

Materials and methods. Under an inspection there were 178 patients with arthropathy psoriasis, the indexes of the functional state of vessels were first of all determined that.

Conclusions. It is discovered and the instrumental is confirmed at 3,9 sacroilitis, at 6,7 spondylitis thoracal and lumbar departments. The expressed correlative dependence is well-proven between an increase functional loading of joints, duration of flow of arthropathy psoriasis and worsening of quality of life of patients.

© Л.О.Гулей

УДК 616.5-076.4:[535.361:535.37

ПЕРСПЕКТИВИ ЗАСТОСУВАННЯ КОНФОКАЛЬНОЇ ЛАЗЕРНОЇ СКАНУЮЧОЇ МІКРОСКОПІЇ В ДЕРМАТОЛОГІЧНІЙ ПРАКТИЦІ

Л.О.Гулей

*Вищий державний навчальний заклад України
«Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці*

Мета роботи. Провести аналіз літератури щодо сучасного методу діагностики – конфокальної лазерної скануючої мікроскопії та перспектив її застосування в дерматології.

Матеріал і методи. Вивчали вітчизняні та іноземні джерела літератури щодо доцільності використання конфокальної лазерної скануючої мікроскопії при різних дерматозах.

Результати дослідження та обговорення. Аналіз літератури свідчить, що конфокальна лазерна скануюча мікроскопія дозволяє вивчати структуру шкіри без порушення цілісності, тому більшість авторів розглядають її як діагностичну альтернативу ексцизійній біопсії. Суперечливість даних полягає у тому, що вищезазначений метод не може повністю замінити загальноновизнані діагностичні стандарти, особливо при глибоких ураженнях шкіри

Висновок. Перспективним є впровадження конфокальної лазерної скануючої мікроскопії в клінічну практику з метою вдосконалення діагностики захворювань шкіри людини на території України.

Вступ

Однією з тенденцій сучасної медицини є застосування неінвазивних органозберігаючих методів дослідження [5]. Завдяки науковим розробкам і впровадженню в практику інноваційних технологій в останнє десятиліття з'явилися нові неінвазивні високорозрішуючі методи дослідження структури шкіри та інших тканин. Такими методами є: дерматоскопія, оптична когерентна томографія, високочастотне ультразвукове сканування, ядерно-магнітний резонанс, конфокальна лазерна скануюча мікроскопія (КЛСМ) [1]. Останній

метод займає особливе місце серед візуалізуючих технологій, оскільки дозволяє отримати зображення епідермісу і поверхневої частини дерми з розрішенням, подібним до традиційної світлової мікроскопії та є наближеним до даних гістологічного дослідження [1, 5, 19]. Зважаючи на суперечливість даних відносно досвіду застосування КЛСМ у світі при дерматозах, актуальним є дослідження цього питання.

Мета роботи

Провести аналіз джерел літератури, щодо сучасного методу діагностики – конфокальної лазерної скануючої мікрос-

копії та перспектив її застосування в дерматології.

Матеріали і методи досліджень

Вивчити дані вітчизняних та іноземних джерел літератури щодо доцільності використання новітньої діагностичної технології – конфокальної лазерної скануючої мікроскопії при різних дерматозах для верифікації пухлин шкіри, бляшкового псоріазу, дерматофітій, оніхомікозу, atopічного дерматиту, демодекозу; для проведення диференційної діагностики складних випадків папулосквамозних та алергодерматозів. Конфокальна мікроскопія (КМ) [2, 15] – це сучасний метод для візуалізації та дослідження внутрішньо- і позаклітинних структур та аналізу клітинних процесів у біологічних та біомедичних дослідженнях. Характерними рисами, що вирізняють КЛСМ з поміж інших різновидів світлової мікроскопії, є покращена просторова та часова роздільна здатність; високий рівень контрастності зображень; можливість проведення мультиспектральних досліджень з розділенням сигналів від різноманітних флюорохромів; отримання тривимірного зображення об'єкту (так звана 3D-реконструкція) [4]. Метод КЛСМ був розроблений Марвіном Мінскі (Гарвардський університет) в 1961 році, проте його клінічне використання почалося тільки в 90-х роках ХХ століття [4, 5]. КСЛМ дозволяє оцінювати морфологію досліджуваного елемента як *in vivo*, тобто вивчати структуру шкіри в режимі реального часу (без порушення цілісності шкірних покривів) в чотирьох вимірах – глибина, ширина, довжина і час, а також контролювати процеси загоєння і регенерації тканин [13, 16]. Це дозволило назвати даний метод «прижиттєвою біопсією» та, навіть, «віртуальною біопсією». Як і при дерматоскопії, використовуючи КЛСМ *in vivo*, ми отримуємо горизонтальний зріз тканини, що дає нам можливість вивчити морфологію досліджуваної зони. Основна відмінність її від інших неінвазивних методів – вивчення морфології на клітинному рівні. При використанні даного методу візуалізація клітинних структур епідермісу і сосочкового шару дерми відбувається в режимі реаль-

