

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Lékařská fakulta
Ústav lékařské biofyziky

VYUŽITÍ LASEROVÉHO ZÁŘENÍ V DIAGNOSTICE
Disertační práce

Doktorand: MUDr. Jiří Štětinský

Školitel: Doc. MUDr. Alois Krobot, Ph. D.

Červen 2015

Využití laserového záření v diagnostice

Poděkování:

Autor práce děkuje zaměstnavateli, popáleninovému centru Fakultní nemocnice Ostrava, za možnost provedení studie a poskytnutí materiální podpory. Dále děkuje Ústavu lékařské biofyziky Univerzity Palackého v Olomouci za odborné vedení při realizaci studie, zejména děkuje Prof. RNDr. Haně Kolářové, CSc. Zvláštní poděkování patří také MUDr. Janě Zapletalové, Ph. D. za pomoc při statistickém zpracování výsledků studie.

Klinická studie prezentovaná v této práci byla provedena na Popáleninovém centru FN Ostrava od ledna 2010 do června 2014. Na základě získaných výsledků byla autorem samostatně vypracována disertační práce. Všechny použité literární zdroje jsou řádně uvedeny.

MUDr. Jiří Štětinský

Seznam použitých označení a zkratek

CLSM	Confocal laser scanning microscopy
CMOS	Complementary metal-oxide semiconductor
DE	Dermoepidermální (transplantace)
IF-interferon	Interferon alfa
LASCA	Laser Speckle Contrast Analysis
LASER	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LDF	Laser Doppler Flowmetry
LDC	Laser Doppler Camera
LDI	Laser Doppler Imaging
LDPI	Laser Doppler Perfusion Imaging
NPD	Nepolarizovaný dermoskop
PBD	Postburn day
PD	Polarizovaný dermoskop
PTD	Posttraumatic day
PU	Perfusion unit
ROI	Region of interest
RSD	Reflexní sympatická blokáda
SD in	Standard deviation inside
SD out	Standard deviation outside
TBSA	Total body surface area
UV-B	Ultraviolet light B
VEGF	Vessel endothelial growth factor

1.	Úvod.....	6
2.	Teoretická východiska.....	7
2.1	Laser, Dopplerův jev, interakce s tkání, cílová oblast.....	7
2.2	Modality Laserdopplerometrie (LDI, LDF, LDC).....	9
2.3	Využití metody Laser Doppler Imaging (LDI) v klinické praxi.....	12
2.3.1	Interní obory a experimentální medicína.....	12
2.3.2	Chirurgické obory.....	14
2.3.3	Popáleninová medicína a laserdopplerometrie.....	15
2.3.3.1	Anatomické a fyziologické poznámky.....	15
2.3.3.2	Stupně popálení a patofyziologie.....	17
2.3.3.3	Operační léčba popálenin, časná nekrektomie.....	18
2.3.3.4	Dosavadní poznatky z LDI diagnostiky hloubky popálení.....	19
2.3.4	Maligní melanom a laserdopplerometrie	21
2.3.4.1	Etiopatogeneze, epidemiologie	21
2.3.4.2	Histopatologie, Breslow, Clark, stádia melanomu.....	22
2.3.4.3	Operační léčba maligního melanomu	23
2.3.4.4	Vyšetřovací metody.....	23
2.3.4.5	Dosavadní poznatky LDI diagnostiky pigmentových lézí.....	25
3.	Cíle.....	26
3.1	LDI diagnostika hloubky popálení, monitorace vývoje ranné perfuze.....	26
3.2	LDI diagnostika maligního melanomu	27
4.	Materiál a metodika.....	27
4.1.	Diagnostika hloubky popálení.....	27
4.1.1	Inkluzní, exkluzní kriteria.....	28
4.1.2	Soubor pacientů.....	28
4.1.3	Rány, časové intervaly	29
4.1.4	Průběh vyšetření, kategorizace pacientů.....	30
4.1.5	Instrumentárium.....	31
4.1.6	Analýza dat.....	32
4.2	LDI diagnostika maligního melanomu.....	32
4.2.1	Soubor pacientů.....	32
4.2.2	Histologické vyšetření.....	33
4.2.3	LDI vyšetření.....	34
4.2.4	Analýza dat.....	34
5.	Výsledky.....	35
5.1	LDI diagnostika hloubky popálení.....	35
5.2	LDI detekce maligního melanomu.....	44

6.	Diskuse.....	62
6.1	Diagnostika hloubky popálení	62
6.2	Diagnostika maligního melanomu.....	66
7.	Závěr.....	69
8.	Přehled literatury.....	70
9.	Souhrn.....	78
10.	Publikace autora disertační práce.....	80

1. Úvod

Správná diagnóza má zásadní podíl na průběhu léčby pacienta, její stanovení vede k zahájení adekvátního terapeutického postupu. Subjektivní klinická diagnóza či diferenciální diagnostická rozvaha, založená na fyzikálním vyšetření, je velmi důležitá v ambulanci praktických lékařů, kteří nasměrují pacienty na specializovaná vyšetření, soustředěná do center a klinik. Na těchto pracovištích je, aby diagnóza byla určena co nejpřesněji. Toho lze dosáhnout pouze za použití objektivních metod. Technologický pokrok jde „rukou v ruce“ také s vývojem diagnostických metod. Jedním s průlomových objevů minulého století je vynález laseru. Teoreticky byl princip laseru popsán již v roce 1917 Albertem Einsteinem, ale sestrojen byl až Theodorem Maimanem v r.1960, jednalo se o rubínový pulsní laser [1]. Laser pronikl do lékařství jak v oblasti terapeutické, tak diagnostické. Oblastí zájmu této práce bylo využití laserů právě v oblasti diagnostické, a to především v kombinaci s Dopplerovým jevem při analýze frekvenčního posunu paprsků laserového záření, po interakci s vyšetřovanou oblastí. Jedná se o tzv. laserovou dopplerometrii, zkráceně laserdopplerometrii.

Předkládaná práce se zaměřila na 2 nozologické jednotky, diagnostiku hloubky popálení a diagnostiku maligního melanomu pomocí laserdopplerometrie. Práce byla vypracována na základě podnětů z klinické praxe na popáleninovém centru a na základě hledání objektivní neinvazivní dobře reprodukovatelné a finančně dostupné diagnostické metody ke stanovení hloubky popálení a diagnózy maligního melanomu. Pro určení správného terapeutického plánu u pacientů po termickém traumatu je nezbytné co nejčasnější správné zhodnocení hloubky popálení. Klinická diagnostika, založená na vzhledu, barvě, kapilárním návratu a citlivosti rány je pouze subjektivní metoda, chybná až ve 35 % případů, důsledkem čehož je řetězec negativních dopadů [2]. Jsou to: špatné načasování operace, prodloužení hojení rány a tím i hospitalizace, jizevnaté komplikace, sekundární rozpad jizev a negativní vliv na ekonomiku pracoviště [3, 4]. Laserdopplerometrie poskytuje možnost objektivního hodnocení kapilárního prokrvení, které úzce souvisí s hloubkou popálení, resp. délkou hojení rány [5]. Některé práce uvádějí přesnost metody při diagnóze hloubky popálení až 97 % [6, 7, 8, 9], sledované parametry, podmínky měření a doporučení pro praxi se však liší a výsledky se omezují jen na období do 5. poúrazového dne. Předkládaná práce monitoruje vývoj ranné perfuze během 9 poúrazových dnů a zkoumá schopnost metody predikovat průběh hojení v různých časových intervalech.

Druhá část této práce byla motivována stále početnější skupinou pacientů, kteří jsou léčeni v rámci popáleninového centra. Jsou to pacienti s pigmentovými kožními lézemi, benigními či maligními, v různém stádiu onemocnění. Nemocní zde podstupují chirurgickou léčbu, tj. odstranění ložiska a v indikovaných případech, tj. vertikální šíře tumoru nad 1 mm dle Breslowa, také biopsii sentinelové (tzv. strážné) uzliny. Radikalitu operace, tj. šíři bezpečnostního lemu a event. extirpaci sentinelové uzliny (za účelem histologického vyšetření), určuje předem dermatolog na základě klinického vyšetření a také vyšetření dermatoskopem, který však šíři tumoru nepojme. Dle dostupných zdrojů je správná diagnóza maligního melanomu s použitím dermatoskopu stanovena v 80 % případů, a to i v rukou zkušeného dermatologa, s nedostatkem klinických zkušeností tato hodnota klesá až k 60 % [10]. Nesprávná diagnóza může mít za následek nutnost reoperace, horší variantou je progrese stádia onemocnění a vyšší mortalita. V letech 2012 - 2015 jsme zaznamenali 128 případů nutných reoperací (radikálních reexcizí) pro nepřesnou diagnózu melanomu, u 25 % melanomů s šíří 1 mm a více dle Breslowa nebyla primárně dermatologem indikována biopsie sentinelové uzliny, z důvodu poddiagnostikování stádia. Schopnost kvantifikovat kapilární perfuzi pomocí metody Laser Doppler Imaging (LDI), teorie maligní neovaskularizace [11, 12, 13, 14] a rozdílné výsledky odborných prací zabývajících se LDI diagnostikou melanomu, nás vedly k ověření schopnosti laserdopplerometrie jednak zachytit maligní pigmentovou lézi, ale také rozpoznat histopatologické stádium a indikovat tak pacienta k biopsii sentinelové uzliny.

Kromě diagnostiky hloubky popálení a maligního melanomu zde budou zmíněny také ostatní oblasti využití laserové dopplerometrie v diagnostice.

2. Teoretická východiska

2.1 Laser, Dopplerův jev, interakce s tkání, cílová oblast

Laserová dopplerometrie (zkáceně laserdopplerometrie) nachází v klinické diagnostice a také v experimentech široké využití. Využívá specifických vlastností laserového záření v optickém nebo blízkém infračerveném pásmu spektra pro kvantifikaci míry pohybu či průtoku v pod povrchových strukturách pomocí Dopplerova jevu. Hlavní oblastí využití laserdopplerometrie je stanovování průtoku (perfuze) krve superficiálními oblastmi různých tkání prostřednictvím vyšetření mikrocirkulace, kapilár, venul, arteriol a také A-V shuntů.

Naproto tomu dopplerovská ultrasonografie je díky fyzikálním vlastnostem ultrazvuku schopná registrace pohybu pouze na rozměrové škále makrocirkulace a ve větších hloubkách. Laserdopplerometrie nachází své využití napříč medicínskými obory.

Slovo „laser“ je akronymem anglického „Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation“, česky zesilování světla stimulovanou emisí záření. Laser je po fyzikální stránce kvantový generátor a zesilovač koherentního optického záření. Unikátními vlastnostmi optického záření generovaného laserem jsou (1) extrémní monochromatičnost (fotony záření mají s vysokou přesností stejnou vlnovou délku resp. frekvenci), (2) vysoká koherence (fotony svazku jsou sfázovány), (3) v závislosti na rezonátoru laseru lze dosáhnout nízké divergence neboli rozbíhavosti svazku (tj. všechny fotony se s vysokou přesností pohybují stejným směrem), vysoká hustota výkonu (velký jas) [15, 16].

Dopplerův jev (také nazývaný Dopplerův posuv nebo dopplerovský posuv) byl poprvé popsán Christianem Dopplerem v roce 1842 a oveřen Ballotem v roce 1845 na zvukových vlnách [18]. Princip tohoto jevu spočívá ve změně frekvence vlnění vysílaného zdrojem, jenž je v relativním pohybu vzhledem k pozorovateli (příjemci, posluchači, detektoru). Při vzájemném přibližování zdroje a pozorovatele dochází ke „zhušťování“ vln a tím ke zkracování vlnové délky a zvyšování frekvence, naopak při vzájemném vzdalování zdroje a pozorovatele dochází k „natahování“ vln a tím k prodlužování vlnové délky a snižování frekvence. Stejný efekt, ale pro elektromagnetické vlnění, popsal v roce 1847 Hippolyte Fizeau. Tento jev je proto také někdy nazýván Doppler-Fizeau efekt [19].

V případě medicínské aplikace laserdopplerometrie na měření krevní perfuze se Dopplerův jev uplatňuje dvakrát: pohybující se krevní element „vnímá“ frekvenci dopadajícího laserového světla dopplerovský posunutou a sám se stává pohybujícím se zdrojem rozptýleného světla (mj. směrem zpět k měřící hlavici, v níž je umístěn jak zdroj, tak detektor). Výsledkem je změna frekvence $\Delta f = -2f_0 v \cos(\alpha)/c$, kde f_0 je původní frekvence záření emitovaného laserem, v je rychlosť pohybu rozptylujícího elementu, α je úhel mezi směrem laserem emitovaného svazku záření a rychlostí elementu, $c = 2,99792458 \times 10^8$ m/s je rychlosť světla. Vezmeme-li v úvahu, že charakteristická rychlosť proudění krevních elementů v mikrokapilárách nepřevyšuje 5 mm/s, vychází pro obvyklé vlnové délky používané při laserdopplerometrii (650 až 690 nm) frekvenční posun Δf nejvýše 15 kHz, tedy relativní změna frekvence řadově 10^{-11} . Bez specifických vlastností laserového záření by nebylo možné tak malou změnu detektovat, natož změřit.

Smísení různého počtu nazpět rozptýlených fotonů s různými hodnotami Dopplerova posuvu (danými různým počtem a různými rychlostmi krevních elementů) ve fotodetektoru

způsobí modulaci proudu produkovaného fotodetektorem: větší Dopplerův posuv vyvolá vyšší frekvenci fotoproudu, zatímco magnituda fluktující části proudu je úměrná počtu pohyblivých rozptylových center. Z proměnného proudu fotodetektoru je pak po filtraci možné odvodit signál úměrný perfuzi, tj. průměrné rychlosti krát koncentrace rozptylových center [20]. Metoda laserdopplerometrie byla do praxe zavedena poprvé v roce 1972 Rivou [21] při sledování průtoku v arteriolách sítnice, pro diagnostiku hloubky popálenin byla použita Sternem v roce 1975 [22]. Jednalo o tzv. metodu LDF (Laser Doppler Flowmetry) [23].

2.2 Modality Laserdopplerometrie (LDI, LDF, LDC), úskalí metody

Metoda LDF (laser doppler flowmetry) využívá laserového záření vedeného z externího zdroje optickým kabelem k sondě, která je v přímém kontaktu s vyšetřovanou oblastí. Dříve se tato metoda používala také k diagnostice kapilárního prokrvení ranných ploch, popálenin či chronických běrcových vředů, připravovaných k přenosu kožního štěpu. V některých indikacích se dodnes používá při diagnostice pokročilosti onemocnění diabetických nohou, pomáhá objektivizovat postižení mikrocirkulace, nejvíce tangované cévní složky tohoto onemocnění. Na základě výsledných hodnot krevní perfuze lze monitorovat také efekt léčby např. kmenovými buňkami či vazodilatačními farmaky [24, 25]. Problémem této metody je riziko kontaminace při vyšetřování ranných ploch a také pouze bodovitý vyšetřený okrsek rány. Zdokonalením této metody vznikl bezkontaktní, plošně vyšetřující skener LDI nebo také LDPI, Laser Doppler Perfusion Imaging (obr. 2 v odstavci metodika). V předkládané studii byla použita právě metoda LDPI. Problematice bezkontaktního laserdopplerometrického vyšetřování bude věnován následující text.

Laser Doppler Imaging (LDI) je zobrazovací metoda využívající stejného principu jako Laser Doppler Flowmetry (LDF). Rozdíl spočívá v tom, že zdroj a detektor (analyzátor) laserového záření nejsou v přímém kontaktu s vyšetřovanou oblastí, takže odpadá riziko kontaminace. Díky nízkému výkonu laserového paprsku (cca do 1 mW, Class 2 podle IEC 60825-1:1994/A1:2002/A2:2001) není při vyšetření zapotřebí speciálních ochranných pomůcek, metoda je pro pacienta i personál zcela bezpečná a průběh vyšetření nebolelivý. Toto zobrazovací zařízení funguje jako skener. Laserový svazek o průměru cca 1 mm, generovaný He-Ne laserem, je zrcadlem uvnitř hlavice skeneru rozkmitán po povrchu měřené oblasti tak, že vytváří síť měřených bodů o velikosti maximálně 256×256 bodů (podle typu přístroje). Vzájemná rozteč měřených bodů kolísa mezi 1–3 mm podle zvoleného rozlišení (low, medium, high) a vzdálenosti měřící hlavice od skenované oblasti. Skener setrvá v každém

bodě několik milisekund, během této doby je analyzován laserový paprsek odražený od vyšetřovaného objektu. Dopplerovský frekvenční posun způsobí modulaci proudu produkovaného fotodetektorem, tento proud je ve vyhodnocovacích obvodech analyzován za účelem kvantifikace průtoku krevních elementů na jednotku plochy ve směru kolmém ke směru laserového svazku. Nespornou výhodou je velikost vyšetřované oblasti, která může dosáhnout až 2500 cm^2 . Výše zmíněná veličina, kvantifikující průtok krevních elementů na jednotku plochy (perfuze), se udává v arbitrárně dohodnutých tzv. perfuzních jednotkách (obvykle označovaných PU). Perfuzní jednotka vyjadřuje „určitý počet“ laserový svazek rozptylujících krevních elementů procházejících za jednotku času jednotkou plochy, tedy plochou rovnoběžnou s povrchem oblasti [20]. Zde záměrně uvádíme „určitý počet“ – tento nás ve skutečnosti nezajímá, podstatné je porovnání mezi různými oblastmi jediného pacienta, mezi pacienty navzájem. Skenováním vytvořená 2D mapa je dále převedena metodami pro zpracování obrazu na barevně kódovanou mapu znázorňující jednotlivé úrovně prokrvení.

Barevný sken je tvořen 6 základními barvami: tmavě modrá (nejnižší perfuze), světle modrá, zelená, žlutá, oranžová a červená (nejvyšší perfuze), interpolací lze získat případně až 256 barev. Rozsah perfuzní stupnice a stupeň rozlišení jsou volitelné v závislosti na vyšetřované oblasti. Při diagnostice prokrvení ranné plochy jsme využívali rozsah stupnice od 0 do 480 PU (viz obr. 5,6,7,8 v kapitole výsledky). Při diagnostice onemocnění kůže (např. maligních onemocnění, kvantifikace alergické reakce) se zachovanou epidermis *in situ* je obvykle zvolen rozsah stupnice nižší. Pro vyšetření maligního melanomu jsme volili rozsah 240 PU. Obr. 9, 10, 11 (viz. kapitola výsledky) ukazuje perfuzní sken pigmentových lézí s tímto rozsahem stupnice. Přístroje některých výrobců volbu rozsahu perfuzní stupnice postrádají, jsou aplikovatelné pouze pro oblast popáleninové medicíny, v jiných medicínských oborech není možné barevně rozlišit jemnější rozdíly.

Metoda LDI má také svá úskalí. Puchýře na pokožce zeslabují perfuzní signál z důvodu perzistence stratum corneum, rohovějící vrstvy pokožky, která dobře odráží laserové paprsky a brání jejich průchodu. Limitací metody je vrstva edematozní tekutiny v puchýřích šíře 3–5 mm, která přesahuje hloubku penetrace laserového paprsku o výkonu 1 mW. (obr. 5, kapitola výsledky)

Dalším ovlivňujícím faktorem je úhel, který svírá laserový paprsek s kolmicí na vyšetřovanou oblast. V ideálním případě by měl být laserový paprsek s touto kolmicí rovnoběžný. V práci Drooga z roku 2001 byl prokázán pokles perfuzního signálu o 10 %, pokud je laserový paprsek vychýlen od kolmice v úhlu 10 stupňů. Pokud svírá úhel 50 stupňů, pak je pokles signálu o 50 % [5].

Opatrnosti je třeba při aplikaci lokálních léčivých prostředků. Droog ve své práci prokázal pokles perfuzního signálu o 13 % při aplikaci preparátů se stříbrem. I po pečlivém odstranění antibakteriálního lokálního prostředku obsahujícího stříbro, byl pokles signálu o 3 %. V případě tetováže byl zaznamenán výpadek signálu, modré barvivo tetováže pohlcuje dobře laserové paprsky v červené oblasti viditelného spektra a blízké infračervené oblasti, které zahrnují také diagnostický paprsek [26].

Samostatnou kapitolou je vliv ambientního osvětlení. Výrobci LDI modalit udávají maximální osvětlení, které ještě zaručuje spolehlivé výsledky.

Pro správné hodnocení barevného skenu je nutné vždy zhodnotit topografii vyšetřované oblasti. Zdravá kůže vykazuje stejně nízkou perfuzi jako nekróza (popálení III. stupně). Zánětlivý lem okolí rány vykazuje falešně vysokou perfuzi a musí být vyjmut [5]. (obr. 5, viz. kapitola výsledky)

Skenování trvá řádově minuty, takže vlivem neklidu vyšetřovaného pacienta mohou vznikat pohybové artefakty, což je limitujícím faktorem u malých dětí a pacientů s motorickým neklidem.

Posledně jmenovanou nevýhodu eliminuje ještě pokročilejší laserdopplerovská technologie, která umožňuje kontinuální 2 rozměrnou monitoraci perfuze v čase (laserdoppler camera). Zařízení snímá laserdopplerovský intenzitní sken z oblasti max. 15x15 cm rychlostí až 100 skenů za sekundu, a to pomocí CMOS (complementary metal-oxide semiconductor) kamery. CMOS kamera snímá odražené laserové paprsky infračerveného spektra (o vlnové délce 720 nm) a mění je na elektrony. Na základě LASCA technologie (Laser Speckle Contrast Analysis) porovnává jednotlivé intenzitní skeny a barevně kóduje jejich změnu. Opakování skeny stacionární oblasti vytvoří v sumaci vysoký kontrast, u pohybujících se předmětů je pak kontrast nízký. Laser speckl je barevně kódován a je dán poměrem standardní odchylky a průměru intenzity. Číselným výstupem je také počet perfuzních jednotek. Tato technologie je výhodná pro monitorování v reálném čase, což poskytuje jednak informaci o okamžité perfuzi vyšetřované oblasti, jednak informaci o pulsové aktivitě, nevýhodou zůstává cena, která se nyní pohybuje kolem 1,7 mil. kč. [27].

2.3 Využití metody Laser Doppler Imaging (LDI) v klinické praxi

2.3.1 Interní obory a experimentální medicína

Využití zobrazovací metody laserdopplerometrie, LDI, jako objektivního diagnostického prostředku nalezlo široké uplatnění jak v chirurgických, tak v mnoha interních oborech a v oblasti experimentální medicíny.

Bornmyr se pokusil zhodnotit dysfunkci autonomního nervového systému u diabetiků. Oslabená vazokonstriční reakce při indirektním chlazení kontralaterální končetiny, byla vyjádřena více u diabetiků 1. typu než u diabetiků 2. typu, což koreluje se závažností diabetických komplikací. Obě skupiny měly nižší vasokonstriční reakci než zdraví dobrovolníci [28].

Khan prokázal na zvířecím modelu telete, že stav kožní mikrocirkulace je také ukazatelem funkčnosti kardiální mikrocirkulace. Prokázal pozitivní korelací mezi kožní konduktancí (poměr mezi kapilárním kožním prokrvením a středním arteriálním tlakem) a koronární průtokovou rezervou (hyperemický a bazální diastolický průtok) po aplikaci adenosinu [29].

Dle Turnera lze na riziko kardiovaskulárních onemocnění usuzovat dle hodnocení lokální kožní odpovědi na lokální aplikaci acetylcholinu či nitroprusidu iontoforézou, odpověď je závislá na funkci kapilár [30].

Prokrvení hrudníku u onkologických pacientů s tumory v této oblasti sledoval Seifalian, který zjistil vyšší perfuzi u pacientů s maligními nádory než u pacientů s benigními nádory, u pacientů s benigními nádory pak perfuzi vyšší než u kontrolní skupiny pacientů neonkologických [31].

Široké využití nalezla laserdopplerometrie v revmatologii. LDPI může sloužit k rozlišení různých stádií vaskulárního poškození u pacientů se systémovou sklerodermií. Rosato et al. prokázal nehomogenní prokrvení na hřbetu ruky u pacientů se sklerodermií, na rozdíl od zdravých dobrovolníků, ale také pacientů s primárním Raynaudovým syndromem. Dle abnormalní mikrovaskulární odpovědi na chladovou stimulaci, s opožděným kapilárním návratem, lze usuzovat na pokročilost systémové sklerodermie. Počáteční stádia tuto abnormalitu, oproti zdravým jedincům, vykazují pouze na prstech, pokročilejší stádia také na hřbetech rukou [32].

Pomocí laserdopplerometrie byla také prokázána endoteliální dysfunkce u idiopatických zánětlivých myopatií (polymyositis, dermatomyositis). Po iontoforézou aplikovaném acetylcholinu, jehož efekt je závislý na endotelu, byl rozdíl mezi prokrvením u pacientů s myopathií a zdravých dobrovolníků. Pacienti s myopathií vykazovali signifikantně nižší hyperémii než zdraví pacienti. Tento rozdíl v odpovědi nebyl patrný po iontoforézou aplikovaném nitroprusidu, jehož efekt je endotel-independentní [33].

LDI může zachytit zánětlivé procesy ovlivňující podkožní struktury. Pomocí laserdopplerometrie byla prokázána rozdílná kožní perfuze nad proximálními interphalangeálními klouby u zdravých dobrovolníků a pacientů s revmatoidní arthritidou. Zánětlivá reakce kloubů tedy ovlivňuje také podkožní a kožní struktury [34].

U vazoneurózy LDPI prokáže narušenou vaskulární regulaci na úrovni kapilár. Po chladovém testu, tj. chlazení vyšetřované ruky 10 min. ve vodě o teplotě 10°C, vykazovali pacienti s vazoneurózou větší pokles perfuze a pomalejší zotavení ve srovnání se zdravými dobrovolníky [35].

Některé kožní změny není metoda LDI překvapivě schopná zachytit. Goh monitoroval pomocí LDI efekt fototerapie na psoriatická ložiska. Psoriáza vykazovala abnormální perfuzi ložisek proti okolní zdravé tkáni. Efekt fototerapie, který vyústil v klinicky patrné zlepšení, se však nijak neprojevil na LDI skenech [36]. Laserdopplerometrie nezaznamenala také rozdíl u cévních lézí charakteru hemangioma. Nicméně po terapii Argonovým laserem byla bezprostředně patrná elevace perfuze, následovaná postupným poklesem [37]. Také v naší praxi jsme monitorovali efekt laserterapie cévním barvivovým laserem o vlnové délce 585 nm na neavus flammeus, kdy byla zaznamenána reaktivní hyperemie v okolí spotů, s patrným poklesem perfuze uvnitř spotů, což potvrdilo efektivní zasažení cévní složky (obr.8, viz. kapitola výsledky).

Mayrovitz sledoval efekt magnetoterapie (permanentní keramický magnet 0,1 T) na prokrvení dlaňové plochy ruky a hřbetu ruky, kde byl magnet přiložen po dobu 36 minut. Nezaznamenal žádnou změnu perfuze studované anatomické oblasti ani kontralaterální kontrolní oblasti [38].

Z dermatologického hlediska zajímavá je práce prokazující vazokonstriční efekt kortikosteroidů (clobetasol) na kůži po lokální aplikaci. Po 3 hodinové lokální aplikaci kortikosteroidů dosáhla vasokonstrukce maxima za další 3 hodiny. Vazokonstrukce navíc pomaleji ustupovala, pokud aplikaci kortikosteroidů doprovázelo okluzní (neprodyšné) krytí. To lze vysvětlit lepší biodostupností kortikoidů pro tkáně pod okluzním krytím. Rychlosť nástupu vazokonstrice však okluzní krytí neurychlilo [39].

V experimentální oblasti byla sledována korová perfuze mozku u králíků po okluzi arteria cerebri media. Po navození hypertenze u zvířat, dosažením středního arteriálního krevního tlaku 65 mm Hg, došlo k redukci rozsahu infarktu o 94 %, pokud okluze trvala 1 hodinu, ale jen 46 %, pokud okluze trvala 2 hodiny [40].

Shymkiw sledoval prokrvení kortikální části tibie pomocí LDI u králíků. Vyšetřil 12 králičích tibií a potvrdil korelací s jinými, invazivními metodami (color-microspherere determined flow method). Závěr jeho práce je, že pomocí LDPI lze monitorovat kostní prokrvení a sledovat tak kostní metabolismus a remodelaci kosti [41].

2.3.2 Chirurgické obory

V neurochirurgii je důležité intraoperativní mapování vitálních center a center aktivity. Raabe monitoroval aktivitu kůry mozku pomocí LDI skeneru spřaženého s operačním mikroskopem. Toto monitorování bylo prováděno u pacientů při vědomí a prokázalo svou platnost při intraoperativním funkčním monitorování mozku [42].

V plastické chirurgii nalezla využití laserdopplerometrie při plánovaní lalokových plastik. Pro rekonstrukci prsu, např. po ablaci, se využívá muskulokutánní lalok DIEP (z anlického deep inferior epigastric artery flap), zásobovaný cévní stopkou z a.epigastrica inferior. Tindholdt sledoval pomocí LDI prokrvení jednotlivých zón tohoto laloku (I-IV), dle dělení podle Scheflana a Dinnera [43]. Zjistil, že nejlépe jsou vaskularizovány zóny I a III, což lze využít při plánování způsobu inserce laloku. To překonalo dřívější anatomicky podložený předpoklad, že nejbezpečnější jsou zóny I a II [44].

Pracovní skupina kolem Zdolseka monitorovala perfuzi kožního volného laloku předloktí, zásobovaného arteria radialis (tzv. čínský lalok) při rekonstrukci dutiny ústní po operaci nádoru. Tento volný lalok je mikrochirurgicky inzerován na místní cévní stopku. Pomocí LDI vyšetření na 11 pacientech prokázal hyperémii samotného laloku a také hyperémii okolní tkáně po inzerci laloku. Radiální část dlaně, po přerušení a.radialis, vykazovala naopak přechodně hypoperfuzi. Metoda LDI je tedy svou neinvazivností vhodná k zaznamenání poruchy prokrvení cévní stopky a zajistění včasné chirurgické revize před ztrátou laloku [45].

Schlosser prokázal u 18 volných laloků kritickou hodnotu pro rozvoj ischémie, u všech později ischemických laloků byla naměřena perfuze pod 187 perfuzních jednotek (PU), naopak u laloků bez komplikací hojení byla naměřena perfuze nad 221 PU. Povrdil tak oprávněnost metody LDI při monitoraci prokrvení laloku [46].

Pomocí LDI lze detektovat perforátory (cévní stopky laloků) v břišní oblasti. Komuro tuto vlastnost ověřil ve své práci, kdy jako srovnávací metodu použil ultrasonografickou dopplerometrii. Závěrem je, že LDI usnadňuje plánování umístění a tvaru laloku při rekonstrukci zejména v oblasti hrudníku [47].

