

УДК [616.5-002+616.5-006.441]:612.42-078.33

МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЯДЕР ДЕРМАЛЬНЫХ ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ И Т-КЛЕТОЧНОЙ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ЛИМФОМОЙ КОЖИ

¹Кунгуров Н.В., ¹Кохан М.М., ¹Куклин И.А., ¹Сафонова Г.Д., ²Кадушников Р.М.

¹ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт дерматовенерологии и иммунопатологии» Минздрава России, Екатеринбург;

²ООО «СИАМС», Екатеринбург, e-mail: mkokhan@yandex.ru

С использованием метода компьютеризированной морфометрии в гистологических образцах кожи здоровых лиц, пациентов с atopическим дерматитом и больных с Т-клеточной злокачественной лимфомой кожи (грибовидный микоз) на свето-оптическом уровне изучены удельная плотность и планиметрические характеристики ядер дермальных лимфоцитов. Установлены морфометрические параметры ядер дермальных лимфоцитов (площадь ядер, периметр ядер, диаметр Фере, фактор формы) достоверно различающиеся у больных с грибовидным микозом и atopическим дерматитом взрослых. В условиях недостаточной информативности клинической и морфологической симптоматики, когда установление диагноза ГМ на ранних этапах развития и его дифференцирование с проявлениями взрослой фазы atopического дерматита затруднено, установленные морфометрические характеристики могут служить дополнительным объективизированным критерием в дифференциальной диагностике указанных заболеваний.

Ключевые слова: кожа, лимфоциты, морфометрия, atopический дерматит, грибовидный микоз

MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS OF NUCLEUSES OF DERMAL LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH ATOPIC DERMATITIS AND THE T-CELL MALIGNANT LYMPHOMA OF THE SKIN

¹Kungurov N.V., ¹Kokhan M.M., ¹Kuklin I.A., ¹Safonova G.D., ²Kadushnikov R.M.

¹Ural Research Institute of Dermatovenereology and Immunopathology, Ekaterinburg;

²SIAMS Ltd., Ekaterinburg, e-mail: support-siams@siams.com

Applying computerized morphometry of histologic samples of skin of healthy subjects, patients with atopic dermatitis and patients with the T-cellular malignant skin lymphoma (mycosis fungoides) the specific density and planimetric characteristics of nucleuses of dermal lymphocytes are studied. Morphometric parameters of nucleuses (area, perimeter, Fere diameter and form factor) authentically differing at patients with mycosis fungoides and atopic dermatitis of adults. In the conditions of an insufficient specificity of clinical and morphological semiology, when differentiation between early stages of mycosis fungoides and adult phase of atopic dermatitis is difficult, the established morphometric characteristics of dermal lymphocytes can serve as additional objective criterion in differential diagnostics of the specified diseases.

Keywords: skin, lymphocytes, morphometry, atopic dermatitis, mycosis fungoides

Среди иммуно-медицированных заболеваний кожи особое место занимает atopический дерматит (АтД), широко распространенный в мире и встречающийся у 15–20% детей и 2–5% взрослых пациентов [11]. Клинические проявления АтД у взрослых, в особенности у больных старшего возраста, многообразны и отличаются от типичных для детей и подростков; чаще встречаются эритематозно-бляшечные, инфильтрированные, экскориированные высыпания в области головы и шеи, разгибательных поверхностях верхних конечностей, нередко развивается состояние эритродермии, при этом выявляется выраженный белый дермографизм [14]. Ведущим иммуноморфологическим феноменом в коже у больных в хронической стадии АтД является наличие инфильтрата, преимущественно Th2-лимфоцитарного, различной степени выраженности, локализующегося периваскулярно или диффузно в верхних слоях собственно дермы [9].

