	0,8920	5,446 (1,351–22,118)	0,0172
		30,349 (9,41–97,876)	$<0,0001$
Pedžetoidinės ląstelės ir epidermio netaisyklingumas	0,8713	0,699 (0,190–2,567)	0,5893
		62,484 (19,364–201,619)	$<0,0001$

AUC – plotas po kreive (angl. *area under the curve*); GS – galimybių santykis; PI – pasikliautinis intervalas.

Remiantis 6 lentelėje pateiktais duomenimis, netaisyklingas epidermis kartu su nehomogeniškais ląstelių lizdais yra reikšmingiausias diagnostinių kriterijų derinys nustatant odos melanomą, o mažiausiai netaisyklingo epidermio požymis reikšmingas derinyje su pedžetoidinėmis ląstelėmis.

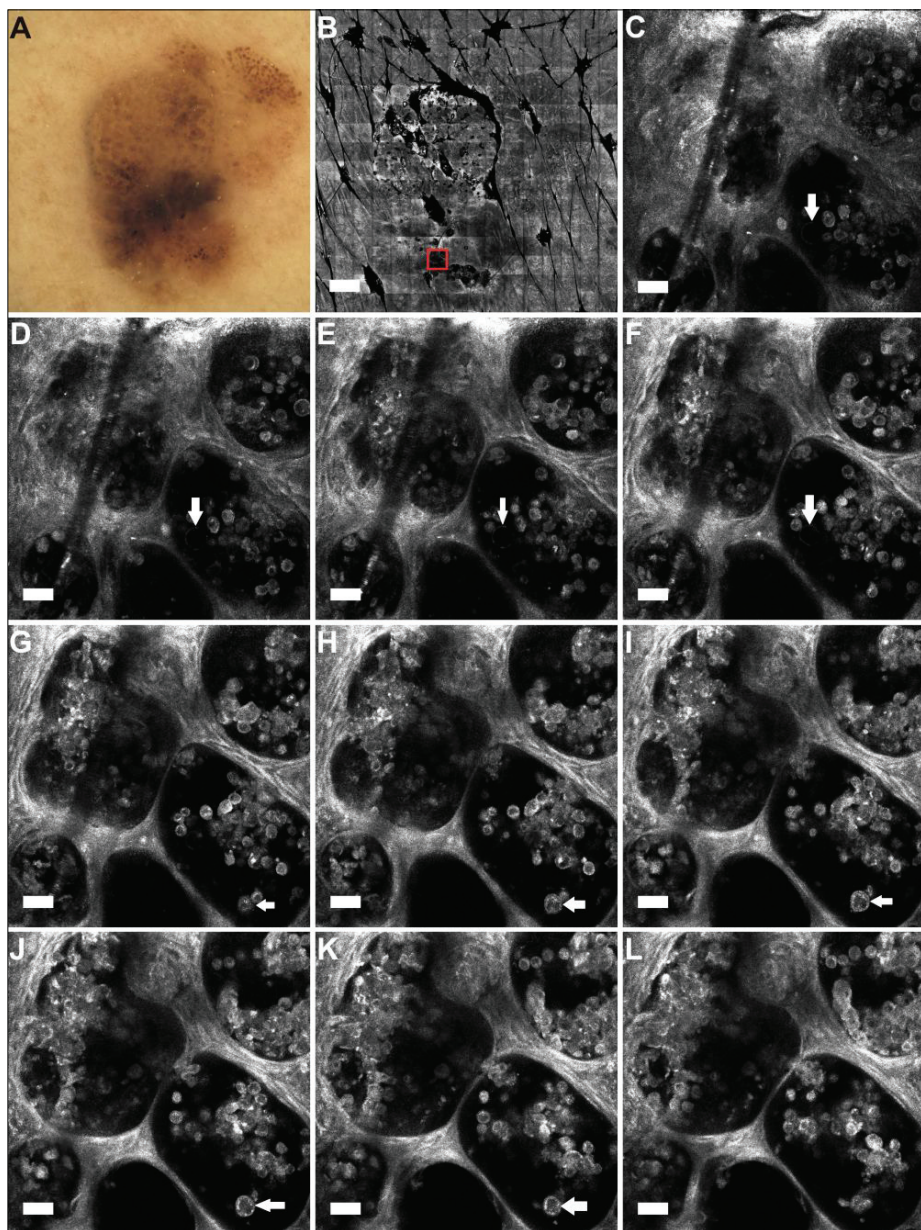
Statistiniai modeliai pagal tris ir keturis diagnostinius *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos tyrimu nustatomus požymių derinius turėjo nors vieną statistiškai nereikšmingą požymį, todėl neanalizuojami. Tiriant priklausomybes tarp *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos požymių, nustatyta statistiškai reikšminga koreliacija tarp visų keturių diagnostinių kriterijų ($p < 0,0001$).

Apibendrinant atliktą *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos tyrimu nustatomų požymių analizę galima teigti, kad melanocitinių odos navikų neinvazinės diagnostikos papildymas *in vivo* konfokalia atspindžio mikroskopija leidžia nustatyti požymius, kurių tikslumas diagnozuojant odos melanomą siekia 89 proc. Vertinant diagnostinę tyrimo vertę pagal plotą po kreive *in vivo* konfokali atspindžio mikroskopija yra informatyvi, kai nustatomi ne mažiau nei du tirtieji požymiai. Tačiau displazinių apgamų diagnostikai šis tyrimas pagal nagrinėtus požymius nėra reikšmingas.

Siekiant detalizuoti *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos požymius atlikta odos melanomos naviko, kuriame matomi visi tirtieji požymiai pasluoksninė analizė.

4.4 Darbinės hipotezės iškėlimas ir odos melanomos klinikinio atvejo analizė

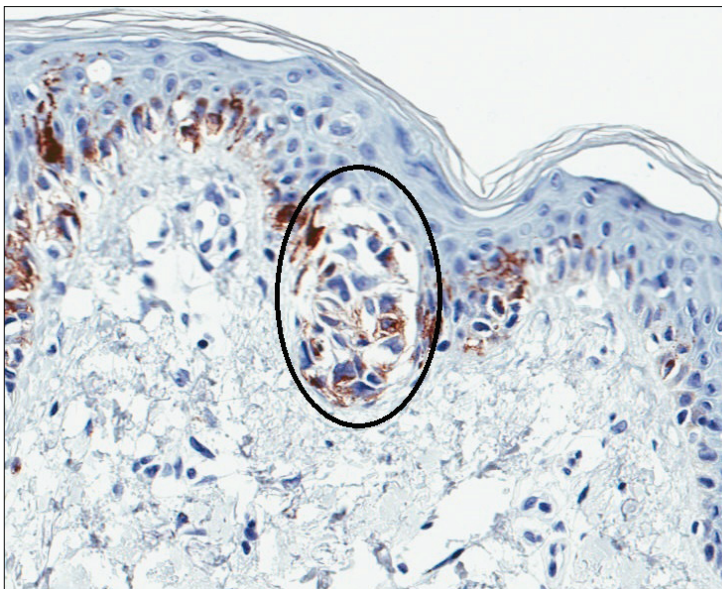
Nustačius, kad *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos tyrimu nustatomi melanocitų kilmės displazinių apgamų ir odos melanomos požymiai koreliuoja su histologiškai nustatomais pigmento turinčių melanocitų atipijos požymiais, o o epidermyje matomų diskohezinių arba pavienių ląstelių lizdų ir histologiniuose preparatuose matomų lizdų atitikimas nėra visai aiškus, buvo iškelta hipotezė, kad tiriant *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos metodu ne visi melanocitai pasižymi šviesą atspindinčiomis savybėmis. Analizuotas paviršiumi plintančios odos melanomos klinikinis atvejis, kai tiriant *in vivo* konfokalia atspindžio mikroskopija buvo matomi visi tirtieji melanocitų atipijos požymiai. Paviršiniuose odos sluoksnuose matomi pavienių ląstelių lizdai buvo analizuojami *VivaStack* 5 μm žingsniu gilyn *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos vaizduose. Atskirus lizdus sudarančių ląstelių analizė pateikiama 25 paveiksle.



25 pav. Odos melanomos dermoskopijos tyrimo vaizdas (A), konfokalinio atspindžio mikroskopijos *in vivo* vaizdų mozaika (8 mm x 8 mm naviko plotas), gauta epidermio ir dermos jungties lygyje 30 μm žemiau *stratum corneum* (B), ir B vaizde raudonu kvadratu pažymėtame plote konfokalinio atspindžio mikroskopijos *in vivo* būdu gauti vaizdai 5 μm žingsniu gilyn (C–L) iki 75 μm žemiau *stratum corneum* (L). Skalė = 50 μm . Histopatologijos diagnozė: paviršiumi plintanti melanoma pT1A (III invazijos lygis pagal *Clark* klasifikaciją, naviko storis – 0,9 mm pagal *Breslow* klasifikaciją)

25 paveiksle raudonu kvadratu pažymėtas mozaikos fragmentas yra išdidintas C vaizde ir analizuojamas konfokališios atspindžio mikroskopijos *in vivo* vaizduose 5 μm žingsniu gilyn C–L vaizduose. Matomas vaizdas atitinka pavienių ląstelių lizdų požymį. Remiantis bendru *in vivo* konfokališios atspindžio mikroskopijos susitarimu dėl terminų vartojimo [99], pavienių ląstelių lizdai apibrėžiami kaip apvalios šviesos neatspindinčios aiškių ribų struktūros, turinčios atskiras apvalias arba ovalias ląsteles tamsiais branduoliais ir šviesą atspindinčia citoplazma. Standartinė apibrėžta ląstelė, pažymėta horizontalia rodykle, vaizdinama penkiose viena po kitos gilyn kas 5 μm einančiose *in vivo* konfokališios atspindžio mikroskopijos (*VivaStack*) nuotraukose (G–K). Atipinė taikinį primenanti ląstelė (vertikali rodyklė) turi kontrastuojantį branduolį ir plazminę membraną, jos dydis 25–30 μm ir ji matoma penkiose konfokališios atspindžio mikroskopijos *in vivo* (*VivaStack*) nuotraukose (C–F).

