

Zastosowanie refleksyjnej mikroskopii konfokalnej *in vivo* w dermatologii

The application of *in vivo* reflectance confocal microscopy in dermatology

Marta Kurzeja¹, Irena Walecka¹, Lidia Rudnicka¹, Małgorzata Olszewska²

¹Klinika Dermatologii CSK MSWiA w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Lidia Rudnicka

²Katedra i Klinika Dermatologiczna Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Wiesław Gliński

Przeł. Dermatol 2010, 97, 281–289

STRESZCZENIE

SŁOWA KLUCZOWE:

czerniak, diagnostyka, mikroskopia konfokalna, nowotwory skóry, pęcherzyca.

KEY WORDS:

melanoma, diagnostics, confocal microscopy, skin cancer, pemphigus.

Refleksyjna mikroskopia konfokalna *in vivo* jest nowoczesną, nieinwazyjną metodą diagnostyczną umożliwiającą obrazowanie naskórka oraz górnych warstw skóry właściwej z prawie histologiczną rozdzielczością i dobrym kontrastem w czasie rzeczywistym. Obecnie metoda ta znajduje najszersze zastosowanie w diagnostyce różnicowej łagodnych i złośliwych nowotworów skóry, szczególnie nietypowych i bardzo wczesnych czerniaków, oraz innych nowotworów. W piśmiennictwie podkreśla się możliwość rozszerzenia zakresu wskazań do diagnostycznego wykorzystania refleksyjnej mikroskopii konfokalnej *in vivo*, w tym do choroby Dariera, łuszczycy, kontaktowego zapalenia skóry, pęcherzyca, skórno-tocznia rumieniowatego i niektórych genodermatoz przebiegających z łysieniem. Dotychczas nie ma jednak jeszcze badań oceniających czułość i swoistość refleksyjnej mikroskopii konfokalnej *in vivo* w nienowotworowych chorobach skóry.

ABSTRACT

ADRES DO KORESPONDENCJI:

dr hab. n. med.
Małgorzata Olszewska
Klinika Dermatologiczna
Warszawski Uniwersytet
Medyczny
ul. Koszykowa 82 A
02-008 Warszawa
e-mail: malgorzataolszew-
ska@wum.edu.pl

In vivo reflectance confocal microscopy is a novel non-invasive technique that allows real-time visualization of epidermis and superficial dermis with near histological resolution and good contrast. The method is most widely used in differential diagnosis of atypical or very early melanomas and other neoplastic skin diseases. Current literature indicates the possibility of widening indications for this diagnostic method. These include Darier's disease, psoriasis, contact dermatitis, pemphigus and discoid lupus erythematosus. However, to date there are no studies assessing the sensitivity and specificity of *in vivo* reflectance confocal microscopy in these non-neoplastic diseases.

WPROWADZENIE

Refleksyjna mikroskopia konfokalna *in vivo* (ang. *in vivo reflectance confocal microscopy* – RCM) jest nowoczesną, nieinwazyjną metodą diagnostyczną,

pozwalającą na wizualizację tkanek z prawie histologiczną rozdzielczością w czasie rzeczywistym [1]. Metoda ta umożliwia obrazowanie zarówno naskórka i górnych warstw skóry właściwej, jak również przydatków skóry [2]. Zdjęcia uzyskane metodą

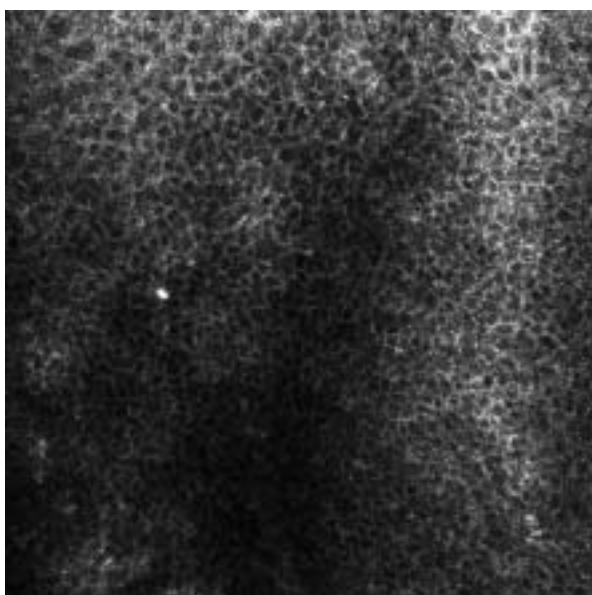
RCM, czyli tzw. przekroje optyczne tkanek, odpowiadają horyzontalnym przekrojom poszczególnych warstw naskórka lub skóry właściwej na określonej głębokości.

Obecnie w dermatologii metoda RCM jest wykorzystywana przede wszystkim we wczesnej diagnostyce czerniaka oraz niemelanocytowych nowotworów skóry [3, 4]. Znalazła także zastosowanie w monitorowaniu nieinwazyjnych metod leczenia stanów przednowotworowych oraz nowotworów skóry [5, 6]. Prowadzone są również badania dotyczące wykorzystania tej metody w chirurgii mikrograficznej metodą Mohsa [7]. Istnieją ponadto pojedyncze doniesienia dotyczące zastosowania RCM w diagnostyce innych schorzeń skóry, w tym chorób zapalnych oraz infekcyjnych [8, 9].

OBRAZ PRAWIDŁOWEGO NASKÓRKA I SKÓRY WŁAŚCIWEJ W REFLEKSYJNEJ MIKROSKOPII KONFOKALNEJ

W przekrojach optycznych wykonanych refleksyjnym mikroskopem konfokalnym warstwa rogowa złożona jest z jasnych, wielokątnych komórek o ciemnych brzegach. Średnica komórek warstwy rogowej wynosi od 10 μm do 30 μm . Korneocyty tworzą zgrupowania komórek oddzielone fałdami skórnymi, które są widoczne na przekrojach optycznych jako ciemne linie.

Warstwa ziarnista jest zlokalizowana od 15 μm do 20 μm poniżej powierzchni naskórka. Składa się z dwóch do czterech warstw keratynocytów o średnicy od 25 μm do 35 μm . Charakterystyczną cechą keratynocytów tej warstwy jest jasna, ziarnista cyto-



Ryc. 1. Prawidłowa warstwa kolczysta naskórka
Fig. 1. Normal squamous epithelium

plazma oraz ciemne jądro komórkowe zlokalizowane w części centralnej komórki [10].