У пациентов зрелого и пожилого возраста нередко диагностируются также первичные злокачественные лимфомы кожи, чаще Т-клеточного происхождения (Т-ЗЛК), заболеваемость которыми, по данным литературы, варьируется от 0,3 до 1,18 случаев на 100 тыс. населения, и количество таких больных во всем мире продолжает увеличиваться [3, 10]. Т-ЗЛК являются серьезной междисциплинарной проблемой, поскольку эти тяжелые хронические заболевания характеризуются формированием злокачественных лимфопрлиферативных очагов в коже, неуклонной опухолевой прогрессией и неблагоприятным прогнозом, в том числе с летальным исходом. До 80% случаев Т-ЗЛК представлены грибовидным микозом (ГМ). Развитие ГМ также сопровождается накоплением активированных лимфоцитов в дерме и эпидермисе, формированием инфильтрата различной степени выраженности [5].

Установление диагноза ГМ и его дифференцирование на ранних этапах развития с проявлениями взрослой фазы АтД и хронической экземы являются сложной клинико-лабораторной проблемой, вследствие сходства клинических симптомов и нередким отсутствием специфических патоморфологических признаков [6, 4, 13].

При анализе гистологических срезов в светооптическом микроскопе одним из важных диагностических критериев, отличающих доброкачественные хронические дерматозы, в том числе АтД, от ГМ, является описательная характеристика самого лимфоидного инфильтрата в дерме (плотность, расположение); свойства формирующих его лимфоцитов и их ядер: размеры, форма, плотность расположения глыбок хроматина и др. В то же время рутинное гистологическое описание образца кожи подчас носит субъективный характер, зависит от особенностей эксперта, с позиций современной доказательной медицины не всегда убедительно [15, 8].

Для объективизации оценки патоморфологических проявлений заболеваний по гистологическим образцам разработаны системы количественной морфометрии клеток, в том числе компьютеризированной, где квантификация, метрический, численный подход позволяют изучить ткань наиболее глубоко, полностью исключая субъективизм исследователя [1]. В диагностике Т-ЗЛК стандартная свето-оптическая морфометрия также использовалась, и в ранних исследованиях были описаны выявленные особенности ядер лимфоидных клеток – вариабельность их величины, формы, особенности контура ядер, «рисунки» ядерного хроматина, его дислокация [7, 2, 12]. В настоящее время компьютеризированная морфометрия лимфоцитов кожи и периферической крови остается актуальным методом исследования, воспроизводима в условиях патоморфологических подразделений клинико-диагностических лабораторий кожно-венерологических диспансеров и других учреждений, оказывающих медицинскую помощь по профилю «дерматовенерология».

Цель исследования – изучение морфометрических характеристик ядер дермальных лимфоцитов у больных АтД и ГМ, оценка возможностей использования компьютеризированной морфометрии в дифференциальной диагностике заболеваний.

Материал и методы исследования

Проведено рутинное гистологическое исследование (окраска гематоксилин-эозином; аппаратное увеличение 400) и морфометрия ядер лимфоцитов дермального инфильтрата 46 образцов кожи, в том числе 5

от здоровых лиц (проанализировано 595 клеток), 15 от больных АтД (1972 клетки), 26 образцов кожи больных ГМ (2687 клеток). Использован аппаратный видео-компьютерный комплекс, состоящий из свето-оптического микроскопа Leica DM 4000, снабженного системой видеоввода изображений, персонального компьютера, оснащенного компьютерной программой SIAMS-Photolab (Программное решение «Анализатор фрагментов микроструктуры твердых тел», Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ № 2007614623 от 2 ноября 2007 г.; Свидетельство об утверждении типа средства измерений RU.C.31.005.A №36493 от 10.10.2009 г.).

Метрологическое обеспечение процедуры измерений заключалось в калибровке масштаба системы: съемка горизонтально и вертикально расположенного объекта-микрометра и установка действительной величины одного пикселя в микронах, при расхождении в измерении действительного участка линейки размером $100 < 0,5$ мкм.

Автоматизированно определялись:

- удельная плотность ядер лимфоцитов на 1 мкм^2 (УПЯ);
- площадь ядер в мкм^2 (S);
- периметр ядер в мкм (P);
- стандартный фактор формы (Ff) – отношение периметра, эквивалентного по площади круга, к периметру частицы;
- средний диаметр Фере (DF) – усредненный диаметр частицы, не имеющей формы круга.

