

Грибовидный микоз: совершенствование диагностики ранних и поздних стадий с помощью квантифицированной оценки результатов иммуногистохимического исслед

И. А. Ку克林, М. М. Кохан, Г. Д. Сафонова, Н. П. Торопова, И. Д. Кузнецов

Грибовидный микоз (ГМ) — форма первичной эпидермотропной Т-клеточной лимфомы кожи, характеризующаяся пролиферацией малых и средних Т-лимфоцитов с наличием церебриформных ядер и сопровождающаяся этапностью развития клинических проявлений в виде пятен, бляшек и опухолей. Согласно рекомендациям Международного общества по лимфомам кожи (International society for cutaneous lymphomas, ISLE) и Европейской организации по изучению и лечению рака (European organization for research and treatment of cancer, EORTC) выделяют ранние (IA–IIA) и поздние (IIB–IVB) стадии развития ГМ. Определение стадии заболевания базируется на четырех характеристиках злокачественного процесса (T, N, M, B), когда под каждой буквой указывается число, которое характеризует морфологические элементы (пятна, папулы, бляшки, опухоли) и распространенность кожных проявлений, вовлечение в патологический процесс лимфатических узлов, внутренних органов и крови [1–3].

Особенно сложной задачей для практикующего врача является дифференциальная диагностика перехода ранних стадий ГМ в поздние, так как между IIA и IIB стадиями заболевания очень много общего и при отсутствии изменения периферических лимфоузлов (N_{0-2}), вовлечения крови (B_{0-1}) и внутренних органов (M_0), кардинальным отличием IIB стадии заболевания является появление хотя бы одного узла на коже. В то же время при почти одинаковой инфильтрации и размерах морфологических элементов на коже больного отсутствуют объективные критерии различия «бляшки» и «узла». Поэтому своевременная диагностика и правильное установление стадии развития ГМ являются приоритетными задачами дерматовенеролога и гематолога, поскольку имеют принципиальное значение при выборе оптимальной тактики лечения больного и определяют долгосрочный прогноз заболевания. Так, терапия ранних (I–IIA) стадий ГМ предусматривает консервативный подход с постепенным наращиванием потенциала лечебных методов и технологий от тактики «наблюдай и жди» и наружной терапии топическими глюкокортикостероидами до применения ретиноидов, интерферона- α , метотрексата, ультрафиолетового облучения спектра В (311 нм), ПУВА-терапии и локальной лучевой терапии, тогда как осуществление специализированной медицинской помощи больным с поздними (IIB–IVB) стадиями ГМ в учреждениях онкогематологического профиля предусматривает уже «агрессивный» подход с применением арсенала системной химиотерапии, биологических препаратов, электронно-лучевой терапии и аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток [1, 2, 4].

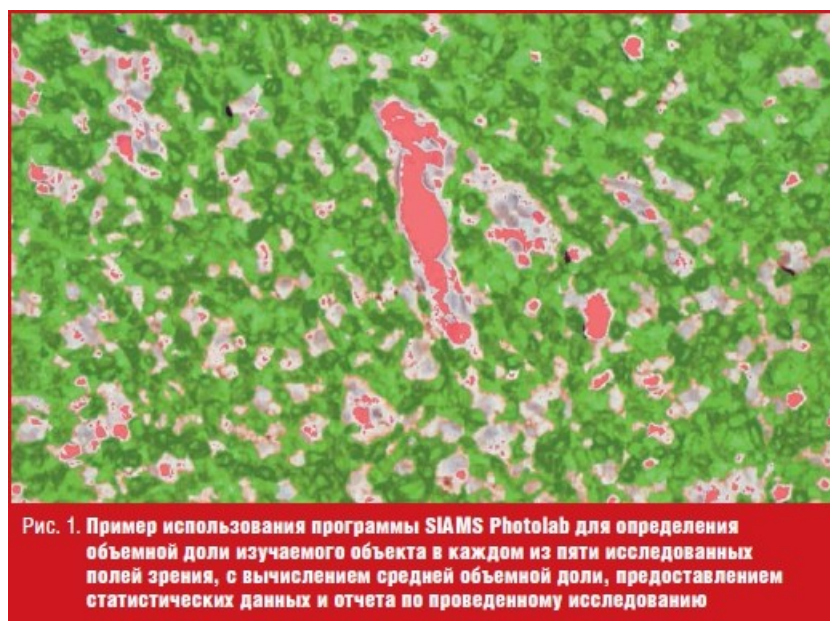
Диагностический процесс при ГМ предусматривает ряд логически связанных этапов, сочетающих оценку анамнеза и клинических проявлений заболевания, анализ данных морфологических и иммуногистохимических (ИГХ) исследований, фиксирующих наличие злокачественной лимфоидной (клональной) пролиферации в коже. Проведение ИГХ-исследований биоптата кожи считается «золотым стандартом» диагностики ГМ, на что указывают клинические рекомендации европейских стран и России [1, 2, 4, 5].