Remiantis 25 paveiksle pateikto klinikinio melanomos atvejo analize buvo iškelta darbinė hipotezė, kad melanocitai, kai tiriama *in vivo* konfokališios atspindžio sistema, gali turėti šviesai pralaidžią citoplazmą ir kontrastuojantį branduolį. Nutarta atlikti to paties naviko histologinių pjūvių tyrimus konfokališios atspindžio mikroskopijos metodu. Palyginus histologinių pjūvių bei *in vivo* konfokališios atspindžio mikroskopijos vaizdus nustatyta, kad naviko periferijoje *in vivo* konfokališios atspindžio mikroskopijos būdu matomi pavienių ląstelių lizdai (25 pav.) atitinka intraepiderminius diskohezinius lizdus histologiniame preparate (26 pav.).



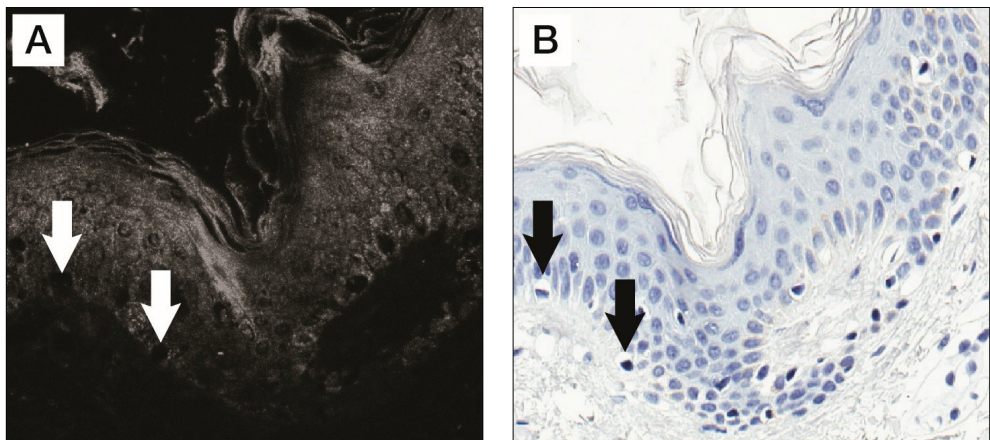
26 pav. Paviršiumi plintančios piktybinės odos melanomos histologijos mikropreparato vaizdas (imunohistocheminis tyrimas panaudojant HMB 45 žymenis, 20x)

Tiriant odą *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos būdu negalima pasakyti, kuri ląstelė yra keratinocitas, o kuri – melanocitas. Siekiant nustatyti melanocito atspindį tiriant konfokaliuos atspindžio mikroskopijos būdu, atlikti odos naviko histologinių pjūvių konfokaliuos atspindžio mikroskopijos tyrimai bei imunohistocheminiai tų pačių histologinių odos pjūvių tyrimai panaudojant melanocitams specifinius žymenis. Toliau pateikiami to paties odos melanomos naviko histologinių pjūvių konfokaliuos atspindžio mikroskopijos ir imunohistocheminių tyrimų rezultatai.

4.5 Histologinių pjūvių konfokali atspindžio mikroskopija (*ex vivo*)

Toliau pateikiamuose vaizduose galima palyginti, kaip tos pačios ląstelės matomos konfokaliuos atspindžio mikroskopijos tyrimo metu (A vaizdai 27–29 pav.) bei histologiniuose preparatuose (B vaizdai 27–29 pav.).

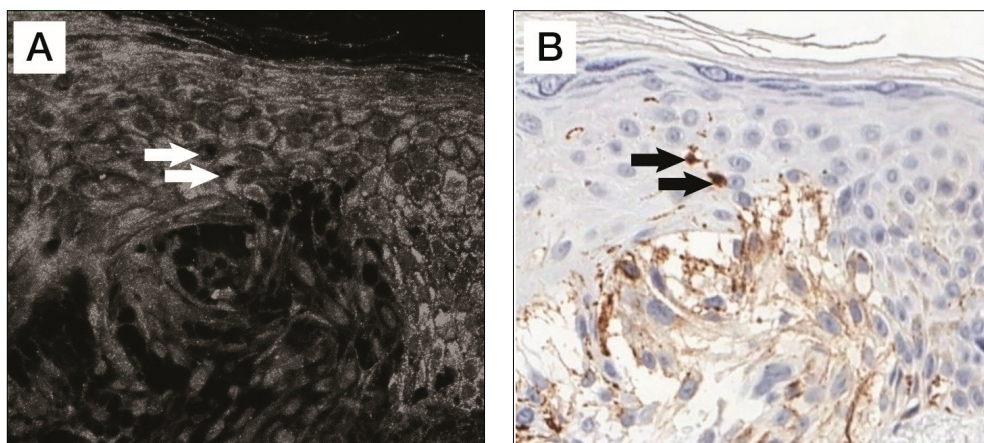
Atlikta sveikos odos (27 pav.), *Spitz* apgamo (28 pav.) ir odos melanomos (29 pav.) histologinių pjūvių (*ex vivo*) konfokali atspindžio mikroskopija bei imunohistocheminiai tyrimai. Imunohistocheminiams tyrimams panaudoti melanocitų žymenis Melan-A arba HMB 45. Histologiniuose vaizduose rodyklėmis pažymėti epidermio sluoksnio melanocitai. Jų citoplazmos ir branduolio atspindys konfokaliuos atspindžio mikroskopijos *ex vivo* vaizduose vertintas lyginant melanocitų ir aplinkinių ląstelių – keratinocitų atspindžius.



27 pav. Sveikos odos histologinis pjūvis (53 metų amžiaus pacientas; lokalizacija – vidinis riešo paviršius; odos fototipas I–II): (A) konfokaliuos atspindžio mikroskopijos *ex vivo* tyrimo metu daryta nuotrauka; (B) to paties pjūvio HMB 45 imunohistocheminio tyrimo vaizdas

Iš 27 paveiksle pateiktų vaizdų matyti, kad rodyklėmis pažymėtų pamatinio epidermio sluoksnio melanocitų citoplazma nekontrastuoja (t. y. tamsi), o silpnas kontrastas matomas jų branduoliuose.

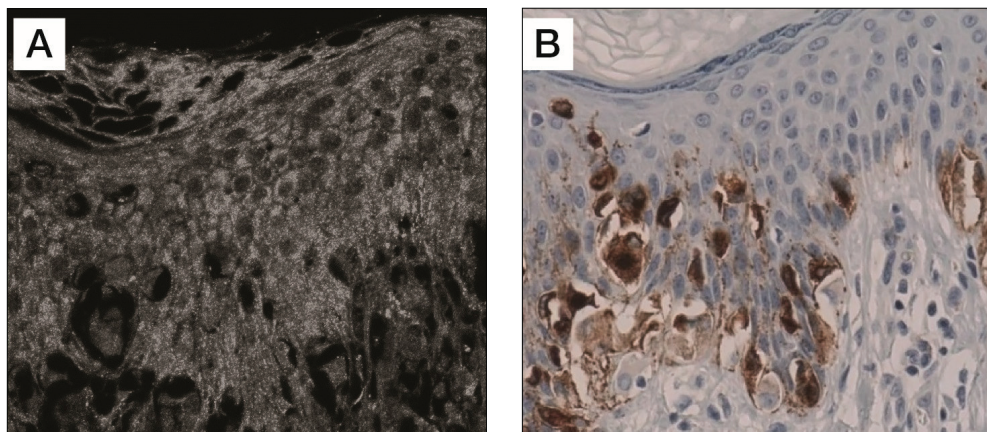
Iš 28 paveiksle pateiktų vaizdų matyti, kad apgamo ląstelės (nevocitai) turi kontrastuojančius branduolius, o citoplazmos kontrastas tiriant konfokaliu atspindžio mikroskopu yra neryškus, tiesiogiai koreliuoja su stipresne HMB 45 reakcija (B vaizde matomi HMB 45 teigiami nevocitai ir melanocitai, kurių citoplazma nusidažiusi ruda spalva). Rodyklėmis pažymėti epidermyje esantys pavieniai melanocitai yra hipokontrastiniai tiriant konfokaliu atspindžio mikroskopijos metodu, palyginti su aplink išsidėsčiusiais kontrastuojančių citoplazmą turinčiais keratinocitais.



28 pav. Spitz apgamas – 3 mm skersmens amelanozinė papulė turinti aiškius kraštus (56 metų amžiaus paciento apgamas vidiniame riešo paviršiuje; odos fototipas II): (A) konfokaliu atspindžio mikroskopijos *ex vivo* tyrimo metu daryta nuotrauka; (B) HMB 45 imunohistocheminio tyrimo vaizdas

Iš 29 paveiksle pateiktų vaizdų matyti, kad dauguma melanocitų (melanos ląstelių) yra hipokontrastiniai arba izokontrastiniai, palyginti su aplinkiniais keratinocitais.

Taigi konfokaliu atspindžio mikroskopijos *ex vivo* būdu vaizdinami tiek odos keratinocitai, tiek melanocitai, o kartu su imunohistocheminiais tyrimais galima vertinti odos melanocitų atspindį ir brandumą tiek sveikoje odoje, tiek melanocitiniuose odos navikuose.



29 pav. Melanoma *in situ* (53 metų amžiaus pacientė; pigmentinis šlaunies odos navikas; odos fototipas II): (A) konfokalių atspindžio mikroskopijos *ex vivo* tyrimo metu daryta nuotrauka; (B) Melan-A imunohistocheminio tyrimo vaizdas (melanocitai yra Melan-A teigiami, jų citoplazma rudos spalvos)

Remiantis atliktų tyrimų pradiniais rezultatais, kai epidermio sluoksnyje tarp keratinocitų išsidėstę melanocitai dažniau buvo hipokontrastiniai nei ryškiai kontrastuojantys, kontrastuojantis branduolys buvo matomas tiek sveikos odos melanocituose, tiek apgamo nevocituose, o melanomos ląstelės (atipiniai melanocitai) buvo tiek hipo-, tiek izo-, tiek hiperkontrastinės keratinocitų atžvilgiu, daroma išvada, kad melanocito citoplazmos atspindžio savybės skiriasi priklausomai nuo melanosomų brandumo stadijos. Nebrandžias melanosomas turintys melanocitai gali turėti hipokontrastinę, t. y. šviesai pralaidžią, citoplazmą ir kontrastuojantį branduolį tiriant konfokalių atspindžio mikroskopijos metodu.

