

## ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ДИАГНОСТИКИ МЕЛКОБЛЯШЕЧНОГО ПАРАПСОРИАЗА, КРУПНОБЛЯШЕЧНОГО ПАРАПСОРИАЗА И ГРИБОВИДНОГО МИКОЗА

Сыди́ков А.А.<sup>1</sup>, Заславский Д.В.<sup>1</sup>, Зайцев В.С.<sup>1</sup>, Насыров Р.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет», Санкт-Петербург, Россия (194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2), e-mail; [Dr.Sidikov@yahoo.com](mailto:Dr.Sidikov@yahoo.com)

В работе представлены результаты сравнительного анализа данных клинического, гистологического и иммуногистохимического исследований биоптатов больных мелкобляшечным параспориозом, крупнобляшечным параспориозом и грибковидным микозом. Впервые установлено, что увеличение уровня экспрессии антигена лимфоцитов, ассоциированных с кожей Неса-452 (что по данным отдельных авторов считается признаком ранней стадии грибковидного микоза) имеет место также при мелкобляшечном параспориозе и крупнобляшечном параспориозе. Проведен сравнительный анализ экспрессии маркера макрофагов CD68, Т-лимфоцитов CD3, цитотоксических Т-лимфоцитов CD8, антигена незрелых дендритных клеток CD209/DC-Sign, при параспориозе и грибковидном микозе. Впервые обнаружена экспрессия антигена ВЭБ у больных мелкобляшечным параспориозом и крупнобляшечным параспориозом.

Ключевые слова: крупнобляшечный параспориоз, мелкобляшечный параспориоз, грибковидный микоз, иммуногистохимия, CD209/DC-SIGN, HECA-452, CD3, CD8, CD68.

## IMMUNOHISTOCHEMICAL CRITERIA OF DIAGNOSTICS OF SMALL PLAQUE PARAPSORIASIS, LARGE PLAQUE PARAPSORIASIS AND MYCOSIS FUNGOIDES

Sidikov A.A.<sup>1</sup>, Zaslavsky D.V.<sup>1</sup>, Zaitcev V.S.<sup>1</sup>, Nasyrov R.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Saint-Petersburg State Peadiatric Medical University, Saint-Petersburg, Russia (194100, Saint-Petersburg, street Litovskaya, 2), e-mail: [Dr.Sidikov@yahoo.com](mailto:Dr.Sidikov@yahoo.com)

In work revealed results of the comparative analysis of data of clinical, histologic and immunohistochemical researches patients with small plaque parapsoriasis, large plaque parapsoriasis and mycosis fungoides. For the first time it is established that the increase in level of an expression of an antigene of the cutaneous lymphocytes associated antigen of Heca-452 (that according to certain authors is considered a sign of an early stage of mycosis fungoides) takes place also at small plaque parapsoriasis and large plaque parapsoriasis. The comparative analysis of an expression of markers macrophages CD68, T-lymphocytes CD3, cytotoxic T-lymphocytes CD8, an antigene of immature dendritic cells CD209/DC-Sign is carried out and at parapsoriasis and mycosis fungoides. For the first time the expression of an antigene of EBV is found in patients with small plaque parapsoriasis and large plaque parapsoriasis.

Keywords: small plaque parapsoriasis, large plaque parapsoriasis, mycosis fungoides, immunohistochemistry, CD209/DC-SIGN, HECA-452, CD3, CD8, CD68.

### Введение

В последние годы в мировой дерматологии значительно вырос интерес к первично возникающим в коже Т-клеточным лимфомам, в частности грибковидного микоза (ГМ), в связи их резким учащением (Cerroni L., 2009) [1]. Среди дерматозов, которые наиболее часто имитируют ГМ, является параспориозы. В настоящее время в зарубежной литературе выделяют два типа параспориозов: крупнобляшечный (КБП) и мелкобляшечный (МБП). Эти заболевания рядом авторов считают предлимфоматозными кожными состояниями, из-за их биологического поведения (в ряде случаев перехода в ГМ) (Vakeva L. et al., 2005) [5]. Трудности дифференциального диагноза КБП и МБП с ГМ в начальной стадии их развития общеизвестна и продолжает существовать до сих пор. В современных условиях в

дифференциации этих заболеваний, используются молекулярная иммунология, иммунофенотипирование и генотипирование.