Od 20 μm do 100 μm poniżej powierzchni naskórka znajduje się warstwa kolczysta, która jest zbudowana z sześciennych komórek o średnicy od 15 μm do 25 μm (ryc. 1.). Komórki warstwy kolczystej mają jasną, homogenną cytoplazmę oraz ciemne jądro komórkowe [10]. Zarówno komórki warstwy ziarnistej, jak i kolczystej układają się we wzór przypominający plaster miodu (ang. *honeycomb pattern*) [1].

Warstwa podstawna zlokalizowana jest około 40 μm do 100 μm poniżej powierzchni naskórka [3]. Średnica komórek warstwy podstawnej wynosi od 7 μm do 12 μm [10]. W obrębie prawidłowego naskórka keratynocyty warstwy podstawnej występują jako owalne lub okrągłe komórki o jasnej cytoplazmie oraz ciemnym jądrze komórkowym. Melanina w keratynocytach warstwy podstawnej zlokalizowana jest ponad jądrem komórkowym i tworzy tzw. czapeczki melaniny (ang. *melanin caps*) [1], natomiast melanocyty widoczne są jako jasne, okrągłe, owalne, wrzecionowate lub dendrytyczne komórki [11].

Warstwa brodawkowata skóry właściwej znajduje się około od 50 μm do 150 μm poniżej powierzchni naskórka. Na przekrojach optycznych RCM brodawki skórne są widoczne jako okrągłe lub owalne obszary o jednolitym ciemnym zabarwieniu, otoczone pierścieniem złożonym z pojedynczej warstwy jasnych komórek warstwy podstawnej, tzw. ostre obrysy brodawek skórných (ang. *edged papillae*) [3]. W centralnej części brodawki skórnej widoczne są naczynia krwionośne, w obrębie których można zaobserwować przepływ krwi.

Poniżej granicy skórno-naskórkowej w warstwie brodawkowatej skóry właściwej występują włókna kolagenu o grubości od 1 μm do 5 μm , które przyjmują postać zwojów oraz okrągłych struktur. W warstwie siateczkowatej skóry właściwej kolagen ma natomiast postać wiązek o grubości od 5 μm do 25 μm ułożonych równolegle względem siebie [2]. W górnej części skóry właściwej, najczęściej w sąsiedztwie naczyń krwionośnych, mogą być widoczne melanofagi w postaci jasnych komórek o średnicy od 5 μm do 25 μm , w obrębie których nie jest widoczne jądro komórkowe [3].

Należy jednak zaznaczyć, że opisana powyżej morfologia zarówno naskórka, jak i skóry właściwej może mieć różne odmiany w zależności od płci, wieku, fototypu skóry oraz lokalizacji [12].

ZASTOSOWANIE REFLEKSYJNEJ MIKROSKOPII KONFOKALNEJ W DIAGNOSTYCE ŁAGODNYCH ZMIAN MELANOCYTOWYCH

W przekrojach optycznych wykonanych metodą RCM Pellacani i wsp. [13] stwierdzili u ponad 50%

pacjentów z łagodnymi zmianami melanocytowymi obecność w warstwie ziarnistej i kolczystej dużych, wielobocznych komórek o średnicy od 10 μm do 30 μm układających się we wzór plastra miodu lub małych, wielobocznych komórek o bardzo jasnej cytoplazmie i ciemnych brzegach układających się we wzór kocich łbów [13]. U około 33% pacjentów obserwowano natomiast dezorganizację warstwy ziarnistej i kolczystej naskórka. W obrębie górnych warstw naskórka u części pacjentów obecne były okrągłe komórki pagetoidalne (ang. *roundish pagetoid cell*), widoczne na przekrojach optycznych RCM jako pojedyncze, duże komórki o jasnej cytoplazmie i ciemnym, położonym ekscentrycznie jądrze komórkowym oraz jasne, dendrytyczne komórki pagetoidalne (ang. *dendritic pagetoid cells*) [13, 14]. W obrębie znamion melanocytowych Pellacani i wsp. [13] obserwowali w ponad 80% przypadków tzw. ostre obrysy brodawek skórnych (ang. *edged papillae*), a tylko w pojedynczych przypadkach widoczne były brodawki skórne o nieostrych obrysach (ang. *non-edged papillae*). Między brodawkami skórnymi obserwowali wówczas duże, jasne komórki [13]. Poniżej granicy skórno-naskórkowej w ponad połowie przypadków widoczne są gniazda złożone z melanocytów. W obrębie łagodnych znamion melanocytowych obserwuje się w przeważającej liczbie przypadków gniazda małej (oś długa < 250 μm) oraz średniej wielkości (oś długa od 250 μm do 500 μm) zbudowane z dużych wielobocznych komórek ściśle ze sobą połączonych, tzw. zbite gniazda melanocytów (ang. *dense nests*) [15, 16].

ZASTOSOWANIE REFLEKSYJNEJ MIKROSKOPII KONFOKALNEJ W DIAGNOSTYCE ZNAMIENTA SPITZ

Na przekrojach optycznych RCM cechą charakterystyczną znamienia Spitz są wyraźne granice oraz symetryczny kształt zmiany [17]. W 2009 roku Pellacani i wsp. stwierdzili w obrębie warstwy ziarnistej i kolczystej u około połowy pacjentów ze znamieniem Spitz wzór kocich łbów, rzadziej wzór plastra miodu, częściową lub całkowitą dezorganizację naskórka [18]. Autorzy uwidocznili także w obrębie naskórka w 45% przypadków pojedyncze dendrytyczne komórki pagetoidalne oraz w 25% przypadków okrągłe komórki pagetoidalne. W obrębie granicy skórno-naskórkowej można było stwierdzić zarówno nieostre, jak i ostre obrysy brodawek skórnych. U około 20% pacjentów zarysy brodawek skórnych nie zostały uwidocznione. W większości przypadków obserwowano gniazda melanocytów zarówno związane z warstwą podstawną, jak i zlokalizowane w skórze właściwej. Najczęściej były to zbite gniazda melanocytów, w pojedynczych przypadkach stwierdzano obecność