5. REZULTATŲ APTARIMAS

Atliekant konfokalią atspindžio mikroskopiją, kaip minėta, *in vivo* esamuoju laiku ląstelinio lygiu yra matomi odos navikai. Šio tyrimo pritaikomumas diagnozuojant melanocitų kilmės odos navikus pirmą kartą aprašytas 2005 metais atliekant odos melanomos *in vivo* konfokalią atspindžio mikroskopijos tyrimus [87]. Tolesni melanocitų kilmės odos navikų tyrimai atlikti siekiant nustatyti odos melanomai būdingus požymius, padedančius odos melanomą atskirti nuo apgamų [87–90]. Remiantis 2007 metais pasakytu A. Scope *in vivo* konfokalią atspindžio mikroskopijos terminų apibendrinimu, melanocitų kilmės odos navikų ląstelių lizdai skirstomi į tris variantus: tankių ląstelių, pavienių ląstelių ir cerebriforminius [100]. Šių lizdų histologiniai atitikmenys aprašyti G. Pellacani ir bendraautorių publikacijoje [101; 108].

Duomenų apie displazinių apgamų tyrimus *in vivo* konfokalią atspindžio mikroskopijos metodu sukaupta nedaug: dažniausiai *in vivo* konfokalią atspindžio mikroskopijos tyrėjai publikacijose apibendrina odos melanomos ir ryškios displazijos apgamų charakteristikas (požymius) ir displazinių apgamų diagnozės neišskiria iš apgamų ir melanomos diagnozės [88; 90].

Melanocitiniuose odos navikuose tyrėme epidermio struktūros bei citologinės atipijos požymius, nustatomus *in vivo* konfokalią atspindžio mikroskopijos būdu, analizavome lizdų homogeniškumą, lizdus sudarančių ląstelių atspindžio savybes bei pavienes atipines ląsteles paviršiniuose epidermio sluoksniuose (pedžetoidinė infiltracija) *in vivo* konfokalią atspindžio mikroskopijos vaizduose. Skenuoti histologiniai navikų mikropreparatų vaizdai lyginti su *in vivo* konfokalią atspindžio mikroskopijos vaizdais, ieškota sąsajų tarp lizdus sudarančių melanocitų histopatologinės atipijos požymių, lizdų homogeniškumo bei ląstelių tankumo tiriant odą *in vivo* konfokalią atspindžio mikroskopijos būdu.

Apibendrinant tyrimo rezultatus reikia pasakyti, kad nė vienas iš tirtų melanocitų kilmės displazinių apgamų ir odos melanomos *in vivo* konfokalią atspindžio mikroskopijos tyrimu nustatytų požymių nėra nei tikslus, nei statistiškai reikšmingas diferencinei displazinių apgamų ir įprastinių apgamų diagnostikai. Tačiau tiek visi kartu, tiek kiekvienas atskirai tirtieji *in vivo* konfokalią atspindžio mikroskopijos būdu nustatomi požymiai yra reikšmingi diagnozuojant odos melanomą.

Toliau pateikiama apibendrinta *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimo analizė pagal atskirus požymius, lyginant gautus rezultatus su kitų tyrėjų duomenimis.

Tankių ląstelių lizdai. Analizuodami tirtų odos navikų *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos vaizdus nustatėme, kad dominuojantys tankių ląstelių lizdai yra matomi apgamuose nesant citologinės atipijos (28,00 proc.), displaziniuose apgamuose (28,98 proc.) ir melanomose (4,55 proc.). Tai sutampa su kitų tyrėjų duomenimis, kas rodo, kad tankių ląstelių lizdai yra vienas iš skiriamųjų apgamų (tarp jų ir displazinių) požymių, tačiau kartais jie matomi ir melanomose. Prof. G. Pellacani tankių ląstelių lizdus nustatė 47,9 proc. apgamų ir 36,0 proc. melanomų [89]. Mūsų tyrimo duomenimis, displazinių apgamų diagnostikoje tankių ląstelių lizdų požymis nėra informatyvus, nes taip pat dažnai nustatomas ir įprastiniuose apgamuose, ir displaziniuose apgamuose (atitinkamai 28,00 proc. ir 28,98 proc.).

Tankių ląstelių lizdų histologinė koreliacija aprašyta G. Pellacani publikacijoje: 15 apgamų, iš kurių 5 – dermaliniai apgamai su taisyklingomis pigmentinėmis šviesiai rudos spalvos globulėmis, matomomis tiriant dermoskopu, *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos vaizduose buvo sudaryti iš tankių ląstelių lizdų, kurie histologiniuose tyrimuose atitiko monomorfiškus nevocitus ir melanocitus, neturinčius citologinės atipijos ar brendimo sutrikimo požymių, t.y. stambesnius paviršiniuose ir smulkesnius gilesniuose odos sluoksniuose [108]. Mūsų tyrimo duomenimis, tankių ląstelių lizdus turintys melanocitų kilmės navikai 73,91 proc. atvejų turėjo ląstelių atipijos požymius. Nustatyti skirtumai gali būti paaiškinti skirtingais tiriamaisiais navikais: G. Pellacani tyrė dermalinius apgamus, jie sudarė 30 proc. visų navikų. Mūsų tyrime tirti atipiniai, bet ne dermaliniai melanocitų kilmės apgamai.

Gautais duomenimis, tankių ląstelių lizdai yra būdingas melanocitų kilmės apgamų *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrimu nustatomas požymis, svarbus siekiant atskirti nepiktybinius navikus nuo piktybinių ir turi teigiamą prognozinę vertę ($p < 0,0001$) odos melanomos diagnostikoje. Tai sutampa su daugumos konfokalių atspindžio mikroskopijos tyrėjų tyrimų išvadomis [90;97;108].

Nehomogeniški lizdai. 2012 metais G. Pellacani kartu su bendraautorais paskelbė publikaciją apie displazinių apgamų diagnostiką tiriant juos *in vivo* konfokalių atspindžio mikroskopijos būdu. Publikacijoje teigiama, kad displaziniai apgamai gali būti atskirti nuo apgamų, neturinčių citologinės atipijos, remiantis architektūros ir citologinės atipijos požymiais. Siekiant šiuos apgamus atpažinti sukurtas

supaprastintas displazinių apgamų diagnostikos algoritmas, kuriame citologinės atipijos požymiai kartu su matomais atipiniais lizdais siejami su displazinio apgamo diagnoze, o išplitusi pedžetoidinė infiltracija, citologinė atipija epidermio ir dermos jungties srityje bei neturintys aiškaus kontūro dermos speneliai – su melanomos diagnoze. Atipinių lizdų charakteristikoms priskirti netaisyklingi lizdai, trumpi susijungimai (angl. *short interconnections*) tarp dermos spenelių ir /arba nehomogeniški lizdai. Palyginti su G. Pellacani pateiktais duomenimis, mūsų tyrime nehomogeniški lizdai nėra būdingi displaziniams apgamams: nustatytas požymio jautrumas displaziniams apgamams diagnozuoti yra 23,19 proc., specifiškumas – 84,00 proc. Šie lizdai nustatomi visose trijose navikų grupėse – įprastiniuose apgamuose (16,00 proc.), displaziniuose apgamuose (23,19 proc.) ir odos melanomose (88,64 proc.). Kitų tyrėjų anksčiau aprašytų stebėjimų duomenimis, nehomogeniški lizdai matomi 44,1 proc. odos melanomų ir 20,00 proc. apgamų [89]. Remdamiesi savo tyrimo duomenimis, gautais analizuojant displazinių apgamų histologinius preparatus ir *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos vaizdus, darome išvadą, kad lizdų homogeniškumas koreliuoja su vienoda ląstelių (nevocitų) pigmentacija, o ne su citologine atipija. Melanoma tiksliausiai diagnozuota, kai buvo matomi nehomogeniški lizdai kartu su netaisyklingu epidermiu; nehomogeniškų lizdų požymis yra statistiškai reikšmingas gerybinių vs piktybinių melanocitinių odos navikų diferencinėje diagnostikoje. Tai sutampa su kitų tyrėjų duomenimis [90; 92; 97; 108].

Diskoheziniai bei pavienių ląstelių lizdai. Literatūros duomenimis, tai yra retas *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos tyrimu nustatomas požymis; pavienių ląstelių lizdai beveik išimtinai matomi tik melanomose bei *Spitz* apgamuose. G. Pellacani duomenimis, pavienių ląstelių lizdai nustatyti 17,6 proc. melanomų [89]. Mūsų tyrime pavienių ląstelių lizdai nustatyti 2,27 proc. melanomų. Analizuojant *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos vaizdus šie lizdai buvo skaičiuojami kartu su diskoheziniais lizdais, kuriems taip pat būdingos tamsios struktūros šviesą atspindinčių ląstelių fone. Pavienių ląstelių bei diskoheziniai lizdai, mūsų tyrimo duomenimis, yra retai nustatomi displaziniuose apgamuose (5,8 proc.) ir apgamuose, kuriuose nėra citologinės atipijos (4,0 proc.), taigi jie nėra informatyvūs displazinių apgamų diagnostikoje. Tyrimo duomenimis, pavienių ląstelių bei diskoheziniai lizdai yra svarbus melanomos požymis tiriant *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos būdu. Šis požymis yra nustatomas 56,82 proc. odos melanomų. Tai sutampa su kitų tyrėjų paskelbtais rezultatais [96; 98; 101].

Pedžetoidinės ląstelės, kaip vienas iš odos melanomos citologinės atipijos požymių, nustatomos tiek atliekant histologinius tyrimus, tiek *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopiją. Remiantis bendru sutarimu, pedžetoidinėmis ląstelėmis vadintos hiperrefleksinės (šviesios) atipinės ląstelės, matomos paviršiniuose odos epidermio sluoksniuose [100]. 2014 metų A. Losi ir bendraautorai publikacijoje teigiama, kad hiporefleksinės pedžetoidinės ląstelės yra amelanotinės melanomos požymis [107].