Используемые при иммунофенотипировании биоптатов кожи как значимый маркер в диагностике ГМ увеличение соотношения CD4/CD8 не является показательным, так как возрастает лишь в бляшечной стадии и не изменяется в премикотической стадии (Gambichler T. et al., (2008) [4]. В этих случаях в диагностике ГМ авторы Di Trollo et al., (2006) [3] предлагают использовать Неса-452 (CLA – антиген лимфоцитов, ассоциированных с кожей), который выявляется лишь при ГМ и не обнаруживается при КБП.

В последнее время особое внимание уделяется роли дендритных клеток у больных с Т-клеточной лимфомой кожи и парапсориазом. Особенно большой интерес вызвала работа Christoph Sch. et al., (2010)[5] посвященная определению незрелых дендритных клеток (CD209/DC-SIGN) у больных с ГМ. По их данным, обнаружено значительное число этих клеток среди опухолевого инфильтрата, имеющих тесный контакт с опухолевыми клетками; они считают, что подобный контакт приводит к защитной иммунной реакции по отношению к клеткам опухоли; авторы указывают на важность обнаружения этих маркеров в случаях развития ГМ.

Таким образом, сложность диагностики ГМ на ранних стадиях болезни, а также дифференциальной диагностики ГМ и парапсориаза диктует необходимость дальнейшего изучения клинико-морфологических проявлений указанных заболеваний с использованием современных методов, наиболее перспективным из которых является иммуногистохимическое исследование.

### **Материалы и методы исследования**

В настоящей работе было изучено 50 наблюдений, больных МБП, КБП и различными формами ГМ, проходивших обследование и лечение на базе городского и областного кожно-венерологических диспансеров Санкт-Петербурга и в отделении дерматологии НИИ Микологии им. П.Н. Кашкина в период с 2003 по 2011 гг. Критериями отбора случаев явились наличие типичных для этих заболеваний клинических проявлений, а также анамнестические и катamnестические данные. У части больных была проведена верификация диагноза с помощью гистологического и гистохимического исследований пораженных участков кожи. Учитывались продолжительность основного заболевания и последовательность появления клинических проявлений, проводились их всесторонняя оценка и дифференциальная диагностика с дерматозами со сходной симптоматикой. Анализировались также характер, объем, длительность и эффективность терапии. Часть больных наблюдалась в динамике при повторной госпитализации.

При оценке клинической картины определялись степень поражения кожных покровов, преимущественная локализация и характер первичных морфологических изменений, а также размер, величина и окраска очагов поражения кожи. Учитывался характер элементов, возникающих на ранее неизменной коже или на месте уже существующих высыпаний и время их появления.

Для обследования пациентов с МБП, КБП и ГМ был разработан алгоритм, включающий клинические характеристики, результаты общеклинических и биохимических анализов крови, а также данные гистологического и иммуногистохимического исследований.

Лабораторные исследования включали клинический и биохимический анализы крови, а при ГМ проводились тест на толерантность к глюкозе и определение уровня лактатдегидрогеназы. У части больных проводилась также ФЛГ грудной клетки и УЗИ брюшной полости для исключения вовлечения внутренних органов. Пациенты, включенные в исследование, не получали системных и топических глюкокортикостероидов в течение 2-х месяцев до взятия биопсии кожи.

Гистологическое и иммуногистохимическое исследование проводилось на кафедре патологической анатомии с курсом судебной медицины Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета. Во всех наблюдениях биопсийный материал подвергался стандартной проводке с последующей парафиновой заливкой.

В 26 наблюдениях было проведено иммуногистохимическое исследование (ИГХ) биоптатов, взятых из пораженных участков кожи в период прогрессирования заболевания. В 1-й группе биопсии были взяты у 15 человек, во 2-й – у 5 и в 3-й – у 6 больных. Материал забирался из длительно существующих очагов при согласии больного на исследование.