Результаты исследования и их обсуждение

Установлены параметры указанных показателей для кожи здоровых лиц и у больных АтД, ГМ (табл. 1).

Исследования показали, все изученные параметры у пациентов с АтД достоверно отличаются от таковых в коже здоровых лиц, так же как и у больных ГМ, за исключением среднего показателя площади ядер лимфоцитов, демонстрирующего лишь тенденцию к увеличению в сравнении с нормой.

В то же время выделены векторные направления изменений параметров у здоровых лиц в сравнении с больными АтД, а также у данных больных в сравнении с ГМ. Показано, что различия между АтД и ГМ являются статистически значимыми для всех исследованных планиметрических показателей морфометрии ядер дермальных лимфоцитов (табл. 2).

Таким образом, анализ полученных данных свидетельствует о возможности использования представленного набора планиметрических характеристик ядер дермальных лимфоцитов в качестве дифференцирующего у больных АтД и ГМ, что может служить обоснованием применить данный морфометрический (кариометрический) подход при изучении гистологических образцов кожи на свето-оптическом уровне, в том числе в качестве дополнительного критерия постановки диагноза ГМ. Предпо-

лагаемая последовательность осуществления метода диагностики:

- Проводится эксцизионная биопсия кожи на участке с выраженными клиническими проявлениями дерматоза у пациентов с подозрением на наличие ГМ.

- По стандартной методике изготавливаются парафинированные блоки и стекла, окрашенные гематоксилином и эозином.

- Проводится автоматизированная компьютеризированная морфометрия ядер лимфоцитов (УПЯ, площадь, периметр, DF, Ff) на участке среза на уровне дермы, где обнаруживаются максимальные скопления лимфоцитов: не менее 5 полей зрения, не

менее 100 клеток, производится интегрированная оценка полученных показателей с исчислением $M \pm m$; (ДИ).

- Проводится сравнение полученных результатов морфометрии ядер дермальных лимфоцитов у исследуемого пациента с данными обучающей выборки (табл. 1 и 2).

- Анализируется векторная направленность изменений в морфометрических параметрах исследуемого образца и статистическая оценка различий. На основании полученных данных делается предварительное заключение о вероятности наличия у больного АтД или ГМ.

Таблица 1

Данные морфометрических исследований ядер дермальных лимфоцитов у здоровых лиц, больных с АтД и ГМ ($M \pm m$; ДИ)

Показатель	Здоровые	Больные АтД	Больные ГМ
Удельная плотность ядер (УПЯ)	0,0045 ± 0,0030 (0,0026; 0,0049)	0,0120 ± 0,0050* (0,0090; 0,0070)	0,0141 ± 0,0016 ** , *** (0,0130; 0,0193)
Площадь (S)	13,1900 ± 0,0110 (12,2780; 13,0011)	11,6889 ± 0,0582* (9,8790; 12,3455)	13,6610 ± 0,0802 *** (12,9120; 14,9934)
Периметр (P)	12,8700 ± 0,0900 (11,3210; 12,9780)	13,8330 ± 0,0740* (12,2780; 14,1712)	15,0500 ± 0,0890 ** , *** (14,5178; 17,2189)
Средний диаметр Фере (DF)	4,4120 ± 0,0230 (3,9790; 4,5738)	4,5254 ± 0,0177* (4,0322; 4,6583)	4,5900 ± 0,014 ** , *** (4,4879; 4,9745)
Фактор формы (Ff)	0,8780 ± 0,0050 (0,8600; 0,8837)	0,8699 ± 0,0063* (0,8455; 0,8707)	0,8452 ± 0,0050 ** , *** (0,8311; 0,8423)

Примечания:

* – достоверность различий между показателями у здоровых и больных с АтД ($p < 0,05$);

** – достоверность различий между показателями у здоровых и больных ГМ ($p < 0,05$);

*** – достоверность различий между показателями у больных АтД и ГМ ($p < 0,05$).

Таблица 2

Достоверные различия морфометрических показателей и векторная направленность отклонений в клинических параллелях у здоровых лиц, больных АтД и ГМ

Параллели	УПЯ	S	P	DF	Ff
Здоровые и АтД	+ ↑	+ ↓	+ ↑	+ ↑	+ ↓
АтД и ГМ	+ ↑	+ ↑	+ ↑	+ ↑	+ ↓

Примечания:

↑ ↓ – векторная направленность отклонений при сравнении между группами;

+ – наличие статистически достоверных различий показателей.