LDI bezkontaktně diagnostikuje povrchovou tkáňovou perfuzi různých splanchnických orgánů. Nejvyšší prokrvení vykazují pankreas a střevní kličky, nižší perfuzi žaludek a játra, nejnižší prokrvení pak slezina. U velkých tumorů jater byl patrný pokles perfuze. Nebyl potvrzen rozdíl perfuze u zánětlivých střevních onemocnění a kontroly [48].

Efekt sympatektomie na zlepšení prokrvení u RSD (reflexní sympatické blokády) laserdopplerometricky potvrdil Soronson [49].

Úspěšnost transplanace jater sledoval Seifalian při LDI monitoraci kapilární perfuze levého jaterního laloku. Na 2215 bodech zaznamenal 10 % regionální variabilitu. (Po klemáži splenické artérie vzrostla perfuze jater o 9,3 %) [50].

2.3.3 Popáleninová medicína a laserdopplerometrie

Jelikož je monitorace prokrvení ranné plochy a její klinický význam jedním z cílů této práce, zmíníme zde také anatomico-patofyziologické poznámky, týkající se kůže a popálenin.

2.3.3.1 Anatomické a fyziologické poznámky

Kůže jako největší orgán v těle, s váhou kolem 7 % celkové tělesné hmotnosti, plní dobře svou roli ochrany mechanické (škára) i antibakteriální (pokožka), radiační ochrany (melanocyty, rohovějící vrstva kůže), funkci termoregulační (kapilární síť, potní žlázy), estetickou, depotní (podkožní tuk), vylučovací (potní a mazové žlázy) a úlohu největšího tělesného smyslového orgánu, s velkým počtem volných nervových zakončení a receptorů, reagujících na teplo (Ruffiniho těliska), chlad (Krauseho těliska), tlak (Vaterova–Paciniho těliska), bolest. Kůže se skládá ze 3 hlavních vrstev. Je to pokožka, tzv. epidermis, kde lze rozeznávat 5 vrstev buněk – keratinocytů. Na spodině této vrstvy jsou basální zárodečné buňky, nad kterými je vrstva granulózních buněk, dále vrstva buněk ostnitých (tzv. stratum spinosum), následuje vrstva tzv. světlých buněk (stratum lucidum), kde je patrný proces rohovění, svrchní vrstva je tvořena pouze zdrohovatělými odumřelými buňkami, tzv. stratum corneum. Poslední 2

vrstvy jsou opticky nejaktivnější. Šíře pokožky je asi 0,15 mm, nejsilnější je na chodidlech a dlaních rukou. Pod epidermis je vrstva škáry, tzv. dermis, kde lze rozpoznat dvě funkčně rozdílné vrstvy. Horní část, tzv. papilární dermis, zahrnuje hustou kapilární pleteninu a je zodpovědná za přísun živin, zejména proteinů, stavebních kamenů pro replikaci buněk. Hlubší, tzv. retikulární část, odpovídá za mechanickou odolnost a ukotvení vlasových folikulů a potních žláz. Šíře dermis je různá dle anatomické lokalizace, kolísá od 0,5 mm (oční víčka) až po 3 mm (záda). Poslední vrstvou kůže je vrstva podkoží, která má individuální šíři, dle stavu výživy, věku a pohlaví. Její význam je zejména termoizolační a také depotní. Mezi nejdůležitější kožní buňky, kromě keratinocytů, patří melanocyty, které se nachází v pokožce, mezi buňkami basální vrstvy a dále ve vlasových folikulech.

Melanocyty mají četné výběžky, jimiž zásobují okolní keratinocyty melaninem. Melanin je pigment se schopností pohlcovat ultrafialové záření (UV). UV-B složka tohoto okem neviditelného záření poškozuje buněčnou DNA a významně se spolupodílí na vzniku nádorových onemocnění kůže. Na základě počtu tzv. melanozomů v melanocytech, tj. buněčných organel obsahujících barvivo, lze rozpoznat 6 základních fototypů dle přirozeného zbarvení kůže. Fototyp I je charakteristický nápadně světlou pokožkou, fototyp VI je nejtmařší, typicky u Afroameričanů. Dalšími kožními buňkami jsou Langerhansovy buňky, které se nacházejí ve stratum spinosum a patří mezi tzv. antigen presentující buňky. V dermis, zejména prstů rukou a nohou, jsou přítomny Merkelovy buňky s mnoha volnými nervovými zakončeními ve své blízkosti. Ty se spolupodílejí na funkci mechanoreceptorů. Za produkci kolagenních vláken jsou odpovědný fibroblasty.

Cévní zásobení kůže tvoří 2 horizontální plexy. Povrchnější je situovaný ve škáře (dermis), 1-1,5 mm pod povrchem (rete subpapillare), hlubší plexus se nachází na přechodu škáry a podkoží. Vzestupné arterioly a sestupné venuly jsou párovány a spojují oba plexy. Z horního plexu vystupují kapilární kličky do papilární dermis, jejich funkce je nutritivní. V místě, kde se větví ascendentní arterioly, aby se včlenily do subpapilárního arteriálního plexu, se v jejich stěnách nachází buňky hladkého svalstva, které tvoří sfinktery, regulující průtok krve horním plexem. Na dermosubkutánní junkci jsou sběrné žíly s dvoucípými chlopněmi, které brání retrográdnímu toku [51].

2.3.3.2 Stupně popálení a patofyziologie

Vystavení vlivu termické noxy způsobuje denaturaci proteinů. Hloubka postižení závisí na hloubce průniku termické noxy. Vlhké teplo proniká mnohem rychleji do tkání než teplo suché. S rostoucí teplotou se bezpečný čas expozice zkracuje. Kontakt s vlhkým teplem nad 68 °C způsobuje téměř okamžitou smrt buněk a trombotizaci kožních cév. Maximální snesitelná kontaktní teplota je 43,5 °C [52].

Rozeznáváme 4 základní stupně popálení. U popálení I. stupně se v podstatě nejedná o poškození kožních vrstev, ale o vazodilataci cév, jako reakci na tepelnou noxu, ve snaze pokožku ochladit. Toto popálení je velmi bolestivé, ale do týdne se stav kůže navrací k normě. Je způsobeno většinou protrahovanou expozicí slunečnímu záření. Při popálení II. stupně je již poškozena epidermis a také část dermis. Dle stupně postižení dermis se rozlišuje popálení IIa stupně (obr. 5, viz. kapitola výsledky), kterézasahuje do papilární vrstvy dermis a popálení IIb stupně, kdy je postižena také hlubší retikulární vrstva dermis. Popálení IIa stupně („superficial dermal burn“) je klinicky velmi bolestivé, s puchýři a vlhkou růžovou spodinou, kapilární návrat je zachován. Toto popálení je obvykle způsobeno horkými tekutinami. Hojení trvá 10–12 dnů a probíhá rozrůstáním epitelu z vlasových váčků. Po zhojení nezanechává popálení IIa stupně jizvy. Popálení IIb stupně lze dále rozdělit dle anglosaské literatury na „mid dermal burn“ a „deep dermal burn“. „Mid dermal burn“ je popálení zasahující do poloviny dermis (obr. 7, viz. kapitola výsledky). Je obvykle způsobeno delší expozicí horkým tekutinám (5–10 s), nebo ožehem plamenem. Mohou byt přítomny puchýře, nebo jsou již strženy, spodina je více překrvena s méně vlhkým vzhledem, nebo naopak bledší. Délka hojení je obvykle 2–4 týdny, epitelizace probíhá z mazových žlázek. Pokud hojení trvá déle než 3 týdny, výrazně narůstá počet jizevnatých komplikací, a to zejména u pacientů s tmavším fototypem. Tyto, dosud uvedené stupně popálení, lze léčit konzervativním způsobem, jejich tendence ke spontánnímu zhojení je dobrá.

Dále budou popsány popáleniny vyžadující operační léčbu. „Deep dermal burn“ je termické poranění s postižením 2/3 vrstvy škáry. Hojení trvá 4–10 týdnů a nová pokožka (epidermis) neadheruje dobře ke spodině. Často dochází k sekundárnímu rozpadu již zhojené rány a hypertrofickému jizvení (obr. 4, viz kapitola výsledky). Popálení III. stupně je obvykle způsobeno plamenem. Vzhled rány je bělavý nebo hnědý či černý (obr. 6, kapitola výsledky). Rány jsou nebolestivé, suchého vzhledu. Popálení IV. stupně je termické postižení také podkožních struktur, svalů, šlach a skeletu. Toto popálení je často asociováno

s elektrotraumatem. Jedná se mnohdy o ztrátová poranění končetin, či mutilující poranění obličeje a kalvy. Léčba tohoto poranění je zdlouhavá a problematická z důvodů nutnosti krytí defektů lalokovou plastikou [53].

Patofyziologie: Perfuze u popáleninové traumatu prochází ve svém akutním období, tj. do zhojení ranných ploch, vývojem. V prvních hodinách se rozvíjí lokální otok, který kulminuje po 48 hodinách a který ještě více kompromituje průtok termicky destruovaným kapilárním a arteriolárním řečištěm. V místě termického traumatu lze rozlišit nejpovrchněji zónu nevratných změn, tzv. zónu koagulace, pod ní se naléza zóna stázy, která se za příznivých okolností (adekvátní tekutinová resuscitace a lokální léčba) může restaurovat a nejhлouběji je zóna intaktní mikrocirkulace [54].

Po odeznění lokálního edému, nastává lokálně vasodilatace a rozvoj zánětlivé reakce za účelem reparace termického poškození [55]. Tato dynamika je důležitá pro stanovení diagnózy, kdy je zapotřebí vzít v úvahu časový faktor.

2.3.3.3 Operační léčba popálenin, časná nekrektomie

Popálení IIb stupně charakteru „deep dermal burn“ a popálení III. stupně jsou indikovány k nekrektomii, tj. ostrému snesení termicky ireverzibilně postižených vrstev kůže. Nekrektomii rozeznáváme buďto tangenciální nebo fasciální. Při tangenciální nekrektomii se ostře snáší Watsonovým a Gulianovým nožem tenké vrstvy kůže, dokud se neobjeví známky anteriorálního (v podkoží) nebo kapilární krvácení (v dermis, při „deep dermal burn“), viz obr.1. Fasciální nekrektomie se provádí, pokud je termické postižení závažnější a postihuje také podkožní tukovou tkáň. Za pomocí skalpelu se odstraní všechny avitální vrstvy kůže, včetně podkoží až k fasciálním strukturám. Následně je na takto připravenou vitální spodinu přiložen dermoepidermální (DE) autologní štěp (obr. 4, viz. kapitola výsledky). V případě nedostatku DE štěpů při kritickém rozsahu popálení je plocha po nekrektomii kryta dočasným biologickým (xenotransplantáty), umělým kožním krytem, nebo dermálními kožními náhradami.

Popáleninové rány, které nevykazují schopnost spontánního zhojení do 3 týdnů, jsou indikovány k provedení časné nekrektomie, t. j. operační léčby provedené optimálně do 5. poúrazového dne [52]. Tato časná operační léčba má za následek lepší estetické a funkční výsledky (obr. 4, kapitola výsledky), vyplývající z kvality jizev a také časnější zařazení do běžného způsobu života. Tento koncept byl poprvé navržen v roce 1975 [56]. Provedení časné nekrektomie je podmíněno stanovením správné diagnózy.



Obr. 1

Tangenciální nekrektomie prováděná Watsonovým nožem u hlubokého dermálního poranění na zadní ploše stehna. Postupně snášené tenké vrstvy kůže až do známek kapilárního krvácení, které svědčí o dostatečném rozsahu nekrektoemie. Foto je z archivu popáleninového centra FN Ostrava.

2.3.3.4 Dosavadní poznatky z LDI diagnostiky hloubky popálení

Chybná diagnóza, založená na subjektivně hodnocených klinických známkách, jako je kapilární návrat, bolestivost rány a barva spodiny, se vyskytuje až ve 40 % případů [2]. Nesprávné označení popálení za hluboké vede k chybné indikaci operační lečby. Pacient je zbytečně zatěžován rizikem celkové anestezie, krevních ztrát a nutností aplikace krevní transfúze, či pooperační imobilizace. Zejména u geriatrických a polymorbidních pacientů riziko celkové anestezie a operační zátěž mnohonásobně narůstá. Volba konzervativního postupu u nerozsáhlých popálenin umožňuje také časné převedení pacienta do ambulantní péče. Chybné

označení ranné plochy za povrchní popálení vede nesprávně ke konzervativní terapii, která prodlužuje hojení rány i hospitalizaci s mnoha nepříznivými dopady, včetně ekonomických [57, 58]. Vzácné nejsou případy sekundárního rozpadu již zhojených ploch, hypertrofických jizev a jizevnatých provazců [59]. Tato skutečnost vedla kliniky k hledání objektivních metod diagnostiky hloubky popálení. Zlatým standardem zůstává histologické vyšetření bioptického vzorku [60, 61], je to však invazivní a bolestivé vyšetření.

Laserdopplerometrie splňuje dobře požadavky na vyšetřovací metodu v oblasti popáleninové medicíny pro bezkontaktnost a eliminaci rizika kontaminace rány, příznivou délku trvání vyšetření, finanční náklady na jedno vyšetření a také poměrně snadné hodnocení perfuzního skenu. Mimo schopnosti lidského oka je postihnout nepatrné rozdíly v úrovni dermálního postižení, zejména rozlišení mezi „mid dermal“ a „deep dermal burn“. Díky přítomnosti cévních plenek a jejich anatomické lokalizaci v dermis má LDI předpoklady tuto hranici určit. Princip metody vychází ze skutečnosti, že úroveň intaktní mikrocirkulace dermis úzce koreluje s hloubkou popálení [5]. Některé práce dokonce prokazují korelací mezi hodnotou prokrvení ranné plochy a dobou hojení [62].

Při měření okamžité perfuze lze orientačně použít toto pravidlo: popálení III. stupně vykazuje přibližně stejnou nebo dokonce nižší perfuzi než intaktní zdravá kůže, což je průměrně 67 perfuzních jednotek [62]. Kraniálněji a centrálněji, směrem k srdci, počet perfuzních jednotek narůstá, akrálně klesá s vyjímkou bohatého prokrvení dlaní rukou a plosek nohou, kde jsou přítomny cévní glomy. Při hodnocení laserdopplerometrických skenů je tedy důležité odlišit makroskopicky oblast intaktní a hluboce termicky poškozené tkáně. Povrchní popáleniny vykazují přibližně 3–5 násobek prokrvení okolní zdravé kůže [5].

Dynamika: lokální otok během prvních 48 hodin kulminuje a omezuje průtok v kapilárníchplexech. Některé práce nedoporučují měřit v tomto intervalu [63], jiné naopak prokazují přesnost této metody také v tomto časném poúrazovém období [64]. Chybná interpretace může nastat také při měření perfuze bezprostředně po sejmutí nekrotické epidermis [65]. Zachované subpapilární kapilární pleny reagují reflexním spasmem, který pozvolna během 15 minut odeznívá. Kloppenberg [55], který sledoval rannou perfuzi v 1., 4. a 12. dni, rozdělil popáleniny dle podobnosti dynamiky v tomto období. Popáleniny IIa stupně, tedy „superficial dermal burn“, vykazovaly již vstupně vysoké prokrvení, nad 250 PU, které navíc dále narůstá do 4. dne, 12. den zaznamenal pokles. Zánětlivá fáze zde kulminuje již před 12. poúrazovým dnem, bod zlomu zde však není patrný. Popálení IIb stupně, blíže nespecifikovaná, vykazují vstupně nižší perfuzi, ta postupně narůstá až do 12. poúrazového dne. Hlubší průnik termické noxy a potřeba větších reparačních změn vyžaduje protrahovanou

zánětlivou reakci. Popáleniny III. stupně vykazují nízkou perfuzi podobnou okolní zdravé kůži ve všech 3 sledovaných dnech, dermis je zde kompletně termicky poškozena. Velké časové rozestupy mezi 3 sledovanými poúrazovými dny ale neodkryvají přesnější průběh vývoje perfuze.

Různé výstupy těchto prací jako navrhovaná perfuzní kriteria hodnocení hloubky popálení, protichůdné názory na využitelnost metody v prvních 48 hodinách po úrazu a časově omezená využitelnost LDI do 5. poúrazového dne, nás vedla k monitoraci perfuze popáleninové rány v období prvních 9 poúrazových dnů, k ověření prediktivní schopnosti metody během tohoto období a snaze o sestavení diagnostického algoritmu pro sledované období.

Také v rehabilitační fázi našla laserdopplerometrie své uplatnění. Bray et all potvrdil korelaci mezi klinickým hodnocením hypertrofických jizev na základě Vancouverského score (hodnotí výšku, pružnost, cévnatost a pigmentaci jizvy) [66] a výstupy měření LDI skenerem. LDI objektivizuje cévnatost jizev [67]. K objektivnímu zhodnocení pliability (ohebnosti) se dnes využívá kutometrie [68].

2.3.4 Maligní melanom a laserdopplerometrie

Jelikož je laserdopplerometrická diagnostika maligního melanomu, resp. jeho histopatologického stádia, druhým cílem této práce, bude na tomto míšťe pojednáno o etiopatogenezi, epidemiologii, histopatologii a diagnostických možnostech maligního melanomu.

2.3.4.1 Etiopatogeneze, epidemiologie

Maligní melanoblastom je kožní onemocnění, vycházející z pigmentových buněk, tzv. melanocytů. Melanocyty jsou přítomny zejména v epidermis, ale také v jiných tkáňových strukturách, např. v oční duhovce a perianálně. Maligní onemocnění, vycházející z těchto buněk, je charakteristické časnou tendencí k metastazování. Incidence výskytu melanonů plynule narůstá. Celosvětově je ročně nově diagnostikováno 160 000 případů, nejčastěji u mužů bělochů. Mortalita na toto onemocnění činí 48 000 pacientů ročně, úmrtí na melanom tvoří až 90 % úmrtí na onkologická onemocnění [70]. V Evropě se pohybuje incidence kolem 15

nových případů na 100 000 obyvatel [72], v ČR bylo v roce 2010 zachyceno 24 nových případů na 100 000 obyvatel [73].

Etiologicky nejvýznamnějším a také jediným prokázaným zevním faktorem je expozice UV-B záření, které je složkou slunečního záření. Ultrafialové záření typu B, poškozující buněčnou DNA, je pohlcováno v ozónové vrstvě, ta se však neustále ztenčuje. Opakované termické traumata v dětství zvyšuje riziko melanomu 3,6 x [74].

V 1/3 případů vzniká melanom z dříve existující pigmentové léze, ve 2/3 pak de novo. Riziková je přítomnost tzv. atypických névů (char. atypiemi v histologickém obrazu) [75], 2 – 5 % melanomů vzniká na genetickém podkladě, z dysplastických névů. Rizikoví jsou také imunosuprimovaní pacienti.

2.3.4.2 Histopatologie, Breslow, Clark, stádia melanomu

Zlatým standardem zůstává histologické vyšetření, jako objektivní, ale invazivní metoda, která se využívá k definitivnímu stanovení diagnózy melanomu a histopatologického stádia onemocnění. Dle způsobu šíření, morfologie a biologické povahy rozlišujeme povrchově se šířící melanom, tzv. „superficial spread melanoma“, vertikálně se šířící melanom, tzv. „melanoma nodulare“, akrolentiginózní melanom, na akrálních částech končetin a amelanotický melanom, postrádající pigment. Nodulární forma melanomu je mnohem agresivnější než povrchově se šířící a vzniká vždy de novo.

Clarkova klasifikace hodnotí hloubku invaze nádoru. Clark I, tzv. carcinoma in situ, kde patří také lentigo maligna melanom, označuje přítomnost nádorových buněk v bezcenné vrstvě epidermis. Ve stádiu Clark II invaduje nádor již do papilární dermis, která je vyživována z rete subpapilare (subpapilární pláteně). Ve stádiu Clark III zasahuje nádorové buňky do stratum reticulare dermis. Stádium Clark IV je charakteristické invazí nádoru přes celou vrstvu dermis [76]. Klasifikace dle Breslowa hodnotí vertikální rozdíl melanomu, v milimetrech. Marghoob na retrospektivní studii 919 pacientů, kteří byli sledováni po dobu 10 let, prokázal prognosticku důležitost patologického hodnocení jak dle Breslowa, tak Clarka a doporučuje zohlednit Clarkovu klasifikaci, jako hloubku invaze nádoru, do klasifikace AJCC (American Joint Committee of Cancer, cancer staging manual) [77].

Desetileté přežití u stádia melanomu Clark II se uvádí 93 %, Clark III 71 %, Clark IV 59 % a Clark V 36 % [76, 78]. U Breslowovy klasifikace je přežití u nádoru šíře do 0,75 mm 98-100 %, 0,76-1,5 mm 90-95 %, 1,51-2,25 mm 80-85 %, 2,26-3 mm 70-75 %, více něž 3 mm

45 % [79]. Mezi prognosticky špatné histopatologické faktory patří přítomnost mitóz, satelitů a ulcerací.

Celkový průběh onemocnění lze rozdělit na 4 stádia, která jsou důležitá pro určení terapeutického postupu, TNM (tumor, nodulus, metastases) klasifikace rozeznává tato stádia [79]:

IA -Breslow pod 0,75 mm, Clark II

IB -Breslow 0,75-1,5 mm, Clark III

IIA -Breslow 1,5-4,0 mm, Clark IV

IIB -Breslow nad 4 mm, Clark V

III -přítomnost metastáz v lokoregionálních lymfatických uzlinách

IV -vzdálené metastázy

2.3.4.3 Operační léčba maligního melanomu

Pacienti s melanomem stádia Breslow 1 mm a více jsou indikováni k biopsii sentinelové uzliny, také pacienti ve stádiu Breslow méně než 1mm, ale Clark IV a V. nebo s přítomností ulcerace. Přibližně 20 % těchto nádorů mělo mikrometastázy, v případě Clark IV až ve 35 %. [80]. Doporučení pro ochranný lem při kožní excizi nádoru je 0,5-3 cm [81]. Bezpečný lem doporučený pro melanomy in situ je 0,5 cm, u melanomů do vertikálního rozměru 0,75 mm lem široký 1 cm, u melanomů nad 0,75 mm je doporučován lem 2 cm do všech stran, u melanomů s vertikálním rozměrem nad 4 mm je doporučován lem 3 cm [82].

Imunoterapie: u stádia II je indikována imunoterapie tzv. low dose interferonem (IF) alfa (3 miliony mezinárodních jednotek - IU podkožně, 3x týdně po dobu 24 měsíců), u stádia III je indikována tzv. high dose terapie IF alfa (10 milionů IU 3x týdně po dobu 11 měsíců) [82]. Paliativní polychemoimunoterapie je indikována u stádia IV.

2.3.4.4 Vyšetřovací metody

Diagnostika melanomu je založena, pro svou dostupnost, především na klinických známkách, tzv. ABCDE, vycházejících z anglických slov „Asymmetry“ (nepravidelné okraje), „Borders“ (nerovné okraje nádoru), „Color“ (barevné variace), „Diameter“ (velikost nad 5 mm), „Enlargement“ (změna tvaru, růst névu).

Pacient obvykle vyhledá lékaře z důvodu změny barvy či velikosti pigmentového névu. Svědčení a krvácení léze je již známka pokročilejší formy nádoru. Část pacientů je odeslána na specializované vyšetření při preventivní prohlídce praktickým lékařem pro suspicium na maligní lézi. Preventivní akce pro širokou veřejnost probíhají každoročně také v rámci tzv. Euro melanoma day, jež organizuje společnost European Academy of Dermatology and Venerology. Cílem je zvýšit povědomí o této nemoci a přispět k časnému záchytu nádorového onemocnění kůže.

Až ve 40 % případů je klinická diagnóza pigmentového névu nesprávná, pokud je založena na vizuální diagnostice. I při hodnocení dermatologem za použití dermatoskopu může chyba kolísat od 5 % do 40 %, dle zkušeností lékaře [83, 84].

Při klinickém podezření na malignitu podstupují pacienti další specializovaná vyšetření. Total body photography (celotělová fotografie) umožnuje objektivizovat vznik nových znamének a změnu již existujících suspektních pigmentových lézí, zejména na místech nedostupných sebevyšetření. Celotělové fotografování sestává ze standardních 20 snímků a je výhodné zejména u pacientů s mnohočetnými pigmentovými névy.

Dermatoskopie, též epiluminiscenční mikroskopie, umožňuje sledovat pod povrchovou strukturu znamének, jejich síťování apod. Existují 2 typy dermatoskopů. U tzv. NPD (Nonpolarized Dermoscope) je čočka dermatoskopu spojena se stratum corneum kůže prostřednictvím olejové emulze, která díky svým fyzikálním vlastnostem zajišťuje lepší penetraci světla kůží. PD (Polarized Dermoscope) je vybaven polarizačním světelným filtrem, který přednostně zachytává odražené světelné paprsky z hlubších vrstev kůže. Výhodou PD oproti NPD je možnost bezkontaktního vyšetřování znamének. Počítacově asistovaná dermatoskopie porovnává morfologii vyšetřovaného znaménka, za použití multispektrální obrazové analýzy (430-950 nm), s databází tisíců znamének. Diagnóza je stanovena s minimálním zásahem klinika – přístrojem Sia scope, MelaFind (senzitivita 100 %, specificita 85 %).

Confocal laser scanning microscopy (CLSM)-vyšetřuje kožní lézi na úrovni celulárního rozlišení, podobnému histologii. Zdroj laserového záření emituje paprsek o vlnové délce 830 nm (dobře kontrastní pro melanin), který ske+nuje vyšetřovanou oblast. Filtr (Pihhole filter) před fotodetektorem propouští pouze paprsky odražené z vyšetřované oblasti, po průchodu čočkou objektivu. Paprsky jsou po dopadu na fotodetektor konvertovány na obraz. Hloubka penetrace je maximálně 350 µm, takže místy jsou zachyceny také erytrocyty v papilární dermis. Diagnóza melanomu je stanovena na základě architektoniky buněk, pagetoidního šíření buněk, dermálních hnízd a jiných morfologických známků.

Ultrazvuk slouží k vyšetření sentinelových uzlin a také regionálních metastáz. High-Resolution ultrasound (20MHz) odhalí vertikální rozměr nádoru [85].

MRI (zobrazení magnetickou rezonancí) slouží k vyšetření pacientů ve stádiu IV. Cílem všech těchto metod je omezení invazivních biopsií a snížení morbidity pacientů s melanomem. [86]

2.3.4.5 Dosavadní poznatky LDI diagnostiky pigmentových lézí

Laserdoppler imaging funguje jako skener a zvolenou oblast vyšetřuje až do hloubky 1 mm, postihne tak subpapilární pleteně (rete subpapilare) a místy i pleteně na dermosubkutánním přechodu (rete cutaneum). Dopplerovský princip umožňuje kvantifikovat míru pohybu erytrocytů. LDI tak poskytuje informaci o cévním zásobení pigmentových névů.

LDI diagnostika je založena na průkazu rozdílné perfuze malignity proti okolí. Vychází z teorie maligní neovaskularizace, kdy buňky tumoru uvolňují růstové faktory, zejména VEGF (vessel endothelial growth factor) k zajištění metabolických potřeb nádoru [87].

Pozitivní korelace mezi vertikálním rozměrem nádoru a krevní perfuzí, verifikovanou metodou LDF (laser doppler flowmetry), prokázal Srivastava [14].

V práci Hungera splňovalo stanovená kritéria malignity, tj. navýšení laserdopplerometricky naměřené perfuze proti okolí o 16 %, pouze 42 % maligních melanomů. Při použití digitální dermatoskopie splňovalo kritéria malignity 80 % maligních melanomů. Krevní perfuzi sledoval u 33 melanocytárních benigních lezí a 12 maligních lezí [88].

Ilias neprokázal statisticky signifikantní rozdíl mezi benigními a maligními lézemi, pokud hodnotil násobek prokrvení tumoru proti okolí. Naopak statisticky signifikantní rozdíl zjistil u procentuálního zastoupení počtu bodů s hodnotou perfuze větší než $2 \times SD$ (standardní odchylka) [89].

Stücker u maligních melanomů prokázal $3,6 \pm 1,5$ násobek perfuze proti okolní intaktní tkáni. Pro dysplastické névy byla elevace prokrvení $2,2 \pm 1,1$ a pro basaliomy $2,0 \pm 0,7$. Všechny maligní léze vykazovaly minimálně $1,8 \times$ vyšší perfuzi než okolí a při této hladině elevace perfuze pigmentové léze proti okolí udává senzitivitu testu 100 % a specificitu 85 %. Při determinaci mezi maligním melanomem a prekancerózou (dysplastický névus) klesá specificita testu na 48 %. Korelace mezi vertikálním rozměrem nádoru a elevací prokrvení ve své práci neprokázal. [90] Dále sledoval homogenitu perfuze. Plochu melanomu rozdělil

na 9 stejných regionů. V centrální části byla perfuze vyšší u melanomů, zatímco basaliomy vykazovaly homogenní prokrvení. [91]

V jiné práci Stücker prokázal zvýšený počet cév v histologickém vzorku oproti okolní zdravé tkáni, v případě melanomů $3,7 \pm 1,9$. Laserdopplerometricky však byla elevace perfuze $10,56 \pm 10,7$ x vyšší než ve zdravé okolní tkáni. V případě benigních melanocytárních lezí byl histologicky prokázán $1,7 \pm 0,9$ x vyšší počet kapilár než ve zdravé tkáni. Naměřená perfuze byla $2,7 \pm 3,5$ x vyšší než okolí. Nerovnoraměrnost těchto hodnot Stücker hodnotí jako funkční hyperémii. LDI však nerozliší, jaký je podíl hyperémie a neovaskularizace na zvýšení perfuze [92].

Studie dosud provedené sledovaly rozdílné parametry perfuze. Detekční limity, senzitivita testů a doporučení pro praxi jsou rozdílné. Předkládaná část práce se proto zaměřila na schopnost odhalit malignitu a také detektovat stádia indikovaná k biopsii sentinelové uzliny.

3. Cíle

3.1 LDI diagnostika hloubky popálení, monitorace vývoje ranné perfuze

Cílem práce byla monitorace prokrvení ranné plochy popáleninové rány v časném poúrazovém období a stanovení algoritmu pro indikaci k operační léčbě, tj. nekrektomii a dermoepidermální autotransplantaci během tohoto období. Indikace k operaci přímo souvisí se stanovením diagnózy hloubky popálení. Cílem bylo tedy určení perfuzní hranice mezi popálením charakteru „mid dermal burn“ (postihujícím polovinu dermis) a „deep dermal burn“ (postihujícím 2/3 dermis) nebo „full thickness burn“ (popálení III. stupně, postihující celou vrstvu dermis). Hojení a epitelizace termického poškození dermis, postihujícího cca polovinu její šíře, probíhá spontánně z vlasových folikulů a mazových žláz do 3 týdnů. Hlubší popálení zdolouhavě spontánně epitelizuje z okolí, s délkou hojení nad 3 týdny a s častým sekundárním rozpadem jizev nebo zcela postrádá schopnost spontánní epitelizace.