Sukurti keli odos melanomos diagnostikos taikant *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos būdą algoritmai [26; 90; 91]. Juose visuose naudojamas *in vivo* atliekamos konfokaliuos atspindžio mikroskopijos metodu nustatomų pedžetoidinių ląstelių požymis. Mūsų tyrimo duomenimis, šis požymis nėra reikšmingas displazinių apgamų diagnostikoje: pedžetoidinės ląstelės matomos įprastiniuose apgamuose (24,00 proc.), displaziniuose apgamuose (28,99 proc.), o dažniausiai – odos melanomose (84,09 proc.). Melanomos diagnostikoje pedžetoidinės ląstelės yra mažiausiai tikslus iš visų tirtų požymių. Mažą tikslumą galima paaiškinti Langerhanso ląstelių ir melanocitų panašumu, kuris aprašytas 2011 metais P. Hashemi [106]. Analizuodamas 24 atvejus apgamų, kurie buvo neteisingai diagnozuoti kaip melanomos dėl pedžetoidinių ląstelių, matomų paviršiniuose epidermio sluoksniuose tiriant juos *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos būdu, tyrėjas nustatė, kad pedžetoidinės ląstelės buvo ne melanocitai, bet Langerhanso ląstelės.

Epidermio netaisyklingumas. Mūsų tyrimo duomenimis, įprastiniuose apgamuose netaisyklingo epidermio matoma nebuvo. Displazinių apgamų diagnostikoje šis požymis nėra svarbus; jis nustatytas tik 8,70 proc. displazinių apgamų. Netaisyklingas epidermis matomas odos melanomose (79,55 proc.). Mūsų tyrimo duomenimis, tiriant *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos būdu, netaisyklingas epidermis yra tiksliausias odos melanomos požymis. Tai sutampa su kitų tyrėjų paskelbtais duomenimis [89; 96; 98]. Taisyklingas keratinocitų išsidėstymas viršutiniuose epidermio sluoksniuose yra būdingas nepiktybiniams melanocitų kilmės odos navikams, kuriuose tiriant *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos būdu matoma išlaikyta medaus koriui ir akmens grindiniui būdinga epidermio struktūra. Šis požymis turi teigiamą prognozinę reikšmę, o jos nebuvimas (t.y. netaisyklingas epidermis) yra svarbus odos melanomos požymis. G. Pellacani duomenimis, gautais analizuojant 136 piktybinių odos melanomų *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos vaizdus, netaisyklingas epidermis buvo matomas net 85 vaizduose ir tai sudarė 62,5 proc. [89].

Svarbi melanomos diagnostikos *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos būdu problema iškyla dėl panašių melanocitų ir nemelanocitų kilmės ląstelių atspindžio savybių. Pigmento turintys keratinocitai gali kauptis sudarydami pseudolizdus, matomus atliekant *in vivo* konfokalią atspindžio mikroskopiją, o dendritinės Langerhanso ląstelės gali būti neatskiriamos nuo melanocitų ir imituoti pedžetoidinę infiltraciją.

Analizuojant odos melanomos, esant pavienių ląstelių lizdams, klinikinį atvejį buvo iškelta darbinė hipotezė, kad atipinis melanocitas gali turėti šviesai pralaidžią citoplazmą ir kontrastuojantį branduolį tiriant *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos metodu. Todėl buvo atlikti navikų histologinių pjūvių tyrimai taikant *ex vivo* konfokalią atspindžio mikroskopiją. Nustatyta, kad sveikoje odoje melanocitas gali turėti šviesai pralaidžią citoplazmą ir kontrastuojantį branduolį. Tirtuose odos navikuose hiperkontrastiniai melanocitai sudarė tik mažesnę dalį visų atipinių melanocitų (melanomos ląstelių).

Įvertinus eksperimentinius *ex vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos rezultatus – kad melanocitai gali turėti šviesai pralaidžią citoplazmą, o jų šviesos atspindys nesiskirti nuo keratinocitų šviesos atspindžio, – kyla abejonų dėl melanocitų kilmės odos navikų diagnostikos tikslumo tiriant *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos metodu, jei ši diagnostika grindžiama kontrastuojančio atipinio melanocito aptikimu. Manytume, kad dėl melanomos navikams būdingo atipinių melanocitų heterogeniškumo (pleomorfizmo) hiperkontrastiniai atipiniai melanocitai dažnai yra matomi odos melanomose ir odos melanomos diagnostika *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos metodu yra tiksli, tačiau vertinant displazinius apgamus, kuriems nebūdingas tokio didelio laipsnio naviko heterogeniškumas ir atipinių melanocitų pleomorfizmas, nepakanka diagnostikos, paremtos hiperkontrastinio melanocito požymiais.

Remiantis *ex vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos duomenimis, tik hiperkontrastinių melanocitų radimu grindžiama diagnostika gali būti netiksli ir nulemti diagnostikos klaidas netgi melanomų atvejais, kai atipiniai melanocitai nėra hiperkontrastiški (neturi pigmento). Reikalingi detalesni melanocitų atspindžio *ex vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos ir imunohistocheminiai tyrimai siekiant tiksliau interpretuoti *in vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos vaizdus.

Imunohistocheminiai tyrimai naudojant melanocitų žymenis (Melan-A ir HMB 45) suteikia papildomos informacijos diagnozuojant nepiktybinius ir piktybinius

melanocitų kilmės navikus. Melanocitai sintetina premelanosomas (0 stadijos melanosomas), kurios esant normaliam brendimui išsivysto į IV stadijos melanosomas. III–IV stadijos melanosomos turi pigmento melanino ir yra tankios žiūrint elektroniniu mikroskopu. Jos suteikia odai tamsią spalvą.

Monokloniniai antikūnai HMB 45 atpažįsta I ir II stadijos vadinamąsias nebrandžias melanosomas. Vaisiaus ir suaktyvinti suaugusiojo epidermio ir dermos jungties melanocitai yra HMB 45 teigiami, o kai jie neaktyvūs (poilsio fazės) melanocitai sveikoje odoje yra HMB 45 neigiami.

Melan-A monokloniniai antikūnai atpažįsta Melan-A baltymą, kuris randamas sveikos odos melanocituose, apgamuose nevocituose, melanocituose ir melanomos ląstelėse. Remiantis dviejų didelės imties tyrimų duomenimis, Melan-A yra visose pirminėse melanomose ir 81–88 proc. metastazinėse melanomose, o desmoplazinės melanomos dažniausiai yra Melan-A neigiamos [109].

Apibendrinant melanocitų žymenis bei jų reaktyvumą, sveikoje odoje pamatinio sluoksnio melanocitai yra HMB 45 neigiami, Melan-A teigiami; suaktyvinti melanocitai – HMB 45 teigiami, Melan-A teigiami. Keletas tyrimų parodė, kad 90–100 proc. pirminių odos melanomų yra HMB 45 teigiamos. Pigmento melanino neturinčios (amelanozinės) melanomos gali būti HMB 45 teigiamos arba neigiamos [110]. HMB 45 laikomas specifiniu melanocitų diferenciacijos žymeniu, tačiau jis nepadedą atskirti piktybinių navikų nuo gerybinių.

Melanosomų brandumo nulemtas skirtingas sveikos odos ir atipinių melanocitų imunoreaktyvumas gali paaiškinti matomus melanocitų atspindžio skirtumus atliekant *ex vivo* konfokalią odos mikroskopiją. Nesuaktyvinti suaugusio žmogaus melanocitai citoplazmoje turi tik premelanosomas (nes yra HMB 45 neigiami), kurių amorfiška sudėtis neatspindi lazerio šviesos, todėl tokių melanocitų citoplazmos kontrastas mažesnis nei branduolio. HMB 45 teigiami amelanoziniai melanocitai citoplazmoje turi ne tik I, bet ir II stadijos melanosomas, kurios atspindi lazerio šviesą, tačiau jų citoplazmos kontrastas mažesnis nei keratino nulemtas keratinocitų citoplazmos kontrastas. Tokių ląstelių (HMB 45 teigiamų amelanozinių melanocitų) nenustatysime, jeigu ieškosime tik hiperkontrastinių pedžetoidinių ląstelių. Ir tik melanino turinčių ląstelių (III–IV stadijos melanosomas turintys melanocitai) citoplazma yra hiperkontrastinė, o branduolys – hipokontrastinis.

Hipokontrastinės pedžetoidinės ląstelės yra aprašytos 2014 metais A. Losi su bendraautorais; jos yra matomos amelanozinėse melanomose [107]. Tai sutampa

su mūsų iškelta hipoteze, todėl tikslinga tęsti melanocitų atspindžio *ex vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos ir imunohistocheminius tyrimus siekiant patikslinti melanocitinių odos navikų citologinės atipijos požymius. Detali atipinių melanocitų atspindžio analizė tiriant *ex vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos metodu gali padėti nustatyti displazinio apgamo požymius.

6. IŠVADOS

1. *In vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos tyrimu nustatomi melanocitų kilmės displazinių apgamų ir odos melanomos požymiai – epidermio netaisyklingumas, pedžetoidinės ląstelės, diskoheziniai arba pavienių ląstelių lizdai, nehomogeniški lizdai, tankių ląstelių lizdai – 73,91–100,00 proc. atitinka ląstelių atipijos požymius, nustatomus histologiniais tyrimais.
2. *In vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos tyrimo jautrumas diagnozuojant melanocitų displazinius apgamus yra 71,02 proc., specifiškumas – 28,00 proc. Tiksliausias melanocitų kilmės displazinių apgamų požymis, nustatomas atliekant *in vivo* konfokalią atspindžio mikroskopiją, yra tankių ląstelių lizdai.
3. *In vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos tyrimo jautrumas diagnozuojant odos melanomą yra 79,55 proc., specifiškumas – 93,62 proc. Tiksliausias odos melanomos požymis, nustatomas atliekant *in vivo* konfokalią atspindžio mikroskopiją, yra epidermio netaisyklingumas.
4. *In vivo* konfokaliuos atspindžio mikroskopijos tyrimas yra reikšmingas odos melanomos diagnostikoje, tačiau šis tyrimas yra nepakankamai tikslus melanocitų kilmės displazinių apgamų diagnostikoje ir nepadedą atskirti melanocitų kilmės displazinių apgamų nuo įprastinių apgamų.

7. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

Remdamiesi atlikto darbo rezultatais, jų interpretavimu ir palyginimu su kitų autorių duomenimis, suformulavome šias praktines rekomendacijas:

1. *In vivo* konfokali atspindžio mikroskopija padeda išvengti nebūtinų atlikti biopsijų, kai tyrimo metu nenustatoma melanocitų kilmės displaziniam apgamui ar odos melanomai būdingų požymių.
2. *In vivo* konfokali atspindžio mikroskopijos tyrimo metu nustatytą odos melanomos požymių turintį odos naviką galima pašalinti kartu su plačiais, t. y. 5 mm sveikos odos kraštais. Taip išvengiama pirminės diagnostinės naviko ekscizijos esant ryškiai apgamo displazijai bei melanomos *in situ* atvejais.
3. Nors *in vivo* konfokali atspindžio mikroskopija yra daug žadantis tyrimo metodas, tačiau dėl mažo specifiškumo melanocitų kilmės displazinių apgamų diagnostikoje šis tyrimas nepakeičia naviko biopsijos, histologinių ir imuno-histocheminių tyrimų būtinybės.
4. Siekiant nustatyti tikslesnius *in vivo* konfokali atspindžio mikroskopijos displazinių apgamų požymius, tikslinga derinti displazinių apgamų *in vivo* konfokali atspindžio mikroskopijos tyrimus su displazinių apgamų histologinių pjūvių konfokali atspindžio mikroskopijos tyrimais kartu atliekant imuno-histocheminius melanocitų žymenų tyrimus.

8. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Stang A, Valiukeviciene S, Aleknaviciene B, Kurtinaitis J. Time trends of incidence, mortality, and relative survival of invasive skin melanoma in Lithuania. *Eur J Cancer*. 2006;42(5):660–667.
2. De Angelis R, Sant M, Coleman MP, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D, et al. Cancer survival in Europe 1999–2007 by country and age: results of EUROCARE–5-a population-based study. *Lancet Oncol*. 2014;15:23–34.
3. Smailytė G, Ulinskas K, Aleknavičienė B. Susirgusiųjų onkologinėmis ligomis 1994–2005 metais išgyvenamumas lietuvoje: pokyčiai ir netolygumų įvertinimas. *Visuomenės sveikata*. 2011; priedas 1:3–40.
4. Clark WH, Reimer RR, Greene M, Ainsworth AM, Mastrangelo MJ. Origin of familial malignant melanoma from heritable melanocytic lesions. The B-K Mole syndrome. *Arch Dermatol*. 1978;114:732–738.
5. Elder DE, Clark WH, Elenitsas R, Guerry IV, DHalpern AC. The early and intermediate precursor lesions of tumor progression in the melanocytic system: common acquired nevi and atypical (dysplastic) nevi. *Semin Diagn Pathol*. 1993;10(1): 18–35.
6. Goldstein AM, Tucker MA. Dysplastic nevi and melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013;22(4):528–532.
7. Farber MJ, Heilman ER, Friedman RJ. Dysplastic nevi. *Dermatologic clinics*. 2012;30:389–404.
8. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer*. 2005;41:28–44.
9. Elder DE. Dysplastic naevi: an update. *Histopathology*. 2010;56:112–120.
10. Clark WH, Jr, Elder DE, Guerry D, 4th, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol*. 1984;15(12):1147–1165.

11. Marks R, Dorevitch AP, Mason G. Do all melanomas come from “moles”? A study of histological association between melanocytic naevi and melanoma. *Australasian J Dermatol.* 1990;31:77–80.
12. Togawa Y, Nakamura Y, Kamada N, Kambe N, Takahashi Y, Matsue H. Melanoma in association with acquired melanocytic nevus in Japan: a review of cases in the literature. *Int J Dermatol.* 2010;49:1362–1367.
13. Marghoob AA. Congenital melanocytic nevi: evaluation and management. *Dermatol Clin.* 2002;20:607–616.
14. Duffy K, Grossman D. The dysplastic nevus: from historical perspective to management in the modern era: part I. Historical, histologic, and clinical aspects. *J Am Acad Dermatol.* 2012;67:1.e1–1.e16.
15. Duffy K, Grossman D. The dysplastic nevus: from historical perspective to management in the modern era. Part II. Molecular aspects and clinical management. *J Am Acad Dermatol.* 2012;67:19.e1–19.e12.
16. Bafounta ML, Beauchet A, Aegerter P, Saiag P. Is dermoscopy (epiluminescence microscopy) useful for the diagnosis of melanoma? Results of a meta-analysis using techniques adapted to the evaluation of diagnostic tests. *Arch Dermatol.* 2001;137(10):1343–1350.
17. Kittler H, Pehamberger H, Wolff K, Binder M. Diagnostic accuracy of dermoscopy. *Lancet Oncol.* 2002;3(3):159–165.
18. Vestergaard ME, Macaskill P, Holt PE, Menzies SW. Dermoscopy compared with naked eye examination for the diagnosis of primary melanoma: a meta-analysis of studies performed in a clinical setting. *Br J Dermatol.* 2008;159(3):669–676.
19. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Melanoma. V.3. 2011.
20. Rajadhyaksha M, Grossman M, Esterowitz D, Webb RH, Anderson RR. *In vivo* confocal scanning laser microscopy of human skin: melanin provides strong contrast. *J Invest Dermatol.* 1995;104:946–952.
21. Ahlgrimm-Siess V, Hofmann-Wellenhof R, Cao T, Oliviero M, Scope A, Rabinovitz HS. Reflectance confocal microscopy in the daily practice. *Semin Cutan Med Surg.* 2009;28:180–189.

22. Cinotti E, Perrot JL, Labeille B, Grivet D, Habougat C, Douchet C, et al. Contribution of reflectance confocal microscopy in the diagnosis of eyelid dermal nevus. *Ann Dermatol Venereol*. 2015;142(3):226–228.
23. Ulrich M, Alarcon I, Malveyh J, Puig S. *In vivo* Reflectance Confocal Microscopy Characterization of Field-Directed 5-Fluorouracil 0.5%/Salicylic Acid 10% in Actinic Keratosis. *Dermatology*. 2015;230:193–198.
24. Friedman D, Friedman PC, Gill M. Reflectance confocal microscopy: an effective diagnostic tool for dermatophytic infections. *Cutis*. 2015;95(2):93–97.
25. Rajadhyaksha M, Gonzalez S, Zavislan JM, Anderson RR, Webb RH. *In vivo* confocal scanning laser microscopy of human skin II: advances in instrumentation and comparison with histology. *J Invest Dermatol*. 1999;113:293–303.
26. Pellacani G, Cesinaro AM, Seidenari S. Reflectance-mode confocal microscopy of pigmented skin lesions – improvement in melanoma diagnostic specificity. *J Am Acad Dermatol*. 2005;53:979–985.
27. Friedman RJ, Farber MJ, Warycha MA. The “dysplastic” nevus. *Clin Dermatol*. 2009;27:103–115.
28. Naeyaert JM, Brochez L. Dysplastic Nevi. *N Engl J Med*. 2003;349:2233–2240.
29. Elder DE, Goldman LI, Goldman SC, Greene MH, Clark WH Jr. Dysplastic nevus syndrome: a phenotypic association of sporadic cutaneous melanoma. *Cancer*. 1980;46:1787–1794.
30. Lynch HT, Fritchot BC, Lynch JF. Familial atypical multiple mole melanoma syndrome. *J Med Genet*. 1978;15:352–358.
31. Meyer LJ, Piepkorn M, Goldgar DE, Lewis CM, Cannon-Albright LA, Zone JJ, et al. Interobserver concordance in discriminating clinical atypia of melanocytic nevi, and correlations with histologic atypia. *J Am Acad Dermatol*. 1996;34:618–625.
32. MacKie RM. Multiple melanoma and atypical melanocytic naevi. *Br J Dermatol*. 1982;107:621–629.
33. Tucker MA. Melanoma epidemiology. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009;23:383–395.

34. Miller AJ, Mihm MC., Jr Melanoma. *N Engl J Med.* 2006;355:51–65.
35. Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous Melanoma. *Lancet.* 2005;365:687–701.
36. Arumi-Uria M, McNutt NS, Finnerty B. Grading of atypia in nevi: correlation with melanoma risk. *Mod Pathol.* 2003;16:764–771.
37. National Institutes of Health (NIH) Consensus Conference. Precursors to melanoma. *JAMA.* 1984;251:1864–1866.
38. MacKie RM, McHenry, Hole DJ. Accelerated detection with prospective surveillance for cutaneous malignant melanoma in high risk groups. *Lancet.* 1993;341:1618–1620.
39. Kraemer KH, Greene MH, Tarone R, Elder DE, Clark WH, Jr, Guerry D. Dysplastic naevi and cutaneous melanoma risk. *Lancet.* 1983;2:1076–1077.
40. Silva JH, Sá BC, Avila AL, Landman G, Duprat Neto JP. Atypical mole syndrome and dysplastic nevi: identification of populations at risk for developing melanoma - review article. *Clinics (Sao Paulo).* 2011;66(3):493–499.
41. Celebi JT, Ward KM, Wanner M, Polsky D, Kopf AW. Evaluation of germline CDKN2A, ARF, CDK4, PTEN, and BRAF alterations in atypical mole syndrome. *Clin Exp Dermatol.* 2005;30:68–70.
42. Chaudru V, Laud K, Avril MF, Minière A, Chompret A, Bressac-de Paillerets B, et al. Melanocortin-1 receptor (MC1R) gene variants and dysplastic nevi modify penetrance of CDKN2A mutations in French melanoma-prone pedigrees. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14:2384–2390.
43. Tsao H. Update on familial cancer syndromes and the skin. *J Am Acad Dermatol.* 2000;42:939–946.
44. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Žiūrėta: 2015-02-07. Prieiga per internetą: <http://globocan.iarc.fr>.
45. Nacionalinis vėžio institutas. Vėžio registras. Vėžys Lietuvoje 2012 metais. Vilnius, 2015.

