

Повышение результативности использования комплексных патоморфологических исследований для своевременной диагностики грибовидного микоза

Г. Д. Сафонова, И. А. Ку克林, М. М. Кохан, Н. В. Кунгуров, О. Г. Римар

Первичные лимфомы кожи (ПЛК), ранее именовавшиеся злокачественными лимфомами кожи, представляют собой большую гетерогенную группу лимфопролиферативных заболеваний кожи (ЛПЗК), развитие которых обусловлено неопластической пролиферацией в коже клонов Т-лимфоцитов, NK-клеток или В-лимфоцитов, и характеризующуюся неуклонно прогрессирующим течением и неблагоприятным прогнозом [1–5].

Грибовидный микоз (ГМ) является наиболее распространенной формой Т-клеточных ПЛК. При классическом варианте ГМ заболевание протекает стадийно с последовательным развитием клинических фаз: пятнистой (эритематозной), бляшечной и опухолевой. Заболевание начинается с розовато-буроватых, неярких пятен разных размеров, с четкими границами, которые расположены несимметрично и чаще локализуются на участках кожи, защищенных от солнечного воздействия. Для бляшечной стадии характерно образование инфильтрированных бляшек различной величины и плотности, желтовато-красной или синюшной окраски. Поверхность их может быть гладкой, слегка шелушащейся или лихенифицированной. Разрешаются бляшки медленно и неравномерно, при разрешении в центре приобретают кольцевидную форму. В опухолевой стадии у больного обычно обнаруживается сочетание пятен, бляшек и опухолевых узлов. Узлы могут формироваться как в области существующих бляшек, так и на непораженной ранее коже. Большинство авторов признается сложность клинической дифференциальной диагностики ранних стадий ПЛК, имитирующих широкий спектр хронических дерматозов (ХД), что делает возможным постановку клинического диагноза ПЛК не более чем у 25–33% больных. Наиболее часто врачу-дерматовенерологу при первичном обращении больного приходится проводить клиническую дифференциальную диагностику ГМ и доброкачественных воспалительных дерматозов: параспориоз, хроническая экзема, псориаз, атопический дерматит, взрослая фаза, диффузный тип [6–10].

Известно, что «золотым стандартом» диагностики ГМ является клиническое обследование с картированием очагов поражения, биопсия кожи с патоморфологическими и иммуногистохимическими (ИГХ) исследованиями, при возможности – определение перестройки гена Т-клеточного рецептора. ГМ характеризуется следующими основными патоморфологическими признаками: формированием эпидермотропного инфильтрата, состоящего преимущественно из Т-лимфоцитов малого и среднего размера, выраженность которого варьирует в зависимости от стадии заболевания; деструктивными изменениями в эпидермисе с нарушением целостности дермоэпидермального соединения и проникновением лимфоцитов в базальный слой, диффузным распространением в шиповатом слое, формированием микроабсцессов Потрие [11, 12].

В основе ИГХ-исследований тканей (биоптата) лежит реакция антиген–антитело, что позволяет выявлять и определять точную локализацию того или иного клеточного или тканевого компонента (антигена) в тканях *in situ* с помощью ИГХ-реакций. Спектр моноклональных антител (МКА), принятый в диагностике ПЛК в соответствии с Федеральными клиническими рекомендациями по дерматовенерологии (2016 г.): CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD20, CD30 [11]. Однако, по данным научных исследований, дополнительную информацию о свойствах дермального инфильтрата при ПЛК дают и другие иммуномаркеры, такие как CD1a — для выявления клеток Лангерганса, а также Ki67 — для оценки пролиферативной активности клеток в составе инфильтратов, что было использовано нами дополнительно к основной панели МКА [5, 12].

Даже при реализации «золотого стандарта» диагностики существуют трудности в интерпретации результатов патоморфологических и ИГХ-исследований биоптатов кожи при дифференциальной диагностике ПЛК и ХД [12–14]. Большинство патоморфологических исследований в области дерматоонкологии выполнено с использованием полуколичественной оценки с применением критериев «отрицательная/положительная реакция», при этом степень выраженности обозначается знаками «+» (от 1 до 4), что не исключает доли субъективизма. На современном этапе в диагностике различных заболеваний все большее значение приобретает использование количественной оценки патоморфологических и ИГХ-характеристик биоптата. С целью объективизации процесса диагностики дополнительной опцией может служить разработка новых диагностических технологий и экспертных систем квантифицированной (с измерением качественных признаков в количественном выражении) оценки результатов патоморфологических и ИГХ-исследований у больных ПЛК [15–19].