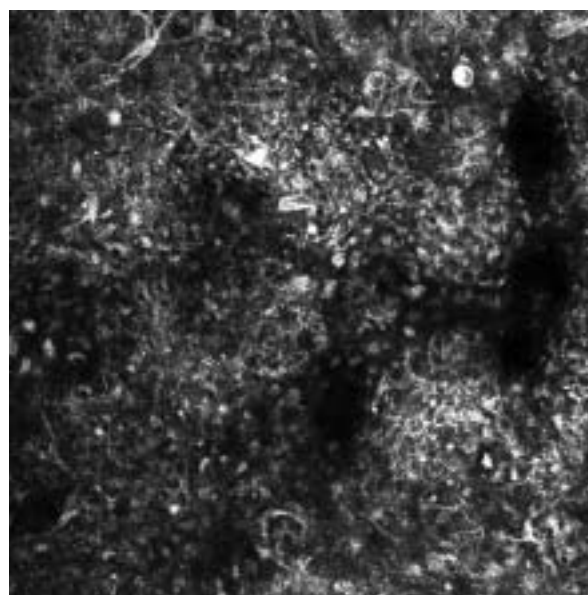
luźnych lub mózgokształtnych gniazd. Ponadto w około 90% przypadków uwidoczniono melanofagi w obrębie skóry właściwej. Najbardziej charakterystycznymi cechami, które pozwalają na odróżnienie znamienia Spitz od czerniaka złośliwego, są: wyraźne granice zmiany, gniazda melanocytów związane z warstwą podstawną oraz obecność melanofagów na poziomie warstwy brodawkowej skóry [18].

ZASTOSOWANIE REFLEKSYJNEJ MIKROSKOPII KONFOKALNEJ W DIAGNOSTYCE CZERNIAKA SKÓRY

Refleksyjna mikroskopia konfokalna jest obecnie istotnym badaniem uzupełniającym, które pozwala na bardzo wczesne rozpoznanie czerniaka oraz wykluczenie lub potwierdzenie czerniaka w przypadkach, kiedy obraz dermatoskopowy oraz wideo-dermatoskopowy jest niejednoznaczny [19, 20].

Czerniak *in situ* oraz czerniak szerzący się powierzchownie

W przekrojach optycznych RCM czerniaka *in situ* oraz czerniaka szerzącego się powierzchownie obserwowano u ponad 60% pacjentów zdeorganizowaną warstwę ziarnistą i kolczystą naskórka [13]. W ponad 12% przypadków uwidoczniono prawidłową budowę górnych warstw naskórka o wzorze plastra miodu lub kostki brukowej. Ponadto w obrębie powierzchniowych warstw naskórka uwidoczniono naciek z okrągłych oraz dendrytycznych komórek pagetoidalnych (ryc. 2.). Według Pellacaniego i wsp. [13] charakterystyczną cechą czerniaka jest obecność



Ryc. 2. Naciek z komórek pagetoidalnych w czerniaku skóry
Fig. 2. Pagetoid cells in cutaneous melanoma

trzech lub więcej komórek pagetoidalnych o średnicy powyżej 20 μm w obrębie pojedynczego przekroju optycznego. Rozproszony naciek oraz polimorfizm komórek pagetoidalnych były swoistym, ale mało czułym markerem złośliwości. W większości przypadków uwidoczniło umiarkowaną lub wyraźną atypię melanocytów warstwy podstawnej. Na granicy skórno-naskórkowej obserwowano nieostre obrysy brodawek skórnych, a bezpośrednio poniżej granicy uwidoczniło u ponad 1/3 pacjentów zbite gniazda melanocytów. Odpowiednio w 44,1%, 17,6% oraz 8,1% stwierdzono niehomogenne, luźne lub mózgokształtne gniazda melanocytów. W obrębie górnej warstwy skóry właściwej u ponad połowy pacjentów widoczne były duże komórki z wyraźnie widocznym jądrem [13].

W 2005 roku Pellacani i wsp. [21] wyodrębnili kryteria rozpoznania czerniaka na podstawie badania RCM. Wyróżniono kryteria duże, do których zalicza się nieostre obrysy brodawek skórnych, umiarkowaną lub znaczną atypię melanocytów warstwy podstawnej, oraz kryteria małe, takie jak obecność okrągłych komórek pagetoidalnych w górnych warstwach naskórka lub rozproszony naciek z komórek pagetoidalnych, mózgokształtne gniazda melanocytów, obecność pojedynczych melanocytów z widocznym jądrem w obrębie skóry właściwej. Wykazano, że stwierdzenie jednego kryterium dużego oraz jednego kryterium małego jest niezbędne do rozpoznania czerniaka na podstawie badania RCM [21].

Przeprowadzone w 2009 roku badania dotyczące swoistości i czułości RCM oraz dermatoskopii w ocenie czerniaka złośliwego wykazały, że RCM ma większą swoistość w diagnostyce czerniaka (68%, 95-procentowy przedział ufności 61,1–74,3) w porównaniu z dermatoskopią (32%, 95-procentowy przedział ufności 25,9–38,7), natomiast metoda ta charakteryzuje się porównywalną czułością w stosunku do dermatoskopii (91%, 95-procentowy przedział ufności 84,6–95,5 w przypadku RCM; 88%, 95-procentowy przedział ufności 80,7–92,6 w przypadku dermatoskopii) [22].

Czerniak guzkowy

W przekrojach optycznych u 70% pacjentów z czerniakiem guzkowym warstwa ziarnista i kolczysta składa się z wielobocznych komórek z widocznym czarnym jądrem oraz wyraźnymi jasnymi granicami, układającymi się w tzw. rozszerzony wzór plastra miodu (ang. *broadened honeycomb pattern*) [23]. W pozostałych przypadkach Segura i wsp. [23] obserwowali całkowitą dezorganizację górnych warstw naskórka. W większości przypadków w obrębie naskórka uwidoczniło tylko pojedyncze dendrytyczne komórki pagetoidalne. U ponad 80% pacjentów z czerniakiem guzkowym stwierdzono znaczną atypię melanocytów w obrębie warstwy podstawnej,

natomiast tylko w 10% przypadków widoczne były nieostre obrysy brodawek skórnych. U wszystkich pacjentów w obrębie warstwy brodawkowej obserwowano atypowe melanocyty. W górnej części skóry właściwej w 70% przypadków widoczne były również jasne komórki o nieregularnym kształcie oraz niewyraźnym zarysie brzegów, odpowiadające w badaniu histopatologicznym melanofagom. W warstwie siateczkowej skóry właściwej u 60% pacjentów stwierdzano niejednorodny oraz mózgokształtne gniazda melanocytów oraz u 90% pacjentów kręte, poszerzone naczynia krwionośne [23].

