

VILNIAUS UNIVERSITETAS
NACIONALINIS VĖŽIO INSTITUTAS

RASA VANSEVIČIŪTĖ

GIMDOS KAKLELIO IKIVĖŽINIŲ BŪKLIŲ TYRIMAS *IN VIVO*
SENSIBILIZACINĖS FLUORESCENCIJOS SPEKTROSKOPIJOS
METODU

Daktaro disertacija
Biomedicinos mokslai, medicina (06 B)

Vilnius, 2015 metai

Disertacija rengta 2010–2014 metais Nacionaliniame vėžio institute
(buvusiame Vilniaus universiteto Onkologijos institute)

Mokslinė vadovė - doc. dr. Simona Rūta Letautienė (Nacionalinis vėžio
institutas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

Mokslinis konsultantas - dr. Jonas Venius (Nacionalinis vėžio institutas,
biomedicinos mokslai, biofizika – 02B)

Kalbos redaktorė: Gražina Pruskuvienė

TURINYS

SANTRUMPOS	5
DISERTACIJOJE VARTOJAMŲ TERMINŲ PAAIŠKINIMAI	7
1. ĮVADAS	11
1.1. Tiriamoji problema.....	11
1.2. Darbo aktualumas	15
1.3. Darbo tikslas.....	16
1.4. Darbo uždaviniai	16
1.5. Ginamieji teiginiai	16
1.6. Darbo mokslinis naujumas	17
1.7. Autoriaus indėlis.....	18
2. LITERATŪROS APŽVALGA	18
2.1. Literatūros paieška.....	18
2.2. Gimdos kaklelio ikivėžinės būklės ir vėžys.....	19
2.3. Gimdos kaklelio ikivėžinių būklių diagnostikos metodai.....	24
2.4. Optinė biopsija	29
2.4.1. Savitoji ir sensibilizacinė audinių fluorescencija.....	30
2.4.2. 5 –aminolevulininė rūgštis ir jos indukuota protoporfirino IX gamyba	36
2.5. Sensibilizacinės fluorescencijos diagnostikos pritaikymo sritys medicinoje	38
2.6. Sensibilizacinės fluorescencijos diagnostika tiriant gimdos kaklelio ikivėžines būkles.....	43
3. TYRIMO METODIKA	51
3.1. Tyrimo medžiaga	51
3.2. Tyrimo schema, vykdytų procedūrų ir pacienčių vizitų aprašymas	62
3.2.1. Tiriamasis preparatas, dozavimas	67
3.2.2. Naudota aparatūra.....	68
3.2.3. Fluorescencijos spektrų matavimo metodika.....	69

3.3. Statistinė duomenų analizė	69
4. DARBO REZULTATAI.....	72
4.1. Savitosios fluorescencijos spektrų analizė	74
4.2. Sensibilizacinės fluorescencijos spektrų analizė	82
4.3. Diagnostinio koeficiento apskaičiavimo algoritmas.....	84
4.4. Skaitinės skiriamosios vertės gimdos kaklelio didelės rizikos pakitimams diagnozuoti, nustatymas.....	85
4.5. Sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos, kolposkopijos bei šių metodų derinio diagnostinio tikslumo palyginimas	86
5. REZULTATŲ APTARIMAS	98
6. IŠVADOS	106
7. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS.....	106
8. MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS.....	107
9. LITERATŪROS SĄRAŠAS	109
10. PRIEDAI.....	130
11. PADĖKA	138

SANTRUMPOS

5-ALA – 5 - aminolevulino rūgštis (angl. *5 – aminolevulinic acid*)

ASC-H – atipinės plokščiojo epitelio ląstelės, galimi žymūs plokščialąsteliniai intraepiteliniai pakitimai (angl. *atypical squamous cell suggestion for high grade squamous intraepithelial lesion*)

CIN – intraepitelinė gimdos kaklelio neoplazija (angl. *cervical intraepithelial neoplasia*)

CIN 1 – mažo laipsnio intraepitelinė gimdos kaklelio neoplazija

CIN 2 – vidutinio laipsnio intraepitelinė gimdos kaklelio neoplazija

CIN 3 – didelio laipsnio intraepitelinė gimdos kaklelio neoplazija

CIS – *carcinoma in situ*

CT – citologinis gimdos kaklelio tyrimas (*Papanicolaou tyrimas, PAP testas*)

FDT – fotodinaminė terapija

GK – gimdos kaklelis

HAL – heksa aminolevulinatas

HSIL – žymūs plokščialąsteliniai intraepiteliniai pakitimai (angl. *high grade squamous intraepithelial lesions*)

HpD – hematoporfirino dariniai

kv – gimdos kaklelio kvadrantas (-ai)

KN – klaidingai neigiami atvejai

KT – klaidingai teigiami atvejai

LSIL – nežymūs plokščialąsteliniai intraepiteliniai pakitimai (angl. *low grade squamous intraepithelial lesion*)

- NVI** – Nacionalinis vėžio institutas
- NPV** – neigiama tyrimo prognozinė vertė
- n** – skaičius
- pav.** – paveikslas
- PSO** – Pasaulio sveikatos organizacija
- PI** – pasikliautiniai intervalai
- PpIX** – protoporfirinas IX
- ROC** – kreivės, skirtos diagnostinėms testo charakteristikoms apibūdinti (angl. *receiving operating curve*)
- SFS** – sensibilizacinė fluorescencijos spektroskopija
- TN** – teisingai neigiami atvejai
- TPV** – teigiama tyrimo prognozinė vertė
- TT** – teisingai teigiami atvejai
- TZ** – transformacijos zona
- ŽPV** – žmogaus papilomos virusas

DISERTACIJOJE VARTOJAMŲ TERMINŲ PAAIŠKINIMAI

1. Citologinio tyrimo terminai gimdos kaklelio plokščiojo epitelio ląstelių ikivėžinėms būklėms apibūdinti yra **LSIL** - nežymūs plokščialąsteliniai intraepiteliniai pokyčiai; **HSIL** – žymūs plokščialąsteliniai intraepiteliniai pokyčiai; **ASC-H** - atipinės plokščiojo epitelio ląstelės, galimi žymūs plokščialąsteliniai intraepiteliniai pakitimai.

2. Histologinio tyrimo terminai gimdos kaklelio ikivėžinėms būklėms apibūdinti yra trijų (mažo, vidutinio ir didelio) laipsnių intraepitelinė gimdos kaklelio neoplazija – (angl. *cervical intraepithelial neoplasia*) – **CIN 1, CIN 2, CIN 3** bei **CIS** (angl. *carcinoma in situ*), kuo didesnis laipsnis tuo žymesnė patologija.

3. Gimdos kaklelio ikivėžinių būklių rizikos progresuoti į vėžį, dydis be histologinių pokyčių, taip pat priklauso ir nuo kitų sąlygų (pacientės amžiaus, infekotumo didelės rizikos tipų ŽPV, gimdymų skaičiaus, socialinės būklės ir kt.). Šiame darbe pasirinkta vartoti terminus – **didelės ir mažos rizikos gimdos kaklelio pakitimai**, atsižvelgiant tik į diagnozuotus histologinius pokyčius.

- **Didelės rizikos** gimdos kaklelio pakitimai darbe laikomi esant \geq CIN 2 pakitimams;

- **Mažos rizikos** gimdos kaklelio pakitimai - esant CIN 0-1 pakitimams (CIN 0 - histologiškai neoplazijos požymių nenustatoma).

4. Fluorescencija gali būti matoma plika akimi (fluorescencijos vaizdinimas), taip pat spektrometru galima objektyviai išmatuoti fluorescencijos intensyvumus, registruoti spektrus – tai fluorescencijos spektroskopija.

- **Savitoji (nesensibilizacinė) audinių fluorescencija** pagrįsta ląstelėse esančių molekulių - endogeninių fluoroforų optiniu sužadinimu tam tikro bangos ilgio šviesa ir jų fluorescencijos stebėjimu. Vykstant patologiniams procesams ląstelėse ir audiniuose keičiasi endogeninių fluoroforų kiekis,

pasiskirstymas bei jų mikroaplinkos cheminės ir fizinės savybės. Taigi patologinių audinių savitosios fluorescencijos spektrai skiriasi nuo sveikų audinių spektrų – dėl to galima jų diferencinė diagnostika.

- **Sensibilizacinė fluorescencija** –tai tokia audinių fluorescencija, kai papildomai (vietiškai ar sistemiškai) yra naudojama egzogeninė sensibilizuojanti medžiaga (pvz., 5-ALA), kuri intensyviau kaupiasi patologiniame audinyje. Audinius apšvietus tam tikro bangos ilgio šviesa, matoma fluorescencija, nurodanti patologijos židinių vietas.

5. R – tai gimdos kaklelio sensibilizacinės **fluorescencijos intensyvumų santykis** tarp PpIX fluorescencijos maksimumo (bangos ilgio vertei esant ties 634 nm) ir savitosios fluorescencijos maksimumo (bangos ilgio vertei esant ties 510 nm). 634 ir 510 nm tai yra šviesos bangos ilgio vertės, ties kuriomis yra fluorescencijos smailė:

$$R = \frac{I_{634}}{I_{510}}$$

Šis santykis sumažina paklaidas atsirandančias dėl tyrimo atlikimo technikos.

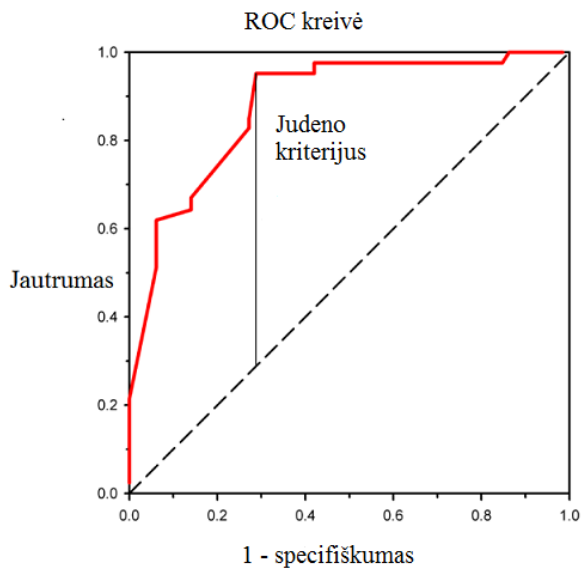
6. D - diagnostinis koeficientas – santykis tarp kiekvieno gimdos kaklelio kvadranto R ir tai pačiai pacientei apskaičiuoto sveiko gimdos kaklelio audinio R:

$$D = \frac{R \text{ (GK kiekvieno kvadranto)}}{R \text{ (sveiko GK audinio)}}$$

Šis santykis sumažina paklaidas, atsirandančias dėl individualių kiekvienos moters organizmo savybių.

7. Judeno kriterijus yra labiausiai nuo diagonalės nutolęs ROC kreivės taškas. Pagrindinė Judeno kriterijaus prasmė yra maksimaliai išnaudoti skirtumą tarp teisingai teigiamų (TT) atvejų dažnio (jautrumas) ir klaidingai teigiamų (KT) atvejų dažnio (1- specifiškumas). Judeno kriterijaus vertė dalija tiriamus atvejus

į dvi reikšmingai besiskiriančias grupes, kai tyrimo jautrumo ir specifiškumo rodikliai yra geriausi.



Skiriamąja verte pasirenkama ta, kuriai esant Judeno kriterijus yra maksimalus.

$$J = \max (\text{jautrumas } (c) + \text{specifiškumas } (c) - 1)$$

čia J – Judeno kriterijus; c – skiriamoji vertė; jautrumas (c) – jautrumas esant c skiriamajai vertei; specifiškumas (c) – specifiškumas esant c skiriamajai vertei.

8. Diagnostinė vertė (skaitinė jos vertė) – tai didžiausia apskaičiuota D vertė tiriamoje srityje (visame gimdos kaklelyje arba atskirame gimdos kaklelio kvadrante).

Didžiausia (sensibilizacinės fluorescencijos atveju) arba mažiausia (savitosios fluorescencijos atveju) diagnostinė vertė pasirenkama todėl, kad ir histologinio tyrimo („auksinio standarto“) diagnozė taip pat pateikiama pagal žymiausią nustatytą patologiją (pvz.: jei viename kvadrante nustatyti pakitimai CIN 1 ir CIN 3 – bendra diagnozė yra - CIN 3).

Klinikinis gimdos kaklelio diagnostikos tikslas yra nustatyti didelės rizikos pakitimų buvimą arba nebuvimą, kadangi nuo to priklauso gydymo taktikos pasirinkimas.

9. Skaitinė skiriamoji vertė – tai nepriklausoma vertė (rizikos lygio riba), pagal kurios dydį tiriamosios gimdos kaklelio sritys atliekant sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopiją skirstomos į turinčias didelės ir turinčias mažos rizikos pakitimų.

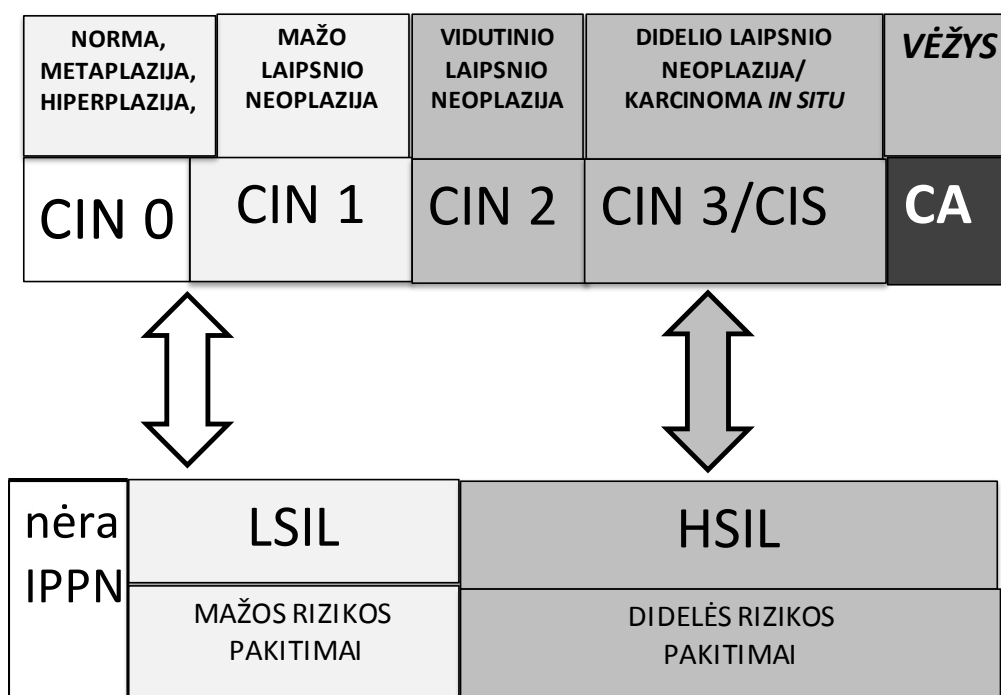
1. ĮVADAS

1.1. Tiriamoji problema

Nuolat daugėja šiuolaikinės medicinos laimėjimų kuriant įvairias priemones, skirtas išvengti vėžio, jį gydyti ir išgydyti, tačiau onkologinės ligos tebeišlieka itin aktuali visuomenės sveikatos problema. Kasmet pasaulyje užregistruojama apie 12,7 mln. naujų vėžio atvejų ir apie 7,6 mln. mirčių dėl šios ligos [1]. Gimdos kaklelio vėžys yra pirmaujančiose vietose tarp dažniausiai moterims diagnozuojamų onkologinių ligų, taip pat ir moterų mirtingumo dėl piktybinių ligų priežasčių [1].

Gimdos kaklelio intraepitelinė neoplazija – tai gimdos kaklelio epitelio ikivėžinė būklė, laipsniškai besivystanti į vėžį. Šis procesas, moteriai nesukeldamas beveik jokių nusiskundimų, tęsiasi kelerius ar keliolika metų, todėl laiku diagnozavus ikivėžines būkles galima išvengti onkologinės ligos atsiradimo [2, 3, 4, 5, 6]. Daugelyje pasaulio šalių vykdoma prevencinė atrankinė gimdos kaklelio patikros programa, kuri ženkliai sumažino sergamumą ir mirtingumą dėl gimdos kaklelio vėžio [3, 7, 8]. Lietuvoje prevencinė atrankinė gimdos kaklelio patikros programa pradėta vykdyti 2004 m. Patikros programos tikslas – anksti diagnozuoti ikivėžines gimdos kaklelio būkles, kada, aptikus citologinių pokyčių gimdos kaklelyje, esant indikacijoms, kontroliuojant kolposkopu, atliekama tikslinė biopsija. Visoms 25-60 m. amžiaus moterims kas trejus metus yra atliekamas gimdos kaklelio citologinis tyrimas [4, 9]. Gimdos kaklelio ikivėžinėms būklėms apibūdinti citologiniame tyrime vartojami terminai „nežymūs plokščialąsteliniai intraepiteliniai pokyčiai” – tarptautinė santrumpa LSIL (angl. *low grade squamous intraepithelial lesion*) ir „žymūs plokščialąsteliniai intraepiteliniai pokyčiai” - tarptautinė santrumpa HSIL (angl. *high grade squamous intraepithelial lesion*). Radus pakitimų gimdos kaklelio citologiniame tyrime moteris pasiunčiama atlikti kolposkopiją ir gimdos kaklelio biopsiją, t.y. patikslinti diagnozę. Kolposkopijos tikslas atpažinti skirtumus tarp sveiko ir pakitusio gimdos kaklelio epitelio bei pasirinkti vietas

biopsijai. Gimdos kaklelio ikivėžinėms būklėms, nustatytoms histologinio tyrimo metodu, apibūdinti vartojami terminai: trijų laipsnių (mažo, vidutinio ir didelio laipsnio) intraepitelinė gimdos kaklelio neoplazija (angl. *cervical intraepithelial neoplasia*) – CIN 1-3 ir CIS (angl. *carcinoma in situ*) [4]. Pirmajame paveiksle pavaizduoti citologiniu ir histologiniu tyrimais nustatytų diagnozių atitikimai. Pagrindinis atliekamų tyrimų tikslas yra diagnozuoti didelės rizikos, t.y. \geq CIN 2 pokyčius, kadangi, gimdos kaklelyje radus žymių pakitimų, moteriai reikia atlikti pakitusių plotų pašalinimą, t.y. intervencinę procedūrą (gimdos kaklelio konizaciją elektros kilpa, skalpeliu ar destrukciją lazeriu ir kt.).



CIN 0 – nenustatyta neoplazijos požymių; CIN 1 – mažo laipsnio neoplazija; CIN 2 – vidutinio laipsnio neoplazija; CIN 3 – didelio laipsnio neoplazija; LSIL – nežymūs plokščialąsteliniai intraepiteliniai pokyčiai; HSIL- žymūs plokščialąsteliniai intraepiteliniai pokyčiai; nėra IPPN – nėra intraepitelinė pakitimų ar piktybinio naviko.

1 pav. Citologinių ir histologinių gimdos kaklelio audinių tyrimų atitikimas

Didžiausias šių intervencinių gydymo metodų šalutinis poveikis yra žymi gimdos kaklelio stromos destrukcija, dėl kurios gali atsirasti komplikacijų – gimdos kaklelio striktūra, nepakankamumas. Tokios komplikacijos sąlygoja tai, kad kartais nėštumas nutrūksta prieš laiką, gimdymą tenka užbaigti cezario pjūvio operacija ar kt. [10, 11]. Gimdos kaklelio ikivėžinės būklės dažniau diagnozuojamos jauno ir vidutinio amžiaus moterims (t.y. reprodukcinio amžiaus), todėl yra svarbu gimdos kaklelio intervencinėms procedūroms turėti kuo labiau pagrįstas indikacijas.

Pagrindiniai ikivėžinių gimdos kaklelio būklių aptikimo trūkumai yra gana didelis klaidingai neigiamų citologinio tyrimo rezultatų skaičius bei mažas kolposkopijos specifiškumas [13, 14, 15, 16, 17, 18]. Suprantama, kad yra reikalingi nauji diagnostiniai metodai, leidžiantys tiksliau diagnozuoti ikivėžines gimdos kaklelio būkles bei išvengti nebūtinų chirurginių procedūrų. Mokslininkų siekinys yra greitų, jautrių, nebrangių ir neinvazinių diagnostikos metodų, kurie sudarytų galimybę diagnozuoti ir gydyti didelės rizikos gimdos kaklelio ikivėžines būkles vieno pacientės apsilankymo pas ginekologą metu, radimas.

Pastaruoju metu daug dėmesio skiriama optiniams diagnostiniams metodams. Susidomėjimą šiais metodais didina jų neinvazinis pobūdis, didesnis jautrumas ir skiriamoji geba, palyginti su įprastais diagnostikos metodais. Optiniais metodais galima aptikti morfologinius ir biocheminius gimdos kaklelio epitelio pokyčius realiu tyrimo laiku ir išvengiant chirurginės invazijos. Dauguma optinių tyrimų naudojamų diagnostikoje, remiasi įvairių tipų spektroskopija: atspindžio spektroskopija [19, 20, 21], fluorescencijos spektroskopija [22, 23, 24, 25], Ramano sklaidos spektroskopija [26, 27].

Optinės technologijos turi didelį pritaikymo klinikinėje praktikoje potencialą. Gimdos kaklelio ikivėžinių būklių diagnostika vieno apsilankymo metu („matau ir gydau“), nereikalaujanti papildomų pacientės vizitų, sutaupytų laiko ir lėšų. Visa tai ypač aktualu ekonomiškai silpnose šalyse. Šiuo laikotarpiu, viena iš daugiausiai žadančių naujų diagnostinių priemonių yra optinė biopsija. Terminas „optinė biopsija“ taikomas įvairioms technologijoms, kai atliekama

šviesos ir audinio sąveika, siekiant nustatyti audinio morfologiją, bet neatliekant audinio biopsijos histologiniam tyrimui atlikti [28, 29, 30, 31, 32]. Optinės biopsijos metodai pasižymi diagnostikos efektyvumu, optimaliais kaštais, nesudėtingu procedūros atlikimu. Svarbiausia, kad optinės biopsijos tyrimas yra neinvazinis, todėl gali būti kartojamas kelis kartus, tinka diagnostikai ir stebėjimui po gydymo. Dauguma optinės diagnostikos metodų remiasi fluorescencijos reiškiniu.

Audiniai, kuriuose vyksta kancerogenezės procesai, skiriasi nuo sveikų savo morfologija ir ląstelių augimo greičiu, dėl to taip pat skiriasi ir jų optinės charakteristikos. Pakitusių audinių spektrų skirtumai atsiranda dėl patologijos nulemtų fluorescencinių medžiagų sudėties pokyčių [30, 32]. Tam, kad matytųsi ryškesnis kontrastas tarp sveikų ir patologinių audinių, gali būti naudojamos egzogeninės fluorescencinės medžiagos arba jų pirmtakai (pvz., 5-aminolevulininė rūgštis (5-ALA)). Fluorescencinės diagnostikos metodai šiuo metu tiriami kaip viena iš progresyvių priemonių, diagnozuoti įvairias ginekologines patologijas, tokias kaip gimdos kaklelio, vulvos intraepitelinė neoplazija, endometriozę, krūties bei kiaušidžių vėžį [33, 34, 35, 36, 37, 38].

Sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos metodas, lokaliai naudojant 5-ALA, kaip sensibilizuojančią medžiagą, labiausiai atitinka mūsų išskeltus tikslus, t.y. šis metodas gali būti neinvazinė gimdos kaklelio neoplazijos diagnozavimo priemonė, leidžianti aptikti pakitusį audinį bei pasižyminti mažu toksiškumu sveikiems audiniams.

5-ALA yra endogeninė medžiaga, hemo pirmtakas įvairiose organizmo ląstelėse, ji metabolizuojama iki protoporfirino IX (PpIX), kuris yra endogeninis fluoroforas. Sensibilizacinės fluorescencinės diagnostikos metodas yra naudojamas ikivėžinių būklių, navikų bei jų recidyvų ankstyvojoje diagnostikoje, taip pat gydymo metu, nustatant tikslias naviko ribas. Tai perspektyvus metodas onkologijoje, tačiau jo metodikos tiriant gimdos kaklelio ikivėžines būkles nėra visuotinai patvirtintos, o metodas taikomas tik klinikinių tyrimų metu. Vertinant šio metodo specifiškumą ir jautrumą tiriant gimdos

kaklelio patologiją yra sukaupta nepakankamai duomenų, todėl svarbu atlikti tyrimus ir nustatyti gimdos kaklelio ikivėžinių būklių sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos metodo diagnostinę vertę (jautrumą, specifiškumą, tikslumą, teigiamą prognozinę vertę ir neigiamą prognozinę vertę) bei įvertinti metodo ypatumus.

1.2. Darbo aktualumas

Lietuvoje sergamumas gimdos kaklelio vėžiu didžiausias Baltijos šalių regione ir Rytų Europoje antroje vietoje po Rumunijos [39]. 2004 m. Lietuvoje buvo pradėta ir toliau tęsiama atrankinės patikros dėl gimdos kaklelio patologijos programa, kurioje naudojamas profilaktinis testas - citologinis gimdos kaklelio tyrimas. Pagal gimdos kaklelio citologinio tyrimo rezultatą atrenkamos moterys, kurioms reikalingas detalesnis ištyrimas: kolposkopija, histologinis tyrimas ar aktyvus stebėjimas. Diferencijuojant gimdos kaklelio patologijas kolposkopijos jautrumas yra didelis, tačiau specifiškumas mažas. Žinoma, kad kolposkopijos tikslumas tiesiogiai priklauso nuo tiriančiojo klinikinės patirties [6, 40, 41, 42, 43]. Todėl diagnozei patvirtinti tenka atlikti gimdos kaklelio intervencinius diagnostinius tyrimus ne visada pagrįstai.

Pastaruoju metu atliekami klinikiniai tyrimai ieškant metodų, padedančių objektyviau diagnozuoti gimdos kaklelio ikivėžines būkles neinvaziniu būdu [12]. Atliekant tokį tyrimą pakitimus turėtų būti galima atpažinti be histologinio tyrimo (t.y. neatliekant biopsijos) ir tyrėjo klinikiniai įgūdžiai turėtų kuo mažiau lemti tyrimo rezultatus. Daugėja tyrimų, kurių tikslas analizuoti fluorescencijos spektroskopijos diagnostinę vertę tiriant gimdos kaklelio ikivėžines būkles. Nustatyta, kad sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos metodas yra tinkamas tirti biocheminius ir struktūrinius pakitimus audiniuose, kurie atsiranda vystantis ikivėžinėms būklėms ir vėžiui. Taigi šis metodas tinka „optinei biopsijai“ atlikti.

1.3. Darbo tikslas

Įvertinti sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos metodo tikslumą diagnozuojant ikivėžines gimdos kaklelio būkles *in vivo*.

1.4. Darbo uždaviniai

1. Išmatuoti savitosios fluorescencijos intensyvumą tiriamuosiuose gimdos kaklelio audinio *in vivo* ir apskaičiuoti skiriamąją vertę didelės rizikos ikivėžiniams gimdos kaklelio pakitimams diferencijuoti.

2. Išmatuoti sensibilizacinės fluorescencijos intensyvumą gimdos kaklelio audiniuose *in vivo* ir apskaičiuoti šio metodo skaitinę skiriamąją vertę (rizikos lygio ribą) didelės rizikos ikivėžiniams gimdos kaklelio pakitimams nustatyti.

3. Palyginti sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos, kolposkopijos ir šių metodų derinio tikslumą bei įvertinti sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos metodo tinkamumą diagnozuojant didelės rizikos ikivėžinius gimdos kaklelio pakitimus.

1.5. Ginamieji teiginiai

1. Savitosios fluorescencijos spektroskopija yra tinkamas metodas didelės rizikos ikivėžiniams gimdos kaklelio pakitimams diagnozuoti, tačiau metodo tikslumą sąlygoja matavimo sąlygos (šviesolaidžio zondo priglaudimo kampas, prispaudimo stiprumas, organizmo skysčiai esantys matavimo vietoje, patalpos apšvietimas ir kt.).

2. Sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos verčių normavimas į savitosios fluorescencijos vertes leidžia sumažinti gautų pacientės gimdos kaklelio audinio fluorescencijos intensyvumų santykių išsibarstymą, o gauto

santykio papildomas normavimas į sveiko audinio fluorescencijos vertę leidžia sumažinti diagnostinių koeficientų išsibarstymą tarp pacienčių.

3. Sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopija yra objektyvus ir didelės klinikinės patirties nereikalaujantis tyrimo metodas, kurio tikslumas nustatant didelės rizikos pakitimus gimdos kaklelyje yra didesnis nei kolposkopijos metodo.

1.6. Darbo mokslinis naujumas

Įprastinis tyrimo metodas įtariant gimdos kaklelio ikivėžines būkles, yra kolposkopija. Šio tyrimo trūkumas - nepakankamas tikslumas, kuris labiausiai priklauso nuo gydytojo klinikinės patirties [12, 35, 44]. Tiriant ikivėžines gimdos kaklelio būkles, kliniškai svarbiausia nustatyti pakitimus, kurių atveju yra didelė rizika išsivystyti gimdos kaklelio vėžiui. Nustačius didelės rizikos pakitimus reikia atlikti diagnostines ir gydomąsias intervencines procedūras (biopsija, konizacija), o jų nenustačius – pacientėms reikalingas tik stebėjimas. Taigi tiksliau diagnozuodami didelės rizikos pakitimus, taip pat galime išvengti nereikalingų intervencijų.

Diagnostikos taikant sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopiją tikslas – atpažinti ir diferencijuoti audinius esant ikivėžinėms būklėms, panaudojus sensibilizuojančią medžiagą (šiuo tyrime 5-ALA). Šiuo metu mokslinių – klinikinių duomenų apie pakitusio gimdos kaklelio audinio sensibilizacinės fluorescencijos matavimus *in vivo* dar nepakanka, šio perspektyvaus tyrimo metodikos visuotinai nėra patvirtintos, todėl šiame darbe buvo atlikti tokių gimdos kaklelio audinio sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos tyrimai bei įvertintas šio metodo tikslumas atskiriant didelės rizikos ikivėžines būkles. Atlikti gimdos kaklelio audinių fluorescencijos spektrų matavimai prieš ir po sensibilizuojančios medžiagos naudojimo, nustatyta skaitinė skiriamoji vertė, leidžianti atskirti didelės rizikos ikivėžines gimdos kaklelio būkles tiriant juos

sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos metodu. Taip pat palyginti tarpusavyje kolposkopijos ir sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos jautrumas, specifiškumas, tikslumas, teigiamos ir neigiamos prognozinės vertės, išanalizuotos netinkamų ir neapibrėžtų diagnozių priežastys.

Mokslinio darbo metu Lietuvoje gimdos kaklelio ikivėžinių būklių diagnostikai pradėta taikyti sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopija naudojant sensibilizuojantį preparatą 5-ALA ir nustatyta, kad sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopija yra objektyvus tyrimas, tinkamas taikyti klinikinėje praktikoje, gimdos kaklelio didelės rizikos pakitimams identifikuoti, t.y. atlikti optinę biopsiją.

1.7. Autoriaus indėlis

Šio darbo autorė parengė tyrimo protokolą bei dokumentus Biomedicininį tyrimų etikos komiteto leidimui atlikti tyrimą. Disertantė vykdė tiriamųjų pacienčių apklausą, apžiūrą, kolposkopinių vaizdų vertinimą, savitosios bei sensibilizacinės fluorescencijos spektrų registravimą (darbas tiesiogiai su paciente), biopsijų iš gimdos kaklelio atlikimą, duomenų bazės pildymą. Autorė analizavo ir interpretavo gautus tyrimo rezultatus, su bendraautoriais parengė tris mokslinius straipsnius disertacinio darbo tema.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

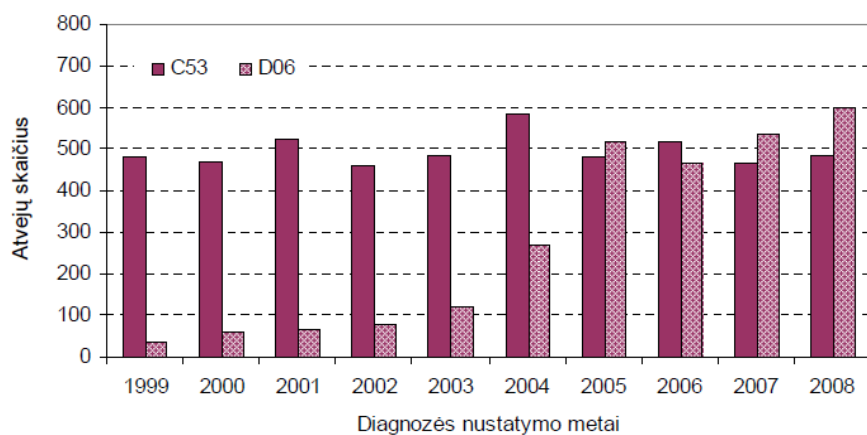
2.1. Literatūros paieška

Literatūros šaltinių paieška atlikta naudojant PUBMED, COCHRANE DATABASE elektroninės bibliografijos duomenų šaltinius. Duomenų ieškota literatūros šaltiniuose anglų, lietuvių kalbomis. Pagrindiniai paieškos žodžiai: “*cervical neoplasia diagnostics*”, “*cervical precancer optical diagnostics*”, “*cervical neoplasia sensitized fluorescence diagnostics*”, “*cervical neoplasia autofluorescence*“, “*cervical neoplasia spectroscopy*”, “*gynecology fluorescence diagnostic*“, „*cervical neoplasia photodynamic diagnostics*”,

“*cervical neoplasia fluorescence imaging*” „gimdos kaklelio neoplazija“, „gimdos kaklelio diagnostika“, „optinė biopsija“, „fluorescencinė diagnostika“ ir kt. Taip pat naudotasi Lietuvos mokslinių medicininių žurnalų, disertacinių darbų bei tarptautinių konferencijų spausdinta medžiaga.

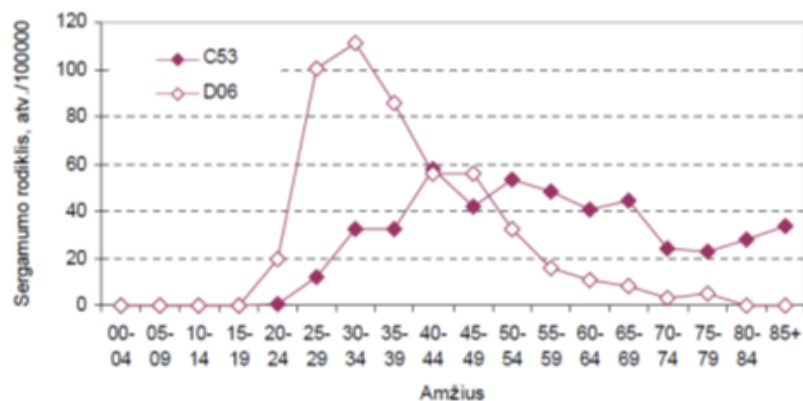
2.2. Gimdos kaklelio ikivėžinės būklės ir vėžys

Pasaulyje gimdos kaklelio vėžys pagal dažnumą yra ketvirtoje vietoje tarp moterų onkologinių ligų. 2012 m. diagnozuota 528000 naujų šios ligos atvejų. 85 % gimdos kaklelio vėžio atvejų užregistruojama ekonomiškai silpnesnėse pasaulio šalyse [45]. 2012 m. pasaulyje užregistruotos 266000 mirtys dėl gimdos kaklelio vėžio, tai yra 7,5 % iš visų moterų mirčių priežasčių. Nors onkologinėmis ligomis dažniau serga vyresnio amžiaus žmonės, būtent gimdos kaklelio vėžys paplitęs tarp jauno ir vidutinio 35–50 metų amžiaus moterų [45]. Žinoma, kad gimdos kaklelio ikivėžinės būklės laipsniškai gali tapti vėžiu. Šis procesas, dažniausiai nesukeldamas moteriai jokių nusiskundimų, vystosi kelerius ar keliolika metų, todėl laiku diagnozavus ikivėžines būkles ir laiku išgydžius nustatytus pažeidimus galima išvengti onkologinės ligos atsiradimo [3, 6, 46, 47]. 2004 m. Lietuvoje pradėjus vykdyti atrankinės patikros dėl gimdos kaklelio patologijos programą, gerokai padidėjo naujai nustatytų gimdos kaklelio vėžio atvejų skaičius, o 2005–2008 m. CIN 3/CIS atvejų skaičius pralenkė invazinio gimdos kaklelio vėžio atvejų skaičių (2 ir 3 pav.) [48]. Tai galime paaiškinti tuo, kad patikrinta daugiau moterų, neturinčių jokių skundų (žinoma, kad į gydytoją dažniau kreipiamasi esant skundų) ir dėl to daugiau diagnozuota gimdos kaklelio patologinių pakitimų nei įprastai. Tai pat nustatyta ir daugiau ankstyvųjų stadijų gimdos kaklelio vėžio bei ikivėžinių gimdos kaklelio būklių, t.y. liga nustatyta ankstyvosios stadijos ir išgydžius nustatytus pažeidimus išvengta invazinių pakitimų ar išplitusios onkologinės ligos.



CIN 3/CIS - didelio laipsnio neoplazija ir carcinoma in situ, C53- gimdos kaklelio vėžio ir D06- gimdos kaklelio carcinoma in situ (pagal Tarptautinę ligų klasifikaciją TLK -10)

2 pav. Gimdos kaklelio vėžio (C53) ir CIN 3/CIS (D 06) atvejų skaičiaus pokyčiai Lietuvoje 1999 - 2008 m [48]



C53-gimdos kaklelio vėžio ir D06-gimdos kaklelio carcinoma in situ (pagal Tarptautinę ligų klasifikaciją TLK -10).