Выполнение таких морфометрических исследований требует обязательной стандартизации условий при изготовлении гистологических препаратов, что наилучшим образом достигается использованием современного оборудования, позволяющего выполнять необходимые операции по обработке материала в автоматическом режиме [19]. Комплексное использование современного гистологического оборудования и специализированного программного обеспечения для морфометрии позволяет объективизировать процесс диагностики, повысить ее эффективность при выявлении ПЛК.

На основании анализа результатов количественной оценки объемной доли (ОД) позитивности ИГХ-маркеров лимфоцитов инфильтрата дермы, их субпопуляционного состава и индекса пролиферации (Ki67+) нами разработаны модели предварительной дифференциальной диагностики ГМ и ХД, а также ранних и поздних стадий ГМ, реализуемые с помощью программ для ЭВМ [20–22].

Целью данного ретроспективного исследования является обобщение и анализ результатов комплексных подходов к диагностике ПЛК в ГБУ СО УрНИИДВиИ за период 2010–2019 гг. с использованием методов светооптической микроскопии, иммунофенотипирования и морфометрии, посредством изучения основных качественных и количественных характеристик дермального инфильтрата, формирующегося при различных стадиях ГМ.

Материалы и методы исследования

Проанализированы результаты комплексной диагностики ПЛК в ГБУ СО УрНИИДВиИ за период 2010–2019 гг. Количество обследованных больных с подозрением на ЛПЗК с использованием клинического и гистологического методов — 561, что составило 15,22% от всех проведенных патоморфологических исследований, на основе которых ИГХ-исследования рекомендованы в 225 случаях, выполнено ИФТ — в 146 случаях.

Для постановки диагноза была необходимость выполнения как стандартных патоморфологических исследований, так и использования специальных методов, в частности, ИФТ с целью определения фенотипа лимфоцитов, формирующих инфильтраты в дерме, их количественных параметров (морфометрия) в каждом наблюдении, а также выявления соотношения между наиболее значимыми для дифференциальной диагностики характеристиками лимфоцитов.

Патоморфологические исследования выполнены на светооптическом уровне с использованием исследовательских микроскопов производства LEICA и ZEISS (Германия). Первичные исследования производили с использованием серийных парафиновых срезов толщиной 5 мкм, окрашенных гематоксилином-эозином. В случаях неясного диагноза с целью верификации рекомендовали выполнение ИФТ, показаниями для использования которого являлось обнаружение патоморфологических признаков, характеризующих различные стадии ГМ [11].

ИФТ выполнялось в автоматизированном режиме с использованием иммуногистостейнера Bond-MaX (Германия), МКА производства Leica biosystems Newcastle Ltd (Соединенное Королевство): CD1a (MTB1), CD2 (11F11), CD3 (LN10), CD4 (4B12), CD5 (4C7), CD7 (LP15), CD8 (4B11), CD20 (MJ1), CD30 (1G12), Ki67 (MM1) и необходимых реагентов для постановки ИГХ-реакций. В целях более полной оценки иммунофенотипа лимфоцитов, функциональных потенциалов клеток кожи и формируемого пролиферата нами использована также методика двойного ИФТ, которая дает возможность визуализации в одном поле зрения интересующих объектов, окрашенных различными цветами. Подбор иммуномаркеров для двойного ИФТ осуществлялся в зависимости от цели исследования.

Для морфометрических исследований использованы программы ZEN 2012 (Германия) — для ввода изображений гистологических препаратов и SIAMS (Россия) — для дальнейшей обработки оцифрованных изображений. При выполнении морфометрических исследований использовали парафиновые срезы толщиной 5 мкм, окрашенные методом ИФТ. В каждом наблюдении анализировали по 5 имиджей, содержащих участки дермального инфильтрата с наибольшей плотностью. Изучаемые показатели: общая площадь исследуемого имиджа, содержащего дермальный инфильтрат; суммарная площадь в нем иммунофенотипированных клеток; их доля (ОД) в составе анализируемого имиджа.