ного часу [2, 15]. При КЛСМ використовується лазерний промінь певної довжини та високої потужності освітлення [4]. Розрізняють флюоресцентну і відбивну КЛСМ. Завдяки своїй безпеці та неінвазивності прижиттєва відбивна КЛСМ є кращою у використанні [5, 10, 13]. Основною перевагою КЛСМ є здатність виробляти серійно-тонкий (0,5-1,5-0,3-0,5мкм) оптичний зріз через люмінесцентні зразки, товщиною в діапазоні 50-100 мкм. Оптичне секціонування усуває артефакти, які виникають під час фізичних зрізів і флюоресценції тканини зразків, які використовують при традиційних формах мікроскопії, що дозволяє бачити більш чітке зображення [4, 9, 10]. Зазвичай сучасні конфокальні скануючі мікроскопи обладнані трьома-п'ятьма лазерними системами, що контролюються акустично-оптичним фільтрами для точного регулювання довжини хвилі та інтенсивності лазерного випромінювання завдяки наявності фотопомножувачів із квантовою ефективністю в ультрафіолетовому діапазоні спектра. Такі мікроскопи дають можливість проводити дослідження у діапазоні 400-759 нм. Фактично конфокальний мікроскоп спроможний виявити присутність окремої молекули. Проте, незважаючи на покращену роздільну здатність конфокального мікроскопа, деталізація зображень, отриманих за допомогою електронного мікроскопа, чіткіша. Основний принцип конфокальної мікроскопії полягає в збігу фокальних площин мікроскопа. У об'єктива оптичного мікроскопа є дві площини – фокальна, де розміщується досліджуваний об'єкт, та співвідносна до неї конфокальна площина, куди об'єкт проєктується. Ця проєкція, зазвичай, і розглядається спостерігачем через окуляр [2, 4, 10]. Існують конфокальні скануючі лазерні мікроскопи різних фірм-виробників: Vivascope 1000, 1500, 2 500 Lucid Inc., Rochester, NY; CarlZeissLSM510 META; Optiscan F900, Optiscan Pty. Ltd., Notting Hill, VIC, Australia та ін. [2, 5, 10]. Конфокальний лазерний скануючий мікроскоп CarlZeissLSM 510 META призначений для кількісного обчислення та аналізу цифрових зображень (рис. 1). Цей мікроскоп вве-

дено в експлуатацію на початку 2006 р. на базі ЦККП Інституту харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України і на сьогодні є найсуча-

снішим приладом не лише в системі установ Національної академії наук, але інших науково-освітніх закладах України [2].



Рис. 1. Конфокальний лазерний скануючий мікроскоп LSM510 META (CarlZeiss, Німеччина)

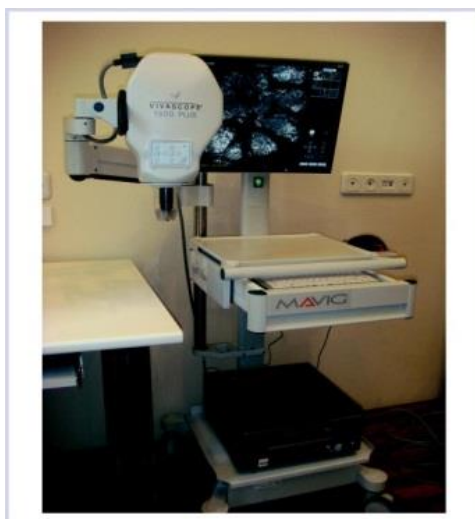


Рис. 2. Конфокальний лазерний скануючий мікроскоп «LucidInc»