3 pav. Sergamumo gimdos kaklelio carcinoma in situ ir vėžiu rodikliai Lietuvoje 2008 m. amžiaus grupėse [48]

Lietuvos vėžio registro duomenys rodo, kad sergamumas gimdos kaklelio vėžiu siekia 19–23 atvejus 100 000 gyventojų, o mirtingumas 6–8 atvejų 100 000 gyventojų [48], 2011 m. buvo užregistruoti 452 nauji gimdos kaklelio vėžio atvejai [49]. Lietuvoje sergamumo gimdos kaklelio vėžiu rodiklis didžiausias, palyginti su šiuo rodikliu Baltijos bei Skandinavijos šalyse [50]. Tokie duomenys dar kartą atkreipia mūsų dėmesį, kaip svarbu laiku diagnozuoti pavojingus gimdos kaklelio pakitimus ir drauge atlikti tai kuo tiksliau, siekiant išvengti tiriamųjų psichologinio streso bei nereikalingų invazinių procedūrų.

Svarbų vaidmenį užima atrankinės gyventojų sveikatos būklės patikros, dėl kurių įdiegimo daugelyje šalių ženkliai sumažėjo sergamumo ir mirtingumo nuo gimdos kaklelio vėžio, rodikliai [3, 39, 48].

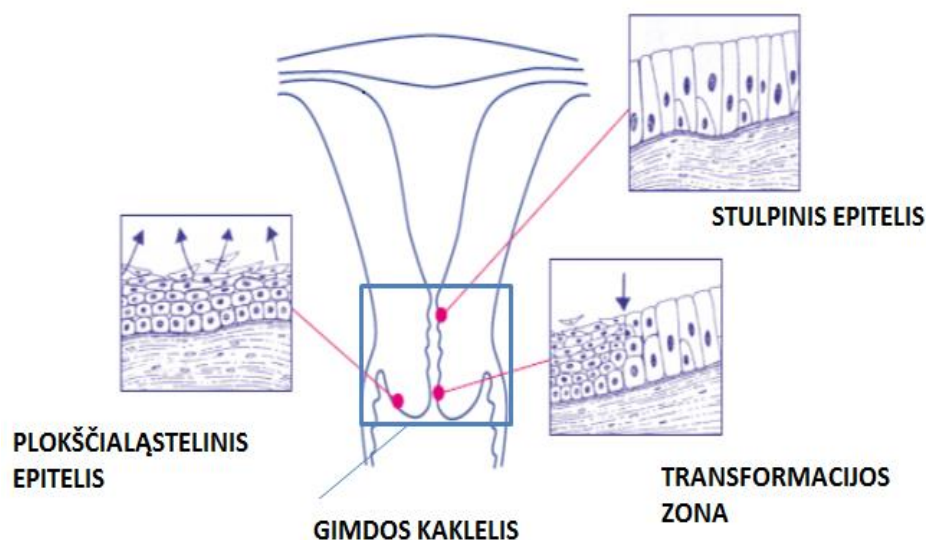
2008 m. *H. Zur Hauseno*, Nobelio premijos laureato, įrodytas žmogaus papilomos viruso (ŽPV) vaidmuo gimdos kaklelio kancerogenezeje leido pažvelgti į gimdos kaklelio vėžį kaip į infekcinę lytiniu keliu plintančią ligą. Jau yra sukurtos ir naudojamos vakcinos, apsaugančios nuo plačiausiai paplitusių didelės (16, 18 tipai) ir mažos (6, 11 tipai) rizikos tipų ŽPV. Tai papildo pirminės vėžio profilaktikos priemonės. Vakcinos, apsaugančios nuo minėtų tipų ŽPV sukeltų patologijų, daugiausia skirtos mergaitėms ir berniukams (pradedama skiepyti nuo 9 metų), taip pat rekomenduojama skiepyti ir vyresniame amžiuje [51].

Derinant šias dvi profilaktikos priemones – vakcinaciją ir moterų patikrą t.y. atliekant citologinį gimdos kaklelio tyrimą, galima išvengti ženklios gimdos kaklelio vėžio atvejų dalies [52].

Siekdami paaiškinti ikivėžinių būklių patogenezę iš pradžių trumpai aptarsime gimdos kaklelio anatomines ypatybes. Gimdos kaklelis yra apatinė gimdos kūno dalis, jo ilgis 2–3 cm. Gimdos kaklelio viduje yra siauras kanalas, kuris vidinėmis žiotimis atsiveria į gimdos ertmę, išorinėmis - į makštį. Išorinė gimdos kaklelio dalis yra išklota daugiasluoksniu neragėjančiu plokščiuoju epitelium, kurio brendimą skatina estrogenai. Epitelis nuo gimdos kaklelio stromos atskirtas plona jungiamojo audinio juostele – bazine membrana.

Vidinė gimdos kaklelio dalis išklota liaukiniu epitelium, kurį sudaro vienos eilės, gleives (muciną) sekretuojančios stulpinės ląstelės. Liaukinis epitelis 5 mm. gylyje įlinksta į gimdos kaklelio stromą ir formuoja endocervikines liaukas.

Ginekologinės apžiūros metu matyti, kad didžiąją dalį išorinio gimdos kaklelio paviršiaus dengia šviesiai rausvos spalvos epitelis (plokščiasis daugiasluoksnis). Liaukinis epitelis sudarytas iš paprastų stulpinių ląstelių, yra raudonos spalvos, iškloja gimdos kaklelio kanalą ir siekia išorinę gimdos kaklelio dalį. Riba, kurioje susisiečia abiejų tipų epiteliai, vadinama jungtimi. Didėjant moters amžiui, veikiant hormoniniams pokyčiams jos organizme, vyksta stulpinio epitelio ląstelių virtimas plokščiuoju epitelium (šis procesas vadinamas metaplazija) ir dėl to jungtis kyli gimdos kaklelio kanalo link. Pastebėta, kad ikivėžiniai gimdos kaklelio pakitimai prasideda transformacijos (pasikeitimo) zonoje (TZ). Transformacijos zona – tai gimdos kaklelio sritis (4 pav.), kurioje susitinka vienasluoksnis stulpinis ir daugiasluoksnis plokščiasis epitelis, joje vyksta aktyvi metaplazija [4].



4 pav. Gimdos kaklelį dengiančio epitelio tipai ir jų jungties vieta - transformacijos zona

Neoplazija yra sutrikęs epitelio augimas ir vystymasis. Sutrikus normaliam metaplazijos procesui vystosi daugiasluoksniu plokščiojo epitelio neoplazija ir šis patologinis procesas iš pradžių neišplinta už epitelio bazinės membranos ribų. Gimdos kaklelio neoplazija skirstoma į tris laipsnius (CIN 1-3) atsižvelgiant į neoplaziškai pakitusio (matomas padidėjęs ląstelės branduolys, daugėja nebrandžių ląstelių) epitelio gylį (CIN 1 – pakitimai matomi tik epitelio viršutiniame trečdalyje, CIN 2 - pakitimai apima 2/3 epitelio storio, CIN 3 – pakitimai matomi per visą epitelio sluoksnį iki bazinės membranos). Neoplazijos procesui pažeidus bazinės membranos sluoksnį prasideda invaziniai pokyčiai [4, 6].

Pagrindinis šiuo metu atliekamų mokslinių tyrimų tikslas yra diagnozuoti \geq CIN 2 pokyčius. Svarstoma, ar histologiškai patvirtinus CIN 2 pokyčius galima vadinti didelės rizikos būkle, nes tokia diagnozė rodo tarpinį variantą tarp didelio laipsnio (CIN 3) ir mažo laipsnio (CIN 1) intraepitelinių pokyčių gimdos kaklelyje, o jų gali atsirasti tiek dėl mažos, tiek dėl didelės rizikos genotipų ŽPV infekcijos [47]. Jei atliekant histologinį tyrimą randami CIN 2 pokyčiai, o ŽPV nerandama, tai tokia būklė gali būti apibrėžta kaip CIN 1 ir CIN 3 pokyčių derinys, tačiau jei nustatomas 16 ŽPV tipas, tai CIN 2 pokyčiai jau laikomi didelės rizikos ikivėžine būkle [53].

Daugumoje naujausių tyrimų, kurių metu nagrinėjama histologiškai patvirtintų didelio laipsnio intraepitelinių pokyčių regresija, nepateikiama CIN 2 bei CIN 3 diagnozių atskirai. Praktikoje histologai atskirais atvejais nurodo nevisai tikslius histologinius atsakymus: „CIN 1–2“ arba „CIN 2–3“. Europos šalių rekomendacijose CIN 2 ir CIN 3 siūloma atskirti, Pasaulio sveikatos organizacija šiuos du histologinius vienetus klasifikuoja atskirai [46, 54, 55]. Histologiškai patvirtintas CIN 3 yra svarbiausias veiksnys, rodantis invazinio gimdos kaklelio vėžio riziką [46, 56].

2.3. Gimdos kaklelio ikivėžinių būklių diagnostikos metodai

Gimdos kaklelio neoplazijos požymiai dažniausiai aptinkami atliekant citologinį tyrimą profilaktiškai (t.y. moterims, kurios neturi jokių nusiskundimų). Citologiniu tyrimu nustčius pakitimų, moterys siunčiamos atlikti kolposkopiją ir biopsiją (pastarąją, jei atliekant kolposkopiją randama pakitimų).

Kolposkopija yra išorinių lyties organų, makšties bei gimdos kaklelio makštinės dalies apžiūra optiniu (vaizdą didinančiu 8-50 kartų) prietaisu (kolposkopu). Kolposkopija atliekama gimdos kaklelio patologijai diagnozuoti, kai, kaip minėta, citologiniame tyrime randama neoplazijos požymių. Atliekant šį tyrimą kolposkopas statomas apie 15-20 cm. atstumu nuo moters, gulinčios ant ginekologinės kėdės, įjungiamas apšvietimas. Naudojant sterilius instrumentus ir medžiagas, tamponu nuo gimdos kaklelio nuvalomos gleivės, žiūrint pro kolposkopo okuliarus sureguliuojamas vaizdas (galima keisti optinės sistemos didinimo ir mažinimo režimą bei spalvotus filtrus, kad išryškėtų kraujagyslių piešinys). Gimdos kaklelio paviršius suvilgomas 3 % acto rūgšties tirpalu, tuomet išryškėja liaukų angos, epitelio ektopijos, neoplazijos vietos. Gimdos kaklelio vaizdai fotografuojami ir archyvuojami kompiuteryje. Pagrindiniai gydytojo uždaviniai atliekant kolposkopiją yra: nustatyti tikslią TZ lokalizaciją, patvirtinti arba paneigti citologiškai nustatytą neoplazijos laipsnį, esant reikalui surasti vietas tikslinei biopsijai atlikti, atpažinti arba atmesti invazinius pokyčius, stebėti ikivėžinių būklių regresiją ar progresiją.

Šiuo metu tobulinamos skaitmeninės kolposkopijos technologijos, taikoma videokolposkopija, tyrimo metu yra galimybė padidinti, archyvuoti ir pakartotinai peržiūrėti gimdos kaklelio vaizdus, atsirado galimybės naudoti telekolposkopiją, t.y. persiūsti tyrimų vaizdus į kitą gydymo įstaigą, kad patologiją galėtų vertinti keli specialistai. Dėl to sumažėja diagnostinių klaidų kiekis. Patogus skaitmeninės kolposkopijos duomenų archyvavimas bei galimybė po gydymo palyginti tyrimų vaizdus. Tai svarbu klinikinėje praktikoje bei mokant medicinos darbuotojus [29].

Jeigu moteriai citologinio tyrimo metu aptinkami HSIL, yra rizika, kad negydomi pakitimai gimdos kaklelyje pradės vystytis į vėžį. Citologinis gimdos kaklelio tyrimas yra atrankinis tyrimas nustatant ikivėžines gimdos kaklelio būkles. Nacionalinės gimdos kaklelio patikros (Jungtinė Karalystė) kolposkopinio tyrimo rekomendacijose (NHSCSP angl. *National Health Service Cervical Screening Programme*) nurodoma, kad kolposkopijos tyrimo tikslumas yra tik 65 % [57]. Galutinė išvada diagnozuojant ikivėžines būkles padaroma atlikus pašalintų gimdos kaklelio audinių histologinį tyrimą. Pasirenkant chirurginį gimdos kaklelio gydymo būdą dažniausiai atliekamos ekscizinės gimdos kaklelio procedūros t.y. atliekama gimdos kaklelio konizacija diatermine kilpa, pašalinant gimdos kaklelio dalį, kurioje yra TZ. Histologinio tyrimo metu vientisame gimdos kaklelio audinio konuse galima tiksliai įvertinti intraepitelinės gimdos kaklelio neoplazijos topografiją, pažeistų gimdos kaklelio kvadrantų kiekį, intraepitelinės neoplazijos santykį su endocervikinėmis liaukomis ir operacinio pjūvio kraštų būklę bei taip nustatyti galutinę diagnozę. Siekiama, kad tiriant pacientę dėl ikivėžinės gimdos kaklelio būklės kolposkopiją atliktų patyręs specialistas, tačiau net ir patyręs kolposkopuotojas gali nepastebėti kai kurių CIN 2/CIN 3 gimdos kaklelio pokyčių dėl plono epitelio sluoksnio, uždegiminių pokyčių, anatominių gimdos kaklelio ypatybių [59]. Pirmojoje lentelėje pateikiami literatūros apžvalgų duomenys apie gimdos kaklelio citologinio, histologinio tyrimo ir kolposkopijos tikslumo rodiklius. Iš pateiktų duomenų matyti, kad atlikus didelės apimties tyrimų analizę nustatomas žymus tikslumo rodiklių variavimas. Metodo jautrumas ir specifiškumas tiesiogiai priklauso nuo tiriančiojo klinikinės patirties. Pakitimus gimdos kaklelyje diferencijuojant patyrusiam kolposkopuotojui tyrimo jautrumas yra didelis (96%), tačiau specifiškumas mažas (48 %) [18]. Todėl diagnozei patvirtinti dažnai tenka atlikti gimdos kaklelio biopsijas [15, 40, 41]. Naudojant skaitmeninę kolposkopiją šio metodo specifiškumas gali siekti 88 %, o jautrumas, diagnozuojant mažo ir didelio laipsnio neoplazijas gimdos kaklelyje – 79 %, [14]. Skaitmeninis kolposkopas turi automatizuotą vaizdų analizės

programą, gebančią atpažinti neoplazinius audinių plotus ir pasiūlyti diagnozės variantą.

1 lentelė. Gimdos kaklelio citologinio, histologinio tyrimo ir kolposkopijos tikslumo rodikliai literatūros apžvalgose

	Jautrumas, %	Specifiškumas, %	Tiriamųjų skaičius	Literatūros šaltinis
Citologinis tyrimas	80	99	277842	<i>H.J.Soost</i> ir bendr., 1991 [58]
	30 - 87	86 - 100	12 -os tyrimų apžvalga	<i>K.Nanda</i> ir bendr., 2000 [13]
Kolposkopija	85- 96	48 - 69	9 -ių tyrimų apžvalga (5378)	<i>M.F.Mitchel</i> ir bendr.,1998 [18]
	30 - 90	67- 97	8 –ių tyrimų apžvalga	<i>O.B.Olaniyan</i> ir bendr., 2002 [17]
	96	57	100	<i>R.Zivadovic</i> ir bendr., 2005 [16]
	61 - 86	30 - 94	3040	<i>L.S.Hammes</i> ir bendr., 2007 [15]
Skaitmeninė kolposkopija	85	75	198	<i>G.Mehlhorn</i> ir bendr., 2010 [14]
Histologinis tyrimas	75 - 90	83 – 98	1128	<i>P.D.Palma</i> ir bendr., 2008 [41]

Siekiant didesnio ikivėžinių gimdos kaklelio būklių diagnostikos tikslumo, kuriami įvairūs kolposkopiją papildantys ar galintys ją pakeisti metodai. Pagrindiniai reikalavimai naujam gimdos kaklelio ikivėžinių būklių diagnostikos metodui turėtų būti neinvazinis, greitas ir nesudėtingas atlikimo būdas.

Audinių sudedamąsias dalis neinvaziniu būdu galima įvertinti naudojant optinius metodus, kurie teikia informaciją apie audinių sandarą ląsteliniu ar net molekulinio lygmeniu. Didelis šių metodų jautrumas pasiekiamas naudojant papildomus detektorius, su kurių pagalba yra užregistruojami signalai priklausomi nuo audinių biocheminės sudėties, vykstančių metabolinių procesų ir audinių struktūrinių savybių. Šviesai krintant ant audinių atsispindi nuo audinio paviršiaus, o į audinį patekusi šviesa yra sklaidoma ir sugerama. Po to šviesa gali būti išspinduliuojama arba sukelti šiluminius efektus. Šviesos spindulių šaltinis, dažniausiai ultravioletinio diapazono, sužadina elektronus tam tikrų junginių molekulėse, kurie grįždami į nesužadintas būsenas, energijos perteklių atiduoda išspinduliuodami šviesos kvantus (vyksta fluorescencija). Fluorescencijos spektroskopija analizuoja apšviestame audinyje atsiradusią ir išspinduliuotą šviesą [60].

Audiniai esant jų ikivėžinėms būklėms skiriasi nuo sveikų morfologiškai, t.y. ląstelių forma, dydžiu, branduolio ir citoplazmos santykiu, ląstelių augimo greičiu. Dėl to skiriasi ir optinės audinių charakteristikos [28, 30, 31, 32]. Artimos ultravioletinės ir matomos šviesos bangos ilgiuose, stipriausiai šviesą sugeriantys komponentai gimdos kaklelyje yra oksigenuotas ir deoksigenutas hemoglobinas, esantis stromos kraujagyslėse [61]. Neoplaziniame audinyje atsiranda ženklūs optinių savybių pokyčiai. Stromos absorbcija padidėja dėl angiogenezės ir padidėjusio mikrokraujagyslių tankumo, epitelio sklaida padidėja dėl pasikeitusio citoplazmos ir branduolio santykio bei hiperchromazijos. Stromoje sklaida, priešingai, neoplazijai progresuojant mažėja dėl ekstraceliulinio kolageno ryšių irimo [62].

Pasitelkus spektroskopijos metodą kuriami įvairūs prietaisai, skirti gimdos kaklelio pakitimų diagnostikai. Aptarsime keletą iš jų. Tai LuViva™ (multimodalinis spektrinis vaizdinimas, gimdos kaklelio fluorescencijos ir atspindžio spektrai registruojami *in vivo*), LUMA™ (fluorescencijos, baltos šviesos atspindžio spektroskopijos ir vaizdinimo derinys), DySIS™ (registruoja spektrų pokyčius po acto rūgšties poveikio, taip pat kartu atliekama įprastinė kolposkopija), trimodalinė (trijų metodų) spektroskopija (fluorescencijos,

difuzinio atspindžio ir šviesos sklaidos spektroskopijos derinys), elektrinio impedanso spektroskopija (prietaiso daviklis priglaudžiamas prie audinio ir leidžiant elektros srovę užregistruojama audinio varža), Truscreen® (registruoja gimdos kaklelio audinių atsaką į žadinimą optiniu ir elektriniu būdu, davikliu liečiant gimdos kaklelio paviršių) [60]. Antroje lentelėje pateikiami tyrimų, atliktų su šiais kolposkopiją papildančiais prietaisais bei kolposkopijos atskirai, jautrumo ir specifiškumo duomenys.

2 lentelė. Tyrimai, kurių metu tirti gimdos kaklelio pakitimai įvairiais spektroskopijos būdais

Spektroskopijos prietaisai	Jautrumas, %	Specifiškumas, %	Literatūros šaltinis
	Mažo laipsnio CIN		
	Didelio laipsnio CIN		
LuViva™	95	55–83	<i>D.G.Ferris</i> ir bendr., 2001 [63]; <i>T.DeSantis</i> ir bendr., 2007 [64]
LUMA™	92	50	<i>W.K.Huh</i> ir bendr., 2004 [65]
DySIS™	79	76	<i>W.P.Soutter</i> ir bendr., 2009 [66]; <i>J.Louwers</i> ir bendr., 2011 [67]
Trimodalinė spektroskopija	92	71	<i>I.Georgakoudi</i> ir bendr., 2002 [68]
Elektrinio impedanso spektroskopija	74	53	<i>S.Abdul</i> ir bendr., 2006 [69]
Truscreen®	70	-	<i>A.Singer</i> ir bendr., 2003 [70]
Kolposkopija	61-86	30-94	<i>L.S.Hammes</i> ir bendr., 2007 [15]

S. Hariri Tabrizi [71] su bendraautoriais atliko gimdos kaklelio ikivėžinių būklių optinės spektroskopijos apžvalgą, kurioje buvo išanalizuoti 44 tyrimai, atlikti 1994-2012 metais. Tirtos savitosios fluorescencijos metodų galimybės.

Tyrimuose gauti jautrumai ir specifiškumai yra labai nevienodi, jautrumai varijuoja tarp 52 ir 100 %, specifiškumai tarp 9 ir 100 %. Kadangi savitosios fluorescencijos rezultatai (intensyvumas) priklauso nuo kiekvieno matavimo sąlygų, todėl geresni rezultatai gaunami atliekant ne taškinį tyrimą, o visuminę intensyvumų analizę iš vaizdų (fluorescencijos vaizdinimas).

Nepaisant atliktų tyrimų ir matomų gerų rezultatų, sukaupta dar nepakankamai duomenų apie optinės spektroskopijos taikymą diagnozuojant gimdos kaklelio ikivėžines būkles, nėra suvienodintų tyrimo algoritmų. Žinoma, kad metodas dėl savo neinvazinio pobūdžio bei gaunamo ryškaus kontrasto (identifikuojant ikivėžines būkles ir invazinius pakitimus įvairiuose audiniuose ir organuose) gali turėti svarbų vaidmenį šiuolaikinės medicinos praktikoje. Diegiant šiuos metodus į kasdienę klinikinę praktiką, svarbūs tolesni tyrimai bei glaudus mokslininkų ir medikų bendradarbiavimas [71].

Reikia pažymėti, kad nė vienas iš išvardytų prietaisų nėra plačiai taikomas kasdienėje praktikoje, tačiau keli iš jų jau yra sertifikuoti ir parduodami medicinos įstaigoms, kai kurių dar atliekami klinikiniai tyrimai, kiti tobulinami. Šiuo metu pagrindiniu diagnostikos metodu, citologiniu tyrimu nustatius gimdos kaklelio pakitimų, išlieka kolposkopija, nepaisant to, kad kontroliuojant kolposkopu atliktų biopsijų jautrumas yra apie 70 %, o diagnozuojant ikivėžines būkles gimdos kaklelyje kolposkopijos jautrumas yra 49-85 %, o specifiškumas tik 69 % be to diagnozuojant didelio laipsnio pokyčius dažni klaidingai teigiami atsakymai [18, 40, 66, 67, 72].

2.4. Optinė biopsija

Mokslinėje literatūroje pateikti tyrimų rezultatai ir klinikinė praktika rodo, kad šiuo metu nė vienas iš įprastai naudojamų neinvazinių gimdos kaklelio patologijos nustatymo metodų ar jų derinių neturi pakankamo tikslumo gimdos kaklelio ikivėžinėms būklėms diagnozuoti. Todėl aktyviai ieškoma alternatyvių diagnostikos būdų. Išskirtinį mokslininkų dėmesį šioje srityje traukia vadinamoji optinė biopsija. Optinė biopsija – tai neinvazinis diagnostikos

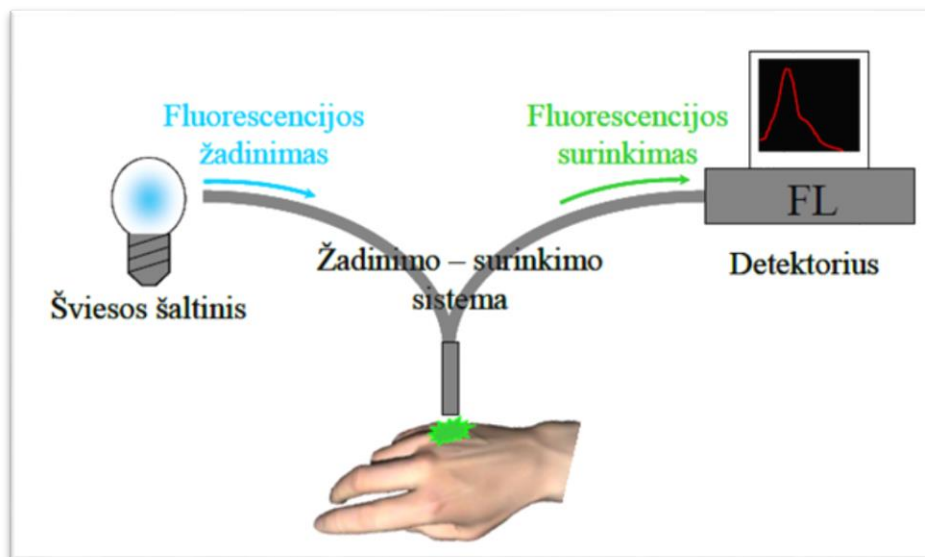
metodas, kurio esmė - audinių optinių savybių tyrimas [31, 73]. Taigi, optine biopsija galima vadinti tyrimo metodus, kuriuos taikant informacija apie tiriamą objektą yra gaunama naudojant optines sistemas. Terminu „biopsija“ yra nurodoma, kad, neatliekant invazinės procedūros, informacija gaunama ne tik atskirų organų lygiu, o audinių struktūros, ląsteliniu ir dar smulkesniu baltyminės sudėties lygiu. Optinei biopsijai atlikti gali būti naudojama fluorescencijos spektroskopija, optinė koherentinė tomografija, infraraudonasis ar fotosensibilizacinis vaizdinimas, mikroskopija *in vivo* ir kt. [28, 29, 30, 31]. Šie metodai yra neinvaziniai, neskausmingi, neturi šalutinio poveikio ir atrodo patraukliai, kadangi leidžia diagnozuoti patologiją ir nustatyti įprastinės biopsijos vietą, jei tai reikalinga. Dažnai optinei biopsijai atlikti yra naudojamas fluorescencijos spektroskopijos metodas. Nors jis ir nėra visiškai naujas, tačiau nuolat tobulėja vystantis medicinos technologijoms.

Fluorescencijos spektroskopijos metodas tinka tirti biocheminiams ir struktūriniais pakitimams gimdos kaklelio audiniuose, kurie atsiranda vystantis ikivėžinėms būklėms [19]. Audiniai, kuriuose vyksta kancerogenezės procesai, selektyviai kaupia jautrias šviesai diagnostines medžiagas – tuo remiasi sensibilizacinės fluorescencijos diagnostikos metodas [77]. Pokyčiai aptinkami vykstant fluorescencijai, kai jautrios šviesai medžiagos, sužadintos tam tikro bangos ilgio šviesa. Švytintys pakitusio audinio plotai rodo patologines sritis, kurias galime matyti akimi ar išmatuoti fluorescencijos spektrus specialiu aparatu - spektrometru.

2.4.1. Savitoji ir sensibilizacinė audinių fluorescencija

Savitosios fluorescencijos diagnostika pagrįsta audinių endogeninių fluoroforų (ląstelėse ir tarpląsteliniame užpilde) optiniu sužadinimu ir jų fluorescencijos stebėjimu. Daugumos endogeninių fluoroforų fluorescenciją nulemia biologinių audinių struktūra bei juose vykstantys fiziologiniai ir patologiniai metaboliniai procesai, todėl taikant savitąją audinių fluorescenciją galima atskirti sveiką ir patologinį audinį, taip pat atpažinti audinio morfologinius ar metabolinius

specifiškumus. Jei audinyje esančių endogeninių fluoroforų fluorescencija nėra pakankamai informatyvi, naudojamos selektyviai tam tikruose audiniuose (pavyzdžiui, audiniuose esant ikivėžinėms būklėms ir vėžiui) besikaupiančios medžiagos – sensibilizatoriai ir registruojama sensibilizacinė fluorescencija. Apšvietus tam tikro bangos ilgio šviesa, kurią sugeria sensibilizatorius, matomas patologinių sričių švytėjimas [78]. Optinės biopsijos schema yra pateikta 5 – ajame paveiksle. Pagrindiniai optinės diagnostinės aparatūros elementai yra šviesos šaltinis, skirtas fluorescencijai žadinti, detektorius, kuris užregistruoja optinį signalą, bei žadinimo–surinkimo sistema, kuria žadinančioji spinduliuotė yra nukreipiama iki audinio ir kuria surenkama audinio fluorescencija.



FL fluorescencijos detektorius.

5 pav. Optinės biopsijos schema [79]

Svarbiausi audiniuose aptinkami fluoroforai yra: triptofanas, kolagenas ir elastinas, redukuotas nikotinamidadeninukleotidas (NADH) ir jo fosfatas (NADPH), flavinai ir flavoproteinai, *beta* karotinas ir porfirinai. Pagrindiniai fluoroforai ląstelėse lokalizuoti mitochondrijose ir lizosomose. Tarpląsteliniame užpilde pagrindiniai fluoroforai yra kolagenas ir elastinas, kurių fluorescencija yra susijusi su skersiniais ryšiais tarp amino rūgščių [80, 81]. Kolagenas

fluorescuoja 330 – 510 nm spektrinėje srityje (smailė ties 390 nm), o elastinas – 330 – 550 nm srityje (smailė ties 410 nm).

Kadangi ląstelėse, vystantis ikivėžinėms būklėms ir vėžiui, kokybiškai ir kiekybiškai kinta endogeninių fluoroforų būklė, registruojant audinių savitosios fluorescencijos spektrus, šias patologijas galima aptikti. [32]. Atliekant fluorescencinę diagnostiką, svarbu žinoti gimdos kaklelio audinių sudėtį, t.y. jame esančias medžiagas, kurioms būdinga fluorescencija. Gimdos kaklelio fluoroforų fluorescencijos intensyvumas kinta vystantis neoplazijai (ikivėžinei būklei). Neoplazijos srityje epitelio fluorescencijos intensyvumas didesnis negu sveiko audinio, o stromos fluorescencijos intensyvumas sumažėja. Tiriant audinių oksidacinę ir redukcinę būklę buvo nustatyta, kad epitelio ląstelių fluorescencijos intensyvumas padidėja, kadangi suintensyvėjus metabolizmui pagausėja NADH kiekis. Pakitusios epitelio ląstelės gali sąveikauti su stromos kolagenu ir ardyti kolageno skersines jungtis ir dėl to mažėja stromos fluorescencijos intensyvumas [26].

Audiniai, esant ikivėžinėms būklėms, skiriasi nuo sveikų morfologiškai, taigi fluorescencinių spektrų skirtumai atsiranda dėl patologijos sukeltų fluorescencinių medžiagų (endogeninių fluoroforų) sudėties pokyčių.

Audinių savitoji fluorescencija priklauso nuo žadinančios bangos ilgio, nes naudojant skirtingas žadinimo bangas yra sužadinami skirtingi endogeniniai fluoroforai. *N. Ramanujam* su kolegomis [21] atliko 18 biopsijų iš gimdos kaklelio sveikų ir įtartinų vietų žadinimo – emisijos matavimus (fluorescencijos žadinimo spektrai matuojami registruojant fluorescenciją ties vienu bangos ilgiu, o žadinama plataus intervalo bangos ilgių šviesa). Buvo nustatyta, kad didžiausi gimdos kaklelio sveikų ir patologinių audinių fluorescencijos spektrų skirtumai gaunami, kai žadinama ties 340, 380 ir 460 nm. Žadinant gimdos kaklelio audinius 460 nm ilgio šviesos bangomis, ikivėžiniai pakitimai aptikti esant 91 % jautrumui ir 75,5 % specifiškumui. Kartojant tyrimus ir žadinant 337 nm ilgio banga, buvo nustatytas specifiškumas ir jautrumas atitinkamai 92 % ir 90 %. Mažiausiai tikslūs rezultatai gauti žadinant 380 nm ilgio banga, kai specifiškumas ir jautrumas buvo atitinkamai

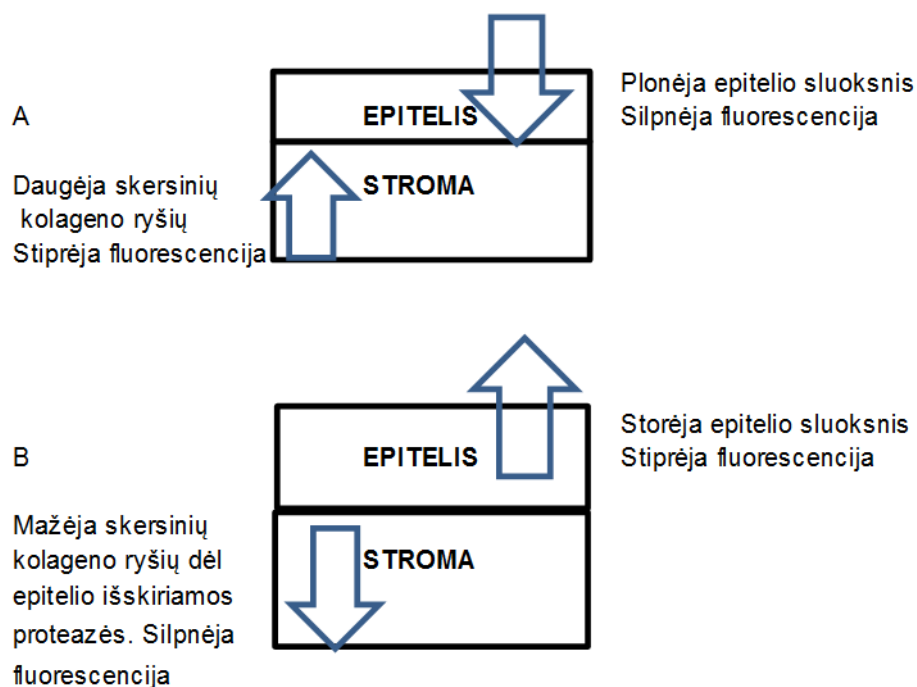
77 % ir 72 %. [20].

Remiantis šiais rezultatais, buvo atlikti sveikų ir neoplazinių gimdos kaklelio pakitimų *in vivo* fluorescencijos matavimai, žadinant 337 nm bangos ilgio šviesa. Gauti spektrai parodė, kad progresuojant neoplazijai, fluorescencijos intensyvumas mažėja ir juostos smailė neženkliai pasislenka į ilgabangę spektro pusę. Sveiko ir patologinio audinio savitosios fluorescencijos skirtumas aiškinamas neoplazinio epitelio sustorėjimu ir jo ląstelių sutankėjimu, dėl padidėjusio branduolio ir plazmos santykio. Todėl didesnio laipsnio epitelio neoplazijos gali susilpninti sužadinimą ir sumažinti stromos kolageninių skaidulų fluorescenciją [78].

2002 m. H. Weingandt ir bendraautorių [82] atlikti tyrimai, fluorescencijai sužadinti naudojant 375 – 440 nm bangos ilgio šviesą, parodė, kad histologiškai patvirtinto CIN 3 gimdos kaklelio audinio fluorescencijos intensyvumas buvo mažesnis negu sveiko audinio. Kiekybinis savitosios fluorescencijos spektrų įvertinimas, atliktas ties 520 nm. bangos ilgiu, rodo, kad sveiko audinio vidutinė fluorescencijos intensyvumo vertė buvo – 0,73, CIN 1 – 0,86, CIN 2 – 0,64 ir CIN 3 – 0,32. Iš pateiktų duomenų matyti, kad ženklus skirtumas aptiktas tik tarp sveiko ir CIN 3 audinio, o CIN 1-2 spektrai praktiškai nesiskyrė nuo sveiko epitelio spektrų, tačiau juos galima atskirti nuo CIN 3 spektrų. Tyrimo metu pasiektas CIN 2-3 diagnostikos jautrumas – 88 %, specifiškumas – 53 %, teigiama prognozė bei neigiama prognozė vertės atitinkamai buvo 29 % ir 95 %. Atskirai tik CIN 3 atvejais diagnostikos jautrumas buvo 100 %, specifiškumas - 51 %, teigiama prognozė bei neigiama prognozė vertės atitinkamai buvo 28 % ir 100 %. Tolesni tyrimai parodė, kad dauguma klaidingai teigiamų diagnozių buvo nustatyta moterims, kurioms buvo ūmus gimdos kaklelio uždegimas. Uždegiminis procesas sukėlė epitelio sustorėjimą ir taip sumažino jo skaidrumą. Dėl to uždegiminėse vietose buvo nustatyta mažesnė savitoji fluorescencija. Taip pat autoriai nustatė, kad nepriklausomai nuo CIN buvimo, transformacijos zonos savitoji fluorescencija buvo ženkliai mažesnė nei už jos ribų.

C.K. Brookner vadovaujama autorių grupė [24], tyrė fluorescencijos

priklausomybę nuo pacienčių amžiaus. Tyrimui atlikti to buvo sukurtas specifinis gimdos kaklelio audinio kultūros fluorescencijos matavimo metodas *ex vivo*, supjaustant audinį į plonus 200 μm storio sluoksnius. Paimtų mėginių fluorescencijos mikroskopiniai vaizdai buvo gauti praėjus 1,5-5,0 valandoms po biopsijos, naudojant 380 nm ir 460 nm ilgių žadinimo bangas. Tirta 31 pacientė, iš kolposkopiškai sveikai atrodančių audinių paimti mėginiai buvo suskirstyti į tris grupes pagal epitelio ir stromos fluorescencijos intensyvumų santykį: (1) mėginiai, kurių epitelio fluorescencija daug intensyvesnė negu stromos; (2) mėginiai, kurių epitelio ir stromos fluorescencijos intensyvumai beveik vienodi, ir (3) mėginiai, kurių epitelis fluorescuoja silpnai, o stroma – intensyviai. Gauti rezultatai parodė, kad yra aiški gimdos kaklelio audinio fluorescencijos vaizdo priklausomybė nuo pacientės amžiaus: kuo moteris vyresnė, tuo silpniau fluorescuoja epitelis ir intensyviau fluorescuoja stroma (6 pav.).



6 pav. Gimdos kaklelio audinių fluorescencijos pokyčiai, vykstantys dėl amžinių pokyčių (A) ir dėl neoplazijos vystymosi (B)

Histologinių tyrimų rezultatai leidžia tai sieti su kolageno kiekiu, kurio vyresnėms pacientėms daugiau aptikta stromoje. Kolageno fluorescencijos gausėjimas didėjant moters amžiui yra biologiškai pagrįstas, nes kolageno fluorescencija priskiriama jo skersinėmis jungtimis, o šių audiniuose didėjant moters amžiui daugėja. Be to, didėjant moters amžiui plonėja gimdos kaklelio epitelio sluoksnio storis, tai sudaro geresnes sąlygas skverbtis šviesai į stromą ir sužadinti kolageną [25].