Результаты исследования

В клинике ГБУ СО УрНИИДВиИ за период 2010–2019 гг. под наблюдением находился 561 больной с подозрением на ПЛК (от 24 до 73 больных ежегодно). После проведения этапа клинической и патоморфологической диагностики диагноз ПЛК был верифицирован у каждого пятого пациента — 105 больных (18,7%), при этом у подавляющего большинства установлен диагноз ГМ — 86 больных (81,9%). В большинстве случаев диагностирована II стадия ГМ — 59 больных (68,6%). У 21 больного (24,4%) выявлено наличие I стадии ГМ, у 6 больных (7,0%) диагностирована III (опухолевая) стадия.

Для верификации диагноза ПЛК ИГХ-исследования биопсийного материала в различные годы изученного периода были рекомендованы от 13 до 35 больным (23,3–60,9%), количество выполненных ИФТ варьировало более существенно — от 4 до 21 случая (23,5–100%). Диагностирование ПЛК ежегодно, на основе проведенных ИГХ-исследований, составило от 4 до 18 случаев (41,6–100%), при этом верификация ГМ от количества подтвержденных ПЛК составила от 3 до 17 случаев (75–100%).

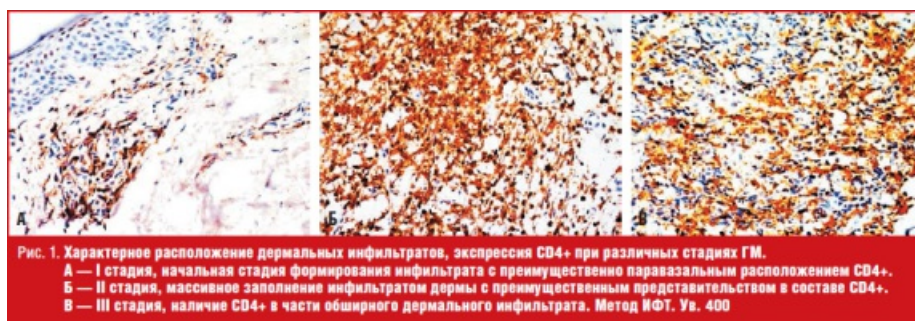
Наиболее важная составляющая патоморфологической диагностики ГМ — характеристика дермального инфильтрата. При этом помимо локализации, распространенности, плотности инфильтрата очень значима его качественная характеристика: определение клеточного состава, выявление иммунофенотипа опухолевых клеток, наличие клонального опухолевого роста.

При патоморфологических исследованиях для I стадии ГМ было характерно обнаружение в отдельных участках сосочкового слоя дермы рыхлого мелкофокусного периваскулярного лимфогистиоцитарного инфильтрата с очаговым эпидермотропизмом. В отдельных случаях можно было наблюдать расположение лимфоцитов разрозненно или цепочкой в базальном слое, единичные некрупные микроабсцессы Потрие.

На II стадии ГМ визуализировались более специфичные для данного заболевания признаки: наличие в верхних слоях дермы плотного полосовидного или диффузно-очагового эпидермотропного лимфогистиоцитарного инфильтрата, в котором обнаруживались крупные клетки с гиперхромными, иногда церебриформными ядрами. В эпидермисе нередко выявлялись некрупные микроабсцессы Потрие и/или лимфоциты, окруженные светлым перинуклеарным ободком (*haloed lymphocytes*).

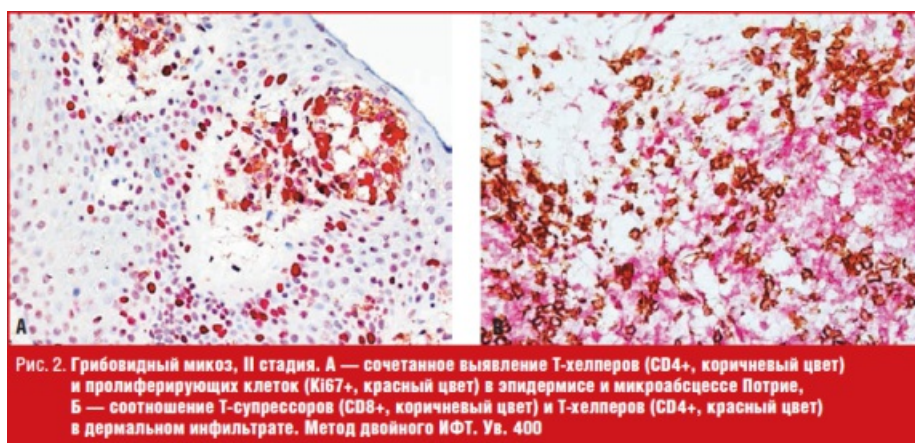
Для III (опухолевой) стадии ГМ характерно наличие массивного инфильтрата из лимфоидных клеток, вариабельных по форме и размерам, отсутствие в отдельных участках эпидермотропизма и дермоэпидермальной границы, выраженные деструктивные изменения в эпидермисе с формированием в нем микроабсцессов Потрие различных размеров.