Czerniak wywodzący się z plamy soczewicowatej

W przekrojach optycznych RCM czerniaka wywodzącego się z plamy soczewicowatej obserwowano w obrębie warstwy ziarnistej i kolczystej częściową lub całkowitą utratę prawidłowej budowy naskórka oraz okrągłe lub dendrytyczne komórki pagetoidalne [24]. Wokół ujść jednostek włosowo-łojowych, a także w obrębie warstwy podstawnej stwierdzano różnokształtne atypowe melanocyty. W górnych warstwach skóry właściwej widoczne były również atypowe melanocyty, melanofagi oraz pogrubiałe wiązki kolagenu [24, 25]. Istnieją pojedyncze doniesienia dotyczące wykorzystania RCM w przedoperacyjnej ocenie marginesu zmiany, a także w monitorowaniu terapii miejscowej czerniaka wywodzącego się z plamy soczewicowatej [26].

Czerniak bezbarwnikowy

Refleksyjna mikroskopia konfokalna umożliwia wykrywanie melanocytów w obrębie zmian ocenianych w badaniu przedmiotowym jako zmiany bezbarwnikowe, ponieważ resztkowa melanina oraz melanosomy stanowią źródło kontrastu. Na przekrojach optycznych czerniaka bezbarwnikowego obserwowano całkowite zatarcie prawidłowej struktury naskórka oraz atypowe melanocyty widoczne jako jasne, okrągłe, owalne lub wydłużone komórki w obrębie górnych warstw naskórka [27]. Stwierdzono również zwiększoną liczbę melanocytów w obrębie warstwy podstawnej, a także obecność jasnych, ziarnistych struktur o wielkości poniżej 1 μm . W większości przypadków wzdłuż granicy skórno-naskórkowej melanocyty były asymetrycznie rozproszone, rzadziej tworzyły układ gniazd [27].

ZASTOSOWANIE REFLEKSYJNEJ MIKROSKOPII KONFOKALNEJ W DIAGNOSTYCE RAKA PODSTAWNOKOMÓRKOWEGO

W 2004 roku na podstawie retrospektywnych, wielośrodkowych badań Nori i wsp. [28] stworzyli kryteria rozpoznania raka podstawnokomórkowego

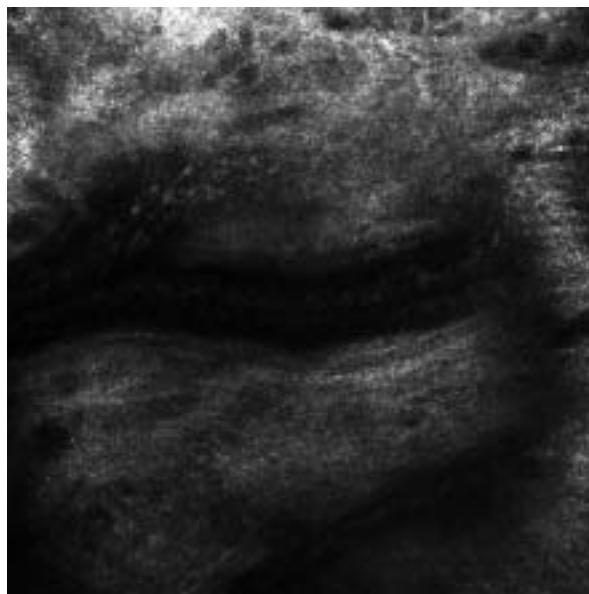
na podstawie przekrojów optycznych RCM oraz opisał jego najbardziej charakterystyczne cechy: 1) pleomorfizm naskórka, 2) obecność wydłużonego, monomorficznego jądra w komórkach warstwy podstawnej, 3) orientację jąder komórkowych wzdłuż tej samej osi, 4) nasilony naciek zapalny oraz 5) zwiększone unaczynienie w obrębie górnych warstw skóry właściwej (ryc. 3). Obecność czterech powyższych kryteriów umożliwia rozpoznanie raka podstawnokomórkowego ze swoistością wynoszącą 95,7% oraz czułością 82,9%, natomiast obecność wszystkich pięciu cech powoduje zwiększenie swoistości do 100%, natomiast zmniejszenie czułości do 48,8% [28]. Najbardziej czułym (91,6%) i swoistym (97,0%) kryterium rozpoznania raka podstawnokomórkowego jest orientacja jąder komórkowych w jednej linii.

W przekrojach optycznych RCM raka podstawnokomórkowego barwnikowego, poza wyżej wymienionymi cechami, można stwierdzić obecność melanofagów, które mają postać dużych, owalnych, jasnych komórek o rozmytych brzegach zlokalizowanych w obrębie lub między skupiskami komórek nowotworowych [29, 30]. Widoczne są ponadto w obrębie gniazd komórek nowotworowych komórki dendrytyczne odpowiadające melanocytom. Także w naskórku obserwowano komórki o dendrytycznym kształcie, które odpowiadały komórkom Langerhansa w badaniu histopatologicznym [31].

Refleksyjna mikroskopia konfokalna wykorzystywana jest również w celu wyznaczania granicy linii cięcia chirurgicznego podczas zabiegów usunięcia raka podstawnokomórkowego metodą chirurgii Mohsa [32, 33]. Metoda ta umożliwia ponadto monitorowanie nieinwazyjnego oraz inwazyjnego leczenia raka podstawnokomórkowego, bez konieczności wykonywania badania histopatologicznego [34].

ZASTOSOWANIE REFLEKSYJNEJ MIKROSKOPII KONFOKALNEJ W DIAGNOSTYCE RAKA ROGOWACENIA SŁONECZNEGO

W obrębie zmian o charakterze rogowacenia słonecznego w przekrojach optycznych uzyskanych metodą RCM uwidoczniono następujące charakterystyczne cechy: przerwanie ciągłości warstwy rogowej, hiperkeratozę oraz parakeratozę. Obserwowano także zatarcie prawidłowej budowy poszczególnych warstw naskórka, pleomorfizm jego komórek, egzocytozę oraz spongiozę [35]. W części przypadków stwierdzano ponadto ogniska dyskeratozy, widoczne jako jasne obszary zlokalizowane w głębszych warstwach naskórka [36]. W górnych warstwach skóry właściwej obserwowano elastozę słoneczną oraz poszerzone naczynia krwionośne [35, 37, 38].