Kita mokslininkų grupė, matuodama *in vivo* gimdos kaklelio savitąją fluorescenciją, žadinant 337 nm bangos ilgio šviesa, nustatė, kad acto rūgštis (naudojama kolposkopijos metu) padidina fluorescencijos intensyvumą skirtumą tarp sveiko ir patologinio audinio, o gimdos kaklelio gleivių buvimas, nepaisant to, kad jos nefluorescuoja ir nesugeria šviesos, gali trukdyti matuoti fluorescencijos spektrus [83].

Pagrindinis savitosios fluorescencinės diagnostikos trūkumas yra tai, kad gaunama informacija tik nuo paviršinio audinio sluoksnio, nes žadinti naudojamos ultravioletinės/mėlynos šviesos bei sužadintų fluoroforų savitosios fluorescencijos prasiskverbimas į/iš audinio yra ribotas ($< 500 \mu\text{m}$), todėl fluorescencijai registruoti reikalinga labai jautri įranga. Geresniam kontrastui tarp sveikų ir patologinių audinių gauti, yra naudojamos egzogeninės fluorescencinės medžiagos arba jų pirmtakai [19, 21,82].

Sensibilizacinė fluorescencinė diagnostika pagrįsta kai kurių egzogeninių sensibilizatorių savybe selektyviai kauptis patologiniuose audiniuose. Dėl didesnės sensibilizatoriaus koncentracijos patologinėse srityse, audinį apšvietus tam tikro bangos ilgio šviesa, jos fluorescuoja intensyviau, palyginti su sveiku audiniu. Tas audinių fluorescencijos intensyvumo skirtumas ir leidžia identifikuoti patologijas.

Pirmiausia fotodetekcijai buvo panaudotas pirmos kartos sensibilizatorius HpD ir jo labiau išgryninta versija – fotofrinas, tačiau abu šie preparatai pasižymėjo nedideliu selektyvumu bei sukeldavo ilgai trunkantį odos įjautrinimą šviesai – iki 60 dienų [77].

Vienas iš antros kartos sensibilizatorių naudojamų diagnostikoje ir terapijoje yra

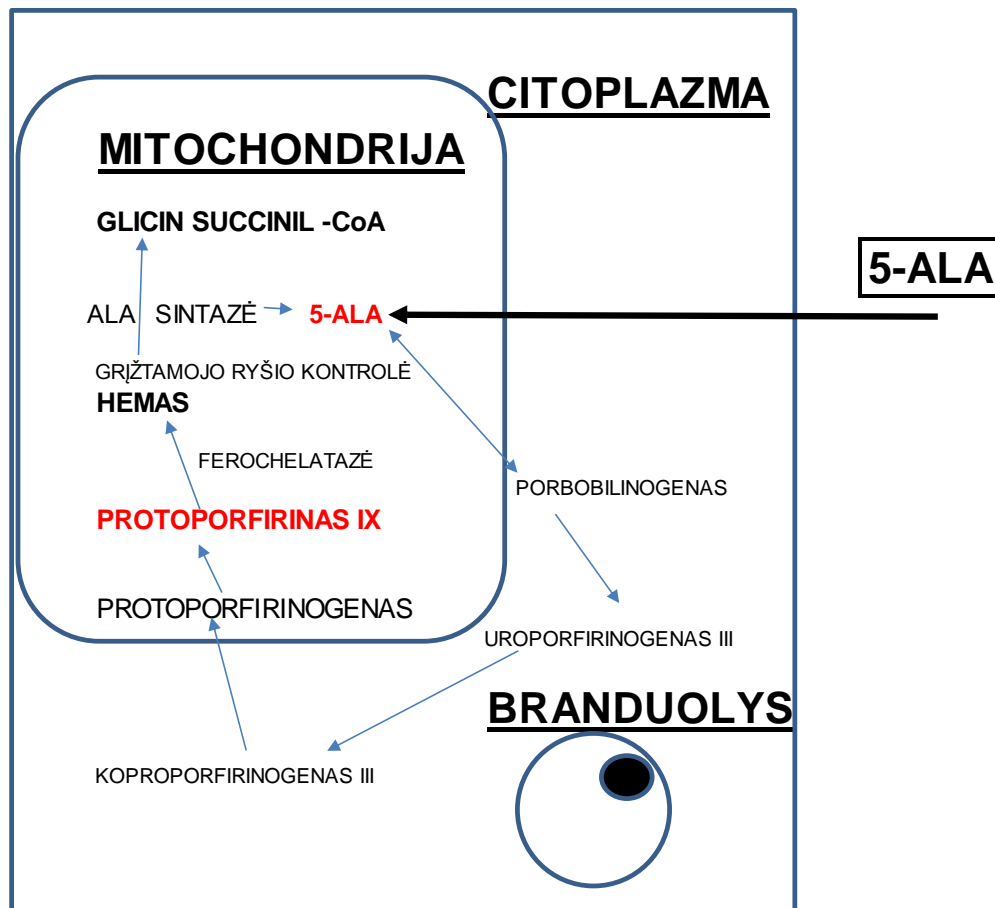
PpIX, kurio pirmtakas hemo sintezės cikle yra 5-ALA. Į organizmą įterpus egzogeninės 5-ALA, hemo sintezė vyksta intensyviau ir pasigamina daugiau PpIX, priešpaskutinio sintezės ciklo produkto. PpIX pasižymi selektyviu kaupimusi audiniuose esant ikivėžinėms būklėms ir vėžiui. Naudojant fluorescencinius metodus, galima šiuos pakitimus vizualizuoti arba registruoti spektrus. PpIX pranašumas yra tas, kad junginys yra endogeninis, jo metabolizmas greitas, dėl to odos įjautrinimas šviesai, net ir naudojant sisteminiu būdu, yra ne ilgesnis negu 24 valandos [84].

PpIX sugerties spektrą sudaro intensyvi juosta ties maždaug 400 nm bangos ilgiu (taip vadinamoji Soret'o juosta) ir keturios mažiau intensyvios juostos regimojoje spektro srityje nuo 500 nm iki 635 nm (vadinamosios Q-juostos) bangos ilgiu. Apšvietus PpIX molekules 400 - 405 nm bangos ilgio arba regimosios šviesos srities spinduliuote gaunamas jų fluorescencijos spektras su dviem smailėmis ties 636 nm ir 703 nm bangos ilgiais [85].

2.4.2. 5 –aminolevulininė rūgštis ir jos indukuota protoporfirino IX gamyba

Endogeniniai porfirinai ląstelėse yra gaminami hemo biosintezės ciklo metu (7 pav.). Pirmas hemo biosintezės ciklo žingsnis yra 5-ALA rūgšties sintezė iš glicino ir sukcinil-kofermento-A kaip katalizatoriui veikiant 5-ALA-sintazei. Šis procesas vyksta mitochondrijose. Vėliau citozolyje iš dviejų 5-ALA molekulių susidaro porfobilinogenas. Veikiant porfobilinogeno deaminazei ir uroporfirinogeno sintazei keturios porfobilinogeno molekulės kondensuojamos į uroporfirinogeną III. Kai citozolyje uroporfirinogeno dekarboksilazė atima iš uroporfirinogeno III keturias karboksilo grupes, susidaro koproporfirinogenas III. Koproporfirinogeno III šoninės propiono rūgšties liekanos veikiamos koproporfirinogeno oksidazės, yra dekarboksilinamos ir oksiduojamos į vinilo grupes. Šios reakcijos vėl vyksta mitochondrijoje. Kaip katalizatoriui veikiant protoporfirinogeno oksidazei, tetrapirolo žiedo metileno grupės oksiduojamos į

metilo grupės – susidaro protoporfirinas IX. Iš aštuonių 5-ALA molekulių pasigamina viena PpIX molekulė (7 pav.). Kaip katalizatoriui veikiant ferochelatazei į tetrapirolo struktūros centrą įterpiamas divalentės geležies atomas Fe (II) – susidaro ne fluorescuojanti hemo molekulė [84].



7 pav. Hemo biosintezės ciklas ir 5-ALA metabolinė seka

Įprastomis sąlygomis organizme maksimalus 5-ALA sintezės greitis visada yra mažesnis už didžiausią kiekvieno kito ciklo etapo greitį ir dėl to tarpiniai produktai ląstelėje nesikaupia. Į organizmą patekus egzogeninei 5-ALA, ląstelėje susidaro jos perteklius ir ląstelėje intensyviau produkuojami PpIX. Jei PpIX vartimas hemu vyksta lėčiau negu PpIX sintezė, ląstelėse pradeda kauptis PpIX perteklius [84, 86].

Atliekami moksliniai tyrimai, siekiant išsiaiškinti, kaip ir kodėl navikiniuose audiniuose daugiau nei sveikuose kaupiasi endogeninių porfirinų. Nustatyta, kad difuzijos barjeras, trukdantis 5-ALA molekulėms skverbtis ir pasiskirstyti tarp audinių, navikiniuose audiniuose būna sumažėjęs. 5-ALA patenka į ląsteles dėl aktyvios pernašos. Navikinėse ląstelėse dėl įvairių priežasčių yra didesnis baltymų kanalų kiekis ir aktyvumas. Nustatyta, kad navikinėse ląstelėse padidėjęs fermento porfobilinogeno deaminazės, veikiančios kaip katalizatorius endogeninių porfirinų sintezės tarpinius etapus, aktyvumas. Veikiant katalizatoriui ferochelatazei į PpIX molekulės centrą įterpiama divalentė geležis – susidaro nefluorescuojanti hemo molekulė. Navikinėse ląstelėse nustatytas sumažėjęs ferochelatazės aktyvumas, todėl jose susikaupia daugiau PpIX [84, 86].

2.5. Sensibilizacinės fluorescencijos diagnostikos pritaikymo sritys medicinoje

Fluorescencinės diagnostikos metodai šiuo metu jau yra taikomi klinikoje įvairių lokalizacijų ikivėžinės būklės ir vėžiui diagnozuoti bei išplitimo riboms nustatyti.

1. Urologijoje fluorescencinė diagnostika taikoma šlapimo pūslės ikivėžinėms būklėms ir vėžiui ir diagnozuoti. Analizuojant ilgalaikius gydymo ir išgyvenamumo rezultatus, nustatyta, kad cistoskopinė fluorescencinė diagnostika daugeliu atvejų pranašesnė už įprastinę cistoskopiją, ypač nustatant šlapimo pūslės ikivėžines būkles ir papildinius navikus [87]. Fluorescencinei diagnostikai naudojama 5-ALA ar jos heksilesteris - heksaminolevulinatas (*Hexvix*[®], *Photocure*, Norvegija). 2006 m. Europos Sąjungoje heksaminolevulinatas patvirtintas kaip sensibilizatorius šlapimo pūslės fluorescencinei diagnostikai atlikti. Šis vizualizacijos metodas pagerina transuretrinės navikų rezekcijos rezultatus [88].

Įprastinės cistoskopijos metu gali būti nepastebėti smulkūs papildiniai navikai ir plokšti urotelio pažeidimai, tokie kaip displazija ar karcinoma *in situ*. Naudojant 5-ALA ar heksilaminolevulinatą, fluorescencija šiuose pažeidimuose matoma nuo 96,9 % iki 100 % atvejų [89]. Net 28 % pacientų šlapimo pūslės ikivėžinių pokyčių nebuvo nustatyta įprastinės cistoskopijos metu, tačiau jie buvo diagnozuoti fluorescencinės diagnostikos metodu, ir 17 % pacientų pritaikius šį metodą atliktas radikalesnis gydymas [90]. Kito tyrimo metu atliekant įprastinę cistoskopiją nebuvo pastebėti 47 vėžio atvejai. Jie aptikti tik naudojant fluorescencinę diagnostiką – 40 % iš šių atvejų buvo diagnozuota karcinoma *in situ*. Nustatytas šlapimo pūslės navikų fluorescencinės diagnostikos jautrumas – 92,5% ir specifiškumas 60,1%, ištyrus 57 pacientų 301 darinį [91].

2. Pulmonologijoje fluorescencinė diagnostika taikoma ankstyvosioms bronchų bei plaučių vėžio stadijoms nustatyti. Šiam tikslui naudojami fotosensibilizatoriai HpD arba fotofrinas. Šiuo metu atliekami tyrimai naudojant 5-ALA aerozolio pavidalu [92].

Diagnozuojant ankstyvųjų stadijų plaučių vėžį fluorescencinės bronchoskopijos metodu, inhaliavus 5-ALA, beveik dvigubai padidėja šio tyrimo jautrumas, palyginti su įprastine bronchoskopija [93]. Tirti pacientai, kuriems buvo nustatytas arba įtarta onkologinė liga iš citologinės skreplių analizės, bet bronchoskopuojant pažeidimų plaučiuose nenustatyta. Naudojant 5-ALA sužadintą fluorescenciją šiems pacientams buvo diagnozuota karcinoma *in situ* ar displazija. Gautas didelis šio tyrimo jautrumas - apie 100 %, specifiškumas - apie 50 %.

3. Virškinamojo trakto ligoms nustatyti taip pat naudojama fluorescencinė diagnostika. Kartais yra sudėtinga endoskopiškai diagnozuoti gastrointestinius ikivėžinius ir smulkus piktybinius židinius. Naudojant fluorescencinės diagnostikos metodą ikivėžinės būklės diagnozuojamos beveik 2 kartus dažniau, nei diagnozuojant įprastiniais metodais. Atliekant fluorescencinę diagnostiką kolorektalinių polipų nustatoma 28% daugiau, nei naudojant baltos šviesos

endoskopiją [94]. 5-ALA sužadinta fluorescencija naudojama storosios žarnos navikams, kolorektalinėms adenomoms, skrandžio polipams bei įvairioms ikivėžinėms būklėms, stemplės navikams, displazijoms bei Bareto pokyčiams diagnozuoti [95, 96, 97].

4. Tiriant galvos ir kaklo srities navikus registruojama audinių savitoji fluorescencija bei nustatyti 5-ALA indukuoto PpIX fluorescencijos intensyvumo skirtumai sveikame ir navikiniame audinyje [98]. Burnaryklės, nosiaryklės bei gerklų gleivinėje sunku diagnozuoti navikus, esančius tarp randų ar randuose, taip pat smulkius navikų recidyvus. Šiais atvejais efektyvi 5-ALA fluorescencijos diagnostika [99, 100]. Lyginant savitąją fluorescencinę diagnostiką ir 5-ALA fluorescencinę diagnostiką nustatyta, kad abi šios neinvazinės technikos informatyvios ankstyvojoje gerklų vėžio diagnostikoje [101]. 5-ALA sužadinta fluorescencija labiau tinka ikivėžiniams ir vėžiniams gleivinės recidyvams diagnozuoti po operacinio gydymo, savitosios fluorescencinės diagnostikos pranašumas - sugaištama mažiau laiko tyrimui, nes nereikia laukti, kol pradės veikti sensibilizatorius.

5. Ginekologijoje daugiausia fluorescencinė diagnostika taikoma tiriant gimdos kaklelio ikivėžines būkles ir vėžį [102, 36]. Taip pat atliekami tyrimai, kuriais siekiama nustatyti fluorescencinės diagnostikos svarbą, makšties, vulvos intraepitelinį pakitimų diagnostikoje bei operacijų metu vertinant kiaušidžių vėžio ir endometriozės išplitimą [37, 38]. *M. Akoel* su kolegomis [103] pateikė duomenis 107 pacienčių, kurioms atlikta 1-3 laipsnio vulvos intraepitelinio neoplazijų fluorescencinė diagnostika lokaliai naudojant 5-ALA, inkubacinis periodas - 180–360 min. Nustatytas šio tyrimo 93 % jautrumas ir 90 % specifiškumas.

M. Löning su kolegomis [37] atliko fluorescencinę diagnostiką laparoskopiskai, naudodami intraperitoninę 1% ALA aplikaciją, esant sensibilizatoriaus dozei 30 mg/kg 29 pacientėms seragnčioms kiaušidžių vėžiu. Nustatyta, kad ši procedūra nesukėlė ženkliai šalutinių reiškinių ir pasižymėjo didesniu jautrumu aptinkant

epitelinio kiaušidžių vėžio metastazes pilvaplėvėje, palyginti su įprastine laparoskopija. Atliekant kitą tyrimą autoriai panaudojo 10 mg/kg dozę peroralinio 5-ALA tirpalo–laparoskopiskai buvo matomas tipinis metazinių limfmazgių švytėjimas. Po tyrimo pacientės 36 valandas buvo saugomos nuo tiesioginės šviesos siekiant išvengti fototoksinių reakcijų. Fluorescencijos diagnostika kiaušidžių vėžio diagnostikoje dar yra klinikinių tyrimų etape, tačiau aišku, kad šis metodas gali padėti atliekant pirmines ir pakartotines operacijas (recidyvų diagnostikoje, taip pat vertinant chemoterapijos efektyvumą).

6. Krūties vėžio diagnostikoje fluorescencijos metodas dažniausiai taikomas navikui aptikti bei jo riboms nustatyti operacijos metu. Krūties vėžys dažniausiai vystosi gilesniuose audinių sluoksniuose, todėl neinvaziniais metodais negalime gauti tikslios informacijos [36].

7. Neurochirurgijoje taikoma smegenų navikų fluorescencinė diagnostika. Išgyvenamumas po piktybinių galvos smegenų gliomų operacinio gydymo priklauso nuo chirurginio naviko pašalinimo radikalumo, turint omeny, kad būtina išsaugoti kuo daugiau sveiko smegenų audinio. Dėl to naudojama 5-ALA indukuota PpIX fluorescencija ir siekiama kuo tiksliau nustatyti gliomų ribas bei jas kuo radikaliau pašalinti [86, 104, 105]. W. Stummer vadovaujama grupė [106] atliko atsitiktinės atrankos III fazės multicentrinį tyrimą. Ištyrus 322 pacientus, sergančius piktybinėmis gliomomis, buvo nustatyta, kad naudojant 5-ALA fluorescencinę diagnostiką 65 % pacientų buvo atlikta radikali naviko pašalinimo operacija, o įprastinės operacijos metu pasiektas tik 36 % radikalumas. Taikant fluorescencinę diagnostiką naudojant 5-ALA po operacinio gydymo 19,9 % pacientų tęsėsi 6 mėnesiais ilgesnis periodas iki prasidedant recidyvui. Nustatyta, kad fluorescencinės diagnostikos jautrumas neurochirurgijoje yra 85-98 %, specifiškumas – 100 % [107]. Sveikame smegenų audinyje nenustatyta PpIX fluorescencijos, o navike - ji ryškiai raudona. Moksliniai darbai taikant šį smegenų navikų vizualizacijos metodą

atliekami ir Lietuvoje, metodas taikomas taip pat neurochirurgijos klinikinėje praktikoje [108, 109, 110].

8. Fluorescencinė diagnostika gana plačiai taikoma dermatologijoje. Šiuo metu odos ligos dažniausiai nustatomos vizualiai apžiūrint. Jei audinys atrodo įtartinas, imama biopsija arba iš karto atliekama operacija. 5-ALA indukuotas porfirinas odos ir gleivinių piktybiniame navike švyti selektyviai rausva spalva, kuri matoma apšvietus tiriamą zoną Vudo lempa ar kitu tinkamu šviesos šaltiniu [111]. Fluorescencinės diagnostikos metodas gali būti naudingas, nustatant tikslias navikinio pažeidimo ribas ir ankstyvuosius dauginius smulkius recidyvus [112, 113, 114,115].

9. Fluorescencinė diagnostika taip pat taikoma aterosklerozinėms pažaidoms kraujagyslėse aptikti. Kadangi aterosklerozė yra lėtinė arterijų liga, tai jos aptikimas pradinės, dar nepavojingos stadijos, padėtų išvengti didesnių kraujotakos sutrikimų bei sudėtingų operacijų. Šioje srityje daugiausia žadantys yra fluorescencijos gyvavimo trukmių matavimų rezultatai [116]. Lietuvoje atliekami moksliniai darbai, kuriais siekiama vizualizuoti širdies laidžiąją sistemą sensibilizacinės fluorescencinės diagnostikos metodu [117].

Jei diagnostikai yra naudojamas išorinis sensibilizatorius, po sensibilizacinės diagnostikos yra patogu taikyti fotodinaminę terapiją. Toks metodas tinka ir įprastinių operacijų metu t.y. stebint navike susikaupusio sensibilizatoriaus fluorescenciją galima matyti naviko kraštus ir pagal tai koreguoti operacijos eigą [118].

Nors optinė biopsija yra patraukli, jautri ir palyginti nesudėtingai atliekama diagnostinė procedūra, jos taikymas yra komplikotas dėl gausybės fluorescuojančių, sklaidančių ir sugeriančių šviesą molekulių audinyje. Pagrindinė užduotis prieš diegiant šį metodą į kliniką yra identifikuoti spektrines sritis selektyviai žadinti bei registruoti tiriamojo objekto fluorescenciją. Ieškant tinkamų tyrimo sąlygų yra naudojama sistema, kuria galima registruoti fluorescencijos spektrus *in vivo*, keičiant žadinimo spinduliuotės bangos ilgus.

Tokiu būdu yra sudaroma fluorescencijos žadinimo – emisijos matrica, kuri parodo įvairių fluoroforų indėlį tam tikrame spektriniame ruože [119]. Selektyvias sritis ne visada pavyksta surasti, todėl yra pasitelkiami sudėtingi spektrinių duomenų analizės metodai, kuriamos įvairios metodikos ar panaudojami išoriniai žymekliai.

2.6. Sensibilizacinės fluorescencijos diagnostika tiriant gimdos kaklelio ikivėžines būkles

Idėja, gimdos kaklelio neoplazijoms diagnozuoti naudoti 5-ALA sensibilizacinę fluorescenciją, kilo 1996 m., kai *P.G. Rossi* ir bendraautorai *in vitro* nustatė, kad 5-ALA kaupiasi HeLa (gimdos kaklelio epiteloidinių ląstelių karcinomos) ir SiHa (gimdos kaklelio plokščialąstelinės karcinomos) ląstelėse [120]. Statistiškai reikšmingą skirtumą tarp egzogeninės 5-ALA susikaupimo gimdos kaklelio vėžinėse HeLa ląstelėse ir sveikose žmogaus epitelio ląstelėse aptiko mokslininkas *E. Gallegos* ir bendraautorai [121]. Taip pat buvo nustatyta, kad maksimalus PpIX susikaupimas ląstelėse įvyksta praėjus 4 valandoms po 5-ALA aplikacijos. Fotosensibilizuojanti medžiaga palaipsniui pasišalina ir po 24 val. jau nebeaptinkama. Šį faktą savo darbe taip pat patvirtino *A. Marti* ir bendraautorai, kurie pranešė, kad 5-ALA indukuoto PpIX fluorescencijos intensyvumas audiniuose tiesiškai didėja 4 valandas, vėliau pasiekia plato ir palaipsniui mažėja [120]. *S.A. Pahernik* ir bendraautorai [122] fluorescencinės mikroskopijos metodu atliko 5-ALA indukuotų porfirinų farmakokinetikos, selektyvumo ir pasiskirstymo tyrimus CIN audiniuose *ex vivo*. Nustatyta, kad lokaliai panaudojus 3 % 5-ALA naudojimo, neoplazinės gimdos kaklelio sritys ima selektyviai kaupti PpIX. Aukštos PpIX fluorescencijos intensyvumo vertės CIN ir sveikame audinyje buvo užfiksuotos praėjus 150 – 450 min. po 5-ALA užtepimo ir pasiekė maksimumą po 300 min. Porfirinų fluorescencija pakitusiame CIN 1 ir CIN 2 epiteliniame audinyje, palyginti su sveiku, skyrėsi nežymiai. Fluorescencijos intensyvumo santykiai tarp CIN 1 ir sveiko bei tarp

CIN 2 ir sveiko audinio buvo atitinkamai 1,3 ir 1,21. Kita vertus, tiriant CIN 3 pakyčius gautas vidutiniškai 2,35 kartus didesnis PpIX fluorescencijos intensyvumas nei gretimame sveikame epitelyje.

1999 m. *P. Hillemanns* ir bendraautorai [123] savo publikacijoje apie fotodinaminės terapijos taikymą gimdos kaklelio intraepitelinei neoplazijai gydyti, aprašė *in situ* fluorescencinės mikroskopijos matavimus. Tyrime dalyvavo pacientės, kurioms buvo skirtingo laipsnio CIN. Pritaikius atitinkamo dydžio gimdos kaklelio gaubteliais, lokaliai buvo naudojama po 10 ml 20 % 5-ALA tirpalo. 5-ALA indukuotų porfirinų fluorescencija audiniuose buvo vertinama po 4 – 5 valandų. Gauti rezultatai parodė, kad CIN audinių porfirinų fluorescencijos intensyvumas ne visuomet koreliavo su kolposkopijos vaizdais. Didžiausia fluorescencija pasižymėjo CIN pažeidimai esantys transformacijos zonoje, tačiau intensyvumas pažeistame audinyje ne visada buvo pasiskirstęs tolygiai. Autoriai mano, kad taip gali būti dėl nehomogeniško 5-ALA užtepimo ar dėl skirtingais greičiais vykstančios 5-ALA konversijos į PpIX.

V. Andikyan ir bendraautorai [124] tyrė, kokia 5-ALA koncentracija turi didžiausią diagnostinę vertę tiriant CIN pakitimus. Tam tikslui, 27 pacientėms buvo atlikti CIN 1-3 audinių *ex vivo* fluorescencinės mikroskopijos ir spektroskopijos matavimai. Nuo 30 min. iki 12 val. prieš konizaciją ant gimdos kaklelio buvo užteptas 10 ml termogelio su 4, 10 ar 20 % 5-ALA. Termogelis kambario temperatūroje yra skysčio konsistencijos, o žmogaus kūno temperatūroje tampa gelio konsistencijos. Tai turėjo padidinti 5-ALA adhezines savybes. Gauti rezultatai parodė, kad ALA indukuotų porfirinų fluorescenciją buvo maksimali naudojant 10 % 5-ALA preparatą. PpIX fluorescencijos intensyvumas neoplazinių audinių epitelyje pasiekė maksimumą praėjus 3-6 valandoms po 5-ALA užtepimo. Didžiausiu selektyvumu pasižymėjo CIN 3 audiniai. Jų fluorescencijos intensyvumo santykis su sveikų audinių fluorescencijos intensyvumu buvo lygus 3,5.

Skirtingų koncentracijų ALA savo darbe naudojo ir *P. Hillemanns* su kolegomis [33]. Fluorescencinei diagnostikai atlikti lokaliai ant gimdos kaklelio buvo uždedamas marlinis tamponas išmirkytas 10 ml 0,5 % ir 1 % 5-ALA tirpale.

Video ir spektrinė fluorescencijos analizė atlikta praėjus 30 – 360 min. po ALA aplikacijos. Tyrimas parodė, kad CIN audiniai endogeninių porfirinų srityje fluorescuoja intensyviau negu sveiki. Fluorescenciją, panaudojus 1 % 5-ALA, buvo galima matyti ir plika akimi, ir per videokolposkopą. Naudojant 0,5 % 5-ALA, dėl staigaus fotoblukimo, fluorescencijos užfiksuoti nepavyko. Tyrėjai nustatė, kad gimdos kaklelio audinių fluorescencijos intensyvumas priklauso nuo laiko praėjusio po 5-ALA aplikacijos. Atliekant diagnostiką svarbu pasiekti ne patį didžiausią fluorescencijos intensyvumą, bet patį didžiausią skirtumą tarp fluorescencijos intensyvumų neoplaziniuose ir sveikuose gimdos kaklelio audiniuose. Taigi, maksimalus kontrastas tarp CIN bei sveiko audinio fluorescencijos buvo užfiksuotas praėjus 60 - 90 min. po 1 % 5-ALA panaudojimo ir sudarė santykį 11:1. Praėjus ilgesniam laikui po 5-ALA preparato aplikacijos, santykis mažėjo ir paaiškėjo, kad atsiranda nespecifinė fluorescencija, kuri apsunkina CIN diagnostiką (audinių kontrastingumą). Audinių, kurių pažeidimas apibūdinamas kaip CIN 2-3, fluorescencijos intensyvumas buvo didesnis negu CIN 1, o visi CIN pažeidimai fluorescavo labiau negu sveikas audinys. Tyrimo metu taip pat paaiškėjo, kad pažeidimams esant teigiamam ŽPV DNR testui būdinga ženkliai intensyvesnė fluorescencija [125].

Siekiant ištirti 5-ALA poveikį vartojant *per os* gimdos kaklelio neoplazijų diagnostikai, *L. Duska* ir bendraautorai [126] į šį tyrimą įtraukė 14 pacienčių. Tyrimas parodė, kad naudojant 10 mg/kg 5-ALA tirpalo *per os*, optimali gimdos kaklelio patologinių audinių fluorescencija pasiekama praėjus 3 valandoms. Pacientės gerai toleravo 5-ALA preparatą, nebuvo pastebėta jokių šalutinių efektų, tarp jų įjautrinimo šviesai ar pykinimo, biocheminių kraujo rodiklių pokyčių. Atliekant gimdos kaklelio sveikų ir neoplazinių audinių mikroskopinės fluorescencijos matavimus, buvo nustatyta, kad 5-ALA indukuotos PpIX fluorescencijos intensyvumas plokščialąstelinio epitelio sluoksnyje buvo ženkliai didesnis nei giliau esančioje gimdos kaklelio stromoje.

P. Collinet ir bendraautorai [127] atliko panašaus pobūdžio tyrimus naudodami 5-ALA metilo esterį (MAL). Tyrime dalyvavo 14 moterų esant histologiškai

patvirtintam CIN. 160 mg/ml MAL buvo suteptamas gimdos kaklelio paviršius 35 – 160 min. prieš konizaciją. Gimdos kaklelio pakitimai buvo vertinami („yra“ arba „nėra“) stebint fluorescenciją per videokolposkopą. Pagal gimdos kaklelio fluorescenciją, dviems pacientėms nustatyta klaidingai teigiama diagnozė, o keturioms – klaidingai neigiama. Autoriai pabrėžia, kad klaidingai neigiamos diagnozės nustatytos moterims, kurioms fluorescencijos stebėjimas vyko praėjus mažiau nei 60 min. po MAL užtepimo, taigi greičiausiai neoplaziniai audiniai nepasižymėjo fluorescencija dėl to, kad šio laiko neužteko PpIX pakankamai susikaupti audiniuose.

Fluorescencijos diagnostikos efektyvumo tyrimą diagnozuojant CIN paskelbė Z. Nowakowski ir bendraautorai [128]. Šio tyrimo metu 68 moterims, 2 val. prieš fluorescencijos matavimus, gimdos kaklelio buvo suteptamas 15 % 5-ALA kremo. Audinių fluorescencija buvo vertinama vizualiai. Rezultatai parodė, kad taikant fluorescencijos diagnostiką 62,9 % moterų, kurioms pagal citologinį tyrimą buvo didelio laipsnio neoplazija, nustatyta teisinga diagnozė. Šiai grupei moterų atliktos kolposkopijos rezultatai koreliavo su histologinio tyrimo rezultatais 55,6 % atveju. Autorius pabrėžė išskirtinę fluorescencinės diagnostikos metodo naudą nustatant daugiažidinius gimdos kaklelio pakitimus. Z. Nowakowski ir bendraautorai darbo išvadose teigia, kad diagnozuojant ikivėžines gimdos kaklelio būkles fluorescencinės diagnostikos ir kolposkopijos jautrumas bei specifiškumas yra panašūs.

Siekdami įvertinti fluorescencinės diagnostikos efektyvumą diagnozuojant gimdos kaklelio neoplazijas, 2009 m. A. Szafińska-Dolata ir bendraautorai [34] atliko tyrimą, kurio metu palygino fluorescencinę diagnostiką su įprastai naudojamu citologiniu tyrimu ir kolposkopija. Fluorescencijos diagnostika atlikta vertinant gimdos kaklelio fluorescencijos vaizdus videokolposkopu, praėjus 4 val. po 3 % 5-ALA gelio aplikacijos ant gimdos kaklelio. Šiame tyrime, nustatant CIN pažeidimus, fluorescencinės diagnostikos jautrumas buvo lygus 91 %, specifiškumas – 93 %, teigiama prognozinė vertė – 95 %, neigiama prognozinė vertė – 88 %, o citologinio tyrimo kartu su ŽPV DNR testu gautos vidutinės vertės buvo atitinkamai 97 %, 43 %, 71 %, 92 %. Kolposkopinio

tyrimo efektyvumas buvo 79 % jautrumo ir 77 % specifiškumo. Taigi, matome, kad fotosensibilizacinė diagnostika pasižymi didesniu už kolposkopiją jautrumu ir specifiškumu bei ženkliai didesniu specifiškumu nei citologinis tyrimas ir ŽPV DNR testas.

Šiame tyrime autoriai taip pat nagrinėjo gimdos kaklelio pakitimus matuojant audinių fluorescencijos intensyvumus skaitmeniniuose vaizduose. Tačiau spektrų analizė parodė, kad sveikų ir neoplazinių audinių PpIX fluorescencijos intensyvumas reikšmingai nesiskyrė. Taip pat nebuvo rasta koreliacijos tarp neoplazijos laipsnio ir PpIX fluorescencijos intensyvumo [34].

P. Hillemanns ir bendraautorių [33] tyrimo metu, naudojant gimdos kaklelio pakitimų diagnostikai 1 % 5-ALA tirpalą, vaizdinimo fluorescencinės diagnostikos metodo jautrumas buvo 94 %, o specifiškumas – 51 %, taikant fluorescencinę spektroskopiją jautrumas buvo toks pat, o specifiškumas padidėjo iki 75 %. Šiame tyrime kolposkopijos jautrumas buvo 95 % ir specifiškumas – 50 %, o citologinio tyrimo atitinkamai 73 % ir 90 %. Matome, kad sensibilizacinės diagnostikos jautrumas yra didelis, tačiau pasitaiko klaidingai neigiamų rezultatų. Tai gali būti susiję su tuo, kad vienai pacientei gali būti diagnozuotos kelios patologijos, pavyzdžiui, nustatytas ir uždegimas, ir neoplaziniai pakitimai. Taip pat fluorescencinei diagnozei gali trukdyti tinkamai nepašalintos gimdos kaklelio liaukų gaminamos gleivės.

Papildomas fluorescencinės diagnostikos privalumas yra tai, kad naudojant sensibilizatorių galima nustatyti pakitimų ribas ir iš karto atlikti jų fotodinaminę terapiją.

Apšvietus naviką, sensibilizatoriaus absorbcijos spektro maksimumą atitinkančia šviesa, sensibilizatorius sugeria fotoną, tampa sužadintu, sąveikauja su šalia esančiu deguonimi ir jį suaktyvina (tripletinės būsenos deguonį paverčia singletiniu). Sužadintas deguonis aktyviai reaguoja su ląstelės citoplazmos bei organelių membranose esančiomis medžiagomis. Prasideda fotocheminės reakcijos sukeliančios navikinių ląstelių žūtį.

A. Barnett ir bendraautoriai [129] atliko CIN audinių fotodinaminę terapiją naudodami 3 % ir 5 % 5-ALA preparatus. Atlikdami fluorescencinę

mikroskopiją autoriai nustatė, kad praėjus 3 val. po 5-ALA panaudojimo neoplaziniuose audiniuose susikaupia pakankamas PpIX kiekis. Skirtumo tarp įvairių koncentracijų nebuvo nustatyta. Praėjus trimis mėnesiams po fotodinaminės terapijos 33 % gydytų pacienčių CIN nebuvo rasta, 42 % pacienčių CIN laipsnis nepasikeitė, o 25 % pacienčių buvo nustatytas ligos progresavimas.

Panašius tyrimus atliko *K.A. Keefe* su kolegomis [130]. Pacientėms esant CIN 2-3 pakitimų fotodinaminę terapiją taikė praėjus 90 min. po 200 mg/ml 5-ALA preparato užtepimo. Pakartotiniai moterų patikrinimai atlikti po 4, 8 ir 12 mėnesių, parodė, kad gydymo efektyvumas buvo atitinkamai 51 %, 46 % ir 31 %. Taigi, šiuo atveju terapija neturėjo ilgalaikio poveikio ir praėjus tam tikram laikui (8-12 mėnesių) liga recidyvavo.

Geresni rezultatai pasiekti naudojant ant gimdos kaklelio aplikuojamą heksaminolevulinatą (HAL) 3 - 5 val. prieš fotodinaminę terapiją. Po šešių mėnesių pastebėta remisija 71 % - CIN 1, 50 % - CIN 2 ir 71 % - CIN 3 atvejų [131].

Atsižvelgiant į tai, kad 5-ALA esteriai dėl didesnio lipofiliškumo pasižymi didesniu prasiskverbimu į ląsteles, taip pat buvo tiriamas jų naudojimas CIN diagnostikai. 2008 m. mokslininkų grupė *ex vivo* tyrė HAL indukuoto PpIX farmakokinetiką ir selektyvumą audiniuose esant CIN pakitimų. Tyrimo metu 24 moterims 5–720 min. prieš konizaciją gimdos kaklelis buvo sutepamas 4 mmol/L ar 10 mmol/L HAL. Vėliau atliekami konizuoto audinio mikroskopiniai fluorescencijos matavimai. Rezultatai parodė, kad po HAL užtepimo, neoplazinio audinio fluorescencijos intensyvumas buvo didesnis negu sveiko. Abiejų audinių fluorescencijos intensyvumai didėjo laikui bėgant ir pasiekė maksimumą po 180–540 min. Lygindami fluorescencijos intensyvumą priklausomai nuo naudojamos HAL koncentracijos, mokslininkai nustatė, kad 10 mmol/L HAL pritaikymas sukelia ženkliai ryškesnę fluorescenciją negu 4 mmol/L. Šis metodas leido atskirti CIN laipsnius. CIN 2-3 audinių vidutinis porfirinų fluorescencijos intensyvumas buvo 2,8 kartus didesnis negu CIN 1 audiniuose. Visų tipų audinių didžiausia fluorescencija aptikta epitelio

sluoksnyje. Analizuodami rezultatus fotodinaminio gydymo kontekste, autoriai nustatė, kad didžiausias fluorescencijos intensyvumo santykis sveikame ir CIN audinyje pasiekiamas praėjus 300-540 min. po 10 mmol/L HAL aplikacijos [125].