Иммуногистохимическое исследование проводилось на парафиновых срезах по схемам, рекомендуемым фирмами производителями. В работе использовали поликлональные антитела к антигенам вирусов простого герпеса (ВПГ) I и II типов (Dako, США); к антигену NCL-PVp вируса папилломы человека (Novocastro, UK); к антигену Т-лимфоцитов CD3 (Dako, США); антигену цитотоксических Т-лимфоцитов CD8 (Dako, США); антигену лимфоцитов, ассоциированных с кожей Неса-452 (Biolegend, США), моноклональные антитела к маркерам макрофагов и незрелых дендритных клеток: CD68 (Dako, США) и CD209/DC-SIGN (R&D systems, США) соответственно, а также к антигену вируса Эпштейна-Барр (Novocastro, UK).

Оценка результатов ИГХ исследования проводилась полуколичественным методом с подсчетом числа клеток. Экспрессия исследуемого маркера расценивалась как слабая <<+>> при наличии окрашенных гранул в 1-50-ти клетках, умеренная <<++>> – в 51-100 клетках и

резко выраженная <<+++>> – в 101 и более клетках, в четырех полях зрения при увеличении  $\times 400$ . Оценка степени экспрессии антигенов вирусов проводилась также полуколичественным методом и оценивалась как слабая (+) при выявлении антигенов в 1-10 клетках, умеренная (++) – 11-20 клетках и резко положительная (+++) – при выявлении 21 и более окрашенных клеток по всей площади срезов при увеличении  $\times 400$ . Результаты ИГХ приведены в таблицах 1 и 2, где в числителе число больных с положительной экспрессией; в знаменателе – отрицательной экспрессией.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

Распределение больных по группам. Первую группу составили 25 человек с МБП, вторую группу – 9 больных КБП и третью группу – 16 пациентов с различными формами ГМ (8 человек с пойкилодермической формой, 4 пациента с фолликулотропным вариантом и 4 больных в бляшечной стадии ГМ). Распределение больных ГМ, КБП и МБП по возрасту и длительности заболевания представлено в таблицах 1 и 2.

### Клинико-морфологическая характеристика исследуемых наблюдений.

Средний возраст больных на момент осмотра составил для пациентов с МБП 46,40 лет, для больных КБП – 55,00 и для пациентов с ГМ – 60,63 лет соответственно (табл. 1). При этом минимальный возраст больных МБП на момент осмотра составил 25 лет, а максимальный – 71 год. Минимальный возраст больных КБП составил 47 лет, максимальный – 63 года, в то время как у пациентов с ГМ минимальный возраст был 43 года, а максимальный – 85 лет. Средняя продолжительность заболевания составляла в первой группе 42 месяца, во второй группе – 26 и в третьей группе – 47 месяцев соответственно (табл. 1). Соотношение женщин и мужчин в 1 группе было 0:4, во второй группе – 2:3 и в 3-й группе – 1:1.

Анализ клинических и морфологических проявлений МБП и КБП показал их сходство. Оба заболевания клинически проявлялись появлением разных по величине пятен, гистологически характеризовавшихся хроническим воспалением во всех зонах кожи: эпидермисе, дермо-эпидермальном соединении и в дерме.

В первой группе больных МБП процесс на коже был чаще распространенным. Высыпания преимущественно располагались в области боковой поверхности туловища, передней поверхности бедер и внутренней поверхности плеч. Пятна, как правило, имели розовато-желтоватый или желтовато-коричневый цвет. Размер пятен составлял менее 5-6 см в диаметре.

У больных третьей группы различными формами грибовидного микоза наиболее типичным клиническим проявлением являлось появление пятен с так называемой, твердой текстурой и бляшек, разрешающихся с одной стороны и прогрессирующих с другой и образующих

причудливые фигуры или гирлянды, а также папул с остроконечными шипиками (симптом «терки»).