Ryc. 3. Poszerzone naczynia krwionośne w raku podstawnokomórkowym

Fig. 3. Dilated blood vessels in basal cell carcinoma

Wśród powyższych cech parametrami charakteryzującymi się największą czułością i specyficznością były pleomorfizm komórek warstwy ziarnistej i kolczystej oraz bezład w obrębie warstwy kolczystej [37].

Refleksyjną mikroskopię konfokalną stosuje się również do oceny skóry wokół ognisk rogowacenia słonecznego w celu wykluczenia obecności subklinicznych zmian w obrębie skóry klinicznie niezmięnionej (teoria pola kanceracji) [39]. Istnieją wstępne doniesienia dotyczące zastosowania RCM w monitorowaniu zarówno nieinwazyjnych, jak i inwazyjnych metod leczenia rogowacenia słonecznego [40, 41].

ZASTOSOWANIE REFLEKSYJNEJ MIKROSKOPII KONFOKALNEJ W DIAGNOSTYCE RAKA KOLCZYSTOKOMÓRKOWEGO

W obrębie zmian o charakterze raka kolczystokomórkowego w górnych warstwach naskórka widoczna jest dezorganizacja jego prawidłowej architektury lub atypowy wzór plastra miodu. Na poziomie warstwy kolczystej w 65% przypadkach stwierdza się okrągłe komórki z jądrem komórkowym odpowiadające atypowym keratynocytom lub komórkom dyskeratocytom, natomiast w górnej części skóry właściwej u 90% pacjentów obserwuje się poprzecznie ułożone naczynia krwionośne [37].

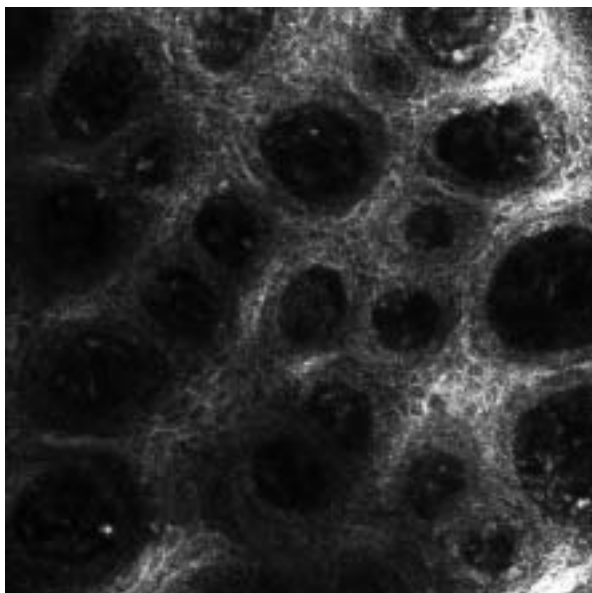
Za pomocą refleksyjnej mikroskopii konfokalnej ocenia się również *ex vivo* margines usuniętej zmiany [42].

ZASTOSOWANIE REFLEKSYJNEJ MIKROSKOPII KONFOKALNEJ W DIAGNOSTYCE ŁUSZCZYCY

Badanie metodą RCM może potwierdzić kliniczne rozpoznanie łuszczycy [8, 43]. W obrębie zmian skórnych o charakterze łuszczycy plackowatej na przekrojach optycznych widoczna była parakeratoza (ciemne punkty wewnątrz korneocytów warstwy rogowej), mikroropnie Munro (zgrupowanie jasnych komórek o średnicy od 6 μm do 30 μm w obrębie warstwy rogowej) oraz redukcja grubości lub brak warstwy ziarnistej naskórka [8, 43]. Kolejną charakterystyczną cechą łuszczycy widoczną w obrazach RCM jest akantozą. Grubość naskórka u pacjentów z łuszczycą wynosi od 75 μm do 300 μm , natomiast w obrębie zdrowej skóry od 60 μm do 90 μm . Obserwowano także zwiększone średnice przekrojów brodawek skórnych (> 100 μm) w porównaniu ze średnicami u osób zdrowych (80 μm). Na przekrojach optycznych łuszczycowych zmian skórnych stwierdzano ponadto poszerzone naczynia krwionośne w obrębie brodawek skórnych oraz naciek z komórek zapalnych w obrębie warstwy siateczkowatej skóry właściwej (ryc. 4.) [8, 43].

ZASTOSOWANIE REFLEKSYJNEJ MIKROSKOPII KONFOKALNEJ W DIAGNOSTYCE CHOROÓB INFEKCYJNYCH

Refleksyjna mikroskopia konfokalna znalazła również zastosowanie w diagnostyce chorób infekcyjnych. Badanie pozwala na identyfikację strzępek



Ryc. 4. Hiperplazja naskórka, zwiększenie średnicy brodawek skórnych, nacieki zapalne w brodawkach skórnych w blaszce łuszczycowej

Fig. 4. Epidermal hyperplasia, increased diameter of dermal papillae, inflammatory infiltrates in dermal papillae in plaque psoriasis

grzybni widocznych na przekrojach optycznych jako sieć długich, ciemnych, miejscami rozgałęzionych, nitkowatych struktur [9].

Umożliwia również potwierdzenie obecności świerzbowca, który jest widoczny w postaci owalnej struktury z dwiema parami wypustek. Można ponadto za pomocą tej metody uwidocznnić tunele wydrążone przez samice świerzbowca ludzkiego w obrębie warstwy rogowej naskórka [44].

W przekrojach optycznych RCM można też potwierdzić infekcję wywołaną wirusem opryszczki zwykłej. W obrębie naskórka widoczne są polimorficzne, duże, okrągłe komórki o ciemnej cytoplazmie odpowiadające keratynocytom ze zwyrodnieniem balonowatym oraz wielojądrowe komórki olbrzymie [45].

ZASTOSOWANIE REFLEKSYJNEJ MIKROSKOPII KONFOKALNEJ W DIAGNOSTYCE POSTACI OGNISKOWEJ TOCZNIA RUMIENIOWATEGO

W obrębie zmian skórnych pacjentów z postacią ogniskową tocznia rumieniowatego (ang. *discoid lupus erythematosus* - DLE) obserwowano dezorganizację warstwy kolczystej naskórka oraz poszerzone przestrzenie międzykomórkowe między keratynocytami, co odpowiadało spongiozie w badaniu histopatologicznym [46, 47]. W części przypadków widoczne były również w obrębie warstwy kolczystej jasne, okrągłe i wieloboczne komórki o rozmytych konturach odpowiadające nekrotycznym keratynocytom. Ardigò i wsp. [47] obserwowali także zatarcie prawidłowej struktury granicy skórno-naskórkowej, a także częściową lub całkowitą obliterację brodawek skórnych przez komórki zapalne. Wokół mieszków, a także w części przypadków wokół naczyń krwionośnych widoczny był ponadto naciek zapalny w obrębie skóry właściwej. W warstwie brodawkowatej skóry obserwowano poszerzone naczynia krwionośne oraz wiązki sklerotycznego kolagenu [47].