Iš pateiktų literatūros duomenų galima matyti, kad patologiniai gimdos kaklelio audiniai pasižymi ryškesne PpIX fluorescencija. Toks 5-ALA indukuoto PpIX selektyvus kaupimasis patologiniuose audiniuose mokslinėje literatūroje yra aiškinamas keliais aspektais. PpIX selektyvumas yra sąlygotas padidėjusio 5-ALA skvarbumo į pakitusius audinius. Navikinių audinių ląstelėse difuzijos barjeras, ribojantis 5-ALA molekulių skverbimąsi, būna sumažėjęs, todėl jose susikaupia daugiau PpIX. Be to, įrodyta, kad navikinėse ląstelėse dėl įvairių priežasčių gali būti didesnis baltymų nešiklių kiekis ir jų aktyvumas. Tai sudaro palankesnes sąlygas 5-ALA patekti į ląsteles, nes tai vyksta aktyvios pernašos būdu. Dar vienas svarbus veiksnys yra tai, kad navikinėse ląstelėse nustatytas padidėjęs fermento porfobilinogeno deaminazės ir sumažėjęs ferochelatazės aktyvumas. Dėl padidėjusio fermento porfobilinogeno deaminazės aktyvumo pagreitėja endogeninių porfirinų sintezės tarpiniai etapai, o dėl sumažėjusio ferochelatazės aktyvumo lėtėja divalentinės geležies įterpimas į PpIX ir hemo susidarymas, kas sąlygoja didesnę PpIX kaupimąsi ląstelėje [84].

Analizuojant literatūrą mokslinio darbo tema, radome tik tris šaltinius, kuriuose aprašomi tyrimai, kai taikant sensibilizacinę fluorescencijos diagnostiką naudojant 5-ALA buvo atliekamas spektrų matavimas spektrometru *in vivo* [33, 132, 133], ir keliuose šaltiniuose aprašoma, kad buvo registruojami fluorescencijos intensyvumai iš skaitmeninių vaizdų [34, 127, 128, 134].

Kadangi mūsų darbe tirta gimdos kaklelio ikivėžinių būklių sensibilizacinė fluorescencijos spektroskopija naudojant 5-ALA *in vivo*, 3 – oje lentelėje pateiktos atliktų panašių tyrimų metodikos.

3 lentelė. Duomenys apie skirtingų autorių, atlikusių gimdos kaklelio fluorescencijos tyrimus naudojant 5-ALA *in vivo*, pasirinktas ALA preparato koncentracijas ir 5-ALA poveikio laikus iki fluorescencijos matavimo

Literatūros šaltinis	Tiriamųjų skaičius (n)	5-ALA tirtas poveikio laikas (min.)	5-ALA preparatai ir jų dozavimas
A.Zikov, 2011 [133]	20	120	<i>Alasens</i> 20% tepalas
A.Zikov, 2011 [133]	44	240-360	<i>Alasens</i> 20mg/kg <i>per os</i>
A.Szafińska-Dolata ir bendr., 2009 [34]	73	240	5- ALA 3 % gelis
P.Collinet ir bendr., 2007 [127]	14	35–150 (tinkamiausias laikas >75)	<i>Metvix®</i> —160 mg/mL kremas
V.Sapoznikova ir bendr., 2005 [132]	18	150-180	15mg/kg 5-ALA tirpalas <i>per os</i>
L.R.Duska ir bendr., 2002 [126]	14	60 - 240 (tinkamiausias laikas - 180)	10 mg/kg 5-ALA tirpalas <i>per os</i>
Z.Nowakowski ir bendr., 2002 [128]	68	120	5- ALA 15 % kremas
P.Hillemanns ir bendr., 2000 [33]	68	30 - 360 (tinkamiausias laikas 60-90)	0,5 % ir 1,0 % 5-ALA tirpalas
A.Bogaards ir bendr., 2002 [134]	16	60 – 120	5-ALA 1,0 % tirpalas

Mokslinėje literatūroje pateikti įvairių tyrimų rezultatai rodo, kad sensibilizacinė fluorescencinė diagnostika naudojant 5-ALA tinka gimdos kaklelio ikivėžinių būklių diagnostikai. Skirtingos metodo jautrumo ir specifiškumo vertės aiškinamos skirtingos koncentracijos 5-ALA naudojimu, skirtingu pasirinktu 5-ALA inkubacijos laiku, o taip pat skirtingu tyrimo pobūdžiu (*ex vivo* ar *in vivo*, vertinant fluorescenciją akimi (vaizdinimas), ar matuojant fluorescencijos intensyvumus ir fotodiagnostikos metodu (fluorescencinė mikroskopija, fluorescencijos vertinimas pagal filmuotą medžiagą ar tiesiog plika akimi bei fluorescencinė spektroskopija (kai spektrai matuojami spektrometru ar

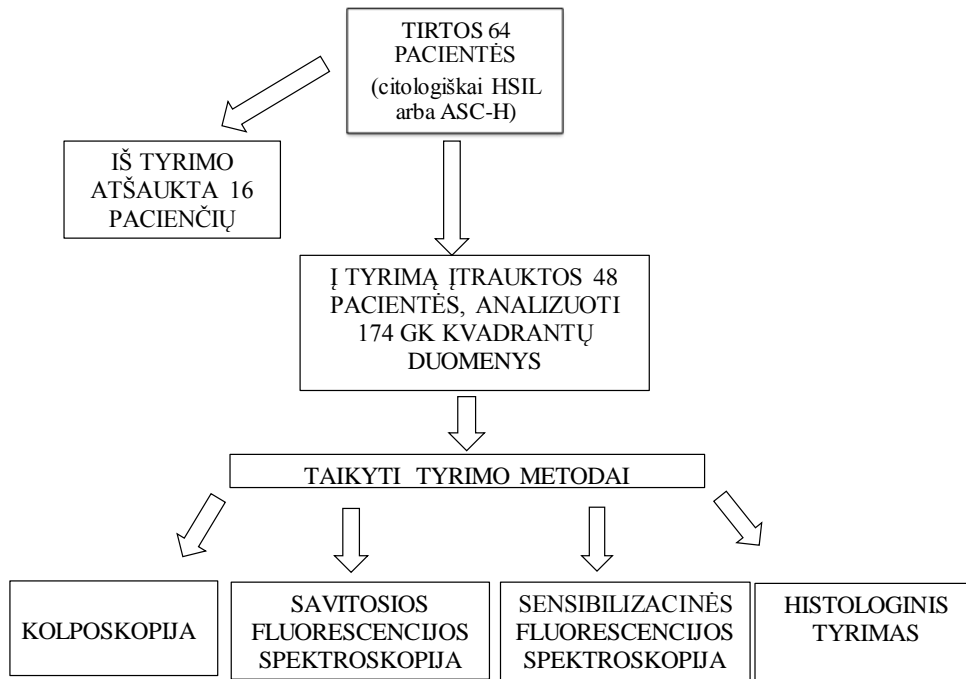
vertinami analizuojant skaitmeninius vaizdus bei taikant matematinius modelius duomenims apdoroti). Moksliniuose straipsniuose pateikti duomenys rodo, kad šiuo metu dar nesudaryta rekomenduojama sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos atlikimo metodika siekiant diferencijuoti gimdos kaklelio ikivėžines būkles *in vivo*.

3. TYRIMO METODIKA

3.1. Tyrimo medžiaga

Tyrimas atliktas 2012 - 2014 m. Nacionalinio vėžio instituto (buvusio Vilniaus universiteto Onkologijos instituto) Radiologijos, branduolinės medicinos ir konsultacijų centre. Tyrimo protokolą įvertino ir patvirtino Vilniaus regioninis biomedicininis tyrimų etikos komitetas (2012 01-11 Nr. 158200).

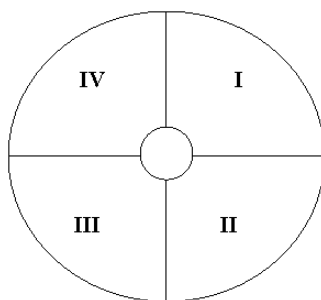
Tyrime dalyvavo 64 pacientės, kurios atvyko konsultuotis į Nacionalinio vėžio instituto Konsultacinės poliklinikos skyrių iš Vilniaus miesto, Vilniaus, Širvintų, Šalčininkų, Pasvalio Kupiškio, Zarasų, Utenos ir Panevėžio rajono dėl atlikus citologinį tyrimą įtariamų žymių plokščiojo epitelio pokyčių gimdos kaklelyje. Tyrimo schema pateikiama 8 -ajame paveiksle.



n – atvejų skaičius; *HSIL* – žymūs plokščialąsteliniai intraepiteliniai pokyčiai; *ASC-H* - atipinės plokščiojo epitelio ląstelės, galimi žymūs plokščialąsteliniai intraepiteliniai pakitimai.

8 pav. Tyrimo schema

Kadangi šio darbo tikslas - nustatyti sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos metodo tikslumą diagnozuojant gimdos kaklelio ikivėžines būkles, buvo nutarta gimdos kaklelį tirti suskirsčius jį į kvadrantus pagal laikrodžio rodyklę, ir kiekvieną jų nagrinėti kaip atskirą tiriamąjį atvejį. Bendra gimdos kaklelio kvadrantų diagnozė rodo atskiros pacientės klinikinę būklę (9 pav.).

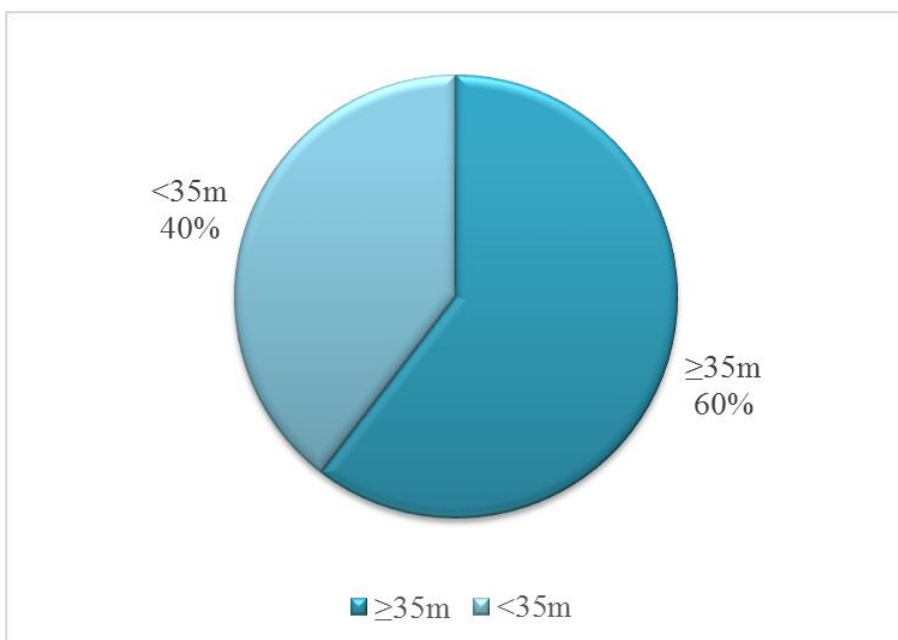


9 pav. Diagnostikoje naudojamas gimdos kaklelio skirstymas į kvadrantus siekiant tiksliau aprašyti patologijos lokalizaciją

Į tyrimą įtrauktos 48 moterys, analizuoti 174 gimdos kaklelio kvadrantų duomenys. Pacientės atvyko konsultuotis dėl patologinių radinių aptiktų atliekant citologinį tyrimą 37 (77 %) HSIL ir 11 (23 %) ASC – H atsakymai.

18 gimdos kaklelio kvadrantų tyrimo duomenys nebuvo analizuojami, tarp kurių 8 – dėl netikslaus gimdos kaklelio kvadrantų žymėjimo, ar kvadranto medžiagos nebuvimo po gimdos kaklelio konizacijos arba biopsijos; 5 – dėl intensyvios koaguliacijos poveikio gauto netikslaus histologinio atsakymo; bei esant nepatenkinamiems fluorescencinės spektroskopijos rezultatams dėl kraujavimo tyrimo metu -4 ir 1- matavimas nepavyko dėl spektrometro gedimo.

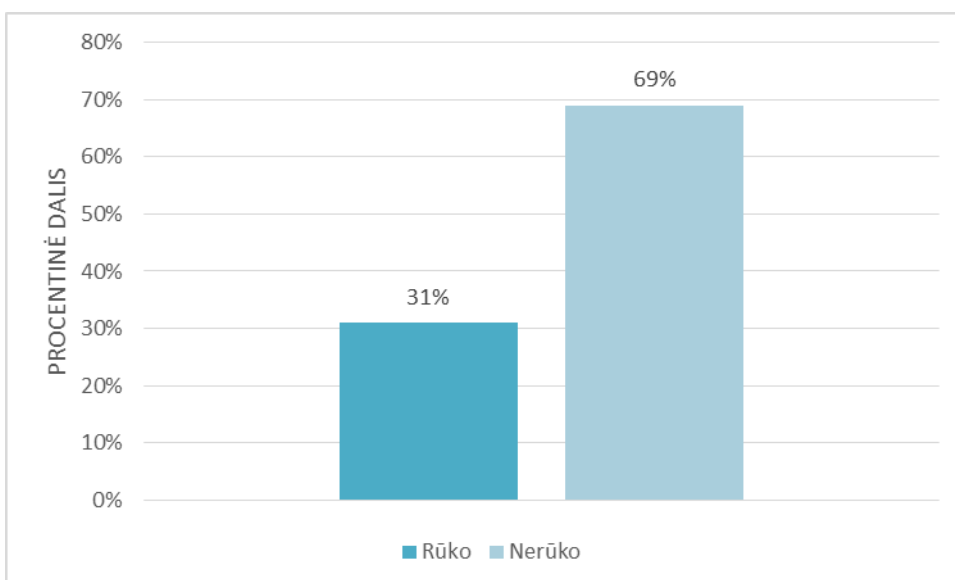
Į tyrimą įtrauktų pacienčių amžius svyravo tarp 23 ir 57 m., amžiaus mediana 36 m. (10 pav.).



m – metai.

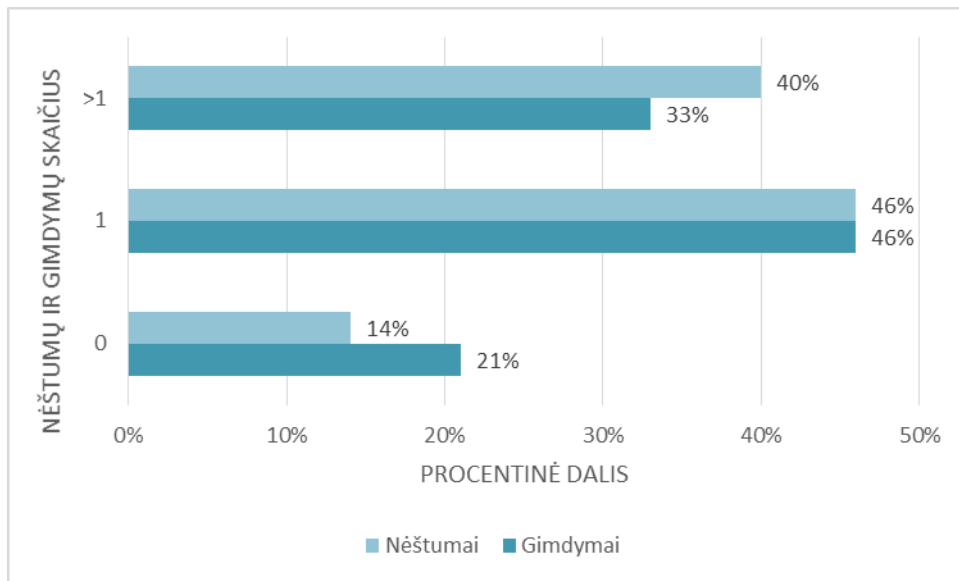
10 pav. Pacienčių pasiskirstymas amžiaus grupėse < ir ≥35 m.

60 % pacienčių buvo vyresnės nei 35 m., 31 % pacienčių buvo rūkančios, 69 % - nerūkė (11 pav.).



11 pav. Duomenys apie pacienčių rūkymo įpročius

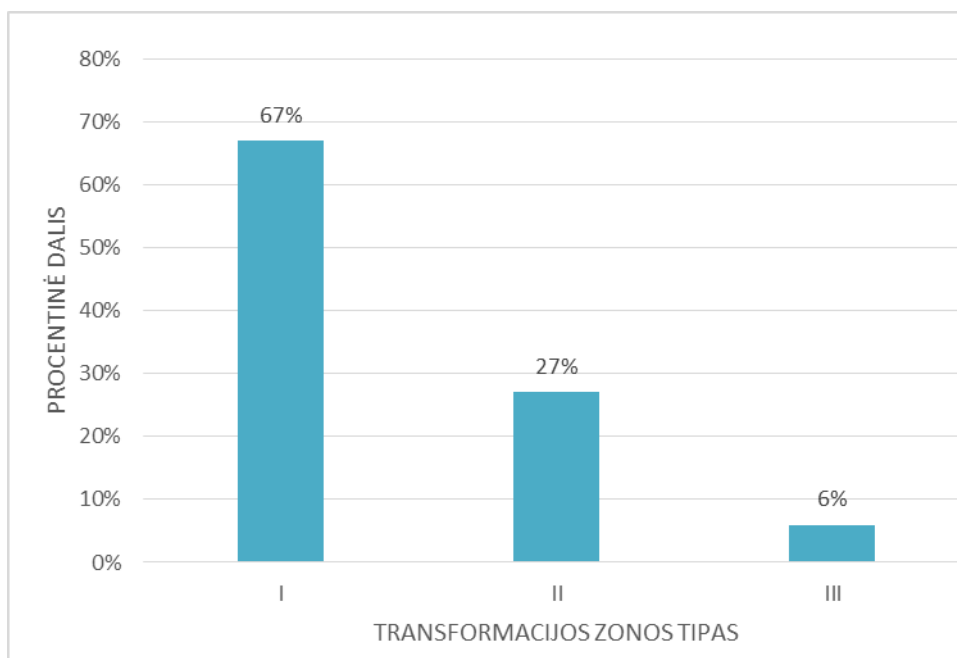
Tiriamoje grupėje 79 % buvo gimdžiusios moterys, 7 % turėjusios nėštumo nutraukimą ir nė karto negimdė, 14 % - nebuvo turėjusios nėštumų (12 pav.)



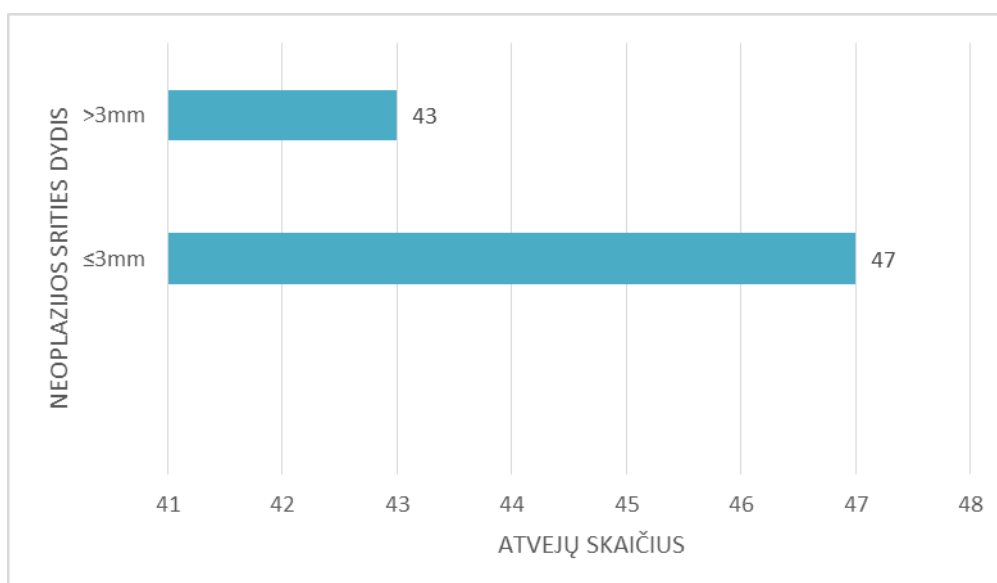
12 pav. Duomenys apie pacienčių nėštumus ir gimdymus

Ginekologinės apžiūros metu gimdos kaklelio transformacijos zona (vieta, kurioje dažniausiai vystosi ikivėžinės būklės) yra vertinama pagal jos matomumą ir skirstoma į tris grupes: I–visa transformacijos zona yra gimdos kaklelio makštinėje dalyje (egzocervikse), epitelijų jungtis matoma gerai; II-transformacijos zona ar jos dalis yra gimdos kaklelio kanale, visgi kolposkopuojant epitelijų jungtis yra matoma; III-visa ar dalis transformacijos zonos yra gimdos kaklelio kanale, tačiau, nepaisant pastangų, kolposkopuojant epitelijų jungtis nematoma ar matoma ne visa [4].

Aptariant tiriamųjų pacienčių gimdos kaklelio anatomijos savybes ir CIN 2-3 židinių dydį, iš 13-jame ir 14-ajame paveiksluose pateiktų duomenų matyti, kad gerai ir patenkinamai transformacijos zona buvo matoma 94 % atvejų, o didelės rizikos pakitimų dydis gimdos kaklelyje varijavo ir net 47 atvejai iš 90 CIN 2-3 pažeidimų buvo smulkūs, t.y. mažesni nei 3 mm dydžio.



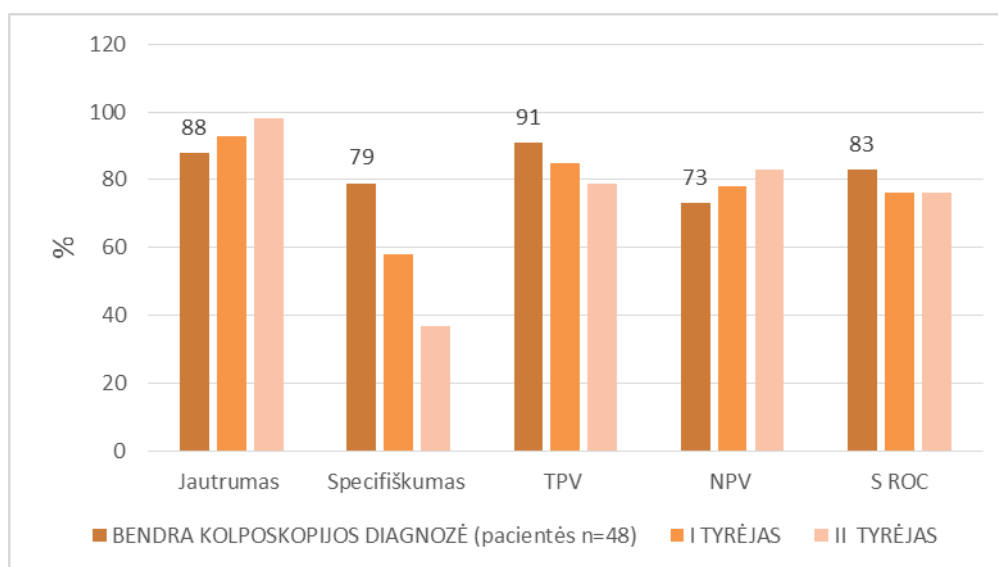
13 pav. Tiriamųjų pacienčių suskirstymas pagal gimdos kaklelio transformacijos zonos tipą



mm – milimetrai.

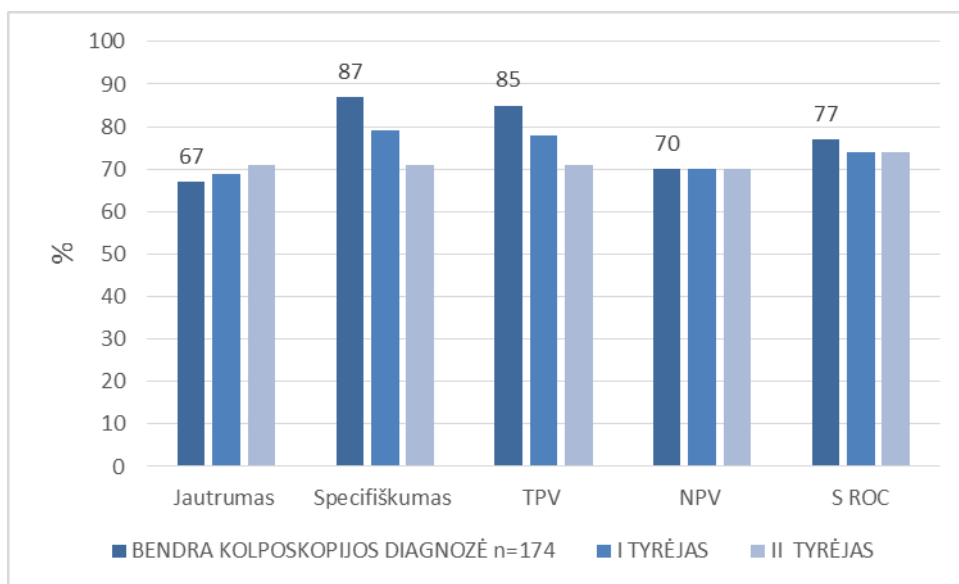
14 pav. CIN 2-3 židinių dydis gimdos kaklelyje

Kolposkopinius vaizdus vertino du gydytojai ginekologai. Tiriantis gydytojas – kolposkopinius vaizdus vertino realiu laiku, kitas gydytojas – pagal kolposkopinius video vaizdus. Kolposkopijos tyrimo atsakymai buvo skirstomi taip: norma, mažo laipsnio pokyčiai, didelio laipsnio pokyčiai, neinformatyvus arba nepatenkinamas kolposkopinis tyrimas [136]. Atliekant kolposkopiją diagnozė buvo nustatyta kiekvienam gimdos kakleliui ir atskiriems gimdos kaklelio kvadrantams. Didelės rizikos pakitimais buvo laikomi tie atvejai, kai vienas arba abu tyrėjai nustatydavo šiuos pakitimus, pateikiant diagnozę kiekvieno gimdos kaklelio kvadranto ir viso gimdos kaklelio (15-16 pav.).



n—atvejų skaičius; %-procentai; TPV-teigiama prognozė, NPV-neigiama prognozė; SROC-tyrimo vertė.

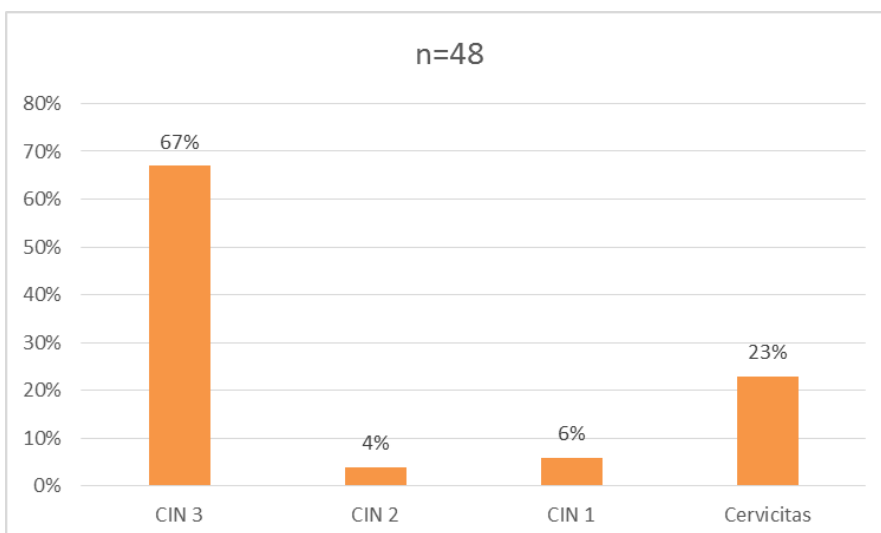
15 pav. Bendra kolposkopijos diagnozė tiriant dviems gydytojams (n=48 pacientės)



n–atvejų skaičius; %-procentai; TPV-teigiama prognozinė vertė; NPV-neigiama prognozinė vertė; S_{ROC}-tyrimo vertė.

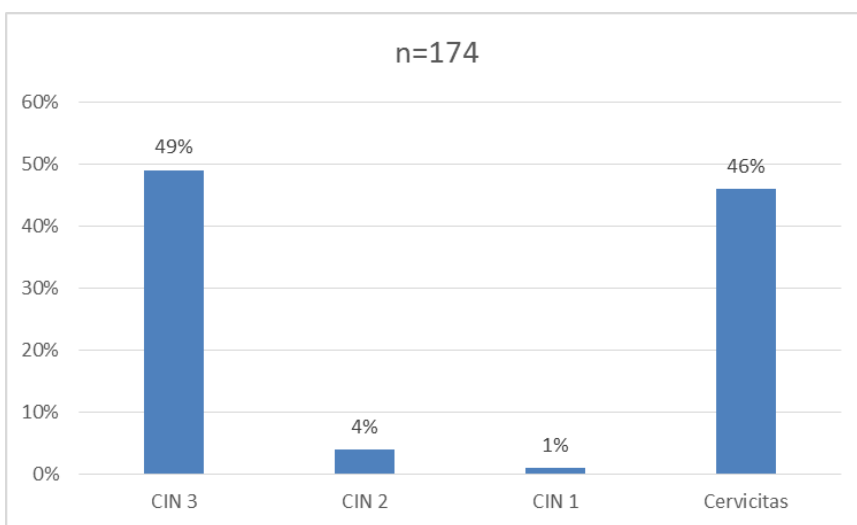
16 pav. Bendra kolposkopijos diagnozė tiriant dviems gydytojams (n=174 gimdos kaklelio kvadrantai)

Biopsijos/konizacijos histologiniai tyrimai buvo suskirstyti taip: cervicitas, CIN 1, CIN 2, CIN 3 gimdos kaklelio pokyčiai.



n-atvejų skaičius; %-procentai; CIN 1-mažo laipsnio intraepitelinė gimdos kaklelio neoplazija; CIN 2-vidutinio laipsnio intraepitelinė gimdos kaklelio neoplazija; CIN 3-didelio laipsnio intraepitelinė gimdos kaklelio neoplazija.

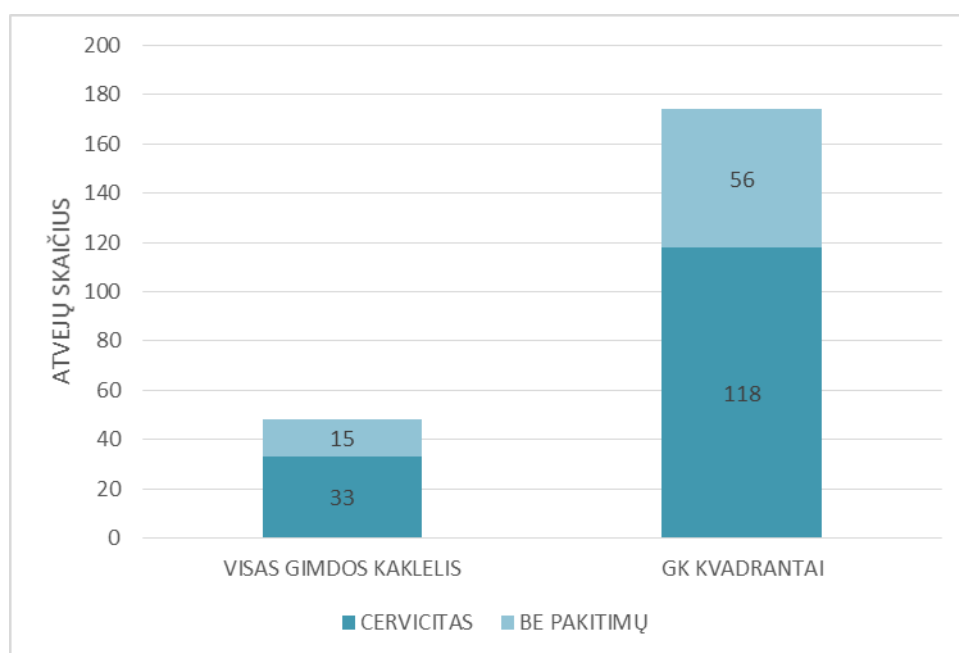
17 pav. Viso gimdos kaklelio histologinio tyrimo atsakymai (48 pacienčių)



n- atvejų skaičius; %-procentai; CIN 1-mažo laipsnio intraepitelinė gimdos kaklelio neoplazija; CIN 2-vidutinio laipsnio intraepitelinė gimdos kaklelio neoplazija; CIN 3-didelio laipsnio intraepitelinė gimdos kaklelio neoplazija.

18 pav. Atskiro gimdos kaklelio kvadranto (174 kvadrantų) histologinio tyrimo atsakymai

Gimdos kaklelio ikivėžinių būklių rizikos progresuoti į vėžį dydis yra sąlygotas ne tik intraepitelinės neoplazijos, nustatytos histologiškai, bet ir pacientės amžiaus, infekuotumo didelės rizikos tipų ŽPV, lytinio gyvenimo ypatumų, gimdymų skaičiaus, rūkymo įpročių, bendros sveikatos ir socialinės būklės bei kt. Šiame darbe tiriamųjų gimdos kaklelio pakitimus pavadiname didelės ir mažos rizikos gimdos kaklelio pakitimais, atsižvelgiant tik į diagnozuotus histologinius pokyčius.



19 pav. Histologiniame tyrime nustatyti lėtinio uždegimo požymiai (cervicitas)

Analizuodami histologinio tyrimo duomenis, matome, kad iš visų pacienčių atvykusių konsultuotis dėl atlikus citologinį tyrimą įtariamoms didelio laipsnio neoplazijos – ši diagnozė nustatyta 71 % pacienčių, bei 51 % visų gimdos kaklelio kvadrantų atvejų (17 ir 18 pav.). Svarbu taip pat pažymėti, kad beveik pusei tirtų pacienčių (bei atitinkamai gimdos kaklelio kvadrantų) buvo diagnozuotas lėtinis cervicitas (19 pav.).

Sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopija vertinta matuojant spektrus ir analizuojant jų intensyvumų santykius bei diagnozuojant didelės ir mažos rizikos gimdos kaklelio pakitimus pagal apskaičiuotą skaitinę vertę.

Pacienčių anketiniai duomenys, kolposkopiniai vaizdai, jų įvertinimai buvo registruojami specialiai sukurtoje kompiuterinėje duomenų bazėje, apdoroti fluorescencinės spektroskopijos spektrai - archyvuojami kompiuterio atmintyje.

Pacienčių įtraukimo kriterijai:

- > 18 m amžiaus moteris ;
- citologiškai diagnozuota gimdos kaklelio ASC-H, HSIL;
- nėra alergijos 5-ALA preparatui;
- anamnezėje nėra nustatyta porfirinų apykaitos sutrikimo;
- numatyta gimdos kaklelio konizacija ar biopsija po ištyrimo;
- pasirašytas sutikimas dalyvauti tyrime.

Pacienčių neįtraukimo kriterijai:

- citologiškai nepatvirtinta gimdos kaklelio ASC-H, HSIL;
- nėštumas;
- pacientei < 18 metų;
- anamnezėje buvęs porfirinų apykaitos sutrikimas;
- alergija 5-ALA preparatui;
- nesutikimas dalyvauti tyrime.

Pacienčių atšaukimo kriterijai:

- alergija 5-ALA preparatui;
- neatlikta gimdos kaklelio biopsija ar konizacija po ištyrimo;
- neužregistruoti fluorescencijos spektrai.

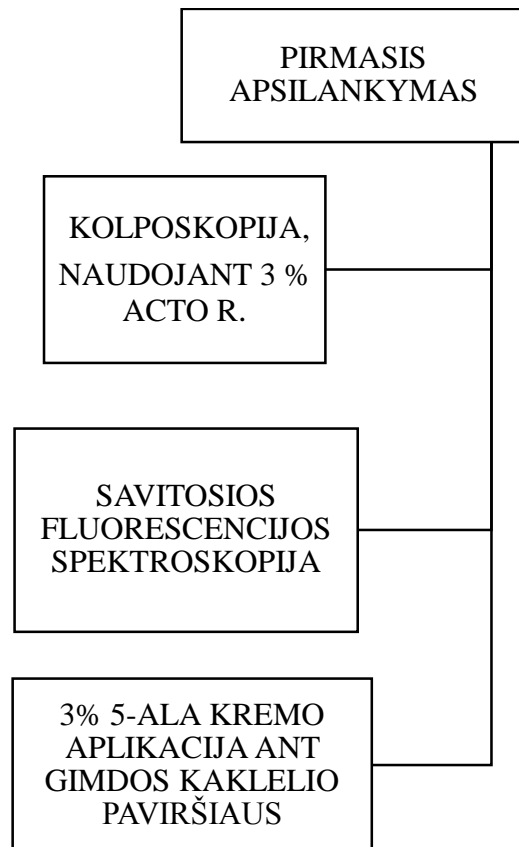
3.2. Tyrimo schema, vykdytų procedūrų ir pacienčių vizitų aprašymas

Tirtos pacientės, kurioms atlikus gimdos kaklelio citologinį tyrimą buvo įtarti žymūs intraepiteliniai pokyčiai. Mūsų tikslas buvo diagnozuoti CIN pakitimus ir atskirti atvejus, kada reikalinga intervencija (biopsija ar konizacija), t.y. atskirti didesnės rizikos atvejus (CIN 2-3). Pacienčių gimdos kaklelio pakitimus sąlyginai pavadiname didelės ir mažos rizikos vėžiui išsivystyti pakitimais, atsižvelgiant tik į histologinę diagnozę.

Kiekvienai pacientei buvo atlikta kolposkopija, savitoji ir sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopija, histologinis tyrimas, duomenys archyvuoti tolesnei analizei. 5-ALA koncentracija, vaistinė forma bei inkubacinis periodas pasirinkti, remiantis kitų autorių jau atliktais moksliniais tyrimais šia tema [33, 127, 128, 134].

Duomenys apdoroti statistiškai, duomenų tikslumui gerinti atliktas fluorescencijos matavimų normavimas, siekiant išvengti išorinių ir vidinių aplinkybių bei sąlygų nulemtų paklaidų.