В клинических и биохимических анализах крови у всех больных выраженных отклонений от нормы выявлено не было. Результаты гистологических исследований в третьей группы больных, соответствовали ранее изложенным в литературе описаниям морфологической картины при различных форм ГМ (Разнатовский И.М., 1982; Cerroni L., 2009).

При иммуногистохимическом исследования биоптатов кожи экспрессия антигенов вирусов выявлялась в виде зерен и глыбок на поверхности клеточной мембраны, а также в цитоплазме, реже – в ядре клеток. У пациентов с различными формами ГМ в пораженной коже определялась экспрессия вируса папилломы человека и вируса Эпштейн-Барр, а у пациентов с мелкобляшечным и крупнобляшечным параспориозом выявлен лишь антиген ВЭБ. У больных ГМ положительная реакция на антиген ВЭБ отмечалась как в клетках базального слоя эпидермиса, так и в цитоплазме лимфоцитов, располагавшихся в дерме, а также в клетках эндотелия сосудов сосочкового слоя дермы. У больных первой и второй группы реакция на антиген вируса Эпштейна-Барр была положительной лишь в клетках базального слоя эпидермиса. Заметная экспрессия, вирусных антигенов может рассматриваться как важный этиопатогенетический фактор в данной группе больных. У больных пойкилодермической формой ГМ в инфильтратах отмечалась также экспрессия антигенов вирусов папилломы человека. Реакция на антигены ВПГ 1 и 2 типов у подавляющего числа пациентов во всех трех группах была отрицательной.

Таблица 1

Данные иммуногистохимического исследования кожи у больных крупнобляшечным и мелкобляшечным параспориозом, грибковидным микозом. Экспрессия антигенов в эпидермисе.

Группы	МБП (15)		КБП (5)		ГМ (6)	
	Количество во больных	Выраженность экспрессии	Количество больных	Выраженность экспрессии	Количество о больных	Выраженность экспрессии
ВПГ 1 и 2 типов	3/12	2 (+): 13% 1 (+++) 6,5%	1/4	1 (+): 20%	-/6	-
ВЭБ	15/-	15(+++): 100%	5/-	5 (+++): 100%	6/-	6 (+++): 100%
ВПЧ	-/15	-	-/5	-	2/4	2 (++): 33%
CD 209 DC-Sign	2/13	2 (+): 13%	1/4	1 (+): 20%	1/5	1 (+): 17%
CD68	15/-	15 (+): 100%	5/-	5 (+): 100%	6/-	6 (++): 100%

CD3	15/-	15 (++): 100%	5/-	5 (++): 100%	6/-	6 (+++): 100%
CD8	15/-	15(+++): 100%	5/-	5 (+++): 100%	6/-	6 (+): 100%
Неса-452	15/-	13 (++): 87% 2 (+++): 13%	5/-	4 (++): 80% 1 (+++): 20%	6/-	1 (+): 17% 1 (++): 17% 4 (+++): 66%

Числитель – наличие экспрессии, знаменатель – отсутствие экспрессии

Экспрессия CD3 (маркера зрелых Т-лимфоцитов) во всех группах в дерме была резко выраженной, а в эпидермисе – умеренно выраженной. У больных КБП и МБП во всех слоях кожи определялась значительно выраженная экспрессия CD8 (маркера цитотоксических Т-лимфоцитов). В то же время при ГМ указанные клетки встречались в эпидермисе и в дерме лишь в небольшом количестве. Соотношение CD3/CD8 при КБП и МБП не является показательным для ранней диагностики ГМ, так как они экспрессивались одинаково во всех группах наблюдений.

Рекомендуемое выявление рядом авторов (Di Trollo et al.) антигена лимфоцитов, ассоциированных с кожей (Неса-452) как важного маркера для выявления ГМ в ранней стадии, по нашим данным, не является обязательным при ГМ, он также выявлялся при КБП и МБП.

Таблица 2

Данные иммуногистохимического исследования кожи у больных крупнобляшечным и мелкобляшечным параспориозом, грибовидным микозом. Экспрессия антигенов в дерме.