Описанные возможности иллюстрирует следующий клинический пример:

Больная КММ, 59 лет поступила в клинику Института для уточнения диагноза. Больна в течение 5 лет, когда появились зудящие пятна на коже верхних конечностей и на коже живота. Высыпания полностью регрессировали после применения топических глюкокортикостероидных (ГКС) гормонов сильного действия (адвантан, акридерм). Однако появлялись свежие высыпания после инсоляции и/или после контакта с предметами бытовой химии.

В течение последних 2-х лет зудящие пятна появились также на коже лица, боковых поверхностей туловища. Лечение топическими ГКС приводило к уменьшению зуда, однако регресса высыпаний не было. В анамнезе: аллергические реакции на цитрусовые, пыльцу растений в форме ринита. Из семейного анамнеза выявлено наличие аллергического дерматита (диагноз устоявлен клинически) у дочери.

Объективный статус: При общем осмотре патологических отклонений по системам и органам не выявлено.

Локальный статус: Процесс носит пространственный характер: в области предплечий на сгибательных и разгибательных поверхностях туловища, а также на коже лба и в зоне пограничной с волосистой частью головы мономорфные слегка элевирующие пятна и тонкие бляшки с неправильными очертаниями размерами до 8,5×12 см застойного розово-красного цвета с четкими границами, мелкопластинчатым шелушением на поверхности. Дермографизм скорый, белый.

Учитывая указания на аллергические реакции у пациентки и аллергического дерматита у дочери больной, характер клинических проявлений и белый дермографизм, дифференциальная диагностика проводилась между диагнозами: атопический дерматит, взрослая фаза и грибовидный микоз на ранней стадии развития.

Данные общеклинического обследования патологических изменений не выявили. Проведенное гистологическое исследование кожи установило интактный эпидермис, наличие умеренно выраженного лимфоцитарного инфильтрата вокруг посткапиллярных венул и собственно в дерме. Признаки эпидермотропизма – минимальные. Эксперт-патоморфолог не установил всех необходимых признаков атопического дерматита, а также не исключил возможности наличия ранних проявлений ГМ.

Гистологические препараты кожи больной были подвергнуты компьютеризированной морфометрии с использованием компьютерной программы SIAMS-Photolab, установленные показатели:

Средняя УПЯ – 0,01534 ± 0,004.
 Средняя площадь ядер (S) – 15,152 ± 0,06.
 Средний периметр ядер (P) – 16,033 ± 0,080.
 Средний диаметр Фере (DF) – 5,215 ± 0,07.
 Средний фактор формы (Ff) – 0,8281 ± 0,006.

При сравнении с обучающей выборкой все показатели у данной пациентки имели векторную направленность и числовые параметры, характерные для ГМ. Таким образом, больной КММ был выставлен предварительный диагноз ГМ Ib стадии, в последующем проведенное иммунофенотипирование образца кожи подтвердило установленный нами диагноз.

Данные компьютеризированной морфометрии ядер дермальных лимфоцитов на свето-оптическом уровне являются дополнительными критериями, свидетельствующими о наличии у больной злокачественной Т-клеточной лимфомы кожи в ранней стадии развития, что позволяет специалисту обоснованно применить высокотехно-

логичные диагностические методы исследований, необходимые для окончательной верификации диагноза.

Выводы

1. С использованием компьютеризированной морфометрии в коже здоровых лиц, а также у больных АтД взрослых и также пациентов с ГМ (Т-ЗЛК) определена удельная площадь ядер лимфоцитов дермы и их планиметрические характеристики.

2. Установлены морфометрические параметры ядер дермальных лимфоцитов (площадь ядер, периметр ядер, диаметр Фере, фактор формы) достоверно различающиеся у больных ГМ и АтД, что может служить дополнительным объективизированным критерием в дифференциальной диагностике указанных заболеваний кожи.