Полученные данные ИФТ с использованием МКА CD3, CD4, CD8, Ki67 позволили получить объективную картину участия в процессе формирования дермального инфильтрата Т-лимфоцитов в целом, субпопуляций хелперов и супрессоров, выявить особенности течения пролиферативного процесса. На ранних стадиях заболевания в составе дермального инфильтрата выявлялось умеренное количество Т-лимфоцитов, на поздних стадиях наблюдалось значительное количество данных клеток в составе сформированного объемного инфильтрата, распространяющегося в нижележащие участки дермы (рис. 1, А–В). Визуально на представленных изображениях наиболее плотное и равномерное расположение хелперов (CD4+) в составе дермальных инфильтратов определяется на II стадии ГМ (рис. 1, Б).



Выполнение морфометрических исследований позволило определить количественные параметры представительства лимфоцитов в составе инфильтратов на различных стадиях заболевания. Так, средние значения ОД CD4+ у данных больных составили: I стадия — $0,86 \pm 0,033$ (рис. 1, А), II стадия — $0,302 \pm 0,143$ (рис. 1, Б), III стадия — $0,227 \pm 0,028$ (рис. 1, В). Минимальные значения CD4+ выявлены в начале заболевания (стадия пятна), при формировании бляшек прослеживается максимальное увеличение их количества с последующим уменьшением в опухолевой стадии. Учитывая, что при диагностировании ГМ на различных стадиях значение соотношения CD4/CD8 является одним из определяющих критериев, особенно важно получение количественных критериев позитивности данных клеток.

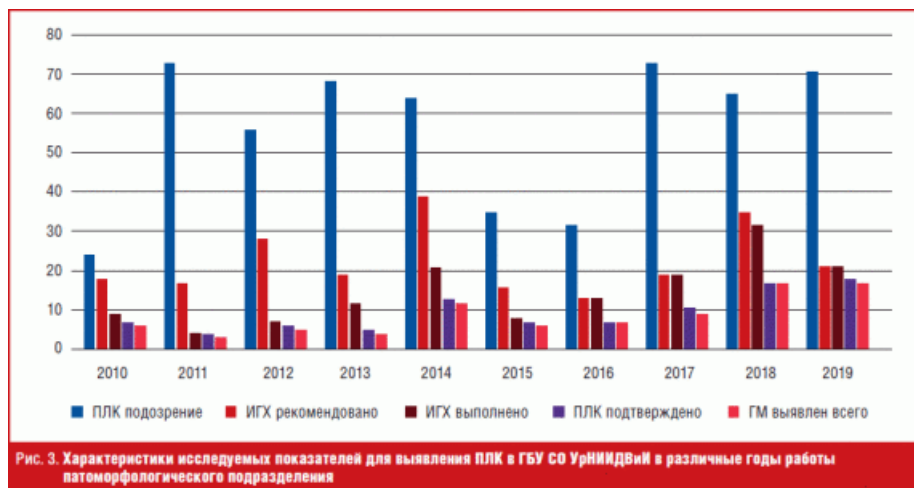
В целях более полной оценки иммунофенотипа ПЛК, наличия и соотношения лимфоцитов в эпидермисе и дерме, функциональных потенциалов клеток кожи и пролиферата целесообразно использование методики двойного ИГХ-окрашивания, которая дает возможность визуализации в одном поле зрения двух интересующих объектов, окрашенных различными цветами (рис. 2).