46. Hall CJ, Doss S, Robertson J, Adam J. NICE guidance on ipilimumab for treating previously untreated advanced (unresectable or metastatic) melanoma. *Lancet Oncol.* 2014;15(10):1056–1057.
47. Bedane C, Leccia M, Sassolas B, Bregman B, Lebbé C. Treatment patterns and outcomes in patients with advanced melanoma in France. *Curr Med Res Opin.* 2013;29(10):1297–1305.
48. Wasif N, Bagaria SP, Ray P, Morton DL. Does metastasectomy improve survival in patients with Stage IV melanoma? A cancer registry analysis of outcomes. *J Surg Oncol.* 2011;104(2):111–115.
49. Braun RP, Saurat JH, French LE. Dermoscopy of pigmented lesions: a valuable tool in the diagnosis of melanoma. *Swiss Med Wkly.* 2004;134:83–90.
50. Gershenwald JE, Soong SJ, Balch CM; American Joint Committee on Cancer (AJCC) Melanoma Staging Committee. 2010 TNM staging system for cutaneous melanoma...and beyond. *Ann Surg Oncol.* 2010;17:1475–1477.
51. Bevona C, Goggins W, Quinn T, Fullerton J, Tsao H. Cutaneous Melanomas Associated With Nevi. *Arch Dermatol.* 2003;139:1620–1624.
52. Weatherhead SC, Haniffa M, Lawrence CM. Melanomas arising from naevi and de novo melanomas – does origin matter? *Br J Dermatol.* 2007;156(1):72–76.
53. Chen LL, Dusza SW, Jaimes N, Marghoob AA. Performance of the first step of the 2-step dermoscopy algorithm. *JAMA Dermatol.* 2015;151(7):715–721.
54. Pehamberger H, Steiner A, Wolff K. *In vivo* epiluminescence microscopy of pigmented skin lesions. I. Pattern analysis of pigmented skin lesions. *J Am Acad Dermatol.* 1987;17:571–583.
55. Argenziano G, Fabbrocini G, Carli P, De Giorgi V, Sammarco E, Delfino M. Epiluminescence microscopy for the diagnosis of doubtful melanocytic skin lesions. Comparison of the ABCD rule of dermatoscopy and a new 7-point checklist based on pattern analysis. *Arch Dermatol.* 1998;134:1563–1570.
56. Argenziano G, Giacomel J, Zalaudek I, Blum A, Braun RP, Cabo H, et al. A clinico-dermoscopic approach for skin cancer screening: Recommendations involving a survey of the international dermoscopy society. *Dermatol Clin.* 2013;31(4): 525–534.

57. Lopez-Ravello BM, Arias-Santiago S, Fernandez-Pugnaire MA, Ortega SS, Buendía-Eisman A. Prevalence of common and atypical melanocytic nevi in young adults and its relationship with sun protection and exposure habits. *Eur J Dermatol.* 2015;25(1):45–51.
58. Valiukeviciene S; Miseviciene I, MD; Gollnick H. The Prevalence of Common Acquired Melanocytic Nevi and the Relationship With Skin Type Characteristics and Sun Exposure Among Children in Lithuania. *Arch Dermatol.* 2005;141(5):579–586
59. Marghoob AA, Blum R, Nossa R, Busam KJ, Sachs D, Halpern A. Agminated atypical (dysplastic) nevi: case report and review of the literature. *Arch Dermatol.* 2001;137:917–920.
60. Hofmann-Wellenhof R, Blum A, Wolf IH, Piccolo D, Kerl H, Garbe C, et al. Dermoscopic classification of atypical melanocytic nevi (Clark nevi). *Arch Dermatol.* 2001;137(12):1575–1580.
61. Hofmann-Wellenhof R, Blum A, Wolf IH, Zalaudek I, Piccolo D, Kerl H, et al. Dermoscopic classification of Clark's nevi (atypical melanocytic nevi). *Clin Dermatol.* 2002;20(3):255–258.
62. Grichnik JM. Dermoscopy of melanocytic neoplasms: subpatterns of dysplastic/atypical nevi. *Arch Dermatol.* 2003;139:1238.
63. Grichnik JM. Dermoscopy of melanocytic neoplasms: subpatterns of dysplastic/atypical nevi. *Arch Dermatol.* 2003;139:970.
64. Grichnik JM. Dermoscopy of melanocytic neoplasms: subpatterns of dysplastic/atypical nevi. *Arch Dermatol.* 2004;140:142.
65. Braun RP, Rabinovitz HS, Krischer J, Kreusch J, Oliviero M, Naldi L, et al. Dermoscopy of pigmented seborrheic keratosis: a morphological study. *Arch Dermatol.* 2002;138:1556–1560.
66. Braga JC, Scope A, Klaz I, Mecca P, Spencer P, Marghoob AA. Melanoma mimicking seborrheic keratosis: an error of perception precluding correct dermoscopic diagnosis. *J Am Acad Dermatol* 2008;58:875–880.
67. Tsao H, Olazagasti JM, Cordoro KM, Brewer JD, Taylor SC, Bordeaux JS, et al. Early detection of melanoma: Reviewing the ABCDEs. *J Am Acad Dermatol.* 2015;72(4):717–723.

68. Carli P, de Giorgi V, Chiarugi A, Nardini P, Weinstock MA, Crocetti E. Addition of dermoscopy to conventional naked-eye examination in melanoma screening: a randomized study. *Am Acad Dermatol*. 2004;50(5):683–689.
69. Kittler H, Pehamberger H, Wolff K, Binder M. Diagnostic accuracy of dermoscopy. *Lancet Oncol*. 2002;3(3):159–165.
70. Nachbar F, Stolz W, Merkle T, Cognetta AB, Vogt T, Landthaler M, et al. The ABCD rule of dermatoscopy. High prospective value in the diagnosis of doubtful melanocytic skin lesions. *J Am Acad Dermatol*. 1994;30(4):551–559.
71. Menzies SW, Ingvar C, McCarthy WH. A sensitivity and specificity analysis of the surface microscopy features of invasive melanoma. *Melanoma Res*. 1996;6:55–662.
72. Saida T, Koga H, Uhara H. Key points in dermoscopic differentiation between early acral melanoma and acral nevus. *J Dermatol*. 2011;38:25–34.
73. Argenziano G, Cerroni L, Zalaudek I, Staibano S, Hofmann-Wellenhof R, Arpaia N, et al. Accuracy in melanoma detection: a 10-year multicenter survey. *J Am Acad Dermatol*. 2011;67:54–59.
74. Annessi G, Bono R, Sampogna F, Faraggiana T, Abeni D. Sensitivity, specificity, and diagnostic accuracy of three dermoscopic algorithmic methods in the diagnosis of doubtful melanocytic lesions: the importance of light brown structureless areas in differentiating atypical melanocytic nevi from thin melanomas. *J Am Acad Dermatol*. 2007;56:759–767.
75. Pozo L, Naase M, Cerio R, Blanes A, Diaz-Cano SJ. Critical analysis of histologic criteria for grading atypical (dysplastic) melanocytic nevi. *Am J Clin Pathol*. 2001;115:194–204.
76. Duncan LM, Berwick M, Bruijn JA, Byers HR, Mihm MC, Barnhill RL. Histopathologic recognition and grading of dysplastic melanocytic nevi: an interobserver agreement study. *J Invest Dermatol*. 1993;100(3):318S–321S.
77. Clemente C, Cochran AJ, Elder DE, Levene A, MacKie RM, Mihm MC et al. Histopathologic diagnosis of dysplastic nevi: concordance among pathologists convened by the World Health Organization Melanoma Programme. *Hum Pathol*. 1991;22:313–319.

78. de Wit PE, van't Hof-Grootenboer B, Ruiter DJ, Bondi R, Bröcker EB, Cesarini JP, et al. Validity of the histopathological criteria used for diagnosing dysplastic naevi. An interobserver study by the pathology subgroup of the EORTC Malignant Melanoma Cooperative Group. *Eur J Cancer*. 1993;29:831–839.
79. Weinstein D, Leininger J, Hamby C, Safai B. Diagnostic and prognostic biomarkers in melanoma. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2014;7(6):13–24.
80. Smoller BR, McNutt NS, Hsu A. HMB-45 recognizes stimulated melanocytes. *J Cutan Pathol*. 1989;16:49–53.
81. Smoller BR, McNutt NS, Hsu A. HMB-45 staining of dysplastic nevi. *Am J Surg Pathol*. 1989;138:680–681.
82. Minsky M. Microscopy Apparatus. Patent US3013467, 1961.
83. Minsky M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning*. 1988;10:123–128.
84. Nwaneshiudu A, Kuschal C, Sakamoto FH, Anderson RR, Schwarzenberger K, Young RC. Introduction to Confocal Microscopy. *J Invest Dermatol*. 2012;132(12):e3.
85. Nori S, Rius-Díaz F, Cuevas J, Goldgeier M, Jaen P, Torres A, et al. Sensitivity and specificity of reflectance-mode confocal microscopy of basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*. 2004;51:923–930.
86. Ulrich M, Stockfleth E, Roewert-Huber J, Astner S. Noninvasive diagnostic tools for nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol*. 2007;157 Suppl 2:56–58.
87. Gerger A, Koller S, Kern T, Massone C, Steiger K, Richtig E, et al. Diagnostic applicability of *in vivo* confocal laser scanning microscopy in melanocytic skin tumors. *J Invest Dermatol*. 2005;124(3):493–498.
88. Gerger A, Koller S, Weger W, Richtig E, Kerl H, Samonigg H, et al. Sensitivity and specificity of confocal laser-scanning microscopy *for in vivo* diagnosis of malignant skin tumors. *Cancer* 2006;107(1):193–200.
89. Pellacani G, Guitera P, Longo C, Avramidis M, Seidenari S, Menzies S. The impact of *in vivo* reflectance confocal microscopy for the diagnostic accuracy of melanoma and equivocal melanocytic lesions. *J Invest Dermatol*. 2007;127(12):2759–2765.