Dosavadní práce se zaměřovaly na použití LDI v prvních 5 poúrazových dnech. Hodnoty hraniční perfuze v tomto období jsou různé a také názory na využitelnost metody v prvních 48 hodinách se rozcházejí, viz. výše (kap. 2.3.3.4). V naší práci jsme hledali perfuzní hranici až

do 9. poúrazového dne. Dle zkušeností z vlastní klinické praxe přetrvává nejistota při hodnocení hloubky popálení také 6.-9. poúrazový den.

Tyto a další okolnosti přispěly k prozkoumání metody LDI při diagnostice hloubky popálení během 9 poúrazových dnů. V mnoha případech se pacienti dostávají na popáleninové centrum opožděně z primárních chirurgických pracovišť. Ne vždy je v době přijetí k dispozici lékař s dostatkem zkušeností pro hodnocení LDI skenů.

3.2 LDI diagnostika maligního melanomu

Cílem této části práce bylo ověřit schopnost laserdopplerometrie diagnostikovat maligní pigmentovou lézi a určit rozdíly mezi jednotlivými histopatologickými stádii. Jako srovnávací metoda bylo použito histologické vyšetření, které je považováno za standardní vyšetřovací metodu. Na popáleninovém centru FN Ostrava bylo od července 2011 do ledna 2015 provedeno 128 reoperací (reexcizí) pro nesprávnou diagnózu maligní pigmentové léze. Naše zkušenost s velkým počtem reexcizí, jakož i některé odborné práce potvrzující nepřesnost klinické diagnostiky až ve 40 % případů i při použití dermatoskopu [83], nedostupnost nákladných přístrojů s automatizovaným počítacovým vyhodnocením a vysokou diagnostickou přesnosti (confocal laser scanning microscopy, počítacová dermatoskopie) a naopak možnost libovolně využívat předoperačně LDI na pracovišti, nás vedly k myšlence použití LDI jako diagnostické metody, přestože výsledky dosavadních prací jsou kontroverzní.

4. Materiál a metodika

4.1 Diagnostika hloubky popálení

Studie zaměřená na diagnostiku hloubky popálení pomocí monitorace ranné perfuze metodou LDI byla studií prospektivní. Proběhla na Popáleninovém centru Fakultní nemocnice Ostrava od ledna 2010 do června 2014 a byla řádně schválena etickou komisí Fakultní nemocnice Ostrava.

4.1.1 Inkluzní, exkluzní kriteria

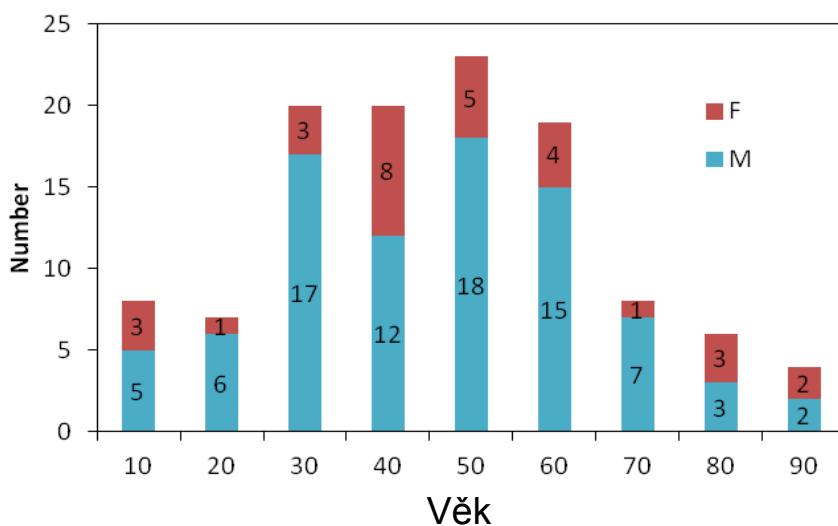
Do studie byli zařazeni pacienti s popálením klinicky nejednoznačným II.-III. stupně, kteří splňovali tato inkluzní kriteria: podepsaný informovaný souhlas, dobrá spolupráce pacienta, hospitalizace, normothermie před vyšetřením, histologické vyšetření v případě provedení operace.

Mezi exkluzní kriteria patří: nespolupracující pacient (jak děti, tak dospělí), febrilie či subfebrilie, jakékoliv makroskopické známky infekce (purulentní sekrece, zánětlivé změněná okolní kůže, známky lymfangoitidy či flegmóny, zněčištění rány), polytrauma, kožní onemocnění, např. psoriázou, sklerodermií a kortikosteroidní terapie.

4.1.2 Soubor pacientů

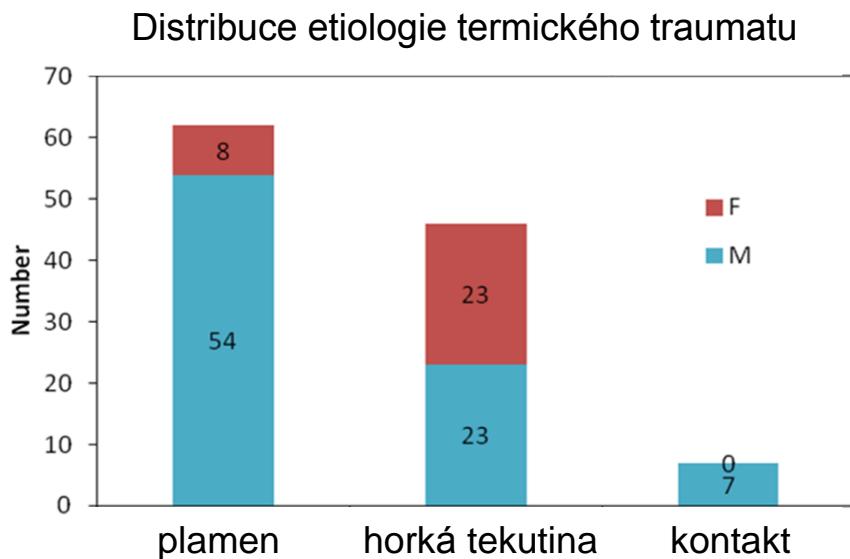
Skupina vyšetřených zahrnovala soubor 115 pacientů, 85 mužů (74 %), 30 žen (26 %). Průměrný věk pacientů byl 41,49 let (2-88). Průměrný věk mužů byl 44,59 let, žen 49,74 let. Distribuce pacientů dle věku ukazuje graf 1a. Jako mechanismus úrazu dominovalo, v 57 % případů, popálení plamenem, 37 % pacientů bylo opařeno a 6 % pacientů utrpělo popálení kontaktem s horkým předmětem, viz. graf. 1b. Průměrný rozsah popálení činil 8,8 % (0,5 % - 45 %) tělesného povrchu (TBSA).

Distribuce pacientů dle věku



Graf 1a

Distribuční křivka věku pacientů. Osa x znázorňuje jednotlivé věkové skupiny, osa y počet pacientů ve věkové skupině. Modře jsou označeni muži, červeně ženy.



Graf 1b

Etiologie termického úrazu. Na ose x jsou jednotlivé etiologické faktory, osa y představuje počet pacientů s daným mechanismem úrazu. Modře jsou označeni muži, červeně ženy. Predominantním mechanismem úrazu byl ožeh plamenem či vznícení oděvu.

4.1.3 Rány, časové intervaly

Pomocí LDI byla vyšetřena ranná perfuze u 148 ran, 115 pacientů. 63 ran bylo laserdopplerometricky vyšetřeno opakovaně s odstupem 48 hodin v různých dnech během 9 poúrazových dnů (viz. obr. 7 v kapitole výsledky). Datum a hodinu měření jsme zaznamenali a následně rozdělili naměřené hodnoty do jednotlivých dnů. Celkem bylo s pomocí LDI provedeno 268 měření během 9 poúrazových dnů. Počet vyšetřených ran činil 1. den 21, 2. den 32, 3. den 34, 4. den 36, 5. den 45, 6. den 38, 7. den 22, 8. den 22 a 9. den 19 ran.

Celé 9 denní poúrazové období bylo rozděleno na 4 časové intervaly na základě patofyziologických pochodů (rozvoj lokálního edému během 48 hodin), dosavadních prací a zjištěného vývoje perfuze. 53 ran bylo vyšetřeno do 2. poúrazového dne, interval byl pracovně nazván „Early perfusion“. Vyšetření v tomto intervalu je nejvíce kontroverzní právě díky lokálnímu edému kulminujícímu během prvních 48 hodin. 99 měření bylo provedeno od 3. do 5. poúrazového dne (interval byl nazván „Blood perfusion 1“). Tento interval je doporučován výrobci laserdopplerometrických zobrazovacích zařízení jako nejhodnější pro diagnostiku hloubky popálení. 60 ran bylo vyšetřeno v 6. a 7. poúrazovém dni (interval byl

nazván „Blood perfusion 2“), 41 ran bylo vyšetřeno 8. a 9. den (v intervalu nazvaném „Blood perfusion 3“). (viz. tabulka č. 1 v kapitole výsledky)

4.1.4 Průběh vyšetření, kategorizace pacientů

Pacienti byli vyšetřeni za pomocí LDI časně po přijetí, ne však v den úrazu z důvodu akutní bolesti a také psychologického traumatu. 2 lékaři se zkušeností při hodnocení LDI vyšetření prováděli měření a hodnocení skenů. Jiný lékař, popáleninový chirurg, určil terapeutický plán, tj. konzervativní či operační léčbu, bez znalosti výsledků LDI skenů. Pokud byl pacient nasměrován ke konzervativní terapii, celý proces hojení vyšetřované oblasti byl dokumentován fotograficky. V případě operační léčby byl histologicky vyšetřen peroperačně odebraný vzorek z centra vyšetřované oblasti. Histologické vyšetření stále zůstává zlatým standardem při diagnostice hloubky popálení [60, 61].

Popáleninové rány byly rozděleny do 2 skupin, dle stavu hojení 3 týdny po úrazu, tedy 21. poúrazový den nebo dle výsledku histologické analýzy v případě operace: 1) skupina zhojených (tzv. „Healed“) zahrnovala pacienty s prokazatelně zhojenou měřenou plochou do 21. poúrazového dne. 2) skupina nezhojených (tzv. „Nonhealed“) zahrnovala rány bez známek reepitelizace ve skenované oblasti 21. poúrazový den nebo rány podstupující operaci s histologickým nálezem hlubokého popálení. Pro histologickou analýzu bylo použito barvení hematoxylinem-eosinem.

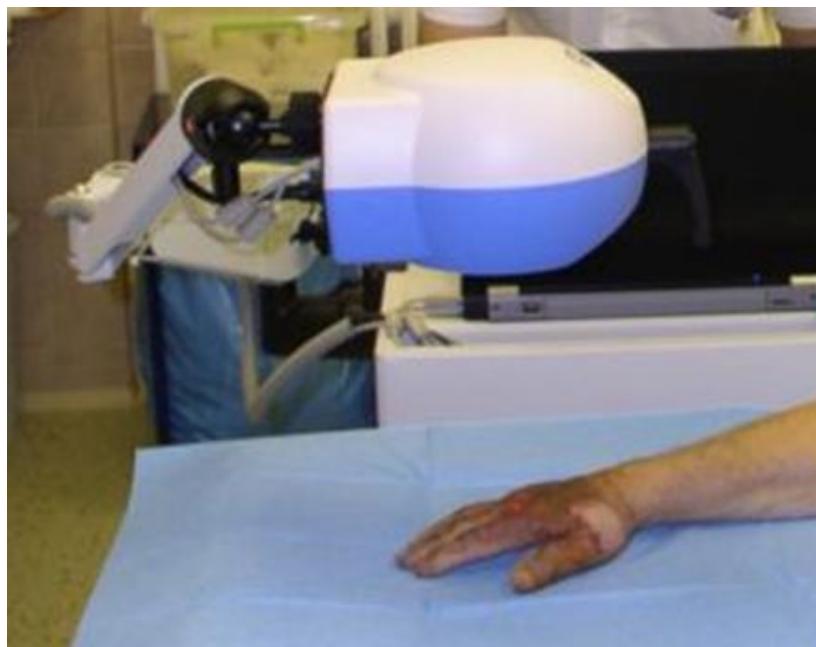
Vyšetření bylo prováděno během převazů, po sejmutí obvazů a očištění rány od zbytků nekrotické epidermis a lokálního léčiva, v místnosti s konstantní teplotou 22 °C, relativní vlhkostí 30-50 %, za denního světla. Jednotlivé měření trvalo přibližně 2 minuty, v závislosti na velikosti skenované oblasti.

Převazy i měření ranných ploch probíhalo v dopoledních hodinách. K lokální léčbě byly používány silversulfadiazine (Dermazine) nebo polyvinylpyrrolidon iodine (Betadine). Rány ošetřované Dermazinem byly pečlivě očištěny od zbytků lokálního léčiva, z důvodu prokázaného vlivu na absorpci laserového diagnostického paprsku. [5]

Opakovaná měření, i po několika dnech, jsme prováděli vždy ve stejně oblasti a za stejných fyzikálních podmínek (obr. 7 v kapitole výsledky). K dosažení identické lokalizace během měření jsme využili okrajů rány, které byly vždy porovnány s předchozím skenem a simultánně pořízenou fotografickou dokumentací. Rozměry a rozlišení LDI skenů byly rovněž identické pro jednotlivé rány.

4.1.5 Instrumentárium

Pro měření perfuze ranné plochy byl použit Laserdoppler imager, PIM III (Perimed AB, Stockholm) (obr. 2), který má zabudovaný digitální fotoaparát. Skenovací laserový paprsek o vlnové délce 640 nm, výkonu 1 mW, hloubky penetrace 1mm, skenuje vyšetřovanou oblast, s roztečí 1-2 mm mezi meřenými body, které jsou barevně kódovány (viz. kap. 2.2). Skener setrvá v každém bodě několik milisekund, což do jisté míry eliminuje pohybové artefakty (např. dýchací pohyby). Měřená oblast měla velikost průměrně 150 cm^2 , se 4300 vyšetřovanými body (maximální velikost skenu 2500 cm^2 s 65000 body). Pozice hlavice skeneru během vyšetření byla rovnoběžná s povrchem těla, z důvodu dosažení optimální intenzity zpětně odražených paprsků [5]. Hlavice skeneru a povrch rány byly při měření vzdáleny 15-20 cm.



Obr. 2

LDI bezkontaktní skener PIM III firmy Perimed AB (Stockholm) během skenování vyšetřované oblasti na hřbetu ruky. Vzdálenost mezi skenerem a vyšetřovanou plochou je 20 cm.

Při diagnostice prokrvení ranné plochy jsme volili rozsah barevné škály od 0 do 480 PU, (obr. 5,6,7,8 v kap. výsledky).

Přístroj PIM III je vybaven softwarem PIM soft, který umožňuje graficky (bílou čarou), ohrazenit na barevném skenu oblast zájmu (obr. 5,6,7 kap. výsledky), tzv. ROI (region

of interest) a následně provést základní charakteristiku souboru všech naměřených a ohrazených bodů. Software zobrazí Count (počet bodů uvnitř ROI), Mean, Median, SD (standardní odchylka) a čas pořízení skenu. V případě označení více oblastí zájmu ROI v jednom skenu nabídne software funkci Change (rozdíl průměrné perfuze mezi jednotlivými oblastmi) a Change % (procentuální rozdíl průměrné perfuze jednotlivých ROI). Pro hodnocení ranné perfuze plochy byla vzata v úvahu průměrná perfuze (Mean).

LDI skeny byly pečlivě porovnány s klinickým vzhledem rány při označování oblasti zájmu. Při hodnocení LDI skenů byl vyloučen z oblasti zájmu fyziologický zánětlivý lem, patrný při okraji hlubokých popálených ploch. Zánětlivý lem by výrazně ovlivnil průměrnou rannou perfuzi (obr. 6, kapitola výsledky). Dále byly z LDI skenu vyloučeny bully, imituující popálení III. stupně.

4.1.6 Analýza dat

Data byla analyzována za pomocí statistického softwaru IBM SPSS verze 18. Analyzovali jsme rozdíly v ranné perfuzi mezi oběma skupinami pacientů „Healed“ a „Nonhealed“ (viz kap. 4.1.4) ve všech sledovaných časových intervalech. Použit byl mediánový test. Ke stanovení statistické signifikance pro všechny analýzy byla určena oboustranně hladina významnosti $P = 0,05$.

Pro získání cut off hodnot ranné perfuze, s optimální sensitivitou a specificitou pro záchyt ran indikovaných k operaci (tedy popálení IIb char. „deep dermal burn“ a III. stupně) a jejich oddiferencování od povrchních ran (popálení II. stupně charakteru „superficial dermal“ a „mid dermal burn“) jsme provedli ROC analysu (tab. 2, kapitola výsledky).

4.2 LDI diagnostika maligního melanomu

4.2.1 Soubor pacientů

Celkem bylo od září 2012 do prosince 2014 vyšetřeno laserdopplerometricky 69 pacientů s lézemi klinicky suspektními na malignitu, nebo benigními v lokalizacích exponovaných slunečnímu záření, či chronicky mechanicky traumatizovaných se zvýšeným rizikem maligního

zvratu. Tyto léze byly odeslány na naše pracoviště melanomovou komisí a spádovými dermatology za účelem provedení excise a histologického vyšetření. Mezi vyšetřenými pacienty bylo 43 mužů (62,3 %) a 26 žen (37,7 %). Průměrný věk pacientů byl 62 let (14-86), u mužů 61 let (14-86), u žen 63 let (15-78). U mužů převažovala lokalizace pigmentové léze na trupu (62 %), u žen převažovala lokalizace na dolních končetinách (50 %).

Podmínkou pro zařazení do studie byla spolupráce pacienta během vyšetření LDI skenerem, informovaný souhlas podepsaný pacientem nebo zákonným zástupcem, normothermie pacienta při vyšetření. Ze studie byli vyřazeni pacienti po mechanickém podráždění okolí, např. v rámci předoperační přípravy operačního pole, pacienti po intrakutánní aplikaci koloidu Tc do okolí nádoru v rámci scintigrafického vyšetření sentinelové uzelny (ještě před vyšetřením laserdopplerem), pacienti se zánětlivým kožním onemocněním nebo medikující kortikosteroidy.

Nejpozději do 24 hodin od vyšetření přístrojem LDI byla provedena operace, excise znaménka, sutura okrajů kůže, nebo krytí defektu dermoepidermálním kožním štěpem a místním kožním lalokem. Dle doporučení dermatologa podstoupil pacient také scintigrafickou detekci sentinelové uzelny s její následnou biopsií. Operace probíhala jak v celkové, tak místní okrskové anestezii, dle radikality operace.

4.2.2 Histologické vyšetření.

Perioperačně odebraný vzorek tkáně byl vyšetřen histologicky. V histopatologickém hodnocení jsme sledovali maximální šíři nádoru v mm dle Breslowa a anatomickou hloubku invaze nádoru, dle postižené vrstvy kůže (hodnocení dle Clarka). V případě vyšetření sentinelových uzelny byla hodnocena přítomnost metastatických melanomových buněk. Na základě histologického vyšetření byli pacienti rozděleni do 2 základních skupin, maligní nádory a benigní kožní léze. Maligní kožní nádory byly dále rozčleněny do podskupin dle Clarkovy klasifikace. Toto rozčlenění do podskupin vychází z rozdílného cévního zásobení jednotlivých vrstev kůže, do kterých tumor prorůstá. Jsou to tyto podskupiny: 1. melanoma in situ, 2. melanomy ve stádiu Clark II, 3. melanomy ve stádiu Clark III, 4. melanomy ve stádiu Clark IV, V. 5. zvláštní skupinu tvořily basaliomy, nádory vycházející z basálních buněk epidermis.

4.2.3 LDI vyšetření

K vyšetření byl opět použit Laserdoppler Imager PIM III (Perimed AB, Stockholm). Pacienti byli skenování ve vysokém rozlišení, s roztečí jednotlivých měřených bodů 0,5 mm. Skenovací hlavice byla nastavena rovnoběžně s tělesným povrchem, ve vzdálenosti 8,5 - 12 cm od povrchu. Vyšetřovaný objekt jsme umístili do středu skenovaného pole. Skenovaná oblast měřila průměrně 20 cm^2 a byla vyšetřena při vysokém rozlišení skenu (high resolution) přibližně za 3 minuty. Počet měřených bodů byl průměrně 8000.

Vyšetření probíhalo v místnosti s teplotou 22°C , relativní vlhkostí 30-50 %, za denního světla. Minimálně 1 hodinu před vyšetřením se pacienti nacházeli v prostředí se stejnými fyzikálními podmínkami.

Na LDI skenu pacienta jsme vyznačili vždy 2 oblasti zájmu (ROI). ROI č.1 (inside-zkráceně in) ohraničovala samotnou kožní eflorescenci v celém svém rozsahu. Na obr. 10, 11 (viz. kapitola výsledky) je vyznačena oblast zájmu ROI 1 bílou čárou a číselným indexem. ROI č. 2 (outside-zkráceně out) ohraničovala celou okolní oblast. Ovladací software LDI vyhodnotil analýzou všech měřených bodů v každé ROI oblasti Mean in, out, Median in, out, standardní odchylku (SD in,out), rozdíl středních hodnot Change of the Mean, Change of the Median (out-in) a % Change of the Mean, % Change of the Median (out-in)/in.

Při diagnostice maligních onemocnění, se zachovanou epidermis in situ, jsme zvolili rozsah stupnice 240 PU (obr. 9,10,11 v kapitole výsledky).

4.2.4 Analýza dat

Po obdržení histologie jsme pigmentové léze rozdělili na maligní a benigní. Následně byla provedena korelační analýza malignity s popisnými charakteristikami souboru a s parametry perfuze naměřenými laserdopplerometricky. U obou skupin byla sledována diference v těchto ukazatelích: pohlaví, věk, lokalizace, detekce proliferační aktivity Ki 67 $> 5\%$, přítomnost zvýšeného prokrvení kožní eflorescence proti okolí, podíl průměrné perfuze nádoru a okolí, rozdíl průměrné perfuze léze a okolí (Change of mean), rozdíl medianů perfuze léze a okolí (Change of median), median perfuze uvnitř léze (Median in) i vně léze (Median out), průměr perfuze uvnitř léze (Mean in) i v okolí (Mean out), standardní odchylka uvnitř léze (SD in) a v okolí (SD out).

Mezi podskupinami, stádii maligních melanomů, jak jsou uvedeny v kap. 4.2.2, byla sledována diference v následujících parametrech: pozitivita zvýšené perfuze proti okolí, podíl perfuze nádoru a okolí (násobek prokrvení), rozdíl průměrné perfuze nádoru a okolí (Change of mean), rozdíl medianů perfuze nádoru a okolí (Change of Median), Median in, out, Mean in, out, standardní odchylka SD in, out.

Pro parametr % Change of Mean (out-in)/in jsme provedli ROC analýzu za účelem získání optimální cut off hodnoty pro predikci malignity a dále pro predikci melanomu ve stádiu Breslow 1 mm a více a Clark II-IV. Analyzována byla také korelace mezi vertikálním rozměrem nádoru dle Breslowa a násobkem prokrvení dle LDI.

Data byla analyzována ve statistickém programu IBM® SPSS® Statistics version 22. K posouzení závislosti mezi nálezem malignity a kvantitativními proměnnými (parametry prokrvení, věk) byl použit Mann-Whitney U test. Závislost mezi malignitou nálezu a kvalitativními parametry (lokalita nálezu, pohlaví pacienta) byla posouzena pomocí Fisherova přesného testu. K analýze závislosti mezi parametry perfuze a stádiem tumoru byl použit Kruskal-Wallisův test a Mann-Whitney U post hoc test. U porovnávání násobku prokrvení tumoru a okolí byla provedena Bonferroniho korekce signifikance. K porovnání mužů a žen podle věku byl použit Mann-Whitney U test, v kategoriálních parametrech byl použit Chí-kvadrát test, resp. Fisherův přesný test. Normalita dat byla testována pomocí Shapiro-Wilk testu. Všechny testy byly dělány na hladině signifikance 0,05.

5. Výsledky

5.1 LDI diagnostika hloubky popálení

V 1.skupině, zhojených do 21.dne „Healed”, se ocitlo celkově 90 ran: 23 ran bylo zhojeno do 2 týdnů, 67 ran se zhojilo až ve 3. týdnu. Do 2. skupiny, nezhojených „Nonhealed”, bylo zařazeno 58 ran: 43 ran podstoupilo chirurgickou léčbu, tedy nekrektomii a dermoepidermální autotransplantaci s histologickým vyšetřením termicky poškozené tkáně, 15 ran bylo léčeno konzervativně, délka jejich hojení přesáhla 21 dnů a průměrně činila 28,2 dny (23-34). Tabulka č. 1 ukazuje počet vyšetřených ran v každé časové periodě a střední hodnoty jejich perfuze.

	Healed	Nonhealed	p-value
Early Perfusion			
Počet	32	21	< 0.0005
Mean	249	96	
Median	207	85	
Blood perfusion 1			
Počet	64	35	< 0.0005
Mean	338	98	
Median	281	88	
Blood perfusion 2			
Počet	36	24	< 0.0005
Mean	434	99	
Median	433	102	
Blood perfusion 3			
Počet	23	18	< 0.0005
Mean	645	103	
Median	668	84	

Tab. 1

Počet ran ve 4 časových inervalech u 2 skupin pacientů: „healed”, zhojených do 21 dnů, „nonhealed”, nezhojených do 21 dnů či operovaných a jejich střední hodnoty perfuze. „Early perfusion”, (do 2. PTD), „Blood perfusion 1” (3. až 5. PTD), „Blood perfusion 2” (6. a 7. PTD), „Blood perfusion 3”(8. a 9. PTD). Rozdíly mezi skupinami „healed” a „nonhealed” jsou statisticky signifikantní.

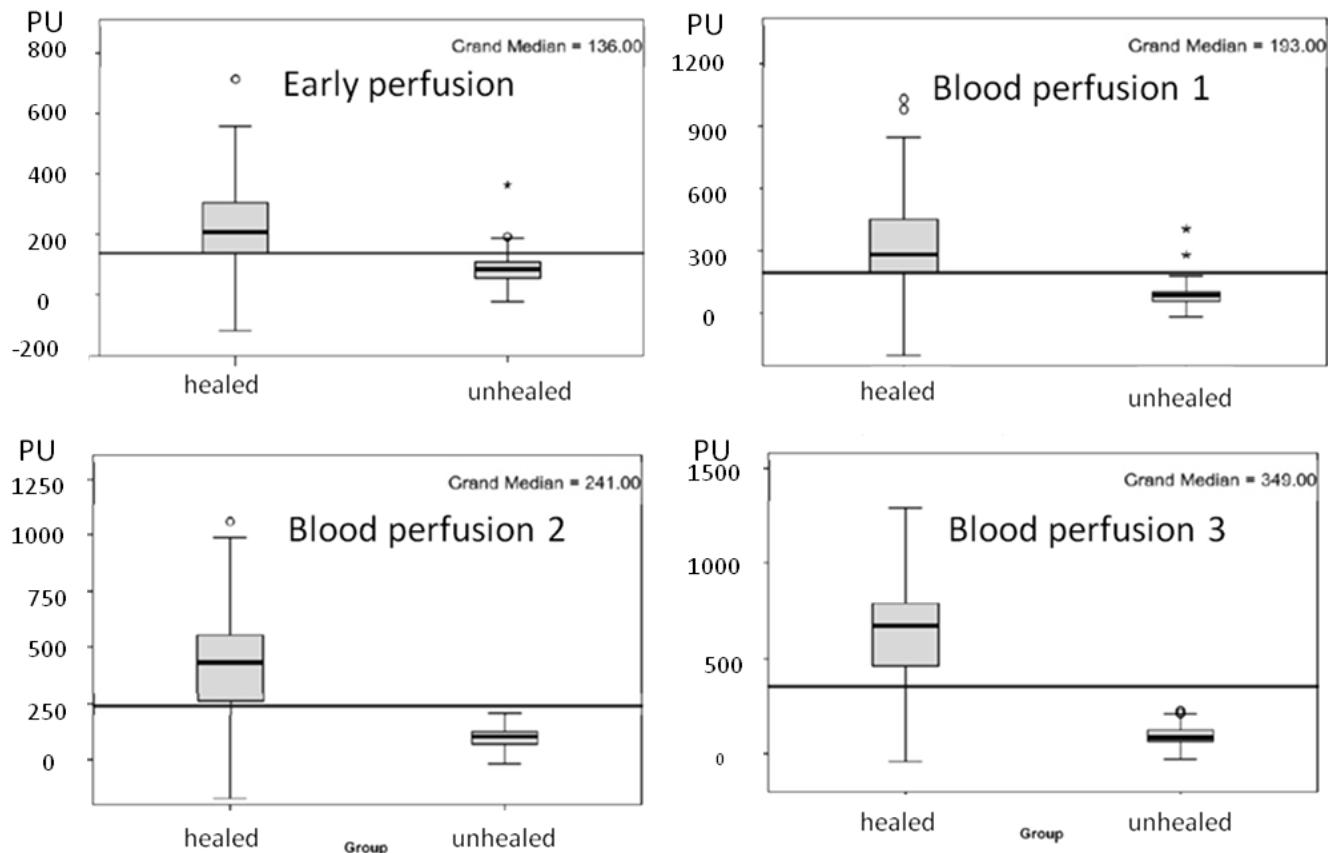
Mezi oběma skupinami pacientů, „Healed” a „Nonhealed”, byla prokazatelně rozdílná perfuze ve všech sledovaných časových intervalech během 9 poúrazových dnů, „Early perfusion, Blood perfusion 1, Blood perfusion 2, Blood perfusion 3” ($P<0,0005$, graf č. 2).

Cut off hodnotu perfuze pro indikaci k chirurgické léčbě, s uspokojivou hodnotou sensitivity a specificity, nebylo možné stanovit pro 1. a 2. poúrazový den, interval nazvaný „Early blood perfusion”. V tomto intervalu se hodnoty perfuze z 1. i 2. skupiny ran překrývaly.

Cut off hodnota perfuze pro druhý interval, od 3. do 5. poúrazového dne („Blood perfusion 1”), pro indikaci k operaci, byla stanovena na 148,5 perfuzních jednotek (PU), se senzitivitou 94 %, specificitou 95 %.

Cut off hodnota perfuze pro třetí interval, tedy 6. a 7. poúrazový den (interval „Blood perfusion 2”), byla stanovena na 186 PU, se senzitivitou 100 % a specificitou 94 %.