При використанні конфокального лазерного мікроскопа Vivascope 1500 Lucid Inc. (див. рис. 2) лазерне сканування здійснюється на довжині хвилі 830 нм з оптичною потужністю не більше 16 мВт, яка не викликає пошкодження тканини або ураження ока. Лінза об'єктива дає 30-кратне збільшення (NA 0,9), при цьому у мікроскопі використовується водна імерсійна лінза і це зводить до мінімуму сферичну аберацію, викликану поверхневими епідермальними шарами клітин, коли відтворюється зображення глибше в дермі. Сканування

відбувається в площинах XY 4×4 мм з розміром кадру $0,5 \times 0,5$ мм та частотою 9 кадрів в секунду. За допомогою цієї системи можна отримати зображення нормальної шкіри на глибині від 200 до 400 мкм, достатньої для зображення епідермісу і верхньої частини дерми (сосочкової та верхньої ретикулярної). Відсканований через імерсійний об'єктив Lucid Stable View зображення з розрішенням 1000×1000 точок обробляється програмою Vivascope Ver.7,0 і передається на кольоровий монітор 19", що має максимальне

розрішення 1280×1024 точок [5]. При використанні мікроскопа Vivascope +1500 не потрібно застосовувати контрастні речовини. Отримання зображень можливо завдяки природному контрасту і відмінностей в коефіцієнті рефракції компонентів шкіри, таких як меланін і кератин [10]. Під час відтворення зображення використовується спеціальний пристрій для контакту зі шкірою, щоб зменшити утворення артефактів. Воно містить воду або гель на межі розділу фаз. Цей пристрій складається з металевого кільця, яке фіксується на шкірі пацієнта шляхом прилипання і з'єднується з мікроскопом, який забезпечений магнітом. Даний пристрій має увігнуту форму, для того щоб вміщати імерсійне середовище [5]. У зв'язку з тим, що зображення отримані при КЛСМ мають вигляд напівтонів (файли зберігаються у вигляді мікрофільму у динаміці або мікрофотографій) та орієнтовані паралельно поверхні шкіри (enface), метод дозволяє побачити епідерміс і сосочковий шар дерми з розрішенням, наближеним до гістологічного, однак певні труднощі викликає інтерпретація та аналіз отриманих результатів [1, 5, 10].

Основні результати

Аналіз літературних даних свідчить, що у дерматології КЛСМ використовують для: вивчення penetрації сполук у шкіру (шляхів проникнення, кінетики, розподілу в шкірі); спостереження за роботою залоз (визначення активного і пасивного стану); дослідження мікроциркуляторного русла (у тому числі і в режимі реального часу); діагностики новоутворень шкіри [1]. Даний метод застосовується для прижиттєвої верифікації пухлин шкіри, в тому числі і базально-клітинного раку шкіри (БКРШ) з досить високими показниками чутливості і специфічності, що дозволяє розглядати КЛСМ в якості оптимального методу діагностики та моніторингу пацієнтів, а також для скринінгу новоутворень шкіри. Дана технологія в практиці зарубіжних клінік використовується також як метод, який дозволяє верифікувати БКРШ у ході мікрохірургічної операції базаліоми за Mohs, суть якого полягає в інтраопераційному дослідженні пошарових горизонтальних