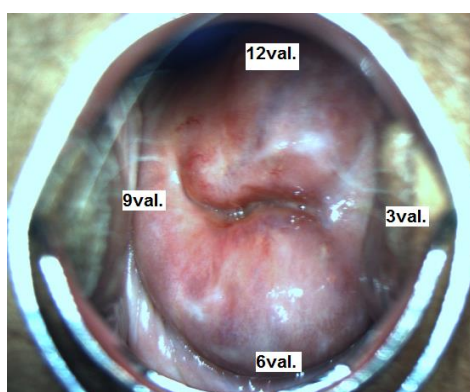
Suplanuoti pacienčių apsilankymai ir atliekamų procedūrų tvarka (20 pav.) :



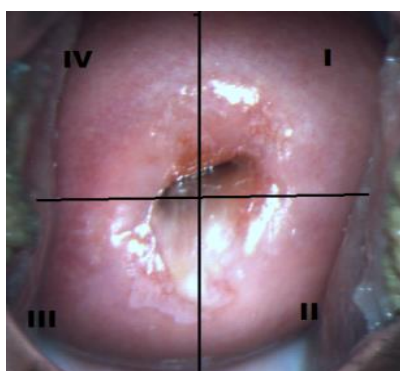
20 pav. Pirmojo pacientės apsilankymo tyrimų schema

Pirmiausia buvo atliekamas detalus klinikinis pacientės ištyrimas: buvo surenkama moters gyvenimo bei ginekologinė anamnezė (mėnesinių ciklo pobūdis, lytinės gyvensenos ypatumai, nėštumai, gimdymai, paskutinių menstruacijų data, persirgtos ligos, anksčiau atlikti gimdos kaklelio tyrimai, operacijos, vartojami vaistai, žinomos alerginės reakcijos). Tada buvo atliekamas įprastinis ginekologinis ištyrimas - moteriai gulint ant ginekologinės kėdės apžiūrėti išoriniai lyties organai, steriliais makštiniais skėtikliais išplėtus makšties sienelės (apžiūrima makštis, gimdos kaklelis). Atlikta kolposkopija *Wallach* gamybos *Zoomscope with Trulight* kolposkopu, naudojant 3 % acto rūgšties tirpalą, gimdos kaklelio vaizdai vertinti tyrimo metu, vaizdų nuotraukos išsaugotos kompiuterio atmintyje. Kolposkopiniai vaizdai vertinti nustatant preliminarią diagnozę - viso gimdos kaklelio ir kiekvieno gimdos kaklelio kvadranto (21, 22 pav.). Po to, naudojant fluorescencijos spektrų registravimo

sistemą matuoti kiekvieno gimdos kaklelio kvadranto fluorescencijos intensyvumai (2-5 taškuose). Gydytoja, registruodama spektrus spektroskopo šviesolaidžio zondą kuo tolygiau glaustavo prie tiriamo gimdos kaklelio paviršiaus taško ir spektras fiksuotas kompiuterio atmintyje (kiekvienam spektrui suteikiamas pavadinimas, nurodantis matavimo vietą gimdos kaklelyje). Apšvietus gimdos kaklelį 405 nm bangos ilgio šviesa buvo matoma fluorescencija plika akimi (gimdos kaklelio fluorescencijos vaizdų nepavyko nufotografuoti dėl techninių galimybių stokos).



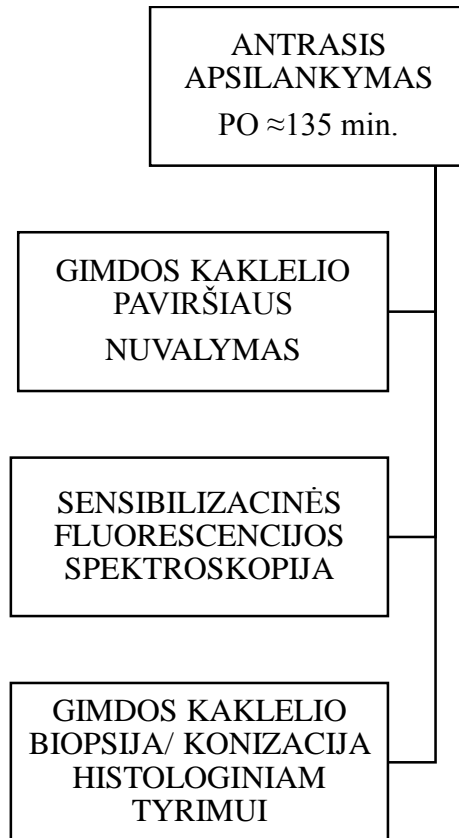
21 pav. Kolposkopijos metu matomo gimdos kaklelio paviršiaus schematinis suskirstymas į kvadrantus laikrodžio rodyklės principu



22 pav. Kolposkopijos metu matomo gimdos kaklelio paviršiaus schematinis suskirstymas į kvadrantus I, II, III, IV

Apžiūros pabaigoje gimdos kaklelio paviršius buvo padengiamas 3 % 5 – ALA kremu (viena dozė 3g). Po to buvo atliekamas bimanualinis tyrimas per makštį vertinant gimdos bei gimdos priedų būklę (padėtį, dydį, skausmingumą, darinius).

Toliau pateikiama antrojo pacientės apsilankymo tyrimų eiga (23 pav.).



23 pav. Antrojo pacientės apsilankymo tyrimų schema

Antrojo apsilankymo pacientė atvykdavo tą pačią dieną po 1,5-2,5 val. (mediana 135 min.). Buvo atliekama pakartotinė ginekologinė apžiūra, marliniu tamponu nuvalomas gimdos kaklelio paviršius. Naudojant fluorescencijos spektrų registravimo sistemą buvo išmatuojamas fluorescencijos intensyvumas kiekviename gimdos kaklelio kvadrante (2-5 taškuose) transformacijos zonos srityje. Spektrai registruoti priliečiant gimdos kaklelio paviršiaus tašką spektroskopo šviesolaidžio zondų, fiksuojant spektrą kompiuterio atmintyje.

Esant indikacijų (jei kolposkopijos vaizduose neįtariama žymios gimdos kaklelio neoplazijos ar planuojama neekscizinė procedūra (pvz., destrukcija lazeriu) ir kt.) pacientei biopsinėmis žnyplėmis buvo atliekamos biopsijos iš kiekvieno gimdos kaklelio kvadranto, arba dienos stacionaro sąlygomis suplanuojama gimdos kaklelio konizacija, atliekama taikant bendrinę (intraveninę) nejautrą.

Atlikus biopsijas (biopsinėmis žnyplėmis), medžiaga iš kiekvieno gimdos kaklelio kvadranto buvo dedama į atskirą indelį su 10 % buferiniu formalino tirpalu ir pažymint kvadranto numerį (I, II, III, IV). Jei buvo atliekama gimdos kaklelio konizacija – elektros kilpa išpjautas vientisas gimdos kaklelio konusas markiruotas, pritvirtinant prie specialios plokštelės sužymėtos laikrodžio valandų principu (24 pav.).



24 pav. Kamštinės medžiagos plokštelė histologiniam preparatui markiruoti po konizacijos (A) ir gimdos kaklelio konusas pritvirtintas prie plokštelės (B)

Biopsinė medžiaga arba išpjautas gimdos kaklelio konusas buvo dedami į 10 % formalino tirpalą ir siunčiami į patologinės diagnostikos laboratoriją (Patologijos diagnostika) gydytojui patologui ištirti. Sužymėti pagal gimdos kaklelio kvadrantus histologiniai audinių preparatai buvo ruošiami standartizuotai. Tiriamosios medžiagos mikropjūviai buvo perkeliama ant objektyvio stikliuko ir dažomi hematoksilinu-eozinu pagal standartinę metodiką. Gydytojas patologas pateikdavo kiekvieno gimdos kaklelio kvadranto galutinę

diagnozę, nurodydamas pažeidimo lokalizaciją ir plotį (mm). Gimdos kaklelio histologinio tyrimo rezultatai buvo vertinami pagal PSO 2003 m. patvirtintą Krūtų ir moters genitalijų piktybinių navikų klasifikaciją bei gimdos kaklelio intraepitelinės neoplazijos trijų laipsnių sistemą: mažo laipsnio neoplazija (CIN 1), vidutinio laipsnio neoplazija (CIN 2) ir didelio laipsnio neoplazija bei *carcinoma in situ* (CIN 3/CIS).

Pacientė buvo supažindinama su tyrimų rezultatais (po konizacijos/biopsijos praėjus 10 dienų gaunamas histologinio tyrimo atsakymas) bei tolesnėmis jos stebėjimo ar gydymo rekomendacijomis.

Toliau pacientės stebėtos ar gydytos remiantis galutiniu histologinio tyrimo atsakymu. Fluorescencijos ir morfologinių tyrimų atsakymai buvo lyginami ir analizuojami.

Tyrimus padėjo atlikti ir vertinti Nacionalinio vėžio instituto Konsultacinės poliklinikos skyriaus vedėja gydytoja ginekologė onkologė dr. Daiva Kanopienė ir medicinos fizikos studentė magistrantė Olga Žukovskaja.

Disertaciniame darbe pateiktų paveikslų publikavimui gauti autorių leidimai.

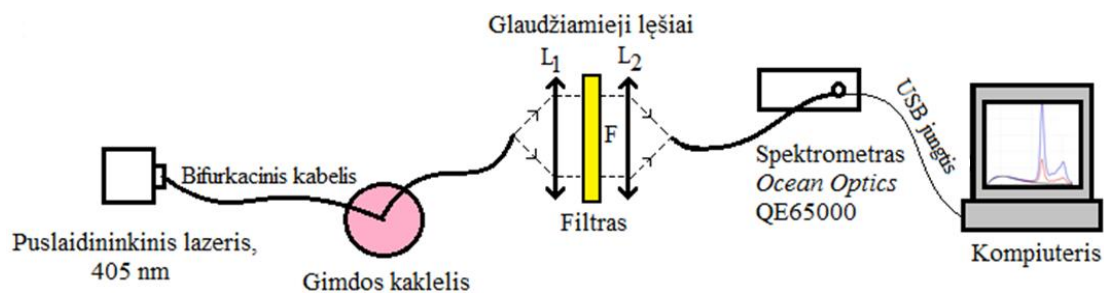
3.2.1. Tiriamasis preparatas, dozavimas

Taikant sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopiją buvo naudotas preparatas 5-ALA. Vaistinė forma buvo ruošiama iš 5-ALA hidrochlorido (*5-aminolevulinic hydrochloridum*) miltelių Gintarinėje vaistinėje (Vilnius, P. Baublio g. 2), turinčioje vaistų gamybos skyrių. *Ex tempore* buvo ruošiamas 3 % tepalas, riebaus kremo (*Excipial*) pagrindu. Preparatas buvo tinkamas naudoti iki 24 valandų, saugant nuo šviesos.

Ruošiantis diagnostinei procedūrai, ginekologinės apžiūros metu, naudojant sterilų marlinį tamponą, plonu 5-ALA tepalo sluoksniu sutepamas gimdos kaklelio paviršius. Po 1,5-2,5 val. inkubacinio periodo, gimdos kaklelio tiriamasis paviršius buvo švariai nuvalomas tamponu ir atliekama sensibilizacinės fluorescencinė diagnostika, naudojant fluorescencijos spektrų registravimo sistemą.

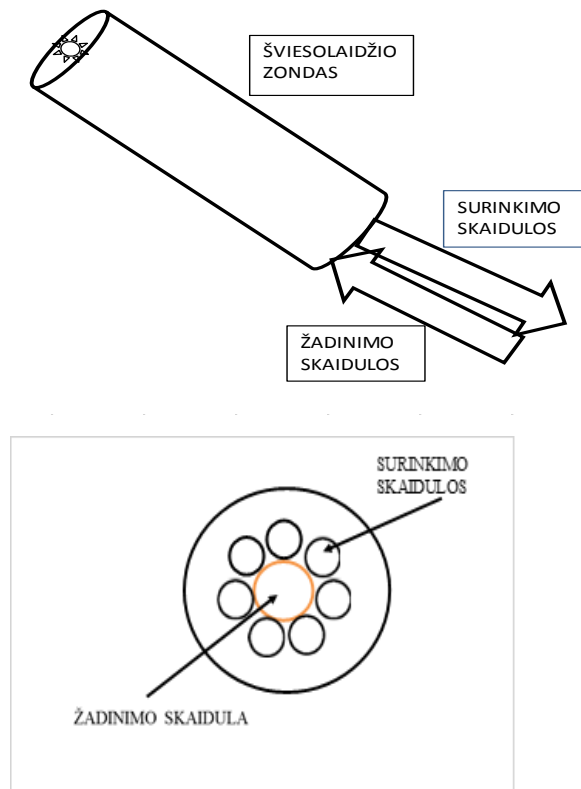
3.2.2. Naudota aparatūra

Darbo pradžioje buvo sudarytas darbo protokolas bei medicinos fizikų sumontuota speciali įranga, spektroskopinei analizei atlikti. Atliekant tyrimus paaiškėjo, kad nors fluorescencija matoma akimi, tačiau jos nefiksuoja kolposkope įrengta video įranga, taigi archyvuoti fluorescencijos vaizdų negalėjome. Fluorescencijos spektrų registravimo sistemos schema pavaizduota 25 – ajame paveiksle.



25 pav. Fluorescencijos spektrų registravimo sistemos schema

Fluorescencijai žadinti naudojamas puslaidininkinis lazeris, spinduliuojantis 405 nm bangos ilgio šviesą. Prie šio šviesos šaltinio tiesiogiai jungiamas žadinimo šviesolaidis, kuriuo spinduliuotė nuvedama iki audinio. Audinio optinis atsakas – fluorescencija – per spinduliuotės spektrinės sudėties modifikavimo sistemą (glaudžiamieji lęšiai L1 ir L2 bei geltonas filtras F), kurioje yra nufiltruojama žadinančioji spinduliuotė, surinkimo atšaka eina į spektrometrą QE65000 (*Ocean Optics*). Spektrometro šviesolaidžio zondo skersmuo 3,175 mm. Centre yra surinkimo skaidula 600 μm skersmens, aplink žadinimo skaidulos-200 μm skersmens. (26 pav.) Spektrų matavimas vyksta užtemdytoje patalpoje.



26 pav. Spektroskopo šviesolaidžio zondo schema

3.2.3. Fluorescencijos spektrų matavimo metodika

Ijungus spektrometrą, buvo nustatomas integravimo laikas 500 ms., išmatuojamas tamsinis triukšmo signalas, t.y. prietaiso parodymai registruoti tamsoje. Šis tamsinis triukšmo signalas vėliau automatiškai atimamas iš registruojamų duomenų. Tokia kalibravimo seka atliekama prieš kiekvieną naują pacientės tyrimą. Spektrai registruojami priliečiant gimdos kaklelio paviršiaus tašką spektrometro šviesolaidžio zonu ir fiksuojant spektrą kompiuterio atmintyje.

3.3. Statistinė duomenų analizė

Didelės ir mažos rizikos pakitimų gimdos kaklelio kvadrantuose diagnostinių koeficientų (D) statistinė analizė atlikta naudojant „Origin Pro 8“ kompiuterinę programą.

Skirstinių normalumui patikrinti buvo taikomas Šapiro-Vilko testas, esant $< 0,05$ reikšmingumo lygmeniui. Nustačius, kad skirstiniai yra nenormalieji, tolesnei analizei taikyti neparametriniai testai. Buvo atlikti Mano-Vitnio-Vilkoksono nepriklausomų imčių testai. Skirtumai buvo vertinami kaip statistiškai reikšmingi, jei $P(H_0=0) < 0,05$.

Diagnostiniam tyrimo tikslumui nustatyti buvo naudotos ROC kreivės, kurios atvaizduoja tyrimo jautrumo priklausomybę nuo specifiškumo bei parodo tyrimo vertę. Diagnostinio tyrimo vertė (arba tyrimo tikslumas) nustatoma apskaičiuojant plotą po ROC kreive. Matematiškai šis plotas yra lygus tikimybei, kad atsitiktiniam sergančiam asmeniui bus nustatytas didesnis tyrimo matavimo dydis nei atsitiktiniam sveikam asmeniui. Diagnostinė tyrimo vertė pagal plotą po kreive vertinama taip: kai plotas po kreive 0,9 – 1- tyrimas yra puikus, 0,8 – 0,9 – labai geras, 0,7 – 0,8 – geras, 0,6 – 0,7 – patenkinamas, 0,5 – 0,6 – nepakankamas. ROC kreivės nubraižytos naudojant „MedCalc“ programą. Statistiškai apdorojant tyrimo rezultatus apskaičiuotas kiekvieno tyrimo metodo jautrumas, specifiškumas, tikslumas, teigiama ir neigiama prognozinės vertės. Taip pat kiekvienam metodui sudaryta kryžminė 2x2 lentelė, nustatant teisingai teigiamų (TT), teisingai neigiamų (TN), klaidingai neigiamų (KN) ir klaidingai teigiamų (KT) išvadų skaičius iš rezultatų visumos, kai analizuojamas tiriamasis metodas analizuojamas į histologinį tyrimą, kaip „auksinį standartą“.

AUKSINIS STANDARTAS (Histologinis tyrimas)		LIGA YRA (teigiamas)	LIGOS NĖRA (neigiamas)
TIRIAMASIS METODAS	LIGA YRA (teigiamas)	TEISINGAI TEIGIAMAI ATVEJAI (TT)	KLAIDINGAI TEIGIAMAI ATVEJAI (KT)
	LIGOS NĖRA (neigiamas)	KLAIDINGAI NEIGIAMAI ATVEJAI (KN)	TEISINGAI NEIGIAMAI ATVEJAI (TN)

Apskaičiuoti tiriamųjų metodų jautrumas, specifiškumas, tikslumas, teigiama bei neigiama prognozinė vertė.

Jautrumas - rodiklis, apibūdinantis diagnostikos metodo tikslumą ir rodantis tikimybę, kad sergančio žmogaus tyrimo duomenys patvirtina ligą,

$$\text{Jautrumas} = \frac{TT}{TT + KN}$$

Specifiškumas - rodiklis, apibūdinantis diagnostikos metodo tikslumą ir rodantis tikimybę, kad sveiko žmogaus tyrimo duomenys patvirtina, jog jis yra tikrai sveikas,

$$\text{Specifiškumas} = \frac{TN}{KT + TN}$$

Tikslumas – rodiklis, apibūdinantis diagnostikos metodo tikslumą ir rodantis teisingai identifikuotų atvejų santykį su visais tiriamais atvejais,

$$\text{Tikslumas} = \frac{TT + TN}{TT + TN + KT + KN}$$

Teigiama prognozinė vertė (TPV) nusako teisingo ligos atpažinimo tikimybę tarp sergančiųjų,

$$\text{TPV} = \frac{TT}{TT + KT}$$

Neigiama prognozinė vertė (NPV) aprašo tikimybę nenustatyti ligos, kai jos nėra,

$$\text{NPV} = \frac{TN}{KN + TN}$$

Diagnostinių koeficientų skiriamajai vertei, pagal kurią galima atskirti gimdos kaklelio audinius turinčius didelės ir mažos rizikos pakitimų, nustatyti buvo skaičiuojamas Judeno kriterijus. Tuo tikslu buvo įvertintas jautrumas ir specifiškumas kiekvieną diagnostinį koeficientą nagrinėjant kaip skiriamąją vertę. Vėliau buvo braižomos ROC kreivės, o atstumas tarp labiausiai link kairiojo viršutinio krašto priartėjusio ROC kreivės taško ir diagonalės - yra Judeno kriterijus. Kuo Judeno kriterijus (atstumas) didesnis, tuo skiriamoji vertė tiksliau dalija visus diagnostinius koeficientus į didelės ir mažos rizikos

pakitimus apibūdinančias vertes. Paprastai skiriamąją vertę (c) pasirenkama ta, kuriai esant Judeno kriterijus yra maksimalus (A formulė).

$$J = \max (\text{jautrumas (c)} + \text{specifiškumas (c)} - 1) \quad (A)$$

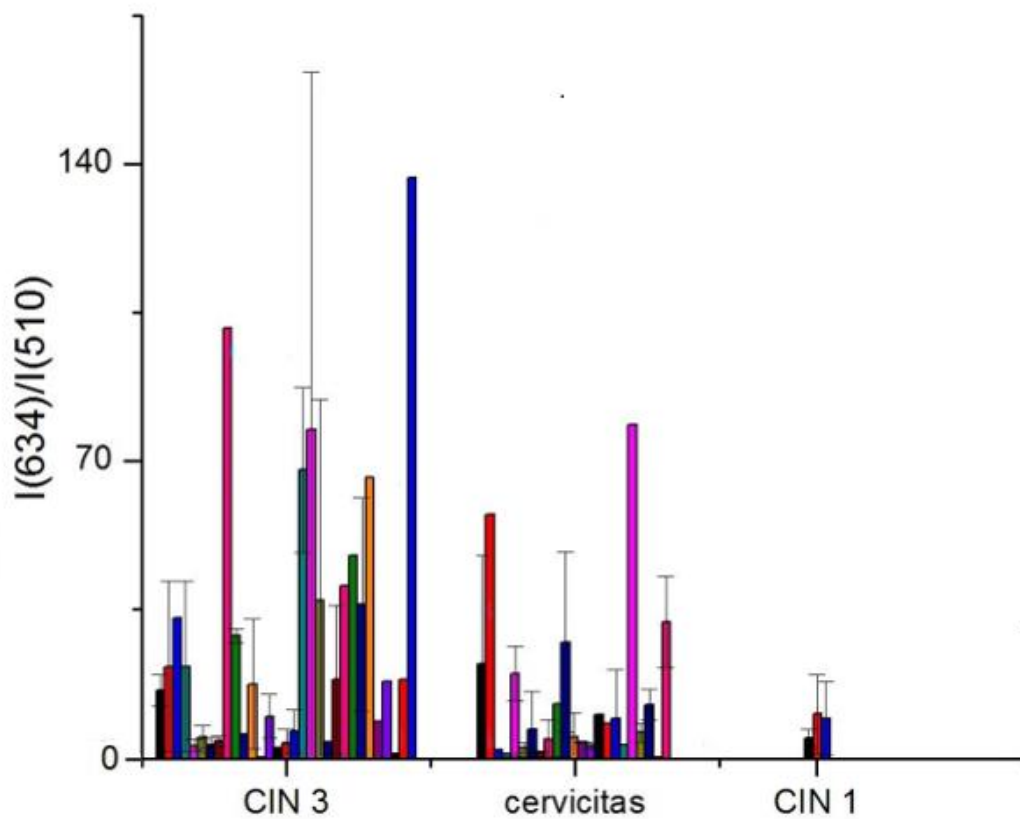
čia J – Judeno kriterijus; c – skiriamoji vertė; jautrumas (c) – jautrumas esant c skiriamajai vertei; specifiškumas (c) – specifiškumas esant c skiriamajai vertei.

4. DARBO REZULTATAI

Darbo pradžioje atliktas žvalgomasis tyrimas, kuriame dalyvavo 18 pacienčių. Tyrimo metu buvo sudarytas didelės ir mažos rizikos gimdos kaklelio pakitimų diferencijavimo skaičiavimo algoritmas, taip pat buvo identifikuoti metodo tikslumą mažinantys veiksniai, kurie tolesniame tyrime buvo eliminuoti. Kiekvienai pacientei buvo atlikta kolposkopija ir registruota gimdos kaklelio audinių fluorescencijos spektrai prieš 5-ALA kremo aplikaciją ir praėjus vidutiniškai 135 min. (90-150 min.) po šios aplikacijos, bei atliktas histologinis tyrimas (po gimdos kaklelio konizacijos). Kolposkopijos ir histologinio tyrimo diagnozė buvo pateikiama viso gimdos kaklelio ir kiekvieno atskiro gimdos kaklelio kvadranto (kaip atskiro tiriamojo atvejo). Fluorescencijos spektrai buvo išmatuoti 3–5 skirtingose kiekvieno gimdos kaklelio kvadranto vietose transformacijos zonos srityje. Kiekvienos pacientės fluorescencijos spektrai buvo sugrupuoti pagal gimdos kaklelio kvadrantus (I, II, III, IV).

Vienas iš pagrindinių veiksnių, lemiančių fluorescencinio metodo tikslumą, yra registravimo sąlygų pastovumas. Registravimo sąlygų pastovumą tiriant *in vivo* išlaikyti yra sudėtinga. Todėl siekiant eliminuoti paklaidas, kurios gali atsirasti glaudžiant šviesolaidžio zondą prie gimdos kaklelio paviršiaus, kiekvieno spektro PpIX fluorescencijos intensyvumo maksimumo ties 634 nm bangos ilgiu vertė buvo padalyta iš savitosios fluorescencijos srities maksimumo vertės ties 510 nm bangos ilgiu ir gautas intensyvumų santykis R: $R = \frac{I_{634}}{I_{510}}$.

Apskaičiuoti R buvo sugrupuoti pagal histologinio tyrimo diagnozes (27 pav.).



CIN 1 - mažo laipsnio intraepitelinė gimdos kaklelio neoplazija; CIN 3 - didelio laipsnio intraepitelinė gimdos kaklelio neoplazija; I - fluorescencijos intensyvumas.

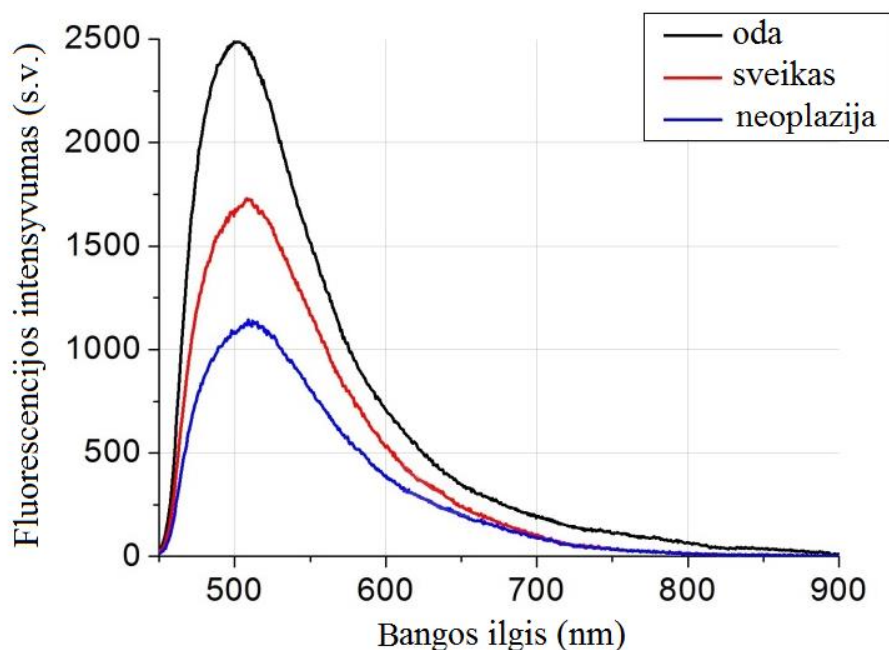
27 pav. Fluorescencijos intensyvumų santykio $R=I(634)/I(510)$ reikšmės priklausomybė nuo pakitimų gimdos kaklelio audiniuose

Kaip matyti iš 27 – amė paveiksle pateiktų duomenų, dalies gimdos kaklelio kvadrantų, kuriuose nėra neoplazijos R yra didesnis, nei esant didelio laipsnio neoplazijai, kai neoplaziniuose audiniuose fluorescencijos intensyvumas $I_{(634)}$ dėl susikaupusio didesnio PpIX kiekio turėtų būti didesnis nei sveikuose audiniuose, todėl ir neoplazinių audinių $R = \frac{I_{634}}{I_{510}}$ turėtų būti didesnis. Statistiškai reikšmingos koreliacijos tarp gimdos kaklelio neoplazijos laipsnio, diagnozuoto histologiškai, ir R nebuvo nustatyta. Tai galėjo lemti atvejai, kai patologinė sritis

gimdos kaklelyje yra labai maža ir fluorescencijos spektrai joje nebuvo užregistruoti, tačiau pakitimas nustatomas histologiškai ir lemia viso tiriamo gimdos kaklelio kvadranto histologinę diagnozę. Histologinė diagnozė yra pateikiama pagal didžiausią neoplazijos laipsnį (pvz., jei gimdos kaklelyje aptinkami CIN 1 ir CIN 3 pakitimai, galutinė diagnozė bus CIN 3), nes kliniškai yra aktualiausia rasti didžiausią esamą patologiją ir tuomet spręsti dėl gydymo taktikos. Kadangi fluorescencija yra matuojama daugelyje tiriamųjų taškų, (tiek nesant neoplazijos, tiek esant neoplazijai), todėl apskaičiuojant tik atliktų matavimų vidurkį netenkama dalies diagnostinės informacijos. Taigi, atsižvelgiant į tai, kad gimdos kaklelio kvadranto fluorescencijos spektrų vidurkio apskaičiavimas yra nekorektiškas, todėl atliekant sensibilizacinę fluorescencijos spektroskopiją buvo nutarta diagnozę formuluoti pagal aukščiausią R vertę tiriamojoje gimdos kaklelio srityje. Aukščiausia tiriamo gimdos kaklelio kvadranto R vertė turėtų atitikti žymiausią diagnozuotą neoplaziją, kurios buvimas lemia taip pat ir viso kvadranto diagnozę.

4.1. Savitosios fluorescencijos spektrų analizė

Į tyrimą įtrauktos 48 pacientės. Analizuoti 174 gimdos kaklelio kvadrantų duomenys. Atliekant spektrų matavimus tirta savitoji ir sensibilizacinė fluorescencija. Pirmiausia aptarsime savitosios fluorescencijos matavimų analizę. Tipiniai įvairių audinių savitosios fluorescencijos spektrai parodyti 28 – ame paveiksle. Iš šiame paveiksle pateiktų savitosios fluorescencijos spektrų, užregistruotų sveikame, neoplaziniame gimdos kaklelio audinyje bei odoje, matyti, kad savitosios fluorescencijos srityje maksimumas yra ties 510 nm bangos ilgiu, neoplazinio audinio fluorescencijos intensyvumas yra mažesnis nei sveiko audinio. Smailė savitosios fluorescencijos spektre yra sąlygota spektrometre esančio filtro optinių parametrų.



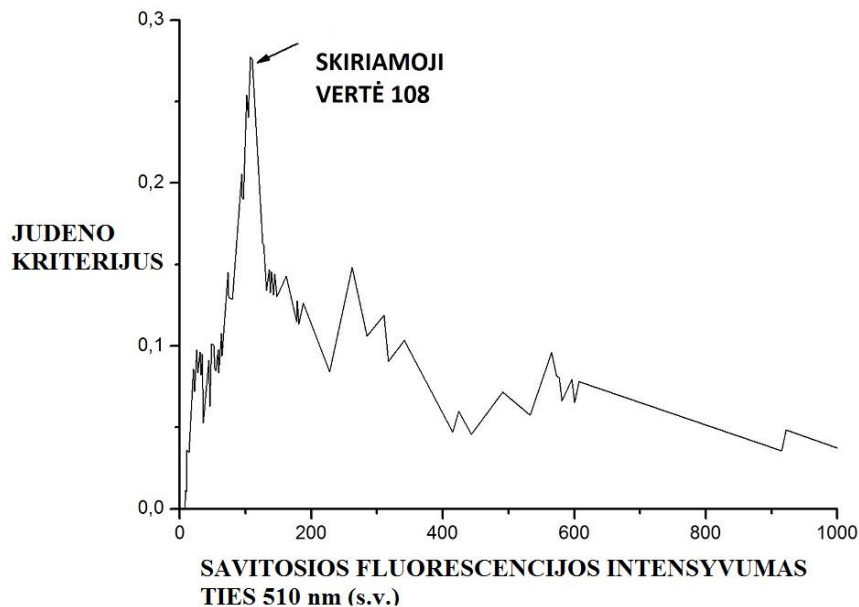
s.v. – santykiniai vienetai; nm – nanometrai.

28 pav. Sveikų ir neoplazinių gimdos kaklelio audinių bei odos savitosios fluorescencijos spektrai (be 5-ALA)

Siekiant nustatyti skaitinę skiriamąją vertę gimdos kaklelio mažos ir didelės rizikos pakitimams atskirti savitosios fluorescencijos spektroskopijos metodu buvo nustatyta kiekvieno gimdos kaklelio kvadranto savitosios fluorescencijos srityje maksimalaus intensyvumo vertė ties 510 nm, kiekvienai iš jų apskaičiuotas Judeno kriterijus. Literatūros duomenimis, mažiausias savitosios fluorescencijos intensyvumas koreliuoja su didžiausio laipsnio neoplazija [135], todėl gimdos kaklelio kvadranto diagnozei nustatyti buvo pasirinktas mažiausią intensyvumo vertę turintis spektras.

Atlikus skaičiavimus gauta, kad Judeno kriterijaus aukščiausia vertė yra 0,27 ir ji buvo pasiekta, kai savitosios fluorescencijos vertė buvo 108. Šią vertę pasirinkome skiriamąją verte mažos ir didelės rizikos pakitimams gimdos kaklelyje atskirti (29 pav.), t.y. savitosios fluorescencijos didžiausio

intensyvumo vertės mažesnės nei 108 buvo vertinamos kaip gimdos kaklelio didelės rizikos pakitimai CIN 2-3.



s.v. – santykiniai vienetai

29 pav. Skiriamos vertės nustatymas iš apskaičiuotų Judeno kriterijų kiekvieno gimdos kaklelio kvadranto savitosios fluorescencijos intensyvumui ties 510 nm

Nustačius skiriamąją vertę visos savitosios fluorescencijos vertės padalytos į dvi grupes (n (CIN 0-1 kvadrantai) = 86; n (CIN 2-3 kvadrantai) = 88). Savitosios fluorescencijos metodu nustatytų didelės rizikos pakitimų tiriamoje grupėje apskaičiuota mediana 98,5, vidurkis – 242,9, mažos rizikos pakitimų grupėje - atitinkamai 116,5 ir 387,1. Atlikus statistinę analizę taikant, Mano-Vitnio-Vilkoksono testą nustatyta, kad CIN 0-1 grupės savitosios fluorescencijos vertės, esant reikšmingumo lygiui $< 0,05$, yra statistiškai reikšmingai didesnės negu CIN2-3 grupės vertės. Savitosios fluorescencijos vertes lyginant su „auksiniu standartu“ histologiniu tyrimu visam gimdos kakleliui ir atskiriems gimdos kaklelio kvadrantams sudarytos kryžminės lentelės 2x2 (4 lent.), apskaičiuotas kolposkopijos ir savitosios fluorescencijos jautrumas, specifiškumas, tikslumas,

teigiama ir neigiama prognozinės vertės bei įvertintas plotas po ROC kreive, aprašantis tyrimo vertę (5 lent.).

4 lentelė. Savitosios fluorescencijos spektroskopijos ir histologinio tyrimo palyginimas analizuojant gimdos kaklelio kvadrantų duomenis (n=174)

Histologinis tyrimas		DR	MR
Savitosios fluorescencijos spektroskopija	DR	52	39
	MR	36	47

MR - mažos rizikos gimdos kaklelio pakitimai; DR - didelės rizikos gimdos kaklelio pakitimai.

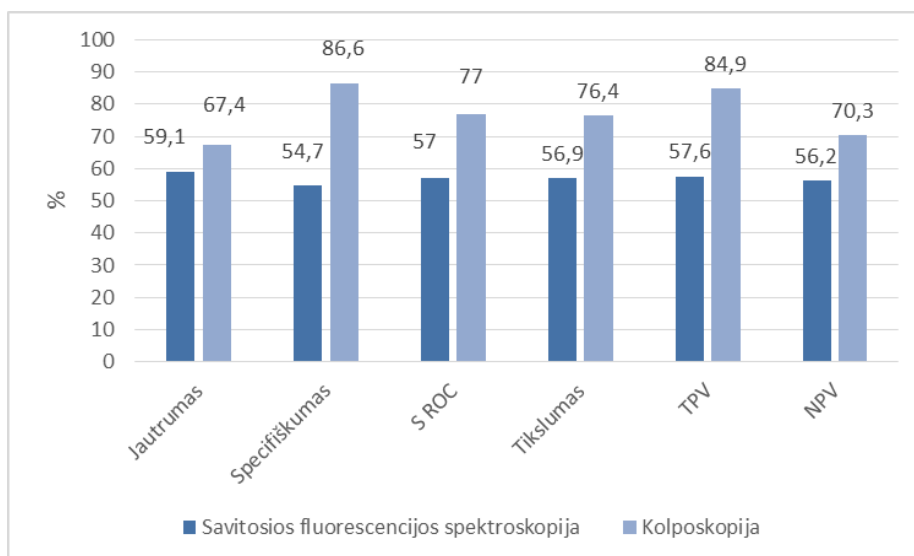
Iš 4 – oje lentelėje pateiktų rezultatų (analizuojant 174 gimdos kaklelio kvadrantus) matyti, kad tiriant savitosios fluorescencijos spektroskopijos metodu buvo teisingai diagnozuoti 52 didelės rizikos atvejai ir 47 – mažos rizikos atvejai. Mažos rizikos pakitimai klaidingai diagnozuoti kaip didelės – 39 atvejais ir 36 atvejai diagnozuoti kaip mažos rizikos, nors histologiškai buvo patvirtinti didelės rizikos pakitimai.

5 lentelė. Savitosios fluorescencijos spektroskopijos ir kolposkopijos jautrumo, specifiškumo, tyrimo vertės bei teigiamos ir neigiamos prognozinės vertės palyginimas analizuojant gimdos kaklelio kvadrantų duomenis (n=174)

Metodas	Jautrumas, % (95% PI)	Specifiškumas, % (95% PI)	TPV, %	NPV, %	S _{ROC} (95% PI)
Savitosios fluorescencijos spektroskopija	59,1 (48,1– 69,5)	54,7 (43,5 – 65,4)	57,6	56,2	0,569 (0,492 - 0,643)
Kolposkopija	67,4 (56,8-76,8)	86,6 (77,3-93,1)	84,9	70,3	0,770 (0,700-0,830)

TPV- teigiama prognozinė vertė; NPV - neigiama prognozinė vertė; S_{ROC}-tyrimo vertė; %-procentai; PI - pasikliautinis intervalas.

30 –ame paveiksle pateikti duomenys savitosios fluorescencijos ir kolposkopijos tyrimų statistiniams rodikliams palyginti.



TPV - teigiama prognozinė vertė; NPV- neigiama prognozinė vertė; S_{ROC} – tyrimo vertė; %-procentai; n- atvejų skaičius.