Cut off hodnota pro indikaci k operaci pro čtvrtý interval, 8. a 9. den (interval „Blood perfusion 3“), byla stanovena na 269,5 PU. Senzitivita i specificita testu byla 100 %. Tyto hodnoty jsou shrnuty v tab. 2.



Graf 2

Kvartilový box graf perfuze 2 skupin pacientů. Sloupce na ose X znázorňují pacienty zhojené do 21 dnů „healed“ a nezhojené do 21 dne nebo operované „unhealed“. Jednotlivé grafy představují 4 časové intervaly „Early perfusion, Blood perfusion 1, Blood perfusion 2, Blood perfusion 3“. Osa Y znázorňuje počet perfuzních jednotek, patrná je statisticky signifikantní diference v hodnotách perfuze mezi oběma skupinami pacientů.

	Area	p	Cut off hodnota	Positivní Indikace	Negativní Indikace	Sens %	Spec %
Blood Perfusion 1	0.944	< 0.0005	148.5	35	64	94.3	95.3
<							
Blood Perfusion 2	0.986	< 0.0005	186.0	24	36	100.0	94.4
<							
Blood Perfusion 3	1.00	< 0.0005	269.5	18	23	100.0	100.0
<							

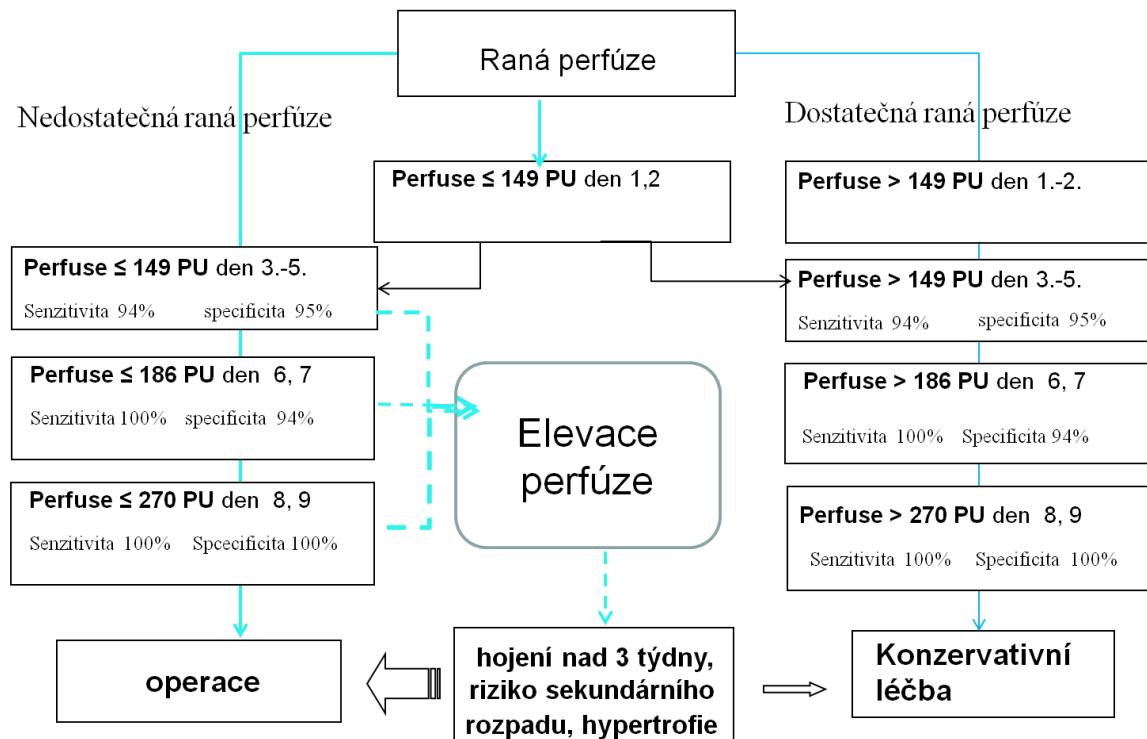
Tab. 2

ROC Analysa ve 3 časových intervalech: 3.-5. den "Blood Perfusion 1", 6.-7. den "Blood Perfusion 2", 8.-9. den "Blood perfusion 3". Area: plocha pod křivkou; p: hladina signifikance pro nulovou hypotézu: Area = 0,5; Cut off hodnota: hodnota pro indikaci k operaci; Positivní indikace: počet pacientů indikovaných k operaci; Negativní indikace: počet pacientů indikovaných ke konzervativní léčbě; Sens %: sensitivita (%); Spec %: specifickita (%).

Pacienti v 1. skupině vykazovali signifikantně vyšší nárůst perfuze ve 3. intervalu (6.-7. poúrazový den) a 4. intervalu (8. a 9. posttraum.den-PTD), a to ve srovnání s 2. intervalem, t.j. 3.-5. poúrazový den (P=0,018 a P<0,0005, použit Friedmanův test a párový test). Z této skutečnosti vyplývá, že s přibývajícími poúrazovými dny se rychleji mění ranná perfuze. Rány ve 2. skupině „Nonhealed“ vykazují v průběhu sledovaného období minimální, nebo žádnou elevaci.

Na základě stanovených cut off hodnot byl sestaven algoritmus pro určení typu léčby dle naměřené perfuze. Rány s nižší perfuzí prvních 48 hodin po úrazu je nutné skenovat opakováně v následujícím časovém intervalu. Rány s vyšší perfuzí než 148,5 PU v časném poúrazovém období lze indikovat ke konzervativní terapii. Pokud v následujícím časovém intervalu perfuze přesáhné cut off hodnoty, lze rány ponechat ke konzervativní terapii, v opačném případě je indikována operace, viz obr. 3.

Při podcenění nedostatečné perfuze a nesprávné indikaci ke konzervativní léčbě je estetický výsledek nepříznivý. Srovnání obou způsobů léčby u popálení s nedostatečnou perfuzí (char. „deep dermal burn“) ukazuje obr. 4.

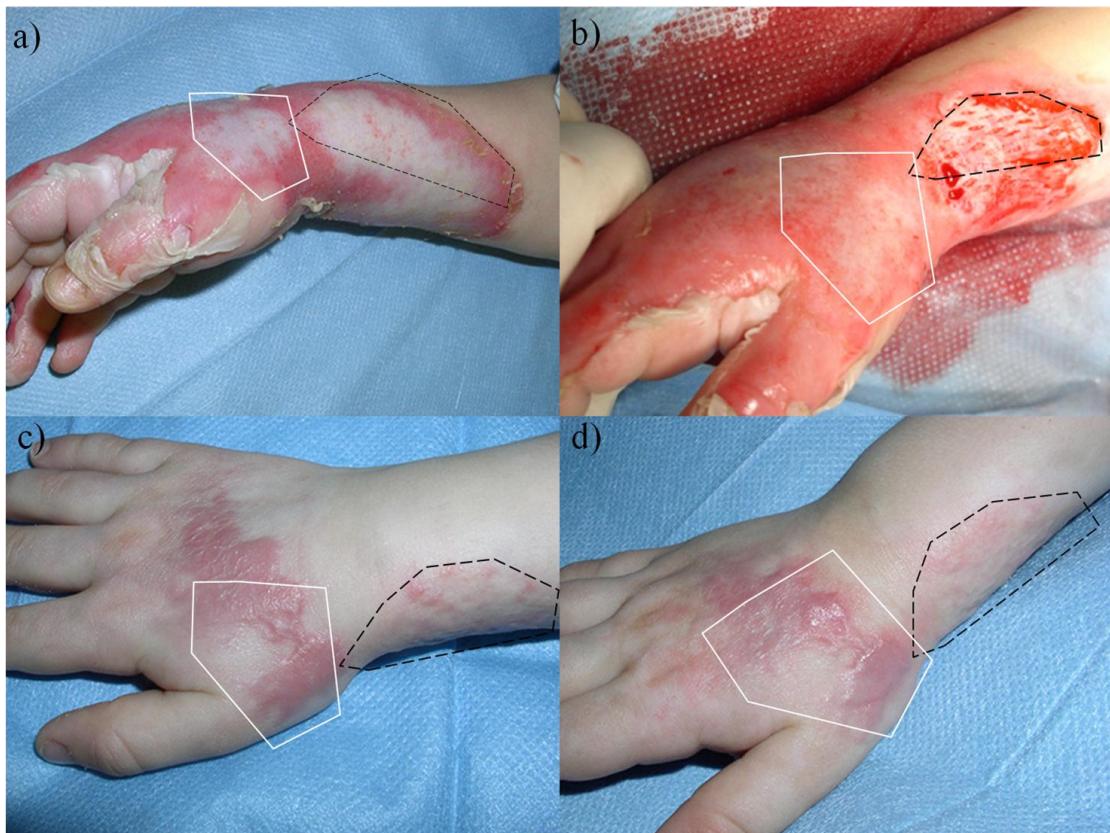


Obr. 3

Rozhodovací algoritmus při plánování terapie na základě ranné perfuze. Rány s nedostatečnou perfuzí jsou v levé větvi, která směřuje k provedení operace. Rány s dostatečnou perfuzí jsou v pravé větvi, která směřuje ke konzervativní terapii. Rány s perfuzí nižší než 148,5 PU v prvních 48 hodinách, ve středním sloupci, podstupují další měření, které je následně zařadí do levé (operace) či pravé větve (konzervativní léčba). Na základě elevace perfuze se rány z levého sloupce mohou ocitnout zpět ve středu celého diagramu, který, za jistých okolností (malý rozsah rány), umožní konzervativní způsob léčby s délkou hojení nad 3 týdny a rizikem komplikací, preferovaný způsob léčby je proto operace.

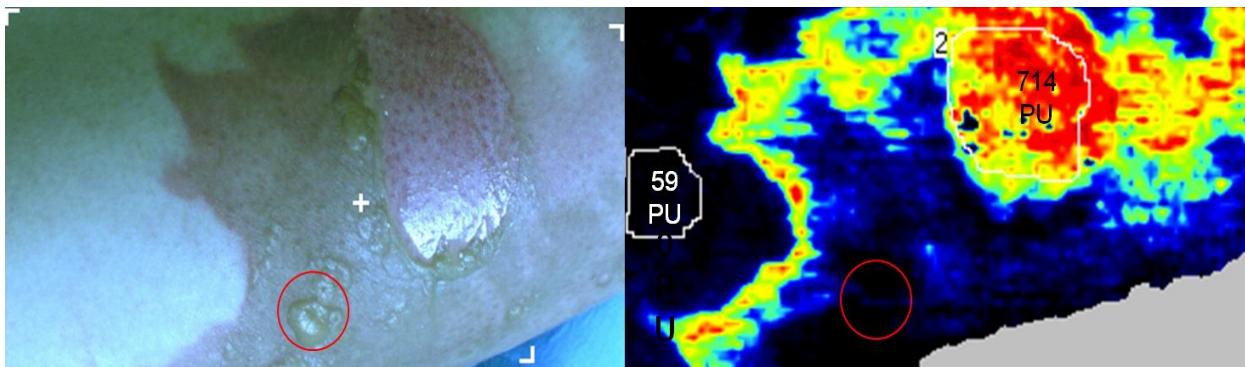
Na základě 2 měření, trendu vývoje perfuze a jejich vztahu ke cut off hodnotám lze určit blíže typ rány a tím predikovat dobu hojení. Plochy III. stupně nevykazují žádnou elevaci a nepřesáhnou v žádném intervalu cut off hodnotu (obr. 6). Plochy hlubokého dermálního poranění („deep dermal burn“, obr. 4) vykazují elevaci perfuze, nedosahují však určených cut off hodnot v žádném intervalu. Jejich spontánní zhojení je event. možné za 4-6 týdnů, se zmíněnými komplikacemi (sekundárním rozpadem, nedostatečnou mechanickou odolností a kontrakcí jizev). Plochy IIb stupně charakteru „mid dermal burn“ vykazují v prvních 48 hodinách nízkou perfuzi, po tomto intervalu se již dostávají nad hodnoty cut off a délka jejich hojení trvá do 3 týdnů (viz. obr. 7). Plochy charakteru IIa stupně („superficial dermal burn“)

vykazují vysokou perfuzi již v prvních 48 hodinách (viz obr. 5) a perfuze dále narůstá až do 5. dne, délka hojení je 10-14 dnů. V naší práci jsme skenovali také popálení I. stupně, vyjádřené reaktivní hyperémií, po aplikaci cévního laseru na cévní kožní lézi char. naevus flammeus. Termokoagulační efekt je patrný uvnitř spotů, reaktivní hyperémie v okolí spotů (viz obr. 8). Trend vývoje perfuze je důležitý prognostický faktor a je specifický pro obě skupiny pacientů (graf č. 3).



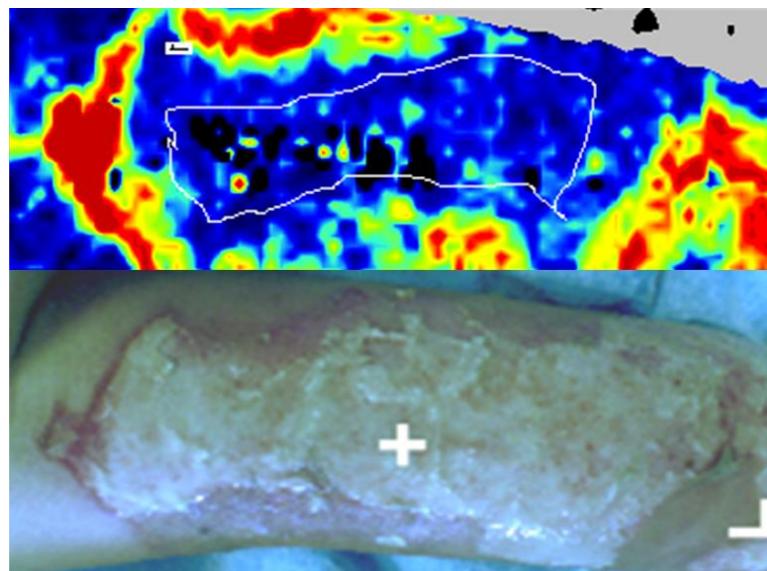
Obr. 4

Porovnání konzervativního a operačního způsobu léčby u pacienta s popálením IIb stupně, charakteru „deep dermal burn“, s nedostatečnou rannou perfuzí. Bílou čárou označená oblast hřbetu pr. ruky je ponechána ke spontánnímu zhojení (z „estetického hlediska“ na žádost rodičů), délka hojení této oblasti byla 4 týdny. Černou čárou ohrazená oblast na zápěstí byla léčená chirurgicky. a) předoperační snímek s hlubokým dermálním popálením na zápěstí i hřbetu ruky, b) perioperační foto, na zápěstí provedena nekrekтомie a následně přiložen kožní štěp, c) 3 měsíce po úrazu je patrná hypetrofická jizva na hřbetu ruky a výrazně lepší textura jizvy na zápěstí. d) 6 měsíců po úrazu je na hřbetu ruky stále hypetrofická jizva, rudá, 1-2 mm nad úroveň okolí, ohebná pod tlakem, na zápěstí je jizva bledá, normální pigmentace, v úrovni okolí, měkká.



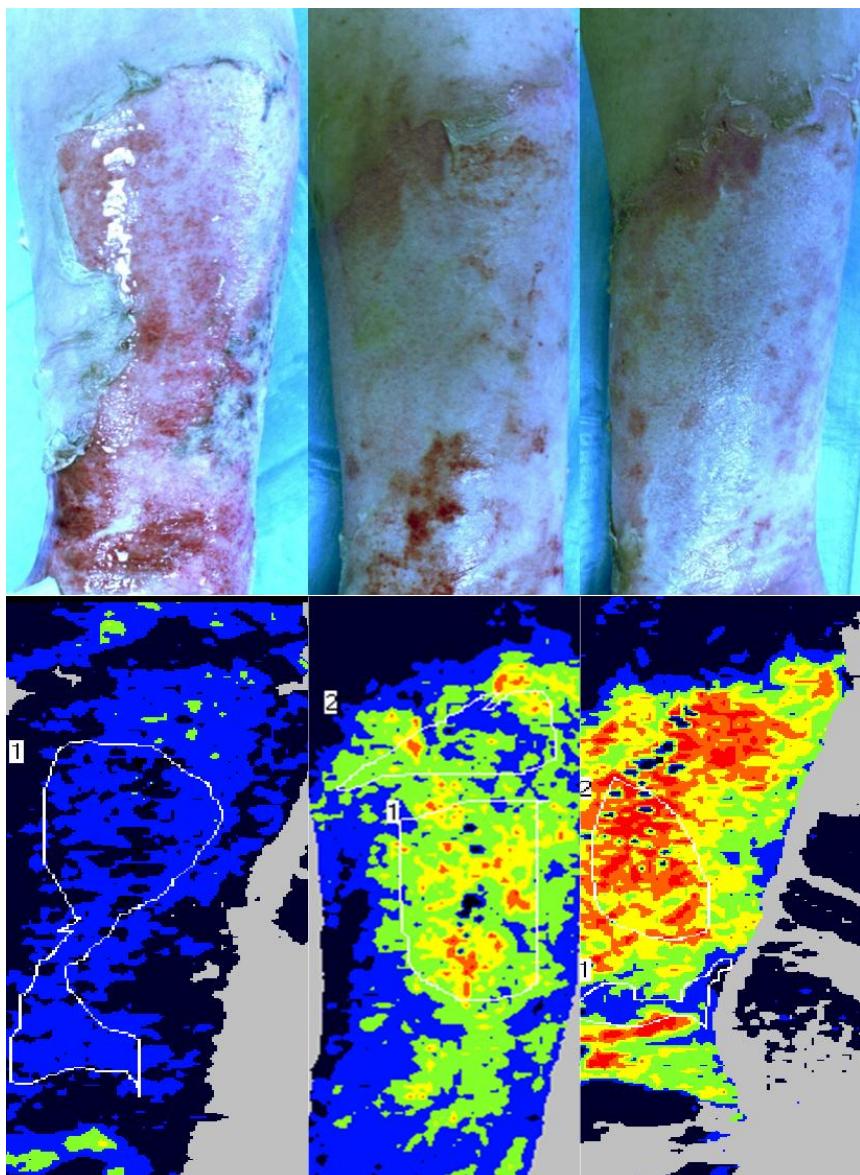
Obr. 5

Povrchní popálení IIa stupně charakteru „superficial dermal burn“, zasahující do papilární dermis. Vlevo je fotografie rány s drobnými bullami a centrálně již strženou krytbou, vpravo topograficky odpovídající perfuzní sken. Pro IIa stupeň je charakteristická vysoká perfuze ranné plochy bez krytby (714 PU), na skenu červená barva. V místě ponechání krytby je perfuze falešně nízká, stejně jako u intaktní kůže (59 PU), bulla je označena červeným kruhem, bílé nepravidelné čáry ohraničují oblast zájmu (ROI).



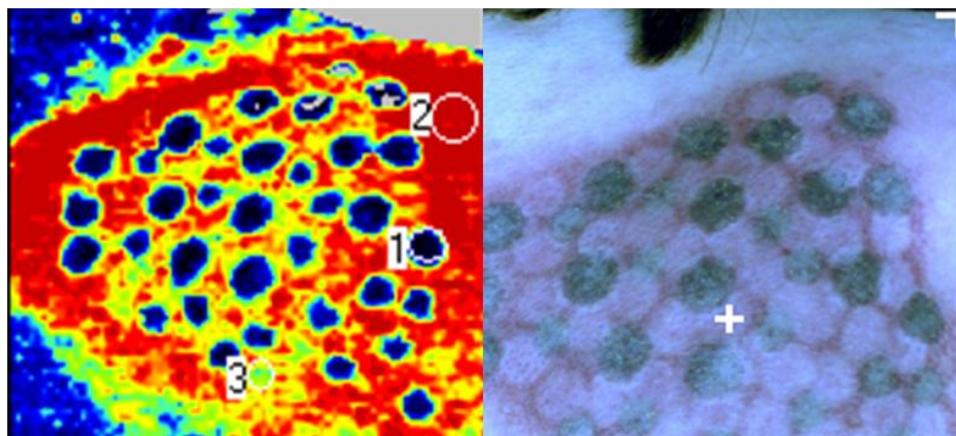
Obr. 6

Popálení III. stupně, zachycené 5. poúrazový den. Dole: fotografie rány na paži, křížek označuje střed skenu, obrácené L označuje pravý dolní roh skenované oblasti. Nahoře: perfuzní sken topograficky indentické oblasti. Fyziologický zánětlivý lem (červené barvy) kolem popálení III. stupně, bílá čára uvnitř zánětlivého lemu označuje oblast zájmu, která vykazovala průměrnou perfuzi 92 PU. Při zavzatí zánětlivého lemu do oblasti zájmu je perfuze falešně vysoká (224 PU).



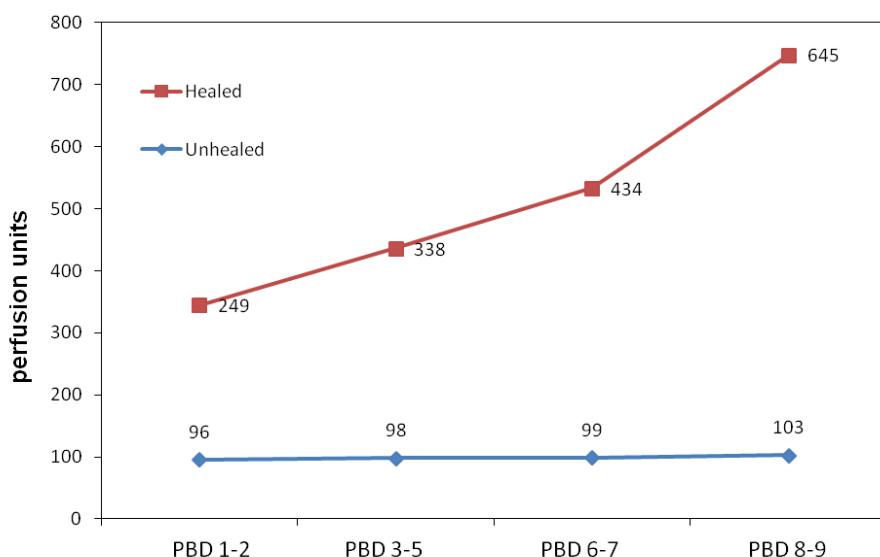
Obr.7

Popálení IIb stupně, char. „mid dermal burn“. Nahoře: foto popálení IIb st. na předloktí způsobené ožehem plamenem, snímky zachycují ránu 1., 3. a 5. poúrazový den, makroskopicky není patrný klinický vývoj ploch. Dole: LDI skeny s patrnou elevací prokryvení v průběhu hojení, skeny pořízeny 1., 3. a 5. poúrazový den, naměřená perfuze byla 170, 465 a 668 PU. Tenká nepravidelná čára na skenech ohraničuje oblast zájmu, je označena číslem v bílém poli při obvodu oblasti.



Obr. 8

Pacient s naevus flammeus na pravé lopatce, po ošetření cévním Laserem Candella V beam Perfecta, s reaktivní hyperémií char. popálení I. stupně. Vpravo: fotografie cévní léze, bílý křížek označuje střed skenu, obrácené L pravý horní roh skenu. Vlevo: barevný sken topograficky identické oblasti. Na jednotlivé spoty aplikována energie $9\text{J}/\text{cm}^2$ po dobu 1,5 ms, velikost spotu 10 mm, v okolí spotů je patrná výrazná reaktivní hyperémie-popálení I. stupně, která odezněla během 4 dnů (označeno č. 2 na LDI skenu-červená barva, 684 PU), v centru spotů je naopak destrukce kapilár termokoagulačním efektem (označeno č. 1 na LDI skenu - tmavě modrá barva, 89 PU). Číslem 3, zelenou a žlutou barvou, je označeno místo předchozího ošetření (před 8 týdny).



Graf 3

Vývoj perfuze na základě průměrných hodnot ve 4 časových intervalech. Osa X znázorňuje použitazové dny, osa Y perfuzní jdenotky. Patrný je vzestupný trend ve skupině zhojených „healed”, stagnující perfuze ve skupině nezhojených (operovaných, či konzervativně léčených déle než 3 týdny) „nonhealed”.

5.2 LDI detekce maligního melanomu

Z celkového počtu 69 pacientů bylo histologicky potvrzeno 46 maligních a 23 benigních lézí. V histopatologickém stádium Clark I bylo zachyceno 13 (28,3 %) pacientů, Clark II 6 (12,9 %) pacientů, Clark III 14 (30,4 %) pacientů, Clark IV 7 (15,2 %) pacientů a Clark V 1 pacient (2,2 %), bylo vyšetřeno také 5 basaliomů (10,9 %) imitujících pigmentovou lézi., viz. tab. 3.

	Celý soubor	Muži	Ženy	P
Počet pacientů	69	43 (62,3 %)	26 (37,7 %)	
Věk	62,0 (14-86)	61,0 (14-86)	63,0 (15-78)	0,616
Typ léze				
benigní	23 (33,3 %)	13 (30,2 %)	10 (38,5 %)	0,600
maligní	46 (66,7 %)	30 (69,8 %)	16 (61,5 %)	
Clark I	13 (28,3 %)	5 (16,7 %)	8 (50,0 %)	
Clark II	6 (13,0 %)	5 (16,7 %)	1 (6,3 %)	
Clark III	14 (30,4 %)	11 (36,7 %)	3 (18,8 %)	
Clark IV	7 (15,2 %)	5 (16,7 %)	2 (12,5 %)	
Clark V	1 (2,2 %)	1 (3,3 %)	0 (0 %)	
Basaliom	5 (10,9 %)	3 (10,0 %)	2 (12,5 %)	
Lokalita				
hlava	7 (10,1 %)	5 (11,6 %)	2 (7,7 %)	
trup	34 (49,3 %)	27 (62,8 %)	7 (26,9 %)	0,005
HK	9 (13,0 %)	5 (11,6 %)	4 (15,4 %)	
DK	19 (27,5 %)	6 (14,0 %)	13 (50,0 %)	
Lokalita maligní léze				
hlava	2 (4,3 %)	2 (6,7 %)	0	
trup	22 (47,8 %)	20 (66,7 %)	1 (6,7 %)	< 0,0001
HK	7 (15,2 %)	4 (13,3 %)	3 (20,0 %)	
DK	15 (32,6 %)	4 (13,3 %)	11 (73,3 %)	
Zvýšené prokrvení	43 (62,3 %)	30 (69,8 %)	13 (50,0 %)	0,127
Pozitivita uzlin	2 (2,9 %)	2 (4,7 %)	0	0,523
Ki 67 > 5%	38 (55,1 %)	23 (53,5 %)	15 (57,7 %)	0,806

Tab. 3.

Popisné charakteristiky souboru pacientů, rozdíly mezi oběma pohlavími: statisticky signifikantní je diference v lokalitě výskytu pigmentových lézí u mužů a žen a diference v lokalitě výskytu maligních lézí u mužů a žen. U mužů převažuje výskyt malignit na trupu (66,7 %), u žen výskyt malignit na dolních končetinách (73,3 %).

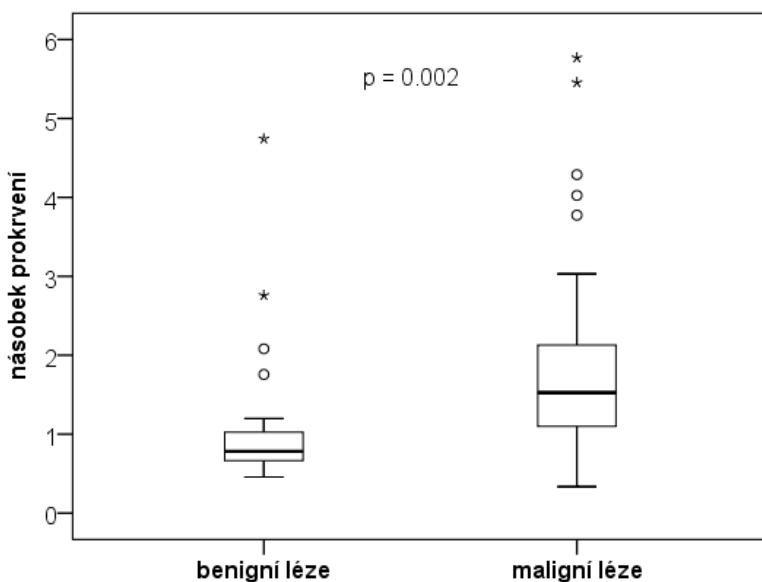
Korelace malignity se sledovanými parametry (viz. tab. 3,4):

Lokalizace: výskyt maligních melanomů na trupu byl signifikantně častější u mužů (66,7 %), než u žen (6,7 %). Výskyt melanomů na dolních končetinách byl signifikantně častější u žen (73,3 %), než u mužů (13,3 %).

Věk: věk pacientů s maligními lézemi byl signifikantně vyšší než u pacientů s benigními lézemi (medián věku 64 let vs. 48 let u benigních lézí, $p = 0,002$).

Přítomnost zvýšeného prokrvení: u maligních lézí bylo signifikantně častěji zjištěno zvýšené prokrvení než u benigních (80 % vs. 26 % u benigních lézí, $p < 0,0001$).

Násobek prokrvení: u maligních lézí byl násobek prokrvení signifikantně vyšší než u benigních (medián 1,53 vs. 0,74 u benigních lézí, $p = 0,002$), viz. graf 4, obr. 9, 10.



Graf 4

Kvartilový box graf násobku prokrvení benigní a maligní pigmentové léze oproti okolní tkáni.

Change of Median (%): u maligních lézí byl procentuální rozdíl mezi prokrvením znaménka a okolí znaménka (out-in)/in signifikantně vyšší než u benigních lézí ($p = 0,004$), Change of median (%) u malignit byl -34 % (tj. vyšší prokrvení bylo zjištěno uvnitř znaménka než v jeho okolí). U benigních lézí byla diference mediánů prokrvení (out-in)/in +26 % (tj. prokrvení bylo vyšší v okolí znaménka).

Change of Mean (%): procentuální rozdíl mezi prokrvením znaménka a okolí znaménka byl signifikantně vyšší u maligních lézí ($p = 0,002$). Procentuální rozdíl průměrného prokrvení okolí s prokrvením léze (out-in)/in byl u maligních lézí -35 % (tj. vyšší prokrvení bylo

zjištěno u znaménka než v jeho okolí). U benigních lézí byla diference průměrného prokrvení (out-in)/in +28 % (tj. prokrvení bylo vyšší v okolí znaménka).