90. Guitera P, Pellacani G, Longo C, Seidenari S, Avramidis M, Menzies SW. *In vivo* reflectance confocal microscopy enhances secondary evaluation of melanocytic lesions. *J Invest Dermatol* 2009;129:131–138.
91. Guitera P, Menzies SW, Longo C, Cesinaro AM, Scolyer RA, Pellacani G. *In vivo* confocal microscopy for diagnosis of melanoma and basal cell carcinoma using a two-step method: analysis of 710 consecutive clinically equivocal cases. *J Invest Dermatol*. 2012;132(10):2386–2394.
92. Castro RP, Stephens A, Fraga-Braghiroli NA, Oliviero MC, Rezze GG, Rabino-vitz H. Accuracy of *in vivo* confocal microscopy for diagnosis of basal cell carcinoma: a comparative study between handheld and wide-probe confocal imaging. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015;29(6):1164–1169.
93. Lovatto L, Carrera C, Salerni G, Alós L, Malveyh J, Puig S. *In vivo* reflectance confocal microscopy of equivocal melanocytic lesions detected by digital dermoscopy follow-up. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015;29(10):1918–1925.
94. Pellacani G, Cesinaro AM, Longo C, Grana C, Seidenari S. Microscopic *in vivo* description of cellular architecture of dermoscopic pigment network in nevi and melanomas. *Arch Dermatol*. 2005;141(2):147–154.
95. Guitera P, Pellacani G, Longo C, et al. *In vivo* reflectance confocal microscopy enhances secondary evaluation of melanocytic lesions. *J Invest Dermatol*. 2009;129(1):131–138.
96. Longo C, Rito C, Beretti F, Cesinaro AM, Piñeiro-Maceira J, Seidenari S, et al. De novo melanoma and melanoma arising from pre-existing nevus: *in vivo* morphologic differences as evaluated by confocal microscopy. *J Am Acad Dermatol*. 2011;65(3):604–614.
97. Pellacani G, Farnetani F, Gonzalez S, Longo C, Cesinaro AM, Casari A, et al. *In vivo* confocal microscopy for detection and grading of dysplastic nevi: a pilot study. *J Am Acad Dermatol*. 2012;66(3):e109–121.
98. Pellacani G, Scope A, Ferrari B, Pupelli G, Bassoli S, Longo C, et al. New insights into nevogenesis: *in vivo* characterization and follow-up of melanocytic nevi by reflectance confocal microscopy. *J Am Acad Dermatol*. 2009;61(6):1001–1013.

99. Busam KJ, Hester K, Charles C, Sachs DL, Antonescu CR, Gonzalez S, et al. Detection of clinically amelanotic malignant melanoma and assessment of its margins by *in vivo* confocal scanning laser microscopy. *Arch Dermatol.* 2001;137(7):923–929.
100. Scope A, Benvenuto-Andrade C, Agero AL, Malvehy J, Puig S, Rajadhyaksha M, et al. *In vivo* reflectance confocal microscopy imaging of melanocytic skin lesions: consensus terminology glossary and illustrative images. *J Am Acad Dermatol.* 2007;57(4):644–658.
101. Pellacani G, Cesinaro AM, Seidenari S. *In vivo* confocal reflectance microscopy for the characterization of melanocytic nests and correlation with dermoscopy and histology. *Br J Dermatol.* 2005;152(2):384–386.
102. Hofmann-Wellenhof R, Wurm EM, Ahlgrimm-Siess V, Richtig E, Koller S, Smolle J, et al. Reflectance confocal microscopy – state-of-art and research overview. *Semin Cutan Med Surg.* 2009;28(3):172–179.
103. Segura S, Puig S, Carrera C, Palou J, Malvehy J. Development of a two-step method for the diagnosis of melanoma by reflectance confocal microscopy. *J Am Acad Dermatol.* 2009;61(2):216–229.
104. Stevenson AD, Mickan S, Mallett S, Ayya M. Systematic review of diagnostic accuracy of reflectance confocal microscopy for melanoma diagnosis in patients with clinically equivocal skin lesions. *Dematol Pract Conc.* 2013;3(4):5.
105. Fosgate GT. Practical sample size calculations for surveillance and diagnostic investigations. *J Vet Diagn Invest.* 2009;21(1):3–14.
106. Hashemi P, Pulitzer MP, Scope A, Kovalyshyn I, Halpern AC, Marghoob AA. Langerhans cells and melanocytes share similar morphologic features under *in vivo* reflectance confocal microscopy: a challenge for melanoma diagnosis. *J Am Acad Dermatol.* 2012;66(3):452–462.
107. Losi A, Longo C, Cesinaro AM, Benati E, Witkowski A, Guitera P, et al. Hyporeflective pagetoid cells: a new clue for amelanotic melanoma diagnosis by reflectance confocal microscopy. *Br J Dermatol.* 2014;171(1):48–54.
108. Pellacani G, Longo C, Malvehy J, Puig S, Carrera C, Segura S, et al. *In vivo* confocal microscopic and histopathologic correlations of dermoscopic features in 202 melanocytic lesions. *Arch Dermatol.* 2008;144(12):1597–1608.

109. Miettinen M. Modern soft tissue pathology. Tumors and non-neoplastic conditions. New York: Cambridge University Press. 2010; p. 63–65.
110. Naoki Oiso and Akira Kawada (2011). The Stage of Melanogenesis in Amelanotic Melanoma, Melanoma in the Clinic – Diagnosis, Management and Complications of Malignancy, Prof. Mandi Murph (Ed.). ISBN: 978-953-307-571-6, InTech, DOI: 10.5772/18628. Available from: <http://www.intechopen.com/books/melanoma-in-the-clinic-diagnosis-management-and-complications-of-malignancy/the-stage-of-melanogenesis-in-amelanotic-melanoma>. Žiūrēta: 2015-09-01.

9. PUBLIKACIJOS IR DISERTACIJOS TEMA SKAITYTI PRANEŠIMAI

Moksliniai straipsniai

1. Ingrida Vaišnorienė, Janina Didžiapetrienė, Konstantinas Povilas Valuckas, Ričardas Rotomskis. Optinės biopsijos taikymas melanocitinių odos darinių diagnostikai. Sveikatos mokslai, 2011 (21):140–147.
2. Ingrida Vaišnorienė, Janina Didžiapetrienė, Giedrė Smailytė, Konstantinas Povilas Valuckas. Odos melanomos ankstyvoji diagnostika. Medicinos teorija ir praktika, 2013 (4):362–368.
3. Ingrida Vaišnorienė, Ričardas Rotomskis, Vytautas Kulvietis, Rimantas Eidukevičius, Violeta Žalgevičienė, Aida Laurinavičienė, Jonas Venius, Janina Didžiapetrienė. Nevomelanocytic atypia detection by *in vivo* reflectance confocal microscopy. Medicina, 2014 (50):209–215.

Moksliniai pranešimai

1. Tezės ir standinis pranešimas: I. Vaisnoriene, J. Venius, J. Didziapetriene, R. Rotomskis, K. P. Valuckas. Atypia grading in nevi by reflectance confocal microscopy. Pigment cell Melanoma Res, 2011 (24), Abstract Nr. P138. Blackwell. ISSN 1755-1471. XXIst International Pigment Cell Conference, 21–24 Sept 2011, Bordeaux (France).
2. Žodinis pranešimas: I. Vaišnorienė, J. Didžiapetrienė, G. Pellacani. Melanomos diagnostika konfokalia odos vaizdinimo sistema. Doktorantų stažuotės užsienio mokslo centruose 2012–2013 m., Lietuvos mokslo tarybos projektas „Studentų mokslinės veiklos skatinimas“, 2013-11-11, Vilnius (Lietuva).
3. Žodinis pranešimas: I. Vaišnorienė. Malignant melanoma: case report. Salzburg Weill Cornell Seminar in Dermatology, 2014-11-13, Zalcburgas (Austrija).

10. PRIEDAI

1 priedas



VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETAS

Kodas 211950810, M.K. Čiurlionio 21/27, 03101, Vilnius Tel.(85)2398701, 2398700, faks.2398705, El.p. mf@mf.vu.lt

VILNIAUS REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS

M.K. Čiurlionio 21/27, LT-03101, Vilnius Tel.(85) 2686998, el.p.: rbtek@mf.vu.lt

LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ

2010-11-05 Nr.158200-11-256-59

Biomedicininio tyrimo pavadinimas:

Apgamų displazijos lygio ivertinimas optiniais metodais

Protokolo Nr.: ADT-01
Versija: 02
Data: 2010.11.04
Asmens informavimo forma ir Informuoto asmens sutikimo forma (lietuvių kalba):
Versija: 2
Data: 2010.11.01
Pagrindinis tyrėjas: I.Vaišnorienė

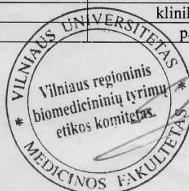
Biomedicininio tyrimo vieta:

[staigos pavadinimas: Vilniaus universiteto Onkologijos institutas, Konsultacinė poliklinika
[staigos adresas: Santariškių g. 1, Vilnius
[staigos pavadinimas: Vilniaus universiteto Onkologijos institutas, Biomedicininės fizikos
Laboratorija
[staigos adresas: Baublio g. 3D, Vilnius

Leidimas išduotas Vilniaus Regioninio biomedicininių tyrimų etikos komiteto posėdžio (protokolas Nr. 158200-2010/11), vykusio 2010 m. lapkričio 04 d., sprendimu.

Vilniaus regioninio biomedicininių tyrimų etikos komiteto ekspertų grupės nariai			
Nr.	Vardas, pavardė	veiklos sritis	dalyvavo posėdyje
1	doc. Dr. Laimutė Jakavonytė	filosofija	taip
2	doc. Dr. Kęstutis Žagminas	epidemiologija	taip
3	dr. Gytis Andrulionis	teisė	ne
4	dr. Marija Veniūtė	visuomenės sveikata	taip
5	doc.dr. Jolanta Gulbinovič	medicina	ne
6	doc.dr. Vytautė Pečiulienė	medicina, odontologija	taip
7	Laura Malinauskienė	medicina	ne
8	dr. Gražina Pastavkaitė	klinikinė psichologija	ne
9	Ugnė Šakūnienė	pacientų teisės	taip

Pirmininkas



Gytis Andrulionis

ASMENS INFORMAVIMO FORMA

Pacientas _____

Apie apgamų displazijos lygio įvertinimo optiniais metodais klinikinį tyrimą

Jūs esate kviečiamas (-a) dalyvauti klinikiniam tyrimo, todėl turite pats nuspręsti, ar jame dalyvausite. Šios asmens informavimo formos tikslas yra visapusiškai išaiškinti apie tyrimą, kad greičiau galėtumėte apsispręsti.

Dalyvauti šiame tyrimo kviečiami pacientai, kuriems gydytojas įtaria displazinių (-ius) apgamą (-us) arba melanomą. Displazinis apgamas priskiriamos melanomos rizikos veiksniams (požymiams). Jeigu Jums siūloma dalyvauti šiame tyrimo, vadinausi, Jus konsultuojantis gydytojas įtaria, kad vienas ar keli apgamai rodo padidėjusią riziką susirgti piktybine melanoma arba gydytojas įtaria, kad sergate melanoma. Dėl to Jums siūloma atlikti keletą detalesnių optinės diagnostikos tyrimų.