Анализ результатов ИГХ-исследований биоптата кожи в диагностике ГМ проводится на основании оценки позитивности определенных маркеров опухолевых клеток — антигенов кластеров дифференцировки (CD) на поверхности лимфоцитов. При этом врач-патоморфолог, анализирующий ИГХ-реакции, использует описательные и качественные приемы оценки выраженности окрашивания маркеров с применением критериев «отрицательная/положительная реакция». Тем не менее в литературе встречаются и усовершенствованные методики с использованием критериев и балльной шкалы в зависимости от процента окрашивания опухолевых клеток [5–9]. Однако описанные качественные и полуквантитативные приемы также не лишены субъективной составляющей, в связи с этим нами была поставлена цель исследования: совершенствовать диагностический процесс определения стадии ГМ посредством использования объективной количественной оценки позитивности ИГХ-маркеров биоптата кожи.

Материалы и методы исследования

В клинике ГБУ СО УрНИИДВиИ были изучены имиджи биоптатов кожи 36 человек: 30 больных ГМ I, II и III стадий, 6 — контрольной группы (здоровые лица). После подписания информированного согласия на исследование больным были проведены инцизионные биопсии кожи на участках с наиболее выраженными клиническими проявлениями дерматоза. Диагноз ГМ у каждого больного был подтвержден данными патоморфологического и ИГХ-исследований биоптатов кожи. Иммунофенотипирование объектов исследования проводили в стандартных условиях на аппарате для иммуногистохимии Bond-maX LEICA (Германия) с использованием парафиновых срезов толщиной 4 мкм. Патоморфологические и морфометрические исследования выполнены с использованием аппаратно-программного комплекса, состоящего из светового микроскопа Axio Imager M2, цифровой камеры AxioCam MRc 5 и программы ZEN 2012 для ввода изображений, проведения измерений и документирования

(ZEISS, Германия). Для анализа изображений использовалась автоматизированная система «SIAMS Photolab» (Россия, свидетельство об утверждении типа средства измерений RU.C. 31.058.A, № 40862 от 28.07.2015 г., срок действия до 28.07.2020 г.). В дерме больных ГМ на стандартной площади имиджей кожи нами изучены параметры позитивной окраски моноклональными антителами (МКА) CD3, CD4, CD8, Ki67 и Granzyme B. При обработке изображений ИГХ-реакций измеряемые иммунопозитивные объекты выделялись определенным цветом с помощью функции пороговой сегментации (рис. 1). Использование модуля колориметрической оценки результатов ИГХ-реакций позволило получить квантифицированную оценку изображений по следующим параметрам: площадь гистологического среза кожи (мкм^2); занимаемая площадь позитивного окрашивания иммуномаркером (мкм^2); объемная доля позитивного окрашивания иммуномаркером; средняя объемная доля позитивного окрашивания иммуномаркером; среднеквадратичное отклонение объемной доли позитивного окрашивания иммуномаркером. Анализ данных на нормальное распределение проводился при помощи критериев Колмогорова–Смирнова, Д’Агостина–Пирсона. Сравнение групп проводилось с помощью критерия Стьюдента и двухфакторного дисперсионного анализа. Корреляционные взаимосвязи оценивались с помощью критерия Спирмена (r).