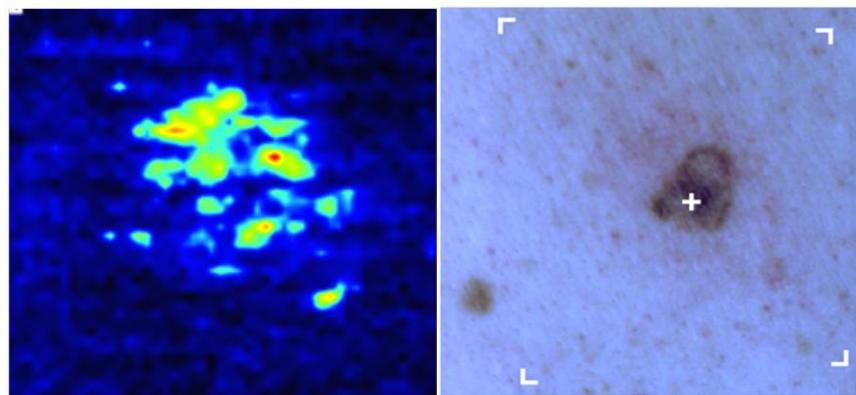
Variabilita prokrvení (SD in): variabilita prokrvení, vyjádřená hodnotou standarní odchylky (SD), byla signifikantně vyšší u malignity, než variabilita benigního pigmentového névnu ($p = 0,028$).

V okolí pigmentové léze nebyl zjištěn statisticky signifikantní rozdíl mezi maligní a benigní pigmentovou lézí v žádném parametru perfuze: variabilita okolí pigmentové léze (SD out), Mean out, Median out. Uvnitř léze nevykazovaly statisticky signifikantní rozdíl mezi malignitou a benigním pigmentovým náměvem přímé ukazatele: Mean in a Median in.

	Maligní léze	Benigní léze	P
Pohlaví			
M	30 (65,2 %)	16 (34,8 %)	0,600
F	13 (56,5 %)	10 (43,5 %)	
Věk	64,0 (39-86)	48,0 (14-77)	0,002
Lokalita			
hlava	2 (4,3 %)	5 (21,7 %)	
trup	22 (47,8 %)	12 (52,2 %)	0,110
HK	7 (15,2 %)	2 (8,7 %)	
DK	15 (32,6 %)	4 (17,4 %)	
Pozitivita uzlin	2 (4,3 %)	0 (0 %)	0,549
Ki 67 > 5%	33 (71,7 %)	5 (21,7 %)	0,0001
Zvýšené prokrvení	37 (80,4 %)	6 (26,1 %)	< 0,0001
Násobek prokrvení	1,53 (0,33-5,77)	0,74 (0,46-4,74)	0,002
Median in	62,6 (15,5 - 302)	51,0 (18,7 - 534)	0,359
Median out	44,4 (22,5 - 257)	60,0 (26,4 - 334)	0,099
Change of Median (out-in)	-19,6 (-221 až +77)	9,4 (-331 až +189)	0,008
Change of Median (%)	-34,6 (-88 až +196)	26,1 (-79 až +129)	0,004
Mean in	71,6 (16 - 338)	56,3 (19 - 568)	0,215
Mean out	48,4 (24 - 275)	61,9 (27 - 357)	0,130
Change of Mean (out-in)	-23,6 (-221 až +79)	10,0 (-362 až 187)	0,002
Change of Mean (%)	-34,5 (-83 až +199)	27,7 (-79 až +119)	0,002
SD in	37,7 (7,3 - 154)	19,9 (8,6 - 121)	0,028
SD out	17,2 (7,9 - 134)	20,9 (7,7 - 199)	0,380

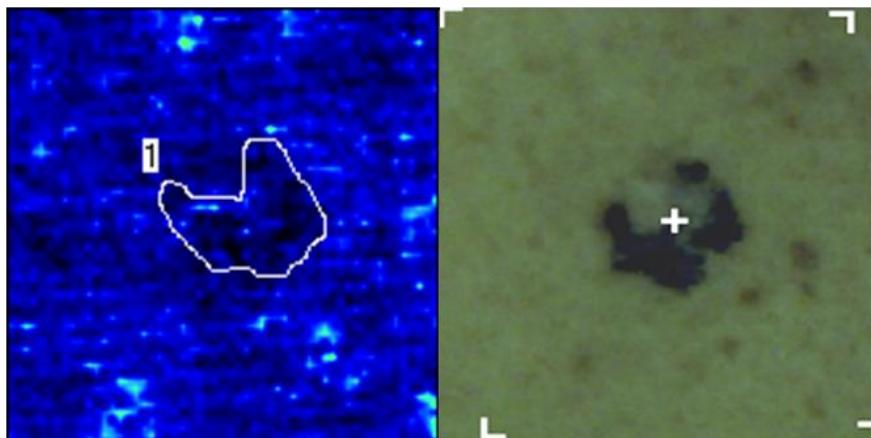
Tab. 4

Korelace malignity s ostatními parametry: statisticky signifikantní je rozdíl mezi benigními a maligními lézemi ve věku, proliferační aktivitě nad 5 % (přítomnost proteinu Ki 67, asociovaného s proliferací buněk) a v nepřímých parametrech perfuze (násobek prokrvení, rozdíl prokrvení: change of mean, change of median, procentuální rozdíl prokrvení: change of mean %, change of median %, variabilita prokrvení uvnitř léze: SD in).



Obr.9

Vpravo: foto povrchově se šířícího melanomu zad u muže, Histopatologický nález: Clark II, Breslow 0,27 mm. Bílé značky ohraničují oblast skenování. Vlevo: barevný perfuzní sken topograficky identické oblasti, pořízený před operačně, ukazuje na zvýšené prokrvení léze oproti okolí. Pro nedostatečenou radikalitu původní excize, na základě poddiagnostikování pokročilosti léze, byla následně provedena reoperace, radikální reexcize s ochranným lemem 2 cm od okrajů jizvy, do všech stran. Perfuzní scan ukázal před 1. operací zvýšení perfuze proti okolí 1,9 x. Rozsah barevné stupnice je 240 PU.



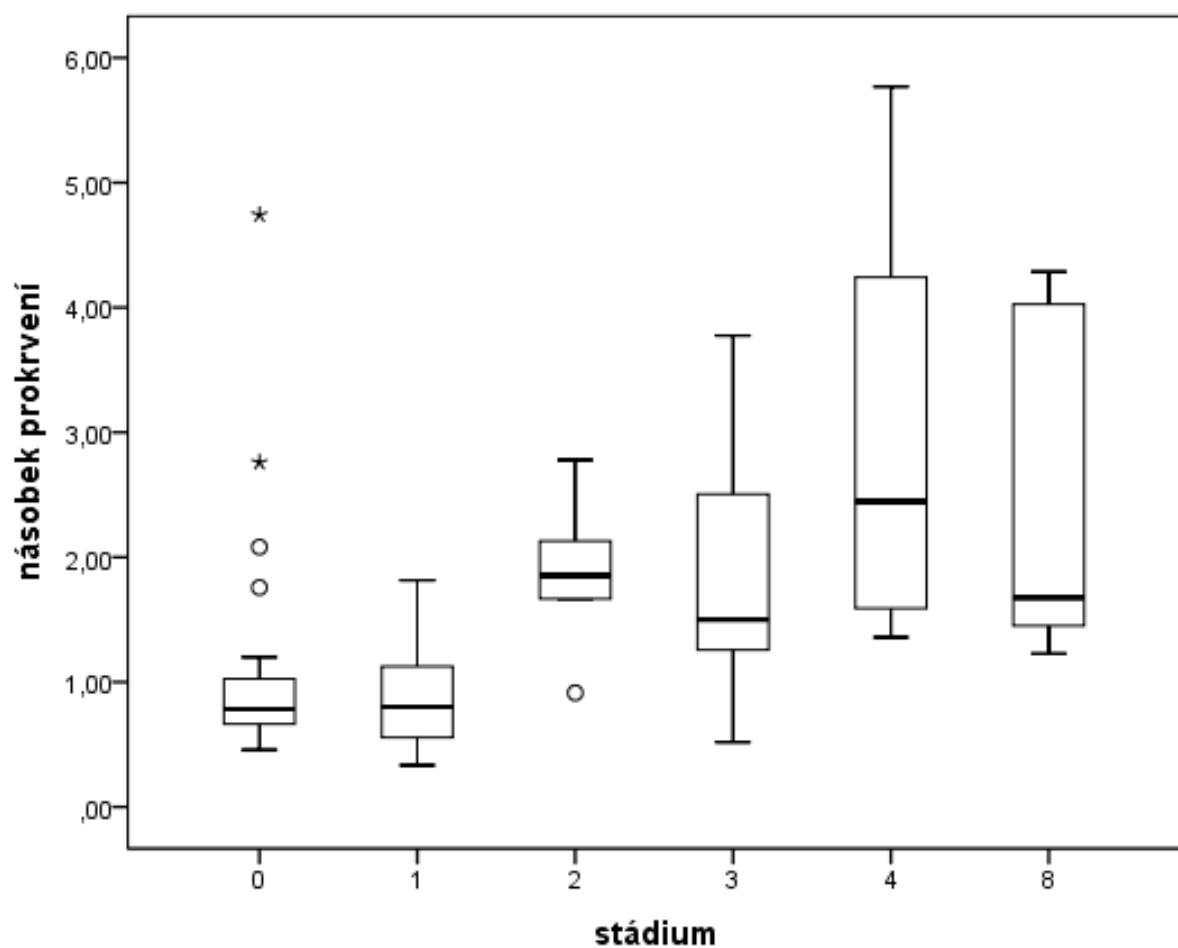
Obr.10

Vpravo: foto pigmentového névu zad muže, histologický nález: dysplastický náevus. Vlevo: barevný perfuzní sken identické oblasti. Není patrné zvýšení prokrvení léze proti okolí, náevus vykazuje 0,8 x perfuze okolní kůže. Dermatologem doporučena radikální excize s lemem 2 cm pro suspekci na maligní melanom.

Parametry prokrvení melanomu vs. histopatologické stádium zhoubných nádorů

(viz tab. 6, str. 59), Mann-Whitney U post hoc testy:

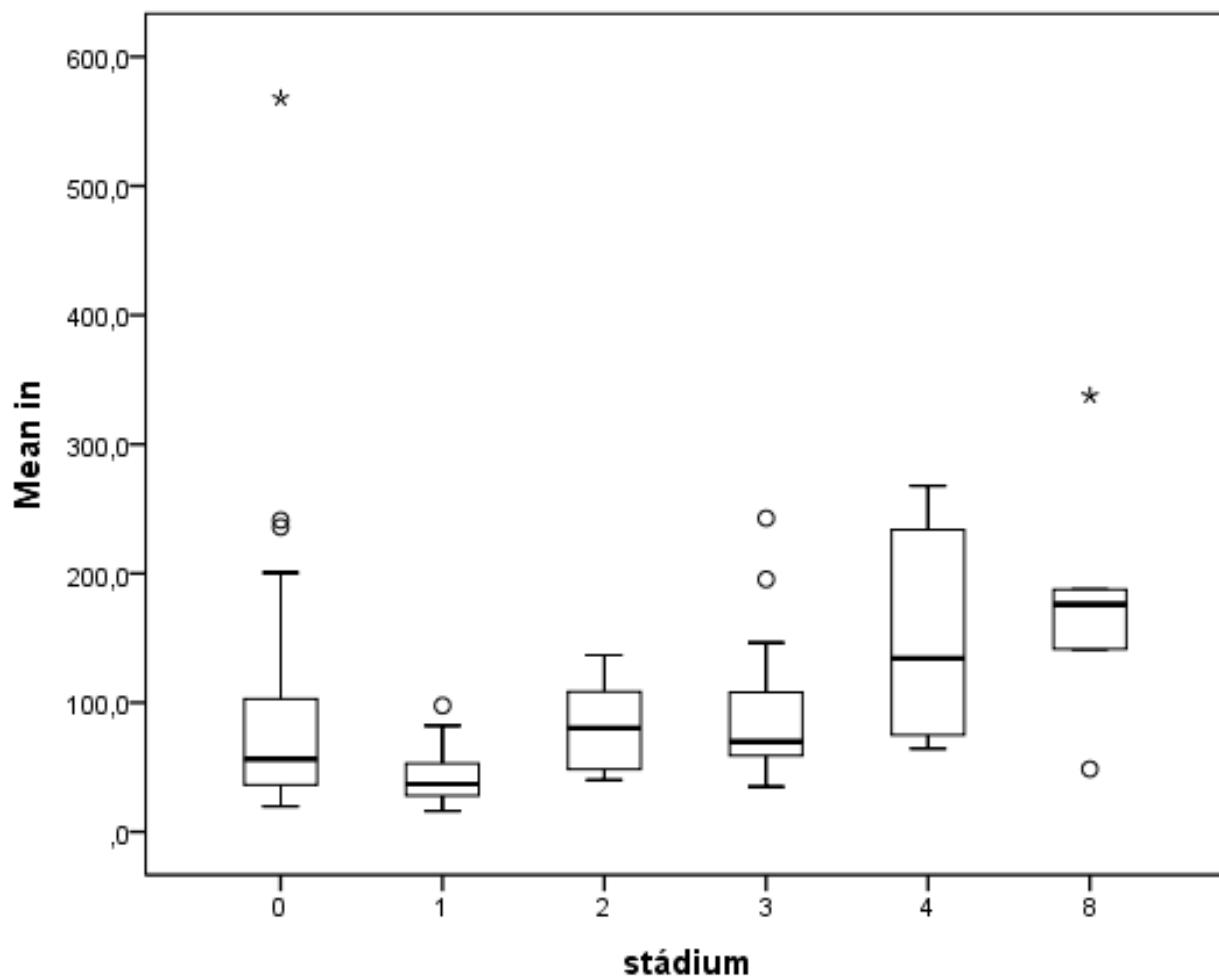
Násobek prokrvení: stádium Clark IV a V (podskupina 4) bylo sjednoceno kvůli malému počtu případů. U stádia Clark I (podskupina 1) byly zjištěny signifikantně nižší hodnoty násobku prokrvení než u stádia Clark III (podskupina 3), $p = 0,042$, resp. u stádia Clark IV,V, (podskupina 4), $p = 0,005$, viz. graf 5.



Graf 5

Násobek prokrvení proti okolní tkáni u jednotlivých histopatologických stádií nádoru dle Clarka. Benigní léze: $0,74 \times$ (sloupec 0), Clark I: $0,8 \times$ (sloupec 1), Clark II: $1,85 \times$ (sloupec 2), Clark III: $1,5 \times$ (sloupec 3), Clark IV a V: $2,4 \times$ (sloupec 4), Basaliomy: $1,68 \times$ (sloupec 8).

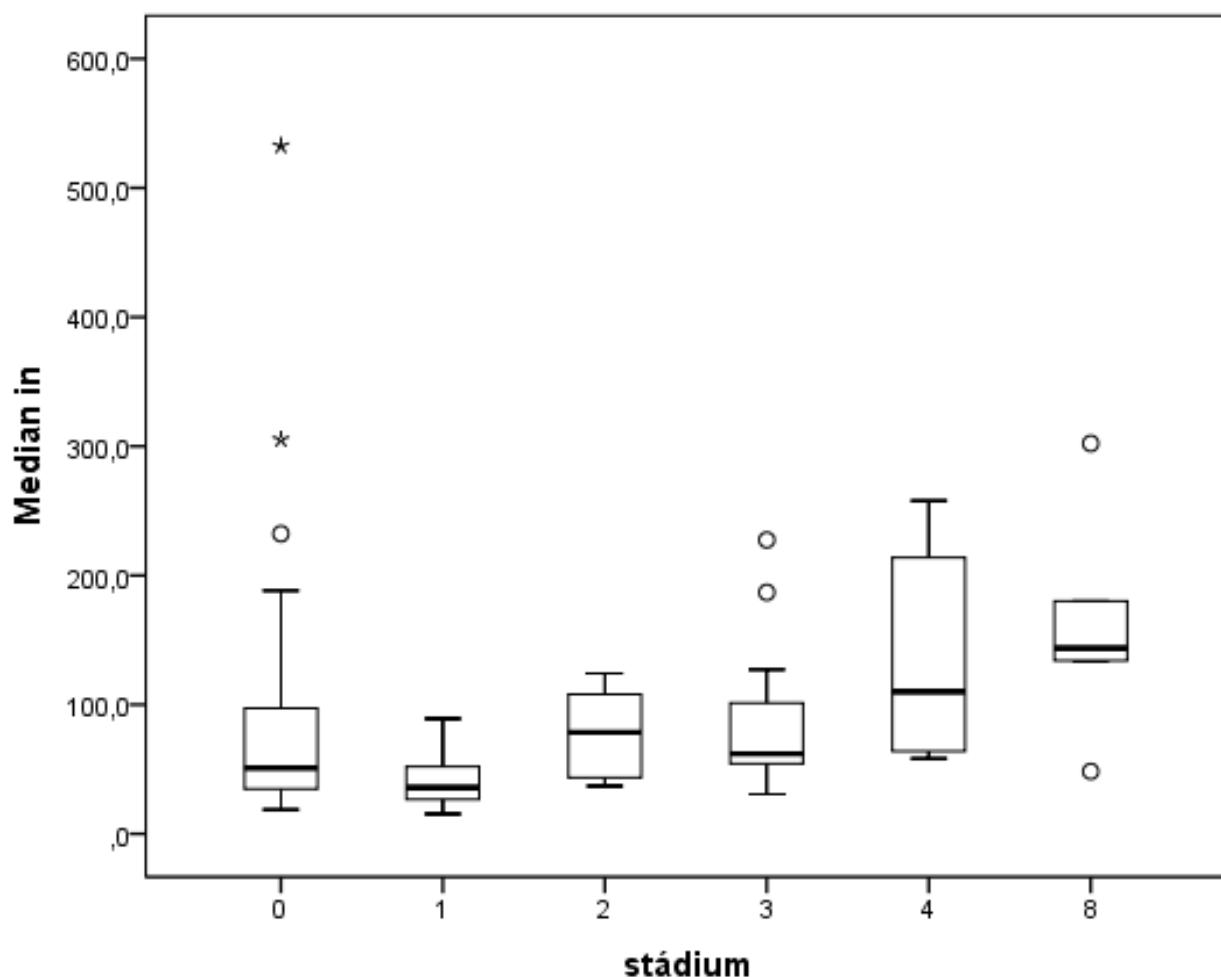
Mean in: u stádia Clark I byly zjištěny signifikantně nižší hodnoty průměrného prokrvení malignity než u stádia Clark III ($p = 0,036$), resp. u stádia Clark IV,V ($p = 0,011$), viz. graf 6.



Graf 6

Průměrné prokrvení malignit (v PU) u jednotlivých stádií dle Clarka, benigní léze: 56 PU (sloupec 0), Clark I: 37 PU, Clark II: 80 PU, Clark III: 70 PU, Clark IV a V: 134 PU (sloupec 4), basaliomy: 176 PU (sloupec 8).

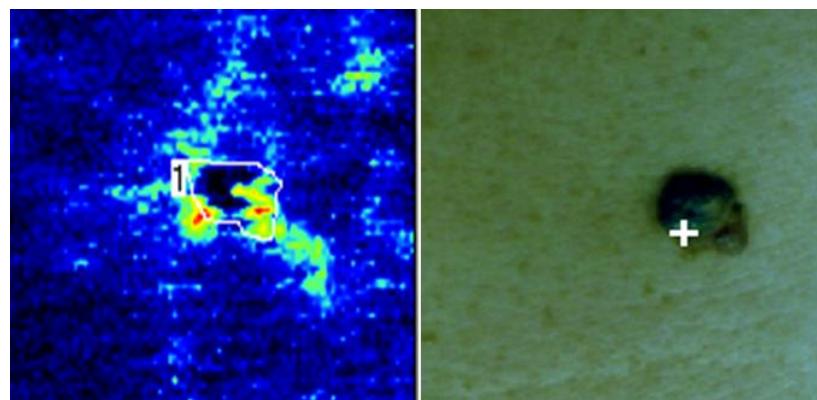
Median in: u stádia Clark I byly zjištěny signifikantně nižší hodnoty mediánu prokrvení uvnitř malignity než u stádia Clark III ($p = 0,036$), resp. u stádia Clark IV, V ($p = 0,014$), resp. u basaliomu ($p = 0,049$), viz. graf 7.



Graf 7

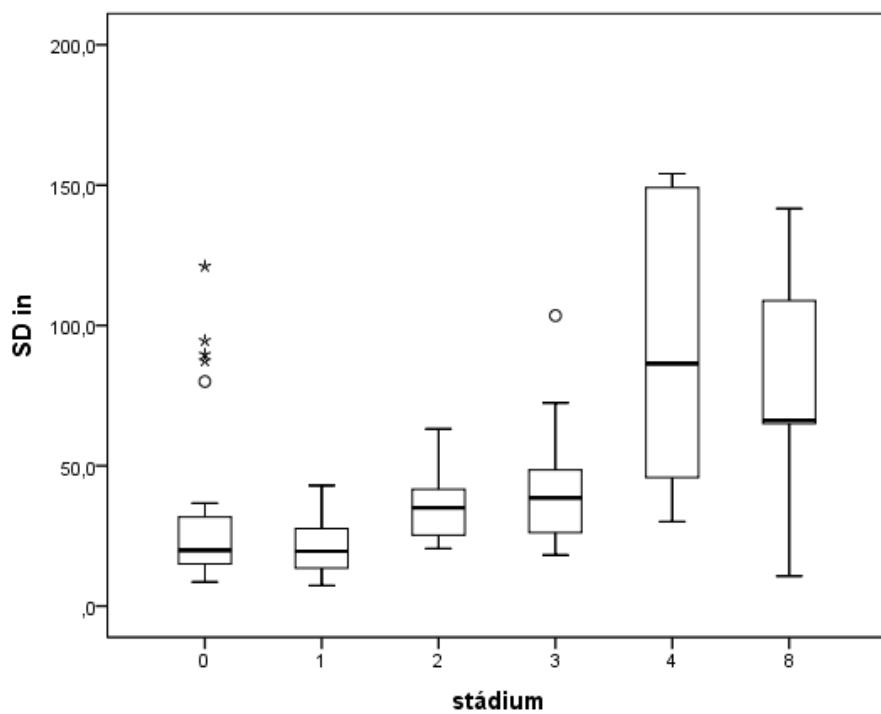
Median prokrvení maligní léze u jednotlivých stádií nádoru dle Clarka (v PU). Benigní léze: 56 PU (sloupec 0), Clark I: 36 PU (sloupec 1), Clark II: 79 PU (sloupec 2), Clark III: 62 PU (sloupec 3), Clark IV a V: 110 PU (sloupec 4), basaliomy: 144 PU (sloupec 8).

SD in: u stádia Clark I byla zjištěna signifikantně nižší variabilita prokrvení uvnitř (in) melanomu než u stádia Clark III ($p = 0,031$), resp. u stádia Clark IV,V ($p = 0,005$), viz. graf 8, obr.11.



Obr. 11

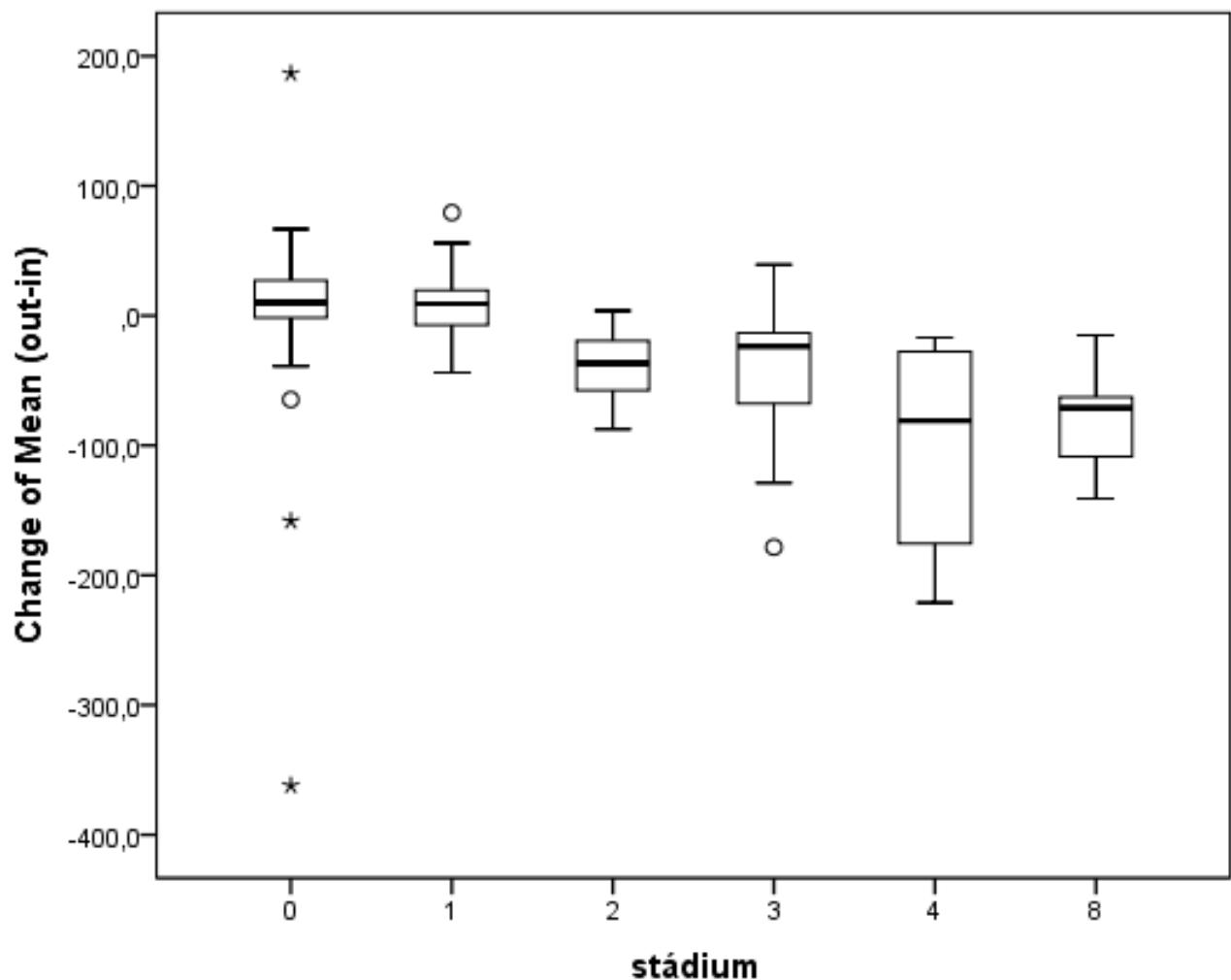
Vpravo: foto melanoblastomu paže s histopatologickým nálezem Clark III, Breslow 1 mm, křížek uvnitř léze označuje střed perfuzního skenu. Vlevo: barevný perfuzní sken identické oblasti ukazuje na zvýšené prokrvení léze oproti okolí, zejména v její periferní části. Pacient byl dermatologem správně indikován k biopsii sentinelové uzliny.



Graf 8

Standardní odchylka prokrvení maligní léze u jednotlivých stádií nádoru dle Clarka. Hodnota SD pro stádium Clark I :19,5 PU, Clark II: 35,1, Clark III: 38,6, Clark IV, V: 86,5 PU, Basaliomy 66,2. Statisticky signifikantní je rozdíl mezi stádii Clark I a Clark III, IV, V.

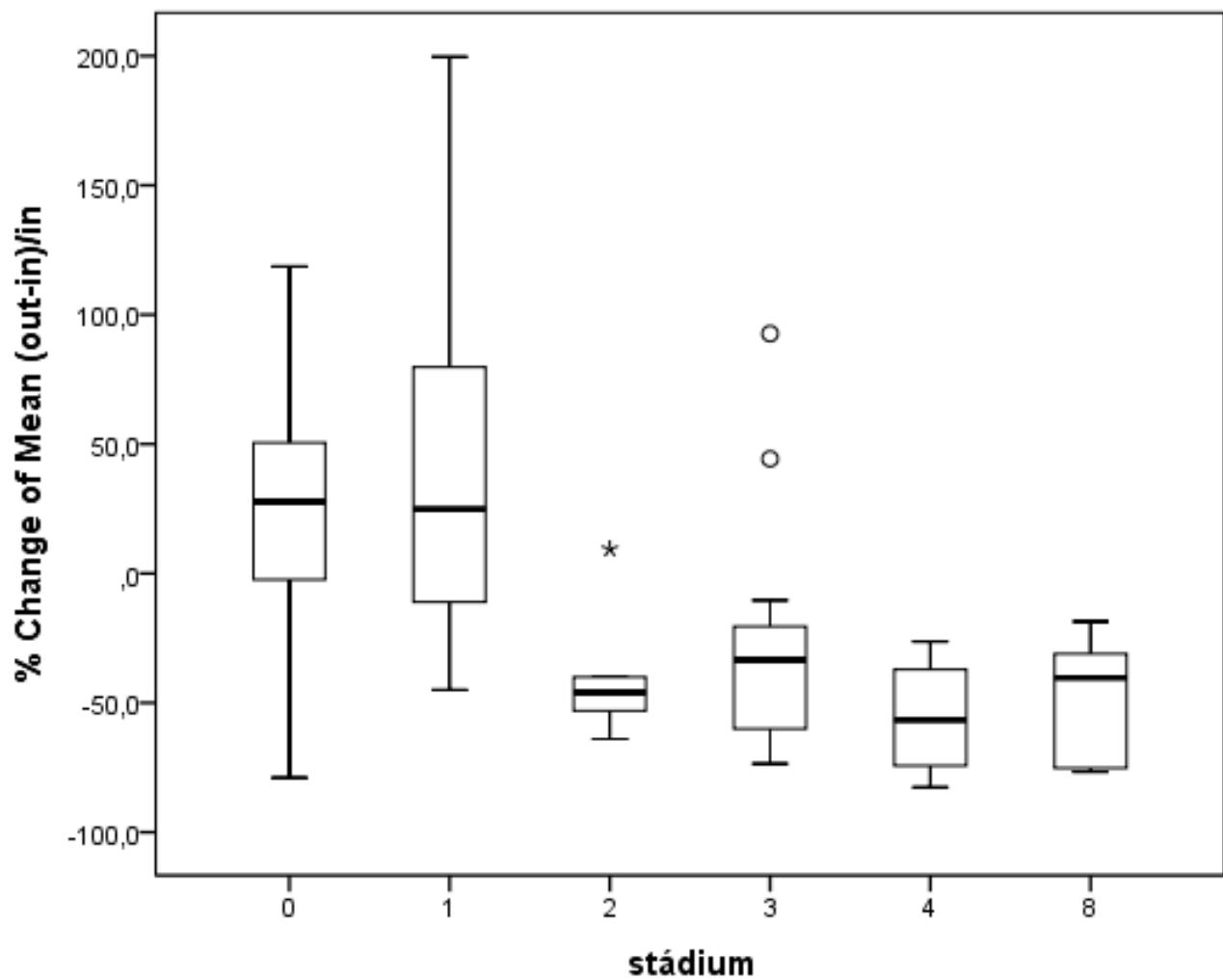
Change of the mean(out-in): u stádia Clark I byl zjištěn signifikantně menší rozdíl mezi průměrným prokrvením okolí a malignity než u stádia Clark III ($p = 0,022$), resp. u stádia Clark IV,V ($p = 0,005$), resp. u basaliomu ($p = 0,019$), viz. graf 9, tab. 6.