ZASTOSOWANIE REFLEKSYJNEJ MIKROSKOPII KONFOKALNEJ W DIAGNOSTYCE CHOROBY DARIERA

W chorobie Dariera w przekrojach optycznych RCM hiperkeratotycznych grudek uwidoczniono ciała okrągłe o średnicy od 20 μm do 25 μm zlokalizowane około 16 μm do 50 μm poniżej warstwy rogowej [48], natomiast w warstwie rogowej widoczny był inny typ dyskeratotycznych komórek, tzw. ziarna Dariera. Komórki te miały owalny lub wydłużony kształt, mniejszą średnicę niż ciała okrągłe (od 7 μm do 10 μm) oraz w części z nich obserwowano pykno-

tyczne jądro komórkowe. Stwierdzano ponadto zanik warstwy ziarnistej w miejscach, gdzie ponad warstwą podstawną występowała akantoliza. W warstwie brodawkowatej skóry właściwej widoczne były pogrubiałe włókna kolagenu [48].

ZASTOSOWANIE REFLEKSYJNEJ MIKROSKOPII KONFOKALNEJ W DIAGNOSTYCE PĘCHERZYCY ZWYKŁEJ I LIŚCIASTEJ

Wyniki badań własnych [49, 50] wskazują, że u 52% pacjentów z pęcherzycą zwykłą oraz u 100% pacjentów z pęcherzycą liściastą stwierdza się w obrębie zmian skórnych dezorganizację warstwy rogowej. U 71% osób z pęcherzycą liściastą widoczne są pęcherze z komórkami akantolitycznymi na poziomie warstwy ziarnistej, natomiast u pacjentów z pęcherzycą zwykłą w 63% przypadków odnotowuje się obecność akantolitycznych pęcherzy zlokalizowanych ponadpodstawnie (ryc. 5.). Często obrazowi temu towarzyszy naciek limfocytarny i zwiększone unaczynienie z widocznym szybkim przepływem krwi przez naczynia brodawek skórnych w obrębie i w otoczeniu zmian skórnych pacjentów z pęcherzycą liściastą oraz pęcherzycą zwykłą. Wydaje się, że najistotniejszą wartością RCM w badaniu wstępnym pacjentów z wykwitami pęcherzowymi jest możliwość różnicowania poziomu, na jakim dochodzi do oddzielania się naskórka, oraz nieinwazyjna wizualizacja komórek akantolitycznych.

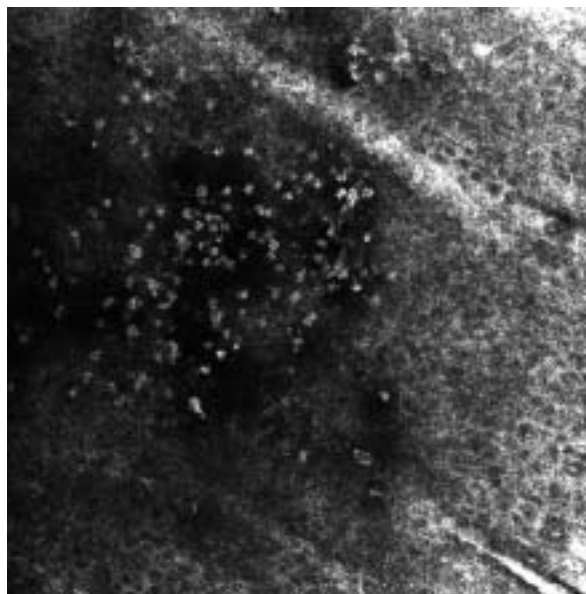
Podobnie do naszych badań Angelova-Fisher i wsp. [51] obserwowali w obrębie zmian pęcherzycy liściastej obecność śródskórnych pęcherzy zlokalizowanych w warstwie ziarnistej. Warstwa kolczysta oraz podstawna nie wykazywały natomiast żadnych zmian patologicznych. Nie uwidoczniłono także nacieku z komórek zapalnych [51].

ZASTOSOWANIE REFLEKSYJNEJ MIKROSKOPII KONFOKALNEJ W DIAGNOSTYCE ŁYSIENIA

Metoda RCM znajduje dotychczas bardzo ograniczone zastosowanie w diagnostyce łysienia, gdyż nie wykazano jej przewagi nad trichoskopią. Może być jednak przydatna do obrazowania genetycznie uwarunkowanych nieprawidłowości struktury włosów [52].

PODSUMOWANIE

Wprowadzenie metody RCM stanowiło kolejny przełom w szybko rozwijającej się dziedzinie diagnostyki chorób skóry. Metodę tę najszerzej sto-



Ryc. 5. Pęcherz śródskórny z komórkami akantolitycznymi w pęcherzycy zwykłej

Fig. 5. Acantholytic cells in intra-epidermal blister in pemphigus vulgaris

suje się w diagnostyce różnicowej nietypowych i bardzo wczesnych lub nieinwazyjnych czerniaków, jednak jej zastosowanie w diagnostyce dermatologicznej może być znacznie szersze. Obecnie jednak nie ma badań oceniających czułość i swoistość RCM *in vivo* w większości chorób skóry i dotyczących oceny jej ewentualnej wyższości nad innymi metodami diagnostycznymi.