Группы	МБП (15)		КБП (5)		ГМ (6)	
	Количество больных	Выраженность экспрессии и %	Количество больных	Выраженность экспрессии и %	Количество больных	Выраженность экспрессии и %
ВПГ 1 и 2 типов	-/15	-	--/5	-	/6	-
ВЭБ	-/15	-	-/5	-	6/-	6 (+++): 100%
ВПЧ	-/15	-	-/5	-	2/4	2 (+++): 33%
CD 209 DC-Sign	14/1	14 (+): 93%	4/1	4 (++): 80%	6/-	1 (+): 17% 2 (++): 33% 3 (+++): 50%
CD68	15/-	15 (+++): 100%	5/-	5 (+++): 100%	6/-	6 (+++): 100%
CD3	15/-	15 (+++): 100%	5/-	5 (+++): 100%	6/-	6 (+++): 100%
CD8	15/-	15 (+++): 100%	5/-	5 (+++): 100%	6/-	6 (+): 100%
Неса-452	15/-	3(+): 20% 12(+++): 80%	5/-	5 (+++): 100%	6/-	6 (+++): 100%

Числитель – наличие экспрессии, знаменатель – отсутствие экспрессии

Во всех наблюдениях в дерме выявлялась резко выраженная экспрессия маркера макрофагов CD68. При грибовидном микозе умеренное количество макрофагов определялось также в базальном слое эпидермиса, что может иметь диагностическое значение.

Количество незрелых дендритных клеток (оценивавшееся по степени экспрессии CD209/DC-SIGN) было наибольшим при пойкилодермической форме и в стадии бляшек классической формы грибовидного микоза Алибера Базена. Число незрелых дендритных клеток при крупнобляшечном парапсориазе было умеренным, а при мелкобляшечном парапсориазе и фолликулотропном варианте грибовидного микоза – небольшим.

По данным Christoph Sch. et al., незрелые дендритные клетки обнаруживаются при ГМ и синдроме Сезари; в наших наблюдениях экспрессия CD209/DC-Sign выявлялась при МБП (слабая реакция), КБП (умеренная), а при различных формах ГМ отмечалась резкоположительная экспрессия.

Таким образом, выявление CD209 DC-Sign может рассматриваться как диагностический маркер ГМ; выраженная экспрессия этого маркера при КБП и МБП вероятно свидетельствует о возможном развитии ГМ в этих случаях.

### Список литературы

1. Cerroni L., K.Gatter and Kerl.H. Skin Lymphoma: The Illustrated Guide - 3th ed. Published Blackwell Publishing ISBN. 2009- 28.
2. Christoph Sch., Ochsenbein A., Kaelin U., Akmal S. Hassan.et al. High numbers of CD-209 DC-Sign+ dendritic cells in lesional skin of cutaneous T-cell lymphoma // J. Am. Acad. Dermatol. 2010.- Vol.62, P. 995-1004.
3. DI Trollo R., DL Lorenzo G., Barbiero E., Lacono A., Franco R., Armiento D.M., et al. Expression of HECA-452 in parapsoriasis and mycosis fungoides // Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 2006. – Vol.19, P. 105-10.
4. Gambichler T., Bischoff S., Bechara F.G., Altmayer P., Kreuter A. Expression of proliferation markers and cell cycle regulators in T-cell lymphoproliferative skin disorders // J. Dermatol. Sci. 2008.- Vol.49, P.125-32.
5. Vakeva L., Sarna S., Vaalasti A., Pukkala E. et.al. A retrospective study of the probability of the evolution of parapsoriasis en plaques into mycosis fungoides // Acta. Derm. Venereol. 2005. – Vol.105, P. 318-23.

**Рецензенты:**

Родионов А.Н., д.м.н., профессор, главный консультант Санкт-Петербургского государственного бюджетного учреждения здравоохранения “Городской кожно-венерологический диспансер”, г.Санкт-Петербург.

Горланов И.А., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой дерматовенерологии Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета, г.Санкт-Петербург.