Особенно значимой при определении различных стадий ГМ является одновременное наблюдение

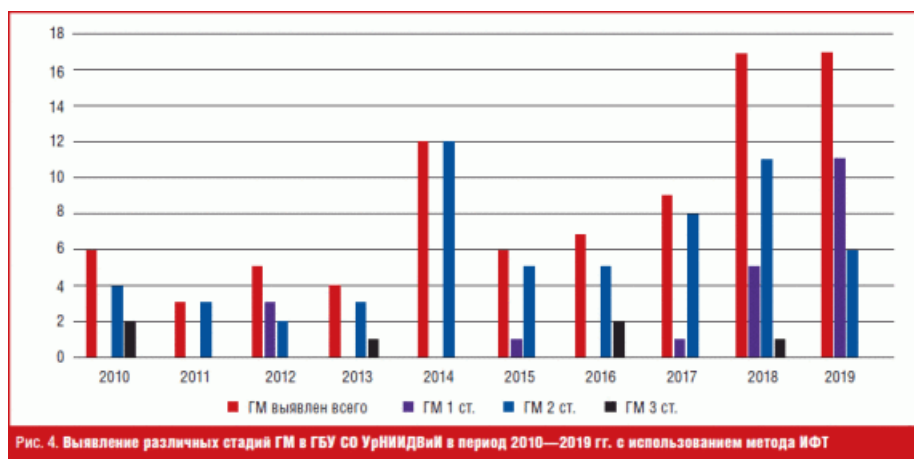
пролиферирующих клеток (Ki67+) в сочетании с выявлением лимфоцитов определенного фенотипа, в частности, Т-хелперов CD4+ в составе микроабсцесса Потрие (рис. 2, А). Также несомненным достоинством использования данного метода является возможность наблюдения в одном поле зрения прогностически значимых компонентов дермального инфильтрата, в частности, определение представительства в его составе хелперов (CD4+) и супрессоров (CD8+), визуализация их соотношения (рис. 2, Б).

Анализ биопсийного материала, поступившего на патоморфологическое исследование за период работы данного подразделения в ГБУ СО УрНИИДВиИ (2010–2019 гг.), показал существенные различия по изученным параметрам в промежутках 2010–2013 гг. и 2014–2019 гг., характеризующиеся минимальными значениями в периоде до 2014 г. и их увеличением в 3–4 раза в последующем, что обусловлено появлением возможности выполнения ИФТ непосредственно в ГБУ СО УрНИИДВиИ (рис. 3).



ГМ был диагностирован у половины больных в возрасте 58–75 лет, в то же время у 30% больных данное заболевание впервые было верифицировано в возрасте от 19 до 50 лет. Так, ГМ II стадии был выявлен у больного 19 лет (фолликулотропный вариант) и у двух больных в возрасте 34 лет (классический вариант), ГМ III стадии — у больного 49 лет.

Необходимо отметить, что внедрение новых технологий патоморфологической диагностики увеличило долю больных ГМ, выявленных на ранних стадиях заболевания. В 2018 г. количество больных с I стадией составило 29,4% от выявленных случаев и 50,0% — от всех диагностированных за 9-летний период. В 2019 г. выявлено 11 больных с ранними стадиями ГМ (I–IIA), что составило 64,7% от диагностированных случаев ГМ за год, превысив суммарный показатель (10 больных) за 2010–2018 гг. (рис. 4).



О результативности использования собственных ресурсов для ИГХ-исследований свидетельствует сравнительная характеристика основных показателей диагностики в отдельные годы (табл.). Так, при равном или сопоставимом количестве больных с подозрением на ПЛК получены различающиеся значения по изучаемым показателям в различные временные промежутки: до использования метода ИФТ в нашем учреждении (2010–2013 гг.), в период освоения (2013–2014 гг.) и его эффективной реализации (2015–2019 гг.).

Результативность применения метода ИФТ для выявления ГМ по данным ГБУ СО УрНИИДВиИ в различные годы изученного периода						Таблица
	Количество обследованных больных					
	2011 г.	2013 г.	2014 г.	2017 г.	2018 г.	2019 г.
ПЛК — подозрение	73	68	64	73	65	71
ИГХ рекомендовано	17	19	39	19	35	21
ИГХ выполнено, % от рекомендованных	4 23,5%	12 63,2%	21 53,8%	19 100%	32 91,4%	21 100%
ПЛК, подтверждено	4	12	13	11	17	18
ГМ выявлен всего, % от подтвержденных ПЛК	3 75,0%	4 33,3%	12 92%	9 81,8%	17 100%	17 94,4%
ГМ I стадия	0	0	0	1	5	11
ГМ II стадия	3	3	12	8	11	6
ГМ III стадия	0	1	0	1	1	0

Анализ материала, полученного в нашем учреждении за 2019 г., подтверждает тенденцию к более раннему выявлению ГМ при условии выполнения комплексных патоморфологических исследований, с полноценным использованием современного оборудования, методов ИФТ и морфометрии.