30 pav. Savitosios fluorescencijos spektroskopijos ir kolposkopijos jautrumo, specifiškumo, tikslumo, tyrimo vertės (S_{ROC}) bei teigiamos ir neigiamos prognozinės vertės palyginimas analizuojant gimdos kaklelio kvadrantų duomenis (n=174)

Iš 30–ame paveiksle pateiktų duomenų matyti, kad lyginant savitosios fluorescencijos spektroskopijos metodą su įprastine kolposkopija tiriant gimdos kaklelio kvadrantus, metodų jautrumas yra atitinkamai 59,1 % ir 67,4 %, o specifiškumas 54,7 % ir 86,6 %.

Toliau tirtas viso gimdos kaklelio savitosios fluorescencijos spektroskopijos tikslumas. Sudarytos kryžminės lentelės 2x2 teisingai teigiamų ir neigiamų bei klaidingai teigiamų ir neigiamų atvejų analizei savitosios fluorescencijos spektroskopijos diagnozes lyginant su histologiniu tyrimu.

Iš 6–oje lentelėje pateiktų rezultatų matyti, kad tiriant savitosios fluorescencijos spektroskopijos metodu buvo teisingai diagnozuota 27 iš 33 didelės rizikos gimdos kaklelio pakitimų atvejų bei 7 iš 15 mažos rizikos pakitimų atvejų. Mažos rizikos pakitimai diagnozuoti kaip didelės rizikos 8 atvejais ir 6 atvejais

diagnozuoti kaip mažos rizikos, nors histologiškai buvo patvirtinti didelės rizikos pakitimai.

6 lentelė. Savitosios fluorescencijos spektroskopijos ir histologinio tyrimo palyginimas analizuojant viso gimdos kaklelio duomenis (n = 48)

Histologinis tyrimas		DR	MR
Savitosios fluorescencijos spektroskopija	DR	27	8
	MR	6	7

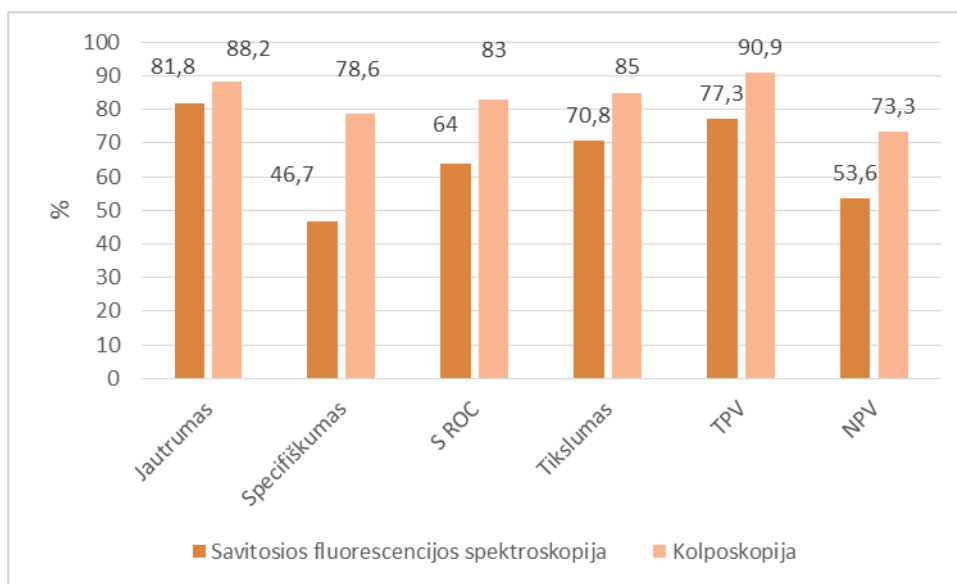
MR - mažos rizikos gimdos kaklelio pakitimai; DR - didelės rizikos gimdos kaklelio pakitimai.

7-oje lentelėje pateikiami duomenys savitosios fluorescencijos ir kolposkopijos tyrimų statistiniams rodikliams palyginti.

7 lentelė. Savitosios fluorescencijos spektroskopijos ir kolposkopijos jautrumo, specifiškumo, tyrimo vertės bei teigiamos ir neigiamos prognozinės vertės palyginimas analizuojant viso gimdos kaklelio duomenis (n=48)

Metodas	Jautrumas, % (95% PI)	Specifiškumas, % (95% PI)	TPV, %	NPV, %	S _{ROC} (95% PI)
Savitosios fluorescencijos spektroskopija	81,8 (64,5 – 93,0)	46,7 (21,3 – 73,4)	77,3	53,6	0,642 (0,491-0,775)
Kolposkopija	88,2 (72,5-96,6)	78,6 (49,2-95,1)	90,9	73,3	0,834 (0,699-0,925)

TPV- teigiama prognozinė vertė; NPV - neigiama prognozinė vertė; S_{ROC} - tyrimo vertė; %-procentai; PI - pasikliautinis intervalas.



*TPV - teigiama prognozinė vertė; NPV- neigiama prognozinė vertė;
S_{ROC} – tyrimo vertė; %-procentai; n – atvejų skaičius.*

31 pav. Savitosios fluorescencijos spektroskopijos ir kolposkopijos jautrumo, specifiškumo, tikslumo, tyrimo vertės (S_{ROC}) bei teigiamos ir neigiamos prognozinės vertės palyginimas analizuojant viso gimdos kaklelio duomenis (n=48)

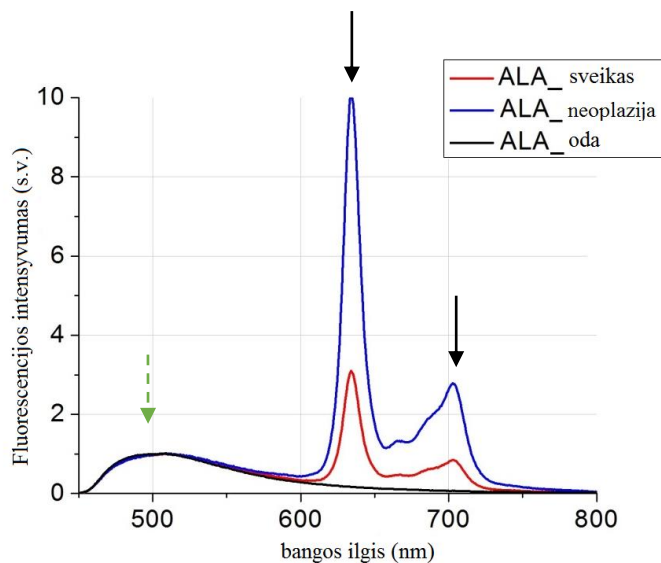
Buvo atliktas apskaičiuotos savitosios fluorescencijos spektroskopijos ir kolposkopijos jautrumo, specifiškumo, tyrimo vertės bei teigiamos ir neigiamos prognozinės vertės palyginimas analizuojant visą gimdos kaklelį (t.y. viso gimdos kaklelio diagnozę lemia gimdos kaklelio kvadrantas, kuriame nustatyta didžiausio laipsnio neoplazija). Iš 31-ame paveiksle pateiktų duomenų matyti, kad lyginant savitosios fluorescencijos spektroskopijos metodą su kolposkopija analizuojant visą gimdos kaklelį, šių metodų jautrumas yra atitinkamai 81,8 % ir 88,2 %, o specifiškumas - 46,6 % ir 78,6 %.

Kadangi savitosios fluorescencijos spektroskopijos diagnostika remiasi tik fluorescencijos intensyvumų skirtumais, šio metodo tikslumas tiesiogiai priklauso nuo tyrimo atlikimo sąlygų pastovumo (šviesolaidinio zondo prigludimo kampo, prispaudimo stiprumo, organizmo skysčių esančių matavimo vietoje, patalpos apšvietimo ir kt.), kurias išlaikyti nekintančias

tyrimo *in vivo* atlikimo metu sudėtinga. Gauti rezultatai rodo, kad savitosios fluorescencijos spektroskopija yra jautrus gimdos kaklelio neoplazijos diagnostikos metodas, tačiau, kaip minėta, yra sudėtinga išlaikyti vienodas tyrimo sąlygas tiriant *in vivo*, o tai lemia paklaidas registruojant spektrus. Nustatyti savitosios fluorescencijos spektroskopijos metodo tikslumo rodikliai yra reikšmingai mažesni nei įprasto tyrimo metodo – kolposkopijos, todėl, matyti, kad siekiant diegti šį metodą klinikinėje praktikoje reikalingi papildomi veiksmai, sumažinantys matavimų paklaidas. Tai, kad tiriant savitosios fluorescencijos spektroskopijos metodu negaut pakankamo kontrasto tarp mažos ir didelės rizikos gimdos kaklelio pakitimų paskatino mus ieškoti kitų diagnostinių metodų, mūsų atveju pasirinkta sensibilizacinė fluorescencijos spektroskopija naudojant 5- ALA.

4.2. Sensibilizacinės fluorescencijos spektrų analizė

Mūsų tyrime, panaudojus 5-ALA, PpIX fluorescencija buvo stebima ir sveikuose, ir patologiniuose gimdos kaklelio audiniuose (smailės ties 634 nm ir 703 nm).



s.v. – santykiniai vienetai; nm – nanometrai; ALA – 5- aminolevulinė rūgštis.

32 pav. Sveikų ir neoplazinių gimdos kaklelio audinių bei odos fluorescencijos spektrai po 5-ALA panaudojimo, normuoti į savitosios fluorescencijos smailę ties 510 nm

Tipiniai gimdos kaklelio audinių ir odos fluorescencijos spektrai naudojant 5-ALA parodyti 32-ame paveiksle. Sveiko gimdos kaklelio audinio fluorescencijos spektre panaudojus 5-ALA naudojimo matome PpIX fluorescencijos maksimumą (smailės ties 634 nm ir 703 nm) ir savitosios fluorescencijos srityje maksimumą (smailė ties 510 nm). Esant gimdos kaklelio neoplazijai fluorescencijos intensyvumas ties 634 nm ir 703 nm yra didesnis negu sveiko audinio, kas rodo gausesnę PpIX susikaupimą patologijos srityse. Išmatuoti odos spektrai, neturėjo PpIX būdingos smailės, o tai rodo, kad, vietiškai naudojant 3 % 5-ALA kremą gimdos kaklelio diagnostikai, perteklinė PpIX gamyba kituose organuose nevyksta (sisteminio poveikio nėra) ir nesukeliama šalutinių poveikių.

Analogiškai kaip ir savitosios fluorescencijos atveju, gimdos kaklelio kvadranto ir viso gimdos kaklelio diagnozė buvo nustatoma pagal vieną vertę (vertę, kuri

nurodo didžiausią tiriamos srities neoplazijos laipsnį). Tiriant sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos metodu didžiausią patologiją atitinka didžiausias PpIX fluorescencijos intensyvumas, todėl nustatant diagnozę buvo imamas didžiausių intensyvumų santykio $R = \frac{I_{634}}{I_{510}}$ vertę turintis spektras.

Buvo nustatytas kiekvieno gimdos kaklelio kvadranto R. Taip pat buvo apskaičiuotas sveiko gimdos kaklelio audinio R. Sveiko gimdos kaklelio audinio spektrų matavimas atliekamas toliau nuo transformacijos zonos, toje srityje kolposkopu neaptikus patologinių pokyčių. Viso gimdos kaklelio sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos diagnozė buvo nustatyta pagal didžiausią R vertę turintį gimdos kaklelio kvadrantą.

4.3. Diagnostinio koeficiento apskaičiavimo algoritmas

Įvairių tyrėjų yra nustatyta, kad tos pačios pacientės (skirtinguose taškuose) ir skirtingų pacienčių fluorescencijos reikšmių kitimus gali lemti individualios organizmo savybės pavyzdžiui, rasė, kūno masės indeksas, nėštumų/gimdymų skaičius, mėnesinių ciklo fazė, hormoniniai kitimai, socialinė ekonominė pacientės būklė [23,136], ieškojome būdo, kaip šias paklaidas maksimaliai sumažinti. Siekiant atlikti pacienčių visumos analizę, kiekvienos pacientės gautos vertės buvo sunormuotos. Normavimas atliktas dalinant kiekvieno gimdos kaklelio kvadranto intensyvumų santykį R_{GK} kiekvieno kvadranto iš apskaičiuoto tos pačios pacientės sveiko gimdos kaklelio audinio intensyvumų santykio $R_{sveiko\ GK\ audinio}$ (A formulė). Gauta vertė pavadinta diagnostiniu koeficientu – D. Tolesni skaičiavimai atlikti naudojant D vertes.

$$D = \frac{R(GK\ kiekvieno\ kvadranto)}{R(sveiko\ GK\ audinio)} \quad (A)$$

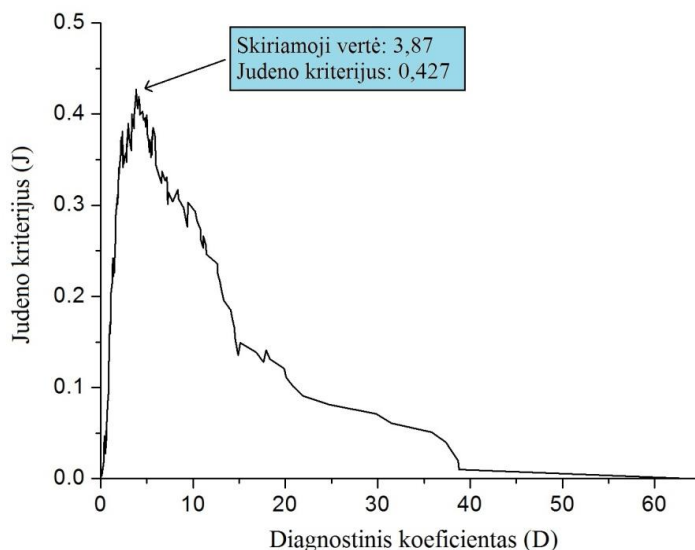
Neoplazinių audinių fluorescencijos intensyvumas ilgabangėje srityje yra didesnis, palyginti su sveikų audinių fluorescencijos intensyvumu.

Fluorescencijos spektrų normavimas pagal savitosios fluorescencijos smaile gerina metodo tinkamumą, nes eliminuoja kintančių matavimo sąlygų sukeltą paklaidų kiekį.

Prieš 5-ALA naudojimą gimdos kaklelio audinių fluorescencijos spektruose PpIX fluorescencijos nebuvo užfiksuota. Savitosios fluorescencijos maksimumas yra ties 510 nm, sveiko gimdos kaklelio audinio – fluorescencijos intensyvumas yra didesnis nei neoplazinio audinio (priešingai nei sensibilizacinės fluorescencijos atveju).

4.4. Skaitinės skiriamosios vertės gimdos kaklelio didelės rizikos pakitimams diagnozuoti, nustatymas

Siekiant nustatyti sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos skaitinę skiriamąją vertę gimdos kaklelio mažos ir didelės rizikos pokyčių diagnostikai – kiekvienam gimdos kaklelio kvadrantui buvo apskaičiuotas diagnostinis koeficientas D ir kiekvienai gautai D vertei apskaičiuotas Judeno kriterijus (34 pav.)



34 pav. Judeno kriterijaus priklausomybė nuo skaitinės skiriamosios vertės

Iš 34 – amė paveiksle pateiktų duomenų matyti, kad Judeno kriterijaus aukščiausia vertė yra 0,427 ir ji buvo pasiekta, kai D vertė yra **3,87**. Ši vertė parodo, kad esant tokiai ribinei vertei (jei D vertė yra mažesnė nei 3,78 – gimdos kaklelio kvadrante yra mažos rizikos pakitimų, jei D vertė didesnė nei 3,78, gimdos kaklelio kvadrante yra didelės rizikos pakitimų) pasiekiamas geriausias metodo tikslumas, todėl skaitinė vertė 3,87 ir buvo pasirinkta skiriamąja verte t.y. rizikos lygio riba, mažos ir didelės rizikos pakitimams gimdos kaklelyje atskirti.

Nustačius skiriamąją vertę visos D vertės suskirstytos į dvi grupes ($n_{(CIN\ 0-1\ kvadrantai)} = 88$; $n_{(CIN\ 2-3\ kvadrantai)} = 86$). Statistinei analizei pritaikius Šapiro-Vilko testą nustatyta, kad reikšmingumo lygiui esant $< 0,05$ šie tiriamieji skirstiniai nėra normalieji. Skirstinių normalumą svarbu nustatyti pasirenkant tolesnius statistinės analizės metodus.

Didelės rizikos gimdos kaklelio pakitimų grupėje apskaičiuota mediana 5,9, vidurkis – 9,7, esant mažos rizikos pokyčiams atitinkamai 2,1 ir 3,2. Siekiant patikrinti, ar susidariusios didelės ir mažos rizikos grupės (jų vertės) reikšmingai skiriasi statistinei analizei pritaikytas Mano-Vitnio-Vilkoksono nepriklausomų imčių testas. Nustatyta, kad, esant reikšmingumo lygiui esant $< 0,05$, didelės rizikos pakitimų grupės D vertės yra didesnės už mažos rizikos pakitimų grupės D vertes $P(H_0=0)=2,53E-9$.

Taigi, išmatavus gimdos kaklelio kvadrantų fluorescencijos spektrus ir nustačius D vertes, visi kvadrantai, kurių D yra daugiau nei 3,87 buvo priskirti didelės rizikos pakitimams, likę atvejai – mažos rizikos pakitimams.

4.5. Sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos, kolposkopijos bei šių metodų derinio diagnostinio tikslumo palyginimas

Siekiant palyginti savitosios ir sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos bei kolposkopijos rezultatus, kiekvienas iš taikytų diagnostinių metodų buvo

palygintas su „auksiniu standartu“ – histologiniu tyrimu ir sudarytos kryžminės lentelės 2x2 duomenų analizei.

8 lentelė. Sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos, kolposkopijos ir šių metodų derinio palyginimas su histologiniu tyrimu analizuojant gimdos kaklelio kvadrantų duomenis (n =174)

Histologinis tyrimas		DR	MR	Histologinis tyrimas		DR	MR
Sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopija	DR	66	20	Kolposkopija	DR	62	11
	MR	26	62		MR	30	71
Histologinis tyrimas		DR	MR				
Metodų derinys	DR	81	25				
	MR	11	57				

MR-mažos rizikos gimdos kaklelio pakitimai; DR-didelės rizikos gimdos kaklelio pakitimai.

Atliekant sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopiją 86 kvadrantuose diagnozuoti didelės rizikos gimdos kaklelio pakitimai ir 88 – mažos rizikos pakitimai. Pagal histologinį tyrimą sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos metodu teisingai nustatyta didelės rizikos pakitimų diagnozė 66 atvejais iš 86, teisingai nustatyti mažos rizikos pakitimai 62 iš 86. Iš pateiktų duomenų taip pat matyti, kad 20 mažos rizikos kvadrantų buvo klaidingai priskirti didelės rizikos pakitimų kvadrantams, o 26 kvadrantuose priešingai - buvo aptikti mažos rizikos pakitimai, kai histologiškai buvo įrodytas didelės rizikos pakitimų buvimas.

Vertinant gimdos kaklelio kvadrantus kolposkopiškai diagnozuota, kad 73 kvadrantuose yra didelės rizikos pakitimų ir 101 – mažos rizikos pakitimų (8 lent.). Pagal gautus duomenis, 30 didelės rizikos pakitimų atvejų nebuvo aptikta ir 11-oje kvadrantų buvo klaidingai diagnozuoti didelės rizikos pakitimai jų neesant.

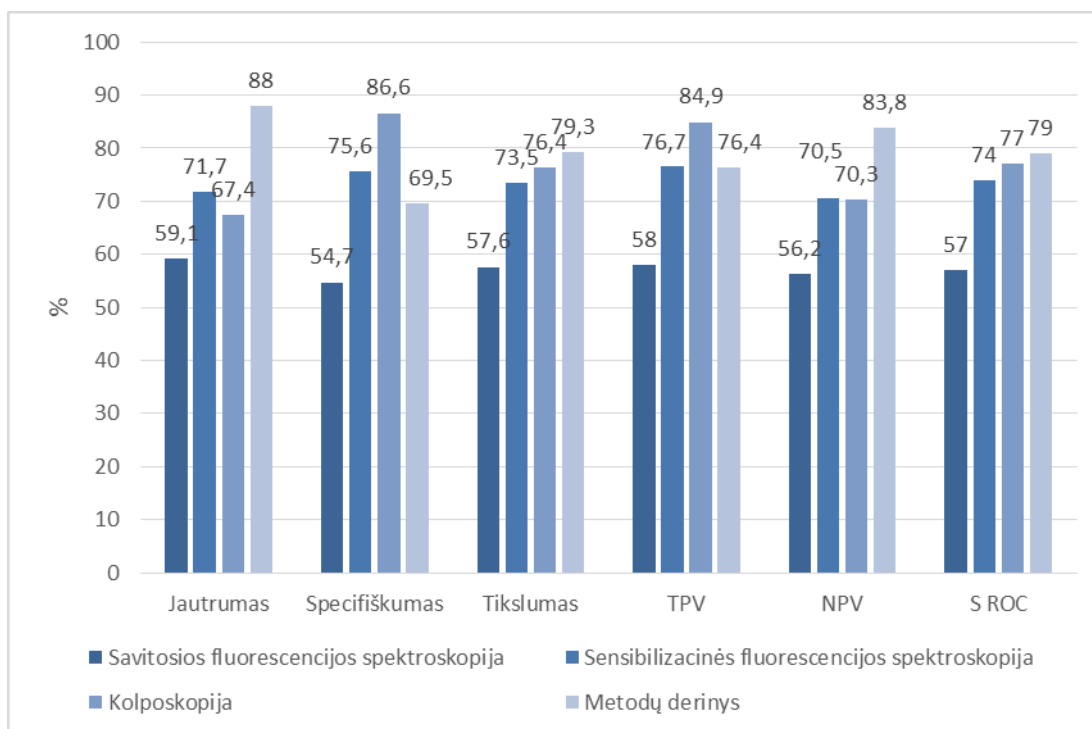
Vienas iš potencialių sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos naudojimo tikslų yra papildyti jau naudojamą įprastinį tyrimą („antra nuomonė“) patikslinti įprastinį ištyrimą (mūsų atveju – kolposkopiją) atliekančio gydytojo išvadas, t. y. naudoti tyrimų derinį (8 lent.). Taikant metodų derinį didelės rizikos pakitimai laikyti nustatytais, jei bent vienu iš tyrimo metodų jie aptikti. Atliekant metodų derinio tyrimą 106 kvadrantai diagnozuoti kaip turintys didelės rizikos ir 68 – mažos rizikos pakitimus (8 lent.). Iš pateiktų duomenų matyti, kad teisingai nustatyta didelės rizikos diagnozė 81 atveju iš 106, ir mažos rizikos pakitimai - 57 iš 68 atvejų. Tenka taip pat pažymėti, kad derinant kartu kolposkopiją ir sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopiją, tik 11 didelės rizikos atvejų buvo diagnozuoti neteisingai, tad galime teigti, jog metodų derinys duoda geriausius rezultatus. Vis dėlto, 25 mažos rizikos pakitimų atvejai buvo klaidingai priskirti didelės rizikos pakitimams.

Pagal gautus rezultatus buvo apskaičiuoti visų taikytų diagnostinių metodų savitosios fluorescencijos spektroskopijos, sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos ir kolposkopijos bei pastarųjų dviejų metodų derinio statistiniai rodikliai: jautrumas, specifiškumas, tikslumas, tyrimo vertė bei teigiama ir neigiama prognozinė vertė. Rezultatai pateikti 9-oje lentelėje ir 35 –ame paveiksle.

9 lentelė. Savitosios fluorescencijos spektroskopijos, sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos ir kolposkopijos bei pastarųjų dviejų metodų derinio jautrumas, specifiškumas bei tyrimo vertė analizuojant gimdos kaklelio kvadrantų duomenis (n=174)

Tyrimo metodas		Jautrumas	Specifiškumas	S _{ROC}
Savitosios fluorescencijos spektroskopija	n	52/88	47/86	-
	%	59,1	54,7	0,569
	95% PI	48,1–69,5	43,5–65,4	0,492-0,643
Kolposkopija	n	62/92	71/82	-
	%	67,4	86,6	0,770
	95% PI	56,8-76,8	77,3-93,1	0,700-0,830
Sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopija	n	66/92	62/82	-
	%	71,7	75,6	0,737
	95% PI	61,4-80,6	64,9-84,4	0,665- 0,800
Metodų derinys	n	81/92	57/82	-
	%	88,0	69,5	0,788
	95% PI	79,6-93,9	58,4-79,2	0,719-0,846

S_{ROC} -tyrimo vertė; PI-pasikliautinis intervalas; %-procentai; n-atvejų skaičius.



TPV - teigiama prognozė; NPV- neigiama prognozė; S_{ROC} – tyrimo vertė; %-procentai; n – atvejų skaičius.

35 pav. Savitosios, sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos ir kolposkopijos bei pastarųjų dviejų metodų derinio jautrumo, specifiškumo bei tikslumo palyginimas analizuojant gimdos kaklelio kvadrantų duomenis (n=174)

Kaip matyti iš 35 – amė paveiksle pateiktų duomenų, savitosios fluorescencijos spektroskopijos metodo tikslumo rodikliai yra mažesni tiek už kolposkopijos, tiek už sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos tiriant gimdos kaklelio kvadrantus.

Pagal šiuos duomenis sensibilizacinės fluorescencijos diagnostikos jautrumas yra didesnis nei kolposkopija (71,7 % vs 67,4 %), tačiau kolposkopijos specifiškumas yra aukštesnis (86,6 % vs 75,6 %). Metodų derinio jautrumas buvo didesnis, tačiau mažesnis specifiškumas (88,0 % vs 69,5 %).

10-oje lentelėje pateikti tiriamų diagnostinių metodų TPV, NPV ir tikslumo rodikliai.

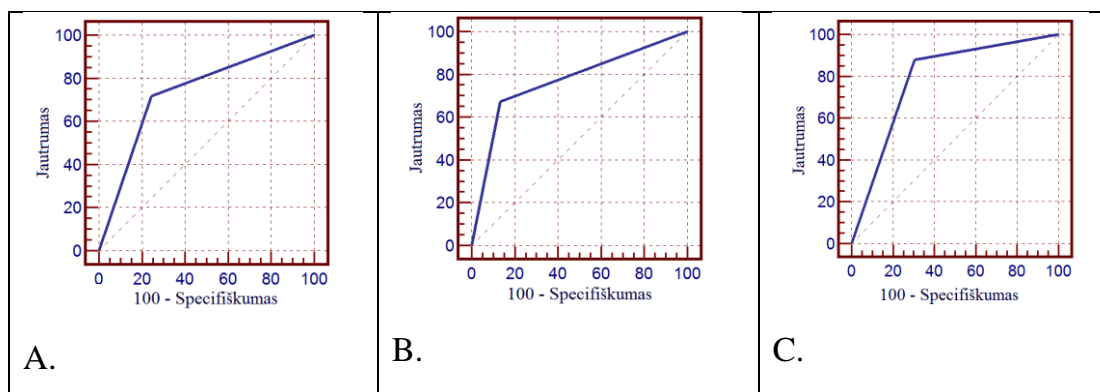
10 lentelė. Savitosios fluorescencijos spektroskopijos, sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos ir kolposkopijos bei pastarųjų dviejų metodų derinio teigiama ir neigiama prognozinė vertės bei tikslumas analizuojant gimdos kaklelio kvadrantų duomenis

Tyrimo metodas		TPV	NPV	Tikslumas
Savitosios fluorescencijos spektroskopija	n	52/91	47/83	99/174
	%	57,6	56,2	56,9
Kolposkopija	n	62/73	71/101	133/174
	%	84,9	70,3	76,4
Sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopija	n	66/86	62/88	128/174
	%	76,7	70,5	73,5
Metodų derinys	n	81/106	57/68	138/174
	%	76,4	83,8	79,3

TPV - teigiama prognozinė vertė; NPV- neigiama prognozinė vertė; %- procentai; n – atvejų skaičius.

Kaip minėta, pritaikius metodų derinį dažniausiai teisingai diagnozuojami didelės rizikos pakitimai ir gautas metodų derinio tikslumas šiuo atveju yra didžiausias (79,3 %), palyginti su kitų taikytų diagnostinių metodų (10 lent.)

Metodų diagnostinei vertei nustatyti yra skaičiuojamos ir braižomos ROC kreivės. Plotas po ROC kreive parodo metodo vertę. Analizuojant ROC kreives matyti, kad tiriant gimdos kaklelio kvadrantus S_{ROC} vertės yra labai panašios tiek sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos, tiek kolposkopijos ir metodų derinio diagnostinė vertė yra gera, o savitosios fluorescencijos spektroskopijos vertė yra patenkinama (36 pav.). Reikia pažymėti, kad metodų derinio diagnostinė vertė yra didžiausia ($S_{ROC} = 0,788$), nors skirtumas nėra statistiškai reikšmingas (36 pav.).



36 pav. Sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos (A), kolposkopijos (B), metodų derinio (C) ROC kreivės analizuojant gimdos kaklelio kvadrantus

Sąlygiškai mažas sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos jautrumas nustatant neoplaziją gimdos kaklelio kvadrantuose gali būti paaiškintas tuo, kad atliekant tiek kolposkopiją, tiek sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopiją, o labiausiai konizacijos atlikimo metu yra sudėtinga visiškai tiksliai pažymėti gimdos kaklelio kvadrantų ribas (nuo to priklauso kvadranto histologinio tyrimo išvadų tikslumas (mažiau viso gimdos kaklelio). Tačiau įprastinių procedūrų metu tokių aplinkybių visiškai išvengti neįmanoma, taigi šiuos galimus netikslumus, apskaičiuojant jautrumą ir specifiškumą, reikėtų priskirti atsitiktinėms paklaidoms. Kita vertus, šie veiksniai neturėtų veikti bendrosios sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos diagnozės rezultatų - taigi pacientės (viso gimdos kaklelio) diagnozė turėtų būti korektiška. Atsižvelgdami į jau minėtas tyrimo atlikimo aplinkybes galime numatyti, kad tikrasis sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos tyrimo tikslumas yra didesnis. Viso gimdos kaklelio tyrimo analizė turėtų iliustruoti aukščiau pateiktus teiginius.

Siekiant gauti bendrą viso gimdos kaklelio diagnozę - kaip buvo aprašyta anksčiau, gimdos kaklelio diagnozė nustatoma pagal žymiausią neoplaziją turintį kvadrantą pavyzdžiui, jei nors vienas kvadrantas įvertintas CIN 3, viso gimdos kaklelio diagnozė yra CIN 3.

Pacientės sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos ir kolposkopijos duomenų pacientei palyginimas su histologiniu tyrimu pateikti 11 lentelėje.

11 lentelė. Sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos, kolposkopijos, šių metodų derinio palyginimas su histologiniu tyrimu analizuojant viso gimdos kaklelio duomenis (n=48)

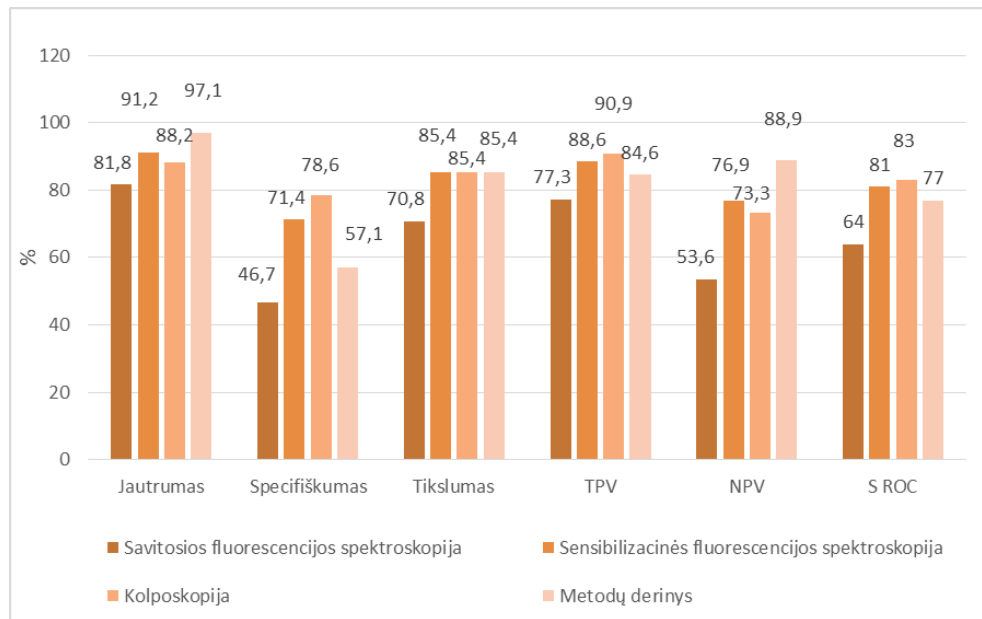
Histologinis tyrimas		DR	MR	Histologinis tyrimas		DR	MR
Sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopija	DR	31	4	Kolposkopija	DR	30	3
	MR	3	10		MR	4	11
Histologinis tyrimas		DR	MR				
Metodų derinys	DR	33	6				
	MR	1	8				

MR - mažos rizikos gimdos kaklelio pakitimai; DR- didelės rizikos gimdos kaklelio pakitimai.

Tiriant sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos metodu teisingai nustatyti didelės rizikos pakitimų 31 iš 35, o mažos rizikos pakitimų - 10 iš 13 atvejų. Atliekant sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopiją neaptikti tik 3 didelės rizikos atvejai iš 34, o atliekant kolposkopiją neteisingai diagnozuoti 4 atvejai. Remdamiesi šiais rezultatais matome, kad abu šiuos metodus galima laikyti lygiaverčiais. Be to, fluorescencija yra objektyvus metodas, reikalaujantis tik trumpo apmokymo tinkamiems fluorescencijos spektrų registravimo įgūdžiams įgyti, o kolposkopinis tyrimas labai priklauso nuo gydytojo klinikinės patirties, todėl apžiūrą atliekant mažiau patyrusiam specialistui netikslumų yra daugiau [17, 18]. Atliekant tyrimą naudojant metodų derinį gautas didesnis jautrumas – daugiau teisingai diagnozuotų didelės rizikos pakitimų atvejų – 33 iš 39 (11 lent.) ir tik vienas didelės rizikos atvejis diagnozuotas neteisingai. Reikia pažymėti, kad klaidingai teigiamų didelės rizikos pakitimų diagnozių

skaičius taip pat padidėjo - 6 pacientėms klaidingai nustatyti didelės rizikos pokyčiai jų neesant.

37 – amė paveikste pateikti duomenys savitosios fluorescencijos spektroskopijos, sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos ir kolposkopijos bei pastarųjų dviejų metodų derinio jautrumui, specifiškumui ir tikslumui palyginti analizuojant viso gimdos kaklelio duomenis.



TPV - teigiama prognozinė vertė; NPV- neigiama prognozinė vertė;

S ROC – tyrimo vertė; %-procentai; n – atvejų skaičius.

37 pav. Savitosios fluorescencijos spektroskopijos, sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos ir kolposkopijos bei pastarųjų dviejų metodų derinio jautrumo, specifiškumo ir tikslumo palyginimas analizuojant viso gimdos kaklelio duomenis (n=48)

12 lentelė. Savitosios fluorescencijos spektroskopijos, sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos ir kolposkopijos bei pastarųjų dviejų metodų derinio jautrumas, specifiškumas ir tyrimo vertė analizuojant viso gimdos kaklelio duomenis (n=48)

Tyrimo metodas		Jautrumas	Specifiškumas	S _{ROC}
Savitosios fluorescencijos spektroskopija	n	27/33	7/15	-
	%	81,8	46,7	0,642
	95% PI	64,5-93,0	21,3-73,4	0,491-0,775
Kolposkopija	n	30/34	11/14	-
	%	88,2	78,6	0,834
	95% PI	72,5-96,6	49,2-95,1	0,699-0,925
Sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopija	n	31/34	10/14	-
	%	91,2	71,4	0,813
	95% PI	76,3-98,0	41,9-91,4	0,674-0,911
Metodų derinys	n	33/34	8/14	-
	%	97,1	57,1	0,771
	95% PI	84,6-99,5	28,9-82,2	0,627-0,880

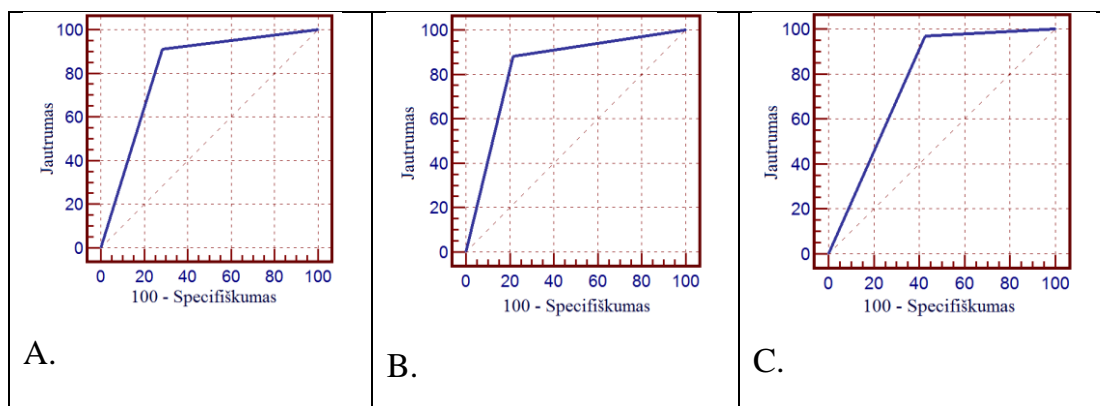
PI – pasikliautinis intervalas; %-procentai; n- atvejų skaičius.

13 lentelė. Kolposkopijos, savitosios ir sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos bei metodų derinio (kolposkopijos ir sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos) tikslumas, teigiama ir neigiama prognozinė vertė analizuojant viso gimdos kaklelio duomenis (n=48)

Tyrimo metodas		TPV	NPV	Tikslumas
Savitosios fluorescencijos spektroskopija	n	27/35	7/13	34/48
	%	77,3	53,6	70,8
Kolposkopija	n	30/33	11/15	41/48
	%	90,9	73,3	85,4
Sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopija	n	31/35	10/13	41/48
	%	88,6	76,9	85,4
Metodų derinys	n	33/39	8/9	41/48
	%	84,6	88,9	85,4

TPV - teigiama prognozinė vertė; NPV- neigiama prognozinė vertė; %-procentai; n - atvejų skaičius.