Piśmiennictwo

1. González S., Gilaberte-Calzada Y.: In vivo reflectance-mode confocal microscopy in clinical dermatology and cosmetology. *Int J Cosmet Sci* 2008, 30, 1-17.
2. Branzan A.L., Landthaler M., Szeimies R.M.: In vivo confocal scanning laser microscopy in dermatology. *Lasers Med Sci* 2007, 22, 73-82.
3. Hofmann-Wellenhof R., Wurm E.M., Ahlgrim-Siess V., Richtig E., Koller S., Smolle J. i inni: Reflectance confocal microscopy-state-of-art and research overview. *Semin Cutan Med Surg* 2009, 28, 172-179.
4. Ulrich M., Stockfleth E., Roewert-Huber J., Astner S.: Noninvasive diagnostic tools for nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 2007, 157 suppl. 2, 56-58.
5. Ahlgrim-Siess V., Horn M., Koller S., Ludwig R., Gerger A., Hofmann-Wellenhof R.: Monitoring efficacy of cryotherapy for superficial basal cell carcinomas with in vivo reflectance confocal microscopy: a preliminary study. *J Dermatol Sci* 2009, 53, 60-64.
6. González S.: Clinical applications of reflectance confocal microscopy in the management of cutaneous tumors. *Actas Dermosifiliogr* 2008, 99, 528-531.
7. Gareau D.S., Patel Y.G., Li Y., Aranda I., Halpern A.C., Nehal K.S. i inni: Confocal mosaicing microscopy in skin excisions: a demonstration of rapid surgical pathology. *J Microsc* 2009, 233, 149-159.
8. Ardigo M., Cota C., Berardesca E., González S.: Concordance between in vivo reflectance confocal microscopy and

- histology in the evaluation of plaque psoriasis. *J EADV* 2009, 23, 660-667.
9. **Hongcharu W., Dwyer P., González S., Anderson R.R.:** Confirmation of onychomycosis by confocal microscopy. *J Am Acad Dermatol* 2000, 42, 214-216.
 10. **Rajadhyaksha M., González S., Zavislan J.M., Anderson R.R., Webb R.H.:** In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin II: advances in instrumentation and comparison to histology. *J Invest Dermatol* 1999, 113, 101-111.
 11. **Busam K.J., Charles C., Lee G., Halpern A.C.:** Morphologic features of melanocytes, pigmented keratinocytes, and melanophages by in vivo confocal scanning laser microscopy. *Mod Pathol* 2001, 14, 862-868.
 12. **Huzaira M., Rius F., Rajadhyaksha M., Anderson R.R., González S.:** Topographic variations in normal skin, as viewed by in vivo reflectance confocal microscopy. *J Invest Dermatol* 2001, 116, 846-852.
 13. **Pellacani G., Guitera P., Longo C., Avramidis M., Seidenari S., Menzies S.:** The impact of in vivo reflectance confocal microscopy for the diagnostic accuracy of melanoma and equivocal melanocytic lesions. *J Invest Dermatol* 2007, 127, 2759-2765.
 14. **Pellacani G., Cesinaro A.M., Seidenari S.:** Reflectance-mode confocal microscopy for the in vivo characterization of pagetoid melanocytosis in melanomas and nevi. *J Invest Dermatol* 2005, 125, 532-537.
 15. **Pellacani G., Cesinaro A.M., Seidenari S.:** In vivo confocal reflectance microscopy for the characterization of melanocytic nests and correlation with dermoscopy and histology. *Br J Dermatol* 2005, 152, 384-386.
 16. **Pellacani G., Cesinaro A.M., Seidenari S.:** In vivo assessment of melanocytic nests in nevi and melanomas by reflectance confocal microscopy. *Mod Pathol* 2005, 18, 469-474.
 17. **Pellacani G., Cesinaro A.M., Grana C., Seidenari S.:** In vivo confocal scanning laser microscopy of pigmented Spitz nevi: comparison of in vivo confocal images with dermoscopy and routine histopathology. *J Am Acad Dermatol* 2004, 51, 371-376.
 18. **Pellacani G., Longo C., Ferrara G., Cesinaro A.M., Bassoli S., Guitera P. i inni:** Spitz nevi: in vivo confocal microscopic features, dermatoscopic aspects, histopathologic correlates, and diagnostic significance. *J Am Acad Dermatol* 2009, 60, 236-247.
 19. **Segura S., Puig S., Carrera C., Palou J., Malveyh J.:** Development of a two-step method for the diagnosis of melanoma by reflectance confocal microscopy. *J Am Acad Dermatol* 2009, 61, 216-229.
 20. **Scope A., Zalaudek I., Ferrara G., Argenziano G., Braun R.P., Marghoob A.A.:** Remodeling of the dermoepidermal junction in superficial spreading melanoma: insights gained from correlation of dermoscopy, reflectance confocal microscopy, and histopathologic analysis. *Arch Dermatol* 2008, 144, 1644-1649.
 21. **Pellacani G., Cesinaro A.M., Seidenari S.:** Reflectance-mode confocal microscopy of pigmented skin lesions – improvement in melanoma diagnostic specificity. *J Am Acad Dermatol* 2005, 53, 979-985.
 22. **Guitera P., Pellacani G., Longo C., Seidenari S., Avramidis M., Menzies S.W.:** In vivo reflectance confocal microscopy enhances secondary evaluation of melanocytic lesions. *J Invest Dermatol* 2009, 129, 131-138.
 23. **Segura S., Pellacani G., Puig S., Longo C., Bassoli S., Guitera P. i inni:** In vivo microscopic features of nodular melanomas: dermoscopy, confocal microscopy, and histopathologic correlates. *Arch Dermatol* 2008, 144, 1311-1320.
 24. **Ahlgrimm-Siess V., Massone C., Scope A., Fink-Puches R., Richtig E., Wolf I.H. i inni:** Reflectance confocal microscopy of facial lentigo maligna and lentigo maligna melanoma: a preliminary study. *Br J Dermatol* 2009, 161, 1307-1316.
 25. **Guitera P., Pellacani G., Crotty K.A., Scolyer R.A., Li L.X., Bassoli S. i inni:** The impact of in vivo reflectance confocal microscopy on the diagnostic accuracy of lentigo maligna and equivocal pigmented and nonpigmented macules of the face. *J Invest Dermatol* 2010, 130, 2080-2091.
 26. **Nadiminti H., Scope A., Marghoob A.A., Busam K., Nehal K.S.:** Use of reflectance confocal microscopy to monitor response of lentigo maligna to nonsurgical treatment. *Dermatol Surg* 2009, 36, 177-184.
 27. **Busam K.J., Hester K., Charles C., Sachs D.L., Antonescu C.R., Gonzalez S. i inni:** Detection of clinically amelanotic malignant melanoma and assessment of its margins by in vivo confocal scanning laser microscopy. *Arch Dermatol* 2001, 137, 923-929.
 28. **Nori S., Rius-Díaz F., Cuevas J., Goldgeier M., Jaen P., Torres A. i inni:** Sensitivity and specificity of reflectance-mode confocal microscopy for in vivo diagnosis of basal cell carcinoma: a multicenter study. *J Am Acad Dermatol* 2004, 51, 923-930.
 29. **Agero A.L., Busam K.J., Benvenuto-Andrade C., Scope A., Gill M., Marghoob A.A. i inni:** Reflectance confocal microscopy of pigmented basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 2006, 54, 638-643.
 30. **Charles C.A., Marghoob A.A., Busam K.J., Clark-Loeser L., Halpern A.C.:** Melanoma or pigmented basal cell carcinoma: a clinical-pathologic correlation with dermoscopy, in vivo confocal scanning laser microscopy, and routine histology. *Skin Res Technol* 2002, 8, 282-287.
 31. **Segura S., Puig S., Carrera C., Palou J., Malveyh J.:** Dendritic cells in pigmented basal cell carcinoma: a relevant finding by reflectance-mode confocal microscopy. *Arch Dermatol* 2007, 143, 883-886.
 32. **Gareau D.S., Li Y., Huang B., Eastman Z., Nehal K.S., Rajadhyaksha M.:** Confocal mosaicing microscopy in Mohs skin excisions: feasibility of rapid surgical pathology. *J Biomed Opt* 2008, 13, 054001.
 33. **Chung V.Q., Dwyer P.J., Nehal K.S., Rajadhyaksha M., Menaker G.M., Charles C. i inni:** Use of ex vivo confocal scanning laser microscopy during Mohs surgery for non-melanoma skin cancers. *Dermatol Surg* 2004, 30, 1470-1478.
 34. **Marra D.E., Torres A., Schanbacher C.F., Gonzalez S.:** Detection of residual basal cell carcinoma by in vivo confocal microscopy. *Dermatol Surg* 2005, 31, 538-541.
 35. **Ulrich M., Maltusch A., Rius-Díaz F., Röwert-Huber J., González S., Sterry W. i inni:** Clinical applicability of in vivo reflectance confocal microscopy for the diagnosis of actinic keratoses. *Dermatol Surg* 2008, 34, 610-619.
 36. **Horn M., Gerger A., Ahlgrimm-Siess V., Weger W., Koller S., Kerl H. i inni:** Discrimination of actinic keratoses from normal skin with reflectance mode confocal microscopy. *Dermatol Surg* 2008, 34, 620-625.
 37. **Rishpon A., Kim N., Scope A., Porges L., Oliviero M.C., Braun R.P. i inni:** Reflectance confocal microscopy criteria for squamous cell carcinomas and actinic keratoses. *Arch Dermatol* 2009, 145, 766-772.
 38. **Agasshi D., Anderson R.R., Gonzalez S.:** Confocal, laser microscopic imaging of actinic keratoses in vivo: a preliminary report. *J Am Acad Dermatol* 2000, 43, 42-48.
 39. **Ulrich M., Maltusch A., Röwert-Huber J., González S., Sterry W., Stockfleth E., Astner S.:** Actinic keratoses: non-invasive diagnosis for field cancerisation. *Br J Dermatol* 2007, 156 suppl. 3, 7-13.
 40. **Ulrich M., Krueger-Corcoran D., Roewert-Huber J., Sterry W., Stockfleth E., Astner S.:** Reflectance confocal microscopy