Dažniausiai įtariamai displaziniai apgamai šalinami chirurginiu būdu, todėl atliekamas jų histologinis tyrimas. Tačiau pastaraisiais metais moksliniais darbais ieškoma galimybės atlikti neinvazinę biopsiją (biopsiją be pjūvio). Vilniaus universiteto Onkologijos institute atliekamas tyrimas siekiant nustatyti fluorescencinės spektroskopijos metodo tikslumą vertinant apgamų displaziją ir diagnozuojant piktybinę melanomą. Jeigu būtų nustatyta, kad fluorescencinė spektroskopija gali tiksliai diagnozuoti pigmentinių odos darinių displazijos lygį, ateityje pavyktų sumažinti diagnostinių chirurginių intervencijų skaičių.

Siekiant nustatyti spektroskopijos tyrimo tikslumą, atskiriant apgamus su minimalia melanomos rizika („gerus“), displazinius („blogus“) apgamus ir melanomą, VUOI planuojama fluorescencinė spektroskopija displaziniams apgamams ir melanomos tikslumui nustatyti. Jei norite prisidėti prie fluorescencinės spektroskopijos displazinių apgamų bei melanomos ankstyvosios diagnostikos tyrimo siekių, tuomet prašome Jūsų sutikimo atlikti Jūsų odos tiesioginę optinę spektroskopiją arba operacijos metu iš Jūsų kūno paimtos medžiagos tyrimus. Ši Jūsų medžiaga tuojau po

operacijos iš operacinės patalpos bus paimta ir ištirta VUOI Biomedicininės fizikos laboratorijoje, vėliau bus atlikti histologiniai tyrimai galutinei diagnozei nustatyti.

Tyrimo metu atliekami tokie optiniai tyrimai: dermatoskopija, spektrofotometrinė intrakutaninė analizė, fluorescencinės spektroskopijos tyrimas ir tyrimas konfokalia odos vaizdinimo sistema. Visi atliekami optiniai tyrimai yra neskausmingi, nežalingi odai, atliekami priglaidus optinius daviklius prie odos ir apšvietus odą tam tikro bangos ilgio šviesa. Fluorescencinės spektroskopijos tyrimai nesukelia jokios papildomos rizikos, kad Jūsų apgamas pasikeistų ar supiktybėtų, kadangi tyrimams naudojami matomos šviesos spektro spinduliai, nesukeliantys odos pakitimų ar sveikatos sutrikimų. Šis tyrimas taip pat neturės įtakos morfologiniams Jūsų apgamų ar melanomos tyrimams: naudojami spinduliai nesukelia jokių audinių pakitimų.

Jūsų odos pigmentiniai dariniai bus tiriami siekiant nustatyti specifinius displazinių apgamų ir melanomos optinius parametrus lyginant juos su sveikais audiniais. Atlikus optinius tyrimus, gali būti gauta informacija, kuri pagerintų ankstyvąją melanomos diagnostiką.

Be to, Jums bus atliktas vienas iš pažangiausių – konfokališkos odos vaizdinimo sistemos tyrimas, kurio metu bus galima apžiūrėti Jūsų įtartinus pigmentinius odos darinius ląsteliniu lygiu be chirurginės intervencijos. Tyrimas atliekamas ant Jūsų odos konfokališkos lazerinės skenavimo mikroskopijos principu. Nė vienas optinis tyrimas nesukels jokios rizikos Jūsų sveikatai.

Atlikus optinius apgamo tyrimus histologinei diagnozei nustatyti, ištirtas apgamas gali būti pašalintas chirurgiškai.

Šis Jūsų dalyvavimas tyrime yra savanoriškas ir gali būti bet kada atšauktas nepaaiškinus priežasčių. Atsisakymas nesukels Jums jokių neigiamų padarinių.

Tolesnę informaciją Jūs gausite iš konsultuojančio gydytojo.

Dėkojame Jums už pagalbą.

TYRIMO IR GYDYMO PROCEDŪROS

Prieš pradėdant gydymą, bus išsamiai ištirta Jūsų sveikatos būklė: bus atlikti kasdienėje praktikoje naudojami optiniai odos tyrimai – dermatoskopija. Pooperacinė medžiaga (navikas) bus tirama Valstybiniame patologijos centre. Visi šie tyrimai yra įprastiniai. Jie yra atliekami, jeigu Jūs tyrime ir nedalyvautumėte.

Taip pat Jūsų bus paprašyta nueiti į VUOI Biomedicininės fizikos laboratoriją, kur Jums bus atlikti papildomi optiniai spektrofotometrinių odos analizės, konfokalinės odos vaizdinimo sistemos bei fluorescencinės spektroskopijos tyrimai.

RIZIKA, NEPATOGUMAI, ŠALUTINIS POVEIKIS

Atliekami spektrofotometrinių odos analizės, konfokalinės vaizdinimo sistemos bei fluorescencinės spektroskopijos tyrimai negali sukelti nepageidaujamo poveikio odai ar organizmui. Fluorescencinės spektroskopijos metu naudojami spinduliai nekeičia biopsijos medžiagos. Nepatogumų gali sukelti tai, kad visi papildomi optiniai tyrimai atliekami gretimame VUOI mokslinių tyrimų pastate, į kurį Jūs palydės medicinos personalas.

GALIMA NAUDA

Jei nuspręsite dalyvauti šiame tyrime, jis bus naudingas Jums, nes suteiks galimybę atlikti papildomus, taip pat ir labai tobulus optinius tyrimus, iš kurių bus gauta žinių, naudingų tiriant kitus pacientus.

Tikimybė gauti naudą yra didesnė už tai, kad naudos gali nebūti.

PACIENTŲ TEISĖS

Jei nuspręsite nedalyvauti šiame tyrime, šis sprendimas nepaveiks Jūsų tolesnės medicininės priežiūros.

Galite pasitraukti iš tyrimo bet kuriuo metu, nerizikuodami būsima medicinine priežiūra ar galimu įtraukimu į vėlesnius klinikinius tyrimus. Jūsų dalyvavimas šiame tyrime yra visiškai savanoriškas, todėl galite nuspręsti pasitraukti iš šio tyrimo bet kuriuo metu – dėl to nebus taikomos jokios nuobaudos. Jei kuriuo nors metu nuspręsite pasitraukti iš tyrimo, turėtumėte kreiptis į gydantį gydytoją. Jei manote, kad pažeidžiamos Jūsų teisės ar turite kokių klausimų apie savo, kaip tyrimo subjekto, teises, Jūs galite kreiptis į Lietuvos bioetikos komiteto pirmininką E. Gefeną, tel. 8 5 212 45 65.

KONFIDENCIALUMAS

Jūs turite teisę į privatumą. Jūs suprantate, kad visa informacija bus laikoma konfidencialia ir pagal galiojančius įstatymus nebus atskleidžiama. Jūsų pavardė ir kita tapatybę atskleidžianti informacija nebus išsiųsta už Vilniaus universiteto Onkologijos instituto ribų. Šio tyrimo duomenys gali būti spausdinami, tačiau Jūsų tapatybė nebus atskleista. Pasirašę šią sutikimo formą, sutinkate, kad gauti duomenys (informacija) būtų panaudojami neatskleidžiant Jūsų tapatybės.

KOMPENSACIJA

Už dalyvavimą šiame tyrime Jūs negausite jokio atlygio.

INFORMUOTO ASMENS SUTIKIMO FORMA

Pasirašęs (-iusi) šią formą, Jūs pritariate, kad perskaitėte ir supratote jau minėtą Asmens informavimo formą ir savo noru sutinkate dalyvauti apgamų displazijos lygio įvertinimo optiniais metodais moksliniame tyrime. Sutinkate, kad tyrimo metu gauti duomenys apie onkologinę ligą, diagnostiką ir gydymą gali būti saugomi ir perduodami remiantis duomenų apsaugos reglamentu.

Pasirašęs šią formą, Jūs sutinkate, kad tyrimo personalas labai gerai paaiškino šio tyrimo pobūdį, procedūras, naudą ir riziką, labai gerai atsakė į Jūsų klausimus.

Jūs suprantate, kad galite pasitraukti iš tyrimo bet kuriuo metu ir kad toks Jūsų veiksmas nepaveiks Jūsų tolesnio medicininio gydymo.

Pasirašydamas (-a) šią formą, Jūs leidžiate naudoti gautą informaciją neatskleidžiant Jūsų tapatybės.

Aš, _____, sutinku, kad būtų atlikti šie konkretūs tyrimai:

Mano odos mokslinė fluorescencinė spektroskopija:

sutinku

nesutinku

Mano odos konfokaliuos odos vaizdinimo sistemos tyrimai:

sutinku

nesutinku

Mano odos spektroskopinė analizė:

sutinku

nesutinku

Operacijos metu paimtos mano pataloginės medžiagos moksliniai tyrimai:

sutinku

nesutinku

Tyrimo dalyvio parašas

Data

Pavardė (spausdintinėmis raidėmis)

Aš, čia pasirašęs, minėtam pacientui labai gerai paaiškinau visą svarbią, su tyrimu susijusią informaciją.

Gydytojo parašas

Data

PADĖKA

Esu dėkinga prof. Janinai Didžiapetrienei už suteiktas žinias,
vertingas pastabas ir nuolatinį skatinimą tobulėti.

Nuoširdžiai dėkoju:

Prof. Ričardui Rotomskiui ir visiems Nacionalinio vėžio instituto
Biomedicinos fizikos laboratorijos darbuotojams už techninę pagalbą
ir palaikymą vykdant mokslinį tyrimą bei skelbiant rezultatus;

Doc. dr. Rimantui Eidukevičiui už profesionalią pagalbą
statistiškai apibendrinant duomenis;

Nacionalinio vėžio instituto kolegoms už nuoširdų bendradarbiavimą,
įdomius klinikinius atvejus ir diskusijas,
moralinį palaikymą ir supratimą;

Nacionalinio vėžio instituto administracijai už suteiktą galimybę
ir paramą vykdant šį mokslinį tyrimą;

Valstybinio patologijos centro kolegoms už histologinių ir
imunohistocheminių tyrimų vertinimą bei konsultacijas.

Šeimai dėkinga už visapusišką
palaikymą ir supratimą.