біоптатів із визначенням меж пухлини, що підвищує ефективність їх терапії і значно знижує відсоток випадків рецидиву БКРШ після лікування [6, 10, 18, 19]. Метод КЛСМ у діагностиці меланоми шкіри відіграє важливу роль, особливо меланоми *in situ*, який дозволяє уникнути багатьох непотрібних біопсій. Водночас повне і точне хірургічне видалення раку шкіри керується даними патогістологічного дослідження, однак підготовка до гістопатології є трудомістким і повільним процесом, оскільки приготування препарату повинно проводитися на заморожуючому мікромомі під час оперативного втручання по Mohs (Micrographic Oriental Histology Surgery) [8, 14, 18]. Було проведено порівняльну оцінку 35 клінічних випадків та продемонстровано потенційну корисність КЛСМ для швидкого скринінгу раку шкіри як методу інтраопераційної оцінки. Конфокальні зображення з'являлися приблизно через 9 хвилин, показуючи тканину в полях зору 12 мм зі збільшенням $\times 2$ та імітували дані гістопатології [18]. Два пацієнти з екстрамамарною хворобою Педжета були дообстежені за допомогою КЛСМ для визначення обсягу хірургічного втручання, результати якої були підтверджені даними гістологічного дослідження [16]. Отже, даний метод може допомогти в режимі реального часу в постановці діагнозу, але тільки як доповнення до звичайної гістопатології та спрямувати операцію по відношенню до більш точної оцінки меж видалення пухлин в ході дослідження ексцизійних зразків під час операції [6, 16, 18]. Ardigo M. (2009) було проведено дослідження, спрямоване на визначення в природних умовах за допомогою КЛСМ вогнищ уражень на шкірі 36 хворих з діагнозом бляшкового псоріазу, на підставі чого продемонстровано прямі кореляційні зв'язки з гістологічними дослідженнями біоптатів з аналогічних місць. Більш, ніж у 90% випадків, КЛСМ виявила гіперкератоз, паракератоз, зниження або відсутність зернистого шару, папіломатоз і розширені кровоносні судини. Акантоз спостерігали при псоріазі при довжині хвилі від 75 до 300 мкм, в порівнянні з нормальною шкірою, яка становила

від 60 до 90 мкм. Діаметр сосочків дерми також був збільшений – більше ніж 100 мкм порівняно з тим, що спостерігали в нормальній шкірі – більше ніж 80 мкм [12]. Turan E. (2013) проведено діагностику 5 атипичних клінічних випадків дерматофітій за допомогою мікологічного дослідження лусочок та КЛСМ. Результатом було отримання характерних лінійних розгалужених гіфів у міжклітинному просторі рогового шару при обох методах. При використанні КЛСМ оцінку природних зображень тканин проводили на трьох довжинах хвиль (785, 658, 445 нм) і найкращі зображення грибкових елементів були отримані при 445 нм [7]. Також проведено порівняльну оцінку результатів, отриманих за допомогою портативного апарату КЛСМ та стандартних тестів мікологічного дослідження у 58 пацієнтів з підозрою на оніхомікоз. Дослідження з гідроксидом калію та культуральне дослідження проводили на початку та після лікування. КЛСМ-діагноз оніхомікозу був виставлений у 46 (79,3%) з 58 пацієнтів. Чутливість методу склала 52,9%, специфічність – 90,2%, позитивна прогностична цінність – 69,2%. Повне одужання наступило у 9 пацієнтів, що підтвердили результати КЛСМ, які були аналогічними даним мікологічного дослідження [20]. Також провізуалізовано КЛСМ-ознаки атопічного дерматиту *in vivo*: гіперкератоз, акантоз, паракератоз, спонгіоз, папіломатоз, розширення капілярів дерми та її периваскулярний набряк, збільшення кількості меланіну в базальному шарі разом з порушення архітектоники зернистого і шипуватого шарів епідермісу, хвилеподібним розташуванням шарів епідермісу по відношенню до поверхні шкіри, зміною форми поперечного розташування дермальних сосочків, зниженням чіткості зображення дермо-епідермального з'єднання, зменшення щільності дермальних сосочків у шкірі. Доведено, що КЛСМ дозволяє визначити ступінь ремісії у хворих на атопічний дерматит і може використовуватися з метою прогнозування ризику розвитку загострення захворювання у таких пацієнтів [3]. Доцільним є також використання КЛСМ для проведення диферен-

ційної діагностики складних випадків папулосквамозних та алергодерматозів [11]. Щодо методів діагностики демодекозу, яка згідно деяких джерел літератури ґрунтується на інвазивних методах, а саме на проведенні біопсії та проведенні наступного патогістологічного дослідження, що не дозволяє точно вирахувати кількість кліщів-демоцид. Це травматичний спосіб, для якого необхідною умовою є дотримання стерильності, на відміну від КЛСМ, при якій було встановлено картину ураженої демодицидами шкіри і виявлено: розширення її судин та значне потовщення стінок; присутність вогнищевої лімфоплазматичної, нейтрофільної та еозинофільної інфільтрації; гіперплазію сальних залоз та руйнування епітелію фолікулів; гіперпластоз, а інколи й утворення у дермі цист та гранульом [15, 17].