- for noninvasive monitoring of therapy and detection of subclinical actinic keratoses. *Dermatology* 2010, 220, 15-24.
41. **Richtig E., Ahlgrim-Siess V., Koller S., Gerger A., Horn M., Smolle J. i inni:** Follow-up of actinic keratoses after shave biopsy by in-vivo reflectance confocal microscopy – a pilot study. *J EADV* 2009, 24, 293-298.
 42. **Horn M., Gerger A., Koller S., Weger W., Langsenlehner U., Krippel P. i inni:** The use of confocal laser-scanning microscopy in microsurgery for invasive squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2007, 156, 81-84.
 43. **Gonzalez S., Rajakhyaksha M., Rubinstein G., Anderson R.R.:** Characterization of psoriasis in vivo by reflectance confocal microscopy. *J Med* 1999, 30, 337-356.
 44. **Longo C., Bassoli S., Monari P., Seidenari S., Pellacani G.:** Reflectance-mode confocal microscopy for the in vivo detection of *Sarcoptes scabiei*. *Arch Dermatol* 2005, 141, 1336.
 45. **Goldgeier M., Alessi C., Muhlbauer J.E.:** Immediate non-invasive diagnosis of herpesvirus by confocal scanning laser microscopy. *J Am Acad Dermatol* 2002, 46, 783-785.
 46. **Koller S., Gerger A., Ahlgrim-Siess V., Weger W., Smolle J., Hofmann-Wellenhof R.:** In vivo reflectance confocal microscopy of erythematosquamous skin diseases. *Exp Dermatol* 2009, 18, 536-540.
 47. **Ardigo M., Maliszewski I., Cota C., Scope A., Sacerdoti G., Gonzalez S. i inni:** Preliminary evaluation of in vivo reflectance confocal microscopy features of discoid lupus erythematosus. *Br J Dermatol* 2007, 156, 1196-1203.
 48. **González S., Rubinstein G., Mordovtseva V., Rajadhyaksha M., Anderson R.R.:** In vivo abnormal keratinization in Darier-White's disease as viewed by real-time confocal imaging. *J Cutan Pathol* 1999, 26, 504-508.
 49. **Olszewska M., Rudnicka L., Kurzeja M.:** Usefulness of new skin imaging techniques as accessory tools in diagnosing pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *J Am Acad Dermatol* 2010, 62, AB78.
 50. **Kurzeja M., Warszawik O., Rudnicka L., Olszewska M.:** Reflectance confocal microscopy in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *Skin Res Technol* 2009 (wysłane do druku).
 51. **Angelova-Fisher I., Pfeuti T., Zillikens D., Roze C.:** In vivo laser scanning microscopy for non-invasive diagnosis of pemphigus foliaceus. *Sin Res Technol* 2009, 15, 40-44.
 52. **Rudnicka L., Olszewska M., Rakowska A.:** In vivo reflectance confocal microscopy: usefulness for diagnosing hair diseases. *J Dermatol Case Rep* 2008, 4, 55-59.

Otrzymano: 13 VII 2010 r.

Zaakceptowano: 24 VII 2010 r.