Kaip matyti iš 12 -oje, 13 – oje lentelėse pateiktų duomenų, savitosios fluorescencijos spektroskopijos metodo visi tikslumo rodikliai yra mažesni tiek už kolposkopijos, tiek už sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos tiriant visą gimdos kaklelį, o taip pat ir atskirus gimdos kaklelio kvadrantus. Sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos jautrumas yra 91,2 % ir jis yra didesnis nei kolposkopijos (88,2 %) (36 pav.). Didesnis klaidingai teigiamų diagnozių skaičius mažina fluorescencijos metodo specifiškumą – 71,4 %, palyginti su kolposkopijos metodo specifiškumu, kuris yra 78,6 %.



38 pav. Sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos (A), kolposkopijos (B) ir metodų derinio (C) ROC kreivės analizuojant viso gimdos kaklelio duomenis (n=48)

Abiem atvejais metodų tikslumas yra toks pat 85,4 %, o efektyvumas (S_{ROC}) yra daugiau nei 80 %, kas reiškia, kad abiejų metodų vertė diagnozuojant didelės rizikos pokyčius yra labai gera (38 pav.), o metodų derinio efektyvumas yra mažesnis kaip 80 % (t. y. 77 %). Nepaisant to, metodų derinio jautrumas yra 97,1%, taigi šis variantas yra tinkamiausias didelės rizikos pokyčiams atpažinti.

Apibendrinant reikia pažymėti, kad sensibilizacinė fluorescencijos spektroskopija turi potencialą didelės rizikos gimdos kaklelio pakitimų diagnostikoje. Tiriant šiuo metodu pasiekiamas panašus jautrumas ir specifiškumas kaip ir tiriant kitais šiuo metu taikomais patikros metodais, be to, sensibilizacinė fluorescencijos spektroskopija turi aiškų privalumą, kadangi pateikia objektyvius rezultatus (t.y. mažai priklausančius nuo tyrėjo). Sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopija yra tyrimo metodas, kuriam išmokti naudoti reikalinga trumpa praktika, tuo tarpu kokybiškai kolposkopijai atlikti reikalinga ilgalaikė praktika ir patirtis, t.y. tyrimo tikslumas labai priklauso nuo tyrėjo įgūdžių, kas tiesiogiai veikia tyrimo kokybę.

5. REZULTATŲ APTARIMAS

Gimdos kaklelio vėžys yra vienas iš dažniausiai diagnozuojamų onkologinių ligų tarp moterų, o taip pat ir viena dažniausių mirtingumo dėl piktybinių navikų priežastis [1].

Laiku diagnozavus gimdos kaklelio ikivėžines būkles ir taikant gydymą pasveiksta 95 - 100 % pacienčių [2]. Įprastinis tyrimo metodas, kai citologiškai yra įtariama gimdos kaklelio ikivėžinė būklė, yra kolposkopija. Šio tyrimo trūkumas yra varijuojantis metodo tikslumas, tiesiogiai priklausantis nuo gydytojo įgūdžių (atliktų tyrimų kiekis, dažnis) [18, 35, 44, 72]. Dėl to ieškoma naujų objektyvesnių diagnostikos metodų, kurie būtų greitai ir nesudėtingai taikomi, kuo mažiau priklausytų nuo tiriančiojo patirties ir būtų pakankamai tikslūs, kad galėtų padidinti gimdos kaklelio ikivėžinių būklių diagnostikos tikslumą.

Optiniai diagnostikos metodai pagrįsti audinių optinių savybių neinvaziniu tyrimu. Diagnostika, taikant savitąją audinių fluorescenciją, remiasi endogeninių fluoroforų optiniu sužadinimu tam tikro bangos ilgio šviesa ir jų fluorescencijos stebėjimu. Patologinių audinių spektrai skiriasi nuo sveikų audinių spektrų – dėl to galima jų diferencinė diagnostika. Siekiant labiau padidinti metodo tikslumą gali būti naudojamos papildomos medžiagos (sensibilizatoriai), kurios kaupiasi patologiniuose audiniuose ir registruojant jų fluorescenciją nustatomi pakitę audiniai (sensibilizacinė fluorescencijos diagnostika).

Mūsų darbe siekta nustatyti sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos vertę identifikuojant audinius esant ikivėžinėms būklėms gimdos kaklelyje, lokaliai panaudojus sensibilizatorių (5 - ALA).

Tiriant ikivėžines gimdos kaklelio būkles, kliniškai svarbiausia nustatyti didelės rizikos gimdos kaklelio pakitimus, kadangi laiku nediagnozavus ir nepašalinus didelės rizikos pakitimų atsiranda invazinio proceso vystymosi rizika.

Tirdami sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos metodo tikslumą diagnozuojant didelės rizikos gimdos kaklelio pakitimus, palyginome šio metodo tikslumą su savitosios fluorescencijos spektroskopijos metodo tikslumu.

Nustatyta, kad esant mažos rizikos gimdos kaklelio pakitimų audinių savitoji fluorescencija yra intensyvesnė nei esant didelės rizikos gimdos kaklelio pakitimų. Taigi šiuo metodu galima registruoti gimdos kaklelio audinių pakitimus, tačiau pakitimų diferenciacijos tikslumas nėra pakankamas, tiek diagnozuojant pakitimus gimdos kaklelio kvadrantuose, tiek visame gimdos kaklelyje: atitinkamai jautrumas – 59,1 % ir 81,8 %, o specifiškumas – 46,7 % ir 54,7 %.

Atliekant savitosios fluorescencijos matavimus *in vivo* stebimas ženklus fluorescencijos intensyvumų išsibarstymas ir tos pačios pacientės (tiriant skirtingus taškus), ir skirtingų pacienčių, o tai sudaro sąlygas paklaidoms atsirasti bei apsunkina duomenų interpretavimą. Gauti savitosios fluorescencijos spektroskopijos metodo tikslumo rodikliai yra reikšmingai mažesni nei įprasto tyrimo metodo – kolposkopijos, todėl siekiant diegti šį metodą klinikinėje praktikoje reikalingi papildomi veiksmai, sumažinantys matavimų paklaidas. Keletas autorių tyrė galimybę naudoti savitąją fluorescenciją gimdos kaklelio neoplazijų diagnostikai [19, 20,82], tačiau matomas ženklus tos pačios pacientės ir skirtingų pacienčių spektrų variavimas komplikuoja metodo taikymą [137]. Gauti rezultatai leidžia teigti, kad savitosios fluorescencijos spektroskopija yra jautrus gimdos kaklelio pakitimų diagnostikos metodas, tačiau techniškai yra sudėtinga išlaikyti vienodas tyrimo sąlygas *in vivo*, kurios papildomai veikia spektrų intensyvumus bei jų išsibarstymą. Sukurti tyrimo algoritmai iš dalies išsprendžia šias problemas, tačiau pakankamo kontrasto tarp sveikų ir pakitusių audinių trūkumas skatina ieškoti kitų diagnostinių metodų.

Mūsų darbe taip pat įvertintos sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos, naudojant 5-ALA, galimybės diagnozuoti ikivėžinių būklių sritis gimdos kaklelyje. Patologinių sričių identifikavimas atliekamas remiantis PpIX fluorescencija, kurią indukuoja perteklinis 5-ALA susikaupimas, lokaliai panaudojus egzogeninį 5-ALA preparatą. Dėl tikslesnio kiekybinio įvertinimo apskaičiuojamas santykis (R) tarp porfirinų fluorescencijos ir audinių savitosios fluorescencijos. Papildomas šių santykių normavimas su sveikų gimdos kaklelio audinių R verte leido apskaičiuoti diagnostinį koeficientą D ir nustatyti

skiriamąją vertę mažos ir didelės rizikos pakitimams gimdos kaklelyje diagnozuoti. Fluorescencijos spektrų santykių normavimo algoritmai buvo taikyti ir kitų autorių *N. Ramanujam* [19], atliekant savitosios fluorescencijos spektrų matavimus bei *P. Hillemanns, N. Sapozhnikova ir A. Bogaards* su bendr. [33, 132, 134], atliekant sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopiją.

Analizuojant įvairių autorių tyrimų rezultatus pastebėta, kad jų gauti rezultatai varijuoja tiek lyginant skirtingų pacienčių duomenis, tiek lyginant tos pačios pacientės atskirų tiriamųjų sričių duomenis. Siekiant universalizuoti tyrimo metodą, svarbu nustatyti rezultatų tikslumą mažinančius veiksnius ir maksimaliai juos eliminuoti.

E. Vargis su bendraautoriais [138] savo tyrime analizavo kiekvienos pacientės individualiai keturis, galimai spektroskopijos rezultatams darančius įtaką veiksnius. Nustatyta, kad ženkliausiai spektroskopijos rezultatus veikia pacientės gimdymų skaičius ir kūno masės indeksas, mažesnę poveikį turi rasė bei socialinė padėtis. *V.T. Chang* su kolegomis pastebėjo, kad tyrimo rezultatus gali veikti pacientės mėnesinių ciklo fazė bei makšties mikrofloros ypatumai [23].

Reikia pažymėti, kad analizuodami literatūrą radome tik kelis šaltinius, kuriuose aprašomi tyrimai, kai atliekant gimdos kaklelio sensibilizacinės fluorescencijos diagnostiką, naudojant 5-ALA, buvo *in vivo* matuojami spektrai [33, 132,133], ir keliuose literatūros šaltiniuose aprašoma, kad gimdos kaklelio fluorescencijos intensyvumai buvo analizuojami iš skaitmeninių vaizdų [34,134].

P. Hillemanns su kolegomis [33] nustatė, kad, siekiant atlikti sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopiją, 10 ml 1 % 5-ALA tirpalo yra minimali, tinkama lokaliai naudoti sensibilizatoriaus dozė, o optimalus inkubacinis periodas yra 60-90 min. Taip pat autorius pabrėžia, kad, per ilgai laikant 5-ALA, atsiranda gimdos kaklelio audinių nespecifinė fluorescencija, kas apsunkina CIN diagnostiką. Atliekant fluorescencinį vaizdinimą gautas jautrumas siekė 91-94 %, specifiškumas - 25-51 %, atliekant fluorescencijos spektroskopiją atitinkamai - 91- 94 % ir 72-75 %. Pažymėtina, kad šiame tyrime dalyvavusios pacientės buvo atrinktos atsitiktiniu būdu (pagal histologinį tyrimą gauta: CIN 1- 37 %;

CIN 2/3- 26 %; norma- 37 %). Atliekant fluorescencinį vaizdinimą šiame tyrime diagnozė buvo vertinama arba neoplazija yra (+), arba neoplazijos nėra (-) t.y. nebuvo nurodoma neoplazijos laipsnio [23].

Mūsų tyrime dalyvavo pacientės, kurioms CT įtariama žymi neoplazija, sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos tyrimo jautrumas gautas 72 ir 91 % (viso gimdos kaklelio ir GK kvadrantų), o specifiškumas - 76 ir 71 % atitinkamai.

V. Sapozhnikova su kolegomis [132] atliko tyrimą, naudojant 5-ALA *per os* ir atliekant sensibilizacinę fluorescencijos spektroskopiją bei optinę koherentinę tomografiją. Šio tyrimo tikslas buvo kuo tiksliau pažymėti sveikų ir patologinių audinių ribas gimdos kaklelyje. Tiriamųjų grupėje 14 –ai pacienčių iš 18 –os diagnozuoti invaziniai pakitimai, taigi daugumoje atvejų gimdos kaklelyje diagnozuoti žymūs pakitimai, kas galėjo sąlygoti didesnę diagnostinį efektyvumą. Autorių pateikiamoje informacijoje teigiama, kad 79,5 % (31/39) atvejų sensibilizacinė fluorescencijos spektroskopija buvo efektyvi nustatant neoplazinių pakitimų ribas, naudojant metodus kartu – diagnostinis efektyvumas padidėjo iki 94,9 % (37/39).

A.Zikov [133] savo darbe naudojo 5-ALA lokaliai (20 % tepalą) ir *per os* (20 mg/kg), tiriamųjų grupes sudarė atitinkamai 20 ir 44 pacientės, atkreiptinas dėmesys, kad trečdaliui iš jų nustatyti jau invaziniai gimdos kaklelio pakitimai. Autorius teigia, kad lokaliai panaudota 5-ALA taikymas sukelia pakankamą diagnostinį kontrastą tarp neoplazinių ir sveikų gimdos kaklelio audinių, jei pakitimai nėra lokalizuoti gimdos kaklelio kanale. Nustatytas 100 % metodo jautrumas diagnozuojant neoplaziją (+) ir diagnozuojant neoplazijos nebuvimą (-) tiek naudojant 5-ALA lokaliai, tiek *per os*.

A. Szafinska-Dolata su kolegomis [34] vertindami gimdos kaklelio fluorescencijos vaizdus videokolposkopu, fluorescencinę diagnostiką atliko praėjus 4 val. po 3 % 5-ALA gelio lokalaus panaudojimo. Šiame tyrime, nustatant CIN pažeidimus, fluorescencinės diagnostikos jautrumas buvo 91 %, specifiškumas – 93%. Kolposkopijos jautrumas šiame tyrime buvo 79 %, o specifiškumas – 77 %. A. Szafinska-Dolata su kolegomis taip pat tyrė gimdos

kaklelio pakitimus matuodami audinių fluorescencijos intensyvumus (naudojo IRIS PDD programą, kuri registruoja fluorescencijos intensyvumą matuojant vidutinę ryškumo vertę). Spektrų analizė parodė, kad sveikų ir neoplazinių audinių PpIX fluorescencijos intensyvumas reikšmingai nesiskyrė. Koreliacijos tarp neoplazijos laipsnio ir PpIX fluorescencijos intensyvumo nebuvo nustatyta. *A.Bogaards* su kolegomis [134] savo tyrime analizavo sensibilizacinės fluorescencijos vaizdinimo duomenis, vertindamas fluorescencijos intensyvumus iš skaitmeninių vaizdų. Tirtos 16 pacienčių, atlikta 19 biopsijų. Apibendrinant rezultatus fluorescencijos vertės buvo normuojamos ir pagal gautus duomenis tirti atvejai suskirstyti į grupes: sveikas audinys -3, CIN 1- 7, CIN 2 - 3, CIN 3 – 6 atvejai. Autoriai teigia, kad sensibilizacinės fluorescencijos diagnostika tinka gimdos kaklelio ikivėžinių būklių diagnostikai ir jų laipsniui nustatyti neinvaziniu būdu.

Mūsų atliktame tyrime dalyvavo 48 pacientės, kurioms atlikus citologinį tyrimą buvo įtariama gimdos kaklelio žymi neoplazija. Atlikus histologinį tyrimą nė vienos pacientės gimdos kaklelyje nerasta invazinių pokyčių. Analizuojant histologinio tyrimo rezultatus matyti, kad beveik pusėje tyrimų atsakymų nustatyti lėtinio uždegimo požymiai. Kaip žinome iš literatūros duomenų, uždegiminiai pokyčiai gali lemti fluorescencijos tyrimo tikslumo pokyčius, kadangi uždegimo židiniuose, kaip ir neoplazijos atveju suaktyvėja PpIX gamyba, taigi uždegimo buvimas gali imituoti neoplaziją [33,82].

Lyginant kolposkopiją ir sensibilizacinę fluorescencijos spektroskopiją naudojant 5-ALA viena vertus, turime gydytojo klinikinę patirtį atliekant kolposkopiją, kita vertus – didesnę objektyvumą taikant sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos metodą. Žvelgiant į šiuo metu esančią situaciją turime daryti tam tikrą kompromisą, kadangi iki šiol nėra vieno metodo ar metodų derinio, kuris tobulai atitiktų visus pageidaujamus diagnostinius reikalavimus.

Reikia pažymėti, kad sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos atveju taip pat stebimos paklaidos, atsirandančios dėl analogiškų priežasčių kaip ir savitosios fluorescencijos atveju, tačiau pritaikius duomenų apdorojimo ir

analizės metodus galima maksimaliai eliminuoti sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos tikslumą nulemiančius veiksnius, todėl mūsų tyrime gauta gera metodo diagnostinė vertė ($S_{ROC} = 0,813$). Pažymėtina, kad tolesnių tyrimų etapų metu reikėtų pagerinti fluorescencijos matavimų technologijas siekiant gauti dar tikslesnius rezultatus. Svarbu atsižvelgti ir į tai, kad mūsų tyrimo metu matavimai buvo atlikti tik toms pacientėms, kurių gimdos kaklelio citologinis tyrimas rodė žymios neoplazijos požymius. Tai gali būti papildomas veiksnys, apsunkinantis sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos diagnostiką (jos specifiškumą), kadangi patologiniai gimdos kaklelio pakitimai, nustatyti citologiniu tyrimu, gali lemti gausesnį porfirinų kaupimąsi ir galiausiai sukelti klaidingai teigiamus rezultatus bei mažinti tyrimo specifiškumą, neesant histologiškai patvirtintos neoplazijos (pvz., esant tik ląstelių hiperplazijai, t.y. dar neesant neoplazijos požymių). Atkreiptinas dėmesys, kad tirtoms moterims, kurioms nenustatyta neoplazijos požymių ar nustatyta tik mažos rizikos pakitimų, dažnai gimdos kaklelyje buvo diagnozuoti ir uždegiminiai pokyčiai. Uždegimas nėra ikivėžinė būklė, tačiau uždegiminis procesas keičia gimdos kaklelio audinių optines savybes, taigi galimybė atskirti uždegiminius ir neoplazinius gimdos kaklelio pakitimus turėtų pagerinti sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos diagnostinę vertę.

Sukonstravus mūsų tyrimo aparatūrą bei sudarius diagnostinius algoritmus, buvo apskaičiuota sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos skaitinė skiriamoji vertė (rizikos laipsnio riba) mažos ir didelės rizikos pakitimams gimdos kaklelyje atskirti ($D_{skiriamoji} = 3,87$). Tyrimas su šia skiriamąja verte parodė, kad sensibilizacinė fluorescencijos spektroskopija yra tinkamas diagnostinis metodas didelės rizikos gimdos kaklelio pakitimų diagnostikai. Nustatytas šio metodo analogiškas jautrumas ir specifiškumas, palyginanti su kitų šiuo metu taikomų patikros metodų jautrumu ir specifiškumu. Be to sensibilizacinė fluorescencijos spektroskopija turi aiškų privalumą, kadangi ją naudojant gaunami objektyvūs (t.y. minimaliai priklausomus nuo tyrėjo) rezultatai. Išmokti taikyti sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos metodą reikalinga trumpa praktika, siekiant įgusti tinkamai atlikti matavimus, o

kokybiškai kolposkopijai atlikti reikalinga ilgalaikė praktika ir klinikinė patirtis, t. y. tyrimo tikslumas labai priklauso nuo tyrėjo įgūdžių, kas tiesiogiai veikia tyrimo kokybę.

Nustatyta 3,87 skiriamoji vertė yra nepriklausoma, aptinkant didelės rizikos ikivėžines būkles gimdos kaklelyje jos tikslumas 85,4 %. Taigi, sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopija naudojant 5-ALA turi dideles galimybes gimdos kaklelio ikivėžinių būklių diagnostikoje. Vis dėlto reikia pažymėti, kad siekiant įdiegti šį metodą klinikinėje praktikoje, skiriamąją vertę reikėtų tikslinti tobulinant tyrimo atlikimo metodiką bei įtraukti į tolesnius tyrimus daugiau pacienčių.

Svarbu paminėti, kad atliekant tyrimus *in vivo* dažniausiai susiduriama su papildomais sunkumais atliekant matavimus, šiuo atveju tiek paties matavimo metu (priklausomai nuo moters anatomijos ypatumų, bendros būklės (tiek fizinės, tiek psichologinės)), taip pat dėl aparatūros pritaikomumo – zondo prigludimo tikslumo ir pastovumo (tiriančiojo rankos judesių), matomumo sąlygų, bei galimo patalpos užtamsinimo santykinio kitimo.

Svarbu suvokti, kad, nustatant diagnozę kolposkopiškai, gimdos kaklelis kvadrantais suskirstomas „kontroliuojant akimis“ ir patologijos lokalizacija nurodoma pasirenkant vaizdą (dar neatlikus intervencijos). Histologinis tyrimas buvo atliekamas kiekvienam gimdos kaklelio kvadranto, todėl ir fluorescencinės diagnostikos atveju buvo nustatoma atskiro kvadranto diagnozė, kurią nulėmė didžiausias fluorescencijos intensyvumų santykis tame kvadrante.

Atliekant tokį kaip mūsų tyrimą galutinė teisinga diagnozė priklauso nuo keleto atskirų veiksnių t.y. tyrimo tikslumą lemia biopsijos atlikimas (tikslus biopsijos vietos nustatymas, mėginio paėmimas iš pasirinktos vietos; atlieka gydytojas ginekologas), jei atliekama gimdos kaklelio konizacija – gimdos kaklelio kvadrantų tikslus pažymėjimas (tai daro gydytojas ginekologas chirurgas) ir gimdos kaklelio preparato kokybiškas paruošimas (tai atlieka gydytojas patologas) – šios aplinkybės taip pat gali keisti tam tikrus parametrus atliekant gimdos kaklelio pakitimų navigaciją – ir nulemti galutinius fluorescencinės spektroskopijos tikslumo duomenis.

Atlikto darbo rezultatai rodo, kad būtina toliau tęsti tyrimą tobulinant atlikimo techniką (t.y. įsigyti endoskopinę aparatūrą, su kuria būtų galimybė vaizdo kamerą bei spektroskopą šviesolaidžio zondą laikyti viename lygyje (movoje) ir taip dar pagerinti matavimų ir biopsijos paėmimo tikslumą).

Taip pat būtų svarbu, kad gydytojas atliekantis pacientės ištyrimą atliktų ir gimdos kaklelio konizaciją to paties vizito metu – (siekiant padidinti gimdos kaklelio kvadrantų markiravimo tikslumą) bei taip pat reikėtų įtraukti į tyrimą daugiau pacienčių.

Diagnostikos metodas sensibilizacinė fluorescencijos spektroskopija geriausiai galėtų būti taikomas specializuotosios medicinos įstaigose, skirtose konkrečiai gimdos kaklelio patologijos diagnostikai ir gydymui (pvz., reikėtų įkurti Gimdos kaklelio tyrimų centrą).

Būtų prasminga paruošti 5-ALA diagnostinį preparatą kaip vaginalines žvakutes ar 5-ALA tirpale išmirkytus tamponus. Šiuo atveju žvakutę ar tamponą pacientė į makštį galėtų įsidėti pati ir po kelių valandų atvykti į gydymo įstaigą tirtis – taip būtų išvengta medikų ir pacienčių laiko gaišimo, o tai yra vienas iš tyrimo nepatogumų.

Taip pat rekomenduotina pacientę tyrimui paruošti iš anksto, t. y. gydyti makšties ir gimdos kaklelio uždegimą, tai dar pagerintų tyrimo tikslumą.

Reikalingi tolesni tyrimai, siekiant įdiegti sensibilizacinę fluorescencijos spektroskopiją į klinikinę praktiką diagnozuojant gimdos kaklelio ikivėžines būkles. Turime skirti daugiau dėmesio neoplazinių ir uždegiminių pokyčių identifikacijai/diferenciacijai bei tyrimo visuose gimdos kaklelio taškuose užtikrinimui ir galimybei archyvuoti pokyčius, siekiant turėti kuo tikslesnį ir objektyvesnį gimdos kaklelio pakitimų vaizdą (žemėlapi). Apibendrinami rezultatus galime teigti, kad sensibilizacinė fluorescencijos spektroskopija yra perspektyvi technologija gimdos kaklelio ikivėžinių būklių diagnostikoje.

6. IŠVADOS

1. Nustatyta savitosios fluorescencijos spektroskopijos skiriamoji vertė didelės ir mažos rizikos ikivėžiniams pakitimams gimdos kaklelyje diferencijuoti (skiriamoji vertė yra 108). Taikant savitosios fluorescencijos spektroskopijos metodą apskaičiuotas tyrimo tikslumas nėra pakankamas didelės ir mažos rizikos ikivėžiniams pakitimams gimdos kaklelyje diferencijuoti.

2. Sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos metodo skaitinė skiriamoji vertė (rizikos lygio riba), pagal kurią diagnozuoti didelės rizikos ikivėžiniai pakitimai gimdos kaklelyje, yra apskaičiuota atliekant dvigubą normavimą. Šis normavimas leidžia lyginti tos pačios pacientės ir skirtingų pacienčių matavimų duomenis. Nustatyta sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos skaitinė skiriamoji vertė yra 3,87.

3. Palyginus sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos, kolposkopijos bei šių metodų derinio tikslumo rodiklius (jautrumą, specifiškumą) nustatant didelės rizikos pakitimus gimdos kaklelyje, statistiškai reikšmingo skirtumo nenustatyta, šių metodų tikslumas yra panašus. Taigi sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopija yra objektyvus ir didelės klinikinės patirties nereikalaujantis metodas tinkamas didelės rizikos ikivėžiniams pakitimams gimdos kaklelyje diagnozuoti.

7. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

Sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopija rekomenduojame taikyti gimdos kaklelio ikivėžinėms būklėms diagnozuoti t.y. optinei biopsijai atlikti. Šį metodą galima pasirinkti kaip alternatyvą kolposkopijos metodui, kai tyrėjui trūksta klinikinės patirties. Sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos metodas tinka siekiant nustatyti diagnozę ir gydyti pacientę to paties vizito metu.

8. MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

PRANEŠIMAI DISERTACINIO DARBO TEMA

Vansevičiūtė R, Žukovskaja O, Venius J. Comparison of 5-ALA based fluorescence diagnostics with histology in the detection of cervical neoplasia. International conference "Medical physics in the Baltic states 11". Kaunas (Lietuva), Oct. 10-12, 2013.

Vansevičiūtė R. „Gimdos kaklelio ikivėžinių būklių tyrimas sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos metodu *in vivo*“ 2014-09-10; NVI Mokslinė konferencija.

Vansevičiūtė R. „Gimdos kaklelio ikivėžinių būklių tyrimas sensibilizacinės fluorescencijos spektroskopijos metodu *in vivo*“ 2015-04-14; Mokslinių tyrimų centras Biomedicininės fizikos laboratorijos darbuotojų posėdis.

PUBLIKACIJOS DISERTACINIO DARBO TEMA

Vansevičiūtė R, Žukovskaja O, Venius J. Comparison of 5-aminolevulinic acid based fluorescence diagnostics with histology in the detection of cervical neoplasia. Medical Physics in the Baltic States: proceedings of the 11th international conference on medical physics. 2013;11:12-4.

Vansevičiūtė R, Letautienė S, Venius J. 5-aminolevulinic acid based fluorescence diagnostics of cervical preinvasive changes. Medicina 2014;50(3):137-43.

Vansevičiūtė R, Letautienė S, Venius J, Žukovskaja O, Kanopienė D, Rotomskis R. 5-aminolevulinic-acid-based fluorescence spectroscopy and

conventional colposcopy for *in vivo* detection of cervical pre-malignancy.
BMC Women's health 2015;15:35.

9. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer statistics. *Ca Cancer J Clin* 2011;61:69–90.
2. Kalliala I, Anttila A, Pukkala E, Nieminen P. Risk of cervical and other cancers after treatment of cervical intraepithelial neoplasia: retrospective cohort study. *BMJ* 2005;331(7526):1183-5.
3. The Working Group of IARC. Cervical Cancer screening. IARC Handbook of Cancer Prevention. Lyon: IARC Press; 2005;Vol.10. 311p.
4. Jarienė K, Čigriejienė V. Gimdos kaklelio intraepitelinės neoplazijos kai kurie diagnostikos bei gydymo aspektai (literatūros apžvalga). (Some aspects of diagnosis and treatment of cervical intraepithelial neoplasia.) *Medicina* 2002;38(9):876-87.
5. Shaniqua LMcG, Jeanne MF. Update on prevention and screening of cervical cancer. *World J Clin Oncol* 2014;5(4): 744-52.
6. Singer A, Monaghan MJ, Quek SC. Lower Genital Tract Precancer. Colposcopy, pathology and treatment. 2nd Edition. Oxford. Blacwell science; 2008; 344p.
7. Ronco G, van Ballegooijen M, Becker N, Chil A, Fender M, Giubilato P, Kurtinaitis J, Lancucki L, Lynge E, Morais A, O'Reilly M, Sparen P, Suteu O, Rebol M, Veerus P, Zakelj MP, Anttila A. Process performance of cervical screening programmes in Europe. *Eur J Cancer* 2009; 45(15):2659-70.
8. Maver PJ, Seme K, Korać T, Dimitrov G, Döbrössy L, Engele L, Iljazović E, Kesić V, Kostova P, Laušević D, Maurina A, Nicula FA, Panayotova Y,

Primic Žakelj M, Repše Fokter A, Romejko-Wolniewicz E, Smailytė G, Şuteu O, Świdarska-Kiec J, Tachezy R, Valerianova Z, Veerus P, Vīberga I, Znaor A, Zubor P, Poljak M. Cervical cancer screening practices in central and eastern Europe in 2012. *Acta Dermatovenerol APA* 2013;22:7-19.

9. Kerienė V, Grabauskas V, Kurtinaitis J. Preliminarūs Lietuvos prevencinės gimdos kaklelio vėžio atrankinės patikros programos ekonominio vertinimo aspektai. *Lietuvos bendrosios praktikos gydytojas* 2009;8(5):288-97.

10. Kyrgiou M, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, Arbyn M, Prendiville W, Paraskevaidis E. Obstetric outcomes after conservative treatment for intraepithelial or early invasive cervical lesions: systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2006;367(9509):489–98.

11. Sadler L, Saftlas A, Wang W, Exeter M, Whittaker J, McCowan L. Treatment for cervical intraepithelial neoplasia and risk of preterm delivery. *JAMA* 2004;291:2100-6.

12. Adelman MR. Novel Advancements in Colposcopy: Historical Perspectives and a Systematic Review of Future Developments. *Journal of Lower Genital Tract Disease* 2014;18(3): 246–60.

13. Nanda K, McCrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD, Matchar DB. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med* 2000;132(10):810-9.

14. Mehlhorn G, Münzenmayer C, Benz M, Kage A, Beckmann MW, Wittenberg T. Computer-assisted diagnosis in colposcopy: results of a preliminary experiment? *Acta Cytol* 2012;56(5):554-9.

15. Hammes LS, Naud P, Passos EP, Matos J, Brouwers K, Rivoire W, Syrjänen KJ. Value of the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy (IFCPC) Terminology in predicting cervical disease. *J Low Genit Tract Dis* 2007;11(3):158-65.

16. Živadinović R, Radović M, Lilić V, Petrić S. Grading the severity of preinvasive changes of the uterine cervix by colposcopy and exfoliating cytology. *Medicine and Biology* 2005;12(1):55-9.

17. Olaniyan OB. Validity of colposcopy in the diagnosis of early cervical neoplasia--a review. *Afr J Reprod Health* 2002;6(3):59-69.

18. Mitchell MF, Schottenfeld D, Tortolero-Luna G, Cantor SB, Richards-Kortum R. Colposcopy for the diagnosis of squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 1998;91(4):626-31.

19. Ramanujam N, Mitchell MF, Mahadevan A, Thomsen S, Silva E, Richards-Kortum RR. *In vivo* diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia using 337 nm laser induced fluorescence. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:10193-7.

20. Ramanujam N, Mitchell MF, Mahadevan A, Thomsen S, Malpica A, Wright T, Atkinson N, Richards-Kortum R. Spectroscopic diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia (CIN *in vivo* using laser induced fluorescence spectra at multiple excitation wavelenghts). *Lasers Surg Med* 1996;19: 63-74.
21. Ramanujam N, Mitchell MF, Mahadevan-Jansen A, Thomsen SL, Staerkel G, Malpica A, Wright T, Atkinson N, Richards-Kortum R. Cervical Precancer Detection Using a Multivariate Statistical Algorithm Based on Laser-Induced Fluorescence Spectra at Multiple Excitation Wavelengths. *Photochemistry and Photobiology* 1996;64(4):720-35.
22. Mitchell MF, Cantor SB, Ramanujam N, Tortolero-Luna G, Richards Kortum R. Fluorescence spectroscopy for diagnosis of squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Obstet Gynecol* 1999;93(3): 462-70.
23. Chang SK, Dawood MY, Staerkel G, Utzinger U, Atkinson EN, Richards-Kortum RR, Follen M. Fluorescence spectroscopy for cervical precancer detection: Is there variance across the menstrual cycle? *J Biomed Opt* 2002; 7(4):595-602.
24. Brookner C, Utzinger U, Follen M, Richards-Kortum R, Cox D, Atkinson EN. Effects of biographical variables on cervical fluorescence emission spectra. *J Biomed Opt* 2003;8(3): 479-83.
25. Pandey K, Pradhan A, Agarwal A, Bhagoliwal A, Agarwal N. Fluorescence Spectroscopy. A New Approach in Cervical Cancer. *The Journal of Obstetrics and Gynecology of India* 2012; 62(4):432–6.
26. Drezek R, Brookner C, Pavlova I, Boiko I, Malpica A, Lotan R, Follen M, Richards-Kortum R. Autofluorescence microscopy of fresh cervical tissue

sections reveals alterations in tissue biochemistry with dysplasia. *Photochem Photobiol* 2001;73:636-41.

27. Kanter EM, Vargis E, Majumder S, Keller MD, Woeste E, Rao GG, Mahadevan-Jansen A. Application of Raman spectroscopy for cervical dysplasia diagnosis. *J Biophotonics* 2009; 2:81-90.

28. Wang TD, Van Dam J. Optical biopsy: a new frontier in endoscopic detection and diagnosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004;2(9):744-53.

29. Alfano RR. Advances in optical biopsy for cancer diagnosis. *Technol Cancer Res Treat* 2011;10:101.

30. Costas B. Review of biomedical optical imaging—a powerful, non-invasive, non-ionizing technology for improving in vivo diagnosis. *Measurement Science and Technology* 2009;20(10):104020.

31. Johansson A, Kromer K, Sroka R, Stepp H. Clinical optical diagnostics: Status and perspectives. *Medical Laser Application* 2008;23(4):155-174.

32. Rotomskis R, Streckytė G. Fluorescencinė navikų diagnostika. *Medicina (Kaunas)* 2004; 40(12): 1219-30.

33. Hillemanns P, Weingandt H, Baumgartner R, Diebold J, Xiang W, Stepp H. Photodetection of cervical intraepithelial neoplasia using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence. *Cancer* 2000; 88(10):2275-82.

34. Szafińska-Dolata A, Kedzia W, Szafiński A, Józefiak A, Spaczyński M. Porównanie czułości i swoistości metody fotodynamicznej z kolposkopią i diagnostyką cytologiczną w wykrywaniu zmian neoplastycznych szyjki macicy.

(Comparison of sensitivity and specificity of PDD, colposcopy and cytology in the detection of cervical neoplastic lesions.) *Ginekol Pol* 2009;80(8):602-8.

35. Hillemanns P, Soergel P, Löning M. Fluorescence diagnosis and photodynamic therapy for lower genital tract diseases – A review. *Medical Laser Application* 2009; 24(1):10-7.
36. Löning M, Soergel P, Hillemanns P. Fluorescence diagnosis and photodynamic therapy in intra-abdominal gynecologic diseases and breast cancer – A review. *Medical Laser Application* 2009; 24:18-26.
37. Löning M, Diddens H, Friedrich M, Altgassen C, Diedrich K, Hüttmann G. Fluorescence diagnosis and photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX in gynecology: an overview. *Zentralbl Gynakol* 2006; 128:311-7.
38. Soergel P, Löning M, Staboulidou I, Schippert C, Hillemanns P. Photodynamic Diagnosis and Therapy in Gynecology. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology, and Oncology*, 2008; 27(4):307–20.
39. Arbyn M, Antoine J, Magi M, Smailyte G, Stengrevics A, Suteu O, Valerianova Z, Bray F, Weiderpass E. Trends in cervical cancer incidence and mortality in the Baltic countries, Bulgaria and Romania. *Int J Cancer* 2011; 128:1899–907.
40. Jeronimo J, Schiffman M. Colposcopy at a crossroads. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 195(2):349–53.
41. Palma PD, Rossi PG, Collina G, Buccoliero AM, Ghiringhello B, Lestani M, Onnis G, Aldovini D, Galanti G, Casadei GP, Aldi M, Gomes V, Giubilato P, Ronco G, the NTCC Pathology Group. The Risk of False-Positive

Histology According to the Reason for Colposcopy Referral in Cervical Cancer Screening. *Am J Clin Pathol* 2008; 129:75-80.

42. Cremer ML, Peralta EI, Dheming SG, Jimenez ME, Davis-Dao CA, Alonzo TA, Blumenthal PD, Felix JC. Digital Assessment of the Reproductive Tract Versus Colposcopy for Directing Biopsies in Women With Abnormal Pap Smears. *Journal of Lower Genital Tract Disease* 2010; 14(1):5-10.

43. Guido RS, Jeronimo J, Schiffman M, Solomon D, ALTS Group. The distribution of neoplasia arising on the cervix: results from the ALTS trial. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193(4):1331-7.

44. Jarienė S, Minkauskienė M, Nadišauskienė R, Kliučinskas M, Vaitkienė. Didelės rizikos žmogaus papilomos viruso įtakoti gimdos kaklelio citologiniai pokyčiai bei sąsajos su histologiniais bei kolposkopiniais radiniais (II dalis). *Lietuvos akušerija ir ginekologija* 2010;13(2):142-9.

45. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. GLOBOCAN 2012 v 1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internetas]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 13/12/2013.

46. Jarienė S, Nadišauskienė R, Kliučinskas M, Vaitkienė D, Minkauskienė M. Citologinio gimdos kaklelio tyrimo ir žmogaus papilomos viruso nustatymo gimdos kaklelyje klinikinė svarba. *Lietuvos akušerija ir ginekologija* 2009; 12(3):216-28.