Висновки

Отже, внаслідок високої розрішувачої здатності апарату, який дозволяє отримати зображення не тільки додатків шкіри, але і вивчити морфологію клітин різних шарів епідермісу, дерми, волокон сосочкового шару дерми, оцінити стан капілярів дерми, метод прижиттєвої КЛСМ розглядається як діагностична альтернатива ексцизійної біопсії [5, 13]. Метод є малоінвазивним і не призводить до утворення рубцевих змін. Прижиттєва КЛСМ може з успіхом застосовуватися для контролю ефективності лікування з метою наступної корекції обраних методів лікування [3, 13]. Водночас КЛСМ на сьогоднішній день не може повністю замінити загальноновизнані діагностичні стандарти дерматозів, особливо при глибоких ураженнях [18, 19]. Таким чином, в даній статті продемонстровано дані літератури щодо потенціалу КЛСМ для неінвазивної діагностики дерматологічної патології. На наш погляд доцільним і перспективним є впровадження методу КЛСМ з метою вдосконалення діагностики захворювань шкіри людини на території України. Важливу роль у впровадженні цієї сучасної технології має забезпечення відповідним обладнанням лікувальних установ та підготовка фахівців, які вміють інтерпретувати конфокальні зо-

браження. Цей метод прижиттєвого дослідження морфології шкіри може стати новою медичною технологією, яка допоможе

проводити оцінку стану шкіри в нормі та при патологічних змінах.

Список літератури

1. Калюжна Л.Д. Сучасні методи діагностики шкірних захворювань / Л.Д. Калюжна, Е.О. Мурзіна, К.О. Бардова // Збірник наук. праць співр. НМАПО ім. П.Л. Шупика. – 2013. – № 22(3). – С. 96-100.
2. Конфокальна мікроскопія у центрі користування унікальними приладами при інституті біохарчової технології та геноміки НАНу / Я.Б. Блюм, Я.О. Шеремет, Ю.А. Красиленко, А.І. Ємець // Наука та інновації. – 2009. – Том 5, № 2. – С. 82-91.
3. Лукашева Н.Н. Возможности прижизненной конфокальной лазерной сканирующей микроскопии при оценке морфологической структуры больных атопическим дерматитом [Текст] : автореф. дис... канд. мед. наук. : 14.00.10 / ВАКМОН России. – М., 2009. – 24 с.
4. Олар О.І. Сучасні методи мікроскопії в біології і медицині / О.І.Олар, О.Ю.Микитюк, В.І.Федів / Клін. та експерим. патол. //2014. – Том 13, № 2(48). – С.212-217.
5. Прижизненная отражательная конфокальная лазерная сканирующая микроскопия: история создания, принцип работы, возможности применения в дерматологии / Н. Потекаев, С.Б. Ткаченко, Т.С. Кузьмина [и др.] // Клин.дерматол. и венерол. –2008.– № 5.–С.10-15.
6. Сучасні методи обстежень пацієнтів з метою виявлення новоутворень шкіри. Скринінг раку шкіри. – Метод. рекомендації. – Київ,2013. – 48 с.
7. A new diagnostic technique for tinea incognita: in vivo reflectance confocal microscopy. Report of five cases / E. Turan, A.T.Erdemir, M.S. Gurel, N. Yurt // Skin Research and Technology. – 2013. – Vol.19, №1. – P. 103-107.
8. Automated detection of malignant features inconfocal microscopy on superficial spreading melanoma versus nevi / D. Gareau, R. Hennessy, E. Wan, G. Pellacani [et al.] // J. Biomed. Optics.– 2010. – Vol.15, № 6. – P. 161-167.
9. Cancer of the skin / Darrell S. Rigel, K. June [et al.]. // 2nd edition: Elsevier Saunders, 2011.– 698 p.
10. Claxon N.S.Laser scanning confocal microscopy / N.S. Claxon, T.J. Fellers, M.W. Davidson // Olympus Fluoview Resource Center. National High Magnetic Field Laboratory. Retrieved on 2007-07-25
11. Clinical Application of Confocal Laser Scanning Microscopy for Atypical Dermatoses / J. Ma, X. Zhang, Y. Lv, C. Chao [et al.] // Cell Biochem. Bioph. –2015. – Vol. 73, № 1. – P. 199-204.
12. Concordance between in vivo reflectance confocal microscopy and histology in the evaluation of plaque psoriasis / M.Ardigo, C.Cota, E.Berardesca [et al.]// J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol. –2009.–№23.–P.660-667.
13. In vivo confocal scanning laser microscopy: comparison of the reflectance and fluorescence mode by imaging human skin /L.E.Meyer, N.Otberg, W.Sterry[et al.] //J.of biomed.optics.–2012.–Vol.11, № 4.–P.11-14.
14. In vivo confocal laser scanning microscopy in the diagnosis of melanocytic skin tumours / A. Gerger, R. Hofmann-Wellenhof, H. Samonigg, J. Smolle // Br. J. Dermatol. – 2009. – Vol. 160, № 3. – P. 475-481.
15. In vivodetection ofDemodex folliculorumby means of confocal microscopy / C. Longo,G. Pellacani,C. Ricci [et al.] //Br. J. Dermatol. –2012.–Vol.166, № 3.–P.690-692.
16. In vivo reflectance confocal microscopy of extramammary Paget disease: Diagnostic evaluation and surgical management / Zhan-Yan Pan, Jun Liang, Qiao-An Zhang [et al.] // J.of the Amer. Acad. of dermatol. – 2012. – Vol. 6, № 2. – P. 47-53.
17. Lacey N. Demodex quantification methods: Limitations of Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) / N. Lacey , F.M. Forton , F.C. Powell //Br. J. Dermatol. – 2013. – Vol. 168, № 6. – P.1024-1029.