Результаты исследований

Проведенное изучение иммуноморфологических характеристик клеток дермального инфильтрата в биоптате кожи у 30 больных ГМ продемонстрировало закономерные изменения их популяционного состава в динамике прогрессирования заболевания (табл. 1).

Изучаемые ИГХ-маркеры в биоптате кожи	Больные грибовидным микозом		Контрольная группа, n = 6 ($\bar{X} \pm \Delta X$)
	I–IIA стадии, n = 19 ($\bar{X} \pm \Delta X$)	IIB–III стадии, n = 11 ($\bar{X} \pm \Delta X$)	
CD3+	0,290 $\pm$ 0,057*	0,601 $\pm$ 0,072*	0,033 $\pm$ 0,005
CD4+	0,175 $\pm$ 0,032**	0,424 $\pm$ 0,103**	0,025 $\pm$ 0,004
CD8+	0,100 $\pm$ 0,033	0,195 $\pm$ 0,074	0,019 $\pm$ 0,006
CD4+/CD8+	1,750 $\pm$ 0,033**	2,174 $\pm$ 0,074**	1,012 $\pm$ 0,014
Ki67+	0,018 $\pm$ 0,007**	0,053 $\pm$ 0,004**	0,012 $\pm$ 0,003
Granzyme B+	0,027 $\pm$ 0,012	0,028 $\pm$ 0,001	0,023 $\pm$ 0,006

Примечание: * $p < 0,01$ при сравнении между группами больных ГМ; ** $p < 0,001$ при сравнении между группами больных ГМ.

Как видно из табл. 1, в группе больных с поздними (IIB–III) стадиями ГМ наблюдалось достоверное увеличение количества всех зрелых Т-лимфоцитов (CD3+) и Т-хелперной субпопуляции лимфоцитов (CD4+), хелперно-индукторной субпопуляции лимфоцитов над супрессорно-цитотоксической (CD4+/CD8+) при сопоставлении с аналогичными показателями дермального инфильтрата у больных ранними (I–IIA) стадиями заболевания. Кроме этого было обнаружено, что у больных ГМ в IIB–III стадии показатели объемной доли позитивности Ki67 ($0,053 \pm 0,004$) в 2,9 раза превышали аналогичные показатели у больных I–IIA стадиями заболевания, что свидетельствовало о высокой пролиферативной активности исследованных клеток дермального инфильтрата при поздних стадиях заболевания. В исследуемых группах больных ГМ отсутствовали изменения позитивной экспрессии Granzyme B+ на клетках инфильтрата и отмечалась недостоверная тенденция к увеличению количества Т-цитотоксической субпопуляции лимфоцитов (CD8+) при развитии последующих стадий заболевания.

Методом нелинейной динамики [10, 11] в исследуемых группах больных были рассчитаны пороговые значения средних объемных долей позитивного окрашивания опухолевых клеток инфильтрата МКА CD3, CD4, CD8 и Ki67,

достоверно отличающие ранние и поздние стадии ГМ (табл. 2).

Таблица 2		
Пороговые значения объемной доли позитивности ИГХ-маркеров биоптата кожи у больных ГМ в зависимости от стадии заболевания		
Изучаемые ИГХ маркеры биоптата кожи	Больные грибовидным микозом	
	I–IIA стадии, n = 19 (min–max)	IIВ–III стадии, n = 11 (min–max)
CD3+	0,16–0,446*	0,447–0,78*
CD4+	0,10–0,3*	0,301–0,64*
CD8+	0,08–0,148*	0,149–0,6*
Ki67+	0,008–0,038**	0,039–0,11**
Примечание. * $p < 0,01$ при сравнении между группами больных ГМ; ** $p < 0,001$ при сравнении между группами больных ГМ.		

С учетом пороговых значений показателей объемной доли позитивной окраски клеток дермального инфильтрата МКА CD3, CD4, CD8 и Ki67 была построена математическая модель определения стадии ГМ:

$$F = 0,75 \times X_1 + 1,9 \times X_2 + 2,99 \times X_3 + 10,53 \times X_4 + 0,22,$$

где: F — суммарный диагностический индикатор указанных МКА; X1 — среднее значение объемной доли позитивной окраски CD3; X2 — среднее значение объемной доли позитивной окраски CD4; X3 — среднее значение объемной доли позитивной окраски CD8; X4 — среднее значение объемной доли позитивной окраски Ki67; 0,75, 1,9, 2,99, 10,53 и 0,22 — поправочные коэффициенты.