47. Meijer CJ, Berkhof J, Castle PE, Hesselink AT, Franco EL, Ronco G, Arbyn M, Bosch FX, Cuzick J, Dillner J, Heideman DA, Snijders PJ. Guidelines

for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer* 2009; 124(3):516-20.

48. Smailytė G, Rimienė J, Gudlevičienė Ž, Aleknavičienė B. Gimdos kaklelio patologijos patikros programos vykdymo įtaka sergamumui gimdos kaklelio vėžiu Lietuvoje. (Influence of the cervical cancer screening programme on cervical cancer incidence in Lithuania.) *Medicinos teorija ir praktika* 2010;16(2):152–7.

49. Lietuvos vėžio registras [<http://www.nvi.lt/index.php?-1413089819>].

50. Arbyn M, Castellsagué X, Sanjosé S, Bruni L, Saraiya M, Bray F, Ferlay J. Worldwide burden of cervical cancer in 2008. *Ann Oncol* 2011; 22(12):2675-86.

51. Markowitz LE, Dunne EF, Saraiya M, Chesson HW, Curtis CR, Gee J, Bocchini JA Jr, Unger ER; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Human papillomavirus vaccination: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*. 2014;63(RR-05):1-30.

52. Paavonen J, Naud P, Salmerón J, Wheeler CM, Chow SN, Apter D, Kitchener H, Castellsague X, Teixeira JC, Skinner SR, Hedrick J, Jaisamrarn U, Limson G, Garland S, Szarewski A, Romanowski B, Aoki FY, Schwarz TF, Poppe WA, Bosch FX, Jenkins D, Hardt K, Zahaf T, Descamps D, Struyf F, Lehtinen M, Dubin G, HPV PATRICIA Study Group. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): Final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *Lancet* 2009; 374(9686):301-14.

53. Wang SS, Zuna RE, Wentzensen N, Dunn ST, Sherman ME, Gold M, Schiffman M, Wacholder S, Allen RA, Block I, Downing K, Jeronimo J, Carreon JD, Safaeian M, Brown D, Walker JL. Human papillomavirus cofactors by disease progression and human papillomavirus types in the study to understand cervical cancer early endpoints and determinants. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18(1):113-20.
54. Arbyn M, Anttila A, Jordan J, Ronco G, Schenck U, Segnan N, Wiener H, Herbert A, von Karsa L. European guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening. 2nd Edition-Summary Document. *Ann Oncol* 2010; 21(3):448–58.
55. Herbert A, Arbyn M, Bergeron C. Why CIN3 and CIN2 should be distinguished on histological reports. *Cytopathology* 2008;19(1):63-4.
56. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2007;370(9590):890-907.
57. NHSCSP Colposcopy and Programme Management. Guidelines for the NHS Cervical Screening Programme. Sheffield: NHSCSP publication No. 20; 2004; 20:1-80.
58. Soost HJ, Lange HJ, Lehmacher W, Ruffing-Kullmann B. The validation of cervical cytology. Sensitivity, specificity and predictive values. *Acta Cytol* 1991;35(1):8-14.
59. Yang B, Pretorius RG, Belinson JL, Zhang X, Burchette R, Qiao YL. False negative colposcopy is associated with thinner cervical intraepithelial neoplasia 2 and 3. *Gynecol Oncol* 2008; 110(1):32-6.

60. Tan JHJ, Wrede CDH. New technologies and advances in colposcopic assessment. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2011;25:667–77.
61. Hornung R, Pham TH, Keefe KA, Berns MW, Tadir Y, Tromberg BJ. Quantitative near-infrared spectroscopy of cervical dysplasia *in vivo*. *Hum Reprod* 1999;14 (11): 2908–16.
62. Chang VT, Cartwright PS, Bean SM, Palmer GM, Bentley RC, Ramanujam N. Quantitative physiology of the precancerous cervix *in vivo* through optical spectroscopy. *Neoplasia* 2009, 11(4):325-32.
63. Ferris DG, Lawhead RA, Dickman ED, Holtzapple N, Miller JA, Grogan S, Bambot S, Agrawal A, Faupel ML. Multimodal hyperspectral imaging for the noninvasive diagnosis of cervical neoplasia. *J Low Genit Tract Dis* 2001; 5: 65–72.
64. DeSantis T, Chakhtoura N, Twiggs L, Ferris D, Lashgari M, Flowers L, Faupel M, Bambot S, Raab S, Wilkinson E. Spectroscopic imaging as a triage test for cervical disease: a prospective multicenter clinical trial. *J Low Genit Tract Dis* 2007; 11: 18–24.
65. Huh WK, Cestero RM, Garcia FA, Gold MA, Guido RS, McIntyre-Seltman K, Harper DM, Burke L, Sum ST, Flewelling RF, Alvarez RD. Optical detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia *in vivo*: results of a 604-patient study. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190: 1249–57.
66. Soutter WP, Diakomanolis E, Lyons D, Ghaem-Maghani S, Ajala T, Haidopoulos D, Doumplis D, Kalpaktsoglou C, Sakellaropoulos G, Soliman S, Perryman K, Hird V, Buckley CH, Pavlakis K, Markaki S, Dina R, Healy V, Balas C. Dynamic spectral imaging: improving colposcopy. *Clin Cancer Res* 2009; 15:1814–20.

67. Louwers J, Zaal A, Kocken M, Ter Harmsel W, Graziosi G, Spruijt J, Berkhof J, Balas C, Papagiannakis E, Snijders P, Meijer C, van Kemenade F, Verheijen R. Dynamic spectral imaging colposcopy: higher sensitivity for detection of premalignant cervical lesions. *BJOG* 2011; 118: 309–18.
68. Georgakoudi I, Sheets EE, Muller MG, Backman V, Crum CP, Badizadegan K, Dasari RR, Feld MS. Trimodal spectroscopy for the detection and characterization of cervical precancers *in vivo*. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186: 374–82.
69. Abdul S, Brown BH, Milnes P, Tidy JA. The use of electrical impedance spectroscopy in the detection of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16: 1823–32.
70. Singer A, Coppleson M, Canfell K, Skladnev V, Mackellar G, Pisal N, Deery A. A real time optoelectronic device as an adjunct to the Pap smear for cervical screening: a multicenter evaluation. *Int J Gynecol Cancer* 2003; 13: 804–11.
71. Hariri Tabrizi S, Aghamiri SM, Farzaneh F, Sterenberg HJ. The use of optical spectroscopy for *in vivo* detection of cervical pre-cancer. *Lasers Med Sci* 2014;29(2):831-45.
72. Leeson S. Advances in colposcopy: new technologies to challenge current practice. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2014;182:140-5.
73. Hegyi J, Hegyi V, Ruzicka T, Arenberger P, Berking C. New developments in fluorescence diagnostics. *J Dtsch Dermatol Ges* 2011; 9(5):368-72.

74. Singh R, Chen Yi Mei SL, Tam W, Raju D, Ruszkiewicz A. Real-time histology with the endocytoscope. *World J Gastroenterol* 2010; 16(40):5016-9.
75. Newton RC, Kemp SV, Shah PL, Elson D, Darzi A, Shibuya K, Mulgrew S, Yang GZ. Progress toward optical biopsy: bringing the microscope to the patient. *Lung* 2011; 189(2):111-9.
76. Thekkekk N, Richards-Kortum R. Optical imaging for cervical cancer detection: solutions for a continuing global problem. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(9):725-31.
77. Krammer B, Plaetzer K. ALA and its clinical impact, from bench to bedside. *Photochem Photobiol Sci* 2008; 7:283–9.
78. Drezek RA, Richards-Kortum R, Brewer MA, Feld MS, Pitris C, Ferenczy A, Faupel ML, Follen M. Optical Imaging of the Cervix. *CANCER Supplement* 2003; 98 (9):2015-27.
79. Rotomskis R, Streckytė G, Bagdonas S, Venius J. Optinės diagnostikos technologijos (optinė biopsija). *Vilniaus Universiteto leidykla*; 2008; 52 p.
80. Monici M. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol Annu Rev* 2005; 11:227-56.
81. Wagnieres GA, Star WM, Wilson BC. *In vivo* fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. *J Photochem Photobiol* 1998; 68:630-2.
82. Weingandt H, Stepp H, Baumgartnerb R, Dieboldc J, Xianga W, Hillemanns P. Autofluorescence spectroscopy for the diagnosis of cervical

intraepithelial neoplasia. *International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2002; 109:947–51.

83. Ronan MV, Ibbotson SH, Wood K, Tom C, Brown A, Moseley H. Modelling fluorescence in clinical photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci* 2013; 12:203-13.

84. Fotinos N, Campo MA, Popowycz F, Gurny R, Lange N. 5-Aminolevulinic Acid Derivatives in Photomedicine: Characteristics, Application and Perspectives. *Photochemistry and Photobiology* 2006; 82: 994-1015.

85. Dietel W, Bolsen K, Dickson E, Fritsch C, Pottier R, Wendenburg R. Formation of water-soluble porphyrins and protoporphyrin IX in 5-aminolevulinic-acid-incubated carcinoma cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 1996; 33:225-31.

86. Colditz MJ, van Leyenb K, Jeffreea RL. Aminolevulinic acid (ALA)–protoporphyrin IX fluorescence guided tumour resection. Part 2: Theoretical, biochemical and practical aspects. *Journal of Clinical Neuroscience* 2012; 19(12):1611–16.

87. Grossman HB. Improving the management of bladder cancer with fluorescence cystoscopy. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2007; 26:143-7.

88. Witjes JA, Douglass J. The role of hexaminolevulinate fluorescence cystoscopy in bladder cancer. *Nat Clin Pract Urol* 2007; 4:542-9.

89. Ray ER, Chatterton K, Thomas K, Khan MS, Chandra A, O'Brien TS. Hexylaminolevulinate Photodynamic Diagnosis for Multifocal Recurrent Nonmuscle Invasive Bladder Cancer. *J Endourol* 2009; 23:983-8.
90. Frampton JE, Plosker GL. Hexyl aminolevulinate: in the detection of bladder cancer. *Drugs* 2006; 66:571-8.
91. Inoue K, Kuno T, Fukuhara H, Hamaguchi T, Fukata S, Karashima T, Kamada M, Shuin T, Sakakura N, Kasahara K, Watanabe H, Kozai T, Yasuda M, Kataoka S, Tanimura M, Atsushi K, Furihata M. Clinical experience with transurethral resection of bladder tumor (TUR-Bt) guided by photodynamic diagnosis (PDD). *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi*. 2009; 100:661-70.
92. Allison R, Moghissi K, Downie G, Dixon K. Photodynamic therapy (PDT) for lung cancer. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2011; 8(3):231-9.
93. Hautmann H, Pichler JP, Stepp H, Baumgartner R, Gamarra F, Huber RM. In-vivo kinetics of inhaled 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence in bronchial tissue. *Respir Res* 2007; 19(8):33.
94. Mayinger B, Neumann F, Kastner C, Degitz K, Hahn EG, Schwab D. Early detection of premalignant conditions in the colon by fluorescence endoscopy using local sensitization with hexaminolevulinate. *Endoscopy* 2008; 40:106-9.
95. Filonenko EV, Kaprin AD, Raszhivina AA, Urlova AN, Nechipai AM. Fluorescence Diagnostics of Colon Malignant and Premalignant Lesions Using 5-Aminolevulinic Acid. *International Journal of Photoenergy* 2014; (2014):4p Article ID 378673.

96. Endlicher E, Gelbmann CM, Knüchel R, Fürst A, Szeimies RM, Gölder SK, Schölmerich J, Lottner C, Messmann H. Hexaminolevulinate-induced fluorescence endoscopy in patients with rectal adenoma and cancer: a pilot study. *Gastrointest Endosc* 2004; 60:449-54.
97. Claydon PE, Ackroyd R. 5-Aminolaevulinic acid-induced photodynamic therapy and photodetection in Barrett's esophagus. *Dis Esophagus* 2004; 17:205-12.
98. Bredell MG, Besic E, Maake C, Walt H. The application and challenges of clinical PD-PDT in the head and neck region: a short review. *J Photochem Photobiol B* 2010; 101(3):185-90.
99. O'Dwyer M, Day A, Padgett M, Ogden GR, McLaren S, Goodman CR. Detection of mucosal abnormalities in patients with oral cancer using a 90 photodynamic technique: A pilot study. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2008; 46:6-10.
100. Thong PS, Olivo M, Kho KW, Zheng W, Mancer K, Harris M, Soo KC. Laser confocal endomicroscopy as a novel technique for fluorescence diagnostic imaging of the oral cavity. *J Biomed Opt* 2007; 12:014007.
101. Arens C, Reussner D, Woenkhaus J, Leunig A, Betz CS, Glanz H. Indirect fluorescence laryngoscopy in the diagnosis of precancerous and cancerous laryngeal lesions. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2007; 264:621-6.
102. Allison RR, Cuenca GH, Downie GH, Randall ME, Bagnato VS, Sibata CH. PD/PDT for gynaecological disease: A clinical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2005; 2:51-63.

103. Akoel KM, Welfel J, Gottwald L, Suzin J. [Photodynamic diagnosis of vulvar precancerous conditions and invasive cancers using 5-aminolevulinic acid]. *Ginekol Pol* 2003; 74(9):662-5.
104. Stylli SS, Kaye AH. Photodynamic therapy of cerebral glioma - a review. Part II - clinical studies. *J Clin Neurosci* 2006; 13(7):709-17.
105. Niyazi M, Siefert A, Schwarz SB, Ganswindt U, Kreth FW, Tonn JC, Belka C. Therapeutic options for recurrent malignant glioma. *Radiother Oncol* 2011; 98(1):1-14.
106. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ. ALA-Glioma Study Group. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol* 2006; 7:392-401.
107. Hefti M, von Campe G, Moschopoulos M, Siegner A, Looser H, Landolt H. 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX fluorescence in high-grade glioma surgery: a one-year experience at a single institution. *Swiss Med Wkly* 2008; 22(138):180-5.
108. Skauminas K, Klumbys L, Šaferis V, Didžiapetrienė J, Gražalienė G, Gudinašičienė I, Kaškelytė D, Gadonas R, Smilgevičius V. Spektrofluorimetrija piktybinių gliomų intraoperacinėje diagnostikoje. Jautrumo ir specifiškumo įvertinimas eksperimente. *Neurologijos seminarai* 2003;1(17):66-73.
109. Čiburys A, Gadonas D, Gadonas R, Didžiapetrienė J, Gudinašičienė I, Gražalienė G, Kaškelytė D, Piskarskas A, Skauminas K, Smilgevičius V, Sukackaitė A. 5-Aminolevulinic acid induced protoporphyrin

IX fluorescence for detection of brain tumor cells *in vivo*. *Experimental Oncology* 2003;25:51-4.

110. Skauminas K, Kaškelytė D, Keleras E, Čikotas P, Radžiūnas A, Šidiškis J, Deltuva VP, Tamašauskas A. Centrinės nervų sistemos navikų vaizdinimas. Kaunas; Vitae Litera, 2008; 192p.

111. Vereecken P, Da Costa CM, Steels E, De Lathouwer O, Heenen M, De Mey A. Fluorescence diagnosis of face-located basal cell carcinomas: a new dermatological procedure which may help the surgeon. *Acta Chir Belg* 2007; 107:205-7.

112. Fauteck JD, Ackermann G, Birkel M, Breuer M, Moor AC, Ebeling A, Ortlund C. Fluorescence characteristics and pharmacokinetic properties of a novel self-adhesive 5-ALA patch for photodynamic therapy of actinic keratoses. *Arch Dermatol Res* 2008; 300:53-60.

113. De Leeuw J, van der Beek N, Neugebauer WD, Bjerring P, Neumann HA. Fluorescence detection and diagnosis of non-melanoma skin cancer at an early stage. *Lasers Surg Med* 2009; 41:96-103.

114. Liutkevičiūtė Navickienė J, Mordas A, Šimkutė S, Bloznelytė-Plėšnienė L. Odos navikų fluorescencinė diagnostika naudojant 5-aminolevulininę rūgštį ir jos metilintą esterį. *Medicina* 2009; 45(12):937-42.

115. Neus S, Gambichler T, Bechara FG, Wöhl S, Lehmann P. Preoperative assessment of basal cell carcinoma using conventional fluorescence diagnosis. *Arch Dermatol Res* 2009; 301:289-94.

116. Marcu L, Jo JA, Fang Q, Papaioannou T, Reil T, Qiao JH, Baker JD, Freischlag JA, Fishbein MC. Detection of rupture-prone atherosclerotic

plaques by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy. *Atherosclerosis* 2009; 204(1):156-64.

117. Venius J, Bagdonas S, Žurauskas E, Rotomskis R. Visualization of human heart conduction system by means of fluorescence spectroscopy. *J Biomed Opt* 2011; 16(10):107001.

118. Yano S, Hirohara S, Obata M, Hagiya Y, Ogura SI, Ikeda A, Kataoka H, Tanaka M, Joh T. Current states and future views in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry & Photobiology* 2011; 12(1):46-67.

119. Zuluaga A F, Utzinger U, Durkin A, Fuchs H, Gillenwater A, Jacob R, Kemp B, Fan J, Richards-Kortum R. Fluorescence Excitation Emission Matrices of Human Tissue: A System for in Vivo Measurement and Method of Data Analysis. *Applied Spectroscopy* 1999; 53(3):302-11.

120. Marti A, Lange N, van den Bergh H, Sedmera D, Jichlinski P, Kucera P. Optimisation of the formation and distribution of protoporphyrin IX in the urothelium: an in vitro approach. *JUrol* 1999; 162: 546-52.

121. Gallegos E, DeLeón-Rodríguez I, Martínez-Guzmán L, Pérez Zapata AJ. In vitro study of biosynthesis of protoporphyrin IX induced by delta-aminolevulinic acid in normal and cancerous cells of the human cervix. *Arch Med Res* 1999; 30:163-70.

122. Pahernik SA, Botzlar A, Hillemanns P, Dellian M, Kirschstein M, Abels C, Korell M, Mueller-Hoecker J, Untch M, Goetz AE. Pharmacokinetics and selectivity of aminolevulinic acid-induced porphyrin synthesis in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 1998; 78(3):310-4.


123. Hillemanns P, Korell M, Schmitt-Sody M, Baumgartner R, Beyer W, Kimmig R, Untch M, Hepp H. Photodynamic therapy in women with cervical intraepithelial neoplasia using topically applied 5-aminolevulinic acid. *Int J Cancer* 1999; 81:34- 8.
124. Andikyan V, Kronschnabl M, Hillemanns P, Hillemanns M, Wang X, Stepp H. Fluoreszenzdiagnostik mit 5-ALA-Thermogel bei zervikaler intraepithelialer Neoplasie. (Fluorescence diagnosis with 5-ALA thermogel of cervical intraepithelial neoplasia.) *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch* 2004; 44(1):31-7.
125. Hillemanns P, Wang X, Hertel H, Andikyan V, Hillemanns M, Stepp H, Soergel P. Pharmacokinetics and selectivity of porphyrin synthesis after topical application of hexaminolevulinate in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 198(3):300-7.
126. Duska LR, Wimberly J, Deutsch TF, Ortel B, Haas J, Houck K, Hasan T. Detection of female lower genital tract dysplasia using orally administered 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX: a preliminary study. *Gynecol Oncol* 2002; 85(1):125-8.
127. Collinet P, Jouve E, Regis C, Farine MO, Vinatier D, Cosson M, Mordon S. Fluorescence diagnosis of cervical squamous intraepithelial lesions: A clinical feasibility study. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 2007; 4(2):112-6.
128. Nowakowski Z, Kietlińska Z, Stelmachów J. Ocena wydolności metody fotodynamicznej PDD w rozpoznawaniu zmian na tarczy części pochwowej szyjki macicy doniesienie wstępne (The effectiveness of photodynamic diagnosis method in diagnosis of cervical lesions.) *Ginekol Pol* 2002; 73(11):930-3.

129. Barnett AA, Haller JC, Cairnduff F, Lane G, Brown SB, Roberts DJ. A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of photodynamic therapy using 5-aminolaevulinic acid for the treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 2003; 103(6): 829-32.
130. Keefe KA, Chahine EB, DiSaia PJ, Krasieva TB, Lin F, Berns MW, Tadir Y. Fluorescence detection of cervical intraepithelial neoplasia for photodynamic therapy with the topical agents 5-aminolevulinic acid and benzoporphyrin-derivative monoacid ring. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184(6):1164-9.
131. Soergel P, Wang X, Stepp H, Hertel H, Hillemanns P. Photodynamic therapy of cervical intraepithelial neoplasia with hexaminolevulinate. *Lasers Surg Med* 2008; 40(9):611-5.
132. Sapozhnikova VV, Shakhova NM, Kamensky VA, Petrova SA, Snopova LB, Kuranov RV. Capabilities of Fluorescence Spectroscopy Using 5-ALA and Optical Coherence Tomography for Diagnosis of Neoplastic Processes in the Uterine Cervix and Vulva. *Laser Physics* 15(12); 2005:1664–73.
133. Zikov AE. Лазерная флюоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия заболеваний шейки матки. Диссертация. 2011; 122р.
134. Bogaards A, Aalders MC, Zeyl CC, de Blok S, Dannecker C, Hillemanns P, Stepp H, Sterenborg HJ. Localization and staging of cervical intraepithelial neoplasia using double ratio fluorescence imaging. *J Biomed Opt* 2002; 7(2):215-20.

135. Richards-Kortum R, Rava RP, Petras RE, Fitzmaurice M, Sivak M, Feld MS. Spectroscopic diagnosis of colonic dysplasia. *Photochem Photobiol* 1991; 53:777-86.
136. Bornstein J, Bentley J, Bösze P, Girardi F, Haefner H, Menton M, Perrotta M, Prendiville W, Russell P, Sideri M, Strander B, Tatti S, Torne A, Walker P. 2011 Colposcopic Terminology of the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy. *OBSTETRICS & GYNECOLOGY* 2012; 120(1):166-172.
137. Richards-Kortum R, Drezek R, Basen-Enquist K, Cantor SB, Utzinger U, Brookner C, Follen M. Cervical dysplasia diagnosis with fluorescence spectroscopy. *Handbook of biomedical fluorescence*, CRC Press 2003; 265-313.
138. Vargis E, Byrd T, Logan Q, Khabele D, Mahadevan-Jansen A. Sensitivity of Raman spectroscopy to normal patient variability. *J Biomed Opt* 2011;16(11):117004.

10. PRIEDAI

1 priedas. Leidimas atlikti biomedicininį tyrimą



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

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 BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ**

2012-01-11 Nr.158200-01-445-126

Tyrimo pavadinimas:
MODIFIKUOTOS KOLPOSKOPIJOS PANAUDOJIMAS NUSTATANT GIMDOS KAKLELIO
PRIEŠVĖŽINES BŪKLES IR VĖŽĮ *IN VIVO*

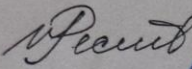
Protokolo Nr.: 1
Versija: 3
Data: 2011-12-14
Asmens informavimo ir informuoto asmens sutikimo forma (lietuvių kalba):
Versija: 3
Data: 2011-12-30


Pagrindiniai tyrėjai: S.R. Letautienė

Biomedicininio tyrimo vieta:
Įstaigos pavadinimas: VUOI
Įstaigos adresas: Santariškių g. 1, LT-08660, Vilnius

Leidimas išduotas Vilniaus regioninio biomedicininių tyrimų etikos komiteto posėdžio (protokolas Nr. 158200-2012/01), vykusio 2012 m. sausio 10 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. Indrė Isokaitė	teisė	ne
4	dr. Marija Veniūtė	visuomenės sveikata	ne
5	doc.dr. Jolanta Gulbinovič	medicina	ne
6	prof.dr. Vytautė Pečiulienė	medicina, odontologija	taip
7	Laura Malinauskienė	medicina	taip
8	dr. Gražina Pastavkaitė	klinikinė psichologija	ne
9	Ugnė Šakūnienė	pacientų teisės	taip

Pirmininkė  Vytautė Pečiulienė



2 priedas. Asmens informavimo forma

ASMENS INFORMAVIMO FORMA

Gerbiama Paciente,

Kviečiame dalyvauti moksliniame klinikiniam tyrimo: „**MODIFIKUOTOS KOLPOSKOPIJOS PANAUDOJIMAS NUSTATANT GIMDOS KAKLELIO PRIEŠVĖŽINES BŪKLES IR VĖŽĮ *IN VIVO***“

Kadangi siūlome Jums dalyvauti šiame tyrimo, norėdami padėti suvokti tyrimo esmę, pateikiame Jums šią informaciją. Prašome būtinai klausti, jei pateikta informacija Jums neaiški, - mes pasistengsime kuo išsamiau viską paaiškinti.

TYRIMO TIKSLAS

Jūs žinote, kad, atlikus onkocitologinį tepinėlį (tai tyrimas, kuriuo nustatoma ar yra pakitusių ląstelių gimdos kaklelio paviršiuje) Jums jau nustatyti priešvėžiniai pakitimai gimdos kaklelyje, dėl kurių reikalinga operacija (gimdos kaklelio dalies, su pakitusiomis ląstelėmis, pašalinimas).

Mes Jums siūlome saugų ir neskausmingą tyrimo metodą, kuris galėtų pagerinti šių pakitimų diagnostiką, patikslinti pakitimų vietas, jų plotą, ribas, daugiažidiniškumą (t.y. pamatyti ar pakitimai yra vienoje ar keliose gimdos kaklelio vietose). Tai, ką mes Jums siūlome, yra tik klinikinis tyrimas ir mes negalime duoti garantijų, kad ši diagnostika visais atvejais bus pakankamai efektyvi, nors to ir tikimės, remdamiesi anksčiau atliktais tyrimais, literatūros duomenimis.

Tyrimo tikslas - išsiaiškinti fluorescencinės diagnostikos (tai yra tyrimo metodas naudojant specialų šviesos šaltinį gimdos kaklelio apžiūrai) efektyvumą, diagnozuojant Jums įtariamus priešvėžinius pakitimus gimdos kaklelyje. Šis tyrimas gali padėti patikslinti pakitimų vietas, plotą, ribas, daugiažidiniškumą, vėliau - po gydymo – įvertinti galimus liekamuosius ar naujai atsiradusius, pakitimus toliau stebėti gimdos kaklelio būklę. Tai leis mums ateityje įvertinti fluorescencinės diagnostikos jautrumą ir specifiškumą taikant šį diagnostinį

metodą onkologijoje ir nustatyti, fluorescencinės diagnostikos svarbą ir patikimumą vertinant gimdos kaklelio priešvėžinius pakitimus. Ši diagnostikos metodą galima taikyti neribotą kiekį kartų.

Informuojame Jus, kad bet kuriame tyrimo etape Jūs galite atsisakyti tolimesnio dalyvavimo šiame tyrime. Už dalyvavimą tyrime mokestis nenumatytas.

TYRIMO EIGA

Jeigu Jūs dalyvausite šiame tyrime, Jums bus atliekamos šios procedūros:

Įprastinė ginekologinė apžiūra ir kolposkopija:

(atliekama moteriai gulint ant ginekologinės kėdės, makštis skėtikliais išplečiama makštis, apžiūrimas gimdos kaklelis, tuomet gimdos kaklelis sutepamas acto rūgties tirpalu, bei Lugolio tirpalu (preparatas su jodu), tuomet gimdos kaklelis apžiūrimas specialiu vaizdą didinančiu aparatu kolposkopu, įvertinamai matomi pakitimai. Esant reikalui bus paimtas onkocitologinis tyrimas iš gimdos kaklelio, bei tyrimas žmogaus papilomos viruso infekcijai nustatyti.

Po to ant gimdos kaklelio paviršiaus bus užtepamas preparatas - fotosensibilizatorius – ALA (5-aminolevulininė rūgštis), kurio veikiami išryškėja pakitimai gimdos kaklelyje. Pakartotinė apžiūra bus atliekama po 2-3 valandų (tiek laiko reikia, kad išryškėtų pakitimai). T.y. nurodytu laiku, tą pačią dieną, Jums reikės sugrįžti pakartotinai apžiūrai.

Fluorescencinės gimdos kaklelio pakitimų diagnostika, ginekologinės apžiūros metu, atliekama 3- 5 minutes, ji visiškai neskausminga ir saugi. Taikant fluorescencinės diagnostiką audiniai bus apšviečiami mažo intensyvumo pasirinkto bangos ilgio šviesa. Bus vertinama apšvietimo metu atsirandanti audinių fluorescencija (tai yra matomo pakitusių ląstelių švytėjimo plotai, intensyvumas). Tiriama vaizdai (t.y. tik gimdos kaklelio vaizdai) bus matomi videokolposkopo ekrane ir duomenys išsaugomi kompiuterio atmintyje. Vėliau atvaizdus galima lyginti, esant reikalui vaizdus gali konsultuoti daugiau gydytojų.

Po šio ištyrimo, jums bus paaiškinta kada atvykti gimdos kaklelio operacijai ir kaip jai pasiruošti.

Jeigu Jūsų neatrinksime dalyvauti tyrime, Jums paaiškinsime to priežastis. Tokiu atveju Jums bus atlikta įprastinė ginekologinė apžiūra, kolposkopija ir būsite nukreipta gydymui.

Mes negalime Jūsų įtraukti į tyrimą, jeigu:

- Jums citologiškai nepatvirtinta gimdos kaklelio HSIL ar *Ca in situ*.
- Jums yra alergija jodui ar 5-aminolevulino rūgšties preparatui.
- Jums anksčiau nustatytas porfirinų apykaitos sutrikimas (reta liga).
- Jūs jaunesnė nei 18 metų.
- Jūs laukiatės kūdikio.
- Jūs nesutinkate dalyvauti šiame tyrime.

TYRIMO RIZIKA

Įspėjame Jus, kad vartojant 5-aminolevulino rūgšties preparatą (kaip ir bet kurį medicininį preparatą) galimos sisteminės alerginės reakcijos. Mūsų duomenimis, **iki šiol jokių kitų su vietiškai vartojamais aminolevulinatais, susijusių nepageidaujamų reiškinių po fluorescencinės diagnostikos nepastebėta** (neradome tokios informacijos mūsų išnagrinėtuose literatūros šaltiniuose). Kaip ir bet kuri medžiaga – šis preparatas išskirtinai retais atvejais gali sukelti bendrąsias alergines reakcijas: odos paraudimą, dilgėlinį bėrimą, audinių patinimą, niežulį, apsunkintą kvėpavimą, dusulį, dažną širdies plakimą.

KOKIA GALI BŪTI TYRIMO NAUDA

Tyrimas gali padėti patikslinti pakitimų gimdos kaklelyje vietas, plotą, ribas, daugiažidiniškumą. Tyrimų metu sukaupta medžiaga leis nustatyti, koks yra fluorescencinės diagnostikos specifiškumas ir jautrumas diagnozuojant, bei patikslinant intraepitelinių pakitimų gimdos kaklelyje vietą.

ALTERNATYVŪS DIAGNOSTIKOS BŪDAI

Jeigu atsisakytumėte dalyvauti šiame tyrime, Jums būtų taikomas įprastinis ištyrimas ruošiant gimdos kaklelio operacijai – t.y. ginekologinė apžiūra ir kolposkopija (tai įprastinis ištyrimas, atliekamas pagal Vilniaus universiteto Onkologijos Institute patvirtintus tyrimo ir gydymo standartus).

KONFIDENCIALUMAS

Tyrimo metu užrašyti duomenys apie Jūsų sveikatą visą laiką bus laikomi griežtai konfidencialiais. Tačiau Etikos komiteto nariams ir medicinos priežiūros institucijoms bus leidžiama susipažinti su šiais duomenimis. Pasirašydamas sutikimo formą, Jūs duodate leidimą naudotis duomenimis dabartinio tyrimo metu ir vėliau bet kokiame kitame, su šiuo tyrimu susijusiame tyrime (net jei pasitrauksite iš tyrimo). Mes pasilieiname teisę publikuoti gautus gydymo rezultatus, tiriamųjų gimdos kaklelio vaizdų fotografijas arba filmuotą medžiagą, nenurodant asmens dokumentinių duomenų. Iš gimdos kaklelio vaizdų fotografijų niekaip nebus įmanoma identifikuoti paciento.

SAVANORIŠKAS DALYVAVIMAS

Dalyvavimas šiame tyrime yra savanoriškas. Pacientai išsaugo visas savo juridines ir etines teises. Jūs galite be jokio pasiaiškinimo pasitraukti iš tyrimo. Jeigu Jūs pasitraukiate iš tyrimo dėl šalutinio poveikio, prašome apie tai informuoti savo gydytoją. Jeigu gydytojas manys, kad Jums būtų naudingiau nutraukti tyrimą, jis gali tai padaryti bet kuriuo metu be Jūsų sutikimo. Jeigu Jūs pats nutarsite nedalyvauti ar nutraukti tyrimą, tai jokių būdu neatsilieps Jūsų tolesniam gydymui ir priežiūrai. Gydytojas Jums paaiškins dalyvavimo tyrime nutraukimo procedūrą.

PAPILDOMA INFORMACIJA

Jeigu turite klausimų apie šio tyrimo riziką, galimas šalutines reakcijas ar Jūsų, kaip paciento, teises arba jei Jūs jaučiate kokius nors simptomus, kurie galėtų

būti susiję su tyrimu, ar reikėtų ekstrinės pagalbos, prašom susisiekti su gydytoja Rasa Vansevičiūte

mob. tel +37068612360; el.paštas: rasa.vanseviciute@nvi.lt

Taip pat dėl informacijos galite kreiptis į Vilniaus regioninį biomedicininį tyrimų komitetą

Adresas: **M.K. Čiurlionio 21/27, 228 kab., LT-03101, Vilnius**

Tel./faksas: **(8 5) 2686998, el. paštas: rbtek@mf.vu.lt**

3 priedas. Informuoto asmens sutikimo forma

INFORMUOTO ASMENS SUTIKIMO FORMA

.....
Paciento vardas, pavardė

.....
Gimimo data

Pagrindinio tyrėjo vardas, pavardė: Simona Letautienė

Tyrėja : gydytoja akušerė ginekologė Rasa Vansevičiūtė

1. Patvirtinu, kad perskaičiau ir supratau man pateiktą informaciją apie anksčiau minėtą tyrimą ir turėjau galimybę gauti atsakymus į mano klausimus. Tyrėjas paaiškino tyrimo esmę bei tikslą ir aš suprantu, kas man yra siūloma.
2. Suprantu, kad mano dalyvavimas šiame tyrime yra savanoriškas ir, kad aš galiu pasitraukti iš tyrimo bet kuriuo metu, nenurodydama jokios priežasties. Dėl to nenukentės mano sveikatos priežiūra bei nebus pažeistos mano teisės.
3. Suprantu, kad mano individualūs tyrimo duomenys liks paslapyje ir duodu leidimą publikuoti mano fotografijas ar filmuotą medžiagą (gimdos kaklelio vaizdus), nenurodant asmens duomenų.
4. Sutinku dalyvauti anksčiau aprašytame tyrime.

.....
Paciento parašas, data

Aš, pagrindinis tyrėjas, atsakingas už šį tyrimą, patvirtinu, kad paaiškinau anksčiau minėtam pacientui būsimo tyrimo esmę ir tikslą, atsakiau į klausimus.

.....
Pagrindinio tyrėjo parašas, data

Jeigu Jums iškils problemų dėl šio tyrimo,

prašome pranešti pagrindiniam tyrėjui:

dr. Simonai Letautienei darbo tel : (85)2190962

arba tyrėjai gydytojai Rasai Vanseviciūtei mob. tel. +37068612360,

el.paštas : **rasa.vanseviciute@nvi.lt**

Taip pat dėl informacijos galite kreiptis į Vilniaus regioninį biomedicininį tyrimų komitetą.

Adresas: **M.K. Čiurlionio 21/27, 228 kab., LT-03101, Vilnius**

Tel./faksas: (8 5) 2686998, el. paštas: rbtek@mf.vu.lt

11. PADĖKA

Dėkoju Nacionalinio vėžio instituto administracijai ir vadovams prof. Eduardui Aleknavičiui, prof. Narimantui Evaldui Samalavičiui, prof. Konstantinui Povilui Valuckui už suteiktą galimybę ir paramą vykdant šį mokslinį darbą. Dėkoju disertacinio darbo recenzentams ir disertacijos gynimo komisijos nariams už šio darbo įvertinimą.

Esu nuoširdžiai dėkinga mokslinio darbo vadovei doc. Simonai Rūtai Letautienei už palaikymą, pagalbą organizuojant mokslinio darbo rengimą, supratimą ir gerą nuotaiką visose situacijose. Dr. Jonui Veniui dėkoju už mokslines diskusijas, idėjas ir dosniai skirtą laiką rašant straipsnius ir disertacijos rezultatus bei jų aptarimą.

Dėkoju gerbiausiai prof. Janinai Didžiapetrienei už kantrybę, supratimą, svarbias mokslines pastabas ir skatinimą tobulėti, prof. Ričardui Rotomskiui ir dr. Vydmantui Atkočiui už vertingus patarimus darbo eigoje. Taip pat dėkoju medicinos fizikos studentei magistrei Olgai Žukovskajai už pagalbą registruojant ir analizuojant fluorescencijos spektrų duomenis, bei statistinius skaičiavimus. Dėkoju kalbos redaktorei Gražinai Pruskuvienei už disertacijos teksto redagavimą.

Dėkoju visoms tyrime dalyvavusioms pacientėms už sutikimą dalyvauti tyrime. Taip pat esu dėkinga kolegėms gydytojoms, nukreipusioms pacientes konsultavimui. Labai ačiū kolegoms Konsultacinės poliklinikos vedėjai dr. Daivai Kanopienei už dalyvavimą tiriant pacientes, bei palaikymą ir supratimą, onkoginekologijos skyriaus gydytojams ir slaugos personalui už pagalbą atliekant intervencines procedūras – kaip mokslinio darbo etapą, dr. Jolitai Rimienei už histologinių tyrimų atlikimą. Nuoširdžiai dėkoju savo kolegei slaugytojai Onutei Stankevičienei už kasdienį palaikymą, supratimą, profesionalų darbą ir gebėjimą sudaryti pozityvų psichologinį klimatą nepaisant gausaus sudėtingų pacientų srauto.

Taip pat esu labai dėkinga savo šeimai Mamai, Tėčiui ir savo artimiausiam žmogui Vaidui už visapusišką palaikymą, supratimą, kantrybę ir rūpestį mokslinio darbo rengimo metu.