Graf 9

Rozdíl průměru (out-in) perfuze (v PU) u jednotlivých stádií nádoru dle Clarka. U stádia Clark I: 9,2 PU(vyšší perfuze okolní tkáně), Clark II: -36,7 PU, Clark III: -23,6 PU, Clark IV, V: -80,9 PU (negativní hodnota svědčí pro vyšší perfuzi malignity).

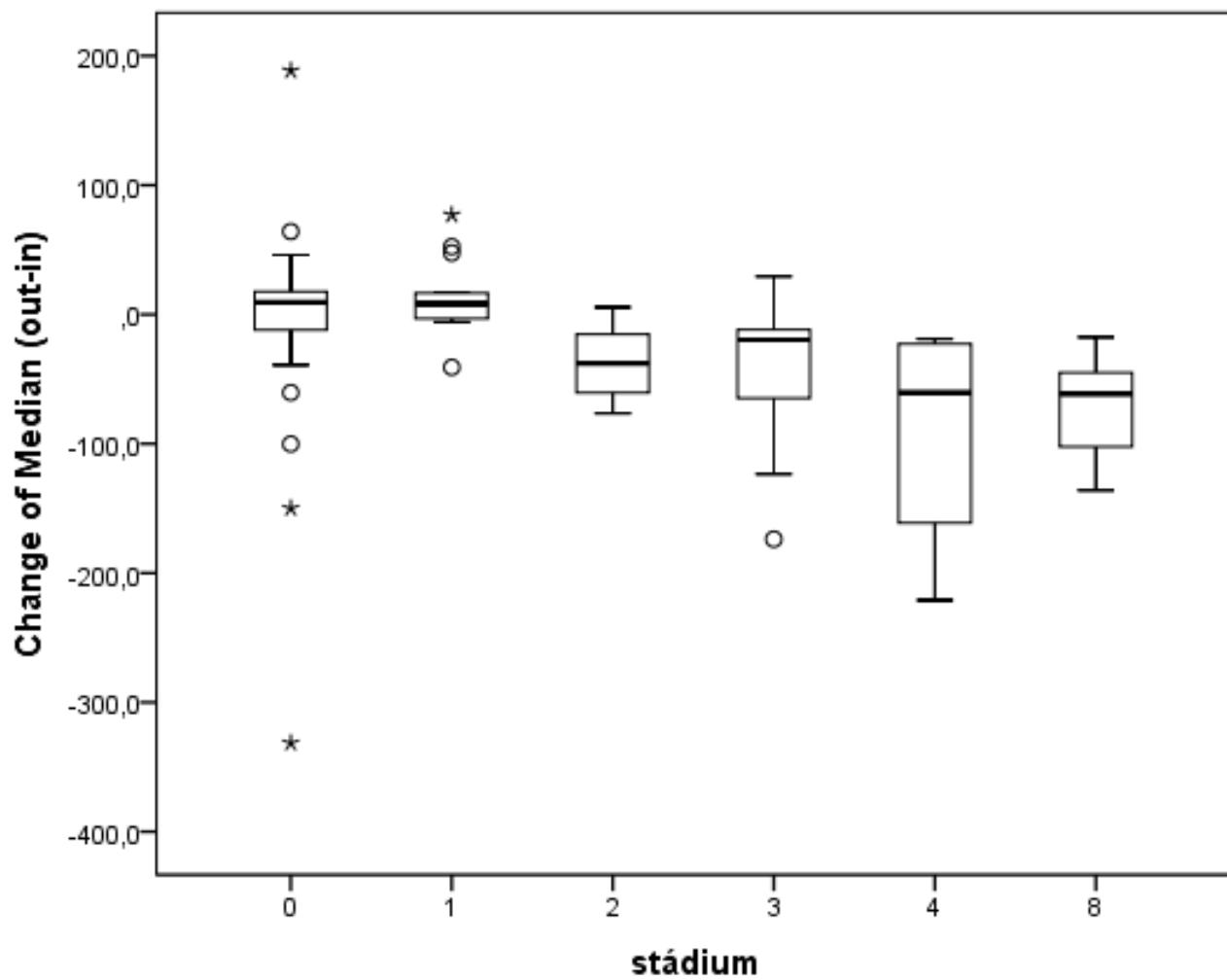
Change of the mean % (out-in)/in: u stádia Clark I byl zjištěn signifikantně menší rozdíl (v %) mezi průměrným prokrvením okolí a samotné pigmentové léze než u stádia Clark III ($p = 0,042$), resp. u stádia Clark IV,V ($p = 0,005$), viz. graf 10.



Graf 10

Change of the mean % (procentuálně vyjádřený rozdíl průměru perfuzí vně a uvnitř léze), u stádia Clark I: +25 % (vyšší perfuze okolí), Clark II: -37 %, Clark III: -24 %, Clark IV, V: -57 %, Basaliomy: -40 % (vyšší perfuze nádoru).

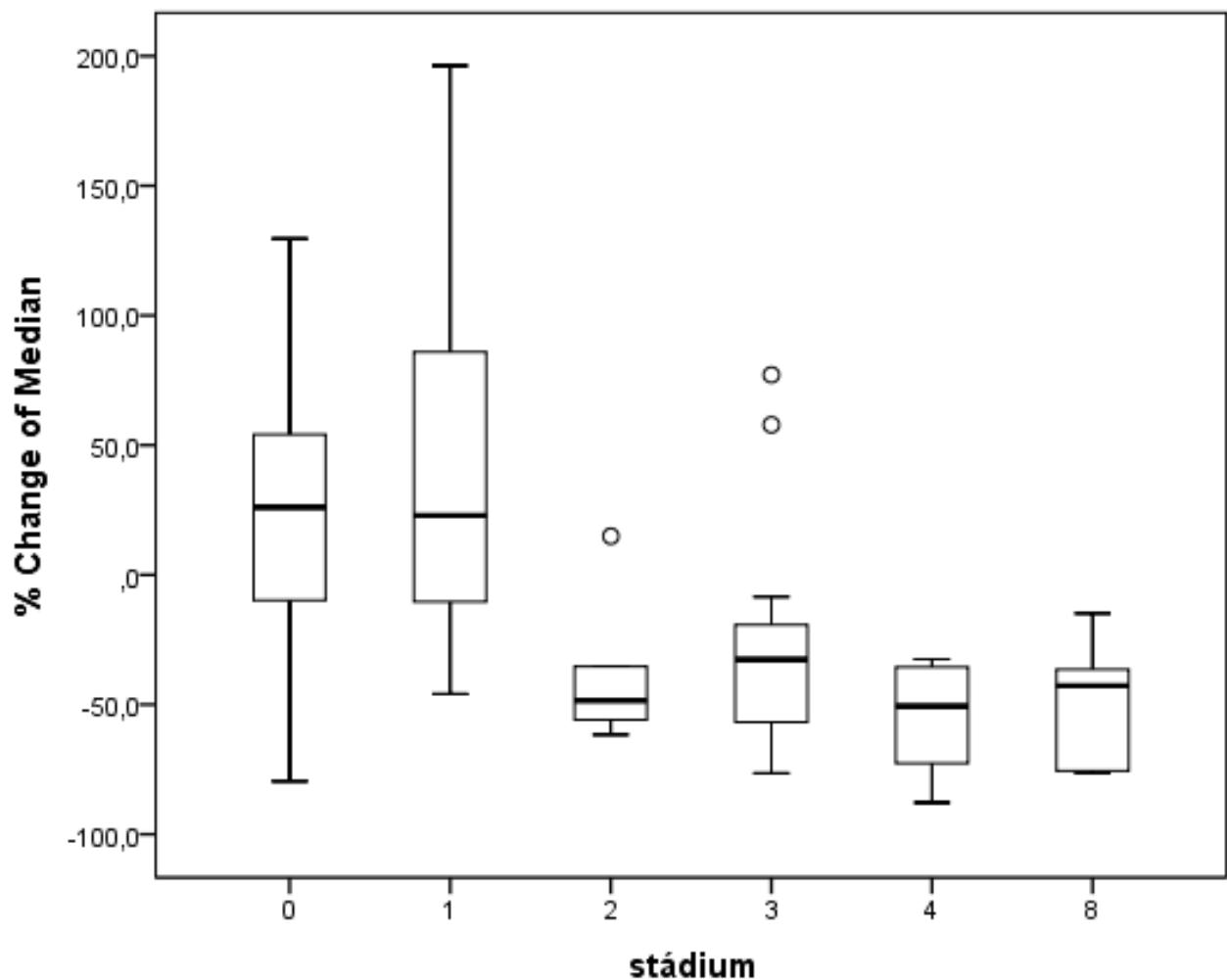
Change of the median (out – in): u stádia Clark I byl zjištěn signifikantně menší rozdíl mezi perfuzí okolí a perfuzí malignity než u stádia Clark III ($p = 0,026$), resp. u stádia Clark IV, V ($p = 0,005$), resp. u basaliomu ($p = 0,019$), viz. graf 11.



Graf 11

Change of the median (out – in): Rozdíl medianu perfuzí vně a uvnitř maligní léze, Clark I: 8,2 PU (vyšší perfuze okolí), Clark II: -37,8 PU, Clark III: -19,6 PU, Clark IV,V: -60,6 PU (matematické znaménko – označuje vyšší perfuzi nádoru, než jeho okolí)

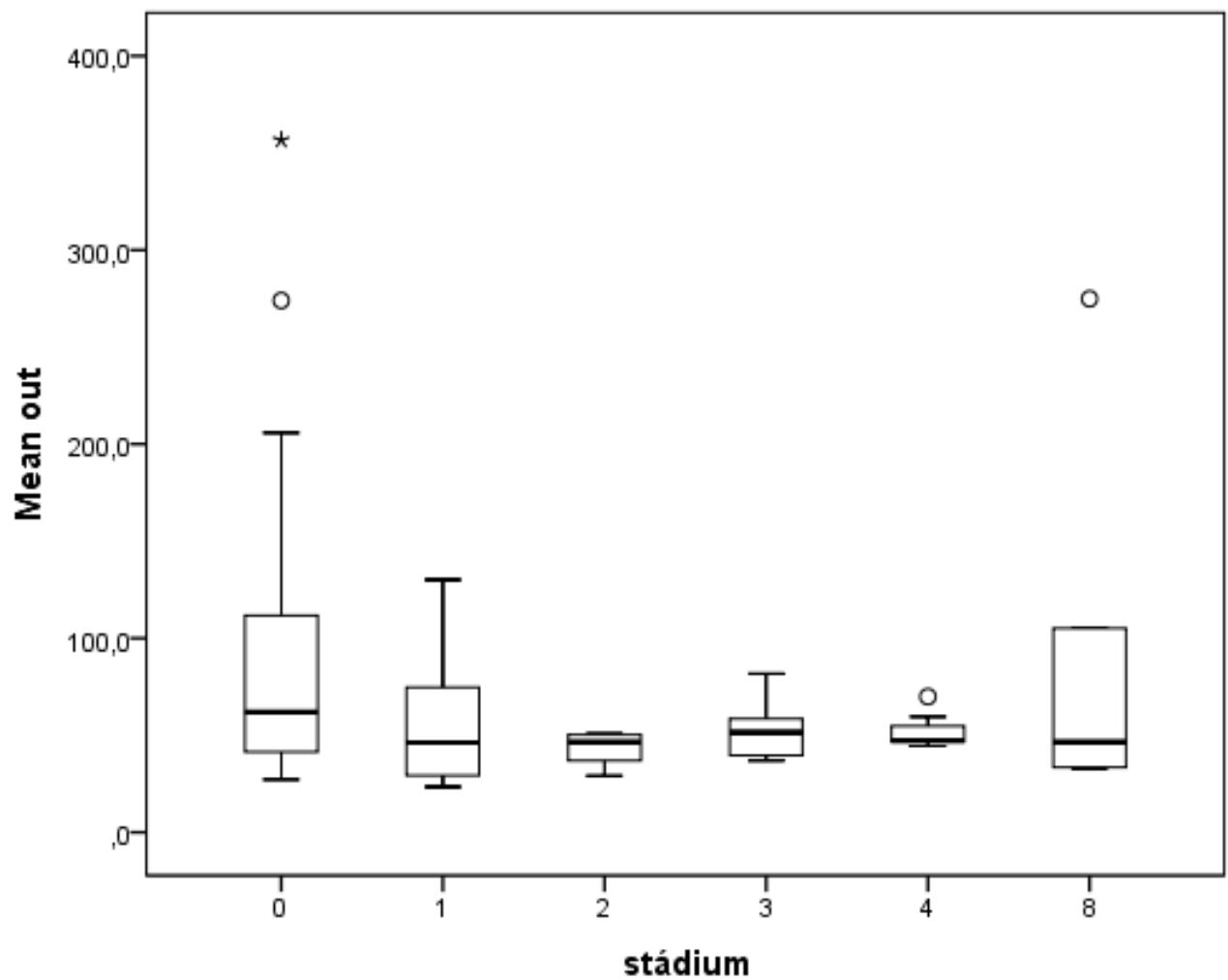
Change of the median (%) (out-in)/in: u stádia Clark I byl zjištěn signifikantně menší rozdíl mezi prokrvením okolí znaménka a prokrvením znaménka než u stádia Clark III ($p = ,022$), resp. u stádia Clark IV, V ($p = 0,005$), viz. graf 12.



Graf 12

Change of the median (%): procentuálně vyjádřený rozdíl medianů perfuzí vně a uvnitř malignity, Clark I: +23 % , Clark II: -48 %, Clark IV,V: -51 % (neg.hodnota - vyšší perfuze maligní léze).

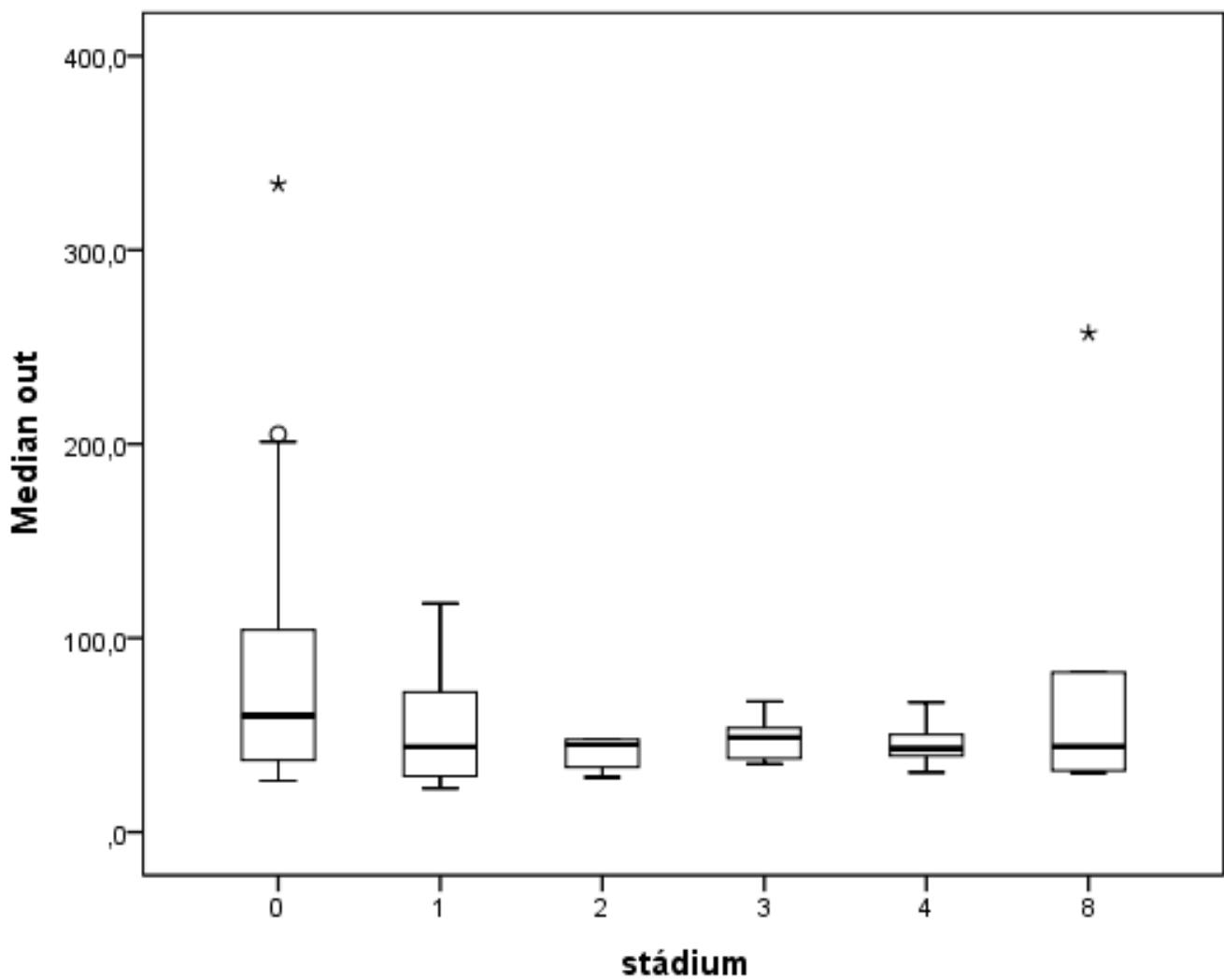
Mean out: nebyl signifikantní rozdíl průměrů perfuze okolí pro jednotlivá stádia melanomů, viz. graf 13.



Graf 13

Průměrné prokrvení (v PU), v okolí maligní léze u stádií nádoru. Clark I: 47PU, Clark II: 47 PU, Clark III: 52PU, Clark IV a V: 47 PU, basaliomy: 47 PU (sloupec 8), není patrný statisticky signifikantní rozdíl.

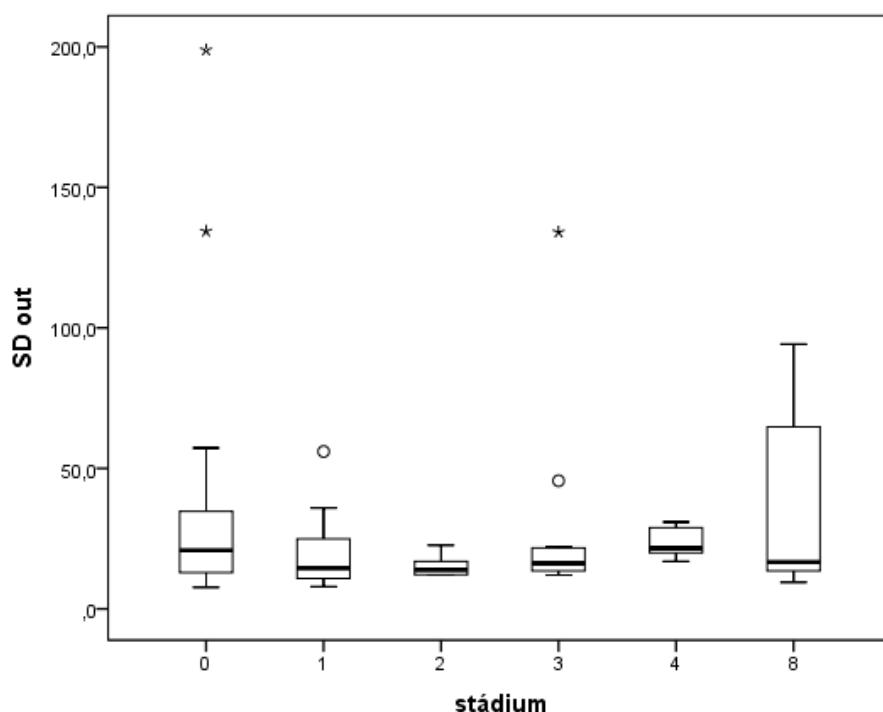
Median out: nebyl signifikantní rozdíl medianů perfuze okolní tkáně mezi jednotlivými stádii melanomu, viz. graf 14.



Graf 14

Median prokrvení (v PU) v okolí maligní léze u jednotlivých stádií malignit, Clark I: 44 PU, Clark II: 45 PU, Clark III: 49 PU, Clark IV a V: 43 PU, basaliomy: 44 PU, není patrný statisticky signif. rozdíl.

SD out: nebyl prokázán signifikantní rozdíl mezi stádii melanomu, viz. graf 15.



Graf 15

Standardní odchylka, SD out, prokrvení v okolí maligní léze u jednotlivých stádií nádoru dle Clarka nevykazuje signifikantní rozdíl.

Veškeré číselné hodnoty zobrazené v předchozích grafech 5-15 jsou shrnuty v tab. 6.

Signifikantně častější výskyt zvýšeného prokrvení byl zjištěn u stádia Clark III a Clark IV, V ve srovnání se stádiem Clark I ($p = 0,016$; resp. $p = 0,027$; dle Fisherova přesného testu s Bonferroniho korekcí signifikance), viz. tab.5.

zvýšené prokrvení	Počet	procento	P
Clark I	8/5	35,5	-
Clark II	6/6	100	0,072
Clark III	13/14	92,9	0,016
Clark IV, V	8/8	100	0,027
Bazaliom	5/5	100	0,144

Tab.5

Výskyt zvýšeného prokrvení u jednotlivých stádií maligní pigmentové léze a signifikance rozdílu vůči stádiu Clark I.

	Clark I (n=13)	Clark II (n=6)	Clark III (n=14)	Clark IV,V (n=8)	Basaliom (n=5)	P
Násobek prokrvení	0,801 (0,33-1,82)	1,85 (0,91-2,78)	1,50 (0,52-3,77)	2,44 (1,36-5,77)	1,68 (1,23-4,29)	0,001
Mean in	37,0 (16,0-97,7)	80,4 (40,2-136,7)	69,7 (35,0-243)	134 (64,5-267,7)	176 (48,6-337,7)	0,001
Median in	35,8 (15,5-89,1)	78,6 (36,9-124,2)	61,9 (30,6-227,5)	110 (58,4-257,9)	144 (48,3-302,2)	0,001
Mean out	46,23 (23,5-130)	46,6 (29,1-50,9)	51,6 (36,9-81,7)	47,3 (44,5-69,9)	46,6 (33-274,9)	0,782
Median out	44,0 (22,5-118)	45,0 (28,2-48,1)	48,7 (35,1-67,3)	43,1 (30,8-66,9)	44,1 (30,7-257,1)	0,722
SD in	19,5 (7,3-43,0)	35,1 (20,5-63,1)	38,6 (18,2-103,5)	86,5 (30,1-154,1)	66,2 (10,7-141,6)	0,001
SD out	14,5 (7,9-56,0)	13,9 (12,1-22,7)	16,3 (12,0-134,1)	21,6 (16,9-30,9)	16,7 (9,5-94,2)	0,269
Change of the Mean (out-in)	9,2 (-44 až +79)	-36,7 (-87,5-3,8)	-23,6 (-178,4-39,3)	-80,9 (-221,3 až -17)	-71,1 (-141 až -15,1)	< 0,0001
Change of the Mean (%)	24,9 (-45 až +200)	-45,9 (-64,0-9,5)	-33,4 (-73,5-92,7)	-56,7 (-82,7 až -26,4)	-40,4 (-76,7 až -18)	0,001
Change of the Median	8,2 (-41 až +77)	-37,8 (-76,5-5,5)	-19,6 (-173,8-29,3)	-60,6 (-221 až -19)	-61,4 (-136,1 až -17,6)	< 0,0001
Change of the Median (%)	22,9 (-46 až 196)	-48,4 (-61,6-14,9)	-32,7 (-76,4-77,1)	-50,6 (-87,8 až -32,5)	-42,7 (-76,3 až -14,9)	0,001

Tab. 6

Parametry perfuze jednotlivých stádií malignit dle Clarka a signifikance rozdílu mezi nimi.

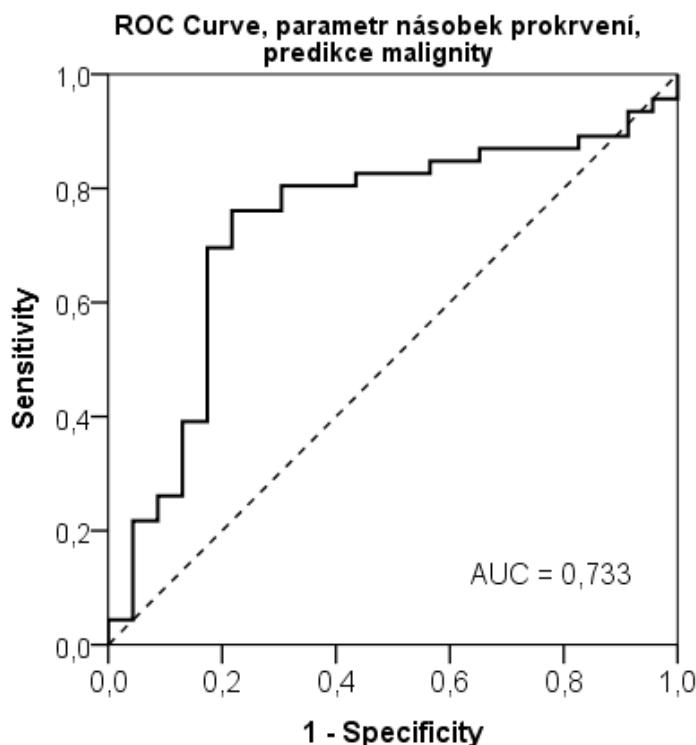
ROC analýza pro predikci malignity:

Při hledání hledání cut off hodnoty pro parametr Change of Mean (%), (out-in)/in, pro predikci malignity, byla stanovena hranice 10 %. Navýšení prokrvení znaménka o $\geq 10\%$ vzhledem k průměrnému prokrvení okolní tkáně, predikuje malignitu se senzitivitou 76 %, specificitou 78 %, pozitivní prediktivní hodnotou 87 % a negativní prediktivní hodnotou 62 %, viz tab. 7. Totožné výsledky vychází pro násobek prokrvení proti okolí o $\geq 1,07$, viz. graf 16.

	% Change of Mean (out-in)/in
AUC (p)	0,733 (p=0,002)
Cut-off value	10%
Sensitivity	76,1% (61,2% - 87,4%)
Specificity	78,3% (56,3% - 92,5%)
PPV	87,5% (73,2% - 95,8%)
NPV	62,1% (42,3% - 79,3%)
False positivity	21,7% (4,5% - 43,7%)
False negativity	23,9% (12,6% - 38,8%)

Tab.7

Výsledky ROC analýzy. AUC ... plocha pod křivkou, PPV ... pozitivní prediktivní hodnota, NPV ... negativní prediktivní hodnota.



Graf 16

ROC křivka pro predikci malignity při cut off hodnotě násobku prokrvení znaménka proti okolí 1,07.

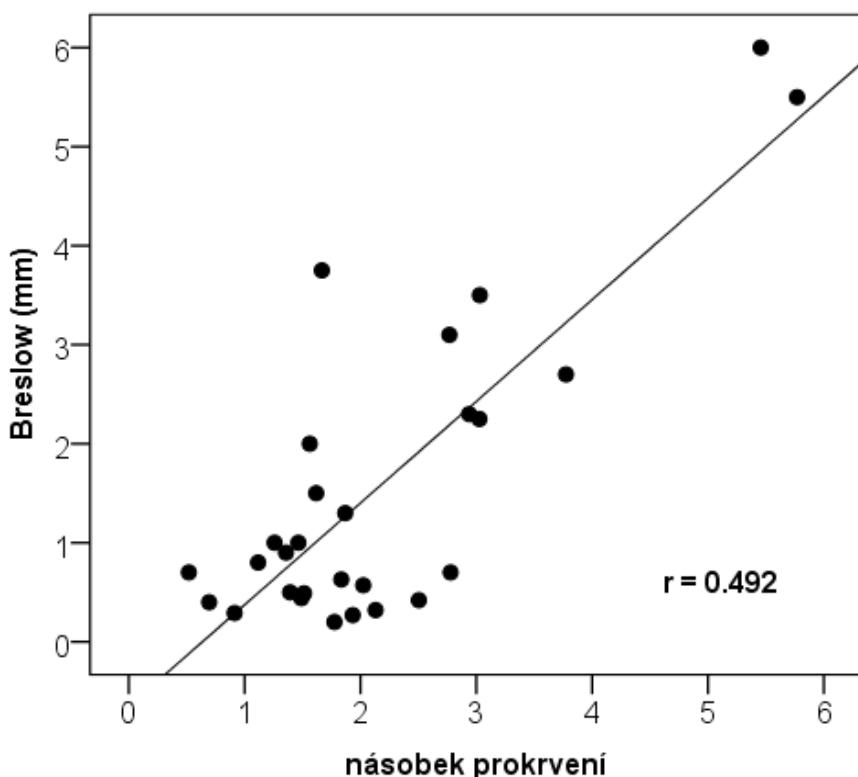
ROC analýza pro predikci malignít ve stádiu Clark II-IV a Breslow 1 mm a více:

Průměrné zvýšení prokrvení znaménka o $\geq 35,5\%$ vzhledem k průměrnému prokrvení okolí (Change of Mean %) predikuje malignitu ve stádiu Clark II-IV a Breslow 1mm a více se senzitivitou 84 %, specificitou 73 %, pozitivní prediktivní hodnotou 42 % a negativní prediktivní hodnotou 95 %.

Průměrné zvýšení prokrvení znaménka o $\geq 31,3\%$ vzhledem k průměrnému prokrvení okolí (Change of Mean %) predikuje malignitu ve stádiu Clark II-IV a Breslow 1mm a více se senzitivitou 92 %, specificitou 68 %, pozitivní prediktivní hodnotou 40 % a negativní prediktivní hodnotou 97 %. Tato cut off hodnota lépe vyhovuje našim klinickým požadavkům.

Korelace vertikálního rozměru nádoru dle Breslowa s násobkem prokrvení:

Spearmanova korelační analýza prokázala středně silnou pozitivní korelaci mezi násobkem prokrvení melanomu proti okolní tkáni a vertikálním rozměrem nádoru dle Breslowa ($r = 0,492$), viz. graf 17.



Graf 17

Středně silná pozitivní korelace mezi násobkem perfuze malignity (mean in/mean out) a hodnotou Breslow v mm.