18. Rapid screening of cancer margins in tissue with multimodal confocal microscopy / D.S. Gareau, H. Jeon, K.S. Nehal, M. Rajadhyaksha // The j. of surg. research.– 2012. – Vol. 178, №2. – P. 533-538.

19. Levi A. In vivo reflectance-mode confocal laser microscopy: basic principles and clinical and research employments in derma-

tology / A. Levi, A. Ingber, D.C. Enk // Harefuah. –2012. – Vol. 151, № 10. – P. 576-580.

20. Diagnosis and treatment monitoring of toenail onychomycosis by reflectance confocal microscopy: Prospective cohort study in 58 patients / M. Pharaon, M.Gari-Toussaint, A. Khemis [et al.] // J. of the Amer. Acad. of dermatol. –2014. – Vol. 71, № 1. – P. 56-61.

РЕЗЮМЕ

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ КОНФОКАЛЬНОЙ ЛАЗЕРНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ МИКРОСКОПИИ В ДЕРМАТОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Л.О.Гулей

Цель работы. Провести анализ литературы по современному методу диагностики – конфокальной лазерной сканирующей микроскопии и перспектив применения.

Материал и методы. Изучали данные отечественных и иностранных источников литературы о целесообразности использования конфокальной лазерной сканирующей микроскопии при различных дерматозах.

Результаты исследования и обсуждение. Анализ литературы свидетельствует, что конфокальная лазерная сканирующая микроскопия позволяет изучать структуру кожи без нарушения целостности, поэтому большинство авторов рассматривают ее как диагностическую альтернативу эксцизионной биопсии. Противоречивость данных заключается в том, что вышеупомянутый метод диагностики не может полностью заменить общепризнанные диагностические стандарты дерматозов, особенно при глубоких поражениях кожи

Выводы. Перспективным является внедрение конфокальной лазерной сканирующей микроскопии в клиническую практику, с целью совершенствования диагностики заболеваний кожи человека на территории Украины.

SUMMARY

PROSPECTS OF CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPY IN DERMATOLOGICAL PRACTICE.

L.O.Guley

Intention study. To analyze the literature on the modern method of diagnosis confocal laser scanning microscopy and prospects for its use in dermatology.

Material and methods. We studied the data of national and foreign sources of literature on the feasibility of using confocal laser scanning microscopy at various dermatoses.

Results and discussion. Analysis of the literature shows that confocal laser scanning microscopy allows us to study the structure without destroying the integrity of the skin therefore the most of at hours see it as an alternative diagnostic biopsy. The contradictory data are that the aforementioned diagnostic method cannot completely replace generally accepted diagnostic standards of dermatoses, especially in the deep skin lesions.

Conclusion. Introduction a confocal laser scanning microscopy into clinical practices perspective to improve diagnosis of human's kind is eases in Ukraine.