Для реализации способа определения стадии ГМ врачу необходимо подставить в уравнение значение каждого из исследуемых МКА у конкретного больного. Полученное значение F в диапазоне от 0,220 до 1,969 свидетельствует о ранней стадии ГМ, а при получении значения $F > 1,970$ — в пользу поздней стадии ГМ (патент РФ № 1660542 от 06.07.2018 г. «Способ определения стадии грибовидного микоза», патентообладатель: ГБУ СО УрНИИДВиИ).

В качестве иллюстрации применения способа определения стадии ГМ у больных приводим следующие клинические наблюдения.

Больной К., 1973 г. рождения, поступил в клинику ГБУ СО УрНИИДВиИ для уточнения диагноза с жалобами на распространенные пятна и бляшки на коже туловища и конечностей, сопровождающиеся периодическим зудом, покалыванием и стягиванием кожи. Болеет в течение 4 лет, когда впервые заметил единственное пятно на коже левого плеча. Через год в связи с появлением многочисленных пятен на коже туловища и верхних конечностей впервые обратился к дерматологу по месту жительства. Для уточнения заболевания дважды амбулаторно проводились стандартные гистологические исследования кожи, больной находился под наблюдением дерматолога с диагнозом «бляшечный парапсориаз». Сезонности обострений заболевания не отмечал, а на фоне инсоляции наблюдалось усиление окраски пятен и появление умеренного зуда. За предыдущий год отмечает прогрессирование заболевания — усиление кожного зуда и появление новых бляшек на коже, часть из которых была наиболее инфильтрирована.

Анамнез жизни, аллергоанамнез и профессиональный маршрут у больного без особенностей. Наследственность по кожным заболеваниям и онкопатологии неотягощена. При общем осмотре патологических отклонений по системам и органам не выявлено. Подмышечные лимфатические узлы диаметром до 1,5–2 см, мягкие, безболезненные и подвижные при пальпации. Физиологические отправления в норме.

Локальный статус: кожный процесс имеет распространенный характер. На коже плеч, предплечий, груди, живота, спины и правого бедра присутствуют розовато-красные пятна и умеренно инфильтрированные бляшки диаметром до 3,5 см, округлой формы, с четкими границами и шероховатой поверхностью. На поверхности бляшек отсутствует рост волос, имеются эскориации с точечными геморрагическими корочками. Кроме этого, на коже правой половины живота имеются 4 округлых высыпания, максимально возвышающихся над уровнем кожи, которые за счет своей выраженной инфильтрации не позволяют их отнести к бляшкам или опухолям. Дермографизм белый (рис. 2).



Лабораторные данные. В общем анализе крови, общем анализе мочи, биохимической гепатограмме и иммунограмме отклонений не выявлено. Комплекс серологических реакций к *Treponema pallidum* отрицательный. Антитела к ВИЧ, гепатитам В и С не обнаружены.

Патоморфологическое исследование биоптата кожи больного. Эпидермис неравномерно гиперплазирован, с гиперкератозом и небольшим акантозом. В верхних отделах дермы присутствуют полосовидные эпидермотропные инфильтраты из лимфоидных клеток малого и среднего размера. Дермоэпидермальная граница нечеткая, с формированием небольших единичных скоплений в эпидермисе типа микроабсцессов Потрие.

Иммуногистохимическое исследование биоптата кожи больного: опухолевый инфильтрат имеет Т-клеточный иммунофенотип: клетки экспрессируют CD3, CD4 и CD8; В-лимфоциты (CD20) — в виде единичных скоплений среди опухолевых клеток.

Иммуногистохимические препараты биоптата кожи больного были подвергнуты морфометрии с использованием компьютерной программы SIAMS Photolab, вычисленные показатели составили: среднее значение объемной доли позитивной окраски CD3 = 0,263, среднее значение объемной доли позитивной окраски CD4 = 0,152, среднее значение объемной доли позитивной окраски CD8 = 0,078, среднее значение объемной доли позитивной окраски Ki67 = 0,017.