Так, за 2019 г. ГМ на ранних стадиях (I–IIA) выявлен у большинства обследованных больных с использованием метода ИФТ: 11 случаев из 17; только у трети больных диагностирован ГМ IIA стадии (всего 6 случаев: 5 больных — классический вариант, у 1 больного — фолликулотропный вариант ГМ). Помимо этого, в 2 случаях диагностирован хронический дерматоз, у 1 больного выявлена доброкачественная лимфооплазия кожи, в 1 случае обнаружен подтип первично кожной периферической Т-клеточной лимфомы с индолентным течением.

При проведении ИФТ вне нашего учреждения за первые 3 года работы патоморфологического подразделения (2010–2012 гг.) выявлено всего 3 случая ГМ I стадии, тогда как за последние 3 года (2017–2019 гг.) с появлением возможности полноценно выполнять ИГХ и морфометрические исследования в ГБУ СО УрНИИДВиИ диагностировано 17 случаев.

Положительная динамика выявления ГМ на ранних стадиях (2017 г. — 1 случай, 2018 г. — 5 случаев, 2019 г. — 11 случаев) является убедительным доказательством востребованности, эффективности и полноценного комплексного использования современных патоморфологических методов, включающих ИГХ-исследования, в учреждениях дерматовенерологического профиля.

Заключение

Проведенный ретроспективный анализ свидетельствует о большой востребованности патоморфологических и ИГХ-исследований для установления диагноза ПЛК среди больных хроническими дерматозами, из числа которых ежегодно клинически было заподозрено наличие ПЛК у 24–73 пациентов.

Опыт применения метода ИФТ в клинической повседневной практике ГБУ СО УрНИИДВиИ показывает его значимость как для эффективной диагностики ПЛК, так и для дифференциальной диагностики заболеваний у больных «со сложным диагностическим поиском». Несомненным преимуществом в улучшении процесса диагностики является возможность использования современного оборудования, квантифицированной оценки субпопуляций лимфоцитов в составе дермального инфильтрата. Комплексное использование патоморфологических, иммуногистохимических и количественных морфометрических исследований позволяет объективизировать процесс диагностики, повысить ее результативность, в том числе по выявлению ранних стадий ГМ.

Литература

1. Ahn C. S., ALSayyah A., Sangüeza O. P. Mycosis fungoides: an update review of clinicopathologic variants // American Journal of Dermatopathology. 2014. Т. 36. Р. 933–948.
2. Дерматоонкология (злокачественные новообразования кожи, первичные лимфомы кожи): атлас / Под общ. ред. проф. Н. В. Кунгурова. Екатеринбург: Издательско-полиграфическое предприятие «Макс-Инфо», 2016. 168 с.
3. Воронцова А. А., Карамова А. Э., Знаменская Л. Ф. Современные представления о патогенезе грибовидного микоза // Онкогематология. 2018. Т. 13. № 3. С. 39–46.
4. Kelati A., Gallouj S., Tahiri L. et al. Defining the mimics and clinico-histological diagnosis criteria for mycosis fungoides to minimize misdiagnosis // International Journal Womens Dermatology. 2017. Vol. 3 (2). Р. 100–106.
5. Willemze R., Cerroni L., Kempf W. et al. The 2018 update of the WHO-EORTC classification for primary cutaneous lymphomas // Blood. 2019. Vol. 133 (16). Р. 1703–1714.
6. Trautinger F., Eder J., Assaf C. et al. European Organisation for Research and Treatment of Cancer consensus recommendations for the treatment of mycosis fungoides / Sezary syndrome e Update 2017 // European Journal of Cancer. 2017. Т. 77. Р. 57–74.