6. Diskuse

6.1 Diagnostika hloubky popálení

V této práci byla ověřena schopnost laserdopplerometrie predikovat průběh hojení během období prvních 9 poúrazových dnů. Pro jednotlivé časové úseky byly s využitím metody Laser Doppler Imaging stanoveny perfuzní hodnoty indikující operační léčbu popálenin. Tyto hodnoty přímo souvisí s rozdelením termického poranění dle hloubky popálení, tedy dle hloubky poškození dermis. Z hlediska strategie léčby je nejdůležitější rozlišit popálení charakteru „mid dermal“ a „deep dermal burn“, která jsou charakteristická délkou hojení do 3 týdnů, resp. nad 3 týdny. Morfologicky se hranice mezi těmito 2 jednotkami nachází přibližně na přechodu dolní a střední třetiny dermis. Klinickým vyšetřením je téměř nemožné, na rozdíl od popálení povrchových, nebo naopak velmi hlubokých termických poranění, tuto hranici určit. Na pomoc přichází punkční biopsie, což je ale bolestivé vyšetření. Při ponechání hlubokých dermálních poškození ke spontánnímu zhojení nezabrání tenká vrstva viabilní retikulární dermis, odpovědná za ukotvení kožních adnex a mechanickou odolnost kůže, jizvení v rehabilitační fázi nemoci z popálení [53]. Neinvazivní vyšetření LDI eliminuje počet mutilujících jizevnatých komplikací správnou indikací k operaci. Vyšetření ploch a topografické zmapování nutnosti nekrekтомie umožňuje omezení rozsahu operace u pacientů s rozsáhlými popáleninami, kteří jsou limitování rozsahem dárcovských ploch. Eliminace počtu zbytečných operací omezuje zátěž organismu celkovou anestesií, což je výhodné zejména u geriatrických pacientů a také redukuje potřebu krevních převodů. Pomocí LDI lze výrazně zkrátit dobu hospitalizace, a to ze dvou důvodů. V případě, kdy naměřená perfuze predikuje schopnost spontánního zhojení, pacienta převádíme po redukcí rozsahu ranné plochy, za dobré oběhové a ventilační kompenzace, do ambulantní péče. Tento fakt eliminuje mimo jiné rozvoj hospitalismu, specifické formy psychické dekompenzace, související s delším pobytom v nemocnici, nechutenstvím, zhoršením nutričních parametrů a zpomalením hojení. Podmínkou předání do ambulantní péče je dobré rodinné zázemí, dostupnost ambulantních převazů, soběstačnost a dobrá mobilita pacienta. V opačném případě, kdy přetravá od 3. poúrazového dne nedostatečná perfuze, je provedeno předoperační vyšetření a naplánování operace. Plánování a časná indikace k operaci umožňuje lepší využití operačních sálů a také personálu. Zkrácení hospitalizace a omezení počtu předoperačních vyšetření vede k ekonomickým

úsporam. I přes vyšší pořizovací cenu přístroje, 1 mil. kč, je přínos metody v oblasti popáleninové medicíny významný. Díky LDI je možné dosáhnout zkrácení hospitalizace minimálně o 2 dny.

Určené determinující hodnoty perfuze pro různé časové intervaly, v průběhu 9 denního poúrazového období, ukazují na skutečnost, že pro správné zhodnocení poškození dermis a indikaci k operaci je nutné vzít v úvahu časový faktor.

Nízká perfuze naměřená do 2. poúrazového dne (v intervalu „Early perfusion“) nemůže samostatně indikovat operační léčbu, naměřené hodnoty mohou být zavádějící. Jak rány ve skupině nezhojených, „Nonhealed“ (popálení III. stupně a IIb stupně charakteru „deep dermal burn“), tak rány ve skupině zhojených, „Healed“ (popálení IIb stupně charakteru „mid dermal burn“), zejména způsobených ožehem, vykazovaly podobnou, velmi nízkou perfuzi. Nízká perfuze byla naměřena také bezprostředně po sejmutí krytby bull [65]. Cut off hladiny perfuze, determinující operaci, byly určeny pro následující období od 3. do 9. PTD, hodnoty byly statisticky signifikantní.

Tyto závěry kontrastují s prací Khanha (2010), který neprokázal statisticky signifikantní rozdíl ve specificitě a senzitivitě při predikci zhojení do 21. dne, pokud je měření provedeno před a po 48. hodině [93]. Deklarovaná specificita a senzitivita je realitivně nízká, 78%, 74% resp., oproti 74%, 85%. Soubor pacientů byl tvořen výhradně dětmi (median věku 2,5 roku) s predominantním mechanismem úrazu opařením. Predominance opaření v dětském věku a nízký výskyt úrazů způsobených ožehem plamenem nebo vznícením oděvu, u kterých jsme i makroskopicky porozovali reflexní vazokonstrikci v prvních dnech, může zkreslovat dané výsledky.

V Práci Hollanda z roku 2002 byla potvrzena platnost vyšetření LDI mezi 36.-72. hodinou [94]. Vyšetřeny byly pouze děti s převažujícím mechanismem úrazu opařením. Holland dokonce uvádí, že v jednom případě byla naměřena nízká perfuze u povrchového popálení, tento pacient utrpěl popálení ožehem. Jako cut off byla použita hranice 125 PU.

Také v práci Mill (2009) je zmíňována přesnost LDI vyšetření již v prvních 24 hodinách po úrazu, stejně jako po 72 hodinách [64]. I v tomto případě byly vyšetřeny pouze děti, u kterých je popálení horkou tekutinou statisticky nejčastějším úrazem. Pouze 28 % utrpělo popálení ožehem či plamenem, oproti 57 % v souboru našich pacientů. Tato skutečnost nás vede úsudku, že při popálení plamenem, nebo ožehem, je vhodné provádět vyšetření až ve fázi rozvoje zánětlivé fáze hojení, zajišťující reparační změny, po 48 hodinách od úrazu. Mill se o možném efektu mechanismu úrazu na rannou perfuzi ve své práci zmiňuje.

Naproti tomu práce Colina (2003) poukazuje na změnu perfuze v prvních 72 hodinách, kdy potvrdil její vývoj v časovém bodě 24-48-72 hodin po úrazu [97]. Uvádí, že v jeho souboru 22 pacientů byl operován pacient s počáteční nízkou perfuzí, histologie ale prokázala povrchové popálení.

Již O'Reilly ve své práci (1989) prokázal, že výsledky perfuze, měřené laserdopplerometricky pomocí LDF, tedy metodou fungující na stejném principu jako LDI, nekorelují s histologickými nálezy v 1. 24 hodinách [95]. Také Atiles (1993) a Niazi (1993) prokázali, že změny perfuze probíhají během 48-72 hodin [63, 98].

Jiným faktorem ovlivňujícím dobu hojení při stejné perfuzi je pohlaví. Baker prokázal, že ženy vykazovaly vyšší perfuzi než muži u ran se stejnou dobou hojení. Tento faktor může snížit přesnost při predikci doby hojení o 1,1 %. Vliv věku a pigmentace Baker ve své práci neprokázal. Neprokázal ani vliv rozsahu na rannou perfuzu, i když v jeho souboru 310 ran byl maximální rozsah popálení 30 % [96]. V naší práci bylo spektrum pacientů obdobné, s průměrným rozsahem popálení 8,8 %. Pouze u 1 pacientky s větším rozsahem popálení (45 % TBSA) bylo provedeno LDI měření. Výsledkem byla vysoká perfuze a elevace mezi 2 měřeními (3. den 320 PU, 5. den 380 PU), které predikovaly zhojení do 3 týdnů, ke zhojení však došlo až 25. den, příznivým faktorem byl nárůst perfuze behem 2 dnů. Výsledná jizva byla kvalitní a nevykazovala tendenci k sekundárnímu rozpadu. Tato pacientka byla ve fázi šoku, který mohl mít vliv na rychlosť hojení. Na základě matematického modelování Baker poznamenal, že při rozsáhlých popáleninách, nad 30 %, by mohlo dojít k snížení přesnosti při predikci doby hojení maximálně až na 85 %. K definitivním závěrům je zapotřebí vyšetření většího počtu pacientů s kritickým rozsahem popálení, nad 40 %.

Naše výsledky týkající se elevace perfuze se shodují se závěry Colina, Atila i Niaziho [63, 97, 98]. Elevaci perfuze jsme však sledovali až do 9. poúrazového dne a pro jednotlivé časové intervaly jsme stanovili perfuzní hladiny determinující schopnost spontánního zhojení. Perfuzní hladiny 147, 186 a 267 PU byly určeny jako minimální hodnoty perfuze, nutné ke zhojení do 21 dnů. Ruzné hodnoty perfuze korelují také s prací Hoeksem (2008), který sledoval přesnost metody v průběhu času a to v 0., 1., 3., 5. a 8. poúrazovém dni [65]. Přestože cut off hodnota perfuze se v jeho práci nemění, je 220 PU, narůstá během času přesnost LDI od 54 % do 100 % při predikci průběhu hojení. Tato skutečnost koreluje s námi určenými narůstajícími cut off hodnotami během 9 denního poúrazového období. Počet perfuzních jednotek v Hoeksemově práci je platný pro laserdoppler pracující s NIR (near infrared) zářením (Moor instrument), které penetruje hlouběji, až do 2 mm. Naše výsledky jsou platné pro LDI přístroje pracující s He-Neonovým laserem, kde je hloubka penetrace 1 mm. Nepatrné rozdíly

v perfuzních jednotkách vybízí ke vzniku relativních ukazatelů vycházejících z opakovaných měření. Trend vývoje perfuze je proto důležitým prognostickým faktorem.

Narůstající ranná perfuze ve skupině zhojených, na rozdíl od konzistentně nízké perfuze ve skupině pacientů nezhojených, je také důležitý ukazatel pro určení povahy rány. Tento trend je patrný na grafu č. 3 (kapitola výsledky). Nárůst krevní perfuze u 1. skupiny pacientů je obrazem rozvoje fyziologické zánětlivé reakce s vazodilatací, zajišťující metabolické potřeby rány, což svědčí pro průchodnost mikrocirkulace v dermálních plexech. Naproti tomu poškozená mikrocirkulace u 2. skupiny pacientů neumožní vazodilataci k dosažení dostatečné perfuze nezbytné pro uskutečnění reparačních změn.

Nízká perfuze v prvních 2 poúrazových dnech je dána kompresí vaskulárního lože lokálním edémem, vasokonstrikcí způsobenou dysbalancí prostanoidů po popálení a také mikrotrombotizací. To může falešně imitovat destrukci kapilárního řečiště. Perfuze v zóně stázy, tedy vrstvě rány s reverzibilním poškozením, mezi koagulační nekrózou a intaktní tkání, je ukazatelem úspěšnosti tekutinové resuscitace a dává prostor dalším LDI měřením při sledování efektu lokální léčby, vlivu lokálních antibakteriálních prostředků na rychlosť hojení a také vlivu lokálně aplikovaných antikoagulantů na hojení rány.

Na základě zmiňovaných skutečností a výsledných cut off hodnot navrhujeme, pro určení správné diagnózy a terapeutického plánu, diagnostický algoritmus, který je také hlavním výstupem této části práce. Pacienta lze vyšetřit co nejčasněji po úrazu, a to i během prvních 48 hodin. Spolehlivě indikovat lze v tomto časném období pacienty pouze ke konzervativní léčbě, ne však k operaci. S ohledem na rostoucí perfuzi je možné konzervativně léčit rány, které v tomto období dosáhnou perfuze alespoň 148,5 PU, což je cut off hodnota pro následující časový interval (od 3. do 5. poúrazového dne). Důvodem je rychlý nárůst perfuze během prvních 48 hodin [65, 98, 99]. V následujících časových intervalech rozhodujeme o terapii dle porovnání s příslušnými cut off hodnotami. V případě nízké perfuze je navíc vhodné zopakovat alespoň 1x měření s odstupem 24-48 hodin a potvrdit tak správnou indikaci k operaci na základě trendu vývoje perfuze. V případě vyšší perfuze pacienta indikujeme ke konzervativní terapii. Zvláštní situace nastává, pokud je perfuze nedostatečná a přesto vykazuje elevaci. Spontánní zhojení zde probíhá zdlouhavě, déle než 21 dnů (proto je preferovaný způsob léčby operace), konzervativní způsob léčby volíme pouze vyjímečně (malý rozsah popálení, rizikový pacient, odmítnutí operační léčby), viz. obr. 3.

Tato metoda vyžaduje určitou zkušenosť vyšetřujícího, která může být do jisté míry úskalím metody. Nekrózy a intaktní tkáně vykazují podobnou perfuzi a je nutné je makroskopicky na skenech a ráně rozlišit. Zaznamenali jsme pacienta s IIa stupněm popálení

(„superficial dermal burn”), který byl vyšetřen 6. poúrazový den, kdy rána vykazovala falešně nízkou perfuze. Nízká perfuze byla ale způsobena ústupem zánětlivé rakce s počínající diskrétní epitelizací a to 5 dnů před úplným zhojením.

Infekce rány mohou ovlivnit výsledky LDI vyšetření jednak zvýšením perfuze při vyplavení proinflamatorních vazodilatačních působků, ale také prohloubením popálené plochy nebo lýzou vznikající epidermis, což v konečném důsledku vede k prodloužení hojení a potřebě operace. U pacienta s infekcí rány nelze spolehlivě predikovat průběh léčby na základě LDI měření z důvodu možné konverze hloubky popálení. Pravidelný bakteriální screening je tedy velmi důležitý a nález koků, zejména Streptokoků, je varovný, u Stafylokoků je nutno obezřetnosti, pokud počet kolonií přesáhne 1000 na 25 cm². V jednom případě bylo nutné vyloučit pacienta z tohoto důvodu ze studie.

Výzvou zůstavají malé nespolupracující děti, jejichž vyšetření vyžaduje analgosedaci. Pokrok v technologii skenování laserdopplerometrií a příchod LASCA technologie, se snímáním okamžité hodnoty perfuze, je řešením pro nejmenší pacienty. Před zařazením technologie do běžné klinické praxe je zapotřebí prozkoumání determinujících hodnot, ev. určení koeficientu pro přepočet počtu perfuzních jednotek, který by umožnil použití diagnostického algoritmu platného pro LDI.

6.2 Diagnostika maligního melanomu

Maligní melanom je vážnou hrozbou pro narůstající incidenci a časnou tendenci k tvorbě metastáz. Často uniká pozornosti pacienta z důvodu podcenění rizika nebo neznalosti základních varovných příznaků. Častěji postihuje starší pacienty, jak vyplývá také z našich výsledků a jak uvádějí studie ostatních autorů [79, 80]. Průměrný věk pacientů s maligním melanomem činil v naší práci 64 let, u benigních lezí pak 48 let. Tento fakt vyplývá z délky expozice UV-B složce záření, která je jedním z hlavních fyzikálních faktorů vyvolávajících maligní zvrat.

V rámci vstupního vyšetření provádí každý lékař při přijetí pacienta fyzikální vyšetření, součástí kterého je také základní onkologický screening, včetně vyšetření kůže. U mužů jsme nejčastěji pozorovali výskyt melanomu na trupu, v 67 %, u žen na dolních končetinách, v 73 %. Tyto oblasti je proto vhodné zvláště pečlivě zkontolovat.

Vzhledem k tomu, že se v naší praxi setkáváme jak s pacienty vyšetřenými dermatologem, tak s primozáchyty melanomů, ověřovali jsme, zda by laserdopplerometrie

mohla být screeningovou metodou. Na základě následného histologického vyšetření můžeme konstatovat, že maligní léze vykazovaly signifikantně vyšší perfuzi než jejich okolí, a to v 80 %, oproti 26 % u benigních lézí. V případě malignit byla průměrná perfuze 1,53 x vyšší než v okolní zdravé tkáni, oproti násobku 0,74 x u benigních lézí. Potvrdila se tak schopnost LDI prokázat neovaskularizaci u kožních tumorů, což koreluje s teorií maligní neovaskularizace [92]. Relativní hodnota násobku prokrvení eliminuje možné topografické rozdíly.

Další signifikantní rozdíly mezi maligními a benigními lézemi vykazovaly nepřímé, ovládacím softwarem (PIM III soft) dopočítané ukazatele perfuze: Change of median (out-in): -19,6 PU u malignit vs 9,4 PU u benigních lezí, Change of median % (out-in/in): -34,6 % vs. 26 %, Change of mean (out-in): -23,6 PU u malignit, 10,0 PU u benigních lezí, Change of mean % (out-in/in): -34,5 % vs. 27,7 %. Matematické znaménko minus vypovídá o vyšší perfuzi uvnitř léze, je tak základním orientačním markrem. Naproti tomu u přímých ukazatelů perfuze, jako je mean a median, nebyly shledány statisticky signifikantní rozdíly mezi malignitami a benigními névy. Celková perfuze pigmentové léze je totiž ovlivněna klidovou perfuzí spodiny, která je topograficky rozdílná.

Důležitou hodnotou je standardní odchylka SD, která vypovídá o variabilitě perfuze uvnitř tumoru. Maligní melanomy vykazovaly signifikantně vyšší hodnoty než benigní léze: 37,7 vs. 19,9. K podobným závěrům ve variabilitě dospěl ve své práci také Stucker (2002), při rozdelení tumoru na 9 kvadrantů. Jeho zjištění je, že melanomy vykazují zvýšené prokrvení zejména ve vnitřním poli, basaliomy jsou prokrveny rovnoměrně [91]. V našem souboru jsme měli pouze 5 basaliomů, ale i ty vykazovaly nadprůměrné hodnoty SD, 66,2 (10,7-141,6).

Velikost standardní odchylky vykazovala korelací s pokročilostí stádií melanomů. Zatímco u melanomů *in situ* (Clark I) byla průměrná SD 19,5, u stádia Clark II 35,1, Clark III 38,6 a Clark IV a V 86,5. Tato hodnota velmi dobře eliminuje vliv topografie.

Korelace s pokročilostí histopatologického stádia onemocnění dle Clarka vykazovaly jak přímé, tak nepřímé ukazatele perfuze. Průměrný násobek perfuze proti okolí byl u stádia Clark I 0,8 x, Clark II 1,85 x, Clark III 1,5 x, Clark IV, V 2,44 x. Stádia Clark III, IV, V vykazovaly signifikantně vyšší hodnoty perfuze než stádium Clark I, (vyjádřené středními hodnotami perfuze Mean, Median) a signifikantně vyšší negativitu rozdílů perfuzí „out-in“ (Change of median, Change of median %, Change of mean, Change of mean %). Teorie maligní neovaskularizace podporuje tyto výsledky. Větší počet invazivních nádorových buněk produkuje více působků charakteru VEGF, neovaskularizace pak zajišťuje vyšší metabolické nároky.

Na základě schopnosti detekce vaskularity lze s pomocí LDI metody odhadnout pokročilost onemocnění.

Při hodnotě Breslow 1 mm narůstá četnost mikrometastáz až ke 20 % [80]. Abychom mohli prakticky využít LDI při naplánování rozsahu operace, bezpečnostního lemu a zejména biospie sentinelové uzliny, stanovili jsme cut off hodnody pro % nárůst perfuze melanomu proti okolí, s cílem odhalit histopatologická stádia Breslow 1mm a ev.Clark II. Při cut off hodnotě 36 % nárůstu prokrvení proti okolí (out-in/in) je senzitivita metody 84 %, specificita 73 %. Při 31 % nárůstu perfuze je senzitivita 92 % a specificita 68 %. Tato druhá hodnota lépe vyhovuje klinickým požadavkům, snižuje riziko falešného podcenění těchto stádií. Byla prokázána také středně silná korelace mezi vertikálním rozměrem nádoru dle Breslowa a násobkem prokrvení malignity.

V rukou melanomové komise, jejíž součástí je také chirurg, by metoda LDI, spolu s dermatoskopem, mohla sloužit jako pomůcka k přesnějšímu navržení léčebného plánu a indikaci vyšetření sentinelové uzliny.

Úskalím této metody zůstavají melanomy *in situ*, které v naší práci vykazovaly pozitivitu zvýšeného prokrvení pouze ve 35 % případů, zatímco ve stádiu Clark II byla pozitivita zvýšeného prokrvení ve 100 %, ve stádiu Clark III 93 % a Clark IV a V 100 %. Nízká hodnota zvýšeného prokrvení u melanomů *in situ* ovlivňuje také senzitivitu a specificitu LDI metody při záchytu malignity. Při cut off hodnotě nárůstu prokrvení pigmentové léze oproti okolí o 10% je senzitivita metody 76 %, specificita 78 %, pozitivní prediktivní hodnota 87 % a negativní prediktivní hodnotou 62 %. Jako samostatná screeningová metoda není proto, vzhledem k těmto hodnotám, při záchytu maligních lézí metodou volby. Na druhé straně, ve spojení se základními ABCDE klinickými parametry je LDI dobrou pomůckou při potvrzení suspekce na maligní melanom. Rozdílný počet melanomů *in situ* ve studiích může být důvodem rozdílných hodnot průměrného násobku perfuze malignit proti okolí v práci Stuckerově (1,8 x) oproti našim výsledkům (1,53 x) [92].

Předmětem dalšího výzkumu je skutečnost, zda lze přítomnost zvýšeného prokrvení u melanomů *in situ* pokládat za rizikový faktor či mezistádium Clark I-II před mikroskopicky patrným průnikem nádorových buněk bázální membránou. Melanomy ve stádiu Clark II již vykazují signifikantně vyšší pozitivitu zvýšeného prokrvení (nádorové buňky jsou přítomny v dobře vaskularizované papilární dermis). Dle naší teorie mohou být incipientní formy malignity zastiženy v různých fázích invaze přes přirozenou bariéru, bazální membránu. Průnik bazální membránou probíhá ve 3 krocích: přichycení k bazální membráně, proteolýza proteinové struktury s fokálními defekty (detekovatelnými elektronovým mikroskopem) a

následná lokomoce přes bazální membránu, která je jinak pro velké proteiny nepropustná [100, 101]. K potvrzení této teorie je zapotřebí větší množství pacientů a také dalších imunohistochemických vyšetření. Přestože Clarkova klasifikace není hlavním prognostickým faktorem, má hodnocení dle Clarka význam zejména u melanomů s hodnotou Breslow menší než 1 mm, u většího vertikálního rozměru je hodnocení dle Clarka alternativní klasifikací.

Při rozvaze melanomové komise o rozsahu reoperace u mladších pacientů s melanomem *in situ* (již vyšetřených histologicky, po excizi bez ochranného lemu), by přítomnost zvýšené perfuze mohla přispět k rozšíření bezpečnostního lemu nebo provedení biopsie sentinelové uzliny.

Výhodou metody LDI je informace o cévním zásobení, kterou ostatní metody nepostihnou. Této vlastnosti lze využít pro sledování efektu terapie maligních kožních nádorů fotosenzitizéry na chirurgicky obtížně řešitelných lokalitách, zejména v oblasti obličeje [103, 104]. Také možnost opakování sledování, monitorace vývoje perfuze a elektronická archivace výsledků může posloužit ke kontrole pacientů s mnohočetnými névy. Změny vaskularizace uvnitř pigmentového névu by měly přimět klinika zvážit indikaci operace, stejně jako morfologické změny zachycené pouhým okem nebo dermatoskopem [105].

7. Závěr

Laserdopplerometrie jako objektivní metoda hodnocení kapilárního prokrvení tkání přinesla do mnoha oblastí praktické medicíny novou neinvazivní vyšetřovací metodu, která se uplatňuje tam, kde je důležitá informace o cévním zásobení nejpovrchnejších struktur. Kůže, největší tělesný orgán, je tomuto vyšetření nejdostupnější. Zobrazovací metoda LDI umožňuje rychlé neinvazivní a dobře interpretovatelné vyšetření.

Mnoho nozologických jednotek je spojeno s patofyziologickými změnami ovlivňujícími cévní zásobení kůže. Jsou mezi také termická traumata a onkologická onemocnění, která patří mezi nejčastější příčiny kožních chorob. S pomocí LDI lze nyní nepřímo zlepšit kvalitu života těchto pacientů a snížit pravděpodobnost následné morbidity.

Přehled literatury

1. Hecht J. Short history of laser development. *Optical Engineering* 2010; 49: 99-122. DOI: 10.1117/1.3483597.
2. Watts AMI, Tyler MPH, Perry ME, Roberts AHN, McGrouther DA. Burn depth and its histological measurement. *Burns* 2001;27:154–160.
3. Klein MB, Hollinworth W, Rivala FP, Kramer CB, Askay W, Heimbach DM, Gibran NS. Hospital costs associated with pediatric burn injury. *J Burn Care* 2008;29:632–637.
4. Lawrence KHC, Ward D, Lam L, Holland AJA. The impact of laser Doppler imaging on time to grafting decisions in pediatric burns. *J Burn Care* 2010;31:328–332.
5. Droog EJ, Steenbergen W, Sjoberg F. Measurement of depth of burns by laser Doppler perfusion imaging. *Burns* 2001; 27: 561–568.
6. Hemington-Gorse SJ. A comparison of laser Doppler paging with other measurement techniques to assess burn depth. *J wound care* 2005;14:151–153.
7. Jeng JC, Bridgeman A, Shivnan L, Thornton PM, Alam H, Clarke TJ. Laser Doppler imaging determines need for excision and grafting in advance of clinical judgment: a prospective blinded trial. *Burns* 2003;29:665–670.
8. La Hei ER, Holland AJ, Martin HCO. Laser Doppler paging of paediatric burns: burn wound outcome can be predicted independent of clinical examination. *Burns* 2006;32:550–553.
9. Cho JK, Moon DJ, Kim SG, Lee HG, Chung SP, Chung SP. Relationship between healing time and mean perfusion units of laser Doppler imaging (LDI) in pediatric burns. *Burns* 2009;35:818–823.
10. Mayer J. Systematic review of the diagnostic accuracy of dermatoscopy in detecting malignant melanoma. *The Medical Journal of Australia* 1997; 167: 206-210.
11. Barnhill RL, Fandrey K, Levy MA. Angiogenesis and tumor progression of melanoma. Quantification of vascularity in melanocytic naevi and cutaneous malignant melanoma. *Lab Invest* 1992; 67: 331–7.
12. Ribatti D, Vacca A, Palma W. Angiogenesis during tumor progression in human malignant melanoma. *HEXS* 1992; 61: 415–20.
13. Vacca A, Ribatti D, Roncali L. Melanocyte tumor progression is associated with changes in angiogenesis and expression of the 67-kilodalton laminin receptor. *Cancer* 1993; 72: 455–61.

14. Srivastava A, Hughes LE, Woodcock JP, Laidler P. Vascularity in cutaneous melanoma detected by Doppler sonography and histology: correlation with tumour behaviour. *Br J Cancer* 1989; 59: 89–91.
15. Navrátil L, Rosina J. Medicínská biofyzika. 1. vyd. Praha: Grada, 2005, 524 s. ISBN 80-247-1152-4.
16. Hrazdíra I, Mornstein V. Lékařská biofyzika a přístrojová technika. 1. vyd. Brno: Neptun, 2001, 381 s.
17. Eden A. The Search for Christian Doppler. Vienna: Springer, 1992, s 1-4.
18. Ballot B. Akustische Versuche auf der Niederländischen Eisenbahn, nebst gelegentlichen Bemerkungen zur Theorie des Hrn. Prof. Doppler. *Annalen der Physik und Chemie* 1845; 142: 321-351.
19. Becker BJ. Unravelling starlight. William and Margaret Huggins and the rise of the new astronomy. New York: Cambridge University Press, 2011, 380 s. ISBN 11-070-0229-X.
20. Watkins D, Holloway GA. An instrument to measure cutaneous blood flow using the Doppler shift of laser light. *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on bio-medical engineering / Bio-medical Engineering Group* 1978; 1: 28-33.
21. Riva C, Ross B, Benedek G. Laser Doppler measurements of blood flow in capillary tubes and retinal arteries. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1972; 11: 936-944.
22. Stern MD. In vivo evaluation of microcirculation by coherent light scattering. *Nature* 1975; 254: 56–58.
23. Jaskille AD, Shupp JW, Jordan MH, Jeng JC. Critical review of burn depth assessment techniques: part I. Historical review. *Journal of Burn Care & Research* 2009; 30 : 937-947.
24. Forst T, Forst S, Strunk K, Löbig M, Welter K, Kazda C. Impact of insulin on microvascular blood flow and endothelial cell function in the postprandial state in patients with Type 1 diabetes. *Journal of Diabetes and its Complications* 2005; 19: 128-132.
25. Procházka V, Gumulec J, Jalůvka F, Šalounová D, Jonszta T, Czerný D. Cell therapy, a new standard in management of chronic critical limb ischemia and foot ulcer. *Cell transplantation* 2010;19: 1413-1424.
26. Lo S, Grob M, Gilbert P, Dheansa B. Tattoos masquerading as full-thickness burns: limitations of laser Doppler burns assessment. *Plastic and reconstructive surgery* 2006; 117: 716-717.

27. Draijer M, Hondebrink E, van Leeuwen T, Steenbergen W. (2009). Review of laser speckle contrast techniques for visualizing tissue perfusion. *Lasers in medical science* 2009; 24: 639-651.
28. Bornmyr S, Castenfors J, Svensson H, Wroblewski M, Sundkvist G, Wollmer P. Detection of autonomic sympathetic dysfunction in diabetic patients. A study using laser Doppler imaging. *Diabetes Care* 1999;22: 593-597.
29. Khan F, Patterson D, Belch J, Hirata K, Lang C. Relationship between peripheral and coronary function using laser Doppler imaging and transthoracic echocardiography. *Clinical Science* 2008; 115: 295-300.
30. Turner J, Belch JF, Khan F. Current concepts in assessment of microvascular endothelial function using laser Doppler imaging and iontophoresis. *Trends in cardiovascular medicine* 2008;18:109-116.
31. Seifalian AM, Chaloupka K, Parbhoo SP. Laser Doppler perfusion imaging—a new technique for measuring breast skin blood flow. *International Journal of Microcirculation* 1995;15:125-130.
32. Rosato E, Rossi C, Molinaro I, Giovannetti A, Pisarri S, Salsano F. Laser Doppler perfusion imaging in systemic sclerosis impaired response to cold stimulation involves digits and hand dorsum. *Rheumatology* 2011; 50: 1654-1658.
33. Gunawardena H, Harris ND, Carmichael C, McHugh NJ. Microvascular responses following digital thermal hyperaemia and iontophoresis measured by laser Doppler imaging in idiopathic inflammatory myopathy. *Rheumatology* 2007; 46: 1483-1486.
34. Ferrell WR, Sturrock RD, Mallik AK, Abbot NC, Lockhart JC, Edmondson WD. Laser Doppler perfusion imaging of proximal interphalangeal joints in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental rheumatology* 1995; 14: 649-652.
35. Terada K, Miyai N, Maejima Y, Sakaguchi S, Tomura T, Yoshimasu K. Laser Doppler imaging of skin blood flow for assessing peripheral vascular impairment in hand-arm vibration syndrome. *Industrial health* 2007; 45: 309-317.
36. Goh CL, Khoo L. Laser Doppler perfusion imaging (LDPI) and transepidermal water loss (TEWL) values in psoriatic lesions treated with narrow band UVB phototherapy. Dermal vascularity may be useful indicator of psoriatic activity. *ANNALS-ACADEMY OF MEDICINE SINGAPORE* 2004; 33: 75-79.
37. Troilius A, Wårdell K, Bornmyr S, Nilsson GE, Ljunggren B. Evaluation of port wine stain perfusion by laser Doppler imaging and thermography before and after argon laser treatment. *Acta dermato-venereologica* 1991; 72: 6-10.
38. Mayrovitz HN, Groseclose EE, Markov M, Pilla AA. Effects of permanent magnets on resting skin blood perfusion in healthy persons assessed by laser Doppler flowmetry and imaging. *Bioelectromagnetics* 2001; 22: 494-502.