Для определения у больного стадии ГМ в уравнение были подставлены значения соответствующих признаков: $F = 0,75 \times 0,263 + 1,9 \times 0,152 + 2,99 \times 0,078 + 10,53 \times 0,017 + 0,22$. У данного больного было получено значение $F = 1,118$, что было характерно для ранней стадии ГМ ($0,220 \leq F \leq 1,969$).

На основании анамнеза, клинической картины, данных гистологического, иммуногистохимического и морфометрического методов исследования биоптата кожи больному был установлен окончательный диагноз: первичная лимфома кожи, грибовидный микоз, IIA стадия (T₂N₁M₀B₀).

Больной Г., 1950 г. рождения, поступил с жалобами на распространенные высыпания на коже предплечий, груди, живота и спины, сопровождающиеся периодическим интенсивным зудом и стягиванием кожи. Болеет в течение 6 лет, когда впервые возникли пятна на коже правого предплечья. В течение последующих нескольких лет обращал внимание на постепенное появление аналогичных пятен на коже туловища. Наблюдался у дерматовенеролога по месту жительства с диагнозом «крупнобляшечный параспориоз», где в результате проводимой терапии (H1-антигистаминные средства, десенсибилизирующая терапия, наружно — топические глюкокортикостероиды) больной отмечал кратковременное улучшение в виде исчезновения зуда высыпаний. За предыдущие 5–6 месяцев отметил появление новых пятен и усиление кожного зуда, в связи с чем был госпитализирован в клинику ГБУ СО УрНИИДВИИ.

Анамнез жизни, аллергоанамнез и профессиональный маршрут у больного без особенностей. Наследственность по кожным заболеваниям и онкопатологии неотягощена. При общем осмотре патологических отклонений по системам и органам не выявлено. Подмышечные и паховые лимфатические узлы диаметром до 1,5–2,0 см, мягкие, безболезненные и подвижные при пальпации. Физиологические отправления в норме.

Локальный статус: непораженные участки кожных покровов физиологической окраски, нормальной влажности и тургора. Видимые слизистые влажные, физиологической окраски. Кожный процесс имеет распространенный характер, поражены — грудь, живот, спина, плечи и предплечья. На коже груди, живота, предплечий и поясничной области имеются многочисленные пятна бледно-красного цвета, диаметром до 2–3 см, с четкими

границами, без шелушения и эскориаций. На коже живота и спины присутствуют округлые бляшки, кирпично-красного цвета, диаметром до 6 см, с точечными геморрагическими корочками в местах эскориаций. На поверхности бляшек отсутствует рост волос, имеются единичные трещинки в местах физиологических складок кожи и незначительное мелкопластинчатое шелушение. На коже левой половины живота имеются 2 наиболее инфильтрированных образования, округлой формы, диаметром 1,8 см и 2,5 см, насыщенно-красного цвета, с гладкой поверхностью, которые по своей морфологии и размерам не позволяют их отнести либо к бляшкам, либо к опухолям. Дермографизм белый (рис. 3).



Лабораторные данные. В общем анализе крови, общем анализе мочи и иммунограмме отклонений не выявлено. В биохимической гепатограмме — повышение общего билирубина до 24,3 мкмоль/л. Комплекс серологических реакций к *Treponema pallidum* отрицательный. Антитела к ВИЧ, гепатитам В и С не обнаружены.

Патоморфологическое исследование биоптата кожи больного: в дерме присутствует плотный, полосовидный, эпидермотропный инфильтрат из лимфоидных клеток разных размеров, «размывающий» дермоэпидермальную границу и проникающий в эпидермис, в котором прослеживается очаговая деструкция. Определяются микроабсцессы Потрие. Митотическая активность клеток достаточно высокая.

Иммуногистохимические препараты биоптата кожи больного были подвергнуты морфометрии, при этом средние значения объемной доли позитивной окраски составили: CD3 = 0,606, CD4 = 0,56, CD8 = 0,24, Ki67 = 0,059.