7. Felcht M., Hillen U., Klemke C. D. Diagnostics of primary cutaneous lymphomas // *Hautarzt*. 2017. Т. 68 (9). P. 696–701. DOI: 10.1007/s00105-017-4020-6.
8. Basir H. R. G., Alirezaei P., Rezanejad A. et al. Early morphea simulating patch-stage mycosis fungoides in two cases // *Dermatology Reports*. 2018. Т. 10 (1). P. 7471. DOI: 10.4081/dr.2018.7477.
9. Belousova I. E., Khairutdinov V. R., Bessalova A. et al. Mycosis fungoides manifesting as giant cell lichenoid dermatitis // *American Journal of Dermatopathology*. 2018. Т. 40 (4). P. 283–285.
10. Aun J. A., Patel H. S., Patel K. K. et al. Perplexing Rash: Challenges to Diagnosis and Management of Mycosis Fungoides // *Journal of the American Osteopathic Association*. 2018. Т. 118 (7). P. 472–478. DOI: 10.7556/jaoa.2018.101.
11. Федеральные клинические рекомендации. Дерматовенерология 2015: Болезни кожи. Инфекции, передаваемые половым путем. 5-е изд., перераб. и доп. М.: Деловой экспресс, 2016. 768 с.
12. Белоусова И. Э., Казаков Д. В., Криволапов Ю. А. Современные подходы к диагностике и лечению первичных лимфом кожи на основе новой ВОЗ-EORTC классификации. Т-клеточные лимфомы кожи // *Архив патологии*. 2007. № 69 (5). С. 11–17.
13. Amorim G. M., Niemeyer-Corbellini J. P., Quintella D. C. et al. Clinical and epidemiological profile of patients with early stage mycosis fungoides // *Anais Brasileiros De Dermatologia*. 2018. Т. 93 (4). P. 546–552.
14. Олисова О. Ю., Грекова Е. В., Варшавский В. А. и соавт. Современные возможности дифференциальной диагностики бляшечного параспориоза и ранних стадий грибовидного микоза // *Архив патологии*. 2019. Т. 81 (1). С. 9–17.
15. Сыдинов А. А., Заславский Д. В., Зайцев В. С. и др. Иммуногистохимические критерии диагностики мелкобляшечного параспориоза, крупнобляшечного параспориоза и грибовидного микоза // *Современные проблемы науки и образования*. 2013. № 6. С. 568–575.
16. Жуков А. С., Белоусова И. Э., Самцов А. В. Роль иммуногистохимического метода в диагностике грибовидного микоза // *Вестник дерматологии и венерологии*. 2014. № 2. С. 38–46.
17. Mancebo S. E., Cordova M., Myskowski P. L. et al. Reflectance confocal microscopy features of mycosis fungoides and Sézary syndrome: correlation with histopathologic and T-cell receptor rearrangement studies // *Journal of Cutaneous Pathology*. 2016. Т. 43 (6). P. 505–515.
18. Geller S., Myskowski P. L., Pulitzer M. et al. Cutaneous T-cell lymphoma (CTCL), rare subtypes: five case presentations and review of the literature // *Chinese Journal of Clinical Oncology*. 2019. Т. 8 (1). DOI: 10.21037/cco.2018.11.01 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://cco.amegroups.com/article/view/22497> (дата обращения: 20.03.2020).
19. Сафонова Г. Д., Кохан М. М., Зильберберг Н. В., Римар О. Г., Куклин И. А. Оптимизация диагностики и перспективы патогенетических исследований первичных лимфом кожи (обзор литературы) // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2014. № 12-2. С. 264–268.
20. Куклин И. А., Кохан М. М., Сафонова Г. Д., Торопова Н. П., Кузнецов И. Д. Грибовидный микоз: совершенствование диагностики ранних и поздних стадий с помощью квантифицированной оценки результатов иммуногистохимического исследования биоптата кожи // *Лечащий Врач*. 2018. № 11. С. 15–19.
21. Кунгуров Н. В., Куклин И. А., Кохан М. М., Сафонова Г. Д. Способ определения стадии грибовидного микоза // Патент 2660542 Российская Федерация, МПК G01N 33/53; № 2017138188; заявл. 04.10.2017; опубл. 06.07.2018, Бюл. № 19.

Н. В. Кунгуров, доктор медицинских наук, профессор

Г. Д. Сафонова¹, кандидат биологических наук

М. М. Кохан, доктор медицинских наук, профессор

О. Г. Римар

И. А. Куклин, кандидат медицинских наук

ГБУ СО УрНИИДВиИ, Екатеринбург

¹ Контактная информация: galdm@mail.ru

DOI: 10.26295/OS.2020.63.83.005

Повышение результативности использования комплексных патоморфологических исследований для своевременной диагностики грибовидного микоза/ Н. В. Кунгуров, Г. Д. Сафонова, М. М. Кохан, О. Г. Римар, И. А. Куклин

Для цитирования: *Лечащий врач* № 5/2020; Номера страниц в выпуске: 27-32

Теги: кожа, лимфопролиферативные заболевания, биоптаты кожи, диагностика