39. Sommer A, Veraart J, Neumann M, Kessels A. Evaluation of the vasoconstrictive effects of topical steroids by laser-Doppler-perfusion-imaging. *Acta Dermato Venereologica* 1998; 78: 15-18.
40. Smrcka M, Ogilvy CS, Crow RJ, Maynard K I, Kawamata T, Ames III A. Induced hypertension improves regional blood flow and protects against infarction during focal ischemia: time course of changes in blood flow measured by laser Doppler imaging. *Neurosurgery* 1998; 42:617-625.
41. Shymkiw RC, Zernicke RF, Forrester KR, Bray RC. Evaluation of laser-Doppler perfusion imaging for measurement of blood flow in cortical bone. *Journal of Applied Physiology* 2001; 90: 1314-1318.
42. Raabe A, Van De Ville D, Leutenegger M, Szelényi A, Hattingen E, Gerlach R. Laser Doppler imaging for intraoperative human brain mapping. *NeuroImage* 2009; 44: 1284-1289.
43. Scheflan M, Dinner M. The transverse abdominal island flap: part I. Indications, contraindications, results, and complications. *Annals of plastic surgery* 1983; 10: 24-35.
44. Tindholdt TT, Saidian S, Pripp AH, Tønseth KA. Monitoring microcirculatory changes in the deep inferior epigastric artery perforator flap with laser Doppler perfusion imaging. *Annals of plastic surgery* 2011; 67: 139-142.
45. Zdolsek JM, Droog EJ, Thorfinn J, Lidman D. Laser Doppler perfusion imaging of the radial forearm flap: A clinical study. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery and hand surgery* 2006; 40: 101-105.
46. Schlosser S, Wirth R, Plock JA, Serov A, Banic A, Erni D. Application of a new laser Doppler imaging system in planning and monitoring of surgical flaps. *Journal of biomedical optics*, 2010; 15(3): 036023
47. Komuro Y., Iwata H., Inoue M., Yanai A. Versatility of scanning laser Doppler imaging to detect cutaneous perforators. *Annals of plastic surgery* 2002; 48: 613-616.
48. Liu DL, Svanberg K, Wang I, Andersson-Engels S, Svanberg S. Laser Doppler perfusion imaging: New technique for determination of perfusion and reperfusion of splanchnic organs and tumor tissue. *Lasers in surgery and medicine* 1997; 20: 473-479.
49. Sørensen J, Bengtsson M, Malmqvist E, Nilsson G, Sjöberg F. Laser Doppler perfusion imager (LDPI)-for the assessment of skin blood flow changes following sympathetic blocks. *Acta anaesthesiologica scandinavica* 1996; 40: 1145-1148.
50. Seifalian AM, Davidson BR, Rolles K. Laser Doppler imaging for the assessment of liver perfusion during transplantation. *European journal of gastroenterology & hepatology* 1993; 5: 479-482.
51. Kolarsick PA, Kolarsick MA, Goodwin C. Anatomy and Physiology of the skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association* 2011; 3: 203-213.

52. Konigová R. Komplexní lečba popálenin. Praha: Grada, 1999.
53. Herndon DN (4th Ed). Total burn care. New York: Saunders Elsevier, 2012.
54. Hettiaratchy S, Dziewulski P. ABC of burns: pathophysiology and types of burns. British Medical Journal 2004; 328: 1427.
55. Kloppenberg G, Beerthuizen H, Ten Duis HJ. Perfusion of burn wounds assessed by Laser Doppler Imaging is related to burn depth and healing time. Burns 2001; 27: 359–363
56. Janžekovic Z. A new concept in the early excision and immediate grafting of burns. Journal of Trauma and Acute Care Surgery 1970, 10: 1103-1108.
57. Lawrence KHC, Ward D, Lam L, Holland AJA. The impact of laser Doppler imaging on time to grafting decisions in pediatric burns. J Burn Care 2010;31:328–332.
58. Klein MB, Hollinworth W, Rivala FP, Kramer CB, Askay W, Heimbach DM, Gibran NS. Hospital costs associated with pediatric burn injury. J Burn Care 2008;29:632–637.
59. Cubison TCS, Pape SA, Parkhouse N. Evidence for the link between healing time and the development of hypertrophic scars (HTS) in paediatric burns due to scald injury. Burns 2006;32: 992–999.
60. Riordan CL, McDonough M, Davidson JM, Corley R, Perlov C, Barton R. Noncontact laser Doppler imaging in burn depth analysis of the extremities. J Burn Rehabil 2003;24:177–186.
61. Brown RFR, Rice P, Bennet NJ. The use of laser Doppler imaging as an aid in clinical management decision making in the treatment of vesicant burns. Burns 1998;24:692–698.
62. Cho JK, Moon DJ, Kim SG, Lee HG, Chung SP, Yoon CJ. Relationship between healing time and mean perfusion units of laser Doppler imaging (LDI) in pediatric burns. Burns 2009;35: 818–823.
63. Niazi ZBM, Essen TJH, Papini R, Scott D, Mc Lean NR, Blafl MJM : New laser Doppler scanner, a valuable adjunct in burn depth assessment. Burns 1993;19: 485–489.
64. Mill J, Cuttle L, Harkin DG, Kravchuk O, Kimble RM. Laser Doppler imaging in a paediatric burns population. Burns 2009; 35: 824-831.
65. Hoeksema H, Van de Skipe K, Tondu T, Hamdi M, Landuyt K, Blondeel P. Accuracy of early burn depth assessment by laser Doppler imaging on different days post burn. Burns 2009;35: 36–45.
66. Baryza MJ, Baryza GA. The Vancouver Scar Scale: an administration tool and its interrater reliability. Journal of Burn Care & Research 1995;16: 535-538.

67. Bray R, Forrester K, Leonard C, McArthur R, Tulip J, Lindsay R. Laser Doppler imaging of burn scars: a comparison of wavelength and scanning methods. *Burns* 2003; 29: 199-206. DOI: 10.1016/S0305-4179(02)00307-8
68. Klosová H, Štětinský J, Bryjová I, Hledík S, Klein L. Objective evaluation of the effect of autologous platelet concentrate on post-operative scarring in deep burns. *Burns* 2013; 39: 1263-1276.
69. Lucas RM, McMichael AJ, Armstrong BK, Smith WT. Estimating the global disease burden due to ultraviolet radiation exposure. *International journal of epidemiology* 2008; 37: 654-667.
70. LUCAS R. et al. Solar ultraviolet radiation. Assessing the environmental burden of disease at national and local levels. *Environmental Burden of Disease Series* 2006; 13.
71. de Vries E, Bray FI, Coebergh JW. Changing epidemiology of malignant cutaneous melanoma in Europe 1953–1997: rising trends in incidence and mortality but recent stabilizations in western Europe and decreases in Scandinavia. *Int J Cancer* 2003; 107: 119–26.
72. Pizinger K. Kožní pigmentové projevy. 1. vyd. Praha: Grada, 2003, 124 str.
73. Dusek L, Muzik J, Kubasek M, et al. Epidemiology of malignant tumours in the Czech Republic [online]. Masaryk University 2005. Available from: <http://www.svod.cz>
74. Langley RGB, Sober AJ. A clinical review of the evidence for the role of ultraviolet radiation in the etiology of cutaneous melanoma. *Cancer Incest* 1997; 15: 561.
75. Holly EA, Kelly JV, Shpall SN, Chiu SH. Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1987; 17: 459–468.
76. Clark WH, Elder DE, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, Synnestvedt M. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst.* 1989; 81: 1893–904.
77. Marghoob AA. Congenital melanocytic nevi: evaluation and management. *Dermatologic clinics* 2002; 20: 607-616.
78. Fikrle T, Pizinger K. Maligní melanom. *Onkologie* 2010;4: 225-228.
79. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3635–3648.
80. Cascinelli N, Belli F, Santinami M, Fait V, Testori A, Ruka W, Kirov K. Sentinel lymph node biopsy in cutaneous melanoma: the WHO Melanoma Program experience. *Annals of Surgical Oncology* 2000; 7: 469-474.
81. Roesch A, Volkenandt M. Melanoma. Braun-Falco' Dermatology. 3rd Edition, Heidelberg: Springer, 2009: 1416–1432.

82. Garbe C, Terheyden P, Keilholz U, Kölbl O, Hauschild A. Treatment of melanoma. *Dtsch Arztebl Int* 2008;105: 845-851.
83. Kittler H, Pehamberger H, Wolff K. Diagnostic accuracy of dermoscopy. *Lancet Oncol* 2002; 3:159-165.
84. Krajsová I. Melanom. 1. vyd. Praha: Jessenius Maxdorf, 2006: 332.
85. Wang SQ, Hashemi P. Noninvasive imaging technologies in the diagnosis of melanoma. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*. WB Saunders 2010: 174-184.
86. Patel JK, Konda S, Perez OA, Amini S, Elgart G, Berman B. Newer technologies/techniques and tools in the diagnosis of melanoma. *European Journal of Dermatology* 2008;18: 617-631.
87. Srivastava A, Ralhan R, Kaur J. Angiogenesis in cutaneous melanoma: pathogenesis and clinical implications. *Microscopy research and technique* 2003; 60: 208-224.
88. Hunger RE, Torre RD, Serov A, Hunziker T. Assessment of melanocytic skin lesions with a high-definition laser Doppler imaging system. *Skin Research and Technology* 2012; 18: 207-211.
89. Ilias, M. A., Wårdell, K., Stücker, M., Anderson, C., & Salerud, E. G. Assessment of pigmented skin lesions in terms of blood perfusion estimates. *Skin research and technology* 2004; 10: 43-49.
90. Stücker M, Horstmann I, Nüchel C, Röchling A, Hoffmann K, Altmeyer P. Blood flow compared in benign melanocytic naevi, malignant melanomas and basal cell carcinomas. *Clinical and experimental dermatology* 1999; 24: 107-111.
91. Stücker M, Esser M, Hoffmann M, Memmel U, LLER AH, Von Borman C. High-resolution laser Doppler perfusion imaging aids in differentiating between benign and malignant melanocytic skin tumours. *Acta Derm Venereol* 2002; 82: 25-29
92. Stücker M, Springer C, Paech V, Hermes N, Hoffmann M, Altmeyer P. Increased laser Doppler flow in skin tumors corresponds to elevated vessel density and reactive hyperemia. *Skin Research and Technology* 2006; 12:1-6.
93. Khanh N, Ward D, Lam L, Holland AJ. Laser Doppler Imaging prediction of burn wound outcome in children: Is it possible before 48h?. *Burns* 2010; 36: 793-798.
94. Holland AJ, Martin HC, Cass DT. Laser Doppler imaging prediction of burn wound outcome in children. *Burns* 2002; 28: 11-17.
95. O'Reilly TJ, Spence RJ, Taylor RM, Scheulen JJ. Laser Doppler Flowmetry Evaluation of Burn Wound Depth. *Journal of Burn Care* 1989; 10: 1-6.

96. Baker R, Weinand CH, Jeng JC, Hoeksema H, Monstrey S., Pape SA, Spence R, Wilson D. Using ordinal logistic regression to evaluate the performance of laser-Doppler predictions of burn-healing time: Logistic Regression. BMC Medical Research Methodology 2009; 9: 301-325.
97. Riordan CL, McDonough M, Davidson JM, Corley R, Perlov C, Barton R. Noncontact laser Doppler imaging in burn depth analysis of the extremities. J Burn Rehabil 2003;24:177–186.
98. Atiles L, Mileski W, Spann K, Pardue G, Hunt J, Barter C. Early assesment of pediatric burn wounds by laser Doppler flowmetry. J Burn Care Rehabil 1995;16:596–601.
99. Holland AJ, Martin HC, Cass DT. Laser Doppler paging prediction of burn wound outcome in children. Burns 2002;28:11–17.
100. Liotta LA. Tumor invasion and metastases: role of the basement membrane. Warner-Lambert Parke-Davis Award lecture. The American Journal of Pathology 1984;117:339-348.
101. Martinez-Hernandez A, Amenta PS. The basement membrane in pathology. Lab.Invest. 1983; 48: 656-677.
102. Timpl R, Wiedemann H, Delden V, Furthmayr H, Kuhn K. (1981). A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes. European Journal of Biochemistry 1981; 120 : 203-211.
103. Kolarova H, Tomankova K, Bajgar R, Kolar P, Kubinek R. Photodynamic and sonodynamic treatment by phthalocyanine on cancer cell lines. Ultrasound in medicine & biology 2009; 35:1397-1404.
104. Kennedy JC, Pottier RH, Pross DC. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin: IX: basic principles and present clinical experience. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 1990; 6 : 143-148.
105. Kittler H, Pehamberger H, Wolff K. Follow-up of melanocytic skin lesions with digital epiluminiscence microscopy: Patterns of modification observed in early melanoma, atypical nevi, and common nevi. J Am Acad Dermatol 2000; 43: 467–476.

Souhrn: Využití laserového záření v diagnostice

Úvod:

Unikátní fyzikální vlastnosti laserů umožnily jejich využití v lékařství v oblasti diagnostiky. Analýzou diskrétních změn frekvence laserového záření po interakci s tkání lze detekovat prokvení povrchových tkáňových struktur, vyjádřené počtem arbitrárních perfuzních jednotek (PU). Laser doppler imaging je zobrazovací metoda pro vyšetření mikrocirkulace, využívající tohoto principu. V oblasti popálenin i kožních malignit je stav mikrocirkulace proměnnou ovlivňující prognózu onemocnění.

Cíle:

Cílem práce bylo sestavení diagnostického algoritmu pro hodnocení hloubky popálení na základě ranné perfuze a ověření schopnosti metody LDI detektovat maligní melanom a jeho stádia.

Metody:

Do studie diagnostiky hloubky popálení bylo zařazeno 113 ran u 96 pacientů, celkem bylo provedeno 268 měření během 9 poúrazových dnů. Na základě stavu hojení k 21. dni nebo vzhledem k histologickému nálezu byli pacienti rozděleni na 2 skupiny: 1. zhojení, 2. nezhojení do 21. dne (ev. s histologickým nálezem popálení III. stupně). 9 denní poúrazové období bylo rozděleno na 4 časové úseky, ve kterých byly analyzovány rozdíly v perfuzi mezi oběma skupinami, s cílem nalézt hladinu perfuze opravňující k indikaci operační léčby.

Za účelem ověření korelace mezi prokvením pigmentového névu a jeho malignitou, resp. histopatologickým stádiem malignity, bylo vyšetřeno pomocí LDI 69 pigmentových lézí, které byly následně excidovány, histologicky vyšetřeny a rozděleny na maligní a benigní. Perfuzní parametry jednotlivých lézí a jejich okolí byly srovnány u obou základních skupin a u podskupin malignit dle histopatologického stádia.

Výsledky:

Ve všech 4 časových intervalech: 1) 1.-2. den, 2) 3.-5. den, 3) 6.-7. den, 4) 8.-9. den byl u popálených prokázán statisticky signifikantní rozdíl mezi oběma skupinami. Hladinu perfuze indikující operaci (určující popálení III. stupně a IIb stupně, char. „deep dermal burn“) nebylo možné určit pro první interval, z důvodu lokálního otoku a falešně nízké perfuze u některých zhojených pacientů. Ve 2. intervalu byla ROC analysou stanovena cut off hodnota perfuze 147,5 PU, ve 3. intervalu 187,5 PU, ve 4. intervalu 274 PU. Zhojení pacienti vykazovali na rozdíl od nezhojených elevaci perfuze ve sledovaném období.

U maligních pigmentových lézí byl prokázán signifikantně vyšší násobek prokvení proti okolí než u benigních lezí (1,53 vs. 0,74), $p=0,002$, a také variabilita perfuze uvnitř léze, vyjádřena SD (37,7 v.s. 19,9). Střední hodnoty perfuze (median a mean) nevykazovaly statisticky signifikantní rozdíl. Mezi jednotlivými histopatol. stádii dle Clarka (Clark I vs. Clark III, IV, V) byly patrné signif.rozdíly ve všech sledovaných parametrech perfuze: mean, median, SD, change of mean (změna perfuze proti okolí). Pro záchyt melanomu ve stádiu Clark II a více a Breslow nad 1mm byla stanovena cut off hodnota elevace perfuze proti okolí o 31,3 %, senzitivita testu 92 %, specificita 68 %.

Závěr

S pomocí metody LDI lze pacienta s termickým poraněním časně indikovat k operaci. Je však nutné vzít v úvahu čas vyšetření a ev. vývoj perfuze. Při terapii melanomů je LDI užitečnou indícií pro indikaci biopsie sentinelové uzliny u stádií Breslow nad 1mm. Také závažnost lokálního nálezu a anatomickou hloubku invaze lze s pomocí LDI určit na základě středně silné korelace mezi stádiem melanomu a násobkem perfuze proti okolí. Nízký výskyt zvýšené perfuze u melanomů *in situ* (35 %) bude předmětem dalšího výzkumu.

Klíčová slova: Laserdoppler imaging(LDI), perfuzní jednotka, popálení, zhojení, nezhojení, melanom, Clark, Breslow

Summary: The Use of Laser Radiation in Diagnosis

Introduction: The unique physical properties of lasers allowed their use in medicine in the field of diagnostics. Owing to the analysis of discrete changes in frequency of laser radiation after the interaction with the tissue surface, perfusion of tissue structures can be detected, expressed in arbitrary perfusion units (PU). Laser Doppler Imaging(LDI) is an imaging technique utilized to investigate microcirculation, using this principle. Microcirculation is variable influencing prognosis in burns and skin malignancies.

Objectives: The aim of this work was to build a diagnostic algorithm based wound perfusion for assessing the depth of burns and verification of ability of the LDI methods to detect malignant melanoma and to differentiate its stages.

Methods: 113 wounds in 96 patients were enrolled into the study of diagnosing the depth of burns and a total of 268 measurements were performed within 9 days post-injury. The patients were divided into 2 groups based on the condition of wound healing up to 21th post-traumatic day, or due to histology: 1) healed 2) unhealed within 21 days (with histological confirmed grade III). 9 days post-injury period was divided into four periods where the differences in perfusion between the two groups were analyzed in order to find blood perfusion to justify the indication for surgical treatment.

69 pigmented lesions were examined using LDI to verify the correlation between perfusion of benign pigmented nevi and malignant disease, histopathological stage of malignancy, respectively. Lesions were then excised, histologically assessed and divided into malignant and benign. Perfusion parameters of individual lesions and their surroundings were compared in the two main groups and subgroups according to histopathological stage.

Results: In all four time intervals: 1) 1st-2nd day, 2) 3rd-5th day, 3) the 6th-7th day, 4) 8th – 9th day, a statistically significant difference was demonstrated between the two groups of burned patients. Blood perfusion indicating the operation (determining full thickness burn and deep dermal burn) could not be determined for the first interval, due to local edema and falsely low perfusion in some healed patients. Based on ROC analysis, the cut off value of perfusion in the 2nd interval was determined 147.5 PU, 3rd interval 187.5 PU and 4th interval 274 PU. The healed patients showed steadily increase of perfusion during the 9-day period, the unhealed did not.

A significantly higher blood perfusion was demonstrated in malignant pigmented lesions: lesion/surrounding tissue, than in benign lesions (1.53 vs. 0.74), $p = 0.002$, as well as perfusion variability within the lesion, expressed by Standard Deviation (SD 37.7 vs. 19.9). Mean and Median of perfusion inside the lesion did not show a statistically significant difference. There were evident significant differences in all perfusion parameters among the different histopathologic stages according to Clark classification (Clark I vs. Clark III, IV, V): mean, median, SD, change of median, change of mean(lesion-surrounding tissue). The cutoff value for change of median parameter to detect stage Clark II and Breslow over 1 mm was determined as 31.3%, with sensitivity 92 % and specificity 68 %.

Conclusion: The patients with thermal injuries can be early indicated to surgery due to LDI method. However, it is necessary to take into account the time of examination and development of perfusion. LDI is a useful indicator of need of sentinel lymphonode biopsy which has to be made in melanomas Breslow over 1mm. The severity of the local findings and anatomic depth of invasion using LDI can be estimated on the basis of a moderately strong correlation between the stage of melanoma and perfusion. Low incidence of increased perfusion in melanomas in situ (35%) will be the subject of further research.

Key words: Laserdoppler imaging, perfusion unit, burn, healed, nonhealed, melanoma, Clark, Breslow

Publikace autora disertační práce:

Články v časopisech s IF:

1. Štětinský J, Klovová H, Kolářová H, Šalounová D, Bryjová I, Hledík S. The time factor in the LDI (Laser Doppler Imaging) diagnosis of burns. Lasers in surgery and medicine 2015; 47: 196-202. DOI: 10.1002/lsm.22291. IF: 2.611
2. Klovová H, Štětinský J, Bryjová I, Hledík S, Klein L. Objective evaluation of the effect of autologous platelet concentrate on post-operative scarring in deep burns. Burns 2013; 39: 1263-1276. IF: 1.836
3. Prochazka V, Klovová H, **Štětinský J**, Gumulec J, Vitková K, Salounová D, Lakka, GK. Addition of platelet concentrate to Dermo-Epidermal Skin Graft in deep burn trauma reduces scarring and need for revision surgeries. Biomedical Papers 2014; 158:242-258. IF: 1.661

Články v recenzovaných časopisech:

4. Štětinský J, Klovová H, Crkvenjaš Z, Kolářová H. Indikace k operační léčbě popálenin při využití metody laserdoppler paging. Lékař a technika 2013; 43(2): 23-27.

Ostatní články v recenzovaných časopisech:

5. Lipový B, Klovová H, Tokarik M, Kempný T, Chaloupková Z, Štětinský J, Crkvenjaš Z. Severe bullous diseases in the Czech Republic. Epidemiology Reports 2014; 2. DOI: 10.1787/mei-v2012-4-table66-en.
6. Klovová H, Crkvenjaš Z, Petrás L, Štětinský J. (2013). The use of acellular biological xenografts in local treatment of Lyells syndrome. Rozhledy v chirurgii: mesicnik Ceskoslovenske chirurgicke spolecnosti 2013; 93: 76-81.
7. Brat R, Sieja J, Štětinský J. Primary heart tumors as a cause of embolization into the central nervous system: Ten-years' experience. CESKA A SLOVENSKA NEUROLOGIE A NEUROCHIRURGIE 2007; 70, 278-283.
8. Zamecnikova I, Tymonova J, Štětinský J, Bakhtary A, Jourová I, Hladík M, Trávníček B. Critical and severe burn injury in children. Acta chirurgiae plasticae 2004;47:16-18.
9. Zamecnikova I, Štětinský J, Tymonova J, Kadlcik M. Burn injury in children. Acta chirurgiae plasticae 2004; 47:13-15.

Publikovaná abstrakta:

1. ŠTĚTINSKÝ J, KLOSOVA H, CRKVENJAS Z, KOLAROVA H. Využití laserdopplerometrie k diagnostice hloubky popálení. In: Sborník abstrakt z XVI výroční konference České společnosti popáleninové medicíny. Brno, 2010, s.51. ISBN 978-80-210-5290-1.
2. STETINSKY J, KLOSOVA H, KOLAROVA H, ZAPLETALOVÁ J. The blood perfusion monitoring in the burn wound area by LDI in a process of healing time and its clinical meaning. Burns (Impact Factor: 1.946). 2011, 37(1), S4. ISSN 0305-4179.
3. STETINSKY J, KLOSOVA H. LDI, a useful and correct method for early right diagnosis of burn depth. In: Abstracts of 16th Congress of the International Society for Burn Injuries, Edinburgh, Scotland, 9th-13th September,2012. [CD]
4. STETINSKY J, KLOSOVA H, HLEDIK S, BRYJOVA I, KOLAROVA H. Laser Doppler paging of capillary blood flowchanges of various burn wounds. In: 15th European Burn Association Congress, Vienna, Austria, August 28th -31st 2013: abstracts online. Dostupné z <http://www.eba2013.org/images/EBA2013Abstracts.pdf>
5. ŠTĚTINSKÝ J, KOLEK M, KLOSOVÁ H, CRKVENJAŠ Z, PETRÁŠ L. Endokarditida u rozsáhlého popáleninového traumatu. In: Hojení ran. Sborník abstrakt z 18. Výroční konference Společnosti popáleninové medicíny. 2013, 7(2), 15. ISSN 1802-6400. ISBN 978-80-86256-97-9.
6. ŠTĚTINSKÝ J, KLOSOVÁ H. Využití Laser Doppler Imaging k diagnostice hloubky popálení. Hojení ran. 2013, 7(1), 43. ISSN 1802-6400.
7. ŠTĚTINSKÝ J, KLOSOVÁ H, BRYJOVÁ I, PETRÁŠ L. Možnosti LDI (Laser Doppler Imaging) při diagnostice kožního melanomu. In: Sborník abstrakt z XXXVI. Dnů lékařské biofyziky. Lázně Bělohrad, 2013, s.76. ISBN 978-80-87727-04-1.
8. ŠTĚTINSKÝ J, KOLEK M, KLOSOVÁ H, NÉMEČKOVÁ CRKVENJAŠ Z, PETRÁŠ L. Endokarditida u rozsáhle popáleného pacienta. In: Sborník abstrakt konference Medicína a chemie popáleninových stavů. Ostrava, 2014, s.9.ISBN 978-80-905684-1-9.
9. KLOSOVA, H., J. STETINSKY, R. DOLECEK, J. GUMULEC, K. VITKOVA, D. SALOUNOVA, J. DVORACKOVA, H. BIELNIKOVA, V. LEVAKOVA a V. PROCHAZKA. DE graft and Platelet Rich Plasma in deep burn trauma. In: 15th Meeting of International Society for Burn Injuries, Istanbul, Turkey. 2010, June 21st-25th.
10. KLOSOVA, H., J. STETINSKY, K. VITKOVA, D. SALOUNOVA, V. PROCHAZKA, J. DVORACKOVA, H. BIELNIKOVA,G.L. KLEMENT. Platelet rich plasma in surgical treatment of deep burn. In: Abstracts of 16th Congress of the International Society for Burn Injuries, Edinburgh, Scotland, 9th-13th September,2012.[CD]

11. KLOSOVÁ H, ŠTĚTINSKÝ J, PETRÁŠ L, CRKVENJAŠ Z. Laserterapie jizev po termickém traumatu. In: Hojení ran. Sborník abstrakt z 18. Výroční konference Společnosti popáleninové medicíny. 2013, 7(2), 13-14. ISSN 1802-6400. ISBN 978-80-86256-97-9.
12. KLOSOVÁ, H., Z. VÁVROVÁ, J. ŠTĚTINSKÝ. Xe-Derma – možnosti využití v léčbě popáleninového traumatu a další indikační spektrum. In: Hojení ran. 2013, 7(1), 43. ISSN 1802- 6400.
13. BRYJOVÁ, I., H. KLOSOVÁ, J. ŠTĚTINSKÝ a S. HLEDÍK. Metodika objektivního hodnocení jizvení po popáleninách. In: Sborník abstrakt z XXXVI. Dnů lékařské biofyziky. Lázně Bělohrad, 2013, s.18. ISBN 978-80-87727-04-1.
14. KLOSOVA, H., J. STETINSKY, I. BRYJOVA, S. HLEDIK a L. KLEIN. Cutometrical monitoring of the Autologous Platelet Concentrate efficacy in surgical treatment of deep burns – evaluation of the course of scarring. In: 15th European Burn Association Congress, Vienna, Austria, August 28th -31st 2013: abstracts online. Dostupné z <http://www.eba2013.org/images/EBA2013Abstracts.pdf>
15. KLOSOVA, H., J. STETINSKY, I. ZAMECNIKOVA, Z. NEMECKOVA CRKVENJAS a Z. VAVROVA. Xe-Derma®- Possibilities of the use in the treatment of burn trauma and other therapeutic indications. In: 15th European Burn Association Congress, Vienna, Austria, August 28th -31st 2013: abstracts online. Dostupné z <http://www.eba2013.org/images/EBA2013Abstracts.pdf>

Přednášky na odborných setkáních přednesené autorem disertační práce:

1. ŠTĚTINSKÝ J, KLOSOVA H, CRKVENJAS Z, KOLAROVA H. Využití laserdopplerometrie k diagnostice hloubky popálení. XVI. výroční konference České společnosti popáleninové medicíny ČLS JEP. 14.-15.10.2010, Brno. (Poster)
2. ŠTĚTINSKÝ J, KLOSOVÁ H. Využití Laser Doppler Imaging k diagnostice hloubky popálení. XI. celostátní kongres ČSLR s mezinárodní účastí na téma Mezioborová spolupráce při léčbě ran a kožních defektů. 24.–25. 1. 2013, Pardubice.
3. STETINSKY J, KLOSOVA H, HLEDIK S, BRYJOVA I, KOLAROVA H. Laser Doppler paging of capillary blood flowchanges of various burn wounds. 15th European Burn Association Congress. 28.–31.8.2013, Vienna, Austria.
4. ŠTĚTINSKÝ J, KOLEK M, KLOSOVÁ H, CRKVENJAŠ Z, PETRÁŠ L. Endokarditida u rozsáhlého popáleninového traumatu. 18. výroční konference popáleninové medicíny. 3.–4. 10. 2013, Praha.
5. STETINSKY J, KLOSOVA H. LDI, a useful and correct method for early right diagnosis of burn depth. 16th Congress of the International Society for Burn Injuries. 9.–13. 9. 2012, Edinburgh, Scotland.(poster)

6. STETINSKY J, KLOSOVA H, KOLAROVA H, ZAPLETALOVÁ J. The blood perfusion monitoring in the burn wound area by LDI in a process of healing time and its clinical meaning.. 14th European Burns Association Congress.14.–17. 9. 2011, Den Hague, Netherlands.
7. ŠTĚTINSKÝ J, KOLEK M, KLOSOVÁ H, NÉMEČKOVÁ CRKVENJAŠ Z, PETRÁS L. Endokarditida u rozsáhle popáleného pacienta. Konference medicína a chemie popáleninových stavů. 27.2.2014, Ostrava.
8. ŠTĚTINSKÝ J, KLOSOVÁ H, BRYJOVÁ I, PETRÁŠ L. Možnosti LDI (Laser Doppler Imaging) při diagnostice kožního melanomu. XXXVI. dny lékařské biofyziky. 5/2013, Lázně Bělohrad.