Для определения стадии ГМ в уравнение были подставлены значения соответствующих признаков: $F = 0,75 \times 0,606 + 1,9 \times 0,56 + 2,99 \times 0,24 + 10,53 \times 0,059 + 0,22$. У данного больного было получено значение $F = 3,07$, что было характерно для поздних стадий ГМ ($1,970 \leq F \leq 4,973$).

На основании анамнеза, клинической картины, результатов патоморфологического, иммуногистохимического и морфометрического методов исследования биоптата кожи больному Г. был установлен окончательный диагноз: первичная лимфома кожи, грибовидный микоз, IIB стадия (T₃N₁M₀B₀). С целью назначения профильной терапии больной был направлен к гематологу.

Заключение

Проведенный анализ иммуноморфологических характеристик клеток дермального инфильтрата больных продемонстрировал закономерные изменения их популяционного состава в динамике прогрессирования заболевания.

Результаты использования математической модели определения стадии ГМ в 97,3% совпали с экспертной оценкой и патоморфологической верификацией диагноза у больных, причем 100% достоверность была зафиксирована у больных с поздними стадиями ГМ (IIB–III), что является особенно актуальным для этой группы больных с неблагоприятным прогнозом заболевания.

Литература

1. Федеральные клинические рекомендации. Дерматовенерология 2015: Болезни кожи. Инфекции, передаваемые половым путем. 5-е изд., перераб. и доп. М.: Деловой экспресс, 2016. 768 с.
2. Малишевская Н. П., Кохан М. М., Соколова А. В., Куклин И. А. и соавт. Дерматоонкология (злокачественные новообразования кожи, первичные лимфомы кожи): Атлас / Под общ. ред. Н. В. Кунгурова. Екатеринбург:

Изд-во Урал. ун-та, 2016. 168 с.

3. Вольф К., Голдсмит Л. А., Кац С. И. Дерматология Фицпатрика в клинической практике / Пер. с англ. М.: Изд. Панфилова. БИНОМ, 2012. Т. 2. С. 1514–1531.
4. Willemze R., Dreyling M. Primary cutaneous lymphoma: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up // *Annals of Oncology*. 2009. Vol. 20. P. 115–118.
5. 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. С. 264–268.
6. Qureshi A., Pervez S. Allred scoring for ER reporting and its impact in clearly distinguishing ER negative from ER positive breast cancers // *Journal Pakistan Medical Association*. 2010. Vol. 60 (5). P. 350–353.
7. Allred D. C. Assessment of prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemistry // *Connection*. 2005. Vol. 9. P. 4–5.
8. Сыдинов А. А., Заславский Д. В., Зайцев В. С., Насыров Р. А. Иммуногистохимические критерии диагностики мелкобляшечного парapsориаза, крупнобляшечного парapsориаза и грибовидного микоза // *Современные проблемы науки и образования*. 2013. № 6. С. 568–575.
9. Жуков А. С., Белоусова И. Э., Хайрутдинов В. Р. и соавт. Уровень пролиферативной активности лимфоцитов при грибовидном микозе и бляшечном псориазе // *Вестник дерматологии и венерологии*. 2014. № 1. С. 30–36.
10. Сергиенко В. И., Бондарева И. Б. Математическая статистика в клинических исследованиях. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001. 256 с.
11. Арнольд В. И. Математические методы классической механики. 5-е изд., стереот. М.: Едиториал УРСС, 2003. 416 с.

И. А. Куклин¹, кандидат медицинских наук

М. М. Кохан, доктор медицинских наук, профессор

Г. Д. Сафонова, кандидат биологических наук

Н. П. Торопова, доктор медицинских наук, профессор

И. Д. Кузнецов, кандидат медицинских наук

ГБУ СО УрНИИДВиИ, Екатеринбург

¹ Контактная информация: kuklin71@mail.ru

Грибовидный микоз: совершенствование диагностики ранних и поздних стадий с помощью квантифицированной оценки результатов иммуногистохимического исследования биоптата кожи/ И. А. Куклин, М. М. Кохан, Г. Д.

Сафонова, Н. П. Торопова, И. Д. Кузнецов

Для цитирования: *Лечащий врач* № 11/2018; Номера страниц в выпуске: 15-19

Теги: кожа, лимфома, дерматоз, пятна, зуд