3. Рациональны дальнейшие исследования в данном направлении с целью установления чувствительности и специфичности метода исследования, дифференцирующего АтД и ГМ с использованием морфометрии образца кожи на свето-оптическом уровне.

Список литературы

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
2. Современные подходы к диагностике Т-клеточных злокачественных лимфом кожи / З.З. Кардашова, В.Н. Шабалин, И.А. Василенко, В.Б. Метелин, С.В. Бабакова // Вестник последипломного медицинского образования. – 2007. – №1. – С. 33–34.
3. Злокачественные новообразования кожи: заболеваемость, ошибки диагностики, организация раннего выявления, профилактика / Н.В. Кунгуров, Н.П. Малишевская, М.М. Кохан, В.А. Игликов. – Курган: Зауралье, 2010. – С. 176–192.
4. Лезвинская Е.М., Вавилов А.М. Лимфопролиферативные опухоли кожи: руководство для врачей. – М.: Практическая медицина, 2010 – 366 с.
5. Молочков В.А., Ковригина А.М., Овсянникова Г.В. Т-клеточные лимфомы кожи: современные подходы к клинико-морфологической диагностике согласно классификации WHO/EORTC (2006) Часть I. // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2009. – №2. – С. 4–15.
6. Самцов А.В., Белоусова И.Э. Клинические, гистологические и иммуногистохимические особенности лимфом кожи на современном этапе // Вестник дерматологии и венерологии. – 2006. – №1. – С. 3–6.
7. Овсянникова Г.В., Лезвинская Е.М. Злокачественные лимфомы кожи // Consilium medicum. – 2005. – № 07. – С. 7–14.
8. Arafah M., Zaidi S. N., Kfoury H. K., Rikabi A.A., Ghamdi K. The Histological Spectrum of Early Mycosis Fungoides: A Study of 58 Saudi Arab patients // Oman Medical Journal. – 2012. – Vol. 27. – P. 134–139.
9. Bieber T. Atopic Dermatitis // Ann. Dermatol. – 2010. – Vol. 22 (2). – P. 125–137.
10. Bradford P.T., Devesa S.S., Anderson W.F., Toro J.R. Cutaneous lymphoma incidence patterns in the United States: a population-based study of 3884 cases // Blood. – 2009. – Vol. 113 (21). – P. 5064–5073.

11. ETFAD/EADV eczema task force 2009 position paper on diagnosis and treatment of atopic dermatitis / U. Darsow, A. Wollenberg, D. Simon, A. Tar'eb, T. Werfel, A. Oranje, C. Gelmetti, A. Svensson, M. Deleuran, M. Calza, F. Giusti, J. Ring // *JEADV*. – 2010. – Vol. 24. – P. 317–328.

12. Marchevsky A.V., Gal A.A., Shah S., Koss M.N. Morphometry Confirms the Presence of Considerable Nuclear Size Overlap Between «Small Cells» and «Large Cells» in High-Grade Neoplasms // *Am J Clin Pathol*. – 2001. – Vol. 116. – P. 466–472.

13. Meyer N., Mazereeuw-Hautier J., Launay F., Lamant L., Paul C. Cutaneous T cell lymphoma complicating severe atopic dermatitis. Is making a diagnosis the main challenge? // *Dermatology*. – 2009. – Vol. 218(2). – P. 168–171.

14. Tanei R., Katsuoka K. Clinical analyses of atopic dermatitis in the aged // *J Dermatol*. – 2008. – Vol. 35(9). – P. 562–569.

15. Yeh Y.A., Hudson A.R., Prieto V.G., Shea C.R., Smoller B.R. Reassessment of lymphocytic atypia in the diagnosis of mycosis fungoides // *Mod Pathol*. – 2001. – Vol. 14(4). – P. 285–288.

References

1. Avtandilov G.G. – *Medicinskaya morfometriya*. M.: Medicina, 1990. 384 p.

2. Kardashova Z.Z., Shabalin V.N., Vasilenko I.A., Metelin V.B., Babakova S.V. Sovremennye podkhody k diagnostike T-kletochnykh zlokachestvennykh lymphoma kozhi // *Vestnik postdiplomnogo medicinskogo obrazovaniya*. 2007. no. 1. pp. 33–34.

3. Kungurov N.V., Malishevskaya N.P., Kokhan M.M., Igl'ikov V.A. Zlokachestvennye novoobrazovaniya kozhi: zabol'vaemost, oshibki diagnostiki, organizatsiya rannego vyavleniya, profilaktika. Kurgan: «Zauralie»; 2010. pp. 176–192.

4. Lezvinskaya E.M., Vaviliv A.M. Lymphoproliferativnye opukholi kozhi: Rukovodstvo dlya vrachey. – M.: *Practicheskaya medicina*, 2010 – 366 p.

5. Molochkov V.A., Kovrigina A.M., Ovsyannikova G.V. T-kletochnye lymphomy kozhi: sovremennye podkhody k kliniko-morfologicheskoy diagnostike soglasno klassifikatsii WHO/EORTC (2006) Chast I // *Rossiyskiy zurnal kozhnykh i venericheskikh bolezney*. 2009. no. 2. pp. 4–15.

6. Samtsov A.V., Belousova I.E. Klinicheskie, gistologicheskie i immunogistokhimicheskie osobennosti lymphoma kozhi na sovremenom etape // *Vestnik dermatologii i venerologii*. 2006. no.1. pp. 3–6.

7. Ovsyannikova G.V., Lezvinskaya E.M. Zlokachestvennyye lymphomy kozhi // *Consilium medicum*. 2005. no. 07. pp. 7–14.

8. Arafah M., Zaidi S.N., Kfoury H.K., Rikabi A.A., Ghamdi K. The Histological Spectrum of Early Mycosis Fungoides: A Study of 58 Saudi Arab patients // *Oman Medical Journal*. 2012. Vol. 27. pp. 134–139.

9. Bieber T. Atopic Dermatitis // *Ann. Dermatol*. 2010. Vol. 22 (2). pp. 125–137.

10. Bradford P.T., Devesa S.S., Anderson W.F., Toro J.R. Cutaneous lymphoma incidence patterns in the United States: a population-based study of 3884 cases // *Blood*. 2009. Vol. 113 (21). pp. 5064–5073.

11. Darsow U., Wollenberg A., Simon D., Tar'eb A., Werfel T., Oranje A., Gelmetti C., Svensson A., Deleuran M., Calza M., Giusti F., Ring J. ETFAD/EADV eczema task force 2009 position paper on diagnosis and treatment of atopic dermatitis // *JEADV*. 2010. Vol. 24. pp. 317–328.

12. Marchevsky A.V., Gal A.A., Shah S., Koss M.N. Morphometry Confirms the Presence of Considerable Nuclear Size Overlap Between «Small Cells» and «Large Cells» in High-Grade Neoplasms // *Am J Clin Pathol*. 2001. Vol. 116. pp. 466–472.

13. Meyer N., Mazereeuw-Hautier J., Launay F., Lamant L., Paul C. Cutaneous T cell lymphoma complicating severe atopic dermatitis. Is making a diagnosis the main challenge? // *Dermatology*. 2009. Vol. 218(2). pp. 168–171.

14. Tanei R., Katsuoka K. Clinical analyses of atopic dermatitis in the aged // *J Dermatol*. 2008. Vol. 35(9). pp. 562–569.

15. Yeh Y.A., Hudson A.R., Prieto V.G., Shea C.R., Smoller B.R. Reassessment of lymphocytic atypia in the diagnosis of mycosis fungoides // *Mod Pathol*. 2001. Vol. 14(4). pp. 285–288.

Рецензенты:

Зиганшин О.Р., д.м.н., заведующий кафедрой дерматовенерологии ГБОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, г. Челябинск;

Базарный В.В., д.м.н., профессор кафедры клинической лабораторной диагностики и микробиологии ГБОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, г. Екатеринбург.

Работа поступила в редакцию 24.08.2012.